

## 2002～2017年に鹿児島県内で検出された 豚サーコウイルス2型遺伝子の系統樹解析

平島宜昌<sup>1)†</sup> 坂口善二郎<sup>1)</sup> 北原尚英<sup>1)</sup> 西中川 淳<sup>2),3)</sup> 岩尾 俊<sup>1)</sup>  
藤岡 舞<sup>1),4)</sup> 藏前 保<sup>2)</sup> 高木道浩<sup>5)</sup>

- 1) 鹿児島中央家畜保健衛生所 (〒 899-2201 日置市東市来町湯田 1678)
- 2) 曾於家畜保健衛生所 (〒 899-7601 志布志市松山町新橋 21-17)
- 3) 鹿児島中央家畜保健衛生所徳之島支所与論町駐在機関 (〒 891-9301 大島郡与論町茶花 1420-2)
- 4) 南薩家畜保健衛生所 (〒 897-0302 南九州市知覧町郡 4210-18)
- 5) 国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒 305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2018年3月19日受付・2019年1月17日受理)

### 要 約

鹿児島県で2002～2017年に実施された豚症例の病性鑑定のうち、豚サーコウイルス関連疾病(PCVAD)と診断された16事例を含む22例の豚の材料を用いて、豚サーコウイルス2型(PCV2)の系統樹解析を行い、遺伝子型を調べた。その結果、遺伝子型aは2002～2009年の4検体、遺伝子型bは2008～2017年の13検体、遺伝子型dは2014～2017年の5検体からみつき、鹿児島県では2008年から遺伝子型b、2014年から遺伝子型dがそれぞれ出現したことが明らかとなった。——キーワード：遺伝子型、豚サーコウイルス2型、系統樹解析。

-----日獣会誌 72, 339～343 (2019)

豚サーコウイルス2型(Porcine circovirus type 2: PCV2)は、サーコウイルス科(*Circoviridae*)サーコウイルス属(*Circovirus*)に属し、エンベロープのない直径約17nmの小型ウイルスで、約1.8kbの1本鎖環状DNAをゲノムとして有する[1, 2]。PCV2のゲノムには2つの主要なオープンリーディングフレーム(ORF)が存在しており、ORF1はDNA複製に関連する蛋白質を、ORF2はカプシド蛋白質を、それぞれコードする[3]。

PCV2は、日本を含む世界中に広く分布しており[4, 5]、その感染による疾病は、豚サーコウイルス関連疾病(PCVAD)と総称される。PCVADは、1991年にカナダで発生した離乳豚の発育不良、呼吸困難及び死亡率上昇等を主徴とする離乳後多臓器性発育不良症候群(PMWS)として初めて報告され[6]、ほかに豚皮膚炎腎症症候群(PDNS)、呼吸器病、腸炎及び繁殖障害等

のさまざまな病態が知られている[7]。また、国内では、1998年に発生したPMWSにPCV2感染が大きく関わっていることが確認され、PCVADがすでに国内に存在していることが明らかにされた[5, 8]。

PCV2はORF2の塩基配列に基づく系統樹解析により遺伝子型が分類され、現在までに5つの遺伝子型(PCV2a, PCV2b, PCV2c, PCV2d及びPCV2e)の存在が報告されている[9, 10]。このうちPCV2dは、2つのサブグループ(PCV2d-1及びPCV2d-2)に細分される[9]。

PCV2の優勢な遺伝子型は、年代とともに変化していることが報告されており、かつてはPCV2aの流行が主体であったため、同遺伝子型をベースとしたワクチンが製造及び使用されてきたが、2003年以降、北米等において、PCV2bに優勢株が置き換わった[11]。さらに、2014年以降、PCV2d-2が米国内で優勢な遺伝子型とな

† 連絡責任者：平島宜昌(鹿児島中央家畜保健衛生所)

〒 899-2201 日置市東市来町湯田 1678

☎ 099-274-7555 FAX 099-274-7556

E-mail : hirashima-yoshimasa@pref.kagoshima.lg.jp

鹿児島県内の PCV2 遺伝子の系統樹解析

表1 解析に供した病性鑑定事例の発生前、ワクチン接種歴、臨床症状及び病性鑑定時の診断名

病性鑑定事例		PCV2 ワクチン接種 <sup>a)</sup>		おもな臨床症状	病性鑑定時の診断名	
事例番号	発生前	母豚	子豚		PCVAD <sup>b)</sup>	PCVAD 以外 (混合感染含む)
KS14-298H	2002	-	-	肥育豚の死亡数増加, 呼吸器症状	●	PRRS, 細菌性肺炎
KS17-482S	2005	-	-	肥育豚の発育不良, 虚弱	●	
KS17-956K	2006	-	-	肥育豚の皮膚炎	●	
KS19-863K	2008	-	-	離乳豚の虚弱	●	
KS20-629N	2008	-	-	離乳豚の死亡数増加, 発育不良, 虚弱	●	
KS21-84K	2009	-	-	離乳豚の死亡数増加, 虚弱	●	
KS21-281H	2009	-	-	離乳豚の下痢, 死亡数増加	●	
KS21-330KM	2009	-	-	肥育豚の呼吸器症状, 死亡数増加	●	
KS23-421A	2011	-	-	肥育豚の呼吸器症状	●	
KS24-698N	2013	不明	+	肥育豚の下痢, 発育不良, 死亡数増加	●	
KS25-725A	2014	不明	不明	離乳豚の死亡数増加	●	
KS26-381S	2014	-	-	肥育豚の下痢, 呼吸器症状, 虚弱		PRRS
KS26-528N	2014	-	+	肥育豚の神経症状, 呼吸器症状, 死亡数増加	●	豚レンサ球菌症
KS26-880K	2015	-	-	肥育豚の死亡数増加, 呼吸器症状		豚パストツレラ肺炎
KS27-226S	2015	-	+	哺乳豚の死亡数増加	●	豚大腸菌症
KS27-363K	2015	-	+	肥育豚の皮膚炎	●	
KS27-511OS	2015	不明	-	肥育豚の呼吸器症状	●	豚胸膜肺炎, 豚パストツレラ肺炎
KS28-62T	2016	-	-	肥育豚の死亡数増加, 発育不良, 虚弱	●	
KS28-507A	2017	+	-	肥育豚の神経症状		<i>Trueperella (Arcanobacterium) pyogenes</i> 感染症
KS29-86A	2017	-	-	肥育豚の死亡数増加, 下痢, 呼吸器症状		豚パストツレラ肺炎
KS29-97H	2017	-	-	離乳豚の下痢		豚大腸菌症
KS29-117KM	2017	-	+	肥育豚の呼吸器症状		豚パストツレラ肺炎

a) + : あり, - : なし    b) ● : PCVAD と判断

り [12], 南米, ヨーロッパ, アジア等でも同様の傾向がみられている [9]. なお, PCV2 遺伝子型と病原性との関連は不明な点が多い [13-16]. 日本においては, 1998 年以降は PCV2a が, 2006 年以降は PCV2b が検出されていたが [7, 17], 小池ら [18] は, 2015 年に千葉県及び青森県の健常豚から採取した血清から PCV2d を検出しており, 国内における PCV2d の存在が示された. しかしながら, 鹿児島県内における PCV2d を含む遺伝子型の動向は不明である.

そこで, 鹿児島県内で 2002~2017 年に実施した豚症例の病性鑑定事例のうち, PCVAD と診断された事例を含む 22 事例について, それらの保存材料を用いた PCV2 遺伝子の検出を行い, 検出された遺伝子について遺伝子型別を実施した.

材料及び方法

**DNA 抽出及び PCR :** 2002~2017 年に実施した豚症例の病性鑑定事例のうち, PCVAD と診断された事例を含む 22 事例について (表 1), 発症豚の臓器または血清検体から, 市販キット (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, Roche, Germany) を用いて DNA を抽出した. これらの抽出 DNA を鋳型とし, PCV2 の国内株 3 株 (A802 株, Aomori 株及び F203 株) の塩基配列に基づいて設

計した ORF2 のアミノ酸コード領域を増幅するプライマーセットを用いて (図 1, 表 2), 市販 PCR 試薬 (ExTaq HS version, タカラバイオ (株), 滋賀) により Nested PCR を実施した. なお, PCR 条件は, 95°C・5 分間の熱変性後, 95°C・30 秒, 55°C・30 秒, 72°C・30 秒を 35 回繰り返す, 最終伸長反応を 72°C・7 分間実施した.

**塩基配列決定及び系統樹解析 :** 得られた PCV2 ORF2 の PCR 増幅産物を市販キット (QIAquick Gel Extraction Kit または QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN, Germany) で精製後, シーケンサー (3130xl Genetic Analyzer, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) において市販シーケンス試薬 (Big Dye Terminator V3.1, Thermo Fisher Scientific, U.S.A.) を用いたダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定した. 続いて, GenBank に登録されている PCV2 ORF2 の塩基配列で, 既報 [12, 13, 17, 18] において遺伝子型が分類されている株と, 今回決定した PCV2 遺伝子の塩基配列を用いて, Xiao ら [9] の方法に基づき近隣結合法による系統樹解析を実施し, MEGA6 [19] で作成した系統樹に基づいて PCV2 遺伝子型を分類した.

成績及び考察

系統樹解析により, 2002~2017 年に実施した豚の病

表2 PCV2のORF2のアミノ酸コード領域を増幅するプライマーセット

	プライマー名	配列 (5'-3')	位置 <sup>a)</sup>	Tm値 <sup>b)</sup>	サイズ (bp)
1st PCR	ORF2up FW	CAGAACAATCCACGGAGGAAG	913~933	65.7	907
	ORF1up RV	ATGTTGCTGCTGAGGTGCTGCC	31~52	72.8	
2nd PCR	ORF2out FW	CACTTCGTAATGGTTTTTATTATTC	1,007~1,031	58.5	753
	ORF2out RV	CAGCGCACTTCTTTCGTTTTC	1,739~1,759	65.9	

a) PCV2国内株3株 (A802株, Aomori株, F203株) に基づく

b) Nearest Neighbor 法により算出

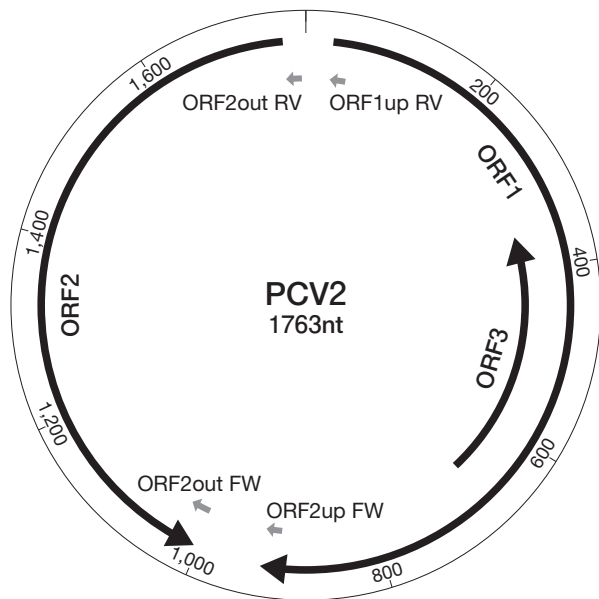


図1 PCV2のゲノム構造

Zhaiら [2] の原図を一部改変した。灰色の矢印は本研究で使用したプライマーを示す。

性鑑定材料22検体から検出されたPCV2遺伝子は、3つの遺伝子型(PCV2a, PCV2b及びPCV2d)に分類された(図2)。すなわち、4検体(2002~2009年検出)がPCV2a、13検体(2008~2017年検出)がPCV2b、5検体(2014~2017年検出)がPCV2dであった。

PCV2aは2009年を最後に検出されておらず、以降は2008年から検出され始めたPCV2bが優勢となった。Takahagiら [20] は、国内で2007年頃よりPCV2bの検出が増加したことを報告しており、本県においても同様の傾向が確認された。

また、PCV2dは2014年以降検出され始めた。小池ら [18] は、2015年に国内で検出されたPCV2dが、2008年に宮崎県内で検出されたPCV2d-1 (798-1株)と異なるサブグループに属し、2012年に北米で分離されたPCV2d-2 (22625-33株) [13] に近縁であったと述べており、本県で検出されたPCV2dも同様であった。

本調査では、鹿児島県内におけるPCV2遺伝子型が、国内外の傾向と同様、年代とともに変化していることを

明らかにした。流行株の遺伝子型の変化は、抗原性や病原性の変化を招く恐れがあることから、今後もその動向を検証していく必要がある。

稿を終えるに当たり、プライマー作製にご助言いただいた(国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門の鈴木孝子氏、PCV2遺伝子型の調査にご助言いただいた新潟県中央家畜保健衛生所の羽入さち子氏に深謝する。

引用文献

[1] 恒光 裕：豚サーコウイルス関連感染症, 動物の感染症, 明石博臣ら編, 第3版, 192-193, 近代出版, 東京 (2011)

[2] Zhai SL, Chen SN, Xu ZH, Tang MH, Wang FG, Li XJ, Sun BB, Deng SF, Hu J, Lv DH, Wen XH, Yuan J, Luo ML, Wei WK : Porcine circovirus type 2 in China: an update on and insights to its prevalence and control, *Virology*, 11, 88 (2014)

[3] Nawagitgul P, Morozov I, Bolin SR, Harms PA, Sorden SD, Paul PS : Open reading frame 2 of porcine circovirus type 2 encodes a major capsid protein, *J Gen Virol*, 81, 2281-2287 (2000)

[4] Opriessnig T, Meng XJ, Halbur PG : Porcine circovirus type 2 associated disease: update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies, *J Vet Diagn Invest*, 19, 591-615 (2007)

[5] Kawashima K, Katsuda K, Tsunemitsu H : Epidemiological investigation of the prevalence and features of postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan, *J Vet Diagn Invest*, 19, 60-68 (2007)

[6] Ellis J, Hassard L, Clark E, Harding J, Allan G, Willson P, Strokappe J, Martin K, McNeilly F, Meehan B, Todd D, Haines D : Isolation of circovirus from lesions of pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome, *Can Vet J*, 39, 44-51 (1998)

[7] Segalés J : Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: clinical signs, pathology and laboratory diagnosis, *Virus Res*, 164, 10-19 (2012)

[8] Onuki A, Abe K, Togashi K, Kawashima K, Taneichi A, Tsunemitsu H : Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan, *J Vet Med Sci*, 61, 1119-1123 (1999)

[9] Xiao CT, Halbur PG, Opriessnig T : Global molecular genetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) sequences confirms the presence of four main PCV2

鹿児島県内の PCV2 遺伝子の系統樹解析

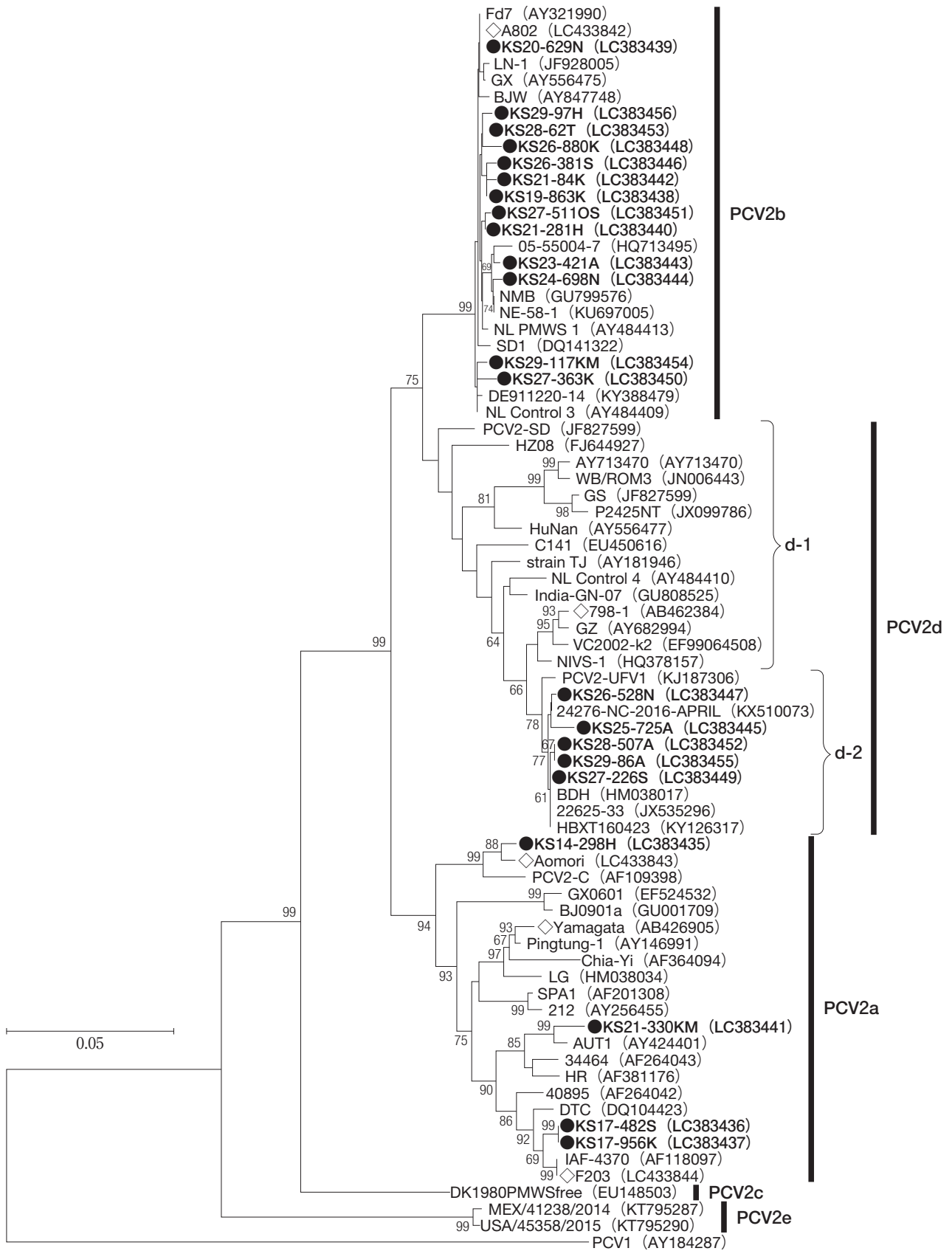


図2 PCV2 の ORF2 のアミノ酸コード領域の塩基配列 (約 700bp) に基づく系統樹

●は本研究で使用した株 (太字で表示), ◇は国内株を示し, 括弧内はアクセッション番号を示す.

図中の数値はブートストラップ値を示す (1,000 回演算, 百分率). 系統樹上にはブートストラップ値 60 以上を表示した.



- genotypes and reveals a rapid increase of PCV2d, *J Gen Virol*, 96, 1830-1841 (2015)
- [10] Harmon KM, Gauger PC, Zhang J, Piñeyro PE, Dunn DD, Chriswell AJ : Whole-genome sequences of novel porcine circovirus type 2 viruses detected in swine from Mexico and the United States, *Genome Announcement*, 3, e01315-15 (2015)
- [11] Beach NM, Meng XJ : Efficacy and future prospects of commercially available and experimental vaccines against porcine circovirus type 2 (PCV2), *Virus Res*, 164, 33-42 (2012)
- [12] Xiao CT, Harmon KM, Halbur PG, Opriessnig T : PCV2d-2 is the predominant type of PCV2 DNA in pig samples collected in the U.S. during 2014-2016, *Vet Microbiol*, 197, 72-77 (2016)
- [13] Opriessnig T, Xiao CT, Gerber PF, Halbur PG : Emergence of a novel mutant PCV2b variant associated with clinical PCVAD in two vaccinated pig farms in the U.S. concurrently infected with PPV2, *Vet Microbiol*, 163, 177-183 (2013)
- [14] Ramos N, Mirazo S, Castro G, Arbiza J : First identification of Porcine Circovirus Type 2b mutant in pigs from Uruguay, *Infect Genet Evol*, 33, 320-323 (2015)
- [15] Seo HW, Park C, Kang I, Choi K, Jeong J, Park SJ, Chae C : Genetic and antigenic characterization of a newly emerging porcine circovirus type 2b mutant first isolated in cases of vaccine failure in Korea, *Arch Virol*, 159, 3107-3111 (2014)
- [16] Opriessnig T, Ramamoorthy S, Madson DM, Patterson AR, Pal N, Carman S, Meng XJ, Halbur PG : Differences in virulence among porcine circovirus type 2 isolates are unrelated to cluster type 2a or 2b and prior infection provides heterologous protection, *J Gen Virol*, 89, 2482-2491 (2008)
- [17] Takahagi Y, Toki S, Nishiyama Y, Morimatsu F, Murakami H : Differential effects of porcine circovirus type 2 (PCV2) vaccination on PCV2 genotypes at Japanese pig farms, *J Vet Med Sci*, 72, 35-41 (2010)
- [18] 小池郁子, 村田 知, 大井宗孝, 村上 賢 : 2015年に日本の健康豚から検出された豚サーコウイルス2の遺伝子型, *日獣会誌*, 70, 650-654 (2017)
- [19] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S : MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Mol Biol Evol*, 30, 2725-2729 (2013)
- [20] Takahagi Y, Nishiyama Y, Toki S, Yonekita T, Morimatsu F, Murakami H : Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis, *J Vet Med Sci*, 70, 603-606 (2008)

## Phylogenetic Analysis of Porcine Circovirus Type 2 Detected in Kagoshima Prefecture between 2002 and 2017

Yoshimasa HIRASHIMA<sup>1)†</sup>, Zenjiro SAKAGUCHI<sup>1)</sup>, Syoei KITAHARA<sup>1)</sup>,  
Jun NISHINAKAGAWA<sup>2),3)</sup>, Shun IWAO<sup>1)</sup>, Mai FUJIOKA<sup>1),4)</sup>,  
Tamotsu KURAMAE<sup>2)</sup> and Michihiro TAKAGI<sup>5)</sup>

- 1) *Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center, 1678 Yuda, Higashiichiki, Hioki, 899-2201, Japan*
- 2) *Soo Livestock Hygiene Service Center, 21-17 Shinbashi, Matsuyama, Shibushi, 899-7601, Japan*
- 3) *Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center Tokunoshima Branch, Yoron Resident Office, 1420-2 Chabana, Yoron, Oshima-gun, 891-9301, Japan*
- 4) *Nansatsu Livestock Hygiene Service Center, 4210-18 Kohri, Chiran, Minamikyusyu, 897-0302, Japan*
- 5) *National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

### SUMMARY

Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) was conducted using 22 PCV2-positive samples collected from pigs reared in Kagoshima Prefecture between 2002 and 2017, 16 of which were diagnosed with porcine circovirus associated diseases (PCVAD). The 22 analyzed samples were classified into three genotypes: genotype a (PCV2a), four samples collected from 2002 to 2009; genotype b (PCV2b), 13 samples collected from 2008 to 2017; and genotype d (PCV2d), five samples collected from 2014 to 2017.

— Key words : Genotype, PCV2, phylogenetic analysis.

† Correspondence to : Yoshimasa HIRASHIMA (*Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center*)

*1678 Yuda, Higashiichiki, Hioki, 899-2201, Japan*

*TEL 099-274-7555 FAX 099-274-7556 E-mail : hirashima-yoshimasa@pref.kagoshima.lg.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 72, 339 ~ 343 (2019)