

## 12 国内 2 例目となる豚サペロウイルスによる豚エンテロウイルス性脳脊髄炎の発生と県内浸潤状況調査

中央家畜保健衛生所

○曾田 泰史・平野 晃司

### I はじめに

豚サペロウイルス (PSV) はピコルナウイルス科に属し、以前は豚エンテロウイルス血清型 8 という名称であったが、近年の遺伝子解析の結果から、豚エンテロウイルス A を経て現在の名称となっている<sup>1)</sup>。健康豚の扁桃や糞便中からも検出される常在ウイルスであるが、下痢や肺炎、繁殖障害を引き起こす<sup>1)</sup> ほか、近年、神経病原性が明らかにされた<sup>2)</sup>。病性鑑定指針では豚テシオウイルス (PTV)、エンテロウイルス B (PEV-B) とともに届出伝染病である豚エンテロウイルス性脳脊髄炎の原因ウイルスとして記載されている<sup>3)</sup> が、PSV による脳脊髄炎の確定診断事例及び発生報告は国内では 1 例のみである<sup>2, 4, 5)</sup>。今回、本県で発生した国内 2 例目の PSV による脳脊髄炎の確定診断事例及び PSV の県内浸潤状況調査を報告する。

### II 発生概要

母豚 75 頭、肥育豚 850 頭を飼養する一貫経営農場で、平成 28 年 1 月 3～7 日にかけて 40～60 日齢の肥育豚 4 頭が前肢麻痺を主徴とする起立不能を呈した。死亡豚はみられず、発症豚には抗生物質とプレドニゾロンが投与されていた。本農場では発育状態が近い子豚を混合飼養していたため、4 頭の母豚は不明であった。また、肥育豚には豚サーコウイルスとマイコプラズマのワクチンが接種されていた。

### III 材料と方法

#### 1 材料

##### (1) 発症豚の病性鑑定

平成 28 年 1 月 8 日、発症豚 4 頭 (No. 1～4) をヘパリン加血液と血清を採取した後に鑑定殺し、病性鑑定材料とした。

##### (2) 発生農場 PSV 抗体検査

本農場で平成 24 年及び平成 27 年 7 月に採取した母豚群 14 頭、発症後の平成 28 年 9 月に採取した母豚群 10 頭の血清を検体とした。また、平成 28 年 9 月に採取した神経症状を発症していない肥育豚のステージ別血清 (56、86、99、116 日齢各 5 頭) を検査に供した。

##### (3) 非発生農場 PSV 抗体検査

県内の神経症状が認められない 3 農場で平成 24～26 年に採取した肥育豚ステージ別血清 (30、60、90、120 日齢各 15 頭) を検査に供した。

##### (4) PSV 浸潤状況調査

平成 26～28 年に採取した県内 20 戸各 10 頭、合計 200 頭の母豚または肥育豚の血清を検体とした。

## 2 方法

### (1) 発症豚の病性鑑定

#### ア 血液学的検査

全頭のヘパリン加血液について、定法に従い赤血球及び白血球数(個/ml)、白血球百分率(%)、ヘマトクリット値(%)及びフィブリノーゲン値(mg/dl)を計測した。

#### イ 病理学的検査

全頭を剖検に供し、主要臓器、脳、脊髄及びリンパ節を 10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、定法によりヘマトキシリン・エオジン(HE)染色標本を作製、鏡検した。また、肺についてはPAS反応を実施し、鏡検した。

#### ウ 細菌学的検査

全頭の主要臓器と脳を材料に、5%羊血液加寒天培地(48時間CO<sub>2</sub>培養)及びDHL寒天培地(24時間好気培養)により細菌分離を実施した。

#### エ ウイルス学的検査

全頭の大脳、小脳、間脳、延髄、脊髄、扁桃、肺、脾臓、腎臓及び腸間膜リンパ節を抗生物質添加済みイーグル培地(日水製薬)に懸濁、10%臓器乳剤を作成した。上記乳剤を4000rpmで5分間遠心した上清及び血清からHigh Pure Viral RNA Kit(Roche)を用いてRNAを、DNeasy Blood & Tissue Kit(QIAGEN)を用いてDNAを抽出して遺伝子検査に供した。遺伝子検査はPSV、PTV、PEV-B<sup>6)</sup>、日本脳炎ウイルス<sup>7)</sup>、豚パルボウイルス<sup>8)</sup>、ペスチウイルス<sup>9)</sup>、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(PRRSV)<sup>10、11)</sup>、豚サーコウイルス2型(PCV2)<sup>12、13)</sup>及びゲタウイルス<sup>14)</sup>について実施した。また、ウイルス分離は上記乳剤を12000rpmで10分間遠心後、CPK細胞に接種し、37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベータ内で7日間静置培養し、5代盲継代した。培地は市販のL-グルタミン添加済みイーグル培地(Gibco)に5%量のFBSを添加して用いた。分離されたウイルスは遺伝子解析を実施した。なお、本症例から分離されたPSVを限界希釈法で3代継代してクロニング、その後5代継代し、感染力価10<sup>4.85</sup>TCID<sub>50</sub>/100μlとして、CPK細胞を用いたPSV中和抗体検査に用いた。さらに、No.1～4の血清を用いて、PSV中和抗体検査とオーエスキー病ウイルス(ADV)(gI)エリーザキット(IDEXX)を使用した抗体検査を実施した。

### (2) 発生農場 PSV 抗体検査

Ⅲの1(2)に記載した検体についてPSV中和抗体検査を実施し、母豚群PSV抗体価の発症前後における変動と発生農場における農場内PSV動態を調べた。

### (3) 非発生農場 PSV 抗体検査

Ⅲの1(3)に記載した検体についてPSV中和抗体検査を実施し、非発生農場における農場内PSV動態を調査し、発生農場と比較した。

(4) PSV 浸潤状況調査

Ⅲの 1 (4) に記載した検体の PSV 中和抗体検査を実施し、抗体保有状況を調査した。

IV 成績

1 発症豚の病性鑑定

(1) 血液学的検査

血液一般検査成績は表 1 のとおりで、著変は認められなかった。

表 1 発症豚の血液一般検査成績

No.	Ht (%)	RBC (個/ml)	WBC (個/ml)	WBC百分率 (%)										Fib (mg/dl)	
				Eo	Baso	Neu	(St	Seg				Lym	Mo		
								2	3	4	5				
1	36	1050万	16200	1.5	0	41.5	0	0	3.5	33.5	4.5	53.5	3.5	700	
2	37	778万	20600	0.5	0	61.5	0	0	8	48.5	5	35.5	2.5	700	
3	36	749万	21300	8	0	29.5	0	0	5.5	20.5	3.5	60.5	2	800	
4	36	762万	10200	4	0	27.5	0	0	3	20.5	4	67	1.5	600	
肥育豚 正常値 <sup>15)</sup>	29-42	570万- 830万	11600- 32900	0-11	0-3.6		0-8		4.4-62.1				21-78	0.1-20.1	100-500

(2) 病理学的検査

ア 剖検所見

外貌では、全頭に前肢または全肢麻痺による起立不能が認められた。眼球や耳介は周囲の人の動きや音に反応して動き、蹄底を刺激すると反応はあるものの肢は動かず、知覚は残存し、運動機能が消失していた。全頭に腸間膜リンパ節の腫脹がみられたが、その他に著変はなかった。

イ 組織所見

No. 1~3 に非化膿性脳脊髄炎、No. 4 に非化膿性脊髄炎が認められた。病変は No. 1 の中脳、橋、延髄及び脊髄、No. 2、3 の中脳、延髄及び脊髄、No. 4 の脊髄を主体として、リンパ球主体の囲管性細胞浸潤、グリア細胞の増数、グリア結節などがみられた。No. 1~3 に認められた脳の病変は延髄や橋などの脳幹部で、全頭にみられた脊髄の病変は白質よりも灰白質で重度となる傾向があった。特に、図 1 に示した No. 3 の腰部脊髄では灰白質の背角よりも腹角を主として病変が分布していた。また、全頭に間質性肺炎が認められ、No. 2~4 の肺胞腔内には PAS 陽性の泡沫状物の重度貯留が認められ、その形状からニューモシスチス・カリニ (*Pneumocystis carinii*) によるカリニ肺炎と診断した。

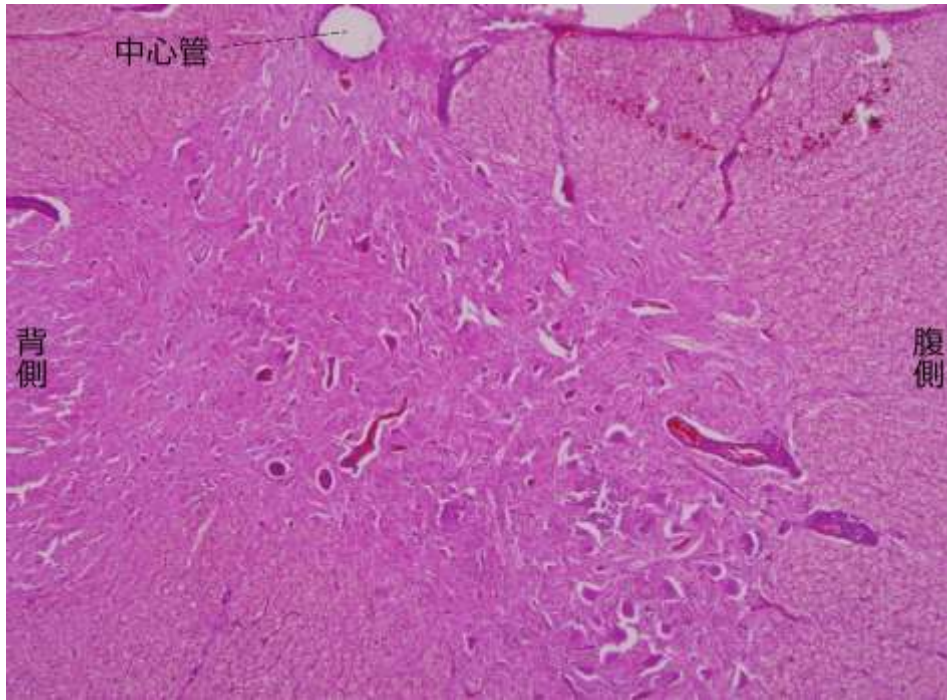


図 1 No. 3 脊髓病変部

(3) 細菌学的検査

細菌学的検査で有意な結果は得られなかった。

(4) ウイルス学的検査

ア 遺伝子検査

表 2 に示した検体から PSV 特異遺伝子が検出された。その他のウイルス特異遺伝子は検出されなかった。

表 2 PSV 特異遺伝子検出成績

	No.1	No.2	No.3	No.4
大脳	-	+	-	+
小脳・間脳	+	+	+	+
延髄	+	+	+	-
脊髓胸部・腰部	+	+	+	+
血清	-	+	+	-

イ ウイルス分離

No. 1 の延髄及び No. 2 の脊髓から継代 3 代目で円形化の細胞変性効果が認められた。遺伝子解析の結果、分離されたウイルスは 5' UTR 領域 168 塩基において、国内で分離された PSV 株 (PSV/Japan/niigata/2008) と 97.6%一致し、PSV と同定された。

ウ ウイルス抗体検査

発症豚の PSV 中和抗体価は 2 倍未満～4 倍であった。ADV 抗体検査は陰性であった。

2 発生農場 PSV 抗体検査

発生農場母豚群の中和抗体価は、平成 24 年及び 27 年 7 月、平成 28 年 9 月時点いずれにおいても 4～128 倍であり、各時点の抗体価の幾何平均 (GM) 値は、25.0、21.5、22.6 倍であった (図 2)。発生前後で抗体価の GM 値や年ごとの抗体価の偏りに大きな変動は認められなかった。

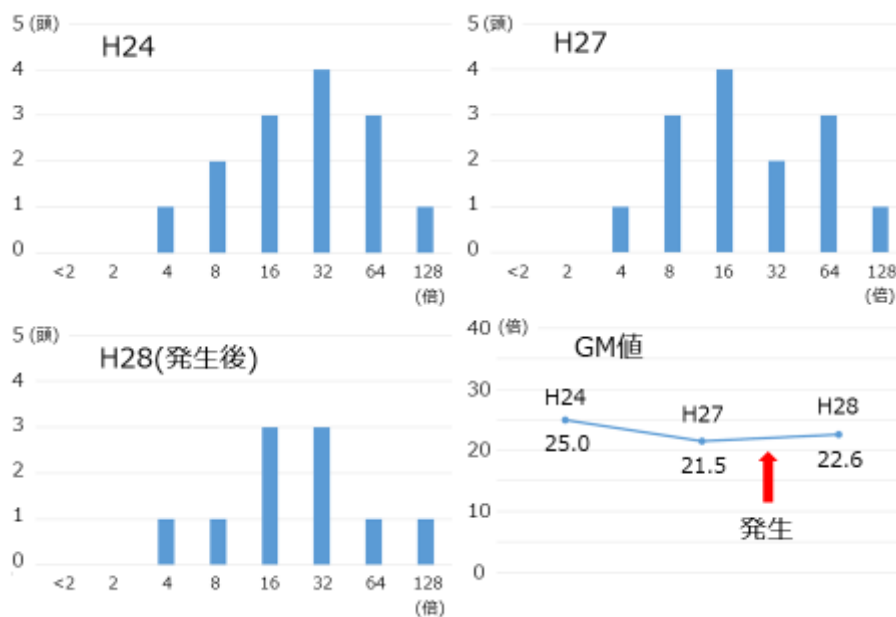


図 2 発生前後の母豚群 PSV 中和抗体価

発生農場の非発症肥育豚ステージ別中和抗体価は、56 日齢で 2～32 倍 (GM 値 : 9.2 倍)、86 日齢で 8～64 倍 (GM 値 : 24.2 倍)、99 日齢で 32～64 倍 (GM 値 : 42.2 倍)、116 日齢で 8～128 倍 (GM 値 : 32.0 倍) であった。前述の発症豚 4 頭の抗体価と併せて図 3 に示す。非発症豚では、56 日齢以降に抗体価の上昇がみられ、発症豚 4 頭は近い日齢の非発症豚と比較して抗体価が低い傾向にあった。

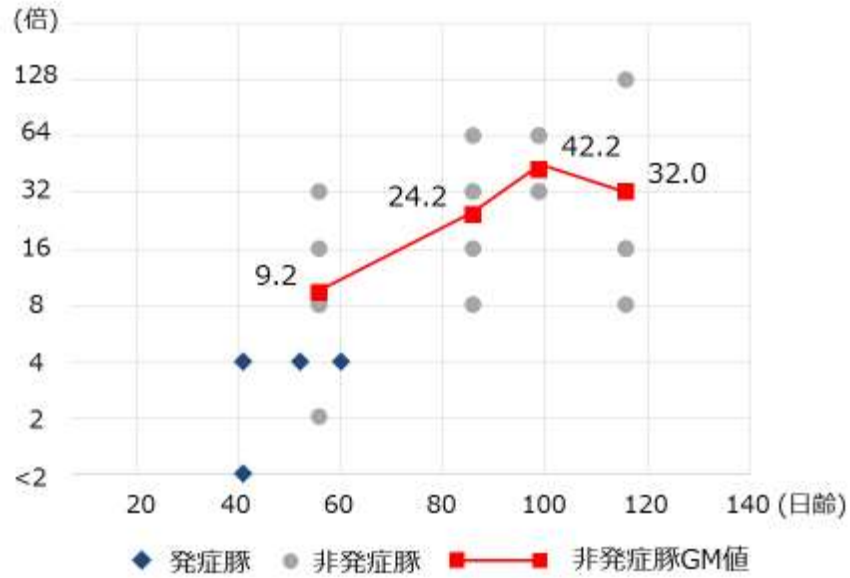


図3 発症豚と非発症豚群のPSV中和抗体価

### 3 非発生農場PSV抗体検査

非発生農場肥育豚の農場ごとの中和抗体価GM値は30日齢で2.9~6.1倍、60日齢で6.9~15.2倍、90日齢で36.7~61.1倍、120日齢で26.6~50.8倍であった。前述の発生農場肥育豚のステージ別抗体価GM値と併せて図4に示す。いずれの非発生農場においても、30日齢以降に抗体価の上昇が認められた。各日齢の抗体価に発生農場と非発生農場の間で大きな差はなかった。

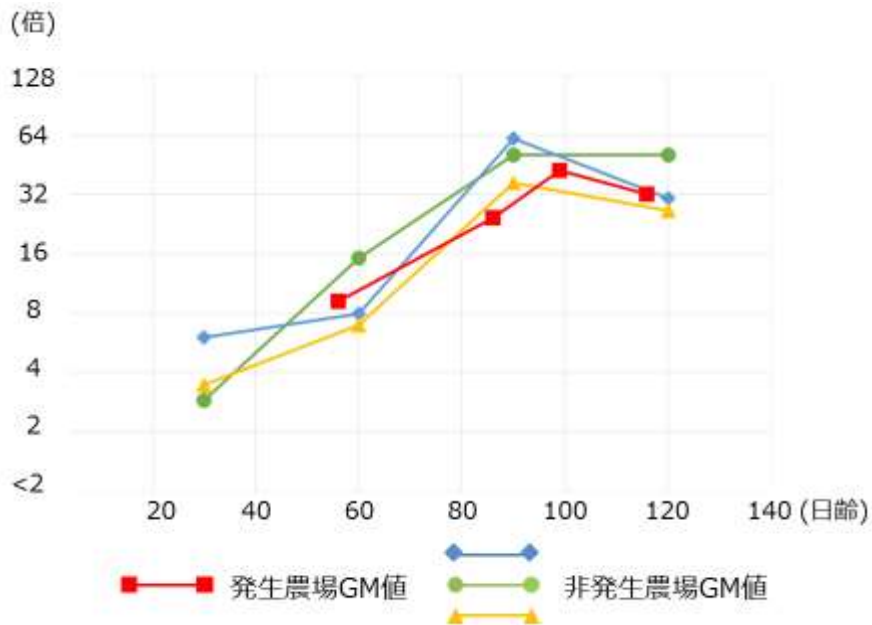


図4 発生農場と非発生農場のステージ別PSV中和抗体価

#### 4 PSV 浸潤状況調査

PSV 浸潤状況調査の結果は図 5 のとおりであった。抗体価 2 倍以上を陽性とする、個体別陽性率は 92.5% (200 頭中 185 頭)、農場陽性率は 100%であった。農場ごとに抗体価の偏りはなく、GM 値に差もみられなかった。

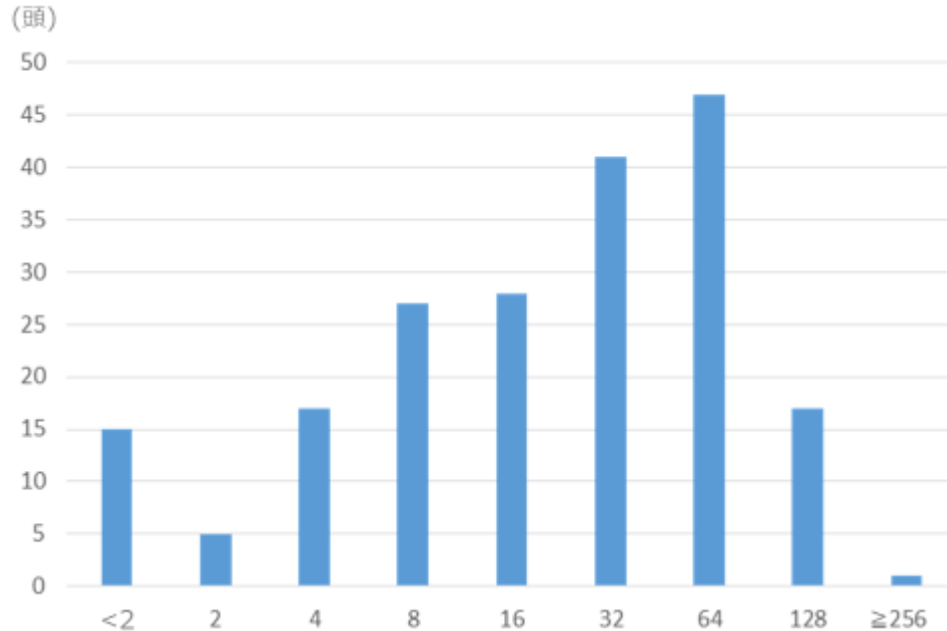


図 5 県内 PSV 浸潤状況調査

#### V まとめと考察

豚エンテロウイルス性脳脊髄炎の確定診断には、臨床的に神経症状がみられ、中枢神経組織に非化膿性炎が認められ、中枢神経病変部からウイルスが分離されるという 3 点が必要とされている<sup>3)</sup>。本例は上記を満たしたため、PSV による豚エンテロウイルス性脳脊髄炎と診断した。これは、国内では 2 例目の確定診断及び発生報告である。その他、組織所見から、No. 2~4 をカリニ肺炎と診断した。

本例で得られた所見と過去の発生報告及び感染実験<sup>2, 4, 5)</sup>を比較すると表 3 のようになり、知覚が残存した、いずれかの四肢麻痺による起立不能、脳幹部や脊髓灰白質を中心とした組織学的な病変が PSV による脳脊髄炎の特徴所見と考えられた。本例では、発症した 4 頭中 1 頭で、脊髓灰白質の背角よりも腹角を主とする病変がみられた。腹角は主に骨格筋を支配する運動神経細胞から構成されている<sup>16)</sup>ため、そこに病変を作ることが運動器の麻痺に関与している可能性が考えられた。しかし、まだ症例が少ないため、今後の症例を含めた検討が必要である。

表 3 本例と過去事例及び感染実験との比較

	本例	過去事例	感染実験
発症個体	肥育豚40～60日齢	肥育豚30～70日齢	ノトバイオート豚2日齢に接種
死亡	なし	あり	20日齢までに鑑定殺
臨床症状	前肢、四肢麻痺		後肢麻痺
知覚	あり		
剖検所見	腸間膜リンパ節腫脹	脳血管充血・うっ血	
組織所見	脳幹部と脊髄灰白質を主とした囲管性細胞浸潤、グリア細胞増数		
	中心性色質融解なし	中心性色質融解あり	
PSV分離	延髄、脊髄	大脳、小脳、延髄	
再発	なし	あり	

PSV は養豚場に広く浸潤しているウイルスであり<sup>1, 2)</sup>、今回実施した浸潤状況調査でも、検査した全ての農場の個体から PSV 抗体が検出され、本県に広く浸潤していることが確認された。PSV 感染実験では、ウイルスを経口接種した場合は非化膿性脳脊髄炎の病変を形成するものの、臨床症状は認められず、静脈内接種した場合にのみ臨床症状も再現されたことが報告されている<sup>2)</sup>。このことから、PSV は野外では不顕性感染が多く、神経症状を呈することは稀と考えられる。本例の発症原因として、発症豚は近い日齢の個体と比べて PSV 抗体価が低い傾向があったことが挙げられた。また、No. 2 及び 3 の血清から PSV 特異遺伝子が検出されたことから、本例では、抗体価が低い個体が PSV に感染し、何らかの原因でウイルス血症となり発症に至ったと推察した。豚エンテロウイルス性脳脊髄炎の発症や病変形成には PCV2 などによる免疫抑制状態が関与している可能性が報告されている<sup>17)</sup>。本例でも、3 頭が日和見感染症であるカリニ肺炎を発症していたことから、免疫不全状態であったと考えられたが、PCV2 や PRRSV などは検出されなかった。

発生農場で実施した PSV 抗体検査では、発症前後で母豚群抗体価に変動はみられず、農場内ウイルス動態も非発生農場と差がなかった。また、本調査では県内に PSV が広く浸潤していることが初めて確認された。本例では抗体価が低かったことを発症要因と考えたが、明確な発症要因の特定には至らなかった。PSV は未だ不明な点が多いウイルスであるが、近年、全ゲノムの遺伝子解析が報告されるなど、研究が進んでいる<sup>18, 19)</sup>。本例で分離された PSV についても、より詳細な遺伝子解析を実施し、病原性の検討や神経症状を引き起こしていないウイルスとの比較など、さらなる調査をしていきたい。

## VI 謝辞

PSV の遺伝子解析を実施していただいた農研機構 動物衛生研究部門 高木道浩上級研究員、ウイルス分離に関してご助言下さいました同 宮崎綾子主任研究員に深謝します。



引用文献

- 1) Knowles : Porcine Enteric Picornaviruses. Disease of Swine. Straw BE, et al eds, 9th ed, 337-345, Blackwell Publishing, Iowa (2006)
- 2) 會田ら : 豚サペロウイルスが脳脊髄炎原因ウイルスであることを明らかにした野外事例及び感染実験. 平成 25 年度新潟県家畜保健衛生業績発表会集録, 48-51 (2013)
- 3) 農林水産省消費・安全局 : 病性鑑定指針, 216-217 (2015)
- 4) 里麻ら : 豚エンテロウイルス A の関与を疑う豚の脳脊髄炎発生事例. 平成 21 年度新潟県家畜保健衛生業績発表会集録, 63-65 (2010)
- 5) 篠川ら : 豚エンテロウイルス A の関与が疑われた症例の病理組織学的検索. 平成 21 年度新潟県家畜保健衛生業績発表会集録, 66-68 (2010)
- 6) Zell et al. : Detection of porcine enteroviruses by nRT-PCR : Differentiation of CPE Groups I-III with Specific Primer Sets. J Virol Methods, 88, 205-218 (2000)
- 7) 小野ら : 病原体検出マニュアル, 国立感染症研究所 (2013)
- 8) Soares et al. : Detection of Porcine Parvovirus DNA by The Polymerase Chain Reaction Assay Using Primers to The Highly Conserved Nonstructural Protein Gene, NS-1. J. Virol. Methods. 78, 191-198 (1999)
- 9) Vilcek et al. : Pestiviruses Isolated from Pigs, Cattle and Sheep Can Be Allocated into at Least Three Genogroups Using Polymerase Chain Reaction and Restriction Endonuclease Analysis. Arch. Virol. 136, 309-323 (1994)
- 10) Kono et al. : Nested PCR for Detection and Typing Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) Virus in Pigs. J. Vet. Med. Sci. 58, 941-946 (1996)
- 11) Christopher-Hennings et al. : Detection of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in Boar Semen by PCR. J. Clin. Microbiol. 33, 1730-1734 (1995)
- 12) Ellis et al. : Coinfection by Porcine Circoviruses and Porcine Parvovirus in Pigs with Naturally Acquired Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome. J. Vet. Diagn. Invest. 12, 21-27 (2000)
- 13) Kawashima et al. : Effects of Dexamethasone on The Pathogenesis of Porcine Circovirus Type 2 Infection in Piglets. J. Comp. Pathol. 129, 294-302 (2003)
- 14) Wekesa et al. : Genomic Analysis of Some Japanese Isolates of Getah virus. Vet. Microbiol. 83, 137-146 (2001)
- 15) 柏崎ら : 豚病学〈第 4 版〉, 近代出版, 64 (1999)
- 16) 獣医解剖学編集委員会監訳 : 獣医解剖学増補改訂版【下巻】, 緑書房, 565 (2010)
- 17) Takahashi et al. : A Piglet with Concurrent Polioencephalomyelitis Due to

Porcine Teschovirus and Postweaning Multi-Systemic Wasting Syndrome. J Vet Med Sci, 70, 497-500 (2008)

- 1 8) Son et al. : Full-Length Genomic Analysis of Korean Porcine Sapelovirus Strains. PLoS One. 2014 Sep 17;9(9) (2014)
- 1 9) Chen et al. : Complete Genome Sequence of Porcine Sapelovirus Strain USA / IA33375 / 2015 Identified in the United States. Genome Announc. 2016 Sep 29; 4(5) (2016)