

7. 野生イノシシにおける家畜疾病関連病原体浸潤調査

○神崎 萌絵 八町慶史 加藤壮浩

要 約

国内野生イノシシでは豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(以下、「PRRSV」という。)、豚サーコウイルス 2 型(以下、「PCV2」という。)及び 3 型(以下、「PCV3」という。)遺伝子が検出されており、飼養豚への感染の恐れがあるが、都内の浸潤状況は明らかでない。そこで、都内野生イノシシにおける PRRSV、PCV2 及び PCV3 について遺伝子検査を行った。

材料は令和 4 年 4 月から令和 6 年 12 月に採材した捕獲イノシシの血清から抽出した核酸 328 検体及び死亡イノシシの血清、扁桃又は耳片から抽出した核酸 13 検体の計 341 検体とした。方法は各ウイルスゲノムを標的とした PCR 検査を実施した。PCV2 陽性検体についてはオープンリーディングフレーム 2 領域のダイレクトシーケンスにより遺伝子型別及び系統樹解析を行った。

結果、PRRSV は全検体で PCR 検査陰性であったが、PCV2 は 20 検体、PCV3 は 10 検体が PCR 検査陽性であった。PCV2 の遺伝子型別の結果、20 検体全て PCV2d-2 型であった。また、PCV2 の系統樹解析を行った結果、陽性検体はさらに 2 つのクラスターに分類された。PCV2 陽性イノシシが採材された場所を地図上にプロットしたところ、1 つのクラスターは特定の地域に集中していることが分かった。

今後は PRRSV、PCV2 及び PCV3 の浸潤状況を踏まえて農家に対し注意喚起を行うとともに、正確な浸潤状況の把握のため、各ウイルスの抗体検査を実施し、農家への衛生指導に役立てていく。

豚熱(以下、「CSF」という。)は豚熱ウイルス(以下、「CSFV」という。)を原因とする豚及びイノシシの伝染病であり、平成 30 年の岐阜県での発生以降、日本各地の農場で CSF の発生が確認されている。CSF 拡大の要因の一つに野生イノシシから飼養豚への CSFV 伝播が挙げられ¹⁾、CSFV 浸潤状況の把握のため、野生イノシシのサーベイランスが全国的に行われている。また、野生イノシシに免疫を獲得させることにより、感染地域内における新規感染の抑制及び感染地域拡大を抑制するため、平成 31 年より CSF 経口ワクチン散布を行っている。

CSF ワクチンによりウイルス増殖抑制及び CSF 発症予防の効果が期待できるが、豚での豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(以下、「PRRSV」という。)及び豚サーコウイルス 2 型(以下、「PCV2」という。)感染が CSFV ワクチン免疫付与の阻害要因になるという報告がある²⁻³⁾。PRRSV は主に肺胞マクロファ

ージに感染し、ウイルス血症や免疫低下を引き起こす⁴⁾。豚サーコウイルス(以下、「PCV」という。)は 1 から 4 型まで報告され、PCV2 は主に免疫細胞に感染しリンパ球減少や免疫細胞の機能低下を引き起こす⁵⁾。このように PRRSV 及び PCV2 の感染は宿主免疫の低下を引き起こすため、イノシシにおいて各ウイルスの感染は CSF 経口ワクチンの免疫付与阻害要因となり、CSFV 感染リスクが高まる可能性がある。また、豚サーコウイルス 3 型(以下、「PCV3」という。)の感染により末梢血単核細胞の増殖が抑制されることが報告されており⁶⁾、PCV2 と同様に CSF ワクチン免疫付与の阻害要因となる可能性がある。国内では野生イノシシにおける PRRSV、PCV2 及び PCV3 の浸潤状況調査が実施されており、PRRSV は、2019 年の全国調査での抗体検査で 0.7%(10/1382)⁷⁾、山口県での PCR 検査で 0%(0/301)⁸⁾であった。PCV2 の PCR 検査の陽性率は山口県で

4. 3%(13/301)⁸⁾、長野県で 8. 3%(21/254)⁹⁾であった。PCV3 の PCR 検査の陽性率は山口県で 24. 3%(73/301)⁸⁾、長野県で 16. 8%(43/256)⁹⁾であった。

このように国内野生イノシシでの各ウイルスの浸潤状況について報告がある一方、都内での野生イノシシにおける浸潤状況は明らかでないため、都内野生イノシシにおける PRRSV、PCV2 及び PCV3 の保有状況を調査した。

材料と方法

1. 材料と核酸抽出

令和 4 年 4 月から令和 6 年 12 月に採材した捕獲イノシシの血清 328 検体並びに死亡イノシシの血清 2 検体、扁桃 8 検体及び耳片 3 検体を試験に供した。核酸抽出キット (High Pure Viral Nucleic Acid Kit、ロシュ・ダイアグノスティックス (株)、東京) を用いてウイルス核酸を抽出した。

2. PCR 法

抽出した核酸は 8 検体ずつプールして PCR を実施し、陽性となったプール検体については個別に PCR を行い、陽性検体を特定した。PRRSV は Lurchachaiwong らの方法¹⁰⁾に従い、リアルタイム PCR キット (One Step TB Green® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (Perfect Real Time)、タカラバイオ (株)、滋賀) を用いてオープンリーディングフレーム (以下、「ORF」という。) 7 領域を標的としたリアルタイム PCR 法を実施した。PCV2 は柴田らの方法¹¹⁾、PCV3 は Wang らの方法¹²⁾に従い、リアルタイム PCR キット (Hot Start TTx (DNA) Kit、東洋紡 (株)、大阪) を用いて PCV2 及び PCV3 とともに ORF2 領域を標的としたリアルタイム PCR 法を実施した。

3. PCV 感染と発育段階の関係性に関する解析

PCV 感染とイノシシの発育段階についての関係性に言及した報告もあるため⁸⁻⁹⁾、幼獣・成獣ごとに PCV 感染率を明らかにし、Fisher の正確検定を行った。

4. 塩基配列決定及び系統樹解析

PCV2 陽性検体は小池らの方法¹³⁾及び平島らの方法¹⁴⁾により ORF2 領域を増幅、塩基配列を決定した。得られた塩基配列データと国際 DNA データベース (DDBJ) に登録されている PCV2 の遺伝子型 a~e の 9 株 (PCV2a: AF109398、HM039034、PCV2b: AY484409、PCV2c: EU148503、PCV2d-1: JF827599、PCV2d-2: KC515010、HM038030、KJ187306、PCV2e: KT795290) の ORF2 配列データを基に、MEGA11 を用いて近隣結合法により系統樹解析を実施した。また、PCV2 陽性検体はブートストラップ値 95 以上でクラスター分類を行った。

5. 採材地点の把握

地図作成ソフトウェア (Google My Maps) を用いてイノシシが採材された地点及び都内豚農家をプロットした。

結果

1. PCR 検査

PRRSV は全 341 検体で陰性であった。PCV2 は捕獲イノシシ 328 検体中 18 検体、死亡イノシシ 13 検体中 2 検体、計 20 検体で陽性、陽性率は 5. 9%であった。PCV3 は捕獲イノシシ 328 検体中 9 検体、死亡イノシシ 13 検体中 1 検体、計 10 検体で陽性、陽性率は 2. 9%であった。

幼獣及び成獣の陽性検体数について、PCV2 陽性検体は幼獣 32 検体のうち 2 検体 (陽性率 6. 3%)、成獣 308 検体中 18 検体 (陽性率 5. 8%)であった。PCV3 は陽性となった 10 検体全て成獣であった。なお、発育段階が不明であった検体が 1 検体あったが、PCV2、PCV3 とともに陰性であった。PCV2 及び PCV3 の感染とイノシシの発育段階との関係について Fisher の正確検定を行った結果、PCV2 感染と発育段階に有意差はみられず ($p=1. 000$)、同様に PCV3 感染と発育段階においても有意差はみられなかった ($p=0. 6073$)

2. PCV2 遺伝子型解析

PCV2 陽性検体について ORF2 領域の遺伝子型別を実施した結果、20 検体全て PCV2d-2 型であった (図 1)。

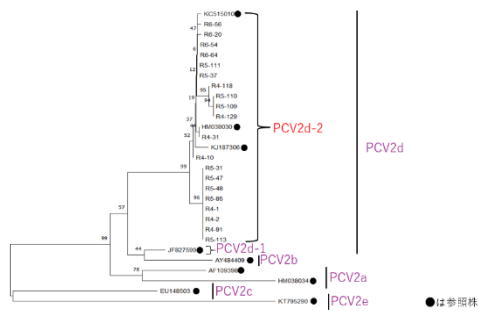


図1 PCV2のORF2のアミノ酸コード領域の塩基配列（622bp）に基づく系統樹

3. 陽性検体の採材地点

PCV2 陽性検体が採材された地点を地図上にプロットしたところ、多摩地域の山沿いの北部から南部まで広くウイルスが浸潤していることが確認された（図2）。

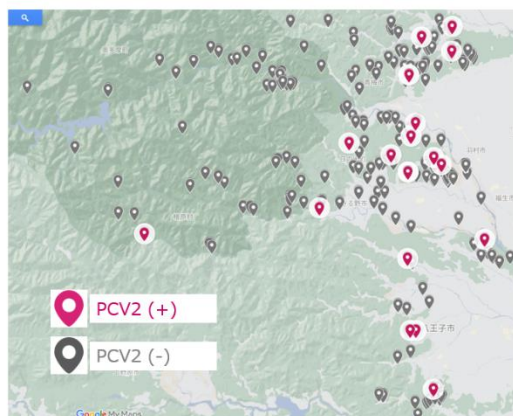


図2 PCV2検査結果

PCV3 においても同様に陽性検体が採材された地点をプロットしたところ、多摩地域の山沿いの北部から南部までウイルスが浸潤していることが確認された（図3）。

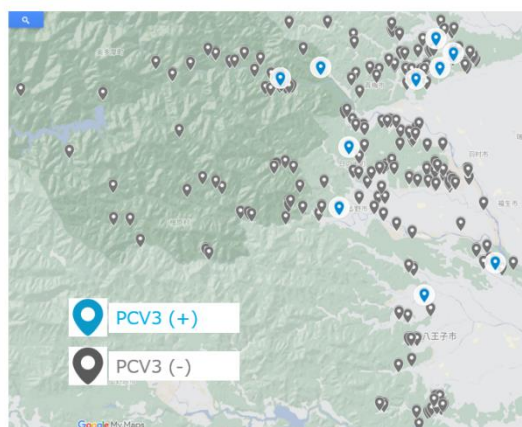


図3 PCV3検査結果

また、PCV2 及び PCV3 陽性地点と都内豚農家を同じ地図上にプロットしたところ、豚農家の近隣において PCV2 又は PCV3 を保有するイノシシがいることが確認された（図4）。



図4 PCV2及びPCV3陽性地点と養豚農家

4. PCV2 陽性検体の地域性

都内 PCV2 陽性検体はブートストラップ値 95 以上でクラスター分類を行ったところ(1)と(2)の2つのクラスターに分類された。クラスターごとに地点を色分けしたところ、(2)のクラスターが特定の地域に集中していた（図5、6）。

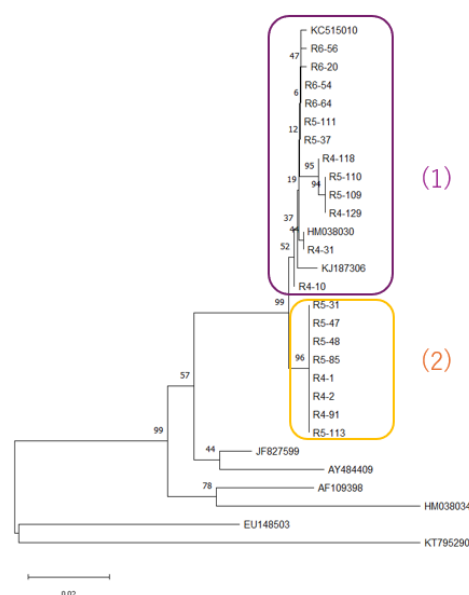


図5 PCV2の系統樹

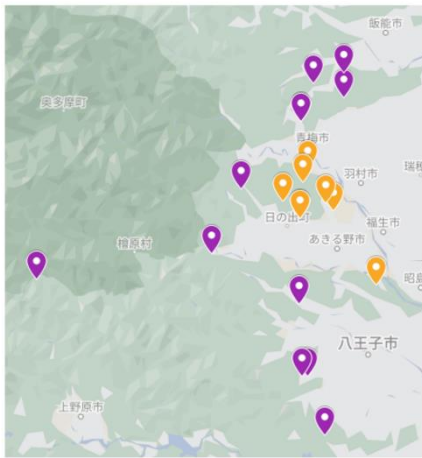


図 6 PCV2陽性検体のプロット図

考察

今回の検査により PRRSV は全検体で陰性であり、この結果は既報⁸⁾と同様であった。しかし、豚の血清中で PRRSV が保持されるのは 3 から 4 週間程度との報告があるため¹⁵⁻¹⁷⁾、PRRSV に感染したが、時間の経過により血液中からウイルスが排除され、ウイルスが検出されなかった可能性がある。PRRSV の抗体は、豚において感染後 1 から 28 週間後まで検出可能であるため¹⁷⁾、ウイルスの正確な浸潤状況の把握には抗体検査も併せて行う必要がある。

PCV2 は捕獲イノシシ 328 検体中 18 検体、死亡イノシシ 13 検体中 2 検体、計 20 検体で陽性、陽性率は 5.9%であった。この結果は既報⁸⁻⁹⁾と大きな違いがあるとは言えず、他地域と同様にイノシシで PCV2 の保有が認められた。なお、PCV2 の豚への感染実験では、感染後 7 日から 140 日目までウイルス DNA が検出されたという報告がある¹⁸⁻¹⁹⁾。また、感染実験の観察期間中に、一過性にウイルス DNA の検出量が減少し、陰性に転じた個体も認められたという報告もあることから¹⁹⁾、PRRSV と同様にウイルスの正確な浸潤状況の把握には抗体検査も併せて行う必要がある。また、幼獣と成獣で PCV2 の陽性率に有意差はみられず、既報と一致した

9)。

PCV3 は捕獲イノシシ 328 検体中 9 検体、死亡イノシシ 13 検体中 1 検体、計 10 検体で陽性、陽性率は 2.9%であった。この結果は既報⁸⁻⁹⁾と比較して陽性率が低く、他県と比較して PCV3 を保有するイノシシの割合が少ない結果となった。しかし、他のウイルスと同様に、ウイルスに感染したが体内からウイルスが排除され検出されなかった可能性が考えられるため、PCV3 についても抗体検査を行う必要がある。また、既報で PCV3 感染について幼獣より成獣で有意に検出されたと報告があるが⁸⁻⁹⁾、今回の検査では PCV3 感染と幼獣・成獣の関係について有意差はみられなかった。

PCV2 陽性検体について遺伝子型別を行った結果、20 検体全てで PCV2d-2 型となった。豚において、以前は PCV2a、PCV2b が優勢な遺伝子型であったが、2012 年以降はアジア地域を含めた世界中で PCV2d の発生が報告され、PCV2d が優勢な遺伝子型となっている²⁰⁾。豚とイノシシ間で近縁の PCV2 遺伝子株を持つ報告があり²¹⁾、豚とイノシシ間でウイルスが伝播するほど十分な接触があると考えられる。また、飼養豚から野生イノシシへの PCV2 伝播率は野生イノシシから飼養豚への伝播率の約 3 倍高いことが報告されており²²⁾、豚農家の近隣で PCV2 保有イノシシが確認されたことから、都内イノシシでも飼養豚と野生イノシシとの接触及び飼養豚から野生イノシシへのウイルス伝播の可能性が考えられ、今回の陽性検体が全て PCV2d であったと推察される。今後飼養豚の PCV2 の PCR 検査及び遺伝子型別を行うことにより、都内飼養豚とイノシシの接触の有無やウイルスの浸潤状況を把握する必要がある。

PCV2 の陽性検体は、図 5 中黄色のアイコンで示したクラスターについて、7 地点は特定の地域(ア)に集中していたものの、その地域から外れた地域(イ)で採材された 1 検体が同一クラスターに分類された。(イ)で採材された要因として①山間部を通じイノシシの往来があった、②傍を流れる一級河

川沿いにイノシシの往来があった、の 2 点が考えられる(図 7)。

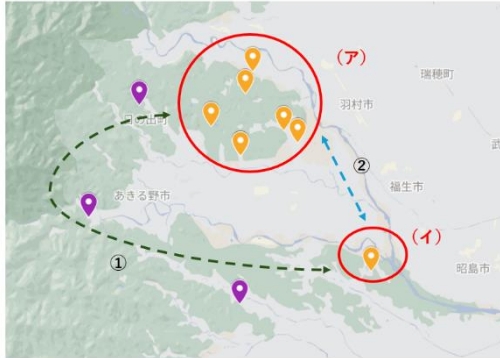


図 7 同一クラスター内の検体の地理情報

イノシシの行動範囲は通常時 1~2km と言われており、①では約 20km、②では約 5.6km のため、②の可能性が高いと考える。また、図 5(1)のクラスターについては多摩地域の山沿いに北部から南部まで広くウイルスが確認された。PCV2 陽性野生イノシシ検出地域の中央部に図 5(2)のクラスターが存在することを考えると、都内全域で同系統のウイルスが存在した中で特定の地域で独自のクラスターが形成されたと考える。今後 PCV3 の系統樹解析を実施することで、PCV2 と同様に、地域性を考察する一助となる可能性がある。

また、今回の検査により PCV2 及び PCV3 が都内西部において広く浸潤していたが、採材地域の西側にあたる奥多摩町及び檜原村の PCV2 及び PCV3 の陽性数はそれぞれ 1 検体、0 検体であり、一見ウイルスが浸潤していないように思われる(図 2、3)。しかしながら、誤差±5%、信頼度 95%、母比率を今回の PCV2 及び PCV3 陽性率として必要なサンプルサイズを算出すると奥多摩町及び檜原村でそれぞれ 87 検体、45 検体であり、今回の検査数の奥多摩町 25 検体及び檜原村 16 検体ではサンプル不足となる。そのため、今回の検査数では各ウイルスの浸潤状況を正確に反映していない可能性がある。今後検査数を増やしていくことで、正確な浸潤状況の把握につながると考える。

まとめ

令和 4 年 4 月から令和 6 年 12 月に採材した捕獲イノシシの血清 328 検体並びに死亡イノシシの血清 2 検体、扁桃 8 検体及び耳片 3 検体について核酸を抽出し、PRRSV、PCV2 及び PCV3 のウイルスゲノムを標的としたリアルタイム PCR を実施した。結果、PRRSV は全検体で陰性、PCV2 は陽性率 5.9%、PCV3 は陽性率 2.9%であった。PCV2 の遺伝子型解析の結果、20 検体全て PCV2d-2 型であった。また、PCV2 の系統樹解析を行った結果、陽性検体はさらに 2 つのクラスターに分類された。

今後、各ウイルスの抗体検査及び PCV3 の系統樹解析を実施し、ウイルスの正確な浸潤状況の把握を行うほか、今回の調査により豚農家の近隣で PCV2 又は PCV3 を保有するイノシシがいることが明らかとなり、豚とイノシシ間でのウイルスの循環も考えられることから、今後豚での各ウイルスの浸潤状況調査を行う。また、農家への周知と注意喚起を行う等、疾病対策のための衛生指導に生かしていく。

引用文献

- 1) 菊池栄作：野生イノシシの豚熱対策，畜産技術，(2021)
- 2) Li H, Yang H. Infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus suppresses the antibody response to classical swine fever virus vaccination, Vet Microbiol, (2003)
- 3) Chen JY, Wu CM, Liao CM, Chen KC, You CC, Wang YW, Huang C, Chien MS : The impact of porcine circovirus associated diseases on live attenuated classical swine fever vaccine in field farm applications, Vaccine, (2019)
- 4) Cai H, Zhang H, Cheng H, Liu M, Wen S, Ren J : Progress in PRRSV Infection and Adaptive Immune

- Response Mechanisms, Viruses, (2023)
- 5) Yan YR, Sun YH: Genotypic diversity and immunological implications of porcine circovirus : Inspiration from PCV1 to PCV4, Microb Pathog, (2024)
 - 6) Jiang H, Wang D, Wang J, Zhu S, She R, Ren X, Tian J, Quan R, Hou L, Li Z, Chu J, Guo Y, Xi Y, Song H, Yuan F, Wei L, Liu J : Induction of Porcine Dermatitis and Nephropathy Syndrome in Piglets by Infection with Porcine Circovirus Type 3, J Virol, (2019)
 - 7) 大崎慎人, 山本健久, 下地善弘, 高木道浩, 須田遊人: 筒井俊之野生イノシシにおける家畜疾病の全国調査, 豚病会報 No. 74, (2019)
 - 8) 鹿島貴朗: 野生いのししにおける豚伝染病ウイルスの遺伝子学的浸潤調査, 第 65 回(令和 5 年度)山口県家畜保健衛生業績発表会, (2024)
 - 9) Kaneko F, Kato M, Ito Y : Porcine circoviruses in wild boars in Nagano Prefecture, Japan, J Vet Med Sci, (2023)
 - 10) Lurchachaiwong W, Payungporn S, Srisatidnarakul U, Mungkundar C, Theamboonlers A, Poovorawan Y : Rapid detection and strain identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) by real-time RT-PCR, Lett Appl Microbiol, (2008)
 - 11) 柴田明弘, 村田史郎, 中尾哲也, 井関 博: 定量 PCR を用いた輸入豚のサーコウイルス 2 型遺伝子量調査, 日本獣医師会雑誌 71, (2018)
 - 12) Wang J, Zhang Y, Wang J, Liu L, Pang X, Yuan W : Development of a TaqMan-based real-time PCR assay for the specific detection of porcine circovirus 3, J Virol Methods, (2019)
 - 13) 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, 日本獣医師会雑誌, (2017)
 - 14) 平島 宜昌, 坂口 善二郎, 北原 尚英, 西中川 淳, 岩尾 俊, 藤岡 舞, 藏前 保, 高木 道浩 : 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, 日本獣医師会雑誌, (2019)
 - 15) Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, Hoffman LJ, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB : Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: routes of excretion, Vet Microbiol, (1997)
 - 16) Wills RW, Doster AR, Galeota JA, Sur JH, Osorio FA : Duration of infection and proportion of pigs persistently infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus, J Clin Microbiol, (2003)
 - 17) Meier WA, Galeota J, Osorio FA, Husmann RJ, Schnitzlein WM, Zuckermann FA : Gradual development of the interferon-gamma response of swine to porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection or vaccination. Virology, (2003)
 - 18) Palya V, Homonnay ZG, Mató T, Kiss I. Characterization of a PCV2d-2 isolate by experimental infection of pigs, Virol J, (2018)
 - 19) Opriessnig T, Prickett JR, Madson DM, Shen HG, Juhan NM, Pogranichniy RR, Meng XJ, Halbur PG : Porcine circovirus type 2 (PCV2)-infection and re-inoculation with homologous or heterologous strains: virological,

- serological, pathological and clinical effects in growing pigs, Vet Res, (2010)
- 20) Maity HK, Samanta K, Deb R, Gupta VK. Revisiting Porcine Circovirus Infection : Recent Insights and Its Significance in the Piggery Sector, Vaccines (Basel), (2023)
- 21) Rudova N, Buttler J, Kovalenko G, Sushko M, Bolotin V, Muzykina L, Zinenko O, Stegnyy B, Dunaiev Y, Sytiuk M, Gerilovych A, Drown DM, Bortz E, Solodiankin O. Genetic Diversity of Porcine Circovirus 2 in Wild Boar and Domestic Pigs in Ukraine, Viruses, (2022)
- 22) Franzo G, Tinello S, Grassi L, Tucciarone CM, Legnardi M, Cecchinato M, Dotto G, Mondin A, Martini M, Pasotto D, Menandro ML, Drigo M. Free to Circulate: An Update on the Epidemiological Dynamics of Porcine Circovirus 2 (PCV-2) in Italy Reveals the Role of Local Spreading, Wild Populations, and Foreign Countries, Pathogens, (2020)