

NIBS LETTER 2013 MARCH
No. 579

日生研おより

2013年(平成25年)3月号 第59巻第2号(通巻579号)

挨拶・巻頭言

思い出に浸りながら今を考えてみた
.....草薙公一(2)

獣医病理学研修会

第52回 No. 1046 ハクチョウの心臓
.....北海道大学 比較病理学教室(3)

第52回 No. 1053 ウサギの肝臓
.....摂南大学(4)

研究報告

型特異的 PCR を用いた国内における豚
サーコウイルス 2a、2b 型の検出
.....平 修(5)

論文紹介

豚の肺炎病変における Torque teno sus
viruses の探索的研究.....鈴木敬之(8)



NIBS

一般財団法人 日本生物科学研究所

NIPPON INSTITUTE FOR BIOLOGICAL SCIENCE

<http://nibs.lin.gr.jp/>



思い出に浸りながら今を考えてみた

草薙 公一

正月気分も抜けかけた1月のある日曜日、ぼんやりと目的もなくテレビのリモコンを押しながら番組を変えているとラグビーの試合中継に目がとまった。全国大学ラグビー選手権決勝の中継番組であった。国立大学が決勝まで駒を進め、「初の選手権獲得」の懸かった試合であった。いつの間にか画面はそのままとなり私は試合に入り込んでいたようである。後で聞いた話であるが「観客のような、解説者のような、監督のような、または選手のような、とにかく何時になく熱い言葉を発し続けていた」とは傍らで一緒に見ていた家族からの少々驚きの感想であった。

フォワードの平均体重差10キログラムのハンディーをどのように克服するのかに興味をもたれた。一般的にラグビーでは重いフォワードを有する側が有利である。押し込む力が強くなるためラックやモールでのボールコントロールに余裕が生まれ次のプレーが組み立てやすくなり、ボール支配率に歴然と差が生ずるからである。しかしながら、試合ではどのような展開であれ後半に入ると必ず動きが鈍くなる。そこをどのように凌ぐか、または攻めるかで勝敗が分かれることもあり、戦略とそれに伴った最後まで走り続ける「体力と気力」のスタミナが結果を左右する。この試合結果は結局のところ、「初の選手権獲得」とはならなかったが試合後半の成績はほぼ互角であり、10キログラムのハンディーを縮めた事を物語っていた。ちなみに同じカードでの対抗戦グループ内成績は逆の結果となっていた。

久々の試合観戦に高揚感を覚えつつ、この時、ラグビーを経験した40年前の思い出にも浸っていた。私がまだ目標ははっきりと定まらず、貴重な時間をひたすら浪費していた頃である。高校時代の先輩が心配し、一風変わったラグビークラブに誘ってくれた。それがラグビーとの出会いであった。今ではすっかり遠ざかってしまい記憶も朧げになってしまったが、それはまだ日本では珍しいクラブ形式のチームであったと思う。当時、神田駿河台に校舎があった私立大学の体育授業に起源を發し、インターカレッジの大学生チームと社会人チームで構成されていた。ラグビーを楽しむという目的の下に、互いに考えるそしてフォローするプレーを通して、更には人間関係や人生をも豊にしていきたいとの創立理念を持ったクラブであった。自主性と上級生・先輩の率先実行が重視され、如何にして不慣れな下級生・後輩をなじませ、気持ちよくチームにとけ込ませるかで上級生のリーダーシップが問われていたと思う。通常の練習はもとより、合宿においても事前のグラウンド整備、食事・掃除を含めた一切が上級生の運営に任されていた。今話題になっている体育会系の暴力問題とは全く無縁の世界であり、スポーツを楽しむと共にすばらしい人間関係の中に身を置かせてもらっていたと思う。しかしながら、練習環境は厳しいものがあり、専用グラウンドが無いため、当時は練馬にあった大学の体育会グラウンドや他大学のグラウンドなどを借りながら、日曜日に週1回の合同練習を行っていた。それ以外は希望者のみのトレーニングを千駄ヶ谷の陸上トラックなどで行っていただけであった。このような状況ではあったが、真剣にトップを目指そうとする者からスポーツ愛好を求める者まで様々な考えを持った人間が集まっており、それぞれの思いに従って自主的に練習に励んでいた。「楽しむ」という同じ目的の下に集まり、互いの考えを尊重しあいながら切磋琢磨する雰囲気は非常に心地良いものであった。私などは冬になるとほとんど練習に参加せず70%に届かない出席率であったため、ラガーマンと言うには本当におこがましく、恥ずかしい限りであったが、そんな自分をも受入れてくれるクラブであった。他大学の体育会クラブとの定期戦もあり、大学選手権で何度も優勝し今でもベスト4に顔を出す強豪校との定期戦も行われていた。当時は、一軍戦ではかなわなかったものの二軍戦では勝利していた記憶がある。練習時間、練習場所、また資金も含め数々のハンディーを抱えていたクラブであったが、それを乗り越え確かな実績を積み重ねていた。昨今クラブスポーツの発展が注目され行政も力を入れ始めているが既に40年以上も前にその一つの萌芽が示され、確かな結果を残していたのだと思う。

目標を明確にし、それに向かう多様な人材や多様な考え方を受け入れる寛容さを養い、共に考え工夫していく。そして最後まで走り続ける力を持てば「10キログラムのハンディー」、「時間や場所のハンディー」も乗り越えられる。この時、そんな思いを感じていた。

取り留めもない思い出話になってしまったが、現実に戻って昨今の社会で起こる様々な変化への対応策を考える時、この中に様々なヒントが見えるように思えた。国内外では大きな動きの中で多様な方向が示され、私たちはその判断に窮する事もある。その中で捨てるもの、残すもの、そして新たに創り出すもの、その選択を誤ることはできない。盤石とは言い難い状況の中でも、前へと進むためにこの変化を乗り越える事が求められ、その方策を考えなければならない時もある。同じ様な状況は、政治、経済に限らず我々の関わる研究なども含めた様々な分野において生ずるであろう。こうした中でそれではどのようにして目標を持つか。どのようにして多様な考えを一つにするか。どのようにして考え工夫するか。そしてどのようにして最後まで走り続けるか。

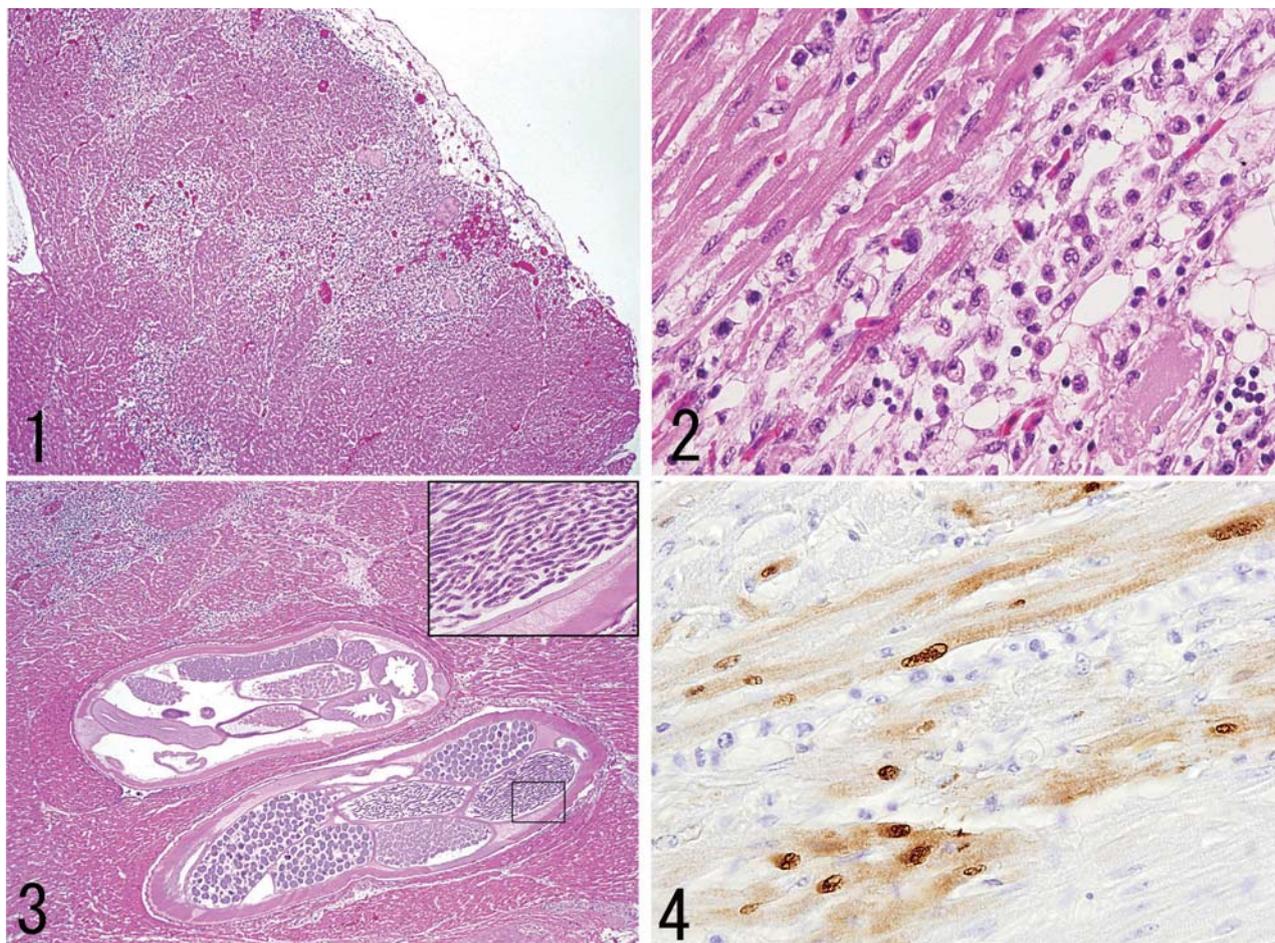
考えるに悩ましい事である。答えを得るまでには至らなかったが、当時は気づいていなかったこの思い出の中にその指標となる事柄が多く含まれているように思えた。

テレビの番組から過去の思い出へ、そして現実へと立ち返り、あれこれと考えを巡らした一日であった。

(副理事長)

ハクチョウの心臓

北海道大学 比較病理学教室 第52回獣医病理学研修会 No. 1046



動物：野生オオハクチョウの幼鳥

臨床事項：本症例は2011年1月に北海道浜中町で衰弱しているところを発見され、安楽殺された。簡易検査キットにて口腔スワブからインフルエンザウイルス陽性反応が得られたため、本学獣医学研究科 BSL3 室内に搬入し剖検された。

肉眼所見：剖検時、臍臓には最大径8mmの壊死巣が散在しており、肺には軽度の水腫が認められた。

組織所見：心室壁全域にかけて、多病巣性から癒合性の病巣が認められた(図1)。病巣は心筋細胞の壊死とマクロファージ、リンパ球の浸潤により構成されていた(図2)。また、心室壁内に線虫の成体が雌雄1対で寄生しており(図3)、その子宮内には多数の子虫(マイクロフィラリア)が観察された(図3、挿入図)。虫体に対する炎症性細胞反応は軽微であった。

診断：1. 非化膿性心筋炎、多病巣性から癒合性、重度

2. マイクロフィラリアを内包する線虫成体の寄生

考察：本症例では心筋炎に加えて壊死性臍炎および非化膿性脳炎も認められた。免疫組織化学的検索によりこれら病巣内にインフルエンザウイルス抗原が検出された(図4)。また、気管、肺、結腸、脳からH5N1型のインフルエンザウイルスが分離された。以上より、本症例はインフルエンザウイルスの全身感染を起こしていたことが判明した。線虫の寄生が認められた臓器は心臓のみで

あり、線虫の寄生部位および形態は過去に報告されている *Sarconema eurycerca* に一致した。本フィラリア線虫はシラミの吸血によって媒介され、致死感染例も報告されているが、病原性の詳細は不明である。本症例はインフルエンザウイルスの全身感染例であり、フィラリアの寄生は偶発所見であると推定した。集会において、配布切片の一部では心筋炎の病巣内にマイクロフィラリアが確認されており、これらマイクロフィラリアによる心筋炎誘発の可能性も考慮するべきである点が指摘された。

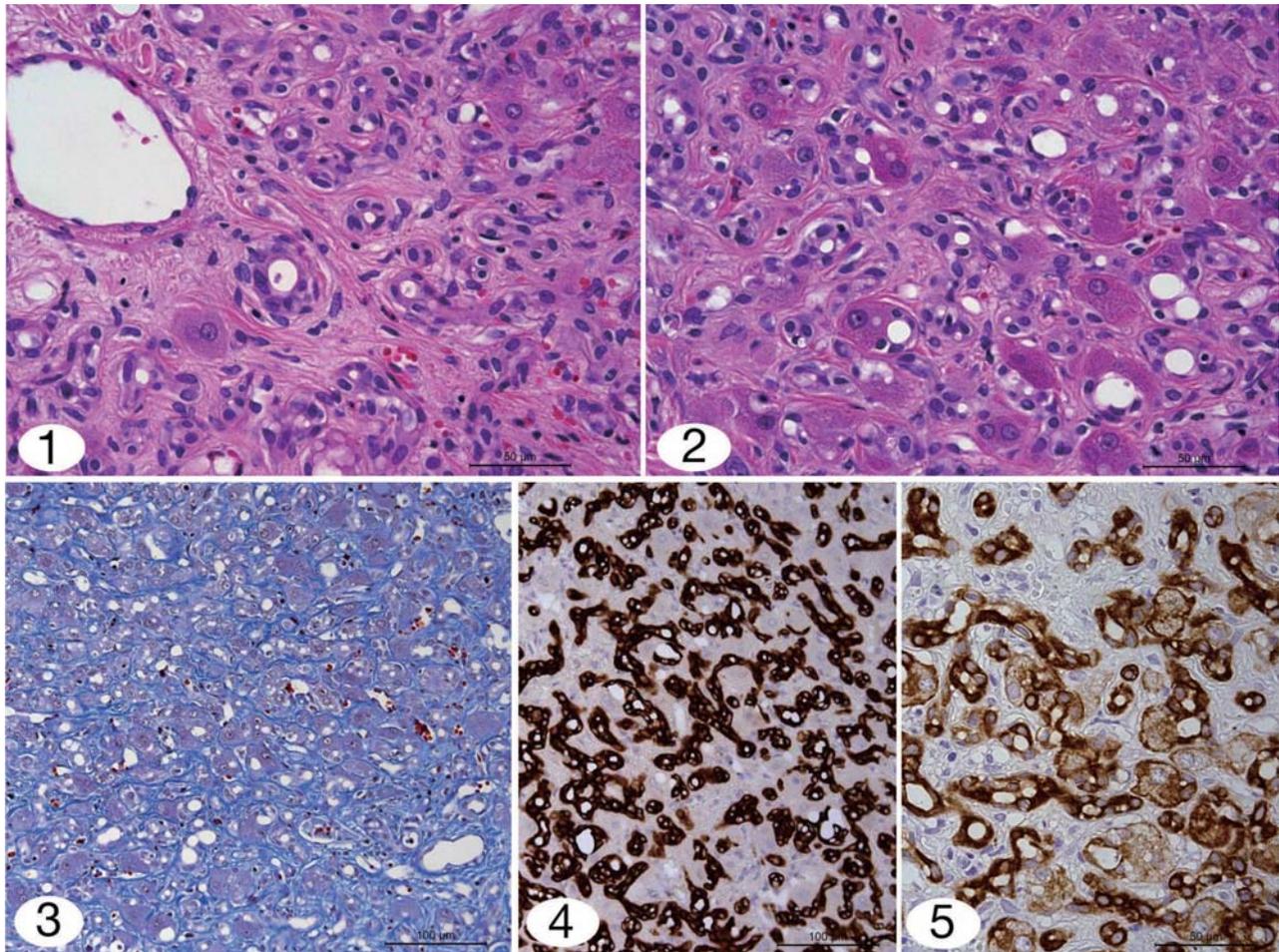
(寸田祐嗣)

参考文献：

1. Irwin, J. C. 1975. Mortality in whistling swans at lake St. Clair, Ontario. *J. Wildl. Dis.* 11: 8-12.
2. Wobeser, G. A. 1981. Metazoan parasites. pp. 129-131. *In*: Diseases of wild waterfowl. Plenum, New York.
3. Rebecca, A. C. 1999. Heartworm of swans and geese. *In*: Field manual of wildlife diseases (Friend, M. and Franson, J.C. eds.), USGS, National Wildlife Health Center, Madison.
4. Woo, G. H., Jean, Y. H., Bak, E. J., Kang, S., Roh, I. S., Lee, K. H., Hwang, E. K. and Lee, O. S. 2010. Myocarditis by nematodes infection, presumably *Sarconema eurycerca*, in a wild whooper swan (*Cygnus cygnus*) in Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 72: 1233-1235.

ウサギの肝臓

摂南大学 第 52 回獣医病理学研修会 No. 1053



動物：ウサギ、ホーランドロップ、雌（未避妊）、2歳8ヶ月。

臨床事項：生後10ヶ月頃よりGPTとALPの高値を示し、肝障害の治療を続けていた。2歳6ヶ月頃から軽度の黄疸と腹水の貯留を認めた。原因追及の為に肝生検が行われた。

組織所見：グリソン鞘周囲および小葉内において大小異なる胆管の増生が瀰漫性に認められた。グリソン鞘周囲では、管腔および基底膜の明瞭な細胆管の増生が主体であり、これらは小型細胞で構成されていた（図1）。グリソン鞘周囲以外の小葉内では、小葉を置換するように大小不同、管腔や基底膜の不整な胆管様構造が瀰漫性に認められた。これら胆管様構造は、細胆管を構成しているものと同様の小型細胞と肝細胞に類する大型細胞で形成されていた（図2）。その他、類洞や細胞周囲に沿って膠原線維の増生がみられた（図3）。免疫染色を用いて胆管様構造の由来について検索した。CK7において組織を全置換するほどの広範囲で胆管形成が確認された（図4）。CK7では、主に細胆管と胆管様構造を形成する小型細胞で強陽性を示し、大型細胞では陰性であった。CK8/18、CK19（図5）、CK20では、いずれの抗体でも細胆管と胆管様構造を形成する小型細胞で強陽性、大型細胞で陽性を示した。また、anti-Hepatocyte抗体では、胆管様構造を形成しない弧在性の肝細胞にのみ強陽性を

示した。以上より胆管様構造の小型細胞は細胆管と同様の染色性を示し、大型細胞は胆管上皮細胞と肝細胞の2つの表現形質を有することが示唆された。

診断：類洞の線維化を伴う汎小葉性細胆管反応

考察：本例では、組織を全置換するほどの顕著な胆管増生が認められた。増生する胆管は、所見から既存の胆管による過形成と肝細胞からの胆管化生が混在していると考えられた。近年、細胆管反応という用語が用いられており、Desmetはこれを細胞の由来および形成部位から細分類している。これによると細胆管反応は、胆管過形成および胆管化生のいずれをも包括するとしている。よって、本例の診断名は増生する胆管の2つの起源を考慮して、単なる胆管過形成ではなく、細胆管反応とすることが適当と考えられた。一方、細胆管反応の発生原因としては多岐にわたる。本例では、胆管炎を示唆する明らかな所見はみられず、炎症も軽度であり非特異的であると考えられた。よって、本例の形成原因について確定するには至らなかった。

（鈴木 学）

参考文献：

1. Desmet, V. J. 2011. Ductal plates in hepatic ductular reactions. Hypothesis and implications. I. Types of ductular reaction reconsidered. *Virchows Arch.* 458 : 251–259.

型特異的 PCR を用いた国内における 豚サーコウイルス 2a、2b 型の検出

平 修

1. はじめに

豚サーコウイルス 2 型 (PCV2) は養豚産業に多大なる損害を与えるウイルスとして知られており、離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS) の起因の一つと考えられている [1]。PCV2 を起因とする一連の病態 (豚皮膚炎腎症症候群: PDNS、豚呼吸器複合感染症: PRDC 等) が多岐に渡る事より、近年では発育・呼吸器・繁殖障害等を呈する病態を豚サーコウイルス関連疾病 (PCVAD) と呼称する動きも見受けられる [2]。

PCV2 はエンベロープの無い約 1.77 kb の小型一本鎖環状 DNA ウイルスであり、レプリケーションを担う ORF1 とカプシド蛋白をコードする ORF2 の二つのゲノムが全体の 93% を占める [3]。分子系統樹解析により PCV2 は二つの遺伝子型に分かれ、1768 塩基で構成される PCV2a と 1767 塩基の PCV2b に大別される。両者は約 93% の遺伝子相同性を有しているが、その病原性との関連性は解っていない [4-7]。従来 PCV2a が流行していたアメリカ・カナダにおいて、流行株が PCV2b に置き換わる現象が認められており、本事象と共に PMWS 被害が増大したため、PCV2b を強毒株とする報告もあるが、病原性の差異は遺伝子型と関連するものではないとの報告もある [8]。

日本では PCV2a が流行株として定着していたが、近年になり急速に PCV2b の検出が報告されている

[9]。今回我々は国内における PCV2 遺伝子型の浸潤状況並びに両者を型別する PCR 法の開発を試みたので、ここに報告する。

2. 材料及び方法

① 野外検体

2006 年から 2008 年にかけて弊所にて実施した病性鑑定材料のうち、PMWS が疑われる 5 県 (秋田県 9 検体、茨城県 5 検体、千葉県 8 検体、愛媛県 2 検体および宮崎県 14 検体)、15 農場、38 検体の肺 (30-60 日齢豚) を用いた。

② PCV2 ORF2 遺伝子検出

常法に従って 10% 肺乳剤より DNA を抽出した後に、表 1 に示した PCV2 ORF2 全域を増幅するプライマー (939/33) を用いて PCR に供した [10]。検出した 34 検体の内、10 検体のシーケンスを行い、参照遺伝子 (PCV2a: AB072302, AY180397, AY256455 and AY424401、PCV2b: AY321990, AY484407, AY484413, AY556477 and AY691169) とともに分子系統樹を作成した。

③ 型特異的 PCR

得られたシーケンスを元に PCV2a、PCV2b の両者を区別する PCR プライマーを構築した。表 1 に示す様に両遺伝子型の共通上流プライマーを PCV2AB-F、PCV2a 特異的下流プライマーとして PCV2A-R、PCV2b 特異的下流プライマーとして

表 1 型別及びシーケンスプライマー

Region	Position	Primer	Sequence
ORF2	939-958	939	5'- GCCGAGGTGCTGCCGCT -3'
ORF2	33-17	33	5'- CAGTTCGTCACCCCTTTCCCC -3'
ORF2	975-994	PCV2AB-F	5'- CCATATGAAATAAATTACTG -3'
ORF2	1470-1489	PCV2A-R	5'- TGATGAGATTTAATATTGAC -3'
ORF2	1504-1524	PCV2B-R	5'- AGGAGGGGGCTCAAACCC -3'

PCV2B-Rを用いた。増幅推測サイズはそれぞれ、PCV2aが550 bp、PCV2bが515 bpであった。

3. 結果

① PCV2 ORF2 シークエンスおよび分子系統樹

PCV2 遺伝子は 38 検体中 34 検体で陽性 (89.5%) となり、PCV1 遺伝子に関しては全ての検体から検出された。得られた陽性検体の中から 10 検体 (秋田県: 1 検体、茨城県: 2 検体、千葉県: 3 検体、宮崎県: 4 検体) を選出しシークエンスに供し、分子系統樹を作成した (図 1) 結果、今回得られた PCV2 遺伝子は PCV2a、PCV2b の遺伝子型に大別される事が明らかとなった (accession numbers for PCV/2a: AB462383, AB462385, AB462386 and AB462388, and for PCV/2b: AB462382, AB462384, AB462387, AB462389, AB462390 and AB462391)。

② 型別 PCR

両者を区別する型別プライマーの有用性を確認するため、分子系統樹で大別された各検体を用いて再度 PCR を行った。図 2 に示す様に分子系統樹で PCV2a に区別された検体は PCV2AB-F/PCV2A-R のプライマーセットのみで増幅され、PCV2b に区

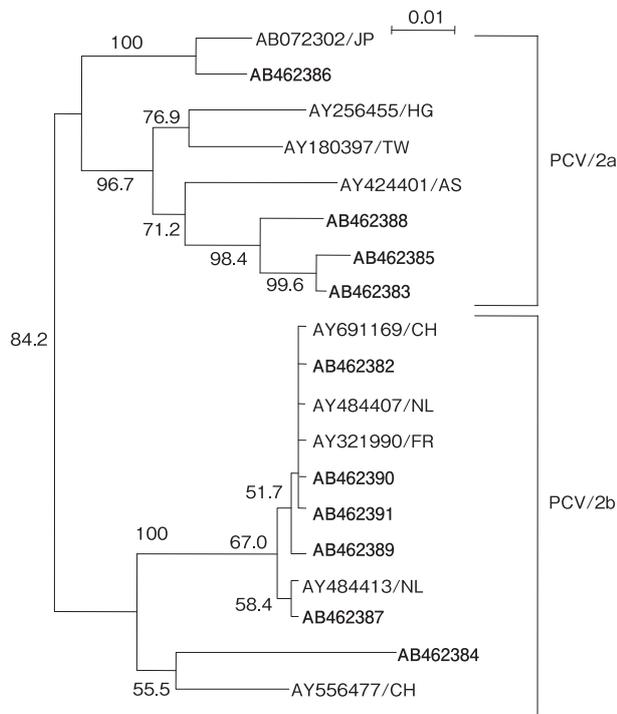


図 1 PCV2 ORF2 領域の分子系統樹 (Japan, JP., Hungary, HG., Taiwan, TW., Netherlands, NL., Austria, AS., China, CH., France, FR. Bootstrap values were indicated > 50% values only.)

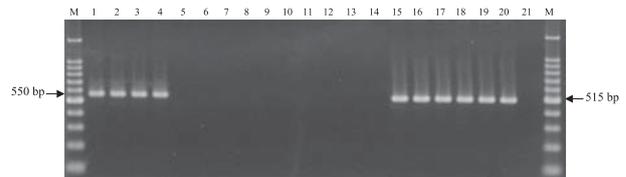


図 2 型別プライマーを用いた PCV2a、PCV2b の検出プライマーセット: PVC2AB-F/PCV2A-R (lane 1-10)、PVC2AB-F/PCV2B-R (lane 11-20)。lane 1, AB462383; lane 2, AB462385; lane 3, AB462386; lane 4, AB462388; lane 5, AB462382; lane 6, AB462384; lane 7, AB462387; lane 8, AB462389; lane 9, AB462390; lane 10, AB462391; lane 11, AB462383; lane 12, AB462385; lane 13, AB462386; lane 14, AB462388; lane 15, AB462382; lane 16, AB462384; lane 17, AB462387; lane 18, AB462389; lane 19, AB462390; lane 20, AB462391 and lane 21, negative control.

別された検体は PCV2AB-F/PCV2B-R のプライマーセットのみで増幅された。両プライマーセットは PCV1 遺伝子を検出しなかった。

4. 考察

PMWS による養豚界への被害は世界中で根強い問題となっている [1、11、12]。日本国内において PCV2 関連の PMWS が報告されたのは 1997 年の事であり [13]、その後の血清学的調査によって 90% 以上の豚が抗体を有している事が報告されている [14]。現在までに PCV2 遺伝子検出方法や診断法、ワクチン等、種々の報告がされてきており、Horlen ら [3] によって PCV2 遺伝子型別 PCR 法も報告されているが、PCV2a、PCV2b 両者を増幅サイズによって区別することは出来ない。本研究は国内における PCV2b の浸潤状況を調査すると共に、両遺伝子型を簡便に検出できる PCR 法の開発を目的とした。

国内各地域より採取した PMWS が疑われる肺検体から 89.5% で PCV2 遺伝子が検出され、分子系統樹から国内では大きく二つの遺伝子型 (PCV2a、PCV2b) が浸潤している事が明らかとなった。系統樹解析に用いた検体数が少数である事より、さらなる調査の必要性が生じるが、国内では北日本では PCV2a が、西日本では PCV2b が浸潤し、関東付近では両遺伝子型が浸潤している事が示唆された (図 3)。従来日本国内では PCV2a がドミナントとして考えられてきたが、本結果からアメリカ・カナダ [7、15、16] 同様に国内でも PCV2b が浸潤し、両遺伝子型の PCV2 が存在する事が明らかとなった。Hor-

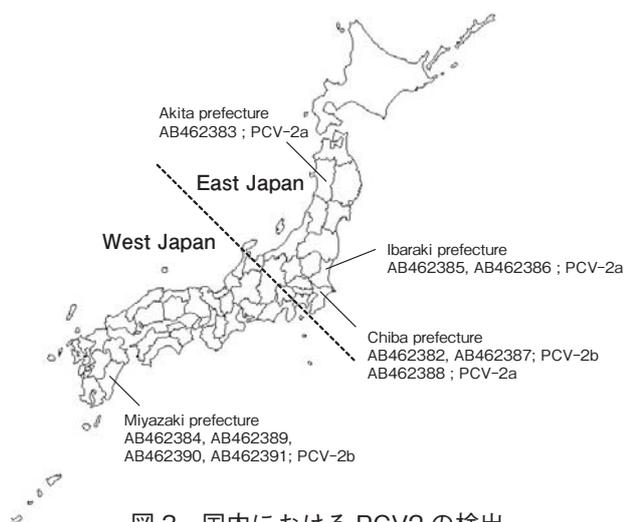


図3 国内におけるPCV2の検出

lenら [3] はPCV2aとPCV2bの異なる病原性に関して報告しており、PCV2b自体が強毒とする説と、PCV2a感染によって得られた免疫機構をPCV2bが免れる事によって病原性が現れるとする二つの仮説を掲げている。このように現状では遺伝子型と抗原型の関連性に関して種々の報告がされているが、解明には至っていない。

PCV2両遺伝子型は93%以上の相同性を有し、両者を区別する配列はORF2領域に33箇所、ORF1領域に13箇所存在し、最も特徴的な配列として1486-1496に位置するPCV2a: AcC/aac/AAA/AT、PCV2b: TcA/aac/ccg/CGモチーフをマーカーとする報告もある [6, 7]。我々はこれらの特徴的な配列を元に、両遺伝子型を増幅サイズ (PCV2a: 975-1489, PCV2b: 975-1524) によって区別する事が出来るプライマーを構築し、従来シーケンスの必要があった型別を簡便なPCR法によって検出することに成功した。

今回の得られた成績を基に、国内でのPCV2遺伝子が浸潤状況を解析し、遺伝子型と病原性との関連性の解明が期待される。

参考文献

1. Chae C. 2005. A review of porcine circovirus 2-associated syndromes and diseases. *Vet. J.* **169**: 326-336.
2. Wellenberg GJ, Stockhofe-Zurwieden N, de Jong MF, Boersma WJA, Elbers ARW. 2004. Excessive porcine circovirus type 2 antibody titres may trig-

ger the development of porcine dermatitis and nephropathy syndrome: a case-control study. *Vet. Microbiol.* **99**: 203-214.

3. Horlen KP. 2007. A cluster of farms experiencing severe porcine circovirus associated disease: Clinical features and association with the PCV2b genotype. *Journal of Swine Health and Production* **15**: 270-278.
4. Dupont K, Nielsen EO, Baekbo P, Larsen LE. 2008. Genomic analysis of PCV2 isolates from Danish archives and a current PMWS case-control study supports a shift in genotypes with time. *Vet. Microbiol.* **128**: 56-64.
5. Grierson SS, King DP, Wellenberg GJ, Banks M. 2004. Genome sequence analysis of 10 Dutch porcine circovirus type 2 (PCV-2) isolates from a PMWS case-control study. *Res. Vet. Sci.* **77**: 265-268.
6. Olvera A, Cortey M, Segalés J. 2007. Molecular evolution of porcine circovirus type 2 genomes: phylogeny and clonality. *Virology* **357**: 175-185.
7. Cheung AK, Lager KM, Kohutyuk OI, Vincent AL, Henry SC, Baker RB, Rowland RR, Dunham AG. 2007. Detection of two porcine circovirus type 2 genotypic groups in United States swine herds. *Arch. Virol.* **152**: 1035-1044.
8. Wiederkehr DD, Sydler T, Buergi E, Haessig M, Zimmermann D, Pospischil A, Brugnera E, Sidler X. 2009. A new emerging genotype subgroup within PCV-2b dominates the PMWS epizooty in Switzerland. *Vet. Microbiol.* **136**: 27-35.
9. Takahagi Y, Nishiyama Y, Toki S, Yonekita T, Morimatsu F, Murakami H. 2008. Genotypic change of porcine circovirus type 2 on Japanese pig farms as revealed by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Vet. Sci.* **70**: 603-606.
10. Yang Z-Z, Shuai J-B, Dai X-J, Fang W-H. 2008. A survey on porcine circovirus type 2 infection and phylogenetic analysis of its ORF2 gene in Hangzhou, Zhejiang Province, China. *J. Zhejiang Univ. Sci.* **B 9**: 148-153.
11. Allan GM, McNeilly F, Kennedy S, Daft B, Clarke

- EG, Ellis JA, Haines DM, Meehan BM, Adair BM. 1998. Isolation of porcine circovirus-like viruses from pigs with a wasting disease in the USA and Europe. *J. Vet. Diagn. Invest.* **10** : 3-10.
12. Sato K, Shibahara T, Ishikawa Y, Kondo H, Kubo M, Kadota K. 2000. Evidence of porcine circovirus infection in pigs with wasting disease syndrome from 1985 to 1999 in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Sci.* **62** : 627-633.
13. Onuki A, Abe K, Togashi K, Kawashima K, Taneichi A, Tsunemitsu H. 1999. Detection of porcine circovirus from lesions of a pig with wasting disease in Japan. *J. Vet. Sci.* **61** : 1119-1123.
14. Kawashima K, Katsuda K, Tsunemitsu H. 2007. Epidemiological investigation of the prevalence and features of postweaning multisystemic wasting syndrome in Japan. *J. Vet. Diagn. Invest.* **19** : 60-68.
15. Ellis JA. 2006. Porcine circovirus disease in Canada: a circle within a wheel, in Proceeding. 19th *Int Pig Vet Soc Cong.* 23-34.
16. Gagnon CA, Tremblay D, Tijssen P, Venne M-H, Houde A, Elahi SM. 2007. The emergence of porcine circovirus 2b genotype (PCV-2b) in swine in Canada. *Can. Vet. J.* **48** : 811-819.

論文紹介

豚の肺炎病変における Torque teno sus viruses の探索的研究

鈴木敬之

Exploratory study of Torque teno sus viruses in pulmonary inflammatory lesions in pigs
 Veterinary Microbiology, Volume 162, Issues 2-4, 23 March 2013, Page 338-344
 Aramouni, M., Martínez, J., Nieto, D., Kekarainen, T. and Segalés, J.

要約

豚トルクテノウイルス1型 (TTSuV1) 及び2型 (TTSuV2) の病的役割や病変形成能については未だ結論は出ていない。TTSuVs は豚サーコウイルス病 (PCVDs) に関与し、ノトバイオート豚で軽度な肺病変を引き起こすといわれている。さらに、豚呼吸器複合病 (PRDC) 罹患豚で TTSuV の感染率の上昇が認められている。本研究では、異なる炎症性病変像を示す肺のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 材料における TTSuV1 及び TTSuV2 の感染率について評価した。それらの測定は定量的リアルタイム PCR 法によるウイルスの検出により行った。

この手法で解析するにあたり、肺凍結材料を用いた結果と比較することで FFPE 組織の使用に最適化した。試験材料の選択基準は豚サーコウイルス2型 (PCV2)、豚繁殖呼吸器症候群ウイルス (PRRSV)、オーエスキー病ウイルス (ADV) 及び豚インフルエンザウイルス (SIV) が陰性であることとした。本研究の結果から、どちらの型の TTSuVs も肺で検出されることが示された。しかしながら、TTSuV2 は TTSuV1 と比較してすべての試験群でより高いウイルス量と感染率を示した。TTSuV2 の平均ウイルス量は正常の肺や細菌感染を背景とする肺炎 (カタル性化膿性気管支肺炎、線維素性胸膜炎及び線維素壊死性胸膜肺炎) の肺と比較して、ウイルス感染

を背景とする肺炎（間質性肺炎及び気管支間質性肺炎）の肺でより高い値となった。この結果はウイルス感染による肺炎病変での病変形成機序において、TTSuV2が何らかの役割を果たしている可能性を示唆している。

序論

トルクテノウイルス (TTVs) は小型でエンベロープを有しないウイルスで、環状一本鎖の DNA をゲノムとして有する。それぞれ Iotatorquevirus 属と Kappatorquevirus 属に属する豚トルクテノウイルス 1 型 (TTSuV1) と 2 型 (TTSuV2) は現在のところ、豚とイノシシを含むイノシシ科における二つの TTV 種である [12]。

TTVs は非病原性と考えられているが、他の病原体との複合感染における役割については未だ判然としていない。ヒト TTVs はいくつかの炎症性疾患や腫瘍に関連し [20]、TTSuVs は離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS) [1, 5, 13, 19] や豚皮膚炎腎症候群 (PDNS) [15] などの豚サーコウイルス関連疾病 (PCVDs) の発生に関与するといわれている。またそれとは対照的に、近年では TTSuVs は PCVDs の病原因子である豚サーコウイルス 2 型感染による疾病の発生に寄与しないという研究報告もある [6, 16]。これらより、TTSuVs の病原性は未だ明らかではないといえる。

TTSuV1 と TTSuV2 が豚で病変形成を起こすかどうかについても未だはっきりとしていない。Krakowka と Ellis ら (2008) は TTSuV1 を投与したノトバイオート豚における軽度の病変形成を報告した。それら病変は一時的な胸腺萎縮と膜性糸球体腎炎、肝臓における中等度のリンパ球・組織球浸潤及び軽度の間質性肺炎であった。同様の結果は SPF 豚に対して TTSuV2 が感染した肝臓乳剤を投与することでも得られた [18]。同じ様にごく近年、豚呼吸器複合病 (PRDC) 罹患豚において TTSuVs の感染率の上昇が認められ、その結果からは TTSuV2 ではなく TTSuV1 がこの臨床的に多病因性な状態と強く関連すると考えられた [21]。これらの著者は TTSuVs が PRDC の病態進行における補因子であるという仮説を上述の結果によって支持することを示している。

共感染による病因としての TTSuVs の正確な役割は明らかではないが、多くのデータからは病気のトリガー因子か日和見病原体としての役割が示されている [1, 3]。したがって、本研究の目的は異なる炎症像を示す肺病変の形成機序への TTSuVs の関わりを調べることである。さらに同時にホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いた定量的リアルタイム PCR による TTSuVs の検出法の有用性を確認する。

材料と方法

組織材料

異なる炎症性病変像を示す肺のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織 45 個を 1998 年から 2010 年までに Veterinary Pathology Diagnostic Service of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain) で解剖された合計 2401 頭の豚から選択した。パラフィンブロックは次の基準で選択された。(a) 8 (± 3) 週齢の豚、(b) 臨床経過と呼吸器病を示す肺病変、(c) *in situ* hybridization (ISH) での PCV2 陰性及び免疫染色での豚繁殖呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV)、オーエスキー病ウイルス (ADV) 並びに豚インフルエンザウイルス (SIV) 陰性、(d) 一つのタイプの顕微鏡学的病変がある肺。陰性対照として、同週齢で病変のない 18 頭の豚の FFPE 肺組織を選択した。

TTSuV2 の定量に対してホルマリン固定とパラフィン包埋が与える影響を評価するために、陰性対照の豚から 13 個の肺凍結組織を選択し、DNA 抽出とウイルス定量を行った。

病理組織学的研究

組織材料は 24–48 時間ホルマリンで保存され、続いて脱水とパラフィン包埋がなされた。5 つの 4 μm の厚さの連続切片を作製し、一つの切片は病理組織検査に、1 つは ISH による PCV2 の核酸検出に、残りの切片は PRRSV、SIV、ADV 抗原を検出する免疫染色にそれぞれ用いた。

顕微鏡学的肺病変の分類は Caswell と Williams ら (2007) 及び Grau-Roma と Segalés ら (2007) によって提案された基準に従った。カタル性化膿性気管支肺炎 (CPBP) では細気管支と肺胞が粘液、好中球及びマクロファージで満たされていた。胸膜

炎では線維素性ないし線維素化膿性滲出液が胸膜を覆い、中皮細胞の増殖や線維化を伴うこともあり、肺実質の炎症を欠いていた。肺胞を囲む肺胞壁の肥厚を伴う細気管支性壊死が認められたときは気管支間質性肺炎 (BIP) と判断した。間質性肺炎 (IP) は 2 型肺胞上皮の増殖と肥厚を伴う肺胞壁のリンパ球・組織球による間質性の炎症とした。線維素壊死性胸膜肺炎 (FNP) は胸膜及び肺実質の広範な壊死を特徴とし、線維素の析出、水腫、好中球と少数のマクロファージや多くの壊死性白血球の滲出に満たされた胸膜、肺胞及び終末細気管支と時折の血管内線維素性血栓を伴っていた [27]。CPBP、胸膜炎及び FNP の重症度は肉眼的に肺炎ないし胸膜炎となっている病変の面積に基づいて 3 段階で評価し、グレード 1 は 30% 以下、グレード 2 は 30-50%、グレード 3 は 50% 以上とした。IP と BIP の重症度も 3 段階で評価したが、これは肺胞壁の炎症細胞浸潤による顕微鏡的基準に従い、軽度 (グレード 1)、中等度 (グレード 2)、重度 (グレード 3) で評価した。

In situ hybridization (ISH) 及び免疫染色

既報にある 41 bp のジゴキシゲニン標識された DNA プローブ (DIG-CCT TCC TCA TTA CCC TCC TCG CCA ACA ATA AAA TAA TCA AA) を用いて PCV2 を検出する ISH 法を実施した [22]。

免疫染色には、PRRSV、ADV 及び SIV に対するモノクローナル抗体を用いて 3 つのアビジン-ビオチン-パーオキシダーゼアッセイを実施した。手技は既報に従い [9]、PRRSV、SIV 及び ADV を検出するモノクローナル抗体はそれぞれ SDOW17 (Rural Technologies, USA)、C65331M (Tib Molbiol, Germany) 及び ICII (Dr.Hans Nauwynck, University of Ghent, Belgium より分与) をそれぞれ TBS で 500 倍、200 倍及び 100 倍に希釈して使用した。

DNA 抽出

パラフィンで 60°C で加温して溶かし、20 mg の肺組織をブレードでカットした。DNA のコンタミを防止するために、各サンプルには新しいブレードを用い、全ての資材はキシレンと 100% エタノール

で清拭した。続いて組織を再水和し、小片に細切して 1.5 ml のマイクロチューブに集めた。続いて 1.5 ml のキシレンを入れ攪拌したのちに室温で 30 分間静置してパラフィンを溶解し、13,000 × g で 5 分間遠心した。上清を取り除き、ペレットに 1.5 ml のキシレンを加えて同様の手順を繰り返した。サンプルのペレット形成と水和を容易にするために、1.5 ml の 96% エタノールを加えた。攪拌後、サンプルを 13,000 × g で 5 分間遠心し、上清を除去した。その後ペレットを風乾し、DNA 抽出の手順へと進んだ。

DNA 抽出は 63 個全ての FFPE 肺組織と 13 の凍結肺組織より NucleoSpin® Tissue Kit (Macherey-Nagel) を用いて製品説明書に従い実施した。抽出手順は 19 サンプルを一単位として陰性対照 (200 µl の PBS) と一緒に行った。抽出した DNA は 100 µl の溶出バッファー (5 mM Tris/HCl, pH8.5) に溶出し、Nanodrop ND-1000 分光光度計を用いて定量した。DNA の純度は A260/280 比が 1.6 以上で評価し、PCR による複製の質は豚の βラクトグロブリンハウスキーピング遺伝子を 237 bp の複製産物を作るプライマー対を用いて増幅し、検定した。DNA 量の少ない (125 ng/µl 以下)、ないし純度が低く、質の悪いサンプルについては再度 DNA 抽出を行った。

TTSuVs を検出する定量的 real time PCR

FFPE 組織と凍結組織における TTSuV1 と TTSuV2 のウイルス量の定量には既報の D-Lux based qPCR 法 [19] を本試験に最適化して実施した。反応は 96 穴ウェルプレートを用いて行った。各サンプルと定量用スタンダードは 3 回計測し、陰性対照にはサンプル DNA の代わりに滅菌蒸留水を 3 つのウェルに入れた。各反応では 2 µl のサンプル DNA (250 ng の DNA) あるいは定量用スタンダード DNA、200 nM の各プライマー、10 µl の Express qPCR Supermix Universal™ (Invitrogen) と 0.04 µl の Rox リファレンス色素を容れ合計 20 µl とした。増幅と定量は ABI®7500 fast real time PCR システム (Applied Biosystems™) を用いて以下の標準的条件で行った: 95°C · 10 分、50°C · 2 分、95°C · 15 秒と 60°C · 1 分を 40 サイクル。ホルマリン固定とパラフィン包埋が組織中

のウイルス量に与える影響を決定するために、また異なる方法で保存された同じ組織に対する定量的PCRの効率を比較するために、同じ組織のFFPE組織と凍結組織を解析した。

定量的PCRのプライマー特異性は既報により確認されており、各反応条件も良好であった[19]：(1) 同一サンプルを三回測定した標準偏差が0.5以下(2) 検量線の相関係数が0.97より大きい(3) 増幅効率(検量線の傾き)は3.2から3.7の間。また、陰性対照が陽性となったときは反応をやり直した。TTSuVのウイルス量は250 ngのDNAより得られた。DNA 1 mg当たりの遺伝子量を計算するために、定量的PCRより得られた個々の結果を4000倍した。そしてDNA 1 mg当たりの平均 \log_{10} コピーを平均ウイルス量の比較に用いた。

TTSuV1とTTSuV2の定量的PCRによる検出限界は250 ngのDNA当たり20コピー(1.301 \log_{10})と決定し、それは1 mgのDNA当たり 8×10^4 コピー(4.903 \log_{10})に相当した。

統計解析

統計解析はIBM SPSS[®] 19を用いた。病変は可能性のある病原因子によって二つに分類された。つまり、CPBP、胸膜炎及びFNPは細菌性の病原因子によるものと考えられ、BIP及びIPはウイルス感染によるものと考えられた。試験材料の選択基準はこれらの肺病変像を引き起こす可能性のある一般的なウイルス性病原因子(PCV2、PRRSV、SIV及びADV)が陰性であることとした。確立した分類(細菌性VSウイルス性)と病変グループに基づき、TTSuVの感染率と平均ウイルス量を評価し、異なるグループ間の比較は分散分析(ANOVA)とstudentのt検定を用いた。さらに、病変タイプ/グループ/重症度とTTSuVのウイルス量との関連性はピアソンの積率相関係数rを用いた。線形回帰は動物の週齢とTTSuV1及びTTSuV2のウイルス量の間での相関性を棄却するために用いた。

結果

病理組織学検査

それぞれの肺病変の症例数及び割合は以下の通り

である：CPBP、17 (37.8%)；胸膜炎、8 (17.8%)；FNP、6 (13.3%)；IP、12 (26.6%)、及びBIP、2 (4.4%)。重症度の平均と標準偏差は以下の通り：CPBP、2.1 (0.8)；胸膜炎、2.4 (0.7)；FNP、2.8 (0.4)；IP、1.5 (0.5)、及びBIP、1.5 (0.7)。31 (68.9%) 症例が細菌性因子に由来する病変群に分類され、14 (31.1%) 症例がウイルス性因子に由来する病変群に分類された。

定量的PCRの最適化

FFPE組織と新鮮組織におけるウイルス定量を比較したとき、TTSuV1、TTSuV2それぞれのウイルス量の差は平均で0.793 (± 0.316)、0.887 (± 0.228) \log_{10} であった (Fig. 1)。

本試験の異なる反応で作成された検量線は大きな変動を見せず、アッセイ間の変動係数は4%以内であった。また増幅効率 (E) は96.5%から98.5%の間であった。

TTSuVウイルス量及び肺病変

TTSuVウイルス量と各々の肺の炎症性病変像、及びウイルス性あるいは細菌性といった病変の由来

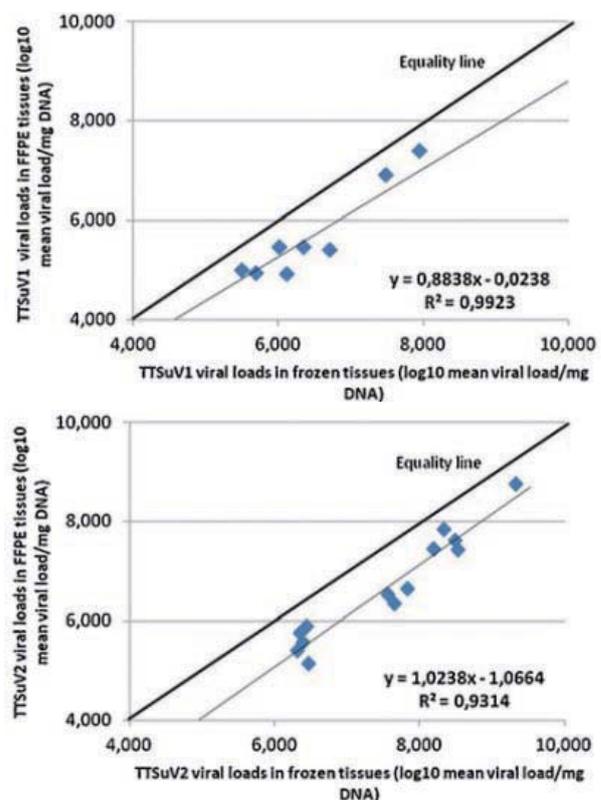


Fig. 1 凍結組織及びFFPE組織におけるTTSuV1及びTTSuV2のDNA1mgあたりの \log_{10} ウイルス量の線形回帰

との関連性を Table.1 にまとめた。また TTSuV1 と TTSuV2 の感染率と、単独感染ないし共感染の検出結果を Table.2 に示した。検査した肺病変を有する全 45 検体中 41 検体 (91%) で TTSuV は陽性であった。肺病変を有する 45 検体中、17 (38%) 検体で TTSuV1 の定量的 PCR 陽性となり、一方 34 (76%) 検体で TTSuV2 の定量的 PCR 陽性、TTSuV1/TTSuV2 の共感染率は 24% (11/45) であった。細菌感染性の肺炎病変を有する 31 検体では、TTSuV1 が 13 (42%) 検体、TTSuV2 が 24 (77%) 検体で検出され、共感染率は 9 (29%) 検体であった。ウイルス感染性の肺炎病変を有する 14 検体からは、定量的 PCR により TTSuV1 が 4 (29%) 検体、TTSuV2 が 10 (71%) 検体で検出され、共感染率は 2 (14%) 検体であった。組織学的に正常な肺 18 検体からは、11 (61%) 検体で TTSuV1 の定量的 PCR 陽性、一方全ての検体 (100%) で TTSuV2 の定量的 PCR 陽性となり、共感染率は 11 (61%) 検体となった。全ての 63 検体でみると、両方の TTSuVs が陰性となったのは 4 (6%) 検体のみであり、6

(10%) 検体は TTSuV1 のみ定量的 PCR 陽性、30 (48%) 検体で TTSuV2 のみ定量的 PCR 陽性となった。統計学的に、TTSuV2 は全てのグループで TTSuV1 よりも流行していた。TTSuVs の種の感染率について病変の有無による差は見られず、病変像、重症度及び細菌性あるいはウイルス性といった病変の由来についても同様であった。

全般的にみると、全ての試験サンプルにおける TTSuV2 の平均ウイルス量は TTSuV1 のウイルス量よりも多く、病理組織学的特徴とは無関係であった (TTSuV2: 6.592 log₁₀/mg DNA, TTSuV1: 5.715 log₁₀/mg DNA, p < 0.01)。TTSuV1 の平均 log₁₀ ウイルス量は病変像、病変の由来及び重症度に関しては差がなく、FNP 及び BIP の全てのサンプルはこの手法による検出限界以下であった。TTSuV2 の平均 log₁₀ ウイルス量は CPBP (6.102 ± 0.9 log₁₀/mg DNA) と IP (7.198 ± 1.3 log₁₀/mg DNA) (p = 0.038)、IP と病変の無いグループ (6.155 ± 0.8 log₁₀/mg DNA) (p = 0.019) 間で差が認められた。包括的な病原因子について考えると、ウイルス感染を背景とする病

Table. 1 細菌感染由来ないしウイルス感染由来の異なる肺炎像を示す肺における陽性サンプルの TTSuVs 平均 log₁₀ ウイルス量。a、b は有意差 (p < 0.05) を意味する；udl は検出限界以下を意味する。

Lesion	Origin	Bacterial (31)			Viral (14)		Control (18)
		CPBP (17)	P (8)	FNP (6)	IP (12)	BIP (2)	
VLL	TTSuV1	5.5	5.9	udl	5.0	udl	6.0
	TTSuV2	6.102 ^a	6.3	7.2	7.198 ^b	7.1	6.155 ^a
VLO	TTSuV1	5.7			5.0		6.0
	TTSuV2	6.333 ^a			7.179 ^b		6.155 ^a

VLL: 病変タイプに基づく平均ウイルス量

VLO: 病変の由来 (細菌性 vs ウイルス性) でグループ分けした時の平均ウイルス量

Table. 2 肺の顕微鏡学的病変と肺組織における TTSuV の検出結果。病変分類の割合は括弧内に表す。

Lesion Category	Lesion severity			TTSuV prevalence		TTV1+ or TTV2+	TTV1+ and TTV2+	TTV1- and TTV2-	TTV1+ and TTV2-	TTV1- and TTV2+
	Mild	Moderate	Severe	TTSuV1+	TTSuV2+					
CPBP (n = 17)	4 (24)	7 (41)	6 (35)	7 (41)*	13 (76)*	17 (100)	4 (24)	0	3 (18)	9 (53)
P (n = 8)	1 (13)	3 (38)	4 (50)	6 (75)	7 (88)	8 (100)	5 (63)	0	1 (13)	2 (25)
FNP (n = 6)	0	1 (17)	5 (83)	0*	4 (67)*	4 (67)	0	2 (33)	0	4 (67)
Total Bacterial (n = 31)	5 (16)	11 (35)	15 (48)	13 (42)*	24 (77)*	29 (94)	9 (29)	2 (6)	4 (13)	15 (48)
BIP (n = 2)	1 (50)	1 (50)	0	0*	2 (100)*	2 (100)	0	0	0	2 (100)
IP (n = 12)	6 (50)	6 (50)	0	4 (33)*	8 (67)*	10 (83)	2 (17)	2 (17)	2 (17)	6 (50)
Total Viral (n = 14)	7 (50)	7 (50)	0	4 (29)*	10 (71)*	12 (86)	2 (14)	2 (14)	2 (14)	8 (57)
Total Lesions (n = 45)	12 (27)	18 (40)	15 (33)	17 (38)*	34 (76)*	41 (91)	11 (24)	4 (9)	6 (13)	23 (51)
Controls (n = 18)	0	0	0	11 (61)*	18 (100)*	18 (100)	11 (61)	0	0	7 (39)
Total (n = 63)				28 (44)*	52 (83)*	59 (94)	22 (35)	4 (6)	6 (10)	30 (48)

* は TTSuV1 と TTSuV2 間の感染率に有意差があることを表す。

変を認めるサンプルでは、対照群 ($6.155 \pm 0.8 \log_{10}/\text{mg DNA}$) ($p = 0.014$) や細菌感染に由来する肺病変群 ($6.333 \pm 1.0 \log_{10}/\text{mg DNA}$) ($p = 0.048$) より高いウイルス量 ($7.179 \pm 1.25 \log_{10}/\text{mg DNA}$) であった。細菌感染に由来する肺病変群の TTSuV2 の平均 \log_{10} ウイルス量 ($6.333 \pm 1.0 \log_{10}/\text{mg DNA}$) は対照群と比較して差は認められなかった。

同様に全例で検出されたウイルス量は変動が大きく、TTSuV1 あるいは TTSuV2 の個々のウイルス量と病変の原因、病変タイプあるいは病変の重症度との間に関連性は認められなかった (Fig. 2)。

考察

世界中の病理部門や病院のアーカイブでは、病理学的解析の標準的な保存方法のため非常に多くの FFPE 組織が貯蔵されている。これらのサンプルは多くの研究のための DNA バンクであると言える。このような有利な点があるものの、組織サンプルのホルマリン固定は時間に依存した pH の低下によって DNA の保存への影響がみられる [7]。さらに、ホルマリンは PCR や他の分子生物学的解析の妨げとなり得る [26]。したがって、FFPE 組織を用いた定量的検定法で信頼できる結果を得るためには純度

が高く質の良い DNA を得る必要があり、最小限の手技での効果的な DNA 抽出法が必須である。このタイプのサンプルからのゲノム DNA の抽出方法はいくつか報告されている。キシレン/エタノールに基づく手法が最も多く使われており [8, 23, 25]、1.18 kb までの DNA 断片を保存できることが示されている [24]。本研究では、キシレン/エタノールによる脱パラフィンに基づいた DNA 抽出方法を実施しており、得られた DNA 量 (ng) と純度は凍結組織を用いた場合と比較して許容範囲にあるものだった。さらに、ハウスキーピング遺伝子の複製では本法がゲノム DNA を保存しサンプルから PCR 反応の阻害物質を除去することが示された。言うまでもなく、FFPE 組織からの DNA 抽出に基づく定量的検定法では凍結組織を用いた場合と比較してウイルスゲノム量の減少が見られる。それは既報にあるように [17]、保存時間に関連する DNA の劣化によるものかもしれない。しかしながら、そのようなゲノム量の減少と保存時間との関連性は本試験サンプルにおいては認められなかった。

FFPE 肺組織について、TTSuV 種の感染率とウイルス量を FFPE 組織からの DNA の使用に最適化した既報の定量的 PCR 法 [19] を用いて解析した。肺の様々な病理学的状態を考慮し、可能性のある感染

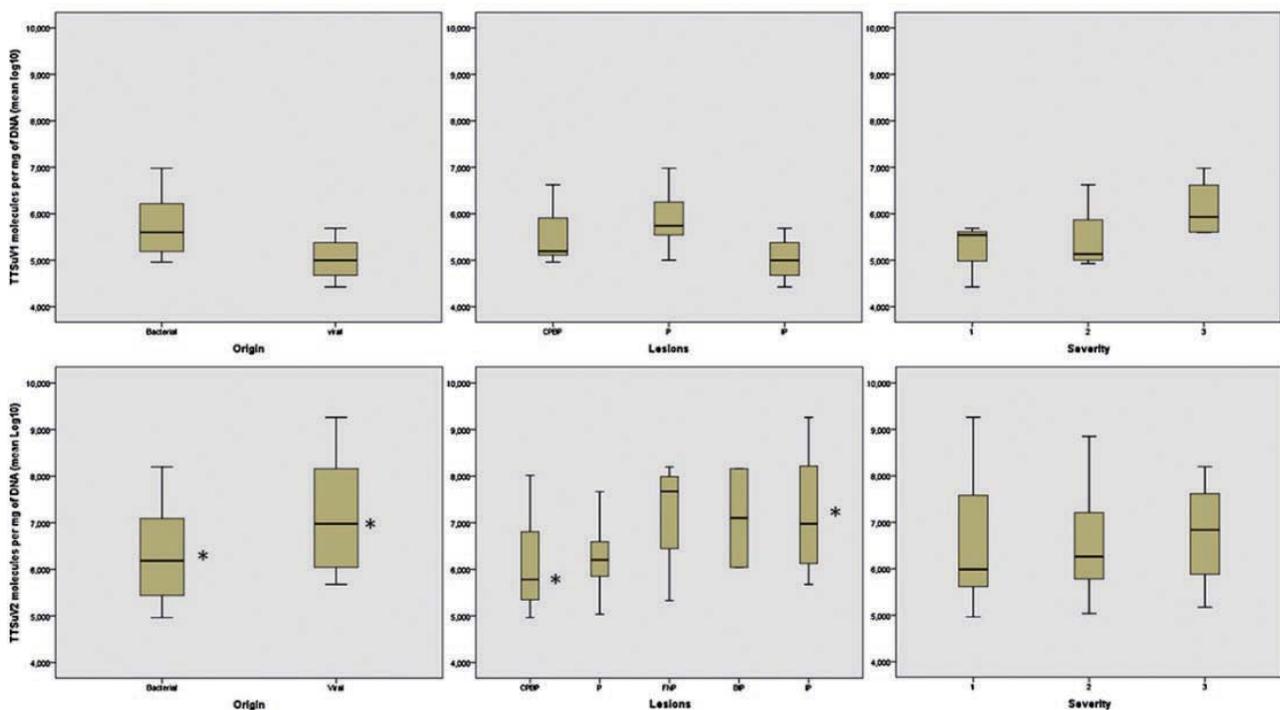


Fig. 2 病変の感染由来、病理組織タイプ及び重症度に対応する TTSuVs の \log_{10} ウイルス量の箱髷図 (ボックスプロット)。

* は平均ウイルス量の有意差。

性因子に基づいて病変をグループ分けした。この方法では、3つの病態（CPBP、胸膜炎及びFNP）を細菌感染に由来するものとし、2つの病態（IP及びBIP）はウイルス感染に由来するものとした。後者では、PRRSV、ADV及びSIV抗原とPCV2ゲノムの存在は除外された。この選択基準は認められた病変がこれらウイルスの単独あるいは複合感染によるものであることを避けるために重要であった。したがって、本研究の目的は他でいわれているようにTTSuVが呼吸器病の原因因子としての可能性があるかどうかを評価することである。豚の呼吸器病におけるTTSuV検出の最初の証明は日本で報告され、いずれのTTSuV種もPRDC罹患豚の血清から広く検出された[28]。そののちにPRDC罹患豚の肺でのTTSuV1の高率な感染が報告された[21]。本研究結果ではどちらのTTSuVも肺組織で検出され、試験サンプルでは特にTTSuV2が優勢であった。統計学的に、TTSuV2はTTSuV1と比較して全てのグループで高いウイルス量と感染率を示した。TTSuV2の平均ウイルス量は正常肺あるいは細菌感染を背景とする肺と比較してウイルス感染を背景とする肺において高い値を示した。この結果はこのTTSuV種がウイルス感染による肺の炎症性病変の形成機序において何らかの役割を果たしている可能性を示している。

TTSuVsの病変形成機序における役割についてはいくつかの研究で議論されているが、未だ検討の余地がある。簡潔にまとめると、スペインの野外状況下ではTTSuV2がTTSuV1と比較してよりPMWSに関与しており[1、13]、一方ノトバイオト豚をもちいたPCV2、PRRSVそれぞれとの共感染試験では、TTSuV1がPMWS及びPDNS様病態の発生に関連していた[5、14]。さらに、PMWSに関連する豚では健常豚と比較して高いウイルスDNA量と低い抗TTSuV2抗体の値が示された[10]。このような状態はTTSuV1については起こらず、ウイルス量と抗体レベルはPCVD罹患豚と非罹患豚間での差は見られなかった[11]。このようにPCV2感染による疾病への関連性が示される一方で、TTSuVsは豚のウイルス性疾患の発生機序において何ら役割を果たさないと指摘する研究報告もある[6、16]。

TTSuVsは肺病変を引き起こす可能性がある程度々記述され、特に間質性肺炎では、一次病原体と

してあるいは他のウイルス病原性因子（PCV2、PRRSV）と共感染することによって病原性を発揮する可能性がある。これを証明する最初の報告では、TTSuV1を暴露させたノトバイオト豚で軽度の間質性肺炎を引き起こすことが示された[5、14、15]。その後、TTSuV2でも同様にTTSuV2を含む肝臓乳剤を豚に接種することによって間質性肺炎を引き起こすことが示された[18]。これらの報告では肺やその他の臓器で病変が示されたが、それらは解剖時に臨床症状を示していなかった。これらの報告や本研究結果に基づく、TTSuV2は単独あるいは複合感染によって間質性肺炎の病変を引き起こすと思われる。本研究結果によると、これはTTSuV1では見られないようである。また細菌感染を原因とする病変におけるTTSuV2の検出率は対照群と大差なく、肺において検出されたウイルス量は無症状で感染している豚で予測される量かもしれないことを示している。

病変の重症度と切り離して、あるいは一緒に考えたとき、TTSuV2ウイルス量と病変との間に相関性は見られなかった。これはTTSuV2の病変形成に対する影響が比較的限局されており、おそらく多くのサンプルでそのような潜在的な関連性を見積もる必要があると思われた。

結論としては、本研究ではTTSuV1ではなくTTSuV2が豚に対して病原性を発揮する可能性が示され、特に間質性肺炎の原因となり得ることが示唆された。

TTSuV1とTTSuV2は遺伝的に異なるウイルスである。野外では両方のウイルスの共感染も一般的に認められ、抗原活性に対して交差反応性はない。これは病変形成能の違いや豚の他の病気への関連性の違いを説明し得る事象である。

Reference

1. Aramouni, M., Segalés, J., Sibila, M., Martín-Valls, G. E., Nieto, D. and Kekarainen, T. 2011. Torque teno sus virus 1 and 2 viral loads in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) affected pigs. *Vet. Microbiol.* **153** : 377–381.

2. Ballester, M., Sanchez, A. and Folch, J. M. 2005. Assignment of the betalactoglobulin (BLG) gene to porcine chromosome 1. *Anim. Genet.* **36** : 356–358.
3. Blomstrom, A. L., Belak, S., Fossum, C., Fuxler, L., Wallgren, P. and Berg, M. 2010. Studies of porcine circovirus type 2, porcine bocavirus and torque teno virus indicate the presence of multiple viral infections in postweaning multisystemic wasting syndrome pigs. *Virus Res.* **152** : 59–64.
4. Caswell, J. L. and Williams, K. 2007. The respiratory system. *In* : Maxie, M.G., *et al.* (Eds.), Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals. 5th ed. Elsevier, Edinburgh, pp. 523–655.
5. Ellis, J. A., Allan, G. and Krakowka, S. 2008. Effect of coinfection with genogroup 1 porcine torque teno virus on porcine circovirus type 2-associated postweaning multisystemic wasting syndrome in gnotobiotic pigs. *Am. J. Vet. Res.* **69** : 1608–1614.
6. Gauger, P. C., Lager, K. M., Vincent, A. L., Opriessnig, T., Kehrl Jr., M. E. and Cheung, A. K. 2011. Postweaning multisystemic wasting syndrome produced in gnotobiotic pigs following exposure to various amounts of porcine circovirus type 2a or type 2b. *Vet. Microbiol.* **153** : 229–239.
7. Gilbert, M. T., Haselkorn, T., Bunce, M., Sánchez, J. J., Lucas, S. B., Jewell, L. D., Van Marck, E. and Worobey, M. 2007. The isolation of nucleic acids from fixed, paraffin-embedded tissues—which methods are useful when? *PLoS ONE* **2**, e537.
8. Goelz, S. E., Hamilton, S. R. and Vogelstein, B. 1985. Purification of DNA from formaldehyde fixed and paraffin embedded human tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **130** : 118–126.
9. Grau-Roma, L. and Segalés, J. 2007. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, porcine circovirus type 2, swine influenza virus and Aujeszky's disease virus in cases of porcine proliferative and necrotizing pneumonia (PNP) in Spain. *Vet. Microbiol.* **119** : 144–151.
10. Huang, Y. W., Harrall, K. K., Dryman, B. A., Beach, N. M., Kenney, S. P., Opriessnig, T., Vaughn, E. M., Roof, M. B. and Meng, X. J. 2011. Expression of the putative ORF1 capsid protein of Torque teno sus virus 2 (TTSuV2) and development of Western blot and ELISA serodiagnostic assays: correlation between TTSuV2 viral load and IgG antibody level in pigs. *Virus Res.* **158** : 79–88.
11. Huang, Y. W., Harrall, K. K., Dryman, B. A., Opriessnig, T., Vaughn, E. M., Roof, M. B. and Meng, X. J. 2012. Serological profile of Torque teno sus virus species 1 (TTSuV1) in pigs and antigenic relationships between two TTSuV1 genotypes (1a and 1b), between two species (TTSuV1 and 2), and between porcine and human anelloviruses. *J. Virol.* **86** : 10628–10639.
12. Kekarainen, T. and Segalés, J. 2012. Torque Teno Sus Virus in Pigs: an emerging pathogen? *Transbound Emerg. Dis.*, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1865-1682.2011.01289.x>.
13. Kekarainen, T., Sibila, M. and Segalés, J. 2006. Prevalence of swine Torque teno virus in postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS)-affected and non-PMWS-affected pigs in Spain. *J. Gen. Virol.* **87** : 833–837.
14. Krakowka, S. and Ellis, J. A. 2008. Evaluation of the effects of porcine genogroup 1 torque teno virus in gnotobiotic swine. *Am. J. Vet. Res.* **69** : 1623–1629.
15. Krakowka, S., Hartunian, C., Hamberg, A., Shoup, D., Rings, M., Zhang, Y., Allan, G. and Ellis, J. A. 2008. Evaluation of induction of porcine dermatitis and nephropathy syndrome in gnotobiotic pigs with negative results for porcine circovirus type 2. *Am. J. Vet. Res.* **69** : 1615–1622.
16. Lee, S. S., Sunyoung, S., Jung, H., Shin, J. and Lyoo, Y. S. 2010. Quantitative detection of porcine Torque teno virus in Porcine circovirus-2-negative and Porcine circovirus-associated disease-affected pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*

- 22 : 261–264.
17. Ludyga, N., Grunwald, B., Azimzadeh, O., Englert, S., Hofler, H., Tapio, S. and Aubele, M. 2012. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchow Arch.* **460** : 131–140.
18. Mei, M., Zhu, L., Wang, Y., Xu, Z., Zhao, L., Peng, X., Wu, Y., Li, S. and Guo, W. 2011. Histopathological investigation in porcine infected with torque teno sus virus type 2 by inoculation. *Virol. J.* **8** : 545.
19. Nieto, D., Aramouni, M., Grau-Roma, L., Segalés, J. and Kekarainen, T. 2011. Dynamics of Torque teno sus virus 1 (TTSuV1) and 2 (TTSuV2) DNA loads in serum of healthy and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) affected pigs. *Vet. Microbiol.* **152** : 284–290.
20. Okamoto, H. 2009. History of discoveries and pathogenicity of TT viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **331** : 1–20.
21. Rammohan, L., Xue, L., Wang, C., Chittick, W., Ganesan, S. and Ramamoorthy, S. 2012. Increased prevalence of torque teno viruses in porcine respiratory disease complex affected pigs. *Vet. Microbiol.* **157** : 61–68.
22. Rosell, C., Segalés, J., Plana-Durán, J., Balasch, M., Rodríguez-Arriola, G. M., Kennedy, S., Allan, G. M., McNeilly, F., Latimer, K. S. and Domingo, M. 1999. Pathological, immunohistochemical, and in situ hybridization studies of natural cases of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs. *J. Comp. Pathol.* **120** : 59–78.
23. Santos, M. C., Saito, C. P. and Line, S. R. 2008. Extraction of genomic DNA from paraffin-embedded tissue sections of human fetuses fixed and stored in formalin for long periods. *Pathol. Res. Pract.* **204** : 633–636.
24. Santos, S., Sa, D., Bastos, E., Guedes-Pinto, H., Gut, I., Gartner, F. and Chaves, R. 2009. An efficient protocol for genomic DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Res. Vet. Sci.* **86** : 421–426.
25. Shi, S. R., Datar, R., Liu, C., Wu, L., Zhang, Z., Cote, R. J. and Taylor, C. R. 2004. DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: heat-induced retrieval in alkaline solution. *Histochem. Cell Biol.* **122** : 211–218.
26. Stanta, G. and Schneider, C. 1991. RNA extracted from paraffin-embedded human tissues is amenable to analysis by PCR amplification. *BioTechniques* **11** : 304, 306, 308.
27. Straw, B. E., Backstrom, L. and Leman, A. D. 1986. Evaluation of swine at slaughter, Part 1. Sample size, mechanics of examination, scoring systems and seasonal effects. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* **8** : S41–S47.
28. Taira, O., Ogawa, H., Nagao, A., Tuchiya, K., Nunoya, T. and Ueda, S. 2009. Prevalence of swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 in Japanese swine with suspected post-weaning multisystemic wasting syndrome and porcine respiratory disease complex. *Vet. Microbiol.* **139** : 347–350.



—— テーマは「生命の連鎖」——
 生命の「共生・調和」を理念とし、生命体の豊かな明日と、研究の永続性を願う気持ちを快いリズムに整え、視覚化したものです。カラーは生命の源、水を表す「青」としています。

表紙題字は故中村稔治博士の揮毫

日生研たより 昭和30年9月1日創刊(隔月1回発行)
 (通巻579号) 平成25年2月25日印刷 平成25年3月1日発行(第59巻第2号)
 発行所 一般財団法人 日本生物科学研究所
 〒198-0024 東京都青梅市新町9丁目2221番地の1
 TEL : 0428(33)1056(企画学術部) FAX : 0428(33)1036
 発行人 林志鋒
 編集室 委員/堤 信幸(委員長)、大嶋 篤、山下 龍
 事務/企画学術部
 印刷所 株式会社 精興社
 (無断転載を禁ず)