

豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) の制御および診断に関する研究の 進捗状況

(独)動物衛生研究所 ウイルス病研究チーム 恒光 裕

昨年度（平成18年度）より、農水省の先端技術を活用した農林水産研究高度化事業において、研究課題「豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）の制御のための飼養衛生管理技術の高度化」を日本養豚開業獣医師協会（JASV）と動物衛生研究所（動衛研）との共同研究として開始した。研究期間は平成18～20年度の3年間で、PRRSの発生リスク低減のための衛生技術開発をめざす。現在、日清丸紅飼料(株)矢原芳博先生ら多くの方々の協力を受けてPRRSの野外調査を実施中である。

一方、平成18年度において、JASVが窓口となって養豚関連の多くの団体、企業より動衛研にPRRS診断技術の高度化に関する研究支援を頂いた。この研究支援によりPRRSウイルス抗体検査法に係わる研究の一部を実施した。以下、平成18年度に得られたこれらの研究成績について、その概要を紹介する。

1. 豚繁殖・呼吸障害症候群の制御のための飼養衛生管理技術の高度化

1) 研究の構成

本研究は野外調査を研究基軸とし、以下の3つの内容を柱とする。

① PRRSの疫学実態と伝播・存続様式の解明

大規模養豚場を対象にアクティブサーベイランスを実施してPRRSによる被害実態を調査するとともに、PRRSウイルスの感染時期や伝播経路等を解明する。

② PRRSの制御を目的とした飼養衛生管理技術の開発

モデル農場を設定してオールイン・オールアウト等のピッグフロー管理、また上記①で明らかにしたウイルス伝播経路の遮断等により、PRRSウイルスの制御あるいは清浄化を試みる。最終的に得られた知見を総合し、PRRS制御のためのガイドラインを作成する。

③ PRRSによる経済損失とPRRS制御の費用対効果

PRRSによって生じる経済的な被害について損失調査法等を用いて算出する。また、PRRSに対する各種制御技術に対して、被害軽減への影響を費用・便益法等を用いて比較し、理想的なPRRS制御技術の選択方法について検討するとともに、各制御技術の費用対効果を検証する。

2) 成績

3年間にわたるPRRSのアクティブサーベイランスの対象農場として5農場（A～E）を選定し、PRRSのウイルス学的調査を開始した。各農場において年間2回の定期検査ならびに異常時検査を行い、PRRSウイルスの農場内動態や流行株が時期や臨床状態の違いによりどのように変化するかを検討し、PRRS対策に役立てることを目的とする。

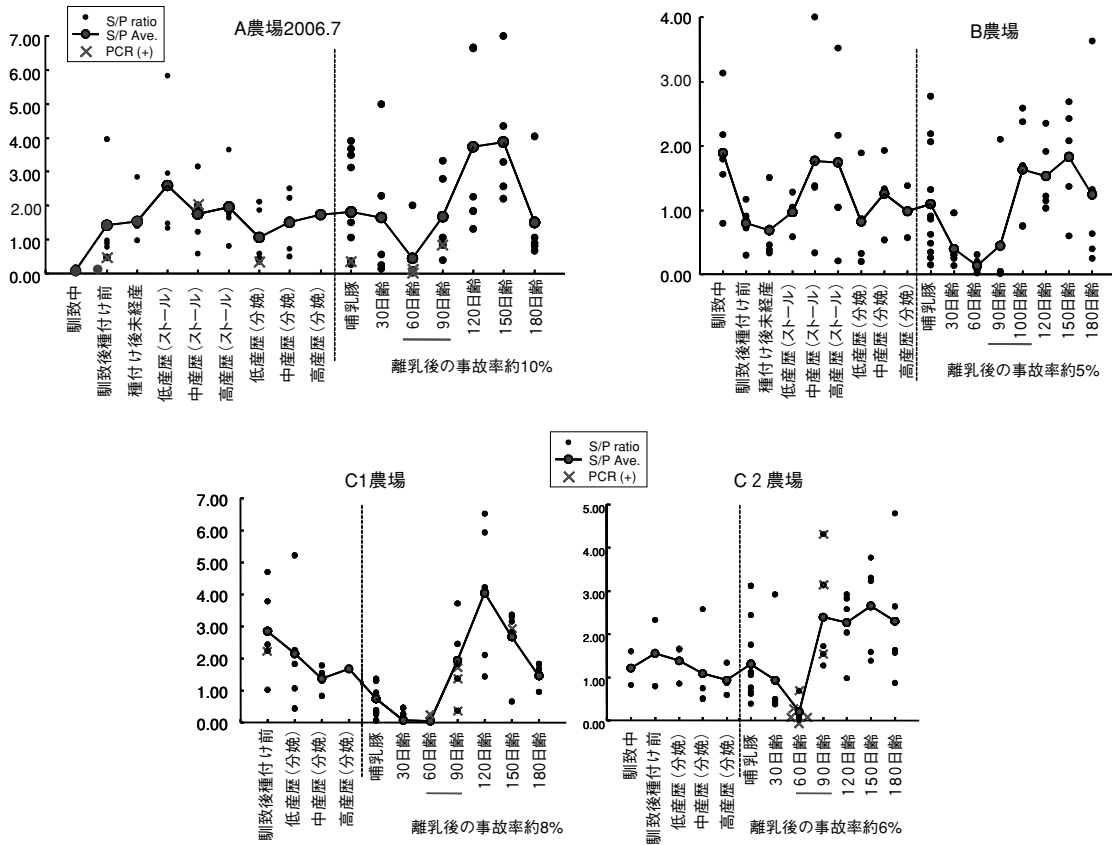


図1 生産ステージ別のPRRS ELISA抗体価 (S/P比; 縦軸) とウイルス遺伝子の検出 (A-C農場; 2006年夏)

第1回目の調査において、A農場（母豚規模550頭）、B農場（母豚規模500頭）、C1農場（母豚規模350頭）およびC2農場（母豚規模300頭）ではいずれも、PRRSウイルスの主な感染時期は60～90日齢であったが、A農場においては一部哺乳豚および母豚でもウイルスが検出されたことから、離乳後の水平感染に加え、母子感染が示唆された（図1）。A農場の子豚損耗率はB、C1およびC2農場に比較して高く、PRRSの影響が示唆された。

D農場（母豚規模130頭）では、抗体が検出されたのは繁殖候補豚と肥育後期の一部だけであり（4/58頭）、PRRSウイルスの浸潤率は極めて低かった。E農場（母豚規模1,800頭）では、抗体検査により繁殖舎でウイルス感染は確認されたが、肉豚において肥育前期まで抗体は認められなかった（図2）。E農場における肥育豚のウイルス感染源を解明する目的で、哺乳豚のウイルス検査を頻回実施した結果、いずれも陰性で

あった。このことから、感染源として肥育舎でのウイルスの存続が推測された。

各農場において、発育不良と呼吸器症状あるいは神経症状を呈した離乳豚ならびに肥育豚の解剖検査を実施した（各農場1～11頭）。その結果、大変興味深いことに肥育豚の肺におけるPRRSウイルス抗原は免疫組織染色によりA、B、C1およびC2農場では確認されたが、肥育前・中期までPRRSウイルス抗体が確認されなかったDとE農場ではPRRS抗原は検出されなかった。このことから、従来からいわれているように、肉豚において離乳舎までPRRSウイルスの感染を阻止することができればPRRSによる肺炎発現の低減が図れることが示唆された。検出されたPRRSウイルスは、遺伝学的に農場ごとに区別された（図3）。

A農場において、定期的なサーベイランス以外の時期に、流死産、子豚の死亡率上昇等PRRSによると思われる疾病の流行が認められた。PRRS流行時の血

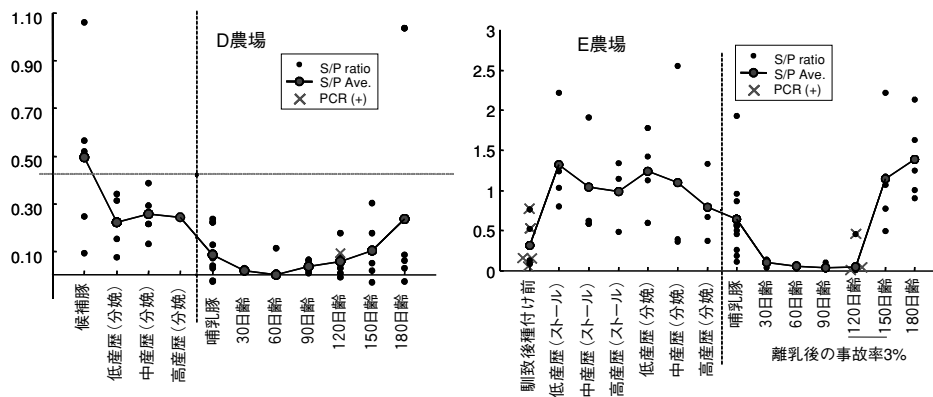


図2 生産ステージ別のPRRS ELISA抗体価 (S/P比; 縦軸) とウイルス遺伝子の検出 (D、E農場; 2006年夏)

液検査において、母豚、特に中・高産歴母豚のELISA抗体価 (S/P比) が定期採材時に比べて高かったこと、子豚でのELISA抗体値の低下が認められなかったこと、多数の哺乳豚でPCR陽性を示したこと等が特徴としてあげられた (図4)。また、注目すべき点として、検出されたPRRSウイルスは定期採材時に検出されたウイルスと遺伝学的に明瞭に区別された (図3、図5)。すなわち、定期検査時 (2006年7月) において検出されたウイルスは単一株 (図5での系統B) であったのに対し、PRRS流行時 (2006年10月、11月) では、この株に加えて新たに2種の系統 (図5での系統AとC) の株が検出された。このことは、元々農場には複数の株が存在してそれが顕在化した、あるいは、外部から新たな株が侵入したためと推測された。したがって、PRRSウイルス陽性農場においても、複数株を存在させないこと、すなわち、外部から新たな株を入れないことがPRRS対策上非常に重要であり、バイオセキュリティ強化の必要性が示された。

一方、PRRS流行による経済損失は、死亡により無駄となった生産費と、それぞれの生産ステージの死亡豚数より、

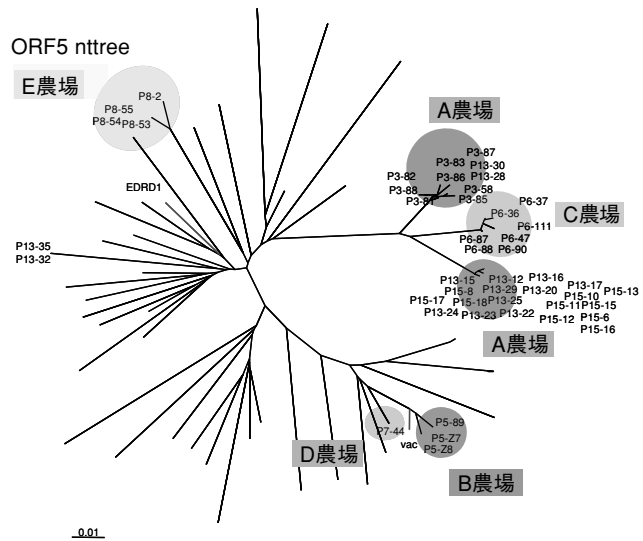


図3 PRRSウイルスの分子系統樹

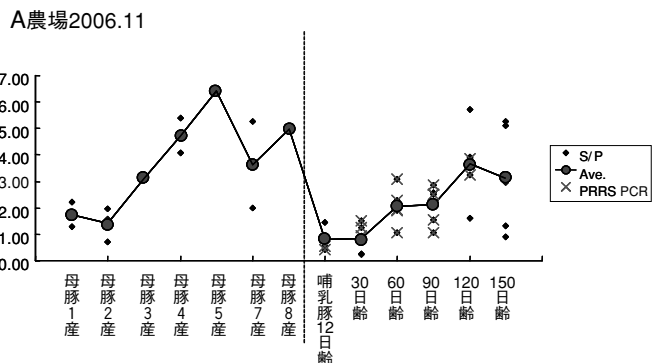


図4 A農場におけるPRRS流行時のELISA抗体価 (S/P比; 縦軸) とウイルス遺伝子の検出

3,715万円（内、哺乳豚 961万円、離乳豚 1,316万円、肥育豚 1,438万円）と推定された。

A農場はPRRS流行後に肥育専門農場に移行したため、調査対象から除外した。第2回目の定期調査（2007年冬季）において、B農場では肉豚におけるELISA値の上昇日齢が遅くなったこと（120日齢で上昇確認）（図6）、検出されたPRRSウイルスは遺伝学的に第1回目の調査時に検出されたウイルスときわめて近縁であったこと等が明らかとなった。C1農場においては、肉豚におけるELISA値の上昇日齢が遅くなったこと（120日齢で上昇確認）が特徴としてあげられた

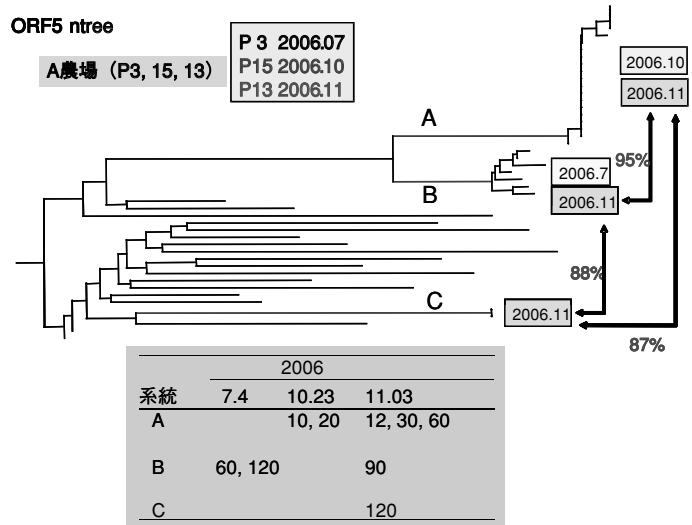


図5 A農場におけるPRRSウイルスの遺伝学的多様性

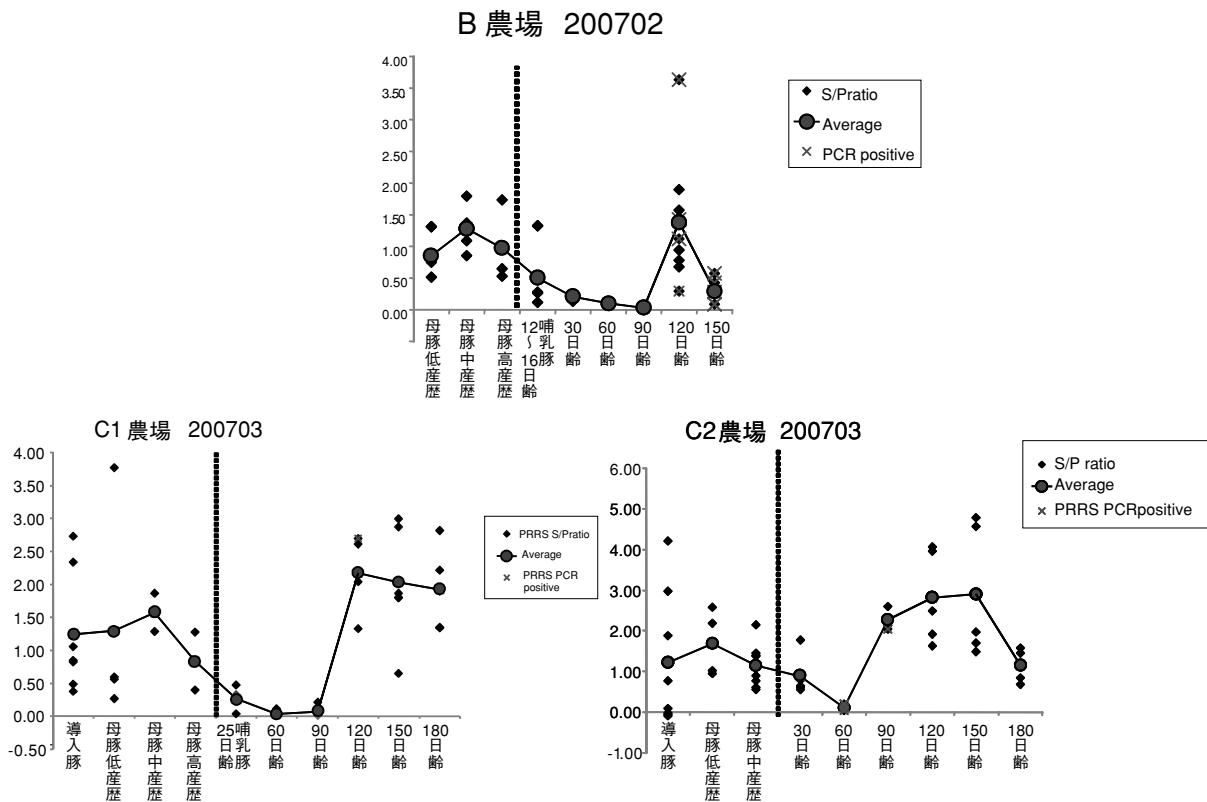


図6 生産ステージ別のPRRS ELISA抗体価（S/P比；縦軸）とウイルス遺伝子の検出（A-C農場；2007年冬）

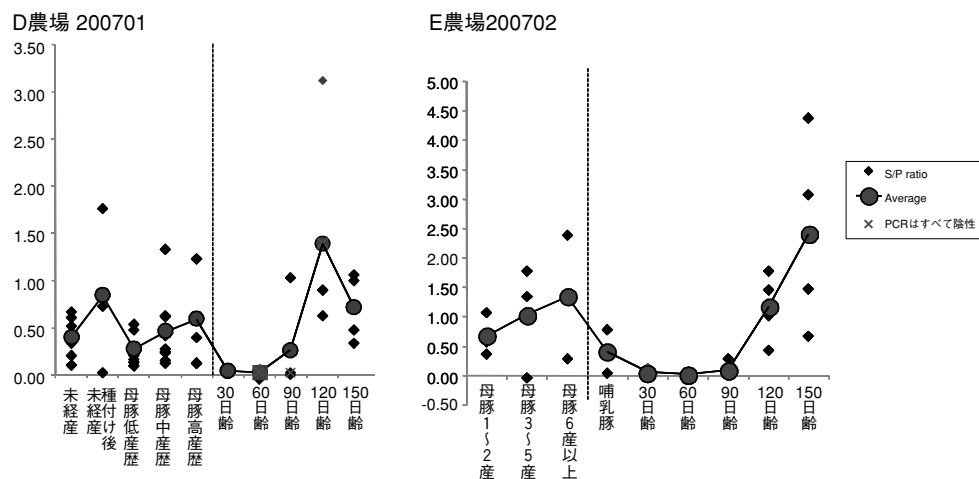


図7 生産ステージ別のPRRS ELISA抗体価（S/P比；縦軸）とウイルス遺伝子の検出（D、E農場；2007年冬）

（図6）。C2農場では、第1回目の抗体の推移と大きな変化は認められなかった。これら農場から検出されたPRRSウイルスは第1回目のそれらと遺伝学に極めて近縁であった。

D農場においては、第1回目の採材後にオーエスキー病（AD）の流行が認められ、当該ワクチンの一斉接種が実施された。このためか、第2回目の採材時において、母豚ならびに肉豚でのPRRSウイルスの感染が確認された（図7）。第2回目の採材時に検出されたウイルスは遺伝学的に第1回目のそれとほぼ同一であった。E農場においては、第1回目の採材時と比較して、肉豚の抗体上昇日齢が若干早まる結果となった（図7）。いずれの材料からもPRRSウイルスは検出されなかった。これら農場において第1回目と第2回目の採材時間で事故率の大きな変動は認められなかった。これら成績の要点は以下の通りである。

- ・定期検査時の一部農場において哺乳豚および母豚の血液からPRRSウイルスが検出されたことから、母子感染が示唆された。よって、流死産がみられなくても母豚群でのウイルス感染は時に起こり、母子感染の原因となる可能性がある。

- ・肥育初期までウイルス感染のない大規模農場が存在し、当該農場での事故率は非常に低かった。

- ・PRRSウイルスは農場毎に遺伝学的に区別される場

合が多い。

- ・PRRSウイルス陽性農場におけるPRRSの流行は、外部からの新たなウイルス株の侵入、あるいは、農場内での複数株の存在がその発生要因として考えられた。

- ・PRRSの流行が認められなかった農場においては、約6ヵ月経過しても検出されるPRRSウイルスは極めて近縁な株であった。

2. PRRSウイルス抗体検査法の高度化

PRRSウイルスに対する抗体検査は、市販のELISAキットを用いて行われることが一般的である。しかし、

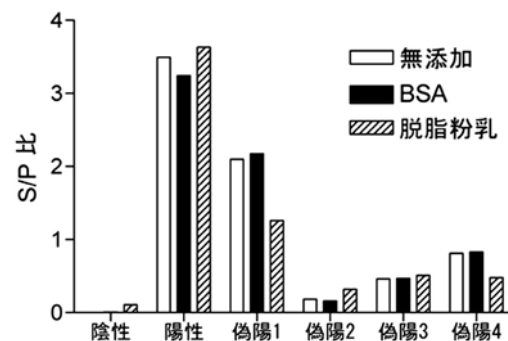


図8 ブロッキング反応ならびにブロッキング剤添加による偽陽性血清のELISA値

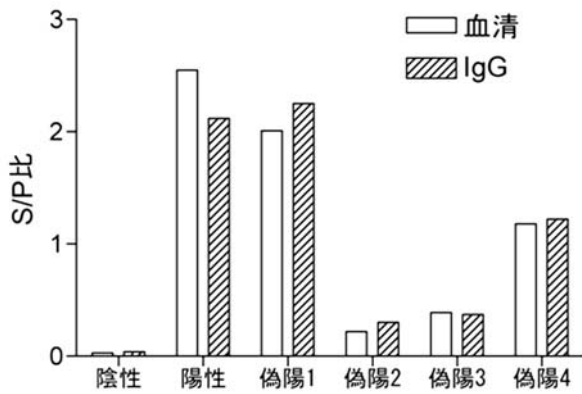


図9 偽陽性血清から精製したIgGのELISA値

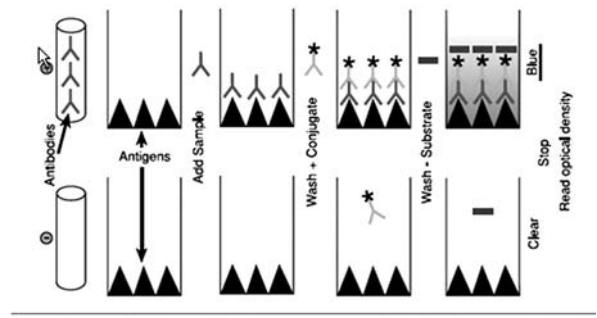
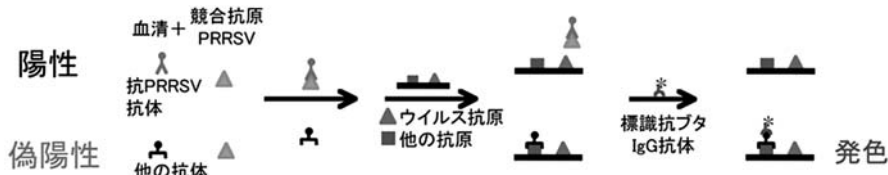


図10 PRRS ELISAキットの原理

(A) 競合 ELISA



(B) 阻害 ELISA

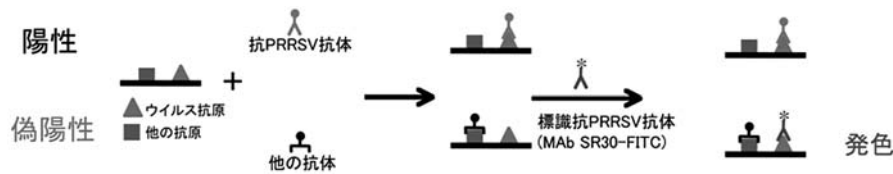


図11 競合 ELISA (A) ならびに阻害 ELISA (B) の原理

時にウイルス陰性農場由来の血清検体で陽性を示す例が認められる。そこで、この偽陽性反応の特性を調べ、さらに当該 ELISA の変法により抗体の有無を確認する方法を検討した。ELISA キットは IDEXX 社の製品を用いた。

まず、血清材料等の非特異的吸着の影響を明らかにする目的で、ウェルへの血清添加前にブロッキング反応の追加、また、キットに添付された血清希釈液ならびに HRPO 標識抗豚 IgG 抗体 (二次抗体) 液にブロッキング剤の添加を行った。ブロッキング剤は、牛血清アルブミン (BSA) あるいはスキムミルクを使用した。その結果、いずれのブロッキング剤によるブロッキング反応ならびに添加によっても偽陽性血清での

ELISA 値に変化はみられなかった (図8)。

次に、偽陽性血清からプロテイン A カラムを用いて IgG を精製して ELISA を行った。なお、IgG 濃度を単純放射免疫拡散法により測定し、精製 IgG と血清中 IgG の濃度を同一にして反応させた。その結果、精製した IgG を用いても、ELISA キットにおける偽陽性反応に変化はなかった (図9)。

さらに、当該キットを基に (図10)、競合 ELISA ならびに阻害 ELISA を実施した。競合 ELISA は、血清検体を濃縮 PRRS ウイルスあるいは濃縮 MARC-145 細胞抗原と前もって反応させた後、ELISA ウェルに添加した (図11A)。阻害 ELISA は、血清検体をウェルに添加反応させた後、キット添付の二次抗体の代わりに

HRPでラベルした抗PRRSウイルス単クローン抗体SR30を反応させた(図11B)。

偽陽性検体73例はIFAではすべて陰性を示し、89%は競合および阻害ELISAで陰性を示した(図12, 図13)。更にELISAで陽性かつIFAで陽性を示した検体の96%は競合および阻害ELISAで陽性を示した。

これらの結果から、偽陽性反応はウイルス抗原とは異なる抗原抗体反応によるものであることが示唆された。今回実施した阻害ELISAや競合ELISAにより、偽陽性検体の多くは陰性と判定された。今後、検体数を増やして今回のELISA変法の実用性について更に評価していく予定である。

なお、動衛研におけるこれらの実験分析について、PRRS制御に係わる部分は吉井雅晃氏、芝原友幸氏および山根逸郎氏が、またPRRS ELISAに係わる部分は沖永龍之氏および日本全薬工業(株)山岸健氏がそれぞれ中心となって実施した。

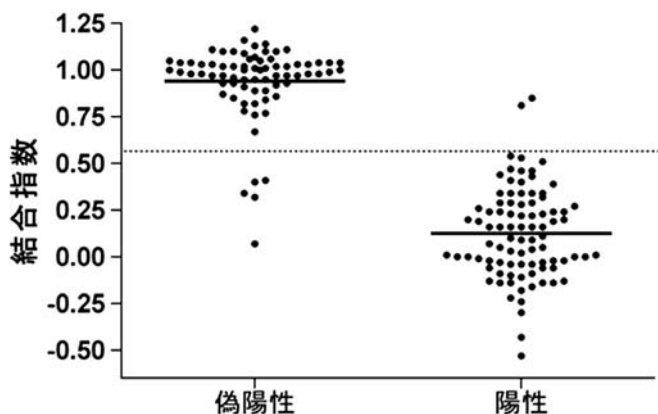


図12 競合ELISAによる野外検体の反応性

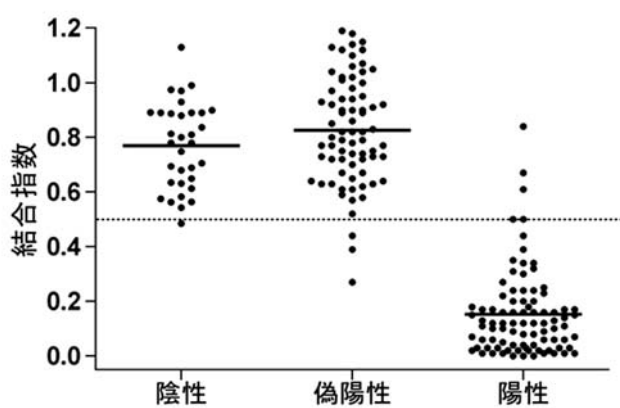


図13 阻害ELISAによる野外検体の反応性