

研究

と畜場搬入豚の豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス 保有状況と肺病変との関係

江口 直、西村英之、西村 肇、佐藤由美、中田 聡、萩原康則

宮城県食肉衛生検査所

要 約

豚繁殖・呼吸障害症候群 (Porcine reproductive and respiratory syndrome: PRRS) は、全国的に蔓延しており、家畜伝染病予防法で監視伝染病に定められている。また、2004年に全部廃棄対象疾病として、と畜場法施行規則に追加されている。今回、PRRSVの感染を疑う特異的な肉眼病変の探索を目的として、と畜場に搬入された豚のPRRSV遺伝子保有状況と豚の発育状態ならびに肺病変について調査した。その結果、PRRSV遺伝子は化膿性肺炎、特に発育不良豚から高率に検出される傾向を認めた。

I. はじめに

豚繁殖・呼吸障害症候群 (Porcine reproductive and respiratory syndrome: PRRS) は、母豚では流死産などの繁殖障害、育成・肥育豚では肺炎などの呼吸障害を主徴とするPRRSウイルス (PRRSV) による監視伝染病である。PRRSは日本で1993年に初めて診断されてから全国各地で流行し、現在その経済被害額は約280億円と推定される¹⁾。PRRSV陽性農場の割合は国内の70%以上、陽性農場の豚のPRRSV抗体陽性率は90%以上との報告もある^{1,2)}。

しかし、全国のPRRSの発生件数は年間で約100件であり³⁾、これはPRRSVが他の病原体と混合感染することで多様な呼吸器障害を示すため、育成・肥育豚の臨床症状のみからPRRSを疑うことが困難であるためと考えられる。一方で、と畜検査では2004年にPRRSが全部廃棄対象疾病に追加されたが、と畜場搬入豚におけるPRRSVの保有状況や解体所見に関する報告は、ほとんどみられない。今回、と畜検査のPRRSの診断に寄与することを目的として、PRRSの主徴病変といわれる発育不良や肺病変に着目し、と畜場搬入豚のPRRSV遺伝子の保有状況と肺病変との関係を調査した。

II. 材料および方法

1 肥育豚の肺病変調査

当所で所管すると畜場に2018年11月～2019年1月に一般畜として搬入された6ヶ月齢の正常発育豚130頭 (5農場) と発育不良豚30頭 (4農場) の肺を採材し、病変により分類した。

2 RT-PCR

(1) 検体前処理

肺組織100mgにリン酸緩衝液 (PBS) 900 μ lを加えFastPrep (funakoshi Co. Japan) で細胞破碎処理 (5m/秒、1分間、室温) 後、遠心分離 (12,000g、10分間、4 $^{\circ}$ C) し、その上清 (10%乳剤) を回収した。また、肺組織100mgにPBS 800 μ lとインゲルパック[®]PRRS生ワクチン100 μ l ($10^{4.6-6.4}$ TCID₅₀/ml) を加えFastPrepで細胞破碎処理後、遠心分離 (12,000g、10分間、4 $^{\circ}$ C) して回収した上清を陽性コントロールとして使用した。

(2) RNA抽出

10%乳剤ないし陽性コントロールにISOGEN (Japan gene Co. Japan) 400 μ lを加え、十分混

和し、室温で5分間静置後、クロロホルム100 μ lを加えて攪拌した。これを遠心分離(12,000g、10分間、4℃)し、上清中のRNAを抽出した。抽出したRNAをエタノール・プロパノール沈殿法により濃縮、乾燥後100 μ lの滅菌蒸留水で溶解し、RNAを得た。

(3) 検出用Primer

Konoらのプライマー⁴⁾を使用し、PRRSVのOpen Reading Frame 6~7領域を増幅した。

(4) RT-PCRおよび電気泳動の条件

RT-PCRはOnestep RT-PCR kit (QIAGEN, Germany)を用い、50℃30分、95℃15分、94℃30秒・50℃30秒・72℃1.5分を40サイクル、72℃10分間の反応終了後に、0.8%アガロースゲルを用いて、135V、30分間泳動後668bp付近の特異的バンドを検出した。

Ⅲ. 結果

1 正常発育豚のPRRSV保有状況と肺病変

正常発育豚の肺のPRRSV遺伝子検出率は7.7% (10/130)であり、農場ごとの検出率は0~15.4%であった(表1)。また、採材した肺を著変無し、胸膜炎、間質性肺炎、カタル性肺炎、化膿性肺炎⁹⁾に分類した。なお、一つの肺に複数の病変がある場合は各病変別々に集計した。各肺病変の発生率は、カタル性肺炎53.1% (69/130)、間質性肺炎36.9% (48/130)、著変無し33.1% (43/130)、化膿性肺炎12.3% (16/130)、胸膜炎6.9% (9/130)であり(図1)、各肺病変からのPRRSV遺伝子の検出率は化膿性肺炎37.5% (6/16)、間質性肺炎14.6% (48/130)、カタル性肺炎10.1% (7/69)、著変無し0% (0/43)であった(図2)。

表1 正常発育豚の各農場の肺病変とPRRSV遺伝子検出率

	A農場	B農場	C農場	D農場	E農場	合計	PRRSV陽性率(%)
著変無し	10	16	8	4	5	43	0
胸膜炎	0	3	3	3	0	9	0
間質性肺炎	11	2	15 (4)	10 (2)	10 (1)	48 (7)	14.6
カタル性肺炎	14	7	5 (1)	22 (2)	19 (4)	69 (7)	10.1
化膿性肺炎	1	0	5 (2)	4 (1)	6 (3)	16 (6)	37.5
各農場の検体数	26	26	26	26	26	130	
PRRSV陽性数	0	0	4	2	4	10	
PRRSV陽性率(%)	0	0	15.4	7.7	15.4	7.7	

0内はPRRSV陽性数

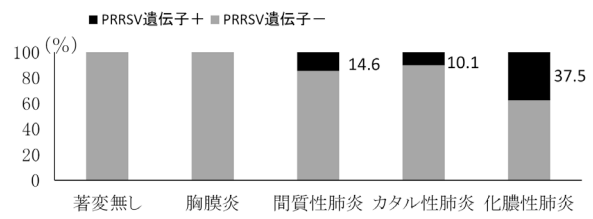


図1 正常発育豚の肺病変の発生率

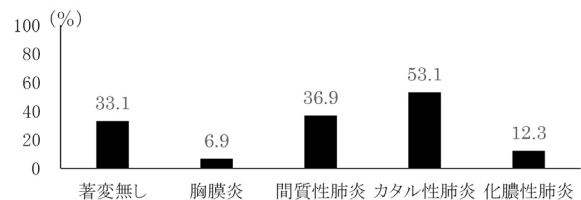


図2 正常発育豚の肺病変のPRRSV遺伝子検出率

2 発育不良豚のPRRSV保有状況と肺病変

発育不良豚の肺のPRRSV遺伝子検出率は40% (12/30)であり、農場ごとの検出率は0~45.5%であった(表2)。また、採材した肺を正常発育豚と同様に分類した。各肺病変の発生率は、カタル性肺炎80% (24/30)、間質性肺炎60% (18/30)、化膿性肺炎23% (7/30)、胸膜炎10% (3/30)、著変無し6.7% (2/30)であり(図3)、各病変からのPRRSVの検出率は化膿性肺炎57.1% (4/7)、間質性肺炎55.6% (10/18)、カタル性肺炎41.7% (10/24)、著変無し0% (0/2)であった(図4)。

表2 発育不良豚の各農場の肺病変とPRRSV遺伝子検出率

	F農場	G農場	H農場	農場	合計	PRRSV陽性率(%)
著変無し	1	1	0	0	2	0
胸膜炎	2	1	0	0	3	0
間質性肺炎	7 (5)	5 (2)	4 (3)	2	18 (10)	55.6
カタル性肺炎	8 (4)	7 (3)	5 (3)	4	24 (10)	41.7
化膿性肺炎	3 (2)	2 (1)	2 (1)	0	7 (4)	57.1
各農場の検体数	11	10	5	4	30	
PRRSV陽性数	5	4	3	0	12	
PRRSV陽性率(%)	45.5	40.0	40.0	0	40.0	

0内はPRRSV陽性数

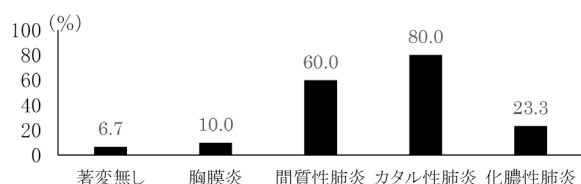


図3 発育不良豚の肺病変の発生率

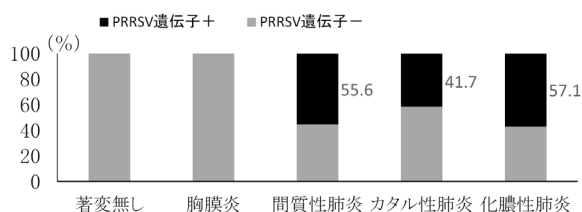


図4 発育不良の肺病変のPRRSV遺伝子検出率

IV. 考 察

今回、正常発育豚の肺組織におけるPRRSVの遺伝子検出率は7.7%で、英国、米国でのPRRSV遺伝子検出率の約4%^{5,6)}より高かった。これは、他国の報告が口腔液を検体としているが、今回の検体が生体内で最もウイルス残存期間が長く、ウイルス力価が高い肺¹⁾であったため、PRRSV遺伝子検出率が高い傾向にあったと推察した。また、国内の豚からのPRRSV抗原検出率は6%程度¹⁰⁾、PRRSV抗体陽性率は40~50%⁸⁾であり、と畜場でのPRRSV遺伝子検出率は抗体陽性率と比較して低値であった。これは、PRRSVの感染時期が生後1~2ヶ月齢が多く^{9,10)}、組織中のウイルス残存期間が約2~3ヶ月¹⁾であるため、回復後の豚がと畜場に搬入されている、あるいはワクチン接種による抗体価の上昇によるものと考えた。

PRRSVは単独感染により間質性肺炎を示すが、他の病原体と混合感染することで多様な病変を示す。今回、PRRSに類する肺病変に焦点を当て、それらの病変の発生率とPRRSVの遺伝子検出率を算出した。カタル性肺炎や間質性肺炎はPRRSV遺伝子が検出されない農場でも発生率が高く、特異的病変とは言えなかった。一方で、化膿性肺炎でPRRSVが検出される割合が最も多く、特に発育不良豚ではその傾向が強かった。化膿性肺炎は一般に細菌感染による病変である¹¹⁾が、PRRSVは肺胞マクロファージを標的として宿主免疫抑制を示し、またグラム陰性菌の細胞壁成分であるLPSと結合することで重度の呼吸器症状を起こす^{11,12)}。そのため、細菌による二次感染である化膿性肺炎の発生が増加し、化膿性肺炎から高率にPRRSV遺伝子が検出されたと考察する。以上の結果より、解体所見からPRRS

と診断するためには豚の発育状態と肺の病変を総合的に判断することが重要であると考えた。今後は肺からPRRSV抗原の免疫染色やウイルス粒子の検出によるウイルス存在の証明を行い、と畜検査に即したPRRSの診断法について検討したい。

引用文献

- 1) 高木 道浩他 (2011) 豚繁殖・呼吸器症候群 (PRRS) とは、社団法人中央畜産会
- 2) 石関 紗代子, 石川 弘道, 足立 吉数他 (2014) 日本の養豚場におけるPRRS (豚繁殖・呼吸障害症候群) の浸潤状況と生産成績との関連の調査, 日本畜産学会報, 85巻2号, pp.171-177
- 3) 平成29年次監視伝染病の発生状況 (2018) 農林水産省ホームページより
- 4) Kono Y. Toru K. Shunji Y. et al. (1996) Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs, J vet Med Sci., 58(10), pp.941-946
- 5) Frossard J.P. Grierson S. Cheney T. et al. (2017) UK Pigs at the Time of Slaughter: Investigation into the Correlation of infection with PRRSV and HEV, viruses,110(9), doi:10.3390/v9060110.
- 6) Almeida M.N. Zimmerman J.J. Wang C et al., (2018) Assessment of abattoir based monitoring of PRRSV using oral fluids. Prev Vet Med., 158, pp.137-145
- 7) Ronald M. Renee L. (2004) Evaluation of the presence of porcine reproductive and respiratory virus in pig meat and experimental transmission following oral exposure, Can J Vet Res., 68(4), pp.259-266
- 8) Yahara Y. (2011) Respiratory Syndrome virus (PRRS) in these 12 years, Proc. Jpn. Pig Vet Soc., 57, pp.39-42
- 9) Kawashima K. Katsuta K. Onodera T. et al. (2003) Pathological Diagnosis of porcine Respiratory Disease Complex (PRDC), Proc. Jpn. Pig vet Soc., 43, pp.18-22
- 10) 高島 久幸, 富松 洋 (1999) 豚繁殖・呼吸障害症候群の免疫病理組織学的観察 J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 52 772-774
- 11) Labarque G, et al. (2002) Porcine reproductive-respiratory syndrome virus infection predisposes pigs for respiratory signs upon exposure to bacterial lipopolysaccharide, Vet. Microbiol., 88(1), pp.1-12
- 12) Gucht V. S. Reeth V. K. Pensaert M. (2003) Interaction between porcine reproductive-respiratory syndrome virus and bacterial endotoxin in the lungs of pigs: potentiation of cytokine production and respiratory disease. J Clin. Microbiol., 41(3), pp.960-965