

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580425

研究課題名(和文)南九州の豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス株の遺伝子解析と持続感染様式の解明

研究課題名(英文)Persistent infection and sequence analysis of PRRS virus in the southern Kyushu

研究代表者

平井 卓哉(Hirai, Takuya)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：60321668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、母豚において扁桃がPRRSウイルスの増殖の場として重要であることを我々の開発したISH増感法で明らかにした。口腔液中で検出されるPRRSVの主な局在部位は口蓋扁桃であることが示唆された。農場内における母豚等におけるウイルス動態の調査に大変有用であると考えられた。本研究で行った調査ではクラスター、型型のウイルス株が検出された。特に南九州のある地域においてはクラスターに分類されるウイルス株が多い傾向にあった。

研究成果の概要(英文)：The objectives of the present study were to evaluate the anatomic localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in naturally infected pigs and to determine whether oral fluid could be used to detect the virus in infected animals. Our results confirm previous findings that PRRSV primarily replicates in tonsils and is then shed into oral fluid. Therefore, oral fluid sampling may be effective for the surveillance of PRRSV in breeding herds.

研究分野：農学

キーワード：豚 豚繁殖・呼吸障害症候群 南九州 ウイルス 持続感染 病理学

1. 研究開始当初の背景

1) PRRS は世界の養豚業界において経済的損失が最も大きい疾病の一つで、本疾患による我が国の推定損失額は年間 280 億円と報告されている。宮崎・鹿児島は全国有数の畜産県で、豚の飼養頭数は両県で全国 1 位、2 位を占めており、本疾患の対策は最重要課題である。

本疾患の主な感染経路は、ウイルス排泄豚との直接接触であるが、ウイルス血症の妊娠豚では垂直感染も成立する。母豚から子豚への感染を抑えないと、子豚の移動と共に離乳～肥育期におけるウイルス循環を断ち切れず、PRRS を抑えられない。本疾患の対策として「母豚群の抗体価の安定・持続化」が広く提唱されている。具体的には、更新雌豚に対する生ワクチンの接種や発育不良豚との同居感染などで母豚群全体の抗体価を同一レベルにして、ウイルスの未排泄を確認後、PRRS 陰性子豚を分娩させる方法である。しかし、母豚群の抗体価に高低差が多く、血清中にウイルス遺伝子が検出される例もあり、その対策は極めて難しいのが現実である。その一因として、母豚の扁桃腺などに持続感染したウイルスが、分娩などのストレス時に増殖し、ウイルス血症を起すと考えられている。しかし、母豚に関する研究報告は少なく、持続感染様式には不明な点が多く残されているため、本症の防御対策の遅延要因にもなっている。持続感染状態の母豚ではウイルス RNA 量の少ないことが予想される。したがって、母豚のウイルス感染細胞を特定するためには、微量ウイルス抗原または遺伝子を検出する技術が不可欠である。

2) PRRS ウイルスでは、遺伝子変異の幅が非常に大きく多くの変異株が存在し、地域によってウイルス株が異なるため、予防対策上の大きな難題になっている。ウイルスゲノムで一番変異しやすい領域は、エンペローブ糖タンパクをコードする ORF5 で、本領域のシー

クエンス解析により株同定が行なわれている。しかし、畜産基地に立地する南九州のウイルス株の遺伝的性状は十分に解析されていない。

2. 研究の目的

母豚における持続感染様式の解明および南九州におけるウイルス流行株の遺伝子性状の解析を目的として、以下のことを明らかにする。

- 1) 宮崎県内の PRRS 陽性農場において、年 4 回、母豚の血清中のウイルス遺伝子および ELISA 抗体価を調べ、母豚群におけるウイルス動態および抗体価の推移を明らかにする。
- 2) 上記 1) をもとに母豚の検査を行い、各種臓器をタイラミド ISH 増感法などで調べ、持続感染細胞などを明らかにする。
- 3) 母豚由来ウイルス株、流産胎児由来株ならびに子豚の肺炎由来株をシークエンス解析し、母豚で検出されたウイルス株が流産や呼吸器病などに関与しているかを明らかにする。
- 4) 宮崎県を中心に、鹿児島県、熊本県、大分県の病豚等を幅広く検査し、ウイルス株の遺伝子性状を調べ、南九州におけるウイルス流行株の遺伝的特徴を明らかにする。

3. 研究の方法

母豚における持続感染様式を解明し、南九州におけるウイルス株の遺伝子性状を明らかにするために、以下の研究項目を実施する。

1) 宮崎県の PRRS 陽性農場における母豚の解析

(1) 血清(母豚あるいは繁殖候補雌豚)の遺伝子検査および抗体検査でウイルスの動態と抗体価の推移を明らかにする。

(2) 流産胎児や呼吸器疾患などを示した子豚のウイルス株を調べ、母豚で検出されたウイルス株が流産や呼吸器病などどのように関与しているかを明らかにする。

(3) 母豚の検査は流産等の理由で廃棄になる症例あるいは上記(1)の結果をもとに実施し、タイラミド ISH 増感法にてウイルス感染臓器や感染細胞を明らかにする。

(4) PRRS フリーの繁殖候補雌豚を導入後、経時的に口腔液を採取し、口腔液におけるウイルスの動態と扁桃でのウイルス増殖について検討する。

2) 宮崎県・鹿児島県を中心とした他農場における病豚の解析

宮崎県の各食肉衛生検査所にて廃豚や出荷豚の各種臓器を調査し、宮崎県を中心とした南九州(鹿児島県、熊本県、大分県を含む)のウイルス株の遺伝的性状を幅広く調べる。

4. 研究成果

1) 母豚群で検出されるウイルス株が流産や子豚の呼吸器病の原因になっているかを明らかにするために、対象農場で発生した流産母豚および胎児におけるウイルス遺伝子の局在などを詳細に解析した。流産母豚においてウイルス遺伝子は唾液、扁桃で検出され、その他の臓器において PCR 陰性を示した。一方、流産胎児においてウイルス遺伝子は肺と胎盤で検出された。シークエンス解析の結果、母豚の扁桃で検出された PRRS ウイルス ORF5 遺伝子の塩基配列は流産胎児のそれと 100%の相同性を示した。また、子豚の肺炎材料より、同じウイルス株が検出された。以上の成績より、母豚群で検出されたウイルス株が流産や子豚の呼吸器病の原因になっていることが明らかになった。さらに、母豚の唾液でウイルスが検出されたことから、持続感染豚における口腔液検査の有用性が示唆された。

2) 流産母豚における感染細胞を明らかにするために、扁桃を用いて免疫組織化学法と ISH 法の二重染色を実施した。その結果、ウイルス感染細胞は扁桃陰窩周囲や粘膜固有層のマクロファージもしくは樹状細胞であることが示された。また、ウイルスが唾液で検出される一因として、感染細胞の一部が口腔内に脱落するためと推測された。

対象農場において母豚の血清を採取し、PRRS ウイルスの遺伝子検査を行ったところ、

46 例中 1 例が PCR 陽性を示した。次に、母豚血清および唾液を経時的に採取し、ウイルス感染状況を解析した。対象母豚は、血清あるいは口腔液サンプルで PCR が陽性になった症例、高い抗体価を示した症例、流産歴のある症例とし、合計 42 例の扁桃を採取した。これらの扁桃より RNA を抽出し、PRRS ウイルス遺伝子を検査したが、全ての症例は陰性を示した。

以上の成績より、母豚において扁桃が PRRS ウイルスの増殖の場として重要であることが明らかになった。感染細胞の一部は口腔内に脱落し、口腔液検査で検出されることが示唆された。

3) 対象農場において導入した PRRS ウイルスフリーの繁殖候補雌豚を経時的に口腔液を検査してウイルス動態を明らかにし、本検査の有用性を検討した。その結果、PRRS ウイルスは導入後 3 週で口腔液より検出され、導入後 11 週で検出されなくなった。また、導入後 4 週および導入後 5 週の死亡豚を検査したところ、扁桃より PRRS ウイルスが検出された。次に宮崎県および鹿児島県内の複数農場にて発育不良豚を検査したところ、多くが豚呼吸器複合感染症と診断され、肺より PRRS ウイルスが検出された。また、ORF5 遺伝子に基づく北米型 PRRS ウイルスの分子系統樹解析を行ったところ、クラスター、型のウイルス株が検出された。特にある地域においてはクラスターに分類されるウイルス株が多い傾向にあり、今後さらに症例数を増やして検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

1) Trang NT, Hirai T, Yamamoto T, Matsuda M, Okumura N, Giang NT, Lan NT, Yamaguchi R. Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome

virus in oral fluid from naturally infected pigs in a breeding herd.

J Vet Sci. 「査読有」

2014;15(3):361-7. Epub 2014 Apr 2.

2) Trang NT, Hirai T, Ngan PH, Lan NT, Fuke N, Toyama K, Yamamoto T, Yamaguchi R.

Enhanced detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in fixed tissues by in situ hybridization following tyramide signal amplification. J Vet Diagn Invest. 2015 Apr 8. 「査読有」

〔学会発表〕(計 9 件)

- 1 Nguyen Thi TRANG、松田麻里、平井卓哉、山口良二 宮崎大・獣医病理
流産母豚における豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの局在
第 154 回日本獣医学会学術集会 (20120914)盛岡市
- 2 松田麻里¹⁾、平井卓哉¹⁾、瀬戸山健二²⁾、山口良二¹⁾
¹宮崎大・獣医病理、²宮崎県 JA 宮崎経済連
口腔液中で検出される豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの局在部位に関する研究
第 61 回九州地区獣医師大会・平成 24 年度 獣医学術九州地区大会 (20121014) 宮崎市
- 3 渡山恵子、平井卓哉、山口良二
宮崎大・獣医病理
死亡事故率の高い一養豚場における発育不良豚についての病理学的検索
第 62 回九州地区獣医師大会・平成 25 年度 獣医学術九州地区大会 (20131012) 大分市
- 4 山本司、平井卓哉、山口良二
宮崎大・獣医病理
死亡率の異なる 3 農場における発育不良豚の病理学的調査および比較
第 62 回九州地区獣医師大会・平成 25 年度 獣医学術九州地区大会 (20131012) 大分市

5 奥村尚子、平井卓哉、小東智哉、山口良二

¹宮崎大・獣医病理、²JA 宮崎経済連
宮崎県内の一養豚場における PRRS 馴致法の検討
第 62 回九州地区獣医師大会・平成 25 年度 獣医学術九州地区大会 (20131012) 大分市

6 山本司 平井卓哉 山口良二
宮崎大・獣医病理
子豚の口腔液中で検出される豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの局在部位に関する免疫組織化学的研究
第 156 回日本獣医学会学術集会 (20130920) 岐阜市

7 TRANG NT, HIRAI T, YAMAGUCHI R
Department of Veterinary Pathology,
Faculty of Agriculture, University of Miyazaki
Localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in naturally infected sows
第 156 回日本獣医学会学術集会 (20130920) 岐阜市

8 Takuya Hirai
Department of Veterinary Pathology,
Faculty of Agriculture, University of Miyazaki
A field Investigation: Localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in naturally infected sows and piglets
3rd International symposium of University of Miyazaki (20130719) Miyazaki

9 兒玉亜侑美¹⁾、平井卓哉¹⁾、奥村尚子¹⁾、兼光宏枝¹⁾、小東智哉²⁾、山口良二¹⁾
¹宮崎大・獣医病理、²JA 宮崎経済連
子豚の PRRS コントロール法を検討するためのウイルス感染状況調査

第 63 回 九州地区獣医師大会・平成 26 年
度 獣医学術九州地区大会 (20141004) 鹿
児島市

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/Vet_path/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平井 卓哉 (HIRAI, Takuya)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：60321668

(2) 研究分担者

山口 良二 (Yamaguchi, Ryoji)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：90150169

(3) 連携研究者

()

研究者番号：