

資料

ウイルス含有エアロゾルの液相捕集による PRRSV と PCV2 の流行動態評価に向けた取り組み

安浦雅人¹⁾、赤上正貴²⁾、川上純子²⁾、都筑智子³⁾、栗田敬介⁴⁾、
鈴木雅美⁴⁾、藤井勇紀⁵⁾、堀口諭吉¹⁾、芦葉裕樹¹⁾、福田隆史¹⁾

¹⁾(国研)産業技術総合研究所 センシングシステム研究センター、²⁾茨城県 県西家畜保健衛生所、

³⁾茨城県 鹿行家畜保健衛生所、⁴⁾茨城県 県南家畜保健衛生所、⁵⁾茨城県 農林水産部 畜産課)

Yasuura, M., Akagami, M., Kawakami, J., Tsuzuku, S., Kurita, K., Suzuki, M., Fujii, Y., Horiguchi, Y., Ashiba, H., Fukuda, T. (2025). Evaluation of PRRSV and PCV2 epidemic dynamics using a liquid cyclonic collector to virus-containing aerosol sampling.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 85, 13-18.

キーワード：エアーサンプラー、核酸検出、飛沫感染

1. はじめに

ヒト・動物を問わず、ウイルス感染症の流行動態の把握は切実な問題である。観測すべき集団の規模が大きくなるほど、コスト・労力面から全数検査は困難になるが、集団から一部個体を抜き取って検査する抽出検査の場合、確率的な見逃しは避けられない。また、抗体検査など一部の検査手法では、感染の履歴は把握できるものの現在の流行を必ずしも反映していない結果が出る場合もある。そこで本研究では、ウイルス感染症の流行動態を把握する手段として、感染個体から排出されたウイルスを空間から採取・測定する手法²⁾に注目した。エリアごとのウイルスの有無を的確に把握できれば、適切な清浄化処置と組み合わせることで予防・拡大防止策といった防疫技術にも繋がる。サイクロン式エアーサンプラーによるバイオエアロゾルの液相捕集法を用いて、豚舎内に漂うウイルス含有エアロゾルを捕集・検出し、群れごとの流行動態評価への可能性を模索した。

2. ウイルス含有エアロゾルの液相捕集とその評価法

ウイルスを含有するバイオエアロゾルの液相捕集には、市販のサイクロン式エアーサンプラー「コロリス μ 」(Bertin Technologies, France)を用いた。当該エアーサンプラーは、人・動物を問わず感染ウイルスの気中検出に用いられた実績があり^{1,8)}、100-300 L/min で空気を吸引し、0.5-10 μ m サイズのエアロゾル等粒子を捕集液中に捕集可能である。我々は、本研

究の事前検討として、HEPA フィルター FFU (Fan Filter Unit) や UV (UltraViolet) 照明を完備した約10m³ のグローブ付き陰圧ブース内で、超音波式ネブライザ NE-U780 (オムロン、京都府)を用いて PBS 希釈した豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) のワクチン株を散布し、当該エアーサンプラーで回収する実験を行い、当該エアーサンプラーによるウイルスの回収とポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) による検出、アフリカミドリザル腎由来株化細胞 (MA104) を用いた捕集液中の感染増殖性を有するウイルスの存在確認が可能であることを確認している。

また、家畜の群れごとのウイルス感染状況を把握することを目的とする場合の、PCR による捕集液中のウイルス核酸検出に基づく気中ウイルスの評価指標についても事前の検討を行った。Otake ら (2010) の文献⁷⁾のように、家畜から十分に距離を取った位置 (数 km 程度) でのサンプリングであれば、ウイルス含有エアロゾルは距離とともに拡散し、風向きの影響はあるものの10分前後のサンプリング時間内において捕集されるウイルス量が大きく変動することは起こりにくくなると考えられる。しかし、家畜の群れごと、例えば同一農場内での畜舎の棟ごとでの感染状況把握を目的とする場合、サンプリング場所は畜舎内、すなわち家畜の直近で行う必要が生じる。このような場合、サンプリング時間内における咳などの家畜の行動に依存して、同一地点で逐次サンプリングした捕集液からのウイルス検出量が数桁範囲で変動し、捕集液からのウイルス検出量を指標とすることが困難であることを、我々は本研究に先行して実施した牛舎での検討において確認した¹²⁾。

そこで我々は、家畜の直近で捕集を行う場合の気中ウイルス検出における検出量に代替する指標として、同時或いは逐次サンプリングした複数サンプルにおける陽性の割合、検出率を用いることを検討している。牛舎における検討では、この検出率を指標とすることで、流行状況やサンプリング位置の関係を反映した評価値になることを確認できたため¹²⁾、本研究においてもこの検出率を指標として採用することが有効か検討するべく解析に用いた。

3. 豚舎内エアロゾルサンプリングによる動態把握実証実験

本研究では、新たに PRRSV 感染が確認された農場において、棟がそれぞれ異なる日齢別の 5 つの豚群に対して、5 カ月にわたり月 1 回の追跡サンプリングを実施し、豚群ごとの PRRSV 及び豚サーコウイルス 2

型 (PCV2) の流行の動態把握を検討した。当該農場は、繁殖母豚約 600 頭を飼養する一貫経営農場であり、一部の肥育豚は別農場で飼養されていた。PRRS 清浄農場であったが、2023 年春に PRRSV の侵入が確認された。当該農場では PCV2 が原因とみられる問題は生じていなかったため、定期的な PCV2 検査は実施されていなかった。2023 年春の PRRSV 侵入により、繁殖豚の死産・流産、また子豚・肥育豚の一過性の呼吸器症状が見られたが、その他の症状は特に認められていなかった。当該農場におけるワクチン使用状況は、PRRSV ワクチンについては 2023 年春の PRRSV 侵入を受けて不活化ワクチンの接種を開始しており、PCV2 ワクチンについては、子豚に不活化ワクチンを 3-5 日齢及び約 3 週齢の 2 回接種している。各豚群のサンプリング時期と日齢 (概算)・採血頭数・豚舎の関係を表 1 に、各豚舎の模式図とサンプリング位置を図 1

表 1 各豚群の日齢表

検査月		2023 年				
豚群		3 月	4 月	5 月	6 月	7 月
A	日 齢	母豚+0-7	母豚+30	60	90	120
	採血※	5 (0/5)	6 (0/6)	5 (0/1)	5 (1/1)	5 (0/1)
	豚 舎	分娩舎	分娩舎	育成舎 γ	育成舎 γ	肥育舎 δ
B	日 齢	母豚	母豚	母豚	母豚	母豚
	採血※	11 (2/11)	8 (0/8)	5 (2/5)	10 (0/10)	5 (0/5)
	豚 舎	ストール	ストール	ストール	ストール	ストール
C	日 齢	60	90	120	150	
	採血※	5 (1/1)	5 (1/1)	5 (0/1)	5 (0/1)	-
	豚 舎	育成舎 α	育成舎 α	肥育舎 β	肥育舎 β	
D 1	日 齢			100	130	160
	採血※			5 (1/1)	5 (0/1)	5 (0/1)
	豚 舎	40 9 (3/3) 育成舎 β	70 9 (1/3) 育成舎 β	育成舎 β	肥育舎 γ	肥育舎 γ
D 2	日 齢			100	130	160
	採血※			18 (0/6)	18 (0/6)	20 (0/4)
	豚 舎			別農場	別農場	別農場
E	日 齢	130	160			
	採血※	6 (2/2)	9 (1/3)			
	豚 舎	肥育舎 α	肥育舎 α			

※採血欄の冒頭の数字は採血頭数、() 内の数字は、RT-PCR における PRRSV の陽性数/検体数であり、採血頭数と検体数が異なる場合は複数サンプルをプールして RT-PCR に供している。各色枠は、図 1 の色枠と対応しており、各豚群が 1 つの豚舎に飼養されていた期間を表している。

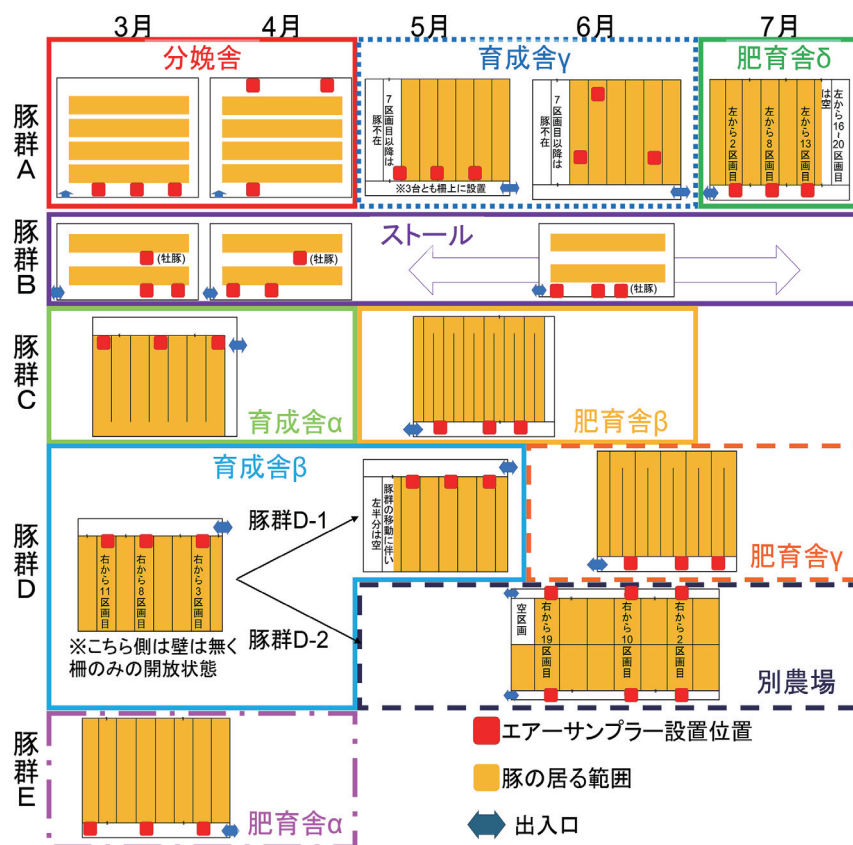


図1 各豚舎の見取り図及びサンプリング位置情報

※各色枠は、表1の色枠と対応しており、各豚群が1つの豚舎に飼養されていた期間を表している。同一の豚舎でも、月によって採取地点が異なる場合は、同一の色枠内でも月毎に見取り図を示している。

に示す。豚群Dについては、途中で約半数が別の農場へ移動したため、豚群D-1、D-2と区別する形を取っている。

各豚群は、常にそれぞれ別棟に飼養されており、豚群間での個体の移動はなかった。各豚群の中には、生育に伴って別棟へ移動した豚群（A、C、Dが該当）もあり、最大2回、異なる棟へ移動している。豚群C及びEは、実施期間中に出荷時期となったため一部期間はデータなしとなっている。飼養形態は棟ごとに状況が異なり、母豚のみ1区画に1頭が飼養される形であり、母豚以外は棟によって幅があるが1区画あたり10-数10頭が飼養され、1棟あたりの区画数は5-16区画であった。1棟につき、3区画を選出し、1区画あたり4.2m³ (300L/minで14分) 相当の空気からのサンプリングを1区画につき1回（計3サンプル/棟）と、1区画あたりランダムに抽出した1-4頭分の豚の採血を実施した。ストールについては1頭ずつ仕切られていた関係で、空気からのサンプリングを実施した位置の目の前の個体に加え、棟全体からランダムで選出して、

合計5-11頭分の豚の採血を行った。エアロゾル捕集サンプルのPCR測定においては、1サンプルから2回に分けて核酸抽出を行い、それぞれの核酸抽出液ごとにduplicateでのqPCR測定を行う形で、1サンプルにつき4ウェル分（2ウェル×2核酸抽出液）の測定を行った。検出率の算出においては、上記4ウェルの内、2ウェル以上陽性で1点、1ウェル陽性で0.5点（偽陽性の疑いを点数に反映）、陽性ウェル無しで0点の点数化を行い、1棟3サンプルの合計点数を3で割った数値を検出率として定義した。採血サンプルのPCR測定においては、母豚では個体毎、肥育豚では豚舎または区画毎に血清をプールしたのから核酸抽出を行い、RT-PCRを行った。検出率の算出においては、エアロゾル捕集サンプルに倣う形で、陽性を1点、陰性を0点とし、合計点数をその棟の採血サンプル数で割った数値を検出率として定義した。但し、プールした血液の測定については、1プールを1サンプルとして計算した。各豚群について、気中・血中のウイルス核酸検出をPRRSVとPCV2についてPCR法を用いて

行い、本手法並びに検出率による評価の妥当性を調査するべく、検出率の推移を比較検討した。

4. 気中・血中ウイルスの検出に用いた核酸検出条件

気中・血中のウイルス核酸検出に用いた PRRSV 及び PCV2 のプライマーの条件を以下に示す。

気中 PRRSV⁹⁾ : TaqMan プローブによる RT-qPCR。ターゲットは北米型の ORF6。

Forward primer TCCAGATGCCGTTTGTGCTT

Reverse primer GACGCCGACGACAAATG

TaqManMGB probe CCCTGCCCACCACGT

血中 PRRSV⁴⁾ : Conventional RT-PCR。ターゲットは北米型・欧州型共通の ORF6-ORF7-3' UTR。

Forward primer GTACATTCTGGCCCTGCCC

Reverse primer GCCCTAATTGAATAGGTGAC

気中 PCV2¹¹⁾ : TaqMan プローブによる qPCR。ターゲットは PCV2b の ORF2。

Forward primer GAGCAGGGCCAGAATTCAAC

Reverse primer TCCCGCACCTTCGGATATACT

TaqManMGB probe TCTGTAGTATTCAAAGGG

血中 PCV2³⁾ : Conventional PCR。ターゲットは PCV2a の ORF2。

Forward primer AGAAGGGTTGGGGGATTGTATG

Reverse primer GGAGACGGAAAAATGGCATCTT

気中ウイルス検出は産総研が、血中ウイルス検出は家畜保健衛生所が担当した。気中ウイルス検出においては、全自動核酸抽出装置 magLEAD 12gC (プレシジョン・システム・サイエンス、千葉県) による核酸抽出に、ハイドロキシアパタイト粒子 Bio-Gel HT Hydroxyapatite (Bio-Rad、USA) を用いた濃縮サンプルを供している。気中 PCV2 検出については、5 月から検査対象として追加したため、3 月・4 月の検査は 5 月以降と異なり、1～2 カ月程度 -80℃ 保存していたサンプルから核酸抽出して検出している。血中ウイルス検出においては、月毎に採血した頭数や同一豚群サンプル内でプールを行ったかなどが現場状況に合わせて異なっており、検出率の計算の分母が月毎に変化している点に注意を要する。

5. 動態把握実証実験結果

図 2 に気中及び血中の PRRSV 検出率の推移を、図 3 に気中及び血中の PCV2 検出率の推移を示す。血中検出率は抽出検査の結果であることから、採血頭数が限られる状況では確率的な見逃しの可能性が考えられるため、血中検出率 0 % のデータ点についても、必ずしもウイルス血症個体が居なかったことを示すものではない。

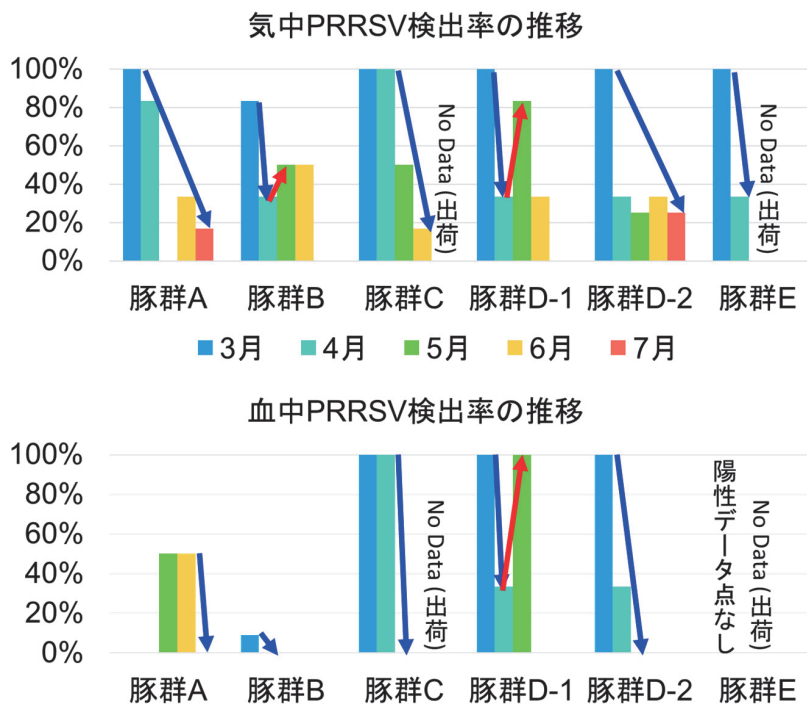


図 2 気中及び血中の PRRSV 検出率の推移

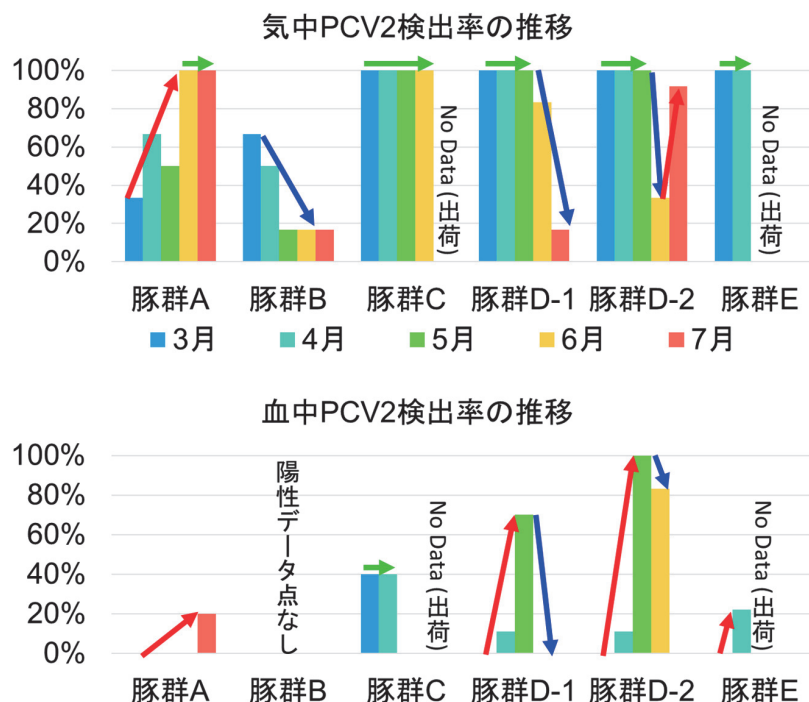


図3 気中及び血中のPCV2検出率の推移

図2中に青矢印で示すように、PRRSVの気中検出率は全体に低下傾向を示しており、この点はPRRSVの血中検出率が低下傾向を示している点と対応している。また、豚群D-1については、PRRSVの気中・血中ウイルス検出率ともに4月から5月にかけて上昇傾向を示しており、全体の低下傾向の一致と併せて流行の消長の動態が相互によく整合している。このことから、PRRSVの気中・血中ウイルス検出率については、上昇・低下の傾向に対応関係が見られると言える。

図3中に緑矢印で示すように、PCV2の気中ウイルス検出率は豚群B以外のすべての群で検出率100%となる時期が存在し、血中PCV2が陽性となった条件はいずれもこの気中PCV2検出率100%の期間中であり、一定程度に対応関係が見られる。但し、PCV2は熱や消毒剤に対して高い耐性を持ち、豚舎の環境条件において長期間安定している可能性が指摘されているウイルスであり^{5,10)}、最小必須培地懸濁時に37℃で12時間のインキュベーションにより力価が半減する⁶⁾との報告もあるPRRSVに比して、気中ウイルス検出においては環境中に残留した核酸を検出している可能性がPRRSVより高くなるため、このデータのみをもとに気中・血中検出率の上昇・下降傾向の対応関係やPRRSVの変動との関係性、感染個体から排出されているPCV2の量などに関する考察を行うことは難しい。

6. 5カ月の追跡調査で見えてきたもの

本研究では、新たにPRRSV感染が確認された農場における5カ月の追跡調査をPRRSV及びPCV2について気中・血中ウイルス検出率を指標として実施し、PRRSV・PCV2ともに気中・血中検出率に一定程度に対応関係を確認した。特にPRRSVについては、気中・血中検出率の増減の傾向に対応関係が見られ、環境耐性が高いことで知られるPCV2と比較して、直近の動態を捉えやすい可能性があり、気中検出率を指標とした流行動態の把握が期待できる。特に気中検出率の場合は、採血頭数が少ない抽出検査による血液検査では追えない変動を追うことが可能になる可能性も考えられる。但し、今回実施したエアースAMPLINGでは、同一豚群のサンプリグ状況が、「3台で同時に3区画の捕集」と「1台で逐次に3区画の捕集」とが混在する、生育に合わせ別の豚舎に移動したため飼養の密集度合や建屋の開放具合が前月までと異なる等、現場状況に合わせて許された範囲内でのサンプリグを行ったものであるため、採血同様条件が一定していない点には注意を要する。

7. 防疫技術への発展に向けて

本研究では、ウイルス含有エアロゾルの捕集・検出技術を流行動態の把握に適用する可能性について検討

を行った。更なる検討が必要ではあるが、気中ウイルス検出による流行動態の把握が、採血による抽出検査を補完しうる可能性が示唆された。今後は、捕集・検出技術の更なる改良と実証を進めるとともに、清浄化技術との融合により、防疫技術へと進化させることを目指す。

利益相反

すべての著者は開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Brown E, et al. (2021) Environmental and air sampling are efficient methods for the detection and quantification of foot-and-mouth disease virus. J Virol Meth, 287: 113988.
- 2) Dybwad M, et al. (2014) Comparative testing and evaluation of nine different air samplers: End-to-end sampling efficiencies as specific performance measurements for bioaerosol applications. Aerosol Sci Technol, 48: 282-295.
- 3) Kawashima K, et al. (2007) Effects of dexamethasone on the pathogenesis of porcine circovirus type 2 infection in piglets. J Comp Path, 129: 294-302.
- 4) Kono Y, et al. (1996) Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. J Vet Med Sci, 58: 941-946.
- 5) López-Lorenzo G, et al. (2019) Environmental distribution of porcine circovirus type 2 (PCV2) in swine herds with natural infection. Sci Rep, 9: 14816.
- 6) Mesa VL, et al. (2024) Survival of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in the environment. Vet Sci, 11: 22.
- 7) Otake S, et al. (2010) Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. Vet Microbiol, 145: 198-208.
- 8) Rahmani AR, et al. (2020) Sampling and detection of corona viruses in air: A mini review. Sci Total Environ, 740: 140207.
- 9) Revilla-Fernández S, et al. (2005) The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen. J Virol Meth, 126: 21-30.
- 10) Rose N, et al. (2012) Epidemiology and transmission of porcine circovirus type 2 (PCV2). Virus Res, 164: 78-89.
- 11) 柴田明弘ら (2018) 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. 日獣会誌, 71: 135-139.
- 12) 安浦雅人ら (2023) 家畜のウイルス感染症防疫に向けた実用的気中ウイルス検出法の開発. 第40回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム論文集, 7P2-PS-51.