

12. 口腔液および処理精巢を利用した PRRSウイルスの農場モニタリングに関する検討

大分家畜保健衛生所・豊後大野家畜保健衛生所¹⁾

○病鑑 人見徹・加藤洋平¹⁾

【はじめに】

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) は、ひとたび農場へ侵入すると清浄化が難しく、経済的な被害が大きいことが知られている。PRRSV の感染については、実験感染での筋肉内投与では数十個のウイルスで感染可能であるため、子豚へのワクチン接種で使用される針を介した感染拡大の可能性もある。また、口腔咽頭粘膜では、22 週間約 150 日間検出され、精液中からも 4～12 週間検出されるとの報告 [1] がある。PRRSV は激しい症状が治まった後も長期間にわたり豚の体内に潜伏、感染源となるため、被害軽減、清浄化の取り組みのためには正確な農場内の浸潤状況を把握して対策をとることが重要で、モニタリング法としては、採血による血清材料の検査に加えロープ法採材による口腔液の検査も活用されつつある [2]。ロープ法による採材は、豚房入り口にロープを垂らして行われるため、採血のように豚房内に術者が入り 1 頭毎に保定、採材を行う必要が無く、豚へのストレスが少なく、水平感染のリスクも小さいと考えられる。しかしロープ法による採材では 60 日齢未満の豚ではロープに興味を示さず採材出来ない問題があり、農場内の PRRSV の動きを確認するためには若齢豚の採血と組み合わせたモニタリングが行われている。

最近米国では去勢処理精巢を用いた哺乳豚の PRRSV 遺伝子検査について、容易に採材が可能で同一群の採血よりも検出率が高い事が報告されている [3]。去勢は、生後 1 週間程度で行われ、その頃の哺乳豚は垂直感染および移行抗体により繁殖豚の病原体感染や抗体保有状況を反映していると考えられることから、ロープ法検査に処理精巢検査を組み合わせることで、ロープ法では採材出来ない日齢の検査を補完し、農場内での詳細な感染状況把握が可能になると考えられる。そこで、去勢処理した精巢を用いた PRRSV 検出法と口腔液検査法の、検出感度や精度、保存性など検査結果に影響を与える要因について検討を行い、両検査法の精度を高め、それらの組み合わせの有効性や活用法について検討を行った。

【材料と方法】

試験ウイルス株：各試験には、県内農場から分離された PRRSV を MARC145 細胞で培養し、 $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml に調整したものを培養ウイルス液として検査に用いた。

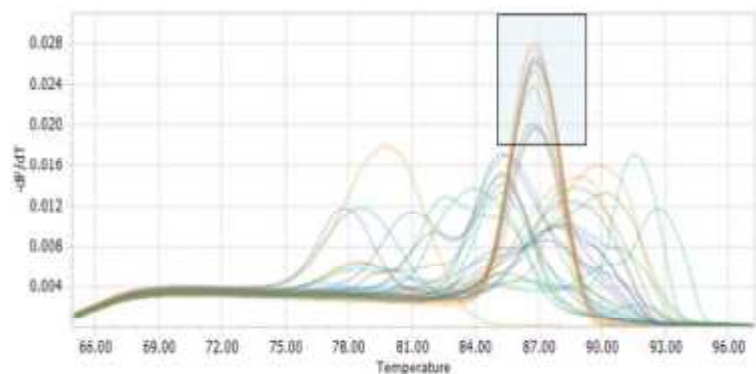


図1 PRRSV使用株のrPCR溶解温度(T_m値)

RNA 抽出は High Pure Viral RNA Kit (Roche 社) を使用、逆転写反応は High Capacity cDNA RT Kit with RNase Inhibitor (ABI 社)、コンベンショナル PCR (cPCR) は TaKaRa Ex Taq (TaKaRa 社)、リアルタイム PCR (rPCR) は Fast Start Essential DNA Green Master (Roche 社) を使用し、cPCR、rPCR とともに ORF7 領域を増幅するプライマーを使用した。rPCR の溶解温度 (T_m 値) は 86.75 ± 0.5 °C (図 1)、試験に用いたウイルス液 $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml の濃度での増幅曲線の見られるサイクル数 (Cq 値) は 14.30 であった。

1. 口腔液検査

県内の PRRS 陰性農場の 60 ~ 90 日齢肥育豚について、6 豚房 (10 ~ 15 頭/豚房) の豚からローブ法で口腔液を採材、4 °C で 4,000rpm、10 分間遠心分離を行い、6 豚房分を等量混合したものを口腔液サンプルとして使用した。

1) 口腔液希釈による検出感度への影響調査

PRRSV 陰性豚から採取した口腔液および MEM 培地を用いてウイルス液の 2 倍段階希釈を行い 4、16、64、256 倍希釈の各サンプルから RNA を抽出、cPCR 法および rPCR 法による PRRSV 遺伝子の検出を行った。

2) 口腔液希釈検体の保存性への影響調査

培養ウイルス液 3ml を口腔液又は MEM 培地 3ml と等量混合後、マイクロチューブに 400μ 1 ずつ分注したものを検体とし 20 °C、4 °C、-20 °C で、0、24、48、96 および 192 時間静置、感作した。各時間の経過後に検体を -80 °C に保存したのから、RNA を抽出し rPCR 法で PRRSV に特異的な遺伝子断片の検出を行った。

2. 処理精巣検査

母豚 250 頭規模の PRRSV 清浄化推進農場で去勢処理された精巣を検査に用いた。精巣を母豚毎に密封容器に入れ、4 °C で保存、漏出した浸出液 (図 2、3) を 1.5ml ずつビーズチューブに分注し、4 °C で 6,000rpm、10 分間遠心分離した。分離された沈渣を残して遠心上清から 1ml を採取しマイクロチューブに保存した。また、残った沈渣をビーズショッカーで 4,000rpm、30 秒間破碎したものを遺伝子材料として検査に用い、rPCR 法で PRRSV が検出されたものを陽性検体、検出されなかったものを陰性検体とした。



図2 処理精巣から漏出した浸出液

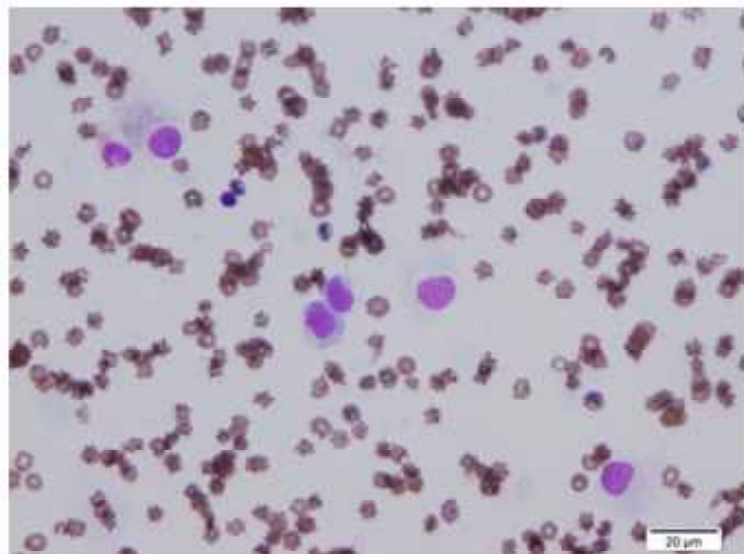


図3 浸出液の塗抹(ギムザ染色中拡大)

1) 精巣組織での PRRSV 局在性確認

精巣組織内の PRRSV 局在部位の確認を行うため、採取された精巣のうち、浸出液検査で陽性となった検体、母豚 2 頭分の精巣を PBS で 3 回洗浄後、白膜内組織と精巣上体および精索組織を分けて組織乳剤を作成し、rPCR 法で PRRSV の遺伝子検索を行った。

2) 精巣組織検査の精度確認

浸出液検査で PRRSV 遺伝子が検出されず陰性と判定された検体について、検出漏れの有無を確認するため、1 母豚につき 2 頭分の精巣上体を採取し乳剤を作成、r-PCR 法を用いて PRRSV 遺伝子の検出を行った。採材農場の処理精巣浸出液検査での陽性率は 2.68%であったため、危険率 5%で検出可能な検体数は 38 検体以上と算出されることから、母豚 48 頭分の処理精巣を検査に用いた。

3) 精巣浸出液検体の保存性

培養ウイルス液 3ml を PRRSV 遺伝子陰性の精巣浸出液上清又は MEM 培地 3ml と等量混合後、マイクロチューブに 400 μ l ずつ分注したものを検体とし 20 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C で、0、24、48、96 および 192 時間静置、感作した。各時間の経過後に検体を -80 $^{\circ}$ C に保存したのから、RNA を抽出し rPCR 法で PRRSV に特異的な遺伝子断片の検出を行った。

【結果】

1. 口腔液検査

1) 口腔液希釈による検出感度への影響調査

ウイルス液の口腔液希釈では、表1 MEMおよび口腔液で希釈したウイルス液の検出 MEM 希釈に比較し rPCR 法の Cq 値は平均 1.5 大きくなったが最大希釈 (256 倍) まで検出された (表 1)。cPCR 法では口腔液希釈で 64 倍希釈まで検出された。

希釈倍率	rPCR Cq値		cPCR
	MEM	口腔液	口腔液
×4	14.42	16.25	+
×16	17.00	18.34	+
×64	18.76	20.45	+
×256	20.95	22.08	-

2) 口腔液希釈検体の保存性への影響調査

ウイルス液の MEM 希釈検体では、感作 0 時間の rPCR 法 Cq 値は 14.30 で、20 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C、-20 $^{\circ}$ C で 192 時間感作後の Cq 値はそれぞれ 14.72、14.48、14.41 となり、大きな増加はみられなかった。しかし、口腔液希釈検体では感作 0 時間の Cq 値 14.45 であったが、-20 $^{\circ}$ C 感作では 14.27 でほぼ変わらなかったものの、20 $^{\circ}$ C および 4 $^{\circ}$ C 感作では経時的に遺伝子が減少し、

192 時間の感作ではそれぞれ Cq 値は 16.49、15.87 に増加した (図 4)。

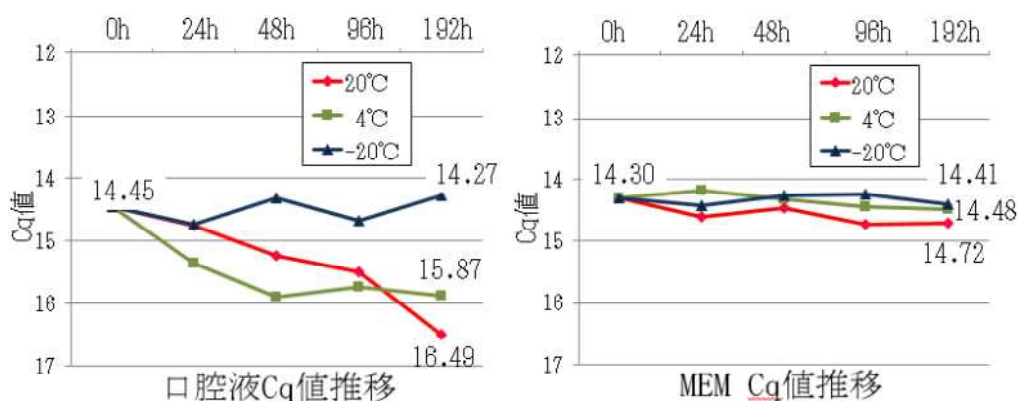


図4 口腔液およびMEMの温度・感作時間の影響

2. 処理精巢検査

1) 精巢組織での PRRSV 検出部位確認

精巢浸出液での陽性検体では、同一母豚の産子全ての精巢上体乳剤から PRRSV に特異的な遺伝子断片が検出され、白膜内組織の乳剤からは全て検出されなかった(図5)。

2) 精巢組織検査の精度確認

浸出液検査で PRRSV 遺伝子が陰性検体となった母豚 48 頭分の精巢上体乳剤では、全て PRRSV 遺伝子は検出されなかった(図6)。

3) 精巢浸出液検体の保存性

ウイルス液の MEM 希釈検体の 0 時間感作での Cq 値 14.30 に対し、精巢浸出液上清希釈検体では 0 時間の Cq 値が 17.10 に増加した。20℃、4℃、-20℃で 192 時間感作での Cq 値はそれぞれ 16.59、17.73、17.17 となり、大きな増加はみられなかった(図7)。

【考察】

ロープ法による口腔液採材と組み合わせた、処理精巢検査を用いた採材法の活用のため、両検査の検出感度や精度、保存性など検査結果に影響を与える要因について検討を行った。

ロープ法による PRRSV 遺伝子検出では、豚房内で少数の豚のみウイルスを排泄している場合が推察されることから、PRRSV が口腔液で希釈された場合の検出感度への影響を確認した。ヨーロッパ型の PRRSV の実験感染で、口腔液中に最大 10⁴TCID₅₀/ml 検出されたとの報告から [井関ら

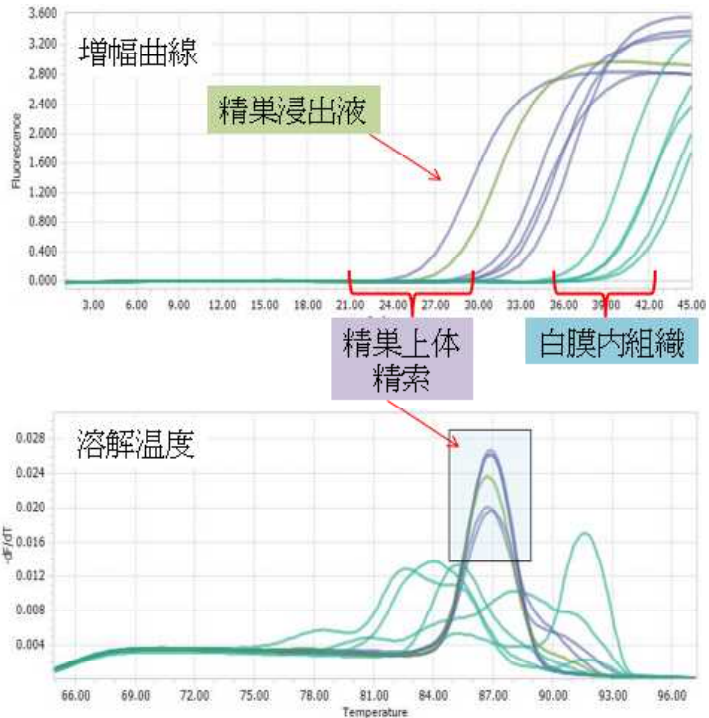


図5 浸出液検査で陽性検体の部位別rPCR

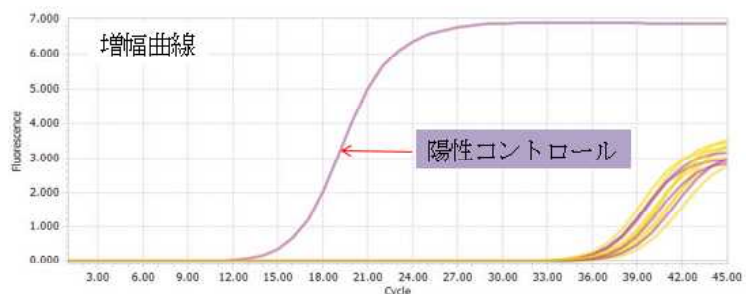


図6 精巢浸出液陰性検体の精巢上体・精索検査

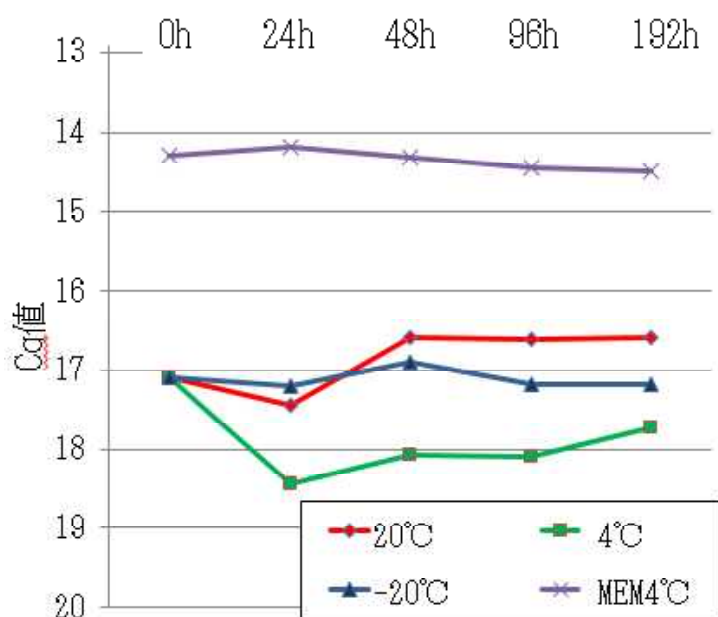


図7 精巢浸出液希釈ウイルスCq値推移

(2014)]、 $10^{4.5}$ TCID₅₀/ml のウイルス液を口腔液を用いて 2 倍段階希釈おこなったところ、rPCR 法では 256 倍以上、cPCR 法では 64 倍希釈まで検出されることが確認された。一般的な肥育豚の飼養形態では 1 豚房あたり 10 ~ 20 頭程度が飼養されていると考えられるため、PRRSV の排泄をしている豚が十分にロープを噛んだ場合には希釈の影響無く検出可能と考えられた。

また、ロープ法による採材ではロープからの抽出に一定の作業時間が必要で、抽出までのウイルス失活の可能性について検討が必要と考えられたことから、口腔液で希釈したウイルス液の温度と時間による検出感度への影響を確認した。口腔液で 2 倍希釈を行った検体では 20 °C、192 時間の保存で、C_q 値が 14.45 から 16.49 に増加、遺伝子量として約 1/4 に低下するなど、-20 °C 保存以外では検出感度が低下することが確認された。口腔液材料では、ウイルス量が少量の場合も考えられることから、採材後は速やかに冷却し抽出、抽出後は検査開始まで凍結保存することが必要と考えられた。

処理精巣検査に適した検体を検討するため、処理精巣浸出液を用いて塗抹標本を作成し鏡検したところ、上皮系の細胞やマクロファージと推察される細胞が確認され、PRRSV はマクロファージに感染することから、精巣浸出液の遠心分離沈渣を検査材料とした。

また、処理精巣の浸出液を検査材料に使用するにあたり、遺伝子検査の検出精度の検討を行うため精巣組織中でのウイルスの局在部位について確認を行ったところ、浸出液検査で陽性の検体では、産子全ての精巣上体および精索から遺伝子が検出されることが確認された。また、浸出液検査で陰性と判定された検体の精巣乳剤から遺伝子を抽出し遺伝子検査を行ったところ、全ての検体で陰性となったことから、精巣浸出液を用いることで、感染産子を見逃しなく検出可能と考えられた。

処理精巣の採材は、去勢処理時に農場の飼養管理者が採材し、保存、運搬された検体を検査に使用されることが想定される。そのため、精巣浸出液中の PRRSV 保存性について検討を行ったところ、20 °C または 4 °C で 196 時間保存した場合にも感作前と比較して検出感度の低下は見られなかった。このことから、処理精巣の検体は野外での飼養者による採材においても精度の低下が少なく対応可能と考えられた。

以上の結果から、処理精巣浸出液の抗原検査は垂直感染又は分娩房での感染状況把握に有効と考えられ、豚の飼養管理者が回収可能なことから、口腔液検査との組み合わせで、豚のストレスが少なく農場の継続的なモニタリングに適していると考えられた。

PRRS は、繁殖豚舎から垂直感染、子豚舎や育成豚舎での水平感染により農場内でウイルスが循環しており、精巣浸出液の検査と口腔液検査を組み合わせた農場モニタリングは、採材が容易で、農場内の感染状況の正確な把握が可能であることから、衛生対策や、ピッグフローの検討などに活用できると考えた。

[1] Christopher-Hennings,J.,et al,Detection and duration of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen,serum,peripheral blod mononuclear cells,and tissues from Yorkshire,Hampshire,and Landrace boars. (2001) J vet Diagn Invest,13,133-142

[2] 会田ら,口腔液を用いた豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス抗体及び遺伝子の検出,(2014) 日獣会誌 67,323-327

[3] W.A. Lopez,et al,Porcine reproductive and respiratory syndrome monitoring in breeding herds

using processing fluids (2018) *Journal of Swine Health and Production* 26(3):146-150