

3 ロープ採材法を用いた PRRS モニタリングの検討

熊谷家畜保健衛生所

○齊藤 史門・武末 寛子

I はじめに

豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) モニタリングのための ELISA 抗体検査 (ELISA) や PCR 遺伝子検出には、検体として血清が用いられ、採血には多くの労力や技術、保定による豚へのストレス、採血事故の危険が伴う。

最近では、国外ではアメリカ、国内では新潟県を中心として、血清の代わりに口腔液をロープ採材法で採材し、PRRS モニタリングに用いる方法が実用化されている^{3、5)}。ロープ採材法は採血と比べて少ない労力で容易に採材でき、豚を保定する必要もなく、豚へのストレスはほとんど無いと報告されている⁴⁾ (表1)。

そこで今回県内初となるロープ採材法による PRRS モニタリングを管内2農場で実施し、その有用性について、口腔液と血清の検査成績の比較及び PRRS 浸潤状況調査を行い、検証したのでその概要を報告する。

表1 採材法の比較

	採血法	ロープ採材法
採材難易度	難しい	容易
多検体の採材	遅い	早い
豚へのストレス	大きい	小さい

II 材料

1 採材対象農場

管内一貫経営2農場を対象とした。いずれも PRRS 陽性であり、母豚規模は A 農場が 100 頭、B 農場が 150 頭である。

2 採材内容

(1) 口腔液と血清の検査成績の比較

1. 5~5 か月齢の肥育豚を 5 ステージに分け、ロープ採材法と採血法共に 1 ステージにつき 2 豚房の計 10 豚房で採材を行った。採血は 1 豚房につき 3 頭とした(表2)。

(2) PRRS 浸潤状況検査

1. 5~5 か月齢の肥育豚を 8 ステージに分け、1 ステージにつき 4 豚房の計 32 豚房でロープ採材法を実施した (表3)。

表2 採材内容(口腔液と血清の検査成績の比較)

A農場(M:月齢)	1.5M	2M	3M	4M	5M	計
ロープ採材法	2	2	2	2	2	10豚房
採血(3頭/豚房)	2	2	2	2	2	10豚房(30頭)

B農場(M:月齢)	1.5M	2M	3M	4M	5M	計
ロープ採材法	2	2	2	2	2	10豚房
採血(3頭/豚房)	2	2	2	2	2	10豚房(30頭)

表3 採材内容(PRRS浸潤状況調査)

A農場(M:月齢)	1.5M	2M	2.5M	3M	3.5M	4M	4.5M	5M	計
ロープ採材法	3	4	4	4	4	4	4	4	31豚房

B農場(M:月齢)	1.5M	2M	2.5M	3M	3.5M	4M	4.5M	5M	計
ロープ採材法	4	4	4	4	4	4	4	4	32豚房

III 方法

1 採材方法

口腔液については、先端を解いた直径9mmの綿ロープ(無漂白、三つ打ち)を豚房の柵に結紮、20分間放置し、豚に自由に噛ませた後、結紮部分の検体を汚染しないようビニール袋へ回収した。(図1-1,2)。

回収したロープから口腔液を搾出、12,000rpm、5分間遠心し上清を検体とした(図1-3,4)。



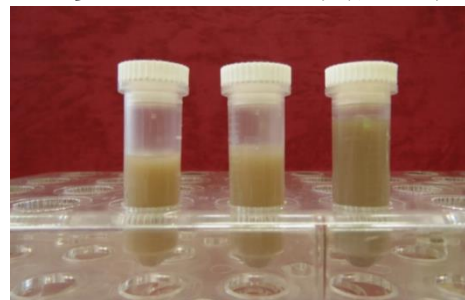
1. 豚房の柵にロープを結紮



2. 多くの豚が咬む様子を見る



3. ロープから口腔液の搾出



4. 遠心管へ移した口腔液

図1 ロープ採材法

2 検査方法

(1) 抗体検出

血清および口腔液からの PRRS ウイルス抗体検出には、PRRSX3 エリーザキット (アイデックスラボラトリーズ (株)) を使用した。

口腔液の ELISA はまず、指示血清を 10 倍、検体を 2 倍にそれぞれ希釈した後、希釈指示血清 100 μ l、希釈検体 250 μ l をプレートにそれぞれ分注し、4 $^{\circ}$ C で 16 時間反応させた。洗浄後、二次抗体として付属のコンジュゲートを用いてペルオキシダーゼ標識抗豚 IgG 抗体 (Cappel 社) を 1500 倍に調整したものを 100 μ l プレートに加えた後 30 分間室温で反応させた。洗浄後、TMB 基質液を 100 μ l 加えて発色させ、反応停止後、OD 値の測定及び S/P 比を算出した^{2、5)}。

判定は血清同様 S/P 比 0.4 以上を陽性とした。

(2) 遺伝子検出

PRRS ウイルス特異遺伝子の検出には、RNA 抽出キット (High Pure Viral RNAKit、ロシュ・ダイアグノスティックス社) を用いて RNA を抽出し、Christopher-Hennings らの方法に準じて、RT-PCR キット (Prime Script One Step RT-PCR Kit Ver.2 タカラバイオ社) を用いた¹⁾。

(3) 群の判定

群に 1 頭でも陽性の個体があった場合、その群を陽性豚房とした。

IV 農場別検査成績

1 A 農場

(1) 血清と口腔液の検査成績の比較

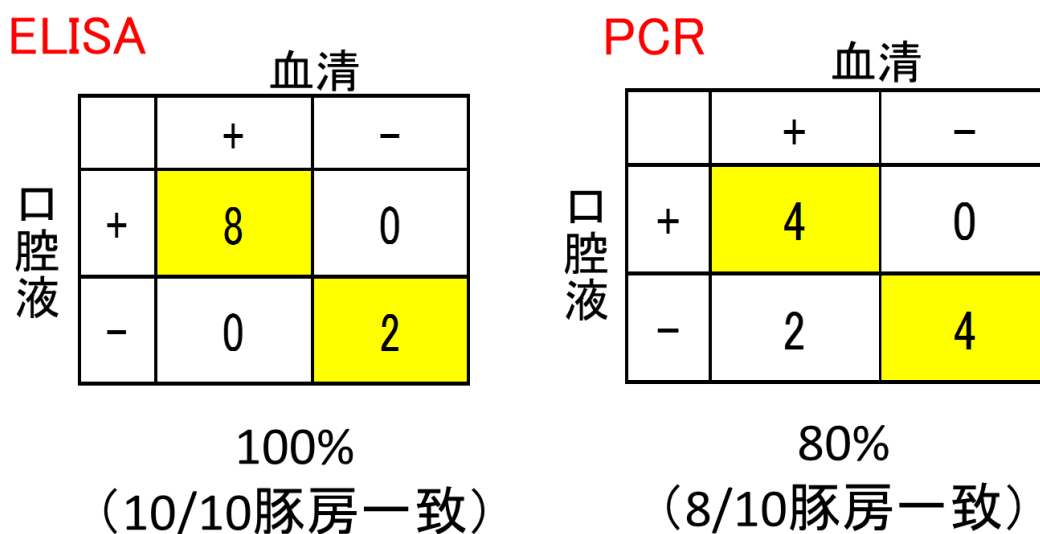
ア ELISA

血清において陽性が 8 豚房、陰性が 2 豚房と判定され、口腔液においても同様の結果となり、血清と口腔液の判定一致率は 10 豚房中 10 豚房で 100%であった (表 4)。

イ PCR

血清において陽性が 6 豚房、陰性が 4 豚房と判定された。一方、口腔液では陽性が 4 豚房、陰性が 6 豚房の判定となり、血清と口腔液の判定一致率は 10 豚房中 8 豚房で 80%であった (表 4)。

表 4 血清と口腔液の検査成績の比較(A 農場)



A 農場においては、血清および口腔液で ELISA および PCR は高い判定一致率であり、月齢別の検査成績の比較(図 2)においても、血清と口腔液の判定はよく一致し、当所においても口腔液を PRRS モニタリングの材料として利用可能であることが確かめられた。

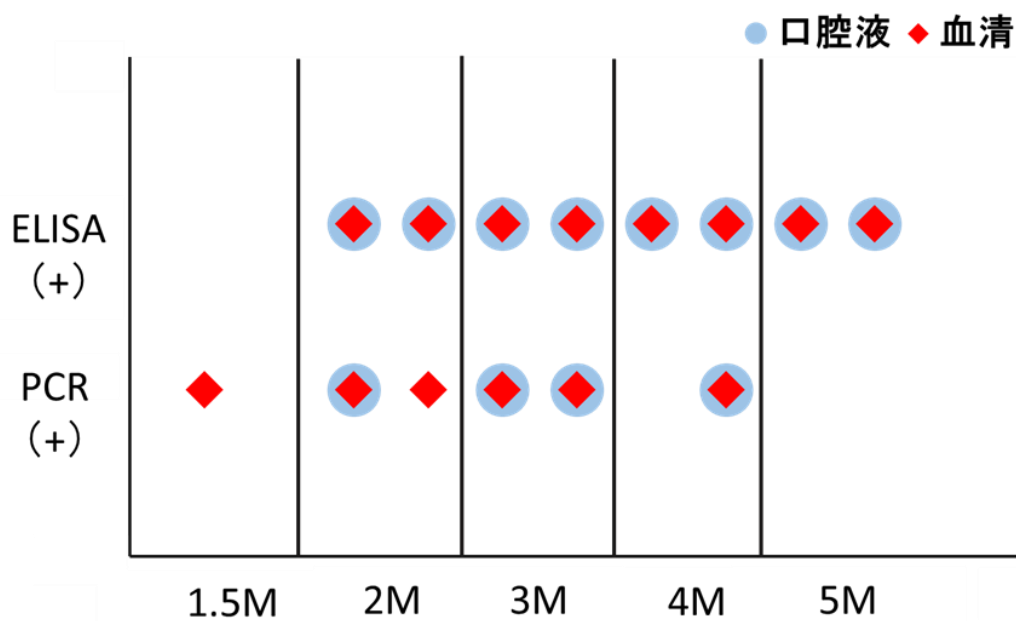


図 2 月齢別血清と口腔液の検査成績の比較(A 農場)

(2) PRRS 浸潤状況調査

31 豚房の口腔液を検体とし、ELISA および PCR を行い、その成績を元に農場内ウイルス分布図を作成した(図 3)。太枠で囲まれたマスが今回採材を行った豚房であり、中央の数字は月齢、斜線の網掛けは PCR 陽性、塗りつぶしは抗体陽性を示す。

この図より、PCR 陽性豚房は簡易子豚ハウスから出現し、育成豚舎でも高い割合を占めていることがわかる。さらに、肥育豚舎では大部分の豚房で抗体陽性・PCR 陰性豚房が占めていることから、主に簡易子豚ハウスから育成豚舎の間、1.5～3 か月齢の間で PRRS ウイルスの感染および排泄が起きていると推測された。

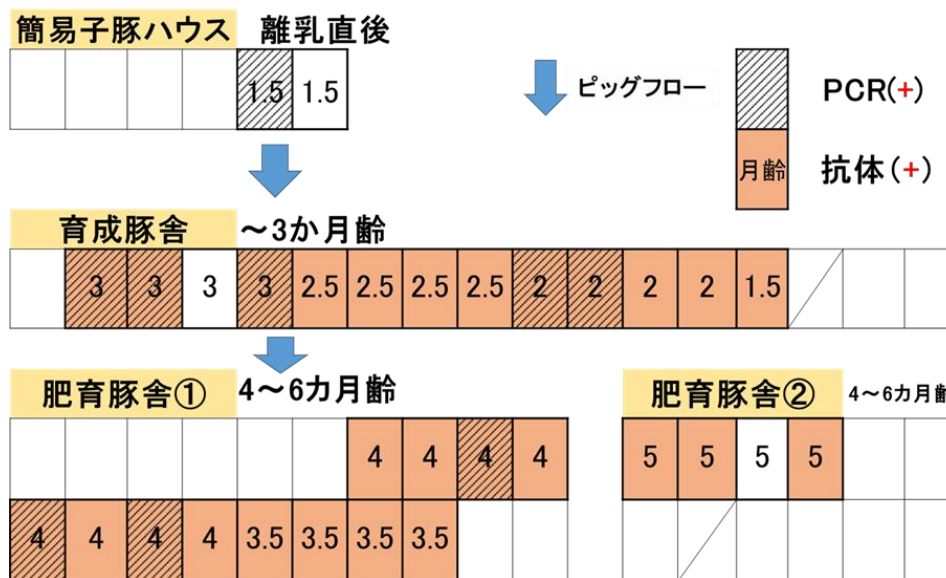


図3 農場内ウイルス分布図(A農場)

2 B農場

(1) 血清と口腔液の検査成績の比較

ア ELISA

血清において陽性が8豚房、陰性が2豚房と判定された。一方、口腔液では陽性が7豚房、陰性が3豚房の判定となり、血清と口腔液の判定一致率は10豚房中9豚房一致で90%であった(表5)。

イ PCR

血清において陽性が5豚房、陰性が5豚房と判定された。一方、口腔液では陽性が2豚房、陰性が8豚房の判定となり、両者の判定一致率は10豚房中5豚房で50%であった(表5)。

表 5 血清と口腔液の検査成績の比較(B 農場)

ELISA		血清		PCR		血清	
		+	-			+	-
口腔液	+	7	0	口腔液	+	1	1
	-	1	2		-	4	4

90% (9/10豚房一致)
50% (5/10豚房一致)

B 農場では、A 農場と比較して、PCR の判定一致率は低い値となった。月齢別の検査成績において、ELISA ではほとんどの月齢で血清と口腔液の陽性判定が一致したが、PCR ではほとんどの月齢で陽性判定が一致しなかった (図 4)。

(2) PRRS 浸潤状況調査

B 農場では A 農場のように、口腔液の検査成績で農場内 PRRS ウイルス分布図を作成することは正確性を欠くと判断し、月齢及び豚舎・豚房間での感染の推移を推定するには至らなかった。

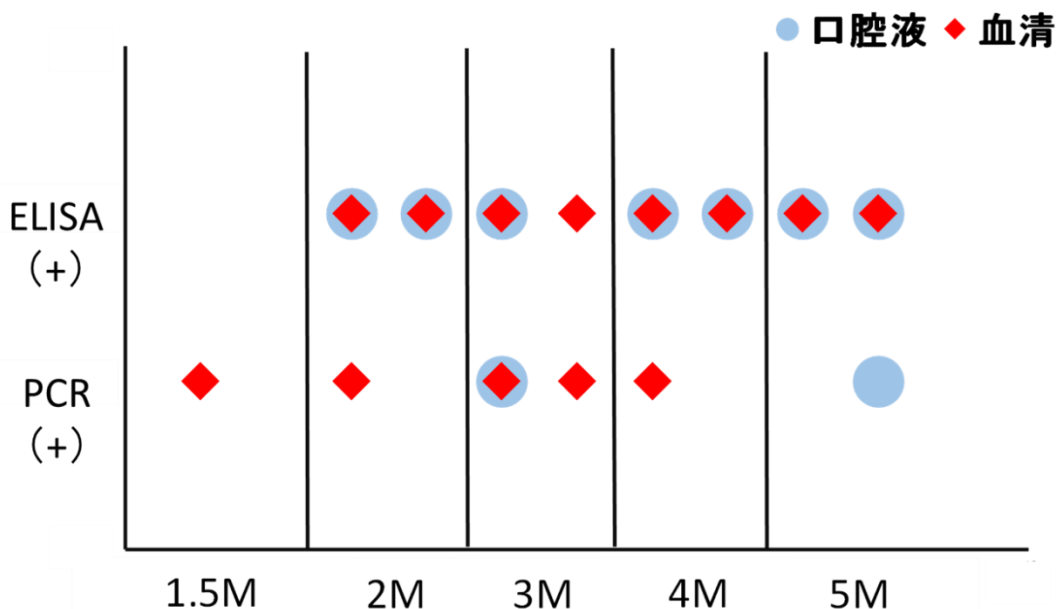


図 4 月齢別血清と口腔液の検査成績の比較(B 農場)

V まとめと考察

口腔液は唾液と粘膜浸出液の混合液で、PRRSの抗体やウイルスを含み、血清とほぼ同様に検査が可能であることが知られている^{2、3、5}。

A農場では、口腔液と血清のELISAおよびPCRの検査成績はそれぞれ100%と80%となり、高率で一致した。このことから、当所においてもロープ採材法による口腔液の採材や、口腔液を検体として用いた検査が可能であることが確かめられた。また、口腔液のELISAやPCRで得られた検査成績は、農場内PRRS浸潤状況の推定や、その清浄化対策の立案、対策効果の判定に有用であると考えられた。

一方B農場では、口腔液と血清のELISAおよびPCRの判定一致率はそれぞれ90%と50%となり、PCRにおいて低い一致率となった。原因として、採材時、A農場では各豚房で先を争う様にロープを咬む様子が観察された一方、B農場では豚のロープへの関心が低く、あまり咬まないため、複数の個体から充分量の口腔液が採材できなかったことが考えられた。豚のロープへの関心が低かった理由として、豚が移動直後で落ち着きがなかったり、採食後の休息時間で昼寝をしていたためと推測された。このことから、事前に豚の移動日や採材時間帯について農家と確認を行い、なるべく多くの豚がロープに興味を示すような採材環境が整う日時を決定することが、検査成績の信頼性を向上させる上で重要であると考えられた。

今回の検証により、口腔液を用いたPRRSモニタリングは採血よりも簡便な方法であり、当所でも導入可能であることが確かめられた。しかし、複数個体から充分量得られなかった口腔液については、信頼性の乏しい検査成績となってしまうため、正確な検査成績を得るためには、多数の個体から充分量の口腔液を採材することが必須条件であることが確かめられた。

今後も、この手法を用いた定期的なPRRSモニタリングを続け、採材技術のさらなる向上を図るとともに、管内農場のPRRS早期清浄化に取り組んでいきたい。

VI 参考文献

- 1) Christopher-Hennings J, Nelson EA, Nelson JK, Hines RJ, Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, Katz JB, Yaeger MJ, Chase CC Benfield DA, : Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR, J Clin Microbiol, 33, 1730-1734(1995)
- 2) Kittawornrat A, Prickett J, Wang C, Olsen C, Irwin C, Panyasing Y, Ballagi A, Rice A, Main R, Johnson J, Rademacher C, Hoogland M, Rowland R, Zimmerman J : Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibodies in oral fluid specimens using a commercial PRRSV serum antibody enzyme-linked immunosorbent assay, J Vet Diagn Invest, 24, 262-269(2012)
- 3) 会田恒彦ら：ロープ採材法による口腔液を用いた豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスモニ

タリング平成23年度新潟県家畜保健衛生所業績発表会集録、74-76(2012)

- 4) 今井杏子ら：口腔液を利用した豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスモニタリングの活用、平成25年度新潟県家畜保健衛生所業績発表会集録、58-61(2014)
- 5) 曾田恒彦：口腔液を用いたPRRSウイルス抗体および遺伝子の検出、家畜衛生フォーラム'15要旨集、65-68(2015)