

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

会田恒彦^{1)†} 馬上 齊¹⁾ 村山和範¹⁾ 大竹 聡²⁾ 田中健介¹⁾
篠川有理¹⁾ 福留 静¹⁾ 樋口良平¹⁾

- 1) 新潟県中央家畜保健衛生所 (〒959-0423 新潟市西蒲区旗屋686)
2) 新潟県 開業 (株)スワイン・エクステンション&コンサルティング: 〒957-0021 新発
田市五十公野4088-2)

(2013年10月1日受付・2014年1月22日受理)

要 約

新潟県内の14養豚場において、2～8カ月齢の豚群50群から血清及び口腔液を採取し、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) の抗体検出を間接蛍光抗体法 (IFAT) 及びELISAにより、遺伝子検出をRT-nested PCR法によりそれぞれ行った。IFATとELISAはいずれも血清が陽性40群、陰性10群、口腔液が陽性38群、陰性12群と判定された (一致率96%)。PRRSV 遺伝子の検出は血清が陽性18群、陰性32群、口腔液が陽性15群、陰性35群であった (一致率90%)。口腔液を用いることで豚群のPRRSVサーベイランスが効率的かつ低コストで実施できると考えられた。

—キーワード: ELISA, IFAT, 口腔液, PRRSV, RT-nested PCR.

----- 日獣会誌 67, 323～327 (2014)

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) は豚の呼吸障害や流死産の原因ウイルスで [1], 国内の養豚場における発生被害額は年間約280億円と試算されるなどその被害はきわめて大きい [2]。このため、養豚場においては飼養環境の改善, 消毒, ワクチン接種等の対策が実施されているが, その際には豚群のPRRSV感染状況を把握するために定期的に抗体検査や遺伝子検査が行われる [3]。

口腔液は唾液と粘膜浸出液の混合液で, 抗体やウイルスが含まれる [4]。PRRSVも口腔液から検出されることが知られており [5], PRRSV検査に口腔液を用いる方法が近年報告されている [6]。しかし, 国内におけるPRRSV検査には通常血清が用いられており, 口腔液を用いた検査はほとんど行われていない。口腔液は採材が容易であることや, 複数の個体から採集されるため群単位でのウイルス検出が可能になることなどから, 検査材料としての有用性が指摘されている [7]。このため国内においても口腔液を材料としたPRRSV検査方法について検討することは, 今後のPRRSV対策において有意義

と考え検討を行った。

材料及び方法

材料: 2011年6月～2012年3月, 新潟県内のPRRSV浸潤11農場及び清浄3農場, 計14養豚場において2～8カ月齢の肥育豚又は繁殖育成豚を対象に, 1農場あたり1～6群, 計50群の口腔液と同群から2～10頭 (平均4.6頭) ずつ, 計233頭の血清を採材し検査に供した。なお, 一豚房内の豚を一群として扱い, 一群あたり頭数は4～40頭 (平均14.6頭) であった。

口腔液の採集: 豚の口腔液は綿ロープを用いて採集した。すなわち, 直径9mmの無漂白の綿ロープを用意し, 下側の端をほどいたものを複数本束ね, 床上10cm程度に垂れるように長さを調節して豚房の柵に結紮した。ロープは豚房の2カ所に離して設置した。豚がロープを咬み始めたら, 豚が交互に咬めるように20分間放置し, その後アルコール綿で拭いた鋏でロープを切り取り, フリーザーバッグに回収した。ロープに浸み込んだ口腔液を搾り出し, 検査に供するまで-20℃以下で保存した。

† 連絡責任者: 会田恒彦 (新潟県中央家畜保健衛生所)

〒959-0423 新潟市西蒲区旗屋686

☎0256-88-3141 FAX 0256-88-3185

E-mail: aita.tsunehiko@pref.niigata.lg.jp



図1 綿ロープを用いた口腔液の採材
豚が入れ替わりながらロープを噛み、ロープに吸収された口腔液を搾り出して採集した。

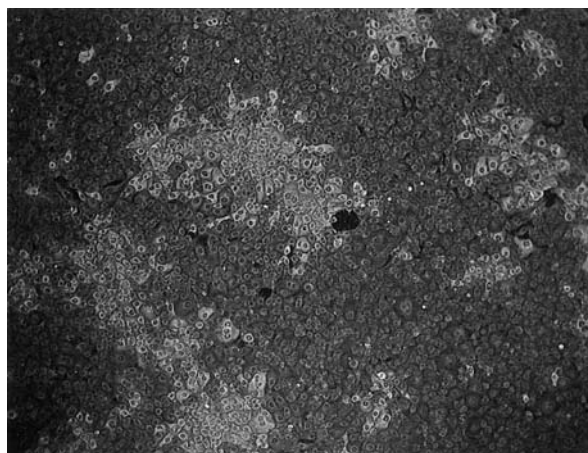


図2 口腔液を用いたPRRSVのIFAT
PRRSV感染細胞に特異的蛍光が認められた(×100)。

IgG 濃度測定：5農場の5群について、同一群の5～8頭分の血清を等量混和したもの（プール血清）及び口腔液のIgG濃度を市販キット（ブタIgG定量キット，メタボリックエコシステム研究所(株)，宮城）により測定した。

抗体検査：血清及び口腔液からのPRRSV抗体検出を間接蛍光抗体法（IFAT）及び市販キット（PRRSエラーザキット，アイデックス ラボラトリーズ(株)，東京）を用いたELISAにより実施した。

血清のIFATはプール血清を用い，既報 [8] により実施した。IFAT用プレートは，96穴マイクロプレートに発育したMARC-145細胞にPRRSV EDRD-1株を接種してPRRSV感染細胞とし，あわせて非接種細胞を陰性対照とし，80%アセトンで固定し作成した。血清はPBS⁻で20倍に希釈し，プレートと37℃で1時間反応させ，PBS⁻で40倍に希釈した二次抗体（FITC-RABBIT ANTI-PORCINE IgG，ライフテクノロジーズジャパン(株)，東京）を37℃で40分間反応させた。判定は，蛍光顕微鏡による観察でPRRSV感染細胞の集塊に蛍光を認め，なおかつ非感染細胞に蛍光が認められなかった場合に抗体陽性とした。

口腔液のIFATは血清と同一プレートを用い2通りの方法で行った。始めに血清のIFATで陽性と判定された5群の口腔液を用い，血清と同様に行った。次に一部方法を変更し全群で実施した。すなわち，口腔液を3,000rpmで5分間遠心した上清原液を，プレートと4℃で一晩（17時間）反応させ，20倍希釈の二次抗体で血清と同様に判定した。血清のIFAT判定との一致度はκ係数により評価した。

血清のELISAは個体別に添付のマニュアルに従って実施した。検体と指示血清のOD値（650nm）の比（S/P比）≥0.4が陽性であるが，群に1頭でも陽性個体

表1 IFAT及びELISAによるPRRSV抗体検査成績

判定	IFAT		ELISA		
	血清	口腔液	血清	口腔液	
				両指示 ^a 血清	×4両指示 ^b 血清
+	40	38	40	23	38
-	10	12	10	27	12

+：抗体陽性群 -：抗体陰性群

a：陽性及び陰性指示血清を用いた判定

b：4倍希釈の陽性及び陰性指示血清を用いた判定

がいた場合にその群を陽性群と判定した。

口腔液のELISAは，口腔液を静置した上清原液と，陽性及び陰性指示血清（両指示血清）をプレートに加え4℃で一晩（17時間）反応させ，以降はマニュアルに従って実施した。なお，両指示血清は原液を用いたものと，添付の検体希釈液で4倍に希釈したもの（4倍希釈両指示血清）の2種類を用いS/P比を算出した。判定は血清と同様にS/P比≥0.4を陽性とした。群の血清ELISA判定との一致度についてもκ係数により評価した。

遺伝子検査：PRRSV特異遺伝子の検出は，プール血清及び口腔液を3,000rpmで5分間遠心した上清200μlからRNA抽出キット（High Pure Viral RNA Kit，ロシュ・ダイアグノスティックス(株)，東京）を用いてRNAを抽出し，Christopher-Henningsら [9]の方法によるRT-nested PCRをRT-PCRキット（Prime Script One Step RT-PCR Kit Ver.2，タカラバイオ(株)，滋賀）及びPCRキット（AmpliTaq Gold 360 Master Mix，ライフテクノロジーズジャパン(株)，東京）を用いて行った。RT-PCRのプライマー塩基配列は5'-TCGTGTTGGGTGGCAGAAAAGC-3'（フォワード）と5'-

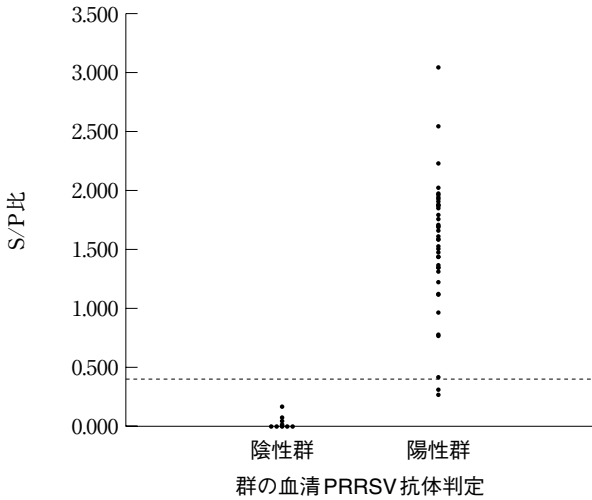


図3a 群内の血清 PRRSV-ELISA 平均 S/P 比
 個体の血清を用いた PRRSV-ELISA で群内に 1 頭でも抗体陽性 (S/P 比 ≥ 0.4) がいた場合、その群を PRRSV 抗体陽性群とし平均 S/P 比を示した。
 点線：カットオフ値 0.4
 陽性群数：40 陰性群数：10

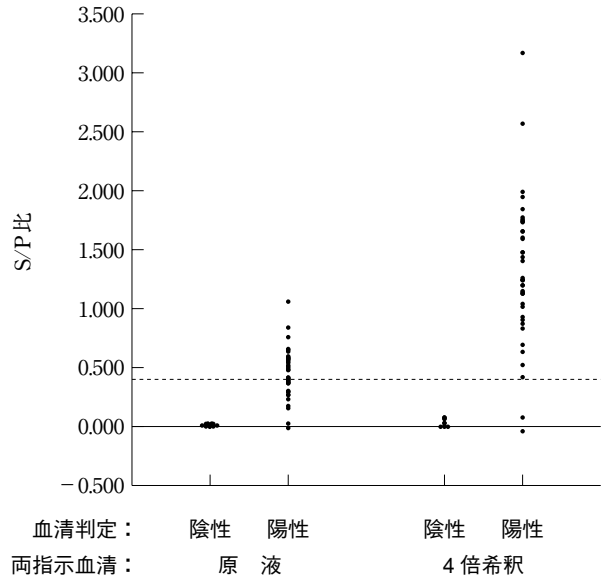


図3b 口腔液を用いた PRRSV-ELISA S/P 比
 口腔液を用いた PRRSV-ELISA で、陽性及び陰性指示血清 (両指示血清) 原液とそれらを 4 倍に希釈したもので算出した S/P 比を、同一群の血清 PRRSV-ELISA 判定別にそれぞれ示した。
 点線：カットオフ値 0.4

GCCATTACCCACACATTCTTCC-3' (リバーズ) で、RT 反応を 50 °C 30 分、94 °C 2 分で行い、続いて 1 サイクル 94 °C 30 秒、58 °C 30 秒、72 °C 30 秒として、35 サイクルの条件で PCR 反応を行った。Nested PCR のプライマー塩基配列は 5'-CCAGATGCTGGGTAAGATCAT-3' (フォワード) と 5'-CAGTGTAACCTTATCCTCCCTGA-3' (リバーズ) で、1 サイクルを上記と同様に、30 サイクルの条件で PCR 反応を行った。判定は、nested PCR 産物の電気泳動で PRRSV 特異遺伝子 (236bp) が認められた場合に陽性とした。

成 績

口腔液の採集：採材を実施したすべての群で豚がロープを咬む様子が観察された (図1)。回収したロープから採集された口腔液の量は 3 ~ 22ml (平均 10.6ml) であった。

IgG 濃度測定：プール血清の IgG 濃度は 8.40 ~ 16.40 mg/ml (平均 10.83mg/ml) であった。一方、口腔液の IgG 濃度は 0.01 ~ 0.03mg/ml (平均 0.018mg/ml) であった。

IFAT：プール血清の IFAT は陽性が 40 群、陰性が 10 群と判定された。

血清の IFAT が陽性であった 5 群の口腔液を用い、血清同様に IFAT を実施したところいずれも陰性であった。口腔液中の IgG は微量であったため、口腔液を希釈しないこと、低温で反応時間を延長すること及び二次抗体の濃度を濃くすることを変更した。その結果、PRRSV 感染細胞に蛍光を認め、非感染細胞に蛍光が認められな

ったことから、PRRSV 特異抗体が検出されたと判断された (図2)。これをもとに、全群の口腔液について IFAT を実施した結果、陽性が 38 群、陰性が 12 群と判定された。プール血清と口腔液の判定は 48 群 (陽性 38 群、陰性 10 群) で一致し、一致率は 96 % (48/50 群) であった (表1)。 κ 係数は 0.88 で高い一致度 ($\kappa > 0.8$) と判定された。

ELISA：血清の ELISA を 50 群 233 頭について実施し、陽性が 40 群、陰性が 10 群と判定された。陽性 40 群の群内血清平均 S/P 比は、38 群が 0.416 ~ 3.044 であったが、残り 2 群については 0.268 及び 0.311 で、5 頭中 2 頭及び 4 頭中 1 頭が抗体陽性の群であった (図3a)。これら 2 群の 2 農場では以降の肥育ステージ群も抗体陽性であった。

口腔液については、両指示血清原液を用いた場合に陽性が 23 群、陰性が 27 群と判定された。しかし、4 倍希釈両指示血清を用いた場合には 15 群で判定が陽転し、陽性が 38 群、陰性が 12 群と判定された。判定がいずれの場合も陽性であった 23 群の S/P 比は、両指示血清原液で 0.406 ~ 1.060、4 倍希釈両指示血清で 1.016 ~ 3.167 (以降同様順に表記) であった。判定が陽転 (≥ 0.4) した 15 群の S/P 比は 0.157 ~ 0.394 と 0.421 ~ 1.200 で、血清の ELISA もすべて陽性群であった。一方、陰性であった 12 群は S/P 比が -0.037 ~ 0.079 と -0.012 ~ 0.026 であった (図3b)。これら 12 群の血清 ELISA は、10 群は陰性であったが、2 群は前述の群内血清平均

表2 PRRSV 遺伝子の検出成績

		口腔液	
		+	-
血清	+	14	4
	-	1	31

+ : 遺伝子検出陽性 - : 遺伝子検出陰性

S/P比が0.4未満の陽性群であった。4倍希釈両指示血清を用いた場合、口腔液のELISAは血清との判定が48群（陽性38群、陰性10群）で一致し、一致率は96%（48/50群）であった（表1）。この場合の κ 係数は0.88で、高い一致度（ $\kappa > 0.8$ ）と判定された。PRRSV清浄農場の6群については、血清及び口腔液とも抗体陰性であった。なお、群内の血清平均S/P比と口腔液のS/P比については相関が認められなかった。その他、血清はELISAとIFATで判定が一致し、口腔液についても同様であった。

遺伝子検査：PRRSV特異遺伝子の検出は、血清が陽性18群、陰性32群で、口腔液が陽性15群、陰性35群であった（表2）。両者の判定は45群（陽性14群、陰性31群）で一致した（一致率90%）。PRRSV清浄農場の6群はいずれも陰性であった。

考 察

PRRSV対策の一つとして豚群の定期的な検査による感染状況の把握、いわゆるPRRSVモニタリングは重要であり、従来その検査材料には血清が用いられている[3]。今回われわれは、国内で市販されている試薬を使用し、口腔液を用いたPRRSV抗体及び遺伝子検査を実施したところ、得られた成績はいずれも血清を用いた成績と良く一致した。

PRRSVの実験感染では血清の他に口腔液からもPRRSV抗体が検出されている[10]。口腔液を用いたIFATについては、血清と同様の方法では蛍光が認められなかったが、これは口腔液のIgG濃度が血清よりもきわめて薄いことが要因と推察された。このため、口腔液を希釈せず、4℃で長時間反応させたところ抗原抗体反応が進み、微量なPRRSV抗体の検出が可能になったと考えられた。

口腔液を用いたELISAについてはIFATの方法を参考にして実施したが、OD値の低い検体は両指示血清原液を用いて算出したS/P比では陰性と判定された。これらは4倍に希釈した両指示血清でS/P比を算出した場合に陽性と陰性に分けられ、IFATと判定が一致した。市販のELISAキットは血清用であり口腔液の使用については適応外である。しかし、今回の方法により口腔液中のPRRSV抗体も検出可能と考えられ、調査対象とした

2～8カ月齢の豚群については、PRRSV抗体保有の確認に口腔液を使用することは有用と考えられた。また、IFATとELISAの2種類の検査で判定は一致したことから、口腔液を用いたPRRSV抗体検査を実施する際にはいずれかを選択することも可能と思われた。

遺伝子検査においても血清と口腔液の判定一致率は高かったが、判定が異なった群については血清が陽性であったものが多かった。PRRSVの実験感染では血清と同様の期間に口腔液からPRRSV遺伝子が検出されている[10]。また、リアルタイムRT-PCR法による口腔液からのPRRSV遺伝子の検出では、酵素を倍量添加すると検出率が増加することも報告されており[11]、今後は血清と口腔液の遺伝子検査の成績一致率を高めるための条件検討も必要と思われた。

血清と口腔液で抗体検査の判定が異なった2農場の2群については、個体血清のELISA陽性率が低く、その後の肥育ステージは血清の個体陽性率と平均S/P比がより高い値であった。また、2群のうち1群は、血清と口腔液の両方からPRRSV遺伝子が検出された（データ表示なし）ことからPRRSV感染初期の群と推察された。口腔液のPRRSV抗体は、濃度が低い又は出現前であったため検出されなかった可能性も考えられた。残り1群は、両方からPRRSV遺伝子は検出されなかったが、複数個体分がプールされた材料のためウイルス量が希釈され少なくなったのかもしれない。

生体の豚群についてPRRSV感染状況を詳細に把握するには、個体別の血清を用いた検査が標準的でありかつ最適と思われる。しかし、野外の農場において、同一豚房から血清とあわせて採材した口腔液は、抗体及び遺伝子検査において高い成績一致率を示したことから、豚群のPRRSV感染状況を判定する検査材料に口腔液は使用可能と考えられた。口腔液は豚の保定が不要なため採材が安全かつ容易であり、豚にも採血の際に伴うストレスがかからない。また、豚群を対象として検査を実施する際、個体別に検査するより検体数が少なくなりコストが抑えられるなどの利点もあげられる。PRRSVによる経済的被害は大きく、その対策に伴うPRRSV検査は養豚場の現場にとって重要であるが、口腔液は豚群を対象にした検査及び広範囲にわたる浸潤調査の際に有用と考えられた。

引 用 文 献

- [1] Rossow KD : Porcine reproductive and respiratory syndrome, *Vet Pathol*, 35, 1-20 (1998)
- [2] 山根逸郎 : PRRS感染による経済的な被害, *日本豚病研究会報*, 61, 1-4 (2013)
- [3] 呉 克昌, 奥村華子 : PRRSウイルスのコントロール事例と、そこから学ぶ養豚密集地域での農場安定化と今後の課題, *日本豚病研究会報*, 59, 25-30 (2012)

- [4] Mckie A, Vyse A, Marple C : Novel methods for the detection of microbial antibodies in oral fluid, *Lancet Infect Dis*, 2, 18-24 (2002)
- [5] Wills RW, Zimmerman JJ, Yoon KJ, Swenson SL, McGinley MJ, Hill HT, Platt KB, Christopher-Hennings J, Nelson EA : Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection, *Vet Microbiol*, 55, 231-240 (1997)
- [6] Kittawornrat A, Prickett J, Chittick W, Wang C, Engle M, Johnson J, Patnayak D, Schwartz T, Whitney D, Olsen C, Schwartz K, Zimmerman J : Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in serum and oral fluid samples from individual boars: will oral fluid replace serum for PRRSV surveillance?, *Virus Res*, 154, 170-176 (2010)
- [7] Ramirez A, Wang C, Prickett JR, Pogranichniy R, Yoon KJ, Main R, Johnson JK, Rademacher C, Hoogland M, Hoffmann P, Kurtz A, Kurtz E, Zimmerman J : Efficient surveillance of pig populations using oral fluids, *Prev Vet Med*, 104, 292-300 (2011)
- [8] Murakami Y, Kato A, Tsuda T, Morozumi T, Miura Y, Sugimura T : Isolation and serological characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses from pigs with reproductive and respiratory disorders in Japan, *J Vet Med Sci*, 56, 891-894 (1994)
- [9] 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)
- [10] Prickett J, Simer R, Christopher-Hennings J, Yoon KJ, Evans RB, Zimmerman JJ : Detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in porcine oral fluid samples: a longitudinal study under experimental conditions, *J Vet Diagn Invest*, 20, 156-163 (2008)
- [11] Chittick WA, Stensland WR, Prickett JR, Strait EL, Harmon K, Yoon KJ, Wang C, Zimmerman JJ : Comparison of RNA extraction and real-time reverse transcription polymerase chain reaction methods for the detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine oral fluid specimens, *J Vet Diagn Invest*, 23, 248-253 (2011)

Detection of Anti Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Antibody and Specific Virus Gene from Oral Fluids

Tsunehiko AITA^{1)†}, Hitoshi MOUE¹⁾, Kazunori MURAYAMA¹⁾, Satoshi OTAKE²⁾,
Kensuke TANAKA¹⁾, Yuri SASAGAWA¹⁾, Shizuka FUKUDOME¹⁾
and Ryohei HIGUCHI¹⁾

1) *Niigata Chuo Livestock Hygiene Service Center, Hataya 686, Nishikan-ku, Niigata, 959-0423, Japan*

2) *Swine Extension & Consulting, 4088-2 Ijimino, Shibata, Niigata, 957-0021, Japan*

SUMMARY

From 14 swine herds in Niigata prefecture, serum and pen-based oral fluid samples were collected from 50 pig groups aged two to eight months. The specimens were assayed for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) infection using the indirect fluorescent antibody test (IFAT), ELISA and RT-nested PCR. With both IFAT and ELISA, 40 groups were positive and 10 were negative in the serum samples, and 38 groups were positive and 12 were negative in the oral fluids (96% matched). In terms of the detection of the PRRSV specific gene using RT-nested PCR, 18 groups were positive and 32 groups were negative in the serum samples, and 15 groups were positive and 35 groups were negative in the oral fluids (90% matched). Oral fluid sampling may contribute to the development of high efficiency, low cost PRRSV surveillance in pig groups. — Key words : ELISA, IFAT, Oral fluid, PRRSV, RT-nested PCR.

† Correspondence to : *Tsunehiko AITA (Niigata Chuo Livestock Hygiene Service Center)*

Hataya 686, Nishikan-ku, Niigata, 959-0423, Japan

TEL 0256-88-3141 FAX 0256-88-3185 E-mail : aita.tsunehiko@pref.niigata.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 67, 323 ~ 327 (2014)