

人工授精で伝播されるウイルス性疾患と雄豚精液からの PCR による PRRSV, PCV-2 検出について

人工授精で伝播されるウイルス性疾患と雄豚精液からの PCR による PRRSV, PCV-2 検出について

千葉県畜産総合研究センター 中根 崇

近年、豚における人工授精 (AI) は、自然交配に比べ疾病に感染する危険を減らし、多くの優良な遺伝子の導入が可能なることから取り入れる養豚農家が増加し、また、海外からの精液の輸入も注目されている。しかし、一度、流通精液中に病原ウイルス等が混入すると広範囲に伝播し、大きな被害が発生することになる。近年、諸外国で流通精液を介してのオーエスキー病 (AD) や豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) の感染や伝播が報告され、国内でもいくつかの人工授精所 (AI センター) の繋養豚での AD の感染が確認され、精液の販売が中止されている。そのため、AI センターでは、新たに遺伝資源として導入する候補豚を厳格に着地検疫して、定期的に種雄豚や採取した精液に対し

て感染が予測される広範囲の病原微生物の分離や抗体測定および遺伝子検索 (PCR) 等の検査を実施することで感染の危険を少なくすることが必要である。

そこで、最近の学術誌から AI に関するウイルス疾病について、感染防除の参考となる知見を紹介する。

1. AI 関連ウイルス疾病についての疫学

2005 年の *Theriogenology* 誌にフランス国立繁殖管理研究所の Guerin らの AI 関連ウイルス疾病についての総論が掲載されている [1]。この中で、AI を介して伝播する主なウイルスの伝染性を表に示している (Table 1, 2)。これらのウイルスは、

Table 1 Viruses present in bore semen and susceptible to being transmitted through AI

	Aujeszky	Swine vesicular disease	African swine fever	FMD	CSF	PPV	PRRS	PCV-II
Virus isolation in semen	+	+	+	+	+	+	+	+
Potential risk for contamination	+	+	+	Low	+	+	+	+

Table 2 Viruses present in bore semen and susceptible to being transmitted through AI

	Adenovirus	Reovirus	Influenza	TGE	Enterovirus*	SPV
Virus isolation in semen	+	+	+	+	+	ND
Potential risk for contamination	Low	Low	Low	Very Low	+	+

* Including Teschens virus; ND, no date

Aujeszky; AD, Swine vesicular disease; 豚水疱病, African swine fever; アフリカブタコレラ, FMD; 口蹄疫, CSF; ブタコレラ, PPV; 豚パルボウイルス, PRRS; 豚繁殖・呼吸障害症候群, PCV-2; 豚サーコウイルス 2 型, PPV; 豚パルボウイルス, Adenovirus; アデノウイルス, Reovirus; レオウイルス, Influenza; ブタインフルエンザ, TGE; 伝染性胃腸炎, Enterovirus; エンテロウイルス, SPV; swine papilloma virus (乳頭腫)

世界的に問題とされており、供給精液からの感染リスクを有するウイルスは多い。日本では、表の他に日本脳炎やサイトメガロウイルス等での精液から伝播が報告されている。

また、最近、問題とされたウイルスは、古典的なFMDとCSFの復活と新たに出現して来たPRRSとPCV-2である。

FMDは、近年、欧州各地での散発が報告されている。臨床徴候の出現の前に精液に認められ、ウイルス濃度は低い、精巣と付属物腺にリンパ管と血液流れを通して精液に排泄される。

CSFは、オランダで精液汚染による1997-1998年の流行が報告されている (Table 3)。

CSFVは、実験感染で精液への排出が確認され、感染胎子の持続性感染が認められており、これらの子豚が疾病継続の原因と考えられる。日本では、ブタコレラの清浄化を宣言したが、同属の牛下痢粘膜病ウイルス (BVDV) の種雄豚での感染が認められている。BVDVは、精液からの伝播の報告があり、注意が必要と考える。

PRRSは、1993年に精液からの感染が明らかにされ、血中や精液中での長期間の検出が報告されている (Table 4)。疾病発見当初、フランス、英国などの国のAIセンターでは、陰性でなければならない疾患であったが、デンマーク、ドイツなどの他の国では、種雄豚のワクチン接種が実施さ

Table 3 Classical swine fever in semen and contamination by AI

	Type of infection	Sero-conversion (dpi)	CSFV in semen	Duration of excretion (dpi)	Site of positivity	Transmission by AI
Choi et al.	EI	7-14	+	7 to > 63	Seminal fluid and non-sperm fraction	ND
Hennecken	NI		ND	ND	ND	58% (21/36 ^a)
Floegel	EI	12	+	8-12	Epididymis	33% (2/6 ^b)
De Smit	EI	14-21	+	5-11		sows ++ (fetuses)

EI, experimental infection; NI, natural infection; dpi, day post infection

^a Number of herds.

^b Number of animals.

Table 4 Detection of PRRS virus RNA in serum and semen of boar after natural or experimental infection

	Breed	Type of infection	No. animals	Detection of PRRS virus (PCR* or bioassay**) (dpi)	
				Serum	Semen
Christophher-Hennings et al.	Landrace	Natural infection	2	4-39 ^a	4-70 ^a
	Yorshire	Natural infection	3	4-28 ^a	4-11 ^a
	Hampshire	Natural infection	3	4-18 ^a	4-46 ^a
Swenson et al.	ND	Experimental infection		ND	3-43 ^b
Larochelle et al.	ND	Experimental infection		4-55 ^a	4-47 ^a

ND, no data.

^a Natural infection

^b Experimental infection

人工授精で伝播されるウイルス性疾患と雄豚精液からの PCR による PRRSV, PCV-2 検出について

れ、精液を介したワクチン株による繁殖障害の発生が報告された。日本の AI センターの種豚では、ワクチン使用は認められておらず、抗体陰性豚を導入し、定期的な検査で清浄度の維持を図っている。

PCV-2 は、2000 年に精液からの垂直感染が報告され、ウイルスが自然感染後に抗体を獲得した豚の精液に認められ、長期間に渡り検出される。しかし、AI センターでのこの疾患を管理する方法を定義するのに科学的なデータが十分で無く、高い罹患率から、AI センターからウイルスを排除することが困難であり、感染種豚の対応に苦慮しているのが現状と報告している。

精液の流通に関して、精液の衛生状態を保証する検査証明書の添付と国際獣疫事務局 (OIE) 等の公的な基準の遵守が必要を挙げている。

また、ウイルスの危険度別をカテゴリー化 (分類化) し、必要な対応を提唱している。カテゴリー化は、流通精液を利用する養豚農家に満足な衛生レベルを保証する。カテゴリー I は、衛生上危険性が高く、根絶化を必要とするウイルス; FMDV, ADV, CSFV, アフリカブタコレラウイルス, 豚水疱病ウイルス。カテゴリー II は、衛生上の危険であるが、衛生的な対応が確立し、清浄化に向かっているウイルス; PRRSV, 日本脳炎ウイルス, ピコルナウイルス。カテゴリー III は、衛生上危険と考えられ、精液による伝播の証明と更なる病原性の検索を必要とするウイルス; PCV-2, ルブラウイルス, ピコルナウイルス, エンテロウイルス。カテゴリー IV は、精液による伝染が確認されず、危険性のないウイルス。

Guerin らの論文を概説したが、今後、日本における AI の普及のためにも AI センターの質を向上

させることが急務であり、カテゴリー別の衛生管理マニュアルを作成し、ウイルス汚染のチェックが必要と考える。そこで、参考に米国のスワイン・ジェネチック・インターナショナル (SGI 社) の衛生管理マニュアルを紹介する。

[SGI 社衛生管理マニュアル]

SGI 社の精液は、1989 年から日本へ精液を輸出され、いくつかの系統造成の基礎豚に利用されるなど、多方面で日本の種畜改良に貢献している。本マニュアルは、輸出事業部長である Dr. Harold H. Hodson, Jr. から提示された。

1) 種雄豚候補導入時の着地検査

着地検査期間は 60 日間で、第 1 段階として 30 日間の初めに実施する検査項目は、PRRS (IFA; 間接蛍光抗体およびエライザ), AD (SN; 血清中和試験), レプトスピラ (RT) (凝集溶菌反応; 5 つの株の抗体) である。第 2 段階として次 30 日間の初めに実施する検査項目は、PRRS (IFA およびエライザおよび PCR), AD (SN), RT (9 つの株), 伝染性胃腸炎 (TGE) (SN および ELISA), BR (Brucella suis; 試験管凝集反応, 補体結合反応), 水疱性口炎 (VS) (SN), トキソプラズマ病 (TP), 結核 (抗酸菌症) (TB) (Mycobacterium bovis and M.avium) である。

これらの検査をクリアーした豚は、人工的に環境を制御された豚舎で消毒された専用の衣服と長靴を身に付けた専従の作業者が管理する。

また、訪問客による豚の観察は、観察用の窓越しに行われ、豚と接触することはない。

2) 全繫留種雄豚に対する検査

60 日毎に実施する検査項目は、PRRS (IFA およびエライザ), AD (SN), VS (SN) である。

120日毎に実施する検査項目は、RT（9つの株）、TGE（SNおよびエライザ）、TP、結核である。

3) 毎週実施する検査

全繋留豚の20%について、ランダムに血清または精液のPRRSウイルスのPCRを実施する。これらの検査は、米国農務省が承認しているアイオワ州立大学獣医学診断研究室（Iowa State University Veterinarian Diagnostic lab）で実施される。また、諸外国へ輸出時に相手国が希望する個体の検査項目において、精液を介して伝染する疾病として、PRRS、AD、RT、BRを検査する。また、豚群の中で問題とされる疾病として、TB、TGE、TP、VSを検査する。

4) 供給精液への広域スペクトル抗生物質の添加

抗生物質の添加の目的は、17℃前後の保存温度帯で精液採取時に含まれている大腸菌などの腸内細菌の増殖を阻止し、精子性状への致命的なダメージを防止する。広域スペクトルのゲンタマイシン、リンコマイシン、スペクチノマイシン等を用い、精液を介して伝播するRT、BRおよびTBの疾病の予防も実施する。

5) 雄豚に対するワクチンの接種

ワクチンの接種は原則として実施せず、血清検査等で陰性を維持する。

なお、米国において、完全に清浄化されているFMDV、CSFV等のウイルスは、検査対象外である。

また、PCV-2について、対応に苦慮しており、現状での供給精液の陰性の保証は、難しいとのことであった。

SGI社の衛生管理マニュアルは、日本のAIセンターにおける危険ウイルスであるPRRS、AD等の衛生対策として、大いに参考になる。なお、

PRRSVについては、毎週、血清や精液のPCR検査を実施しており、特に危険度が高いと思われる。また、今後、PCV-2の対応も重要となると考えられる。

そこで、次に精液中のPRRSVとPCV-2のPCR検出に関する論文を紹介する。

2. 精液中のPRRSVに対するRNA抽出方法の比較について

長年に渡りPRRSを精力的に研究している米国サウスダコタ大学のJane Christopher-Henningsらは、雄ブタ精液からのPRRSVのリアルタイムPCRのためのRNA抽出方法を比較し、2006年のJ.Virol.Meth.で報告している [2]。

RT-PCRによる精液中のPRRSV検出は、精漿がウイルス分離（VI）時に細胞毒性を有すことから、以前から広く用いられていた。しかし、雄ブタ精液は、粘性、非均一性、多量の細胞質と射精量が多いため、精液中の細胞群からのRNA抽出方法が問題であった。したがって、効率的な精液からのウイルスRNAの抽出方法は、PCRの最適化のために重要である。本研究の最初の試験は、正常な精液にPRRSVを添加し、精液の成分として含まれる細胞群にウイルスを結合（スパイク）させた。次に、この模擬的に作成した感染精液材料からのウイルスRNAの抽出プロトコルを比較した。続いて、最良とされたプロトコルを用いて、PRRSVを感染させた豚から精液を採取し、実際にウイルスが感染している細胞群から含まれる精液からウイルスRNA抽出し、リアルタイムPCRを行った。この抽出プロトコルは、従来の手法と比べて極めて高感度にウイルスを検出しており、雄ブタ精液検査に有用と思われる。

人工授精で伝播されるウイルス性疾患と雄豚精液からの PCR による PRRSV, PCV-2 検出について

(1) RNA 抽出試験

1) サンプルの調整

PRRSV 野外分離株 SD-23983 を 1 頭の PRRSV 抗体陰性の雄ブタから採取した精液を遠心処理した細胞断片に 1:1 の割合で混ぜられた。混合溶液には、ウイルスが 3.1×10^7 TCID₅₀/ml の濃度で含まれ、階段希釈された。表の 6 種類の RNA 抽出方法により PRRSV をスパイクした精液中の細胞群で比較した (Table 1)。

プロトコール # 1; 500 μ l のウイルス結合細胞液と前処理用の可溶化カラムに Qiagen Qiashredder™ (QIashredder (#79656)) を用い、Gguanidium リンス緩衝液 buffer 500 μ l を加え、16,100 \times g で 2 分間遠心し、溶出液 500 μ l と等量 70% エタノールと結合させ、RNA 抽出と洗浄に Qiagen RNeasy® (RNeasy Mini Kit (#74104)) を使用し、抽出液 30 μ l を得る。

プロトコール # 2; プロトコール # 1 と同様の手法であるが、RLT リンス緩衝液とキット専用のカラムを用いる。

プロトコール # 3; 140 μ l 細胞液とキット専用のカラムを用い、600 μ l の RLT リンス緩衝液を加え、15 秒間ボルテックスし、3 分間高速遠心し、

上澄み 600 μ l に 70% エタノール 600 μ l を結合させ、RNeasy カラムに加え、抽出液 30 μ l を得る。プロトコール # 4; 500 μ l の細胞液と等量のプロテイン K を加え、37°C 10 分間 3 インキュベートし、600 の μ l の guanidium 緩衝液加え、15 秒間ボルテックスし、3 分遠心し、上澄み 600 μ l に 70% エタノール 600 μ l を結合させ、RNeasy カラムに加え、抽出液 30 μ l を得る。

プロトコール # 5; 140 μ l の細胞液に 25 μ l のブロメライン液 (Bromelain (B-4882)) を加え 37°C 30 分間 3 インキュベートし、600 の μ l の RLT 緩衝液加え、15 秒間ボルテックスし、3 分遠心し、上澄み 600 μ l に 70% エタノール 600 μ l を結合させ、RNeasy カラムに加え、抽出液 30 μ l を得る。プロトコール # 6; 従来の石炭酸 / クロロホルムに従った [3]。

リアルタイム PCR は、既報に従った [4]。

2) 結果と考察

階段希釈されたウイルススパイク細胞を含む精液材料から各キットの RNA 抽出プロトコールに従って RNA を抽出し、各 3 検体 RNA について単一チューブによるリアルタイム PCR (Tetracore VetAlert™) を実施した (Table 2)。

3 検体の平均 Ct 値 (検出されるターゲットの総

Table 1 RNA extractions methods performed to detect PRRSV in the seminal cell fraction of boar semen

#1	Guanidinium lysis buffer/Qiashredder ^a /RNeasy ^b protocol
#2	RLT lysis buffer (proprietary, kit provided ^b)/Qiashredder/RNeasy protocol
#3	RLT lysis buffer (proprietary, kit provided)/centrifugation/RNeasy protocol
#4	Proteinase K lysis buffer/RNeasy protocol
#5	Bromelain/RNeasy protocol
#6	Phenol/chloroform protocol

^a QIashredder (#79656), Qiagen Inc., Valencia, CA.

^b RNeasy Mini Kit (#74104), Qiagen Inc., Valencia, CA

Table 2 Mean RT-PCR cycle thresholds (Ct) as determined with Tetracore's VetAlert™ PRRSV Kit from varying dilutions of PRRSV-inoculated seminal cell fraction using three replicates of six different RNA extraction procedures

RNA extraction protocol	Dilution of PRRSV inoculated into seminal cell fraction (TCID ₅₀ /ml)						NTC ^b	Standard deviation
	10 ^{3a} (3.1 x 10 ⁴)	10 ⁴ (3.1 x 10 ³)	10 ⁵ (3.1 x 10 ²)	10 ⁶ (3.1 x 10 ¹)	10 ⁷ (0.3.1)	10 ⁸ (0.031)		
#1	26.06 ^c	29.95	35.34	37.02^d	N	42.83 ^c	N	1.31 ^f
#2	27.65	31.37	36.45^d	40.46 ^e	43.17 ^f	N	N	2.33
#3	27.74	31.28	35.38	38.41^d	N	N	N	0.51
#4	31.82	32.74	37.95 ^d	N	N	N	N	2.93
#5	31.07	34.23^d	39.57^e	43.3 ^f	N	N	N	0.11
#6	41.72 ^f	N	N	N	N	N	N	-

^a Dilution of wild type isolate (SD-23983) PRRSV inoculated into seminal cell fraction with a starting undiluted concentration of 3.1 x 10⁷ TCID₅₀/ml.

^b NTC, No PRRSV RNA template control.

^c Mean cycle threshold (Ct) values of three replicates determined by Tetracore's VetAlert™ PRRSV Kit. A Ct value of 45 was considered a negative PCR result (N).

^d Highest dilution of PRRSV where all three replicates resulted in a PRRSV RT-PCR Ct value <45.

^e One of three replicates were PRRSV-positive.

^f Standard deviation of the mean for Ct values at the highest PRRSV dilution where all three replicates resulted in a Ct value <45 as determined by Tetracore's VetAlert™ PRRSV Kit.

^g Two of three replicates were PRRSV-positive.

計に反比例する相対的な値) が最も低いレベルを示したのは、プロトコール #1 の Guanidium lysis buffer で希釈精液を処理し、RNeasy スピンカラムと QIAshredder カラムを用いて遠心し RNA 抽出精製する方法とプロトコール #3 の RLT lysis buffer で処理し Qiagen RNeasy 精製カラムを用いて遠心し RNA 抽出精製する方法であった。これらは、ウイルス添加精液 10⁶ 希釈 (ウイルス量ほぼ 30TCID₅₀/ml) 検体で観察された。なお、プロトコール #1 の 3 検体の内の 1 つで、10⁸ 希釈でウイルスを検出した。プロトコール # 1, 2, 5 と 6 の最高希釈での検出は、全 3 検体が PRRSV 陽性ではなかった。プロトコール # 6 の石炭酸 / クロロホルムは、最低希釈検体で、最高の平均 Ct 値を示した。したがって、精液からの RNA 抽出は、プロトコール # 1 および 3 が最も高い感度であった。

(2) PRRSV 感染試験豚精液のリアルタイム PCR 検出試験

1) 材料と方法

感染試験は、6 継代 PRRS 野外株 SD-23983 ウイルス液を 4 頭の抗体陰性雄ブタに鼻腔内に 10⁵ TCブタ ID₅₀/ml 噴霧し、精液をウイルス接種後 4 日間隔で 25 日までに 7 回採取した。なお、陰性対象材料として、ウイルス接種 16 日から 1 日前の 5 回採取した。精液は、手圧法で集め、膠様物をガーゼで濾過して除いた 50ml を 600 × g で 20 分間遠心分離し、PCR 時まで -80°C で保存された。抗体は、血清を IDEXX HerdChekR PRRS ELISA により調べられた。ウイルス分離は、融合性 MARC-145 の細胞を用いて、96-well プレートに血清および精液を連続 5 倍希釈処理後に接種した。希釈は、10% ウシ胎子血清と抗生物質を添加した MEM を使い、5% CO₂ 下 37°C で 24 日間培養された。培

人工授精で伝播されるウイルス性疾患と雄豚精液からの PCR による PRRSV, PCV-2 検出について

養後、プレートは、80%のアセトンで固定され、FITC-labeled SDOW-17 anti-PRRSV ヌクレオカプシド単クローン性抗体で染色し、蛍光顕微鏡で観察された。精液サンプルからの RNA 抽出は、プロトコール # 1, 3 で実施された。

血清のリアルタイム PCR は、既報に従った。

2) 結果と考察

ウイルス接種前の4頭の精液20検体はRT-PCRで全て陰性であった。接種後の精液材料27検体中では、プロトコール #1 で12検体(44%)、プロトコール #3 で4検体(15%)が陽性であった。なお、プロトコール #3 によって検出された4検体は、プロトコール #1 で全て検出された(Table 3)。

Table 3 Results of detection of PRRSV genome, virus or antibodies by RT-PCR using two RNA extraction protocols and VI on semen, VI and RT-PCR on serum, and serology from four PRRSV inoculated boars

	Post-inoculation (days)										
	4	5	6	11	12	13	14	18	20	22	25
Boar #1											
Semen											
PCR-1 ^a	43.10		41.07		-		-	-	43.66		
PCR-3 ^b	-		-		-		-	-	37.14		
VI	-		-		-		-	-	-		
Serum											
PCR		25.64		33.47							-
VI		+		-							-
Serology ^c		-(0.013)		+(1.250)					+(2.054)		
Boar #2											
Semen											
PCR-1	-		-	40.84		43.49		-	-		-
PCR-3	-		-	-		-		-	-		-
VI	-		-	-		-		-	-		-
Serum											
PCR		24.22		34.69							-
VI		+		-							-
Serology		-(0.023)		+(1.343)							+(1.6080)
Boar #3											
Semen											
PCR-1	-		36.46	40.46		-		-	-		-
PCR-3	-		38.56	-		-		-	-		-
VI	-		-	-		-		-	-		-
Serum											
PCR		27.71		29.80							33.04
VI		+		+							-
Serology		-(0.054)		+(0.492)							+(1.856)
Boar #4											
Semen											
PCR-1	37.68		41.39	40.19		40.69		44.13	-		-
PCR-3	42.19		-	41.28		-		-	-		-
VI	-		-	-		+		-	-		-
Serum											
PCR		25.20		32.90							-
VI		+		-							-
Serology		-(0.060)		+(1.447)					+(2.318)		

^a PCR-1 = extraction protocol #1, Ct value given if PRRSV positive, "-" indicates Ct \geq 45.

^b PCR-3 = extraction protocol #3, Ct value given if PRRSV positive, "-" indicates Ct \geq 45.

^c S/P ratio indicated.

プロトコール#1と#3のCt値を比較するとプロトコール#1に由来する12検体中11検体のCt値は、プロトコール#3より低い値を示した。PRRSVの分離は、全雄ブタの精液材料では27検体中1検体、血清材料では全雄ブタから分離され、全頭でウイルスが体内で増殖したことが確認された。また、血清のPCR成績から、長期間のウイルス血症が継続するが確認された。平均Ct値は、精液材料が血清材料に比較して高かった。よって、これらのデータからプロトコール#1がRT-PCRの検出感度の増強に関与したと推察された。

本研究は、精液の細胞群からRNA抽出を目的とした。このアプローチは、精管を結紮した雄ブタ精液の細胞群にPRRSVの存在を示したこれまでの研究に基づいている。細胞群には、PRRSVに感染したマクロファージを含み、PRRSVが感染したマクロファージは、ウイルス特有単クローン性抗体の二重の染色によって鑑定された。PRRSV抗体陽性ブタ精液の87%からウイルスが検出され、精管を結紮した雄ブタの精液の血漿と非精子細胞群検体の17%からウイルスが検出され、精液の血漿だけの検体には、ウイルスは含まれなかったことから、ウイルスの存在は、主に細胞と関連している。RNA抽出処理に使用する精液細胞群の量をプロトコール#3の140 μ lと比較するとプロトコール#1のQIAshredderカラム法は、500 μ lと多く、プロトコール#1は、能率的に、細胞を溶解させ、同様にゲノムDNAを剪断するように設計されている。加えて、QIAshredderカラムは、不溶性の破片をろ過し、高分子パイオポリマーで粘性を減らし、細胞成分や細胞破片を微細な遠心スピナカラムで細かく切断する。また、このプロトコールの長所は、蛋白質分解酵素Kとプロメライ

ン手法で必要とされている10から30分の加温を必要としない。

3. PCV-2の感染試験における豚精液からのPCRによるウイルスの検出について

カナダ食料検査局動物疾病研究所のLarochell Rらは、感染豚の精液からのPCV-2のPCR検出について、2000年J Clin Microbiolで報告している[5]。以前からPCV-2もPRRSVと同様に単球/マクロファージ等の細胞に感染性があると考えられており、PCV-2の精液中への潜在的な排出を証明し、危険性を述べている。

1) 材料と方法

感染試験は、6頭のPCV-1とPCV-2抗体陰性雄豚に対して、PCV-2野外分離株LHVA-V53を試験豚No. 3, 4に10⁴ TCID₅₀/ml、試験豚No. 5, 6に10⁶ TCID₅₀/mlを鼻腔内噴霧した。分離株LHVA-V53は、離乳後多臓器性発育不良症候群(PMWS)の肺のリンパ節からPCV非感染のPK-15細胞を用いて分離された。試験豚No. 1, 2には、PK-15細胞の培養上清5mlを接種した。精液は、ウイルス接種後4, 7, 11, 13, 18, 21, 25, 28, 35, および55日目に採取し、血清は、5, 8, 11, 13, 18, 21, 25, 28, 33, および47日目に採血した。抗体検査は、血清をPBSで20倍に希釈し、PCV-2を感染させたPK-15細胞と非感染細胞をアセトン処理で固定した96-wellプレートを用いて、間接蛍光抗体法(IFA)によって、PCV-2に対する抗体を検出した。PCV-2検出PCR用のDNA抽出物は、200 μ lの血清および精液から市販の抽出キット(DNeasy tissue kit)を用い抽出し、-70℃で保存された。プライマーは、ウイルス構造蛋白質(オープンリーディングフレーム2)の核酸配列

人工授精で伝播されるウイルス性疾患と雄豚精液からの PCR による PRRSV, PCV-2 検出について

から外側のプライマーが PCV-1 と PCV-2 を増幅し、内側のプライマーが PCV2 だけを増幅するように設計された [6]。

PCR outer sense and antisense primers ; 59-CAACTGCTGTCCCAGCTGTAG-39 (nucleotides 844 to 864) および 59-AGGAGGCGTTACCGCAGAAG-39 (nucleotides 1704 to 1723), 894bp 増幅

nested PCR inner sense and antisense primers ; 59-TAGGTTAGGGCTGTGGCCTT-39 (nucleotides 1323 to 1342) および 59-CCGCACCTTCGGATATACT G-

39 (nucleotides 1567 to 1586), 263bp 増幅

PCR および nested PCR 検出下限の決定のため、PCV-2 の LHVA-V53 株液 (ウイルス力価が 2×10^4 TCID₅₀/ml) を精液で 10 倍階段希釈した。

PCR および nested PCR は、既報に従った。

2) 結果と考察

血清学的検査成績 ; 試験豚 No.1,2 は、全期間 PCV-2 抗体陰性、No. 3 は、11 日後から、No. 4, 5, 6 は、18 日から 90 日後まで抗体陽性であった (table 1)。

Table 1 Detection of PCV2 antibodies by IFA and PCV2 nucleic acid by PCR and nested PCR in serum and semen samples from experimentally infected boars

Boar no. and test method	Detection at postinoculation days : ^a											
	P/P	4/5	7/8	11/11	13/13	18/18	21/21	25/25	28/28	35/33	55/47	90/NA
1												
IFA serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
PCR serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
nPCR serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
nPCR semen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
2												
IFA serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
PCR serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
nPCR serum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
nPCR semen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
3												
IFA serum	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PCR serum	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
nPCR serum	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
nPCR semen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	NA
4												
IFA serum	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
PCR serum	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
nPCR serum	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
nPCR semen	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	NA
5												
IFA serum	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
PCR serum	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
nPCR serum	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
nPCR semen	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	NA
6												
IFA serum	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
PCR serum	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
nPCR serum	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
nPCR semen	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	NA

^a Days postinoculation are shown as days postinoculation for serum / days postinoculation for semen.

P, preinoculation ; NA, not available ; nPCR, nested PCR ; +, detected ; -, not

PCR成績；PCRおよびnested PCRの検出下限は、ウイルス力価で 2×10^3 TCID₅₀/mlであった。血清材料では、非ウイルス接種対照豚2頭から、PCV-2のDNAは、検出されなかった。PCRでウイルス接種豚4頭の18検体から、nested PCRで35検体からDNAが検出された (table 1)。

3頭はウイルス接種直後の4日後から、4頭は11から35日後までDNAが検出された。2頭は55日後まで継続してDNAが検出されたが、4頭は90日後では検出されなかった。精液材料では、非ウイルス接種対照豚2頭から、PCV-2のDNAは、検出されなかった。2頭はnested PCRでウイルス接種直後の5日後から間欠的に、2頭は47日まで、DNAが検出された。精液中のPCV-2DNAは、血清中のPCV-2IFA抗体の存在と並行して検出され、2頭においては、47日後でも検出されることから、免疫反応に関わらずウイルスが精液中に持続的に排泄されることが示唆された。血清学的検査は、3頭でIFA抗体が検出される13日前にDNAが検出されていることから、PCV-2の良い感染指標ではない。

本研究において、PCV-2DNAがnested PCRで検出されていることから、ウイルス量は、さほど多くないと思われる。なお、ウイルスDNAを検出した精液によりバイオアッセイが実施されていないため、感染性ウイルスの存在は、証明されていない。また、ウイルスが精漿もしくは精子や精子以外の細胞に存在するのか、検証されていない。

参考文献

- [1] B. Guerin, N. Pozzi. Viruses in boar semen detection and clinical as well as epidemiological consequences regarding disease transmission by artificial insemination. *Theriogenology* 63 (2005) 556-572
- [2] Jane Christopher-Hennings a, Matthew Dammen a Erlc Nelson a Raymond Rowland b, Richard Oberstb, Comparison of RNA extraction methods for the detection of porcine reproductive and respiratory Syndrome Virus from boar Semen. *J. Virol. Meth.* 2006; 136: 248-253
- [3] Christopher-Hennings, J., Nelson, E.A., Hines, R.J., Nelson, J.K., Swen-son, S.L., Zimmerman, J.J., Chase, C.C.L., Yaeger, M.J., Benfield, D.A. Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1995; 7, 456-646
- [4] Wasilk, A., Callahan, J.D., Christopher-Hennings, J., Gay, T.A., Fang, Y., Dammen, M., Reos, M.E., Torremorell, M., Polson, D., Mellencamp, M., Nelson, E., Nelson. W.M. Detection of U.S., Lelystad, and European-like porcine reproductive and respiratory syndrome viruses and relative quantitation in boar semen and serum samples by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2004; 42, 4453-4461
- [5] Larochelle R., Bielanski A., Muller P., Magar R. PCR detection and evidence of shedding of Porcine circovirus type 2 in boar semen. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 4629-32
- [6] Larochelle, R., M. Antaya, M. Morin, and R. Magar. Typing of porcine circovirus in clinical specimens by multiplex PCR. *J. Virol.* 1999; *Methods* 80: 69-75