豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス陰性農場にみられた ELISA の非特異反応

森 岡 秀 就[†] 神 吉 武

富山県東部家畜保健衛生所（〒939-3536 富山市水橋金尾新46）

（2008年4月7日受付・2008年9月11日受理）

要 約

豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）ウイルス陰性農場で、ELISA 抗体陽性豚（陽性豚）が多数検出された。豚種別の陽性率は、育成豚は5.4%（n = 589）であったが、繁殖種雌豚（n = 45）および肥育豚（n = 29）では陽性豚は認められなかった。陽性豚5頭の病性鑑定の結果からPRRS ウイルスの感染は否定された。陽性豚血清32例のELISA S/P比は0.431～3.346を示したが、間接蛍光抗体法（IFA）は20倍未満、nested-PCRは陰性であり、ELISA 陽性結果はすべて非特異反応と判断した。ELISA の非特異反応の判断手法としては、臨床症状を確認し、陽性豚のIFAおよびnested-PCR 検査により、感染の可能性を検討する手法が有効と考えられた。

——キーワード：ELISA, IFA, nested-PCR, 非特異反応, 豚繁殖・呼吸障害症候群。

----- 日獣会誌 62, 294～298 (2009)

豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）は、母豚の繁殖障害と離乳子豚および肉豚の呼吸器病を主徴とする豚のウイルス病であり、わが国では、1993年にウイルスが初めて分離され [1]、その後全国的に広く浸潤していることが明らかになった。国内のPRRS 血清診断法としては、当初は間接蛍光抗体法（IFA）がおもに用いられていたが、現在では、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay（ELISA）がおもに用いられている。ELISA は IFA より感度が良く、PRRS ウイルス感染豚あるいはPRRS 発生農場を的確に識別できる方法であるとの報告があるが [2]、PRRS ウイルス陰性農場における非特異反応の発生報告もある（Torremorell M, Polson D, Henry SC, Morrison RB : Specificity of the PRRSV IDEXX ELISA test in negative farms, Proceedings of International Pig Veterinary Society Congress, 1, 209 (2002)）。いっぽう、国内での非特異反応の発生割合やその対応手法についての報告はこれまではなされていない。今回、PRRS ウイルス陰性農場でELISA 抗体陽性豚（陽性豚）が多数検出され、防疫対応を行うとともに各種検査を行ったので、その概要を報告する。

材 料 お よ び 方 法

農場の概要：富山県下の繁殖種雌豚60頭規模の種豚

生産農場である。1996年以降、繁殖種雌豚および畜場出荷豚においてPRRS に対するELISA 検査を実施し、2005年までは陰性を確認している。また、近年の種豚の外部導入は、2004年に県外種豚場より2頭、2004～2005年に県内SPF 種豚場より7頭行い、県外種豚場の種豚は隔離期間中に、県内SPF 種豚場の種豚は出荷時にELISA 検査でPRRS ウイルス抗体陰性を確認している。

飼養形態としては、分娩子豚は28日齢で離乳後、離乳豚舎に移動し70日齢まで飼養される。その後100m 離れた選抜・肥育豚舎に移動し、選抜豚房で120日齢まで飼養され、その間に種豚選抜が行われる。選抜から漏れた豚は、同豚舎の肥育豚房で肥育豚として飼育される。選抜された豚は、育成豚として育成豚舎に移動し、5～6頭の群に再編成され育成後、県内農場に供給されている。ワクチンについては、繁殖豚には日本脳炎・パルボ混合ワクチンと豚丹毒ワクチンを、育成豚および肥育豚には豚丹毒ワクチンのみを接種している。

検査材料：当該農場で2006年4月から2007年7月までの間に、抗体検査用として、繁殖種雌豚45頭、育成豚589頭（5～6カ月齢）、肥育豚（6カ月齢）29頭から採取した血清を用いた。また、陽性豚5頭について病性鑑定を行った。

血清学的検査：ELISA はPRRS ウイルス米国株精製

[†] 連絡責任者：森岡秀就（東部家畜保健衛生所）

〒939-3536 富山市水橋金尾新46

☎076-479-1106 FAX 076-479-1140

E-mail : hidenari.morioka@pref.toyama.lg.jp

表1 当該農場におけるPRRS検査結果と防疫対応

検査時期	検査目的	検査材料	検査方法	検査頭数	陽性頭数
2006年6月14日	モニタリング検査	と畜場採材血清 (採材：6月9日)	ELISA	15	1
2006年6月16日	モニタリング検査 ※種豚の供給の自粛を要請	育成豚保存血清 (採材：4月24日， 5月24日，6月16日)	ELISA	105	8
2006年6月23日	立入検査	飼育豚全豚	臨床検査	523	0
		育成豚血清（再検）	ELISA	42	4
		育成豚血清（新規）	ELISA	11	2
		繁殖種雌豚血清	ELISA	31	0
		肥育豚血清	ELISA	17	0
2006年6月27日	病性鑑定 ※農場内の陽性豚2頭の淘汰実施（出荷，殺処分）	生体	ウイルス分離	5	0
			Nested-PCR	5	0
		陽性豚血清	IFA	10	0
		陽性豚・同居豚血清	Nested-PCR	13	0
2006年7月10日	清浄性確認検査 ※PRRSの発生は否定できると判断し，ELISAの実施を条件に種豚の供給自粛を解除	育成豚血清	ELISA	41	0
2006年8月2日～ 2007年7月11日	追跡調査	育成豚血清	ELISA	473	22
		繁殖種雌豚血清	ELISA	14	0
		肥育豚血清	ELISA	12	0
		陽性豚血清	IFA	22	0
		陽性豚血清	Nested-PCR	22	0

不活化抗原およびPRRS Lelystad 株遺伝子組換え蛋白抗原を固相化した市販のPRRS ウイルス抗体検出ELISAキット（PRRS エリーザキット，アイデックスラボラトリーズ(株)，東京）を用い，S/P比0.4以上を陽性とした。

IFA 検査は，96 穴平底プレートで MARC145 細胞を単層培養したのち， $10^{3.0}$ TCID₅₀ に調整したワクチン株の JJ1882 株を接種して，3 日間培養後，80 %アセトンで固定し，IFA プレートとした。被検血清はリン酸緩衝食塩水（PBS）で 10 倍に希釈した後，2 倍階段希釈を 1280 倍まで行った。IFA プレートに希釈血清を加え，37℃で 1 時間反応させた後，PBS でプレートを洗浄し，50 倍に希釈した 2 次血清（FITC-Rabbit Antiporcine IgG（H + L），ZYMED 社，San Francisco）を加え，37℃で 1 時間反応させた。PBS でプレートを洗浄後，蛍光顕微鏡にて観察し，抗体価 20 倍以上を陽性とした。

病性鑑定検査：一般細菌検査・病理検査を行うとともに，肺，肺門リンパ節，脾臓，扁桃，血清を採取して MARC145 細胞を用いたウイルス分離を実施した。

nested-PCR 検査：市販キット（ISOGEN-LS，ニッポンジーン(株)，東京）を用いて RNA を抽出し，Kono ら [3] が報告した EDRD-1 株および Lelystad virus 株に特異的なプライマー（1stPCR：No. 21 および No. 26，2ndPCR：22 および No. 24）を用いて市販のキット（TaKaRa RNA PCR™ Kit（AMV）Ver. 3.0，タカ

表2 陽性豚におけるELISA S/P比の推移

育成豚 番 号	採 材 日	
	6 月16日	6 月23日
783	1.439*	0.637
794	0.468	0.295
798	0.833	0.724
800	0.544	0.619
902	3.346	2.185

*ELISA S/P比

ラバイオ(株，滋賀）により実施した。なお，逆転写反応は，30℃ 10 分，42℃ 20 分，99℃ 5 分で行い，PCR は 94℃ 2 分の反応後，94℃ 30 秒，55℃ 30 秒，72℃ 30 秒の反応を 35 サイクル行い，最後に 72℃ 7 分の反応を行った。反応終了後，増幅産物は 2 %のアガロースゲル電気泳動によって確認した。

トキソプラズマ抗体検査：市販のラテックス凝集反応キット（トキソチェック-MT ‘栄研’，栄研化学(株)，東京）を用いて抗体価を測定し，32 倍を疑陽性，64 倍以上を陽性とした。

統計学的検討： χ^2 検定および t 検定により実施した。

成 績

PRRS 検査成績と防疫対応：当該農場における PRRS の検査成績と防疫対応を表 1 に示す。2006 年 6 月，モニタリング検査のと畜場採材血清において ELISA で 15 頭

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス陰性農場にみられたELISAの非特異反応

図1 豚種別のPRRS ELISA S/P比分布

表3 陽性豚の検査概要と陽性豚の母豚（繁殖種雌豚）の検査結果

育成豚 番 号	採材日	ELISA S/P比	IFA	Nested-PCR	繁 殖 種 雌豚番号	繁殖種雌豚 ELISA結果	備 考
728	2006年 4 月24日	0.953	<20	—	W49	NT*	
732	〃	0.539	<20	—	L30	—	
745	〃	1.103	<20	—	LW91	NT	
783	6 月16日	1.439	<20	—	W37	—	病性鑑定
794	〃	0.468	<20	—	W38	—	
798	〃	0.833	<20	—	W44	—	病性鑑定
800	〃	0.544	<20	—	W28	—	病性鑑定
902	〃	3.346	<20	—	W28	—	病性鑑定
801	6 月23日	0.937	<20	—	L32	—	病性鑑定
772	〃	0.690	<20	—	L15	—	
806	9 月 5 日	0.497	<20	—	W49	NT	
810	〃	0.431	<20	—	LW20	NT	
821	〃	0.444	<20	—	D98	—	
827	〃	0.497	<20	—	L22	—	
843	〃	0.987	<20	—	W89	—	
848	〃	0.787	<20	—	L30	—	
856	10月10日	0.957	<20	—	L21	—	
868	〃	0.811	<20	—	L60	—	
872	〃	0.572	<20	—	D58	NT	
951	11月 1 日	0.443	<20	—	L06	—	
962	11月22日	1.811	<20	—	W38	—	
967	〃	0.606	<20	—	W38	—	
288	2007年 2 月13日	0.601	<20	—	W89	—	
361	4 月16日	2.395	<20	—	L04	—	
379	5 月15日	1.419	<20	—	L52	—	
386	〃	0.720	<20	—	W38	—	
398	〃	0.562	<20	—	W38	—	
401	〃	1.734	<20	—	W38	—	
407	6 月 8 日	0.543	<20	—	L77	NT	
438	7 月11日	3.243	<20	—	L61	—	
454	〃	0.755	<20	—	L85	NT	
456	〃	1.207	<20	—	L85	NT	

*NT：実施できず

中1頭の陽性豚を検出した。このため、2006年4～6月に採材した育成豚の保存血清105頭を検査した結果、8頭の陽性豚を検出した。このことにより当該農場に対して種豚供給の自粛を要請し、立入検査を行った。その結

果、繁殖低下、離乳子豚の呼吸器症状等のPRRSに特徴的な臨床症状は認められず、特に、陽性豚を検出した育成豚群の疾病発生状況にも変化はなかった。また、陽性豚の発生豚房には偏りはなかった。

表4 PRRS ELISA検査およびトキソプラズマ抗体検査結果の関係

		トキソプラズマ 抗体検査			計	疑陽性 以上の 発生率 (%)
		陽性	疑陽性	陰性		
PRRS	陽性	5	8	19	32	40.6 ^{a*}
ELISA	陰性	28	51	478	557	14.2 ^b
	計	33	59	497	589	

*ab間に有意差有り ($P<0.01$)

ELISAは、繁殖豚31頭および肥育豚17頭はすべて陰性であったが、育成豚の再検査では42頭中4頭が再度陽性（1頭は陰転）となった。これまで未検査の育成豚11頭を検査した結果、2頭の新たな陽性豚が確認された。陽性豚におけるELISA S/P比の推移を表2に示す。全体的に低下傾向であったが、陰転した1頭を除き、陽性値を維持した。

そこで、陽性豚5頭の病性鑑定と他の2頭の淘汰を実施した。病性鑑定では、すべてにおいて、病理学的にもPRRSの特徴病変は認められず、PRRSウイルス分離およびnested-PCR検査によるPRRSウイルス遺伝子検出は陰性であった。IFAでは陽性豚血清はすべて20倍未満であり、nested-PCR検査では、陽性豚および陰性同居豚血清からPRRSウイルス遺伝子は検出されなかった。さらに、陽性豚全頭淘汰後の2週間後の清浄性確認検査では、残っていた前回ELISA陰性の育成豚41頭はすべて陰性であった。

これらのことから、PRRSの発生およびPRRSウイルスの浸潤は否定できると判断し、ELISAを実施することを条件に種豚の供給自粛を解除した。その後の追跡調査で育成豚473頭のELISAを実施し、22頭の陽性豚が検出されたが、繁殖種雌豚14頭および肥育豚12頭のELISAは全頭陰性であった。

豚種別のELISA陽性率とELISA S/P比分布：豚種別の陽性率は、育成豚では5.4%（32頭陽性／589頭検査）の陽性率であり、繁殖種雌豚（45頭検査）および肥育豚（29頭検査）では陽性豚は認められなかった。豚種別のELISA S/P比分布を図1に示す。育成豚の平均値±標準偏差は 0.107 ± 0.302 、繁殖種雌豚は 0.074 ± 0.079 、肥育豚は 0.079 ± 0.134 であり、育成豚は他より高く、ばらつきが大きかったが、有意差は認められなかった。

陽性豚の検査成績：陽性豚32例の概要を表3に示す。陽性豚のELISA S/P比は、0.431～3.346を示したが、IFAはすべて20倍未満、nested-PCRはすべて陰性であった。追跡可能な陽性豚の親である繁殖種雌豚のELISAは、全頭陰性であった。

トキソプラズマ抗体検査との関連性：PRRS検査と同

時に行ったトキソプラズマ抗体検査成績を表4に示す。PRRS ELISA陽性でトキソプラズマ疑陽性以上の発生率は40.6%、PRRS ELISA陰性でトキソプラズマ疑陽性以上の発生率は14.2%であり、両区間には有意な差（ $P<0.01$ ）が認められた。

考 察

PRRSウイルス陰性農場で陽性豚が多数確認されたが、臨床症状および病性鑑定結果からPRRSウイルス感染が否定され、陽性豚血清のIFAおよびnested-PCRはすべて陰性であったことから、ELISA抗体陽性は非特異反応と判断した。

国内での非特異反応の発生割合に関する報告は、これまでなされていないが、海外では0.5～2%の発生があると報告されている[4, 5] (Keay S, Moreau IA, Provis P : A retrospective study of PRRS diagnostic results from routine serologic testing of seven PRRS naive herds, Proceedings American Association of Swine Veterinarians Congress, 147-148 (2002) および Torremorell M, Polson D, Henry SC, Morrison RB : Specificity of the PRRSV IDEXX ELISA test in negative farms, Proceedings of International Pig Veterinary Society Congress, 1, 209 (2002))。当該農場における非特異反応の発生割合は5.4%とこれまでの報告より高かった。また、非特異反応のELISA S/P比も0.431～3.346とこれまでの報告 (Keay S, Moreau IA, Provis P : A retrospective study of PRRS diagnostic results from routine serologic testing of seven PRRS naive herds, Proceedings American Association of Swine Veterinarians Congress, 147-148 (2002)) (0.40～1.394) よりも高い個体が存在した。

非特異反応の発生要因を検討するために、陽性豚の母豚の検査を行ったがELISAはすべて陰性であり関連性は確認できなかった。

いっぽう、トキソプラズマ抗体の疑陽性以上を示すものに非特異反応の発生が多く確認された。PRRSのELISAとトキソプラズマのラテックス凝集反応は、原理面で差異があることから、検査法の関連性よりは豚個体の要因が関与したと推察される。当該農場ではトキソプラズマ病の発症はないものの抗体陽性豚が存在している。特に、育成豚は選抜のために豚舎の移動と群の再編成が数回あり、豚群内序列が低くストレスを受けた弱い個体のトキソプラズマ抗体陽性豚の発生率が高い傾向も見受けられた。このことが育成豚の高い非特異反応発生割合の要因とも考えられた。

非特異反応の特性を調べるため、ELISA陽性でIFA陰性の非特異反応血清を用い、競合および阻害ELISAを行ったところ89%が陰性を示し、非特異反応はPRRS

ウイルス抗原とは異なる抗原抗体反応とする報告があることから(恒光 裕:豚繁殖・呼吸障害症候群(PRRS)の制御および診断に関する研究の進捗状況,日本養豚開業獣医師協会誌,7,9-15(2007)),当該農場では,PRRSウイルス抗体ではない何かの抗体等が産生され,それにELISAが反応しているものと推察された。

PRRSの血清診断法には,ELISA,IFA,nested-PCR,中和試験がおもに用いられている。各検査法には,感染後検出可能な時期が異なり,nested-PCRは感染初期からウイルスの検出が可能である[3]。また,IFAとELISAは感染後1週間前後から抗体の検出が可能である[2,6]。いっぽう,中和試験は,感染後8~10週後に初めて抗体が検出でき,感度が低く,抗体価のバラツキも大きいとの報告がある[6]。このことから,ELISAの非特異反応の判断手法としては,まず,ELISAと同時期に抗体検出が可能なIFAで感染の可能性を否定し,さらに,IFAでは検出が難しい初期感染をnested-PCRで否定する組み合わせが有用と考えられた。

今回,陽性豚の発生を受け,防疫対応として,摘発,立入検査,病性鑑定(淘汰),清浄性確認検査という手法を実施した。しかしながら,この手法では3週間以上の期間を要し,3回の採血が必要であり,病性鑑定実施による農場の経済的損失があった。そこで,ELISAはスクリーニング検査と位置付け,陽性豚が出た場合には,臨床症状および疫学状況を確認し,陽性豚のIFAおよびnested-PCRにより,感染の可能性を検討する手法が現実的で有効であると考えられた。

引用文献

- [1] Shimizu M, Yamada S, Murakami Y, Morozumi T, Kobayashi H, Mitani K, Ito N, Kubo M, Kimura K, Kobayashi M, Yamamoto K, Miura Y, Yamamoto T, Watanabe K : Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from heko-heko disease of pigs, J Vet Med Sci, 56, 389-391 (1994)
- [2] Yahara Y, Ohkubo Y, Kariwa H, Takashima I : Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and immunofluorescent antibody (IFA) test for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antibody in pigs from conventional farms, J Vet Med Sci, 64, 583-588 (2002)
- [3] Kono Y, Kanno T, Shimizu M, Yamada S, Ohashi S, Nakamine M, Shirai J : Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs, J Vet Med Sci 58, 941-946 (1996)
- [4] Ferrin NH, Fang Y, Johnson CR, Murtaugh MP, Polson DD, Torremorell M, Gramer ML, Nelson EA : Validation of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Clin Diagn Lab Immunol, 11, 503-514 (2004)
- [5] O'Connor M, Fallon M, O'Reilly PJ : Detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus : reduction of cut-off value of an ELISA with confirmation by immunoperoxidase monolayer assay, Irish Vet J, 55, 73-75 (2002)
- [6] 柴田 勲, 矢澤慈人, 森 正史 : 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス実験感染豚におけるウイルスおよび抗体の長期推移, 日獣会誌, 54, 663-666 (2001)

Nonspecific Reaction in ELISA Observed at a Farm that was Negative for Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus

Hiddenari MORIOKA*† and Takeshi KAMIYOSHI

* Toyama Prefectural Tobu Livestock Hygiene Service Center, 46 Mizuhashikanaoshin, Toyama, 939-3548, Japan

SUMMARY

A farm that did not have porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus had several pigs found to be antibody-positive in an ELISA (seropositive pigs). The positive rate was 5.4% among growing pigs and 0% among breeding sows and fattening pigs. Diagnostic tests on the five positive pigs ruled out PRRS. Serum of the seropositive pigs showed an ELISA S/P of 0.431 to 3.346, but had an IFA titer of less than 1 : 20, and were negative for nested PCR. It was concluded that all of the seropositive pigs had shown a nonspecific reaction. Investigating the possibility of infection by checking clinical symptoms, and conducting IFA and nested PCR with seropositive pigs appeared to be an effective procedure for verifying nonspecific reactions in an ELISA.

— Key words : ELISA, IFA, nested-PCR, nonspecific reaction, porcine reproductive and respiratory syndrome.

† Correspondence to : Hiddenari MORIOKA (Toyama Prefectural Tobu Livestock Hygiene Service Center)

46 Mizuhashikanaoshin, Toyama, 939-3548, Japan

TEL 076-479-1106 FAX 076-479-1140 E-mail : hiddenari.morioka@pref.toyama.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 62, 294 ~ 298 (2009)