

効率的な豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) ウイルスの精液からの 検出法及び除去法の検討

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所・主任研究員 鈴木 千恵

■ 目 的

豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) ウイルスは養豚産業に多大な被害を与える疾病の一つで、本ウイルスの主要な農場への侵入経路は、導入豚に加えて精液であることが明らかにされている。従って、PRRS ウイルス感染を防ぐためには適切に管理された清浄な精液を人工授精に用いることが重要であり、精液中の PRRS ウイルスを検出できる PCR 検査は PRRS ウイルス感染拡大を未然に防ぐ意味で非常に重要である。しかし、雄豚の精液は粘性が高く非均質性である上、射精量が多く細胞に富むため、方法によっては抽出効率が異なることが報告されている。そのため、PCR 検査に必要なウイルス核酸抽出法の技術は十分に確立されていない。一方、ヒトにおいては、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に感染した夫の精液からウイルスを除去し人工授精することで、エイズに感染していない子供を出産する方法が既に報告されているが、豚精液から PRRS ウイルスを除去する方法については検討されていない。そこで本課題では、精液中の PRRS ウイルスを PCR 法により効率的に検出するための核酸抽出法を比較検討するとともに、豚精液中の PRRS ウイルス除去法について検討する。

■ 方 法

実験 1 では、2 個体の雄豚の精液に段階希釈したウイルス液を添加し、Protocol (P) 1:グアニジンライシスバッファ (BF)/QIAshredder、P2:RLT BF/QIAshredder、P3:RLT BF、P4:Proteinase-K 処理、P5:プロメライン処理、の 5 つの方法で処理後、RNeasy mini kit で RNA 抽出してリアルタイム RT-PCR 法によりウイルス RNA の定量を行い、効率的な RNA 抽出法について検討を行った。実験 2 では、6 個体の雄豚の精漿ならびに異なる精子濃度の精液に同一濃度のウイルス液を添加し、実験 1 で用いたプロトコールで RNA を抽出して抽出効率について検討した。実験 3 では、4 個体の雄豚の精液に段階希釈したウイルス液を添加し、実験 2 で抽出効率が高いと考えられた P4 および TRIzol 法で RNA を抽出して検出感度について検討した。実験 4 では、2 頭の雄豚の精液にウイルス液を添加してパーコール分離後およびスィムアップ処理後のそれぞれの分画について TRIzol 法で RNA を抽出し、ウイルス除去の程度について検討した。

■ 結果および考察

本実験では、精漿および異なる精子濃度の精液について、種々のプロトコールを用い PRRS ウイルス RNA 検出法の検討を行ったが、個体、添加したウイルス濃度あるいは精子濃度により、同一プロトコール内においても実測値あるいは抽出効率にバラツキが認められ、精漿および精液からのウイルス RNA の効率的な検出法の確立は難しいと考えられた。原液精液の検出法について検討を行ったところ、TRIzol 法が最も検出感度が高いことが判明した。精液からの効率的なウイルス除去法についてパーコール分離法およびスィムアップ法を用いて検討を行ったところ、二つの方法の併用により、精液からウイルスを除去することが可能であったが、精子回収率およびウイルス除去率を高くするためには、パーコール濃度、遠心時間および遠心速度等についてさらに検討する必要があると考えられた。

■ 結 語

本研究では、精漿および精液からのウイルス検出度は、個体、精子濃度および用いるプロトコールにより全く異なっていたが、原液精液を用いて検出感度の検討を行ったところ、TRIzol 法が最も検出感度が高いことが判明した。また、パーコール分離法およびスィムアップ法を併用することで、精液からウイルスを除去することが可能であることが明らかとなった。