農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

Genetic analysis of Japanese porcine reproductive and respiratory syndrome virus

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 井関, 博, 髙木, 道浩, 恒光, 裕 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00002268

研究紹介

国内における豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス流行株の遺伝学的多様性

井関　博，髙木道浩，恒光　裕

Genetic analysis of Japanese porcine reproductive and respiratory syndrome virus

Hiroshi ISEKI, Michihiro TAKAGI & Hiroshi TSUNEMITSU

背景と目的

豚繁殖・呼吸障害症候群（porcine reproductive and respiratory syndrome: PRRS）は，1980年代後半から90年代前半にかけて出現した豚の新興感染症である。育成・肥育豚の呼吸器病や死流産など母豚の繁殖障害を主徴とする感染症であり，生産性を著しく低下させるために深刻な経済被害をもたらす。PRRSの病原体であるPRRSウイルスは，ゲノムの塩基配列の相同性がおよそ60%と遺伝学的に異なる北米型と欧州型の2つに分類され，それぞれの遺伝子型においても多様な遺伝学的系統が存在する。高頻度の遺伝子変異がPRRSウイルスの特徴の一つであり，特に変異が起こりやすいウイルス表面糖蛋白質GP5をコードするOpen Reading Frame 5（ORF5）が世界的に解析の指標として用いられている。我が国では，1992年から2008年までの間に3期に分けてPRRS全国流行調査が実施されてきた。本研究では，これらの間に分離あるいは検出されたPRRSウイルスのORF5を解析し，その遺伝学的多様性と現在流行しているウイルスの遺伝学的特徴を明らかにすることを目的とした。

研究の概要

1．ORF5を基にした系統樹解析

2007～2008年に8府県の異なる14農場において呼吸器症状を呈した17例のPRRSワクチン未接種の病豚から肺乳剤を作製し，RNAを抽出した。RT-PCR法[1]を用いてPRRSウイルスのORF5領域を増幅後，ダイレクトシークエンシング法により塩基配列を決定した。得られたORF5の塩基配列は，1992～1993年（第一期）に分離された11株，2000～2001年（第二期）に分離された21株，既報の北米型に属する海外の分離株11種および2種のワクチン株のORF5と併せて分子系統樹解析を行った（図1）[2]。その結果，2007～2008年（第三期）に検出されたウイルス遺伝子はいずれも北米型に分類された。日本で検出されるウイルスは5つのクラスターに分類することができ，今回調査した第三期のウイルス遺伝子はクラスターIIに3検体，クラスターIIIに12検体，また，クラスターIVに1検体が含まれていたが，いずれのクラスターにも分類されなかった検体が1検体あった（図1）。1992年に初めて日本でPRRSウイルスが分離されてから，多くのウイルスがクラスターIIIに分類されており，現在までのところクラスターIIIは日本において独自の遺伝子系統として広範囲に検出されている。さらに，このクラスターIIIに分類された検体を比較すると，Jnt1株（新潟県）とJyn1株（山梨県）を除く第一期から第二期の株は全て同じ系統から派生しているが，第三期に検出された検体はその系統とは異なる方向へ派生している。このことは，全国レベルで流行株の交代，あるいは多様化が起きていることを示唆している。

クラスターIIに分類される代表的なウイルスとしては，日本で使用されている弱毒生ワクチンのMLV RespPRRS/Repro株が挙げられる。第一期ではクラスターIIに分類される株は検出されていなかったが，第二期にJam2株（青森県）およびJyt2株（山形県）が分離され，第三期にはOsaka08-1株およびOsaka08-2株（大阪府），また，Miyagi08-1株（宮城県）が検出された。これらのウイルスが野外株から派生したものであるか，あるいはワクチン株から派生したものであるかは不明である。しかし，これら3株がワクチン未接種の病豚から検出されていることから，病原性と伝搬力を有していると考えられる。ワクチン株に非常に類似したウイルスが病豚

から分離される事例は幾つかの国で報告されており[4,5]，日本においても注視していく必要がある。

クラスターⅠに分類される代表的なウイルスとして，日本では使用されていない Prime Pac PRRS 弱毒生ワクチン株が挙げられるが，第一期に分離された Kagoshima N14 株（鹿児島県），Nagasaki 93 株（長崎県），Aichi N20 株（愛知県）および Kyoto 93 株（京都府），第二期に分離された Jyc1 株（山口県），Jis1，Jis2 株（石川県）および Jsi1 株（滋賀県）が本クラスターに属していた。クラスターⅠに分類されたウイルスは西日本のみで確認されているが，第三期では西日本の検体が少なかったことから検出されなかった可能性がある。また，近年，中国や東南アジアの広い地域で猛威を振るっている高病原性 PRRS ウイルス JXA1 株（中国強毒株）もクラスターⅠに分類されるが（図 1），ORF5 の解析によって日本常在株と中国強毒株を明確に区別することはできないので注意が必要である。クラスターⅤに分類される株は，第二期に採材された Jos1 株（大阪府）のみであり，第三期の調査では確認されなかった。したがって，日本では本クラスターに分類される株が検出されることは稀と考えられる。また，Kochi08-1 株（高知県）はいずれのクラスターにも分類されなかったことから，四国地方には特有の遺伝子系統が存在する可能性がある。今後，四国地方における PRRS ウイルスの遺伝子情報を収集し，解析を進めていく必要がある。

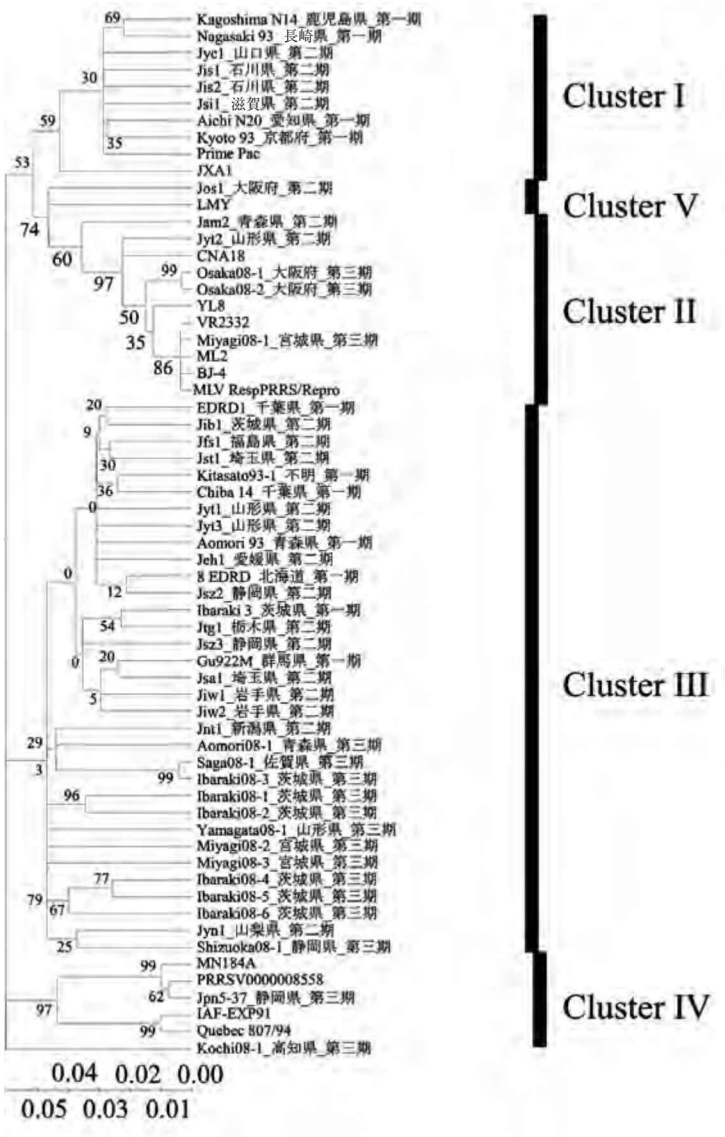


図 1．ORF5 を基に作成した分子系統樹
分子系統樹は neighbor joining 法にて解析し，枝肩に bootstrap 値を示した。株名の右側にクラスター分類を記載した。和名が記載されていないものは海外における分離株あるいはワクチン株を示す。

2. MN184A 様株の分離

第三期の材料から分離された Jpn5-37 株は，日本で初めて確認されたクラスター IV に分類されるウイルスである。クラスター IV に分類されるウイルスの多くが，北米における野外分離株であることから，Jpn5-37 株とこれらの ORF5 を比較したところ，Jpn5-37 株は MN184A 株に対して 97.1%，PRRSV0000008558 株に対して 98.5%と非常に高い相同性を示した。MN184A 株は 2001 年に北米で猛威を振るった高病原性株として知られている。一方で PRRSV0000008558 株は 2006 年に北米で野外材料より分離された株であり，図 1 の分子系統樹より MN184A 株の近縁株から派生した株であることが推察される。次に，ORF5 と同様に非常に多型性に富む non-structural protein 2（nsp2）領域の解析を行った。nsp2 遺伝子では塩基置換のみならず，塩基の挿入や欠失が起こりやすいため，遺伝学的に遠い関係にある株間では nsp2 を構成する塩基数が異なるという性質がある。Jpn5-37 株の nsp2 の塩基配列を既報の方法[6]に従って解析し，日本の代表株である EDRD1 株，MN184A 株および日本で使用されている弱毒生ワクチン MLV RespPRRS/Repro 株の元株である VR2332 株の nsp2 と比較した。その結果，VR2332 株の nsp2 を標準の塩基配列とした場合，EDRD1 株には 117 塩基の欠失があるのに対し，Jpn5-37 株には 2 か所にそれぞれ 3 塩基と 57 塩基の欠失があり，この特徴は MN184A 株と完全に一致していた（図 2）。これらの結果から，Jpn5-37 株は最近北米から日本に侵入した可能性が強く示唆された。

3. 時間経過に伴う PRRS ウイルスの遺伝子変異

第一期から第三期までに検出されたクラスター III に分類される株の ORF5 を構成する塩基配列とアミノ酸配列を 1993 年に分離された EDRD1 株，あるいは弱毒生ワクチン MLV RespPRRS/Repro 株の配列と比較し，相同性の平均値の時間経過に伴う変化を Tukey's multiple range test により調べた。第一期，第二期および第三期における検体の EDRD1 に対する相同性は，それぞれ塩基レベルで 93.4 ～ 100 %，91.2 ～ 95.7 % および 89.7 ～ 93.0%，アミノ酸レベルで 93.5 ～ 100%，89.5 ～ 95.5%および 85.0 ～ 93.0%であった。塩基配列およびアミノ酸配列ともに，第一期より第二期，第二期より第三期において最大値，最小値ともに低下していく傾向がみられ，統計学的にも有意な差が確認された（$P < 0.001$）。このことから，第一期から第三期へと時間の経過に伴ってウイルスの多様化が進んでいったと推測される。同様の傾向

```
EDRD1       1:GGGAAGATTTGGCTGTTGGTGGCCCCTCTGGCCTCCCGACCCTACCTGCACCGGCA---- 56
Jpn5-37     1:GGGAAGACTTGGCCG---GTGGTTCCTTTGACTTCCCAACCCTACCTGAGTTGGTGGTAA 57
MN184A      1:AGGAAGACTTGGCCG---GTGGTTCCTTTGATTTCCCAACCCTACCTGAGTTGGTGGTAA 57
VR2332      1:GGGAAGATTTGGCTGTTAGTAGCCCCTTTGATCTCCCGACCCCACCTGAGCCGGCAACAC 60
              .******.*****.*   **.*..***.**...****.****.*****....**... ..

EDRD1      56:------------------------------------------------------------ 56
Jpn5-37    58:G----------------------------------------------------------CT 60
MN184A     58:G----------------------------------------------------------CT 60
VR2332     61:CTTCAAGTGAGCTGGTGATTGTGTCCTCACCGCAATGCATCTTCAGGCCGGCGACACCCT 120
              .                                                          ..

EDRD1      57:----------------------------------------------------ACACCCT 63
Jpn5-37    61:CGAGTGAGCCTGTGCCTGTCCCTGCACCGCGCAAGGTTGTGTCCCAATTAGTGTCGTCTC 120
MN184A     61:CGAGTGAGTCTGTGCCTGTCCCTGCACCGCGCAGGGTTGTGTCCCGATTAGTGTCGTCTC 120
VR2332    121:TGAGTGAGCCGGCTCCAATTCCCGCACCTCGCGGAACTGTGTCTCGACCGGTGACACCCT 180
              ..........................................................*..*..

EDRD1      64:TGAGTGAGCCGGTTCCTGTGCCCGCA                                 89
Jpn5-37   121:CGATAGTGTCGCCCCCTGTGCCCGCA                                 146
MN184A    121:CGATAGTGTCGACCCCTGTGCCCGCA                                 146
VR2332    181:TGAGTGAGCCGATCCCTGTGCCCGCA                                 206
              .**..*.*.**...************
```

図 2. nsp2 遺伝子の一部における相同性の比較
配列下段のアスタリスク（＊）は，4 株ともに共通の配列である部位に記載した。ハイフン（－）は欠損部位を表した。（EDRD1: 1993 年に分離された標準株，Jpn5-37: 第三期の採材検体からの分離株，MN184A: 2001 年以降北米で猛威を振るった高病原性株，VR2332: 日本で使用している弱毒生ワクチン株の元株である北米の野外標準株）

はMLV RespPRRS/Repro株に対する相同性の変化を解析した場合にも認められ，統計学的にも有意な差が確認された（0.01 < P < 0.05）。このことは，日本の広い地域で時間経過に伴ってワクチン株に対する野外流行株の遺伝学的な距離が離れていくことを示唆している。PRRSワクチンは，遺伝学的系統の異なる株に対し，ウイルス複製の抑制効果が減弱することが報告されていることから[7]，今後現行ワクチンの効果が低下する可能性がある。

残された課題

PRRSという新興感染症が初めて世界に認識されてから約20年が経過したが，その間にPRRSウイルスは多様化しながら急速に世界中に拡散していった。1990年代には日本のほとんどの地域に浸潤したと考えられ，その後も遺伝子変異を繰り返し，多様化し続けていることが本研究で明らかとなった。同じ遺伝子系統内における多様化に加え，新たに国外から侵入したと考えられる系統や，既報のクラスターに分類できない系統の出現が確認された。さらにはワクチン株に類似した病原性を有する野外株の存在や欧州型PRRSウイルスの侵入も明らかになった。PRRSの防疫はウイルスが多様化するほど難しくなるのが現実であり，このような混沌とした状況下で本疾病を劇的に減少させる手法は未だない。PRRSは将来的には国単位での清浄化を目指さなければならない疾病であるとも考えられるが，現在のところは農場単位での防疫がまず重要となる。このような観点から，地方，県，市町村，そして一農場内という様々な単位でどのような遺伝子系統のウイルスが流行し，分布しているかを把握することは農場防疫上非常に意義がある。本研究はごく限られた地域における農場の検体を用いて実施されたが，国内で広範囲に活用できるPRRSの防疫手法を策定するためには，さらなるデータの蓄積が必要不可欠であると考える。

謝　辞

本研究は平成22～23年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施した。

引用文献

1）Andreyev, V.G., Wesley, R.D., Mengeling, W.L., et al.: Genetic variation and phylogenetic relationships of 22 porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) field strains based on sequence analysis of open reading frame 5. Arch. Virol. 142, 993-1001 (1997).

2）Iseki, H., Takagi, M., Miyazaki, A., et al.: Genetic analysis of ORF5 in porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan. Microbiol. Immunol. 55(3), 211-216 (2011).

3）Yoshii, M., Kaku, Y., Murakami, Y., et al.: Genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan. Arch. Virol. 150, 2313-2324 (2005).

4）Mengeling, W.L., Vorwald, A.C., Lager, K.M., et al.: Identification and clinical assessment of suspected vaccine-related field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Am. J. Vet. Res. 60(3), 334-340 (1999).

5）Larochelle, R., D'Allaire, S., Magar, R.: Molecular epidemiology of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in Québec. Virus Res. 96(1-2), 3-14 (2003).

6）Yoshii, M., Okinaga, T., Miyazaki, A., et al.: Genetic polymorphism of the nsp2 gene in North American type porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Arch. Virol. 153, 1323-1334 (2008).

7）Okuda, Y., Kuroda, M., Ono, M., et al.: Efficacy of vaccination with porcine reproductive and respiratory syndrome virus following challenges with field isolates in Japan. J. Vet. Med. Sci. 70(10), 1017-1025 (2008).