

## 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスにおける遺伝学的多様性とその意義

吉井雅晃<sup>1)</sup>、山岸健<sup>2)</sup>、宮崎綾子<sup>1)</sup>、恒光裕<sup>1)</sup> (<sup>1)</sup>動物衛生研究所 <sup>2)</sup>日本全業工業株式会社)

Yoshii M., Yamagishi T., Miyazaki A., Tsunemitsu H. (2006)

Genetic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and its significance.

*Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.*, 49, 9-14.

## 1. はじめに

我が国における養豚の現状として、豚肉自給率が減少を続け、60%を切る中、養豚農家は、生産コスト削減を図るため、急激に飼養規模を拡大している。しかしながら、母豚一頭あたりのと畜頭数は、横ばい、もしくは減少傾向にあり、これは離乳後の高い損耗率が大きな要因と考えられる。平成14年度の家畜共済実績によると、加入頭数159万9千頭のうち、約12%が死亡事故により損耗している。また、日本豚病研究会が平成14年度に実施した全国規模のアンケート調査から、離乳豚および肥育豚において、豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) が関与すると思われる肺炎が多いことが示された<sup>1)</sup>。本稿では、我が国の養豚現場において、大きな損耗要因の一つと考えられる PRRS に関して、病原体である PRRS ウイルスの遺伝学的多様性に焦点を当て、日本のウイルス株の遺伝学的多様性とその意義について、既報の知見とあわせて考察したい。

## 2. PRRS とは

PRRS は、1980年代後半～1990年代初頭にかけて、北米、日本、欧州で相次いで発生した。当初、病原体が不明であったため、ヘコヘコ病やミステリー病など様々な名称で呼ばれたが、1991年オランダにおいてウイルスが分離・同定され、豚繁殖・呼吸障害症候群に名称が統一された。PRRS ウイルスは、通常、妊娠後期の母豚に感染すると、胎盤を通過し、流死産を引き起こす。しかしながら、アメリカにおいて、1996年以降、あらゆる妊娠日齢における異常産と母豚の死亡という重篤な症状が報告され、急性 PRRS や非典型 PRRS と呼ばれた。一方、子豚においては、発熱、食欲不振、肺炎を引き起こすが、他の様々な呼吸器病原体と混合感染し、病態を悪化させる場合が多いことから、豚呼吸器複合感染症 (PRDC) と称され、本ウイルスがその主要因の一つとなっている。このように、PRRS ウイルスは、母豚と肉豚の両方に深刻な経済被害を及ぼす。アメリカにおける本疾病による経済被害

額は年間約5億6,032万ドルと推計され、撲滅前の豚コレラ (3億6,409万ドル)、オーエスキー病 (3,627万ドル) による被害額を上回る<sup>2)</sup>。

PRRS 対策を難しくしている要因として、繁殖障害および呼吸器障害という疾病の二面性、PRDC と称される呼吸器病態の複雑さ、個体レベルでの持続感染および群レベルでの存続による農場での常在化、ウイルスの生態、性質に未解明な点が多く残されている点、そして、ウイルス株の多様性、などが挙げられる。

## 3. PRRS ウイルスの多様性

PRRS ウイルスは、遺伝子、抗原性、そして病原性において、多様であることが知られている。このうち、遺伝学的多様性、および防御免疫に関わる抗原学的多様性に関して、以下に既報の知見をまとめる。PRRS ウイルスは、北米型と欧州型の二つの遺伝子型に分類され、両者のゲノムレベルの相同性は、約60%程度である。主として、北米型は、北米・アジアに、欧州型は、欧州に分布するが、近年、アメリカ、タイ、デンマーク、オーストリアにおいて両者の混在が報告されている。両遺伝子型のウイルスは、1980年代後半から90年代前半にかけて、ほぼ時期を同じくして出現したにも関わらず、遺伝学的に大きく異なることは、本ウイルスの進化における大きな謎となっている。また、それぞれの遺伝子型においても、遺伝学的に多様であることが知られている。欧州型の分子系統樹解析から、リトアニアの株は比較的離れており、また、デンマークやイタリア、チェコなど国による遺伝学的系統の違いが報告されている<sup>3)</sup>。なお、本ウイルスがどの程度、豚の体内で変異するかを調べるため、PRRS ウイルスを367日間かけて、豚で7代、連続して継代したところ、ORF5 遺伝子において、1.3%の相違が生じたことが報告された<sup>4)</sup>。

次に、防御免疫に関わる抗原学的多様性について述べる。PRRS ウイルスに感染・耐過した個体では、免疫が成立し、同一ウイルスの再感染に対して完全な防

御を示すが、異なる株に対しては不完全な場合がある<sup>6,7)</sup>。また、感染豚において、PRRS ウイルスに対する中和抗体は、出現が遅く、その抗体価が低いこと、また中和抗体存在下でもウイルスは長期間、組織（扁桃）に持続感染することから、感染防御における中和抗体の役割は懐疑的であった。しかしながら、中和抗体を含む血清を移入した妊娠豚では、PRRS ウイルスの攻撃に対して、胎児の経胎盤感染および母豚の感染を完全に防いだことから、中和抗体の感染防御能が示された<sup>8)</sup>。一方、中和抗体の交差反応性を野外株間で比較したところ、株によって大きな差がみられた<sup>9)</sup>。

遺伝学的な多様性が防御免疫に及ぼす影響に関して、これまでの知見をまとめる。欧州型のウイルス株において、遺伝学的に異なる株がワクチン効果に及ぼす影響について報告された<sup>10)</sup>。すなわち、ワクチン接種豚は、ワクチンと遺伝学的に同系統に属する株（ORF5 遺伝子の相同性は98%）に対しては、完全にウイルスの複製を抑制し、抗体価の上昇はみられなかったのに対し、異なる系統に属する株（同84%）に対しては、ウイルス複製の抑制は不十分であり、抗体価の上昇がみられた。ワクチン非接種個体において、臨床症状は観察されなかったことから、病態に対するワクチン効果は判断できないが、少なくとも、ウイルス複製に対するワクチン効果は、遺伝学的に異なる株に対しては、低いことが示された。また、北米型のウイルス株においても、遺伝学的に離れた株がワクチン効果に及ぼす影響について報告がなされた<sup>11)</sup>。北米型の ATP ワクチンを接種した個体に、野外強毒株 3 株（ORF5 遺伝子の相同性は76%、85%、89%）で攻撃したところ、ワクチン非接種個体と比較して、増殖率の改善や臨床症状、肺病変の軽減がみられた。一方、ウイルス血症は軽減したものの観察され、また抗体上昇も見られた。以上の結果から、低い相同性の株に対しては、病態に対するワクチン効果があるものの、ウイルス複製に対するワクチン効果は不完全であると考えられた。また、弱毒化した 3 種類のウイルス株で 3 群の豚をそれぞれ免疫し、それらの親株を 3 種類同時に接種した実験において、それぞれの群で、同一もしくは近縁なウイルス株の複製を有意に抑制したことから、免疫応答における株の特異性が示された<sup>12)</sup>。

#### 4. 日本における PRRS ウイルスの遺伝学的多様性について

##### (1) 異なる農場由来のウイルス株間における遺伝学的多様性

このように、PRRS ウイルスは、多様であることが報告されているが、我が国に存在するウイルスの多様性に関しては、ほとんど分かっていない。そこで遺伝学的な多様性と系統学的関係を明らかにするため、分離年代の異なる日本株に関して、分子系統樹解析を行った。1992-93年分離株として 9 株、2000-01年分離株として、平成12から13年度に実施された農林水産省診断予防技術向上対策事業（PRRS）において、全国の家畜保健衛生所の協力を得て分離・収集した株を含む 21 株の合計 30 株を用いた。これらの株は、23 道府県の異なる農場における PRRS ワクチン未接種豚に由来する。分子疫学解析に有用な ORF5 遺伝子の塩基配列を決定し、既報の日本株 2 株（1992-93年分離株）、および、北米型に属する海外の野外株とワクチン株の 189 株とともに、分子系統樹解析を行った<sup>13)</sup>。その結果を図 1 に示す。解析に用いた日本の株は全て北米型に属した。北米型全体では、少なくとも 5 つの遺伝学的系統（I、II、III、IV、V とした）が存在し、日本には少なくとも 4 つの系統（I、II、III、V）が見られたことから、遺伝学的に多様な株が存在していることが分かった。中でも、系統 III が 32 株中 20 株（63%）と優勢にみられた。この系統には台湾と中国の 2 株が属したことから、アジア地域で進化した系統である可能性が示唆された。国別に遺伝学的系統をまとめたものを表に示す。興味深いことに、過半数を占めるアメリカの株は、系統 I と II が優勢に見られたが、系統 III は見られず、日本とは異なる分布を示した。また、日本株の

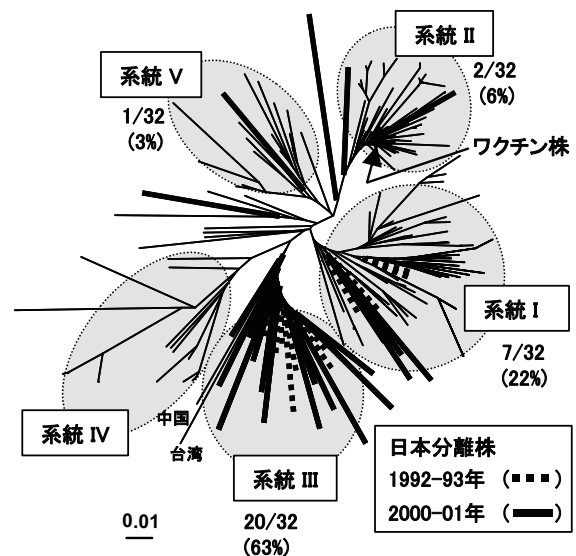


図1 北米型 PRRS ウイルスの ORF5 遺伝子に基づく分子系統図

表 各国における遺伝的系統

国名	遺伝学的系統					その他	合計
	I	II	III	IV	V		
日本	7(22)	2(6)	20(63)	0(0)	1(3)	2(6)	32
中国	5(36)	8(57)	1(7)	0(0)	0(0)	0(0)	14
台湾	0(0)	2(67)	1(33)	0(0)	0(0)	0(0)	3
アメリカ	42(35)	56(47)	0(0)	0(0)	16(13)	5(4)	119
デンマーク	0(0)	24(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	24
カナダ	0(0)	1(8)	0(0)	10(77)	0(0)	2(15)	13
タイ	0(0)	0(0)	0(0)	8(100)	0(0)	0(0)	8
オーストリア	0(0)	3(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3
韓国	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1
グアテマラ	1(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	1
ワクチン株	2(67)	1(33)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	3
合計	57(26)	98(44)	22(10)	18(8)	17(8)	9(4)	221

分離年代と遺伝学的系統を図1に示した。点線で示した1992~93年の分離株は、系統IとIIIのいずれかに属した。一方、実線で示した2000~01年の分離株は、主にこの2系統に属したが、加えて多様な株がみられたことから、年代の経過により、遺伝学的多様性が増したと考えられた。次に、日本で使用されているワクチン株(系統IIに属する)との核酸およびアミノ酸の相同性を比較した(図2)。日本で優勢にみられた系統III

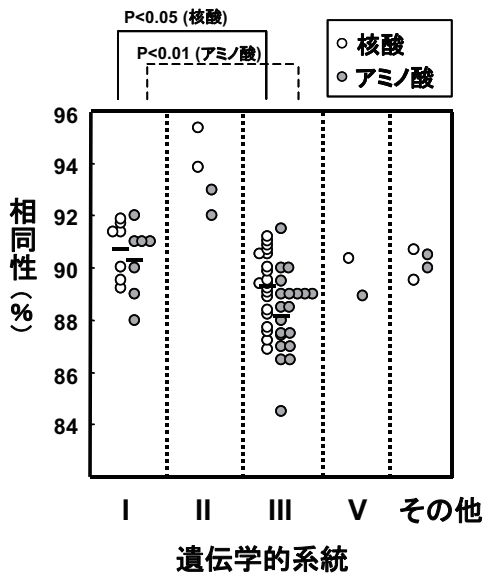


図2 各系統の日本株とワクチン株との相同性  
バーは、系統I、IIIにおける核酸またはアミノ酸の相同性の平均値を示す。

では、核酸で87~91% (平均89%)、アミノ酸で85~92% (平均88%) の相同性を示し、ばらつきはあるものの、核酸およびアミノ酸のいずれにおいても、相同性は概して低かった。また、系統I、Vおよび、その他では、核酸およびアミノ酸のいずれにおいても、92%以下の相同性であった。これに対して、ワクチン

株と同じ系統IIに属する日本株は、核酸で94%以上、アミノ酸で92%以上と比較的高い相同性を示した。これまで海外で報告されているワクチン由来株は、いずれも98%以上の相同性を示すことから、系統IIの日本株がワクチン由来である可能性は低いと考えられた。このように、ワクチン株と異なる遺伝学的系統では、その相同性は概して低いことが分かった。しかしながら、日本の株でみられた遺伝学的な多様性がワクチン効果に及ぼす影響は、現時点では不明である。

(2) 同一農場におけるウイルス株の遺伝学的多様性

次に、同一農場において、どの程度遺伝学的に多様な株が存在しているのかを明らかにするため、3農場における複数の豚舎・室に由来するPRRSウイルスのORF5遺伝子の塩基配列を決定し、系統関係を調べた。

A農場は、母豚1,200頭規模の一貫経営であり、PRRSのワクチンは使用しておらず、候補豚を対象に馴致を実施している。その分娩舎において、妊娠後期の流産が発生したが、母豚からPRRSウイルス遺伝子は検出されなかった。母豚によっては、ELISA抗体のS/P比が8と、高い値を示したことから、抗原学的に異なる株に再感染した可能性が示唆された。一方、分

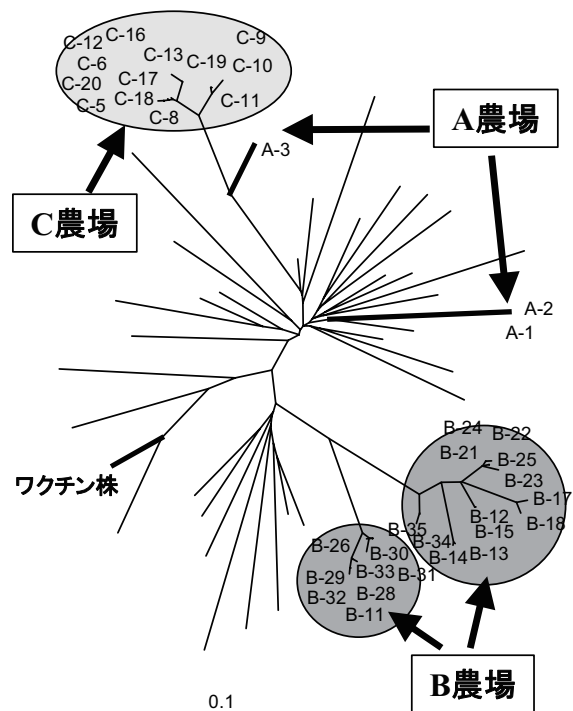


図3 3農場(A~C)におけるORF5遺伝子に基づく分子系統樹

娩舎と同じ棟にある離乳室において、呼吸器症状を示した離乳豚3頭（それぞれ異なる房）から PRRS ウイルス遺伝子が検出され、その遺伝子解析を行った。その結果、図3に示すように、A-1とA-2は100%一致したもので、A-3とは89.7%の相同性であり、分子系統樹において大きく異なる分岐を示した。このように、同一の離乳舎においても、遺伝的に異なる株が共存していることが明らかとなった。今回、母豚からウイルスが検出されなかったため、株間における遺伝子の相違が、異常産に関連するのかわかりませんでした。今後、母豚からの検出を試みるとともに、遺伝学的多様性が防御免疫に及ぼす影響を検討する必要があります。

大規模一貫経営農場であるB農場では、母豚の自家更新を行っており、PRRSのワクチンを育成期に接種している。馴致は実施していない。この農場の2つの分娩舎において、妊娠後期の流産がみられ、母豚から PRRS ウイルス遺伝子が検出された。さらに4つの離乳舎（A～D）において、呼吸器症状を示した17頭から PRRS ウイルス遺伝子が検出され、これらウイルス株間の遺伝学的関係を調べた。その結果を図3、4に示

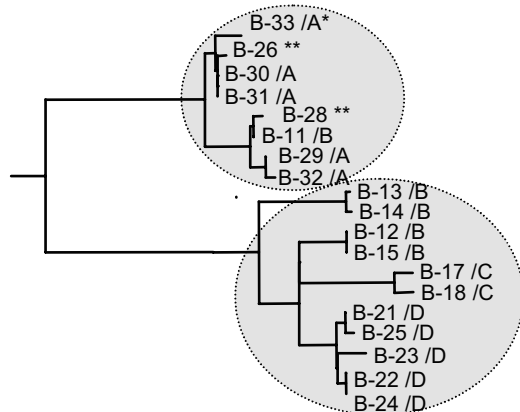


図4 B農場におけるウイルス株間の遺伝学的関係  
 \* /A, /B, /C, /Dは、それぞれ離乳舎A, B, C, Dを表す。  
 \*\* 流産母豚より検出された株を示す。

す。解析した19検体は、ワクチン株とは大きく異なり、また、8検体と11検体の大きく二つの系統に分かれ、これらの系統間の相同性は、90.4～91.9%であった。系統樹解析に用いた日本の野外株の中では、これら2つの系統は互いに最も近縁であったが、その相同性の低さから、近過去に変異したものではないと推測された。離乳舎A（異なる5房由来の5検体）、離乳舎C（異なる2房由来の2検体）および離乳舎D（異なる2房由来の5検体）では、それぞれの離乳舎においては互いに98.5%以上の相同性を示し、近縁であったが、3つの豚舎間では、互いに異なる系統であった。この

結果から、2つの可能性が考えられた。すなわち、1. 環境（豚舎）にウイルスが残留、2. 豚の移動に伴うウイルスの伝播、である。この農場では、棟単位の AI-AO と消毒・乾燥を実施していることから、1の可能性は低いと考えられた。このように、豚舎によって異なる系統がみられたことから、同一豚舎を継続的に監視調査することによって、農場におけるウイルスの伝播様式の解明につながる可能性が考えられた。一方、離乳舎B（異なる2房由来の5検体）では、異なる系統の株が混在しており、うち1検体は、離乳舎Aのウイルス株により近縁であった。また、流産母豚から検出された2検体は、いずれも離乳舎Aのウイルス株に近縁であった。この農場では、母豚を自家更新しているが、その候補豚は、離乳舎CまたはDのいずれかに由来する。そのため、当該母豚が過去に離乳舎CまたはDのウイルス株に感染していた可能性がある。その可能性を前提とすると、妊娠中に系統が大きく異なる離乳舎Aまたは離乳舎Bの一部の株に感染し、流産を起こした可能性が考えられたが、今後も継続的な調査が必要である。

C農場は、母豚300頭規模の一貫経営であり、候補豚に PRRS ワクチンを接種しているが、馴致は実施していない。発育不良と呼吸器症状を示した哺乳豚から検出された4検体、および、これら哺乳豚と同じ棟にある離乳室A、B、C室の、特に臨床症状を示していない離乳豚から検出された8検体について、遺伝学的関係を調べた（図3、5）。ウイルス株間の相同性は、97.2%以上と互いに近縁であり、比較的最近多様化したものと推測された。離乳舎A、B、C室において、各

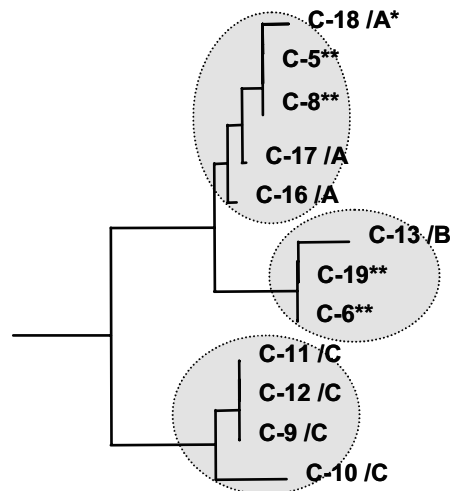


図5 C農場におけるウイルス株間の遺伝学的関係  
 \* /A, /B, /Cは、それぞれ離乳室A, B, Cを表す。  
 \*\* 哺乳豚より検出された株を示す。

室内では互いに非常に近縁であったが、室間では、それぞれ系統が異なった。また、哺乳豚から検出された2株は、離乳室A、Bのウイルス株にそれぞれ極めて近縁であったことから、棟内でのウイルス伝搬が示唆された。

#### 4. まとめ

このように、日本のPRRSウイルス株は、遺伝学的に多様であること、海外では稀な系統が多く存在すること、また、ワクチン株との相同性は概して低いことが示された。また、同一農場内であっても、豚舎によって異なる系統の株が存在している実態が明らかとなった。今回みられた遺伝学的多様性が防御免疫にどのような影響を及ぼすのか、現時点では明らかではない。その上で、株を識別する意義として、1) 農場内に多様な株が存在するかどうか、2) 新規の株の侵入をモニタリング、3) PRRSによる被害が再燃した際に、既往の株との区別、4) 農場内におけるウイルス株の追跡、すなわち、豚舎に居残っているウイルスか、他の豚舎から入ってきたウイルスかを区別できる可能性、そして5) 農場間におけるウイルスの伝播経路解明、に有用であると考えられた。そのためには、継続的な調査が必要であると考えられた。

本疾病の対策としては、ウイルスの伝搬を制限し、病態を低減させ、損耗リスクを最小限に抑える“制御”が主眼となるが、農場からPRRSウイルスを無くしてしまう“清浄化”が最も望ましいと考える。そのために、今回示した遺伝学的な多様性を活かして農場内における伝播・存続様式を明らかにするとともに、遺伝学的な多様性が防御免疫に及ぼす影響を解明することが今後の課題である。

#### 謝辞

本研究の一部は、農林水産省診断予防技術向上対策事業（PRRS）の中で実施され、御協力頂いた全国の家畜保健衛生所の先生方に深謝いたします。また、ウイルスまたは野外材料を分与して頂いた元日本生物科学研究所の桑原博義先生、動物衛生研究所東北支所の川島健司先生、バリューファームコンサルティングの呉克昌先生、サミット動物病院の石川弘道先生、なのはなベテリナリーサービスの榎戸利恵先生、養豚農家の方々、および貴重な情報を頂いた北里研究所の瀧川義康先生に深謝いたします。

#### 引用文献

1. 日本豚病研究会調査実行委員会 (2002) 養豚衛生の実態調査。豚病研報、No. 41:1-34
2. Neumann E. J. et al. (2005) Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States. *J Am Vet Med Assoc.* 227:385-392
3. Stadejek T. et al. (2002) Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *J Gen Virol.* 83:1861-1873
4. Chang C. C. (2002) Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs. *J Virol.* 76:4750-63
5. Lager K. M. et al. (1997) Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet Microbiol.* 58:113-25.
6. Lager K. M. et al. (1997) Duration of homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine. *Vet Microbiol.* 58:127-33.
7. Lager K. M. et al. (1999) Evaluation of protective immunity in gilts inoculated with the NADC-8 isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and challenge-exposed with an antigenically distinct PRRSV isolate. *Am J Vet Res.* 60:1022-1027
8. Osorio F. A. et al. (2002) Passive transfer of virus-specific antibodies confers protection against reproductive failure induced by a virulent strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and establishes sterilizing immunity. *Virology.* 302:9-20.
9. Yoon K. J. et al. (1997) Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. *Vet Microbiol.* 55:277-87.
10. Labarque G. et al. (2004) Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine* 22:4183-4190

11. Opriessnig et al. (2005) Genomic homology of ORF5 gene sequence between modified live vaccine virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus challenge isolates is not predictive of vaccine efficacy. *J Swine Health Production* 246-253
12. Mengeling et al. (2003) Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Micro* 93:13-24
13. Yoshii et al. (2005) Genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan. *Arch Virol*. 150:2313-24.