

総説

豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) の現状と診断法の実際

井関 博¹⁾、高木道浩¹⁾、川畠健司²⁾、芝原友幸²⁾、恒光 裕¹⁾

(1) 動物衛生研究所 ウイルス・疫学研究領域、2) 動物衛生研究所 病態研究領域)

Iseki, H., Takagi, M., Kawashima, K., Shibahara, T. and Tsunemitsu, H. (2012).

Diagnostic methods for porcine reproductive and respiratory syndrome.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 59, 14-18.

キーワード：豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS)、高病原性 PRRS、診断、ウイルス、豚

はじめに

豚繁殖・呼吸障害症候群 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome: PRRS) の原因ウイルスは、1991年にオランダで初めて分離・同定され、1992年には米国でも分離された^{2,14)}。当初これらは異なる二種のウイルスと考えられていたが、その後の遺伝子解析により共に PRRS ウイルス (PRRSV) とされ、遺伝子型としてそれぞれ欧州型と北米型に分類されるに至った。PRRSV は約15.1~15.4 kb のプラス一本鎖 RNA をゲノムとして有し、高頻度に遺伝子変異を生じることが知られている³⁾。新興感染症として認識されてから20年余りという極めて限られた時間の中で、PRRSV は世界中に拡散するとともに複雑で多様な遺伝学的系統を生み出し続けてきた。PRRS は母豚の異常産を主とする繁殖障害と子豚の呼吸器障害を主徴とし、慢性疾病としての認識が一般的である。しかし、世界中で断続的に新しい遺伝子系統が生み出される中で、2006年に中国において全ての生産ステージに高い致死率を示す高病原性 PRRS が発生した¹⁹⁾。多様化し、複雑化した PRRS に対してこれまで多くの診断法が報告されてきたが、それらを適切に用いるにはそれぞれの診断法の利点と欠点を正確に理解する必要がある。本稿では、近年の PRRS 流行状況等を概説した上で、各種診断法の実際について記載する。

増大する我が国の PRRSV の遺伝学的多様性

PRRSV は遺伝子変異の頻度が高いウイルスとして知られているが、日本国内においても様々な遺伝学的系統のウイルスが混在している¹⁸⁾。PRRSV の遺伝学的多様性については、Open Reading Frame (ORF)

5、ORF7、そして nonstructural protein 2 (nsp2) 遺伝子などの遺伝子配列などを基に解析されているが、ORF5 はウイルス粒子の構造上最も変異の頻度が高い部位とされ、世界中でこの領域を指標とした野外分離株の比較が実施されている。1993年に初めて我が国で PRRSV が分離されて以降、我々が収集・蓄積してきたウイルス分離株から得られた ORF5 の遺伝子配列データを用いて分子系統樹を作成すると、5つの遺伝学的グループに分けることができる (I、II、III、IV、V)¹⁷⁾。海外の分離株を含めてこの分子系統樹解析を実施すると、それぞれの遺伝学的グループに分類される地域に偏りがあることから我が国に分布する PRRSV の多様性を伺い知ることができる。

西日本ではグループ I に分類されるウイルスが多く分離される。グループ I には中国において広く流行するウイルスが分類され、高病原性 PRRSV もまた ORF5 の解析では本グループに分類される。1993年に実施された採材において、愛知県、京都府などでもグループ I に分類されるウイルスが分離されているが、2007年以降は九州からの分離に留まっている。グループ II には我が国で用いられている弱毒生ワクチンが分類される。1993年の採材検体からはグループ II に分類されるウイルスは分離されていなかったが、近年ワクチンを接種していない農場からグループ II に分類されるウイルスが数株確認されている。これらがワクチン株由来であるかについては不明であるが、グループ II に分類される野外株が増えてきていることは注視する必要がある。グループ III は中国と台湾で分離された2株を除いて日本に特有のグループと位置づけられ、これまで最も多くの分離ウイルスが分類されている。1992年から2001年にかけて分離されたウイルスと、2007年から2008年にかけて分離されたウイルスの ORF5 は、分子系統樹上で近い関係にあるものが少なく、グループ III

の中でも流行株の変遷が起こっているようである。グループⅣに分類されるウイルスは、2008年に初めて日本で確認された⁵⁾。グループⅣは北米に広く分布しているウイルスで構成されるが、日本で分離されたウイルスは2006年にアメリカで分離された株と98%の相同性を有しており、非常に近縁であると考えられた。このことから、本ウイルス株は近年新たに日本に侵入したと推測される。グループⅤには2000年に大阪で分離された1株が分類されているが、その後分離の報告はない。

以上のことから、国内のPRRSV流行状況は多様化してきており、新たに国外から侵入したと推測される株も確認されていることから、今後のPRRSのコントロールはより難しくなるものと予想される。これに加え、2009年に欧州型PRRSVが国内で初めて分離されたことや、高病原性PRRSVの国内への侵入を早期に摘発するため、診断体制を見直す必要がある。

PRRSの各種診断法とその注意点

PRRSに対しては数多くの診断法が報告されているが、その中から著者らが推奨する幾つかの方法について以下に記載する。手順の詳細については引用文献に譲り、ここでは実施するにあたっての注意点を中心にお伝えしたい。

細胞変性効果（CPE）を指標としたPRRSV分離法^{8,11)}

培養細胞を用いたPRRSVに対する検査法は、サル腎臓由来株化細胞であるMARC145細胞（元となったMA104細胞も使用可能）と生体から調整する肺胞マクロファージの2種類の細胞を主に用いる。CPEを観察する方法は、細胞に感染性を有するウイルスが検体中にどの程度含まれているかを推測できるという点で遺伝子検査では代替が効かない方法である。また、検体に含まれるウイルス量が少ない場合などには、ウイルスを増やして後に続く遺伝子検査に用いるということも可能である。しかしその一方で、結果の判定までに時間を要し、長いものでは4週間以上必要となることもある。また、細胞の調整や維持に手間がかかり、機材や技術も必要となることが欠点として挙げられる。

MARC145細胞は非常に扱いやすい培養細胞であり、株化細胞であるため増殖させて維持管理することができる。非常に細胞境界明瞭な増殖形態のため、CPEの観察や蛍光抗体法にも適した細胞といえる。しかし、

MARC145細胞は本来の宿主である豚とは異なる動物由来の細胞であるため、野外株の分離効率はあまり高くない上、細胞の継代数が増すことによってさらに分離効率は低くなる傾向がある。さらに、必ずしも宿主に症状を発現させたウイルスが分離されるとは限らないという大きな欠点が挙げられる。これは検体中に含まれる様々な形質を発現したウイルスの中から、MARC145細胞への感染能を獲得したウイルスポピュレーションが有意に増殖する可能性があるためである。その場合、肺や血清から直接抽出したRNAから得られたウイルス遺伝子情報と、培養細胞から得られた分離ウイルス由来のRNA情報が一致しないことも起こりうるために注意が必要である。肺胞マクロファージを用いる場合にはそういった可能性は極めて低く、検体中に含まれるウイルス集団がそのまま分離されるため、個体に症状を発現させたウイルスが分離されると考えてよい。肺胞マクロファージは宿主の感染細胞そのものであるため、分離効率はMARC145細胞に比較して非常に高く、ウイルスを細胞で継代することによってウイルス遺伝子の変異を促す確率も小さく抑えることができる。ただし肺胞マクロファージは増殖しない細胞であるため、生体から調整した細胞数が全てである。また、肺胞マクロファージを回収する子豚は5週齢未満のSPFであることが好ましく、その条件の中でも個体ごとに回収された細胞のウイルスに対する感受性は異なっている。また、肺胞マクロファージは形態が一様でないため、培養やCPEの判定には経験が必要となることも欠点として挙げられる。

KonoらとChlistopherらの方法による遺伝子診断法^{1,10)}

KonoらとChlistopherらの方法は、共にnested PCRによるPRRSV遺伝子診断法である。全国の家畜保健衛生所またはそれに準ずる施設では、病性鑑定マニュアルに従い、これらのいずれか、または両方の検査を実施している。

Chlistopherらの方法はRT-PCRのみでも北米型PRRSVに対する特異性、検出感度ともに優れており、PCRプライマーのミスマッチも起こりにくい非常に有用な方法であるため、我々は2008年まではこちらの方法を推奨してきた。しかし、2009年に日本で欧州型PRRSVが初めて分離され、その疫学的な広がりが不明であることから、全国的に欧州型PRRSVに対する検査を実施する必要が生じた。Chlistopherらの方法を

用いて北米型 PRRSV と欧州型 PRRSV の鑑別を実施するためには、ORF1 と ORF7 の二つの領域をそれぞれ個別に RT-PCR により増幅し、それらの増幅産物に対してさらに個別に nested PCR を実施する必要がある。ORF7 は北米型 PRRSV のみが増幅されるが、ORF1 は北米型および欧州型 PRRSV 双方が増幅されることから、ORF1 のみの増幅産物が確認された場合には欧州型 PRRSV、双方の増幅産物が確認された場合には北米型 PRRSV という判定となる。これらの方法は労力を必要とする上、判定も煩雑で解釈が難しい。そこで、2009年の欧州型 PRRSV が分離されて以降、PRRSV の遺伝子検査は Kono らの方法を nested PCR まで実施することを推奨している。Kono らの方法は、北米型および欧州型 PRRSV の双方を増幅するプライマーセットで RT-PCR を実施し、その増幅産物に対してそれぞれに特異的なプライマーを用いた個別の nested PCR により判定する。Kono らの RT-PCR で増幅される遺伝子断片は、北米型 PRRSV が668bp、欧州型 PRRSV が645bp と若干異なるが、その差が非常に小さいことに加え、RT-PCR のみでは検出感度が十分ではないため、nested PCR まで実施することが好ましい。

リアルタイム PCR を利用した診断法

高コストのイメージが一般的かと思われるリアルタイム PCR だが、ここで推奨する PRRSV に対するリアルタイム PCR については、測定機器への投資が必要ない場合には通常の PCR に要するコストと大差がない。リアルタイム PCR は、プローブを用いる方法と、インターカレーター (SYBR green) を利用した方法に大別される。前者はプローブを合成するためにある程度の経費を要するが、後者は試薬に混和されて市販されているものであり、低コストで入手することができる。著者らが引用文献として推奨する北米型および欧州型 PRRSV に対するリアルタイム PCR はいずれも SYBR green を利用した方法であるため、nested PCR と比較して迅速で高感度、さらに技術的な失為の少ないリアルタイム PCR の導入を是非検討していただきたい^{6,12)}。

リアルタイム PCR は、検体にウイルス遺伝子が含まれているか否かという検出と、検体に含まれるウイルス量を推定するという二つの利用法がある。検出という利用法のみにおいても、リアルタイム PCR は多くの利点が挙げられる。PRRSV に対するリアルタイム PCR のプライマーセットで増幅される遺伝子断片

は100bp 以下に抑えてあり、増幅サイズが小さいことから1サイクルに要する時間が短い。さらにこれらのプライマーセットは保存性の高い ORF7 の中でも、さらに非常に保存性の高い遺伝子領域に設定されているため、プライマーのミスマッチによって増幅が起こらない可能性は極めて小さい。また、nested PCR で危惧される RT-PCR 反応液を nested PCR に持ち込む際のクロスコンタミネーションの心配も排除することができる。検体に含まれるウイルス遺伝子量を推定できるという点は、他の方法では代替が効かないリアルタイム PCR の利点である。扁桃や肺の局所から高濃度のウイルス RNA が検出された場合には、PRRS の診断において有力な情報となる他、血液中のウイルス量は感染病態のステージを推定するデータとして利用することも可能である。

ORF5 を利用した分子系統樹解析法⁵⁾

本稿の冒頭にも述べたが、遺伝子変異の頻度が高い ORF5 を構成する塩基配列を調べることによって、分子系統樹解析を行うことができる。先に述べた Kono らの方法や Chlistopher らの方法で得られた増幅産物を利用して分子系統樹解析を行うことも可能であるが、増幅される遺伝子断片のサイズが小さいことや、標的としている ORF7 が保存性の高い領域であるため、それらから作成された分子系統樹から得られる情報は少ないものとならざるを得ない。分子系統樹によってウイルス株を識別する意義として、1) 農場内における多様な株の存在の有無、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伝播経路解明、5) 農場間におけるウイルス株の伝播経路解明、に有用であると考えられる。農場におけるウイルスの動態を監視するためには、定期的な検査を実施することが望ましいが、調査回数を減らす必要がある場合には現時点での状態を一度確認しておきさえすれば、流産の発生時や事故率が急増した際に再度データをサンプリングして比較することも可能である。

免疫組織学的検出法 (IH)^{4,7)}

病理組織学的検査を実施している検査機関では IH も利用できる。IH は PRRS の特徴的な間質性肺炎病変等とリンクしてウイルス抗原を検出するため、疾病診断として利用価値が高い。IH には PRRSV 特異抗体が必要であり、家兔血清や市販のモノクローナル抗体

が利用できる。注意点として、北米型ウイルスを抗原として作製された抗体の欧州型ウイルスに対する検出等、抗原性の大きく変わるようなウイルスに対して用いる抗体の特異性の低下が懸念される。

間接蛍光抗体法 (IFAT) を用いた PRRSV 特異抗体の検出法^{9,16)}

豚群における PRRS をコントロールするためには、PRRSV の感染実態を把握する事が必要であり、血清学的検査法として ELISA が一般的に実施されている。IDEXX 社の PRRS ELISA キットは、その品質・簡便さ・供給体制などの有意性から、世界中で頻用されている。しかしその一方で、疫学状況から明らかに陰性だと思われる血清が陽性と判定される、いわゆる「偽陽性」反応が時に認められることが知られている。偽陽性反応が認められた検体については、IFAT を用いて検体に含まれている抗体が PRRSV 抗原に対して特異的な抗体であるかを確認する必要がある。

PRRSV の IFAT で注意しなければならない点は、MARC145 細胞にウイルスを接種してからアセトンで固定するまでの所要時間である。培養して増殖させた MARC145 細胞にウイルスを接種した後、CPE が確認され始めるまで時間が経過すると、ほぼすべての細胞にウイルスが感染しており、IFAT の判定は実施できない。PRRSV の IFAT の判定は感染細胞と非感染細胞の蛍光強度のコントラストと、ウイルスが細胞質のみに存在することから核が蛍光を発しないという二点から行う (図 1)。そのため、ウイルスを接種する際の細胞の密度と、アセトン固定するまでの所要時間で見え方は大きく変わってくる。

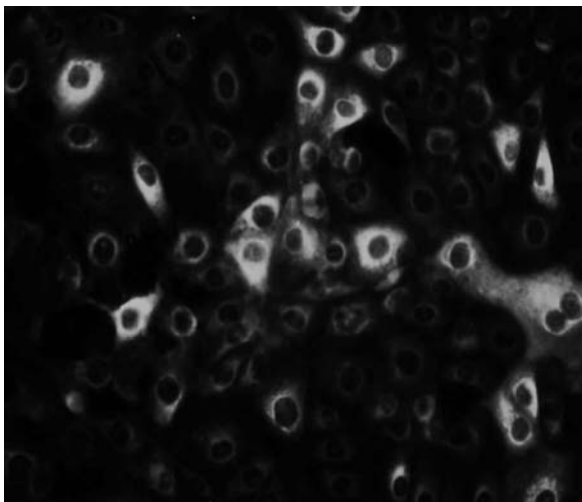


図 1 PRRSV (EDRD1 株) を感染させた MARC145 細胞を間接蛍光抗体法により観察した

高病原性 PRRSV と日本における従来の北米型 PRRSV との鑑別

高病原性 PRRSV の遺伝子をもとに特異的に検出する技術を開発することを難しくしている要因は二点ある。一点は高病原性 PRRSV と従来の北米型 PRRSV の異なる遺伝子配列の部位がほとんど見つからないことであり、もう一点は日本に常在する PRRSV の遺伝学的な多様性が高いために、高病原性 PRRSV を検出せずに共通して使用することができる PCR プライマーを作製することが極めて難しいことである。高病原性 PRRSV と従来の北米型 PRRSV の全遺伝子配列の中で、大きく異なっている領域が nsp2 という遺伝子の一部で確認されている。nsp2 遺伝子は ORF5 とともに PRRSV 遺伝子の中で最も変異の頻度が高い領域であり、複数の遺伝子が抜け落ちる現象 (欠失) や、逆に複数の遺伝子が新たに加えられたりする現象 (挿入) がしばしば認められる。高病原性 PRRSV とアメリカで分離された古典的な北米型 PRRSV である VR2332 株を比較すると、この nsp2 遺伝子の一部で 87 塩基が欠失していることが報告されている¹³⁾。この事象に着目し、Wu らは欠失した 87 塩基を挟み込むように PCR プライマーセットをデザインした診断法を報告している¹⁵⁾。しかし、報告されているプライマーは、日本国内のグループⅢに分類される株では欠失している領域に設定されており、日本では本診断法を流用することはできない。そのため、高病原性 PRRSV と日本における従来の北米型 PRRSV を鑑別するには、高病原性 PRRSV で欠失している領域を塩基配列の解析によって同定する必要がある。それ以外の方法では、現在のところ簡便に鑑別する方法はない。

おわりに

PRRS に対する診断法の選択と実施は近年ますます煩雑なものとなってきている。国内における北米型 PRRSV の遺伝学的多様性は遺伝子変異によって進む一方で、新しく国外からも流入していると推測される。さらに、欧州型 PRRSV の疫学実態は未だ不明であり、これに対しては発生状況を注視しなければならない。また、東アジアおよび東南アジア地域に急激な拡大を見せる高病原性 PRRSV に対して警戒をする必要もある。これらに適切に対処するには、それぞれの診断法の適性を正確に理解し、必要に応じて複数の診断法を組み合わせる必要がある。国内における PRRS による被害は依然として甚大であるが、本稿

がそれに菌止めをかける一助になれば幸いである。

引用文献

- 1) Chlistopher HJ, et al. (1995) Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J Clin Microbiol*, 33(7): 1730-1734.
- 2) Dea S, et al. (1992) Swine reproductive and respiratory syndrome in Québec: Isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. *Can Vet J*, Dec;33(12): 801-808.
- 3) Dea S, et al. (2000) Current knowledge on the structural proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: comparison of the North American and European isolates. *Arch Virol*, 145: 659-688.
- 4) Halbur PG, et al. (1996) Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet Pathol*. 33(2): 159-170.
- 5) Iseki H, et al. (2011) Genetic analysis of ORF5 in porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan. *Microbiol Immunol*, 55(3): 211-216.
- 6) 井関博 (2010) 欧州型豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスの国内浸潤状況. 第150回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 234.
- 7) Kawashima K, et al. (1996) Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyorhinis* antigens in pulmonary lesions of pigs suffering from respiratory distress. *Comp Pathol*. 114(3): 315-323.
- 8) Kim HS, et al. (1993) Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogenous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch Virol*, 133: 477-483.
- 9) Kim SM, et al. (2002) Seroprevalence of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in diagnostic submissions. *J. Vet. Sci*. 3(3): 159-161.
- 10) Kono Y, et al. (1996) Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs. *J Vet Med Sci*, 58(10): 941-946.
- 11) Mengeling WL, et al. (1995) Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J Vet Diagn Invest*, 7: 3-16.
- 12) Revilla FS, et al. (2005) The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen. *J Virol Methods*, 126: 21-30.
- 13) Tian K, et al. (2007) Emergence of fatal PRRSV variants: unparalleled outbreaks of atypical PRRS in China and molecular dissection of the unique hallmark. *PLoS One*, 13;2(6): e526.
- 14) Wensvoort G, et al. (1991) Mystery swine disease in The Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q*, 13(3): 121-130.
- 15) Wu J, et al. (2009) Genetic variation and pathogenicity virulent PRRSV emerging in China. *Arch Virol*, 154: 1589-1597.
- 16) Yahara Y, et al. (2002) 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(7): 583-588.
- 17) Yoshii M, et al. (2005) Genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan. *Arch Virol*, 150(11): 2313-2324.
- 18) Yoshii M, et al. (2008) Genetic polymorphism of the nsp2 gene in North American type porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch Virol*, 153(7): 1323-1334.
- 19) Zhou YJ, et al. (2008) Highly virulent porcine reproductive and respiratory syndrome virus emerged in China. *Transbound Emerg Dis*, 55(3-4): 152-164.