

資料

「豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）ウイルスの遺伝子変異の推移」
～制限酵素断片長多型（RFLP）パターンを中心に～

矢原 芳博（日清丸紅飼料(株)総合研究所）

Yahara, Y. (2013). Genetic analysis of Japanese isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by restriction fragment length polymorphism.
Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 61, 5-10.

キーワード：PRRS、RFLP、遺伝子変異

はじめに

豚繁殖・呼吸障害症候群（Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome；PRRS）は、1980年代後半に欧米で原因不明の疾病（ミステリー病）として出現し、1991年、オランダで原因ウイルスが明らかにされた新興感染症である⁶⁾。

日本においても、Shimizu らが、いわゆる「ヘコヘコ病」の子豚から PRRS ウイルスを分離して以来、全国的に高率に浸潤している事が明らかとなった⁵⁾。

本病は1990年代以降、現在においても、世界各国で経済的被害の大きい疾病として認識されているが、その制御の困難さの原因のひとつとして、PRRS ウイルス遺伝子の変異が激しい事が挙げられる。

今回、著者の検査ラボに送付された検体を用いて、日本において野外の PRRS ウイルス株が1990年代以降どのような遺伝子変異を示したかを検証したので報告する。

材料と方法

供試材料：

日清丸紅飼料株式会社 総合研究所 検査グループに送付された、PRRS 感染を疑う血清、発症豚の臓器のうち、1991年から1998年の材料に関しては、初代豚肺胞マクロファージ細胞（swine alveolar macrophage；SAM）を用いて PRRS ウイルスの分離を行い、CPE が認められた培養上清を野外ウイルス株として遺伝子解析に供試した。2007年から2012年の材料については、血清、臓器から直接 RT-PCR を実施し、得られた増幅産物を遺伝子解析に供試した。なお、1991～1998年に得られた野外ウイルス株は94株、2007年以降に得られた PRRS ウイルスの PCR 産物は82検体であった。な

お、1991年から1998年の33農場と2007年から2012年の29農場のなかで、両期間を通じてサンプルを供試した農場は無かった。

PCR 法：

本報告における PRRS ウイルスの遺伝子解析部位は、ウイルス表面の糖タンパク質のひとつである GP5 をコードし、変異が最も激しいといわれる ORF5 領域とした。この ORF5 領域を含む部位を Andreyev らの方法に従い¹⁾、プライマーセット P420/P620を用いて RT-PCR 法にて増幅を試みた。

RFLP 法：

標的遺伝子の増幅産物は、制限酵素断片長多型（Restriction Fragment Length Polymorphism；RFLP）法によって解析を行った。本報告では Wesley らの方法に従い⁷⁾、それぞれ *Mlu*I、*Hinc*II および *Sac*II の3種の制限酵素を用いて、それぞれの切断パターンを数値化し、3桁のコードとして表現した。このようにして得られた RFLP パターンの結果を、年代別、地域別に解析した。

結果

1. 1991年から1998年に分離された PRRSV 株の RFLP パターンの推移

1991年から1998年の間に我々のラボで分離された PRRS ウイルス野外分離株94株の RFLP パターンを表1に示した。これらのウイルス株は13県の33農場から得られたものであり、合計で11種の RFLP パターンに分類された（表1）。

対照として用いた日本の PRRS ウイルスの標準株とされている EDRD1株の RFLP パターンは1-4-4、日本で市販されている PRRS 生ワクチン株の親株とされ

表1 1991年から1998年に日本で分離されたPRRSウイルス野外株のORF5部位のRFLPパターン

株名	分離野外株			株数	ORF5部位のRFLPパターン	
	農場	県名	分離年			
EDRD1*		千葉	1993		1-4-4	
VR-2332†	USA	Minnesota	1989		2-5-2	
Vaccine Strain‡	-	-	-		2-5-2	
N91-1	A	鹿児島	1991	1	1-4-4	
N91-2A to C	B	愛媛	1991	3	1-2-2	1-4-4
N93-1A to E	C	北海道	1993	5	1-4-1	1-4-2
N93-2A to E	D	北海道	1993	5	1-4-2	
N93-3	E	鹿児島	1993	1	1-4-2	
N93-4	F	愛知	1993	1	1-4-2	
N93-5	G	埼玉	1993	1	1-4-4	
N93-6A to F	H	茨城	1993	6	1-2-4	
N93-7A to G	I	長崎	1993	7	1-4-4	
N93-8A to G	J	千葉	1993	7	1-4-2	1-4-4
N96-11A to B	J	千葉	1996	2	1-2-2	1-2-4
N93-9A to B	K	宮崎	1993	2	1-4-2	1-4-4
N93-10	L	岩手	1993	1	1-4-4	
N94-1	M	鹿児島	1994	1	1-4-4	
N95-1A to C	N	宮城	1995	3	1-2-2	1-2-4 1-4-2
N95-2A to E	O	茨城	1995	5	1-4-4	
N95-3	P	北海道	1995	1	1-4-2	
N95-4A to B	Q	青森	1995	2	1-3-2	1-3-4
N96-8	Q	青森	1996	1	2-5-2	
N96-13A to D	Q	青森	1996	4	2-5-4	
N95-5	R	北海道	1995	1	1-3-4	
N95-6A to B	S	宮崎	1995	2	2-5-2	
N95-7A to C	T	大分	1995	3	1-3-4	
N95-8A to B	U	茨城	1995	2	1-4-4	
N96-1A to B	V	北海道	1996	2	1-4-2	
N96-2A to B	W	青森	1996	2	1-3-4	
N96-3	X	千葉	1996	1	1-2-2	
N96-4A to B	Y	宮崎	1996	2	1-2-2	
N96-10A to C	Y	宮崎	1996	3	1-2-2	
N97-1	Y	宮崎	1997	1	1-2-2	
N96-5A to B	Z	北海道	1996	2	1-4-4	2-5-2
N96-6A to D	AA	青森	1996	4	1-3-4	2-5-2
N96-7	AB	愛知	1996	1	1-4-4	
N96-9A to B	AC	青森	1996	2	1-3-4	
N96-12	AC	青森	1996	1	2-5-2	
N97-2	AD	鹿児島	1997	1	1-7-2	
N97-3	AE	茨城	1997	1	1-4-4	
N97-4A to B	AF	鹿児島	1997	2	1-4-2	
N98-1A to B	AG	宮城	1998	2	1-2-3	1-2-4
合計	33			94		

* EDRD1株は日本で分離されたPRRSウイルス株⁴⁾。

EDRD1株のRFLPパターンはGeneBank (D45852)のORF5部位の配列より得た。

† VR2332株は、日本で市販されているPRRSウイルス弱毒生ワクチンの親株²⁾。VR-2332株のRFLPパターンは、Wesleyら⁷⁾より得た。

‡ ワクチン株 (インゲルバックPRRS生ワクチン) を対照として用いた。

ている VR2332株及びワクチン株は2-5-2であり、パターン1-4-4は1991年以降の野外分離株から、パターン2-5-2は1995年以降の分離株からそれぞれ確認されている。

これら94株のうち、同一農場で、同時にサンプリングされたサンプルから複数のウイルス株が分離された例は述べ24農場であり、このうち10農場では、2種類以上のパターンが同時に検出された。

分離年別に見てみると、1991年では2パターンであったものが、年代を追って徐々にパターン数が増加していく傾向が見られた。なお、この8年間で最も出現頻度の高かったパターンは1-4-4で29株 (30.9%)、次いで1-4-2が19株 (20.2%)、1-3-4が12株 (12.8%)、

1-2-2が11株 (11.7%) であった (表2)。特に1995年から1996年にかけてのパターン数の増加が顕著であった。

さらにこれらのパターンを地域別に検討した(図1)。これらの県別パターンの分布を更に東北日本 (北海道、青森、岩手、宮城)、中日本 (茨城、千葉、埼玉、愛知)、南西日本 (愛媛、大分、長崎、鹿児島、宮崎) の3地域にまとめて、RFLP パターンの分布について比較した (表3)。その結果、東北日本では、1-7-2を除く10パターン、中日本では4パターン、南西日本では6パターンが見られたが、各県、各地域において、特徴のある分布は見られなかった。

なお、現在日本で市販されている PRRS 生ワクチン

表2 PRRSV ORF5部位のRFLPパターンの年別推移(1991年から1998年)

分離年	PRRSV ORF5部位のRFLPパターン別株数(%)											
	1-2-2	1-2-3	1-2-4	1-3-2	1-3-4	1-4-1	1-4-2	1-4-4	1-7-2	2-5-2	2-5-4	Total
1991	2 (50.0)							2 (50.0)				4 (100.0)
1993			6 (6.0)			1 (1.0)	13 (13.0)	16 (16.0)				36 (100.0)
1994								1 (100.0)				1 (100.0)
1995	1 (5.3)		1 (5.3)	1 (5.3)	5 (26.3)		2 (10.5)	7 (36.8)		2 (10.5)		19 (100.0)
1996	7 (25.9)		1 (3.7)		7 (25.9)		2 (7.4)	2 (7.4)		4 (14.8)	4 (14.8)	27 (100.0)
1997	1 (20.0)						2 (40.0)	1 (20.0)	1 (20.0)			5 (100.0)
1998		1 (50.0)	1 (50.0)									2 (100.0)
合計 (%)	11 (11.7)	1 (1.1)	9 (9.6)	1 (1.1)	12 (12.8)	1 (1.1)	19 (20.2)	29 (30.9)	1 (1.1)	6 (6.4)	4 (4.3)	94 (100.0)

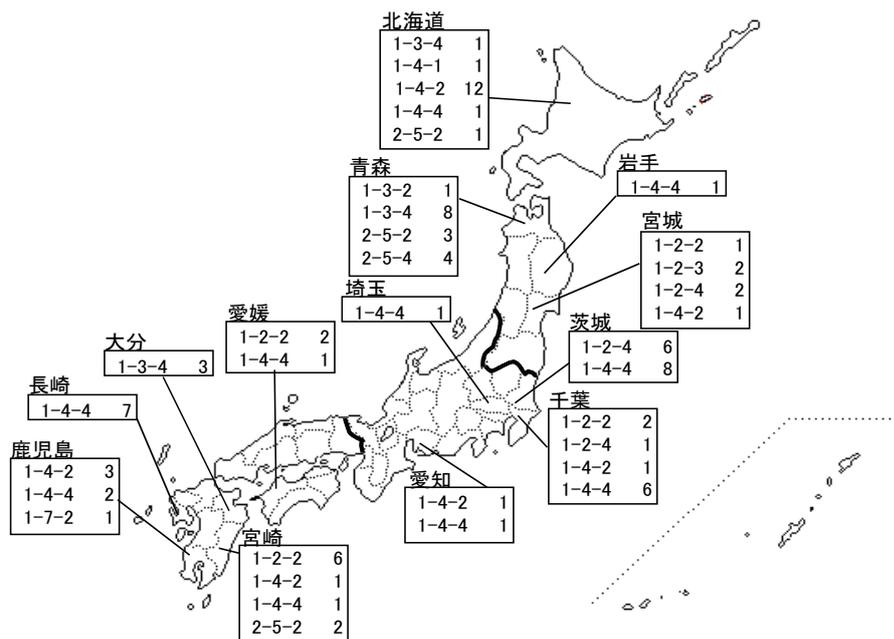


図1 1991年から1998年に日本で分離されたPRRS野外分離株のORF5部位RFLPパターンの県別分布

表3 PRRSV国内野外分離株の地域別RFLPパターン分布(1991年から1998年)

地域	PRRSV ORF5部位RFLPパターンの分布											
	1-2-2	1-2-3	1-2-4	1-3-2	1-3-4	1-4-1	1-4-2	1-4-4	1-7-2	2-5-2	2-5-4	Total
東北日本	1 (2.6)	1 (2.6)	2 (5.3)	1 (2.6)	9 (23.7)	1 (2.6)	13 (34.2)	2 (5.3)		4 (10.5)	4 (10.5)	38 (100.0)
中日本	2 (7.4)		7 (25.9)				2 (7.4)	16 (59.3)				27 (100.0)
南西日本	8 (27.6)				3 (10.3)		4 (13.8)	11 (37.9)	1 (3.4)	2 (6.9)		29 (100.0)
合計	11	1	9	1	12	1	19	29	1	6	4	94
(%)	(11.7)	(1.1)	(9.6)	(1.1)	(12.8)	(1.1)	(20.2)	(30.9)	(1.1)	(6.4)	(4.3)	(100.0)

株のRFLPパターンである2-5-2については、今回の調査では1995年の分離株で2株、1996年には4株が確認されている。この6株の県別内訳は、北海道1株、青森3株、宮崎2株であった。

ンは、1-2-2、1-4-2、1-4-4および2-5-2の4パターンのみであった。1-2-3、1-2-4、1-3-2、1-3-4、1-4-1、1-7-2および2-5-4の7パターンは1991~

2. 2007年以降に分離された PRRSV 株の RFLP パターンの推移

1991年~1998年に分離された PRRSV 野外株の RFLP パターンが、その後どのように推移しているかを検証するために、2007年以降の PRRSV の ORF5部位の RFLP パターンを調査した。なお2007年以降については、ウイルス分離を介さず、血清や肺などの臓器から直接 RNA を抽出して RT-PCR を行い、この PCR 産物を用いて RFLP パターンを得た。2007年から2012年までに我々が PRLP パターンを得たのは、青森、栃木、千葉、岐阜、熊本、鹿児島および宮崎の7県、29農場の82検体であった。これらの検体が示した RFLP パターンは表4の通りであった。これらの82検体は、12種の RFLP パターンを示したが、その分布では、2-5-2が39検体 (47.6%) と最も多く、次いで1-2-2(14検体、17.1%)、1-5-2(9検体、11.0%)、1-4-4(8検体、9.8%) の順に多く、他の8パターンはいずれも5.0%未満であった (表5)。

また、各県毎の RFLP パターンの分布を表6に示したが、青森県の2-5-2(28検体中24検体)、鹿児島県の1-2-2(33検体中12検体) が特に高率であった。

2007年以降の RCR 産物の RFLP パターンと1991年~1998年のそれを比較してみると、両方の時期に共通して見られたパター

表4 2007年から2012年に日本で分離されたPRRSウイルス野外株のORF5部位のRFLPパターン

分離野外株		分離年	株数	ORF5部位のRFLPパターン
農場	県名			
AD	青森	2007	1	2-5-2
AE	鹿児島	2009	1	1-4-2
A	青森	2009	1	2-5-2
A	青森	2010	2	2-1-2 2-5-2
A	青森	2010	2	2-5-1 2-5-2
A	青森	2010	9	2-5-2
B	鹿児島	2011	1	1-5-2
A	青森	2011	1	2-5-2
C	鹿児島	2011	1	2-5-2
A	青森	2011	1	2-5-2
D	鹿児島	2011	1	1-2-2
E	鹿児島	2011	1	1-4-4
F	鹿児島	2011	1	2-5-2
E	鹿児島	2011	1	2-5-2
D	鹿児島	2011	1	1-2-2
A	青森	2011	2	2-5-2
E	鹿児島	2011	1	1-4-4
E	鹿児島	2011	1	1-4-4
E	鹿児島	2011	2	1-4-4 2-5-2
G	鹿児島	2011	1	2-5-2
A	青森	2011	1	2-5-2
H	鹿児島	2011	1	1-4-4
I	鹿児島	2011	1	2-5-2
J	鹿児島	2011	2	1-2-2
H	鹿児島	2011	2	1-2-2 2-5-2
D	鹿児島	2011	1	1-2-2
K	熊本	2011	1	2-2-2
L	鹿児島	2011	2	1-2-1 1-2-2
M	岐阜	2011	1	1-4-3
N	鹿児島	2012	1	1-2-2
O	鹿児島	2012	1	1-2-1
P	宮崎	2012	1	2-5-2
Q	鹿児島	2012	1	1-6-2
R	栃木	2012	1	2-5-2
A	青森	2012	1	2-5-2
S	千葉	2012	1	2-5-2
P	宮崎	2012	1	2-5-2
A	青森	2012	1	2-5-2
M	岐阜	2012	1	1-4-4
T	鹿児島	2012	1	1-2-2
U	鹿児島	2012	2	1-2-1 2-5-2
V	宮崎	2012	4	1-5-2
M	岐阜	2012	1	1-4-4
W	宮崎	2012	1	1-2-2
X	鹿児島	2012	1	1-2-1
M	岐阜	2012	1	1-4-4
V	宮崎	2012	2	1-5-2
A	青森	2012	3	1-5-2 2-5-2 2-6-2
Y	鹿児島	2012	1	1-2-2
Z	鹿児島	2012	1	1-2-2
A	青森	2012	1	2-5-2
X	鹿児島	2012	1	1-2-2
V	宮崎	2012	1	1-5-2
AA	宮崎	2012	2	1-2-2 1-4-2
A	青森	2012	1	2-5-2
AB	宮崎	2012	1	2-5-2
AC	鹿児島	2012	1	2-5-2
A	青森	2012	1	2-5-2
P	宮崎	2012	1	2-5-2
29			82	

表5 PRRSV ORF5部位のRFLPパターンの年代別推移(2007年から2012年)

県	PRRSV ORF5部位のRFLPパターン別株数(%)																		Total	
	1-2-1	1-2-2	1-2-3	1-2-4	1-3-2	1-3-4	1-4-1	1-4-2	1-4-3	1-4-4	1-5-2	1-6-2	1-7-2	2-1-2	2-2-2	2-5-1	2-5-2	2-5-4		2-6-2
2007																	1			1
2009								1									1			2
2010														1		1	11			13
2011	1	7							1	5	1				1		12			28
2012	3	7						1	3	8	1						14		1	38
合計	4	14	0	0	0	0	0	2	1	8	9	1	0	1	1	1	39	0	1	82
(%)	(4.9)	(17.1)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(2.4)	(1.2)	(9.8)	(11.0)	(1.2)	(0.0)	(1.2)	(1.2)	(1.2)	(47.6)	(0.0)	(1.2)	(100.0)

表6 PRRSV ORF5部位のRFLPパターンの県別推移 (2007年から2012年)

県	PRRSV ORF5部位のRFLPパターン別株数(%)																		Total	
	1-2-1	1-2-2	1-2-3	1-2-4	1-3-2	1-3-4	1-4-1	1-4-2	1-4-3	1-4-4	1-5-2	1-6-2	1-7-2	2-1-2	2-2-2	2-5-1	2-5-2	2-5-4		2-6-2
青森											1			1		1	24		1	28
栃木																	1			1
千葉																	1			1
岐阜									1	3										4
熊本																1				1
鹿児島	4	12						1	5	1	1						9			33
宮崎		2						1		7							4			14
合計	4	14	0	0	0	0	0	2	1	8	9	1	0	1	1	1	39	0	1	82
(%)	(4.9)	(17.1)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(2.4)	(1.2)	(9.8)	(11.0)	(1.2)	(0.0)	(1.2)	(1.2)	(1.2)	(47.6)	(0.0)	(1.2)	(100.0)

表7 PRRSV ORF5部位のRFLPパターンの比較

年	PRRSV ORF5部位のRFLPパターン別株数(%)																		Total	
	1-2-1	1-2-2	1-2-3	1-2-4	1-3-2	1-3-4	1-4-1	1-4-2	1-4-3	1-4-4	1-5-2	1-6-2	1-7-2	2-1-2	2-2-2	2-5-1	2-5-2	2-5-4		2-6-2
1991~1998	0	11	1	9	1	12	1	19	0	29	0	0	1	0	0	0	6	4	0	94
	(0.0)	(11.7)	(1.1)	(9.6)	(1.1)	(12.8)	(1.1)	(20.2)	(0.0)	(30.9)	(0.0)	(0.0)	(1.1)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(6.4)	(4.3)	(0.0)	(100.0)
2007~2012	4	14	0	0	0	0	0	2	1	8	9	1	0	1	1	1	39	0	1	82
	(4.9)	(17.1)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(0.0)	(2.4)	(1.2)	(9.8)	(11.0)	(1.2)	(0.0)	(1.2)	(1.2)	(1.2)	(47.6)	(0.0)	(1.2)	(100.0)

1998年に見られたが2007年以降には出現せず、逆に1-2-1、1-4-3、1-5-2、1-6-2、2-1-2、2-2-2、2-5-1および2-6-2の8パターンは2007年以降にのみ確認された。1991~1998年と比較して2007年以降では、特に2-5-2の出現頻度が増加傾向にあった。

これらの結果を総合すると、1991~1998年で見られたRFLPパターンと2007年以降で見られたパターンとは、共通して高率に見られるパターンは少数であり、その分布は大きく移り変わっていた。

考察

今回、1991年~1998年に分離されたPRRSウイルス野外分離株のRFLPパターンと2007年以降にPCR検査により陽性となった検体のPCR産物のRFLPパターンについて比較検討を行い、日本におけるPRRSウイルスの遺伝子の変異の状況について検討を加えた。

1991年から1998年のPRRSウイルス野外株のRFLPパターンについては、当初2パターンのみからスタートし、8年後の1998年には11パターンが検出されたことから、すでに多くの報告にある通り、PRRSウイルスの遺伝子変異の多様性を支持する結果となった。

Mengelingらは、1990年代に合衆国内で分離されたPRRSウイルス野外株のRFLPパターンを報告しており、1-1-2、1-1-4、1-2-2、1-2-3、1-2-4、1-3-2、1-3-4、1-4-1、1-4-2、1-4-4、1-5-1、1-5-2、1-5-3、1-7-1、1-7-2、1-8-2、2-1-2、2-5-2、2-5-4および2-6-2といったパターンが検出されたとしている³⁾。今回調査した1990年代の日本の野外株94株についても、上記のパターンと同じパターンが検出されている事を考慮すると、これらのパターンが日本で独自に変異を重ねた可能性と共に、北米からこれらのパターンのウイルス株が徐々に持ち込まれた可能性も考えられた。

また、Mengelingらは、合衆国では、PRRSウイルス弱毒生ワクチン販売開始直後から、生ワクチン接種農場でワクチン株と同様のRFLPパターンが検出されだし、更にその株から派生したと考えられるRFLPパターンが接種農場で検出されていると報告している³⁾。日本でこの生ワクチンが発売開始されたのは1998年であり、パターン2-5-2が1995年にすでに日本で検出されているのは興味深い。

さらに、1990年代の日本のPRRSウイルス野外株の

RFLP パターンの分布に対し、2007年以降の RFLP パターンは、4種が1990年代から継続して検出されているものの、8種については、新しく見られたパターンであり、この10年以上の間にも、PRRS ウイルスの ORF5部位の変異は継続していることが示唆された。

上記のように、日本で検出される PRRS ウイルスは、ORF5部位において、現在も変異が継続し、より多様性が増している事が明らかとなった。しかし、RFLP という手法は、ウイルス遺伝子の限られた配列の変異のみを表すものであり、Wesley ら⁷⁾の選んだ *Mlu*I、*Hinc*II および *Sac*II という3種の制限酵素が、PRRS ウイルス上の特定の病原性に関与する部位の変異を検出するわけではないので、RFLP パターンと病原性の間には特に関連性は見出せないと考えられている。またパターンの違いだけでは、比較する株間の遺伝子の相同性や系統樹上の位置的関係も不明なため、現在ではむしろ直接シーケンスを行うケースが増えている。

しかし、RFLP 法は、PCR 法が可能な設備があれば、比較的簡単に RFLP パターンを得ることが出来るため、野外での簡易な疫学調査法としても有用と考えられる。日本において、PRRS 発症農場ごとの RFLP パターンの報告は見られるものの、日本全体、かつ年代毎の RFLP パターンの分布に関する報告は少なく、本報告が今後の生産現場での RFLP パターン解析のための基礎データとして役に立てば幸甚である。

引用文献

- 1) Andreyev V, et al. (1997) 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.
- 2) Collins JE, et al. (1992) Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J Vet Diagn Invest*, 4. 117-126
- 3) Mengeling W, et al. (1999) Identification and clinical assessment of suspected vaccine-related field strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *AJVR*, 60. 334-340.
- 4) Murakami Y, et al. (1994) Isolation and serological characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses from pigs with reproductive and respiratory disorders in Japan. *J Vet Med Sci*, 56, 891-984.
- 5) Shimizu M, et al. (1994) Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-Heko disease of pigs. *J Vet Med Sci*, 56, 389-391.
- 6) Wensvoort G, et al. (1991) Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q*, 13. 121-130.
- 7) Wesley R, et al. (1998) Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF 5. *J Vet Diagn Invest*, 10. 140-144.