

10 一農場で分離した PRRS ウイルスの遺伝学的および血清学的性状解析

中央家畜保健衛生所

○曾田 泰史、多勢 景人

I はじめに

豚繁殖・呼吸障害症候群 (Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome : PRRS) は、PRRS ウイルス感染による母豚の死産などの繁殖障害や、育成・肥育豚の呼吸器病を引き起こす豚の伝染性疾病であり¹⁾、届出伝染病に指定されている。

PRRS は 1987 年に米国で初めて報告されて以来、日本を始め世界各地で養豚産業に大きな被害を与えている^{2,3)}。PRRS ウイルスの特徴として、高頻度に遺伝子変異が起こることが知られており⁴⁾、日本国内においても遺伝学的に差異がある複数のウイルス株が存在していると報告されている⁵⁾。また、ウイルス株ごとに免疫応答などの血清学的特徴が異なることも知られており⁶⁾、これにより PRRS のコントロールが難しくなっていると考えられている⁶⁾。

今回、農場内 PRRS 対策に役立てるため、県内 1 養豚場で分離された PRRS ウイルスについて遺伝学的性状及び血清学的性状を調査したので報告する。

II 農場概要

当該農場は母豚 1050 頭を飼養する一貫生産農場で、繁殖候補豚も自家育成していた。繁殖候補雌豚は育成期から隔離豚舎で飼養し、市販の PRRS ウイルス弱毒生ワクチンを接種していた。繁殖候補雄豚は肥育豚と同じ豚舎で飼養され、同様のワクチン接種後、PRRS ウイルスに関して Christopher らの方法による抗原検査⁷⁾ 及び IDEXX 社製 ELISA キットによる抗体検査を実施、抗原検査陰性と抗体検査陽性が確認された個体のみを繁殖に供していた。

また、当該農場は肥育豚舎内で PRRS ウイルスが循環していることが確認されている農場で、平成 21 年には PRRS による死産が発生していた⁸⁾。本農場において、平成 27 年 1 月、死産が続発し、病性鑑定により PRRS と診断された。

III 材料と方法

1 遺伝学的検査

検査に供したウイルスは、平成 27 年に発生した PRRS 事例において、流産母豚 1 頭の血清及び同時期に発育不良を呈した哺乳豚 2 頭の肺から分離された PRRS ウイルス (以下：分離株) を用いた。同材料からは、Christopher らの方法⁷⁾ 及び Kono らの方法⁹⁾ によって北米型 PRRS ウイルス特異遺伝子が検出されていた。分離株を Iseki らの方法⁵⁾ で Open Reading Frame 5 (以下：ORF5) 領域を特異的に増幅し、得られた PCR 産物の塩基配列を解析した。

得られた塩基配列情報を GenBank Database に登録された配列情報と比較し、相同性解析及び系統樹解析を実施した。その際、特に過去に同農場から検出された PRRS ウイルス株⁸⁾ 及び PRRS ウイルス国内標準株 (EDRD1 以下：標準株)、市販 PRRS ウイルス弱毒生ワクチン株 (RespPRRS MLV strain 以下：ワクチン株) との関係に注目した。

2 血清学的検査

上記発育不良哺乳豚の肺の10%乳剤を単層に発育した MARC-145 細胞に接種し、37°C、5% CO₂ 条件下で3代盲継代して PRRS ウイルスを分離した。分離した PRRS ウイルス (以下：分離株) について、3代目培養上清を限界希釈法で3代継代してクローニングし、MARC-145 細胞で8代継代して得られた感染力価 $10^{4.2}$ TCID₅₀/ml の PRRS ウイルス液を血清学的検査に供した。血清学的検査は MARC-145 細胞を用いた中和抗体検査を実施した。

中和抗体検査に使用したウイルスは、分離株と比較のために標準株を用いた。被験血清は、本農場で飼養する平成27年1月に PRRS と診断された流産母豚 (以下：発症群)、同農場で飼養する5か月齢の PRRS 弱毒生ワクチン接種済みかつ PRRS を発症していない繁殖候補雄豚 (以下：非発症群) 及び他農場で飼養する PRRS 弱毒生ワクチン接種豚 (以下：ワクチン群) の各6頭の血清とし、MARC-145 細胞を用いた中和抗体検査を実施した。

なお、上記3群の各6頭は無作為に抽出し、No. 1~6 とした。これにより、発症群、非発症群、ワクチン群の分離株及び標準株への感染防御能を測定した。

IV 成績

1 遺伝学的検査

ORF5 領域の塩基配列から、分離株は北米型 PRRS ウイルスの中で東日本で最も多く検出されているクラスターⅢ⁵⁾ に分類され、ORF5 領域の塩基配列は100%一致した。系統樹解析の結果を図1、相同性解析の結果を表1に示す。なお、両解析結果は過去に同農場から検出された PRRS ウイルス株、標準株、ワクチン株との間の成績のみ示している。

農場には平成21年時点で ORF5 領域の塩基配列が97~99%の相同性を持つ複数株 (図1：H21 農場浸潤株) が常在していた⁸⁾。分離株は H21 農場浸潤株のクラスター内に分類され (図1)、その中で、図1で※で示した1株と最も高い相同性 (97.2%) を示した (表1)。平成21年に発生した PRRS 事例は H21 農場浸潤株によるものではなく、新たに農場に侵入した株 (図1：H21 新規侵入株) によるものであった⁸⁾ が、H21 新規侵入株との相同性は95.5%であった。また、標準株との相同性は90.2%、ワクチン株との相同性は86.6%であった。

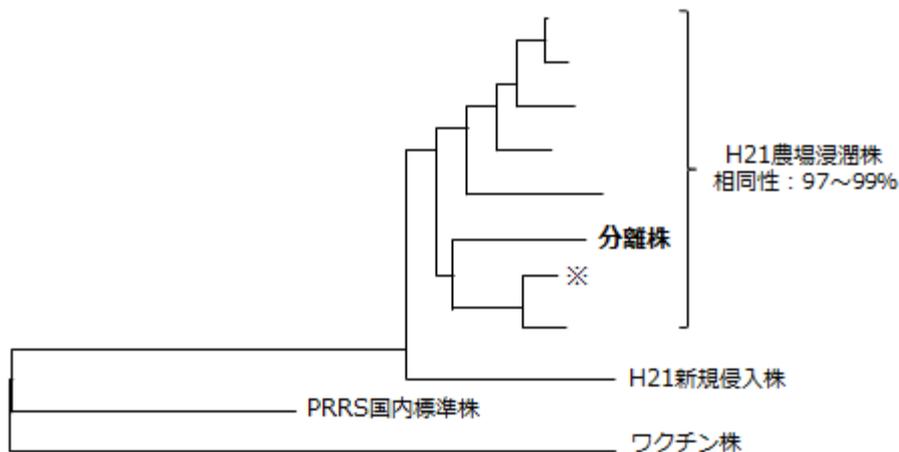


図 1 ORF5 領域塩基配列に基づく分子系統樹

表 1 分離株 ORF5 領域塩基配列の相同性解析

	相同性(%)
H21農場浸潤株(※)	97.2
H21新規侵入株	95.5
標準株	90.2
ワクチン株	86.6

2 血清学的検査

発症群、非発症群及びワクチン群の分離株及び標準株への中和抗体価を図 2~4 に示した。発症群の分離株への抗体価は 2~64 倍、抗体価の幾何平均値(以下:GM 値)は 12.6 倍で、標準株への抗体価は 4~32 倍で、GM 値は 11.3 倍であった(図 2)。非発症群では、分離株への抗体価は 2 倍未満~32 倍、GM 値は 7.1 倍、標準株への抗体価は 4~16 倍、GM 値は 8.9 倍であった(図 3)。ワクチン群では分離株への抗体価は 2 倍未満~4 倍、GM 値は 2.5 倍、標準株への抗体価は 8~16 倍、GM 値は 10.0 倍であった(図 4)。

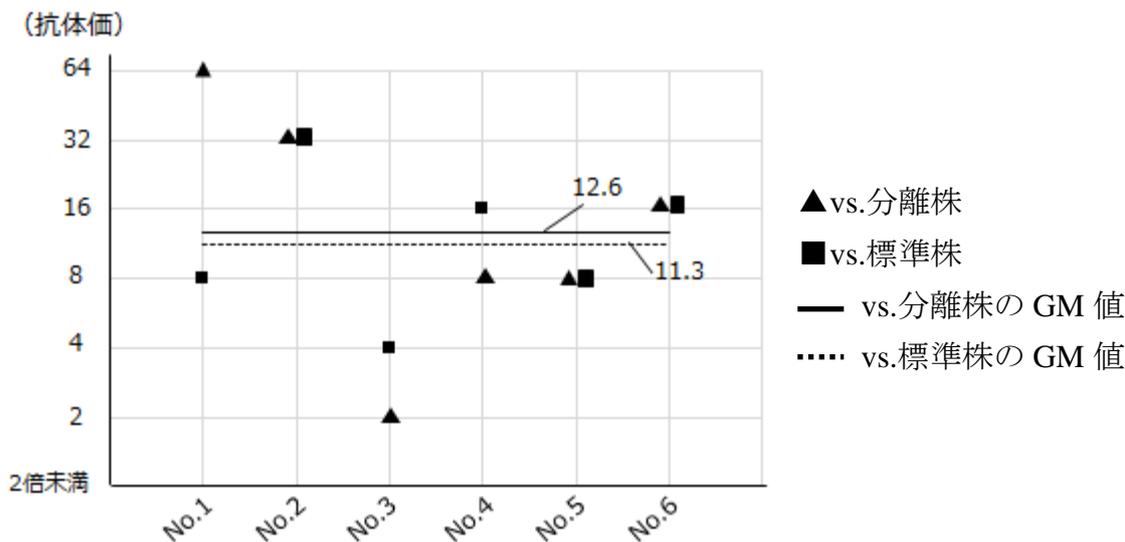


図 2 発症群の抗体価

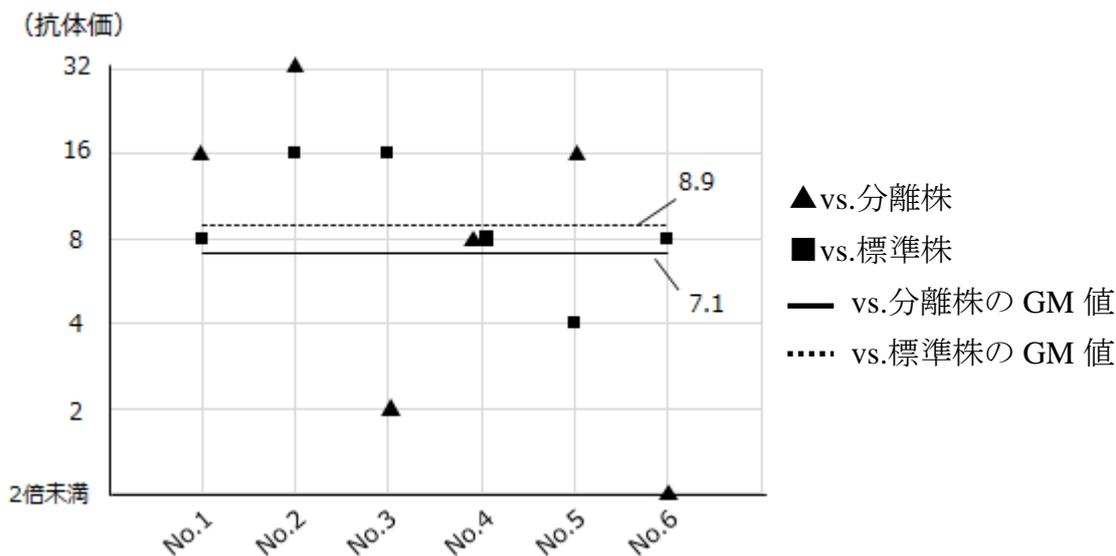


図3 非発症群の抗体価

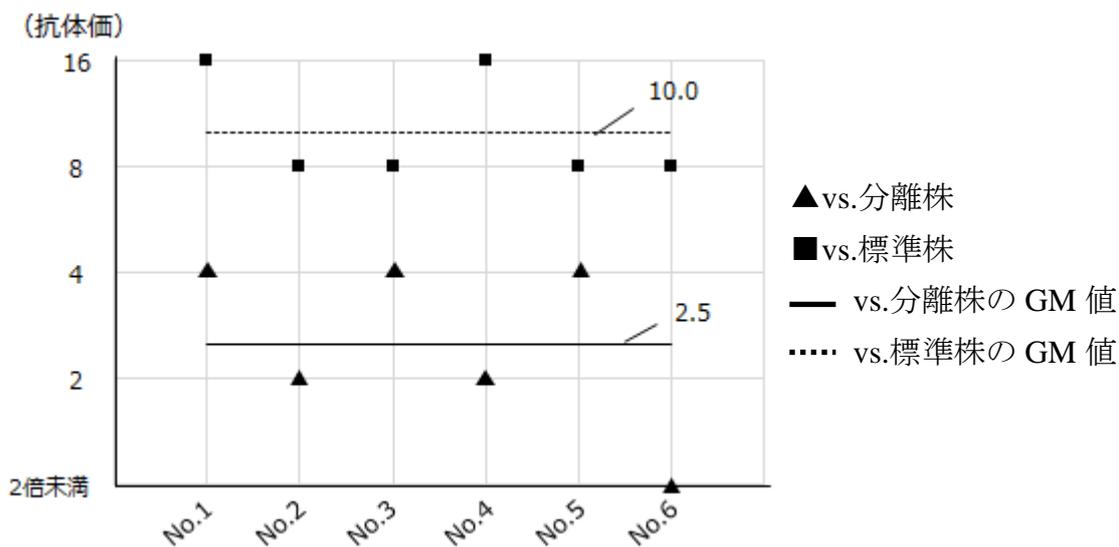


図4 ワクチン群の抗体価

V 考察

1 遺伝学的検査

分離株のORF5領域はH21農場浸潤株に最も高い相同性を示した。PRRSウイルスを豚の生体で367日間かけて7代継代するとORF5領域に約1.3%の変異を生じると報告されている¹⁰⁾。このことから、H21農場浸潤株が遅くとも平成21年から約6年以上に渡り農場内に常在し、分離株に変異したものと考えられた。

平成21年に同農場で発生したPRRS事例では新たに農場に侵入した株によるものであったが⁸⁾、平成27年の発生では農場内に常在する株によるものであったことが示された。また、分離株と標準株及びワクチン株との間の相同性は低いことが判明した。

2 血清学的検査

発症群及び非発症群において、分離株への抗体価がワクチン群よりも高かった。これは、分離株がワクチン接種済みの個体にも抗体産生を誘導するということであり、感染が成立しているということである。このため、ワクチン接種のみでは分離株への感染を完全に防ぐことはできないことを示している。このことは、遺伝学的に相違が大きい PRRS ウイルスに対してはワクチン効果が減弱し、完全な感染防御はできないという報告^{11,12)}に一致する。

遺伝学的検査において示されたように、分離株はワクチン株と遺伝学的に同一性が低いため、ワクチンの効果が減弱したと考えられた。しかし、発症群や非発症群に比較すると低いものの、分離株に感染していないワクチン群に分離株への感染防御能が認められたことから、ワクチン接種が PRRS 対策として有用であることも改めて示された。

現在市販されている PRRS ウイルス弱毒生ワクチンの効能は臨床症状や発育不良、肺病変などの病態変化の抑制であり¹²⁾、ワクチン接種のみではなく適正な飼養管理と合わせ、多量のウイルスに感染させないことが重要であることが再確認された。

VI 農場内 PRRS 対策への応用

血清学的検査において、非発症群で標準株への抗体価に比べて分離株への抗体価が低い個体が認められた(非発症群 No. 3, 6)。これらの個体は過去に分離株に感染していないと考えられ、分離株への抵抗性が弱いと考えられる。このような個体が繁殖豚群におり、分離株へ感染し、発症に至った場合は PRRS による流産が再び発生する可能性がある。

また、ワクチン群の抗体 GM 値が標準株に対しては 10 倍、分離株に対しては 2.5 倍と差が認められたことから、分離株に感染していない個体の判別ができることが示唆された。

PRRS ウイルスは株ごとに免疫応答が異なるが⁶⁾、同じ株の再感染には完全な防御を示すことが知られている¹³⁻¹⁵⁾。繁殖豚選抜の際に分離株を用いた中和抗体検査を実施し、分離株への高い抗体価を持つ個体を選抜することで、農場内常在ウイルスへ強固な免疫を持つ繁殖豚群を作ることができると考えられた。平成 21 年に当該農場で発生した PRRS 事例のような、外部からの新たな PRRS ウイルス侵入対策として、ワクチン接種を継続することが必要であると確認された。

現在、PRRS のモニタリングには ELISA 法が広く実施されているが、ELISA 法ではワクチン抗体と野外ウイルス感染抗体の区別ができない¹⁶⁾。そのため、分離株に特異的なモニタリングは難しい。中和抗体検査では用いたウイルス株に比較的特異的な抗体を検出できるため、これにより農場内常在ウイルスに特異的なモニタリングができる可能性が考えられた。

PRRS 対策においては、母豚群の PRRS ウイルスへの免疫安定化や、子豚への感染を防ぎウイルスの農場内での循環を抑制し、遮断することが重要とされている¹⁷⁾。当該農場では、ウイルスの循環を制御できず、ウイルスの動きがコントロールされていない状態である。今回得られた結果を繁殖豚の選抜や免疫状態の把握、農場内ウイルスのモニタリングに利用していきたい。

引用文献

- 1) 恒光 裕 : 豚繁殖・呼吸障害症候群, 明石博臣ら編 動物の感染症 第3版, p178-179, 近代出版, 東京 (2011)
- 2) 清水 実嗣 : 豚繁殖・呼吸障害症候群, 柏崎守ら編 豚病学 第4版, p237-244, 近代出版, 東京 (1999)
- 3) 山根 逸郎ら : PRRS の発生に関わる呼吸器疾患および繁殖障害などによる経済的な損失調査 (アンケートを用いた疫学調査と全国の被害損額の推定), 豚病会報, 55 : 33-37 (2009)
- 4) Dea S et al. : 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 (2000)
- 5) Iseki H et al. : Genetic analysis of ORF5 in porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan, Microbiol Immunol, 55 (3) : 211-216
- 6) Neumann EJ et al. : Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS), Swine Disease Manual. 4th ed, p65-68, American Association of Swine Veterinarians, USA (2009)
- 7) Christopher-Hennings J et al. : Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR, J Clin Microbiol, 33: 1730-1734 (1995)
- 8) 石関紗代子ら : 流産を主徴とした PRRS の発生例, 豚病会報, 59 : 19-24 (2012)
- 9) Kono Y et al. : Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs, J Vet Med Sci, 58 (10) : 941-946 (1996)
- 10) Chang CC : Evolution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus during sequential passages in pigs, J Virol, 76 : 4750-63 (2002)
- 11) Labarque G et al. : Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy, Vaccine 22 : 4183-4190 (2004)
- 12) Opriessnig T et al. : 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 (2005)
- 13) Lager KM et al. : Homologous challenge of porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine, Vet Microbiol, 58:113-25 (1997)
- 14) Lager KM et al. : Duration of homologous porcine reproductive and respiratory syndrome virus immunity in pregnant swine, Vet Microbiol, 58:127-33 (1997)

- 1 5) Lager KM et al. : 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 (1999)
- 1 6) Lopez OJ et al. : Role of neutralizing antibodies in PRRSV protective immunity, Vet Immunol Immunopathol, 102:pp155-63 (2004)
- 1 7) Cho JG et al. : Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Theriogenology, 66:655-662 (2006)