

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780301

研究課題名(和文) 高病原性豚繁殖・呼吸障害症候群の診断法開発及び病態解明に関する研究

研究課題名(英文) The research for highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus.

研究代表者

井関 博 (ISEKI, Hiroshi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所 ウイルス・疫学研究領域・主任研究員

研究者番号：90548207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は、高病原性豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス(HP-PRRSV)と高病原性でない従来型のPRRSVを個別に検出することが可能な遺伝子診断法を開発した。また、HP-PRRSVを用いて豚の感染実験を実施することにより、我が国では未だ見ることのできないHP-PRRSVによる病態の精査を実施し、HP-PRRSV感染豚におけるウイルス動態とそれに対する宿主応答の解析を実施した。さらに、我が国に流行する従来型のPRRSVに対する免疫が、HP-PRRSVに対して一定の交差性を有することを研究期間を通じて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Although the highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) has not yet been detected in Japan, we must operate under the assumption that the virus could eventually spread there. Through this research issue, we successfully developed a genetic diagnostic method detecting for HP-PRRSV RNA and typical (non-highly pathogenic) PRRSV RNA, respectively. The animal experiment using HP-PRRSV was first report in our country, thus we can provide the insights into their pathogenicity and the property of viral load of HP-PRRSV. Moreover, we clarify the immune response to the Japanese isolate was able to strongly alleviate subsequent manifestation of HP-PRRS. However, this also means that recognition of HP-PRRSV invasion in Japan may be difficult, as symptoms will not be obvious.

研究分野：ウイルス学

キーワード：豚 ウイルス PRRS 遺伝子 診断 繁殖 呼吸器 流産

## 1. 研究開始当初の背景

高病原性豚繁殖・呼吸障害症候群 (HP-PRRS) は、2006 年 5 月に中国の江西省で確認されて以来 2006 年末までにほぼ中国全土に拡大し、中国政府は HP-PRRS が 200 万頭以上発生し約 40 万頭が死亡したと公表した。HP-PRRS の発生は中国だけに留まらず周辺諸国に急激な拡大を続けており、現在までにベトナム、カンボジア、ラオス、ロシア、フィリピン及びブータン等で確認され、深刻な被害を及ぼしている。HP-PRRS ウイルス (HP-PRRSV) 出現以前の PRRS は、致死性は低いものの、母豚の流産や死産、虚弱子豚の分娩といった繁殖障害に加えて、離乳期以降の豚の呼吸器病発生の誘引となり、養豚産業に甚大な経済的被害を与える疾病として認識されていた。PRRSV は遺伝学的に北米型と欧州型に大別され、それぞれの遺伝子配列は 60% 程度の相同性しか有していない。また、PRRSV は非常に遺伝子変異を起こしやすいウイルスとして知られており、北米型と欧州型のウイルスの中でも多種多様な遺伝学的系統が存在し、急速に世界中に拡散しながらその地域に固有の遺伝学的系統を樹立してきた。我が国では 1992 年に初めて北米型 PRRSV が分離されて以降急速な浸潤の拡大が確認され、今では国内の 8 割の農場に浸潤しているとも言われる。ウイルスの拡散を防ぐことが極めて難しい理由として、PRRSV が豚から排出される分泌液・排泄物にも含まれ、これらを含む粉塵で伝播するという点が大い。これまで研究代表者が所属する動物衛生研究所では、国内で最初に PRRSV を分離後、清浄化の難しい本疾病のコントロールを行うための研究開発を推進してきた。しかし、北米型 PRRSV のコントロールすら困難な状況下において、昨年秋に欧州型 PRRSV が国内で初めて分離された。このことは HP-PRRSV も国内に侵入する可能性があることを示唆していると言える。そのような状況にありながら、HP-PRRS に対する研究は我が国において十分に実施されていなかった。

## 2. 研究の目的

HP-PRRSV の日本への侵入に備えて、速やかな摘発および清浄化を実現するための防疫手法を開発する必要がある。その中において本研究の目的は、HP-PRRSV に対する診断法を開発するとともに、HP-PRRSV の病原性を精査し、国内に常在する北米型 PRRSV (従来型 PRRSV) と HP-PRRSV の交差免疫の有効性を解析することにある。

## 3. 研究の方法

(1) 分離ウイルスのクローニングと分子生物学的アプローチの準備

既に導入済みである 2010 年に分離された HP-PRRSV 分離株を豚肺胞マクロファージにより増殖させ、限界希釈法にてウイルスのクローニングを行った後、ウイルスの力価測定

を実施して一時冷凍保存した。これまで蓄積してきた日本国内の野外分離株を含めた保存ウイルス液の一部から RNA を抽出し、RT-PCR により定量 PCR のターゲット領域を増幅させた。ダイレクトシーケンシング法により塩基配列の解析を行い、マルチプルアライメントから株間での遺伝子変異箇所を確認した。

(2) HP-PRRSV 及び従来型 PRRSV を識別可能な定量 PCR 法の開発

HP-PRRSV の遺伝子配列は、non-structural protein 2 (nsp2) と呼ばれる領域に特徴的な欠損があることが報告されている。この領域を利用して定量 PCR のプライマーを設計し、HP-PRRSV 及び日本に常在する従来型 PRRSV 由来の遺伝子を個別に検出する系を確立した。交差反応試験用の欧州型 PRRSV は、日本分離株である Jpn EU 4-37 を用いた。検出感度の比較試験として、従来用いられている Kono らの two step RT-PCR 法を採用した。

(3) HP-PRRSV を用いた感染実験

豚群は HP-PRRSV 実験感染群 (6 頭)、従来型 PRRSV 接種後 HP-PRRSV 実験感染群 (5 頭)、従来型 PRRSV 単独接種群 (5 頭)、対照群 (5 頭) の 4 群計 21 頭を用意した。豚は SPF の離乳後 3 週齢の個体を購入し、導入後 1 週で従来型 PRRSV の日本標準株 (EDRD1 株) を鼻腔内噴霧感染させた。実験開始前日から体重及び体温の測定を毎日実施し、ウイルス接種後は 1 日間隔で血液を回収した。中和抗体産生が十分に誘導されると考えられる 4 週後に HP-PRRSV を鼻腔内噴霧感染させ、以降 2 週間経過するまで血液および口腔液を回収し、定量 PCR によりウイルス RNA 量を測定した。HP-PRRSV 感染から 2 週間後に解剖を行い、病理学的な解析に供した。

(4) 開発した遺伝子診断法による国内疫学調査

国内の PRRS 陽性農場由来の血液から RNA を抽出し、開発した定量 PCR 及び比較対照である nested PCR 法を用いて PRRSV 遺伝子断片を検出した。

## 4. 研究成果

(1) HP-PRRSV および従来型 PRRSV を鑑別可能な定量 PCR 法の開発

ベトナムより導入した HP-PRRSV11 株より遺伝子を抽出し、nsp2 遺伝子のクローニングを実施した。また、国内で確認されている従来型 PRRSV は、多型領域である open reading frame 5 (ORF5) により 5 つのサブグループに分類されることから (引用文献) それぞれのグループに含まれる分離株からも nsp2 遺伝子をクローニングした。それらの遺伝子情報に加え、遺伝子データバンクから参照株の遺伝子情報を加えて、我が国に分布する従来型 PRRSV と HP-PRRSV の遺伝子それぞれに

特異的な遺伝子断片を増幅可能なプライマーセットをデザインした。

遺伝子を検出する方法として、作業時間の短縮、コンタミネーションリスクの軽減、コストの削減等を目的として、RNA から DNA への逆転写から遺伝子増幅までを一貫して実施できる one step quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) の検出系を採用した。生体由来材料からの PRRSV ゲノムの定量的検出法については、既報の方法に従った(引用文献)。また、定量検出系とするために、標準曲線作製用遺伝子を GeneArt® により参照株である JXA1 株 (HP-PRRSV) および EDRD1 株 (従来型 PRRSV) の nsp2 遺伝子を合成して使用した。本研究で新たに開発した遺伝子検出法は、本実験で使用した HP-PRRSV および EDRD1 株の遺伝子断片を特異的に増幅することを確認した。

### (2) 野外材料を用いた HP-PRRSV の遺伝子断片を特異的に検出する PCR 法の検証

既報の nested RT-PCR 法(引用文献)により北米型 PRRSV 陽性と判定された 7 県 100 検体の血清由来 RNA を用い、本研究で開発した qRT-PCR で用いた HP-PRRSV 検出用プライマーにより、HP-PRRSV 遺伝子の検出を試みた。その結果、試験に用いた 100 検体の全てにおいて、HP-PRRSV に特異的な遺伝子増幅産物は確認されなかった。一方、全ての検体において、非特異的な増幅産物は確認されなかった。以上のことから、少なくとも新たにデザインした HP-PRRSV の遺伝子断片を特異的に増幅するプライマーセットが、国内に常在する従来型 PRRSV 遺伝子に対して非特異的に反応する現象は確認されなかった。

### (3) 従来型 PRRSV に対する免疫は HP-PRRSV 感染による臨床症状を著しく軽減する

子豚を用いた感染実験の結果、実験群 4 群のうち HP-PRRSV を単独で接種した群のみが著しい増体率の低下を示した(図 1)。

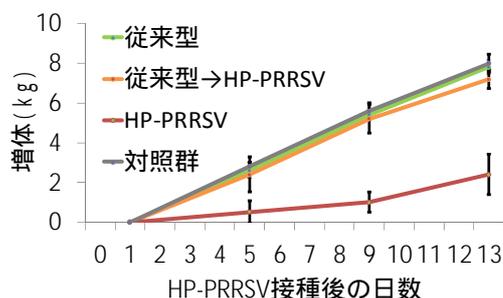


図 1 HP-PRRSV 接種日からの増体比較

一方で、従来型 PRRSV 単独接種群、従来型 PRRSV 接種 4 週後に HP-PRRSV を接種した群、対照群における増体の推移に有意差は認められなかった。同様に体温の上昇についても、HP-PRRSV 単独接種群は他の 3 群に比較して有意に高かった。また、HP-PRRSV 単独接種群に

は中国の報告にあるような重篤な呼吸器症状やチアノーゼが確認されたが、従来型 PRRSV を HP-PRRSV 攻撃前に接種した群では、発熱の見られた 3 個体についてのみ一過性の元気消失と体表の発赤が認められた。

血液中のウイルス量の推移を測定するため、本研究課題の中で開発した定量 PCR 法を用いて HP-PRRSV のウイルス RNA 量を比較した。従来型 PRRSV を接種した後に HP-PRRSV を接種した群では、5 頭中 2 頭は実験終了までウイルス RNA は確認されなかった(図 2 a)、残る 3 頭では、HP-PRRSV 接種 5 日後にウイルス RNA 量の上昇を認めたと、その後は減少した。一方、HP-PRRSV 接種群では、接種 1 日後から 6 頭全てでウイルス RNA 量の上昇が認められ、実験終了まで高い値を維持した(図 2 b)。

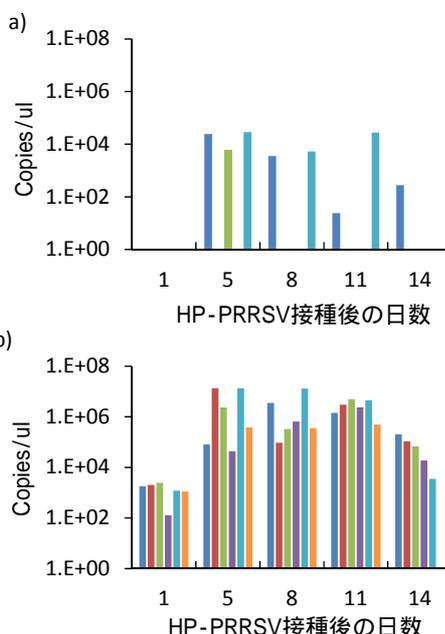


図 2 血液中の HP-PRRSV 由来 RNA 量の推移  
従来型 PRRSV 接種後に HP-PRRSV を接種した群 (a)、HP-PRRSV 単独接種群 (b)

HP-PRRSV 接種 2 週後に実施した剖検では、HP-PRRSV 単独接種群の肺において極めて強い出血性・壊死性病変が認められたことに対し、従来型 PRRSV 接種後に HP-PRRSV を接種した群では血液中にウイルス RNA が確認された 3 頭の肺で軽度から中程度の間質性肺炎が認められたのみであった。また、肺の肉眼病変面積および組織病変の程度をスコア化したところ、従来型 PRRSV を予め接種した群は、HP-PRRSV 単独接種群に比較して有意にスコアが低かった(図 3 a,b)。また、従来型 PRRSV のみを接種した群とその後 HP-PRRSV を接種した群では、肺病変に有意な差は認められなかった。以上のことから、PRRSV の主要な病変形成部位である肺においても、予め従来型 PRRSV に感染していた場合、HP-PRRSV 感染による病変形成が減弱されることが示唆さ

れた。

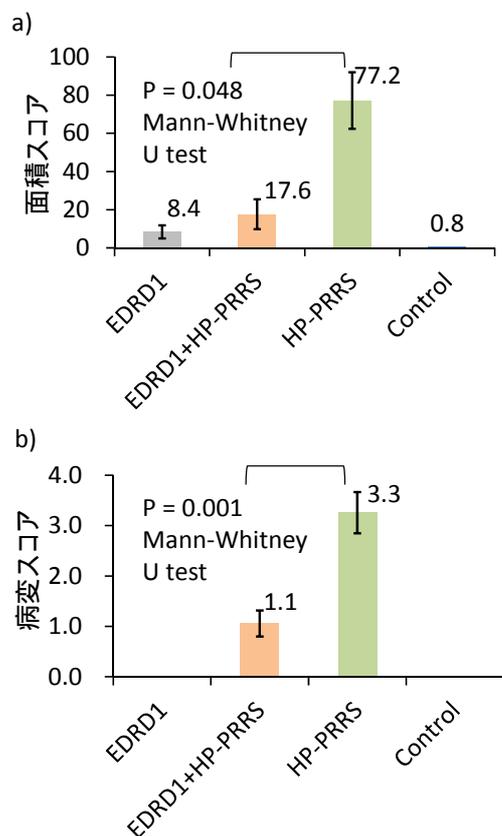


図3 HP-PRRSV 接種後 14 日目の肺における病変の面積スコア (a) および組織病変スコア (b)

本研究で実施した感染実験は、我が国に常在する PRRSV に対する免疫を獲得した豚に HP-PRRSV が感染した際にどのような病態が観察されるか検証した初めての研究である。冒頭の研究の背景においても述べたように、HP-PRRSV がいつ我が国に浸入・蔓延してもおかしくはない状況において、本研究成果が防疫上重要な参照データとなるであろう。

#### < 引用文献 >

Hiroshi Iseki, Michihiro Takagi, Ayako Miyazaki, Ken Katsuda, Osamu Mikami, Hiroshi Tsunemitsu. Genetic analysis of ORF5 in porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan. *Microbiology and Immunology*. 2011. 55(3):211-216.  
Hiroshi Iseki, Michihiro Takagi, Yoshiko Kuroda, Ken Katsuda, Osamu Mikami, Hiroshi Tsunemitsu, Makoto Yamakawa. Application of a SYBR®Green one step real-time RT-PCR assay to detect type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2014. 76(10):1411-1413.

Yuji Kono, Toru Kanno, Mitsugu Shimizu, Shunji Yamada, Seiichi Ohashi, Machiko Nakamine, Junsuke Shirai. Nested PCR for detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 1996. 58(10):941-946.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

Hiroshi Iseki, Michihiro Takagi, Kenji Kawashima, Nguyen Tung, Ken Inui, Mitsutaka Ikezawa, Tomoyuki Shibahara, Makoto Yamakawa. Influence of immune response to Japanese isolate of PRRSV on subsequent manifestation of highly pathogenic PRRSV. The 23<sup>rd</sup> International Pig Veterinary Society Congress. 2014. Jun. 10-13, Jeju (Korea), Abstract p569.

Kenji Kawashima, Michihiro Takagi, Hiroshi Iseki, Tomoyuki Shibahara, Nguyen Tung, Ken Inui, Makoto Yamakawa. Lesion development and viral distribution in pigs following infection with virus of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome. The 23<sup>rd</sup> International Pig Veterinary Society Congress. 2014. Jun. 10-13, Jeju (Korea), Abstract p552.

Kenji Kawashima, Hiroshi Iseki, Tomoyuki Shibahara, Mitsutaka Ikezawa, Nguyen Tung, Ken Inui. Evaluation of vaccine efficacy for highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome under a challenge study. The 6<sup>th</sup> Asian Pig Veterinary Society Congress. 2013. Sep. 23-25, Ho Chi Minh (Vietnam), Abstract pO192.

#### 6. 研究組織

研究代表者

井関 博 (ISEKI, Hiroshi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究所 ウイルス・疫学研究領域 主任研究員

研究者番号：90548207