

—最近における動物衛生研究情報(Ⅹ)—

豚丹毒および豚マイコプラズマ肺炎を一度に予防できる
経口ワクチン技術の開発

下地善弘[†] (動物衛生研究所細菌・寄生虫研究領域上席研究員・
東京理科大学生命科学研究所客員教授)



1 はじめに

平成元年以降, 国内の豚飼育頭数は900~1,000万頭規模を維持しているが, 飼養戸数は50,200戸(平成元年)から7,230戸(平成20年)と1/7に減少しており, これに反して1戸当たりの飼養頭数は平成以後7倍に増加した。こ

のように, 養豚経営の大規模化・集約化の流れは近年, 一段と加速化しているが, 飼育規模の大規模化に伴い, 感染症の発生も増加している。平成20年度は離乳豚の10.5%(養豚基礎調査, 日本養豚協会), すなわち, 年間150万頭以上の子豚が死亡したと推測される。この死亡の原因の多くは肺炎, 下痢である。それらは, 豚繁殖・呼吸器障害症候群(PRRS)や豚サーコウイルス関連疾病(PCVAD)を起こすウイルスによるものとされるが, マイコプラズマなど細菌との混合感染はこれらウイルス感染による症状を悪化させ, 死亡率の上昇を引き起こしている。

ところで, 家畜感染症の予防にはワクチンの使用が防疫上, 最も効果的であり, かつ, 最も安価な手段となる。現在国内では, 従来型の生ワクチン, 不活化ワクチンの使用が主流であるが, 最近では, 遺伝子工学的手法を利用した新しいワクチンの開発が可能になってきた。例えば, 上記のPCVADに関しては, 海外から優れたワクチンが導入されその使用が普及した結果, それに伴う死亡率は大きく改善されているが, このワクチンは, 豚サーコウイルス2型の構成成分を昆虫細胞に作らせた不活化ワクチンや, 2型ウイルスと同種1型ウイルスとを合体させた不活化キメラウイルスワクチンなどである。このように, 新興感染症(Emerging diseases)である豚サーコウイルス2型感染症に対して非常に有効なワクチンが迅速に開発されたように, 遺伝子組換えワクチンは家畜衛生の分野に大きな貢献をしている。また, 新興

感染症ばかりでなく, 我々が過去のものとする感染症, すなわち再興感染症(Re-emerging diseases)の発生も予想される。さらには, 将来予想される畜産物の国際間の価格競争など, これまでも増してコスト削減が要求される状況においては, 高機能, かつ, 省力型ワクチンの開発は極めて重要となるが, これには遺伝子組換え技術が大きく貢献できる。

動物衛生研究所の当研究領域では, 一つのワクチンで複数の感染症に対して有効なベクターワクチン, 特に免疫誘導能に優れた粘膜投与型ワクチンの開発研究を行っている。ベクターワクチンは, 安全性が確認されている生ワクチン株や, 病気を起こさないように操作した弱毒株に他の病原体の遺伝子を導入したワクチンで, 一つのワクチンで複数の感染症の予防効果が期待できる。牛や豚等の家畜衛生分野において, 遺伝子組換えベクターワクチンの実用化の実績はまだないが, 愛玩動物や家禽を対象とした製品は欧米ではすでに実用化されている(表1)。本稿では, 我々がこれまで研究を行ってきた, 豚丹毒・豚マイコプラズマ肺炎用の経口投与型ワクチン技術について紹介する。

表1 欧米で実用化されている次世代型ワクチン

ベクターの種類	対象動物・感染症
鶏痘ウイルス	鶏・ニューカッスル病
鶏痘ウイルス	鶏・鳥インフルエンザH5
カナリア痘ウイルス	馬・インフルエンザ
カナリア痘ウイルス	馬・インフルエンザ&破傷風
カナリア痘ウイルス	馬・ウエストナイル病
カナリア痘ウイルス	鶏・伝染性ファブリキュウス嚢病
七面鳥ヘルペスウイルス	鶏・マレック病
七面鳥ヘルペスウイルス	鶏・マレック病&ニューカッスル病
七面鳥ヘルペスウイルス	鶏・伝染性ファブリキュウス嚢病
DNAワクチン	魚(サケ)・伝染性造血器壊死症
DNAワクチン	馬・ウエストナイル病

[†] 連絡責任者: 下地善弘 (独農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所細菌・寄生虫研究領域)

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5 ☎・FAX 029-838-7790 E-mail: shimoji@affrc.go.jp

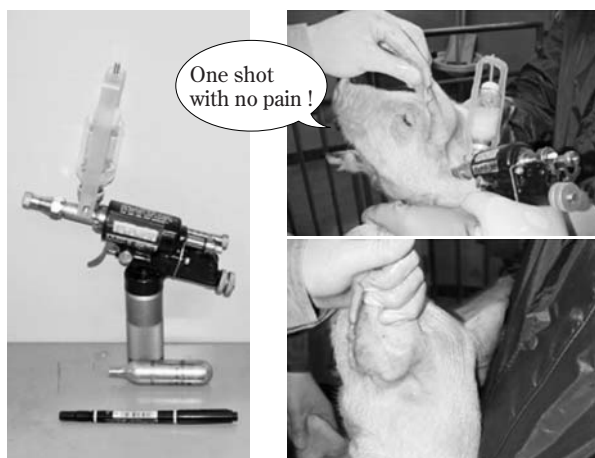


図1 針無し注射による皮内免疫

豚 群	肺炎病変面積 (%)
コントロール群 (n=9)	9.2%
YS-19 免疫群 (n=10)	0.2% (P<0.01)

2 豚丹毒, 豚マイコプラズマ肺炎

豚丹毒は、豚丹毒菌 *Erysipelothrix rhusiopathiae* が起こす感染症である。臨床症状は、急性の敗血症、亜急性の蕁麻疹、また、慢性の関節炎や心内膜炎などで、世界中で被害がある。豚丹毒ワクチンには、生ワクチンと不活化ワクチンとがあり、日本国内では注射によりワクチン接種が行われているが、豚丹毒ワクチンは、国内で最も使用頻度の高いワクチンの一つである。また、欧米においては飲水を介した生ワクチンの経口投与も行われている。

豚マイコプラズマ肺炎は、*Mycoplasma hyopneumoniae* と呼ばれる細菌により引き起こされる感染症で、世界中で問題になる。致死性はほとんど無いが、その病原体が感染することで豚では生体防御機能が抑制され、容易に他の細菌やウイルスの二次感染を引き起こす。伝搬性は極めて高く、国内の農場の大部分はこの病原体に汚染されている。ワクチンは不活化ワクチンのみが使用されているが、この病原体の性質上、ワクチンで感染を防御することは不可能で、肺炎の程度を抑えることがワクチン接種の目的となっている。

我々は、使用頻度の高い豚丹毒生ワクチンをベクターとして使い、経済的被害が極めて大きい豚マイコプラズマ肺炎に対する経口投与型ベクターワクチンの開発を目指した。

3 経口投与による免疫の誘導

これまでに我々は、豚丹毒菌の病原性の本体は菌体表層にある莢膜による食細胞からの貪食並びに細胞内殺菌の回避であることを明らかにした [1, 2]。また、莢膜合成に関与する遺伝子をノックアウトすることにより強毒



図2 下顎部を切除し、舌を後部へ引っ張り出した様子。上顎部の黒丸で囲んだ部位が扁桃。

株からYS-1株と命名した弱毒株を作ること成功した [3]。この株は、マウスや無菌豚に注射してもまったく病気を起こさず、体内から極めて短期間で排除される。しかし、この菌を事前に接種して免疫しておく、その後、強毒株を接種しても完全に感染を防御できる。すなわち、生ワクチン株として利用できる。我々はこの株に、豚マイコプラズマ肺炎病原体のP97と呼ばれる遺伝子を導入し、YS-19株と命名したワクチン候補株を作製した [4]。この株を、豚の鼻腔内にスプレーを使って噴霧投与、あるいは、針なし注射器（ニードルフリーインジェクター）で皮内接種すると、豚丹毒および豚マイコプラズマ肺炎を防御できることが判明した [4-6] (図1)。

ところで、針なし注射器は現在主流の注射型ワクチンよりも注射針の残留などの安全性の面において有用性はあると考えられるものの、豚を一頭一頭捕まえて接種する必要がある。また、養豚現場では、豚の鼻に向けてスプレーする手間を考えると、とても実用的とは言えない。そこで我々は、大規模養豚に最も適する経口投与型ワクチンとしてYS-19株は使用できないかと考え、YS-19株の経口投与後の免疫誘導能を解析した。その結果、この株は経口投与では十分な免疫を誘導できないことが判明したが、この理由は、過度に弱毒化されていることが原因であった。すなわち、無菌豚の鼻腔内にスプレーを使い噴霧投与したYS-19株は、投与後、数時間後に大量の菌が肺内で検出されたが、これらの菌は呼吸器内の防御機構により口腔側に戻された後、食道を介して消化器側へ排出された。投与後、最も長く菌が分離された臓器は扁桃であったが、4日目には扁桃を含めすべての臓器から検出されなくなった。このように、YS-19株は無菌豚を使用した実験においても、極めて短期間に豚の体内から排除されることが判明した。ところで、野外においては、豚丹毒菌をはじめ、サルモネラ菌、連鎖球菌、サーコウイルス、PRRSウイルスなど様々な病原体が扁桃から分離される (図2)。このように、豚の扁桃

表2 経口ワクチン投与後の豚丹毒菌攻撃に対する防御効果

処置	個体番号	豚丹毒菌接種後の臨床症状			
		体温	蕁麻疹	沈鬱	症状
免疫群	176	40度以下	± (接種部位のみ)	無	無
	177	40~41度	±	無	無
	178	40~41度	±	無	無
	179	40~41度	±	無	無
	180	40~41度	±	無	無
	181	40~41度	±	無	無
	182	40度以下	±	無	無
	183	40~41度	±	無	無
対照群	266	42度以上	+++ (全身性)	有	死亡
	267	40~41度	+++	有	安楽殺



図3 ワクチン入りミルクを飲む子豚

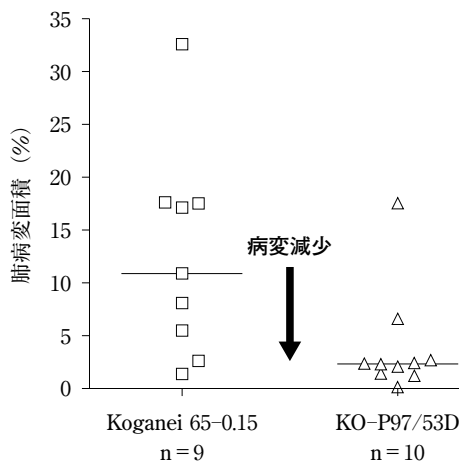
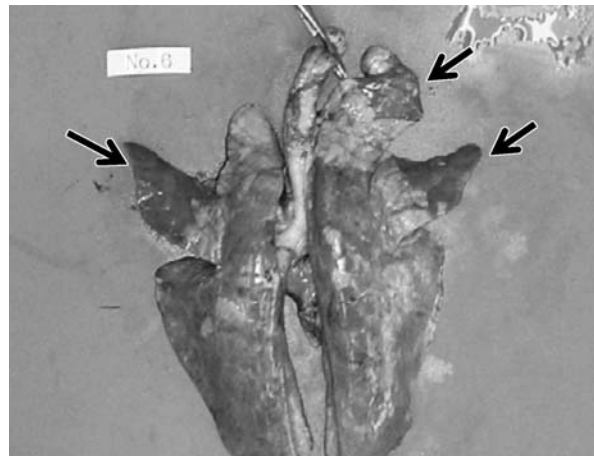


図4 ワクチン入りミルクを摂取した豚群では病変（右写真、矢印）面積が有意に抑制された



は、宿主が外界から侵入した病原体を最初期段階で認識する上で非常に重要な免疫器官であることから、我々は、経口投与後に扁桃にある程度の期間、定着あるいは増殖できる弱毒株であればワクチンベクターとして必要な免疫が誘導できるのではないかと考え、国内で使用されている豚丹毒生ワクチン株の小金井65-0.15株を用いて実験を行った。その結果、小金井65-0.15株は経口投与後、実験で確認した2週間目まではSPF豚の扁桃に定着できることが確認されたことから、我々は、経口投与型のワクチンベクターとして小金井65-0.15株を使用することにした。

4 P97 抗原を発現する小金井65-0.15株の作製

我々は、YS-19株を開発した系を利用し、P97抗原を発現する小金井65-0.15株（KO-P97/53S又はD株）の作製に成功した [7]。まず我々は、生後3週齢の子豚を用い、KO-P97/53S株をミルクに入れ7日間連続して自由摂取させた子豚8頭と、比較対照群としてミルクのみを同じように自由摂取させた子豚2頭を用い、豚丹毒

に対するワクチン効果を判定した。その結果、対照群の2頭では、豚丹毒菌の強毒株の接種後、体温の上昇、蕁麻疹の発生、沈鬱状態などの臨床症状が見られ死亡した。一方、KO-P97/53S株を飲ませたワクチン群の豚では、臨床症状がまったく見られず、豚丹毒に対する強い防御免疫が確認された（表2）。また、豚マイコプラズマ肺炎に対する防御効果を見るため、我々は、生後3週齢の子豚10頭にKO-P97/53D株を、また、比較対照として豚9頭に小金井65-0.15株を入れたミルクを3日間連続して自由摂取させた（図3）。その後、ワクチン投与最終日から13日目に、豚マイコプラズマ肺炎病原体の入った溶液を豚の鼻腔内にスプレー噴霧し、人為的にマイコプラズマ肺炎を起こさせた。その結果、親株を飲ませた比較対照群の豚において、肺炎病変の肺全体に占める割合は約11%だったのに対して、KO-P97/53D株を飲ませた豚ではその割合は1/4以下の2.3%に抑えられた（図4）。この抑制効果は、現在市販されている豚マイコプラズマ肺炎ワクチンと同等であると我々は考えている。

ところで、我々のシステムで確認された豚マイコプラ

ズマ肺炎に対する防御効果についてはその機序について不明な点が多い。これまでの解析では、P97抗原刺激に対して、免疫豚の末梢血リンパ球はインターフェロンを産生し、抗原特異的に増殖するなど、細胞性免疫が誘導されることが分かっている [5, 6]。また、通常、マイコプラズマの感染により細胞性免疫抑制が引き起こされるが、親株（小金井65h0.15株）を投与した豚ではその免疫抑制が見られたが、P97抗原を発現する小金井65h0.15株、すなわちワクチン株を経口投与した豚ではその抑制が起こらないことが判明した [7]。今後は、この機序解明に向けた詳細な解析が必要である。

5 今後のワクチン研究の展開

病原体のゲノム研究が、ワクチン開発の分野にも大きな革命をもたらしつつある。現在では、病原体を入手できなくてもインターネットを通じて目的とする病原体の遺伝情報を容易に得ることが可能である。このことは、安全性および免疫誘導能にすぐれたプラットフォーム（基盤）ベクターとなる弱毒株を開発し、様々な外来遺伝子に対応できる発現系を構築することができさえすれば、培養不能又は困難な微生物に対してもこれまでの方法よりも短期間かつ低労力でワクチン開発が可能になることを意味する。また、ベクターワクチンを用いた場合、ワクチンを接種した動物と自然に感染した動物との区別、すなわち、DIVA (differentiating infected from

vaccinated animals) 理念に基づいたワクチンの開発も可能になり、国家防疫上重要な感染症に対応することが可能になるであろう。ゲノム情報を利用した *in silico* (コンピューター) 解析によるワクチン開発手法は、Reverse vaccinologyと呼ばれているが、今後、獣医学領域においても著しい進展が予想される。

本稿で示した成績の一部は、譚微生物化学研究所・大石英司博士、動物衛生研究所・小川洋介博士、宗田吉広博士との共同研究である。また、本研究の成果の一部は農林水産省「レギュラトリーサイエンス新技術開発事業 (H20～H23)」の支援による。最後に、本研究を遂行するに当たり、動物衛生研究所の実験動物管理課職員の多大なる支援を受けた。この場を借りて深謝したい。

参 考 文 献

- [1] Shimoji Y, et al : Infect Immun,62 (7), 2806-2810 (1994)
- [2] Shimoji Y, et al : Infect Immun,64 (5), 1789-1793 (1996)
- [3] Shimoji Y, et al : Infect Immun,66 (7), 3250-3254 (1998)
- [4] Shimoji Y, et al : Infect Immun,70 (1), 226-232 (2002)
- [5] Shimoji Y, et al : Vaccine, 21 (5-6), 532-537 (2003)
- [6] 下地善弘他：動物衛生研究所研究報告, 第113号, 1-11 (2007)
- [7] Ogawa Y, et al : Vaccine,27 (33), 4543-4550(2009)