

国内で分離された野外株の攻撃に対する豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）ワクチンの効果

奥田 陽（全農家畜衛生研究所）

Okuda, Y. (2009). Efficacy of vaccination with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome virus following challenges with field isolates in Japan

All about SWINE 34, 18-25

豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）は PRRS ウイルス（PRRSV）によって引き起こされ、母豚の繁殖障害と子豚の呼吸器障害を特徴とする疾病である。国内においては 1993 年に肥育豚から初めてウイルスが分離されている [1]。PRRSV はその遺伝子から北米型とヨーロッパ型の 2 つの型（genotypes）に大別されるが、Yoshii らは国内で検出されるウイルスはこれまで全て北米型であること、および同じ北米型のウイルスでも遺伝学的多様性に富んでいることを報告している [2, 3]。また、PRRSV は遺伝的多様性と同様に抗原的多様性にも富んでいる。北米型とヨーロッパ型のウイルスで抗原性が異なることに加えて、北米型ウイルスの中でもウイルスによって抗原性の異なることが報告されている [4]。

最近の研究で、市販 PRRS 弱毒生ワクチンはワクチン株と遺伝学的に異なった野外ウイルスを用いた攻撃試験において、PRRS による臨床症状および病変形成を極めて効果的に抑制したと報告されている [5]。一方で北米型 PRRSV の免疫応答はウイルス株特異的であるという報告 [6] や、ヨーロッパ型のウイルスを用いた試験ではワクチン株と遺伝学的に異なったウイルスで攻撃した場

合ワクチンの効果が減少したという報告 [7] もある。そこで、PRRS ワクチンの国内分離株に対する効果を確認するために、ワクチン株と遺伝学的大体および抗原的に近縁な野外株と異なる野外株を用いた攻撃試験を実施した。

材料と方法

ワクチン：市販 PRRS 弱毒生ワクチン（インゲルバック PRRS 生ワクチン）を用法・用量に従って使用した。

攻撃用ウイルス：2006 年に豚の肺から分離された PRRSV 野外株、PRRSV wt-11 株および wt-7 株を供試した。両野外株とワクチン株の ORF5 遺伝子およびアミノ酸配列の解析結果、およびワクチン株に対する抗血清を用いた交差中和試験の結果から、wt-11 株はワクチン株と比較して遺伝学的、抗原的に近縁なウイルス株、wt-7 株は異なるウイルス株として供試した（表 1）。

試験方法：PRRSV 抗体陰性の SPF 豚を供試した。試験 1 では wt-11 株を、試験 2 では wt-7 株を攻撃株として供試した。各試験とも各区 4 頭ずつ、ワクチン非接種／攻撃なし（非攻撃区）、ワクチン非接種／攻撃あり（ワクチン非接種区）、およびワク

国内で分離された野外株の攻撃に対する豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) ワクチンの効果

表 1. PRRS ワクチン株と供試ウイルスの遺伝学的, 抗原的性状

| PRRSV 株 | 遺伝学的系統 ^{a)} | 中和抗体価 (log ₂) ^{b)} | ORF5 遺伝子, およびアミノ酸配列の相同性 ^{c)} | | | |
|------------------------------|----------------------|--|---------------------------------------|-------------|------------|----------------|
| | | | Ingelvac PRRS MLV | PRRSV wt-11 | PRRSV wt-7 | Lelystad virus |
| Ingelvac PRRS MLV | II | 4.0 | | 96.7 | 89.2 | 64.3 |
| PRRSV wt-11 | II | 3.5 | 94.0 | | 88.7 | 64.8 |
| PRRSV wt-7 | III | 1.6 | 87.5 | 85.5 | | 63.8 |
| Lelystad virus ^{d)} | EU type | NT ^{e)} | 57.1 | 56.1 | 56.6 | |

a) 既報 [3] の分類に基づく。

b) ワクチン株に対する抗血清を用いた片側交差中和試験による。

c) ORF5 遺伝子 (上右部分) とアミノ酸 (下左部分) 配列の相同性 (%)。

d) Lelystadvirus の塩基配列情報は GeneBankDNA データベースから入手した (Accession No. M96262)。

e) 検査せず。

チン接種/攻撃あり (ワクチン接種区) の 3 区に分け, それぞれ別々の部屋で飼育した。4 週齢時にワクチン接種区の豚にワクチンを接種し, ワクチン接種 28 日後にワクチン非接種区およびワクチン接種区の豚に 10⁷TCID₅₀ の各 PRRSV 野外株を経鼻接種した。

臨床症状および体温を毎日観察し, 体重測定, 採血および扁桃スワブの採材を毎週実施した。攻撃後 10 日目および 21 日目に各群 2 頭ずつ剖検し, 肺の肉眼所見の観察し Halbur らの報告 [8] にしたがって肺病変を評価した。ウイルス分離のために各種臓器を採材し, また, 肺からは肺胞洗浄液 (BALF) を回収した。回収した BALF は遠心し上清はウイルス分離に供試し, 細胞成分は PBS で再浮遊させた後にサイトスピンを用いて標本を作製し, 染色後に鏡顕してマクロファージの比率を算出した。ウイルス分離を血清, 扁桃スワブ, BALF 上清および 10% 臓器乳剤から実施した。ウイルス分離は各検体の 10 倍階段希釈列を作製し, 96 穴プレートに培養した MARC-145 細胞に接種した。7 日間観察し, CPE の有無からウイルス力価を算出した。

増体率, BALF 中のマクロファージ百分率, 肺肉眼病変のスコア, ウイルス分離力価およびウイルス分離期間について Student's *t*-test で有意差検定を実施した。

結 果

臨床症状, 体温および増体率: ワクチン株と近縁な wt-11 株で攻撃した試験 1 において, ワクチン接種の有無にかかわらず攻撃後 10 日目より軽度な呼吸器症状が観察された。ワクチン非接種区では攻撃後に平均体温で 40°C 以上を 5 回記録したが, ワクチン接種区では試験期間中に平均体温で 40°C を上回ることはなかった。攻撃後 7 日目の平均増体率においてワクチン非接種区はワクチン接種区と比較して有意に低かった。

ワクチン株と異なる wt-7 株で攻撃した試験 2 ではワクチン非接種区で攻撃後 4 日目から中程度から重度の呼吸器症状が観察され, 2 頭が元氣消失, 食欲不振に陥った。ワクチン非接種区では攻撃後に平均体温で 40°C 以上を 15 回記録したが, ワクチン接種区区では試験期間中に平均体温で 40°C を上回ることはなかった。攻撃後 7 日目の平均増

体率においてワクチン非接種区はワクチン接種区と比較して有意に低かった (図1)。

肺の肉眼所見：両試験において攻撃区では肺虚脱を伴う肺機能不全や黄褐色で斑状の肺炎といったPRRSに特徴的な肉眼病変が観察された。肺肉眼病変スコアにおいて、試験1ではワクチン接種区と比較してワクチン非接種区で有意にスコアが高かったが、試験2においてはワクチン接種区のスコアはワクチン非接種区と比較して低いものの、

両区に有意差は認められなかった (表2)。

ウイルス分離：試験1では、ウイルスはワクチン接種区の肺、下顎リンパ節およびBALFから分離されたが、その力価はワクチン非接種区と比較して低いものであった (表3)。また、ワクチン接種区において血清からは攻撃後3日目のみウイルスは分離され、ワクチン非接種区と比較してウイルス分離期間は有意に短いものであった (表4)。扁桃スワブからはワクチン接種区において攻撃後7日目および10日目にウイルスが分離されたが、ワクチン非接種区では攻撃後7日目から21日目まで継続して分離された (表5)。

試験2では、ウイルスはワクチン接種の有無にかかわらず攻撃した試験区ではBALFおよび臓器から広く分離され、その力価に明らかな差は認められなかった。また血清および扁桃スワブからのウイルス分離力価および分離期間においても、両攻撃区の間には有意な差は認められなかった。

BALFのマクロファージ百分率：攻撃後10日目および21日目を合計した成績において、試験1ではワクチン非接種区はワクチン接種区および非攻撃区と比較して有意にマクロファージが減少しており、ワクチン接種区と非攻撃区の間では有意差は認められなかった。一方で試験2ではワクチン接種区においても非攻撃区と比較してマクロファージが有意に減少していた (表6)。

考 察

試験1および試験2の両試験において、ワクチン非接種区と比較してワクチン接種区ではPRRSV攻撃による臨床症状、すなわち増体率の悪化、発熱は改善されていた。このことから、本試験において市販PRRSワクチンは供試した国内分

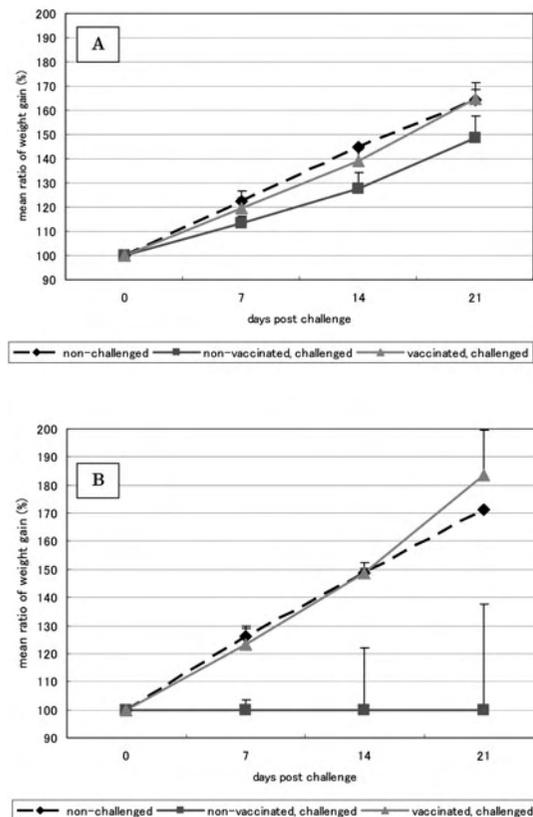


図1. 試験1 (A) および 試験2 (B) における攻撃後の平均増体率の推移。

両試験においてワクチン非接種区 (non-vaccinated, challenged) はワクチン接種区 (vaccinated, challenged) および非攻撃区 (non-challenged) と比較して攻撃後7日目の平均増体率が有意に小さかった

国内で分離された野外株の攻撃に対する豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) ワクチンの効果

表 2. 肺肉眼病変のスコア (平均 ± 標準偏差)

| 試験 | 攻撃ウイルス株 | 試験区 | 攻撃後日数 | | |
|----|---------|----------|--------------|--------------|---------------|
| | | | 10 | 21 | 合計 (10+21) |
| 1 | wt-11 | ワクチン非接種区 | 94.0 ± 1.41 | 84.5 ± 21.92 | 89.25 ± 13.82 |
| | | ワクチン接種区 | 28.0 ± 1.41 | 46.0 ± 18.38 | 37.0 ± 14.88 |
| | | 非攻撃区 | 20.0 ± 9.90 | 3.0 ± 4.24 | 11.50 ± 11.62 |
| 2 | wt-7 | ワクチン非接種区 | 70.5 ± 16.26 | 36.5 ± 3.54 | 53.5 ± 21.86 |
| | | ワクチン接種区 | 63.5 ± 31.82 | 11.0 ± 8.49 | 37.25 ± 35.78 |
| | | 非攻撃区 | 1.00 ± 1.41 | 8.5 ± 9.19 | 4.75 ± 6.9 |

*: 有意差あり (P<0.05)

表 3. 臓器および BALF からのウイルス分離

| 試験 | 攻撃ウイルス株 | 試験区 | 豚 No. | 攻撃後日数 | ウイルス分離材料 ^{a)} | | | | |
|------|---------|----------|-------|-------|------------------------|------|------|------|------|
| | | | | | 肺 | PuLN | 扁桃 | MaLN | BALF |
| 1 | wt-11 | ワクチン非接種区 | 1 | 10 | 4.96 ^{b)} | 2.96 | 4.96 | 3.3 | 5.8 |
| | | | 2 | | 4.8 | 2.63 | 4.8 | 4.96 | 4.63 |
| | | | 3 | 21 | 4.96 | - | 5.8 | 2.63 | 3.96 |
| | | | 4 | | 1.96 | - | 2.3 | - | 2.96 |
| | | ワクチン接種区 | 5 | 10 | 1.96 | - | - | - | 2.3 |
| | | | 6 | | - ^{c)} | - | - | 1.96 | - |
| | | | 7 | 21 | 1.96 | - | - | - | - |
| | | | 8 | | - | - | - | - | - |
| 非攻撃区 | 9-12 | 10, 21 | - | - | - | - | - | | |
| 2 | wt-7 | ワクチン非接種区 | 13 | 10 | 5.96 | 2.96 | 5.8 | 4.3 | 4.96 |
| | | | 14 | | 5.8 | 3.96 | 5.63 | 3.8 | 4.96 |
| | | | 15 | 21 | 3.96 | - | 4.3 | - | 4.96 |
| | | | 16 | | 4.63 | 3.3 | 4.8 | 3.63 | 4.3 |
| | | ワクチン接種区 | 17 | 10 | 3.96 | 3.8 | 5.3 | 3.96 | 2.96 |
| | | | 18 | | 4.96 | 3.3 | 4.96 | 3.96 | 4.96 |
| | | | 19 | 21 | - | - | 2.8 | - | - |
| | | | 20 | | 3.3 | - | 3.8 | 1.96 | 1.96 |
| 非攻撃区 | 21-24 | 10, 21 | - | - | - | - | - | | |

a) PuLN: 肺リンパ節, MaLN: 下顎リンパ節, BALF: 肺胞洗浄液

b) ウイルス力価: logTCID₅₀/g (臓器) または ml (BALF)

c) ウイルス分離陰性

離株の攻撃に対して有効であったと考えられた。両試験のワクチン非接種区を比較すると、wt-7株で攻撃した試験2で症状はより重篤であった。また、ワクチン株と比較した場合 wt-7株がより遺伝学的、抗原的に異なる性状をもっている。この結果から今回の試験では、ワクチン株と性状の異なる野外株に対しても市販 PRRS ワクチンは野外株攻撃による臨床的な PRRS を有効に軽減することが示された。

しかしながら、ウイルス分離の結果では、wt-7株で攻撃した試験2ではワクチン非接種区とワクチン接種区

の間には有意な差は認められなかった。Labarque ら [7] はヨーロッパ型 PRRSV 感染におけるウイルス学的防御の程度はワクチン株と攻撃株の遺伝学的、抗原的性状によって異なると報告している。本試験においても wt-7株は wt-11株と比較して遺伝学的、抗原的にワクチン株と異なっていることから、彼らの示した結果と一致していると言える。これらの結果から、ウイルス学的な防御においては PRRS ワクチンの効果は攻撃株の遺伝学的、抗原的性状に影響を受ける可能性が示唆された。このことは PRRSV の排泄や伝播に直接

表 4. 血清からのウイルス分離

| 試験 | 攻撃ウイルス株 | 試験区 | 豚 No. | 攻撃後日数 | | | | | | | | |
|---------|---------|----------|-------|-----------------|--------------------|------|-----------------|------------------|------|------|----|----|
| | | | | 0 | 3 | 7 | 10 | 14 | 17 | 21 | | |
| 1 | wt-11 | ワクチン非接種区 | 1 | - ^{a)} | 2.63 ^{b)} | 2.8 | + ^{c)} | NT ^{d)} | NT | NT | | |
| | | | 2 | - | - | 2.96 | 2.96 | NT | NT | NT | | |
| | | | 3 | - | 1.96 | 2.3 | 2.8 | + | + | - | | |
| | | | 4 | - | 2.3 | 3.3 | 3.66 | + | + | - | | |
| | | ワクチン接種区 | 5 | - | - | - | - | NT | NT | NT | | |
| | | | 6 | + | + | - | - | NT | NT | NT | | |
| | | | 7 | - | - | - | - | - | - | - | | |
| | | | 8 | + | + | - | - | - | - | - | | |
| | | 非攻撃区 | | | 9-12 | - | - | - | - | - | - | |
| | | 2 | wt-7 | ワクチン非接種区 | 13 | - | 1.8 | 3.63 | 1.3 | NT | NT | NT |
| | | | | | 14 | - | 1.96 | 3.8 | 1.8 | NT | NT | NT |
| | | | | | 15 | - | 1.8 | 3.96 | 2.63 | 1.63 | - | - |
| 16 | - | | | | 2.3 | 2.8 | - | 1.63 | - | - | | |
| ワクチン接種区 | 17 | | | - | - | - | + | NT | NT | NT | | |
| | 18 | | | - | 1.8 | 2.63 | + | NT | NT | NT | | |
| | 19 | | | - | + | 2.3 | - | - | - | - | | |
| | 20 | | | - | 1.8 | 1.8 | - | - | - | - | | |
| 非攻撃区 | | | 21-24 | - | - | - | - | - | - | | | |

a) ウイルス分離陰性。

b) ウイルス力価 (log TCID₅₀/ml)。

c) 血清原液でウイルス分離陽性。

d) 検査せず。

国内で分離された野外株の攻撃に対する豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) ワクチンの効果

関係することであることから重要である。ワクチンの効果を評価するにあたっては臨床的な症状の軽減のみならずウイルス学的な防御の程度も考慮することが重要であると思われた。

BALFのマクロファージ減少が両試験の攻撃区で認められたが、ワクチン接種区における結果は試験1と試験2で差が認められた。豚の肺胞マクロファージは肺における呼吸器病原体感染に対する防御に重要な役割を持っている。ウイルス感染に伴う肺胞マクロファージおよびその機能の損傷は肺における二次感染を誘発させる。PRRSV感染

によって肺胞マクロファージが減少することは知られており [9], Harms ら [10] は豚呼吸器複合感染症 (PRDC) において PRRSV が最も重要な病原体であると報告している。このことから、肺における二次感染に対する PRRS ワクチンの効果や役割について更なる調査が望まれる。

今回の試験結果から、市販 PRRS ワクチンは実験感染において臨床的な PRRS の軽減に効果があったが、ウイルス学的防御においては攻撃株の性状によって差が認められた。野外においては多くの場合呼吸器疾病は PRRSV 単独ではなく、他の

表 5. 扁桃スワブからのウイルス分離

| 試験 | 攻撃ウイルス株 | 試験区 | 豚 No. | 攻撃後日数 | | | | | | | | |
|---------|---------|----------|-------|-----------------|------|-----------------|------|------------------|------|------|------|----|
| | | | | 0 | 3 | 7 | 10 | 14 | 17 | 21 | | |
| 1 | wt-11 | ワクチン非接種区 | 1 | - ^{a)} | - | 2 ^{b)} | 3.33 | 2 | 1.66 | 1.66 | | |
| | | | 2 | - | - | 1 | - | 1.66 | 1.5 | 1 | | |
| | | | 3 | - | - | 1.33 | 2.33 | NT ^{c)} | NT | NT | | |
| | | | 4 | - | - | - | - | NT | NT | NT | | |
| | | ワクチン接種区 | 5 | - | - | 1 | - | NT | NT | NT | | |
| | | | 6 | - | - | - | - | - | - | - | | |
| | | | 7 | - | - | 2.33 | 1.33 | NT | NT | NT | | |
| | | | 8 | - | - | - | - | - | - | - | | |
| | | 非攻撃区 | | 9-12 | - | - | - | - | - | - | - | |
| | | 2 | wt-7 | ワクチン非接種区 | 13 | - | 1.5 | 1.66 | 0.66 | 0.66 | 0.66 | - |
| | | | | | 14 | - | 2.33 | 1.5 | 1 | NT | NT | NT |
| | | | | | 15 | - | 1.5 | 1 | 0.66 | 1.5 | 0.66 | - |
| 16 | - | | | | 1.5 | 0.66 | 1 | NT | NT | NT | | |
| ワクチン接種区 | 17 | | | - | - | 1.5 | - | NT | NT | NT | | |
| | 18 | | | - | - | 1 | - | - | - | - | | |
| | 19 | | | - | 1.66 | 2 | 1.33 | NT | NT | NT | | |
| | 20 | | | - | 1 | 1 | 0.66 | 1.5 | 0.66 | - | | |
| 非攻撃区 | | 21-24 | - | - | - | - | - | - | - | | | |

a) ウイルス分離陰性。

b) ウイルス力価 (log TCID₅₀/ml)。

c) 検査せず。

表 6. BALF のマクロファージ百分率 (平均 ± 標準偏差)

| 試験 | 攻撃 ウイルス株 | 試験区 | 攻撃後日数 | | |
|----|-------------|----------|---------------|--|---|
| | | | 10 | 21 | 合計 (10+21) |
| 1 | wt-11 | ワクチン非接種区 | 30.5 ± 18.38 | 31.25 ± 6.01 } * 80.25 ± 1.06 } * 94.0 ± 1.41 } * | 30.88 ± 11.18 } * 71.88 ± 15.94 } * 91.5 ± 3.87 } * |
| | | ワクチン接種区 | 63.5 ± 21.92 | | |
| | | 非攻撃区 | 89.0 ± 4.24 | | |
| 2 | wt-7 | ワクチン非接種区 | 41.25 ± 6.72 | 36.25 ± 2.47 } * 58.25 ± 6.72 } * 74.75 ± 3.18 } * | 38.75 ± 5.04 } * 55.0 ± 5.40 } * 75.25 ± 7.01 } * |
| | | ワクチン接種区 | 51.75 ± 0.35 | | |
| | | 非攻撃区 | 75.75 ± 11.67 | | |

* : 有意差あり (P<0.05)。

ウイルスや細菌も関与している。そのため、PRRS ワクチンの効果を臨床症状のみから判断することは困難であるかもしれない。また、PRRS ワクチンの効果と野外株の遺伝学的、抗原的性状の関連については未だ明確でないことから、ワクチン接種前にその効果を推測することは困難であると思われる。このことから、野外において PRRS ワクチンの効果を確認するために、ウイルス分離や定量的 PCR などを用いてワクチン接種によるウイルス量やウイルス血症期間の変化などを評価することが有効であるかもしれない。

引用文献

- [1] Shimizu, M., Yamada, S., Murakami, Y., Morozumi, T., Kobayashi, M., Mitani, K., Ito, N., Kubo, M., Kimura, K., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Miura, Y., Yamamoto, T. and Watanabe, K. 1994. Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-Heko disease of pigs. *J. Vet. Med. Sci.* 58: 805-807.
- [2] Yoshii, M., Kaku, M., Murakami, Y., Shimizu, M., Kato, K. and Ikeda, H. 2004. Polymerase chain reaction-based genetic typing of Japanese porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16: 342-347.
- [3] Yoshii, M., Kaku, Y., Murakami, Y., Shimizu, M., Kato, K. and Ikeda, H. 2005. Genetic variation and geographic distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Japan. *Arch. Virol.* 11: 2313-24.
- [4] Yoon, K. J., Wu, L. L., Zimmerman, J. J., and Platt, K. B. 1997. Field isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vary in their susceptibility to antibody dependent enhancement (ADE) of infection. *Vet Microbiol.* 55: 277-287.
- [5] Opriessnig, T., Pallares, F. J., Nilubol, D., Vincent, A. L., Thacker, E. L., Vaughn, E. M., Roof, M. and Halbur, P. G. 2005. 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 Prod.* 13:

国内で分離された野外株の攻撃に対する豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) ワクチンの効果

- 246-253.
- [6] Mengeling, W. L., Lager, K. M., Vorwald, A. C. and Koehler, K. J. 2003. Strain specificity of the immune response of pigs following vaccination with various strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vet Microbiol.* 93: 13-24.
- [7] Labarque, G., Reeth, K. V., Nauwynck, H., Drexler, C., Gucht, S. V. and Pensaert, M. 2004. Impact of genetic diversity of European-type porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains on vaccine efficacy. *Vaccine* 22: 4183-4190.
- [8] Halbur, P. G., Paul, P. S., Frey, M. L., Landgraf, J., Eernisse, K., Meng, X, J., Lum, M. A., Andrews, J. J. and Rathje, J. A. 1995. Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.* 32: 648-660.
- [9] Shibata, I., Mori, M., Uruno, K., Samegai, Y. and Okada, M. 1997. In vivo replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine alveolar macrophages and change in the cell population in bronchoalveolar lavage fluid after infection. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 539-543.
- [10] Harms, P. A., Halbur, P. G., Sorden, S. D. and Sarden, S. D. 2002. Three cases of porcine respiratory disease complex associated with porcine circovirus type 2 infection. *J. Swine Health Prod.* 10: 27-30.