

ブタのサーコウイルス 2 型カプシド・タンパク質の独特の構造的形状に対する認識が感染転帰を決定する

中 根 崇 (千葉県南部家畜保健衛生所；〒 296-0033 鴨川市八色 52)

Nakane, T. (2014). Recognition of the different structural forms of the capsid protein determines the outcome following infection with Porcine Circovirus Type 2

All about SWINE 44, 16-28

はじめに

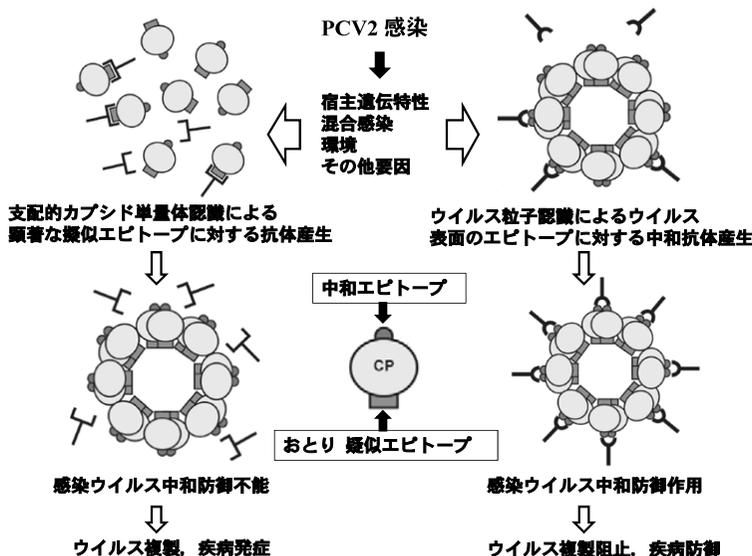
ブタのサーコウイルス 2 型 (PCV2; porcine circovirus type 2) は、1991 年カナダで確認された離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS; porcine multi-systemic wasting syndrome) のブタから分離以来 1990 年代後半より他の多くの国で PCV2 感染が認められ、我が国でも 1996 年に千葉県で最初に確認された。PCV2 は、他ウイルスや細菌の重感染、ワクチン接種による免疫刺激、ストレス負荷等の補因子によるサーコウイルス関連疾病 (PCVAD; porcine circovirus associated disease) と総称される多種多様な症候群の発生に関与し、PCVAD 発生による子豚の死亡率の大幅な増加等が認められた。そのため、PCV2 感染に起因する死亡率の軽減等を目的としたワクチンが販売された。ワクチンは、PCVAD の被害を減少させ非常に高い防御効果を認めたが、PCVAD の病因メカニズムおよびワクチン作用機序については不明な点が多く残されてきた。

近年、米国カンサスシティ州立大学の B.R. Tribble, R.R.R. Rowland らのバキュロウイルス・ベースワクチンの作用機序の研究から、その謎が

徐々に解明されている。そこで、B.R. Tribble らの論文に記載されている図表を用いて、謎の原因とされる PCV2 の独特の構造的形状を有する「おとり・擬似」エピトープ解明に至るまで研究から、興味深い知見を要約して紹介する。

1. 序論

Tribble らの論文では、PCV2 の宿主への感染戦略を次の様に記載している⁵⁾。病原体は、宿主免疫を避けるために、多様な戦略を用いる。1 つの戦略は、表面をおおい被覆するのではなく、免疫優性を保つために「おとり・擬似」エピトープ (抗原決定基; 抗体が病原微生物と結合する際、その全体でなく比較的小さな一部分のみを抗原として認識し、抗体との結合部分) を配備するものである。PCV2 は、PCVAD と総称される多種多様な症候群の発生に関与し、その病態の一つとして、大量に中和抗体と異なる抗体が産生されることによる宿主免疫の調節不全を特徴とする。PCV2 の戦略は、限定された小さなゲノム数の遺伝子をカプシド・タンパク質 (CP; capsid protein ウイルスゲノムを取り囲むタンパク質の殻) に配置する



Review Article B.R. Tribble, R.R.R. Rowland 2012を一部改変

Fig. 1. Structural form of PCV2 immunogen recognized by the host and relationship to outcome.

ことにより、自然および獲得免疫反応を誤らせるものである（図1. 感染宿主が認識するPCV2免疫抗原の形状違いによる疾病発症転帰⁵⁾）。

2. PCV2 検索と遺伝子型の分類

これまでのPCV2検索の歴史は、比較的短期間であるが多くの研究者が携わり、多数の論文がある⁵⁾。ブタのサーコウイルス(PCV)は、1970年代初期にブタ腎臓細胞株PK-15細胞培養の汚染物として報告された(Tischerら1974年)。その形態は、電子顕微鏡による観察からピコルナウイルス様のウイルス粒子を呈し、一本鎖環状DNAゲノムの存在することからPCVと分類された。PCVは、血清学的にブタがウイルスの自然宿主であると確認されが、実験的に感染させたブタが臨床疾患に居たらなかったことから、ブタに病原性がないと考えられた(Tischerら1982年, Tischerら1986

年)。その後1990年代初期に新たなPCVを原因とするPMWSの発生がカナダ西部で多数報告(Clark1997年, Harding1997年)されて以来、北アメリカとヨーロッパで分離されたウイルス株は、DNA解析からPK-15迷入ウイルスPCVとヌクレオチド配列で約70%が相同性を共有していた(Meehanら1998年)。そのため、PK-15迷入ウイルスをPCV1とし、PMWSに関与するウイルスをPCV2とする用語的な区別が用いられた。更にPCV2分離株は、PCV2a(GenBank accession #AF055392)とPCV2b(GenBank accession #AF055394; Meehanら1998年)の2つの主遺伝子型に分類され、加えて第3の遺伝子型としてPCV2c(GenBank accession #EU148503)が1980年代にデンマークで採取された保存されていたブタ組織で確認された。なお、PCV2aとPCV2bは、それぞれ北アメリカとヨーロッパでの疾病発生との関連

があったとされている。しかしながら、PCV2bは、カナダでのPCVADの発生 (Segales ら 2008年)、2005年の最初の米国での発生に参与していた (Horlen ら 2007年)。それ以来、両方の遺伝子型が世界的に循環し、ブタにPCV2aとPCV2bに配列で区別される遺伝子型が感染している。なお、遺伝子型と病原性について、異なるPCV2aと2b分離株による実験的な感染試験により、病原性の違いは個々の分離株の特性であり、遺伝子型とは無関係とされた (Opriessnig ら 2008年)。GenBankに登録されるPCV2 139株の3つの遺伝子型から全部のゲノムヌクレオチド配列を組んだ系統樹を図に示す³⁾ (図2. GenBank登録PCV2 139株の全ゲノムヌクレオチド配列による

系統樹³⁾)。

3. PCVのゲノム構成

PCV2のゲノムは、共有結合した独立した円の形で両側向き一本鎖DNAゲノムを持ち、PCV1ゲノムの長さ (ヌクレオチド数) は、1,759であり、PCV2a、PCV2bとPCV2cは、それぞれ1,768、1,767と1,767である。PCV2のゲノムは、PCV1と68~76%ヌクレオチド配列の相同性を共有し、PCV2a、PCV2bとPCV2cの配列は、約95%を共有する (Fenaux ら 2004年)。ゲノムは、3つの開存性の読み枠 (ORF; open reading frames) を有する。最大のORF1は、ローリングサークル型DNAを複製するレプリカーゼ蛋白質 ReptとRep'をコードする (Mankertz 及び Hillenbrand 2001年)。ORF2は、反対方向に向いて、233または234個のアミノ酸で構成され、CPを形成する役割を果たす。第3の遺伝因子ORF3は、非構造的タンパク質でアポトーシスと関連したタンパク質をコードし、ORF1に組み込まれる (Liu ら 2005年)。なお、PCV2病因に対するORF3の働

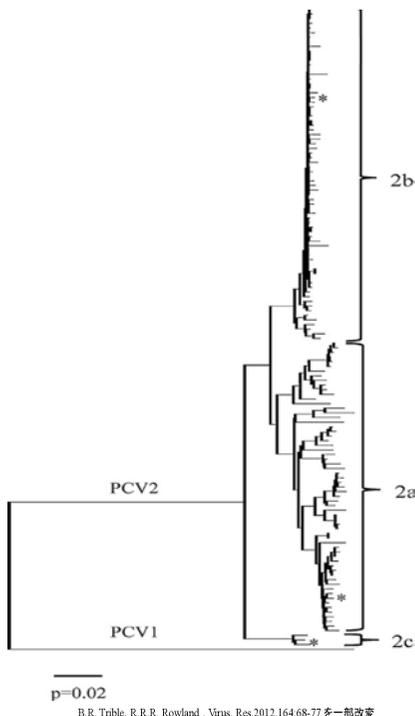


Fig. 2. Phylogenetic tree of 139 genomic PCV2 nucleotide sequences from GenBank.

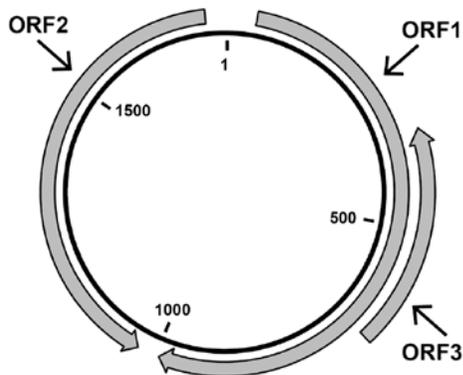


Fig. 3. The PCV2 genome

きは、未だ結論が出ていない (Chaiyakul ら 2010 年) (図 3. PCV2 ゲノムの構成⁵⁾)。

4. PCV2 ウイルス様粒子の構造模型

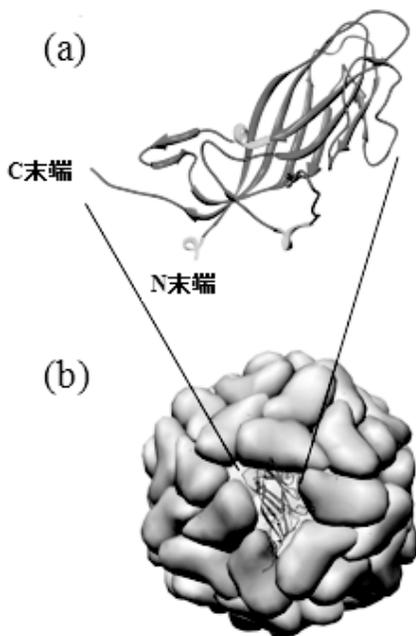
PCV は、60 個の CP モノマー (単量体) が集合し、正二十面体の PCV2 ウイルス様粒子 (VLPs ; virus-like particle) を形成する (Khaya ら 2011 年)。CP は、ウイルスを細胞のレセプターへ附着させウイルス粒子挿入する際に重要な働きをする。CP の N 末端の塩基性アミノ酸は、核にウイルスのゲノムを注入しウイルスを複製させる際に必要とされる (Liu ら 2001 年, Misinzo ら 2006 年, Shuai ら 2008 年)。PCV2 ウイルス粒子の構造模型は、(a) CP サブユニット単量体リボン構造モデル ; 螺旋、ループ線とシート状にアミノ酸

が配列し、CP サブユニット単量体を形成し、(b) CP 集合模型 ; 60 個の CP サブユニット単量体の集合によりウイルス粒子 VLPs を形成する。両構造模型は、2011 年に Khayat らのデータに基づいて、UCSF Chimera コンピュータプログラム (PDB ID 3R0R; Pettersen ら 2004 年) を用いて作成された (図 4. PCV2 CP サブユニットの構造モデルとウイルス・カプシド集合体³⁾)。

5. PCVAD の特徴

PCVAD は、呼吸窮迫、下痢、生殖障害、削瘦と皮膚炎を呈し、一群の複雑な多因子症候群として、PMWS、ブタの皮膚炎と腎症症候群 (PDNS ; porcine dermatitis and nephropathy syndrome)、貧弱生長成績と急性肺水腫 (APE ; acute pulmonary edema) を含む一連の症候群形成で、死亡率が 50% に達する場合がある (Segales

2012 年)。すべての症候群に共通する要素は、大量の PCV2 ウイルスまたは抗 PCV2 抗体の産生である (Meehan ら 1998 年, Rossell ら 2000 年, Wellenberg ら 2004 年)。明白な臨床徴候を示さなくても PCV2 の単独感染により、血液中にウイルスが検出される。PCVAD は、ウイルスか細菌性の病原体 ; 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV)、ブタインフルエンザウイルス (SIV)、ブタのパルボウイルス (PPV)、ヘモフィルス・パラスイス (Hps)、ストレプトコッカス・スイス、マイコプラズマハイオニューモニア (M.hyo)、豚胸膜肺炎菌 (APP)、その他との同時感染により発症する。しかし、同時感染がどのように PCVAD に関与するかについて、これまでの実験的な発症メカニズムの研究では、PRRSV の同時感染が必要か不明である。PCV2 と PRRSV に感



B.R. Tribble, R.R. Rowland. Virus Res 2012 164:68-77 を一部改変

Fig. 4. PCV2 CP subunit model structure and assembly into a viral capsid.

染しているブタのリンパ節でPCV2抗原が増加しても血液中にPCV2ウイルスが検出されず、また、PCV2感染がPRRSVの増殖に結びつかない(Allanら2000年、Roviraら2002年、Sinhaら2011年、Tribleら2012年)。一方、共同で影響を与えている病原体の機能として、宿主の総合的な免疫反応を変調させ有効な抗PCV2免疫応答の誘発を阻止し、更に病原体に反応して、リンパ球増殖が起きる可能性がある(Darwichら2004年)。

6. PCV2 ワクチン

PCV2 ワクチンの接種は、PCVADの防除と予防のために最も有効な戦略である。日本では現在、PCV2aのORF2を抗原の発現に基づく4種類の市販ワクチンが利用できる(表1)。インゲルバックサーコフレックス(ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン株式会社)、ポーシリスPCV(株式会社インターベツト)は、バキュロウイルスによって発現されるCPから作られ、フォステラPCV(ゾエティス・ジャパン株式会社)は、PCV1をバックボーンとしてPCV2のORF2を発現するよう調製されたウイルスから作られたVLPベースのサブユニットワクチンである。サーコバック(メリアル・ジャパン株式会社 日本全薬工業)は、抗原として不活化されたPCV2a全体から作られた従来型ワクチンである。製法は、ワクチン製造用株を株化細胞で増殖培養し、その培養上清に不活化剤を添加して不活化したものにアジュバントを添加(使用時に混合するタイプの場合は懸濁用液に添加)し、製造される。製造業者において、小分製品の無菌試験、不活化試験、毒性限度確認試験、異常毒性否定試験、安

全試験、力価試験を実施し、規格に適合することを検査している。接種量は、1mlのものと2mlのものがある。接種回数は、母豚候補豚では3回、産歴のある豚では2回、その後は分娩前に1回、肥育豚では1回である。接種対象月齢は、肥育豚では3～5週齢又は3～9週齢、繁殖用雌豚では初回免疫は母豚候補豚では交配前3～4週間隔で2回(2回目は交配予定2～4週間前)、更に分娩2～4週前に1回の計3回、産歴のある豚では3～4週間隔で2回(2回目は分娩予定2～4週間前)接種し、次回以降の免疫は分娩予定2～4週間前に1回接種である。接種経路は、筋肉内接種となっている。ワクチンの主たる機序は、PCV2中和抗体の産生である。なお、PCV2aベースのワクチンは、PCV2b感染に対してもPCVADの発生を防御することが、多くの野外試験で確認されている^{3), 7)}。

Elisaらは、VLPベースワクチンに関する論文で、その機能を記している⁶⁾。動物のウイルス性疾患に対する伝統的なワクチンは、不活性化または弱毒化ウイルスに基づいているが、新しいサブユニットワクチン(ワクチンの有効成分として特定の抗原のみを含むワクチン)は、動物ワクチン学の研究者から注目を集めている。これらの中でも、VLPは、動物のワクチンにおいて興味深く魅力的な最も進んでいる開発分野の一つである。VLPは、天然ウイルス粒子の全体的な構造を模倣するが、ウイルスゲノムを欠いて明確に定義された幾何学的形状及び均一性を示す強固なタンパク質を骨格としている。それらは、しばしば由来したウイルスと抗原的に区別できないことと安全性の点が重要な利点となっている。更にVLPは、強い液性および細胞性免疫応答を刺激することが

表 1. 豚サーコウイルス感染症ワクチンの概要

分類	一般的名称	商品名	国内承認時期	製造販売業者名	製造用株	用法・用量	出荷制限期間
VLP ベースサブユニットワクチン	豚サーコウイルス (2 型) 感染症 (1 型・2 型キメラ) (デキストリン誘導体アジュバント加) 不活化ワクチン	フォステラ PCV フォステラ PCV “化血研”	平成 25 年 3 月 25 日	ゾエティス・ジャパン株式会社	不活化 PK-15 細胞培養 1 型・2 型キメラ豚サーコウイルス cPCV1-2 株	3 ~ 5 週齢の子豚に 2 mL を 1 回、頸部筋肉内に注射する。	屠殺 12 週前
VLP ベースサブユニットワクチン	豚サーコウイルス (2 型・組換え型) 感染症 (酢酸トコロフェロール・油性アジュバント加) 不活化ワクチン Capsid タンパク質 (バキュロウイルス発現)	ポーシリス PCV	平成 20 年 7 月 17 日	株式会社インターベット	Spodoptera frugiperda 細胞培養豚サーコウイルス 2 型オープンリーディングフレーム 2 遺伝子組換えバキュロウイルス BacPCV2-Orf2:98-99 株不活化液	2ml を頸部筋肉内に接種。3 ~ 9 週齢に 1 回接種する。感染時期が早期の場合又は移行抗体の保有レベルにばらつきがある場合は 3 日齢以上の豚に 3 週間間隔で 2 回接種する。	屠殺 5 週前
従来型野外分離株不活化ワクチン	豚サーコウイルス (2 型) 感染症不活化ワクチン (油性アジュバント加懸濁液)	サーコバック	平成 20 年 4 月 24 日	メリアル・ジャパン株式会社日本全薬工業	PK15 細胞培養不活化豚サーコウイルス 2 型 1010-25 株	2ml を頸部筋肉内に接種する。初回免疫は母豚候補豚では交配前 3 ~ 4 週間隔で 2 回 (2 回目は交配予定 2 ~ 4 週間前)、さらに分娩 2 ~ 4 週前に 1 回の計 3 回、産歴のある豚では 3 ~ 4 週間隔で 2 回 (2 回目は分娩予定 2 ~ 4 週間前) 接種する。次回以降の免疫は分娩予定 2 ~ 4 週間前に 1 回接種する。	子豚：屠殺 4 週前 母豚：屠殺 25 週前
VLP ベースサブユニットワクチン	豚サーコウイルス (2 型・組換え型) 感染症 (カルボキシニルポリマーアジュバント加) 不活化ワクチン Capsid タンパク質 (バキュロウイルス発現)	インゲルバック サーコフレックス	平成 20 年 1 月 18 日	ベーリンガーインゲルハイムベトメディカルジャパン株式会社	Spodoptera frugiperda 細胞培養豚サーコウイルス 2 型オープンリーディングフレーム 2 遺伝子組換えバキュロウイルス N120-058W 株不活化液	3 週齢 ~ 5 週齢の子豚に 1 頭当たり 1mL を 1 回頸部筋肉内に注射する。	特になし

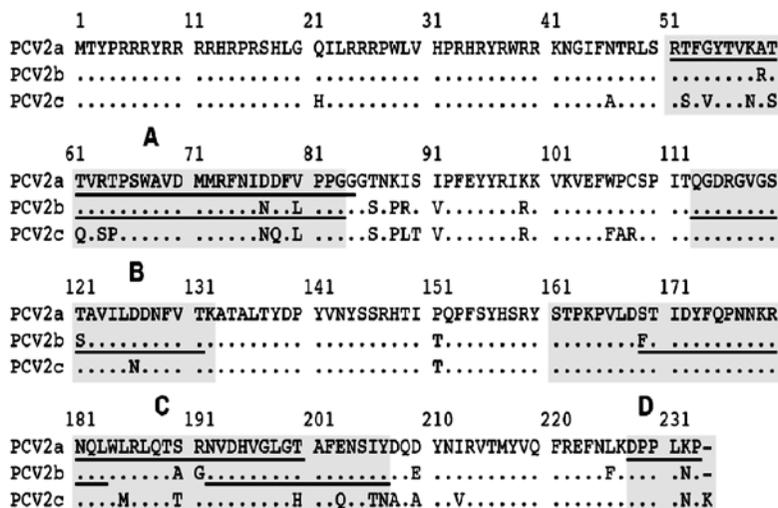
(注) 動物用医薬品データベース詳細表示より、編集した。

でき、自らアジュバント機能を呈するものもある。

7. CP エピトープ遺伝地図作成研究

CP の中で抗体エピトープを確認する研究は、最初は Mahe らが 2000 年、Lekcharoensuk らが 2004 年に実施している。Mahe らは、感染により免疫ができたブタの血清の反応によって線形エピトープを確認した。また、CP の全てをカバーし重なり合う 12 の構造単位オリゴペプチドをウサギに過剰免疫した。抗体反応の部は、PCV2b の CP でアミノ酸 23-43, 71-85, 117-131 と 171-202 の間に確認された。Lekcharoensuk らは、異なるアプローチを使用した。PCV1 感染細胞に PCV2a

のクローンをトランスフェクションさせて、ORF2 配列の異なる組み合わせから成る感染 PCV キメラ DNA を作成し、7 つの抗 CP 単クローン抗体 (モノクローナル抗体) に反応を起こさせることにより構造的なエピトープを確認した。結果は、残基 47-85, 165-200 と 200-233 の間に免疫反応陽性部が提示された。両方の研究の結果から、4 つの免疫反応陽性部の組み合わせが確認された。そして、Trible らは、2011 年にエピトープ A-D に区分した。図に示す典型的な PCV2 遺伝子型から PCV2 CP ペプチド配列の配置の強調された部は、PCV2a と PCV2b の免疫反応部である。これらの研究から抗体免疫反応性エピトープを確



Review Article B.R. Tribble, R.R.R. Rowland . Virus2012. Res.164:68-77

Fig. 5. Alignment of PCV2 CP peptide sequences from representative PCV2 genotypes.

認するために4箇所の配列部位（灰色；エピトープA-D）が調べられた（図5. 典型的なPCV2遺伝子型のCPペプチド配列の配置¹⁾）。

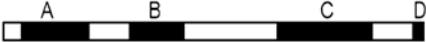
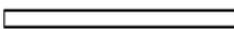
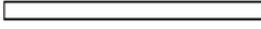
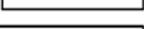
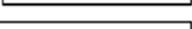
8. PCV2 感染, PCV2 ワクチン接種, PMWS および PCVAD 感染後の免疫優性 CP エピトープ

Tribble らは、2011年にCPの中で免疫優性エピトープの特徴を調べた。実験的なPCV2感染；PCa, PCV2 ワクチン接種；VX, PMWS；PM およびPCVAD；PDを発症したブタの血清は、大腸菌で発現させたCPポリペプチド（50以上のアミノ酸がペプチド結合によって繋がった化合物）に反応した。ワクチン接種を受けたブタからの血清は、最大のポリペプチドであるCP（43-233）領域のみを認識した。対照的に実験的にPCV2を感染したブタまたはPCVADは、C末端部に位置するより小さいフラグメントに対する反応性と同様にCP（43-233）領域に反応性を認めた。なお、

すべてが反応したポリペプチドは、エピトープC部を含んでいた（表2. PCV2 カプシド・ポリペプチドに対する抗体産生応答の概要¹⁾）。

更に実験的にPCVADに感染したブタ血清との反応からC部の中の免疫優性エピトープは、エピトープC部をカバーし重複する15個のオリゴペプチドが判明した。表エピトープC部のアラニンスキャニング変異解析（PEPSCAN解析）の概要に示す灰色の長方形は、反応性のオリゴペプチドである。これらの解析により抗体再認の鍵となるアミノ酸残基（下線）が確認された。CP（169-180）領域は、最も小さい免疫反応性オリゴペプチドであり、アミノ酸残基はY：173-チロシン（Tyr）、F：174-フェニルアラニン（Phe）、Q：175-グルタミン（Gln）とK：179-リジン（Lys）と特定された。GenBankに登録された462株のPCV2のペプチド配列分析から、この部位が全ての株間で高度に保存されていることが示された

Table 2. Summary of antibody responses to PCV2 capsid polypeptides.

Name	Epitope Regions	PC ^a	Vx	PM	PD
42-233		++++ ^b	++++	++	+++
43-135		+	-	-	++
43-160		+	-	-	+
91-160		+	-	+	+++
43-180		++	+	+	+++
160-233		+++	-	+	+++
135-233		++	-	+	+++
91-233		++	-	+	+++

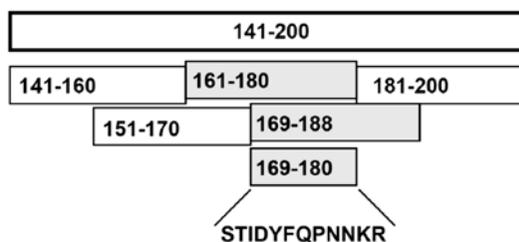
^aKey: PC = PCV2-infected; Vx = vaccinated; PM = PMWS; PD = PDNS.

^bRelative binding activity. Key: (-) no measurable binding activity; (+) low binding activity; (++) intermediate binding activity; (+++) high binding activity; (++++) very high binding activity

Clin Vaccine Immunol.18: 749-757 を一部変更

(図 6. エピトープ C 部の PEPSCAN 分析の概要⁵⁾).

CP 結晶構造の X 線解析⁴⁾ から CP (169-180) 領域構造体 (パネル A) は、外側のループ線を形成し、CP サブユニット単量体の外面へ迫り出ることを示した。また、鍵となる抗体結合エピトープの残基である 173-Tyr, 174-Phe と 175-Gln が、接続ループ領域の真中に位置し平面に並んで配列している (パネル B)。これは、免疫優位ばかりでなく抗体が CP (169-180) 領域へのアクセスしやすい構造的な条件を提供する。しかし、VLPs 状態 (パネル C) の CP (169-180) 領域は、VLPs 表面に露出せず、ほとんどの鍵となる残基が埋設し、VLPs の表面では 3 つの CP サブユニット単量体の接合によって形成される間隙の裾に位置し 173-Tyr 残基だけが見える。このため、VLPs の状態では CP (169-180) 領域に抗体はアクセスできないことが想定された (図 7. CP サブユニット単量体上の CP (169-180) エピトープの位置と VLP⁴⁾).

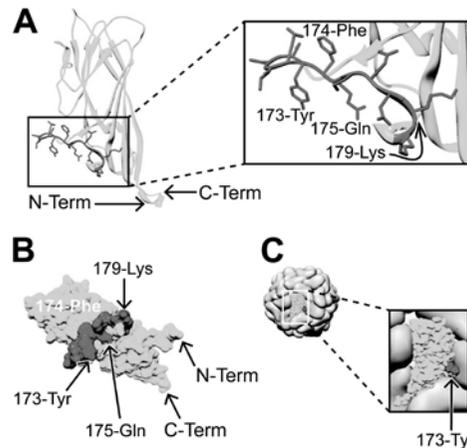


Review Article B.R. Tribble, R.R.R. Rowland 2012 を一部改変

Fig. 6. Summary of PEPSCAN analysis of the epitope C region.

9. ブタへのワクチン接種および疑似エピトープ抗原接種後の PCV2, PRRSV 攻撃試験

Tribble らは、2012 年に疑似エピトープ CP (169-180) 配列の特性を確認するため、ブタに免疫抗原として VLPs および CP サブユニット単量体を免疫接種後に PCV2, RRSV を攻撃接種し、免疫応答と防御能を検討した。VLPs は、自発的 VLPs の形状に集合するバキュロウイルス発現された CP (Bac-CP) ワクチン (Khayat ら 2011 年) を用い、CP サブユニット単量体は、VLPs の構築を阻止し安定した単量体形状が維持されるユビ



Tribble B R et al. J. Virol. 2012;86:13508-13514

Fig. 7. Location of the CP (169-180) epitope within a single CP subunit and VLP

キチン (Ub) 融合タンパク質 (Ub-CP) を用いた。試験豚は、選抜された PCV2 間接蛍光抗体 (IFA) 価 320 倍以下の母豚から生まれた PCV2 ウイルスおよび抗体陰性もしくは低抗体価の子豚 26 頭を用い、生後 3 週間目に各 8 頭ずつ 3 試験区および対照区に配分した。なお、母豚からの移行抗体を有していた 7 頭は、均等に試験区へ割り当てられた。試験区 Bac-CP は、市販ワクチン (Intervet-Schering Plough, hayat ら 2011 年)、試験区 Ub-CP は、(Ub) 融合タンパク質を用い生後 4 と 7 週間目に 2ml 筋注により免疫接種された。なお、Ub-CP 免疫抗原は、Ub-CP (43-233) が 2ml の MEM 液体培地中に $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度に調整され、アジュバント Emulsigen-D (20%, vol/vol; MVP Technologies), ゲンタマイシン $30 \mu\text{g}/\text{ml}$, チメロサル (0.01%) が添加された。試験区 Non-IM, Bac-CP および Ub-CP は、ウイルス攻撃用 PCV2b および PRRSV をそれぞれ 10^5 の組織培養感染量 (TCID₅₀) に調製し鼻腔内に片鼻 1.5ml ずつ計 3ml 投与された。ブタは、攻撃ウイルス

後、毎日臨床観察され、毎週血液採取された。試験終了後に肺、腎臓とリンパ組織は、病理組織学検査および PCV2 免疫組織染色された (表 3. 試験区, 図 8. 試験スケジュール⁴⁾)。

10. 試験結果

①臨床病理組織所見

ウイルス攻撃後 7 日に全試験区のブタは、軽度の呼吸窮迫の徴候を示し急性の PRRS 症状を呈し、非攻撃対照区のブタ 2 頭は正常であった。PRRSV のエライザ抗体検査成績は、ウイルス攻撃されたブタ全頭から抗体が確認された。病理組織学検査所見は、肺にリンパ球、マクロファージと好中球の浸潤した間質性肺炎病変を示し、肺組織切片の PCV2 免疫組織染色で細気管支上皮に PCV2 抗原を検出した。しかし、試験区別の肺での抗原検出頭数が異なり、陽性数が最も多かった Ub-CP 区で 8 頭中 6 頭、ワクチン接種を受けていない Non-IM 区で 8 頭中 4 頭、Bac-CP 区で 8 頭中 2 頭であった (データは、示さない)³⁾。

Table 3. Treatment groups

Group 区	n 頭数	Immunogen 免疫抗原	PCV2/PRRSV 攻撃ウイルス
Non-IM	8	None	Yes
Bac-CP	8	Bac-CP vaccine	Yes
Ub-CP	8	Ub-CP	Yes
Control	2	None	No

Trible B R et al. J. Virol. 2012;86:13508-13514 を一部改変

Non-IM ; 非免疫抗原接種, 非筋肉接種

Bac-CP; パキキュロウイルス発現組換え型不活化ワクチン (Intervet-Schering Plough)

Ub-CP; ユビキチン (Ub) 融合カプシドタンパク質

Control; 比較対照

②全 PCV2 オリゴペプチド抗体

PCV2 に対する IFA 抗体応答は, 母豚由来の低レベルの抗体がいくつかのブタで検出された。Ub-CP 区で抗体価の検出可能な増加は第 2 回目の抗原免疫 14 日後に観察され, その後のウイルス攻撃時にピークに達し, 攻撃の 28 日後に第 2 のピークが続いた。Bac-CP 区の PCV2 ワクチンで免疫されたブタは, 統計学的に類似した抗体産生応答を示した。Non-IM 区の抗体は, ウイルス攻撃後 21 日に検出され 28 日でピークに達した。3 つ試験区の攻撃後の 21 ~ 42 日間の IFA 抗体価は, 類似し統計学的に有意差は無かった。なお, Control 区の子ウイルス攻撃 2 頭の PCV2 抗体価は, 全体を通じて検出可能なレベル以下であった (図 9A. 全 PCV2 オリゴペプチド抗体産生応答⁴⁾)³⁾。

③ CP (169-180) 抗体

免疫抗原 CP (169-180) に対するエライザ抗体活性は, ウイルス攻撃時に Ub-CP 区で検出され, 試験期間全体を通じて上昇したままであった。対照的に Bac-CP 区では, 非ウイルス攻撃の 2 頭の Control 区のブタと類似しバックグラウンド強



Trible B R et al. J. Virol. 2012;86:13508-13514 を一部改変

Fig 8. Study timeline. wks, weeks.

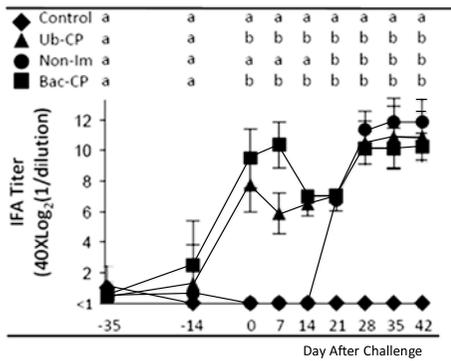
度に近いレベルであった。ウイルス攻撃の後に Non-IM 区は, ウイルス攻撃後に活性を示し 21 日後に Ub-CP 区と同様な活性レベルでピークに達した (図 9B. PCV2 CP (169-180) オリゴペプチド抗体産生応答⁴⁾)³⁾。

④ PCV2 中和抗体

図にウイルス攻撃時, 7 日後および試験終了時 42 日間の抗 PCV2 中和抗体価活性を示す。なお, 35 日前の少量の中和抗体活性は, 血清中に少量の移行抗体が存在した可能性があった。Bac-CP 区は, Non-IM 区および Ub-CP 区に比べ有意に高い抗体価を示し, 試験終了時まで上昇したままであった。なお, Non-IM 区および Ub-CP 区の抗体活性の低下は, 移行抗体の緩徐な減衰を示した (図 10. PCV2 中和活性⁴⁾)³⁾。

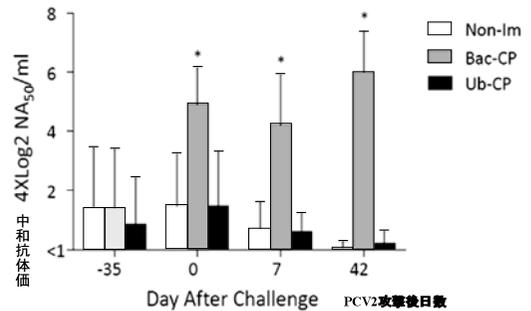
⑤ PCV2 感染ウイルス量

血清中の PCV2 ウイルス量は, 試験開始時 PCR の検査で PRRSV および PCV2 とも全区陰性であった。Ub-CP 区および Non-Im 区では, ウイルス攻撃 14 日後に最初の PCV2 の DNA 検出があり, その後, 同レベルで推移した。なお, ウイルス攻撃



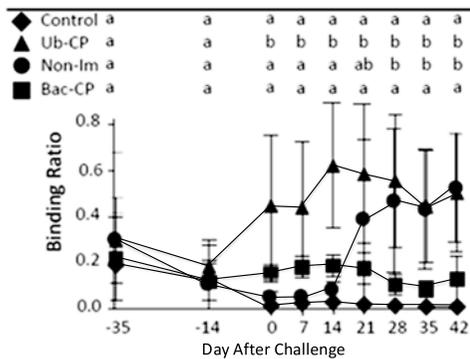
表示値は、平均値を示す。同じ文字は、有意差なし。
Tittle B R et al. J. Virol. 2012;86:13508-13514を一部改変

Fig 9 A. Total oligopeptide antibodyresponse.



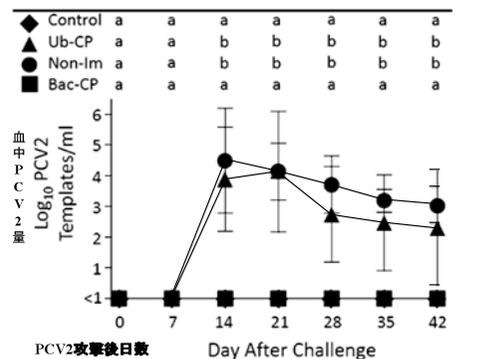
50% (NA50) /ml ; 50% 中和抗体活性, * ; 平均値有意差有り (P<0.05)
Tittle B R et al. J. Virol. 2012;86:13508-13514を一部改変

Fig 10. PCV2 neutralizing activity.



表示値は、平均値を示す。同じ文字は、有意差なし。
Tittle B R et al. J. Virol. 2012;86:13508-13514を一部改変

Fig 9 B. CP (169-180) oligopeptide antibodyresponse.



表示値は、平均値を示す。同じ文字は、有意差なし。
Tittle B R et al. J. Virol. 2012;86:13508-13514を一部改変

Fig 11. PCV2 viremia.

後に試験区の全てのブタは、混合飼育され常にウイルス血症のブタに曝されたままであったが、Bac-CP区は、試験期間を通して検出可能なレベル以下であった (図 11. PCV2 ウイルス血症⁴⁾)³⁾。

11. VLP 及び CP サブユニット単量体による接種後の免疫と防御

これらの成績は、予測されたようにブタへのワクチン VLP・CP (Bac-CP) により産生された免疫抗体が PCV2 攻撃ウイルス感染を防御し、CP

サブユニット単量体・CP (43-233) 領域に対する宿主の免疫系細胞による高いレベルの抗体を産生を抑制し、CP (169-180) 領域に対する低い量の抗体産生に止め、中和抗体が継続的に産生され、PCV2 攻撃接種後にウイルスが血清中に検出されなかった。また、対照的に CP サブユニット単量体 (Ub-CP) 接種による免疫は、CP (169-180) に対する顕著な高レベル抗体が誘導され、中和抗体は検出されず PCV2 攻撃接種後のウイルス血症のレベルは、単独でウイルスを攻撃した Non-

IM区と同様であり、PCV2感染が防御されないPCVAD発症豚で観察されるCP(169-180)領域に対する高レベル抗体応答が再現されたと考えられる(図12. VLP及びCPサブユニット単量体による接種後の免疫と防御³⁾)。

12. ワクチン接種の有無によるPCV2野外感染後の免疫活性と疾病発現

ワクチン接種豚および非接種豚のPCV2野外感染後の免疫活性と疾病発現を図に示す³⁾。ワクチン接種豚は、感染ウイルスに対してワクチンによる防御免疫の働きで低いレベルのウイルス血症に止め、高いレベルの中和抗体産生によりウイルスを排除する。ワクチン非接種豚は、母豚からの移行抗体の量より経過が異なる。移行抗体の無いブタは、感染ウイルスが増殖し高いレベルのウイルス血症となりPCVADを発症し急死する。また、移行抗体を得たブタでは、発育経過し抗体が

減少するに伴い抗病勢が低下することで感染ウイルスが増殖しウイルス血症となりPCVADを発症するが、CP(169-180)おとりエピトープに対する抗体応答のレベルの差で転帰が異なる。高い応答により高いレベルの非中和抗体を産生したブタは、臨床型PCVADによる高い事故率を呈し、低いレベルの非中和抗体産生したブタは、非臨床型PCVADによる発育不全を呈する。よってワクチン接種により、PCVADの発生が不明な農場においても事故率が減少する理由が推察される(図13. ワクチン接種の有無によるPCV2野外感染後の免疫活性と疾病発現³⁾)³⁾。

引用文献

- 1) Benjamin R. Tribble, Maureen Kerrigan, Nicholas Crossland, Megan Potter, Kay Faaberg, Richard Hesse, and Raymond R. Rowland. 2011. Antibody Recognition of Porcine Circovi-

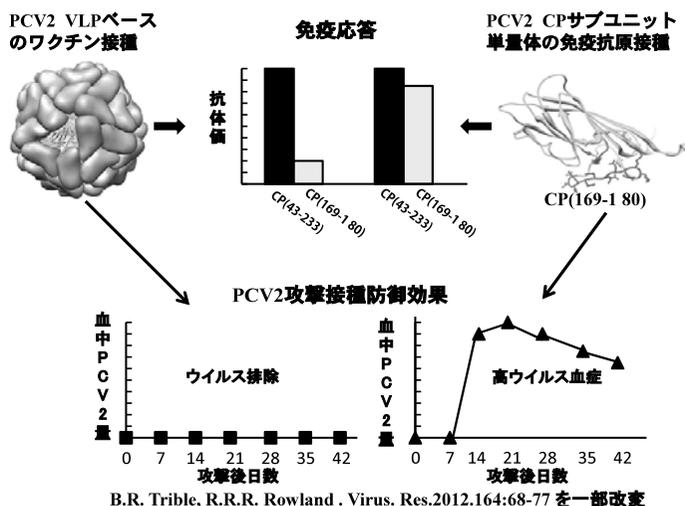


Fig. 12. Immunity and protection following vaccination with VLP or CP monomer.

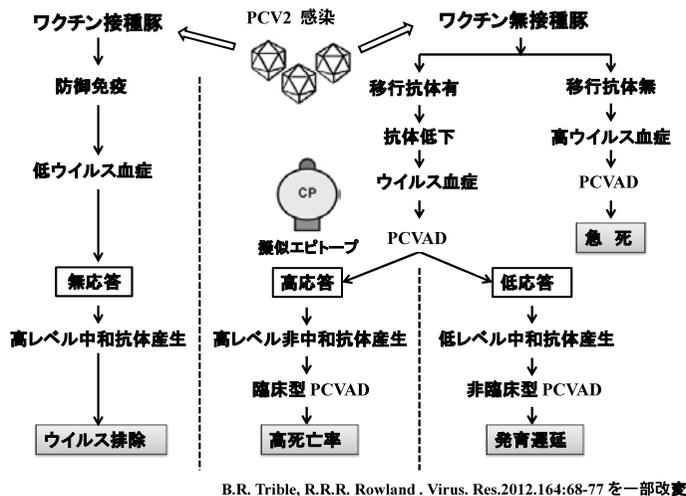


Fig. 13. Immunity and disease following natural infection in vaccinated and non-vaccinated pigs.

- 1) Benjamin R. Tribble, Andrew W. Suddith, Maureen A. Kerrigan, Ada G. Cino-Ozuna, Richard A. Hesse and Raymond R. R. Rowland. 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res.* 164: 68-77.
- 2) Benjamin R. Tribble a, Alejandro Ramirezb, Andrew Sudditha, Alexandra Fullera, Maureen Kerrigan, Richard Hesse, Jerome Nietfelda, Baoqing Guoc, Eileen Thackerd, Raymond R.R. Rowlanda. 2012. Antibody responses following vaccination versus infection in a porcine circovirus-type 2 (PCV2) disease model show distinct differences in virus neutralization and epitope recognition. *Vaccine* 30: 4079-85.
- 3) Benjamin R. Tribble, Raymond R.R. Rowland. 2012. Genetic variation of porcine circovirus type 2 (PCV2) and its relevance to vaccination, pathogenesis and diagnosis. *Virus Res.* 164: 68-77.
- 4) Benjamin R. Tribble, Andrew W. Suddith, Maureen A. Kerrigan, Ada G. Cino-Ozuna, Richard A. Hesse and Raymond R. R. Rowland. 2012. Recognition of the Different Structural Forms of the Capsid Protein Determines the Outcome following Infection with Porcine Circovirus Type 2. *J. Virol.* 86: 13508-14.
- 5) Benjamin R. Tribble, R. R. Rowland. 2012. Protective Immunity vs. Immunopathogenesis: Recognition of the structural form of the PCV2 capsid determines the outcome.
- 6) Elisa Crisci a, Juan Barcenab, Maria Montoya. 2013. Virus-like particle-based vaccines for animal viral infections. *Inmunología*, 32: 102-16.
- 7) 田村直也. 日本で使用されている動物用ワクチン (IX) 豚用ワクチンの概説. 2011. *日獣会誌.* 43: 908-12.