

生ワクチンを利用した豚流行性下痢対策の現状と今後の展望

佐藤 哲 朗（一般財団法人日本生物科学研究所 〒198-0024 東京都青梅市新町 9-2221-1）

Sato, T. (2016). Current status and future prospects of porcine epidemic diarrhea live vaccine

All about SWINE 49, 13-21

1. はじめに

豚流行性下痢（Porcine epidemic diarrhea; PED）は、PED ウイルス（PEDV）の経口感染によって引き起こされる水様性下痢および食欲不振を主徴としたウイルス性感染症である¹⁾。特に7から10日齢以下の幼齢豚における致死率は、50から100%に達する。一方、離乳期以降の豚では、PEDVに対する感受性が低下し、強制的にウイルスを経口投与しても、一過性に下痢を示す、もしくは無症状に経過することもある。

2013年9月、日本国内で7年ぶりにPEDが報告された。分離されたウイルス株は、2013年5月に米国で報告されたウイルスに類似しており、USプロトタイプ型とも呼ばれる遺伝学的グループ2に属していたが、後にウイルスのスパイク遺伝子に塩基の挿入と欠失を伴ったS-INDEL型と呼ばれるグループ2野外株も国内で分離された²⁾。また、2014年11月には、スパイク遺伝子にさらに大きな欠失を伴うTottori2株も報告された³⁾。

2. PED生ワクチン

PEDに対するワクチンは、PED単味の生ワクチンおよび豚伝染性胃腸炎との混合生ワクチンが利用されている⁴⁾。いずれのワクチンも妊娠期間

中の母豚に2回の筋肉内注射によって免疫するワクチンである。生ワクチンで免疫された母豚は、分娩後の乳汁中にPEDVに対する中和抗体を分泌する。乳汁を介して子豚の消化管内に取り込まれた中和抗体は、経口感染したPEDVを中和し、粘膜上皮細胞へのウイルス感染を阻止することにより、PED症状の軽減効果を発揮する。このPEDワクチンの子豚に対する免疫付与メカニズムは、乳汁免疫と呼ばれ、初乳中の移行抗体による母子間の免疫付与とは異なる作用機序で働いている。

乳汁免疫による子豚のPED発症抑制には、子豚の消化管内に絶えず中和抗体を供給する必要がある。従って、哺乳期間中の子豚が、何らかの原因で乳汁を十分に摂取できない状況に陥ると、ウイルスに感染し、重症化してしまう。また、低い中和抗体価を保持する母豚が、大量のウイルスに暴露された場合、泌乳量の減少を伴う全身症状を呈するため、ワクチンの効果を発揮できない状況に陥るといった問題もある。以上のPEDワクチンの作用機序を踏まえると、PEDVの感染前に母豚の免疫レベルを十分に上げておくことが、本症を予防する上で重要な要素の一つであると考えてよい。

3. ワクチン株の性状

3-1. 継代株の豚における病原性

PED 生ワクチンに含まれるワクチン株は、野外 PED 発症子豚より分離され、Vero 細胞を用いた連続継代によって作出された弱毒の PEDV である。Vero 細胞で連続継代したウイルスの病原性を確認するため、分離直後の強毒親株、34 継代株、61 継代株および 100 継代株を 8 から 12 週齢の豚に経口投与した。臨床症状は下痢症状を観察し、正常便を 0 点、軟便を 1 点、下痢便を 2 点、水様性下痢を 3 点および死亡を 4 点と採点した。親株を投与された豚は、投与後 2 日から下痢を発症し、投与後 6 日まで水様性の下痢を呈した (図 1)。また、34 および 61 継代株を投与された豚は、それぞれ投与後 5 日に一過性の下痢または軟便を呈した。一方、100 継代株を投与された豚は、一切の臨床的異常を示さず、糞便は正常であったことから、100 代の連続継代の過程において、分離したウイルスは弱毒化したことが明らかとなった。

3-2. 弱毒株の体内分布

PEDV の体内分布を解析するため、2 から 7 日齢の哺乳豚に強毒親株または弱毒株を経口投与し、全身臓器からウイルス分離を試みたところ、分離直後の強毒親株は小腸、結腸、直腸、腸間膜リンパ節および鼠径リンパ節から分離された (表 1)。一方、弱毒株では、小腸、結腸および直腸

からウイルスが分離されたが、腸間膜リンパ節および鼠径リンパ節からは分離されなかったことから、弱毒株の組織親和性が変化したことが明らかとなった。

3-3. 弱毒株の病原性復帰の検討

弱毒株の *in vivo* における病原性復帰を検討するため、2 日齢の哺乳豚に対して、弱毒株を経口投与し、その 2 日後に安楽殺した当該哺乳豚の 10% 小腸乳剤を、新たな 2 日齢の哺乳豚に経口投与した。同様に哺乳豚での継代を 4 代まで繰り返す、臨床症状を確認することによって、弱毒株の病原性復帰を検討した。表 2 に示したとおり、すべての豚の臨床症状スコアは 0 点で、弱毒株は哺乳豚で 4 代継代しても、その病原性は復帰しな

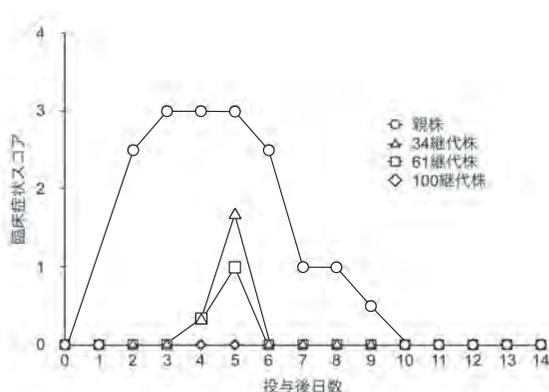


図 1. 弱毒化継代株の臨床症状スコア
臨床症状スコア 0: 正常便, スコア 1: 軟便, スコア 2: 下痢便, スコア 3: 水様性下痢便, スコア 4: 死亡。

表 1. PEDV を経口投与した子豚の諸臓器からのウイルス分離

ウイルス株	小腸	結腸	直腸	腸間膜リンパ節	鼠径リンパ節
強毒親株	+	+	+	+	+
弱毒株	+	+	+	-	-

+: ウイルス分離陽性, -: ウイルス分離陰性
扁桃, 気管, 食道, 肺, 肝臓, 脾臓, 膵臓, 腎臓, 副腎および血液からは、いずれのウイルスも分離されなかった。

かった。また、3代目以降の小腸乳剤からは、ウイルスが分離されなかったことから（データ未掲載）、弱毒株の病原性復帰はないと判断された。

3-4. 弱毒株のウイルス排泄および水平伝播の検討
弱毒株を筋肉内注射された豚からのウイルス排

泄を検討するため、弱毒株を妊娠豚に筋肉内注射し、下痢便からのウイルス分離を試みた。注射後10日間、毎日糞便を採取し、Vero細胞でウイルス分離を試みたが、いずれの豚からもウイルスは分離されなかった（表3）。また、同一豚房に同居している非注射対照豚の血清の中和抗体価を初

表2. PEDV 弱毒株の病原性復帰継代試験における子豚の臨床症状スコア

豚継代数	豚番号	経口投与後日数										
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0	1	0	0	0 ^{a)}								
	2	0	0	0 ^{a)}								
1	3	0	0	0 ^{a)}								
	4	0	0	0 ^{a)}								
	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	7	0	0	0 ^{a)}								
	8	0	0	0 ^{a)}								
	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	11	0	0	0 ^{a)}								
	12	0	0	0 ^{a)}								
	13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	15	0	0	0 ^{a)}								
	16	0	0	0 ^{a)}								
	17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^{a)} 2頭の10%小腸乳剤を次の継代の子豚に経口投与した。

臨床症状スコア0：正常便，スコア1：軟便，スコア2：下痢便，スコア3：水様性下痢便，スコア4：死亡。

表3. PEDV 弱毒株を筋肉内注射された豚の糞便からのウイルス分離

豚番号	筋肉内投与後日数										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

＋：ウイルス分離陽性，－：ウイルス分離陰性

回注射後5週まで経時的に測定したが、すべての検体は陰性で、弱毒株の筋肉内注射によって、ウイルスが水平伝播する可能性は否定された(図2)。

3-5. 連続継代によって作出した弱毒株のスパイク遺伝子における変異

連続継代によって作出された弱毒株のスパイク遺伝子塩基配列を解析したところ、強毒の親株に比べて、100継代株には18塩基の変異および13箇所のアミノ酸置換が存在した(図3)。これらの

遺伝子変異は、既知の中和エピトープ(SS2, SS6および2C10)には挿入されておらず、連続継代によるウイルスの弱毒化過程において、ウイルス株の免疫原性に変化はないものと考えられた⁵⁾。

以上の成績より、Vero細胞で100代継代した弱毒株は、*in vivo*における病原性を完全に失っており、病原性復帰の可能性が低いだけでなく、筋肉内注射された豚からの排泄がないことから、PED生ワクチンは、極めて安全性の高いワクチンであることが明らかとなった。

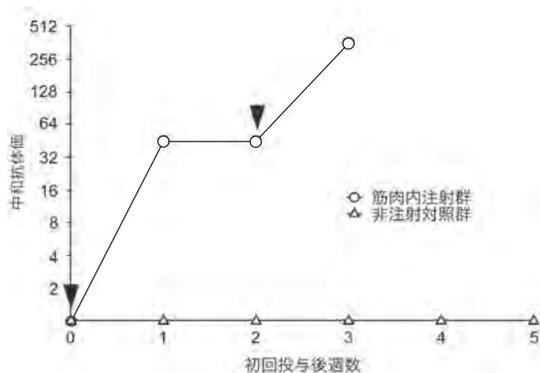


図2. 筋肉内注射群および同居した非注射対照群の血清中和抗体価
矢頭(0週および2週時)は、弱毒株の筋肉内注射を示す。

4. 2013年分離株に対する日生研PED生ワクチンの効果

4-1. 実験室内における免疫母豚由来の子豚攻撃試験

日生研PED生ワクチン株は、PEDVのプロトタイプであるCV777株と同じ遺伝学的グループ1であり、2013年以降に国内で報告された野外株は、遺伝学的グループ2に属する。そこで、新たに流行した遺伝学的グループ2に対する生ワクチンの効果を確認するため、PEDV抗体陰性の2頭の妊娠豚に用法・用量通り4週間隔で2回、日

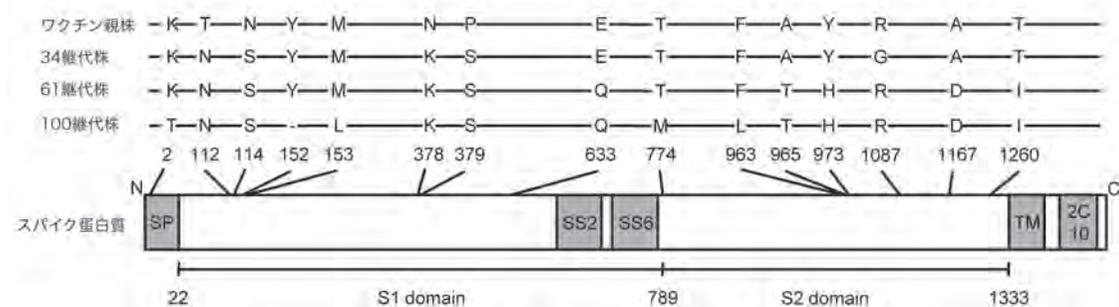


図3. 弱毒化継代過程のスパイク遺伝子に挿入された変異箇所

(SP) シグナルペプチド, (TM) 膜貫通領域, 中和エピトープ (SS2, SS6および2C10)。アミノ酸位置番号は、ワクチン親株を参照した。() は、欠失を示す。引用文献5)を改変した。

生研 PED 生ワクチンを接種し、分娩後2日または4日の子豚に遺伝学的グループ2の野外強毒株 MZ0116-2/2013 を経口投与で攻撃した。対照として、1頭のワクチン未接種の妊娠豚から生まれた子豚に、同様の野外株を経口投与した。

MZ0116-2/2013 株で攻撃された子豚は、母豚のワクチン接種の有無にかかわらず、攻撃翌日から水様性下痢を呈した (図4)。対照群の子豚は、攻撃後4日以降に死亡する個体が急激に増加し、攻撃後5日で全頭が死亡した。一方、ワクチンを接種された母豚の乳汁を摂取している子豚の臨床症状は、攻撃後2日をピークとして軽くなり、攻撃後4日以降では、対照群と比べて有意に臨床症

状スコアが低くなった。攻撃後7日の生存率は、対照群では0%であったのに対し、ワクチン接種群で80%であった。

リアルタイム PCR を用いて、子豚の小腸、盲腸、直腸および腸間膜リンパ節における PEDV ゲノム RNA 量を定量した。ワクチン接種群子豚臓器の PEDV ゲノム RNA 量は、未接種対照群と比較して、いずれの臓器においても有意に減少していた (図5)。

攻撃時におけるワクチン接種母豚血清の中和抗体価は、32 および 128 倍であったが、子豚への攻撃後7日では、256 および 512 倍に上昇した (表4)。乳汁中の中和抗体価は、初乳では 64 お

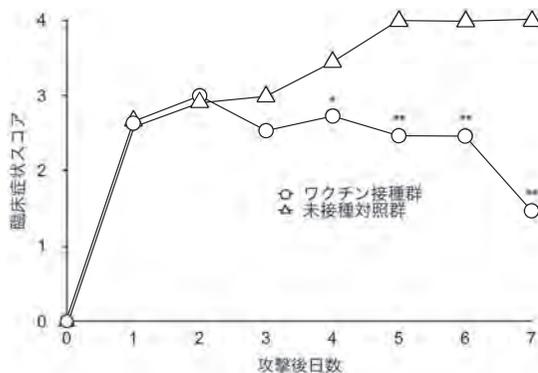


図4. 哺乳豚の平均臨床症状スコア

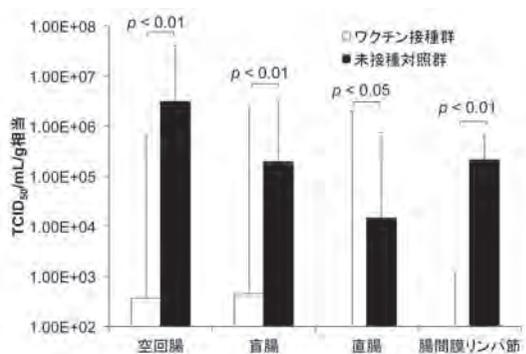


図5. 哺乳豚各臓器のウイルス RNA 量

表4. 母豚の血清および乳汁の中和抗体価

検体	群	母豚番号	分娩時 初乳	攻撃後日数		
				0	2	7
血清	ワクチン接種群	826		32	N. D.	256
	677		128	N. D.	512	
	未接種対照群	72		<2	N. D.	<2
乳汁	ワクチン接種群	826	64	<2	2	128
	677	128	<2	16	128	
	未接種対照群	72	<2	<2	N. D.	N. D.

N. D.: 実施せず。

よび128倍であり、攻撃日には一旦陰性となったが、その後上昇し、攻撃後7日では2頭共に128倍となった。子豚への攻撃後に生じた母豚の速やかな抗体応答は、子豚から排泄されたウイルスに感染したことによって、ブースター効果が惹起された事を示唆している。一方、対照群の母豚は、試験期間中のすべての時点において抗体陰性を示し、攻撃翌日以降は食欲不振および下痢症状を示した。また、攻撃後2日目以降には、対照群母豚の泌乳量が低下し、乳汁を採取することができなかった。

4.2. 乳汁中への中和抗体分泌

上記攻撃試験では、攻撃日に乳汁中の中和抗体は陰性となったが、ワクチンを接種した母豚の乳汁中における持続的な抗体分泌を検証するため、PEDV抗体陰性の妊娠豚にPED生ワクチンを用法に従って2回接種し、乳汁中の中和抗体を経時的に測定した。抗体応答性の低い一部の個体は、分娩後1から3日で乳汁中の中和抗体価が検出できなくなったが、平均では分娩後5から7日においても、20倍の中和抗体価を維持することが明

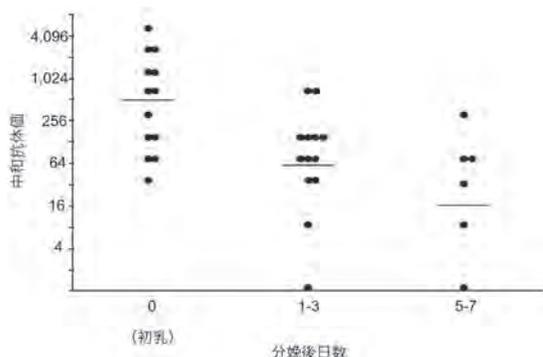


図6. ワクチン免疫母豚の乳汁中における中和抗体価

らかとなった (図6)。

4.3. 生ワクチン免疫豚の細胞性免疫応答

一般に、生ワクチンは細胞性免疫応答を誘導することが知られている。そこで、ELISPOTアッセイを用いてインターフェロンガンマ (IFN- γ) 産生細胞数を計測することにより、PED生ワクチンの細胞性免疫の誘導能を評価した。PEDV抗体陰性の12週齢豚にTGE・PED混合生ワクチンを3週間隔で2回筋肉内注射した後、1週後に末梢血単核球、脾臓および腸間膜リンパ節のリンパ球を分離し、PEDVと共培養した。生ワクチンを接種された豚の脾臓および腸間膜リンパ節において、IFN- γ 産生細胞数の増加が認められたことから (図7)、TGE・PED混合生ワクチンは、細胞性免疫も誘導していることが明らかとなった。

以上の成績より、日生研PED生ワクチンを接種された母豚の乳汁を摂取している子豚では、乳汁に含まれる中和抗体によってPEDVが中和され、その症状および死亡率が低減されたことが明らかとなり、遺伝学的グループ2の野外株に対

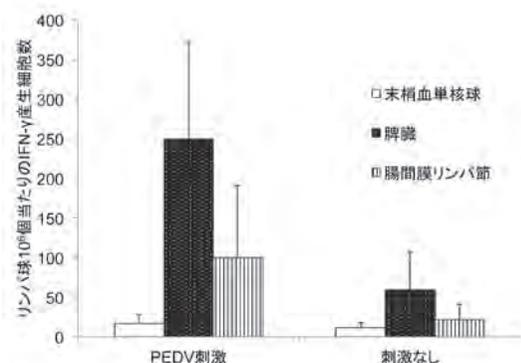


図7. ワクチン免疫豚のリンパ球におけるIFN- γ 産生細胞数

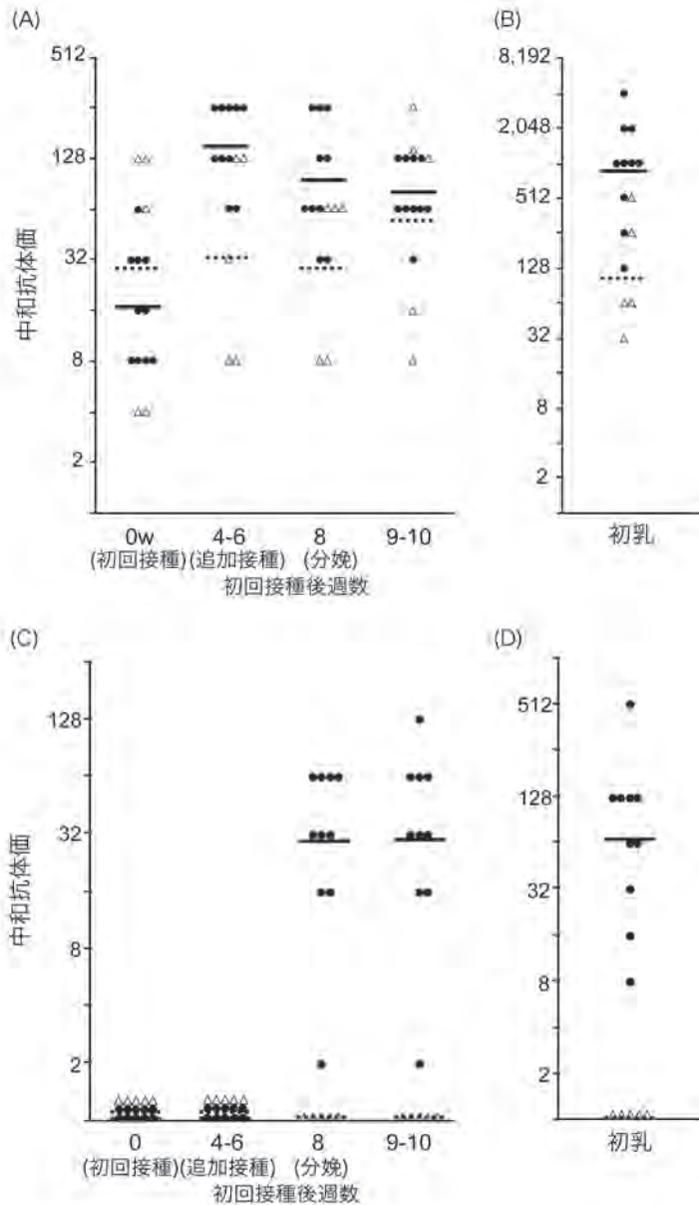


図 8. 野外農場における中和抗体価

A) PED 陽性 A 農場における血清中和抗体価, B) PED 陽性 A 農場における初乳中の PEDV 抗体価, C) PED 陰性 B 農場における血清 PEDV 抗体価, D) PED 陰性 B 農場における初乳の PED 抗体価。●: ワクチン接種豚, △: ワクチン未接種豚, 実線: ワクチン接種豚の平均中和抗体価, 点線: ワクチン未接種豚の平均中和抗体価。

表 5. PED 発生農場の概要

農場	経営形態	母豚規模	妊娠豚への生ワクチン接種	妊娠豚への馴致の実施
C	一貫経営	800 頭	妊娠期間中に 1 回または 2 回の接種	あり
D	一貫経営	800 頭	妊娠期間中に 2 回の接種	なし
E	一貫経営	943 頭	接種せず	あり

しても、現行のワクチンは有効な対策手段であると考えられた。さらに、生ワクチンを接種された母豚は、全身性の液性免疫応答だけでなく、細胞性免疫応答によっても、母豚自身の PEDV による重症化を防いでいることが示唆された。

4.4. 野外農場における効果

PEDV 抗体陽性および陰性農場における生ワクチン接種後の中和抗体価の推移を調査した。抗体陽性の A 農場初回接種時には、ワクチン接種群に比べて、未接種対照群の抗体価が高値を示していたが、2 回目接種時後以降は、ワクチン接種群の抗体価が、未接種対照群を上回った (図 8A)。初乳においてもワクチン接種群は、未接種対照群よりも高い抗体価を示した (図 8B)。一方、抗体陰性の B 農場では、2 回目接種後 2 週の分娩時には、ワクチン接種群の抗体価が陽転し、初乳中にも中和抗体が認められた (図 8C および D)。以上、野外農場においても、PED 生ワクチンを接種すると、実験室内試験と同様の液性免疫応答が誘導されることが明らかとなった。

4.5. PED 発生農場における効果

続いて、PED 対策方法の違いによる PED 発生時の子豚事故率を比較した。表 5 に比較した農場の情報をまとめた。妊娠豚へのワクチン接種の有無にかかわらず、PED 発生当週の子豚の死亡

率は、すべての農場で 100% に近いものであった (図 9)。しかし、C 農場ではワクチンの供給不足の問題から妊娠豚に 1 回しか接種できていない母豚群から生まれた子豚においても、ワクチンを使用せずに馴致のみで対応した E 農場に比べて、PED 発生前後の週に生まれた子豚の死亡率の低下が認められ、用法通り 2 回接種している群では、発生後 2 週に生まれた子豚で死亡例が認められなかった。同様にワクチンのみの対応で PED 発生後の馴致をしなかった D 農場においても、馴致のみの E 農場に比べて、PED 発生当週前後の週で死亡率の低下が認められたことから、新型野外株発生農場においても、PED 生ワクチンに

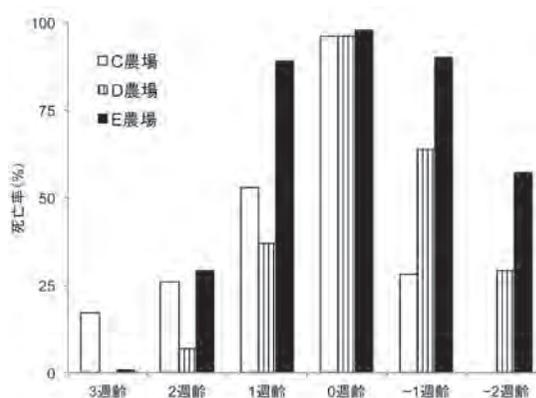


図 9. PED 発生野外農場における週齢ごとの哺乳豚の死亡率

PED 発生当週を 0 週齢とし、翌週以降に生まれた子豚を -1 および -2 週齢とした。PED 発生当週に既に生まれていた子豚は、1, 2 および 3 週齢とした。

よる PED 症状の軽減効果が確認された。

PED 発症子豚の糞便および腸内容物による妊娠豚への馴致は、PEDV に対する粘膜免疫を誘導する可能性がある。ワクチンと併用することで、ブースター効果による高い水準の免疫が得られることも期待されている。しかし、馴致は農場内のウイルス量を人為的に急増させるだけでなく、馴致材料に豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルスや豚サーコウイルスなどの病原体が含まれている危険性もある。また、馴致材料に含まれる PEDV は、一般的な家庭用冷凍庫の温度で長期間保存することは難しく、PED の再発時に十分なウイルス量を利用できる裏付けもない。馴致を完全にコントロールし、安定的な効果を得ることは困難を極めることから、農林水産省は獣医師および行政機関の関与なしに馴致を実施することを控えるよう、PED 防疫マニュアルで指導している⁶⁾。

5. よりいっそう効果の高い PED ワクチンの開発に向けて

本稿では、現在国内で利用されている PED 生ワクチンの効果について、実験室内および野外環境の側面から検証した。現行の PED 生ワクチンは、新しい遺伝学的グループの野外株に対しても一定の効果を発揮することが明らかとなったが、豚へのウイルス感染自体を防御する事が出来ず、ワクチン接種農場においても、PED による被害が発生していることも事実である。これらを打開するための理想的なワクチンは、母豚に粘膜免疫を付与し、ウイルス感染から母豚自身を守りつつ、より強い乳汁免疫によって子豚の感染をも防ぐものが必要であろう。理想的なワクチンを開発するた

めにも、PED の病態をさらに詳細に解明し、筋肉内投与方法以外の免疫方法の検討および粘膜免疫応答を誘導する効果的な抗原の開発が急がれている。

6. 引用文献

- 1) Zimmerman J. J., Karriker L. A., Ramirez A., Schwartz K. J., Stevenson G. W., 2012. Diseases of swine 10th edition. Wiley-Blackwell.
- 2) Suzuki T., Murakami S., Takahashi O., Kodera A., Masuda T., Itoh S., Miyazaki A., Ohashi S., Tsutsui T. 2015, Molecular characterization of pig epidemic diarrhoea viruses isolated in Japan from 2013 to 2014. *Infect. Genet. Evol.* 36, 363-368.
- 3) Masuda T., Murakami S., Takahashi O., Miyazaki A., Ohashi S., Yamasato H., Suzuki T. 2015, New porcine epidemic diarrhoea virus variant with a large deletion in the spike gene identified in domestic pigs. *Arch. Virol.* 160, 2565-2568.
- 4) 佐藤哲朗, 豚流行性下痢生ワクチンの特徴とその効果, 月刊ビッグジャーナル 2014 年 2 月号, 22-25.
- 5) Sato T., Takeyama N., Katsumata A., Tuchiya K., Kodama T., Kusanagi K. 2011, Mutations in the spike gene of porcine epidemic diarrhea virus associated with growth adaptation in vitro and attenuated virulence in vivo. *Virus Genes* 43, 72-78.
- 6) 農林水産省, 豚流行性下痢 (PED) 防疫マニュアル, 平成 26 年 10 月 24 日