

第22回藤崎優次郎賞 受賞記念講演

各種細菌性豚病ワクチンの開発と関連基礎研究

長 井 伸 也 (一般財団法人日本生物科学研究所・日生研株式会社)

Nagai, S. (2019). Development of vaccines for prevention of various swine bacterial diseases and the related basic research.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 74, 1-6.

キーワード：アクチノバシラス・プルロニューモニエ、
豚胸膜肺炎、豚萎縮性鼻炎、パスツレ
ラ・ムルトシダ、豚丹毒菌

1. はじめに

私は4年間の学部卒業後に獣医師の免許を取得できた、いわゆる4年制獣医の最後の学年にあたる。1981年に山口大学農学部獣医学科を卒業後、同大学の修士課程を修了し、1983年4月に財団法人日本生物科学研究所及び日生研株式会社に入所社した。日生研(所社併せた呼称)は各種動物疾病用のワクチンの開発・製造・販売を行っているが、私は入所社して最初に鶏用ウイルスワクチンの部門に配属され、マレック病ワクチンや伝染性ファブリキウス嚢病ワクチンの開発及び製造に携わった。一方、その当時、日生研の細菌ワクチン部門の事業はあまり順調に進行しておらず、また、当時は抗生物質の全盛期でもあったことから、日生研でこれ以上、細菌ワクチンの開発・製造を続ける必要があるのかどうか議論されている最中であった。

そのような折、細菌部門へ人員の補強が必要ということになり、私に白羽の矢が立ち、1987年に鶏ウイルス部門から細菌部門へ異動することになった。そして、細菌学に関する最新の知識が必要だということで、同時に東京大学医科学研究所の細菌研究部に内地留学することになった。留学先の医科学研究所では、分子遺伝学の手法を細菌の病原性の研究に取り入れ始めた時期で、私は2年間、ヒトの赤痢菌の細胞侵入機構に関する最先端の研究に携わることができた。

1989年に医科学研究所から日生研に戻った時、所社内には「動物用の細菌性ワクチンを開発する上で遺伝子組換え技術など必要なのか?」という厳しい意見もあった。私自身も、厳格な日本のカルタヘナ法規制下で、遺伝子組換えベクターワクチンを実用化するのは容易ではないと考えていた。一方で、組換え大腸菌等

で発現させたタンパク質を用いたコンポーネントワクチンや、遺伝子操作技術を用いて病原体の一部の遺伝子を人工的に欠損させて作製する弱毒生ワクチンについては、我が国のカルタヘナ法規制下でも十分実現の可能性はあるのではないかと考えた。結果的に、前者については以下に述べる無毒変異型毒素を用いたアクチノバシラス・プルロニューモニエワクチンを、また、後者については、今回は割愛するが鶏大腸菌の生ワクチンをそれぞれ世界に先駆けて実用化することができたことは、研究開発者として大変幸運なことであった。その他、各種の細菌性豚病ワクチンの開発過程において、現在では常法となっている分子生物学的技術に応用することができ、時宜を得た研究開発活動を実施させてもらったと、当時の指導者の先生方及び一緒に協力して仕事を進めた多くの同僚や後輩に深く感謝している。

2. アクチノバシラス・プルロニューモニエ (*Actinobacillus pleuropneumoniae*) ワクチンの開発

1) 従来型ワクチンの問題点

豚胸膜肺炎の原因菌である *A. pleuropneumoniae* のワクチンは、当時、ホルマリンで不活化した全菌体をその主成分としていた。日生研からは2型の単味ワクチンが、他社からは1型、2型及び5型を混合した3価ワクチンが上市されていた。しかし、この不活化菌体ワクチンには ①獲得できる免疫が強固でなく、予防効果が十分でない ②防御効果が血清型特異的であり、異なる血清型菌の感染・発症を防御することができない ③ワクチン注射時に発熱、沈鬱といった副反応を惹起しやすい、といった問題点があった。

2) 細胞毒素 Apx の発見

ワクチンの改良のため、本菌の抗原物質に関する基

礎研究が、私達の研究グループを含め^{8,9)}、世界各国の研究機関で実施された。その結果、本菌は Apx (*Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin) I、II、III と呼ばれる三種類の細胞毒素を産生し、これらが本菌の重要な病原因子となっている事が判明した³⁾。この Apx をワクチンの成分として応用するために、遺伝子組換え技術に応用した。Apx 遺伝子は、毒素分子本体をアシル化して毒素活性を発現させるための補助遺伝子 (C) と、毒素分子本体をコードする遺伝子 (A) から成っている (図1)。そこで、C 遺伝子を欠損させて A 遺伝子だけを大腸菌内で発現させると、得られたタンパク質は毒素活性を示さず、一方、豚に免疫すると中和抗体を誘導することのできる有用な抗原となる事が判明した¹¹⁾。このタンパク質を無毒変異型毒素 (rmApx) として、ワクチンの成分に応用した。

日本で問題となっている3つの血清型 (1型、2型、5型) の不活化菌体に、3種類の rmApx を加えた6

成分から成るワクチン、「AP125RX」を開発した (図2)。これについて各種の実験室内試験及び臨床試験を行った結果、本ワクチンの安全性と有効性が確認され、1998年に農林水産省より製造販売承認を受けた。その後、「AP125RX」にマイコプラズマの不活化菌体を加えた7成分から成る「APM」(2003年承認)、及びアジュバントを従来の水酸化アルミニウムアジュバントとマイクロエマルジョンの混合液とした「APX-ME」(2015年承認：堤信幸研究員が開発リーダー)、がそれぞれ開発・上市され、現在、広く使用されている。

3) 無毒変異型毒素を含むワクチンの普及状況

無毒変異型毒素を含む「AP125RX」「APM」「APX-ME」の安全性と有効性が評価され、発売以来、順調に普及してきた。2018年度は、上記3ワクチンの合計国内出荷量は473万ドーズ、これは国内で上市されてい

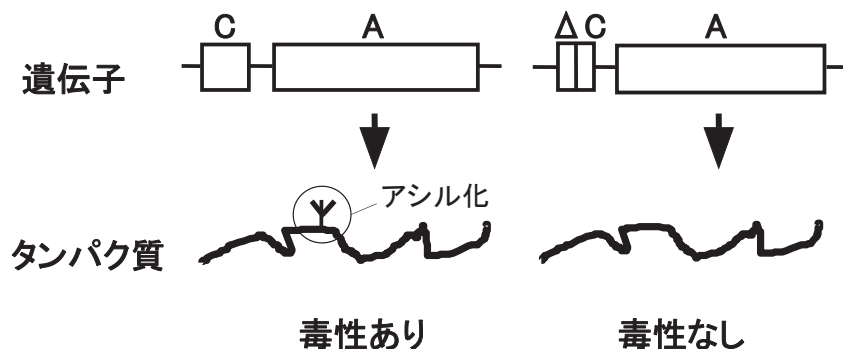


図1. 無毒変異型Apx (rmApx)の作製

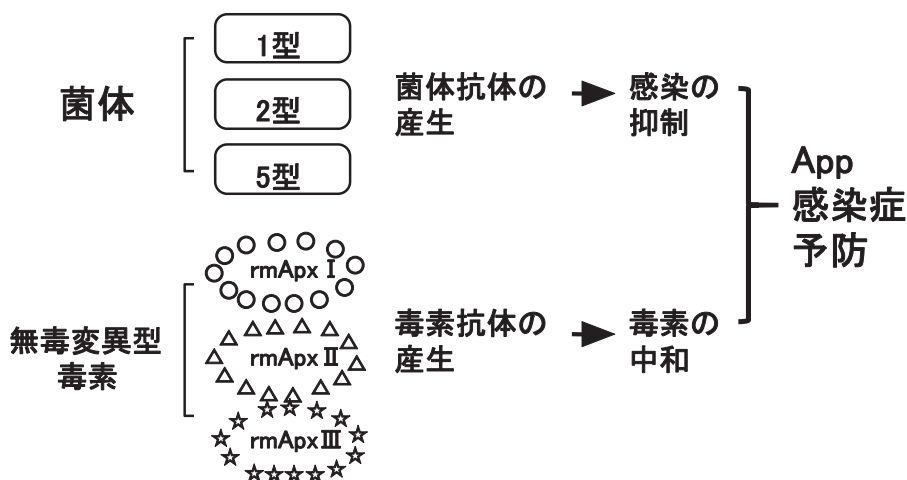
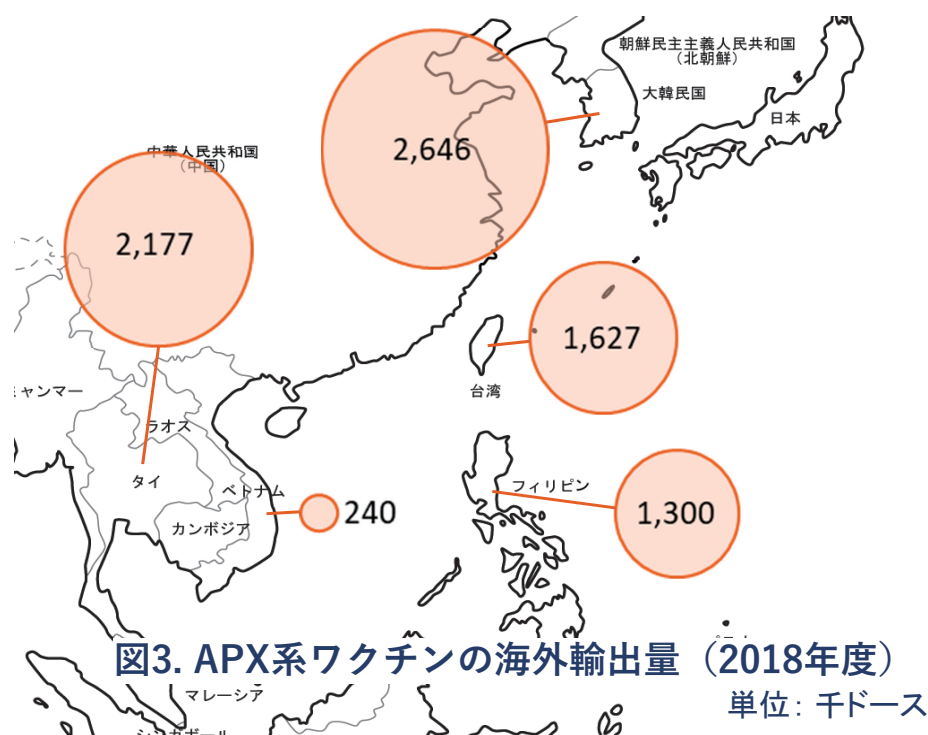


図2. 日生研AP125RXワクチンの組成



る全 *A. pleuropneumoniae* ワクチンの約33%を占める。海外においては「APM」が2009年に韓国で登録されて以来普及が進み、現在では韓国の他、台湾、タイ、フィリピン及びベトナムに輸出しており、2018年度は上記3ワクチンをあわせて約800万ドースを供給し、各国の *A. pleuropneumoniae* 感染症の制御に寄与している（図3）。

3. 豚萎縮性鼻炎ワクチンの開発のための基礎研究

1) 豚萎縮性鼻炎の原因菌

豚萎縮性鼻炎は歴史の古い病気であるが、その病因については諸説が対立し、長い間混乱していた。1960年代の研究により *Bordetella bronchiseptica* が¹¹⁾、1980年代の研究により *Pasteurella multocida* が¹³⁾それぞれ病因と考えられるようになった。これに関して、ヨーロッパでは毒素産生性 *P. multocida* 主因説が、一方、日本では *B. bronchiseptica* 主因説がそれぞれ唱えられ、意見が対立していた。また、日本では *B. bronchiseptica* の不活化菌体を用いた本病対策用不活化ワクチンが使用されていたが、必ずしも本ワクチンの接種のみで豚萎縮性鼻炎の発症を防御できない事例も散見されていた。

2) 毒素産生性 *P. multocida* を検出するためのPCR法の開発

日生研も *B. bronchiseptica* の不活化菌体を主成分と

するワクチンを販売していたが、上記のように、必ずしもその予防効果については十分とは言えなかった。当時ヨーロッパで毒素産生性 *P. multocida* の研究が進んでいたため、豚萎縮性鼻炎ワクチンの改良を目途として、まずは日本国内で毒素産生性 *P. multocida* による豚萎縮性鼻炎の発症事例があるのか疫学調査を行うことにした。その際、多数の *P. multocida* 菌株について、毒素産生株か非産生株なのかを区別する必要がある。当時は、*P. multocida* 菌株の生菌をモルモットの皮内に接種し、48時間以内に接種部位に壊死病変が形成された場合に毒素産生株と判定していた（図4）。しかし、この方法では一度に多数の菌株を検査するのは困難であり、また動物愛護上も好ましくはなかった。そこで当時、病原体の検査に遺伝学的手法が応用され始めた



図4. 従来の毒素産生性 *P. multocida* の検出方法 -モルモット皮膚壊死反応

時期であったので、これを利用することとし、パスツレラ・ムルトシダ毒素(PMT)遺伝子を標的としたPCRを世界に先駆けて開発した¹⁰⁾。この方法は操作が簡便であり、多検体処理が可能となったため、以下に述べる本病の疫学調査に応用した。

3) 日本における豚萎縮性鼻炎発生農場における毒素産生性 *P. multocida* の浸潤状況

北海道から沖縄にかけて豚萎縮性鼻炎が発生している全国52の農場について、発症豚の鼻腔スワブから *P. multocida* の分離培養を行い、本PCRを用いて毒素産生性の判定を行った。その結果、調査した52農場中30農場(58%)から毒素産生性 *P. multocida* が分離された(表1)。このことから、我が国においても、毒素産生

表1. 豚萎縮性鼻炎で問題のあった農場のうち毒素産生性 *P. multocida* が分離された農場 (1993～95年調査)

都道府県	調査農場数	毒素産生性 <i>P. multocida</i> 分離農場数		
		陽性農場数	A型	D型
北海道	12	8 (67%)	2	6
山形	2	2 (100%)	1	1
新潟	1	0 (0%)	0	0
群馬	1	1 (100%)	0	1
千葉	3	0 (0%)	0	0
神奈川	9	3 (33%)	1	2
静岡	2	0 (0%)	0	0
愛知	3	1 (33%)	0	1
鳥取	2	2 (100%)	0	2
愛媛	1	1 (100%)	0	1
佐賀	4	2 (50%)	2	0
大分	1	1 (100%)	0	1
熊本	1	1 (100%)	1	0
宮崎	8	7 (88%)	7	0
鹿児島	1	1 (100%)	0	1
沖縄	1	0 (0%)	0	0
合計	52	30 (58%)	14	16

性 *P. multocida* が全国的に蔓延しており、本菌が豚萎縮性鼻炎の発生に関与している可能性が示された。現在では、*B. bronchiseptica* と毒素産生性 *P. multocida* については、それぞれ単独の感染でも萎縮性鼻炎を発症させるが、多くの場合に *B. bronchiseptica* が先行感染した後に毒素産生性 *P. multocida* が続けて感染し、より重篤な萎縮性鼻炎が惹起されるものと整理されている。なお、この毒素産生性 *P. multocida* が主因となって発症する萎縮性鼻炎は「進行性萎縮性鼻炎: PAR」と名付けられ、*B. bronchiseptica* の単独感染による萎縮性鼻炎とは区別されている²⁾。

4) *B. bronchiseptica* の不活化菌体と PMT のトキシイドを混合した 2 価ワクチン「ARBP」の開発

上記疫学調査の結果を受け、従来の *B. bronchiseptica*

の不活化菌体ワクチンに、新たに PMT のトキシイドを混合した 2 価ワクチン「ARBP」の開発に着手した。これは、研究グループの中で染野修一研究員が開発リーダーとなり、各種の実験室内試験及び臨床試験を行なって、1996年に製造販売承認を取得した。さらに、初代「ARBP」はアジュバントにアルミニウムゲルが使用されていたが、これをマイクロエマルジョンに変更して改良した「ARBP-ME」が開発され、2005年に製造販売承認を取得した。また「ARBP」に豚丹毒の不活化菌体を加えた 3 価ワクチン「ARBP-SER」が1999年に承認された。上記 3 ワクチンをあわせた2018年度の国内出荷量は95万ドーズ、これは国内で上市されている全豚萎縮性鼻炎ワクチンの53%を占めており、国内で最も普及の進んだ豚萎縮性鼻炎ワクチンとなった。現在、本ワクチンの海外での普及も進めており、既に韓国で「ARBP-ME」の承認を取得し、輸出を開始している。

4. 豚丹毒不活化ワクチン関連の疫学的研究

1) 豚丹毒菌の株型別方法の開発

国内で発生している関節炎型の慢性型豚丹毒の病変部位より、生ワクチン株と思われる菌株が検出されるという問題が2004年頃から提起されていた^{4,14)}。当時、ワクチン株のマーカーはアクリフラビンに対する耐性であったが、野外でもアクリフラビン耐性を示す株もあり、ワクチン株と野外株、あるいは野外株同士を区別することは困難であった。そこで、豚丹毒菌が産生する表面防御抗原 (SpaA) をコードする遺伝子中、多型が存在する部分を標的とし、その PCR 増幅断片の塩基配列を決定することにより豚丹毒菌の株型別が行えることを報告した¹²⁾。

2) 株型別方法を応用した新型の豚丹毒菌株の検出

2009年頃、長野県の食肉検査所で、慢性型及び敗血症型豚丹毒の事例が多数認められたとのことで相談を受けた。豚丹毒の発症の様相が従来と異なるとの稟告から、この豚丹毒菌株が、従来から国内に存在した野外株と異なるのかどうか、本株型別法により調査することとした。その結果、これらの事例から分離された豚丹毒菌株には、SpaA 遺伝子の多型部位に従来見られなかったユニークな配列が共通して認められ、この株の名称として609G、あるいはMet-203と呼ぶことを提唱した^{5,18)}。さらに調査をすすめたところ、2010年頃から、全国で敗血症型豚丹毒の発生事例が急増し、ほ

とんどの事例から同じ遺伝子型を示す新しい豚丹毒菌が分離されたことがあわせて明らかになった^{6,18)}。この菌株により引き起こされる敗血症型豚丹毒の予防には、不活化ワクチンの使用が有効であることを、長野県との共同研究によりあわせて報告した^{5,6)}。

5. おわりに

上記の研究の他に、当研究グループから報告した論文の中で Diseases of Swine 第10版 (Zimmerman JJ 編 (2012)、Wiley-Blackwell) に引用されているものを調べたところ、① 豚萎縮性鼻炎ワクチンの成分として利用可能な無毒変異型毒素を作出した報告¹⁶⁾ ② 豚丹毒菌の Spa タンパク質は血清型により SpaA の他に SpaB と SpaC と名付けたバリエーションが存在することを示した報告¹⁷⁾、③ グレーサー病の血清型の2型と5型は交差防御がなく、2つの型の混合ワクチンを作製したところ、両方の血清型の攻撃に対して有効であったことを示した報告¹⁵⁾、④ 日本ではじめて *A. pleuropneumoniae* 血清型15を分離した報告⁷⁾ などが引用されていた。当研究グループにおいて、各種の細菌性の豚病に対するワクチン開発の過程で実施された基礎研究が、世界の豚病研究者にながしかの参考になったのであれば、幾分ながら意味があったのではないかと少し安堵している。

謝辞

私は、山口大学農学部獣医学科の家畜微生物学教室に在籍していた時期に、鹿江雅光教授 (故人) のもとで細菌毒素に関する研究のご指導を受けました。日生研入所社後、内地留学していた東京大学医科学研究所細菌研究部において、吉川昌之介先生 (故人) と笹川千尋先生に細菌の病原性に関する分子遺伝学的研究のご指導を受けました。笹川千尋先生はその後 (一財) 日本生物科学研究所の理事長に就任され、現在もご指導を受けております。日生研に入所社後の最初の研究室において、野村吉利先生と大滝与三郎先生 (故人) に鶏のウイルスに関する研究・製造についてご指導を受けました。細菌の研究室に異動後は、坂崎利一先生 (故人)、田島正典先生 (故人)、瀬戸健次先生及び八木橋武先生に細菌性ワクチンに関する研究のご指導を受けました。なお、ここに述べました研究業績及びワクチン開発は、同じ研究グループの先輩、同僚及び後輩の方々、すなわち、三井正朗氏、長澤洋二氏、染野修一氏、高橋欣也氏、風間敏氏、トーホー氏、永野哲司

氏、小山智洋氏、堤信幸氏、手島香保氏、鳥海宏司技術員及び山下治美技術員らとともに実施されたものです。ワクチン開発時の臨床試験実施の際、各県の薬事担当の先生方、各農場の管理獣医師の先生方に多々ご指導を受けました。豚丹毒の新型株の研究においては、長野県飯田家畜保健衛生所の神田章先生 (当時) 他、長野県の家畜保健衛生所の所員の方々に多大なご協力を頂きました。私達の研究グループで開発したワクチンが現在も国内及び海外に潤沢に供給されているのは、日生研株式会社の製造部・品質管理部・品質保証部・国内営業部・海外事業部、他多数の社員のご協力によるものです。これらの皆様に心よりお礼申し上げます。

最後になりましたが、この度過分なご評価を頂き、栄えある藤崎優次郎賞を受賞させて頂くにあたり、会長の津田知幸先生、選考委員各位、そして会員各位に深く御礼申し上げます。

利益相反状態の有無

著者は開示すべき利益相反はない。

引用文献

- 1) Cross RF. (1962) *Bordetella bronchiseptica*-induced porcine atrophic rhinitis. J Am Vet Med Assoc, 15: 1467-1468.
- 2) de Jong MF, et al. (1990) Definition of progressive atrophic rhinitis. Vet Rec, 126: 93.
- 3) Frey J, et al. (1993) *Actinobacillus pleuropneumoniae* RTX-toxins: uniform designation of haemolysins, cytotoxins, pleurotoxin and their genes. J Gen Microbiol, 139:1723-1728.
- 4) Imada Y, et al. (2004) Serotyping of 800 strains of *Erysipelothrix* isolated from pigs affected with erysipelas and discrimination of attenuated live vaccine strain by genotyping. J Clin Microbiol, 42: 2121-2126.
- 5) 神田章ら (2011) 新しい遺伝子型を示す豚丹毒菌が分離された敗血症型豚丹毒の発生事例. 獣医畜産新報 JVM, 64:905-909.
- 6) 神田章ら (2012) 609G 遺伝子型豚丹毒菌株感染による敗血症型豚丹毒の発生事例とその制御. 豚病会報, 60:17-20.
- 7) Koyama H, et al. (2007) Isolation of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serovar-15 like strain from a field case of porcine pleuropneumonia in Japan. J

- Vet Med Sci, 69: 961-964.
- 8) Nagai S, et al. (1993) *hlyIA*-like sequence present in a genetic locus with low homology to *appA* in *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 10. J Vet Med Sci, 55: 813-819.
 - 9) Nagai S, et al. (1993) DNA sequence analysis of an allelic variant of the *Actinobacillus pleuropneumoniae*-RTX-toxin I (ApxIA) from serotype 10. Microb Pathog, 15: 485-495.
 - 10) Nagai S, et al. (1994) Differentiation of toxigenic from nontoxigenic isolates of *Pasteurella multocida* by PCR. J Clin Microbiol, 32: 1004-1010.
 - 11) 長井伸也 (2002) 無毒変異型細胞毒素を用いた豚胸膜肺炎予防液の開発. 農林水産技術研究ジャーナル, 25:45-48.
 - 12) Nagai S, et al. (2008) Differentiation of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains by nucleotide sequence analysis of a hypervariable region in the *spaA* gene: discrimination of a live vaccine strain from field isolates. J Vet Diagn Invest, 20: 336-342.
 - 13) Rutter JM. (1983) Virulence of *Pasteurella multocida* in atrophic rhinitis of gnotobiotic pigs infected with *Bordetella bronchiseptica*. Res Vet Sci, 34: 287-295.
 - 14) Shiraiwa K, et al. (2015) Development of an SNP-based PCR assay for rapid differentiation of a Japanese live vaccine strain from field isolates of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. J Microbiol Methods, 117: 11-13.
 - 15) Takahashi K, et al. (2001) A cross-protection experiment in pigs vaccinated with *Haemophilus parasuis* serovars 2 and 5 bacterins, and evaluation of a bivalent vaccine under laboratory and field conditions. J Vet Med Sci, 63: 487-491.
 - 16) To H, et al. (2005) Development of a genetically modified nontoxigenic *Pasteurella multocida* toxin as a candidate for use in vaccines against progressive atrophic rhinitis in pigs. Am J Vet Res, 2005 66: 113-118.
 - 17) To H, et al. (2007) Genetic and antigenic diversity of the surface protective antigen proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Clin Vaccine Immunol, 14: 813-820.
 - 18) To H, et al. (2012) Characterization of *Erysipelothrix rhusiopathiae* strains isolated from recent swine erysipelas outbreaks in Japan. J Vet Med Sci, 74: 949-953.