

豚伝染性胃腸炎生ワクチンの開発実用化

古内 進 (農林水産省家畜衛生試験場)

Furuuchi, S. (1993). The development and prevails of the live virus vaccine for transmissible gastroenteritis in pigs. *Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.*, 22:12-17.

ウイルス感染症は、その感染経路によって、大きく2つのパターンに分かれる。第一はリンパ系や血液系の感染により全身感染を起こす疾病であるが、このような疾病には既に多くの優れたワクチンが開発され、発生は著しく減少している。第二は呼吸器、消化器または神経系に親和性を有する局所感染症で、ウイルスは局所組織に限局するため、このような疾病のワクチン開発は難しく、防圧も困難である。豚伝染性胃腸炎はこの消化器感染症の一つである。

1. 豚伝染性胃腸炎 (TGE) の病性：

本病の原因である豚伝染性胃腸炎 (TGE) ウイルスはコロナウイルス科に属し、年齢を問わず全ての豚に感染する。新生豚の場合、ウイルスは全身感染を起こすが、年齢と共にウイルスの増殖は消化器系組織に限局してくる。

感染豚の主な症状は水様性下痢と嘔吐であるが、発病率及び病勢は年齢によって異なり、症状は若齢豚ほど重い。感染豚ではウイルス感染により小腸絨毛の脱落が起こり、水分の吸収はほとんど停止するため脱水状態に陥り易く、生後一週齢以内の子豚は数日のうちにほとんど死亡する。死亡率は年齢と共に低くなるが、若齢豚ほど体重の回復は遅く、いわゆるヒネ豚となりやすい。

本病はほとんどの場合、母豚と新生豚が同時に感染するので、周産期病または母子感染症とも言われ、現在のような経営規模の大きな一貫経営の養豚場では、一旦発生するとその経済的被害は極めて大きい。

2. 発生疫学：

本病の発生は気候と密接な関係を示し、地域的に見ると、その発生はほとんど温帯から寒帯の養豚地帯に集中している。

また、季節的にも1～3月をピークに晩秋から春にかけて多発するのを特徴としている。最近ではほとんど発生は見られ

ないが、抗体の陽性率から本病が依然として存在していることが確認されている。本病の主な伝播源は豚であり、一貫経営による導入豚の減少が本病発生低減の大きな理由と考えられる。

3. TGE免疫機構と乳汁免疫：

TGEに感染・耐過した母豚から生まれた子豚は、母豚からミルクを哺乳している間は本病に感染しない。この免疫様式を乳汁免疫 (lactogenic immunity)⁵⁾ と言い、従来本病のワクチン開発研究は、この乳汁免疫を基盤とした受身免疫法で進められてきた。この乳汁免疫を司る抗体のグロブリンクラスは主としてIgAであり、乳汁中に長く存在する。強毒ウイルスに感染した母豚の場合、このIgA抗体が多く、長期間産生されるので乳汁免疫が成立する。しかし、弱毒ウイルスの免疫で産生される抗体のグロブリンクラスは主としてIgGであり、乳汁中におけるIgG抗体の低下は早いので、弱毒ウイルスによる乳汁免疫は困難である¹⁾。

そこで弱毒ウイルスにより効果的な乳汁免疫を得るためには、高い値のウイルス量、接種経路、接種回数などの3条件が重要な要因で、これらを効率良く組み合わせ、乳汁中へ高濃度の抗体を産生させることが必要である (表1)。

いっぽう乳汁免疫では、ワクチン接種後免疫を獲得するまでに約2か月を要するので、本病の発生時や蔓延防止のためには、その免疫効果は余り期待出来ない。

4. TGEの能動免疫：

1) 研究の発端：

上記の理由から、早期に強い免疫が得られる新しいワクチンの開発が強く望まれてきた。それを可能にし

表1 TGEウイルス弱毒IO-163株による乳汁免疫の感染防御試験

豚	接種量と経路 (ウイルス価) [*]	攻撃時の中和抗体価		発病率 %	死亡率 %	母豚の 発病
		血清	乳汁			
2450	m5・m5・m5	1024	8	100	100 (1/1)	+
2563	M7 M7	256	16	100	100 (9/9)	+
2394	M8・M8・M8・M8	128	4	100	75 (6/8)	+
2561	N7 m7	512	128	100	100 (8/8)	+
2562	M7 N7	128	6	100	50 (4/8)	+
2632	M8 N9	2048	128	100	0 (0/4)	+
2685	M9 N9	2048	512	11	0 (0/9)	-
2697	M9 N9	1024	1024	0	0 (0/7)	-

小文字は不活化, M, mは筋肉内, Nは鼻腔内を示す

^{*}: TCID₅₀/ml (log)

表2 TGEウイルス接種新生豚の臨床症状

ウイルス株	継代数	接種頭数	潜伏期(日数)	症 状 (頭数)			死 亡 豚	
				食欲不振	軟便	下痢	頭数 (接種後死亡までの日数)	死亡率(%)
T O	15	7	1~5	7	0	7	2 (5, 5)	(28.5)
	163	8		0	0	0	0	0
S H	16	8	1	8	0	8	7 (4, 4, 4, 4, 7, 7, 11)	(87.5)
	164	5	2	0	3	2	0	0

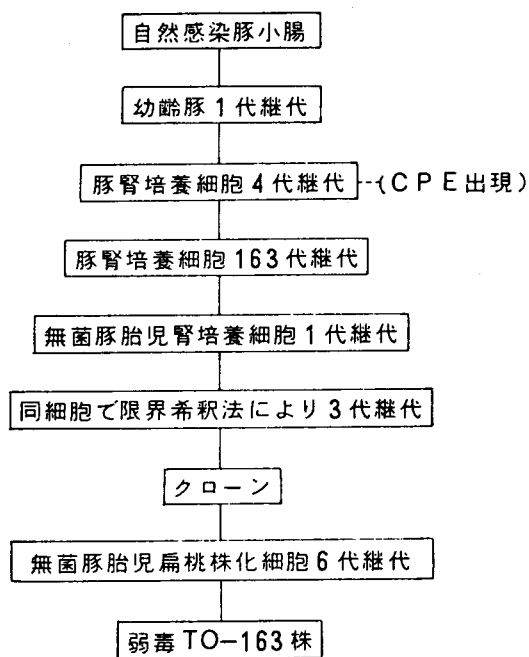


図1 TGEウイルス弱毒TO-163株の作出過程

たのが弱毒ウイルスを直接新生豚に経口投与する能動(自動)免疫である。

TGEの能動免疫に関する研究の発端は乳汁免疫(受身免疫法)の研究過程から得られた。すなわち、乳汁免疫においてTGEウイルス抗原の粘膜への刺激と産生される抗体のグロブリンクラスとの関連を調べるため、弱毒ウイルスを分娩直前の妊娠豚の各乳頭から乳房内へ接種したところ、分娩3日後をピークにウイルスは乳汁中に排出され、その母豚から生まれた新生豚は下痢等の症状も全く示さず、4日目以後の強毒ウイルスの攻撃に対し感染防御を獲得した。この結果

から、能動免疫によるワクチンの開発の可能性を見出し、以後ウイルスの性状、安全性、効力、野外試験、ワクチンの製造法について順次研究を進めた。

2) 弱毒ウイルスの作出と性状:

能動免疫では新生豚へ直接ワクチンを投与するため、ウイルスの病原性が全くないこと、免疫が早期に発現することが求められる。

そこで先ず第一に、ウイルス株間の病原性の比較をおこなった。その結果、原田らが弱毒化を進めてきたウイルス株のうち、TO株は他の株に比べ病原性は著しく低く、新生豚に対しても全く病原性のないウイルス株であることが分かった⁴⁾(表2)。次いで、継代の異なるウイルスについて株間の安全性を比較してTO-163株を選定した後、クローニングを行い、ワクチン製造のための原種ウイルス株を作出した(図1)。

ポリオやハシカなどの生ワクチンとして使用されている弱毒株は強毒株と種々の異なった遺伝的特性を持っており、これらの性状はワクチンウイルスとしての安全性を示す指標となっている。このように、弱毒株をワクチンとして用いる場合、試験管内で証明し得る生物学的、理化学的な特性を明らかにしておくことはワクチンの製造・検定上、極めて重要である。

本ワクチンも生後間もない新生豚に直接投与するため、ウイルス株の厳格な品質管理が要求される。そこで次ぎに弱毒TO株と強毒SH株の生物学的性状を比較検討した。

その結果、増殖温度域は両株間で著しい差が認められ、弱毒TO株の増殖域は強毒SH株に比べ、低温域に移動していることが分かった³⁾(図2)。また、弱毒TO株はトリプシンやペプシンなどのタンパク分解酵素に対する感受性も強毒SH株とは異なり、弱毒TO株はこれらの酵素によって急速に不活化されることも明らかになった³⁾(図3)。

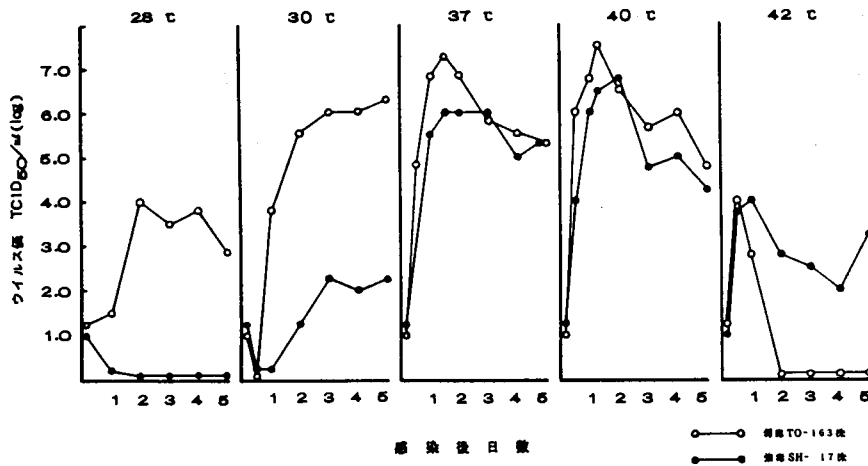


図2 弱毒および強毒TGEウイルスの各種温度における増殖曲線

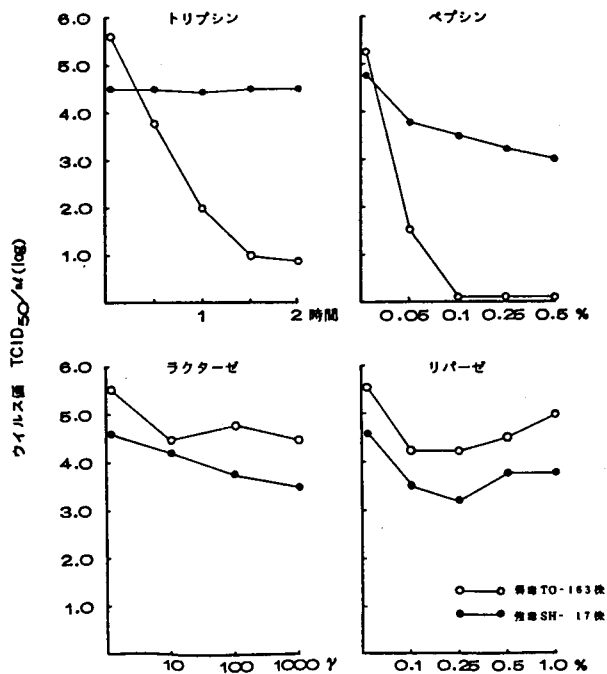


図3 TGEウイルスの各種酵素に対する抵抗性

3) 生体内でのウイルスの増殖性と免疫原性:

弱毒TO株を新生豚に接種し、ウイルスの体内増殖能と免疫獲得との関係を調べた。その結果、新生豚体

内でのウイルス増殖能は環境温度によって著しく異なり、低温ほどウイルスの増殖は良く、高温ではほとんど増殖性を示さないことが明らかになった⁴⁾ (表3)。

表3 異なる環境温度で飼育した新生豚体内でのTGEウイルス弱毒株(TO-163株)の増殖

豚 番 号	環 境 温 度					
	8~12℃			20~23℃		35~37.5℃
	1 (7)	2 (7)	3	4	5	6 7
鼻 粘 膜	※※	※※				
気 管	1.0	3.5	0.63	2.5	0	0 0
肺	0.75	3.0	1.75	0.75	0	0 0
肺 門 リンパ 節	1.5	6.25	0	3.25	0	0 0
腸 間 膜 リンパ 節	2.75	3.0	2.0	1.0	0.88	0 0
脾 臓	2.75	4.25	3.0	2.75	2.25	0 0
肝 臓	1.75	4.5	3.5	1.5	0	0 0
膵 臓	5.25	4.25	4.0	0	1.75	0 0
腎 臓	0.75	0	0	0	0	0 0
胸 腺	1.5	0	0	0	0	0 0
脾 臓	2.75	1.13	2.5	0	0	0 0
胃	0	0	0	0	0	0 0
膵 臓	0	0	0	0	0	0 0
胸 腺	0.75	0	0	0	0	0 0
脾 臓	0.63	0	0	0	0	0 0
食 道	2.5	1.13	0	0.63	0	0 0
胃	1.5	0.75	0	0	0	0 0
十 二 指 腸	1.13	0	0.63	0	0	0 0
空 腸	4.5	3.5	1.0	0	0	0 0
回 腸	4.5	0	0	0	0	0 0
結 腸	0	0	1.13	0	0	0 0
血 清	3.75	0.63	0.75	0	0	0 0

※ 10 倍乳剤 ※※ ウイルス価 TCID₅₀/ml (log)

表4 TGEウイルス弱毒TO-163株接種豚の感染防御試験

環 境 温 度 (℃)	強毒ウイルス攻撃時までの経過日数					
	1	2	3	4	5	6
18~22	0/3	0/3	2/4	4/4	5/5	3/3
31~34	0/1	0/1	0/4	0/4	0/4	0/3

生残頭数/攻撃頭数

これに反し、強毒ウイルスの増殖は環境温度の影響をほとんど受けていない。このように、環境温度が新生豚体内の弱毒ウイルス(TO株)の増殖を規制している重要な因子であることが明らかにされた。

環境温度の影響はこのウイルスによる感染防御能にも強く反映し、常温で弱毒TO株を経口投与した豚では、3~4日後に強毒ウイルスに対し感染防御は成立するが、高温では全く成立していない⁴⁾(表4)。

このように、環境温度によって生体内でのウイルスの増殖性が異なる原因は明らかでないが、このウイルスが低温域で増殖し易いこと、かつ新生豚は体温調節機能が未熟であり、体温が環境温度の影響を直接受け著しく変化すること、などが理由と考えられる。

4) 能動免疫の免疫機構:

能動免疫成立の要因として一般に細胞性免疫と腸管でのIgA抗体の関与が考えられる。しかし、この場合、細胞性免疫の関与は低いと考えられる。その理由として、弱毒ウイルスは消化器内ではほとんど増殖し得ないこと、細胞性免疫能は分娩前後の母豚では低下すること、新生豚のリンパ球、K及びNK細胞はTGEウイルス感染細胞に対するエフェクター細胞としての活性が低いこと²⁾、強毒ウイルス感染の場合でも細胞性免疫の成立は7~11日以降であること⁶⁾、などが挙げられる。

むしろ、本ウイルスは常温で腸間膜リンパ節や上部気道の付随リンパ節から定常的に検出されることから、リンパ節での弱毒ウイルスの増殖が強毒ウイルスの増殖阻止に重要な役割を果たしていると考えられる。さらに、新生豚の局所免疫細胞の成熟は極めて早く、生後5~7日で既にIgM・IgAを産生していることから⁷⁾、分泌性抗体の関与も考えられる。

5) 野外試験:

実験室内での成績をふまえ、新生豚に対する野外応用試験を実施したところ、その安全性が確認された(表5)。また、その免疫効果をワクチン接種後の中和抗体のテーク率、抗体価から判定したところ、抗体陰

性豚ではワクチンのテーク率は極めて良い成績が得られた(図4)。

さらに、本病の発生地域および養豚場でも緊急に用いられ、極めて高い感染防御能や万延防止効果の結果が得られた。

以上、これまで示したような開発研究の過程を経て、豚伝染性胃腸炎において新生豚に対し能動免疫法によるワクチンの開発・実用化が可能となった。

この研究は、豚伝染性胃腸炎研究の基礎を世界で初

めて築いた元家畜衛生試験場の原田熊幸先生の業績において初めて可能となり、当時の豚コレラ研究室長：清水悠紀臣先生(現北大教授)の指導と、清水実嗣氏(現ウイルス第二研究室長)及び内村昭彦氏(現製剤工学研究室)の協力下に進められたものである。

引用文献

- 1) Bohl, E. H. and Saif, L. J. (1975). Passive immunity in transmissible gastroenteritis of swine: Immunoglobulin characteristics of antibodies in milk after inoculating virus by different routes. *Infect. Immun.* 11:12-32.
- 2) Cepica, A. et al. (1984). Antibody-dependent and spontaneous cell-mediated cytotoxicity against transmissible gastroenteritis virus-infected cells by lymphocytes from sows, fetuses and neonatal piglets. *Can. J. Comp. Med.* 48:258-261.
- 3) Furuuchi, S. et al. (1975). Comparison of properties between virulent and attenuated strains of transmissible gastroenteritis virus. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 15:159-164.
- 4) Furuuchi, S. et al. (1976). Vaccination of

表5 TGE生ワクチン野外応用試験実施状況

県名	戸数	母猪数	実施頭数	接種豚			対照豚		
				計	異常	死亡	計	異常	死亡
北海道	5	18	72	36	0	1	36	0	1
宮城	7	22	88	44	0	0	44	0	0
茨城	1	25	100	55	10	0	50	8	0
栃木	3	41	172	86	0	2	86	0	4
群馬	1	22	87	44	0	1	43	0	3
千葉	5	50	318	161	5	0	157	3	1
静岡	12	24	95	47	2	2	48	0	0
新潟	2	9	84	47	0	4	37	1	0
岡山	5	25	100	50	0	0	50	0	0
熊本	1	40	230	130	1	0	100	0	0
計	42	276	1,346	700	18	10	651	12	9
(%)					(2.57)	(1.43)		(1.84)	(1.38)

移行抗体陰性地域

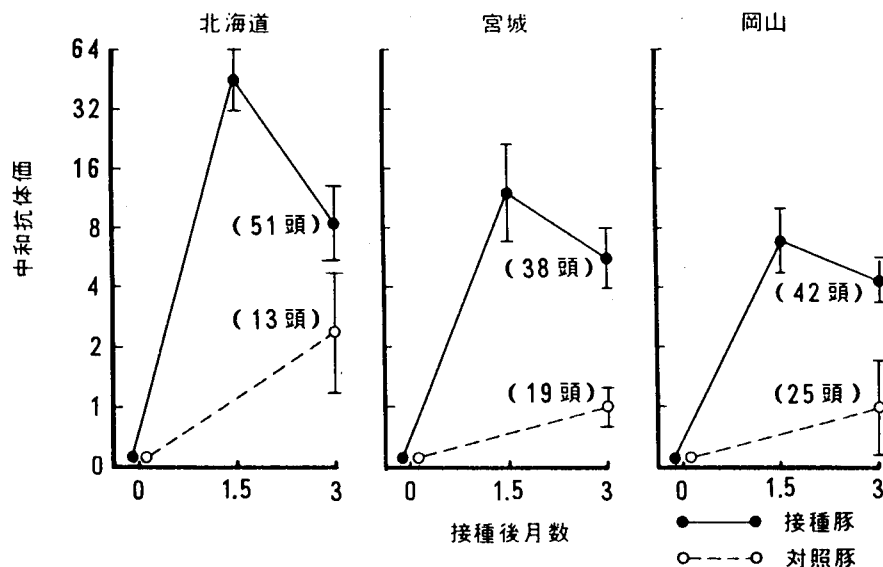


図4 TGE生ワクチン接種豚の中和抗体価の推移

newborn pigs with an attenuated strain of transmissible gastroenteritis virus. *Am. J. Vet. Res.* 37:1401-1404.

- 5) Haelterman, E. O. (1963). Transmissible gastroenteritis of swine. *Proc. 17th World Vet. Congr.* Hannover. 1:615-618.
- 6) Shimizu, M. and Shimizu, Y. (1979). Lymphocyte proliferative response to viral antigen in feeder pigs infected with transmissible gastroenteritis virus. *Infect. Immun.* 23 : 239 - 243.
- 7) Stone, S. S. et al. (1982). Serum antibody responses of neonatal and young adult pigs to transmissible gastroenteritis coronavirus. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 3:529-533.

(第43回日本豚病研究会発表)

住所：〒305 つくば市観音台3-1-1

SPF豚集団変換による疾病防除

柏崎 守 (農林水産省家畜衛生試験場)

Kashiwazaki, M. (1993). Diseases control by re-population with SPF pigs. *Proc. Jpn. Pig Vet. soc.*, 22:17-20.

1. はじめに

家畜衛生試験場では、昭和40年から種々の病原体に汚染していないSPF豚の生産を開始した。SPF豚生産の目的は実験動物としての利用を図るためであり、無菌豚やSPF豚の生産・利用技術を確認して動物実験として使用するほか、診断液やワクチンの製造原料として供給することにあった。

その一方、SPF豚を実験動物としてばかりでなく産業動物としても利用できれば、豚病の防除技術としての期待も大きい。そこで、SPF豚の産業利用を図るため、家畜衛生試験場は県や民間企業と連携して技術開発に取り組んだ。わが国におけるSPF豚の歴史は30年近くなるが、今日のSPF豚生産方式が確立されるまでには多くの試行錯誤が繰り返された。その間の開発の経緯については波岡 (1992) ¹⁾ が解説しているの、ここではSPF豚集団変換計画に必要な技術開発を中心に解説する。

2. SPF豚の生産技術と特性

(1) SPF豚の作出・飼育管理技術の確立

胎児の無菌摘出法の確立^{1, 9)}：一般的には新生子豚は分娩直後に産道や外界、また同居の母豚から病原体を含む種々の微生物に汚染される。このような微生物汚染を防ぐためには妊娠末期の母豚から帝王切開や子宮切断などの外科手術によって無菌的に摘出する必要がある。このため、胎児の無菌摘出のための術式を確立するとともに、これに必要な手術用アイソレータと子豚を無菌的に飼育するためのアイソレータを考案した。摘出胎児の蘇生率は平均95%以上であり、自然分娩の場合に比較して大差ない。

第一次SPF豚の人工哺育法の確立⁴⁾：摘出子豚はただちに清浄な飼育室の単飼用アイソレータに収容して無菌人工乳により2～3週間ほど哺育するが、この間に必要があればドライブラズマや乳酸菌製剤を投与する。さらに群飼用オープンペンに移してさらに2～3週間飼育を続けるが、この間にSPF豚用固形飼料を与えて離乳する。人工哺育による育成率は平均95%以上であり、自然哺育の場合よりも良好な成績が得られる。

このような方法で人工哺育された第一次SPF豚は実験動物としても有用であるが、産業動物として使用する場合はさらに一般の豚が飼育されていないSPF豚専用農場へ運搬し、厳重な隔離状態の下で繁殖素豚として育成される。交配は8～9カ月齢から開始して自然分娩により第二次SPF豚を生産する。

SPF豚用飼料の開発³⁾：SPF豚用飼料は飼料メーカーとの共同研究により開発した。第一次SPF豚の人工哺育用に開発した液体無菌人工乳は罐詰製品で長期保存が可能である。人工乳給与子豚の増体量は母豚乳による哺育の場合と比べて概ね同程度の成績が得られ、また免疫物質や抗菌性物質が含まれていないので、実験用SPF豚や無菌豚の哺育用人工乳としても使用できる。

一方、一般の固形飼料は種々の微生物によって汚染されており、飼料を介して病原体に感染する危険性が高いので、そのままSPF豚の飼料として使うわけにはいかない。そこで、ペレット飼料の製造時における加熱工程を調節することによって1g中の総菌数50万個以下、大腸菌陰性のSPF豚専用飼料(ペレット製品)を開発した。

(2) SPF豚の特性解明

第一次SPF豚の人工免疫^{5, 7)}：子豚は初乳を介して免疫グロブリンが体内に移行することによって感染抵抗性を獲得する。しかし、第一次SPF子豚の場合