

組換え表層防御抗原 SpaA を用いた豚丹毒の ELISA

今田 由美子

(独立行政法人動物衛生研究所：〒305-0856 茨城県つくば市観音台3-1-5)

Imada Y. (2001): Development of surface protective antigen-ELISA for the detection of protective antibody against swine erysipelas. *Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.*, 39, 19-23.

はじめに

豚丹毒は、豚に伝染性の急性敗血症死を起こす病気として古くから知られ、典型的な死亡例では、全身の皮膚に紅いチアノーゼがみられることから Swine Erysipelas (Red Skin の意) の名前が付けられている。このほかに亜急性に経過するじんま型や、慢性に経過する慢性型関節炎・心内膜炎も起こす。原因菌は *Erysipelothrix rhusiopathiae* という、グラム陽性の小桿菌で、主として経口ルートで母豚あるいは同居豚から感染する。

1 豚丹毒の現状

豚丹毒はわが国では、昭和41~42年にかけて合計4万頭以上の大発生をして以後、ワクチン接種の普及に伴って一旦は減少したが、昭和60年から再び増加に転じ、最近の15年間は年間4~5千頭の発生がある。昭和60年以降の発生の特徴は約半数を食肉検査所での慢性型豚丹毒による全廃棄が占めるという点である。

なお、豚の敗血症型から分離される豚丹毒菌の血清型はすべてが血清型1と2に属し、その他の病的材料由来株も殆どが血清型1と2に属し、血清型1と2の豚丹毒菌はすべて *E.rhusiopathiae* である。このことから豚の豚丹毒対策は、*E.rhusiopathiae* の血清型1と2の菌を対象とすべきことが分かる。一方、健康な豚の扁桃から分離される豚丹毒菌の40%はその他の血清型で、この中には豚に病原性がない *E.tonsillarum* も一部含まれている。

2 豚丹毒の問題点

豚丹毒の予防法としては、豚群の清浄化、生菌ワクチンあるいは不活化ワクチンの接種、ならびに発病誘因の排除がある。また、発生群に対しては発病予防としての投薬も行なわれる。野外では生菌ワクチンを接種しているにも関わらず発生する例も散見されているが、こういった予防上の問題点は、豚群の清浄度の判

定、あるいはワクチン接種の際の移行抗体の消失時期やワクチンに対する免疫応答を、従来の手法では的確に判定できていないことも一因と考えられる。そこで、感染防御に関与すると考えられていた2種類の抗原、64~66kDa蛋白とノイラミニダーゼについて遺伝子をクローニングすることから検討を始めた。

3 表層防御抗原 SpaA

我々は、64~66kDa蛋白とノイラミニダーゼいずれのクローニングにも成功したが、ノイラミニダーゼにはマウス感染防御活性が全く認められなかった。一方、64~66kDa蛋白すなわち表層防御抗原 SpaA はマウスだけでなく豚も感染防御することが証明できた。

精製組換え SpaA で免疫した豚各群2頭は血清型1aと2b型のどちらの強毒株の攻撃に対しても、無症状で耐過した。一方、非免疫対照豚は1a型の攻撃では敗血症死し、2b型の攻撃では重篤な敗血症を示した。この結果は、SpaA という1種類の抗原で豚を主要な豚丹毒菌から完全に防御できることを示している。

表層防御抗原 SpaA は、分泌に必要なシグナル配列をもった前駆体として合成され、合成途中でシグナル配列が切り離されて、残りが分子量69kDa(1a型強毒株である藤沢株の場合)の成熟型 SpaA として菌体外に分泌される。感染防御には SpaA の前半70%が関与し、後半30%は分泌された SpaA が菌体表層に結合するのに関与している。我々が豚やマウスでの感染防御試験に使用した SpaA は先を少し欠いた防御領域である。

成熟型 SpaA は菌体外に分泌されたのち、結合領域を使って菌体の表層に結合するが、豚丹毒菌の培養上清中にみられる約48kDaの低分子防御抗原は、結合領域から切れて菌体に結合できなくなった SpaA の前半部分と考えられる。

4 SpaA の ELISA 抗原性

組換え SpaA 断片のうちマウス感染防御活性を示した5種類について、間接法 ELISA における抗原性を比較した。その結果、SpaA 全長と防御領域全長 (SpaA416) に高い反応性が認められ、これまで有用性を報告してきたサンドイッチ法 ELISA と同様、各種ワクチンに対する抗体応答を感度よく検出することができた (図1、2)。このうち収量がよい SpaA416 を以後 SpaA-ELISA 抗原として使用した。

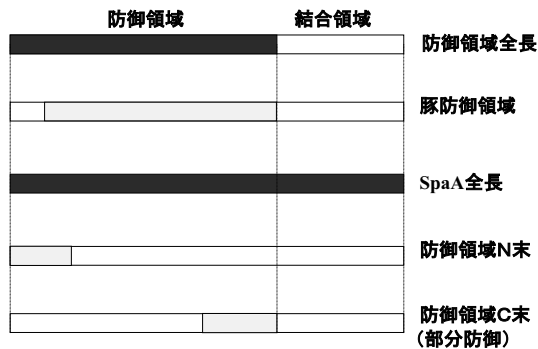


図1 マウス感染防御活性を示す組換え SpaA 断片

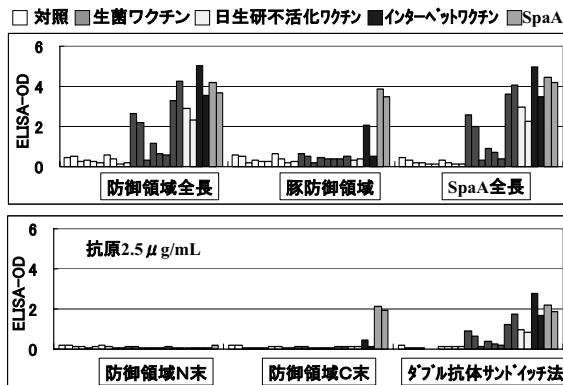


図2 マウス感染防御活性 SpaA 断片の間接法 ELISA 抗原性

なおダブル抗体サンドイッチ法には、豚丹毒菌からアルカリ抽出した抗原をウサギ抗 SpaA 抗体で ELISA プレートにトラップする際、SpaA と結合しているその他の抗原もトラップする欠点がある。これに対し、精製組換え SpaA416 を用いる間接法では、SpaA 抗体だけを特異的に検出できる。

5 生菌ワクチン実験豚血清の反応

SpaA-ELISA の感度と特異性を、まず各種ワクチンで免疫し感染防御試験を行った実験豚の血清を用いて調べた。特に断らない限り免疫豚はすべて無症状で耐過し、対照豚は敗血症死ないし全身性の発病をしたも

のである。

生菌ワクチン接種豚と対照豚各2頭の抗体応答を平均値でみると (図3上)、免疫豚ではワクチン接種2~3週後から抗体が検出され、攻撃後さらに増加している。これに対し、対照豚では免疫時から攻撃1週間まで抗体陰性で、抗体応答は免疫豚より1週間遅い攻撃2週後から検出された。なおこれらの対照豚は発病後治療した。

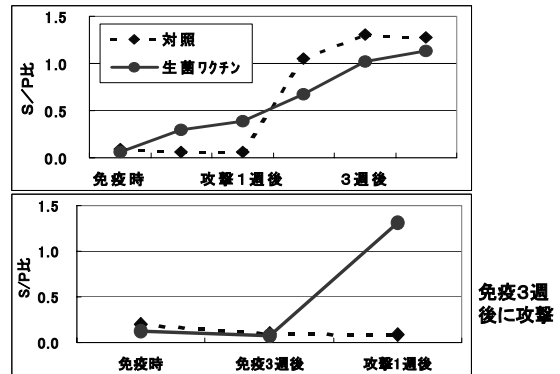


図3 生菌ワクチン実験豚の抗体応答例および阻害例

図3下は、同じく生菌ワクチン接種豚と対照豚各6頭の抗体応答を平均値でみたものである。この例では、ワクチン接種時に S/P 比0.2程度の移行抗体が残っており、このために免疫群の抗体応答が完全に阻害され、抗体価は逆に攻撃時にかけて低下していることが明瞭にわかる。しかし免疫群は対照豚と異なり攻撃後わずか1週間で強い抗体応答を示したことから、感作はされていたことが分かる。これらの免疫豚の防御成績は、完全な耐過から敗血症死まで様々で、完全な感染防御には ELISA 抗体価の上昇が必要と考えられた。

豚丹毒の生菌ワクチン免疫に及ぼす PRRS ウイルスの影響をみた全農家畜衛生研究所の実験豚の抗体応答をみたところ、各群5頭の免疫時の抗体価は全群陰性で、PRRS ウイルス感染を先行させた群および生菌ワクチン単独免疫群は攻撃時に S/P 比0.4の抗体価の上昇を示し、攻撃から完全に防御された。

一方、生菌ワクチン免疫1週後に PRRS ウイルスを感染させた群では、抗体応答が上記2群に比べて半分以下に阻害されていた。この群は抗体価が幾分上昇したものの攻撃がウイルスの増殖時期と重なったため、対照群と同等の発病をした。

生菌ワクチン単独免疫群、対照群について実施したラテックス凝集反応では、両群はともに免疫時から攻撃1週後まで終始高い抗体価を示し、免疫に伴う抗体

価の変動も殆どなく、抗体価と感染防御との関連性が認められなかった。

6 各種ワクチンで免疫した実験豚の反応

実験豚のうち、生菌ワクチン接種豚18頭、日生研の不活化ワクチン接種豚4頭、対照豚15頭の抗体応答をELISAでみたところ、免疫時の抗体価は全群が陰性で、免疫群では攻撃時までに上昇し攻撃によりさらに増加した。一方、対照群では抗体価は攻撃時も陰性で、攻撃1週後の上昇もわずかであった。なおこれらの生菌ワクチン接種豚には、上記移行抗体による抗体応答阻害例6頭とPRRSウイルスによる抗体応答阻害例5頭は含んでいない(図4)。

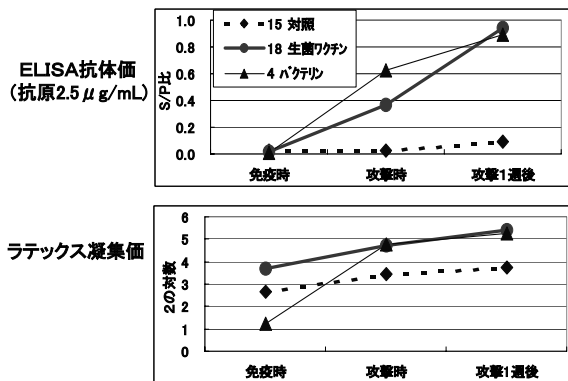


図4 生菌ワクチンおよび日生研不活化ワクチン実験豚血清の抗体応答

実験豚のうち、インターベット不活化ワクチン接種豚3頭、組換えSpaA免疫豚7頭、対照豚15頭の抗体応答をELISAでみたところ、免疫時は全群が抗体陰性で、免疫群では攻撃時までに急上昇した。一方、対照群では攻撃時も攻撃1週後も陰性であった(図5)。なお、これらのワクチンについては、血清の反応性が

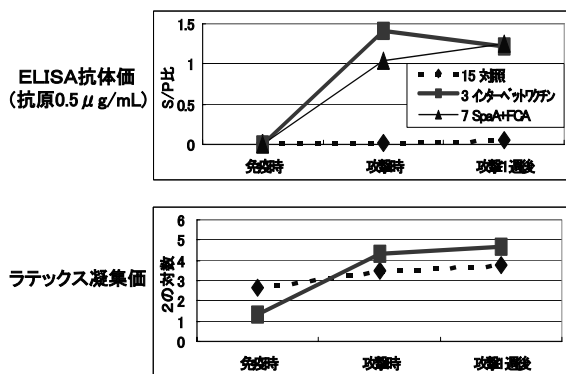


図5 インターベット不活化ワクチンおよびSpaA実験豚の抗体応答

生菌ワクチンおよび日生研の不活化ワクチン接種豚に比べ非常に強いいため、ELISAは抗原濃度を1/5に下げたで実施してある。

7 野外豚血清への応用

以上の実験豚血清を用いた試験の結果、SpaA-ELISAでは、全頭が発病した対照豚では攻撃時の抗体価がすべて陰性、全頭が防御された各種ワクチン免疫豚では攻撃時の抗体価がすべて陽性と、理論どおりの反応を示した。そこでさらに野外豚の血清を用いてELISAの応用性を検討した。

まず、岩手県の野外肉用豚群から日齢別に採取された血清のELISA抗体価を例に説明する。母豚が年1回の生菌ワクチン補強接種を受けているA、B、Cの3農場のうちA農場では、子豚はワクチン未接種で、理論どおり移行抗体だけが検出された。B農場では、子豚は70日齢でワクチン接種を受けており、理論どおり接種3週後の90日齢で抗体上昇が認められた。C農場では、移行抗体価がB農場に比べてかなり高かったためか、子豚は60~70日齢でワクチン接種を受けているにも拘わらず、免疫後の抗体応答は微弱であった。D農場では、母豚はワクチン未接種であるため、殆どの子豚は移行抗体を持たなかった。子豚は70~90日齢でワクチン接種を受けているが、ワクチン接種前にも抗体価がS/P比約1.5と非常に高い個体がみられ、この群に保菌豚が混在していることが推察された。

8 母豚と出荷時肉豚の抗体価の関係

野外血清へのELISA応用試験の結果、野外の農場はELISA抗体価をもとに、殆どの個体の抗体価が低い清浄群、高抗体価と低抗体価の個体が混在する中等度汚染群、殆どの個体の抗体価がS/P比1以上を示す高度汚染群の3種類に大別された。

これについて、富山県の母豚と出荷時肉豚のELISA平均抗体価を例に説明する。これらの母豚は子豚期に1回生菌ワクチン接種を受けた以降はワクチン未接種で、肥育豚は30~60日齢で生菌ワクチン接種を受けている。ELISA抗体価は農場間で大きく異なり、6戸は清浄群、1戸は中等度汚染群、3戸は高度汚染群と考えられた。母豚と出荷時肉豚のELISA平均抗体価は農場毎によく相関していたが、このことは豚丹毒は主として保菌母豚や保菌同居豚から子豚に感染するという、豚丹毒の感染様式を正確に反映していると考えられた(図6)。

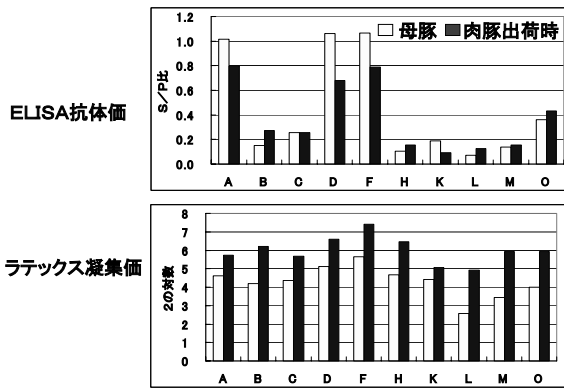


図6 農場別母豚と肉豚出荷時のELISA平均抗体価(富山県)

これらの豚の抗体価をラテックス凝集価で見ると、ラテックス凝集価はELISA抗体価とは相関せず、農場間の抗体価の差は小さかった。従来、生菌発育凝集価は生菌ワクチン接種2週後がピークで接種7週後には殆どが4倍以下に低下するとされたが、ラテックス凝集反応では殆どの農場で出荷時の豚の抗体価が32~64倍と高い値を示した。

9 野生のイノシシの反応

埼玉県下で狩猟により捕獲された野生のイノシシから採取した血清のELISA抗体価をみたところ、殆どが非常に高いELISA抗体価を示した。この結果から、野生イノシシは殆どが保菌しているが、高度な免疫状態にあり、敗血症型豚丹毒による大量死は起きていないことが推察された。

10 SPF豚の反応

動衛研に導入後隔離飼育された、豚丹毒ワクチン未接種の22頭のセカンダリーSPF豚のELISA抗体価を

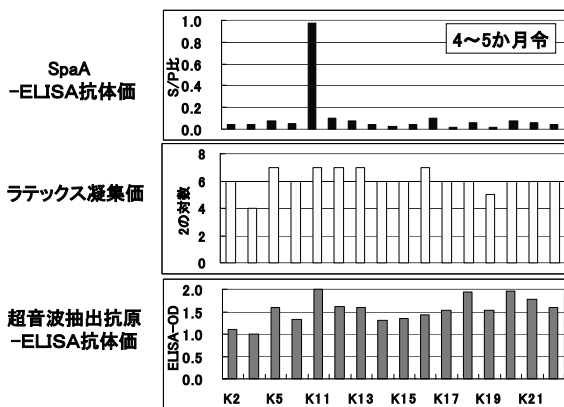


図7 ワクチン未接種セカンダリーSPF豚のELISA抗体価

みたところ、1頭を除き全頭が低い抗体価を示し清浄度と一致した(図7)。しかし、ラテックス凝集反応ならびに豚丹毒菌の超音波抽出抗原を用いた間接法ELISAでは、全頭が清浄度と全く相反する非常に高い抗体価を示し、これらは非特異と考えられる。

11. 敗血症集団発生農場の豚の反応

豚丹毒の被害がないことから長年ワクチンを使用していなかった秋田県の農家で、昨年敗血症型豚丹毒が発生し、1週間で飼養200頭中14頭が死亡した。この農家の平成10~12年の出荷豚各10頭のELISA抗体価は殆どの豚で陰性であったが、平成11年と12年に各1頭のS/P比が1.5前後と非常に高く保菌が疑われる個体がみられた(図8)。敗血症型豚丹毒が発生するには、この農場のように抗体陰性の多数の感受性豚の中に少数の保菌豚が存在する状況が必要であるが、SpaA-ELISA結果はこれを正確に反映していると考えられた。

ラテックス凝集反応では、ワクチンを長年使用していないにも関わらず、殆どの豚が高い抗体価を示し、これが感染防御抗体とすれば沢山の豚が敗血症死亡した状況と矛盾する結果であった。

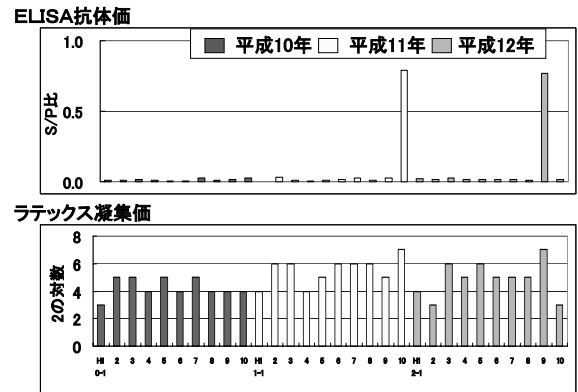


図8 敗血症型豚丹毒発生農場豚のELISA抗体価(秋田県)

12 まとめ及び考察

以上の実験豚ならびに野外豚へのELISAの応用成績を総合すると、SpaA416を用いたSpaA-ELISAは、①従来の抗体測定法に比べ特異性が非常に高い。②感染防御抗原であるSpaAの精製組換え蛋白を抗原としているため、SpaAに対する抗体応答を特異的かつ高感度に検出できる。③組換え蛋白であるため、豚丹毒菌から調製するのに比べて一定の品質の抗原調製が容易である。という大きな利点を持った、有用な抗体検

査法であると考えられた。

13 謝辞

SpaA-ELISA の検討にあたり、沢山の貴重な血清ならびに農家情報やラテックス凝集反応成績などを提供して頂いた下記の方々に深謝いたします。

全農家畜衛生研究所阪野哲也、秋田県中央家畜保健衛生所工藤一磨、石川県南部家畜保健衛生所早川裕二、高井 光、岩手県水沢家畜保健衛生所長山玲子、埼玉県大宮家畜保健衛生所吉田 徹、富山県西部家畜保健衛生所保田仁美、台藏正司、長野県飯田家畜保健衛生所遠藤純子、JA愛知経済連江口 修、動物衛生研究所森 康行、木嶋真人。