

豚丹毒生ワクチンの安全性の再評価

天野健一、本田隆¹⁾、小川哲夫²⁾、瀧川義康³⁾、山崎康人⁴⁾、染野修一⁵⁾、大石英司⁶⁾

(松研薬品工業株式会社¹⁾ 財団法人化学及血清療法研究所²⁾ 株式会社科学飼料研究所³⁾ 社団法人北里研究所⁴⁾ 共立製薬株式会社⁵⁾ 日生研株式会社⁶⁾ 株式会社微生物化学研究所)

Amano, K., Honda, T., Ogawa, T., Takikawa, N., Yamazaki, Y., Someno, S. and Oishi, E. (2008).

Reevaluation of safety of swine erysipelas live vaccine.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 52, 1-4.

1. はじめに

現在わが国で製造販売されている豚丹毒生ワクチン(以下、生ワクチン)は、アクリフラビン(以下、AF)耐性弱毒豚丹毒菌小金井65-0.15株を製造用株とした凍結乾燥生ワクチンである。本ワクチンは1974年に製造が承認されて以来、長年にわたり野外の豚丹毒の防疫に多大な貢献を果たしてきた。過去30年間、豚丹毒の発生件数が一定レベルで抑えられているのは、生ワクチンによる効果が大いものと思われる。

近年、主としてと畜豚から生ワクチン株と同程度のAF耐性を示す分離株の存在がMakinoら³⁾によって初めて報告された。このAF耐性株の性状はrandomly amplified polymorphic DNA (RAPD)解析やマウス病原性試験の結果、生ワクチン株のそれらとは異なっていた。Sawadaら⁶⁾は、AF耐性及びマウス低病原性の豚丹毒菌が野外に存在し、それらの菌株は病原性と遺伝学的性状(pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)型)において多様性が認められたことを示した。ワクチン株とAF耐性が同程度を示す野外株が存在することから、生ワクチン株と野外株の識別にはAF耐性以外の適切なマーカーが必要であると報告している。

最近、Imadaら²⁾は、主として慢性関節炎を呈するとと畜豚から分離した菌株を用いて、AF耐性及びマウス病原性試験およびRAPD解析を行った。その結果、一部の分離株が生ワクチン株と類似する性状を示したことから、これらの株は生ワクチン株由来であると報告した。

以上の成績から、全身性の感染を起こさないとされてきた生ワクチンの安全性を再評価することが求められ、その一環として豚を用いた生ワクチン接種試験並びに野外における生ワクチンの使用状況と食肉検査所での豚丹毒の発生状況調査を生ワクチンの製造販売を行っている7所社(財団法人化学及血清療法研究所、

株式会社科学飼料研究所、社団法人北里研究所、共立製薬株式会社、日生研株式会社、株式会社微生物化学研究所及び松研薬品工業株式会社)で協同して実施した。

2. 材料及び方法

1) 供試豚

表1に示したように、国内7施設で飼育された10~16週齢のSPF豚及びコンベンショナル豚計74頭を用い、これらを接種群と対照群とに群分けし、出荷時まで同居飼育した。

表1 供試豚

施設	系統	生ワクチン 接種時週齢	出荷(剖検) 時週齢	頭数	
				接種群	対照群
A	LW-F1*・SPF	16	24	9	3
B	LWD**・コンベンショナル	10	22	8	2
C	LWD・コンベンショナル	11	27	9	1
D	LWD・コンベンショナル	12	24	8	2
E	LWD・コンベンショナル	12	23	8	2
F	LWD・コンベンショナル	14	25	10	2
G	LWD・コンベンショナル	15	23	8	2
(合計)				60	14

*:ランドレース・大ヨークシャー 一代交雑種

** :ランドレース・大ヨークシャー・デュロック 三元交雑種

2) 供試ワクチン

国家検定合格済みの生ワクチンを各所社1ロットずつ用い、各施設の接種群の豚に用法及び用量に従い、頸部皮下に1mLずつ注射した。

3) 臨床観察

生ワクチン接種後2週間、注射局所における丘疹発現(善感反応)の有無、注射局所以外の体表での発赤や丘疹の発現の有無を観察した。また、臨床所見(元気、食欲、体温、四肢関節部の腫脹、跛行等の異常)について出荷時まで観察した。

4) 抗体検査

生ワクチン接種前、接種後3週目及び出荷時に血清を採取し、Heuner¹⁾、松村ら⁴⁾の方法に準じて生菌凝

集（以下、GA）抗体価を測定した。測定には、血清を0.1mol/L 2-Mercaptoethanol（以下、2ME）と混合し、37℃ 1時間処理したもの及び未処理の血清について実施した。

5) 剖検及び豚丹毒の分離・同定

出荷時に剖検を行ない、全身主要臓器、肘・膝関節及びその付属リンパ節（内側腸骨下リンパ節・第1肋骨下リンパ節）を肉眼的に検査するとともに、これらの組織からの豚丹毒菌の分離・同定を試みた。また、異常所見が認められた組織については、病理組織学的検査を行ない、豚丹毒との関連を検討した。

6) 野外調査

2005年1月～2006年1月に実施し、生ワクチン使用農場及び非使用農場からそれぞれ1年間に出荷された豚の頭数及び食肉検査所で豚丹毒と診断され廃棄された豚の頭数について調査した。

3. 成績

1) 臨床観察

臨床観察の成績を表2に示した。

表2 臨床観察成績

施設	善感反応		丘疹の転移		臨床所見	
	接種群	対照群	接種群	対照群	接種群	対照群
A	8/9*	0/3	2/9**	0/3	0/9***	0/3
B	8/8	0/2	0/8	0/2	0/8	0/2
C	9/9	0/1	0/9	0/1	0/9	0/1
D	8/8	0/2	0/8	0/2	0/8	0/2
E	8/8	0/2	0/8	0/2	0/8	0/2
F	10/10	0/2	0/10	0/2	0/10	0/2
G	8/8	0/2	0/8	0/2	0/8	0/2
合計	59/60	0/14	2/60	0/14	0/60	0/14

* : 善感反応が認められた頭数 / 供試頭数

** : 注射局所以外の体表に発赤や丘疹が認められた頭数 / 供試頭数

*** : 臨床的な異常が認められた頭数 / 供試頭数

注射局所における善感反応は、接種群の60頭中59頭で認められた。注射局所以外への丘疹の転移はSPF豚を用いた施設Aの2頭でのみ認められた。

試験期間中、接種群及び対照群のいずれにおいても、臨床所見で異常を呈した豚は認められなかった。

2) 抗体検査

施設ごとの平均GA抗体価の推移を表3に示した。

接種群の接種前の平均GA抗体価は、2ME未処理血清で2.0～13.5倍、2ME処理血清で2.0倍であった。接種後3週目においては、2ME未処理血清で12.3～274.4倍、2ME処理血清で6.3～128.0倍であり、いずれも接種時と比べて抗体価の上昇が認められた。また

表3 GA抗体価の推移

施設	接種群			対照群		
	接種前	接種後3週目	出荷時	接種前	接種後3週目	出荷時
	- * + *	- +	- +	- +	- +	- +
A	8.6** 2.0	32.0 9.3	32.0 6.7	16.0 2.0	25.4 2.0	32.0 2.0
B	13.5 2.0	64.0 34.9	26.9 8.0	8.0 2.0	11.3 2.0	16.0 2.0
C	2.0 2.0	17.3 6.3	16.0 2.2	2.0 2.0	8.0 2.0	32.0 2.0
D	5.2 2.0	29.3 19.0	16.0 8.7	8.0 2.0	8.0 2.0	8.0 2.0
E	4.8 2.0	12.3 8.0	14.7 6.7	4.0 2.0	5.7 2.0	5.7 2.0
F	2.0 2.0	274.4 128.0	168.9 97.0	2.0 2.0	2.0 2.0	2.0 2.0
G	2.0 2.0	26.9 8.7	20.7 6.7	5.7 2.0	4.0 2.0	4.0 2.0

* : 血清の処理 - = 2ME未処理、+ = 2ME処理

** : 幾何平均値 (<4倍は2として計算)

出荷時においても、2ME未処理血清で14.7～168.9倍、2ME処理血清で2.2～97.0倍の抗体価が認められた。

一方、対照群の平均GA抗体価は、2ME未処理血清では接種前、接種後3週目及び出荷時でそれぞれ2.0～16.0倍、2.0～25.4倍及び2.0～32.0倍であったが、2ME処理血清ではすべて4倍未満で推移した。

3) 剖検及び豚丹毒菌の分離同定

接種群及び対照群の一部の豚において、剖検により異常所見が認められたが、これらは病理組織学的検査の結果、すべて豚丹毒との関連が否定された。

また、すべての豚において、調べたすべての組織から豚丹毒菌は分離されなかった。

4) 野外調査

野外調査の成績を表4に示した。

表4 野外調査成績

項目	生ワクチン 使用農場	生ワクチン 非使用農場
調査農場数	62 (19道県)	10 (6県)
豚	コンベンショナル	コンベンショナル
1年間に農場から出荷された豚の総数	1,018,420	40,019
1年間に食肉検査所で豚丹毒が原因で廃棄された豚の総数 (豚丹毒発生農場数/ 調査農場数)	73 (15/62)	16 (3/10)
廃棄率(%)	0.007	0.04
	p<0.001 (χ ² 独立性検定)	

調査を行った農場は、生ワクチン使用農場が19道県（北海道、青森、秋田、宮城、山形、茨城、群馬、千葉、山梨、広島、愛媛、福岡、大分、佐賀、長崎、宮崎、熊本、鹿児島、沖縄）62か所、非使用農場が6県（宮城、千葉、新潟、山梨、宮崎、鹿児島）10か所であった。これらの農場で飼養されている豚は、すべてコンベンショナル豚であった。

生ワクチン使用農場から、1年間に出荷された豚は、計1,018,420頭であり、この頭数は年間の生ワクチン使用頭数の約10.7%に相当した。このうち、食肉検査所で豚丹毒と診断され廃棄された豚は、62農場中15農場で認められ、その総数は73頭であり、廃棄率は0.007%であった。

一方、非使用農場から出荷された豚は計40,019頭であった。このうち豚丹毒が原因で廃棄された豚は、10農場中3農場で認められ、その総数は16頭であり、廃棄率は0.04%であった。

生ワクチン使用農場の廃棄率は、非使用農場のそれと比較して有意に低かった ($p < 0.001$, χ^2 独立性検定)。

4. 考察

近年、豚丹毒の野外発病例や食肉検査所での豚丹毒菌分離株中に生ワクチン株と類似の性状を呈する株の存在が報告されている。

そこで、豚を用いた生ワクチン接種試験並びに生ワクチンの使用状況と食肉検査所での豚丹毒の発生状況の調査を、生ワクチンの製造販売7所社で協同して実施し、生ワクチンの安全性を再検討した。

その結果、豚を用いた生ワクチン接種試験では、生ワクチン接種後、ほぼ全頭で善感反応が観察された。接種後3週目のGA抗体価は、2ME未処理血清で12.3~274.4倍、2ME処理血清で6.3~128.0倍であり、いずれも接種前と比べて抗体価の上昇が認められ、出荷時においても、2ME未処理血清で14.7~168.9倍、2ME処理血清で2.2~97.0倍の抗体価が認められた。生ワクチン接種後、臨床的な異常を呈する豚は認められず、かつ、出荷時の剖検ではすべての豚の主要臓器から豚丹毒菌は分離されなかった。さらに、丘疹の転移が認められたSPF豚群においても、同居感染は認められなかった。

一方、野外調査では、生ワクチンの接種は豚丹毒による廃棄率を有意に低下しうることが確認された。

以上のように、今回共同で実施した試験及び調査により、生ワクチンの安全性と有効性が再確認された。

ところで、生ワクチンの特徴として、接種後に丘疹が発現することが知られており、この反応はワクチン効果を判定する上での良い指標となることから“善感反応”と呼ばれている。この反応は、接種部位に限局して発現するものであり、通常全身性に転移することなく、約1週間で消退する。しかし、SPF豚等、特

に豚丹毒菌に感受性の高い豚においては、生ワクチン接種後に局所以外の体表への発赤・丘疹の転移が起こる場合がある。そのため、生ワクチンの使用上の注意の中に、副反応として「SPF豚等、特に豚丹毒菌に感受性が高い豚では、善感反応の観察される時期に、接種局所以外の体表に、発赤や丘疹が発現する場合がある。この発赤や丘疹が重度で元気・食欲の不振、発熱がみられた場合は、適切な処置を行うこと」旨記載している。

高感受性の豚において発赤や丘疹の転移が起こる場合があることから、このような豚では生ワクチン株が血流等を介して組織親和性の極めて高い関節組織等へ運ばれる可能性があることは否定できない。しかし、SPF豚飼養頭数の増加にもかかわらず、過去10年以上に渡り、と畜場での豚丹毒による廃棄率に変化がないことから、生ワクチン株により全身性の感染が起こる割合はかなり低いものと推測される。

今回の試験においても、SPF豚を用いた施設Aの接種群の9頭中2頭では丘疹の転移が認められたが、これらの豚においても生ワクチン株が全身性の感染を起こした徴候は認められず、組織から豚丹毒菌は分離されなかった。

豚丹毒の防疫には、1997年以降、豚丹毒不活化ワクチン(全菌体、コンポーネント及び混合ワクチン等)が実用化されてきていることから、生ワクチンの使用上の注意に、「副作用のおそれのある豚等、特に豚丹毒菌に感受性の高い豚に対しては、不活化ワクチンの使用を考慮すること」との文言を追加している。

新田ら³⁾は、Imadaら²⁾の報告でワクチン株由来を強く疑われた計50株について、AF耐性、マウス病原性、抗菌剤感受性、酵素活性測定及びPFGEによる遺伝学的解析を実施した。その結果、そのうち80%の株は生ワクチン株と明らかに異なる性状を示したが、残り20%の株は依然として生ワクチン株と区別できなかったと報告している。

以上のように、野外から分離される豚丹毒菌株中に生ワクチン株と類似する菌株が存在することは否定できないが、これらの菌株が生ワクチン株そのものであるかどうかの決定は、さらに複数の解析方法を組み合わせ検討してゆく必要があるものと思われる。

参考文献

- 1) Heuner, F. (1958) Untersuchungen an Rotlaufstämmen. Arch. Exp. Veterinaermed. 12,40-61.

- 2) 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.
- 3) Makino, S. et al. (1998) Isolation of acriflavine resistant *Erysipelothrix rhusiopathiae* from slaughter pigs in Japan. J. Vet. Med. Sci. 60, 1017-1019.
- 4) 松村梅太郎ら (1972) 豚丹毒生菌凝集反応における血清希釈液としての選択培地の応用。家畜衛試研報, 65, 7-12.
- 5) 新田早人ら (2007) 豚丹毒生ワクチン由来を疑われた豚丹毒菌野外分離株の性状解析。獣畜新報, 60, 831-837.
- 6) Sawada, T. et al. (2006) Pathogenic and genetic characterization of acriflavine resistant *Erysipelothrix* isolates from arthritic pigs. Jpn. Vet. Epidemiol. 10, 21-28.