

藤崎優次郎 賞 受賞記念 講演

わが国の AR における毒素原性 *Pasteurella* の重要性とトキシイド開発

河合 透、牛島稔大（財団法人 化学及血清療法研究所）

Kawai, T. and Ushijima, T. (2009). The importance of toxinogenic *Pasteurella* in Atrophic Rhinitis in Japan and Development of AR Toxoids.*Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.* 55, 4-7.キーワード：AR、毒素原性 *Pasteurella*、トキシイド

1 はじめに

この度は、栄えある第16回藤崎優次郎賞を賜わります心から感謝申し上げます。

私どもが財団法人 化学及血清療法研究所に入所して間もない頃、1987年4月にAR（ボルデテラ）生ワクチンが製造承認され、同年12月に発売されました。しかし、翌年3月頃から本ワクチン接種豚にAR症状がみられるという症例が各地から寄せられたことから、その原因究明に当たったことが本研究のきっかけでした。

萎縮性鼻炎（atrophic rhinitis: AR）は、伝染性の豚の慢性呼吸器病です。特徴的な病変は鼻甲介骨萎縮、顔面の変形（鼻曲り、狎面）で、眼下のアイパッチや激しくしゃみによる鼻出血を伴うこともあります。本病の経済的重要性は、中等度から重度のAR症状を呈した豚の発育が遅延することです。ARの病因は、大学時代の教科書で「*Bordetella bronchiseptica* によって起こる」¹⁾と教わり、更に「感染試験の結果から *Bordetella bronchiseptica* および毒素原性 *Pasteurella multocida* が病原とみられる。前者は一次病原体として単独でARを発病させ、後者は通例、二次病原体としてそのARを悪化させる」²⁾とされておりました。そのため、十分な *B. bronchiseptica* (Bb) 対策を施すことが、毒素原性 *P. multocida* (Pm⁺) 対策にもなるという考えが主流でした。しかし、1975年にソ連の Il'ina & Zasukhin³⁾ は、Pm の一部の株に皮膚壊死毒素（Pm-DNT）を産生する Pm⁺ 株が存在すること、この菌を長期間液体培養した濾液を用いてウサギと子豚に重篤な鼻甲介萎縮を再現できたこと、Bb あるいは非毒素原性 Pm (Pm⁻) の培養濾液では病変が形成されなかったことを報告しました。この発見を de Jong らが1980年の国際豚病学会で紹介したことで、多くの研究者達の注目

が Pm⁺ に集まりました。そして酢酸で鼻内を前処理することによって Pm⁺ 単独感染でも強い鼻甲介萎縮を引き起こすことに成功しました⁴⁾。

以上より、私どもは、まずわが国の AR における Pm⁺ の役割について野外調査し、続いてより効果の高い AR ワクチンを目指して開発に着手しました。

2 疫学的調査

AR の発生がみられた17道府県59農場の豚鼻内から分離した Pm の D 型100株、A 型17株の計117株について Pm-DNT 産生性を検査したところ、D 型菌 (PmD) が72.0% (100株 中72株)、A 型菌 (PmA) が5.9% (17株 中1株) で、前者が高率に陽性でした (表1)。

AR (ボルデテラ) 生ワクチン接種豚に AR 症状がみられ Pm⁺ が検出された宮崎県 K 農場において、4 腹分の子豚について1～9 週齢まで経時的に臨床症状観察および鼻内菌検査を実施しました。また、11週齢時に

表1 AR発生農場から分離した *P. multocida* の毒素保有状況調査(1988年度)

道府県名	農場数	検体数	Pm ⁺ 数／ PmD分離株数	Pm ⁺ 数／ PmA分離株数
北海道	2	89	1/3	0/1
青森	2	62	1/4	1/1
秋田	2	10	4/4	...
岩手	3	11	4/4	0/1
石川	1	34	3/5	0/1
千葉	5	21	4/4	...
岐阜	2	9	2/2	0/1
大阪	1	5	1/1	...
兵庫	2	11	2/2	...
愛媛	2	18	2/5	0/1
福岡	3	33	2/2	...
大分	3	33	4/4	0/1
長崎	1	5	...	0/1
佐賀	14	84	10/13	...
熊本	8	91	12/15	0/6
宮崎	4	112	19/30	0/3
鹿児島	4	92	1/2	...
合計	59	720	72/100(72)	1/17(5.9)

* 選択培地にゲンタマイシン(0.1 μg/mL)、バンコマイシン(25 μg/mL)加デキストロースチ寒天を用いた。

(牛島, 動生協会会報, 27:10-19, 1994より一部抜粋、改変した)

は各腹の産子を4頭ずつ剖検して鼻甲介検査を行ないました。その結果、いずれの腹の産子もPmDがBbに先行して感染しており、ARの初期症状であるくしゃみの発現が、母豚No.97の産子を除く3腹の産子でPmD感染とはほぼ同時期に観察されました(表2)。また、鼻甲介萎縮の程度もPmDの感染程度に比例する傾向がみられました。Pm⁺とBbのどちらが早期に鼻内から検出されるかを調査したところ、本農場を含め九州地区4県10農場中、Pm⁺先行が7農場、Bb先行が2農場、両者同時が1農場で認められました。本来Pm⁺は健康な鼻粘膜に定着できないことから、鼻

粘膜に障害を与えてPm⁺の定着を助けるBb以外のpredisposing因子がわが国の野外に存在することが示唆されました。

AR発生農場豚の毒素中和抗体保有状況を調査しました。Pm由来皮膚壊死毒(Pm-DNT)中和試験には牛胎子肺細胞を、Bb-DNT中和試験にはモルモット(皮膚壊死反応)を用いました。その結果、Pm-DNT中和抗体は母豚の20.9%(40頭/191頭)が陽性を示しました(表3)。一方、肥育豚の陽性率は4カ月齢まで低下傾向を示したことから移行抗体と推察されました。Bb-DNT中和抗体は0.2%(439頭中母豚1頭のみ)が

表2 宮崎県K農場における子豚のAR追跡調査

母豚 No.	項 目	検体数	週 齢									平均鼻甲介 ^{b)} 萎縮スコア	先行感染 (Bb/PmD)
			2	3	4 ^{a)}	5	6	7	8	9			
99	鼻内菌分離	PmD	2~4	-	+	++++	++	++	+++	++	-	2.6±0.7	PmD
		Bb		-	-	-	-	-	+	+++	+++		
	臨床症状	くしゃみ	12~13	-	-	++	+	++	+	+	+		
		アイパッチ		-	-	-	+	+	-	-	-		
100	鼻内菌分離	PmD	2~4	-	-	+++	++	++	+++	++	-	2.4±1.2	PmD
		Bb		-	-	-	-	-	-	-	-		
	臨床症状	くしゃみ	8~9	-	-	+	-	++	-	-	+++		
		アイパッチ		-	-	-	++	+	+	+	-		
97	鼻内菌分離	PmD	3~4	-	-	-	+	-	-	-	-	2.0±0.6	PmD
		Bb		-	-	-	-	-	+	+++	+++		
	臨床症状	くしゃみ	10	-	-	-	-	-	++	-	-		
		アイパッチ		-	-	-	-	-	-	-	-		
38	鼻内菌分離	PmD	3~4	-	-	++	-	++	-	-	+++	1.9±0.9	PmD
		Bb		-	-	-	-	-	-	-	+++		
	臨床症状 ^{d)}	くしゃみ	10~11	-	-	-	+	-	+	+	-		
		アイパッチ		-	-	-	-	-	-	-	-		

a) 離乳を実施, b) 母豚1腹分の子豚群につき4頭ずつ11週齢時に剖検し、Maedaら(1969)の基準に従って左右の鼻甲介についてそれぞれ判定した(0=正常、1=軽度、2=中等度、3=重度、4=完全萎縮), c) 検査豚の陽性率の判定基準: ? = 0%、+ = ~25%、++ = ~50%、+++ = ~75%、++++ = ~100%, d) 母豚1腹分の子豚群に10分間ずつ観察した。

(河合、Sci. Rep. Chemo-Sero-Therap. Res. Inst., 6:21-37, 1997より一部抜粋、改変した)

表3 Pm⁺汚染農場におけるPm-DNT中和抗体保有状況(1988~1992年、14道府県36農場)

検査豚	毒素中和抗体価							抗体陽性 ^{a)} 頭数(%)
	<2	2	4	8	16	32	≥64	
母豚	151 ^{b)}	11	8	7	6	4	4	40 (20.9)
肥育豚 2か月齢未満	228	18	12	11				41 (15.2)
2か月齢~4か月齢未満	130	2	2					4 (3.0)
4か月齢~6か月齢	159	9						9 (5.4)

a) 毒素中和抗体価2倍以上を陽性とした。

b) 該当頭数を示す。

(牛島ら、Sci. Rep. Chemo-Sero-Therap. Res. Inst., 5:42-48, 1996)

表4 野外豚におけるBb-DNT中和抗体保有状況(1988-1995)

月齢	抗体検査		菌検査	
	Bb-DNT中和抗体陽性数/検査数(%)	Bb菌凝集抗体陽性数/検査数(%)	Bb分離数/検査数(%)	
0	0/15 (0)	12/15 (80)	4/15	(27)
1	0/42 (0)	30/42 (71)	4/30	(13)
2	0/31 (0)	20/31 (65)	9/28	(32)
3	0/64 (0)	36/64 (56)	16/47	(34)
4	0/50 (0)	29/50 (58)	19/44	(43)
5	0/56 (0)	43/56 (77)	34/53	(64)
6	0/28 (0)	23/28 (82)	14/24	(58)
7	0/2 (0)	2/2 (100)	2/2	(100)
? 1)	0/46 (0)	27/46 (59)	3/17	(18)
母豚	1/105 (1.0)	97/105 (92)	0/31	(0)
合計	1/439 (0.2)	319/439 (73)	105/291	(36)

1) 月齢不明

(Kawai T. et al., Proceedings of 14th IPCV Congress, Bologna, Italy, 1996)

陽性でした(表4)。以上より、毒素中和抗体検査はPm⁺及びBbの感染時期を推察する血清学的検査法として妥当でないと考えられました。

3 病因

冒頭で、鼻内を酢酸で前処理することにより、Pm⁺単独感染でも強い鼻甲介萎縮を引き起こすことを紹介しました。Pm⁺の実験感染はわが国でも報告されておりますが、単独感染によるARの再現に成功しておりませんでした。そこで、我々は国内で分離されたPm⁺S70株(長崎県 岩松茂博士より分与)を用い、豚の鼻内に複数回投与することによる鼻甲介への影響を検討しました。その結果、1日齢豚にS70株10⁴個ず

つを6回鼻内投与しても正常のままでしたが、10⁷個ずつを3回以上鼻内投与することにより、中等度以上の鼻甲介病変が再現されました⁵⁾。Pm⁺はBbのような定着因子を保有していないため、単回投与で健康豚に鼻甲介萎縮を引き起こすことは難しいのですが、前述のとおり、野外ではpredisposing因子によってPm⁺が定着しやすい環境が形成されており、必ずしもBbの先行感染がなくともARが起り得ると考えられました。そしてBbのみならず、Pm⁺もARの一次病原体であるとみなされました。

4 ワクチン

Pm⁺、Bbはいずれも野生動物に広く分布していることから、農場から撲滅することは非常に困難です。Pm-DNTおよびBb-DNTは鼻甲介萎縮のみならず、主要なAR症状である増体抑制、鼻粘膜上皮細胞の破壊、肺炎などの影響をもたらします。このようにARは、ヒトのジフテリアや破傷風と同様に毒素性疾患であるといえるため、Pm-DNT・Bb-DNT両中和抗体を誘導するトキシイドが最も効果的であると考えられます。

Pm-DNTおよびBb-DNTはいずれも菌体外に分泌されずに細胞質内に蓄積される外毒素ですが、菌体から抽出した粗毒素は抗毒素産生能がよくありません。しかし、クロマトグラフィーなどによって精製度を上昇させることにより、抗体産生能が改善され(表5、6)、ホルマリンによる無毒化もより容易になります。Pm-

表5 Pm-DNTの精製による免疫原性の改善

製法	比活性 (モルモット単位 /mg蛋白)	Pm-DNTトキシイド ^{a)} (モルモット単位/頭)	免疫 回数	母豚		産子 (2日齢, GM ^{a)} 値)
				免疫前	分娩時	
未精製	762	1,920	5	<2	64	128 (128)
			5	<2	16	29 (16-32)
			3	<2	<2	1 (<2)
			2	<2	<2	3 (2-4)
			2	<2	<2	3 (2-4)
			2	<2	<2	1 (<2)
			0	<2	<2	1 (<2)
			0	<2	<2	1 (<2)
クロマト精製	20,480	1,707	2	<2	16	34 (32-64)
			2	<2	8	17 (16-32)
		569	2	<2	16	21 (16-32)
			2	<2	<2	1 (<2)
		対照	0	<2	<2	1 (<2)
			0	<2	<2	1 (<2)

a) GM: 幾何平均値の略

表6 Bb-DNTトキソイドの精製による免疫原性の改善

種類	抗原		Bb-DNT中和抗体価 ^{a)}		
	精製度	比活性 (MND ^{b)} /mg蛋白)			
Bb-DNTトキソイド ^{c)}	未精製	14,000	< 2	< 2	< 2
	低度	37,000	< 2	2	4
	中等度	76,000	32	32	128
Bb死菌ワクチン	A社製	...	< 2	< 2	< 2
	B社製	...	< 2	< 2	< 2

a)5週齢Hartleyモルモット(♀)の両大腿部筋肉内に0.25mLずつ(計0.5mL)1回注射し、9週齢時に採血した。

b)MND:最少壊死単位の略。

c)トキソイド濃度はいずれも3,000 MND/mLに調整し、水酸化アルミニウムゲルを1mg/mLに添加した。

DNTは既報に従って精製できましたが、Bb-DNTはHoriguchiら(1990)⁶⁾の優れた方法があるものの、工業スケールでの生産には応用困難でした。そこで、私どもはBb-DNTが硫酸化多糖類に親和性を示すことを見出し、その原理を応用した群アフィニティークロマトグラフィー法を開発しました。本法は1ステップでHoriguchiら(1990)⁶⁾の方法に匹敵する比活性にまでBb-DNTを精製することができ、また回収率も良好でした。

精製したPm-DNT・Bb-DNT両トキソイドにアルミニウムゲルアジュバントを添加したボルデテラ・パスツレラ混合トキソイドは、菌体を含まないため安全が高く、両DNT中和抗体を誘導できる世界で唯一のワクチンです。また、子豚能動免疫では移行抗体の影響を受けにくく、防御レベルの中和抗体が長期間維持されます。更に、2.7か月以上の間隔で追加免疫すると高いブースター効果が得られます。そのため、移行抗体が3～4か月齢まで持続するので、母子免疫のみでも高い効果が期待できます。しかし、発育の遅い黒豚は出荷までの期間が長いので、パスツレラトキソイドによる子豚免疫の併用を推奨しています。

5 最後に

わが国ではBb死菌ワクチンが1970年代半ばから使用されてきましたが、依然としてARの発生が多く、母豚・子豚両方免疫や抗菌剤の飼料添加、鼻内噴霧の併用などAR対策に苦慮してきました。しかし、国内で最初のARトキソイドであるパスツレラトキソイドが1996年4月に市販されると、子豚に使用した臨床獣医師から「トキソイド注射豚は発育が良好で色つやがよく、肉眼的に非注射豚と区別できる程」との高い評

価を頂いた時に、大変感激したことが思い出されます。そして、ボルデテラ・パスツレラ混合トキソイドが1999年1月に市販され、母豚・子豚両方免疫に代わり母子免疫が主流になると、もはやARは容易にコントロールできる疾病となり、野外で鼻曲りの豚を見かけることはほとんどなくなりました。このように、ワクチン効果の面からもPm⁺がARの一次要因であることはもはや疑いの余地がなく、現在ではパスツレラトキソイドが含まれる多数のARワクチンが使用されるようになりました。

しかし、ARの被害が減っても、現行のARワクチンはいずれも発症予防効果であるため、今後は更に効果の高い、感染防御のできるワクチン開発が望まれます。また、豚用ワクチンは鶏用や牛用ワクチンに較べて混合化が遅れております。ワクチン注射の豚へのストレス軽減や省力化のためにも混合化が要望されており、本混合トキソイドは比較的混合しやすい利点があります。これからも、より安全で有効な日本のニーズに合致したワクチンの開発を通じて、養豚業界の発展に少しでも貢献できればと思います。

引用文献

- 1) 尾形 学(1979)豚伝染性萎縮性鼻炎. pp368-371, 獣医伝染病学, 近代出版, 東京.
- 2) 中瀬安清(1987)萎縮性鼻炎. pp407-416, 豚病学(3版), 近代出版, 東京.
- 3) Il'ina, Z. M. and Zasukhin, M. I. (1975) Role of *Pasteurella* toxins in the pathogenesis of infectious atrophic rhinitis. Sb. Nauchn. Rab. Sib. Nauchn. Issled. Vet. Inst. Omsk, 25: 76-86.
- 4) Pedersen, K. B. and Elling, F. (1984) The pathogenesis of atrophic rhinitis in pigs induced by toxigenic *Pasteurella multocida*. J. Comp. Path., 94: 203-214.
- 5) Kawai, T. et al. (1991) Reproduction of turbinate atrophy in pigs by intranasal consecutive-day inoculation with suspensions of a toxigenic serotype D strain of *Pasteurella multocida*. J. Vet. Med. Sci., 53: 507-509.
- 6) Horiguchi, Y. et al. (1990) Simplified procedure for purification of *Bordetella bronchiseptica* dermonecrotic toxin. FEMS Microbiol. Lett., 66: 39-44.