

粘膜ワクチンによる豚浮腫病予防法の開発に向けて

川本恵子¹⁾、刈屋晴子¹⁾、澤田和敏²⁾、瀧田英司²⁾、松井健史²⁾、加藤 晃³⁾、牧野壮一¹⁾

(1) 帯広畜産大学大動物特殊疾病研究センター 食品有害微生物分野、2) 出光興産株式会社 先進技術研究所 環境・バイオ研究室、3) 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科)

Kawamoto, K., Kariya, H., Sawada, K., Takita, E., Matsui, T., Kato, A. and Makino, S. (2009).

Edible vaccine for swine edema disease.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 55, 21-23.

キーワード: edema disease, Stx2e, mucosal immunity, plant-based vaccine

はじめに

ブタ浮腫病は、腸管に定着した志賀毒素産生大腸菌 (STEC, Shiga toxin-producing *Escherichia coli*) の産生する外毒素 Stx2e により引き起こされる疾患である。離乳後数週の子豚で発症し、死亡率が高く、再発や発育不良などにより、生産性の低下を招き、経済的損失も少なくない。浮腫病は発生が増加しているが、原因菌の多剤耐性化が報告されるなど、抗生物質に替わる予防法や治療法の早期開発が望まれている。本病のように腸管粘膜が感染の場である疾病の予防法としては、粘膜ワクチンが有望視されており、我々は植物を媒体とした“食べるワクチン”による豚浮腫病の制御を目指している。今回、最近我々が行った粘膜免疫による豚浮腫病臨床試験について紹介する。

豚浮腫病

豚浮腫病は豚の大腸菌症の一種で、下痢、浮腫、神経症状を主徴とする感染症である¹⁾。離乳後の子豚に多く、発病した場合の死亡率は50-90%と高い。原因菌は Stx2e を産生する STEC で、病豚からは O-138 や O-139、O-141 といった特定の血清型が検出される。感染豚の糞便により汚染された飼料や飲水などを介して経口的に体内に侵入した病原体は、菌体表層の F18 線毛により豚の腸管上皮に定着し、Stx2e を産生する。F18 線毛抗原に対する受容体は、生後まもない豚では発現していないが、約 2 週齢から発現し、やがて浮腫病を引き起こす大腸菌に対し感受性を獲得するようになる。従って、F18 に対する受容体を持たない豚は本病原菌に抵抗性を示すが、日本の豚のほとんどは遺伝的にこの受容体を持っているそうである。

Stx2e は、毒素活性をもつ A サブユニット 1 分子と結

合分子である B サブユニット 5 分子から形成され、A1B5 型毒素として機能する。毒素本体である A サブユニットは標的細胞上のレセプターに B サブユニットを介して結合し、エンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれた後、細胞質へと移行し、タンパク合成の場である 60S リボソームを加水分解により失活させ、タンパク合成を阻害する。Stx2e は細胞膜の糖脂質の globotriosylceramide (Gb3) や globotetraosylceramide (Gb4) に結合するが、Gb4 により選択的に結合すると考えられている²⁾。これらの糖脂質の含有量や局在性は細胞や組織によって異なる³⁾。毒素的作用により、標的臓器の血管が障害を受けると、血管透過性の亢進により、血漿が血管外に漏出するため、浮腫病変が形成される。浮腫の程度は様々だが、眼瞼周囲や前頭部、下腹部などで顕著に見られる。

粘膜免疫による浮腫病臨床試験

急性の経過を辿るため、浮腫病の有効な治療法は少ないが、経口補液や抗菌剤投与が行われる。しかし、抗生物質によっては菌体の破壊により多量の毒素を放出させ、かえって容態を悪化させる場合があるので注意が必要である。また、抗生物質の乱用は、薬剤耐性菌の出現を招く恐れがある。実際に、浮腫病の発生が長期化した農場では、使用した抗生物質の耐性菌が次々と出現したとの報告もある⁴⁾。また、食の安全の観点からも、抗生物質については厳格な使用が求められるべきである。そのため、抗生物質投与に変わる有効な治療法や予防法の開発が望まれている。

我々の研究グループは浮腫病に対する粘膜ワクチンの研究開発を行っている。腸管粘膜には IgA の産生・分泌を担う粘膜免疫系が存在し、腸管における感染防御のフロントラインとして極めて重要な役割を果たしている。また、粘膜免疫系は局所免疫のみならず全身免疫系の調整にも関与するため、腸管が病原体の侵入

部位となる感染症の場合、全身免疫しか誘導されない注射型のワクチンに比べ、粘膜面における局所免疫と全身免疫の両者を刺激する粘膜ワクチンのほうがより効果的と考えられている。さらに、投与に際し、動物への苦痛やストレスを軽減でき、投与方法も簡便である。このような様々な利点から、粘膜を介したワクチン戦略は次世代ワクチンとして注目を集めている⁵⁾。

豚浮腫病の場合、発症機序からいくつかのワクチン候補が考えられるが、病原菌の定着阻止あるいは毒素作用阻害がおそらく最も効果的な標的であると思われる。Stx2e の毒素作用発現には、Bサブユニットと特異レセプターの結合が必須であるが、Bサブユニット自体は毒素活性を持たないことから、ワクチン候補として有用と思われる。そこで、Bサブユニットとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) の融合タンパク質を組換え大腸菌を用いて調製し (Stx2eB-GST)、哺乳子豚に Stx2eB-GST を経鼻あるいは経口投与し、ブタ浮腫病に対する臨床症状および特異的抗体価を調べた。

健康な子豚を5群に分け、生後6, 12, 18歳の哺乳期子豚に様々な濃度の Stx2eB-GST (1, 4, 16mg/頭) を経鼻あるいは経口投与により計3回免疫した。非免疫群には GST のみを投与した。感染実験は塚原⁶⁾の方法に従った。生後21歳で離乳させ、離乳後3日目に臨床由来株の O-139 血清型 Stx2e 産生大腸菌をチャレンジし、感染後11日目まで毎日臨床症状 (眼瞼浮腫、神経失調、運動障害、下痢など) をモニタリングした。症状の程度に応じて0-3とスコア化することで、粘膜ワクチンによる予防効果を評価した。図1に経口投与時の結果を示す。1群では、感染後2, 3日目から元気の消失や下痢などの症状が出現し、やや遅れて眼

瞼浮腫や神経症状が現れた。症状は観察期間中持続した。これに対し、免疫群では投与量に依存した臨床症状の改善が認められた。特に4 mg以上の投与群では、下痢や眼瞼浮腫などの顕著な改善効果が見られた。これらの臨床実験結果から、Stx2eBによる粘膜免疫は浮腫病の発症の予防に有効であると考えられた。しかしながら、ELISA法による血中および腸管中の特異抗体価の測定では、個体間でのバラツキが大きく、統計的には有意な差を認めなかった。一方、子豚での結果と異なり、妊娠豚を Stx2eB-GST で免疫した場合、血中および初乳中の Stx2eB 特異抗体価は、経鼻あるいは経口免疫のいずれの経路においても、免疫群では有意に上昇していた。以上の結果から、初乳を介した受動免疫による予防効果も期待できることが明らかとなった。

おわりに

我々は経済産業省プロジェクト「植物機能を活用した高度ものづくり基盤技術開発／植物利用高付加価値物質製造基盤技術」において、最終的にはレタスにワクチンタンパク質を生産させ、これを経口的に摂取させることでブタ浮腫病を予防可能とする植物ワクチンの開発に取り組んでおり、現在 Stx2eB の発現レタスの作出が進んでいる (図2)。今後は、これらのレタスによる浮腫病予防効果について検討していく予定である。豚およびマウスにおける Stx2eB-GST 投与試験では、これまでのところ問題となる副作用は認められていないが、今後も安全性については注意深く検討していく必要がある。また、子豚における臨床試験において特異抗体価の誘導が顕著でなかったにもかかわらず臨床的には予防効果が認められたことから、Stx2eB

経口免疫時の総臨床スコア

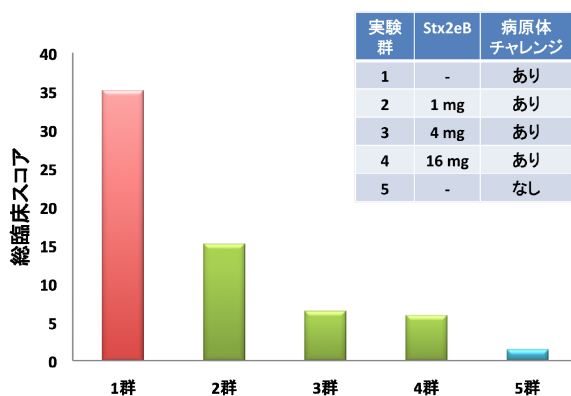


図1

Stx2eB発現レタスの栽培風景



図2

の粘膜投与による感染防御機構について、液性免疫以外のメカニズムも視野に入れた解析を現在行っている。浮腫病の発症機序や豚の免疫機能、特に子豚についてはまだまだ不明な点も多く、さらなる勉強が必要と痛感する日々である。これらについても明らかにしていくことが今後、安全な豚病ワクチン開発のために重要と考える。

引用文献

- 1) 末吉益雄. (2008) 子豚の下痢を伴う浮腫病 (大腸菌性腸管毒血症). 豚病研報, 48: 7-13.
- 2) DeGrandis S, et al. (1989) Globotetraosyl ceramide is recognized by the pig edema disease toxin. J Biol Chem, 264: 12520-12525.
- 3) Boyd B, et al. (1993) Alteration of the glycolipid binding specificity of the pig edema toxin from globotetraosyl to globotriaosyl ceramide alters in vivo tissue targetting and results in a verotoxin I-like disease in pigs. J Exp Med 177: 1745-1753.
- 4) 農林水産省家畜衛生試験場監修. (2000) ブタの病気. 家の光協会, 117.
- 5) Takahashi I, et al. (2009) New horizon of mucosal immunity and vaccines. Curr Opin Immunol, Epub ahead of print.
- 6) Tsukahara T, et al. (2005) Experimental infection of Enterotoxaemic Escherichia coli associated with porcine edema disease and its pathologic characteristics in the intestine. J Vet Med Sci, 67: 1167-1171.