

豚における抗ウイルス剤による口蹄疫ウイルスの排泄抑制

深井克彦¹⁾、大橋誠一¹⁾、小野里洋行¹⁾、森岡一樹¹⁾、山添麗子¹⁾、
吉田和生¹⁾、高橋和美²⁾、古田要介²⁾、坂本研一¹⁾

(¹⁾ 動物衛生研究所 海外病研究施設、²⁾ 富山化学工業株式会社 総合研究所)

Fukai, K., Ohashi, S., Onozato, H., Morioka, K., Yamazoe, R., Yoshida, K., Takahashi, K., Furuta, Y. and Sakamoto, K. (2009).
Inhibition of excretion of foot-and-mouth disease virus from foot-and-mouth disease virus-infected pigs by an anti-viral agent.
Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 55, 28-32.

キーワード：抗ウイルス剤、口蹄疫ウイルス、豚

緒論

口蹄疫 (FMD) は FMD ウイルス (FMDV) により引き起こされる牛、豚、綿山羊及び多くの野生動物を含めた偶蹄類動物の伝染病であり、FMDV 感染動物は発熱、口腔周囲や蹄等の水疱形成、流涎および跛行等の臨床症状を呈する⁵⁾。FMD は伝播力が強く、発症動物はその臨床症状により産業動物としての価値を著しく損なうのに加えて、FMD 発生国は厳しい貿易上の制限を課せられるため、世界的に最も恐れられている家畜伝染病である。FMDV はピコルナウイルス科アフトウイルス属に分類され、血清学的に O、A、C、Asia1、SAT1、SAT2、SAT3 の 7 種類の血清型に区別される⁴⁾。これらの血清型間においては、相互に感染防御が成立しないことに加えて、同じ血清型内においても抗原性に差が確認されており、その場合も同様に十分な感染防御は期待出来ない。そのため、継続的な流行ウイルス株の収集およびその抗原性状の解析は重要と考えられる。

一方、豚が FMDV に感染した場合、その排泄量は牛の 1000～2000 倍と報告されている。そのため、ワクチン非接種清浄国において、豚で FMD が発生した場合、大流行となる可能性が高い。事実、1997 年の台湾や 2001 年の英国での FMD 発生時には、発生国に甚大な被害を及ぼした。そのため、FMDV 感染豚のウイルス排泄量を低減する方法を開発した場合、FMD の防圧に有用であると考えられる。その観点から我々は、FMDV に対して増殖阻害作用を示す抗ウイルス剤を *in vitro* の系で探索した。その結果、FMDV に対して増殖阻害作用を示すピラジンカルボキサミド誘導体 T-1105 を見出した。そこで本試験においては、ワクチンとは異なり即効性の期待される抗ウイルス剤を用いて、豚における FMDV の排泄を制御

する目的で、T-1105 の FMDV 感染豚に対する有効性について検討したので報告する。

材料および方法

細胞およびウイルス：BHK-21 および IB-RS-2 細胞は、10% 量の FBS を添加したイーグル最少必須培地内で維持した。FMDV O/JPN/2000 株³⁾ および O/Taiwan/97 株¹⁾ は、これらの細胞を用いて増殖させた。なお FMDV O/JPN/2000 株は、2000 年のわが国における FMD 発生時に分離された FMDV 株であり、また O/Taiwan/97 株は、1997 年の台湾における FMD 発生時に分離され、豚に対して高い親和性を持つ FMDV 株である。

感染試験：感染試験は、FMDV O/JPN/2000 株および O/Taiwan/97 株について、各々豚 6 頭を用いて、別々に実施した。200mg/kg 量の T-1105 を飼料とともに、豚 4 頭に投与した。その投与 1 時間後に、10⁶ TCID₅₀ (O/JPN/2000 株) ある い は 5 × 10^{5.5} PFU (O/Taiwan/97 株) を左前肢主蹄球部に接種した。T-1105 は、同様に 1 日 2 回、7 日間投与した。また、対照として、T-1105 を非投与の豚 2 頭を用い、これらの豚に対しても同量の FMDV 株を接種した。臨床症状の観察、血清、血漿および唾液の採取は、FMDV 接種後 10 日間実施した。

抗原および抗体検査：血漿および唾液中のウイルス量は、リアルタイム PCR により測定した⁶⁾。また、血清中の抗体価は、液相競合 ELISA により測定した⁶⁾。

成績

臨床症状：FMDV O/JPN/2000 株を用いた感染試験において、T-1105 非投与豚においては水疱形成がウイルス接種 2～3 日後に確認され、それらの水疱は 3～5 日後に破裂した (表 1)。また、跛行および起立障害が、3～6 日後に確認された。一方、T-1105 投与豚

表1 O/JPN/2000 株接種豚における臨床症状の推移

群	豚番号	ウイルス接種後日数							
		1	2	3	4	5	6	7	8
投与	1	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	—	—	—	—
	3	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—
非投与	5	—	+	++	++	++	++	++	++
	6	—	—	+	+	++	++	++	++

+: 水疱形成

++: 水疱破裂

跛行・起立障害

においては、試験期間を通して、臨床症状が全く確認されなかった。

FMDV O/Taiwan/97 株を用いた感染試験において、T-1105 非投与豚においては水疱形成がウイルス接種1日後に確認され、それらの水疱は3日後に破裂した(表2)。また、跛行および起立障害が、3～7日後に確認された。一方、T-1105 投与豚においては、水疱形成がウイルス接種2日後に4頭中2頭において確認され、これらの水疱は5日後に破裂したが、跛行は確認されなかった。しかし、それらの水疱形成はウイルス接種部位に限局的に確認され、その他の部位においては確認されなかった。また、その他の2頭については、試験期間を通して、臨床症状が全く確認されなかった。

抗原検査：FMDV O/JPN/2000 株を用いた感染試

験において、T-1105 非投与豚においては血漿中にウイルスがウイルス接種2～6日後にかけて確認され、ウイルス量は最大で約 10^6 TCID₅₀/0.1mL であった(図1)。一方、T-1105 投与豚においては、試験期間を通して、血漿中にウイルスは確認されなかった。

FMDV O/Taiwan/97 株を用いた感染試験において、T-1105 非投与豚においては血漿中にウイルスがウイルス接種1～7日後にかけて確認され、ウイルス量は最大で約 10^5 PFU/0.1mL であった(図2)。また、唾液中にウイルスがウイルス接種後1～7日後にかけて確認され、そのウイルス量は最大で約 10^4 PFU/0.1mL であった(図3)。一方、T-1105 投与豚においては、血漿中にウイルスがウイルス接種1～2日後にかけて確認され、ウイルス量は最大で約 10^3 PFU/0.1mL で

表2 O/Taiwan/97 株接種豚における臨床症状の推移

群	豚番号	ウイルス接種後日数							
		1	2	3	4	5	6	7	8
投与	2	—	+	+	+	++	++	++	++
	3	—	—	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—	—	—
	5	—	+	+	+	++	++	++	++
非投与	1	+	+	++	++	++	++	++	++
	6	+	+	++	++	++	++	++	++

+: 水疱形成

++: 水疱破裂

跛行・起立障害

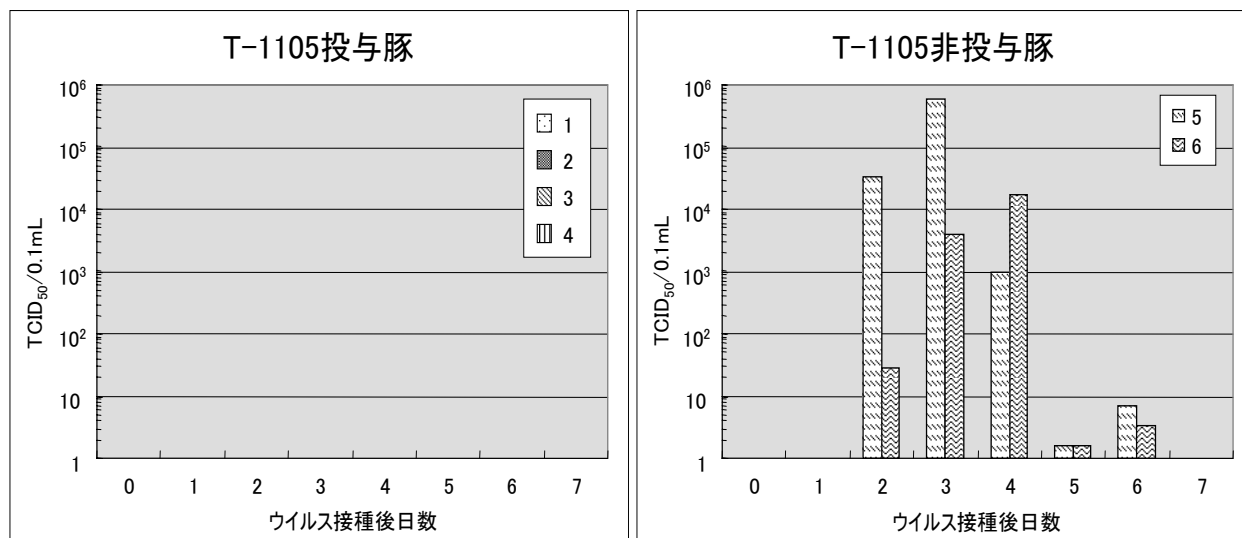


図1 O/JPN/2000株接種豚における血中ウイルス量の推移

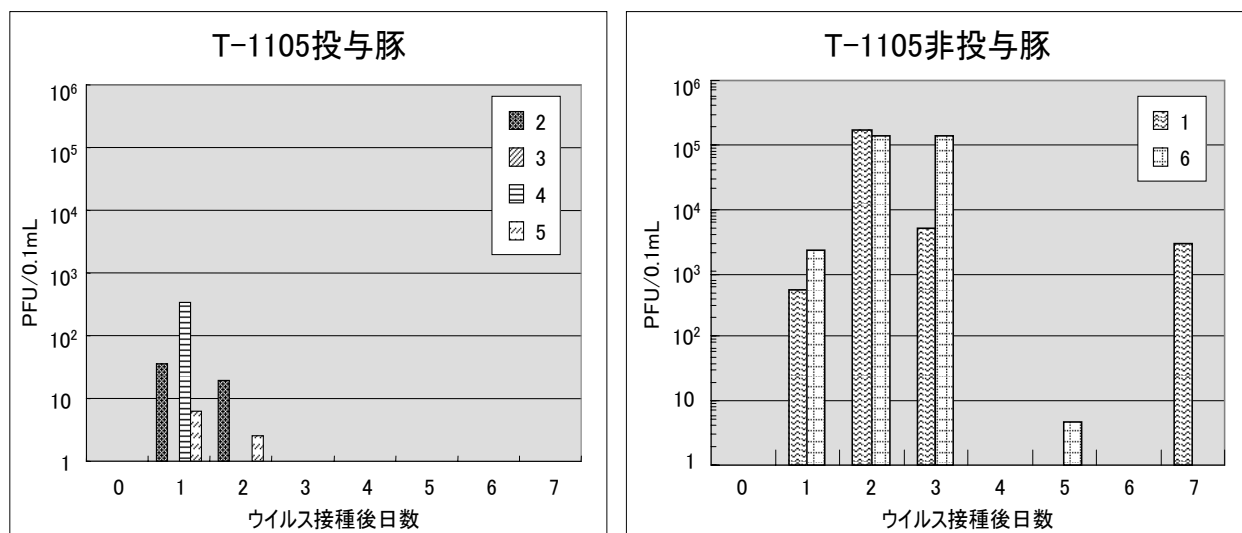


図2 O/Taiwan/97株接種豚における血中ウイルス量の推移

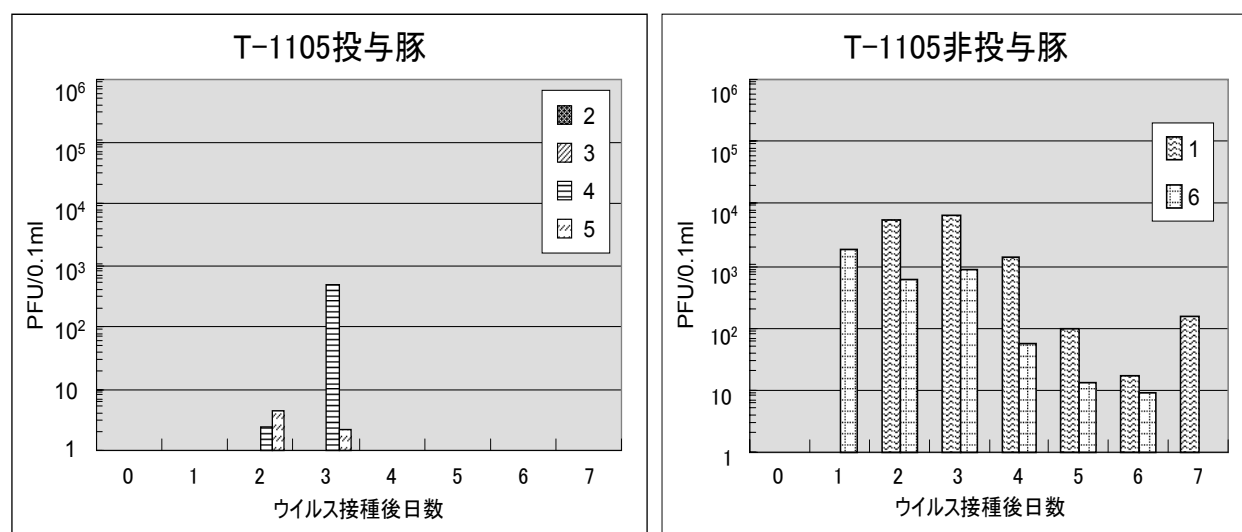


図3 O/Taiwan/97株接種豚における唾液中ウイルス量の推移

あった。また、唾液中にウイルスがウイルス接種2～3日後にかけて確認され、そのウイルス量は最大で約 10^3 PFU/0.1mLであった。

抗体検査：FMDV O/JPN/2000 株を用いた感染試験において、T-1105 非投与豚においては ELISA 抗体がウイルス接種6日後から検出され、ELISA 抗体価は最大で720倍であった（図4）。一方、T-1105 投与豚においては、ELISA 抗体がウイルス接種6日後から検出され、ELISA 抗体価は最大で45倍であった。しかし、1頭については試験期間を通して、抗体は確認されなかった。

FMDV O/Taiwan/97 株を用いた感染試験において、T-1105 非投与豚においては ELISA 抗体がウイルス接種4日後から検出され、ELISA 抗体価は最大で1024倍であった（図5）。一方、T-1105 投与豚においては、

ELISA 抗体がウイルス接種6日後から検出され、ELISA 抗体価は最大で128倍であった。しかし、1頭については試験期間を通して、抗体は確認されなかった。

考察

O/JPN/2000 株を用いた感染試験において、T-1105 投与豚は臨床症状およびウイルス血症は全く確認されなかった。一方、O/Taiwan/97 株を用いた感染試験においては、ウイルス血症は4頭中3頭において短期間（2日間）でかつ低い値（T-1105 非投与豚の約1/100）であった。また、唾液中へのウイルス排泄は4頭中2頭において短期間（2日間）でかつ低い値（T-1105 非投与豚の約1/10）であった。さらに、抗体検査においては、O/JPN/2000 株およびO/Taiwan/97 株を用いた

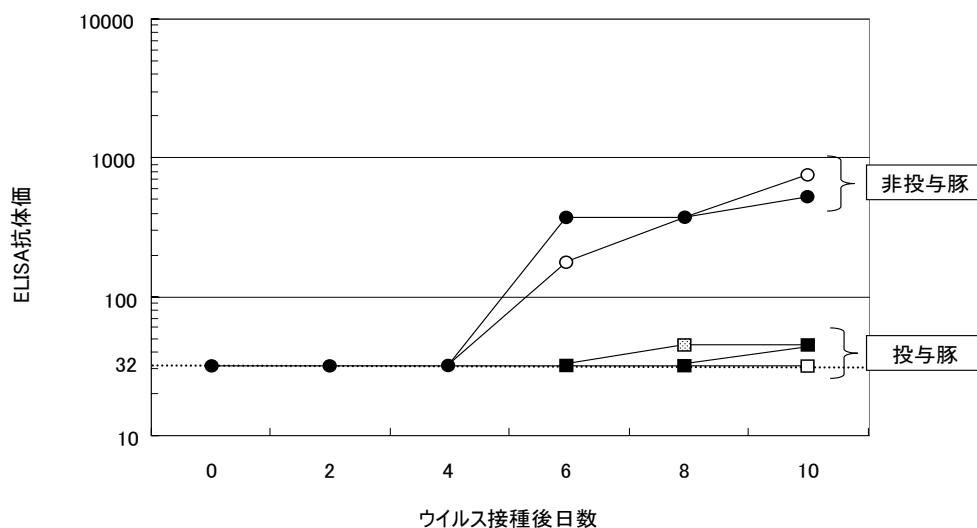


図4 O/JPN/2000 株接種豚における ELISA 抗体価の推移

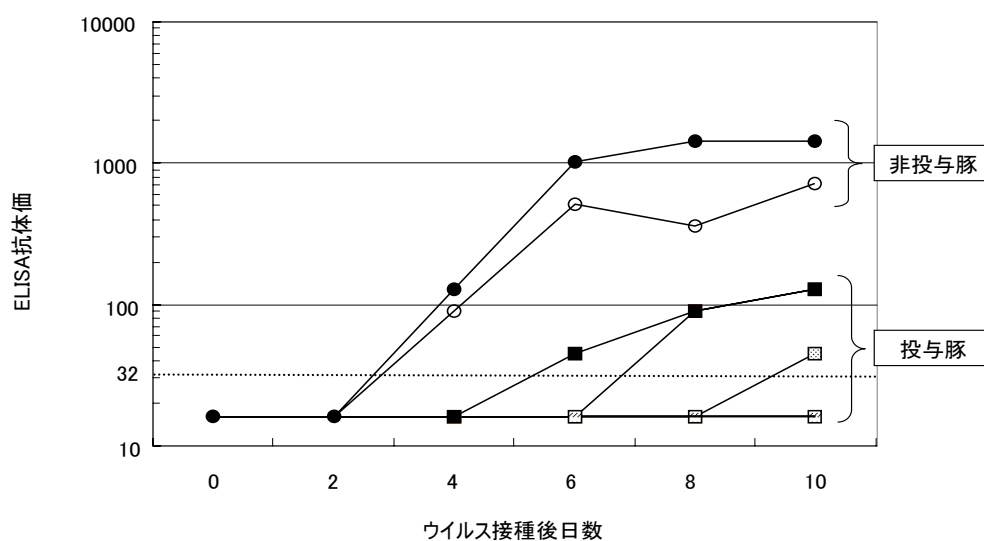


図5 O/Taiwan/97 株接種豚における ELISA 抗体価の推移

感染試験ともに、T-1105 投与豚の ELISA 抗体は、T-1105 非投与豚と比較して、その検出時期が遅くなるとともに、その抗体価も低かった。以上の成績から、T-1105 投与豚においては体内におけるウイルス増殖が顕著に抑制されていることが示唆された。

ピラジンカルボキサミド誘導体 T-1105 および類縁化合物である T-705 や T-1106 は、様々な RNA ウィルス（インフルエンザウィルス、アレナウィルス、ブニヤウィルス、ウエストナイルウィルスおよび黄熱ウィルス）に対して抗ウィルス作用を持つことが報告されている²⁾。また、これらの化合物は RNA ウィルスの増殖に必須な RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RdRp) に作用することによって抗ウィルス作用を示すとされている。一般に RdRp はその性状が高度に保存されている蛋白質であるため、複数の血清型が存在する FMDV においても、血清型の区別なく、T-1105 は抗ウィルス作用を示すと考えられる。今回本試験で用いた FMDV 株は 2 株ともに血清型 O であるが、in vitro の試験成績においては、T-1105 が血清型 O の FMDV 株以外に、血清型 A、C および Asia1 の FMDV 株に対して抗ウィルス作用を示すことが明らかになっている（未発表データ）。そのため、T-1105 は in vivo においても血清型 O 以外の FMDV 株に対して抗ウィルス作用を示すと推測され、その効果が血清型に依存するワクチンと比較して汎用性が高いと考えられた。また、本試験では T-1105 をウィルス接種 1 時間前に初回投与し、その後 1 日 2 回投与することにより、十分な抗ウィルス作用を示す成績を得た。そのため、T-1105 が投与後早期に抗ウィルス作用を示すことが示唆され、その効果の発揮に時間を要するワクチンよりも有用性が高いと考えられた。

わが国のような FMD のワクチン非接種清浄国において本病が発生した場合、基本的には、FMDV 感染動物の摘発淘汰や移動制限による防疫措置が実施され、場合によっては部分的なワクチン接種が実施されることも想定される。しかし、前述のように、血清型や多様な抗原性の存在に加えて、効果発揮までの時間の点で、ワクチンには弱点も存在する。一方、T-1105 はそれらのワクチンの弱点を補うことが可能と考えられ、FMD 発生時に利用可能な新たな防疫資材の一つとして有用であると考えられた。

引用文献

1) Dunn, C. S. & Donaldson, A. I. (1997) Natural

adaption to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus. *Vet. Rec.*, 141, 174-175.

2) Furuta, Y. et al. (2009) T-705 (favipiravir) and related compounds: Novel broad-spectrum inhibitors of RNA virus infections. *Antiviral Res.*, 82, 95-102.

3) Sakamoto, K. et al. (2002) Isolation of foot-and-mouth disease virus from Japanese black cattle in Miyazaki Prefecture, Japan, 2000. *J. Vet. Med. Sci.*, 64, 91-94.

4) Racaniello, V. R. (2001) Picornaviridae: the viruses and their replication. *In* Fields Virology, 4th edition, eds. Knipe, D. M. & Howley, P. M., Lippincott Raven, Philadelphia, pp.685-722.

5) Thomson, G. R., Vosloo, W. & Bastos, A. D. S. (2003) Foot and mouth disease in wildlife. *Virus Res.*, 91, 145-161.

6) World organization for animal health. 2008. The manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. http://www.oie.int/eng/normes/mmanual/A_summry.htm.