

動物ワクチンの研究開発の動向

—豚オーエスキー病サブユニットワクチンの開発—

農林水産省家畜衛生試験場

製剤工学研究室

三浦 康男

日本の畜産は、1960年代以降の高度経済成長にともない飛躍的に発展し、専業家による、多頭羽飼育、畜産の工業化となってきた。この間、獣医学や畜産学も著しく進歩し技術面でも驚異的な発展を遂げてきた。豚コレラやニューカッスル病などの急性の伝染病もすでに古典的になってはきたが、いまだ発生がみられる。また、これらの急性伝染病に加えて、飼養環境の変化にともなって慢性感染症、日和見感染症、薬剤耐性菌症なども新しい感染症として加わり、さまざまな病型の伝染病が発生する時代となってきた。

動物用ワクチンも、これらの感染症に対応すべく、新技術により次々と新しいワクチンが研究され開発されてきている。そこで、動物用ワクチンの開発研究の一端と、現在演者らが研究開発中の豚オーエスキー病サブユニットワクチンについて具体的に紹介したい。

1. 動物用ワクチンの研究開発

ワクチン（予防液）とは、動物にある微生物の免疫物質を人工的に与え（能動免疫）、その微生物に対する抵抗性を賦与する生物学的製剤である。すなわち、ワクチンは、ウイルス、クラミジア、細菌あるいは寄生虫などの病原微生物を種々の方法で弱毒又は不活化して免疫原性を保持させた製剤である。

ワクチンは、Jenner, E.(1796)の天然痘（人痘）の種痘に始まり、その方法はあらかじめ牛痘に感染させて、天然痘に対する免疫を賦与させるものであった。その後、約1世紀後、Pasteur, Lにより家禽コレラ(1880)、炭疽(1881)、豚丹毒(1883)および狂犬病ワクチン(1885)などの弱毒ワクチンが開発されこれら予防に著しい成果をあげた。Salmon, E.D(1886)は、*Salmonella Choleraesuis*の培養死菌を用いて、本菌の感染を予防できることを報告した。これが不活化ワクチンの始まりである。

ワクチンは生ワクチンと不活化ワクチンに分けられる。生ワクチンは、主に病原性を減弱させた弱毒株を用いる。しかし、鶏脳脊髄炎のような強毒ウイルスがそのままワクチンの形で用いられる場合もある。不活化ワクチンは理化学的方法（熱、紫外線、ホルマリン、BPLなど）で増殖性を失わせ、免疫原性を保持させたワクチンである。

現在、野外で疾病予防のために応用されているワクチンは、その安全性、有効性、製造法は時代とともに飛躍的に進歩してきた。

現在、日本で使用されている動物用ワクチンは88種（動物用生物学的製剤協会、1991年11月）で、牛用ワクチン17、豚用20、鶏用28、馬用6、

小動物（犬・猫・ミンク）用15および魚類用2種である。現行ワクチンのうちには、豚萎縮性鼻炎のBordetella bronchiseptica HA antigenのコンポーネントワクチンや豚オーエスキー病の遺伝子欠損変異生ワクチンなどの新しいワクチンも実用化されるようになってきた。一方、ワクチン接種の省力化やワクチン経費の軽減を目標に、多種類の抗原を混合したコンバインワクチンの開発研究も行われている。

近年、分子生物学、細胞工学や遺伝子工学は著しく進歩し、これらを基盤とした遺伝子操作技術や組換えDNA技術を駆使して次世代ワクチンの開発研究が進められている。次世代のワクチンも、生ワクチンと不活化タイプのワクチンに大別される。

生ワクチンの研究はウイルス病で進んでおり、生ウイルスタイプのワクチンとして、遺伝子組換えワクチン（インフルエンザなど）、遺伝子欠損変異生ウイルスワクチン（オーエスキー病など）、ワクチニアベクター生ワクチン（狂犬病など）などがある。

不活化タイプのワクチンとしては、サブユニットワクチン（豚オーエスキー病など）、合成ペプチドワクチン（口蹄疫など）、抗イディオタイプ抗体ワクチンなどで研究が進められている。

2. 豚オーエスキー病サブユニットワクチンの開発

豚オーエスキー病は、ヘルペスウイルス科アルファヘルペスウイルス亜科に属する豚ヘルペスウイルス1型（オーエスキー病ウイルスまたは仮性狂犬病ウイルス）に起因する豚の急性熱性伝染病で、幼若豚に神経症状を示し死亡率は高く、妊娠豚では流産、死産などの異常産を起こす。本病の宿主域は広く、牛、緬羊、山羊、犬、猫、ミンク、狸、げっ歯類などに感染し豚以外の動物では感染すれば致死的で終末宿主である。

このように本病は、豚の生育過程で、様々な病性を呈し、養豚業には大きな経済的被害を与えている。

成豚では感染してもほとんど発病することなく潜伏感染を起こす。しかし感染耐過豚では、種々のストレスでウイルスの再活性化が起こり、ウイルスのキャリア（伝播源）となる。日本でのオーエスキー病は、1981年に山形および岩手県で発生後徐々に広がり、発生および抗体陽性豚の出現は、関東を中心に東北、九州地方の十数県に達している。本病の防除対策は感染豚の摘発・淘汰が最も確実な方法、基本であり、いくつかの国では正常化をほぼ達成している。しかし、汚染地域が広範に拡大した国では全ての感染豚を摘発・淘汰することは極めて困難であるため、ワクチンの使用が検討あるいは実施されている。

豚オーエスキー病のワクチンは、生ワクチンと不活化ワクチンが開発、又は開発されつつある。本病は、他のヘルペスウイルスと同様、感染・免疫機構が複雑で、豚コレラ、日本脳炎などのワクチンのように完全な感染阻止は期待できない。そこで本病のワクチンは、発病防止による損耗防止と感染耐過豚の移動によるウイルス拡散を防ぐ目的で使用されている。日本でも、ワクチンを併用した防疫方法

が採用され、1991年3月から「オーエスキー病防疫対策要領」にのっとって清浄化がスタートした。使用が許可されているワクチンは4種類で、いずれもウイルス増殖に必須でない糖蛋白質遺伝子を失わせた遺伝子欠損変異生ワクチンで、その欠失した糖蛋白に対する抗体の有無で、自然感染豚かワクチン接種豚かの識別も可能である。

一方、幼若豚や繁殖豚に対しては、感染性のない安全でかつ高力価の不活化ワクチンが望まれている。なかでもウイルス構成成分の中から感染防御に重要な特定の成分（コンポーネント）を利用したサブユニットワクチンの開発が強く要請されている。

これらのことから、豚オーエスキー病のサブユニットワクチンとして、ISCOM (Immunostimulating complex, 免疫刺激複合体) や可溶化抗原を用いた、サブユニットワクチンの可能性が検討されている。

1) ISCOM

Morein (Nature, 1984) の方法に準じて、オーエスキー病ウイルス (YS-81株) の精製ウイルスを界面活性剤 Triton X-100 で可溶化し、グリコシド (精製サポニン、Quil A) を含む不連続蔗糖密度勾配遠心により ISCOM を作製した。この ISCOM は特徴的な蜂巢状構造を持つ直径約 40 nm の均一な粒子であった。ISCOM の性状を SDS-PAGE およびウエスタンブロットによって解析したところ、構成蛋白はウイルス糖蛋白 g II であった。

オーエスキー病ウイルス糖蛋白 ISCOM の免疫効果をマウスと豚に接種して調べた。ISCOM 0.2 μ g を筋肉内に2回接種したマウスでは、100 LD₅₀ の強毒ウイルスの攻撃に対し感染防御が成立した。同様に 170 μ g の ISCOM を1ヶ月齢の子豚の筋肉内に2週間隔で2回注射したところ、補体要求性中和抗体の生産が認められた。2回注射10日後に、強毒株ウイルス (YS-81株) 10^{5.6} PFU による鼻腔内接種で攻撃し、鼻汁からのウイルス排泄について調べた。その結果ウイルスの攻撃に対し対照群4頭は、発熱、嘔吐および神経症状を示し、攻撃後8日までにすべて死亡した。これに対し、免疫群は発熱と若干の食欲不振を示したが全て生存した。ウイルス攻撃後は両群ともウイルスの排泄がみられたが、免疫群の排泄量は対照群に比べて有意に低下していた。この結果からウイルス糖蛋白 g II は子豚におけるオーエスキー病の症状軽減、発病防止に効果のあることが明らかになった。またウイルス攻撃時と感染耐過の血清を用いてウイルス蛋白の免疫沈降を行ったところ、ISCOM 免疫血清では g II 糖蛋白とそれ以外に数本のバンドが認められたが、攻撃後の血清ではすべてのウイルス蛋白に対する抗体が産生されていた。このことから感染豚とワクチン接種豚は血清学的に識別できることが明かとなった。

2) 可溶化抗原

オーエスキー病ウイルス (ADV) 感染細胞を非イオン系の界面活性剤で可溶

化した抗原は、本病に対して有効なことは、Roger, k et al(1983), Shimizu, M (1986)によってすでに報告されている。しかし、現在、この抗原をワクチンとして使用する場合、自然感染抗体とワクチン抗体との識別マーカーを有していることが防疫上重要である。そこで、家畜衛生試験場では、識別マーカーを有し、かつ有効な高力価サブユニットワクチンの開発を行った。

まず、ADV、YS-81株から遺伝子工学の手法を用いて作出されたYd1G3株（gⅢ欠損株）を用いて、子豚に対する病原性および各種の高増殖系浮遊培養細胞での増殖性を検討した。

Yd1G3株のウイルスを約18kgの子豚2頭に鼻腔内接種を行ったところ、40～40.8℃の発熱が、3～4日間認められたが、元気・食欲不振などの臨床症状は認められなかった。ウイルスの排泄は、2頭中1頭でのみ認められ、接種後5日に $10^{1.0}$ TCID₅₀/mlのウイルスが回収された。抗体応答では、接種4週後に中和抗体16, 128の高い抗体価が検出さ、Yd1G3株は、親株であるYS-81株より病原性は低下しているが、免疫原性はほぼ同じと判断された。

一方、サブユニットワクチンの実用化には、可溶性抗原を作製するための大量の高感受性細胞系が必須条件で、この細胞系が可溶性抗原ワクチンの実用化を困難にしていた。家畜衛生試験場の製剤工学研究室では、これまでハムスター由来4株、豚腎由来1株および牛腎由来1株の高増殖系浮遊培養細胞株を樹立した。これら6株の細胞でYd1G3株ウイルスの増殖性を検討したところ、野外株ウイルスに比べて1～2Logウイルス感染価は低いが、 10^7 ～ 10^8 TCID₅₀/mlのウイルスが安定して得られるようになっている。抗原量（補体結合、CF）で、野外株に比べて2倍程度低いが、有効な抗原量が得られている。

高増殖系浮遊培養細胞であるHLT細胞株（ハムスター肺由来：HmLu-1細胞）およびCPK/NIAH細胞株（豚腎由来：CPK細胞）の細胞に、Yd1G3株のウイルスを接種して作製した感染細胞を、Triton X-100で可溶性にして作製した可溶性抗原について種々検討した。両細胞で調整した可溶性抗原のCF抗原価を比較すると、HLT細胞由来の可溶性抗原（CF価：<4～16）よりCPK/NIAH細胞由来の可溶性抗原が8～16のCF価を示し、安定して得られた。また、分画分子量10～30万の限外濾過膜を用いて分画した可溶性抗原では、ウイルスDNAはほとんど除去されたが、CF抗原価も不安定で、1/2以下に低下した。次いで、可溶性抗原を用いて豚に対する有効性を検討した。

高速遠心上清（17, 700×g 120分）または限外濾過（分画分子量100万）処理をした2種類の可溶性抗原にリン酸アルミニウムゲルをアジュバントとして可溶性ワクチン（ワクチンと略）を試作し、13～15kgの子豚4頭を2群に分け、それぞれのワクチンを2mlずつ3週間隔で、筋肉内2回注射した。両ワクチンとも2回注射後1週の中和抗体は、4～16倍の抗体産生が認められた。高速遠心処理のみの抗原のワクチンでは2倍高い中和抗体の産生を示した。2回注射後1週に、強毒ウイルスYS-81株 $10^{7.6}$ TCID₅₀で鼻腔内接

種により攻撃した。その結果限外濾過処理抗原のワクチン群の1頭に発熱が認められたが、他の臨床症状はまったく認められなかった。鼻汁中へのウイルス排泄は、両群とも認められたが、高速遠心処理抗原群では、限外濾過処理抗原群および対照に比べて極めて低かった。以上の試験からADVのgⅢ欠損株であるYd1G3株のウイルスを用いてサブユニットワクチンの有効性が示され、実用化のための生産が可能となった。

次で、Yd1G3株および野外ウイルスであるKumamoto-1株(Ku-1株)を用いて、CPK/NIAH細胞で可溶化抗原を調整し、アジュバントにリン酸アルミニウム(アルミ)およびフロイントの完全アジュバント(オイル)を用いて、4種のワクチンを作成した。9~11kgの子豚8頭を、2頭ずつ4群に分けて、各ワクチン2mlずつを4週間隔で2回筋肉内注射を行った。2回注射後1週の中和抗体の産生では、アルミワクチン群の中和抗体価は、Ku-1株群では8, 32、Yd1G3株群は4, 8と、オイルワクチン群では、Ku-1株では128, 128、Yd1G3株は32, 64の中和抗体価を示し、オイルワクチン群の方が、両株とも高い中和抗体を産生した。2回注射後1週に、YS-81株のウイルス $10^{6.3}$ TCID₅₀で鼻腔内接種で攻撃したところ、アルミワクチン群で40~40.8℃の程度の軽度の発熱を認めたが、オイルワクチン群では40℃以上の発熱は認められなかった。また、他の臨床症状もワクチン群はまったく認められなかった。鼻汁へのウイルス排泄は、オイルワクチン群ではYd1G3株注射豚の2頭中1頭に $10^{0.7}$ ~ $10^{2.0}$ TCID₅₀/mlのウイルスが検出されたのみで、他はまったく認められなかった。しかし、アルミワクチン群では、両株群ともウイルスが回収されたが対照群と比較して有意に低かった。

Yd1G3株ウイルスで調整した可溶化抗原でも使用するアジュバントの種類によっては、ADVの感染をほぼ完全に防御できるサブユニットワクチンの開発が可能ながことが明かとなった。

現在、家畜衛生試験場製剤工学研究室では、豚由来の高増殖系浮遊培養細胞株を用いて大量のADV感染細胞の生産が可能となり、界面活性剤による可溶化抗原の作製もほぼ確立された。以上のように、リン酸アルミニウムゲルのアジュバントを用い、豚オーエスキー病のサブユニットワクチンの実用化が可能である。しかし、フロイントの完全アジュバントを用いた場合、その免疫原性は極めてすぐれていることからオイルアジュバントの開発も進めている。