豚パルボウイルス低温順化弱毒株の妊娠豚における安全性と免疫原性

丸山成和* 丸山典彦* 森田迪夫*

(昭和 62 年 9 月 18 日受理)

Safety and Immunogenicity on Pregnant Sows of an Attenuated Strain of Porcine
Parvovirus after Serial Passages at Low Temperature
SEIKA MARUYAMA (Chiba Serum Institute, Ichikawa, Chiba 272),
FUMIHIKO MARUYAMA and MICHIO MORITA

SUMMARY

When a pregnant sow was inoculated subcutaneously with $10^{6.0}$ TCID₅₀/2ml of the HT⁻-SK-C strain at 74 days of pregnancy, it showed no clinical signs and the virus was not recovered from pharynx, larynx, nasal cavity or rectum. Viremia was not observed. At 104 days of pregnancy, it was sacrificed for autopsy. An attempt was made to recover the virus from its fetus and their accessory organs. It had 13 fetuses, which were normal macroscopically. The inoculated virus was not recovered from the respiratory organs or rectum of 7 fetuses tested.

A pregnant sow was inoculated subcutaneously with $10^{6.0}$ TCID₅₀/2ml of the HT⁻-SK-C strain at 42 days of pregnancy. It was challenged intravenously with $10^{5.0}$ TCID₅₀/5ml of the virulent strain at 66 days of pregnancy along with an uninoculated control pregnant sow. At 46 days after challenge (112 days of pregnancy), these pregnant sows were sacrificed for autopsy. The inoculated sow harbored 15 fetuses, which were all alive with no clinical signs. No challenge virus was recovered from 8 fetuses examined. The cohabiting control pregnant sow harbored 11 fetuses, of which 7 were normal, 3 macerated and one was mummiform. The challenge virus was detected from tested organs. HI antibody titers of 5 gilts were 1:40~1:320 at 14 weeks after inoculation with $10^{6.0}$ TCID₅₀/2ml of the HT⁻-SK-C strain.

要 約

初代豚腎細胞で低温順化した、豚パルボウイルス HT⁻-SK-C 株¹³⁾の妊娠豚における安全性と免疫原性について検討した。

HT⁻-SK-C 株 $10^{6.0}$ TCID₅₀/2 ml を妊娠 74 日の豚に皮下接種したところ、臨床所見に異常は認められず、咽頭、鼻腔、直腸からウイルスは回収されなかった。また、ウイルス血症も認められなかった。同豚を妊娠 104 日目に解剖した結果、剖検上 13 頭の胎児はすべて正常で、このうち 7 頭について臓器からウイルス回収を試みたが、陰性であった。

妊娠 42 日目に同株を接種した豚および非接種豚各 1 頭に対して妊娠 66 日目に野外株 $10^{5.0}$ TICD₅₀/5 ml を静脈内に攻撃した。攻撃後 46 日目(妊娠 112 日目)に両豚を解剖したところ、HT⁻-SK-C 株接種豚の胎児は 15 頭全頭正常で、このうち 8 頭の胎児臓器からウイルス回収を試みたが、陰性であった。

いっぽう、非接種豚の胎児は 11 頭で、その内訳は正常胎児 7 頭、白子 2 頭、黒子 1 頭、ミイラ胎児 1 頭であった。このうち、正常胎児 2 頭、白子 2 頭および黒子 1 頭について臓器からウイルス回収を試みたが、いずれも陽性であった。

種付前 7~14 日の初産豚 5 頭に HT⁻-SK-C 株 $10^{6.0}$ TCID₅₀/2 ml を接種し、抗体の持続を観察したが、接種 14 週後の HI 価は 40~320 倍を維持していた。

豚パルボウイルス (PPV) は、おもに初産豚の異常産原因ウイルスとして知られている^{1~3, 8~10)}。したがって、妊娠豚の PPV 感染症に対するワクチンの有効性につい

ては、PPV 野外株に対する感染防御、とくに胎児感染防御の成否が重要であろう。

MENGLING ら¹¹⁾は PPV 不活化ワクチンについて、PAUL ら¹²⁾は PPV 生ウイルスワクチンについて、それぞれ野外株に対する胎児感染防御試験を実施している。

* 千葉県血清研究所 (市川市国府台2-6-1)

著者らは、弱毒日本脳炎ウイルス、不活化豚パルボウイルス試作混合予防疫を接種した妊娠豚で感染防御試験を実施し、日本脳炎ウイルス (JEV) 野外株 AS-6 と PPV 90 HS 株で同時に攻撃し、胎児感染が防御されたことを報告した¹²⁾。

今回、著者らが作出した PPV 低温順化弱毒 HT-SK-C 株の妊娠豚での安全性、免疫原性および胎児感染防御性について試験したので、その成績を報告する。

1. 材 料 と 方 法

1) 使用 ウ イ ル ス

農林水産省家畜衛生試験場より分与を受けた PPV 90 HS 株と PPV HT-SK-C 株¹³⁾を使用した。

2) 試 験 豚

PPV 抗体陰性の妊娠豚 3 頭、種付 7~14 日目の豚 5 頭を使用した。豚はいずれも千葉県八街町の養豚家より贈入した。

3) 細 胞 培 養

豚胎児腎 (ESK) 株化細胞を使用した。ESK 細胞は血液とぬぐい液からのウイルス回収、および臓器からのウイルス回収に使用した。

4) 赤血球凝集抑制 (HI) 試験

マイクロタイター法⁴⁾で実施した。HA 抗原は前報¹³⁾に述べた方法によって調製した。

5) ウ イ ル ス 感 染 価 の 測 定

前報^{13,14)}に述べた方法によった。細胞増殖用培地 (GM) と細胞維持液 (MM) の調製は杉森ら¹⁶⁾の方法に、判定は藤崎ら⁵⁾の方法にそれぞれしたがった。

6) 妊娠豚における安全試験と胎児感染防御試験

(1) 安全試験：妊娠 74 日の豚 (豚番号 1) と妊娠 42 日の豚 (豚番号 2) に HT-SK-C 株 $10^{6.0}$ TCID₅₀/2 ml を皮下接種後、5~7 日間毎日臨床所見を観察するとともに、咽頭、鼻腔、直腸ぬぐい液および血漿よりウイルス回収を試みた。なお、豚番号 2 には、妊娠 42 日の HT-SK-C 株非接種豚 (豚番号 3) を同居させ、豚番号 1 および 2 と同様の観察を実施した。

豚番号 1 は、妊娠 104 日目に解剖して胎児の所見を観察し、胎児の主要臓器からウイルス回収を試みた。

(2) 胎児感染防御試験：豚番号 2・3 は、両豚の妊娠 66 日目に 90 HS 株 $10^{5.0}$ TCID₅₀/5 ml を静脈内に攻撃後、6 日間臨床所見を観察し、前述同様の方法ウイルスで回収を試みた。

攻撃後 46 日目 (妊娠 112 日目) に解剖し、胎児の所見を観察し、胎児の主要臓器から攻撃ウイルスの回収を試みた。

7) HI 抗体価の持続

種付前 7~14 日の豚 5 頭 (いずれも JEV, PPV の抗体陰性) に HT-SK-C 株 $10^{6.0}$ TCID₅₀/2 ml を 1 回皮

下接種し、2, 5, 14 週目にそれぞれ採血し、HI 抗体価を測定した。

2. 成 績

1) 妊 娠 豚 で の 安 全 性

HT-SK-C 株を接種した妊娠 74 日と妊娠 42 日の豚 (豚番号 1, 2) および非接種豚 (豚番号 3) では、接種後発熱、白血球減少症、ウイルス血症は認められず、咽頭、鼻腔、直腸ぬぐい液からウイルスは回収されなかった (図 1)。

妊娠 74 日目に HT-SK-C 株を接種し、104 日目に解剖した妊娠豚 (豚番号 1) の胎児は 13 頭で、肉眼的観察で全頭正常であった。このうち 7 頭の胎児の脳、扁桃、肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、リンパ節、臍帯血よりウイルス回収を試みたが、陰性であった。

豚番号 1・2 は接種豚、3 は非接種豚
 ↓: 接種 ↓: 攻撃 ○—○: 白血球数 ●—●: 体温
 [ウイルス回収] P: 咽頭 N: 鼻腔 R: 直腸 B: 血漿
 上段は 32℃, 下段は 37℃ でのウイルス価 (LogTCID₅₀/ml),
 —は検出できず。

図 1 妊娠豚に対する HT-SK-C 株接種および強毒株攻撃後の臨床所見とウイルス回収成績

2) 妊娠豚における HT⁻-SK-C 株の免疫原性

妊娠 42 日に HT⁻-SK-C 株を接種した豚 (豚番号 2) を、妊娠 66 日目に 90 HS 株で攻撃したところ、攻撃後も発熱、白血球減少症、ウイルス血症は認められず、咽頭、鼻腔、直腸ぬぐい液からウイルスは検出されなかった (図 1)。

HI 抗体価は、HT⁻-SK-C 株接種後 2 週目に 40 倍、3 週目に 160 倍であったが、90 HS 株攻撃後 1 週目に 1,280 倍に上昇した。その後漸減し、HT⁻-SK-C 株接種後 7~8 週目には 160 倍となった (図 2)。

いっぽう、HT⁻-SK-C 株非接種豚 (豚番号 3) は、90 HS 株攻撃後 1 日目に白血球数が 11,400/mm³ から 6,200/mm³ に、2 日目には 5,200/mm³ に減少し、3 日目に 8,100/mm³ に回復した。体温は攻撃後 2 日目にやや上昇した (図 1)。

図 2 HT⁻-SK-C 株接種豚と非接種豚の HI 抗体価の推移

ウイルス血症は攻撃後 2 日目から 4 日目にかけ 3 日間連続して検出され、そのウイルス価は $10^{1.5} \sim 10^{2.5}$ TCID₅₀/ml の間であった (図 1)。

ウイルス排出は咽頭ぬぐい液から、攻撃後 3 日間連続して、また直腸ぬぐい液からは 1 日目にそれぞれ観察され、そのウイルス価はいずれも $10^{1.5}$ TCID₅₀/ml であった (図 1)。

HI 抗体価は、90 HS 株攻撃時まで 10 倍以下であったが、攻撃後 1~2 週目に 10,240 倍に上昇し、攻撃後 4~5 週目でも 2,560 倍であった (図 2)。

3) HT⁻-SK-C 株の胎児感染防御性

HT⁻-SK-C 株接種豚 (豚番号 2) と非接種同居豚 (豚番号 3) を妊娠 66 日目に 90 HS 株で攻撃後、妊娠 112 日目に解剖して胎児の異常の有無について観察した。その結果、HT⁻-SK-C 株接種豚の胎児数は 15 頭で、肉眼的観察で全頭正常であった。これらの胎児のうち 8 頭について、脳、扁桃、肺、肝臓、脾臓、腎臓、膵臓、リンパ節よりウイルスの回収を試みたが、すべて陰性であった。

また、胎児血清について HI 試験を試みたが、すべて 10 倍以下であった。さらに、中枢神経系を病理組織学的に観察したが、いずれも病変は陰性であった。

いっぽう、HT⁻-SK-C 株非接種同居豚は、胎児数が 11 頭で、肉眼的観察で 7 頭が正常、2 頭が白子、他の 2 頭は黒子とミイラ胎児であった。これらの胎児のうち、正常胎児 2 頭、白子 2 頭および黒子 1 頭について臓器からのウイルス回収を試みた。その結果、白子の 1 頭は肝臓、脾臓、腎臓、膵臓から、他の 1 頭は脾臓、腎臓、リンパ節からそれぞれウイルスが回収され、そのウイルス価は $10^{1.5} \sim 10^{2.0}$ TCID₅₀/ml であった (表 1)。

黒子では、調べた脳、肺、肝臓、膵臓、腎臓の全臓器からウイルスが回収され、そのウイルス価は $10^{1.5} \sim 10^{2.25}$

表 1 HT⁻-SK-C 株非接種同居母豚に対する攻撃試験後の胎児臓器からのウイルス回収と胎児の HI 抗体価および病理所見

胎児 番号	胎 児 臓 器 か ら の ウ イ ル ス 回 収									HI 価	中枢神経系 の病理所見
	脳	扁桃	肺	心	肝	脾	腎	膵	リンパ節		
1	{ -*	—	—	•	—	—	—	—	—	2,560	•
2	{ —	—	—	—	—	—	—	—	—	640	+
	{ —	—	—	—	—	1.75	—	—	1.5 1.5		
3	{ —	—	—	—	—	—	—	—	—	2,560	+
4	{ —	—	—	—	—	—	—	—	—	5,120	+
	{ —	—	—	•	2.0	1.5	1.5	—	—		
5	{ —	•	—	•	—	—	—	•	•	•	•
	{ 1.5		2.25		2.25	2.25	2.0				

注) 胎児番号 1・2 は正常胎児、豚番号 3・4 は白子、豚番号 5 は黒子。

*: ESK 細胞で測定したウイルス感染価で上段が 32℃, 下段が 37℃ での TCID₅₀/ml (log)。

- は陰性, • は試験せず

図3 HT-SK-C株を接種した種付候補豚のHI抗体価の持続

TCID₅₀/mlであった(表1)。

また、正常胎児の2頭からも、1頭(胎児番号1)では腎臓と脾臓から、他の1頭(胎児番号2)では脾臓とリンパ節からウイルスが回収され、そのウイルス価は10^{1.5}~10^{2.25} TCID₅₀/mlであった(表1)。

胎児血清のHI価は、採血可能であった9頭全例が陽性で、そのHI価は640~5,120倍であった。

中枢神経系の病変も弱いながら観察され、脳では弱い血管周囲のリンパ系細胞浸潤が観察された。

4) 種付候補豚におけるHI抗体価の持続

交配前7~14日にHT-SK-C株10^{6.0} TCID₅₀/2mlを5頭の皮下に1回接種し、14週までHI抗体価を測定したが、接種後2週では80~640倍、5週では40~320倍で、14週でも40~320倍のHI抗体価を持続していた(図3)。

3. 考 察

PAULら¹⁵⁾は豚胎児腎細胞に30代以上継代し、さらに豚精巢株化細胞に18代継代して作出した、豚パルボウイルス弱毒NADL-2株の妊娠豚での感染防御試験を実施している。それによると、NADL-2株10^{5.0} CCID₅₀(median cell culture infective dose)を1ml筋肉内に接種した時の2週後のHI抗体価は320~1,280倍であった。また、NADL-2株を接種後77~118日目(妊娠40日)に野外株を経口攻撃しても感染防御が成立したことから、長期間の有効性が示唆される。しかし、妊娠40日の2頭の豚の子宮に直接NADL-2株を接種した実験では、8頭中7頭の胎児がPPVにより感染死したことから、妊娠中の豚には接種すべきでないと述べている。

著者らは、HT-SK-C株の子宮内感染は試みていないが、PPVの感染率が高いとされる妊娠中期⁹⁾の豚にHT-SK-C株を接種し、胎児に感染の徴候を認めなかったことから、本株の妊娠豚に対する安全性は高いものと考えている。

藤崎ら⁷⁾は、PPVが分離された母豚21頭の分娩成績

で、1頭当たりの平均産子数が10.2頭、その中で異常胎児は黒子2.0頭、白子3.0頭その他、起立不能、虚弱、生後死亡などの異常が合わせて0.8頭あったことを報告している。

本研究でも、90HS株攻撃後HT-SK-C株非接種豚の胎児では、いずれかの臓器からウイルスが回収されたが、正常とみられた胎児番号1と2の臓器からもウイルスが回収され、HI抗体価も高く、胎児番号2では中枢神経系の病理所見にも弱いながら異常が認められるものと推察される。これに類似する成績は、MENGELINGら¹¹⁾、PAULら¹²⁾の報告にも認められる。

PAULら¹⁵⁾の妊娠豚での感染防御試験、藤崎ら⁷⁾の1カ月齢豚での感染試験、また藤崎ら⁷⁾の野外でのPPVの分離状況などから、PPVの検出されやすい臓器としては、肺、脳、腎臓、腸間膜リンパ節などがあげられる。しかし、著者らの成績では、脾臓と腎臓でより高いウイルス価が認められた。この違いの理由は不明であるが、攻撃方法や分離条件の差によるものと考えている。

著者らは、HT-SK-C株をSPF母豚由来の人工哺育豚に接種し、臨床所見に異常のないこと、ウイルス血症、ウイルス排出を認めないことを報告した¹³⁾。この成績は5ヶ月齢豚でも同様であった¹⁴⁾ことから、豚での安全性が示唆された。さらに、5ヶ月齢豚では、HIおよび中和抗体価の持続性、感染防御の成立が確認され、HT-SK-C株の有効性も示唆された¹⁴⁾。

本報告では、妊娠42日と74日の豚にHT-SK-C株を接種しても母豚ではウイルス排出、ウイルス血症が認められず、胎児も正常であったことから、妊娠豚での安全性が確認された。

また、90HS株の攻撃後、HT-SK-C株接種豚は、母豚および胎児とも正常であったのに対し、HT-SK-C株非接種同居豚では、ウイルス血症が認められ、胎児異常も認められた。この差は、明らかにHT-SK-C株の接種により、胎児感染が防御されたことを示している。

これらの成績より、HT-SK-C株は、PPVの弱毒性生ウイルスワクチンの種ウイルスとして使用できる性状を有しているものと考えられる。

〔本論文の要旨は第98回(1984年10月)、日本獣医学会で報告した。〕

稿を終るに当たり、実験のご指導をたまわった全農家畜衛生研究所の原田熊幸博士、北里研究所の藤崎優次郎博士に深謝いたします。

引用文献

- 1) CARTWRIGHT, S. F. and HUCK, R. A.: *Vet. Rec.*, 81, 196~197 (1967).
- 2) CARTWRIGHT, S. F., LUCAS, M. and HUCK, R. A.: *J. Comp. Pathol.*, 79, 371~377 (1969).
- 3) CARTWRIGHT, S. F., LUCAS, M. and HUCK, R. A.: *J. Comp. Pathol.*, 81, 145~155 (1971).

- 4) 藤崎優次郎：日獣会誌, 28, 135~138 (1975).
- 5) 藤崎優次郎, 守本富昭, 杉森 正, ほか：Bull. Natl. Inst. Anim. Health., 71, 8~14 (1975).
- 6) 藤崎優次郎：豚病学, 熊谷哲夫, 波岡茂郎, 丹羽太左衛門ら編, 第2版, 336~347, 近代出版, 東京 (1982).
- 7) FUJISAKI, Y., SUGIMORI, T., MORIMOTO, T., et al.: *Virus.*, 25, 23~32 (1975).
- 8) JOHNSON, R. H. and COLLINGS, D. F.: *Vet. Res., Rec.*, 85, 446~447 (1969).
- 9) JOHNSON, R. H. and COLLINGS, D. F.: *Res. Vet. Sci.*, 12, 570~572 (1971).
- 10) MAYR, A., BACHMANN, P. A., SIEGL, G., et al.: *Archiv. Ges. Virusforsch.*, 25, 38~51 (1968).
- 11) MENGELING, W. L., BROWN, T. T., PAUL, P. S., et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 40, 204~207 (1979).
- 12) 丸山成和, 丸山典彦, 田中良和, ほか：日獣会誌, 51, 348~352 (1978).
- 13) 丸山成和, 丸山典彦, 森田迪夫：日獣会誌, 40, 197~202 (1987).
- 14) 丸山成和, 丸山典彦, 森田迪夫：日獣会誌, 40, 360~364 (1987).
- 15) PAUL, P. S. and MENGELING, W. L.: *Am. J. Vet. Res.*, 41, 2007~2011 (1980).
- 16) SUGIMORI, T., MORIMOTO, T., MIURA, Y., et al.: *Natl. Inst. Anim. Health Q.*, 9, 55~64 (1969).

家畜衛生, 公衆衛生, 実験動物などの
各分野で活躍する獣医師にとって待望のソフト, いよいよ発売!

新発売

コンピュータによる

獣医一般統計解析

滝沢隆安 製作・監修

定価28,000円 送料350円

適応機種:

NEC PC9800シリーズ (5"FD)

実験および調査により得たデータをコンピュータに入力するだけで, 下記の統計手法が全く簡単に, しかも短時間に実行できます。

監修者の永年の経験をもとに, 特に獣医学領域における一般統計解析のために製作されたソフトです。

定性的解析手法

1. 母百分率の区間推定 (信頼度95%)
2. 母百分率との差の検定
3. 2つの百分率の差の検定
4. いくつかの百分率の差の検定
5. $m \times n$ 分割表による独立性の検定

定量的解析手法

1. 母平均と母標準偏差の区間推定 (信頼度95%)
2. 母平均および母標準偏差との差の検定

3. 2群のデータの平均値間と標準偏差間の差の検定
4. 対応のある2群のデータの平均値間と標準偏差間の差の検定
5. いくつかの群の平均値間と標準偏差間の差の検定
6. 単相関分析および単回帰分析
7. 基本統計量の計算
8. 適合度による正規性の検定
9. 異常値の検出

☆詳しい資料は下記へお申し込み下さい。

〒113

東京都文京区本郷2-27-18

文永堂出版(株)

振替口座 東京0-114601

電話 03 (814) 3321