糖蛋白 gⅢ およびチミジンキナーゼ遺伝子欠損オーエスキー病 ウイルス弱毒生ワクチンの安全性と有効性

宇留野勝好 柴田 勲 鮫ヶ井靖雄

西村雅明 大田峻二

全農家畜衛生研究所（佐倉市大蛇町 7, 〒285）

（平成 3 年 7 月 29 日受付・平成 3 年 12 月 20 日受理）

Safety and Efficacy of an Attenuated Aujeszky's Disease Virus Vaccine with Deletions
in Thymidine Kinase and Glycoprotein-gⅢ Genes

KATSUYOSHI URUNO, ISAO SHIBATA, YASUO SAMEGAI, MASAOKI NISHIMURA, SHUNJI OHTA
(Zen-Noh Institute of Animal Health, Ohja-machi, Sakura-shi, Chiba 285)

SUMMARY

An attenuated Aujeszky's disease virus (ADV) vaccine with deletions in thymidine kinase and glycoprotein-gⅢ genes was evaluated. Sixteen 3-day-old piglets, which had been vaccinated with $1, 10^{-1}$ or 10^{-2} dose of the vaccine, were challenge-exposed intranasally to a virulent strain of ADV on postvaccination day (PVD) 11 together with 5 non-vaccinated piglets of the same age. None of the vaccinates exhibited adverse reactions to the vaccination, and all were protected against the challenge-exposure, while 3 of the 5 control piglets developed severe clinical signs and died after challenge-exposure. Four pigs vaccinated with one dose of the vaccine at 4 weeks of age were challenged intranasally with the virulent strain on PVD 21 together with 4 non-vaccinated pigs. After exposure, the vaccinates developed no clinical signs except for slight fever and shed ADV for 4 to 6 days. On the other hand, in all of the control pigs, clinical signs for 3 to 5 days, fever for 6 days, and virus shedding for 8 to 13 days were observed. Anti-ADV antibodies were detected in the vaccinates on PVD 7, and the titers increased rapidly after challenge-exposure. Twelve piglets, 3-day-old, were vaccinated with one dose of the vaccine, and 3 each of which were exposed intranasally to the virulent strain on PVD 4, 7, 10, or 14. Non-vaccinated piglets were exposed concurrently. None of the vaccinates exhibited adverse reactions to the vaccination. Two of the 3 vaccinates exposed on PVD 4 died, and the remaining one survived. All of the vaccinates exposed on PVD 7, 10, or 14 were protected, while all of the control piglets developed severe clinical signs and died after challenge-exposure. These results indicate the safety and efficacy of the vaccine.

—Key Words : Aujeszky's disease virus, vaccine, safety, efficacy.

-----*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 45, 312~316 (1992)

要 約

糖蛋白 gⅢ (gⅢ) およびチミジンキナーゼ (TK) 遺伝子欠損オーエスキー病ウイルス生ワクチン (米国ファーマンタ・アニマル・ヘルス社製) の豚における免疫能について検討した。免疫試験では、オーエスキー病ウイルス (ADV) 抗体陰性の 3 日齢豚 16 頭にワクチン $1, 10^{-1}$ または 10^{-2} ドースを、また ADV 抗体陰性の 4 週齢豚 4 頭に 1 ドースを筋肉内接種し、3 日齢豚では接種後 11 日目に、また 4 週齢豚では接種後 3 週目にそれぞれ強毒オーエスキー病ウイルス (山形 S81 株 $10^{5.4}$ および $10^{6.2}$ TCID₅₀) で鼻腔内接種し攻撃した。免疫発現時期を検討する試験では、ADV 抗体陰性の 3 日齢豚 12 頭にワクチン 1 ドースを筋肉内接種し、ワクチン接種後 4, 7, 10 および 14 日目にそれぞれワクチン接種豚 3 頭および対照豚 3 頭を、強毒ウイルス (山形 S81 株 $10^{5.0} \sim 10^{5.3}$ TCID₅₀) で鼻腔内接種し攻撃した。

その結果、本ワクチンは 3 日齢および 4 週齢豚において安全であり、強毒ウイルスの攻撃による発症を防御するこ

と、またワクチン接種した3日齢豚ではワクチン接種後4~7日目から発症を抑える免疫効果が発現することが明らかにされた。——キーワード：オーエスキ病ウイルス、ワクチン、安全性、有効性。

日獣会誌 45, 312~316 (1992)

オーエスキ病ウイルス (ADV) は哺乳豚の高率な死亡や妊娠母豚に死産を起こすほか、時には肥育豚に呼吸器病を起こすため侵入した養豚場に大きな被害をもたらす。これまで、わが国ではオーエスキ病 (AD) 発生農場での抗体陽性豚の摘発・淘汰を基本とする対策により清浄化を計ってきたが、ADV の侵入経路が特定できないことが多く、また潜伏感染するため抗体陽性豚が感染源となることなど対策が困難なことから AD 汚染地域が徐々に拡大しつつある。

欧米ではすでに国レベルでの AD 撲滅のためにワクチンを用いた清浄化プログラムが進められている。

Kir¹⁾は糖蛋白 gⅢ遺伝子 (gⅢ) およびチミジンキナーゼ遺伝子 (TK) を欠損した ADV 弱毒生ワクチンを開発し、1989年に米国で製造承認を得た。さらに、Kir³⁾は gⅢ抗体を検出する ELISA を開発し、ワクチン抗体と野外ウイルス抗体とを識別できることを報告した。

今回、この gⅢおよび TK 遺伝子が欠損した ADV 弱毒生ワクチンの有効性について検討した。

材料および方法

細胞培養

試験には CPK 細胞を使用した。増殖培養液 (GM) は Eagle の Minimum Essential Medium (MEM) に Tryptose phosphate broth 0.3%, L-グルタミン 0.03%, 非働化子牛血清 (CS) 5%, 抗生物質および 7.5% NaHCO₃ 溶液を 2% 加えたものを使用した。維持培養液 (MM) には GM の CS を 1% としたものを用いた。

ウイルス

攻撃ウイルスには農水省家畜衛生試験場より分与されたオーエスキ病ウイルス山形 S81 株の 3 代継代株を使用した。

ワクチン

AD 生ワクチンとして「オムニマーク PRV」(ファーマンタ・アニマル・ヘルス社製) を用いた。使用に際しては乾燥ワクチンを溶解用液で溶解し、その 2ml を 1 ドース ($10^{5.1}$ TCID₅₀) とした。また、この 1 ドースを 10 倍または 100 倍に希釈し、その 2ml を 10^{-1} または 10^{-2} ドースとした。

供試豚

免疫試験では ADV 抗体陰性の 3 日齢豚 21 頭と 4 週齢豚 8 頭を、また免疫発現時期を検討する試験では ADV 抗体陰性の 3 日齢豚 22 頭および 4 日齢豚 2 頭を用いた。

免疫試験

3 日齢豚を用いた免疫試験では 21 頭のうち 6 頭に 1

ドース、6 頭に 10^{-1} ドースおよび 4 頭に 10^{-2} ドースのワクチンをそれぞれ 3 日齢時に 1 回筋肉内接種し、残りの 5 頭をワクチン非接種対照豚とした。接種後 11 日目に山形 S81 株 ($10^{5.4}$ TCID₅₀) をワクチン接種豚および対照豚の鼻腔内に接種し攻撃した。

4 週齢豚を用いた免疫試験では、8 頭のうち 4 頭にワクチン 1 ドースを 4 週齢時に 1 回筋肉内接種し、残りの 4 頭をワクチン非接種対照豚とした。ワクチン接種後 3 週目に山形 S81 株 ($10^{6.2}$ TCID₅₀) をワクチン接種豚および対照豚の鼻腔内に接種し攻撃した。

両試験において、ワクチン接種後の元気、食欲等の一般臨床症状を観察し、経時的に体重測定および血清採取を行い経過血清について中和抗体価を測定した。ワクチン接種後および攻撃後、隔日 (3 日齢豚) または毎日 (4 週齢豚) 鼻汁を採取し、ウイルス回収を行った。また、3 日齢豚では攻撃後 2 週間、4 週齢豚ではワクチン接種後および攻撃後 2 週間体温を測定した。さらに 3 日齢豚では攻撃後 14 日目に、4 週齢豚では攻撃後 29 日目に主要臓器 (大脳・三叉神経節・扁桃・肺・肝臓・脾臓) を採取しウイルス回収を行った。

免疫発現時期を検討する試験

3 日齢豚 22 頭のうち 12 頭にワクチン 1 ドースを筋肉内に接種し、残りの 10 頭および 4 日齢豚 2 頭をワクチン非接種対照豚とした。接種後 4, 7, 10 および 14 日目にそれぞれワクチン接種豚 3 頭と対照豚 3 頭を山形 S81 株 ($10^{5.0}$ ~ $10^{5.3}$ TCID₅₀) で鼻腔内接種し攻撃した。

一般臨床症状の観察および各種検査は 3 日齢豚を用いた免疫試験と同様に行った。

鼻汁および臓器からのウイルス回収

鼻汁は綿棒を用いて採取し CS を 2% に増量した MM で抽出し試料とした。また、臓器については摘出臓器に MM (CS2%) をを加え 10% (w/v) 臓器乳剤とし、遠心沈澱 (3000rpm 10 分) 後その上清を試料とした。試料を MM (CS2%) で 10 倍階段希釈し、各希釈当たり 4 穴のマイクロプレート (96 穴) 培養 CPK 細胞に接種 (0.05ml/穴) した。37℃で 90 分間吸着させた後 MM で 3 回洗浄し、MM を 0.1ml ずつ加え 37℃で 7 日間培養し観察した。培養細胞に特有の CPE が現れたものを感染とみなし、ペーレンス・ケルバー法により TCID₅₀ を算出した。

中和抗体価の測定

56℃で 30 分間加温し非働化した被検血清を MM で 2 倍階段希釈した。2 列の各希釈に等量のウイルス液 (山形 S81 株、約 200 TCID₅₀/0.025ml) を加え、37℃、24 時間後血清希釈当たり 2 穴のマイクロプレート培養

表 1 3 日齢豚免疫試験：試験豚の攻撃後の臨床症状、発熱、ウイルス排泄および臓器からのウイルス回収

区 分	ワクチン ドース	豚番号	攻撃後の 転 帰	臨床 ¹⁾ 症状	発 熱 ²⁾			ウイルス 排 泄	臓 器 ・ 組 織					
					+	+	+		大脳	三叉神経節	扁桃	肺	肝臓	脾臓
免疫豚	1	W71	生存	—	0	0	0	4/8 ³⁾	— ⁴⁾	—	—	—	—	—
		W72	生存	+	0	0	0	5/8	—	—	—	—	—	—
		W73	生存	—	0	0	0	1/8	—	—	—	—	—	—
		W74	生存	—	0	0	0	4/8	—	—	—	—	—	—
		W75	生存	—	0	0	0	3/8	—	—	—	—	—	—
		W76	生存	—	0	0	0	4/8	—	—	—	—	—	—
	10 ⁻¹	W77	生存	—	1	0	0	3/8	—	—	—	—	—	—
		W78	生存	—	0	0	0	3/8	—	—	—	—	—	—
		W79	生存	—	4	0	0	2/8	—	—	—	—	—	—
		W80	生存	—	2	0	0	4/8	—	—	—	—	—	—
		W81	生存	—	1	0	0	5/8	—	—	—	—	—	—
		W82	生存	—	1	0	0	4/8	—	—	—	—	—	—
	10 ⁻²	W83	生存	—	1	1	0	4/8	—	—	—	—	—	—
		W84	生存	—	1	0	0	3/8	—	—	—	—	—	—
		W85	生存	—	0	0	0	4/8	—	—	—	—	—	—
		W86	生存	—	2	0	0	4/8	—	—	—	—	—	—
対照豚		W87	死亡(6) ⁵⁾	+	0	2	2	3/3	+	+	+	—	—	—
		W88	死亡(6)	+	0	4	0	3/3	+	+	+	+	—	—
		W89	死亡(5)	+	0	1	1	3/3	+	+	+	+	+	—
		W90	生存	+	2	0	0	8/8	+	—	+	—	—	—
		W91	生存	+	5	0	0	8/8	—	—	—	—	+	—

1) —：異常を認めず +：元気消失・食欲不振を認める ++：神経症状を認める

2) +：40.0℃以上40.5℃未満 ++：40.5℃以上41.0℃未満 +++：41.0℃以上 数字は各区分の発熱が認められた日数を表す

3) ウイルス回収日数/鼻汁採取日数

4) +：ウイルス分離陽性 —：ウイルス分離陰性

5) 攻撃から死亡までの日数

図 1 3 日齢豚免疫試験：ワクチン接種後の体重の推移

CPK 細胞に 0.05ml/ ずつ接種し、MM を 0.05ml/ ずつ加え、37℃で 7 日間培養し観察した。

中和抗体価は 2 穴の培養細胞のうち少なくとも 1 穴で CPE の発現を阻止した血清の最高希釈倍数の逆数で示した。

成 績

3 日齢豚を用いた免疫試験

ワクチン接種後の一般臨床症状の観察を行ったが、ワクチン接種豚および対照豚とも異常は認められなかった。また、ワクチン接種後鼻汁からウイルスは回収されなかった。

ワクチン非接種対照豚は強毒株の攻撃により 5 頭全頭が発症し、そのうち 3 頭が死亡した。1,10⁻¹ または 10⁻² ドースのワクチン接種豚は強毒株の攻撃に対すすべて生存耐過し、発熱の抑制または軽減、ウイルス排泄期間の短縮および体重の順調な増加を示した（表 1、図 1）。また、主要臓器からウイルス回収を行った結果、1,10⁻¹ または 10⁻² ドースのワクチン接種豚ではどの臓器からもウイルスは回収されなかったが、対照豚からは生存あるいは死亡に関係なくウイルスが回収された（表 1）。

4 週齢豚を用いた免疫試験

ワクチン接種後の一般臨床症状の観察を行ったが、ワクチン接種豚および対照豚とも異常は認められず、発熱もみられなかった。ワクチン接種豚はすべて中和抗体を産生した（表 1）。また、ワクチン接種後鼻汁からウイ

表2 4週齢豚免疫試験：試験豚の攻撃後の臨床症状，発熱，ウイルス排泄および中和抗体価

区 分	豚番号	ワクチン 接種時週齢	攻撃ウイル ス量 (TCID ₅₀)	臨床 ¹⁾ 症状	発熱 ²⁾		ウイルス ³⁾ 排 泄	中 和 抗 体 価							
					+	+		ワクチン接種後週数				攻 撃 後 週 数			
								0	1	2	3	1	2	3	4
免疫豚	1	4	10 ^{6.2}	—	1	0	5	<1	8	2	1	>2048	>2048	>2048	>2048
	2			—	2	0	6	<1	8	1	1	>2048	>2048	>2048	2048
	3			—	2	0	4	<1	16	1	2	>2048	>2048	>2048	>2048
	4			—	2	0	5	<1	8	1	1	>2048	>2048	>2048	>2048
対照豚	5	4	10 ^{6.2}	+	3	3	13	<1	<1	<1	<1	8	128	512	1024
	6			+	4	2	10	<1	<1	<1	<1	16	128	256	1024
	7			+	4	2	8	<1	<1	<1	<1	16	256	256	1024
	8			+	3	3	13	<1	<1	<1	<1	64	1024	256	1024

1) —：異常を認めず +：元気消失，食欲不振，嘔吐，クシャミを認める

2) +：40.0℃以上40.5℃未満 ++：40.5℃以上41.0℃未満

数字は各区分の発熱が認められた日数を表す

3) 鼻汁からウイルスが回収された日数を表す

表3 免疫発現試験：試験豚の攻撃後の転帰

ワクチン接種から攻撃迄の日数 ¹⁾	攻撃時日齢	攻撃ウイルス量 (LogTCID ₅₀)	ワクチン接種豚	対 象 豚
			生存数 / 攻撃数	生存数 / 攻撃数
4	7	5.3	1/3(5, 6) ²⁾	0/3(4, 6, 6)
7	10	5.1	3/3	0/3(6, 6, 6)
10	13	5.3	3/3	0/3(6, 6, 7)
14	17	5.0	3/3	0/3(5, 5, 6)

1) ワクチンは3日齢時に接種

2) 死亡豚の攻撃から死亡までの日数

ルスは回収されなかった。

攻撃後の一般臨床症状の観察で，対照豚では3～5日間元気消失，食欲不振，嘔吐などの症状が認められたが，ワクチン接種豚では全く認められなかった。また，鼻汁中へのウイルス排泄は対照豚では8～13日間認められたのに対し，ワクチン接種豚では4～6日間であり，発熱は対照豚の6日間に対し，ワクチン接種豚では1～2日間とウイルス排泄期間および発熱期間とも明らかに短縮された（表2）。攻撃後の中和抗体価は対照豚では徐々に上昇したのに対し，ワクチン接種豚では2次応答による急激な上昇が認められた（表2）。ワクチン接種豚の体重は接種後および攻撃後ともほぼ順調に増加したが，対照豚との間に有意差は認められなかった。

免疫発現時期を検討する試験

ワクチン接種後の一般臨床症状の観察を行ったが，ワクチン接種豚および対照豚とも異常は認められなかった。

ワクチン非接種対照豚は強毒株の攻撃に対していずれも40℃以上の発熱，元気消失，食欲減退等の症状を呈して全頭死亡した。いっぽう，ワクチン接種豚では接種後4日目に攻撃した豚では3頭中2頭が発症し死亡したが，1頭は耐過した。また，ワクチン接種後7，10または14日目に攻撃した豚では臨床上の異常をほとんど示さず（表3），体重も順調に増加した。なお，発症死亡

表4 免疫発現試験：試験豚の中和抗体価

ワクチン接種か ¹⁾ ら攻撃迄の日数	攻撃時 日 齢	豚番号	中和抗体価攻撃後の日数		
			0	7	14
4	7	K-1	<1	64	128
	7	K-2	<1	• ²⁾	•
	7	K-3	<1	•	•
7	10	K-7	<1	4	256
	10	K-8	<1	4	8
	10	K-9	<1	4	128
10	13	K-13	<1	64	1024
	13	K-14	1	16	512
	13	K-15	1	32	256
14	17	K-19	2	512	1024
	17	K-20	8	256	512
	17	K-21	8	256	128

1) ワクチンは3日齢時に接種

2) 死亡のため材料なし

豚では主要臓器からウイルスが回収されたが生存耐過豚からは回収されなかった。

中和抗体はワクチン接種後4および7日目では認められなかったが，接種後10日目では3頭中2頭に認められ，接種後14日目には全頭が2～8倍の抗体価を示した。また，ワクチン接種豚では死亡した2頭を除き攻撃後抗体価の上昇が認められた（表4）。

考 察

ADV に対する豚の感受性は新生子豚で最も高く加齢とともに抵抗性を増すが、KIT²⁾は本ワクチンが3日齢豚へも安全に接種できることを報告している。これは本ワクチンが弱毒生ワクチンとして用いられてきたブカレスト株から、神経病原性に関与している TK^{4,5,7,10)} と、ADV の細胞への吸着^{8,11)} および病原性発現⁶⁾ に関与している gⅢ との2つの遺伝子を欠損したものであるため病原性が減弱していると考えられる。今回、3日齢豚を用いた免疫試験および免疫発現試験において、ワクチン接種後に臨床症状は認められず、本ワクチンの通常投与量の1ドースはもちろん 10^{-2} ドースでも強毒ウイルスの攻撃による発症を抑えること、またワクチン接種後4~7日目から強毒ウイルスの攻撃に対し発症を抑える免疫効果が発現することが明らかになった。これらのことから、本ワクチンの接種は最も感受性の高い新生子豚を安全に、また能動的に免疫できることが確認された。また、免疫発現時期がワクチン接種後4~7日目であり、3日齢時に接種した場合7~10日齢時には免疫されるので、感染の危険性がある場合本ワクチンの接種は早期の発症抑制に有効であることが示された。本ワクチンはまだ血中抗体が検出されない接種後4~7日の時期に免疫効果を示したが、これはインターフェロンあるいは細胞性免疫等の液性免疫以外の効果によるものと推察される。4週齢豚を用いた免疫試験では、本ワクチンの接種により強毒感染後の発熱等一般臨床症状の抑制、鼻汁へのウイルス排泄期間の短縮が確認された。これらのことから、本ワクチンの接種は野外 ADV の感染による豚の発症、死亡あるいは発育の阻害を軽減するとともに ADV 汚染農場内でのウイルスの汚染度を低下させ、伝播の機会を減少させることが期待できるので、AD の清浄化に有効であると思われる。ワクチンを用いて養豚場のオーエスキー病を清浄化するためにはワクチン接種が野外感染を阻止し得ないことから、野外ウイルス感染豚を摘発することが必要であるが、そのめたにはワクチン接種豚と野外ウイルス感染豚を識別できることが必須である。本ワ

クチンでは ADV gⅢ 抗体検出用 ELISA キットが開発されており、gⅢ をマーカーとしてワクチン抗体と野外ウイルス感染抗体の識別が可能であり⁹⁾、わが国における今後の AD 撲滅対策に有効であると思われる。

移行抗体保有豚にワクチンを接種した場合、抗体価が高いとワクチン免疫が阻害されることが報告されており^{12,13)}、本ワクチンについても検討が必要と思われる。また、強毒ウイルスの潜伏感染成立に対するワクチン接種の影響および強毒ウイルスの感染成立に必要なウイルス量とワクチン免疫との関係についても今後の検討課題である。

引用文献

- 1) KIT S., SHEPPARD M., ICHIMURA H., et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 48, 780~793 (1987).
- 2) KIT S.: *Proceedings of the CEC Seminar on Vaccination and Control of Aujeszky's Disease*, VAN OIRSCHOT J. T., 37~44, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht (1989).
- 3) KIT S., AWAYA Y., OTSUKA H., et al.: *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2, 14~23 (1990).
- 4) MARCHIOLI C. C., YANCEY JR. R. J., WARDLEY R. C., et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 48, 1577~1583 (1987).
- 5) MCGREGOR S., EASTERDAY B. C., KAPLAN A. S., et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 46, 1494~1497 (1985).
- 6) METTENLEITER T. C., SCHREURS C., ZUCKERMANN F., et al.: *J. Virol.*, 62, 2712~2717 (1988).
- 7) MOORMAN R. J. M., DE ROVER T., BRIAIRE J., et al.: *J. Gen. Virol.*, 71, 1591~1595 (1990).
- 8) SCHREURS C., METTENLEITER T. C., ZUCKERMANN F., et al.: *J. Virol.*, 62, 2251~2257 (1988).
- 9) 柴田 勲, 宇留野勝好, 鮫ヶ井靖雄, ほか: 日獣会誌, 44, 1180~1184 (1991).
- 10) THOMSEN D. R., MARCHIOLI C. C., YANCEY R. J., et al.: *J. Virol.*, 61, 229~232 (1987).
- 11) ZUCKERMANN F., ZSAK L., REILLY L., et al.: *J. Virol.*, 63, 3323~3329 (1989).
- 12) VANNIER P.: *Am. J. Vet. Res.*, 46, 1498~1502 (1985).
- 13) VAN OIRSCHOT J. T.: *Res. Vet. Sci.*, 42, 12~16 (1987).