

論文の内容の要旨

論文題目 豚マイコプラズマ肺炎の予防法に関する研究

氏名 岡田宗典

生産性向上のために養豚経営の大型化、企業化が進むなかで、近年、生産性を阻害する疾病として呼吸器病や下痢症などの慢性疾病が重要視されている。*Mycoplasma hyopneumoniae* によって引き起こされる豚マイコプラズマ肺炎 (MPS: *Mycoplasmal pneumonia of swine*) は、これらの慢性疾病のなかで最も発生率が高いもののひとつであり、わが国の豚群においても *M. hyopneumoniae* が高率に浸潤していることが明らかとなっている。MPSの予防・治療のために生産現場においては、抗生物質の投与が行われているが、耐性菌の出現や食品としての安全性といった公衆衛生上の観点から使用を制限する傾向が強くなっている。さらに飼育環境の改善のために、早期離乳や SPF 豚群への変換などが提案されているが、莫大な投資を必要とするため、一般的には行われていない。このような背景から、近年、ワクチンによるMPSの予防方法が注目を集めている。*M. hyopneumoniae* の自然感染あるいは実験感染を耐過した豚は再感染に抵抗性を示すことから、従来からMPSに対するワクチンの可能性が示唆されていた。これまでに数多くの不活化ワクチンの試みが報告されているものの一定

した効果が得られていない。*M. hyopneumoniae* 感染においては、肺病変の形成に生体の免疫機構が関与していることが示唆されており、おそらく、このことがワクチン開発を困難なものとしているのであろう。著者らは、MPS に対する不活化ワクチンの実用化をめざし、ワクチン抗原として *M. hyopneumoniae* の培養上清に注目した。本研究では、実験感染系を用いてワクチン抗原としての *M. hyopneumoniae* の培養上清の有効性を確認し、培養上清中に存在する抗原蛋白について検討するとともに、培養上清ワクチン注射豚における肺病変形成の抑制機序を明らかにした。さらに、実際の生産現場に本ワクチンを応用し、培養上清ワクチンの野外における有効性と生産性の改善効果について評価した。

第1章では、*M. hyopneumoniae* の全菌体および培養上清を抗原とした不活化ワクチンを作製し、豚の実験感染系を用いて、各ワクチンのMPSに対する防御効果について評価した。さらに、ワクチン注射豚の血清を用いて免疫応答に関与する抗原について検討した。その結果、対照区では、すべての豚に MPS に典型的な肺病変が観察され、その肺病変面積率は 9.8 から 15.6%であり、平均は $12.2 \pm 2.2\%$ であった。また、肺病変部から $10^{6.2}$ Color-Changing Unit (CCU)/ml の *M. hyopneumoniae* が回収された。これに対して、全菌体ワクチン注射区では、攻撃時の CF 抗体価 (GM 抗体価:256.0) が、著明に上昇していたにもかかわらず、剖検時の平均肺病変面積率は $18.7 \pm 16.5\%$ であり、5 頭中 2 頭には肺病変が認められなかったものの、残りの 3 頭には 25.6%から 33.2%に及ぶ激しい肺病変が認められた。また、肺からの回収菌数は $10^{5.8}$ CCU/ml であり、対照区との有意差は認められなかった。一方、培養上清ワクチン注射区では、攻撃時の CF 抗体価は比較的低い値 (GM 抗体価:4.0) を示したものの 5 頭中 2 頭には、まったく肺病変が認められず、残りの 3 頭にもわずかに認められる程度で、剖検時の平均肺病変面積率は $3.2 \pm 3.9\%$ であり、対照区に比べ有意に ($p < 0.05$) 減少し、安定した肺病変形成抑制効果が認められた。さらに、肺からの回収菌数は $10^{4.2}$ CCU/ml であり、対照区に比べ有意に ($p < 0.05$) 減少していた。攻撃直前の各ワクチン注射豚の血清と *M. hyopneumoniae* の Tween 20 可溶化抗原を用いたイムノブロッティングを行ったところ、全菌体ワクチン注射区の攻撃直前の血清は、少なくとも 17 種類の蛋白 (145, 125, 110, 97, 89, 78, 65, 61, 52, 46, 42, 41, 38, 34, 30, 28, 22 kDa) と強く反応した。一方、培養上清ワクチン注射区の攻撃直前の血清は、8 種類の蛋白 (97, 89, 65, 52, 46, 42, 41, 34 kDa) と反応した。これらのうち 52 kDa と 34 kDa のバンドは、可溶化抗原の非特異反応と考えられたことから、培養上清ワクチン注射豚の攻撃直前の血清は、*M.*

hyopneumoniae の6種の蛋白(97、89、65、46、42 および 41kDa)を認識しており、これらの蛋白のいくつかは、肺病変形成の抑制に関係している可能性が考えられた。以上の結果から、*M. hyopneumoniae* の培養上清ワクチンは、安定した肺病変形成の抑制効果を示し、おそらく、培養上清中に存在する6種の蛋白のいずれかが、肺病変形成の抑制効果に関与するものと推測された。

第2章では、*M. hyopneumoniae* 培養上清ワクチンによる肺病変形成の抑制効果について、その作用機序を明らかにするために、培養上清ワクチン注射豚の BALF 中に出現する炎症性細胞と局所抗体の推移、さらに炎症性サイトカインの産生について検討し、形成された肺病変の組織学的所見との関連について考察した。

ワクチン注射区の BALF では、攻撃後 1 週以降、*M. hyopneumoniae* 特異的 IgA および IgG 抗体価の急速な上昇が認められ、IgA 抗体価は、攻撃後 1 週以降、IgG 抗体価は、攻撃後 2 週から 3 週において対照区に比べ有意($P<0.01$)に高い値を示した。*M. hyopneumoniae* は、両試験区の BALF から回収され、攻撃後 4 週におけるワクチン注射区の回収菌数は、 $10^{2.8}$ CCU/ml であり、対照区の回収菌数($10^{5.0}$ CCU/ml)に比べ有意($P<0.01$)に低かったものの、攻撃後 3 週まで両試験区において有意差は認められなかった。一方、BALF 中の TNF- α は、攻撃後 2 週以降、両試験区において検出されたが、ワクチン注射区の TNF- α 濃度は、対照区に比べ攻撃後 3 週以降、有意($P<0.05$)に低い値を示し、低濃度で推移した。豚の BALF における攻撃前の総細胞数は、 $5.5 \sim 5.6 \times 10^5$ 個/ml であり、そのほとんどを肺胞マクロファージが占め、わずかに、好中球およびリンパ球が認められた。しかし、*M. hyopneumoniae* による攻撃後、対照区では総細胞数が増加し、とくに攻撃後 2 週以降、TNF- α 濃度の上昇に一致して、好中球およびリンパ球が顕著に増加した。一方、ワクチン注射区では、好中球数およびリンパ球数は、攻撃後 2 週以降、対照区に比べ有意($P<0.01$)に低い値を示し、特に、好中球は、攻撃後 4 週で減少に転じた。また肺胞マクロファージも攻撃後 4 週で、対照区に比べ有意($P<0.01$)に低い値を示し、総細胞数は、増加する傾向にあるものの、攻撃後 2 週以降、対照区に比べ、有意($P<0.01$)に低い値を示した。剖検時、対照区のすべての豚に肺病変が認められ、肺病変面積率は $11.2 \pm 7.5\%$ であった。一方、ワクチン注射区の肺病変面積率は $0.6 \pm 0.7\%$ であり、対照区比べ有意($P<0.01$)に低い値を示し、5 頭中 2 頭に肺病変がわずかに認められたものの、残りの 3 頭では肉眼的にはまったく認められなかった。しかしながら、肉眼的に肺病変が認められなかったワクチン注射区の肺においても、組織学的には対照区と同様に気管支および肺胞腔内への炎症性細胞(肺

胞マクロファージおよび好中球)の浸潤さらに気管支周囲のリンパ濾胞の過形成が、組織学的に観察された。一方、ワクチン注射区の肺では、肺胞マクロファージおよび好中球の浸潤を示す MAC387 陽性細胞数や T 細胞の集簇を示す CD3 陽性細胞数が、対照区に比べ有意($P<0.05$)に低かった。さらにワクチン注射区における IgA 産生細胞は、対照区比べ約 2 倍に増加していた。これらの結果から、培養上清ワクチン注射豚では *M. hyopneumoniae* 感染後、早い時期に局所抗体が産生され、この抗体が肺胞マクロファージと *M. hyopneumoniae* との相互作用を抑制することにより、TNF- α の産生を抑制するものと考えられた。その結果、その後の炎症性サイトカインの誘導や炎症性細胞の浸潤など肺の炎症反応が抑制され、肺病変が減少するものと考えられた。

第3章では、これまでに *M. hyopneumoniae* の実験感染系での有効性が確認された培養上清ワクチンについて、実際の生産現場での有効性を実証するために、衛生レベルの異なる三カ所の農場を用いて、培養上清ワクチンの有効性について評価した。

それぞれの農場の子豚をワクチン区と対照区に分け、ワクチン区の豚には培養上清ワクチンを3~7週齢時と、その4週後に注射した。肺病変および菌分離の結果から *M. hyopneumoniae* が浸潤していないと考えられた農場では、第2回注射後4週で CF 抗体が有意($p<0.05$)に上昇し、CF 抗体は第2回注射後12週まで持続したことから、ワクチン抗体は、すくなくとも3ヶ月間持続することが示された。*M. hyopneumoniae* の浸潤が確認された農場では、ワクチン注射により臨床症状が改善され、と場検査において、ワクチン区では、対照区に比べ肺病変保有率が半減し、肺病変面積率も有意($P<0.05$)に減少した。さらに、肺から分離された *M. hyopneumoniae* の菌数も、対照区に比べ有意($P<0.05$)に減少していた。一方、平均1日増体重と出荷日齢は、比較的衛生レベルの高い農場では、ワクチン区と対照区の間有意差は認められなかったが、慢性呼吸器病による被害の大きい農場では、ワクチン区において、平均1日増体重が、有意($P<0.05$)に増加していた。さらに出荷日齢は、対照区に比べ有意($P<0.05$)に短縮された。その結果、飼料要求率の改善も認められた。以上の結果から、*M. hyopneumoniae* の培養上清を用いた不活化ワクチンは、野外においても MPS の臨床症状および肺病変の形成を抑制することが明らかとなった。さらに慢性肺炎による経済的被害の大きい農場においては、生産成績も改善できることが明らかとなった。