

10 豚熱の免疫付与状況確認検査結果と

豚の免疫機能の関係性調査

○八町 慶史 田中 大也

要 約

豚熱ワクチン接種（ワクチン接種）農場での免疫付与状況確認検査の中で、免疫の獲得が不十分なため再接種となる事例や、一部の繁殖豚では複数回ワクチン接種したにも関わらず抗体価が上昇しない事例を認めた。そこで、令和3年度豚病抗体調査や免疫付与状況確認検査で採血した個体の豚熱 ELISA 検査結果が陰性及び偽陽性のものを免疫獲得が不十分な群、豚熱 ELISA 陽性のものを免疫獲得が十分な群として設定し、①免疫低下に関与するウイルス感染症の罹患状況検査、②豚病抗体調査の結果比較、③免疫グロブリン定量、④細胞性免疫検査を行い、比較検討により免疫獲得に関与する因子を探求した。結果は、①豚繁殖呼吸障害症候群（PRRS）は全検体 PCR 陰性であり、豚サーコウイルス 2 型（PCV2）PCR 検査の Ct 値は両区で有意差を認めなかった。②豚マイコプラズマ肺炎（MPS）及び豚胸膜肺炎（APP）の ELISA 検査 S/P 値は、両区で有意差を認めなかった。③免疫グロブリン量は、両区で有意差を認めなかった。④ConA、PWM 及び LPS を用いたリンパ球幼弱化試験は、両区でリンパ球の増殖度に差は認めなかった。以上より、免疫獲得に関与する因子は今回明らかにならなかったが、今後も追加検証するとともに、集団免疫の維持により徹底した豚熱対策を行っていく。

都では、令和元年12月末から展示施設等を含む都内豚飼養施設への豚熱ワクチン接種を開始した。本ワクチンは30日齢以上の飼育豚全頭を接種対象としており、集団免疫を形成することで、免疫を獲得していない豚への豚熱ウイルスの伝播を防止する。定期的な豚熱 ELISA 検査（豚熱エライザキットⅡ，（株）ニッポンジーン，富山）により豚群の免疫付与状況を調べているが、都ではワクチン接種で免疫を獲得しない個体が一定数確認されている。

豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針では、繁殖豚についてワクチン接種の上

限が4回と設定されている。令和3年度に養豚農家で実施した免疫付与状況確認検査について繁殖豚と肥育豚別に分析すると、繁殖豚では全農場で高い陽性率を示した（図1）。

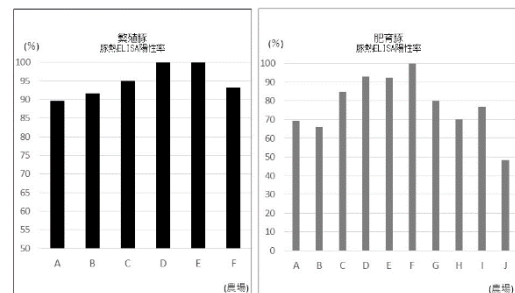


図1 令和3年度の免疫付与状況確認検査結果

しかし個体ごとに確認すると、A農場で飼養されている繁殖豚7頭は、複数回ワクチン接種したにもかかわらず、令和3年度の免疫付与状況確認検査では陽性判定を認めなかった（図2）。

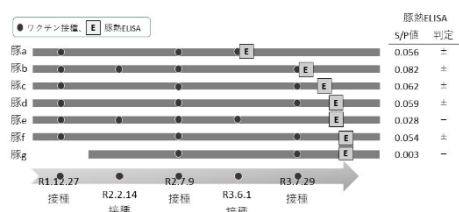


図2 A農場で複数回ワクチン接種したが、免疫獲得しなかった個体

一方肥育豚については、令和4年3月時点で大半が初回接豚母豚(第1世代)から産まれた子豚(第2世代)となり、令和3年度の免疫付与状況確認検査では、一部農場で低い陽性率を示した（図1）。

ワクチン接種下における集団免疫形成率 (%) の数式は、 $\frac{1}{\varepsilon} \left(1 - \frac{1}{Rt} \right) \times 100$ (ε : 免疫付与率、 Rt : 実行再生産数) と表すことができ、集団免疫維持のためにはワクチン接種による確実な免疫の獲得、つまり免疫付与率向上が重要となる。ワクチン接種による免疫獲得に関与する因子の1つとして免疫不全症が考えられる。免疫不全症の原因には、原発性、感染症、自己免疫疾患、血液腫瘍などが挙げられるが、今回は原発性及び感染症に着目し、免疫機能及び感染症の罹患について調査した。

材料及び方法

豚熱ワクチンは弱毒生ワクチン（スワイバックC, 共立製薬株式会社, 東京）を使用している。生ワクチンでは細胞性免

疫と液性免疫を惹起するので、両方の機能について評価した。

試験①：免疫低下に関与するウイルス性疾病の罹患の有無

材料は令和3年度豚病抗体調査の血清30検体を供した。核酸抽出キット（High Pure Viral Nucleic Acid Kit, ロシュ・ダイアグノスティクス株, ドイツ）を用いてウイルス核酸を抽出した。

Christopher-henningsら¹⁾によるPRRSのORF7領域を標的としたnested PCR法、鈴木ら(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門, 未公表)によるPCV2のカプシド遺伝子を標的としたリアルタイムPCR法を実施した。

試験②：豚熱以外の疾病の抗体調査の結果比較

令和3年度豚病抗体調査の血清141検体を用いて、MPSの抗体検査（IDEXX M.hyo エリーザキット, アイデックスラボラトリーズ, アメリカ）とAPPの抗体検査（IDEXX APP エリーザキット, アイデックスラボラトリーズ, アメリカ）を実施した。

試験③：免疫グロブリンの定量

材料は令和3年度豚病抗体調査の血清34検体と、A農場で複数回ワクチン接種したが豚熱ELISA法で疑陽性・陰性判定の血清7検体を検査に供した。血清蛋白電気泳動法による血清蛋白分画検査（クイックジェルSP, 株ヘレナ研究所, 埼玉）から免疫グロブリンを定量した。

試験④：Tリンパ球とBリンパ球の機能評価

A 農場で複数回ワクチン接種したが豚熱 ELISA 法で偽陽性・陰性判定の全血 7 検体を用いて、藤田ら²⁾の報告に従いリンパ球幼弱化学験を行った (図 3)。

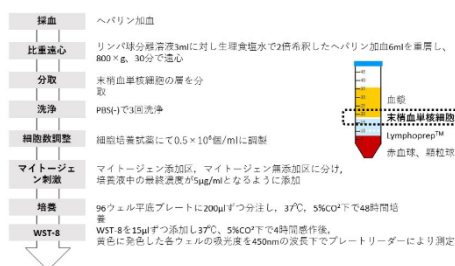


図 3 リンパ球幼弱化学験

リンパ球は、比重遠心法によりリンパ球分離溶液 (Lymphoprep™, Serum Bernburg AG, ドイツ) を用いて分離した。細胞培養には細胞培養試薬 (RPMI-1640, ナカライテスク株式会社, 京都) に L-グルタミン (L-Glutamine, サーモフィッシャーサイエンティフィック(株), アメリカ)、ペニシリンストレプトマイシン (Penicillin-Streptomycin, サーモフィッシャーサイエンティフィック(株), アメリカ)、10% 牛胎子血清を加えた細胞培養試薬、マイトーゼンには、コンカナバリン A (Con A, (株)J オイルミルズ, 東京)、アメリカヤマゴボウ (PWM, (株)J オイルミルズ, 東京) 及びリポポリサッカライド (LPS Solution, サーモフィッシャーサイエンティフィック(株), 東京)、WST-8 法には WST-8 (Cell Counting kit, (株)同仁化学研究所, 熊本) を使用した。求めた吸光度より刺激指数 (SI 値 = マイトーゼンの刺激細胞の測定値 / マイトーゼン非刺激細胞の測定値) を算出し、リンパ球の増殖度を数値化した。

標本抽出法：各試験材料は、豚熱 ELISA の結果をもとに陰性、疑陽性及び陽性検体から層別サンプリングを実施した。

統計処理：試験①②③については、豚熱 ELISA の S/P 値と、各試験で求められた定量値で散布図を作成し、スピアマン順位相関分析 (相関分析) を行った。また標本抽出数が大きい場合は、豚熱 ELISA 陽性判定を免疫が十分な群、豚熱 ELISA 疑陽性・陰性判定を免疫が不十分な群と定義づけ、各試験で求められた定量値について両群でマン・ホイットニーの U 検定 (U 検定) を行った。両検定の有意水準は 5% に設定した。統計解析は、統計ソフト (EZR, 自治医科大学附属さいたま医療センター, 埼玉) で実施した。試験④については、マイトーゼンごとに免疫が十分な群と不十分な群で箱ひげ図を作成し、データの分布を比較した。

成績

試験①：免疫低下に関与するウイルス性疾病の罹患の有無

PRRS は全検体 PCR 陰性だった。PCV2Ct 値は豚熱 ELISA の S/P 値によらず横ばい傾向であり (平均値 34.89)、相関係数 0.245 (p=0.192) と帰無仮説は棄却されず、PCV2Ct 値と豚熱 ELISA の S/P 値に相関性があるとは言えなかった。(図 4)

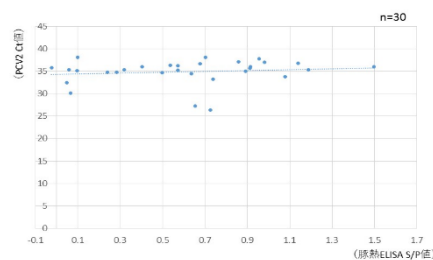


図 4 PCV2 Ct 値と豚熱 ELISA S/P 値の相関分析

試験②：豚熱以外の疾病の抗体調査の結果比較

MPS は、MPS ワクチン接種群/未接種群別に、また、ワクチン未接種群は、肥育豚/繁殖豚に分けて検討した（図5）。

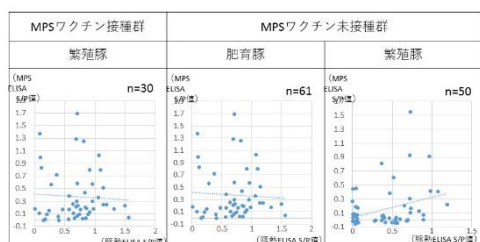


図5 MPS抗体検査と豚熱ELISA S/P値の相関分析

MPS ワクチン接種群では相関係数 0.109 ($p=0.567$)、MPS ワクチン未接種群（肥育豚）では相関係数 0.0257 ($p=0.897$) でいずれも帰無仮説は棄却されず、MPS ELISA の S/P 値と豚熱 ELISA の S/P 値に相関性があるとは言えなかった。MPS ワクチン未接種群（繁殖豚）では相関係数 0.394 ($p=0.000232$) で、弱い正の相関がみられた。また、MPS ワクチン未接種群について免疫が十分な群と不十分な群で U 検定を行ったところ、 $p=0.291$ （肥育豚）、 $p=0.126$ （繁殖豚）といずれも帰無仮説は棄却できず、免疫が十分な群と不十分な群で有意差があるとは言えなかった。

APP は、今回使用の APP ELISA キットは野外株のみを検出するため、野外株の浸潤が確認されている農場と対象とし、肥育豚と繁殖豚に分けて検討した（図6）。肥育豚では相関係数 0.055 ($p=0.0684$)、繁殖豚では相関係数-0.25 ($p=0.607$) でいずれも帰無仮説は棄却されず、APP ELISA の S/P 値と豚熱 ELISA

の S/P 値に相関性があるとは言えなかった。

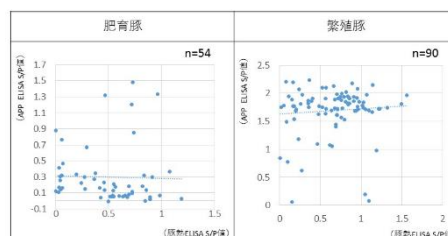


図6 APP抗体検査（野外株）と豚熱ELISA S/P値の相関分析

また、免疫が十分な群と不十分な群で U 検定を行ったところ、 $p=0.0626$ （肥育豚）、 $p=0.261$ （繁殖豚）といずれも帰無仮説は棄却できず、免疫が十分な群と不十分な群で有意差があるとは言えなかった。

試験③：免疫グロブリンの定量

肥育豚と繁殖豚に分けて検討した（図7）。

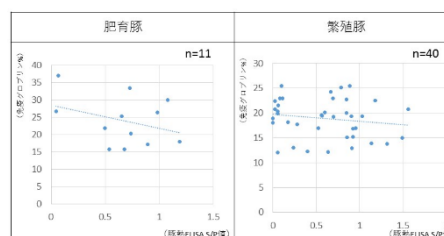


図7 免疫グロブリン量と豚熱ELISA S/P値の相関分析

肥育豚では相関係数-0.168 ($p=0.601$)、繁殖豚では相関係数-0.135 ($p=0.405$) でいずれも帰無仮説は棄却されず、免疫グロブリン量と豚熱 ELISA の S/P 値に相関性があるとは言えなかった。また、繁殖豚について免疫が十分な群と不十分な群で U 検定を行ったところ、 $p=0.247$ と帰無仮説は棄却できず、免疫が十分な群と

不十分な群で有意差があるとは言えなかった。

試験④：Tリンパ球とBリンパ球の機能評価

いずれのマイトージェン刺激でも、免疫が十分な群と不十分な群でリンパ球の増殖度に大きな差は認めなかった（図8）。

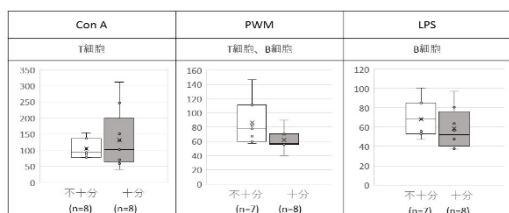


図8 リンパ球幼弱化試験

考察

試験①では、PRRSは全検体PCR陰性であったため影響を検証できなかった。検体として血清を用いたが、ウイルス血症を引き起こすのは間欠的である報告もあるため、確実にPRRSの感染を調べられたとは言い難い。PCV2は、Ct値30以上の感染したウイルス量が低いと考えられる個体では免疫機能に及ぼす影響は小さいと考察された。試験②③では液性免疫の評価をしたが、免疫が不十分な群でも一定量の免疫グロブリンが産生されていることが確認できたため、液性免疫の機能に異常はないと考察された。試験④では細胞性免疫の評価をしたが、免疫が不十分な群も機能的なリンパ球を有していたため、免疫不全状態ではないことが分かった。

今回検証した項目からは、豚群全体の免疫獲得に影響を与える因子を明らかに

することはできなかった。しかし、複数の要因が関与しあい免疫獲得に影響を与える可能性もあるため、個体ごとに本試験データをまとめて分析した。表1はA農場で複数回ワクチン接種したが免疫を獲得しなかった7頭のデータである。比較すると、豚dが全体的に他の豚や基準より低値を示す傾向を認めたことから、複数の試験結果を基に判別することが有用であると想定された。

表1 免疫獲得が不十分な個体の詳細データ

豚	CSF s/片数	判定	CSF 中和抗体価	白血球数	免疫グロブリン	Con A	PWM	LPS
a	0.056	±	NT	14000/μl	22.4%	NT	NT	NT
b	0.082	±	8	NT	22.9%	136.4845%	111.1521%	100.6647%
c	0.062	±	8	NT	21.5%	154.5577%	146.7927%	85.34774%
d	0.059	±	4	8100/μl	14.6%	78.79088%	57.51569%	47.04328%
e	0.028	-	4	13900/μl	22.4%	93.58752%	67.59099%	55.66724%
f	0.054	±	4	19400/μl	20.3%	76.98982%	59.78976%	68.31384%
g	0.003	-	<2	15200/μl	18.9%	86.48534%	82.27794%	53.12367%
※	0.665	-	185	12000~30000/μl	22.3%	119%	73%	63%

L A農場の平均値、一般的な基準値

集団免疫について、豚房内伝播と豚房間伝播での再生産数を比較した際、豚房内伝播のほうが優位に高値となる⁴⁾。豚熱ワクチンの抗体付与率は80-90%との報告³⁾もあるが、豚房内伝播防止のためにさらなる検証を重ね、免疫付与率向上させることが重要となる。今後は、本試験ではPRRSの影響を評価できなかったため、PRRSに罹患した個体のデータを収集し影響を検討していく。PCV2は収集した個体の感染レベルが低かったため、高レベルに感染した個体のデータ収集も行い、PCV2感染が与える影響をより詳細に調査する必要がある。また、複数の因子が関与しあい免疫獲得に影響を与える可能性が示唆されたため、今回試験を行った項目について主成分分析や因子分析といった多変量解析を行い、より詳細に解

析する必要がある。また、今回検証した項目以外にストレス状況や品種など免疫機能に影響を与える因子は存在するため、他の因子も検証していく余地がある。A農場で複数回ワクチン接種したが免疫を獲得しなかった7頭のワクチン初回接種時月齢は、8-72 か月齢（範囲）、 47 ± 25.65 か月齢（平均 \pm 標準偏差）、52 か月齢（中央値）と高い傾向にあり、初回接種時月齢は因子の1つであると想定された。今回、細胞性免疫の評価に初めて着手したが、検査に不慣れであったことや採材が困難であったことなど、検査精度に改善点があったため、今後も検討を重ね検査精度の向上を図る必要がある。また、リンパ球サブセット検査やサイトカイン測定等の他の細胞性免疫の検査も検討し、多角的に免疫機能を評価できる体制を構築していく。

免疫不全症以外のワクチン接種による免疫獲得に関与する因子としては、移行抗体の有無、明らかな発熱、重篤な急性疾患への罹患及びウイルス干渉などが考えられる。今後のワクチン接種体制として、豚の体調をよく観察しワクチン接種するとともに、田中ら⁵⁾の発表を基に移行抗体価が16-32倍になる時期にワクチン接種を行い、高水準の集団免疫を維持していく必要がある。免疫付与状況調査や本試験を通して免疫獲得が不十分な個体が明らかになったため、農場と情報共有し、当該豚に対してより高度な飼養管理を行うことで当該豚を守ることができる。今後も、追加検証及びきめ細やかな対策を実施することで、効果的かつ徹底した豚熱発生予防対策に繋げていく。

引用文献

1) Christopher-hennings J, Nelson EA, Nelson JK, Hines RJ, Swenson SL, Hill HT, Zimmerman JJ, Katz JB, Yaeger MJ, Chase CC, Benfield DA : Identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen and tissues from vasectomized and nonvasectomized boars, *Journal of clinical microbiology*, 33(7),1730-1734(1995)

2) 藤田慶一郎, 高橋孝志, 福田修他, 野口宗彦:豚のリンパ球幼若化試験における簡便法の検討,平成 23 年度栃木県業績発表会, (2011)

3) 農林水産省豚熱・アフリカ豚熱防疫対策本部:豚熱ワクチン接種農場における飼養衛生管理の重要性,豚熱対策,6(2021)

4) D Klinkenberg, J de Bree, H Laevens, M C M de Jong:Within- and between-pen transmission of classical swine fever virus: a new method to estimate the basic reproduction ratio from transmission experiments, *Epidemiology & infection*, 128(2), 293-299(2002)

5) 田中大也, 八町慶史: 離乳豚に適期で豚熱ワクチンを接種するための取組,令和 3 年度東京都家畜保健衛生所業績発表会, (2022)

