

## 豚増殖性腸炎ワクチンの効果検証

佐藤裕夫 井戸徳子 平間ちが

### 要 約

岩手県内の養豚農場で飼養される黒色便を呈して死亡した繁殖豚1頭が、病性鑑定により増殖性腸炎と診断されたことにより、哺乳豚～繁殖豚計69頭の糞便及び血清について*Lawsonia intracellularis*の遺伝子及び抗体検査を実施した。6週齢及び9週齢の豚から*L. intracellularis*遺伝子が検出され、9週齢以降の抗体陽性率も高かった。対策としてワクチン接種したところ、接種豚には排菌頭数の有意な減少及び1日増体量の増加による肥育日数の短縮が認められた。適切なワクチン接種により、本病の排菌率低減と生産成績の向上が図られた。

キーワード：豚増殖性腸炎, *Lawsonia intracellularis*, リアルタイムPCR, ワクチン, 豚

### 緒 言

豚増殖性腸炎 (*Porcine Proliferative Enteropathy*: PPE) は *Lawsonia intracellularis* (*L. intracellularis*) を原因菌とする離乳後肥育期の豚に発生する感染症で、臨床所見により急性型 (増殖性出血性腸炎) と慢性型 (腸腺腫症) に区別される。急性型では粘膜からの出血を伴う下痢便を主徴とし、急性経過で発症豚の50%が死亡することもある。慢性型は発育不良、食欲不振、軽度の下痢がみられ、小腸及び一部大腸の肥厚を特徴とする [1]。細胞内寄生性細菌で分離が困難であることから、遺伝子検査として糞便のnested PCR (nPCR) 検査 [7] が一般的に行われるが、慢性型の発症が疑われる場合、病理組織学的検査及び病変部のnPCR検査を行わないと確定診断は困難であった。近年、木口ら [8] は本病にリアルタイムPCR (rPCR) 法を応用し、病理組織学的検査の病変の程度と直腸内容rPCRによる病原体遺伝子のコピー数に強い相関があり、PPEの診断への応用が可能であることを報告している。

本病の治療にはタイロシン製剤やチアムリン製剤が選択されていたが、“豚のローソニア イントラセルラリス感染症 (急性出血性腸炎型を除く) による増体重低下の軽減”を効能・効果とする生ワクチンが国内でも承認され [2]、国内外でその接種効果が報告されている [3-6]。本報告ではPPEの急性型が発生した農場

において、rPCR法及び抗体検査による浸潤状況調査並びにワクチン接種を主体とした発生予防対策を実施し、その効果を検証したので、その成績を報告する。

### 材料及び方法

#### 供試材料

飼養頭数200頭 (母豚35頭, 種雄豚15頭, 肥育豚150頭) の一貫経営養豚場において、平成23年11月に母豚2頭が発熱、食欲不振及び黒色タール便を呈し、うち死亡した1頭を病性鑑定した。*L. intracellularis*浸潤状況調査には同農場で飼養される哺乳豚 (2, 4, 6, 9週齢)、育成豚 (4, 7カ月齢) 及び1歳以上の繁殖母豚各10頭 (2週齢の哺乳豚は9頭)、計69頭の糞便及び血清を用いた。rPCR検査には、対照群として浸潤状況調査に用いた4及び6週齢の哺乳豚、各10頭、ワクチン接種群として同週齢の各30頭の糞便を用いた。生産成績の比較には、パークシャー種 (B種) の対照群 (ワクチン未接種豚42頭, 平成23年4～7月生まれ) 及びワクチン接種群 (39頭, 平成24年4～7月生まれ) 並びにランドレース種及び交雑種 (L種等) の対照群 (ワクチン未接種豚19頭, 平成23年4～7月生まれ) 及びワクチン接種豚 (44頭, 平成24年4～7月生まれ) の生産成績を用いた。

### ワクチン接種

エンテリゾールイリアイティスワクチン（ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン社）を生後3週齢時の豚に経口接種した。

### 遺伝子検査

DNAテンプレートの作成：nPCRには回腸及び結腸の内容からInstaGene Matrix（BioRad社）を用いてDNA抽出を行った。rPCRにはQIAamp DNA Stool Mini Kit（Qiagen社）によりDNAを抽出した。

nPCR検査：AmpliTaq Gold（ABI社）を用い、プライマー及び増幅条件はJonesら [7] の報告と同様に実施し、アガロースゲル電気泳動後、紫外線下で増幅産物の確認を行った。

rPCR検査：Pasterlaら [9] のプライマーセットを用い、QuantiTect SYBR Green PCR Kit（Qiagen社）によりインターカレーター法で実施した。解析はABI7500 Real Time System（ABI社）により行った。スタンダード系列はnPCRで増幅した産物を精製し、分光光度計（GeneQuant 100, GEヘルスケアジャパン株式会社）でDNA濃度を測定後、コピー数（copies/ $\mu$ l）は以下の計算式で算出した。コピー数=濃度（g/ml）/分子量（ $660 \times \text{PCR産物サイズ} / 6.02 \times 10^{23}$ ）で本試験では $2.5 \times 10^4 \sim 2.5 \times 10^6$  コピー/ $2.5 \mu$ lで使用した。

### 抗体検査

間接蛍光抗体法（IFA）：日清丸紅飼料株式会社から分与されたPPE-IFA抗原スライドを用い、30倍希釈の被検血清 $10 \mu$ lを4℃18時間、30倍希釈のFITC標識抗豚IgGウサギ抗体（ZYMED LAB社） $5 \mu$ lを37℃1時間反応させ、洗浄、グリセリン封入後、蛍光顕微鏡下で観察、判定した。

blocking ELISA法（Jacobsonら [10]）：ベーリンガーインゲルハイムベトメディカジャパン社に依頼した。  
**生産成績**

B種及びL種等に品種を区分し、生産成績は1日増体量（DG）及び肥育日数を比較した。いずれの群も育成豚が30kgに達した時点で肥育豚舎に移動した日を起点（肥育0日目）にDG及び肥育日数を算出した。

### 成績

#### 病性鑑定

剖検所見では空腸から回腸末端部に至る粘膜の著しい肥厚及び結腸における暗赤色血様～泥状内容物を伴う粘膜のうっ血・出血が認められ、病理組織学的所見では、空腸から回腸に至る鍍銀染色にて染色される小桿菌を伴う腸粘膜上皮の腺腫様過形成が確認された。遺伝子検査において回腸及び結腸内容から*L. intracellularis*遺伝子が検出され、細菌検査では豚赤痢菌等、その他有意菌は分離されなかった。

#### *L. intracellularis*浸潤状況調査

遺伝子検査において6及び9週齢の育成豚のそれぞれ10頭中6頭（60%）及び10頭中4頭（40%）から*L. intracellularis*遺伝子が検出された。抗体検査では2週齢、4週齢及び6週齢時の豚にはIFAでのみ陽性が認められたが、以降の9週齢、4カ月、7カ月齢及び繁殖豚では、IFA及びblocking ELISAともに高い抗体陽性率を示した（図1）。

#### ワクチン効果検証

rPCRにより、6週齢の対照群及びワクチン接種群では、それぞれ7頭（70%）及び2頭（6.7%）から遺伝子が検出され、有意な減少が認められた。遺伝子が検出された個体の幾何平均遺伝子量はそれぞれ、

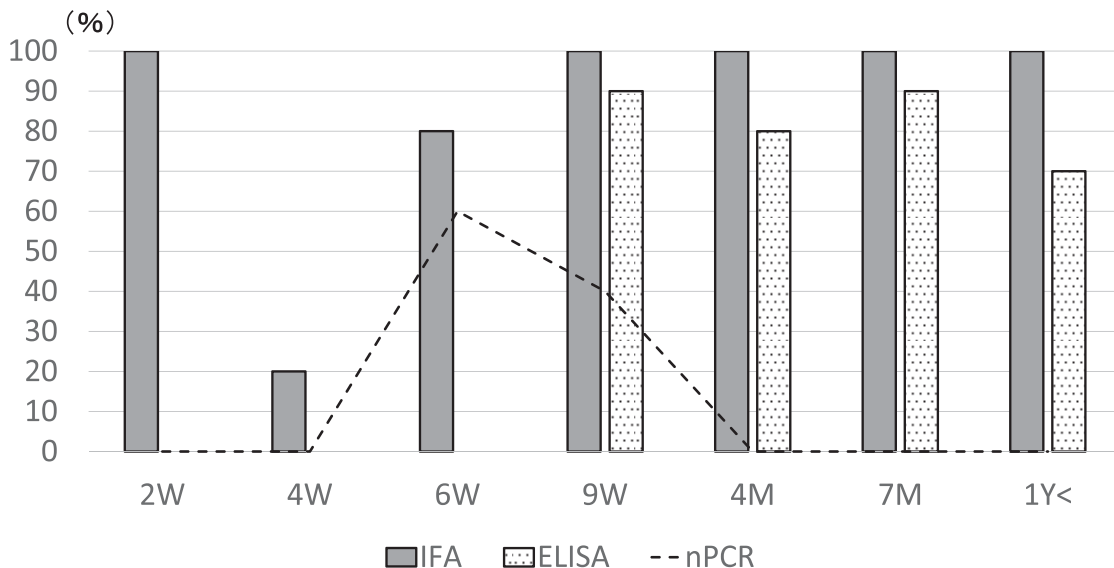


図1 浸潤状況調査：抗体陽性率及び遺伝子検出成績

表1 ワクチン接種効果検証：リアルタイムPCR

週 齢	6 週 齢		9 週 齢		
	ワクチン 対照群 n=10	接種群 n=30	対照群 n=10	接種群 n=30	
排 菌	有	7 <sup>a</sup>	4	7	
	無	3	6	23	
陽性個体の平均遺 伝子量 (copy/well)		7.99×10 <sup>5</sup>	7.98×10 <sup>4</sup>	5.08×10 <sup>4</sup>	7.63×10 <sup>3</sup>

※同符号間で有意差あり (p<0.001: Fisher's exact test)

表2 ワクチン接種効果検証：生産成績 (DG及び肥育日数)

品 種	B 種		L種等	
	ワクチン 対照群 n	接種群 n	対照群 n	接種群 n
DG	0.71±0.13 <sup>a</sup>	0.80±0.10 <sup>a</sup>	1.03±0.20 <sup>b</sup>	1.17±0.11 <sup>b</sup>
肥育日数	115 <sup>c</sup>	102 <sup>c</sup>	81 <sup>d</sup>	70 <sup>d</sup>

※同符号間で有意差あり (p<0.01: T-test), DG: 1日増体量 (kg/day)

B種: バークシャー種, L種等: ランドレース種及び交雑種

7.99×10<sup>5</sup> (2.48×10<sup>3</sup>~4.53×10<sup>7</sup>) copy/well及び7.98×10<sup>4</sup> (2.50×10<sup>4</sup>, 2.55×10<sup>5</sup>) copy/wellであった。9週齢ではそれぞれ4 (40%) 頭及び7 (23.3%) 頭から遺伝子が検出され、遺伝子量はそれぞれ5.08×10<sup>4</sup> (3.73×10<sup>3</sup>~1.53×10<sup>6</sup>) copy/well及び7.63×10<sup>3</sup> (8.60×10<sup>1</sup>~1.84×10<sup>6</sup>) copy/wellであった (表1)。生産成績は、B種の対照群及びワクチン接種群のそれぞれにおいて、DGは0.71±0.10kg及び0.80±0.10kg、肥育日数は115日及び102日、L種等ではDGは1.03±0.20kg及び1.17±0.11kg、肥育日数は81日及び70日となり、いずれも向上が認められた (表2)。

### 考 察

繁殖母豚2頭で発熱、食欲不振、黒色便等の症状が認められ、死亡した1頭の病性鑑定によりPPE様病変及び*L. intracellularis*遺伝子が認められたことから、急性型のPPEと診断した。急性型は肥育中期から後期あるいは繁殖豚での発生が多く、離乳後の肥育豚 (6~24週齢) では、発育不良、食欲不振、軽度の下痢を呈する程度で、豚群に蔓延していても発見が困難である [1]。本事例において繁殖母豚に認められた急性型のPPE発生は、既に*L. intracellularis*が農場内に蔓延している可能性を示唆していた。

浸潤状況調査により6及び9週齢の豚から*L. intracellularis*遺伝子が検出され、ワクチン効果検証の際に実施したrPCRで平均7.99×10<sup>5</sup> copy/wellの遺伝子が検出された。病変が認められる直腸内容の遺伝子量 (10<sup>5.15</sup>±10<sup>5.15</sup> copy/well) とほぼ同等の値を示す

この結果は、顕在化していないものの、慢性型のPPEの関与を示していた [8]。IFAによる抗体陽性率は、2週齢時に母豚に由来する移行抗体が認められ、4週齢時には低下した。6週齢時以降は暫時増加する傾向を示した。他方、blocking ELISA法では9週齢以降で抗体陽性であった。blocking ELISA法はPCRの結果と良好に一致するとの報告があることから [10]、*L. intracellularis*が6週齢以前に感染している実態が示唆された。IFA及びblocking ELISAの感度及び特異度は、IFAがいずれも高いことが報告されている [11]。今回の試験においても、得られた抗体陽性率は既報 [11] と同様の結果を示し、2週齢から6週齢までに認められたIFAの陽性は移行抗体を検出している可能性が推察され、blocking ELISAの陽性が感染抗体の実態を示唆していると考えられた。

以上の結果を踏まえ、ワクチン接種による免疫付与を3週齢時に実施した。Riberら [12] は*L. intracellularis*フリーのSPF豚で感染実験を行い、糞便中の排菌量をrPCR検査により追跡し、再感染時には排菌量が抑えられたことを報告している。検証試験において、ワクチン接種群から検出された*L. intracellularis*の平均遺伝子量は、ワクチン未接種のそれと比較して低位に留まり、既報と同様の効果が得られたと推察された。しかし、ワクチン接種群から平均7.98×10<sup>4</sup> copy/wellの*L. intracellularis*遺伝子が検出された。今回用いられたワクチンは弱毒生菌ワクチン株であるため、投与された個体からワクチン株が排菌された可能性を否定できない [2]。今後、ワクチン接種群で確認された*L.*

*intracellularis* 遺伝子の詳細な検索が必要と考えられた。

本試験ではワクチン接種群において明らかな生産成績の向上が認められた。B種ではDGが0.09kg増加し、肥育日数が13日短縮された。L種等においてもDGに0.14kgの増加がみられ、肥育日数が11日短縮された。本試験では、両群の哺育～育成期間のDG及び日数は比較していない。ワクチン効果の検証には、同期間の生産成績を比較することも有用だと考えられる。病性鑑定の結果に基づき、適切なワクチン接種時期を検討し、確実にワクチン接種を行ったことで、*L. intracellularis* の6週齢時の排菌割合が減少し、生産成績に大きな改善が認められた。*L. intracellularis* の蔓延により、生産成績が悪化している農場においては、ワクチン接種による対策は、ワクチン接種費用に見合った生産性の大きな向上が期待できると考えられた。

#### 謝 辞

稿を終えるにあたり、PPE-IFA抗原スライド及び陽性対照野血清を分与いただいた日清丸紅飼料株式会社の中野満恵先生、blocking ELISA試験を実施していただいたベーリンガーインゲルハイムバトメディカジャパン株式会社の下島博之様に深謝いたします。

#### 引用文献

- [1] 大宅辰夫：特集 豚増殖性腸炎 総論，臨床獣医，22，10-12（2004）
- [2] 内山万利子：豚増殖性腸炎生ワクチン，日獣会誌，65，323-324（2012）
- [3] 佐々田純他：豚増殖性腸炎（PPE）経口生ワクチンの効果と経済評価，家畜衛生学雑誌，38，118-119（2012）
- [4] Roberto MC et al：Onset and duration of fecal shedding, cell-mediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of *Lawsonia intracellularis*, Vet Microbiol, 91, 135-145（2003）
- [5] McOrist S et al：Field evaluation of an oral attenuated *Lawsonia intracellularis* vaccine for porcine proliferative enteropathy (ileitis), Vet Rec, 161, 26-28（2007）
- [6] Bak H et al：Reduced use of antimicrobials after vaccination of pigs against porcine proliferative enteropathy in a Danish SPF herd, Acta Vet Scan, 51,（2009）
- [7] Jones GF et al：Enhanced detection of

intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction, J Clin Microbiol, 31, 2611-2615（1993）

- [8] 木口陽介，水戸部俊治：リアルタイムPCRを用いた豚増殖性腸炎に対する診断のアプローチ，獣医畜産新報，64，121-125（2011）
- [9] Pasterla N et al：Detection of *Lawsonia intracellularis* by real-time PCR in the feces of free-living animals from equine farms with documented occurrence of equine proliferative enteropathy, Wildlife Dis, 44, 992-998（2008）
- [10] Collins A et al：Comparison of a commercial ELISA with an indirect fluorescent antibody test to detect antibodies to *Lawsonia intracellularis* in experimentally challenged pigs, Aust Vet J, 90, 97-99（2012）
- [11] Jacobson M et al：Evaluation of blocking ELISA for the detection of antibodies against *Lawsonia intracellularis* in pig sera, Acta Vet Scan, 53,（2011）
- [12] Riber U et al：Primary infection protects pigs against re-infection with *Lawsonia intracellularis* in experimental challenge studies, Vet Microbiol, 149, 406-414（2011）