



豚サーコウイルス2型(PCV2)感染と抗体産生、保有抗体とPCV2感染について

はじめに

「豚サーコウイルス2型(PCV2)に対する免疫応答」についてはSDI16号に書きましたが、抗体検査の方法や見方などに関して紹介しきれなかった部分もあり、今回再び取り上げます。PCV2の抗体検査方法には、IFA(間接蛍光抗体法)、IPMA(ペルオキシダーゼ抗体法)、ELISA、中和法などがありますが、それぞれ特徴があり、表される抗体価の意味も微妙に異なります。特に、防御能を表すかどうか最も重要と考えられますが、未だに確立されているわけではなさそうです。

本号では、PCV2に対する「抗体」に関して研究の世界で整理されつつあることについて紹介するとともに、PCV2感染と免疫について、読者の皆様の理解が少しでも深まりますれば幸いです。

PCV2の抗体検査方法

まず、検査方法とそれぞれの特徴を簡単に記します。

(1) IFA・IPMA

PCV2感染細胞を固定し、血清と抗原抗体反応後、洗浄し、豚のIgGを認識する二次抗体(蛍光物質またはペルオキシダーゼで標識してある)で染めて*、血清中のPCV2に対する特異抗体を検出する方法(前者がIFA、後者がIPMA。古典的だが最も普及している。細胞に感染したPCV2抗原を使用するため、PCV2の全ての抗原決定基に対するIgG抗体を検出する。(*;ペルオキシダーゼそのものは染色性でないが、その酵素活性を用いた発色反応系を利用;以下同じ)

(2) ELISA

PCV2抗原をプレートに固定し、被検血清と抗原抗体反応後、洗浄し、豚のIgGを認識する二次抗体(ペルオキシダーゼで標識してある)で染めて*、血清中の特異抗体量を着色の濃さで検出する方法。使用する抗原に不純物が含まれる場合、不純物に対する抗体も拾うため特異性が疑われる場合があるので他の方法に較べ特に注意が必要。使用する抗原によってウイルス全体の抗体検出、ウイルスの特定蛋白に対する抗体検出など設計が可能。ELISA抗原としてPCV2抗原、防御に関わる蛋白抗原いずれを用いた場合でもELISA抗体価とIFAと有意な($P < 0.01$)相関関係が認められたとの報告がある(低いELISA抗体価では相関が低い)⁽¹⁾。

(3) 中和

PCV2が増殖する細胞に、予め血清とPCV2を混合しておいたものを接種し、ウイルス増殖が抑制(=中和)されるかどうかをみる方法。一般的に「防御」に関連する抗体を検出できる。通常は細胞変性を顕微鏡で確認するが、PCV2の場合、細胞変性しないので、ウイルス増殖を蛍光やペルオキシダーゼで標識した特異抗体で染めて*確認する。使用する中

和ウイルス量、判定基準(ウイルス増殖抑制の程度;感染細胞数を50、80、90または100%減少させたときの血清の最高希釈倍数⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾)によって表現される抗体価は大きく変わるので方法を明示する必要がある。標準的な方法は確立されていない。

PCV2感染と抗体応答

PCV2感染後の抗体応答に関して、SDI16号の少しおさらいをしておきます。

- (1) 非発病豚ではIFA抗体は14~21日後に上がり始めたが、発病豚では接種21日後までに1頭も上がり始めていない⁽⁵⁾
 - (2) 非発病豚では、28日後に高いIFA抗体応答を示す個体があったが、発病豚では35日後まで高い抗体応答は認められない⁽⁵⁾
 - (3) 全体として抗体価が大きくばらつく傾向は、発病豚で抗体応答が悪い・遅れることが一因の可能性はある
 - (4) (非発病豚において)中和抗体の出現⁽³⁾と血中の感染性ウイルスの収束⁽⁵⁾はほぼ一致する
- ※「感染性」と書いたのは、血中に存在するウイルスは、裸のウイルスと中和抗体で中和されたウイルス(免疫複合体)があると考えられ、前者が感染性ウイルス、後者が非感染性ウイルスと区別した方がよさそうだからです。(この考え方の根拠は、①非発病豚の感染5週後以降は「ウイルス分離」できない⁽⁵⁾、②PCV2遺伝子はそれ以上に長期にわたり血中から検出される、の2点にあります。遺伝子検出=感染性は必ずしも真ならずと見ます。)
- (5) (非発病豚における)中和抗体出現は4週後とIFA抗体に較べ2週程度遅い⁽³⁾

ここから先が、本号で追加して整理する部分です。エッセンスだけ要約すると、実験感染では、

- (1) PCV2接種後のIPMA抗体応答は、非発病豚が発病豚より有意に高い⁽⁴⁾。
- (2) PCV2接種後の中和抗体(中和ウイルス量 $10^{3.7}$ TCID₅₀/well、100%増殖抑制の判定基準)は21日後まで検出できなかった。血清希釈でなく増殖抑制の程度を見た方法では、発病・非発病豚ともに10日目に50%未満の増殖抑制が検出され、非発病豚では21日目に平均80%以上と上昇したが、発病豚では0%と急激に低下した⁽⁴⁾。この現象は、中和抗体の産生量不足か、産生細胞がPCV2で死んだためか、いずれにしても産生された中和抗体が防御には不十分だったと考えられます。非発病豚で10日目に同程度の中和活性があり、21日目に中和抗体が上昇したことを考慮すると、直接的には後者の要因かもしれません。後者の結果が前者と考えるとつじつまが合います。
- (3) IFA抗体はPCV2接種14日後から、中和抗体は28日後から見られ

る(中和ウイルス量200 TCID₅₀、80% 感染細胞数減少)⁽³⁾。このとき、中和抗体価は接種35日後に平均8.8倍。

野外農場の調査例でも、発症豚は中和抗体価が上がらないか低いままのようです。

(1) 34農場72頭の2～4か月齢豚について、①PCV2遺伝子検出、②PMWS診断、③中和抗体価測定(200 TCID₅₀、50%または90% 感染細胞数減少)を実施したところ、50%減少法では非発病豚が平均256倍、発病豚が64倍、90%減少法ではそれぞれ16倍、8倍といずれも非発病豚が高かった。また50%減少法の方が高く表現され、発病・非発病の抗体応答の差が出やすい⁽²⁾。

中和抗体の出現とPCV2の消退が一致することから、どうやら中和抗体が防御能に関与しているのは間違いなさそうです。蛇足ですが、この報告の結果から計算すると、中和抗体が512倍以上あれば不顕性感染が2.7倍多い(128倍以上で2.4倍)という結果になります。

(2) ベルギーにおいて、4～14週齢で2週間毎に中和抗体(10^{3.7}TCID₅₀/well、100% 増殖抑制)を測定。移行抗体価は10週齢で低レベルになり、その後発病豚2頭は抗体上がらず、非発病豚7頭は10～14週齢にかけて抗体上昇(平均86倍;4～512倍)⁽⁴⁾。発病豚では中和抗体が上がらないようです。

(3) オランダにおいて、離乳舎移動0、3及び6週後に中和抗体(条件は同上)を測定。3週後に移行抗体が減衰し低レベルになり6週後に非発病豚は13頭平均で67倍(4～256倍)、発病豚5頭の平均で7倍(4～16倍)に上昇⁽⁴⁾。

やはりここでも発病豚では中和抗体があがりません。

以上、「発病豚で抗体が上がらない」には例外がありません。PCV2感染による免疫抑制の結果でしょう。中和抗体は50%減少法が評価しやすいような印象を受けます。あとは防御能を的確に評価できるかどうかですね。

移行抗体と防御能の関係

以下、McKeownらの報告です。

移行抗体陽性豚24頭を持ち込んで移行抗体価の高さで、「低い」がA、「中」がB、「高」はCとDにわけ、A、B、C群は0日目と42日目の2回、D群は42日目に1回PCV2で攻撃され、ELISA抗体価と血中ウイルス遺伝子量が毎週検査された。使用されたELISA抗体の陽性限界は0.2。結果は、移行抗体が高いと感染率が低く、感染量も少なかった(P=0.025)。42日目まで感染が成立しなかった攻撃前の抗体価は平均で0.84、感染成立の攻撃前の抗体価は平均で0.37であり、高い移行抗体の方が感染リスクは少ない(P=0.044)⁽⁶⁾。

この報告のデータをよく見ると、A,B,C群で0.24～1.25*と移行抗体陽性の個体でも感染が成立しており(同様にD群でも42日目攻撃時の抗体価0.24～0.33*で5頭全て感染成立)、少なくとも移行抗体が0.2以上あっても感染は防御できないと言えます(「陽性0.2」=防御レベル抗体ではない)。感染不成立の個体の抗体は平均0.84でしたが、これも0.36～1.63*の平均であり大きくばらついているので、感染防御レベルの抗体価がなんぼか、一概に言えなさそうです。

42日目の2回目の攻撃(A,B,C群)について、攻撃時までウイルス感染歴がない個体(8頭)をピックアップして攻撃時の抗体価と攻撃後の感染の有無を評価してみました。その理由

は、1回目の攻撃後感染が成立すると血中からウイルスが長く検出され、2回目の攻撃後、1回目の攻撃ウイルスなのか2回目の攻撃ウイルスなのか区別つかないためです。結果は、2回目攻撃時の抗体価が0.15、0.16、0.23、0.28、0.89、0.98(平均0.45)*で感染しておらず、0.03、0.10*で感染が確認されました。0.15以上の抗体価で感染が成立した個体は1頭もいません(頭数が6頭しかいないので防御レベルをはっきり結論づけることはできませんが)。移行抗体の効果と大きく異なり、感染免疫(能動免疫)の有効抗体価は移行抗体よりぐっと低くてよいようにも見えます。42日後に1回目の攻撃をした(感染免疫(能動免疫)なし)のD群が抗体陽性(0.24～0.33*)にも関わらず感染したことと比較すると顕著です。こうやって、抗体価と感染防御能を眺めてみると、能動免疫では移行抗体に比べて低い抗体価で防御できそうということは言えるものの、抗体価が高い方が防御能は高そうというのが何となくわかります。(※;文献中のグラフより読みとった数値)

そのほか、同じELISAによる移行抗体価が低レベル(0.22～0.24程度)時の攻撃に対し、リンパ組織病変、PCV2抗原量を低減したとの報告もあります(ただしランドレースのみ。デュロック、大ヨークは有意差なし)⁽⁷⁾。陽性限界ぎりぎりの低い移行抗体価(ELISAで0.2程度)では、完全な感染防御能はないにしろ、病変は軽減する可能性を示すものです。

ワクチン接種と免疫応答

ワクチンの有効性は、PMWS発生の低減、ウイルス血症の低減などで確認されますが、その内容は別の機会に譲るとして、抗体応答がどうかについて触れておきたいと思います。

海外で市販されているワクチンについて、抗体応答を比較した試験成績が発表されています。1ショットタイプ(ワクチンA、B)は12週後、2ショットタイプ(ワクチンC、D)は2回目接種の9週後に採血した結果で比較すると、ワクチンによって若干の差があるものの、ワクチン非接種対照群に較べるといずれのワクチンもELISA、中和ともに有意に高い抗体価が検出されています⁽⁸⁾。このときのELISAは文献(6)(7)と同じもの、中和は(3)と同じ方法(80%減少法)で実施されています。中和抗体測定結果は794～6310倍であり、不顕性感染5週後の8.8倍⁽³⁾と較べると、いずれのワクチンも高い中和抗体を惹起すると考えてよいでしょう。だから完全に安心かというところでもなく、強毒PCV2で攻撃すると感染量は減るものの一時的にウイルス血症を許してしまうようです(ワクチンによって差あり)⁽⁸⁾。PCV2対策の難しさです。

最後に

PCV2に対する免疫について抗体価で数値化できないか、試みましたがクリアに示せるものは未だならず、です。それゆえ、せっかとお読み頂いたのに現場で役立つ情報が少なかつたと思われまふ。反省です。

外国で市販されているワクチンについては、いずれの製品も中和抗体応答が確認されており、一定の効果はあるようですが、情報収集してみても効果が不十分なのはどのような場合かなど、過酷な条件を含めもうちょっと情報収集が必要に感じました。

参考文献

(1)Nawagitgulら, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 9(1), 33-40, 2002
(2)Fortら, Vet. Microbiol., 125(3-4), 244-55, 2007
(3)Pogranichnyyら, Viral Immunol., 13(2), 143-153, 2000
(4)Meertsら, BMC Vet. Res., 2(6), 2006

(5)Okudaら, J. Vet. Diagn. Invest., 15, 107-14, 2003
(6)McKeownら, Clin. Diagn. Lab. Immunol., 12(11), 1347-51, 2005
(7)Opriessnigら, Vet. Pathol., 43, 281-93, 2006
(8)Opriessnigら, Vaccine, 27, 1002-7, 2009