

豚初乳処理方法の検討と豚熱ワクチン接種適齢期確認のための調査

県央家畜保健衛生所

津田 彩子 平野 幸子

矢島 真紀子 英 俊征

小嶋 信雄

はじめに

平成30年9月、国内で26年ぶりとなる豚熱の発生以降、令和元年9月に関東地方の養豚場で豚熱が初めて確認されたのを受け、本県では10月にワクチン推奨地域に指定され、12月よりワクチン接種を開始した。過去の文献⁵⁾より、ワクチン接種した母豚の抗体価が高い場合に当該母豚の初乳に含まれる抗体も多くなり、哺乳豚がワクチン接種をすべき30～40日齢になっても十分量の移行抗体が保持されていまい、ワクチンがテイクしない事例が出てくることが懸念された。このことから、農林水産省は移行抗体を獲得した哺乳豚へのワクチン接種のタイミングについて、調査を計画した。令和2年2月、「豚熱ワクチン接種適齢期確認のための調査」を開始し、本県も3月より調査に参加することとした。

調査は、調査実施概要に従い、初乳並びに母豚及びその子豚の血清の抗体検査（ELISA、中和試験）を実施した。また、調査実施概要に参考で添付された初乳処理方法では細胞傷害が生じ、中和試験の判定が困難であったため、今回調査前に初乳処理の条件検討を実施したので、併せて報告する。

調査の目的

現行のGPE-株ワクチンの哺乳豚の接種適齢期は、母豚からの移行抗体を考慮し1～2か月齢時と用法・用量の参考事項で示されている。調査実施概要によると、ワクチン接種母豚は通常抗体価が64～128倍程度だが、2,048倍と高値の場合は、哺乳豚の移行抗体の持続期間が長くなる可能性があるが、現在の我が国の流行株、移行抗体、ワクチンの関係性の詳細は調査されていないため、改めて哺乳豚の接種適齢期を確認する必要がある。

今回の調査では、産歴の異なる複数の品種の母豚5頭以上を分娩ごとに抗体価を測定し、初乳の抗体価及び哺乳豚5頭以上の抗体価を経時的に測定することとしている（図1）。

初乳処理にあたっては、細胞への傷害を軽減するため脱カゼイン処理を加えることとした。文献や過去の実施記録を調べたが、資料によって乳汁を脱脂の要否、遠心や試薬添加量、処理時間など条件表記がまちまちであった¹⁾²⁾ため、最適条件を検討、中和試験への影響を評価するため、調査の前に予備試験を実施した。

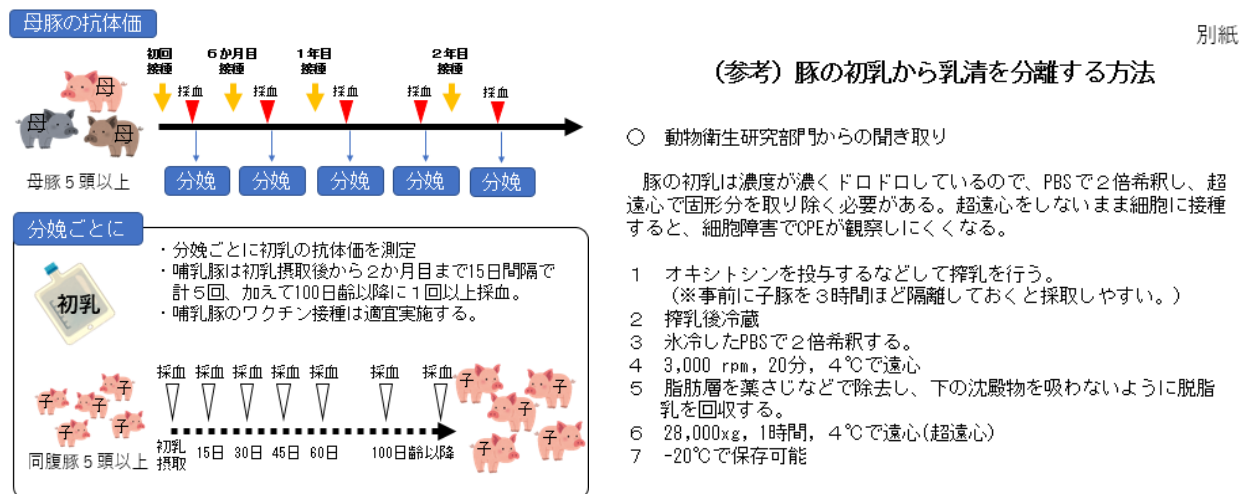


図1 調査実施概要模式図と初乳処理

材料と方法

1 予備試験 豚初乳処理方法の検討

(1) 材料

豚初乳 5 検体 (調査実施概要に従い、クリーム層を葉さじで除去後、中間層の液成分を別のチューブに分取したもの)、PBS⁻、レンネット from *Mucor miehei* (Sigma cat. #R5876) (5mg/ml PBS⁻)、豚熱ウイルス (GPE-株)、CPK-NS 細胞

(2) 方法

初乳を脱脂後、レンネット 5、15、30 μ l/ml 添加区及び 37℃30 分、60 分反応区を設定し、中和試験に供して成績への影響を確認した。中和試験は定法のとおり実施した⁶⁾。

2 本調査 豚熱ワクチン接種適齢期確認のための検査

(1) 材料

県内一貫経営養豚場 2 戸の母豚計 5 頭 (A 農場 3 頭、B 農場 2 頭) の初乳と分娩時血清及び産子各 5~10 頭から約 15 日間隔で計 9~11 回経時的に採取した血清

(2) 方法

ELISA 検査は市販のキットを使用、中和試験は定法のとおり⁶⁾実施した。なお、初乳処理については予備試験の結果を踏まえて、実施した。

結果及び考察

1 予備試験 豚初乳処理最適条件の決定

レンネット 30 分処理区の場合、 $5\mu\text{l}$ や $15\mu\text{l}$ 添加区では、細胞が割れている well や、凝集塊を形成している well が散見された。レンネット 60 分処理区の場合、 $5\mu\text{l}$ 添加区で、同様に凝集塊を形成している well や、CPEwell との境界が不明瞭な well が見られた (写真 1)。

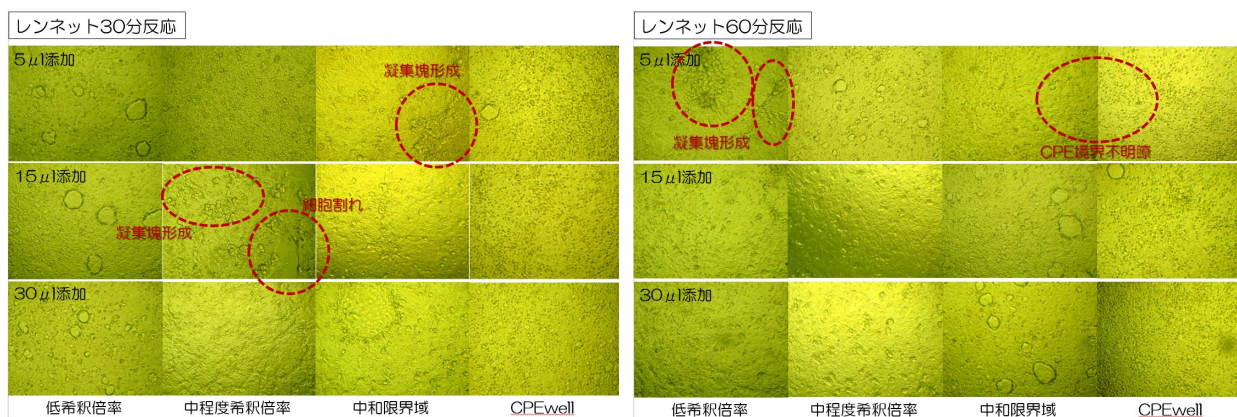


写真 1 処理条件ごとの細胞への影響

各試験区の結果を表 1 に示した。試験は、脱脂後、 $15\mu\text{l}$ 60 分及び $30\mu\text{l}$ 30 分以上処理で良好な成績が得られた。また、繰り返し試験を行った結果、処理の安定していた $15\mu\text{l}$ 添加区と $30\mu\text{l}$ 添加区の処理条件で中和試験の結果に差は認めなかった。

本調査は $30\mu\text{l}$ 60 分処理で実施した。

表 1 処理条件ごとの中和試験結果への影響一覧

レンネット処理条件		細胞への影響			
添加量	反応時間	低倍率	中倍率	中和限界域	CPE
$5\mu\text{l/ml}$	30分	△	×	×	△
	60分	△	△	×	○
$15\mu\text{l/ml}$	30分	○	△	△	○
	60分	○	○	○	○
$30\mu\text{l/ml}$	30分	○	○	○	○
	60分	○	○	○	○

※○：5検体中全て判定可、△：5検体中2～4検体可、×：5検体中0～1検体可。

2 本調査「豚熱ワクチン接種適齢期確認のための調査」調査結果

(1) 母豚初乳及び血清の中和抗体価と S/P 値の比較

母豚初乳及び血清における中和抗体価と S/P 値を比較したところ、初乳抗体価は中和試験、ELISA の両方で血清抗体価よりも高い傾向がみられた（表 2）。

表 2 母豚初乳及び血清の中和抗体価と S/P 値の比較

農場		A農場					
母豚番号		①		②	③		
検体種別		初乳	血清	初乳	血清		
ELISA S/P値		1.39	> 0.87	0.61	> 0.49	0.95	> 0.38
中和抗体価		>4,096	>4,096	×256	×256	×512	>×128

農場		B農場			
母豚番号		④		⑤	
検体種別		初乳	血清	初乳	血清
ELISA S/P値		1.04	> 0.78	1.18	> 0.81
中和抗体価		>4,096	>×256	×1,024	×512

(2) 血清及び初乳における中和抗体価と S/P 値の相関

血清及び初乳における中和抗体価と S/P 値の相関を図 2 にまとめた。産子の中和抗体価と S/P 値は、正の相関 ($r=0.852$) を認めた。

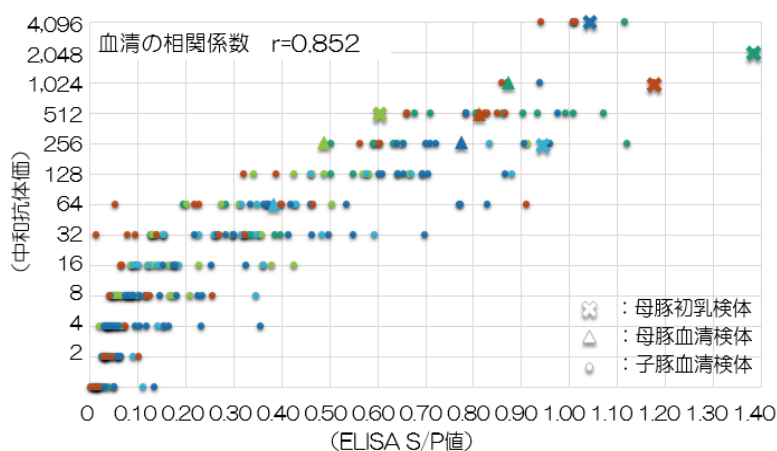


図 2 血清及び初乳における中和抗体価と S/P 値の相関

(3) 母豚ごとの産子抗体価の推移

農林水産省食料・農業・農村政策審議会家畜衛生部会第 30 回牛豚等疾病小委員会資料によると、子豚の移行抗体が豚熱を防御するには、中和抗体価が 16 倍以上必要であり、8 倍以下では防御しないとされている。このため、ワクチンの接種時期の子豚の血中中和抗体価は、接種前の防御を考慮して、16 倍から 32 倍が望ましいとされている。

産子中和抗体価の推移では（図 3）、母豚初乳抗体価が 1,000 倍未満であった A②、A③の 2 頭の産子中和抗体価が 8 倍以下になったのは、57 日齢前後であったのに対し、抗体価 1,000 倍以上であった A①、B④、B⑤の 3 頭の産子中和抗体価が 8 倍以下になったのは、60 日～90 日齢であった。また、A②、A③は産子中和抗体価が 16 倍～32 倍の日齢で見ると 50 日齢でのワクチン接種で問題ないことがわかった。B④についても、抗体価からは 50 日齢でのワクチン接種で問題ないと思われるが、抗体価が上昇しない子豚が 1 頭みられた。

一方、A①、B⑤の産子の中で、子豚のワクチン接種時の中和抗体価が 128 倍以上だった 7 頭は、全て接種後の抗体価上昇を認めなかった。産子中和抗体価が 16 倍～32 倍となった日齢を見

ると、A①、B⑤は約 80 日齢となり、ワクチン接種を遅らせる必要があったことがわかった。

ELISA における産子抗体価の推移（図 4）では、母豚初乳抗体価が S/P 値 1.0 未満であった A②、A③の 2 頭の産子 S/P 値が陰性になったのは、50 日齢前後であったのに対し、S/P 値 1.0 以上であった A①、B④、B⑤の 3 頭の産子 S/P 値が陰性になったのは、75～85 日齢だった。移行抗体が ELISA で陰性になる時期と中和試験で 8 倍以下になる時期は概ね同様で、母豚抗体価が高いほど移行抗体消失時期は遅延した。また、ワクチン接種前の抗体検査で ELISA 陽性だが中和抗体価 8 倍以下であった子豚が 3 頭確認された。

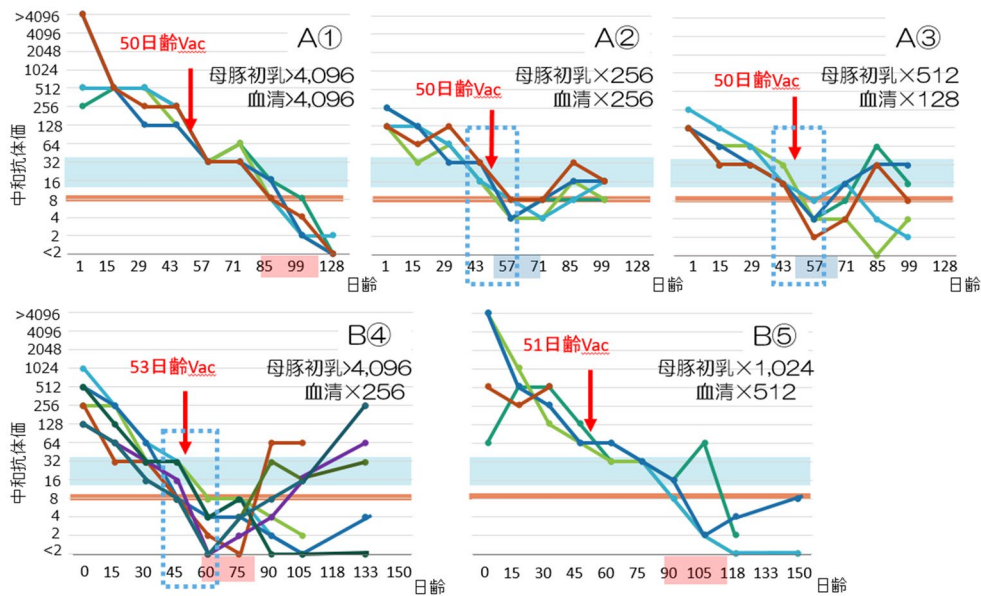


図 3 母豚ごとの産子の抗体価の推移（中和試験）

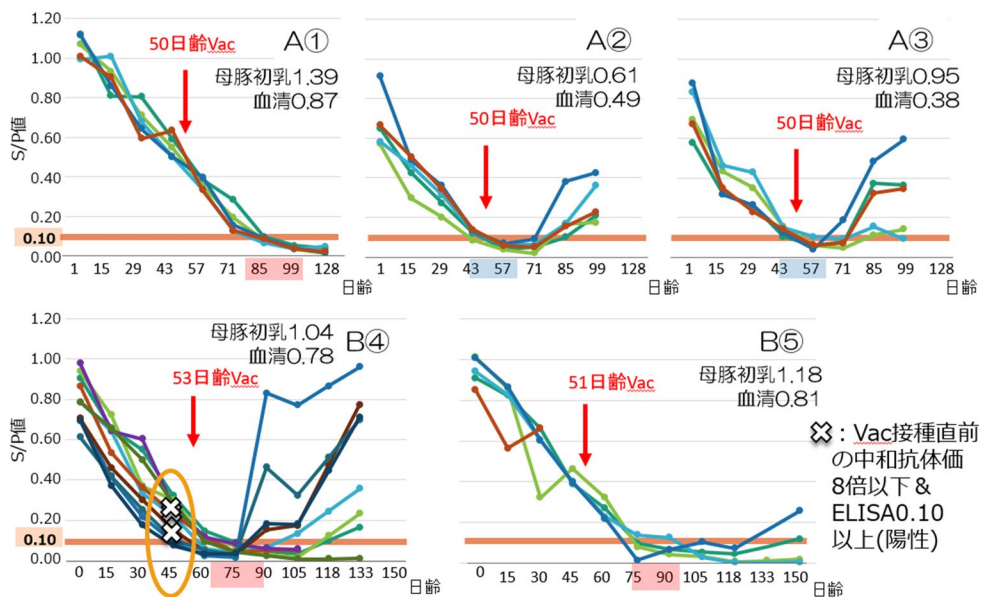


図 4 母豚ごとの産子の抗体価の推移（ELISA）

まとめ

予備試験において、初乳のレンネット処理は、脱脂後、1ml あたり 15 μ l 60min、30 μ l 30min 以上で良好な結果が得られた。

今回の本調査で、母豚の初乳抗体価は、血清抗体価より高い傾向にあり、既報³⁾のとおり母豚抗体価が高いと移行抗体消失は遅延した。子豚の移行抗体は血清よりも初乳抗体価に影響を受けるため、母豚抗体価の評価には注意が必要であることが確認された。

過去の報告⁴⁾⁵⁾に移行抗体価が64 ~ 512 倍の豚では半数がワクチン接種後の抗体価が上昇しないとあるが、今回の調査では、ワクチン接種時の中和抗体価128倍以上の個体において、100%抗体価の上昇はみられなかった。

中和抗体価と S/P 値に正の相関を認めた一方で、ワクチン接種前の抗体検査で移行抗体が ELISA 陽性、中和抗体 8 倍以下の個体が 3 頭確認された。このことから、ワクチン接種適期の判断は、ELISA に加え、必要に応じて中和試験で確認することが望ましいと考える。

引用文献

- 1) Jordan Bjustrom-Kraft et al. : Journal of swine Health and Production, 26(1)34-40 (2018)
- 2) Niraj Makadiya et al. : Virol J., 13-57. (2016)
- 3) 迫田義博 : 北獣会誌 64, 285-293 (2020年)
- 4) 清水悠紀臣 : 動衛研研究報告 第119号, 1-9 (2013年2月)
- 5) 豚コレラ防疫史 豚コレラ防疫史編集委員会編 (2009 年)
- 6) 豚熱に関する特定家畜伝染病防疫指針別紙1 「豚熱の診断マニュアル」