

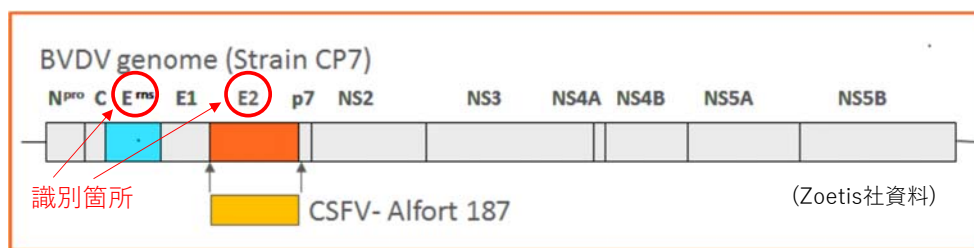


CSFV岐阜分離株に対する マーカーワクチンの有効性と有用性

農林水産省 動物医薬品検査所

マーカーワクチン

- ▶ 製品名：Suvaxyn[®] CSF Marker (Zoetis社製)
- ▶ ワクチン株(CP7_E2alf)：BVDV CP7 株のエンベロープの主要タンパクE2 遺伝子をCSFV Alfort 187 株のE2 遺伝子に置換した弱毒生ワクチン株



- ▶ 用法・用量：生後6～7週齢以上の豚に 1mL/頭 筋肉内注射
- ▶ 承認（備蓄）国：EU, 米国
- ▶ 野外使用実績：なし
- ▶ 免疫賦与期間：ワクチン接種2週間後～6ヶ月以上
- ▶ 特徴：ワクチン接種豚と野外感染豚を識別可能



Suvaxyn® CSF MarkerのDIVAの原理

(DIVA : **D**ifferentiation of **I**nfected from **V**accinated **A**nimals)

- 抗CSFV E2抗体とE^{rns}抗体をELISAキットで検出し、マーカーワクチン接種豚と野外株感染豚を識別可能

ワクチンの種類	ワクチン接種	野外株感染	抗CSFV E2 抗体	抗CSFV E ^{rns} Ab
マーカー	あり	あり	+	+
		なし	+	-
GPE-	あり	あり	+	+
		なし	+	+
上記共通	なし	あり	+	+
		なし	-	-
識別ELISAキット			豚コレラ ELISAキット II	① pigtype ② PrioCHECK

識別可能

2

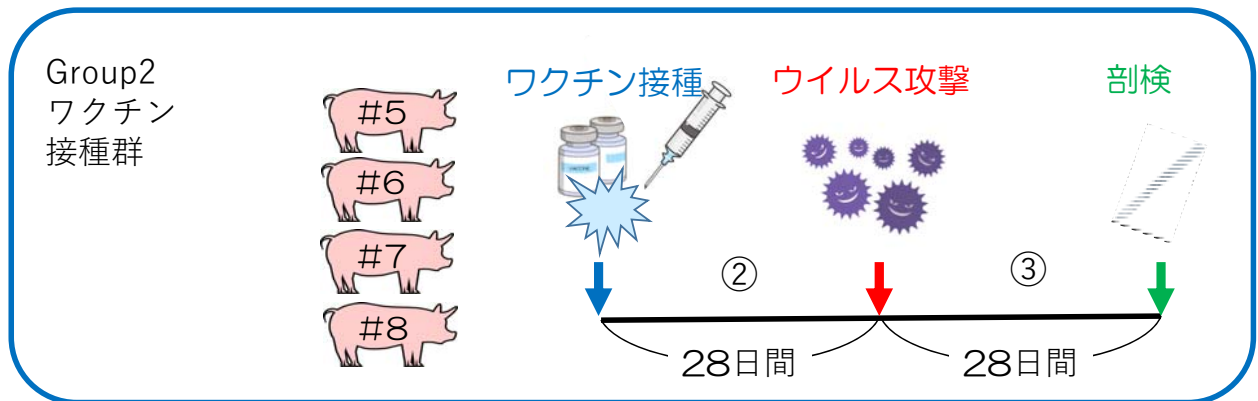
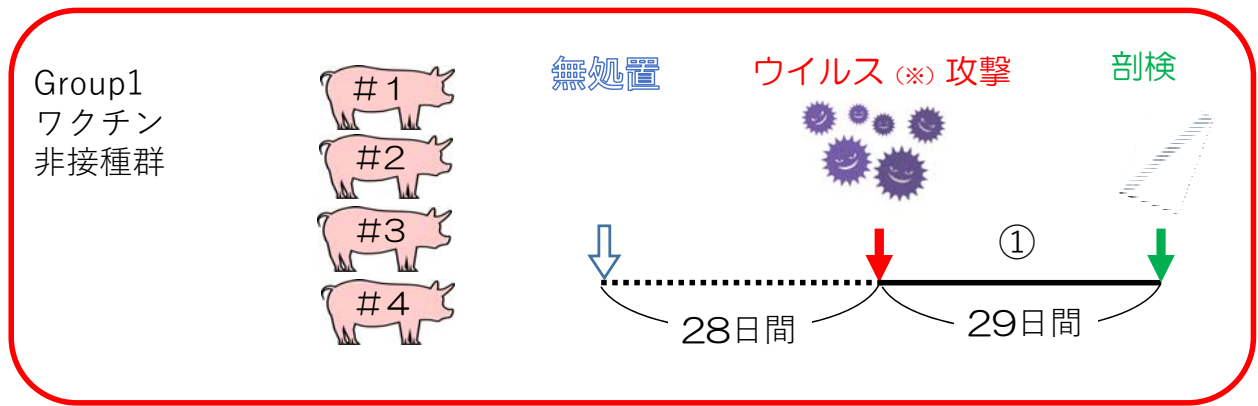
目的

- マーカーワクチンの国内流行株(岐阜分離株：遺伝子型2.1) に対する有効性を確認する
- CSFV E2抗体検出ELISAキット及びCSFV E^{rns}抗体検出ELISAキット2種類を用いて、以下の状態の豚における血清学的識別 (DIVA) の有用性を検証する
 - ① ワクチン非接種＋ウイルス攻撃
 - ② ワクチン接種のみ (ウイルス攻撃前)
 - ③ ワクチン接種＋ウイルス攻撃



3

試験設計



(※) ウイルス：国内流行株（岐阜分離株：遺伝子型2.1型）を経口投与

4

ウイルス攻撃後の臨床所見 1

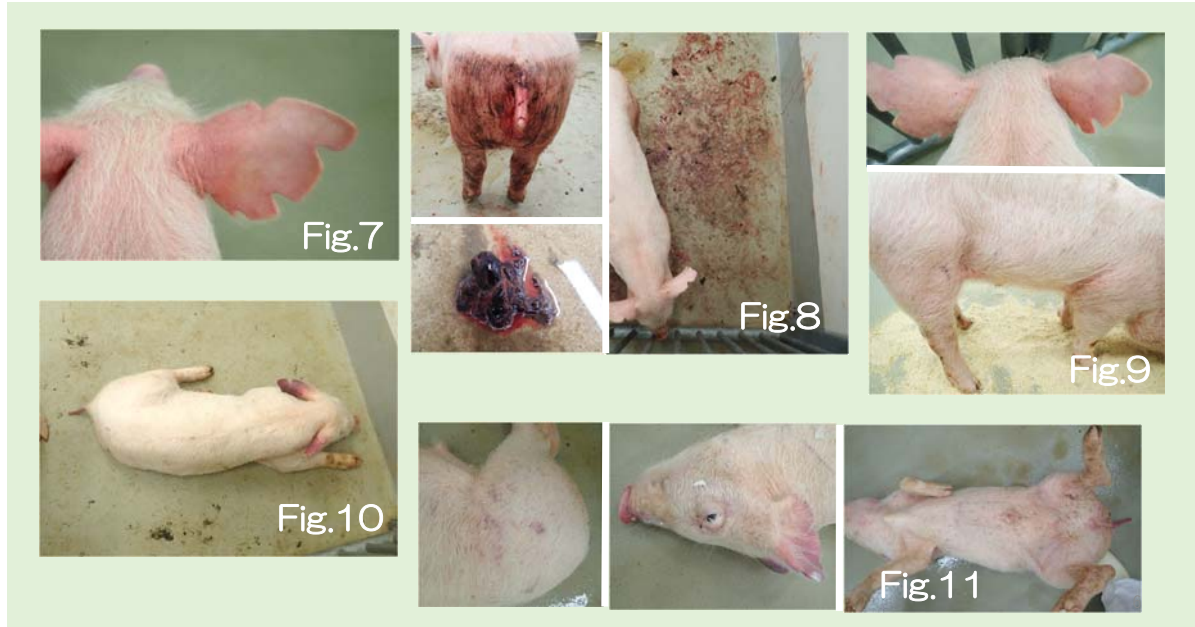
- Group2 ワクチン接種群については顕著な臨床所見なし
- Group1 ワクチン非接種群のうち、1頭(No.4)がウイルス攻撃後24日目に急性経過で死亡
- Group1 ワクチン非接種群の死亡豚以外には、活力低下、軽度の食欲不振、うずくまり(Fig.1)、パイルアップ(Fig.2)、発熱時振戦、眼瞼腫脹(Fig.3)・充血(Fig.3)、結膜炎、眼脂(Fig.4)、鼻汁漏出(Fig.5)、下痢(軟便)(Fig.6)が見られた。



5

ウイルス攻撃後の臨床所見 2(死亡豚)

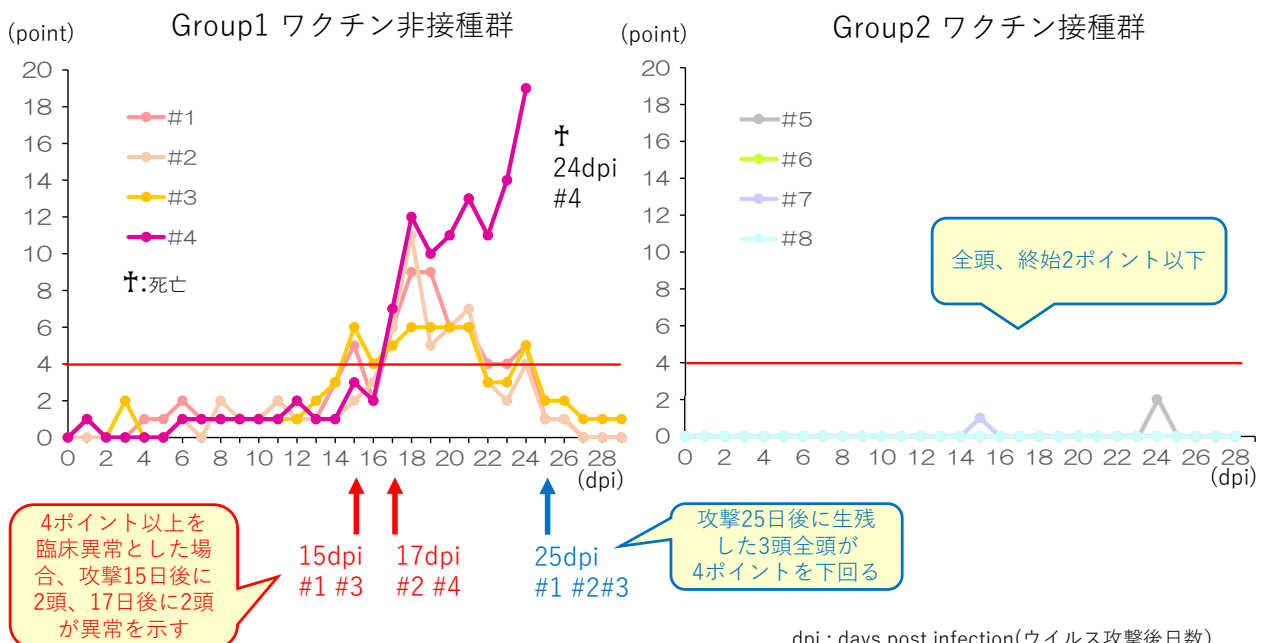
- Group1 ワクチン非接種群の死亡豚では、死亡6日前から耳根部発赤・浮腫 (Fig.7)、死亡5日前からうずくまり、死亡3日前から下血・血便(Fig.8)、死亡前日に耳介部及び体幹に出血斑(Fig.9)、死亡当日に耳端及び尻尾の顕著な暗赤色化(Fig.10)、体表の広範囲に点状から小斑状の出血(Fig.11)



6

臨床スコア

- 6の大項目の中に24の観察項目を設定 (次頁スライド)
- 項目ごとに0-3 or 0-2 or 0-1pointで日ごとに集計
- 体重の推移は両群間で有意差なし(t検定 $p > 0.05$)



7

臨床スコア観察項目

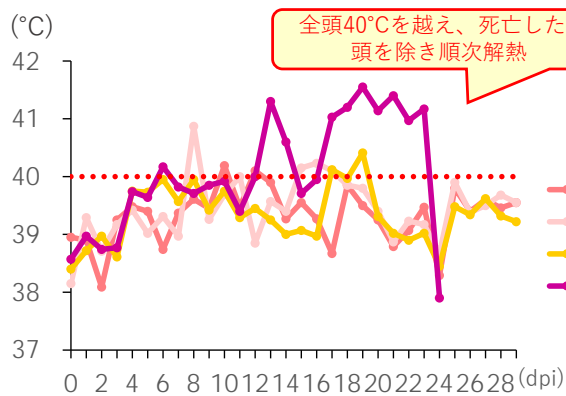
項目	スコア	状態		
一般状態	活力	0	異常なし	注意深い、好奇心が強い、即座に立つ
		1	軽度の低下	介助は不要だが、しぶしぶ立つ、猫背
		2	中程度の低下	寝ている、強制されれば立ち上がるが、また寝転ぶ
		3	重度の低下	眠っている様に立ち上がろうとしない
	歩様	0	異常なし	調和された動き
		1	軽度の異常	おどおどした歩様、交差した肢をゆっくり戻す
		2	中程度の異常	強制的に歩かせると歩くがふらつく、すぐに座り込む
		3	重度の異常	重度の失調、歩行困難
	体形	0	異常なし	
		1	消瘦	やせ衰えている、背骨やあばらが目視できる、体と比較して頭部が不自然に大きく見える
	貧血	0	なし	
		1	あり	眼の粘膜や歯茎の色調が白くなっている
	うずくまり	0	なし	
		1	あり	
	パイルアップ	0	なし	
1		あり		
食欲	0	異常なし	エサを与えるとすぐに食べる、完食する、食べたあと水を飲む	
	1	軽度の食欲不振	エサを与えてもすぐに食べない、少ししか食べない、ゆっくり食べる、飲水はする	
	2	中程度の食欲不振	エサを食べないが、味わう(興味を示す、かき回す)	
	3	重度の食欲不振	エサを全く食べない、興味を示さない	
飲水	0	異常なし	エサを食べたあとに水を飲む	
	1	亢進	観察時間中、水をごくごく飲む	
皮膚	発赤	0	なし	
		1	あり	
	紫斑	0	なし	
		1	あり	
	浮腫	0	なし	
		1	あり	
被毛粗剛	0	なし	光沢がある、そろっている	
	1	あり	毛が抜けている、逆立っている	

項目	スコア	状態		
眼	目やに	0	なし	
		1	あり	
	流涙	0	なし	
		1	あり	
	充血	0	なし	
1		あり		
眼瞼腫脹	0	なし		
	1	あり		
呼吸器	発咳	0	なし	
		1	あり	
	鼻汁漏出	0	なし	
		1	あり	
呼吸促進	0	なし	胸の動きがcaろうじて分かる	
	1	あり	胸の動きが明瞭、開口呼吸をしている	
消化器	下痢症状	0	異常なし	柔らかい便、通常の量、あまり臭くない
		1	軽度の下痢	水気が多い、臭い
		2	中程度~重度の下痢	水様や血液を含んだ便、臭い
	便秘症状	0	なし	柔らかい便、通常の量、あまり臭くない
1		あり	便量の減少、水気がない、粘液のみ、便が黒い・固い	
神経	後肢麻痺	0	なし	
		1	あり	
	けいれん	0	なし	
1		あり		
その他症状	0	なし		
	1	あり	ふるえ、チアノーゼ、こすりつけ等	

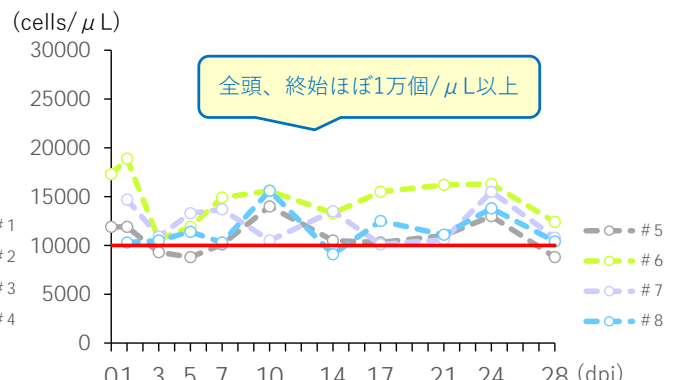
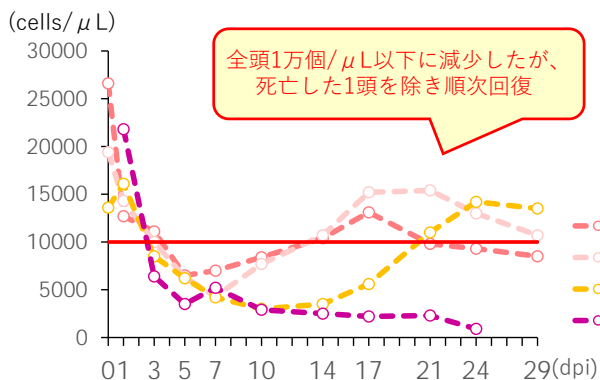
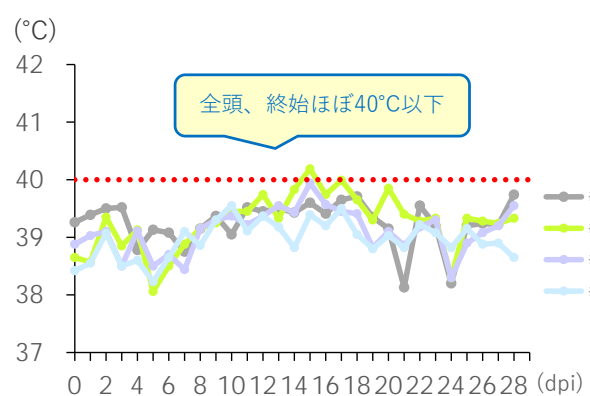
(参考)Mittelholzer et al. (Veterinary Microbiology 74 (2000))

体温 / 白血球数

Group1 ワクチン非接種群



Group2 ワクチン接種群



RT-PCR

血清

dpi	No.	0	1	3	5	7	10	14	17	21	24	28	29
Group1 ワクチン 非接種群	#1	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	#2	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	ND	-
	#3	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
	#4	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Group2 ワクチン 接種群	#5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

鼻腔スワブ

dpi	No.	0	1	3	5	7	10	14	17	21	24	28	29
Group1 ワクチン 非接種群	#1	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
	#2	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	ND	-
	#3	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
	#4	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-
Group2 ワクチン 接種群	#5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

唾液

dpi	No.	0	1	3	5	7	10	14	17	21	24	28	29
Group1 ワクチン 非接種群	#1	-	-	-	-	-	±	+	±	NS	+	-	-
	#2	-	-	-	-	-	±	+	+	+	-	ND	-
	#3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	#4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
Group2 ワクチン 接種群	#5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

糞便スワブ

dpi	No.	0	1	3	5	7	10	14	17	21	24	28	29
Group1 ワクチン 非接種群	#1	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	#2	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	ND	-
	#3	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
	#4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
Group2 ワクチン 接種群	#5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	#8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

ワクチン接種群では全頭でpesti virus 遺伝子は
検出されなかった(プライマー : pesti 324-326)

ND : 採材なし
NS : 収量極小

dpi : days post infection(ウイルス攻撃後日数)

10

剖検時採取臓器 ウイルス分離/RT-PCR

分離 (上段) /RT-PCR (下段)

群	豚番号	dpi	扁桃	腎臓	脾臓	上顎 リンパ節	腸骨下 リンパ節	腹水	尿
Group1 ワクチン 非接種群	#1	29	-	-	-	-	-	NS	ND
	#2	29	+	-	-	+	+	NS	ND
	#3	29	+	-	-	+	+	NS	ND
	#4	24(死亡)	+	+	+	+	+	ND	ND
Group2 ワクチン 接種群	#5	28	-	-	-	-	-	NS	ND
	#6	28	-	-	-	-	-	NS	ND
	#7	28	-	-	-	-	-	NS	NS
	#8	28	-	-	-	-	-	NS	NS

ワクチン接種群の主要臓器では、全頭でCSFウイルス分離陰性
及びpesti virus 遺伝子は検出されなかった

NS:検体なし
ND:データなし

11

ELISA抗体/中和抗体価

- pigtype (INDICAL BIOSCIENCE社製)及びPrioCHECK(Thermo社製) : anti-CSFV E^{ns}抗体を検出
- 豚コレラELISAキット II (JNC社製) : anti-CSFV E2抗体を検出
- NAT : 中和抗体価 (中和ウイルスは攻撃ウイルス)

○ :理論上と異なる結果

群	No.	種類	dpi																
			-28	-21	-14	-7	0	1	3	5	7	10	14	17	21	24	28	29	
Group1 ワクチン 非接種群	1	pigtype	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		PrioCHECK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
		JNC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
		NAT	-	-	-	-	< 2	-	-	-	-	< 2	32	-	-	-	-	256<	
	2	pigtype	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		PrioCHECK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
		JNC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
		NAT	-	-	-	-	< 2	-	-	-	-	< 2	64	-	-	-	-	256<	
	3	pigtype	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		PrioCHECK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
		JNC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	
		NAT	-	-	-	-	< 2	-	-	-	-	4	64	-	-	-	-	256<	
4	pigtype	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	PrioCHECK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+		
	JNC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+		
	NAT	-	-	-	-	< 2	-	-	-	-	< 2	4	-	-	< 2	-	-		
Group2 ワクチン 接種群	5	pigtype	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+		
		PrioCHECK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		JNC	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		NAT	-	-	< 2	2	8	-	-	-	-	128	-	-	-	-	-	256<	
	6	pigtype	-	-	-	-	-	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	
		PrioCHECK	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
		JNC	-	-	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		NAT	-	-	< 2	2	2	-	-	-	-	32	-	-	-	-	-	256	
	7	pigtype	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
		PrioCHECK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	
		JNC	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		NAT	-	-	8	8	8	-	-	-	-	256<	-	-	-	-	-	256<	
8	pigtype	-	-	+	-	±	+	±	+	+	+	+	+	+	±	±	±		
	PrioCHECK	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	JNC	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	NAT	-	-	< 2	4	16	-	-	-	-	32	-	-	-	-	-	32		

pigtype及びPrioCHECKでは検出されないはず
pigtype及びPrioCHECKで抗体産生後は検出されるはず

ELISAキットの特異性

CSFV/BVDV/BDV感染血清 (北海道大学提供)

種類	CSFV		BVDV		BDV	
	GPE-	Kanagawa/74	Nose	KZ91-NCP	87/6	FNK2012-1
pigtype	+	+	-	+	+	-
PrioCHECK	+	+	-	-	-	-
JNC	+	+	+	+	+	-

PrioCHECKが最も特異度が高い

国内CSFV発生農場由来血清

種類	検体 No.																									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	
pigtype	-	-	-	+	-	-	+	+	+	±	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	
prioCheck	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
JNC	-	-	-	+	-	-	±	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-
(参考)RT-PCR	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	

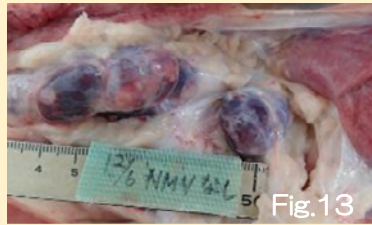
いずれのキットも野外株感染抗体の検出感度は高い

病理所見

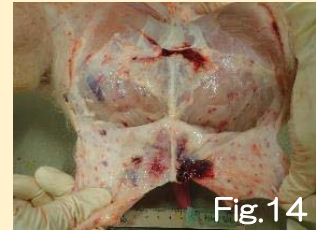
- Group2 ワクチン接種群では、肉眼病変なし
- Group1 ワクチン非接種群には、リンパ節の軽度赤色腫大、膀胱粘膜の点状出血、胃噴門部の軽度潰瘍 (Fig.12)あり
- Group1 ワクチン非接種群の死亡豚(No.4)で、顕著なリンパ節の赤褐色腫大(Fig.13)、広汎かつ重度な主要臓器(肺、心臓、腎臓、脾臓、胃から直腸までの消化管、膀胱、皮膚、体幹及び四肢の筋肉)の点状から斑状の出血(Fig.14,15,16,17)、心嚢水及び胸水並びに心嚢及び胸腔内のフィブリン様析出物の貯留、脊髄の馬尾神経側のうっ血、回盲口部の小潰瘍等の病変あり。



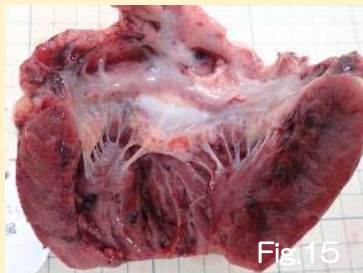
胃噴門部軽度潰瘍



顎下リンパ節群



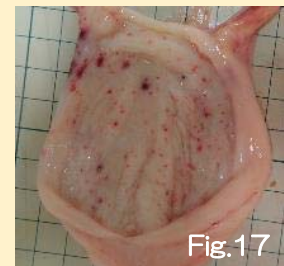
臀部皮下織から筋肉の出血斑



心臓の心内膜から心筋に渡る出血斑



盲腸の出血斑及び回盲口部の小潰瘍 (矢頭)



膀胱粘膜の出血斑

14

結果とまとめ

- ✓ ワクチン接種群は、国内流行株の攻撃による発熱、白血球減少、臨床症状、ウイルス排泄及び病変（肉眼所見）の形成を抑制したため、マーカーワクチンは国内流行株に対して有効である
- ✓ ワクチン接種群において、DIVAの理論上の反応と逸脱する結果が見られたことから、今回供試した識別ELISAキットでは、DIVAによる個体毎の感染・非感染の明確な識別は困難であり、マーカーワクチンの有用性については、さらに識別法を検討する必要がある

Results & Summary

