

免疫シリーズ

免疫関連製剤による豚腸管感染症の発症防御(2)

児玉義勝*・横山英明*

2. GALT と乳腺組織の連鎖

2-1. TGEウイルス感染によって誘導される腸管免疫

TGEウイルスに自然感染し発病後耐過した豚が再感染に抵抗することは、古くから経験的に知られている。この事実は実験的にも確認された。すなわち、強毒ウイルスを経口接種した豚では接種7日後から血清に中和抗体が検出されるようになり、その値は2~256倍である^{14,15)}。このような豚では強毒ウイルスでチャレンジしても発症することなく耐過する。一方、培養細胞継代ウイルスを筋肉内-鼻腔内ルートで接種すると高い中和抗体価が検出されるにもかかわらず、強毒ウイルスでチャレンジすると発症し、防御は全く成立しない。

また、不活化強毒ウイルスをアジュバントと共に筋肉内注射しても発症防御能を誘導することは困難である。これらの成績は、非経口接種では腸管局所に防御免疫を誘導することは難しく、またそれは血清中和抗体価と無関係であることを示している。これらのことから、防御免疫の機構を明らかにするため腸管局所の液性並びに細胞性免疫の両面について検討が加えられた。

表1は強毒あるいは細胞継代ウイルスを経口接種した豚ではマクロファージ遊走阻止因子(MIF)活性が小腸粘膜固有層と脾臓リンパ球の双方から検出されたのに対し、細胞継代ウイルスを皮下注射した場合のそれは脾臓リンパ球のみから検出されることを示している¹⁰⁾。

Shimizu & Shimizu²⁶⁾は、強毒株感染豚のパイエル氏板(PP)、腸間膜リンパ節(MN)、脾臓並びに末梢血由来リンパ球のウイルス抗原に対する反応性をリンパ球幼若化試験によって検討したところ、その反応性はPPとMN由来リンパ球で最

も高く、かつ抗豚胸腺抗体と補体で処理することによって減少することを示した。

さらに、彼ら²⁷⁾は⁵¹Chromium Release TestによりPP, MN, 脾臓並びに末梢血から細胞障害性リンパ球が検出され、それらの活性は抗豚胸腺抗体と補体で処理することによって減少したが、なお標的感染細胞に対し活性が残存することを報告している。このことから、細胞障害性Tリンパ球による作用の他に抗体依存性細胞障害作用の存在を示唆している。

一方、Kodamaら^{13,15)}は³²PラベルウイルスによるRadioprecipitation Testによって小腸分泌液並びに血清から検出される抗体のアイソタイプを調べた。その結果、強毒ウイルスを経口接種した豚では小腸分泌液ばかりではなく、血清からもIgA抗体が検出され、弱毒ウイルスを筋肉内注射した

表1 TGEウイルス接種豚の小腸粘膜および脾臓リンパ球のMIF活性¹⁰⁾

豚番号	ウイルス	接種経路	接種後日数	MIF活性(%)	
				小腸	脾臓
10-5	強毒	経口	14	79.4	68.6
402	"	"	22	84.1	72.6
102	"	"	30	68.8	51.3
2-200	弱毒	"	6	43.9	10.3
3-200	"	"	7	47.7	24.3
4-491	"	"	7	87.3	65.9
4-200	"	"	8	24.6	8.9
5-491	"	"	8	53.4	35.6
18-6	"	"	12	74.7	64.0
2-1	弱毒	皮下	7	1.4	30.2
2-1	"	"	7	2.7	64.6
2-3	"	"	8	-0.9	47.9
3-4	"	"	8	-0.5	68.2
3-5	"	"	10	0.6	54.3
3-6	"	"	10	1.1	56.5
3-7	"	"	14	6.4	47.2
104	"	"	14	1.3	68.7
106	"	"	21	-0.2	71.4
109	"	"	21	1.9	54.6

* 榊崎免疫研究所
(Yoshikatsu Kodama, Hideaki Yokoyama)

表2 TGE ウイルス接種豚の小腸分泌液および血清のIgA 抗体応答¹³⁾

豚番号	ウイルス	経路	接種後 日数	抗豚α鎖抗体による ³² P ラベルウイルスの沈降	
				小腸分泌液(%)	血清(%)
1	強毒	経口	7	22.5	21.0
2	//	//	14	46.8	59.4
3	//	//	21	33.9	57.2
4	//	//	28	38.0	63.4
5	//	//	35	58.2	56.7
6	//	//	56	46.0	38.4
7	弱毒	筋肉	7	0	0
8	//	//	14	0	6.7
9	//	//	21	0	0
10	//	//	28	0	6.4
11	//	//	35	0	0
12	//	//	56	0	6.3

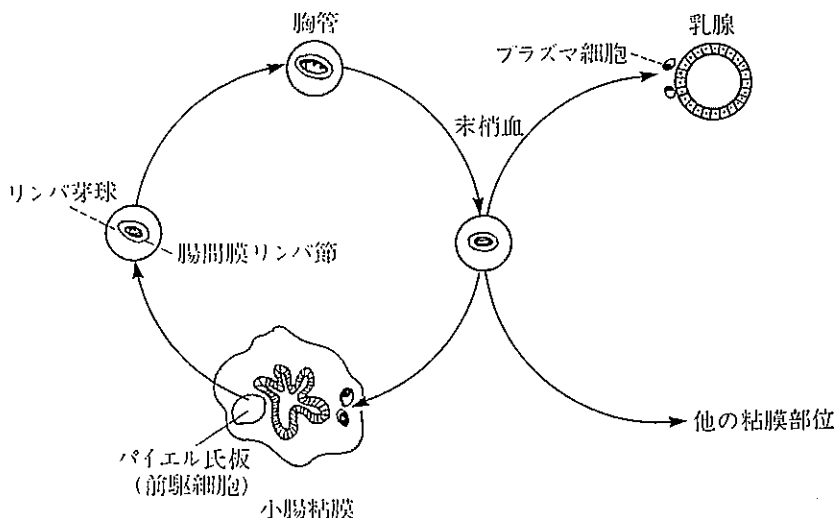
場合とは異なっていた(表2)。

以上のことから、TGE ウイルスによる GALT への抗原刺激は腸管局所への免疫形成に重要であり、その主導的役割は腸管局所の IgA 抗体ばかりではなく、細胞性免疫の関与も考えられる。

2-2. 共通粘膜免疫系のしくみ

近年、GALT への抗原刺激がいろいろな粘膜部位に IgA 抗体の産生と分泌を誘導する機構の存在が明らかとなり、この一連の機構を共通粘膜免疫系(Common Mucosal Immunologic System)と呼ばれる^{18,24)}。

このシステムの内容は経口ワクチンの研究開発に大きなインパクトを与える重要な要素を含んで

図6 IgA 産生細胞の移動サイクル²⁴⁾

いるので、図6²⁴⁾に従ってそのしくみを簡単に整理する。

- ① 経口的に投与された抗原は GALT の PP に到達し、M 細胞に取り込まれる。その抗原情報が GALT の免疫担当細胞に伝達され、当該抗原に対応した IgA 抗体の産生が委任される。
- ② 委任された IgA 前駆細胞は腸間膜リンパ節に移動して分化する。
- ③ これらの細胞は分化しながら胸管を介して体内循環に入る。
- ④ さらにこれらの細胞は腸管、泌尿生殖器、呼吸器など全身の粘膜組織並びに乳腺、唾液腺、涙腺等の間質組織に選択的に移動する。ただし、乳腺および生殖器粘膜への移動は催乳ホルモンあるいは性ホルモンによって調節されている。
- ⑤ 各粘膜部位に移動した IgA 前駆細胞は成熟して IgA プラズマ細胞に分化する。
- ⑥ プラズマ細胞は J 鎖を結合したダイマー IgA 抗体を産生し、管腔に分泌される時に Secretory Component (SC) を結合して分泌生 IgA 抗体となって粘膜表面を防御する。

2-3. M 細胞による抗原性物質の取り組み

PP のドームを被う上皮細胞は形態学的に円柱状ではなく微絨毛、glycocalyx および端網層を欠き、多くの小胞をもった微皺壁(microfolds)から構成され、この PP のリンパ濾胞を被う非円柱上皮細胞は M 細胞と呼ばれる^{7,9,22)}。M 細胞の細胞質は非常に薄く、外膜と内膜が接近しているため、抗原性物質と接触しやすい構造となっている(写真1)。

図7はM細胞によるペルオキシダーゼの取り込み様式を模式図化したものである²²⁾。離乳豚に TGE ウイルスを経口接種すると、感染によって小腸の吸収上皮細胞が破壊されるが感染初期には M 細胞によるウイルス抗原の取り込みが観察される⁸⁾。また



写真1 マウス回腸パイエル氏板のリンパ濾胞の上皮細胞の透過型電子顕微鏡
上皮細胞の中にリンパ球（L）が嵌入し、微絨毛が他の吸収上皮細胞より太く短い細胞が
M細胞（M）。（5 μm）

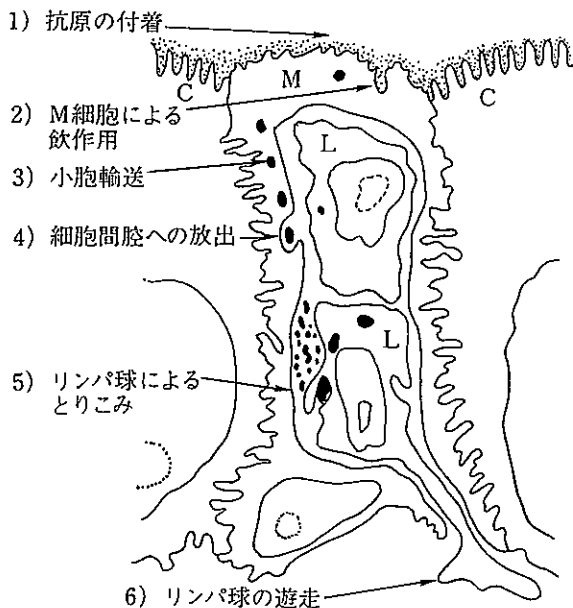


図7 M細胞による抗原の吸収様式²²⁾
M：M細胞，C：円柱上皮細胞，L：リンパ球

ペルオキシダーゼを経口投与しても当該酵素はM細胞に選択的に取り込まれる。

これらのことはM細胞が抗原を取り込み、その抗原情報をGALTの免疫担当細胞に伝達する機構を備えていることを示している。したがって、TGEウイルスに対する乳汁免疫の誘導、つまり乳汁並びに小腸分泌液へのIgA抗体の産生はウイルス抗原が経口的に投与され、胃液並びに腸液でウイルスの抗原性が破壊されず安全にM細胞に取り込まれることが前提となる。

一方、この種のM細胞はBALTが存在している呼吸器粘膜にもその所在が確認されており^{1,2)}、経気道的に投与された抗原物質を吸収し、気道粘膜並びに腸管粘膜に特異IgA抗体の産生を促す。例えば、マウス（6週齢）にインフルエンザウイルスHA抗原をコレラトキシンサブユニットBと混合し

て経鼻接種すると、その後鼻汁中に IgA アイソタイプの HI 抗体が検出され、強毒ウイルスによるチャレンジに低抗する²⁹⁾。さらに、4 週後に経気道的にブースター接種すると特異 IgA 抗体による 10~100 倍の強い二次免疫応答が観察される。非増殖性抗原、HA による IgA 抗体の応答はコレラトキシンサブユニット B が BALT の免疫担当細胞を活性化することによって誘導されると考えられている。

3. 異種抗体による哺乳期 下痢の軽減

ETEC の K 88, K 99, 987 P などの線毛保有株からなる全菌体あるいは線毛からなるコンポーネントワクチンは妊娠豚に接種することによって血中抗体価を上昇させ、血清から初乳に移行した抗体に発症防御効果を期待するものである。

しかしながら、初乳中に検出される抗体は抗体のアイソタイプが IgG であるためその値は分娩後急激に低下する (図 5)。したがって、1 週齢以降に発生する下痢症には効果が期待できないためその対応策が迫られている。

私共は、異種抗体の有効利用を考え、その基礎的研究を行っている。ここではこれまでに得られた成績の一部を紹介したい。

抗体の大量調製方法として牛の初乳、牛および豚などの屠殺時の血液などが上げられるが問題点が多い。筆者らは、鳥類の卵黄中の移行抗体 (IgG) に注目し、産卵鶏に ETEC の線毛サブユニット (K 88, K 99, 987 P) を免疫することにより特異抗体含有卵を得た。この卵黄より、ポリマー (オイドラギット) を用い抗体を抽出し、噴霧乾燥機により粉末抗体製剤を作成した。

得られた抗体製剤の治療効果を実験感染豚を用いて評価した。実験感染豚の作出は、K 88+ETEC 並びに K 99+ETEC ではそれぞれ 10^{12} cfu/豚の培養菌を、また、987 P+ETEC では 10^{10} cfu/豚の培養菌を経口接種した。下痢を確認してから、各々抗体価の異なるサンプル 4 ml を 1 日 3 回 3 日間経口投与し、下痢の改善効果を検討した。

表 3 は、下痢頭数と死亡率を示しているが抗体価に応じて治療効果が観察された。対照群では激

表 3 ETEC 接種後の子豚の発病頭数と死亡率

群 別	ETEC 接種後の日数			死亡率 (%)
	1 日	3 日	5 日	
K 88 対照	7/7	4/4	1/1	6/7 (86)
	160*	6/7	3/5	2/7 (29)
	640	5/7	0/7	0/7 (0)
	2560	3/7	0/7	0/7 (0)
K 99 対照	4/4	0/0	0/0	4/4 (100)
	160	4/4	2/2	2/4 (50)
	640	4/4	4/4	0/4 (0)
	2560	3/4	0/4	0/4 (0)
987 P 対照	5/5	1/1	1/1	4/5 (80)
	160	5/5	2/3	2/5 (40)
	640	5/5	0/5	0/5 (0)
	2560	4/5	0/5	0/5 (0)

*: 菌体凝集抗体価

しい水様性下痢が実験終了時まで持続した。死亡率では 640 並びに 2,560 倍の抗体投与群では全頭生存したが、抗体価の低い 160 倍の投与群では K 88+ETEC 感染例で 29%, K 99 のそれは 50%,

987 P のそれは 40%の死亡率であった。対照群の死亡率は高く、K 88 では 86%, K 99 では 100%, 987 P では 80%であった。

表 4 に直腸便からの接種菌の検出頭数を示した。対照群では、接種菌は実験終了時まで検出されたのに対し、2,560 倍の抗体投与群では K 88 で 5 日目まで、K 99 で 4 日目まで、987 P では 2 日目まで検出された。

写真 2 に剖検した子豚の回腸粘膜の走査型電子

表 4 ETEC 接種後の子豚直腸便からの ETEC の検出頭数

群 別	ETEC 接種後の日数		
	1 日	3 日	5 日
K 88 対照	7/7	4/4	1/1
	160*	7/7	5/5
	640	7/7	4/7
	2560	4/7	2/7
K 99 対照	4/4	0/0	0/0
	160	4/4	2/2
	640	4/4	4/4
	2560	3/4	1/4
987 P 対照	5/5	1/1	1/1
	160	5/5	3/3
	640	5/5	3/5
	2560	5/5	0/5

*: 菌体凝集抗体価

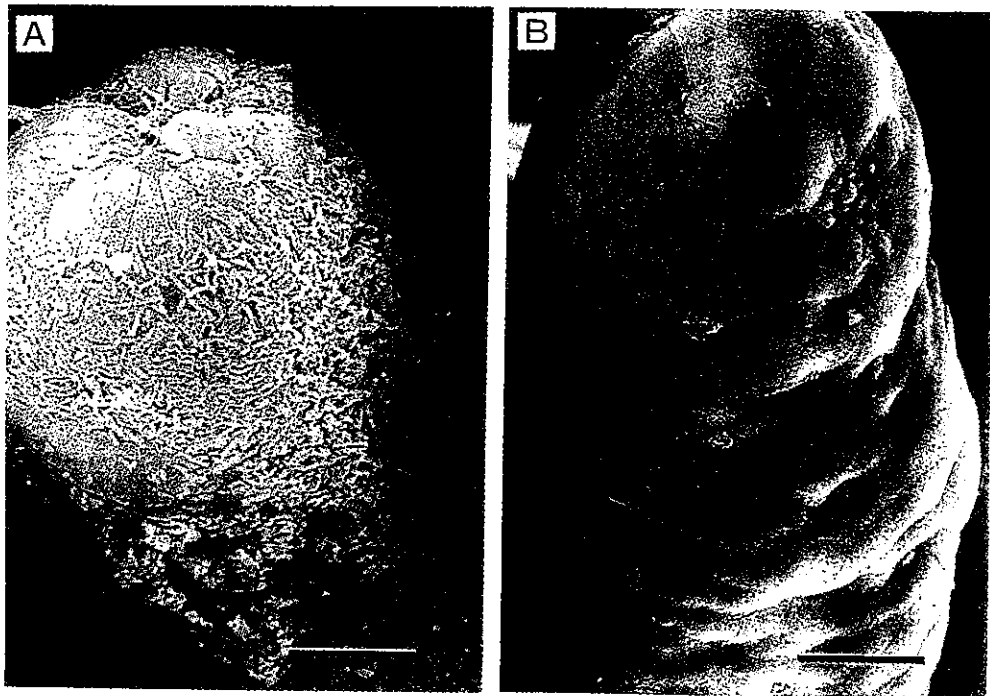


写真 2 ETEC 987 P+株接種後の子豚回腸粘膜の走査型電子顕微鏡像
 A：対照群，B：2,560 力価 987 P の菌体凝集抗体投与群。A の対照群では接種菌と思われる多数の桿菌が腸粘膜に付着しているように見える。B の 2,560 力価の抗体投与群では桿菌が腸粘膜に付着していない。(20 μm)

顕微鏡像を示した。A は対照群で接種菌と思われる多数の桿菌が腸粘膜に付着している。これに対し、B は 2,560 倍の 987 P 抗体を投与した群であるが、接種菌と思われる桿菌は観察されなかった。

図 8 は、増体重の推移を示している。2,560 力価の抗体投与群では、1 日目に体重減少を認めたが、2 日目には菌接種前の体重まで回復し、5 日目の増体率は 10~20% であった。対照群および低力価の群では 1 日目に体重が著しく減少し、その後の増体が遅延した。

これらのことから、ETEC の線毛サブユニットを免疫した産卵鶏の卵黄より抽出した特異抗体は、子豚大腸菌性下痢症による下痢の期間を短縮し増体重を好転させるなど治療に有効と考えられる。また、この抗体製剤はワクチンと共に抗生物質の使用頻度を軽減するのに役立つと考えられる。

まとめ

最も有効な乳汁免疫形成は、経口ルートで投与された抗原性物質が胃内環境をエスケープし、PP のドームを被う M 細胞に取り込まれることが前提となって乳汁への分泌性 IgA 抗体の産生が作動す

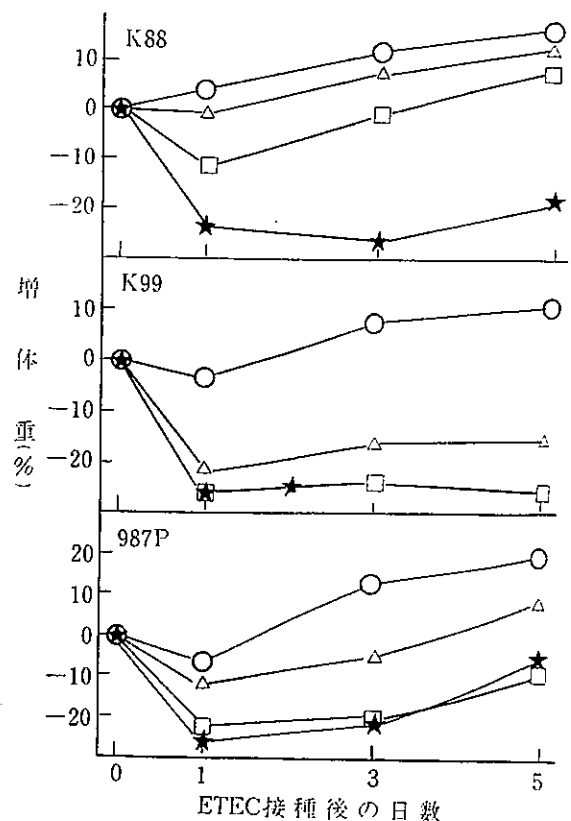


図 8 ETEC 接種後の子豚の増体重
 ★：対照，□：160，△：640，○：2560 各力価の菌体凝集抗体投与群

ると考えられる。豚腸管感染症ワクチンの開発のポイントは、まさにこの点を科学的に解明することである。また、GALT並びにBALTの免疫担当細胞を効率よく刺激するコレラトキシンサブユニットBに類似するアジュバントの開発もあわせて重要な課題であろう。

これらの課題を通して得られたデータの蓄積は腸管感染症にとどまらず、各種の粘膜感染症に対する予防技術として活用できると思われる。

一方では、ETEC等によってもたらされる哺乳豚の損耗を軽減するために異種IgG抗体の利用技術の開発も考えられる。事実、哺乳豚における活性塩酸並びにペプシノーゲンの分泌は極めて微弱であることから、異種IgG抗体による経口投与も可能であろう。異種抗体のソースとして免疫卵黄を利用することは初乳あるいは血清と異なり、色々な点で大量生産に適している。特に、卵黄は成分が単純であることから抗体の精製が比較的容易である。

食品の安全性について論議が高まる中で、抗生物質並びに合成抗菌剤を正しく使用するためにも、これらの課題が積極的に取上げられ、試験研究が進展することを期待したい。

参考文献

- 1) Bienenstock, J., N. Johnston, and D.Y.E. Perey. 1973 (a). *Lab. Invest.* 28 : 686~692
- 2) Bienenstock, J., N. Johnston, and D.Y.E. Perey. 1973 (b). *Lab. Invest.* 28 : 693~698
- 3) Bohl, E.H., R.K.P. Gupta, M.V.F. Olquin, and L. J. Saif. 1972. *Infect. Immun.* 6 : 289~301.
- 4) Bohl, E.H., G.T. Frederick, and L.J. Saif. 1975. *Am. J. Vet. Res.* 36 : 267~271.
- 5) Bohl, E.H., and L.J. Saif. 1975. *Infect. Immun.* 11 : 23~32.
- 6) Chen, K.S., and D.E. Kahn. 1985. *Am. J. Vet. Res.* 46 : 1632~1636.
- 7) Chu, R.M., R.D. Glock, and R.F. Ross. 1979. *Am. J. Vet. Res.* 40 : 1720~1728.
- 8) Chu, R.M., R.D. Glock, and R.F. Ross. 1982. *Am. J. Vet. Res.* 43 : 67~76.
- 9) Chu, R.M., and C.H. Liu. 1984. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 6 : 391~403.
- 10) Frederick, G.T., and E.H. Bohl. 1976. *J. Immunol.* 116 : 1000~1004.
- 11) Gough, P.M., C.J. Frank, D.G. Moore, M.A. Sagona and C.J. Johnson. 1983. *Vaccine.* 1 : 37~41.
- 12) Kaji, T., and Y. Shimizu. 1978. *Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart.* 18 : 43~52.
- 13) Kodama, Y., M. Ogata, and Y. Shimizu. 1980. *Am. J. Vet. Res.* 41 : 740~745.
- 14) Kodama, Y., M. Ogata, and Y. Shimizu. 1981. *Am. J. Vet. Res.* 42 : 437~442.
- 15) 児玉義勝. 1985. 豚における腸管感染症の免疫. *日本獣医学の進展*. PP.228~237.
- 16) Kortbeek-Jacobs, N., and H. van der Donk. 1981. *Vet. Immunopathol.* 2 : 441~451.
- 17) Kortbeek-Jacobs, J.M.C., P.J.S. van Kooten, J.A. Van der Donk, J.E. Van Dijk, and V.P. Rutten. 1984. *Vet. Microbiol.* 9 : 287~299.
- 18) McDermott, M.R., and J. Bienenstock. 1979. *J. Immunol.* 122 : 1892~1899.
- 19) Morgan, R.L., R.E. Isaacson, H.W. Moon, C.C. Brinton and C-C. To. 1987. *Infect. Immun.* 22 : 771~777.
- 20) Nakazawa, M., C. Sugimoto, Y. Isayama and M. Kashiwazaki. 1987. *Vet. Microbiol.* 13 : 291~300.
- 21) 波岡茂郎. 1989. 常在菌の定着過程と生体防御への関与. *生体防御* 6 : 45~53.
- 22) Owen, R.L. 1977. *Gastroenterology* 72 : 440~447.
- 23) Porter, P., D.E. Noakes, and W.D. Allen. 1970. *Immunology* 18 : 245~257.
- 24) Roux, M.E., M. McWilliams, J.M. Phillips-Quagliata, P. Weisz-Carrington, and M.E. Lamm. 1977. *J. Exp. Med.* 146 : 1311~1322.
- 25) Saif, L.J., E.H. Bohl, and R.K.P. Gupta. 1972. *Infect. Immun.* 6 : 600~609.
- 26) Shimizu, M., and Y. Shimizu. 1979. *Infect. Immun.* 23 : 239~243.
- 27) Shimizu, M., and Y. Shimizu. 1979. *Am. J. Vet. Res.* 40 : 208~213.
- 28) 清水悠紀臣. 1976. 乳汁IgAと受動免疫. *代謝* 13 : 57~65.
- 29) Tamura, S., H. Kurata, H. Funato, T. Nagamine, C. Aizawa and T. Kurata. 1989. *Vaccine* 7 : 314~320.