

豚丹毒菌YS-19株免疫豚のマイコプラズマ・ハイオニューモニエ P97抗原に対する免疫応答の解析

下地善弘^{1)*}, 大石英司²⁾, 宗田吉広¹⁾, 芝原友幸³⁾, 森 康行⁴⁾

(平成18年8月1日 受付)

Immune responses to the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 antigen in pigs vaccinated with *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19

Yoshihiro SHIMOJI^{1)*}, Eiji OISHI²⁾, Yoshihiro MUNETA¹⁾, Tomoyuki SHIBAHARA³⁾ & Yasuyuki MORI⁴⁾

Mycoplasma hyopneumoniae P97抗原の一部を菌体表面に発現する豚丹毒菌YS-19株免疫豚のP97抗原に対する免疫応答の解析を行った。YS-19株を3回経鼻的に免疫された豚では、P97抗原に対する血中抗体は検出されなかったが、末梢血単核球は3回目の免疫直後からP97抗原刺激に対して増殖反応を示し、その程度は対照豚と比べて有意な差が認められた。また、*M. hyopneumoniae*強毒株攻撃接種後に採取した末梢血単核球はP97抗原刺激に対して細胞性免疫の重要な指標であるIFN- γ を産生した。免疫、非免疫に拘わらず、豚の末梢血単核球はP97抗原の刺激によりIL-8を産生し、P97抗原を鼻腔内に噴霧投与された豚では気管支肺胞洗浄液中に多量の好中球が観察された。さらに、YS-19株のNeedle-free injector（針なし注射）を用いたワクチン接種法の検討において、皮内に1回免疫した豚の末梢血単核球は、*M. hyopneumoniae*強毒株攻撃接種後にP97抗原刺激による増殖能が有意に上昇した。なお、Needle-free injectorによるYS-19株免疫豚では肺炎病変の形成が有意に抑えられた。

緒言

肺炎は下痢症と並んで子豚の発育遅延を引き起こす最大の要因であり、それによる経済的損害は極めて甚大である。*Mycoplasma hyopneumoniae*は豚に肺炎（豚マイコプラズマ肺炎）を引き起こすがその感染はウイルスなどの2次感染を引き起こすことが多く、豚の呼吸器病の増悪因子として重要である¹⁶⁾。これまで豚マイコプラズマ肺炎については国内外で盛んに研究されてきたが、*M.*

*hyopneumoniae*の病原因子は依然不明であり、どのようなメカニズムで肺炎が引き起こされるのか分かっていない¹⁶⁾。また、肺病変の形成には宿主の免疫反応が関与すると考えられているが、どのような因子がそれに関与するのかも分かっていない¹⁶⁾。

*M. hyopneumoniae*は経口あるいは経鼻的に宿主の体内に侵入後、気管支上皮繊毛に付着するが、*M. hyopneumoniae*が付着した領域の上皮は剥離し炎症が起こるため、それが豚マイコプラズマ肺炎病変形成の引き金になると考えられている^{2), 3), 8)}。*M. hyopneumoniae*の気管支上皮繊毛への付着には、分子量は異なるものの株間で保存されている菌体表層のP97アドヘジン（adhesin：付着因子）蛋白抗原、特に、この蛋白のC末端に存在するAAKPVあるいはAAKPEから成る繰り返しアミノ酸配列を含む領域（R1 region）が重要な役割を果たすことが知られている^{5), 10), 24)}。これまでに我々は、豚丹毒と豚マイコプラズマ肺炎に効果のある多価ワクチン株を作製することを目的として、

- 1) 動物衛生研究所免疫研究部（現次世代製剤開発チーム）
- 2) 微生物化学研究所
- 3) 動物衛生研究所疫学研究部（現疫学研究チーム）
- 4) 動物衛生研究所疫学研究部（現ヨーネ病研究チーム）

* Corresponding author, Mailing address: Yoshihiro SHIMOJI, Research Team for Advanced Biologicals, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, JAPAN
Tel & Fax: +81-29-838-7790
E-mail: shimoji@affrc.go.jp

P97抗原C末端のR1とその近傍に存在するR2と呼ばれる領域を含む約200個のアミノ酸を豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) の弱毒株の菌体表面に発現するYS-19株を作製した¹⁸⁾。YS-19株を経鼻的に噴霧免疫された豚では豚丹毒に対する感染防御が見られ¹⁸⁾, マイコプラズマ肺炎の病変形成も著しく抑制されることが判明した¹⁹⁾。このことは, P97抗原, 特にそのC末端領域が*M. hyopneumoniae* の病原性に深く関わり, かつ, 感染防御抗原であることを強く示唆する。しかしながら, 我々のYS-19株免疫実験においては, マイコプラズマ肺炎の病変形成が抑制された豚ではP97抗原特異的な血中抗体は検出されていない¹⁹⁾。これらの成績は, YS-19株の豚マイコプラズマ肺炎に対する防御には, P97抗原に対する血中抗体ではなく, この抗原が保有するエピトープを認識するT細胞性の免疫応答が重要であることを示唆している。

ところで, 省力的で安全性の高いワクチンの一つとして, Needle-free injector (針なし注射) を使った免疫法が開発されている。この方法は圧縮ガスを利用して動物に出血を起こすことなく皮内, あるいは, その深部の組織にまで抗原を注入することができ, 多頭に連続注入が可能である。この方法は, 大規模化が進みワクチン接種にも省力化が強く求められている現代の養豚業では極めて有効だと思われる。また, その使用により従来型の注射ワクチンで指摘されている枝肉への注射針の残留問題も発生しない。しかしながら, 肺炎病変形成の阻止において, P97抗原の筋肉内注射では有効ではないが⁶⁾, 我々が行ってきたYS-19株の経鼻噴霧投与では有効であったように, ワクチンの投与ルートは有効な免疫反応の誘導に影響を及ぼす極めて重要な要因である。

本研究では, これまで不明であった豚マイコプラズマ肺炎の免疫防御機序を解明するため, 豚免疫担当細胞のP97抗原に対する免疫応答を解析した。また, Needle-free injectorを用いたYS-19株の皮内接種による免疫法について検討した。

材料と方法

1) 微生物

豚丹毒菌YS-19株¹⁸⁾ 及び*M. hyopneumoniae*¹²⁾ の培養はすでに述べた方法で行った。攻撃接種材料として, *M. hyopneumoniae* 強毒株であるE-1株を接種しマイコプラズマ肺炎を発症したspecific pathogen-free (SPF) 豚の肺病変材料に9倍重量のHanks' balanced saline solution (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を添加してホモジナイズ乳剤を作製し, この濾過液と*M. hyopneumoniae* E-1株の3回継代培

養液を1:1の割合で混合して作製した。

2) リコンビナント抗原及び合成ペプチド

M. hyopneumoniae E-1株のP97抗原蛋白C末端領域に存在するR1とR2と呼ばれる繰り返しアミノ酸配列を含む約200個のアミノ酸領域をヒスチジン・タグ付けたリコンビナント抗原(rP97抗原)として大腸菌で発現後, ニッケルカラム及びSepharose S-200 (GE Healthcare Biosciences, Tokyo) を用いて精製した。*M. hyopneumoniae* 由来のリコンビナントRibonucleotide reductase (rNrdF)⁹⁾ 抗原蛋白も, 同様にして精製した。rP97抗原配列中の予想されるT細胞エピトープ配列は遺伝子解析ソフトGENETYX-MAC (Version 7.3, Genetyx, Tokyo) にて決定し, その配列を含んだ細胞刺激用ペプチドはニッピ (東京) にて合成を依頼した。

3) 末梢血単核球芽球化反応

抗原刺激による末梢血単核球芽球化反応の測定は, すでに報告した方法に従い行った¹⁹⁾。簡単に述べると, 採血後Ficoll-Paque Plus (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) にて末梢血単核球を分離後, 2×10^6 個/ml になるように10%牛胎児血清, 2 mM - グルタミン, 1 mM ビルビン酸, ペニシリン (50U/ml), ストレプトマイシン (50 μ g/ml) を添加したRPMI1640 (GIBCO BRL, Rockville, MD) に調整した。細胞浮遊液100 μ lに最終濃度10 μ g/ml になるようにrP97抗原液100 μ lを添加・混和し, 37 $^{\circ}$ C 5% CO₂の条件下で4日間培養した。トリチウムで標識したチミジン (³H-チミジン) は細胞回収の36時間前に1.0 μ Ci/well の濃度で添加した。細胞増殖の結果は, P97抗原刺激細胞とP97抗原非刺激細胞の³H-チミジン取り込み量 (count per minute: cpm) の比 (刺激指数Stimulation index: SI) で示した。

4) ELISA

血中抗体のELISAによる測定は, rP97抗原を固相化したプレートを用いて, すでに報告した方法により行った¹⁸⁾。末梢血単核球から産生されたサイトカインの定量は市販キットを使用して測定した。すなわち, 上記で調整した末梢血単核球の細胞浮遊液 (2×10^6 cells/ml) 100 μ l に, 5 μ g/mlの刺激抗原液100 μ lを添加・混和し37 $^{\circ}$ C で培養した。16時間後, 細胞培養液の上清を回収後, -80 $^{\circ}$ C に保存し適時, 測定した。IFN- γ の測定には Biosource International 社のキットを利用した。また, IL-8の測定はSplichal et al.,²¹⁾ の報告に従って行った。

5) 動物実験

微生物およびリコンビナント抗原の豚への経鼻噴霧はキャニヨンスプレー1号(明治製菓株式会社)を用いた。マイコプラズマ肺炎病変の確認はマイコプラズマ分離と病理検査により行い、ワクチン効果の判定はすでに述べた方法により行った¹⁹⁾。微生物あるいは抗原投与のスケジュールは以下に示した(Fig. 1)。

(1) 実験1: 4週齢のSPF豚24頭を用いて、非免疫コントロール豚群(8頭), YS-1株(P97抗原を発現していないベクター株)接種豚群(8頭; 10⁹CFU/頭), YS-19株接種豚群(8頭; 10⁹CFU/頭)に分け、経鼻的に噴霧免疫した。その16日後および32日後に約10⁹CFUのそれぞれの株を同様に追加免疫し、初回免疫後49, 50, 51日目に、培養した*M. hyopneumoniae*を含む肺炎病変乳剤(2.0×10⁸ Color Changing Unit [CCU]相当量)を経鼻的に噴霧接種攻撃し

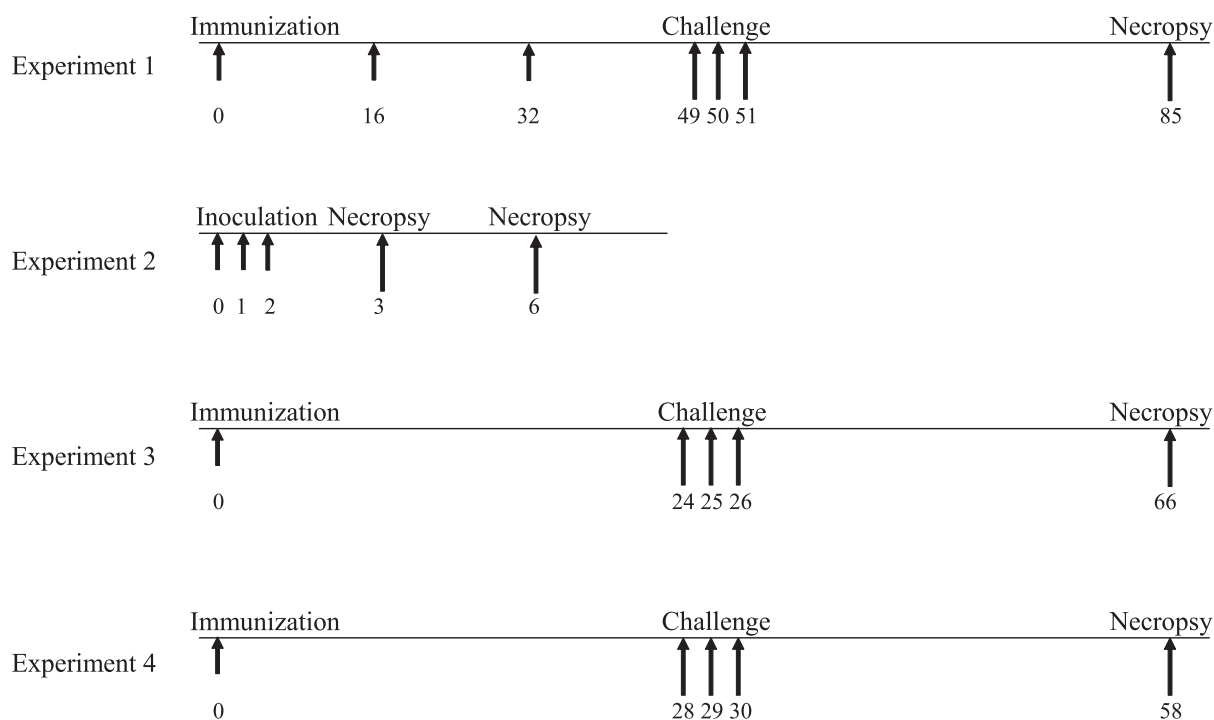


Fig. 1. Schedules for animal experiments. The numbers below arrows indicate days after first immunization or inoculation.

(Experiment 1) Twenty-four SPF pigs were divided into three groups. Groups of eight pigs from groups B and C were immunized intranasally with YS-1 and YS-19, respectively, on days 0, 16 and 32, while eight pigs in group A were inoculated intranasally with the medium as a control. The pigs in three groups were challenged with a virulent *M. hyopneumoniae* strain on days 49-51 days. On day 85, the pigs were necropsied.

(Experiment 2) Six germ-free pigs were divided into three groups. On three consecutive days, two pigs from groups A and B were inoculated intranasally with a suspension containing 1.5mg of rP97protein and rNrDF protein, respectively. Two pigs in group A were inoculated PBS. On days 3 and 6, three pigs from each group were necropsied.

(Experiment 3) Twenty-one SPF pigs were divided into three groups. Groups of seven pigs from groups B and C were immunized intradermally with a needle-free injector with YS-1 and YS-19, respectively, while seven pigs in group A were inoculated intradermally with the medium as a control. The pigs in three groups were challenged with a virulent *M. hyopneumoniae* strain on days 24-26 days. On day 66, the pigs were necropsied.

(Experiment 4) Nineteen SPF pigs were divided into two groups. Ten pigs were immunized intradermally with a needle-free injector with YS-19, while nine pigs were inoculated intradermally with the medium as a control. The pigs were challenged with a virulent *M. hyopneumoniae* strain on days 28-30 days. On day 58, the pigs were necropsied.

た。攻撃34日後に解剖して肺の病変形成を確認した。採血は初回免疫後16, 24, 37, 52, 71日目に行った。また、一部の豚は85日目に採血を行った。

(2) 実験2: 無菌的に作出し, 無菌アイソレーター内で飼育した1週齢の豚各2頭ずつ, Phosphate-buffered saline (PBS), rP97抗原, あるいは, *M. hyopneumoniae* 由来 rNrdF抗原を一頭あたり1.5mg, 3日連続して経鼻的に噴霧投与した。投与最終日の翌日と4日目に各3頭ずつ解剖し, 50ml のPBS を気管内に入れ気管支肺胞洗浄液を回収した。回収された洗浄液は100 μ lをサイトスピン (Shandon Inc., Pennsylvania, USA) を利用してスライドグラス上にはり付け, メタノールで固定後Dif Quick染色を行った。

(3) 実験3: 4週齢のSPF豚21頭を用いて, 非免疫コントロール豚群 (7頭), YS-1株接種豚群 (7頭; 2.2×10^{10} CFU/頭), YS-19株接種豚群 (7頭; 2.5×10^{10} CFU/頭) に分け, Needle-free injector (Med-e-jet Co., USA) を用いて耳根部の皮内に1回免疫した。免疫後24, 25, 26日目に *M. hyopneumoniae* を含む病変乳剤 (4.0×10^8 CCU相当量) を経鼻的に噴霧接種攻撃し, 攻撃40日後に解剖して肺の病変形成を確認した。

(4) 実験4: 3週齢のSPF豚19頭を用いて, 非免疫コントロール豚群 (9頭), YS-19株接種豚群 (10頭; 1.0×10^{10} CFU/頭) に分け, Needle-free injectorを用いて耳根部の皮内に1回免疫した。免疫後28, 29, 30日後に *M. hyopneumoniae* を含む病変乳剤 (2.0×10^8 CCU相当量) を経鼻的に噴霧接種攻撃し, 攻撃28日後に解剖して肺の病変形成を確認した。

6) 統計処理

データの有意差検定は Student's unpaired *t*-test にて行った。

結果

1) YS-19株の経鼻接種により誘導される免疫反応の解析 (実験1)

解剖の結果, 非免疫コントロール群, YS-1株 (P97抗原を発現していないベクター株) 接種群, YS-19株接種群のいずれの豚群でも, 明らかなマイコプラズマ性肺炎病変が認められなかったことから, 本実験ではYS-19株の免疫によるマイコプラズマ肺炎の病変形成の抑制効果を検証することはできなかった。しかしながら, YS-19株投与後の免疫反応の解析では, rP97抗原に特異的な血中抗体は検出されなかったが, YS-19株免疫豚の末梢血単核球は3回目の免疫直後 (初回免疫より37日目) からrP97抗原刺激による増殖反応において非免疫コントロール豚群に比較して有意に高いSI値を示した。この反応は *M. hyopneumoniae* 強毒株の攻撃直後から少なくとも攻撃後3週目 (71日目) まで観察された (Fig. 2)。さらに, 末梢血単核球をrP97抗原で刺激した場合のサイトカインの産生を解析したところ, *M. hyopneumoniae* 強毒株攻撃以前の初回免疫後24日目の解析では細胞性免疫反応の指標とされるIFN- γ の産生に差は認められなかった (成績示さず)。しかしながら, Figure 3に示すようにYS-19株免疫豚の末梢血単核球は, 攻撃直後 (52日目) にYS-1株免疫豚群と比較して, さらに, 攻撃3週後 (71日目) では非免疫コントロール豚群及びYS-1株免疫豚群に比較して有意に高いIFN- γ 産生能を示した。また, 初回免疫より24日目に末梢血単核球をrP97抗原で刺激した場合のIL-8の産

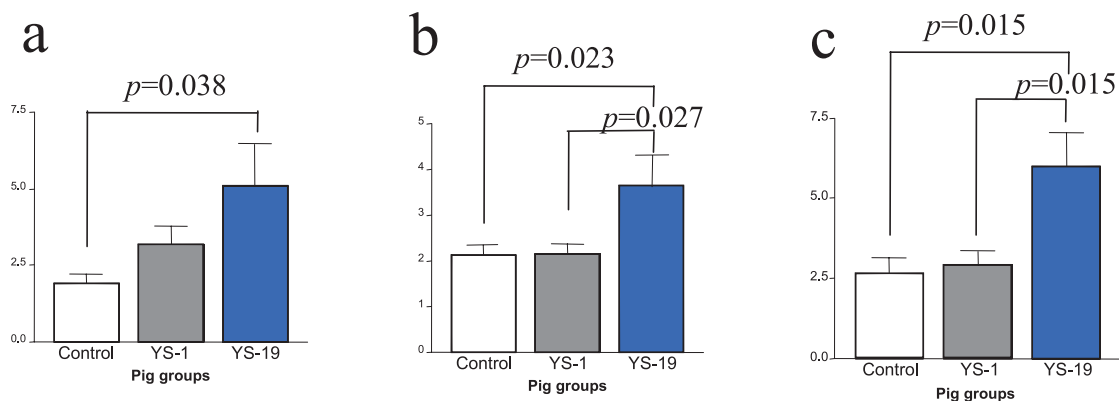


Fig. 2. Proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) in immunized and non-immunized pigs. On days 0, 16, 24, 37(a), 52(b) and 71(c), PBMC from the pigs were stimulated with rP97 protein. The data for on days 0, 16 and 24 are not shown. The results are expressed as the mean of stimulation index (SI) \pm SEM.

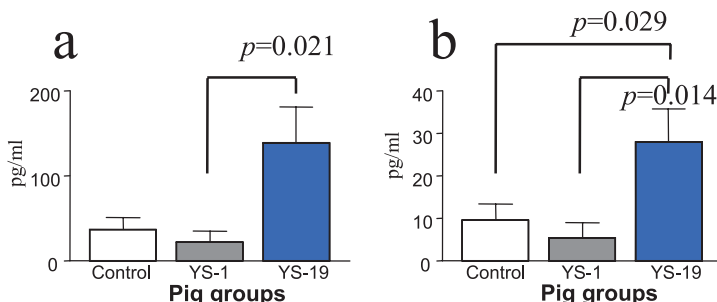


Fig. 3. Production of IFN- γ from PBMC in immunized and non-immunized pigs. On days 24, 52(a) and 71(b), PBMC from the pigs were stimulated with rP97 protein. The data for on day 24 are not shown. The results are expressed as the mean of SI \pm SEM.

生量を測定した結果、いずれの豚群でも高いIL-8の産生が認められた (Fig. 4)。

初回免疫から85日目に、予想されるT細胞エピトープ配列を含む合成ペプチド (Table 1) で *M. hyopneumoniae* 強毒株感染豚の中から無作為に選んだ個体 (非免疫豚2頭, YS-1株免疫豚2頭, YS-19株免疫豚4頭) の末梢血単核球を刺激し、IFN- γ の産生を測定した。その結果、rP97で刺激した場合、最も高い産生が認められたが、特定の合成ペプチド刺激でIFN- γ が強く産生される傾向は見られなかった (Fig. 5)。一方、IL-8の産生を測定したところ、無刺激の細胞でも高いIL-8の産生が見られるとともに、個体ごとに各ペプチドに対する反応に違いが認められた (Fig. 6)。

2) P97抗原鼻腔内投与後の気管支肺胞洗浄液中滲出細胞の解析 (実験2)

IL-8は好中球遊走因子である。そこで、rP97抗原を豚

Table 1. Sequences of the peptides used for stimulation of PBMC

Peptide	Sequence
1	DNKIKGILPQPPA
2	PAAKPEAAKPEAAKPETAKP
3	PVAAKPETTKPVATNTN
4	INVFLELVHQSEYE
5	EYEEQKIIKELDKT
6	QFQEVKVASDQYQK
7	PEAAKPEAAKPEAAKP
8	PEAAKPEAAKP

の鼻腔内へ噴霧投与した場合、肺気管支内洗浄液中に好中球が滲出してくるかどうかを解析した。rP97抗原を3日連続投与し、翌日解剖した豚では多量の好中球の滲出が確認できたが、rNr_dF抗原を投与した豚では好中球の滲出は軽度であり、PBSを投与した豚では好中球の滲出は認められなかった (Fig. 7)。抗原投与後4日目に解剖し

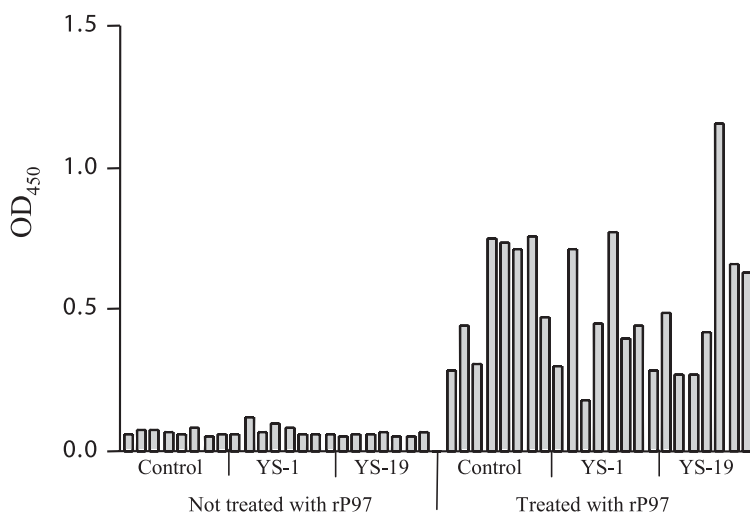


Fig. 4. Production of IL-8 from PBMC in immunized and non-immunized pigs. On day 24, PBMC from the pigs were stimulated with rP97 protein. The data for one pig in the YS-19-immunized group was not included.

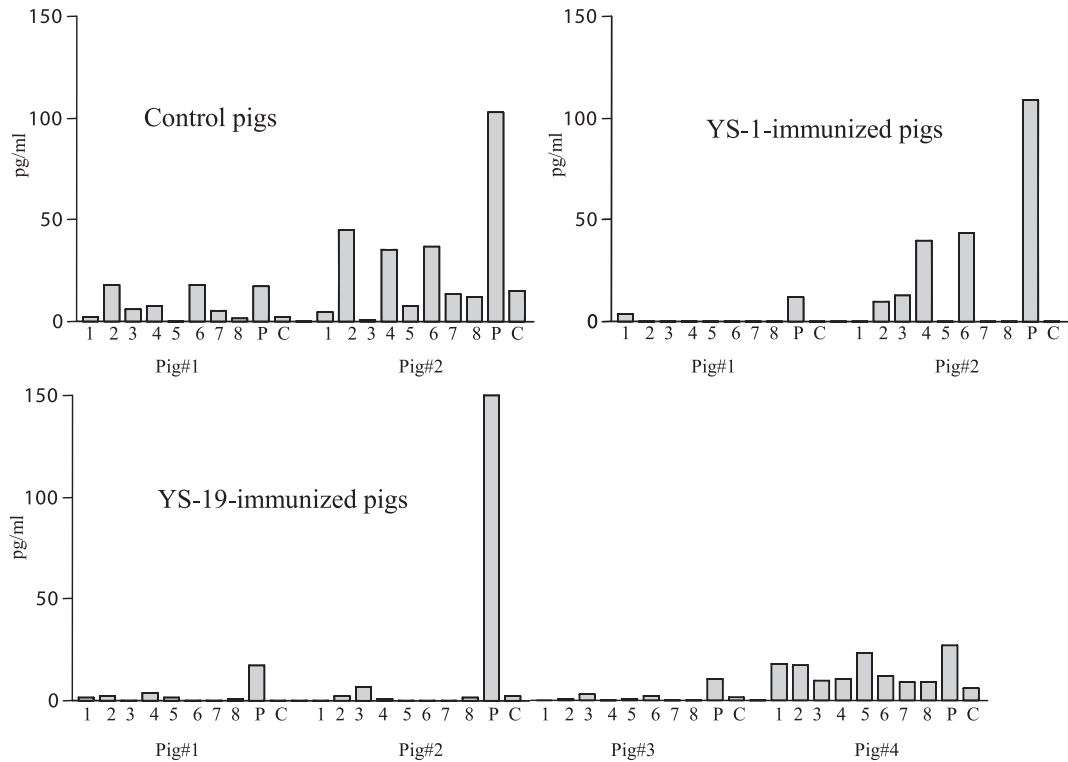


Fig. 5. Production of IFN- γ from PBMC in immunized and non-immunized pigs. On day 85, PBMC from the pigs were stimulated with peptides and rP97 protein. 1, peptide 1; 2, peptide 2; 3, peptide 3; 4, peptide4; 5, peptide5; 6, peptide 6; 7, peptide 7; 8, peptide 8; P, rP97; C, control.

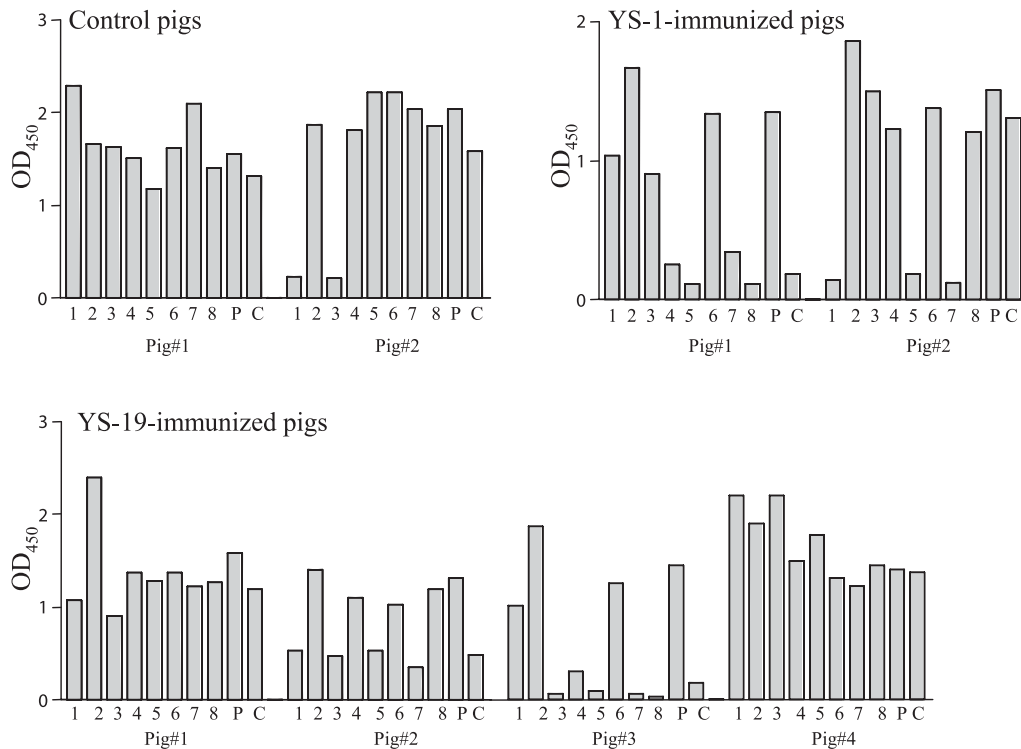


Fig. 6. Production of IL-8 from PBMC in immunized and non-immunized pigs. On day 85, PBMC from the pigs were stimulated with peptides and rP97 protein. 1, peptide 1; 2, peptide 2; 3, peptide 3; 4, peptide4; 5, peptide5; 6, peptide 6; 7, peptide 7; 8, peptide 8; P, rP97; C, control.

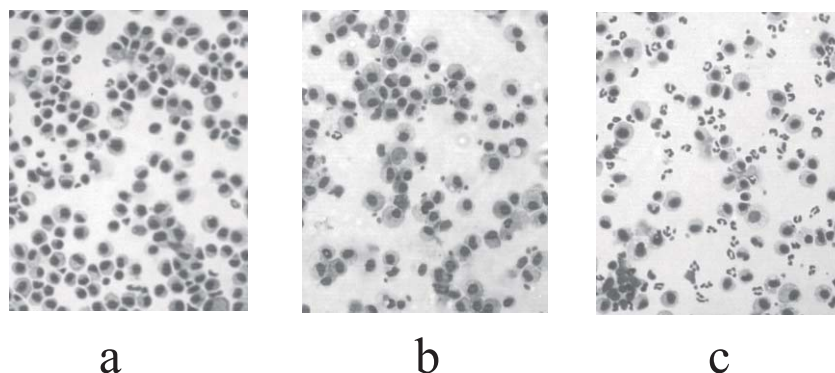


Fig. 7. Cells observed in the bronchoalveolar lavage fluid after intranasal inoculation of PBS (a), rNrdF (b) and rP97 protein (c).

た場合は、いずれの豚でも好中球の滲出は認められなかった（成績示さず）。

3) Needle-free injectorを用いたYS-19株の皮内接種により誘導される免疫反応の解析（実験3）

試験豚群を非免疫コントロール豚群、YS-1株接種豚群、YS-19株接種豚群に分け、Needle-free injector (Fig. 8)を用いて皮内に1回免疫した。攻撃後、すべての豚群において明らかな肺炎病変が観察できなかったことから、本実験ではYS-19株のNeedle-free injectorによる皮内免疫によるマイコプラズマ肺炎の病変形成の抑制効果を検証することはできなかった。

初回免疫から0, 20, 30, 45日目にrP97抗原刺激による末梢血単核球の増殖反応を解析したところ、YS-19株免疫豚の末梢血単核球は*M. hyopneumoniae*強毒株の攻撃直

後（30日目）にのみ非免疫コントロール豚群と比較して有意に高いSI値を示した（Fig. 9）。この反応は強毒株の攻撃から19日目、すなわち初回免疫後45日目には観察されなかった。また、いずれの時点においても、YS-19株免疫豚ではP97抗原特異的な血中抗体は検出されなかった（成績示さず）。

4) Needle-free injectorを用いたYS-19株のワクチン効果（実験4）

試験豚群を非免疫コントロール豚群とYS-19株接種豚群に分け、Needle-free injectorを用いて皮内に1回免疫した。攻撃後、非免疫コントロール群豚では病変面積比率にして平均9.2%の病変が観察されたのに対して、YS-19株接種群豚のそれは平均0.2% ($p < 0.01$)で、有意な肺炎病変形成の抑制が観察された（Table 2）。



Fig. 8. The needle free-injector used for intradermal immunization of YS-19 strain.

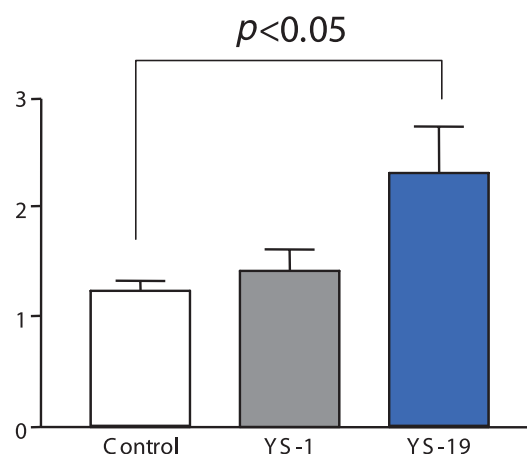


Fig. 9. Proliferation of PBMC in immunized and non-immunized pigs. On days 0, 20, 30 and 45, PBMC from the pigs were stimulated with rP97 protein. The data for on days 0, 20 and 45 are not shown. The results are expressed as the mean of $SI \pm SEM$.

Table 2. Effect of intradermal vaccination with the needle-free injector of *E. rhusiopathiae* YS-19 on development of pneumonia

Treatment group and pig number	Percentage of lung pneumonic (%)		
	Dorsal	Ventral	Average
Control			
107	0	0	0
108	0	5.6	2.8
109	29.3*	18.6	24.0
110	5.9	6.9	6.4
111	21.1	17.4	19.3
112	0	0	0
113	8.8	13.9	11.4
114	19.7	17.7	18.7
115	0	0	0
YS-19-immunized group			
251	0	0	0
252	0	0	0
253	0	0	0
254	0	0	0
255	2.5	2.3	2.4
256	0	0	0
257	0	0	0
258	0	0	0
259	0	0	0
260	0	0	0

* The value indicates the proportions of the lung surfaces with pneumonic lesions.

考 察

これまで、豚マイコプラズマ肺炎に対する防御に細胞性免疫が重要であることを示唆する報告は少ない。Messier et al.⁹⁾は*M. hyopneumoniae*感染豚の末梢血リンパ球は*M. hyopneumoniae*の菌体抗原の刺激により増殖したことから、豚マイコプラズマ肺炎に対する防御には少なくとも細胞性免疫が重要であると報告した。また、Thacker et al.²²⁾は、市販ワクチンを接種した豚群では末梢血リンパ球によるIFN- γ の産生が非免疫豚群に比較して有意に高かったことから、*M. hyopneumoniae*感染からの回復には活性化したT細胞によるIFN- γ の産生が重要であると考察している。しかしながら、これらの報告では細胞性免疫の誘導に関わる抗原は同定されていない。

我々はこれまでに、YS-19株を2回経鼻的に免疫された豚ではマイコプラズマ肺炎の病変形成が抑制されるが、これらの免疫豚ではP97抗原に特異的な血中抗体は検出されず、末梢血単核球は*M. hyopneumoniae*強毒株の攻撃接種後にrP97抗原で刺激することにより特異的に増殖したことを報告した¹⁹⁾。このことは、YS-19株の免疫後、P97

抗原が細胞性免疫系へ抗原提示され、*M. hyopneumoniae*強毒株の接種により*M. hyopneumoniae*が保有するP97抗原に対して免疫学的記憶を持つT細胞が増殖したことを強く示唆する。

本研究では、豚マイコプラズマ肺炎に対する防御には*M. hyopneumoniae*のP97抗原に対する細胞性免疫が重要であることを証明するため、YS-19株免疫豚の末梢血単核球のP97抗原特異的な増殖が、免疫回数を増やすことにより*M. hyopneumoniae*強毒株の攻撃以前、すなわち、免疫による抗原感作だけでも観察されるかどうか、さらに細胞性免疫反応の指標となるIFN- γ などのサイトカインの産生が誘導されるかどうかを解析した。

実験1及び3において、非免疫コントロール豚で*M. hyopneumoniae*強毒株の攻撃接種により肺炎病変が形成されなかったことからYS-19株のワクチン効果を検証することはできなかった。*M. hyopneumoniae*による肺炎は日和見的な感染症であり宿主のストレスなどの要因により発症すると考えられている。今回、これらの実験において強毒株の攻撃接種による発症が成功しなかった原因

は定かでないが、接種時期や哺乳時期などの影響が考えられる。

実験1において、YS-19株を3回経鼻的に投与した豚ではP97抗原に特異的な血中抗体は検出されなかったが、末梢血単核球は3回目の免疫直後にrP97抗原の刺激により特異的に増殖し、また、*M. hyopneumoniae*強毒株の攻撃後にはrP97抗原の刺激によりIFN- γ を産生した。実験3においても、YS-19株を1回皮内投与した豚では同様にP97抗原特異的な血中抗体は検出されず、*M. hyopneumoniae*強毒株の攻撃直後にrP97抗原の刺激により末梢血単核球の増殖が観察された。また、実験3と同様にNeedle-free injectorを用いた実験4において、YS-19株を1回皮内投与した豚群では*M. hyopneumoniae*強毒株の攻撃接種による肺炎病変形成が著しく抑制された。以上の結果から、YS-19株の豚マイコプラズマ肺炎に対する防御には少なくともP97抗原に対する血中抗体よりもむしろ細胞性免疫が重要であると考えられる。事実、King et al.⁶⁾が報告したように、P97抗原を筋肉内に注射免疫された豚ではこの抗原に対する高い抗体価の上昇にも拘わらずワクチン効果は認められていない。また、今回、免疫回数を増やすことにより*M. hyopneumoniae*強毒株攻撃前にP97抗原に特異的な末梢血単核球の増殖を検出できた。我々の実験ではP97抗原特異的な末梢血単核球の増殖は化学発光法では検出されずラジオアイソトープ法を使った方法で検出されるようになったが（成績示さず）、1回の免疫で誘導されるP97抗原特異的な細胞性免疫応答を*M. hyopneumoniae*強毒株の攻撃前に検出するには、より検出感度の優れた反応系を利用する必要がある。

豚マイコプラズマ肺炎の病理発生には宿主の免疫反応が関わると考えられているが、その因子についてはよく分かっていない¹⁶⁾。本研究で、免疫、非免疫に拘わらず、rP97抗原の刺激により豚の末梢血単核球はIL-8を産生すること、特に*M. hyopneumoniae*強毒株感染豚の末梢血単核球は無刺激の状態でもIL-8を強く産生することが明らかになった。IL-8は好中球の強力な遊走因子であり、ヒトのマイコプラズマ肺炎の病理発生に重要や役割を果たすことが知られている¹³⁾。また、豚マイコプラズマ肺炎初期の病理発生には病変部において好中球の浸潤が認められることが知られており¹⁶⁾、*M. hyopneumoniae*を感染させた豚の肺気管支内洗浄液中や肺炎病変部にはIL-8を含む炎症性サイトカインあるいはそれらのmRNAが検出されている^{1), 7), 14), 15), 20), 23)}。今回、我々の実験でもrP97抗原を鼻腔内へ噴霧投与した豚の肺気管支内洗浄液中には好中球が滲出されたことから、肺炎病変の病理発生初期にP97

抗原が関与する可能性も考えられる。*M. hyopneumoniae*のゲノム上には複数のP97抗原パラログが見つまっているが¹¹⁾、我々はIL-8の産生を強く誘導したペプチド2のアミノ酸配列が少なくとも2つのパラログに保存されていることを見出した（成績示さず）。これらの知見は肺炎の病理発生におけるIL-8の関与の観点から考えると興味深い。今回の試験では用いたrP97抗原サンプルへの大腸菌由来リポポリサッカライド（LPS）の混入が否定できない。我々のin vitroの実験ではLPSのアンタゴニストであるポリミキシンBを用いてもrP97抗原刺激による末梢血単核球からのIL-8の産生はまったく阻止されないが（成績示さず）、P97抗原のIL-8を介した肺炎病変形成への関与を疑うには十分な検討が必要である。

最後に、本研究では豚マイコプラズマ肺炎に対する細胞性免疫の誘導に関わる抗原を初めて同定した。これまで、この抗原を発現するYS-19株を経鼻的に免疫された豚において細胞性免疫の誘導が認められたが、Needle-free injectorを用いて皮内投与した豚でも同様にこの抗原に対する細胞性免疫が誘導され、肺炎病変の形成が抑制されることが明らかになった。YS-19株の皮内接種でP97抗原に対する細胞性免疫の誘導が成功した理由は定かではないが、豚丹毒菌は細胞内寄生菌、すなわち抗原提示能力のあるマクロファージ内で増殖できる菌であることから¹⁷⁾、この性質がP97抗原に対する細胞性免疫を誘導することができた要因である可能性が考えられる。さらに、Needle-free injectorを用いたことにより、皮内に多く存在し抗原提示能力の高い樹状細胞によって細胞性免疫を誘導するための抗原提示がより有効に行われたのかもしれない。今回検討したNeedle-free injectorを用いた免疫法は、豚に苦痛を伴わずに多頭に連続免疫が可能になる。この方法は省力化の観点からのみならず動物福祉の面でも将来有望な方法であろう。

謝辞

本研究の一部は平成14年から15年度動物衛生研究所、所内プロジェクト研究の助成を受けて行った。

引用文献

- 1) Asai, T., Okada, M., Ono, M. et al.: Increased levels of tumor necrosis factor and interleukin 1 in bronchoalveolar lavage fluids from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Immunol. Immunopathol. 38, 253-260 (1993).
- 2) Blanchard, B., Vena, M.M., Cavalier, A. et al.: Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Microbiol. 30, 329-341 (1992).

- 3) DeBey, M.C., Jacobson, C.D., & Ross, R.F.: Histochemical and morphologic changes of porcine airway epithelial cells in response to infection with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am. J. Vet. Res. 53, 1705-1710 (1992).
- 4) Fagan, P. K., Djordjevic, S.P., Eamens, G.J., et al.: Molecular characterization of a ribonucleotide reductase (nrdF) gene fragment of *Mycoplasma hyopneumoniae* and assessment of the recombinant product as an experimental vaccine for enzootic pneumonia. Infect Immun. 64, 1060-1064 (1996).
- 5) Hsu, T. & Minion, F.C.: Identification of the cilium binding epitope of the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin. Infect. Immun. 66, 4762-4766 (1998).
- 6) King, K.W., Faulds, D.H., Rosey, E.L. et al.: Characterization of the gene encoding Mhp1 from *Mycoplasma hyopneumoniae* and examination of Mhp1's vaccine potential. Vaccine 15, 25-35 (1997).
- 7) Lorenzo, H., Quesada, O., Assuncao, P., et al.: Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Vet. Immunol. Immunopathol. 109, 199-207 (2006).
- 8) Mebus, C.A. & Underdahl, N.R.: Scanning electron microscopy of trachea and bronchi from gnotobiotic pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am. J. Vet. Res. 38, 1249-1254 (1977).
- 9) Messier, S., Ross, R.F. & Paul, P.S.: Humoral and cellular immune responses of pigs inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. Am. J. Vet. Res. 51, 52-58 (1990).
- 10) Minion, F.C., Adams, C., & Hsu, T.: R1 region of P97 mediates adherence of *Mycoplasma hyopneumoniae* to swine cilia. Infect. Immun. 68, 3056-3060 (2000).
- 11) Minion, F.C., Lefkowitz, E.J., Madsen, M.L., et al.: The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. J. Bacteriol. 21, 7123-7133 (2004).
- 12) Mori, Y., Yoshida, Y., Kuniyasu C. et al.: Improvement of complement fixation test antigen for the diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. Natl. Inst. Anim. Health Q. (Tokyo) 23, 111-116 (1983).
- 13) Narita, M., Tanaka, H., Yamada, S., et al.: Significant role of interleukin-8 in pathogenesis of pulmonary disease due to *Mycoplasma pneumoniae* infection. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 8, 1028-1030 (2001).
- 14) Okada, M., Asai, T., Ono, M. et al: Cytological and immunological changes in bronchoalveolar lavage fluid and histological observation of lung lesions in pigs immunized with *Mycoplasma hyopneumoniae* inactivated vaccine prepared from broth culture supernate. Vaccine. 18, 2825-2831 (2000).
- 15) Rodriguez, F., Ramirez, G.A., Sarradel, J., et al.: Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. J. Comp. Pathol. 130, 306-312 (2004).
- 16) Ross, R.F.: Diseases of swine. In: Mycoplasmal diseases. (Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., et al., eds.), 8th ed., 495-509, Iowa State University Press. Iowa (1999).
- 17) Shimoji, Y., Yokomizo, Y., & Mori, Y.: Intracellular survival and replication of *Erysipelothrix rhusiopathiae* within murine macrophages: failure of induction of the oxidative burst of macrophages. Infect. Immun. 64, 1789-1793 (1996).
- 18) Shimoji, Y., Oishi, E., Kitajima, T. et al.: *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-1 as a live vaccine vehicle for heterologous protein expression and intranasal immunization of pigs. Infect. Immun. 70, 226-232 (2002).
- 19) Shimoji, Y., Oishi, E., Muneta, Y. et al.: Vaccine efficacy of the attenuated *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 expressing a recombinant protein of *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 adhesin against mycoplasmal pneumonia of swine. Vaccine. 21, 532-537 (2003).
- 20) Sohn, M.H., Lee, K.E., Choi, S.Y., et al.: Effect of *Mycoplasma pneumoniae* lysate on interleukin-8 gene expression in human respiratory epithelial cells. Chest. 128, 322-326 (2005).
- 21) Splichal, I., Muneta, Y., Mori, Y., et al.: Development and application of a pig IL-8 ELISA detection system. J. Immunoassay Immunochem. 24, 219-232 (2003).
- 22) Thacker, E.L., Thacker, B.J., Kuhn, M., et al.: Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacteria to pigs. Am. J. Vet. Res. 61, 1384-1389 (2000).
- 23) Thanawongnuwech, R., Thacker, B., Halbur, P. et al.: Increased production of proinflammatory cytokines following infection with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyopneumoniae*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 11, 901-908 (2004).
- 24) Zhang, Q., Young, T.F. & Ross, R.F.: Identification and characterization of a *Mycoplasma hyopneumoniae* adhesin. Infect. Immun. 63, 1013-1019 (1995).

Summary

Immune responses to the *Mycoplasma hyopneumoniae* P97 antigen in pigs vaccinated with *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19Yoshihiro SHIMOJI^{1)*}, Eiji OISHI²⁾, Yoshihiro MUNETA¹⁾, Tomoyuki SHIBAHARA³⁾ & Yasuyuki MORI⁴⁾

We investigated immune responses to the P97 antigen of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs vaccinated with *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19 strain expressing a recombinant protein of the P97 antigen on the cell surface. In the pigs that were intranasally immunized three times with the YS-19 stain, the P97-specific serum antibodies were not detected throughout the experimental period. However, after the third immunization, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from the YS-19-immunized pigs significantly proliferated when stimulated with the P97 protein, compared to the cells from non-immunized pigs. Furthermore, when stimulated with the P97 protein, production of IFN- γ , an indicator of cell-mediated immune responses, from PBMC of the YS-19-immunized pigs was observed after the challenge. Irrespective of the immunization of pigs with the YS-19 strain, PBMC produced IL-8 with stimulation with P97 protein, and exuded polymorphonuclear leukocytes were observed in the bronchoalveolar lavage fluid from the pigs that had been intranasally inoculated with P97 protein. In an experiment in which a needle-free injector was used for intradermal immunization, PBMC from the pigs immunized with the YS-19 strain significantly proliferated with stimulation with the P97 protein after a challenge with a virulent *M. hyopneumoniae* strain. In pigs immunized with the YS-19 strain using the needle-free injector, the severity of pneumonic lung lesions caused by *M. hyopneumoniae* infection was significantly reduced.

Key words: *Erysipelothrix rhusiopathiae* YS-19, mycoplasmal pneumonia of swine, P97 antigen, vaccination