

全国農業共済協会長賞

アカバネ病ワクチン接種牛における アカバネウイルスJaGAr39株および Iriki株に対する血中中和抗体の動態

水戸 康明 植月 義友¹⁾

NOSAI岡山 真庭家畜診療所

¹⁾同 家畜課

(〒717-0023 岡山県真庭市江川794-1)

(E-mail:mito_y@ok-nosai.or.jp)

要 約

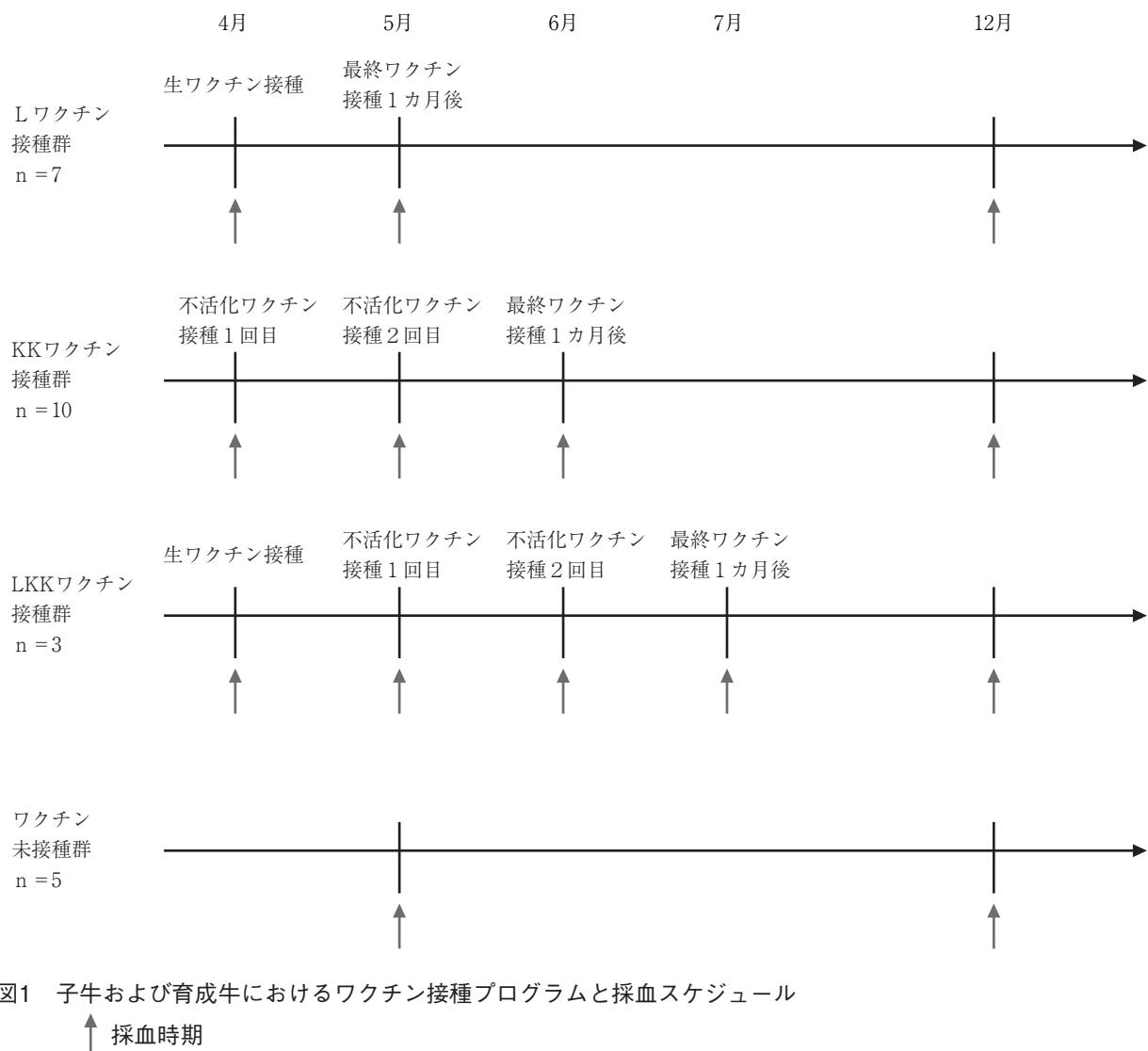
妊娠牛において胎子感染による異常産が生じるアカバネ病が、2006年に子牛や育成牛を中心とした生後感染による脳脊髄炎を主徴として九州で発生した。2011年には中国地方においても同様のアカバネ病が発生し問題となった。そこで、アカバネ病の発生予防を目的としたワクチン接種プログラム(PG)を検討した。ワクチン接種時期である3～5月に、様々な日齢の牛の血中アカバネウイルス中和抗体価を測定したところ、3～4ヶ月齢の牛で低下した。アカバネウイルスJaGAr39株(genogroup II)とIriki株(genogroup I)を抗原とした中和試験を実施したところ、生ワクチン1回接種後に不活化ワクチン2回接種した群(LKK)および生ワクチン1回接種後に不活化ワクチンを1回接種した群(LK)は、従来の生ワクチンを1回接種した群(L)、不活化ワクチンを2回接種した群(KK)および不活化ワクチン1回接種した群(K)に比べてより高い血中中和抗体価を得ることができた。

【キーワード：アカバネ病, genogroup I, genogroup II, 生後感染, ワクチンプログラム】

家畜診療, 61, 351-359(2014)

アカバネ病は、ウシヌカカなどのベクターの吸血により、アカバネウイルスに感染した牛がウイルス血症を引き起こし、妊娠牛の胎盤を介して胎子に感染することで異常産が発生する。過去には4万頭を超す大規模な異常産の発生があり、大きな問題と

なってきた¹⁾。一方、ウイルスが脳脊髄に感染することにより非化膿性脳脊髄炎を引き起こす生後感染は、1984年に鹿児島県でIriki株による発生が報告されていたが²⁾、10頭の発生と規模が小さく問題視されてこなかった。しかしながら、2006年に九州地方



で100頭を超す発生がみられ^{3,4)}、2011年には中国地方でも同様の発生があり⁵⁻⁷⁾、新たな問題となっている。

アカバネ病の予防にはワクチンが活用されているが、現在使用されているワクチンは妊娠牛の異常産予防に開発されたワクチンであり⁸⁻¹⁰⁾、生後感染に対するワクチン接種プログラムはまだ確立されていない。そこで、生後感染予防を目的としたワクチン接種プログラムを検討した。

材料および方法

ワクチン接種時期における抗体調査

管内農家13農場にて1～479日齢の牛84頭(ジャージー種、ホルスタイン種、黒毛和種、F1)を用いて、2012年3～5月に採血を実施し、アカバネウイルス中和抗体価を測定した。

ワクチン

生ワクチンはアカバネウイルスTS-C2株を抗原とするアカバネ病生ワクチン(L)(微生物化学研究所)、不活化ワクチンは、アカバネウイルスOBE-1

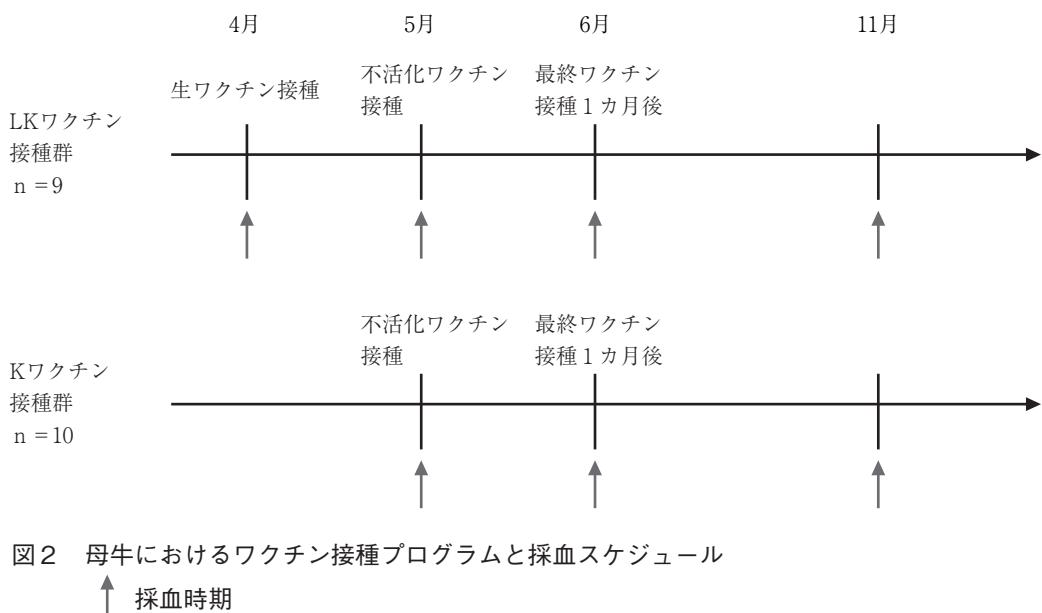


図2 母牛におけるワクチン接種プログラムと採血スケジュール

株を抗原とするアカバネ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症混合不活化ワクチン(K)(化学及血清療法研究所)を試験に供した。

子牛および育成牛におけるワクチン接種PGと採血スケジュール

2012年4～12月の期間に、3酪農場にて2～15ヶ月齢の健康な牛を用いた。生ワクチン1回接種群(L: n=7)、不活化ワクチン2回接種群(KK: n=10)、生ワクチン1回接種後不活化ワクチン2回接種群(LKK: n=3)の3群においてワクチン接種時、最終ワクチン接種1カ月後と12月に採血を実施した。野外感染確認のため、ワクチン未接種群(n=5)においては、5月と12月に2回採血を実施した(図1)。

母牛におけるワクチン接種PGと採血スケジュール

2012年4～11月の期間に、Kワクチンを毎年接種している1酪農場にて、2～11歳の経産牛を用いた。不活化ワクチン1回接種群(K: n=10)、生ワクチン1回接種後不活化ワクチン1回接種群(LK: n=9)の2群において、ワクチン接種時、最終ワクチン接種1カ月後および11月に採血を実施した。ワクチン接種母牛から出生し、初乳を摂取した子牛(n=7)にお

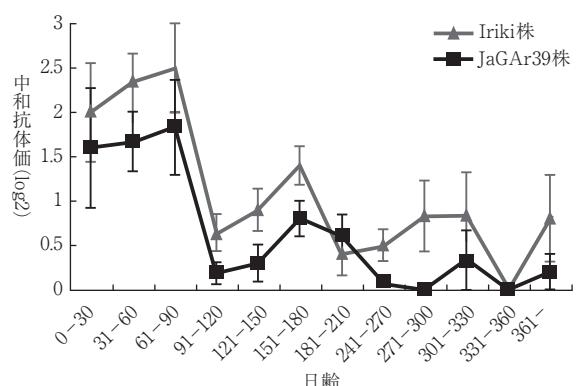


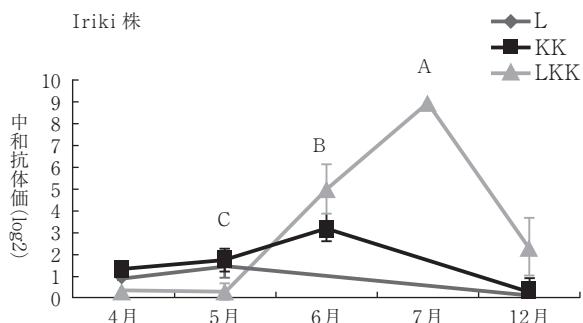
図3 ワクチン接種時期(3～5月)における日齢別のアカバネウイルスに対する中和抗体価平均値±標準誤差

いて、10月および12月に採血を実施した(図2)。

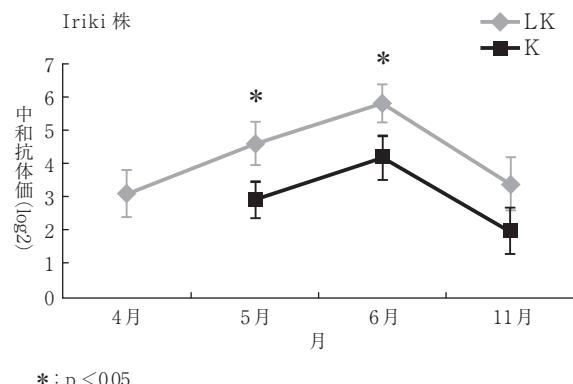
中和抗体価の測定

採血した血液は血清分離し、血清を冷凍保存した後、抗体価の測定に供した。

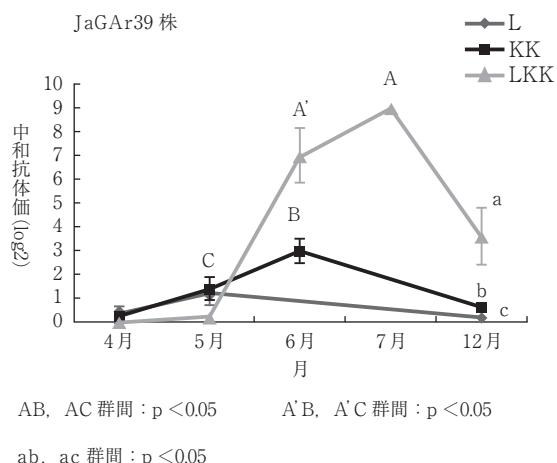
非効化した被検血清100 μ Lを細胞培養液で2～256倍まで2倍段階希釈後、200 TCID50/100 μ Lに調整したアカバネウイルス液(Iriki株またはJaGar39株)を100 μ L加えて37°Cで1時間反応させた。Hmlu-1細胞をシートさせた96穴マイクロプレ



AB, AC 群間 : $p < 0.05$



* : $p < 0.05$



AB, AC 群間 : $p < 0.05$

A', B', C' 群間 : $p < 0.05$

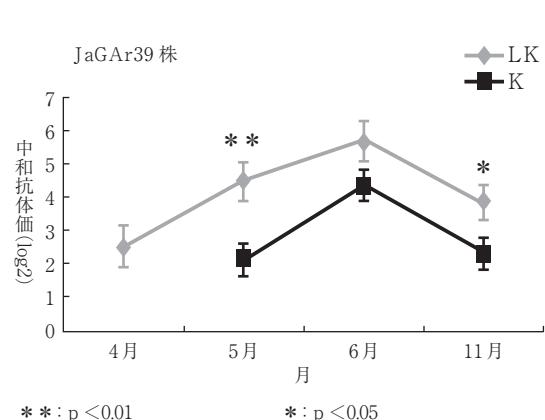
ab, ac 群間 : $p < 0.05$

図4 子牛および育成牛のワクチン接種によるアカバネウイルスIriki株およびJaGAr39株に対する中和抗体価の推移(平均値土標準誤差)

トに、反応後の各希釈血清とウイルス液の混合液を各希釈あたり2穴に50 μ Lずつ接種し、37°CのCO₂インキュベーターで1週間培養した。1穴以上に細胞変性効果(CPE)の阻止を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とした。抗体価の測定は(株)微生物化学研究所に依頼した。

統計解析

抗体価は2を底とする対数値に変換後、子牛の抗体価はSteel-Dwassのノンパラメトリック法による多重比較検定を、親牛の抗体価は、マン・ホイットニ検定を用い解析した(抗体価<2は2⁰、 ≥ 256 は2⁸とした)。p<0.05を有意な差とした。



** : $p < 0.01$ * : $p < 0.05$

図5 母牛のワクチン接種によるアカバネウイルスIriki株およびJaGAr39株に対する中和抗体価の推移(平均値土標準誤差)

成 績

ワクチン接種時期における抗体調査：

Iriki株およびJaGAr39株に対する抗体価は、両方とも91~120日齢で低下していた(図3)。

子牛および育成牛のワクチン接種によるアカバネウイルスに対する中和抗体価の推移：

JaGAr39株に対する抗体価において、LKワクチン接種1カ月後(A')とKKワクチン接種1カ月後(B)、Lワクチン接種1カ月後(C)の抗体価の間と、LKKワクチン接種1カ月後(A)とKKワクチン接種1カ月後(B)、Lワクチン接種1カ月後(C)の抗体価の間で有意な差が認められた($p < 0.05$)。また、

表1 子牛および育成牛のアカバネウイルス中和抗体陽性率

Iriki株

ワクチン接種群	4月	5月	6月	7月	12月
L	85.7%	71.4%	N T	N T	28.5%
KK	80%	90%	100%	N T	20%
LKK	33%	33%	100%	100%	100%

JaGAr39株

ワクチン接種群	4月	5月	6月	7月	12月
L	42.8%	71.4%	N T	N T	42.8%
KK	20%	70%	90%	N T	30%
LKK	0%	33%	100%	100%	100%

抗体価2倍以上を抗体陽性とした N T: 実施せず

表2 ワクチン未接種群のアカバネウイルスに対する中和抗体価

牛 No.	Iriki株		JaGAr39株	
	5月	12月	5月	12月
1	4	2	2	<2
2	4	<2	<2	<2
3	<2	<2	<2	<2
4	<2	<2	<2	<2
5	<2	<2	<2	<2

12月時点の抗体価において、LKKワクチン接種群(a)の抗体価とKKワクチン接種群(b), Lワクチン接種群(c)の抗体価の間で有意な差が認められた($p<0.05$)。

Iriki株に対する抗体価において、LKKワクチン接種1カ月後(A)とKKワクチン接種1カ月後(B), Lワクチン接種1カ月後(C)の抗体価の間で有意な差が認められた($p<0.05$) (図4)。

アカバネウイルス中和抗体陽性率は、12月時点でLKKワクチン接種群では、Iriki株およびJaGAr39株とともに100%, Lワクチン接種群およびKKワクチン接種群では20~42.8%であった(表1)。ワクチン未接種群で、抗体価の上昇は見られず、今回の試験中に野外感染は起きていないかった(表2)。

母牛のワクチン接種によるアカバネウイルスに対する中和抗体価の推移：

表3 母牛のアカバネウイルス中和抗体陽性率

Iriki株

ワクチン接種群	4月	5月	6月	11月
K	N T	90%	90%	60%
LK	89%	100%	100%	100%

JaGAr39株

ワクチン接種群	4月	5月	6月	11月
K	N T	80%	90%	90%
LK	89%	100%	100%	100%

抗体価2倍以上を抗体陽性とした

N T: 実施せず

JaGAr39株に対する抗体価において、LKワクチン接種群とKワクチン接種群の5月($p<0.01$)および11月($p<0.05$)の間で有意な差が認められた。

Iriki株に対する抗体価において、LKワクチン接種群とKワクチン接種群の5月および6月の抗体価の間で有意な差が認められた($p<0.05$) (図5)。

アカバネウイルス中和抗体陽性率は、11月時点でLKワクチン接種群はIriki株およびJaGAr39株とも100%，Kワクチン接種群はIriki株60%，JaGAr39株90%であった(表3)。Kワクチン接種母牛の2日齢子牛で10月に採血した抗体価は、8倍と32倍、168日齢の子牛で12月に採血した抗体価は、<2倍であった。LKワクチン接種母牛の6月、11月に採血した抗体価は4～≥256倍、その2日齢子牛で10月に採血した抗体価は≥256倍、87～121日齢子牛で12月採血した抗体価は<2～128倍であった(表4)。

考 察

アカバネ病は、ベクターの吸血により牛に感染したウイルスが、血流を介して標的臓器に運ばれ、疾患を引き起こす。これは胎子感染と生後感染とともに

同様の発病機序であり、ウイルス血症を予防できれば発症防御できることから、アカバネ病の予防には、ワクチン接種によって產生される血液中の中和抗体が重要である¹⁰⁾。従来のワクチンは、異常産予防に開発されており、ワクチン対象牛は妊娠牛もしくは妊娠予定牛であった⁸⁻¹⁰⁾。しかし、近年、問題となっている生後感染は、品種、性別に関係なくすべての牛に非化膿性脳脊髄炎を引き起こす可能性があるため³⁻⁷⁾、新たなワクチンプログラムを検討する必要があった。

西日本の乳用牛において90%の確率で移行抗体が消失する月齢は、4.3ヶ月齢と推定されている¹¹⁾。今回の試験においても、ワクチン接種時期である3～5月に子牛のアカバネウイルスIriki株およびJaGAr39株に対する抗体価は、91～120日齢で低下しており、この時期に移行抗体が消失していると考えられた。

アカバネウイルスは若齢牛に対して感受性が高く¹⁾、生後感染の発症月齢は、24ヶ月齢未満の牛での発生が多いことから³⁻⁷⁾、4ヶ月齢以降から24ヶ月齢未満の牛は、生後感染発症のリスクが高いと考えられる。

表4 ワクチン接種母牛の初乳摂取子牛におけるアカバネウイルスに対する中和抗体価

採血日	生年月日 (日齢)	母牛 ワクチン PG	抗体価 (母牛6月)		抗体価 (母牛11月)		抗体価 (子牛)	
			Iriki株	JaGAr39株	Iriki株	JaGAr39株	Iriki株	JaGAr39株
	10月14日 (2)	K	NT	NT	NT	NT	8	32
10月16日	10月14日 (2)	K	NT	NT	NT	NT	32	32
	10月14日 (2)	LK	128	NT	128	64	≥256	≥256
	9月16日 (87)	LK	32	32	16	16	2	4
12月12日	9月2日 (101)	LK	≥256	≥256	≥256	128	128	64
	8月1日 (121)	LK	64	16	4	4	<2	<2
	6月2日 (168)	K	NT	NT	NT	NT	<2	<2

NT：実施せず

えられた。従来であれば、吸血昆虫が活動する夏から秋の時期に受精する予定があり、移行抗体によってワクチンの効果が干渉されないように、移行抗体が完全に消失する6カ月齢以降の牛がワクチン接種対象であったが、生後感染に対応するためには4カ月齢以降に対象を拡げる必要があると考えられた。

発症した子牛および育成牛のワクチン接種歴は、ほとんどが未接種であったが⁵⁻⁷⁾、1症例は2回(5月と6月)Kワクチンを接種しているにも関わらず10月に発症した事例も報告されている⁶⁾。アカバネ病の予防には、ワクチン接種が有効であり、接種率

をあげることが重要である。子牛および育成牛のワクチン接種プログラムを検討したところ、Lワクチン接種群およびKKワクチン接種群では、抗体陽性率が12月時点で20~42.8%と低下しているが、LKKワクチン接種群では100%であった。LKKワクチン接種PGは、Lワクチン接種群およびKKワクチン接種プログラムより高い中和抗体価を得ることができ、血中の中和抗体を長く持続できることから、アカバネ病予防により有効であると考えられた。

母牛のワクチン接種プログラムでは、LKワクチン接種群がKワクチン接種群より高い中和抗体価を

得られた。抗体陽性率も、11月時点でLKワクチン接種群は、Iriki株およびJaGAr39株とも100%，Kワクチン接種群はIriki株60%，JaGAr39株90%であった。異常産の予防には、従来のワクチンプログラムで抗体陽性率が11月時点でも高いことから、有効であると思われた。ワクチン接種母牛の初乳摂取子牛の抗体価は、母牛の抗体価が高ければ、子牛の移行抗体の抗体価も高く、その持続期間も長かった。LKワクチン接種群は、異常産の予防だけでなく、Kワクチン接種群より高い移行抗体を子牛に付与できると考えられた。

国内で流行するアカバネウイルスは、遺伝子解析によってgenogroup I とgenogroup II の2つに大別されている¹²⁾。神経症状を示した牛の脳や脊髄から分離された株はgenogroup I に属していることがほとんどであり、Iriki株や2006年に九州地方、2011年の中国地方で生後感染を起こしたアカバネウイルスは、このグループに属する^{1-5,7,12)}。異常産発生に関連して牛胎子から分離された株はgenogroup II に属していることがほとんどであり、現行ワクチン株の原株であるOBE-1株や1959年に群馬で分離されたJaGAr39株はこのグループに属している^{1,12)}。

genogroup I とgenogroup II の株の間には抗原性に差があり、genogroup I の抗血清は、genogroup I の株と同等にgenogroup II の株も中和するが、genogroup II の抗血清は、genogroup II の株に比べてgenogroup I の株を中和する能力が低いことが示されている^{2,3,7)}。現在のワクチン株によって得られる抗体では、genogroup I に属する株を中和する能力が低い可能性が考えられた。しかしながら、今回の試験において、従来のワクチンによってJaGAr39株に対する抗体価を高く上げることができれば、Iriki株に対しても発症防御に有効な中和抗体価を得ることができた。

最後に、抗体検査にご協力頂いた(株)微生物化学研究所の諸先生に深謝いたします。

引用文献

- 1) 山川睦、筒井俊之：アカバネ病の最近の流行動向と対策、家畜診療、59(7)395-401(2012)
- 2) Miyazato S, Miura Y, Hase M et al. : Encephalitis of Cattle Caused by Iriki Isolate, a New Strain Belonging to Akabane Virus, Jpn Vet Sci, 51(1)128-136(1989)
- 3) Kono R, Hirata M, Kaji M et al. : Bovine Epizootic Encephalomyelitis Caused by Akabane Virus in Southern Japan, BMC Vet Res, 4 : 20 (2008)
- 4) 平田美樹、後藤俊介、池田省吾ら：鹿児島県で発生した若齢牛の非化膿性脳脊髄炎、日獣会誌、61, 771-776(2008)
- 5) 嶋田浩紀、下永満展、足立全ら：島根県で発生したアカバネウイルスの生後感染事例：2011年、臨床獣医、30(5)20-24(2012)
- 6) 守屋吉英、佐野通：管内のアカバネ病生後感染事例と対策、平成23年度岡山県家畜保健衛生所業績発表集録、36-38(2011)
- 7) 別所理恵、橋田明彦、菅原佳美：県内で多発したアカバネ病生後感染事例、平成23年度岡山県家畜保健衛生所業績発表集録、43-48(2011)
- 8) 明石博臣：アカバネ病ワクチン、動物用ワクチン-その理論と実際-(動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会編)、69-71、文永堂出版、東京、(2011)
- 9) 小林貴彦：アカバネ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症混合(アジュバント加)不活化ワクチン、動物用ワクチン-その理論と実際-(動物用ワクチン・バイオ医薬品研究会編)、72-74、文永堂出版、東京、(2011)
- 10) 黒木洋、稻葉右二、田中義男ら：牛の異常産ワクチン開発に関する研究、農林水産省農林水産技術会議事務局編、130, 1-118、農林水産技術会議事務局、東京(1980)

- 11) Tsutsui T, Yamamoto T, Hayama Y *et al.* : Duration of Maternally Derived Antibodies against Akabane Virus in Calves : Survival Analysis, *J Vet Med Sci*, 71(7)913-918(2009)
- 12) Kobayashi T, Yanase T, Yamakawa M *et al.* : Genetic Diversity and Reassortments among Akabane Virus Field Isolates, *Virus Res*, 130, 162-171(2007)

Kinetics of neutralizing antibody level in blood against Akabane virus JaGAr39 strain and Iriki strain in cattle inoculated with Akabane disease vaccine

Yasuaki Mito, Yoshitomo Uetsuki¹⁾

Maniwa Veterinary Clinic,

¹⁾Livestock Section, Okayama P.F.A.M.A.A.
(794-1 Egawa, Maniwa-shi, Okayama 717-0023)

SUMMARY

Akabane disease, which causes abnormal births in association with fetal infection, occurred in calves and growing cattle with the main complaint of encephalomyelitis due to postnatal infection in Kyushu in 2006. The disease was also rampant in the Chugoku region in 2011, raising a big concern. Therefore, a vaccine program (PG) for prevention of Akabane disease was considered. Blood neutralizing antibody level was analyzed in cows of various ages, from March to May, the period of regular vaccination. The level was found to decrease in 3-4 month cows. Neutralization tests with antigens the JaGAr39 strain (genogroup II) and Iriki strain (genogroup I) were conducted. Higher blood neutralizing antibody titers were attained in cows that had two-time inoculation with inactivated vaccine after single live vaccine (LKK group) and those that had single inoculation with inactivated vaccine after single live vaccine (LK group), compared to groups treated with conventional vaccination methods i.e., single inoculation with live vaccine (L), two-time inoculations with inactivated vaccine (KK), and single inoculation with inactivated vaccine (K).

【Keywords: Akabane disease, genogroup I, genogroup II, postnatal infection, vaccine program】

..... J Livestock Med, 61, 351-359 (2014)