

# Genogroup I に属するワクチン株を使用する アカバネ病不活化ワクチンの効果的な ワクチネーションプログラムの検討

水戸康明<sup>1)†</sup>富永由香<sup>1)</sup>高岡亜沙子<sup>2)</sup>

1) 岡山県農業共済組合連合会真庭家畜診療所 (〒717-0023 真庭市江川794-1)

2) 岡山県農業共済組合連合会生産獣医療支援センター (〒709-3111 岡山市北区建部町  
福渡1000-1)

(2017年2月22日受付・2017年6月15日受理)

## 要 約

アカバネ病の予防に効果的なワクチンプログラムを評価するために、genogroup I (G I) に属するアカバネウイルス (AKAV) を抗原としたワクチンを育成牛に接種し、AKAVのgenogroup II (G II) に属するJaGAR39株とG Iに属するKM-2/Br/06株に対する中和抗体価を測定した。試験には生ワクチン (TS-C2株：以下、L)、不活化ワクチン (KN-06株：以下、NK、OBE-1株：以下、K) の3種類を使用した。Lを1回接種後、NKを3回接種した群 (A群)、NKを3回接種した群 (B群)、Kを3回接種した群 (C群) の3群とワクチン未接種群を設定し、1群5頭にて試験を実施した。KM-2/Br/06株に対する中和抗体価は、A群とB群がC群と比べてワクチン接種後有意に高い値であった。NKを2回接種すると、ヌカカの活動する6~11月の間にG IとG IIに属するAKAVによるアカバネ病を予防できる中和抗体価が持続することを確認できた。アカバネ病の予防には、G IとG IIの両方をカバーできることから、臨床現場においてKワクチンよりNKワクチンの方がより有用と考えられた。

——キーワード：アカバネ病, genogroup, ワクチン。

-----日獣会誌 70, 584~588 (2017)

アカバネウイルス (AKAV) は、妊娠牛における胎子感染による異常産の原因として重要視されてきたが、近年、病型の違う生後感染による脳脊髄炎の原因としても問題となっている [1-4]。AKAVによって引き起こされるアカバネ病の発病機序は、AKAVを保有したウシヌカカなどの媒介節足動物 (ベクター) が感受性のある牛を吸血することにより、ウイルスが牛体内に侵入し、ウイルス血症となる。このウイルスが血流を介して、胎盤に到達し胎子に感染すると異常産、脳脊髄に感染すると非化膿性脳脊髄炎を引き起こす [1, 2]。AKAVは血流を介して標的臓器に感染するため、血中でAKAVを中和できる抗体が存在すれば、ウイルス血症を防ぐことができ、発病を予防することができることから、ワクチン接種によって血中の中和抗体を産生しておくことがアカバネ病予防には重要である [5]。

AKAVは、血清型は1つであるが、分子系統樹解析により4つの遺伝子型に分類されている。日本国内で分離された株はgenogroup I (G I) もしくはgenogroup II (G II) に分類されている [6]。従来、ワクチンに使用されていたOBE-1株、TS-C2株はG IIに、2014年に発売されたワクチンに使用されているKN-06株はG Iに属している。G Iに属する株とG IIに属する株は抗原性が異なり、G IIに属する株の抗血清は、同じG IIに属する株を中和する能力に比べるとG Iに属する株を中和する能力が低く、それに対してG Iに属する株の抗血清は、G Iに属する株とG IIに属する株を同様に中和でき、G Iの株は免疫交差性が広い [3]。また、G Iに属する株は生後感染牛から、G IIに属する株は異常産の胎子から分離されることがほとんどであると報告されている [1]。

† 連絡責任者 (現所属) : 水戸康明 (岡山県農業共済組合連合会 西部基幹家畜診療所)

〒719-0303 浅口郡里庄町浜中93-269

☎0865-64-4141 FAX 0865-64-2926

E-mail : mito\_y@ok-nosai.or.jp

表1 ワクチン接種による JaGAR39 株に対する中和抗体価の推移

試験区分	牛 No.	4月	5月	6月	7月	11月		12月		1月	
		0日目	28日目	56日目	85日目	208日目	223日目	238日目	253日目	273日目	281日目
A (GⅡ生+GⅠ不 活性化)		L	NK	NK		NK					
	1	<2	8	32	64	8	—	32	—	—	—
	2	<2	16	128	512	—	16	—	—	—	64
	3	<2	128	512	512	128	—	64	—	—	—
	4	<2	8	64	64	—	32	—	—	—	16
	5	<2	2	32	32	—	8	—	16	—	—
GM 値		1	12.12	84.44	128	21.12		32			
B (GⅠ不活化)		NK	NK			NK					
	6	<2	4	32	—	—	8	—	—	8	—
	7	2	16	128	—	—	32	—	128	—	—
	8	2	8	128	—	—	32	—	—	—	128
	9	2	16	64	—	—	64	—	—	—	128
	10	2	16	128	—	—	64	—	512	—	—
GM 値		1.74	10.55	84.44		32		97			
C (GⅡ不活化)		K	K			K					
	11	<2	2	64	—	—	4	—	—	—	16
	12	<2	16	64	—	—	16	—	128	—	—
	13	2	8	32	—	—	8	—	128	—	—
	14	2	4	16	—	—	16	—	128	—	—
	15	<2	2	32	—	—	8	—	32	—	—
GM 値		1.31	4.59	36.75		9.18		64			
ワクチン 未接種	16	<2	—	—	<2	—	<2	—	—	—	—
	17	<2	—	—	<2	—	<2	—	—	—	—
	18	2	—	—	2	—	<2	—	—	—	—
	19	2	—	—	2	—	<2	—	—	—	—
	20	2	—	—	2	—	<2	—	—	—	—
	GM 値		1.51		1.51		1				

—: not tested 初回ワクチン接種時を0日目とした。

今回、免疫交差性の広いGⅠに属するウイルスを抗原としたワクチネーションプログラムを、中和抗体を指標とした免疫応答によって評価したので概要を報告する。

### 材料及び方法

**供試牛:** ワクチン接種群 (A, B, C 群) で試験開始時 (2014年4月10日) 162~471日齢 (5.4~15.7カ月齢) のホルスタイン種15頭、ワクチン未接種群で446~473日齢 (14.9~15.7カ月齢) のジャージー種4頭及びジャージー種と黒毛和種の交雑種1頭を試験に用いた。供試牛はいずれもアカバネ病ワクチンの接種歴がない個体を使用した。

**ワクチン:** 生ワクチンとしてGⅡに属するAKAVの弱毒生ウイルス (TS-C2株) を抗原とするアカバネ病生ワクチン (アカバネ病生ウイルス予防液, Lot013, (一助)化学及血清療法研究所, 熊本: 以下, L) を用いた。不活化ワクチンとしてGⅡに属するAKAV (OBE-1株) を不活化抗原として含有するアカバネ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症混合 (アジュバンド加) 不

活化ワクチン (牛異常産AK・KB・AN混合不活化ワクチン“化血研”, Lot37A, (一助)化学及血清療法研究所, 熊本: 以下, K) とGⅠに属するAKAV (KN-06株) を不活化抗原として含有するアカバネ病・チュウザン病・アイノウイルス感染症混合 (アジュバンド加) 不活化ワクチン (牛異常産ACA混合不活化ワクチン“化血研”N, Lot001, (一助)化学及血清療法研究所, 熊本: 以下, NK) を用いた。

**ワクチンプログラムと血清の採取:** 初回ワクチン接種時 (2014年4月10日) を0日とし, Lを1回接種した後28日目 (5月8日), 56日目 (6月5日) にNKを接種し, その後208日目 (11月4日) もしくは223日目 (11月19日) にNKを追加接種した群 (A群), 初回 (4月10日) と初回接種後28日目 (5月8日) に2回NKを接種し, 223日目 (11月19日) にNKを追加接種した群 (B群), B群と同じスケジュールでKを接種した群 (C群) とワクチン未接種群に供試牛を区分した。A群はワクチン接種時及び85, 238, 253, 281日目, B群はワクチン接種時及び56, 253, 273, 281日目, C群

G I に属するアカバネ病不活化ワクチネーションプログラムの検討

表2 ワクチン接種による KM-2/Br/06 株に対する中和抗体価の推移

試験区分	牛 No.	4月	5月	6月	7月	11月		12月		1月	
		0日目	28日目	56日目	85日目	208日目	223日目	238日目	253日目	273日目	281日目
A (G II 生+G I 不 活性化)		L	NK	NK		NK					
	1	<2	<2	16	64	8	—	64	—	—	—
	2	<2	4	16	128	—	16	—	—	—	128
	3	<2	4	64	128	16	—	64	—	—	—
	4	<2	<2	8	64	—	8	—	—	—	32
5	<2	<2	8	8	—	2	—	8	—	—	
GM 値		1	1.74	16	55.71	8		42.22			
B (G I 不活化)		NK	NK			NK					
	6	<2	8	64	—	—	16	—	—	32	—
	7	<2	8	128	—	—	64	—	128	—	—
	8	<2	8	128	—	—	64	—	—	—	128
	9	<2	8	128	—	—	128	—	—	—	128
10	<2	8	512	—	—	32	—	≥ 1,024	—	—	
GM 値		1	8	147.03		48.5		168.89			
C (G II 不活化)		K	K			K					
	11	<2	<2	4	—	—	<2	—	—	—	4
	12	<2	<2	2	—	—	<2	—	4	—	—
	13	<2	<2	<2	—	—	<2	—	8	—	—
	14	<2	<2	2	—	—	<2	—	4	—	—
15	<2	<2	2	—	—	<2	—	4	—	—	
GM 値		1	1	2		1		4.59			
ワクチン 未接種	16	<2	—	—	<2	—	<2	—	—	—	—
	17	<2	—	—	<2	—	<2	—	—	—	—
	18	<2	—	—	<2	—	<2	—	—	—	—
	19	<2	—	—	<2	—	<2	—	—	—	—
	20	<2	—	—	<2	—	<2	—	—	—	—
GM 値		1			1	1					

— : not tested 初回ワクチン接種時を0日目とした。

A 群 (85 日目) と C 群 (56 日目) の間と 56 日目の BC 群間で有意差あり ( $P < 0.05$ )。



はワクチン接種時及び 56, 253, 281 日目, ワクチン未接種群は 0, 85, 223 日目に採血して, 血清を採取した (図)。

中和抗体価の測定: 細胞培養用 96 穴プレートを用い

て非働化済の血清 100 $\mu$ l を 2 倍段階希釈した後, 200 TCID<sub>50</sub> の指示ウイルス 100 $\mu$ l を混合し, 37 $^{\circ}$ C で 60 分間感作した。この混合液を, 前日に播種した HmLu-1 細胞に添加し, 35 $^{\circ}$ C で 7 日間培養し観察した。指示ウイルスの細胞変性効果を指標とし, 中和を示した血清の最大希釈の逆数を中和抗体価とした。指示ウイルスには, AKAV の G II に属する JaGAr39 株と G I に属する KM-2/Br/06 株を用いた [3]。

統計解析: A, B, C 群の各採血日の抗体価は 2 を底とする対数値に変換し ( $<2 = 2^0$ ,  $\geq 1,024 = 2^{10}$  とした), 多重比較検定の Steel-Dwass 法を用い解析した。  $P < 0.05$  を有意な差とした。

成 績

JaGAr39 株に対するワクチンの免疫効果 (表 1): 抗体価 (幾何平均値: GM 値) はワクチン接種前の A 群で  $<2$  倍 (1 倍), B 群で  $<2 \sim 2$  倍 (1.74 倍), C 群で  $<2 \sim 2$  倍 (1.31 倍) であったが, A 群の L-NK-NK 接種

後 (85 日目) は 32~512 倍 (128 倍), B 群の NK-NK 接種後 (56 日目) は 32~128 倍 (84.44 倍), C 群の K-K 接種後 (56 日目) は 16~64 倍 (36.75 倍) であった。追加接種後の抗体価 (GM 値) は, A 群 (238, 253, 281 日目) で 16~64 倍 (32 倍), B 群で (253, 273, 281 日目) は 8~512 倍 (97 倍), C 群で (253, 281 日目) は 16~128 倍 (64 倍) であった。ワクチン未接種群の抗体価は 0, 85, 223 日目で <2~2 倍であり, 抗体価の上昇は認められなかった。

**KM-2/Br/06 株に対するワクチンの免疫効果 (表 2) :** 抗体価 (GM 値) はワクチン接種前の A, B, C 群で <2 倍 (1 倍) であったが, A 群の L-NK-NK 接種後 (85 日目) は 8~128 倍 (55.71 倍), B 群の NK-NK 接種後 (56 日目) は 64~512 倍 (147.03 倍), C 群の K-K 接種後 (56 日目) は <2~4 倍 (2 倍) であった。A 群 (85 日目) と C 群 (56 日目) の間と 56 日目の BC 群間で有意差 ( $P < 0.05$ ) を認めた。追加ワクチン接種時の抗体価 (GM 値) は A 群 (208, 223 日目) で 2~16 倍 (8 倍), B 群 (223 日目) で 16~128 倍 (48.5 倍), C 群 (223 日目) で <2 倍 (1 倍) であった。追加接種後の抗体価は A 群 (238, 253, 281 日目) で 8~128 倍 (42.22 倍), B 群 (253, 273, 281 日目) で 32~ $\geq$  1024 倍 (168.89 倍), C 群 (253, 281 日目) で 4~8 倍 (4.59 倍) であった。ワクチン未接種群の抗体価は 0, 85, 223 日目で <2 倍であり, 抗体価の上昇は認められなかった。

## 考 察

今回の結果から, GII に属する従来のワクチン株 (OBE-1 株) を接種した群では, GI に属する株に対する抗体価が K を 2 回接種した後である 56 日目において, 他の群と比べてレベルが低く, 223 日目では 5 例中全例抗体陰性であった。筆者ら [7] は以前に実施した試験においても K を 1 カ月間隔で 2 回ワクチン接種した 7 カ月後には中和抗体陽性率が 20% まで減少したことを報告している。したがって, OBE-1 株ワクチン 2 回接種では GI に属する株に対する抗体を産生する能力が低く, GI に属する AKAV に対して十分な予防効果を発揮し得ないことが懸念された。

上記報告において, 筆者ら [7] は GII に属する従来

のワクチンを用いた LKK 法によって, GI に属する AKAV によるアカバネ病を予防できる中和抗体価 (2 倍以上) [5] が 6~12 月の間持続することを報告した。しかしながら, この方法は 3 回接種となるため労働力と経費がかかること, GII に属する株を抗原としているため GI に属する株に対する抗体誘導が低いことが問題点であった。今回, GI に属する KN-06 株 2 回接種でスカカがおもに活動する 6~11 月の間に国内で流行する GI と GII に属する AKAV に対してアカバネ病を予防できる中和抗体価が持続することが確認できた。これらの結果から GI に属する株を抗原とする不活化ワクチンの 2 回接種が本病予防には有効であり, ワクチン接種回数の削減は牛のストレスや経費, 労働力の軽減にもつながると考えられた。

稿を終えるに当たり本試験にご協力, ご助言いただいた(一財)化学及血清療法研究所の先生方に深謝する。

## 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, 395-401 (2012)
- [2] 梁瀬 徹: 一最新の家畜疾病情報 (VI) — アカバネ病, 日獣会誌, 68, 674-676 (2015)
- [3] Kono R, Hirata M, Kaji M, Goto Y, Ikeda S, Yanase T, Kato T, Tanaka S, Tsutsui T, Imada T, Yamakawa M: 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, 濱田忠子, 有川恵理, 藏園光輝, 梁瀬 徹, 山川 睦: 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] 清水武彦, 安藤敬太郎, 稲葉右二, 田中義男, 黒木 洋, 橋口裕治, 池田澄雄, 三浦康男, 秦野好博, 白石忠昭: 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)
- [6] Kobayashi T, Yanase T, Yamakawa M, Kato T, Yoshida K, Tsuda T: Genetic diversity and reassortments among Akabane virus field isolates, Virus Res, 130, 162-171 (2007)
- [7] 水戸康明, 植月義友: 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, 家畜診療, 61, 351-359 (2014)

Evaluation of Effectiveness of Vaccination Program of Inactivated  
Vaccine against Akabane Virus belonging to Genogroup I

Yasuaki MITO<sup>1)†</sup>, Yuka TOMINAGA<sup>1)</sup> and Asako TAKAOKA<sup>2)</sup>

1) *Maniwa Livestock Clinic, Okayama Prefectural Agricultural Mutual Aid Association, 794-1 Egawa, Maniwa, 717-0023, Japan*

2) *Production Veterinary Medical Support Center, Okayama Prefectural Agricultural Mutual Aid Association, 1000-1 Fukuwatari, Takebe-cho, Kita-ku, Okayama, 709-3111, Japan*

SUMMARY

In order to evaluate the effectiveness of the vaccination program for the prevention of Akabane disease, the three commercially available vaccines including genogroup I (GI) or genogroup II (GII) Akabane virus antigen were injected in heifers, and a neutralization test was carried out against JaGAR39 strain (GII) and KM-2/Br/06 strain (GI). The three vaccines were live vaccine "L" (TS-C2 strain), inactivated vaccine "NK" (KN-06 strain) and inactivated vaccine "K" (OBE-1 strain). Twenty heifers were divided into four groups (A, B, C and unvaccinated control : 5 per group). Group A was injected with NK vaccine three times after one injection of L vaccine. Group B was injected with NK vaccine three times. Group C was injected with K vaccine three times. After the vaccination, the antibody titer against KM-2/Br/06 strain in Group A and B was significantly higher than that in group C. After a second injection with NK vaccine, the neutralizing antibody titer remained for six months or more, not only against KM-2/Br/06 strain, but also against JaGAR39 strain. It was concluded that NK vaccine had more practical benefit than K vaccine for the prevention of Akabane disease in the field, because of its ability to neutralize both GI and GII strains. — Key words : Akabane disease, genogroup, vaccine.

† *Correspondence to (Present address) : Yasuaki MITO (Seibu Core Veterinary Clinic, Okayama Prefectural Agricultural Mutual Aid Association)*

*93-269 Hamanaka, Satoshicho-cho, Asakuchi-gun, 719-0303, Japan*

*TEL 0865-64-4141 FAX 0865-64-2926 E-mail : mito\_y@ok-nosai.or.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 584 ~ 588 (2017)*