

Two-step vaccine program の牛ウイルス性 下痢ウイルス2型に対する有用性評価

加藤 肇^{1)†} 江村有希子¹⁾ 澤向陽一¹⁾ 佐藤洋平¹⁾ 西松栄光¹⁾
佐藤礼一郎²⁾ 大西 守³⁾ 田島誉士⁴⁾

- 1) 根室地区農業共済組合西春別支所 (〒088-2576 野付郡別海町西春別81-2)
- 2) 麻布大学獣医学部獣医学科 (〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-1)
- 3) 根室地区農業共済組合検査室 (〒086-1105 標津郡中標津町西5条南11-5)
- 4) 北海道大学大学院獣医学研究科付属動物病院 (〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目)

(2010年7月22日受付・2010年12月6日受理)

要 約

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 1およびBVDV2の不活化ワクチンを接種後にBVDV1の生ワクチンを免疫増強に用いるTwo-step vaccine programのBVDV2に対する免疫効果について検討した。北海道根室地区の農場で出生し、十分に初乳を与えられた子牛15頭を5頭ずつA, BおよびCの3群に分けて試験に用いた。BVDV1とBVDV2の不活化ワクチンを1回接種するA群, Two-step vaccine programのB群およびBVDV1の生ワクチンを1回接種するC群に区分して、中和抗体価を測定した。その結果、BVDV2に対する抗体価が、B群はAおよびC群に比べてTwo-step vaccine program実施後有意に高かった。同方法はBVDV2に対する感染防御効果を向上させることが期待された。

——キーワード：牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 2, Two-step vaccine program.

----- 日獣会誌 64, 453~456 (2011)

わが国で市販されている牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 弱毒生ワクチンは1回の接種により長期間の免疫能を獲得し得ることはすでに報告した [1]。しかし、わが国においてはBVDV2を含む弱毒生ワクチンが市販されていない。そのためBVDV2に対する十分な抗体を生ワクチン接種により獲得することは困難である [1]。いっぽう、ドイツにおいては初回にBVDV1の不活化ワクチンを接種し、4週間後にBVDV1を含む生ワクチンを接種し免疫増強する方法 (Two-step vaccine program) が考案され実用化されている [2, 3]。この方法によりBVDV1とBVDV2の両方に対する十分な免疫能を獲得するとされている [2, 3]。そこで、わが国で市販されているBVDV1とBVDV2を含む不活化ワクチンとBVDV1を含む生ワクチンを用いてTwo-step vaccine programのBVDV2に対する抗体応答を調べた。

材 料 お よ び 方 法

試験農場の概要：北海道根室地区の一酪農場において

試験を実施した。本農場はフリーストール式牛舎で、育成牛舎 (4~15カ月齢牛を飼養) および成牛舎 (搾乳牛と妊娠後期の育成牛および乾乳牛を飼養) の2棟があり、それぞれ独立していた。妊娠した育成牛は同牧場内の放牧地で飼養された。試験開始日の2009年11月30日時点において成牛311頭、育成牛91頭、子牛51頭 (本農場内のカーフハッチにて飼養) を飼養していた。過去8年間に、外部からの牛の導入はなく、試験期間中も外部導入はなかった。さらに過去8年間に本農場の牛すべてにおいて3カ月以上の牛にはBVDV1の弱毒生ウイルスを含有する5種混合生ワクチン (株微生物化学研究所, 京都) の接種歴があった。

供試牛：試験実施農場で出生し、ワクチンの接種歴がないホルスタイン種の子牛15頭を試験に用いた。試験開始時の供試牛の月齢は1~3カ月齢であり、出生後4時間以内に初乳4lをストマックチューブで強制投与され、発育や一般状態が良好な牛を選定した。以後、本農場内のカーフハッチにおいて個別に飼養され、4カ月齢

† 連絡責任者：加藤 肇 (根室地区農業共済組合西春別支所)

〒088-2576 野付郡別海町西春別81-2

☎0153-77-2301 FAX 0153-77-3577

E-mail : nosaikatohajime@isis.ocn.ne.jp

以降は育成牛舎に移動された。調査期間中、本農場以外の牛と供試牛が接触する機会はなかった。

ワクチン：生ワクチンとして、BVDV1の弱毒生ウイルス (No. 12-43株) を含む牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢～粘膜病・牛パラインフルエンザ混合生ワクチン (IBR・BVD-MD・PI生ワクチン, Lot67, (株)微生物化学研究所, 京都, 以下「生ワクチン」) を用いた。不活化ワクチンとして、BVDV1 (Nose/T株) とBVDV2 (KZ-cp/T株) の不活化抗原を含有する牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢～粘膜病2価・牛パラインフルエンザ・牛RSウイルス感染症・牛アデノウイルス感染症混合ワクチン (キャトルウイン-6 (Lot15, (株)微生物化学研究所, 京都, 以下「不活化ワクチン」) を用いた。

ワクチン接種プログラムと血清の採取：不活化ワクチンを1回接種するA群 (試験開始時3カ月齢, 不活化ワクチン接種時3カ月齢), 不活化ワクチンを接種し, 初回接種から1カ月後に生ワクチンを接種するB群 (試験開始時2カ月齢, 不活化ワクチン接種時2カ月齢, 生ワクチン接種時3カ月齢), 生ワクチンを1回接種するC群 (試験開始時1カ月齢, 生ワクチン接種時2カ月齢) に供試牛を区分した。ワクチン接種前に全頭から血清を採取した。さらに同日にA群とB群に不活化ワクチンを接種した。B群とC群には試験開始後31日目に生ワクチンを接種した。AおよびB群に不活化ワクチンを接種した日を0日とし, 接種後31, 54, 93, 124および268日目に採血して, 血清を採取した。抗体価測定までの期間, 血清は凍結保存 (-20℃以下) した。

中和抗体価の測定：すべての血清を採取後, まとめて中和抗体価を測定した。細胞培養用96穴のマイクロプレートを用いて, 非働化した被検血清50 μ lを2倍階段希釈した後, 200TCID₅₀/100 μ lの中和試験用ウイルス50 μ lと混合し, 37℃で60分間感作した。この混合液に牛精巢継代細胞浮遊液100 μ lを添加した後, 37℃で7日間静置培養し, 観察した。中和用ウイルスとして, BVDV1はNose株, BVDV2はKZ-91-cp株を用い, 細胞変性効果の抑制を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とした。

ウイルス学的検査：Kozasaら [4] に準じてバルク乳からのBVDV遺伝子検出を2006年, 2007年および2009年の3回実施した。

統計解析：A, BおよびC群の3群間における各採血日の抗体価は2を底とする対数値に変換後にTukeyの多重比較検定法を用い解析した。P<0.05を有意な差とした。

成 績

BVDV1に対するワクチンの免疫効果：BVDV1に対する抗体価を表1に示した。すなわちB群のTwo-step

表1 ワクチン接種によるBVDV1とBVDV2に対する中和抗体価の推移

試験区分	牛No	検査区分	0日目	31日目	54日目	93日目	124日目	268日目
試験群A	1	BVDV1	64	32	8	2	<2	<2
		BVDV2	128	8	8	<2	<2	<2
	2	BVDV1	4	2	<2	<2	<2	<2
		BVDV2	32	2	4	<2	4	2
	3	BVDV1	16	16	8	<2	<2	<2
		BVDV2	4	4	<2	<2	<2	<2
	4	BVDV1	64	32	16	4	<2	<2
		BVDV2	512	32	8	2	2	<2
	5	BVDV1	64	16	16	2	2	<2
		BVDV2	128	16	8	2	<2	<2
試験群B	6	BVDV1	32	16	64	64	256	512
		BVDV2	16	4	64	128	32	32
	7	BVDV1	32	8	32	512	512	512
		BVDV2	64	4	64	128	32	32
	8	BVDV1	32	8	32	1024	512	2048
		BVDV2	16	2	512	4096	2048	512
	9	BVDV1	64	16	16	128	256	512
		BVDV2	128	16	8	4	8	16
	10	BVDV1	128	16	16	128	512	1024
		BVDV2	64	16	32	128	16	32
試験群C	11	BVDV1	256	128	32	128	2048	512
		BVDV2	1024	64	32	4	16	8
	12	BVDV1	64	16	32	64	512	256
		BVDV2	8	2	<2	<2	8	16
	13	BVDV1	64	16	4	128	256	512
		BVDV2	4	2	<2	2	<2	16
	14	BVDV1	128	64	64	64	512	128
		BVDV2	128	4	<2	2	32	2
	15	BVDV1	512	256	64	512	2048	128
		BVDV2	256	32	16	8	64	16

* : AおよびB群における不活化ワクチン接種日を0日目とした。

BVDV1は0日目のAC群間, 93日目のABとAC群間, 124日目のABとAC群間および268日目のAB, AC, BC群間で有意差あり (P<0.05)。

BVDV2は54日目のABとBC群間, 93日目のAB, BC群間, 124日目のAB群間および268日目のAB, AC, BC群間で有意差あり (P<0.05)。

vaccine program実施前の抗体価は32～128倍で, 実施後の抗体価は16～2048倍であった。0日目のAC群間 (P<0.05), 93日目のABとAC群間 (P<0.01), 124日目のABとAC群間 (P<0.01) および268日目のAB, AC (P<0.01) およびBC群間 (P<0.05) で有意差を認めた。

BVDV2に対するワクチンの免疫効果：BVDV2に対する抗体価を表1に示した。すなわちB群のTwo-step vaccine program実施前の抗体価は16～128倍で, 実施後の抗体価は4～4096倍であった。54日目のABとBC群間 (P<0.05), 93日目のAB, BC群間 (P<0.01), 124日目のAB群間 (P<0.05) および268日目のAB (P<0.01), ACおよびBC群間 (P<0.05) で有意差を認めた。

ウイルス学的検査の結果：試験実施前の4年間で3回

実施した本農場のバルク乳検査では、いずれの検査においてもBVDV遺伝子は検出されなかった。

考 察

調査期間前に約1年間隔で3回実施したバルク乳検査においてBVDV遺伝子は検出されず、当農場の搾乳牛群内に持続感染牛がいた可能性はきわめて低かった[4]。さらに8年前から調査期間中に本農場への外部からの牛の導入はなく、本農場の牛と外部の牛が接触する機会がなかった。また、本農場は3カ月齢以上のすべての牛にBVDV1を含む生ワクチンの接種歴があり、供試牛は十分な量の初乳が給与されていた。以上のことから、ワクチン接種前のA、BおよびC群におけるBVDV1とBVDV2に対する抗体は初乳を摂取したことによって得た移行抗体と考えられた。

Two-step vaccine programを実施した後のB群における、試験開始後54日目のBVDV1とBVDV2に対する抗体価は、生ワクチン接種前である31日目の抗体価より上昇する傾向が認められた。C群では、54日目の抗体価はBVDV1とBVDV2で同じく生ワクチン接種前である31日目の抗体価と比較して下降する傾向が認められた。さらに268日目におけるBVDV1とBVDV2に対する抗体価はB群がC群に比較して有意に高かった。このことから、Two-step vaccine programは抗体が存在する条件下においても生ワクチン接種後のワクチンブレイクを起こすことなく抗体を獲得させることが可能なことが示唆された。

Oguzogluら[3]はTwo-step vaccine programを用いることによって、抗体価はBVDV1の抗体価(64~4096倍)に比較して低いもののBVDV2に対する交差免疫(抗体価4~256倍)が高まるとしている。Freyら[5]はTwo-step vaccine programによりBVDV2に対する子宮内感染の防御効果が向上することを感染試験により証明している。本研究においてBVDV2に対する抗体価がB群はA群に対して54日目以後すべての採血時において、C群に対して54日目、93日目、268日目で有意に高かった。以上のことから、わが国で市販されているワクチンにおいてもTwo-step vaccine programはBVDV1を含む生ワクチン1回接種と比較してBVDV2に対する抗体応答能が高まることが確認され、BVDV2の感染予防効果が期待できる点で有用な手段と考えられた。

抗原の交差性についてCorteseら[6]はBVDV1を含む生ワクチンを接種することで遺伝子型や抗原型の異なる11種類のウイルス株に対する交差免疫を得るとしている。Oguzogluら[3]の接種方法は初回感作用ワクチンとしてBVDV1の不活化ワクチンを用いるのに対して、今回の研究では初回感作用としてBVDV1とBVDV2の不活化ワクチンを用いる点で異なる。さらに、

本試験において供試牛No. 8はTwo-step vaccine program後にBVDV2に対する高い抗体価(512~4096倍)を示した。以上から、BVDV2に対する交差免疫のみではなく、初回に感作させたBVDV2の不活化ワクチンにより、より活性化された記憶TおよびB細胞の働きで免疫増強効果が得られている可能性が考えられた。しかし、BVDVに対する抗体産生の機序を解明することはできなかった。BVDVの子宮内感染防御に重要な役割を果たす免疫システムの解明にはT細胞活性を調査するより詳細な研究[7]が必須と考えられた。

弱毒生ワクチン接種後に接種牛体内で増殖したワクチン株が排出され、未接種牛におけるワクチン株の感染の危険性が懸念されている[1, 2]。Moennigら[2]はBVDVの不活化ワクチンを先に感作させることで生ワクチン接種後のワクチン株によるウイルス血症を抑制し、ワクチン株の排泄による同居牛への感染を防止できる可能性を報告している。以上より、Two-step vaccine programは、生ワクチンの安全性の観点からも有用な方法と考えられた。

引 用 文 献

- [1] 加藤 肇, 一條祐一, 江村有希子, 佐藤礼一郎, 高久英徳, 大西 守, 田島啓士: 牛ウイルス性下痢ウイルスワクチンによる中和抗体価維持期間に関する調査, 日獣会誌, 63, 33-37 (2010)
- [2] Moennig V, Eicken K, Flebbe U, Frey HR, Grummer B, Haas L, Greiser-Wilke I, Liess B: Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD), *Prev Vet Med*, 72, 109-114 (2005)
- [3] Oguzoglu TC, Frey HR, Eicken K, Grummer B, Liess B, Moennig V: Kinetics and persistence of neutralizing antibodies against bovine viral diarrhoea virus-1 and -2 and border disease virus after two step vaccination of cattle, *Dtsch Tierarztl Wochenschr*, 110, 14-17 (2003)
- [4] Kozasa T, Tajima M, Yasutomi Y, Sano K, Ohashi K, Onuma M: Relationship of bovine viral diarrhoea virus persistent infection to incidence of diseases on dairy farms based on bulk tank milk test by RT-PCR, *Vet Microbiol*, 106, 41-47 (2005)
- [5] Frey HR, Eicken K, Grummer B, Kenklies S, Oguzoglu TC, Moennig V: Foetal protection against bovine virus diarrhoea virus after two-step vaccination, *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 49, 489-493 (2002)
- [6] Cortese VS, Whittaker R, Ellis J, Ridpath JF, Bolin SR: Specificity and duration of neutralizing antibodies induced in healthy cattle after administration of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhoea, *Am J Vet Res*, 59, 848-850 (1998)
- [7] Endsley JJ, Roth JA, Ridpath J, Neill J: Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV, *Biologicals*, 31, 123-125 (2003)

Effect of Immunization with Two-Step Vaccine Program
for Bovine Viral Diarrhea Virus 2

Hajime KATO*[†], Yukiko EMURA, Yoichi SAWAMUKAI, Yohei SATO, Eimitsu NISHIMATSU,
Reiichiro SATO, Mamoru OONISHI and Motoshi TAJIMA

* *Nishishunbetsu Branch, Nemuro Agricultural Mutual Aid Association, Nishishunbetsu 81-2,
Bekkai-cho, Notuke-gun, 088-2576, Japan*

SUMMARY

We investigated the effects of immunization against bovine viral diarrhoea virus (BVDV)-2 with a two-step vaccination program using attenuated live BVDV1 after immunizing by inactivated BVDV1 and BVDV2 vaccine. Fifteen calves that had taken adequate colostrum from a dairy farm in the Nemuro District of Hokkaido, Japan, were used. The calves were divided into three groups: Group A was inoculated with one dose of inactivated BVDV1 and BVDV2 vaccine. Group B was inoculated with inactivated BVDV1 and BVDV2 vaccine at first and then inoculated with a live vaccine containing BVDV1 (a two-step vaccine program). Group C was inoculated with only one dose of live BVDV1 vaccine. The antibody titer against BVDV2 in group B was significantly higher than that in group A and C after inoculation with the live BVDV1 vaccine. This result suggested that the two-step vaccine program using in this study is useful for enhancing antibody titers against BVDV2.

— Key words : bovine viral diarrhoea virus (BVDV)-2, two-step vaccine program.

[†] *Correspondence to : Hajime KATO (Nishishunbetsu Branch, Nemuro Agricultural Mutual Aid Association)*

Nishishunbetsu 81-2, Bekkai-cho, Notuke-gun, 088-2576, Japan

TEL 0153-77-2301 FAX 0153-77-3577 E-mail : nosaikatohajime@isis.ocn.ne.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 453 ~ 456 (2011)