

## 牛呼吸器病 3 種混合生ワクチン

(財)日本生物科学研究所

桑原博義

家畜や愛玩動物にはウイルス性、細菌性、寄生虫性等の多くの疾病が発生している。このうちには、種特有のもの、種を越えて発生するものなど多様である。これらの疾病に対しては生ワクチン又は不活化ワクチンの開発が行われ、安全性と有効性が認められたものは実用化され、防疫に貢献している。しかしながら、個体について見ると、同時期に多くのワクチンを用いなければならない場面もあり、畜産経営上の合理化、省力化あるいは動物愛護の面から混合ワクチンの開発が行われてきている。

ここでは牛のウイルス性呼吸器病について、その疾病の概略を述べた後、牛呼吸器病3種混合生ワクチン開発の経緯とその成績について説明する。

なお、本混合生ワクチンは、農林水産省家畜衛生試験場、財団法人化学及血清療法研究所、共立商事株式会社、日生研株式会社及び株式会社微生物化学研究所の共同により開発された。

### 1 疾病の概要

#### 1-1 牛伝染性鼻気管炎 (IBR)

本病は昭和45年に輸入牛の検疫中に発病牛が発見されたのが我が国での最初の症例で、それ以後日本の各地で発生が見られている。

病原体はヘルペスウイルス科のアルファヘルペスウイルス亜科に属するウシヘルペスウイルス1型で、牛にのみ病原性を示す。伝播は発症牛の鼻汁、流涙あるいは性生殖器の分泌物に含まれる大量のウイルスの経口又は経鼻感染により成立する。本病はウイルスの感染部位により様々な症状を示すが、主に4~5日間の40~42°の持続性発熱、それに伴って白血球の減少、元氣、食欲の減退又は廃絶、流涙、結膜角膜炎、鼻漏、咳、喘鳴、呼吸困難などの呼吸器症状を示し、妊娠牛では流産を惹起する。死亡率は成牛で1%以内であるが、子牛では15%に達する。

#### 1-2 牛ウイルス性下痢・粘膜病 (BVD-MD)

本病は、Togaウイルス科のPestivirus属に属するBVD-MDウイルスの感染により起きる。本ウイルスは、昭和32年に大森らにより牛の胎児から培養細胞を用いて我が国で初めて分離された。本ウイルスにはCPEを示す株と示さない株があり、CPEを示さないNon-CPE株の感染では症状は軽いが、CPE株の感染による牛の死亡率は高い。症状は41~42°の発熱とウイルス血症、これに伴う白血球の減少、元氣・食欲の減退又は廃絶などで、体重

減少による産肉の低下などの損害を与える。また、抗体陰性の妊娠牛が感染を受けると、容易に垂直感染が成立し、胎児の死亡、流産、小脳形成不全、盲目症、免疫寛容、虚弱子牛の娩出などが現れる。

### 1-3 牛パラインフルエンザウイルス3型感染症 (PI-3)

本病は、牛パラインフルエンザウイルス3型の感染により起こる。本ウイルスは、Paramyxovirus科のParamyxovirus属に属す。本ウイルスには1~5の血清型が存在する。感染経路は接触又は飛沫による経鼻感染が主である。本ウイルスは、昭和33年に稲葉らが、呼吸器症状を起こした牛の鼻汁から牛の腎臓細胞を用いて分離したのが、我が国での最初の報告である。本ウイルスに感染した牛は、一過性の40°前後の発熱、白血球減少症を示し、元気・食欲の減退、流涙、水様性から膿性の鼻汁の排泄、発咳、肺胞音の異常等の呼吸器症状を示す。本ウイルスの単独感染の場合、症状は軽度であるが、本ウイルスの感染が引き金となり、アデノウイルス7型などの呼吸器感染ウイルスや細菌等との混合感染を起こし、慢性かつ難治性の細菌性疾患へと移行するため、発育障害、乳房炎による産乳低下など酪農経営における経済的損失は大きい。

## 2 各単味生ワクチンの開発

### 2-1 IBR生ワクチン

稲葉らは野外の発病牛の鼻粘膜ぬぐい液から牛精巢培養細胞で分離したIBRウイルスNo. 758株を、入手の容易な豚精巢(ST)細胞を用いて30°の低温で培養し、継代を繰り返したところ、牛に対する病原性は消失し、しかも強毒ウイルスによる攻撃に対して強い免疫賦与能のある弱毒ウイルス株の作出に成功した。本弱毒株はNo. 758-43株と命名され、生ワクチン製造用株として用いられている。

### 2-2 BVD-MD生ワクチン

大森らは牛の胎児から分離したウイルスを牛由来の培養細胞を用いて継代し、弱毒化を行ったが、CPEは示さず、牛に対する病原性も低下しなかった。本ウイルスは豚コレラウイルスと免疫学的に共通抗原を持っており、豚コレラウイルスと同様にST培養細胞で良く増殖することからEND法が可能となり、ウイルス価の定量や中和抗体価の測定が可能となった。一方、本ウイルスがST培養細胞で良く増殖することから、ST培養細胞を用いて34°で継代を続けたところ、17代目ですでに牛に対する病原性が低下し、しかも注射した牛は強毒ウイルスの攻撃に対して完全に抵抗するようになった。そこで、さらに継代を続け、43代のウイルスを弱毒BVD-MDウイルスNo. 12-43株と命名し、生ワクチン製造用株として用いられている。

### 2-3 PI-3生ワクチン

大森らは野外から分離したウイルスの培養細胞での増殖性を比較したところ、本ウイルスは牛由来腎や精巣細胞および豚由来腎などの培養細胞でCPEを伴って増殖すること、ニワトリ胎児（CE）培養細胞では良く増殖するが、CPEは伴わないことを認めた。そこで、本ウイルスをCE培養細胞に接種後、30°で238日間培養して得たウイルスの性状を調べたところ、牛に対する病原性は消失し、中和抗体やHI抗体が上昇することが明らかになり、本株をBN-CE株と命名し、生ワクチン製造用株として用いられている。

### 3 牛呼吸器病3種混合生ワクチンの開発

前述のように、IBR、BVD-MD、PI-3の各単味生ワクチンはそれぞれ実用化され、野外で応用されるようになった。しかしながら、牛の呼吸器病は2種又は3種のウイルスが同時に流行することが多い為、これら3種類のワクチンをほぼ同時期に注射する必要があること、これらのワクチンをそれぞれ単独で使用することは多くの労力を要し、野外におけるこれら疾病の防疫上障害となることから、省力化、効率化を目的として、家畜衛生試験場と製造4所社により混合生ワクチンの開発が昭和43年より開始された。

まず、これら3種類のウイルスに対する抗体調査を全国的に行ったところ、抗体保有率はIBRで16%、BVD-MDで28%、PI-3で44.8%であり、全国的にこれらのウイルスの侵襲が認められ、混合生ワクチンの開発の必要性が確認された。

そこで、前述の各単味生ワクチン製造用株を用い、混合生ワクチンを試作し、各単味生ワクチンの規格及び検査方法を参考にして3種混合生ワクチンの規格及び検査方法を設定し、これに従って試作生ワクチンの自家試験を行ったところ、いずれも設定した規格及び検査方法に適合することが確認された。

これらの試作ワクチンを用い、各種の試験を行なって試作ワクチンの性状を調べた。

#### 1) 安定性に関する試験

試作ワクチンを2~5°、22°及び37°で保存し、ウイルス含有量を測定したところ、2~5°では15カ月間、22°で6日間、37°で3日間保存しても、そのウイルス含有量は製造直後と差は認められず、安定であった。

#### 2) 安全性に関する試験

試作ワクチンを100~200Kgの子牛の筋肉内に1、5、10及び100頭分ずつを注射し、14日間臨床症状を観察した結果、試験牛は全く異常を示さなかった。また、試作ワクチンをモルモット及びマウスに注射しても全く異常は

認められず、安全性が確認された。

### 3) 有効性に関する試験

試作ワクチンの1頭分ずつを100～200Kgの子牛の筋肉内に注射し、4週間後の抗体価を測定した結果、IBR中和抗体価は2～16倍、BVD-MD中和抗体価は16～1,024倍、PI-3HI抗体価は8～160倍を示し、有効性が確認された。

### 4) 免疫持続に関する試験

試作ワクチンの1頭分ずつを注射された牛の各ウイルスに対する抗体価を経時的に測定したところ、IBR及びPI-3ウイルスに対する抗体価はおよそ12カ月間持続し、BVD-MDウイルスに対しては15カ月間後においても高い中和抗体価を持続しており、1年間是有効な免疫を賦与し得ることが確認された。

### 5) 感染防御に関する試験

試作ワクチンを注射した牛を強毒IBRウイルス、強毒BVD-MDウイルス強毒PI-3ウイルスで攻撃して臨床症状を観察した。その結果、いずれのウイルスに対してもワクチン注射牛は異常を示さなかった。一方、ワクチン無接種の対照牛は強毒ウイルスの攻撃により特異的な症状を示した。

以上の結果から、試作ワクチンは、強毒ウイルスの感染を防御することが確認された。

### 6) 用量応答に関する試験

試作ワクチンのウイルス量を希釈して調整し、各希釈ワクチンを牛に注射して抗体価を測定したところ、IBRでは $10^{4.0}$  TCID<sub>50</sub>、BVD-MDでは $10^{1.3}$  TCID<sub>50</sub>、PI-3では $10^{3.8}$  TCID<sub>50</sub>以上のウイルス量で有効な抗体を産生し得ることが確認された。

### 7) 臨床試験

全国の4,260頭の子牛又は成牛に試作ワクチンを注射したところ、臨床症状には全く異常は認められず、1カ月後ではIBR中和抗体価は94.0%、BVD-MD中和抗体価は98.6%、PI-3HI抗体価は94.2%の陽性率を示していた。また、試作ワクチンを妊娠牛及び泌乳牛に1頭分ずつ注射したところ、臨床症状に異常は全く認められず、妊娠牛では正常に分娩し、泌乳牛では泌乳量の低下は認められなかった。

以上の成績から、試作牛3種混合生ワクチンは野外においても安全であり、有効であることが確認され、現在実際応用されている。