犬レプトスピラ病不活化ワクチンの有効性

播谷久美子* 石黒信良* 佐川輝男* 五島精知* 谷山光司*

(昭和 63 年 4 月 15 日受理)

Efficacy of Canine Leptospira Bacterin

KUMIKO HARITANI, SHINRYO ISHIGURO, TERUO SAGAWA, MASATOMO GOTHO and
KOJI TANIYAMA (Central Laboratories, Kyoritu Shoji Co., Ltd., Ibaraki 300-12)

SUMMARY

The dogs were vaccinated with different dosages of Canine Leptospira Bacterin (1 dose, 1/10 dose, and 1/100 dose) and then challenged to evaluate the efficacy of the Bacterin. *Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* and *Leptospira interrogans* serovar *canicola* were used as the challenge strains. Challenge inoculum was prepared from the livers of Leptospira-infected hamsters. Similar experiments were made on hamsters and guinea pigs, and their suitability as experimental animals was evaluated.

As a result, dogs vaccinated with 1 and 1/10 dosages of the bacterin did not show any symptoms when they were challenged. Whereas, the dogs with 1/100 doses developed some symptoms. All unvaccinated dogs died 4 to 6 days after the challenge.

In the trials on experimental animals, hamsters showed a similar result to dogs. The hamsters vaccinated with the bacterin showed higher sensitivity to the challenge and had a higher agglutination titer than did the guinea pigs. Therefore, it is considered that hamsters are more suitable as an experimental animal for Canine Leptospira Bacterin as compared with guinea pigs.

要 約

犬レプトスピラ病不活化ワクチン(米国フロム社製)の、規定量(犬1頭分)、1/10量および1/100量をイヌに接種後、*Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* (Li)あるいは*Leptospira interrogans* serovar *canicola* (Lc)の強毒株で攻撃し、ワクチンの防御効果を検討した。また、ハムスターとモルモットを用いイヌと同様の試験を行い、その結果をイヌのそれと比較した。

ワクチンの規定量ならびに1/10量を接種したイヌでは、いずれのレプトスピラ強毒株で攻撃した場合にも発症防御が完全に成立したが、1/100量では若干の発症例が認められた。いっぽう、ワクチン未接種の対照群では、攻撃後4~6日に全例が死亡した。

ハムスターとモルモットを比較した結果、後者よりも前者の方が、ワクチン接種後の凝集価および攻撃株に対する感受性がいずれも高く、イヌに近い傾向を示した。このことから、ハムスターは犬レプトスピラ病不活化ワクチンの検定用動物として適していると思われた。

レプトスピラ病は、近年、その発生が非常に少なくなったが、いぜんとして重要な人畜共通感染症である。わが国では、野ネズミの菌保有率は戦前から現在まで変わっていないことが指摘されており⁶⁾、野外においてイヌがレプトスピラ病に感染する危険性は高いものと思われる。

イヌに対するレプトスピラワクチンの接種はごく一般

に行われているが、国内では犬レプトスピラ病不活化ワクチンの有効性について検討した報告はきわめて少ない²⁾。いっぽう、欧米諸国ではいくつかの報告^{3,5)}があり、いずれもワクチンの有効性を認めている。しかしながら、これらの報告ではワクチン未接種の対照犬が攻撃感染の後に重篤な症状を示しておらず、ワクチンの有効性を十分に検討したとは思われない。

そこで、今回、犬レプトスピラ病不活化ワクチンの有効性を、対照犬がすべて発症死亡する攻撃条件下で検討

* 共立商事株式会社中央研究所(茨城県稲敷郡茎崎町高見原2-9-22)

した。また、わが国ではワクチンの製造ロットごとにその有効性を確認することが義務づけられているため、頻回の試験が必要となる。そこで、イヌに変わる実験小動物として、ハムスターとモルモットについても同様に検討し、イヌのそれと比較した。

1. 材料と方法

1) 供試動物

イヌ：自家繁殖の2〜3カ月齢の雑種犬22頭を用いた。

ハムスター：体重50〜90gの市販のゴールデンハムスター110匹を用いた。

モルモット：体重200〜250gの市販のハートレー系モルモット40匹を用いた。

全供試動物は臨床的に健康で、*Leptospira interrogans* serovar *icterohaemorrhagiae* (Li) および *Leptospira interrogans* serovar *canicola* (Lc) に対する凝集価は2以下であった。

2) 供試ワクチン

Li および Lc の混合ワクチンである、犬レプトスピラ病不活化ワクチン（FROM社製、ロット17278D）を用いた。Li および Lc とも、不活化前の菌数は規定量のワクチン1ml（1頭分）当たり 10^8 個であった。

3) 攻撃株

FROM社から分与を受けた11403株 (Li) および11203株 (Lc) を用いた。いずれも、毒力を保持するためにコルトフ培地3代ごとにハムスターの腹腔におよそ 10^8 個ずつ接種し、3〜4日後に定型的に発症して斃死直前の心血をふたたびコルトフ培地に接種しているもので、培地経代3代以内の菌液1ml（およそ 10^8 個）はハムスターに対し、 $1 \sim 5 \times 10^3$ MLDの毒力を有する。攻撃材料は定型的に発症して、斃死直前のハムスターの肝臓をリン酸緩衝食塩液 (PBS, pH 7.2) で20%乳剤としたものを2,000rpmで5分間遠心し、その上清（菌数はおよそ 10^9 個/ml）を用いた。

4) ワクチン注射

無希釈、1/10希釈および1/100希釈の3種類の濃度のワクチンを注射用試料とした。なお、ワクチンの希釈はPBSで行った。各試料につき、イヌ6頭、ハムスター30匹およびモルモット10匹を用い、1mlを頸部皮下に注射した。残りのイヌ4頭、ハムスター20匹およびモルモット10匹はワクチン未接種対照とした。

5) 攻撃

ワクチン注射後21日に供試動物を2群に分け、一方はLiで、他方はLcで攻撃した。攻撃は、前述したそれぞれの攻撃材料を、イヌ1頭当たり10ml、モルモット1匹当たり1ml、ハムスターでは乳剤をコルトフ培地で1代経代して1匹当たり 10^8 個ずつ、いずれも腹腔内に注射した。

6) 攻撃後の観察・測定

イヌ：攻撃後14日間にわたり毎日臨床観察を行い、1日1回午前中に体温を測定した。また、攻撃後0, 3, 5, 7および9日に全例採血し、それぞれ血液学・生化学検査（血小板、GOT, GPT, BUN, 総ビリルビン）ならびに、LiとLcに対する血清凝集価測定を行った。凝集価の測定は、攻撃後11日の血清についても行った。

血小板数測定は直接法で、その他の生化学検査はケムテックシステムで行った。凝集価の測定はSchüffner-Mochtarの顕微鏡的凝集反応によって行い¹⁾、菌の凝集が対照（菌液+PBS）と比べて、50%かそれ以上を示す血清の最高希釈の逆数を凝集価とした。なお、菌液は、Li凝集用としてRGA株を、Lc凝集用としてHond Utrecht IV株を用いた。

死亡例は死亡時に、生残例は攻撃後14日に全例ペントバルビタールで麻酔後全放血し、病理学的検査に供した。また、剖検時に尿を採材し、BMテスト紙（ベーリンガー・マンハイム社製）で一般性状を調べるとともに、レプトスピラ菌の排泄の有無を暗視野顕微鏡下での直接鏡検により検査した。また、菌が観察できなかった場合は、尿をハムスターに接種して検査した。すなわち、各イヌの尿を0.2mlずつ、各サンプル当たり1匹のLi, Lcに対する凝集が2以下のハムスターの腹腔内に注射した。その後、16日間ハムスターを観察し、死亡例については病理解剖学的ならびに臓器内の血液からのレプトスピラ菌の回収によって菌感染の有無を検査した。生残例については、全採血して血清凝集価を測定した。そして、ハムスターがレプトスピラ菌感染により死亡したと確認された場合、または凝集抗体が検出された場合を、レプトスピラ菌の尿中排泄陽性とした。

ハムスターおよびモルモット：攻撃後14日間毎日臨床観察を行い、死亡例については病理組織学的検査を行った。また、攻撃時および攻撃後14日（生残例）に採血を行い、血清凝集価を測定した。

2. 成績

1) イヌにおける成績

攻撃後の臨床観察結果および体温の推移を図1-1および図1-2に示した。攻撃後の観察期間中、ワクチン群で、規定量および1/10量を注射したイヌにおいては临床上まったく異常は認められなかった。1/100量のワクチン接種群においては、Li攻撃の2頭 (No. 14, 15) およびLc攻撃の1頭 (No. 16) で、攻撃後3日から7日にかけて発熱、元氣消失、食欲減退、嘔吐および血便などが観察され、このうちの1頭 (No. 15) は4日で死亡した。これに対し、対照群においては、攻撃後2日から3日にかけて元氣消失および食欲減退が観察され、さらに、食欲廃絶、嘔吐、血便および全身衰弱が顕著となり、5日ま

— : 異常なし V : 嘔吐 A : 食欲減退 B : 血便 P : 元気消失 D : 死亡

図 1-1 Li 攻撃犬における攻撃後の体温の推移と一般臨床所見

— : 異常なし V : 嘔吐 A : 食欲減退 B : 血便 P : 元気消失 D : 死亡

図 1-2 Lc 攻撃犬における攻撃後の体温の推移と一般臨床所見

でに全頭が死亡した。なお、Li で攻撃したイヌと Lc で攻撃したイヌの間に、症状の違いは認められなかった。

攻撃後、臨床的に異常の認められなかったイヌにおける血液学・生化学検査結果は、すべて正常範囲内であった。いっぽう、発症したイヌにおいては、攻撃後3日と5日の血小板の減少、GOT、GPT および総ビリルビン

の上昇、BUN の低下または上昇などの異常所見が認められた(表1)。とくに血小板の低下は死亡したイヌにのみ認められた。

攻撃後の血清凝集価の推移を表2に示した。ワクチン群のワクチン注射後21日(攻撃時)の凝集価は、イヌにより多少ばらつきはあったが、注射したワクチンが高

濃度なほど高くなる傾向が認められた。攻撃後、凝集価はワクチン接種群全例で上昇した。なかでも、規定量のワクチンを接種したイヌで凝集価は最も早く上昇し、攻撃後3日でいずれも64以上を示した。これに対し、対照群では、3頭 (No. 20, 21, 22) において、死亡前に若干の上昇が認められたのみであった。

剖検においては、ワクチン接種群では、発症耐過犬も含めて、生残したイヌ全例で異常は認められず、病理組織学的検査においても、わずかに腎臓の細胞反応と脾臓での充血を認めたのみであった。死亡した1頭 (No. 15) では、皮下の点状出血、腹腔内血液貯溜、腎臓および肝臓の腫大、その他、各臓器の出血がみられ、とくに腸管内にはソーセージ状に凝固した血液が貯留していた。病理組織学的検査においては、各臓器の急性充血および出血がとくに高度で、付属リンパ節の赤血球吸収が認められ、また、リンパ組織の萎縮、肝臓内皮細胞の活性化が観察された。対照群では、4例全例で No. 15 と同様の病理変化が認められた。出血の程度は、対照群の方が No. 15 よりもやや高度であった。Li で攻撃したイヌと Lc で攻撃したイヌの病理学的所見に、顕著な差は認められなかった。

剖検時の尿検査で、ワクチン群では発症した3頭を除いて異常は認められなかった。発症した3頭のうち死亡を免れた2頭においては、蛋白、ウロビリノーゲン、ビリルビンが検出され、死亡した No. 15 は加えて潜血反応も陽性を示した。対照群においては、全例で蛋白、ウロビリノーゲン、ビリルビンが検出され、潜血反応も陽性を示した。また、対照群の全例、死亡した No. 15 および発症耐過した No. 14 におけるレプトスピラの尿中排泄は陽性であったが、それ以外のイヌではいずれも陰性であった。

2) ハムスターおよびモルモットにおける成績ならびにイヌとの比較

イヌ、ハムスターおよびモルモットにおける攻撃時と終了時の凝集価および生残率を表3に示した。死亡した

表1 発症犬の血液学・生化学検査結果

イヌ No.	検査項目	ワクチン 希釈	攻撃 菌株	攻 撃 後 日 数				
				0	3	5	7	9
14	血小板 (10^4 個/mm ³)	1/100	Li	27	22	25	41	43
15			Li	31	4*	死亡		
16			Lc	53	49	18	30	35
19		対照	Li	33	5*	死亡		
20			Li	43	5*	0*	死亡	
21			Lc	33	10*	死亡		
22			Lc	42	15	死亡		
14	GOT (U/l)	1/100	Li	30	23	64	40	31
15			Li	49	48	死亡		
16			Lc	26	42	43	46	33
19		対照	Li	21	32	死亡		
20			Li	24	120*	271*	死亡	
21			Lc	18	191*	死亡		
22			Lc	30	55	死亡		
14	GPT (U/l)	1/100	Li	29	94*	141*	61	36
15			Li	37	34	死亡		
16			Lc	22	45	22	36	22
19		対照	Li	29	28	死亡		
20			Li	33	159*	77	死亡	
21			Lc	20	109*	死亡		
22			Lc	18	82	死亡		
14	BUN (mg/dl)	1/100	Li	12.8	4.7*	14.9	18.4	17.9
15			Li	9.8	8.5	死亡		
16			Lc	8.5	19.2	30.5*	15.7	12.0
19		対照	Li	7.9	2.7*	死亡		
20			Li	6.3	7.6	85.7*	死亡	
21			Lc	5.8	29.3	死亡		
22			Lc	6.3	17.9	死亡		
14	総ビリルビン (mg/100ml)	1/100	Li	0.2	0.3	0.3	0.8	0.2
15			Li	0.2	0.5	死亡		
16			Lc	0.3	2.6*	0.3	0.8	0.3
19		対照	Li	0.1	0.5	死亡		
20			Li	0.3	0.2	4.4*	死亡	
21			Lc	0.1	1.1	死亡		
22			Lc	0.1	2.3	死亡		

注) *: 正常範囲外

動物は、病理組織学的検査においてすべてレプトスピラ菌感染によって死亡したことが確認された。

ワクチン注射後21日 (攻撃時) における凝集価は、いずれの動物においても、接種したワクチン量が増加するにつれて高くなる傾向を示したが、幾何平均をみると、いずれのワクチン量でも Li においてはハムスターが、Lc においてはイヌが最も高い値を示した。これらに対し、モルモットにおいては Li, Lc とともに低い傾向であった。また、ハムスターにおいては Li の凝集価が Lc と比べ、少なくとも2倍程度高い値を示した。攻撃後14日の凝集価は、Li および Lc とともにいずれの動物においても、著しい上昇を示した。

生残率から、ハムスターにおいては、イヌと同様ワク

チン注射により Li および Lc に対する防御が成立したことが確認された。いっぽう、モルモットにおいては、Li に対する防御効果は若干認められたが、Lc に対する防御効果は不明であった。

3. 考 察

イヌにおけるレプトスピラ菌自然感染例の多くは不顕性感染である⁴⁾。そのためか否かは不明であるが、BROUGHTON³⁾ や HUH⁵⁾ らの行った攻撃試験でも、ワクチン未接種の対照犬のすべてが発症死亡したわけではない。このような試験では、ワクチンの有効性が確認されたとはいえない。

今回の試験では、生後 2~3 カ月の若齢犬を大量の菌（ハムスターから直接採材した菌を 1 頭当たり 10^{10} 個）で攻撃し、対照犬をすべて発症死亡させる条件下でワクチンの効果を検討することができた。規定量か、またはその 1/10 量の犬レプトスピラ病不活化ワクチン（米国フロム社製）を注射した犬は、上記の条件の攻撃に対して、臨床的、血液学・生化学的、また病理学的に異常が認められず、攻撃後 14 日の尿からもレプトスピラ菌は分離されなかった。これにより、この犬レプトスピラ病不活化ワクチンの有効性が確認された。いっぽう、規定量の 1/100 量のワクチン接種群では 6 頭中 3 頭の発症が確認され、うち 1 頭が死亡した。しかしながら、対照群が全例死亡したことを考慮すると、1/100 量のワクチン接種でもある程度の防御効果があったと思われる。

ワクチン群の攻撃時の凝集価は、1/10 量の 1 頭 (No. 10) および 1/100 量の 2 頭 (No. 15, No. 16) で 2 以下であった。このうち、No. 15 と No. 16 は攻撃後発症したが、No. 10 はまったく異常が認められなかった。このことは、有効な免疫量を注射すれば、凝集価が上昇しなくても発症を完全に防御しうることを示唆している。

BROUGHTON³⁾ らは攻撃後の凝集価について、ワクチン群、対照群ともに上昇を認めたが、上昇の幅は対照群の方が大きいと述べている。今回の試験では、対照群が短時間で死亡したため比較できなかったが、ワクチン群の凝集価は全例で上昇した。凝集価の最高値は、個々の犬ごとにばらつきが認められ、あらかじめ接種してあった

表 2 イヌにおける攻撃後の血清凝集価*の推移

イヌ No.	ワクチン 希 釈	攻撃 菌株	攻 撃 後 日 数						
			0	3	5	7	9	11	14
1	1	Li	{ 16	64	128	512	512	1,024	512
2			{ 33	64	128	128	256	1,024	512
3			{ 32	128	128	512	1,024	1,024	512
4		Lc	{ 32	128	512	1,024	512	512	128
5			{ 32	64	256	512	256	512	512
6			{ 64	128	512	1,024	256	256	128
7	1/10	Li	{ 2	8	256	512	1,024	1,024	1,024
8			{ 8	16	64	256	512	256	256
9			{ 8	8	128	128	512	256	128
10		Lc	{ <2	2	32	64	256	256	256
11			{ 8	8	16	32	64	128	64
12			{ 8	16	16	32	64	128	64
13	1/100	Li	{ 4	8	64	256	2,048	1,024	512
14			{ 4	8	256	1,024	4,096	4,096	2,048
15			{ <2	<2	死亡				
16		Lc	{ <2	<2	256	256	4,096	4,096	4,096
17			{ 4	2	16	16	256	256	256
18			{ 2	8	128	128	512	512	256
19	対照	Li	{ <2	<2	死亡				
20			{ <2	<2	16	死亡			
21		Lc	{ <2	8	死亡				
22			{ <2	2	死亡				

注) *: 攻撃菌に対する血清凝集価

表 3 イヌ、ハムスターおよびモルモットの攻撃時と攻撃後 14 日の凝集価ならびに生存率

ワクチン希釈	攻撃菌株	攻撃時凝集価* (GM)			終了時凝集価* (GM)			生 残 率 (%)		
		イヌ	ハムスター	モルモット	イヌ	ハムスター	モルモット	イヌ	ハムスター	モルモット
1	Li	25.4	31.3	8.0	512.0	256.0	64.0	100	93	100
	Lc	40.3	12.4	13.9	203.1	181.0	97.0	100	86	100
1/10	Li	5.0	14.9	3.1	322.5	83.0	128.0	100	100	100
	Lc	4.0	4.3	2.8	101.5	174.0	168.0	100	80	100
1/100	Li	2.5	7.4	<2	1,024.0	128.0	147.0	67	73	100
	Lc	2.0	1.7	2.4	812.4	128.0	147.0	100	9	100
対照	Li	<2	<2	<2	NT	NT	128.0	0	0	60
	Lc	<2	<2	<2	NT	NT	114.0	0	0	100

注) *: 攻撃菌に対する凝集価

ワクチンの量との間に明かな関係はなかった。しかし、攻撃後3日の時点での凝集価は、あらかじめ接種したワクチン量が多いほど高い傾向にあった。このような攻撃後の早期な免疫二次応答が、侵入したレプトスピラ菌の増殖を抑えて発症を防御すると推察される。

ワクチンの検定用実験小動物として、ハムスターとモルモットを比較した場合、ワクチン注射後の凝集価の上昇、攻撃株に対する感受性、ともにハムスターが高い傾向を示した。攻撃株に対する感受性については、実験に用いた攻撃株が、いずれもハムスターで継代されていることに関係すると思われるが、対照動物が、イヌとハムスターではすべて死亡したのに対し、モルモットではLiで攻撃した5頭中の2頭のみが死亡したことを考えると、ハムスターはモルモットに比べ、少なくともLcに対する感受性は遺伝的に高いと思われる。

ワクチンの有効性をみると、ハムスターでは、イヌと同様に、LiとLcの両者に対してワクチンの効果が認められた。通常、犬レプトスピラ病不活化ワクチンに含まれる抗原はLiとLcである。このことから、今後、犬レプトスピラ病不活化ワクチンの研究ならびに検定に、犬

のモデル動物としてハムスターを用いることができるものとする。

稿を終るに当たり、凝集価測定用 RGA 株および Hond Utrecht IV 株の分与と、血清凝集価測定法のご指導を賜った国立予防衛生研究所の森 守主任研究官、ならびに論文の取りまとめにご指導を賜った共立商事株式会社中央研究所長の吉田 勲博士に深謝いたします。

引用文献

- 1) 有光佳子：臨床検査，23，11，臨時増刊，1169～1171 (1979)。
- 2) 馬場貞義，松田春吉，寺田友次，ほか：メディアサークル，16，7，44～49 (1971)。
- 3) BROUGHTON, E. S. and SCARNELL, J.: Vet. Rec., 117, 307～311 (1985)。
- 4) GOURLEY, I. N. G.: 小動物臨床の実際，ROBERT, W. K. 編，加藤 元，岩村博夫訳，第1版，768～770，医歯薬出版，東京 (1973)。
- 5) HUHN, R. G., BALDWIN, C. D. and CARDELLA, M. A.: J. Vet. Res., 36, 71～74 (1975)。
- 6) 森 守：第23回レプトスピラ・シンポジウム講演要旨，14 (1986)。

連結式

PAT. No. 533555号
PAT. No. 1327708号
PAT. No. 1398228号

入院ケージ オプション

リモコンヒーター組込
排気口装置取付

前面排水溝付

奥行 710

奥行 720

18-8ステンレス 1.2%板使用(ステンレス板は厚い程丈夫で音が静かになります)

巾は下段で600mm×セット一覧表 :は仕切板

連結式寸法

600
770・900
600
600
770

排水溝付寸法

600
850
500
550
750

千葉商事株式会社 〒113 東京都文京区向丘2-22-2
☎03-821-3765(代表)

全国運賃無料
奇数月広告