国内の狂犬病組織培養不活化ワクチン接種犬の 抗体保有状況とワクチン接種後の抗体応答

安田博美^{1)†} 山中盛正¹⁾ 江副伸介²⁾ 大森崇司³⁾ 草薙公一³⁾
西條加須江⁴⁾ 瀧川義康⁴⁾ 天野健一⁵⁾

1) (株)微生物化学研究所 (〒611-0041 宇治市横島町24-16)

2) (財)化学及血清療法研究所 (〒860-8568 熊本市大窪1-6-1)

3) 日生研(株) (〒198-0024 青梅市新町9-2221-1)

4) (社)北里研究所生物製剤研究所 (〒364-0026 北本市荒井6-111)

5) 松研薬品工業(株) (〒184-0003 小金井市緑町5-19-21)

(2006年11月30日受付・2007年8月3日受理)

要 約

不活化狂犬病ワクチン接種犬における抗体応答を中和試験によって検討した。試験には2005年に東京都、静岡県、岐阜県、京都府、宮崎県および熊本県で飼育されていたワクチン接種犬100頭と未接種犬25頭の合計125頭のペア血清を用いた。過去1年間にワクチン接種歴のある犬100頭のうち90頭が有効抗体価25倍以上の中和抗体を保有しており、8倍以上の抗体価を有する個体の幾何平均抗体価 (geometric mean titers; GMT) は251倍であった。このような犬にワクチンを追加接種すると、1カ月後には全頭の抗体価が25倍以上に上昇し、GMTは750倍に達した。いっぽう、今までに接種経験のない25頭にワクチンを接種すると、23頭が中和抗体を産生したが、2頭からは抗体が検出されなかった。ワクチン接種1カ月後の抗体価は8倍未満から256倍に分布し、GMTは43倍であった。これらの成績により、ワクチン接種により確実な免疫を付与し、それを維持するためには、現行の接種プログラムである年1回の追加接種が重要であると考えられる。——キーワード：狂犬病不活化ワクチン、中和抗体価、血清学的調査、ワクチン接種。

----- 日獣会誌 61, 311～314 (2008)

狂犬病は狂犬病ウイルスに感染発病した犬、猫、コウモリなどに噛まれることにより感染し、いったん発症すると致死率は、ほぼ100%に達する人と動物の共通感染症である。わが国は1957年以来、国内での狂犬病感染事例が報告されていない、世界でもまれな狂犬病が根絶された国である。しかし、アジアの近隣諸国をはじめ世界では依然として流行が繰り返されており、海外からわが国へ狂犬病がいつ侵入しても不思議ではない状況が続いている。わが国が狂犬病の清浄国であることを続けるためには、厳重な輸出入検疫とともに飼育犬の管理を徹底し、万一狂犬病が侵入した場合にはこれを速やかにしかも混乱なく排除するために狂犬病ワクチンの接種率の向上、維持が求められる。また、2004年11月に施行された「犬等の輸出入検疫規則」(検疫規則)には、輸入が許可される犬の狂犬病ウイルスに対する中和抗体価が規定されている。国内で行われている狂犬病ウイルスに

対する抗体測定方法は中和試験法 [1-3] が一般的であるが、検疫規則では国際獣疫事務局 (OIE) が作成した狂犬病診断基準に記載されている蛍光抗体ウイルス中和試験 (FAVN) 法 [4] や迅速蛍光フォーカス抑制試験 (RFFIT) 法 [5] を用いることが定められ、犬等の輸入条件の一つとして、国際単位0.5IU/ml以上の証明書が必要と規定されている。

われわれは本検疫規則に定められた接種方法による国内の動物用狂犬病組織培養不活化ワクチン (国内ワクチン) の実験室内犬における有効性および安全性を調べた。国内ワクチンの抗原力価はOIEの基準を満たしていること、FAVN法で測定された抗体価の0.5IU/mlはワクチン製造用RC・HL株を用いた中和抗体価で25倍に相当すること、本規則に定められた2回接種法は犬において有効かつ安全であることを確認した [6]。

海外での調査報告においても、飼育犬に十分な中和抗

† 連絡責任者：安田博美 (株)微生物化学研究所)

〒611-0041 宇治市横島町24-16 ☎0774-22-4518 FAX 0774-24-1407 E-mail: rabies@kyotobiken.co.jp

表1 国内ワクチン接種飼育犬における抗体保有状況

ワクチン接種歴	検査頭数	中和抗体価の範囲	中和抗体 ¹⁾ 価の幾何平均値	有効中和抗体保有率 ²⁾ (%)
無	25	<8		0.0
有	100	<8~4,096	251	90.0

1) 8倍以上の抗体価を有するサンプルの幾何平均値

2) 中和抗体価25倍以上を有効中和抗体価とした。

表2 ワクチン接種後の中和抗体価の推移

ワクチン接種歴	検査頭数	幾何平均値 ¹⁾ (範囲)	有効中和抗体 ²⁾ 保有率 (%)
無	25	43 (<8~256)	72.0
有	100	750 (64~4,096)	100.0

1) 8倍以上の抗体価を有するサンプルの幾何平均値

2) 中和抗体価25倍以上を有効中和抗体価とした。

体を持続させるためには、ワクチンの追加接種が必要であることが述べられている [7-9]。わが国では国内ワクチンについての野外犬での報告があるが、一時点での成績が主体であり [1, 10]、狂犬病ワクチン歴が明らかな飼育犬について追跡して抗体調査を実施し、ワクチンの有効性を確認した報告は少ない。今回は、動物病院の協力を得て、ワクチン接種履歴等の明らかな個体について狂犬病ワクチン接種前後に収集したペア血清を用いて狂犬病ウイルス中和抗体価の変動について解析し、ワクチンの有効性やプログラムについて検討を加えた。

材料および方法

供試犬血清：2005年4月～9月に東京都、静岡県、岐阜県、京都府、宮崎県および熊本県下の動物病院へ狂犬病ワクチン接種を希望して来院した個体を対象として、ワクチン接種前（初回接種時点または前回接種後約1年経過時点）と接種後約1カ月目に採血して得た125頭のペア血清を供試した。これらの個体については、同時にワクチン履歴、年齢、体重、犬種、性別、飼育形態等を聞き取り調査した。

供試狂犬病組織培養不活化ワクチン：国内製造5所社（株）微生物化学研究所、（財）化学及血清療法研究所、日生研（株）、（社）北里研究所および松研薬品工業（株）で製造した狂犬病ワクチンを用いた。

中和抗体価測定方法：測定を実施した国内製造5所社とも、中和用ウイルスには国内ワクチン製造用株であるRC・HL株 [11] を用いた。供試血清は、50μlの2倍階段希釈を4ウェルずつ作り、これに200TCID₅₀/50μlの中和用ウイルス液を50μlずつ滴下混合し、37℃で90分間感作後、HmLu-1細胞またはCEF（鶏胎児線維芽）細胞に接種して培養した。中和抗体価は、培養細胞の半

図1 ワクチン接種回数と接種前後の中和抗体価分布

1) 今回のワクチン接種1か月後

2) 8倍以上の抗体価を有するサンプルの中和抗体価の幾何平均値

数以上のウェルにCPE（細胞変性効果）または酵素抗体法 [12] による染色の阻止を認めた血清の最高希釈倍数で示した。

成績

国内飼育犬における抗体保有状況：供試した125頭の犬の内訳は、狂犬病ワクチン接種歴のない犬が25頭、ある犬が100頭であった（表1）。接種歴のない犬25頭の中和抗体価はすべて8倍未満であった。接種歴のある犬のワクチン接種前の中和抗体価は<8～4,096倍の範囲にあり、8倍以上の抗体価を有するサンプルの幾何平均抗体価（geometric mean titers; GMT）は251倍で、中和抗体価25倍以上の有効中和抗体価を保有する個体の割合は90.0%であった。

ワクチン接種後の中和抗体価の推移：接種歴のない犬にワクチンを接種した場合は、1か月後の中和抗体価は<8～256倍の範囲で推移し、8倍以上の抗体価を有するサンプルのGMTは43倍であった（表2）。有効中和抗体価を保有する個体の割合は、25頭中18頭の72.0%であった。接種歴のある犬ではワクチン追加接種後1か月目で中和抗体価は64～4,096倍の範囲でGMT 750倍となり、すべての個体で25倍以上の有効中和抗体価に上昇した。

ワクチン接種回数と接種前後の中和抗体価分布：初回接種犬での接種後の中和抗体価については、25頭中で2頭（8.0%）が8倍未満、5頭（20.0%）が8倍以上25倍未満、18頭が25倍以上の有効中和抗体価を保有していた（図1）。ワクチン接種歴1回の犬12頭のうち、ワクチン接種前の中和抗体価で8倍未満が2頭（16.7%）、8倍以上25倍未満が4頭（33.3%）、25倍以上が6頭（50.0%）であった。過去に2回以上接種を受けている犬88頭のうち、接種前の中和抗体価が25倍以上の個体は84頭（95.5%）であった。ワクチン接種歴のある犬への追加接種後により全頭（100頭）の中和抗体価が25倍以上に上昇した。

考 察

狂犬病の予防に重要な血中抗体に関して、室内感染実験による狂犬病発症防御に有効な抗体価としては国内で実施している中和試験では10倍 [3]、RFFIT法では約0.1IU/mlと報告されている [2, 13]。われわれは検疫規則に基準として定められている国際単位抗体価0.5IU/mlに相当する中和抗体価25倍以上を有効な中和抗体価と設定した [6]。今回は、狂犬病ワクチン接種前後に収集したペア血清を用いて狂犬病ウイルス中和抗体価の変動について解析し、ワクチンの有効性やプログラムについて検討を加えた。

狂犬病予防接種に用いられている国内の狂犬病組織培養不活化ワクチンはシードロットシステムにより、すべて共通のシードウイルスおよび培養細胞を用いて製造されている。今回の試験で使用した5所社のワクチンはそれぞれ国家検定により規定の抗原力価が確認されており、抗体応答成績において製造元間による違いや地域差は報告されていない。実際に中和抗体価に関して、国内製造5所社において共通のビーグル犬血清を用いて中和抗体価の測定を行ったところ、試験方法に若干の違いはあるが、得られた測定値の差は2倍以内と安定していた [6]。

ワクチン接種歴のある犬の場合、接種前の中和抗体価で25倍以上の抗体を保有する個体は全体の90.0%を占めていた。さらに8倍以上25倍未満の個体を含めると98.0%が中和抗体陽性であった。また、接種回数1回の犬では接種後約1年経過時点でのGMTが49倍であり、石川ら [3] が現行狂犬病組織培養不活化ワクチン開発当時に行った室内試験成績での接種後1年目のGMT 28.9倍より今回の調査の方が高い値となった。さらに、2回目以降の追加接種においては、海外のワクチン同様 [7] にブースター効果により確実に抗体保有率が上昇し、すべての犬で追加接種後1カ月目の中和抗体価は25倍以上に上昇することが確認できた。なお、ワクチン接種回数2回以上の犬で、接種前の中和抗体価が25倍未

満の犬4頭も追加接種後1カ月目にはすべて64～128倍に上昇していることから、免疫応答の低い犬とは考えられず、その理由は前回のワクチン接種から約1年経過しているため、解明できなかった。

初回接種犬25頭では、接種後、72.0%の個体で中和抗体価が25倍以上に上昇した。この8%にあたる2頭の犬では中和抗体価が8倍を下回る4倍と2倍未満であった。これらの犬に関しては、犬種や体重等の詳細なデータから共通する抗体応答不良の原因は把握できなかった。また、遺伝的要因および環境やストレスなど他の因子の影響により免疫の抑制が起こった可能性も否定できない [8]。

今回の調査対象犬を他の項目別に比較したところ、過去にワクチン接種を1、2回しか受けていない2歳以下の犬では接種前の中和抗体価はやや低い傾向にあったが、追加接種後には全頭が25倍以上に上昇しており、いずれの年齢においても良好な抗体応答を示していた（データを示していない）。ワクチン接種犬の体重や犬種に関しては、接種歴の有無に関係無く、いずれの体重の犬でも1頭当たり規定量のワクチン1mlを接種すれば、良好な抗体応答が認められた。また、抗体応答の低い犬が特定の犬種に偏っているような傾向も認められなかった（データを示していない）。

わが国は1950年に制定された狂犬病予防法のもとに検疫、野犬の捕獲と飼育犬の登録および予防接種の3本柱による防疫対策の徹底実施により、1957年以降、現在も狂犬病清浄国であることを保っている。今回の予防接種の有効性に関する調査により、過去に2回以上の接種を受けている犬では、95.5%の高い割合で25倍以上の中和抗体価の保有が認められ、抗体産生および持続が良好であることが確認できた。しかし、過去に狂犬病ワクチンの接種を受けている個体でも、1年後には10%（10/100）で中和抗体価が25倍未満に低下すること、さらに、1回だけの接種では検疫規則で有効とされる抗体価を保有しているとは言い難いことは、追加接種の必要性を示している。したがって、すべての飼育犬に毎年ワクチン追加接種を行うことで確実なブースター効果が得られて、多くの犬に防御抗体が付与できるものと考えられる。世界保健機関（WHO）は狂犬病の蔓延を防ぐためには、全体の70%以上の犬へのワクチンによる免疫を推奨している [14]。今回の調査の結果は、現状のワクチンプログラムにより、万一わが国に狂犬病に感染した動物が侵入したとしても、国内の飼育犬が狂犬病に汚染される事態にはならないことを示唆している。以上、ワクチン接種により確実な免疫を付与し、それを維持するためには、現行の接種プログラムである年1回の追加接種が重要であると考えられる。

引用文献

- [1] 村川泰司, 内布洋一, 時吉幸男, 藤川英雄, 種子野章, 山田進二, 江藤正信: 犬における狂犬病ワクチン抗体の持続と保有状況, 日獣会誌, 45, 796-798 (1992)
- [2] Shimazaki Y, Inoue S, Takahashi C, Gamoh K, Etoh M, Kamiyama T, Makie H: Immune response to Japanese rabies vaccine in domestic dogs, J Vet Med B, 50, 95-98 (2003)
- [3] 石川義久, 鮫島都郷, 布谷鉄夫, 本橋常正, 野村吉利: 細胞培養順化狂犬病ウイルス RC・HL 株の不活化ワクチン候補株としての生物学的性状, 日獣会誌, 42, 637-643 (1989)
- [4] Office International des Epizooties: Rabies, OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccines, third edition, 207-217, OIE, Paris (1996)
- [5] Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H: A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus-neutralizing antibody, Laboratory techniques in rabies, fourth edition, 181-192, WHO, Geneva (1996)
- [6] 江副伸介, 大森崇司, 草薙公一, 安田博美, 山中盛正, 西條加須江, 瀧川義康, 天野健一: 犬等の輸出入検疫規則に定められた注射法による国内狂犬病不活化ワクチンの犬における有効性と安全性, 日獣会誌, 60, 873-878 (2007)
- [7] Ottiger HP, Neimeier-Forster M, Stark KD, Duchow K, Bruckner L: Serological responses of adult dogs to revaccination against distemper, parvovirus and rabies, Vet Rec, 159, 7-12 (2006)
- [8] Sihvonen L, Kulonen K, Neuvonen E, Pekkanen K: Rabies antibodies in vaccinated dogs, Acta Vet Scand, 36, 87-91 (1995)
- [9] Tepsumethanon W, Polsuwan C, Lumlerdaecha B, Khawplod P, Hemachudha T, Chutivongse S, Wilde H, Chiewbamrungrat M, Phanuphak P: Immune response to rabies vaccine in Thai dogs, A preliminary report, Vaccine, 9, 627-630 (1991)
- [10] Sugiyama M, Yoshiki R, Tatsuno Y, Hiraga S, Itoh O, Gamoh K, Minamoto N: A new competitive enzyme-linked immunosorbent assay demonstrates adequate immune levels to rabies virus in compulsorily vaccinated Japanese domestic dogs, Clin Diagn Lab Immunol, 4, 727-730 (1997)
- [11] 石川義久, 鮫島都郷, 野村吉利, 本橋常正, 織間博正, 田坂邦安: 細胞培養順化狂犬病ウイルス RC・HL 株から調製した不活化ワクチンの免疫原性, 日獣会誌, 42, 715-720 (1989)
- [12] Minamoto N, Hirayama N, Kurata K, Sazawa H, Kinjo T: A microassay for the quantitation of rabies virus by an immunoperoxidase technique, Res Bull Fac Agri Gifu Univ, 45, 187-196 (1981)
- [13] Aubert MFA: Practical significance of rabies antibodies in cats and dogs, Rev Sci Tech, 11, 735-760 (1992)
- [14] World Health Organization: Guidelines for dog rabies control, VPH/83. 43 Rev 1 WHO, Geneva (1987)

Antibody Levels of Dogs Vaccinated with Japanese Inactivated Tissue Culture Rabies Vaccine and Their Antibody Responses after Re-vaccination

Hiromi YASUDA^{*†}, Morimasa YAMANAKA, Shinsuke EZOE, Takashi OHMORI, Koichi KUSANAGI, Kazue SAIJO, Noriyasu TAKIKAWA and Kenichi AMANO

* Kyoto Biken Laboratories, Inc., 24-16, Makishima, Uji, 611-0041 Japan

SUMMARY

Antibody responses of dogs inoculated with the inactivated rabies vaccine were investigated using the paired sera obtained from 125 dogs in Tokyo, Shizuoka, Gifu, Kyoto, Miyazaki and Kumamoto Prefectures, Japan, in 2005. Ninety of the 100 dogs that had been previously vaccinated within the past year possessed neutralizing antibodies with titers higher than 25 that are considered as being sufficient for protection. The antibody titers of dogs that were above 8 had geometric mean titers (GMT) of 251. Additional vaccination of those dogs resulted in all dogs acquiring neutralizing antibodies higher than 25, and their titers reached a GMT of 750 one month after the booster inoculation. On the other hand, 23 of 25 dogs having no history of rabies vaccination produced neutralizing antibodies with titers having a GMT of 43, ranging from below 8 to 256, one month after vaccination. Notably, no antibodies were detected in sera collected from two of those dogs even after vaccination. The results seem to suggest that the present vaccination regime in which dogs are vaccinated once a year is important in creating and maintaining consistent immunity in vaccinated dogs.

—Key words: inactivated rabies vaccine, neutralizing antibody, serological investigation, vaccination.

[†] Correspondence to: Hiromi YASUDA (Kyoto Biken Laboratories, Inc.,)

24-16, Makishima, Uji, 611-0041 Japan

TEL 0774-22-4518 FAX 0774-24-1407 E-mail: rabies@kyotobiken.co.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 61, 311~314 (2008)