

Mannheimia haemolytica ワクチンの早期接種 による子牛の抗体応答調査

加藤 肇^{1)†} 杉山昌継¹⁾ 佐久間元希¹⁾ 米山 修²⁾
佐藤礼一郎³⁾ 大西 守⁴⁾ 田島誉士⁵⁾

- 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番地2)
- 2) ファイザー(株) (〒151-8589 渋谷区代々木3-22-7)
- 3) 麻布大学獣医学部 (〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71)
- 4) 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)
- 5) 酪農学園大学獣医学部 (〒069-8501 江別市文京台緑町582)

(2011年5月20日受付・2012年5月15日受理)

要 約

Mannheimia haemolytica の不活化莢膜抗原とロイコトキソイドを含むワクチンをホルスタイン種子牛に早期接種した際の抗体応答を調べた。北海道根室地区の酪農場で出生し十分に初乳を給与された子牛20頭を試験に用い、ワクチンを接種しないA群5頭、1カ月齢でワクチンを1回接種するB群5頭、5カ月齢でワクチンを1回接種するC群5頭及び1カ月齢と5カ月齢でワクチンを2回接種するD群5頭に区分した。その結果、B群がA群とC群に比べて接種後132日目の全菌体抗原に対する抗体価の上昇の程度が有意に大きかった ($P < 0.01$)。さらに、B群とD群間の抗体価の上昇の程度はほぼ同等であり、抗体価に有意な差は認められなかった。このことから、本ワクチンの早期の単回接種は子牛の離乳や移動時の呼吸器疾患の臨床症状を緩和する効果が期待された。

—キーワード：子牛, *Mannheimia haemolytica*, ワクチン。

----- 日獣会誌 65, 694~697 (2012)

Mannheimia haemolytica (以下Mh) は生後5週齢までのほとんどの子牛に自然感染し、鼻咽喉頭部に常在化する [1]。離乳や移動によるストレスやウイルス及びマイコプラズマの感染時に肺組織で増殖し、重篤な線維素性肺炎の原因菌となる。この様な呼吸器疾患に対して、Mhワクチンはその臨床症状緩和効果が期待されている [1]。しかし、若齢牛に対してはMhワクチン接種で得られる抗体はIgM主体であり、抗体応答が不十分とされている [1]。さらに、ホルスタイン種の子牛についてMhワクチンの接種時期とその効果を検討した報告は少ない [1]。そこで、Mhワクチンのホルスタイン種の子牛に対する接種時期の違いによる抗体応答を調べた。

材料及び方法

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、子牛牛舎 (生後から4カ月齢の子牛を飼養)、第1育成牛舎 (5~15カ月齢牛を飼養)、第2育成牛舎 (受胎した育成牛及び乾乳牛を飼養) 及び成牛舎 (搾乳牛を飼養、分娩房設置) の4棟があり、それぞれ独立していた。試験開始日の2006年11月21日時点において成牛412頭、育成牛126頭、子牛48頭を飼養していた。

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20頭を試験に用いた。試験開始時の供試牛の月齢は1~2カ月齢であり、出生後4時間以内に初乳3lを自力哺乳し、発育や一般状態が良好な牛を選定した。生後7日目までは飼養者が哺乳さ

† 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番地2

☎0153-77-2301 FAX 0153-77-3577

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

せ、以後は子牛牛舎内の自動哺乳施設で哺乳させた。4～5カ月齢で離乳し、以降は第1育成牛舎に移動された。調査期間中にMh ワクチン以外のワクチンは接種しなかった。

ワクチン：ワクチンとして、Mh (A1型NL1009株)のロイコトキソイド及び莢膜抗原を含むMh (A1型)感染症不活化ワクチン(油性アジュバント加溶解液, リスポバル, LOT0678401, ファイザー(株), 東京; 以下「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：供試牛は5頭ずつ4群に区分した。試験区は、A群：ワクチン無接種, 対照区, B群：1カ月齢にワクチン接種, C群：5カ月齢にワクチン接種及びD群：1カ月及び5カ月齢にワクチン2回接種に区分した。ワクチン接種前の生後1～2カ月齢に全頭から採血して、血清を採取した。さらに同日にB群とD群にワクチンを接種した。C群とD群には試験開始後106日目にワクチンを接種した。B及びD群にワクチンを接種した日を0日とし、接種後36, 106, 及び132日目に採血して、血清を採取した。供試牛に初乳を提供した母牛7頭(ホルスタイン種, 年齢4～6歳)の血液を試験開始5日後(2006年11月26日)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。

抗体価の測定：すべての血清を採取後、まとめて抗体価を測定した。Mh 全菌体凝集抗体検査は検体血清を56℃30分で非働化後1% (w/v) BSA加PBSにて2倍段階希釈した。MhのNL1009株を0.1% (v/v) ホルマリン添加食塩液と0.5% (w/v) サフラニン溶液にて希釈し、凝集抗原液とした。凝集抗原液をマイクロプレートに分注し、血清と37℃2時間反応させ、その後4℃で1晩保存した。翌日、凝集のみられた血清を陽性とし、凝集のみられた最高希釈倍率を凝集抗体価とした。

Mh ロイコトキソイド中和抗体検査は、検体血清を56℃30分で非働化後RPMI-1640培地にて2倍段階希釈した。MhのNL1009株のロイコトキシン(以下LKT)培養上清をRPMI-1640培地にて希釈し、LKT液とした。LKT液をマイクロプレートに分注し、血清と4℃で一晩反応させた。健康な牛より採血した血液を滅菌蒸留水にて3倍希釈して溶血させ、700G 15分間遠心し、白血球沈渣をPBSにて懸濁させた。白血球懸濁液をRPMI-1640培地にて、 1×10^7 個/mlの細胞濃度に調整し、マイクロプレートの全ウェルに分注し、5% CO₂存在下、37(±2)℃で60～75分間反応させ、その後200Gで12分間遠心した。白血球沈渣を10%ホルマリン溶液にて固定後、クリスタルバイオレットで染色した。染色後、細胞層の変性の有無を確認し、正常細胞層がみられたものを陽性、変性細胞層がみられたものを陰性とした。陽性を示した血清の最高希釈倍率をLKT

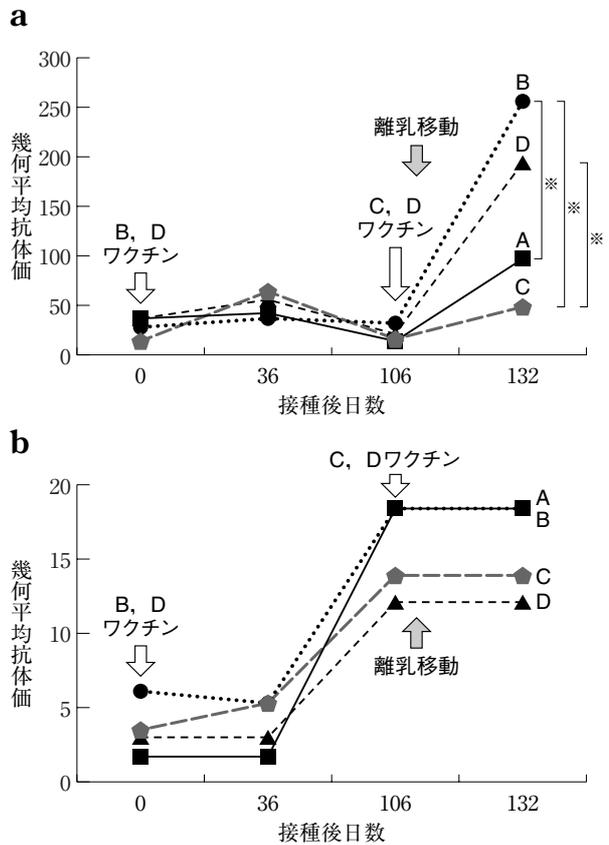


図1 全菌体 (a) 及びロイコトキシン (b) に対する抗体価の推移
 A：非接種群
 B：1カ月齢1回接種群
 C：5カ月齢1回接種群
 D：1カ月齢及び5カ月齢の2回接種群
 B及びD群へのワクチン接種日を0日とした。
 ※ $P < 0.01$ で有意差あり

中和抗体価とした。

統計解析：A, B, C及びD群の4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

全菌体凝集抗原に対する抗体価の推移：全菌体凝集抗原に対する抗体価の推移を図1aに示した。生後1カ月齢でワクチンを1回接種したB群のワクチン接種前の抗体価は16～32倍で、接種後の抗体価は16～256倍であった。132日目のAB, BC及びCD群間で有意差を認められた ($P < 0.01$)。

LKTに対する抗体価の推移：LKTに対する中和抗体価の推移を図1bに示した。生後1カ月齢でワクチンを1回接種したB群のワクチン接種前の中和抗体価は4～16倍で、接種後の中和抗体価は2～32倍であった。A, B, C及びD群の抗体価に有意差は認められなかった。

初乳提供母牛の抗体価：母牛7頭における全菌体凝集抗体価はそれぞれ64, 128, 128, 256, 256, 256及び256倍であり、LKTに対する中和抗体価はそれぞれ32, 64, 64, 128, 128及び128倍であった。

考 察

LKTに対する抗体価が高い母牛の初乳摂取により、子牛は多くのLKTに対する移行抗体を得る [2]。今回、初乳を提供した母牛はMh及びLKTに対する抗体が認められ、供試牛には十分な初乳が給与されていた。したがって、試験開始時における供試牛のMhとLKTに対する抗体は移行抗体と考えられた。

本ワクチンを1カ月齢で接種したB及びD群の抗体価はワクチン未接種のA及びC群と比較して初回ワクチン接種後36日目のMh及びLKTに対する抗体価に有意差は認められなかった。これは、移行抗体が存在する条件下であることと、本研究に用いたワクチンの成分が不活化抗原のため、単回接種では十分な抗体応答が得られないこと [3] が理由と考えられた。

1カ月齢でワクチンを接種したB群はワクチン未接種のA群及び5カ月齢でワクチンを接種したC群と比べて132日目のMhの全菌体凝集抗体（以下Mh抗体）価の上昇の程度が有意に大きかった。しかし、1カ月齢で1回接種したB群と1及び5カ月齢の2回接種のD群間の抗体価には有意な差は認められなかった。さらに、AD群間のMh抗体価の有意差は認められなかったが、132日目のMh抗体価はD群で高い傾向が認められた。離乳時や移動後は強いストレスによりMhが肺内で増殖し、Mh抗体価の上昇が起こることが報告されている [2]。A, B, C及びD群の132日目は離乳による移動から約4週間後であったことから、この132日目に認められた抗体価の上昇もMhの肺組織内増殖によるものと考えられるが抗体応答の程度には群差があった。林 [4] は、一次刺激を免疫記憶細胞に与えることにより、より活性化された免疫記憶細胞によって、その後の抗原感作時に抗体応答能が向上することを報告している。このことから、本研究でみられた132日目の抗体価の群差は、1カ月齢でのワクチン接種では抗体価の上昇は認められないが、免疫記憶細胞に一次刺激を与えることにより、次回の抗原感作時に抗体応答能が向上したことによるものと考えられる。そのため、本ワクチンの子牛に対する早期の単回接種は、Mhの肺組織内増殖時に急速かつ大量の抗体産生を誘導して臨床症を緩和する効果が期待されるため、子牛の呼吸器疾患対策の一つとして有用な手段と考えられた。

一方、試験期間を通して、A, B, C及びD群間で

LKTの抗体価に有意差は認められなかった。この理由については明らかではないが、ホルマリンでトキシド化したLKTは2週間間隔の2回接種によりLKTに対する十分な抗体応答がある [5] とされている。今回、本ワクチンを1回接種したB群と2回接種のD群との間でLKTに対する抗体価の有意差は認められなかった。不活化ワクチンは約3週間間隔での2回接種で十分な免疫増強効果が得られるが、接種間隔が長いと十分な免疫増強効果が得られないとされている [4]。本研究では、2回目のワクチンの接種時期が1回目の接種時期から106日と間隔が長かったために免疫増強効果が得られなかったものとも考えることもできるが、LKTに対する抗体応答については、接種間隔及び回数からさらなる検討が必要と思われる。なお、初回ワクチン接種後106日目の全群におけるLKTに対する抗体価の上昇（2～32倍）の理由は不明であった。

本ワクチンの肉用牛子牛に対する早期の接種による、その後の臨床症状緩和効果や育成期における増体量が向上することはすでに報告されている [6]。本研究から、ワクチンの早期の接種が感染時のMhに対する抗体応答を向上させることで臨床症状緩和効果が得られることが予想された。しかし、本ワクチンのホルスタイン種子牛に対する早期接種の効果をより正確に評価するには、肺炎症状の観察とともに、受胎率や周産期疾病発現状況を調査する、より広範なフィールド研究が必須と考えられた。

引 用 文 献

- [1] Anthony W : *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica, Pasteurella multocida, and Histophilus somni (Haemophilus somnus)*, Large Animal Internal Medicine, Smith BD ed, 4th ed, 1607-1610, Mosby Inc, St Louis (2008)
- [2] 車戸久寿：若齢子牛への *Mannheimia haemolytica* 不活化ワクチン投与効果ならびにロイコトキシン中和抗体の母子間移行, 家畜診療, 55, 583-588 (2008)
- [3] Victor S : Bovine vaccine and herd vaccine programs, Large Animal Internal Medicine, Smith BD ed, 4th ed, 1591-1598, Mosby Inc, St Louis (2008)
- [4] 林 智人：「免疫」システムを担う組織・細胞・分子とその機能的役割, 家畜診療, 55, 291-300 (2008)
- [5] Wernicki A, Mikucki P, Urban-Chmiel R, Puchalski A : Comparison of immunogenic properties of native and inactivated *Mannheimia haemolytica* Lkt in calves, Pol J Vet Sci, 11, 83-88 (2008)
- [6] 河田裕司郎, 山本久光, 渡辺 博：事故低減対策として子牛へのマンヘミア・ヘモリチカ (1型) 感染症不活化ワクチン投与の効果, 家畜診療, 54, 547-552 (2007)

Antibody Response to *Mannheimia haemolytica* Vaccination
in Young Holstein Calves

Hajime KATO*†, Masatsugu SUGIYAMA, Motoki SAKUMA, Osamu YONEYAMA,
Reiichiro SATO, Mamoru OONISHI and Motoshi TAJIMA

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

SUMMARY

We examined the antibody response of young Holstein breeding calves to *Mannheimia haemolytica* (Mh) vaccine containing inactivated capsular antigen and leukotoxin (LKT). Twenty calves that had been raised on a dairy farm in the Nemuro District of Hokkaido, Japan, and that had received adequate colostrum, were allocated to four groups that were vaccinated under different schedules. Group A (5 calves) received no injection of Mh vaccine; Group B (5) received a single injection at age 1 month; Group C (5) received a single injection at 5 months; and Group D (5) received two injections, the first at 1 month and the second at 5 months. After weaning, antibody titers against whole cell antigen in Group B were significantly higher than those in Groups A and C. There was no significant difference between Group B and D. These results suggest that a single, early vaccination could ameliorate Mh-associated respiratory disease in calves at weaning and during transportation. — Key words : calf, *Mannheimia haemolytica*, vaccine.

† Correspondence to : Hajime KATO (Nishishunbetsu Branch, Nemuro Agricultural Mutual Aid Association)
Nishishunbetsu 81-2, Bekkai-cho, Notsuke-gun, 088-2576, Japan
TEL 0153-77-2301 FAX 0153-77-3577 E-mail : nosaikatohajime@isis.ocn.ne.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 65, 694 ~ 697 (2012)