

緒 論

呼吸器病は子牛の主要な疾病であり、その損害は甚大である[61, 70]。鹿児島県においては子牛の病傷事故の約 30%が呼吸器病であり、重要な疾病の一つになっている[56]。子牛の呼吸器病の主な原因としては、Bovine herpesvirus-1 (BHV-1)、*Pasteurella multocida* (*P. multocida*)、*Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) および *Histophilus somni* (*H. somni*) による感染が報告されている[3, 33]。

近年、多頭化の飼養に伴って子牛は群飼形態で飼育され、過密な飼育環境下におけるストレスや病原微生物保有牛との接触機会が増加することによって呼吸器病の発症のリスクが従来に比べて大きくなっている。また、子牛は免疫システムが未成熟なために呼吸器病などの感染症を発症しやすい[6, 34]。特に、黒毛和種の子牛は、ホルスタイン種の子牛に比べて末梢血中の細胞性免疫作用を有する T 細胞と抗体産生を行う B 細胞の数が少なく、感染症に対するリスクが高いとされている[52, 55]。

子牛の呼吸器病の原因の中で、最も高被害を及ぼすのがマンヘミア性肺炎であり、その病原体は *M. haemolytica* である[3, 68]。*M. haemolytica* はグラム陰性の通性嫌気性短桿菌であり、ロイコトキシン (Leukotoxin : Lkt) 外毒素を分泌することによって好中球を主体とする白血球を破壊し、その際に放出される過酸化水素、活性酸素、蛋白分解酵素などにより肺組織に障害を与えて線維索性肺炎を引き起こすことがマンヘミア性肺炎の病勢の高い原因であり、さらに他の病原微生物の複合感染によって病態が悪化する[32, 85]。

呼吸器病に罹患した子牛の血液学的病態については、これまでに呼吸器病の臨床例と類似の症状が再現された実験的な子牛における免疫学的な知見[23, 57, 59]と子牛のマンヘミア性肺炎における被害の報告[4, 42]はあるが、

血液学的病態に関する詳細な報告はない。

また、現在、野外における子牛の呼吸器病に対する治療としては主にマクロライド系やニューキノロン系の抗菌剤の全身投与が行われているが、その治療効果は病原微生物によって異なる[35, 79, 81]。特に、病原性の高い *M.haemolytica* 感染に起因するマンヘミア性肺炎に罹患した子牛は抗生物質療法を行っても死亡あるいは廃用になる例が多く、治癒例においても増体量が減少するなど、マンヘミア性肺炎は子牛における重要な生産性阻害要因になっている[43, 49, 71]。また、野外では呼吸器病に罹患した子牛に対して抗生物質療法を行っても全て根治させるのは困難である。さらに、近年、マクロライド系やニューキノロン系の抗菌剤に薬剤耐性を示す *M.haemolytica* や *P.multocida*、*H.somni* の分離頻度が増加していることが報告 [36, 39] されており、これらの菌が動物からヒトへと伝播した場合、ヒト医療における抗菌剤治療を困難にする可能性が指摘されており、獣医療における抗菌薬の慎重な使用が提言されている[74]。

すなわち、子牛の呼吸器病に対する抗生物質療法には限界があることから、従来から、被害の大きい子牛の呼吸器病に対してワクチン接種による予防対策の確立が強く望まれている。ワクチンには生ワクチンと不活化ワクチンがあり、生ワクチンは弱毒化した微生物を使用して液性免疫と細胞性免疫を獲得でき、不活化ワクチンは化学処理などによって死んだ微生物を使用して液性免疫を獲得する。一般的に生ワクチンは不活化ワクチンに比べて獲得免疫が強く免疫持続時間が長い[5, 19]、ワクチン株の感染による副反応を発現する可能性がある。現在、子牛の呼吸器病の対策として広く使用されているワクチンは、*M.haemolytica* 不活化ワクチンと *P. multocida*、*M.haemolytica* および *H. somni* の混合不活化ワクチンであるが、そのワクチン接種のプログラムは実験モデル子牛の成績に基づいたものであり[28, 29]、野外の子牛、

特に黒毛和種子牛に対する効果的なワクチン接種の方法はまだ確立されておらず、呼吸器病ワクチン接種後における抗体価の推移や呼吸器病の発生状況などの有効性を検証した報告[14, 78]も少ない。

一般的に子牛は出生直後、初乳を介して受動的に移行し免疫を獲得する[7]。初乳によって得られた子牛の移行抗体の半減期は 11.5 日から 16 日であり経時的に減少する[7]。子牛は移行抗体により病原体から免れるため、初乳を十分に摂取し移行抗体を獲得することは重要である。生ワクチンを接種する際における子牛の移行抗体の存在は、子牛の能動的な免疫応答である抗体産生を減弱させる[12, 21, 50]可能性があり、移行抗体の影響を受けにくい時期に接種する必要がある。一方、不活化ワクチンを接種する際には、病原微生物に対する移行抗体が最も低下する時期に投与することが有益である。したがって、子牛に対して有効なワクチン接種を行うためには、病原微生物に対する移行抗体の推移に基づいて実施すべきであるが、野外の子牛における病原微生物に対する移行抗体の推移、特に、病原性の高い *M.haemolytica* の移行抗体の推移の報告は少ない[28, 63]。

また、子牛におけるワクチン効果を向上されるためには、ワクチン接種する子牛の栄養状態が重要であり、近年、子牛の栄養要因の一つとして血中ビタミン E 濃度が注目されている[37]。ビタミン E は、生体の抗酸化剤として作用し、生体膜のリン脂質中の高度不飽和脂肪酸の過酸化を防止して生体膜の安定性を保持し、免疫機能の活性効果を持つとされている[37]。これまでに、ヒトにおいて血中ビタミン E 濃度とワクチン接種による抗体産生との関連性について研究が行われており、血液中のビタミン E 濃度が低値のヒトに対してワクチン接種を行った際には抗体産生が低値であることが明らかにされている[25]。また、ヒトとブタにおいて、ビタミン E の添加によって血液中のビタミン E 濃度が増加すると共に、免疫細胞が活性化して抗原接種後の抗体

産生が高まることが報告されている[46, 62]。一方、牛の血中ビタミン E 濃度はビタミン E の添加により安定的に増加する[65]ことから、子牛においても血液中のビタミン E 濃度を高く誘導することによってワクチン接種による抗体産生能が増加する可能性がある。しかし、子牛の血中ビタミン E 濃度とワクチン接種後における抗体産生との関連性はまだ明らかにされていない。

本研究では、野外における子牛、特に肉生産を目的とした黒毛和種の子牛における呼吸器病の発病を軽減する目的で、まず、マンヘミア性肺炎に罹患した臨床例の子牛における血液学的病態を解明して *M.haemolytica* 感染の病原性を明らかにした。また、*M.haemolytica* 不活化ワクチンと *P. multocida*、*M.haemolytica* および *H. somni* 混合不活化ワクチンの有効な接種時期を明らかにする目的で、黒毛和種子牛の出生後からの *M.haemolytica* 抗体価の推移を観察すると同時に、*M.haemolytica* 不活化ワクチンの接種による抗体産生の推移を明らかにした。さらに、黒毛和種子牛における血液中のビタミン E 濃度とワクチン接種の抗体産生との関連性を解明する目的で、血清ビタミン E 濃度と *M.haemolytica* 不活化ワクチンの接種後における抗体産生との関連性およびビタミン E の代用乳添加と BHV-1 生ワクチンの接種後における抗体産生との関連性を明らかにした。

すなわち、本研究において *M.haemolytica* に罹患した呼吸器病の子牛は高度な肺組織の炎症病変に起因する肺機能の著しい低下、炎症性の血液変化およびサイトカインの産生を伴う重篤な臨床症状を示す難治性の呼吸器病であることが明らかにされた。また、黒毛和種子牛における *M.haemolytica* 不活化ワクチン接種の適正な時期は *M.haemolytica* 抗体価が最低値となる生後 8 週齢前後に行うことが有益であることを明らかにすると同時に、*P.multocida*、*M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンの接種によって呼吸器病が低減することが確認された。さらに、ワクチン接種時における血液ビタミ

ン E 濃度とワクチン抗体産生との間に関連性があり、代用乳にビタミン E を添加することによって黒毛和種子牛におけるワクチン抗体価が増加することが明らかにされた。

本研究は、黒毛和種子牛によって甚大な被害を与える呼吸器病、特に病原性の高い *M.haemolytica* 感染に起因する呼吸器病の血液学的病態を解明して *M.haemolytica* の病原性を明らかにすると同時に、子牛に対する *M.haemolytica* 不活化ワクチンの適正な接種時期を明らかにし、子牛の栄養要因としての血液ビタミン E 濃度とワクチン接種による抗体産生との関連性およびビタミン E 添加によるワクチン接種に抗体産生の増加について明らかにした。すなわち、本研究の成績は野外の黒毛和種子牛における呼吸器病の予防対策の向上に対して大きく寄与するものである。

第 I 章 *M.haemolytica* 感染子牛における臨床および血液学的病態

1. 序 文

子牛の呼吸器病の中で、病原性の高い *M.haemolytica* の感染に起因するマンヘミア肺炎の病態が最も重篤であり死廃率が高い[32, 85]。子牛における呼吸器病の原因菌の一つである *M.haemolytica* を実験的に子牛の気管内に投与して、臨床所見および末梢血白血球ポピュレーションを観察した報告[13, 23]では、*M.haemolytica* 投与後に体温と呼吸数が増加し、好中球数の増数が認められたことから、病態形成に免疫細胞が密接に関連していることが示唆されている。また、主に単球・マクロファージから産生される炎症性サイトカインである腫瘍性壊死因子 (Tumor Necrosis Factor : TNF) は各免疫細胞を刺激して免疫反応を活性化する[9, 84]。実験的な肺への TNF 投与によるラットの呼吸器病モデルでは肺への炎症が誘導されることから、TNF が呼吸器病の病態形成を惹起する重要な因子の一つであるとされている[81]。

これまでの *M.haemolytica* 感染に起因する呼吸器病子牛における臨床および血液学的病態の報告は実験例によるものがほとんどであり[57, 59]、野外の呼吸器病子牛について詳細に解析した報告はほとんど見当たらない。

そこで本章では、子牛における呼吸器病の予防対策を確立する前提として、病原性の高い *M.haemolytica* が鼻腔スワブから分離された呼吸器病子牛の臨床例における臨床および血液学的病態を明らかにする目的で、臨床検査ならびに一般血液、動脈血ガス分圧、末梢血白血球ポピュレーションおよび TNF 活性の血液学的病態の解析を行った。

2. 材料と方法

1) 供試牛

供試牛は呼吸器病に罹患してフィールドで約 7~10 日間、主にマクロライド系とニューキノロン系の抗菌剤による抗生物質療法が行われ、難治性の呼

吸器病と診断されて酪農学園大学附属家畜病院に搬入され、鼻腔スワブから *M.haemolytica* が分離された子牛 29 例である (表 1)。呼吸器病に罹患した 29 例の子牛を予後不良であった 1 群 (ホルスタイン種 6 例、黒毛和種 5 例と交雑種 1 例の計 12 例) と予後良好だった 2 群 (ホルスタイン種 5 例、黒毛和種 12 例の計 17 例) に分類した。1 群の月齢は平均 5.7 ± 1.2 カ月齢、2 群の月齢は平均 5.1 ± 0.7 カ月齢であった。1 群と 2 群における臨床および血液学的所見について臨床的に健康な 3~5 カ月齢の子牛 10 例 (ホルスタイン種 6 例、黒毛和種 4 例) の対照群と比較した。

表1. 供試牛の概要

群	1 群	2 群	対照群
例 数	12	17	10
品 種			
ホルスタイン	6	5	6
黒毛和種	5	12	4
交雑種	1	0	0
月 齢	5.7 ± 1.2	5.1 ± 0.7	3.7 ± 0.3

1) 臨床検査

臨床検査は、酪農学園大学附属病院に搬入された後、体温、心拍数および呼吸数の一般臨床所見について行った。また、搬入後 5 日間、糖酢酸リンゲル液 500mL にセファゾリン 2g の抗生物質を加えた輸液とゲンタマイシン

60mg、気管拡張剤 0.2mL、去痰剤 0.2mL およびデキサメサゾン 0.5mL を注射用蒸留水 20mL に加えた混合液を用いて吸入療法を行い、一般臨床所見と食欲が改善しなかった例を予後不良（1群）、改善した例を予後良好群（2群）とした。

2) 血液検査

(1) 血液採取

採血は一般血液検査ならびに免疫学的検査の目的で、頸静脈から 10mL シリンジを用いて採取した血液を EDTA 加採血管 5mL、ヘパリン加採血管 5mL およびプレーン採血管 10mL に分注し、プレーン採血管を遠心分離して得られた血清サンプルは測定まで -30°C で保存した。同時に、動脈血ガス分圧の測定のためにヘパリン加 1mL シリンジを使用して耳動脈から動脈血を採取した。

(2) 検査項目と方法

ヘマトクリット (Ht) 値は毛細管法にて測定した。動脈血ガス分圧の測定は、採血後 30 分以内に耳動脈から採取したヘパリン血を用いて簡易自動血液ガス分析測定器 (i-stat, 扶桑薬品工業 (株), 東京) を用いて二酸化炭素分圧 (Carbon Dioxide Partial Pressure : pCO_2)、酸素分圧 (Oxygen Partial Pressure : pO_2)、重炭酸イオン (Bicarbonate Ion : HCO_3^-)、余剰塩基および酸素飽和度 (Oxygen Saturation : O_2SAT) について測定した。白血球数は自動血球計算機 (pocH-100iv, Sysmex (株), 東京) で測定し、白血球像分画は血液塗抹標本による百分比を用いて算出した。白血球ポピュレーションの測定はフローサイトメトリー法[54]によって行った。血清 TNF 活性の測定は TNF 感受性細胞を用いてこれまでの報告[83]に準じて行

った。すなわち、WEHI 細胞を 2×10^5 cell/well と 10ml の血清とともに最終量 200ml/well となるように調整して培養し、培地は actinomycin-D と 10% ウシ胎児血清を添加した RPMI-1640 培養液を用いた。20 時間の培養後 5mg/ml の 2,2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) を加えさらに 2 時間培養し、その後 100ml/well の上清を取り去り、100ml/well の 50% N-N dimethylsulfomide により希釈した 0.7M sodium dodecyl sulfate を加えた。各 well の色素はマイクロプレートリーダーを用い吸光度 540nm によって解析した。また、TNF 特異性はヒト抗 TNF 抗体 (Genzyme Cambridge, NA, U.S.A) により反応を確認した。

(3) 測定成績の統計学的処理

成績は平均値±標準誤差として示し、分散分析による多重比較検定を行い $P < 0.05$ を有意な差と判断した。

3. 成績

1) 臨床所見、血液所見ならびに動脈血ガス分圧所見

1 群、2 群および対照群における入院時における臨床所見、血液所見および動脈血ガス分圧所見の成績を表 2 に示した。

体温は 1 群 $39.2 \pm 0.1^\circ\text{C}$ 、2 群 $39.0 \pm 0.2^\circ\text{C}$ および対照群 $39.0 \pm 0.1^\circ\text{C}$ であり、3 群間に有意な差はなかった。心拍数は 1 群 93.4 ± 3.0 回/分、2 群 99.3 ± 6.7 回/分および対照群 74.0 ± 1.7 回/分、呼吸数は 1 群 62.2 ± 6.0 回/分、2 群 52.8 ± 5.4 回/分および対照群 26.0 ± 3.4 回/分であり、1 群と 2 群は対照群に比較して有意 ($P < 0.05$) に増加していた。

Ht 値は 1 群 $38.3 \pm 1.6\%$ 、2 群 $32.1 \pm 1.4\%$ および対照群 $30.6 \pm 1.2\%$ であり、1 群は他の 2 群に比較して有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。動脈血ガス

分圧における $p\text{CO}_2$ は 1 群 $44.5 \pm 3.9\text{mmHg}$ 、2 群 $48.8 \pm 2.6\text{mmHg}$ および 対照群 $41.6 \pm 2.2\text{mmHg}$ 、 $p\text{O}_2$ は 1 群 $65.6 \pm 4.7\text{mmHg}$ 、2 群 $82.0 \pm 3.6\text{mmHg}$ および対照群 $97.7 \pm 3.5\text{mmHg}$ 、 HCO_3^- は 1 群 $25.1 \pm 2.2\text{mmol/l}$ 、2 群 $30.4 \pm 1.5\text{mmol/l}$ および対照群 $26.8 \pm 1.2\text{mmol/l}$ 、余剰塩基は 1 群 $0.6 \pm 1.8\text{mmHg}$ 、2 群 $5.7 \pm 1.3\text{mmHg}$ および対照群 $2.8 \pm 1.1\text{mmHg}$ 、 O_2SAT は 1 群 $67.3 \pm 3.3\%$ 、2 群 $93.6 \pm 1.0\%$ および対照群 $96.8 \pm 0.4\%$ であり、1 群における $p\text{O}_2$ および O_2SAT は他の 2 群と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示した。

表2. 各群の血液所見ならびに血液ガス分圧所見

		1群 (n=12)	2群 (n=17)	対照群 (n=10)
体温	℃	39.2 ± 0.1	39.0 ± 0.2	39.0 ± 0.1
心拍数	回/分	93.4 ± 3.0^a	99.3 ± 6.7^a	74.0 ± 1.7^b
呼吸数	回/分	62.2 ± 6.0^a	52.8 ± 5.4^a	26.0 ± 3.4^b
ヘマトクリット値	%	38.3 ± 1.6^a	32.1 ± 1.4^b	30.6 ± 1.2^b
二酸化炭素分圧	mmHg	44.5 ± 3.9	48.8 ± 2.6	41.6 ± 2.2
酸素分圧	mmHg	65.6 ± 4.7^a	82.0 ± 3.6^b	97.7 ± 3.5^b
重炭酸イオン	mmol/l	25.1 ± 2.2	30.4 ± 1.5	26.8 ± 1.2
余剰塩基	mmHg	0.6 ± 1.8	5.7 ± 1.3	2.8 ± 1.1
酸素飽和度	%	67.3 ± 3.3^a	93.6 ± 1.0^b	96.8 ± 0.4^b

平均±標準誤差

a,b: 異符号間で有意差あり ($P < 0.05$)

2) 白血球数および分画、末梢血白血球ポピュレーションならびに血清TNF活性

1群、2群および対照群における入院時における白血球数および分画、末梢血白血球ポピュレーションならびに血清TNF活性の成績を表3に示した。

白血球数は1群 $152.9 \pm 25.9 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、2群 $117.5 \pm 13.0 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ および対照群 $89.7 \pm 3.1 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、単核球数は1群 $41.1 \pm 3.6 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、2群 $54.5 \pm 3.8 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ および対照群 $56.7 \pm 2.4 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、好中球数は1群 $111.2 \pm 22.8 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、2群 $63.0 \pm 10.9 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ および対照群 $33.0 \pm 1.7 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ であり、1群の白血球数および好中球数は他の2群に比べて増数し、対照群との間に差 ($P < 0.05$) があった。また、1群の単核球数は他の2群に比べて有意 ($P < 0.05$) に減少していた。

CD3⁺T細胞数は1群 $17.4 \pm 3.0 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、2群 $32.3 \pm 2.8 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ および対照群 $34.0 \pm 2.1 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、CD4⁺T細胞数は1群 $10.4 \pm 1.8 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、2群 $19.0 \pm 1.9 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ および対照群 $19.8 \pm 1.5 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、CD8⁺T細胞数は1群 $5.7 \pm 0.9 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、2群 $12.0 \pm 1.3 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ および対照群 $13.2 \pm 1.1 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、CD4⁺/CD8⁺は1群 1.9 ± 0.1 、2群 1.7 ± 0.1 および対照群 1.6 ± 0.1 、WC1⁺T細胞は1群 $3.3 \pm 0.8 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、2群 $8.4 \pm 2.2 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ および対照群 $10.0 \pm 3.9 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、CD14⁺細胞は1群 $57.0 \pm 7.7 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、2群 $11.8 \pm 1.7 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ および対照群 $11.1 \pm 1.2 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、IgM⁺B細胞は1群 $6.6 \pm 2.1 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ 、2群 $6.5 \pm 1.5 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ および対照群 $9.6 \pm 1.4 \text{ } 10^2/\mu\text{l}$ であり、1群におけるCD3⁺T細胞数、CD4⁺T細胞数、CD8⁺T細胞数およびWC1⁺T細胞は2群と対照群に比較して有意 ($P < 0.05$) な低値を示した。また、1群のCD14⁺細胞は2群ならびに対照群に比較して有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。TNF活性は1群 18.8 ± 7.7 および2群 4.8 ± 3.4 であり、1群は2群と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。対照群では血清TNF活性は認められなかった。

表3. 末梢血白血球ポピュレーションおよび血清TNF活性

	1 群 (n=12)	2群 (n=17)	対照群 (n=10)
白血球数 ×10 ² /μl	152.9 ± 25.9 ^a	117.5 ± 13.0	89.7 ± 3.1 ^b
単核球数 ×10 ² /μl	41.1 ± 3.6 ^a	54.5 ± 3.8 ^b	56.7 ± 2.4 ^b
好中球数 ×10 ² /μl	111.2 ± 22.8 ^a	63.0 ± 10.9	33.0 ± 1.7 ^b
CD3 ⁺ T細胞数 ×10 ² /μl	17.4 ± 3.0 ^a	32.3 ± 2.8 ^b	34.0 ± 2.1 ^b
CD4 ⁺ T細胞数 ×10 ² /μl	10.4 ± 1.8 ^a	19.0 ± 1.9 ^b	19.8 ± 1.5 ^b
CD8 ⁺ T細胞数 ×10 ² /μl	5.7 ± 0.9 ^a	12.0 ± 1.3 ^b	13.2 ± 1.1 ^b
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1.9 ± 0.1	1.7 ± 0.1	1.6 ± 0.1
WC1 ⁺ T細胞 ×10 ² /μl	3.3 ± 0.8 ^a	8.4 ± 2.2 ^b	10.0 ± 3.9 ^b
CD14 ⁺ 細胞 ×10 ² /μl	57.0 ± 7.7 ^a	11.8 ± 1.7 ^b	11.1 ± 1.2 ^b
IgM ⁺ B細胞 ×10 ² /μl	6.6 ± 2.1	6.5 ± 1.5	9.6 ± 1.4
TNF活性	18.8 ± 7.7 ^a	4.8 ± 3.4 ^b	ND

平均±標準誤差

a,b: 異符号間で有意差あり ($P < 0.05$). ND: 検出できず.

4. 考 察

本研究において、鼻腔スワブから *M. haemolytica* が分離された呼吸器病の子牛 29 例は対照群に比べて心拍数と呼吸数の増数が確認され難治性の肺炎症状を呈していた。しかし、体温には臨床例と対照群との間に差がなかったが、これはフィールドで行われたマクロライド系やニューキノロン系の抗生物質療法による抗菌作用によるものと推察した。

予後不良群 (1 群) における Ht 値は予後良好群 (2 群) および対照群に比べて高値を示したが、この所見は重度の呼吸器病に起因した赤血球数や白血

球数の血液細胞の増数によるものと推察した。

牛の呼吸器病による肺機能の客観的な病態評価として動脈血ガス分圧が有効な検査法であり、 $p\text{CO}_2$ の増加、 $p\text{O}_2$ および O_2SAT の低下が重度の呼吸器病の特徴である[48, 69]。本研究における動脈血ガス分圧の検査では、予後不良群（1群）における $p\text{O}_2$ と O_2SAT が予後良好群（2群） および対照群に比べて低値であったことから、予後不良群は肺機能が著しく低下する重篤な呼吸器病の病態であったものと推察された。また、予後不良群（1群）では好中球の増数に伴う白血球数の増数が認められたが、この所見は予後不良群（1群）における肺の炎症病変が予後良好群（2群）に比べて重度であることを示唆する所見であると考えられた。

白血球表面抗原の解析により得られる末梢血ポピュレーションは、免疫反応により多様に変化する各白血球のバランスを評価するもので、免疫反応を評価するために有用である[53]。大腸菌性乳房炎を発症した重症例のホルスタイン種、成牛においては $\text{CD}14^+$ 細胞の明らかな上昇と $\text{CD}3^+$ 細胞の明らかな減少が認められ、大腸菌性乳房炎の重症度と末梢血ポピュレーションは関連して変動することが示唆されている[51]。T細胞の中でも $\text{CD}4^+$ 細胞であるヘルパーT (Th) 細胞は $\text{Th}1$ と $\text{Th}2$ の2種類に分類されている[47]。 $\text{Th}1$ 細胞は主に細胞が直接反応する細胞性免疫に関係し、マクロファージなど活性化させ、 $\text{Th}2$ 細胞は抗体産生に重要な役割を持っている[47]。 $\text{CD}4^+$ のレセプターは大量の抗原により刺激されると $\text{Th}1$ 細胞が誘導され、少量の場合には $\text{Th}2$ 細胞が誘導されると報告されている[15, 31]。マクロファージや好中球から産生されるサイトカインの一つである顆粒球・マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) は濃度依存的に末梢血好中球や単球の増加を誘導する[76]。感染症における GM-CSF はマクロファージなどからの産生が促進されることが明らかにされている[45]。

本研究における末梢血白血球ポピュレーションの検査では、予後不良群（1群）における好中球数は対照群と比べて高値を示し、CD14⁺単球数は予後良好群（2群）と対照群に比べて高値を示した。予後不良群（1群）における白血球数の増数は細胞性免疫の中で主な成分である CD14⁺単球ならびに好中球の増数によるものであった。このことから、本研究における予後不良群（1群）では、大量の抗原刺激により細胞性免疫が誘導されるとともに GM-CSF の産生が促進されて末梢血好中球ならびに CD14⁺単球が増数したものと考えられた。

TNFは感染に対する生体防御反応において細胞傷害因子として知られているが、一方で免疫細胞による炎症性反応を調整する作用も持っている[9, 81, 84]。マウスでの実験的な呼吸器病モデルでは感染後の TNF 活性が低値であると生存率が減少するとされており、TNF は免疫反応において産生されなければならない必須の因子であると示唆されている[40, 77]。呼吸器病を発病した子牛における単球・マクロファージは TNF を産生する主要な細胞であり、TNF は好中球や単球・マクロファージを活性化するとされている[9, 84]。実験的な子牛の気管内への細菌投与では、呼吸器病の臨床症状の発現と共に血清 TNF 活性値の上昇が認められている[57, 86]。また、ヒトの炎症性疾患においては血清 TNF 値の上昇と重症度との関連が示唆されている[16]。一方、T細胞はTNFにより過剰に刺激されるとアポトーシスが誘導されることが明らかにされている[73]。また TNF は単球表面の CD4 抗原量を低下させることも報告されている[26]。本研究では予後不良群（1群）における血清 TNF 活性は予後良好群（2群）と比べて高値を示したが、この所見は炎症反応の過程で肺組織の損傷や細菌の感染・増殖などによって細胞性免疫が優位となったことにより誘導され過剰に産生された TNF が全身に及んだことによるものと示唆された。また、今回、予後不良群（1群）における好中球数が著しく

増数していたことから、TNFによって増数した好中球が活性化して肺の炎症反応がさらに重篤化したものと推察した。また、本研究における予後不良群（1群）のCD3⁺T細胞数、CD4⁺T細胞数およびCD8⁺T細胞数の顕著な減少は、TNFの刺激により誘導された細胞数の減少または細胞表面抗原量の減少による可能性が考えられた。細胞性免疫の誘導にはTNFなど炎症反応を誘導するサイトカインが関連していると考えられており[82]、本研究における予後不良群において観察されたCD14⁺ならびに好中球の増数やT細胞数の減少は呼吸器病に罹患した子牛の細胞性免疫の特徴的な所見であることが示唆された。

本研究において、病原性の高い*M.haemolytica*が鼻腔スワブから分離された呼吸器病子牛の臨床例における臨床および血液学的病態を明らかにする目的で、臨床検査ならびに一般血液、動脈血ガス分圧、末梢血白血球ポピュレーションおよびTNF活性の血液学的病態の解析を行った。その結果、*M.haemolytica*感染による重度の呼吸器病に罹患した子牛は高度な肺組織の炎症病変に起因する肺機能の著しい低下、炎症性の血液変化およびサイトカインの産生を伴う重篤な臨床症状を示す難治性の呼吸器病であることが確認された。

5. 小 括

本章では、子牛における呼吸器病の予防対策を確立する前提として、まだ解明されていない病原性の高い*M.haemolytica*感染による呼吸器病子牛の臨床例における臨床および血液学的病態を明らかにする目的で、臨床検査ならびに一般血液、動脈血ガス分圧、末梢血白血球ポピュレーションおよびTNF活性の血液学的病態の解析を行った。その結果、*M.haemolytica*に罹患した呼吸器病子牛の臨床例は心拍数と呼吸数の増数、動脈血ガス分圧の酸素分圧

(pO₂) と酸素飽和度 (O₂SAT) の低下、好中球の増数に伴う白血球数の増数、末梢血白血球ポピュレーションの CD3⁺T 細胞数、CD4⁺T 細胞数および CD8⁺T 細胞数の低下、ならびに血清 TNF 活性が高値を示すことが確認され、*M. haemolytica* に罹患した呼吸器病の子牛は高度な肺組織の炎症病変に起因する肺機能の著しい低下、炎症性の血液変化およびサイトカインの産生を伴う重篤な臨床症状を示す難治性の呼吸器病であることが確認された。

第Ⅱ章 黒毛和種子牛における *M.haemolytica* 抗体の推移と不活化ワクチンの有効性の検討

1. 序 文

M.haemolytica は日和見感染症の原因菌の一つであり、子牛に重篤な呼吸器病を引き起こす[3, 32, 68, 85]。前章では、*M.haemolytica* に罹患した呼吸器病の子牛の臨床例は高度な肺組織の炎症病変に起因する肺機能の著しい低下、炎症性の血液変化およびサイトカインの産生を伴う重篤な難治性の呼吸器病の臨床症状を示すことが明らかになった。

重篤な呼吸器病に罹患した子牛は死廃率のリスクが高く、甚大な被害を及ぼす。また、呼吸器病の軽症例においても治癒後における増体重が健康子牛に比べて低く、呼吸器病は子牛における生産性の大きな阻害要因[43, 49, 71]になっており、特に、牛肉生産が目的である黒毛和種子牛にとっては重要な疾病である。また、病原性の高い *M.haemolytica* に罹患した呼吸器病の子牛は病勢が重篤であり、抗生物質療法を行っても治療効果が低い[39, 54]。したがって、*M.haemolytica* 感染による子牛の呼吸器病に対しては抗生物質療法よりも予防に重点を置いたプログラムが切望されており、その一つがワクチンによる予防対策である。

ワクチンには生ワクチンと不活化ワクチンがあり、弱毒化した微生物を使用して液性免疫と細胞性免疫が獲得できる生ワクチンを接種する際には、子牛の移行抗体の存在が子牛の能動的な抗体産生を減弱させる[12, 21, 50]可能性があり、移行抗体の影響を受けにくい時期に接種する必要がある。一方、不活化ワクチンは化学処理などによって死んだ微生物を使用して液性免疫を獲得する不活化ワクチンを接種する際には、病原微生物に対する移行抗体が最も低下する時期に投与することが有益である。したがって、子牛に対して有効なワクチン接種を行うためには、病原微生物に対する移行抗体の推移に基づいて実施すべきであるが、野外の子牛における病原微生物に対する移行抗体の推移、特に、病原性の高い *M.haemolytica* の移行抗体の推移の報

告はない。

そこで、本章では、子牛におけるワクチネーションを行う適正な時期を特定する目的で、2 牛群の黒毛和種子牛における出生時からの *M.haemolytica* に対する抗体価の推移を測定した。さらに、市販されている *M.haemolytica* 不活化ワクチンと *P. multocida*, *M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンによる黒毛和種子牛の呼吸器病の予防効果について検討する目的で、ワクチン接種を行った群（ワクチン接種群）とワクチンを接種しなかった群（対照群）における Lkt 中和抗体価と *P. multocida*, *M.haemolytica* および *H.somni* の ELISA 抗体価ならびに呼吸器病の発病率を比較検討した。

2. 材料と方法

1) 黒毛和種子牛の出生後における *M.haemolytica* 抗体価の推移

(1) 供試牛

供試牛は鹿児島県内の繁殖農場で出生した黒毛和種子牛であり、農場 1 (Group1) と農場 2 (Group2) におけるそれぞれ各 10 頭、合計 20 頭の子牛を供試した。Group1 の子牛は出生後 5 日間、母牛と同居し、自由に初乳を飲むことが可能であった。子牛は母牛と分離された後、隣同士が接触可能なカーフハッチで 12 週齢まで飼養され、その後、子牛はグループのペンに移動された。Group2 の子牛は出生後、20 週齢まで母牛と同居し飼養された。調査期間中、供試牛には呼吸器病症状は認められなかった。

(2) 血液検査

i) 血液採取

子牛の採血は 1 週齢 (7 日齢)、4 週齢 (28~32 日齢)、8 週齢 (56~62 日齢)、12 週齢 (84~89 日齢)、16 週齢 (112~118 日齢) および 20 週齢 (140

～146日齢)に頸静脈から10mL シリンジを用いて行って採取した血液をプレーン採血管10mLに分注し、プレーン採血管を遠心分離した後に得られた血清サンプルは測定まで-30°Cで保存した。また、母牛の採血は分娩1週(7日)後に頸静脈から子牛と同様な方法で行い、プレーン採血管を遠心分離した後に得られた血清サンプルは測定まで-30°Cで保存した。

ii) 抗体検査

M.haemolytica 抗体価の測定は、酵素抗体法(Enzyme Linked Immunosorbent Assay: ELISA)で実施し、血清型1型(HL2株)の培養上清濃縮液(RPMI-1640にて37°Cで14時間振盪培養し、その培養液を100倍濃縮したもので、ELISA抗原価160倍を示すもの)を炭酸緩衝液で希釈した後、マイクロプレートの全ウェルに100 μ l添加し4°Cで一晩感作した。プレート洗浄後、ブロック液(ブロックエース粉末1gを100mの精製水で溶解したもの)を全ウェルに280 μ l添加し37°Cで1時間感作後、TweenPBSで洗浄したものを抗体価測定用プレートとした。被検血清および参照血清をTweenPBSで100倍希釈から2倍階段希釈して抗体価測定用プレートに添加し、37°Cで1時間感作した。プレート洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗体IgG抗体(Cappel社, U.S.A)を添加し、37°Cで1時間感作した。プレート洗浄後、基質溶液(O-Phenylenediamine dihydrochloride 10mgをリン酸クエン酸緩衝液25mlで溶解し過酸化水素10 μ lを加えたもの)を全ウェルに100 μ l添加し、30°Cで30分感作した後、反応停止液(1Mの硫酸溶液)を全ウェルに50 μ l添加した。測定は主波長492nmおよび副波長630nmで行い、これらの吸光度の差が0.4以上を示す最高希釈倍数をELISA抗体価とした。

(3) 測定成績の統計学的処理

成績は幾何平均±標準誤差で示した。統計処理のためにデータは対数に変換された。同一 Group 内で 1 週齢と 4 週齢、8 週齢、12 週齢、16 週齢および 20 週齢との抗体価を Student's *t*-検定にて比較した。また、1 週齢時の子牛と分娩 1 週後の母牛の抗体価の相関を評価するためにスピアマンの順位相関係数を用い $P<0.05$ を有意な差と判断した。

2) 黒毛和種子牛の *M.haemolytica* 不活化ワクチンに対する抗体産生

(1) 供試牛

供試牛は鹿児島県内の子牛育成農場に導入された 3~5 ヶ月齢の黒毛和種子牛 24 頭であった。24 頭の子牛を *M.haemolytica* 不活化ワクチンを接種したワクチン接種群 (12 頭) とワクチンを接種しなかった対照群 (12 頭) の 2 群に分類した。また、両群における全ての供試牛は同じ給与飼料と飼養環境の下で管理した。

(2) *M.haemolytica* 不活化ワクチン接種

ワクチン接種群には農場導入日に *M.haemolytica* 血清型 1 型 (HL1009 株) の培養液をホルマリンにて不活化後、遠心分離しその上清液によって作成された *M.haemolytica* 不活化ワクチン (リスポバル, ファイザー (株), 東京) を皮下に 2mL 接種した。

(3) 血液検査

i) 血液採取

採血はワクチンの接種日、ならびにワクチン接種した 2 週後、4 週後、8 週後および 12 週後に頸静脈から 10mL シリンジを用いて行って採取した血液

をプレーン採血管に分注し、プレーン採血管を遠心分離して得られた血清サンプルは測定まで -20°C で保存した。

ii) Lkt 中和抗体価測定

Lkt 中和抗体価の測定は検体血清を 56°C で 30 分間非働化後、RPMI-1640 培地にてマイクロタイタープレートの各ウェルに 2 倍階段希釈した。*M. haemolytica* 血清型 1 型 (HL1009 株) を 37°C で振盪培養後にて作成された培養上清を希釈したものを Lkt 液とした。Lkt 液をマイクロプレートの全ウェル(陽性対照は除く)に分注し、 4°C で一晩静置し中和反応させた。陽性対照はリン酸緩衝液+RPMI-1640 培地、陰性対照はリン酸緩衝液+Lkt 液とした。健康な牛から採取した血液を遠心管に分注し、脱イオン水を加えて溶血させ、リン酸緩衝液を加えて混合後遠心し、遠心後に白血球沈査を集めた。RPMI-1640 培地にて $1 \times 10^7/\text{ml}$ に調整した白血球懸濁液をマイクロプレートの全ウェルに $90 \mu\text{l}$ 分注し、 $5\% \text{CO}_2$ 存在下にて 37°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$) で 1 時間加熱し、プレートを遠心した後に上清を除去した。各ウェルにホルマリン溶液を $100 \mu\text{l}$ 加え、細胞沈査を固定した。ホルマリン溶液を除去し、 1% クリスタルバイオレット溶液を $100 \mu\text{l}$ 加えて細胞沈査を染色した。水道水で洗浄した後に乾燥させ、各ウェルの染色された細胞層変性の有無を確認した。正常細胞層は陽性、変性細胞層は陰性とした。中和反応を示した血清の最高希釈倍率を用いて Lkt 中和抗体価とした。

(4) 測定成績の統計学的処理

成績は幾何学平均 \pm 標準誤差で示し、ワクチン接種群と対照群における接種日、ワクチンを接種した 2 週後、4 週後、8 週後および 12 週後の Lkt 中和抗体価を Student' s *t*-検定で比較し $P < 0.05$ を有意な差とした。

3) 黒毛和種子牛に対する *P.multocida*、*M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンによる呼吸器病の予防効果の検討

(1) 供試牛

供試牛は2006年11月から2008年10月の間に鹿児島県内の子牛育成農場に3~4ヵ月齢で導入された後、9~10ヵ月齢で市場に出荷された黒毛和種子牛1,058頭である。供試牛を *P.multocida*、*M.haemolytica* および *H.somni* の混合不活化ワクチンを接種したワクチン接種群(524頭)とワクチンを接種しなかった対照群(534頭)の2群に分類した。また、全ての供試牛は同じ給与飼料と飼養環境の下で管理した。

(2) *P.multocida*、*M.haemolytica*、*H.somni* 混合不活化ワクチン接種
接種群には農場導入日および導入4週後に *P.multocida*、*M.haemolytica*、*H.somni* 混合不活化ワクチン(キャトルバクト3, 微生物化学研究所(株), 京都)を筋肉内に2mL接種した。

(3) 呼吸器病の発生状況調査

農場への導入日から120日後までの観察期間中に、体温39.5℃以上の発熱、発咳、活力低下および異常呼吸音が聴取され、臨床的に治療が必要と認められた例を呼吸器病子牛とした。

(4) 血液検査

i) 血液採取

P.multocida、*M.haemolytica* および *H.somni* の抗体価測定の目的で、接種群の524頭から9頭および対照群の534頭から9頭を無作為に抽出して、導入日のワクチン接種前、導入4週後、8週後、12週後および16週後に10mL

シリンジを用いて頸静脈から採血を行ってプレーン管に注入し、プレーン管を遠心分離機で分離して得られた血清サンプルは測定まで -20°C で保存された。

ii) *P.multocida*, *M.haemolytica* および *H.somni* の抗体価測定

P.multocida 抗体価の測定は、ELISA 法で実施し、血清型 A3 型 (BP165 株) の抗粗精製菌体莢膜ポリクローナル血清 (凝集抗体価 2,048 倍) を炭酸緩衝液で希釈した後、マイクロプレートの全ウェルに $100\mu\text{l}$ 添加し 30°C で 2 時間感作した。プレート洗浄後、ブロック液 (ブロックエース粉末 1g を 100ml の精製水で溶解したもの) を全ウェルに $280\mu\text{l}$ 添加し 4°C で一晩感作後プレート洗浄し、次に粗精製菌体表面抗原を $100\mu\text{l}$ 全ウェルに添加し、 30°C で 30 分感作後、洗浄したものを抗体価測定用プレートとした。被検血清および参照血清を Tween リン酸緩衝液で 100 倍希釈から 2 倍階段希釈して抗体価測定用プレートに添加し、 30°C で 30 分感作した。プレート洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗牛 IgG 抗体 (Cappel 社, U.S.A) を全ウェルに添加し、 30°C で 30 分感作した。プレート洗浄後、基質溶液 (O-Phenylenediamine dihydrochloride 10mg をリン酸クエン酸緩衝液 25ml で溶解し過酸化水素 $10\mu\text{l}$ を加えたもの) を $100\mu\text{l}$ 全ウェルに添加し、 30°C で 30 分感作した後、反応停止液 (1M の硫酸溶液) を全ウェルに $50\mu\text{l}$ 添加した。測定は主波長 492nm 及び副波長 630nm で行い、これらの吸光度の差が 0.4 以上を示す最高希釈倍数を ELISA 抗体価とした。

M.haemolytica 抗体価の測定は、前節と同様な方法で行った。*H.somni* の抗体価の測定は、ELISA 法で実施し、Stephens ら [72] の方法に準じて実施した。被検血清および参照血清をポリソルベート 20 添加リン酸緩衝食塩液でそれぞれ 100 倍希釈したものを抗原吸着プレート (培養した *H.somni* の上清を

濾過したものを炭酸緩衝液で希釈し、各ウェルに 100 μ l 加えて、30°C で 2 時間反応させ、ポリソルベート 20 添加リン酸緩衝食塩液で洗浄後、オボアルブミン液(オボアルブミン 50mg をポリソルベート 20 添加リン酸緩衝液 100ml で溶解したもの)を各ウェルに 300 μ l ずつ加え、4°C で 4 時間反応させた後、ポリソルベート 20 添加リン酸緩衝液食塩液で洗浄したもの)に 100 μ l にずつ加え、30°C で 1 時間感作した。プレート洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗牛 IgG 抗体 (Cappel 社, U.S.A) を全ウェルに添加し、30°C で 1 時間感作した。プレート洗浄後、基質溶液 (α -フェニレンジアミン 2 塩酸 40mg をリン酸クエン酸緩衝液 100ml で溶解し過酸化水素 40 μ l を加えたもの) を 100 μ l 全ウェルに添加し、30°C で 1 時間感作した後、反応停止液 (1M の硫酸溶液) を全ウェルに 50 μ l 添加した。測定は主波長 492nm 及び副波長 630nm で行い、これらの差を吸光度 (Optical Density : OD) 値とした。

P.multocida の抗体価は 100 倍以上、*M.haemolytica* の抗体価は 200 倍以上、*H.somni* の OD 値は 0.6 以上を抗体陽性とした。100 倍未満の *P.multocida* の抗体価を 50 倍、200 倍未満の *M.haemolytica* 抗体価を 100 倍として抗体価の平均値を算出した。

(5) 測定成績の統計学的処理

両群の呼吸器病発症率を χ^2 検定により比較し $P < 0.05$ を有意な差と評価した。*P.multocida*、*M.haemolytica* の抗体価の成績は幾何平均 \pm 標準偏差、*H.somni* の OD 値の成績は平均 \pm 標準偏差で示し、Student' s *t*-検定にて群間で比較して $P < 0.05$ を有意な差とした。

3. 成績

1) 黒毛和種子牛の出生後における *M.haemolytica* 抗体価の推移

図1と表4に2繁殖農場 (Group1 および Group2) で出生した黒毛和種子牛における *M.haemolytica* 抗体価の推移を示した。

1 週齢、4 週齢、8 週齢、12 週齢、16 週齢および 20 週齢における *M.haemolytica* 抗体価は、Group1 がそれぞれ 230 ± 71 、 115 ± 35 、 100 ± 20 、 200 ± 40 、 264 ± 83 および 373 ± 137 、Group2 が 174 ± 70 、 87 ± 14 、 71 ± 15 、 87 ± 45 、 132 ± 152 および 283 ± 33 であり、両 Group 共に *M.haemolytica* に対する抗体価は 8 週齢まで漸次減少し、8 週齢の抗体価は 1 週齢に比較して有意 ($P < 0.05$) な低値を示した。8 週齢以降、両 Group は共に抗体価が増加し 20 週齢に Group1 が 373 ± 137 、Group2 が 283 ± 33 の値を示した。

図2に黒毛和種における 1 週齢の子牛 10 頭と母牛 10 頭の *M.haemolytica* 抗体価の相関性を示した。Group1 では相関係数 $0.689 (P = 0.027)$ 、Group2 では相関係数 $0.638 (P = 0.047)$ で有意な相関を認めた。

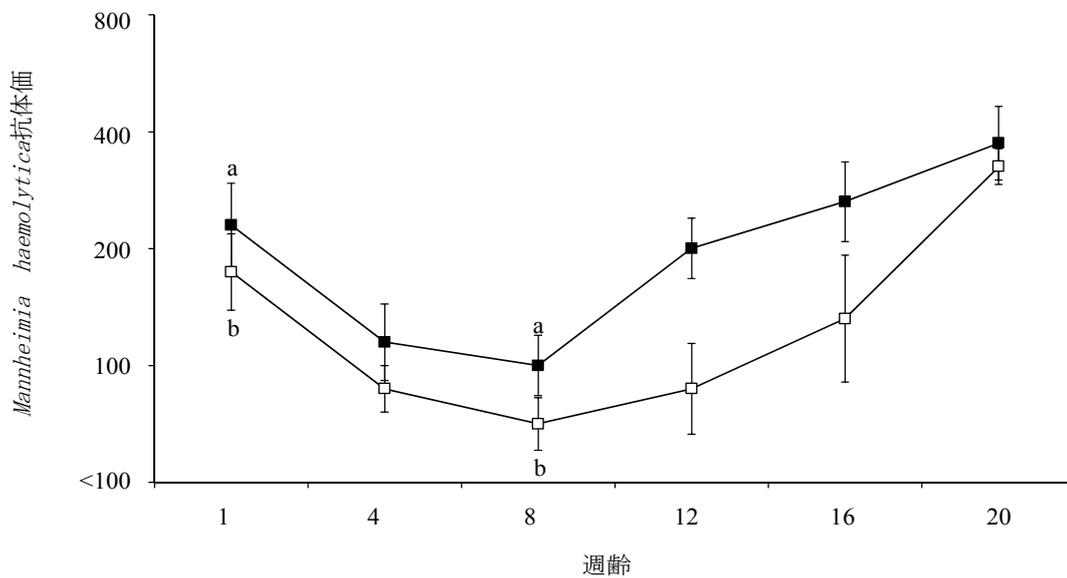


図1. 黒毛和種子牛の出生後におけるELISA法による*Mannheimia haemolytica*抗体価の推移
 Group1(■ : N=10), Group2(□ : N=10)
 同符号間で有意差あり (a-a, b-b : $P < 0.05$)

表4. ELISA法による*M.haemolytica* 抗体価の推移

		Group 1	Group 2
例数		10	10
観 測	1	230 ± 71 ^a	174 ± 70 ^b
	4	115 ± 35	87 ± 14
	8	100 ± 20 ^a	71 ± 15 ^b
	12	200 ± 40	87 ± 45
	16	264 ± 83	132 ± 152
	20	373 ± 137	283 ± 33

幾何平均±標準誤差

a-a, b-bの同符号間で有意差 ($P < 0.05$) 有り

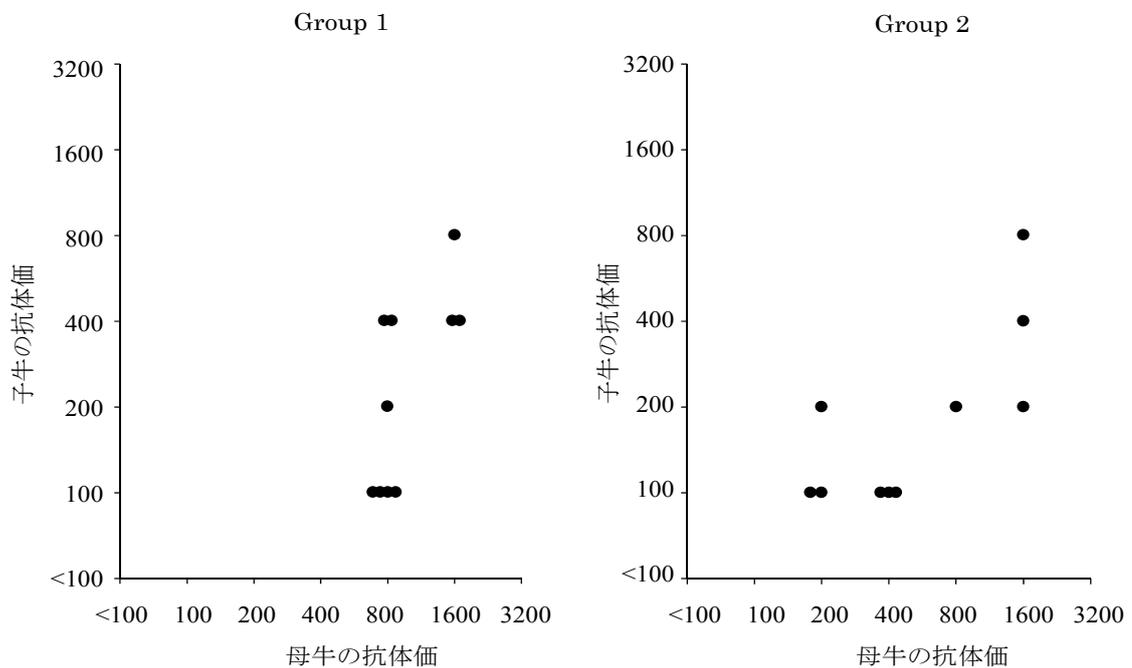


図2. 1週齢時の子牛と分娩1週後の母牛のELISA法による *Mannheimia haemolytica* 抗体価

Group1(■ : N=10), Group2(□ : N=10)

Group1の子牛の抗体価と母牛の抗体価との相関係数($r=0.689$, $p=0.027$)

Group2の子牛の抗体価と母牛の抗体価との相関係数($r=0.638$, $p=0.047$)

2) *M. haemolytica* 不活化ワクチンによる Lkt 中和抗体価の推移

黒毛和種子牛で行った *M. haemolytica* 不活化ワクチンの接種後における Lkt 中和抗体価の推移を図 3 と表 5 に示した。

ワクチンの接種前の 0 週、2 週後、4 週後、8 週後および 12 週後における Lkt 中和抗体価はワクチン接種群が 2.4 ± 3.5 、 7.6 ± 6.8 、 18.0 ± 8.3 、 38.0 ± 6.6 および 42.7 ± 5.4 、対照群が 2.8 ± 1.6 、 2.5 ± 2.9 、 8.3 ± 5.6 、 23.0 ± 7.2 および 22.6 ± 5.6 であり、両群共に 12 週後まで漸次増加して、ワクチン接種群は 2 週齢後以降、対照群は 4 週齢以降、接種前に比べて有意差 ($P < 0.05$) が

認められた。また、接種 12 週後において、ワクチン接種群は対照群に比較して有意 ($P<0.05$) な高値が認められた。

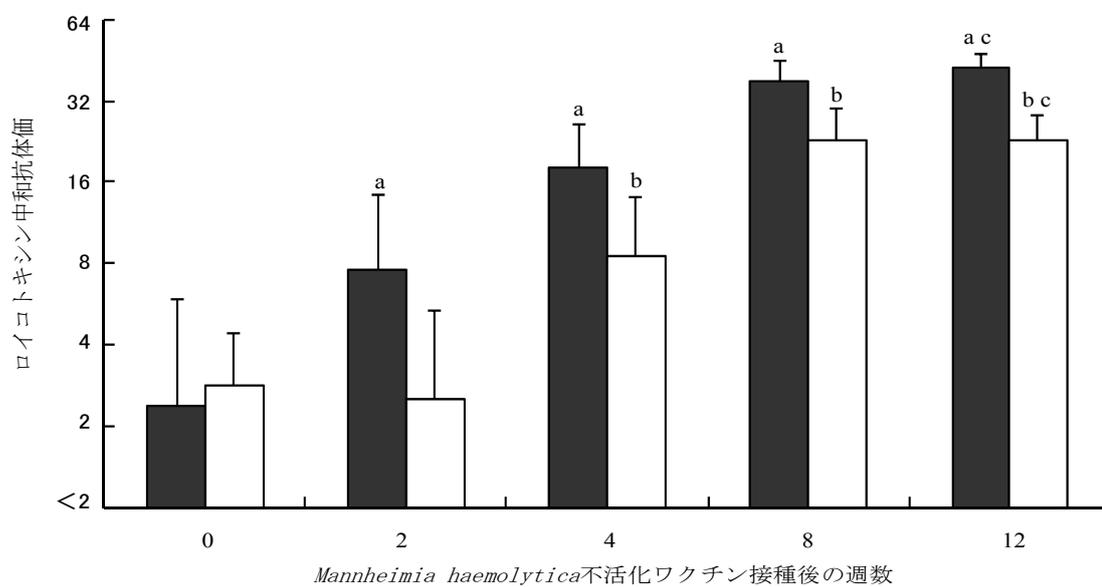


図3. ロイコトキシン中和抗体価の推移

ワクチン接種群(■:N=12), 対照群(□:N=12).

0週齢との間に有意差あり (a, b: $P<0.05$), 群間に有意差あり (c: $P<0.05$)

表5. ロイコトキシン中和抗体価の推移

		ワクチン接種群	対照群
例数		524	534
週 齢	0	2.4 ± 3.5	2.8 ± 1.6
	2	7.6 ± 6.8 ^a	2.5 ± 2.9
	4	18.0 ± 8.3 ^a	8.3 ± 5.6 ^b
	8	38.0 ± 6.6 ^a	23.0 ± 7.2 ^b
	12	42.7 ± 5.4 ^{a c}	22.6 ± 5.6 ^{b c}

幾何平均±標準誤差

a, b: 0週齢との間に有意差 ($P<0.05$) あり

c: 群間に有意差 ($P<0.05$) あり

3) *P.multocida*、*M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンの抗体価の推移ならびに呼吸器病の発生状況

P.multocida のワクチンの接種前、4 週後、8 週後、12 週後および 16 週後における抗体価は、ワクチン接種群がそれぞれ 92.6 ± 58.3 、 233.3 ± 130.2 、 370.3 ± 66.7 、 400.0 ± 156.3 および 400.0 ± 218.6 、対照群がそれぞれ 100.0 ± 112.1 、 171.4 ± 122.5 、 200.0 ± 224.2 、 252.0 ± 220.5 および 252.0 ± 136.4 であり、ワクチン接種群の 8 週後における *P.multocida* の抗体価は対照群と比較して有意 ($P<0.05$) な高値であった (表 6)。

M.haemolytica のワクチンの接種前、4 週後、8 週後、12 週後および 16 週後における抗体価は、ワクチン接種群がそれぞれ 92.6 ± 16.7 、 342.9 ± 290.6 、 466.6 ± 147.0 、 342.9 ± 63.3 および 317.5 ± 64.8 、対照群がそれぞれ 85.7 ± 46.4 、 171.4 ± 309.0 、 185.2 ± 76.6 、 272.2 ± 155.0 および 342.9 ± 61.9 であり、ワク

チン接種群の8週後における *M.haemolytica* の抗体価は対照群と比較して有意 ($P<0.05$) な高値を示した (表7)。

H.somni のワクチンの接種前、4週後、8週後、12週後および16週後における OD 値は、ワクチン接種群がそれぞれ 0.18 ± 0.04 、 0.46 ± 0.08 、 0.82 ± 0.11 、 0.68 ± 0.07 および 0.85 ± 0.01 、対照群がそれぞれ 0.45 ± 0.07 、 0.38 ± 0.05 、 0.55 ± 0.09 、 0.65 ± 0.10 および 0.47 ± 0.03 であり、ワクチン接種群の16週後の *H.somni* 抗体価は対照群と比較して有意 ($P<0.05$) な高値を示した (表8)。

表6. *Pasteurella multocida* のELISA抗体価の推移

	接種前	4週後	8週後	12週後	16週後
ワクチン接種群 (N=9)	92.6 ± 58.3 (6/9)*	233.3 ± 130.2 (8/9)	370.3 ± 66.7 [‡] (9/9)	400.0 ± 156.3 (9/9)	400.0 ± 218.6 (9/9)
対照群 (N=9)	100.0 ± 112.1 (6/9)	171.4 ± 122.5 (9/9)	200.0 ± 224.2 (9/9)	252.0 ± 220.5 (9/9)	252.0 ± 136.4 (9/9)

幾何平均±標準偏差

(*):抗体陽性牛/供試牛, ELISA抗体価100倍以上を抗体陽性とした, (‡): $P<0.05$,対照群との比較

表7. *Mannheimia haemolytica* のELISA抗体価の推移

	接種前	4週後	8週後	12週後	16週後
ワクチン接種群 (N=9)	92.6 ± 16.7 (0/9)*	342.9 ± 290.6 (8/9)	466.6 ± 147.0 [‡] (9/9)	342.9 ± 63.3 (9/9)	317.5 ± 64.8 (9/9)
対照群 (N=9)	85.7 ± 46.4 (1/9)	171.4 ± 309.0 (4/9)	185.2 ± 76.6 (5/9)	272.2 ± 155.0 (8/9)	342.9 ± 61.9 (9/9)

幾何平均±標準偏差

(*):抗体陽性牛/供試牛, ELISA抗体価200倍以上を抗体陽性とした, (‡): $P<0.05$,対照群との比較

表8. *Histophilus somni* のOD値の推移

	接種前	4週後	8週後	12週後	16週後
ワクチン接種群 (N=9)	0.18 ± 0.04 (0/9)*	0.46 ± 0.08 (1/9)	0.82 ± 0.11 (5/9)	0.68 ± 0.07 (5/9)	0.85 ± 0.10 [‡] (8/9)
対照群 (N=9)	0.45 ± 0.07 (2/9)	0.38 ± 0.05 (1/9)	0.55 ± 0.09 (2/9)	0.65 ± 0.10 (4/9)	0.47 ± 0.03 (1/9)

幾何平均±標準偏差

(*):抗体陽性牛/供試牛, OD値0.6以上を抗体陽性とした, (‡): $P<0.05$,対照群との比較

黒毛和種子牛のワクチン接種後 120 日間における呼吸器病の発症頭数はワクチンの接種を行ったワクチン接種群が 524 頭中の 242 頭 (46.2%)、ワクチン接種を行わなかった対照群が 534 頭中の 341 頭 (63.9%) であり、ワクチン接種群は対照群に比較して有意 ($P<0.01$) な発病率の減少が確認された (表 9)。

表9 ワクチン接種後120日間の呼吸器病の発症状況

群	頭数	発症頭数	発症率(%)
ワクチン接種群	524	242	46.2 ^a
対照群	534	341	63.9 ^a

a: 同符号間で有意差 ($P<0.01$) あり

4. 考 察

M. haemolytica 感染による呼吸器病子牛は死廃のリスクが高く、治癒例における増体重も健康子牛に比べて低く、*M. haemolytica* 感染による呼吸器病は子牛における生産性の大きな阻害要因[43, 49, 71]になっており、特に、肉生産が目的である黒毛和種子牛にとっては重要な疾病である。また、病原性の高い *M. haemolytica* に罹患した呼吸器病の子牛は病勢が重篤であり、抗生物質療法を行っても治療効果が低い[39, 54]。

M. haemolytica 感染によるマンヘミア性肺炎が重篤化する理由としては、*M. haemolytica* が Lkt 外毒素を分泌することによって好中球を主体とする白血球を破壊し、その際に放出される過酸化水素、活性酸素、蛋白分解酵素などにより肺組織に障害を与えて線維素性肺炎を引き起こし、さらに他の病原体と複合感染することによって病勢が悪化することに起因する[32, 85]。したがって、*M. haemolytica* 感染による子牛の呼吸器病に対しては抗生物質療法よりも予防に重点を置いたワクネーションによる予防対策の確立が切望されている。

子牛は反芻動物の特異的な胎盤構造のために分娩前に母体からの免疫グロブリンの移行がなく、 γ グロブリンの少ない状態で出生し、出生後 24 時間以内に受動免疫を獲得するために母牛から初乳中の免疫グロブリンを摂取して吸収する[7]。したがって、初乳から獲得した移行抗体は子牛における感染症の予防にとって最も重要な感染予防因子である。しかし、弱毒化した微生物を使用して液性免疫と細胞性免疫が獲得できる生ワクチンを接種する際には、子牛の移行抗体の存在が子牛の能動的な抗体産生を減弱させる[12, 21, 50] 可能性があり、また、化学処理などによって死んだ微生物を使用して液性免疫を獲得する不活化ワクチンを接種する際には、病原微生物に対する移行抗体が最も低下する時期に投与することが有益である。すなわち、子牛に対し

て有効なワクチン接種を行うためには、病原微生物に対する移行抗体の推移に基づいた効果的なワクチン接種プログラムを構築する上で移行抗体の推移を知ることが重要であるが、野外の子牛における病原微生物に対する移行抗体の推移、特に、病原性の高い *M.haemolytica* の移行抗体の推移の国内における報告はない。

そこで本章では、野外の黒毛和種子牛におけるワクチン接種を行う適正な時期を特定する目的で、黒毛和種子牛における出生時からの *M.haemolytica* に対する抗体価の推移を測定し、さらに、市販されている *M.haemolytica* 不活化ワクチンと *P. multocida*, *M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンの呼吸器病ワクチンを黒毛和種子牛に接種して *M.haemolytica* の Lkt 中和抗体価と *P. multocida*, *M.haemolytica* および *H.somni* の ELISA 抗体価ならびに呼吸器病の発病率をワクチン接種していない対照群と比較検討した。

その結果、黒毛和種子牛における *M.haemolytica* 抗体価は出生後から漸次減少して生後 8 週齢に最低値となり、その後、生後 20 週齢まで増加する傾向を示した。したがって、通常は生後 2~3 ヶ月齢以降にワクチン接種が行われているが、本研究において黒毛和種子牛に対する *M.haemolytica* 不活化ワクチン接種の時期は生後 8 週齢前後に行うことが有益であることが確認された。ホルスタイン種とヘレフォード種の子牛における *M.haemolytica* の移行抗体は、それぞれ 5 週齢と 60 日齢まで減少し、その後、自然感染により漸次上昇したと報告されている [28, 63]。今回の黒毛和種子牛における *M.haemolytica* 抗体価も 8 週齢まで漸次減少し、その後、上昇したことから、本研究を行った供試農場内においても *M.haemolytica* の自然感染の関与が示唆された。また、新生子牛と母牛の抗体価は関連すると報告 [27, 30] されており、本研究の黒毛和種の母子における *M.haemolytica* 抗体価も相関していたことから、

子牛に *M.haemolytica* ワクチンを接種する際には、母牛の *M.haemolytica* 抗体価を考慮する必要があると考えられた。

さらに、子牛育成農場に導入された 3～5 ヶ月齢の黒毛和種子牛へ *M.haemolytica* 不活化ワクチンを行ったところ、Lkt 中和抗体価は、接種 2 週間後から対照群に比べて高値を示したことから、*M.haemolytica* 不活化ワクチンは自然感染に先行して子牛に早期かつ確実な抗体賦与が可能であることが示唆された。

また、本研究で 3～4 ヶ月齢の黒毛和種子牛に対して *P.multocida*、*M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンの接種を行ったところ、対照群における呼吸器病の発症率が 63.9%であったのに対してワクチン接種群が 46.2%であり、対照群に比較して接種群における呼吸器病の発症率の低下が確認された。これは、ワクチン接種群が *P.multocida*、*M.haemolytica* および *H.somni* に対する免疫が賦与されたことに起因するものであり、黒毛和種子牛の呼吸器病の予防に対する *P.multocida*、*M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンの有効性が示唆された。

本研究では、黒毛和種子牛における *M.haemolytica* の抗体価は出生後から漸次減少して生後 8 週齢に最低値となり、その後、増加する傾向を示したことから黒毛和種子牛に対する *M.haemolytica* 不活化ワクチン接種の時期は生後 8 週齢前後に行うことが有益であることが確認された。また、*M.haemolytica* 不活化ワクチンの接種は自然感染に先行して子牛に早期かつ確実な抗体賦与が可能であり、*P.multocida*、*M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンの接種によって抗体価が増加して呼吸器病が減少することが確認された。

5. 小 括

呼吸器病は子牛における生産性の大きな阻害要因になっており、特に、肉生産が目的である黒毛和種子牛にとっては重要な疾病である。また、病原性の高い *M.haemolytica* に罹患した呼吸器病の子牛は病勢が重篤であり、抗生物質療法を行っても治療効果が低い。したがって、*M.haemolytica* 感染による子牛の呼吸器病に対しては抗生物質療法よりも予防に重点を置いたワクチンによる予防対策の確立が切望されている。

本研究では、子牛におけるワクチンを行う適正時期を特定する目的で、黒毛和種子牛における出生時からの *M.haemolytica* に対する抗体価の推移を測定し、さらに、市販されている *M.haemolytica* 不活化ワクチンと *P.multocida*、*M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンによる黒毛和種子牛の呼吸器病の予防効果を検討する目的で、ワクチン接種群とワクチンを接種しなかった対照群における *M.haemolytica* の Lkt 中和抗体価と *P.multocida*、*M.haemolytica* および *H.somni* の ELISA 抗体価ならびに呼吸器病の発病率を比較検討した。

その結果、黒毛和種子牛における *M.haemolytica* の抗体価は出生後から漸次減少して生後 8 週齢に最低値となり、その後、増加する傾向を示したことから黒毛和種子牛に対する *M.haemolytica* ワクチン接種の時期は生後 8 週齢前後に行うことが有益であることが確認された。また、*M.haemolytica* 不活化ワクチンの接種は自然感染に先行して子牛に早期かつ確実な抗体賦与が可能であり、*P.multocida*、*M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンの接種によって抗体価が増加して呼吸器病が減少することが確認された。

第Ⅲ章 黒毛和種子牛における血清ビタミン E 濃度と呼吸器病ワクチン 接種による抗体産生との関連性

1. 序 文

第 I 章の研究において、病原性の高い *M.haemolytica* に罹患した呼吸器病子牛の臨床例は高度な肺組織の炎症病変に起因する肺機能の著しい低下、炎症性の血液変化およびサイトカインの産生を伴う重篤な臨床症状を示す難治性の呼吸器病であることが明らかになった。また、第 II 章の研究では、黒毛和種子牛におけるワクチネーションを行う適正な時期を特定する目的で、出生時からの *M.haemolytica* に対する抗体価の推移を観察したところ、黒毛和種子牛における *M.haemolytica* 抗体価は出生後から漸次減少して生後 8 週齢に最低値となったことから、*M.haemolytica* 不活化ワクチン接種の時期は生後 8 週齢前後に行うことが有益であることが確認された。さらに、市販されている *M.haemolytica* 不活化ワクチンと *P. multocida*, *M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンによる黒毛和種子牛の呼吸器病の予防効果を検討する目的で、ワクチン接種群と対照群における Lkt 中和抗体価と呼吸器病の発病率を比較したところ、*M.haemolytica* 不活化ワクチンの接種によって子牛に確実に抗体賦与され、*P.multocida*, *M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンの接種によって抗体価が増加して呼吸器病が減少することが確認された。

また、子牛における最大限のワクチン効果を得るためには、ワクチン接種する子牛の栄養状態が重要であり、近年、ワクチン効果を上げる子牛の栄養素の一つとして血中ビタミン E 濃度が注目されている[37]。ビタミン E は、生体の抗活性酸素剤として作用し、生体膜のリン脂質中の高度不飽和脂肪酸の過酸化を防止して生体膜の安定性を保持し、免疫機能の活性効果を持つとされている[37]。これまでに、血液中のビタミン E 濃度の低いヒトではワクチンによる抗体産生が低いことが明らかにされているが[25]、子牛における血中ビタミン E 濃度とワクチン接種後の抗体産生の関連性についてはまだ明ら

かにされていない。

そこで、本章では、呼吸器病ワクチンを接種した子牛の抗体産生とワクチン接種時における栄養状態、特に、血清ビタミン E 濃度との関連性を明らかにする目的で、黒毛和種子牛における呼吸器病ワクチン接種時の血清ビタミン E 濃度とワクチン接種後の抗体産生との関係を検討すると同時に、ワクチン接種による抗体産生に対するビタミン E 添加の効果についての検討を行った。

2. 材料と方法

1) 黒毛和種子牛の血清ビタミン E 濃度と *M.haemolytica* 不活化ワクチン接種後の抗体産生との関連性

(1) 供試牛

供試牛は、鹿児島県内の子牛育成農場に導入された 3~5 ヶ月齢の黒毛和種子牛 12 頭である。供試牛 12 頭をワクチン接種時に血清ビタミン E 濃度が 100 μ g/dl 未満であった低ビタミン E 群 (4 頭)、100 μ g/dl 以上であった高ビタミン E 群 (4 頭) および血清ビタミン E 濃度 100 μ g/dl 以上でワクチンを接種しなかった未接種群 (4 頭) の 3 群に分類した。

(2) *M.haemolytica* 不活化ワクチン接種

低ビタミン E 群と高ビタミン E 群に対して *M.haemolytica* 血清型 1 型不活化ワクチン (リスポバル, ファイザー (株), 東京) を頸部皮下に 2mL 接種した。

(3) 血液検査

i) 血液採取

採血はワクチンの接種日、接種 2 週後、4 週後、8 週後および 12 週後に頸静脈から 10mL シリンジを用いて行って採取した血液をプレーン採血管に分注し、プレーン採血管を遠心分離して得られた血清サンプルは測定まで -20°C で保存した。

ii) Lkt 中和抗体価検査

Lkt 中和抗体価の測定は前章と同様な方法で行った。

iii) 血清ビタミン E 濃度測定

血清ビタミン E 濃度の測定は高速液体クロマトグラフィー法（高速液体クロマトグラフ LC-2000, 日本分光 (株), 東京) で行った[18]。

(4) 測定成績の統計学的処理

成績は抗体価については幾何平均±標準誤差で示し、血清ビタミン E 濃度については平均±標準誤差で示した。*Tukey-Kramer* 検定にて群間で比較し $P<0.05$ を有意な差と判断した。

2) 黒毛和種子牛に対するビタミン E 添加による BHV-1 生ワクチン接種における抗体産生効果についての検討

(1) 供試牛

供試牛は 1 農場で飼養されていた黒毛和種子牛の中から無作為に選んだ 30 頭であり、出生後に母牛の初乳を十分量摂取させ、その後、個別のカーフハ

ッチにおいて3ヵ月齢まで代用乳を給与し、離乳後はグループのペンに移動して飼養された。30頭の供試牛を1ヵ月齢から3ヵ月齢までの期間、代用乳に日量300IUのビタミンE（ビタミンE50%粉末，新和成，中国）を添加したビタミンE群（15頭）とビタミンEを添加しなかった対照群（15頭）の2群に分類した。

（2）BHV-1 生ワクチン接種

全ての供試牛に対して、2ヵ月齢と3ヵ月齢の2回、BHV-1生ワクチン（IBRワクチン-KB，微生物化学研究所（株），京都）を筋肉内に2mL接種した。

（3）血液検査

i) 血液採取

採血は生後1ヵ月齢、2ヵ月齢、3ヵ月齢および4ヵ月齢時に頸静脈から10mL シリンジを用いて行って採取した血液をプレーン採血管に分注し、プレーン採血管を遠心分離して得られた血清サンプルは測定まで -20°C で保存した。

ii) BHV-1 中和抗体価測定

BHV-1 中和抗体価の測定は、これまでの報告に準じて行った[10]。被検血清を 56°C で30分加温後、5%ウシ胎児血清を添加したDMEM培地にてマイクロタイタープレートの各ウェルが $50\mu\text{l}$ となるように2倍階段希釈した。各ウェルにウイルス液（BHV-1（No.758株）を200TCID₅₀/ $50\mu\text{l}$ になるように調整したもの）を $50\mu\text{l}$ 加えた。プレートを5%CO₂存在下にて 37°C で24時間感作後、全ウェルにCRF細胞浮遊液を $100\mu\text{l}$ 添加し、5%CO₂存在下にて 37°C で6日間培養した。顕微鏡下で細胞変性効果を確認し、変性を抑制

した血清の最高希釈倍数の逆数を中和抗体価とした。

iii) 血清ビタミン E 濃度測定

血清ビタミン E 濃度の測定は高速液体クロマトグラフィー法（高速液体クロマトグラフ LC-2000, 日本分光（株）, 東京）によって行った[18]。

(4) 測定成績の統計学的処理

成績は抗体価については幾何平均±標準誤差で示し、血清ビタミン E 濃度については平均±標準誤差で示した。Student' s *t*-検定にて抗体価および血清ビタミン E 濃度を群間で比較し $P<0.05$ を有意な差と判断した。

4. 成績

1) 血清ビタミン E 濃度と Lkt 中和抗体価の推移

低ビタミン E 群、高ビタミン E 群および未接種群の 3 群における血清ビタミン E 濃度の推移を図 4 と表 10 に示した。

ワクチン接種日、ワクチン接種した 2 週後、4 週後、8 週後および 12 週後における血清ビタミン E 濃度は、低ビタミン E 群がそれぞれ $67.1 \pm 7.1 \mu\text{g/dl}$ 、 $73.0 \pm 7.6 \mu\text{g/dl}$ 、 $63.0 \pm 5.6 \mu\text{g/dl}$ 、 $86.0 \pm 9.9 \mu\text{g/dl}$ および $74.0 \pm 9.1 \mu\text{g/dl}$ 、高ビタミン E 群が $160.1 \pm 18.8 \mu\text{g/dl}$ 、 $66.0 \pm 10.6 \mu\text{g/dl}$ 、 $57.0 \pm 0.7 \mu\text{g/dl}$ 、 $82.0 \pm 20.0 \mu\text{g/dl}$ および $80.0 \pm 13.0 \mu\text{g/dl}$ 、未接種群が $142.4 \pm 24.0 \mu\text{g/dl}$ 、 $71.8 \pm 7.4 \mu\text{g/dl}$ 、 $65.0 \pm 8.1 \mu\text{g/dl}$ 、 $100.0 \pm 4.7 \mu\text{g/dl}$ および $77.0 \pm 7.1 \mu\text{g/dl}$ であり、ワクチン接種時、低ビタミン E 群は高ビタミン E 群および未接種群と比較して有意 ($P<0.05$) な低値であった。また、高ビタミン E 群と未接種群はワクチン接種 2 週後に減少し、ワクチン接種 2 週後以降、3 群はほぼ同様な値で推移した。

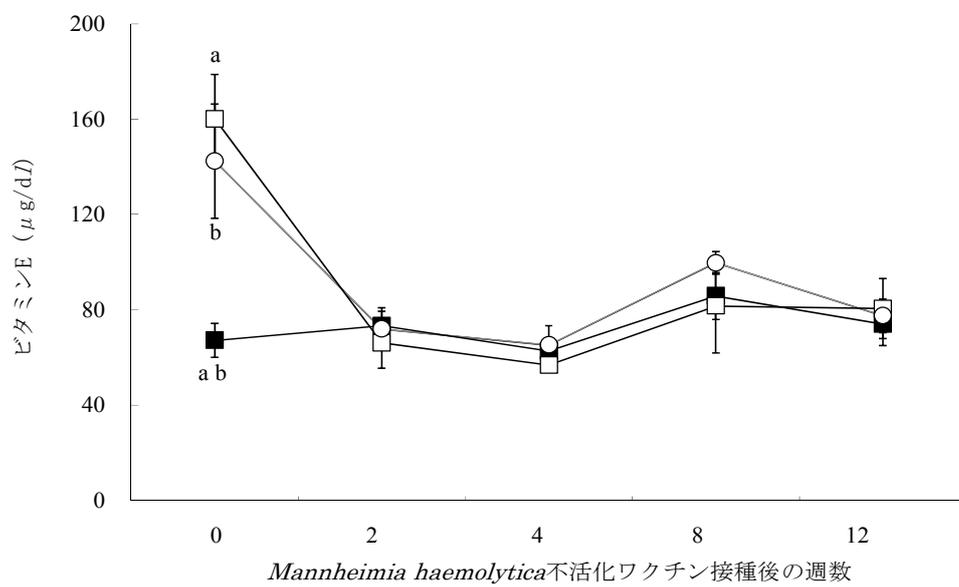


図4. 血清ビタミンE濃度の推移

ワクチン接種時血清ビタミンE100 $\mu\text{g/dl}$ 未満群 (■:N=4), 血清ビタミンE100 $\mu\text{g/dl}$ 以上群 (□:N=4)
 ワクチン未接種群 (○:N=4)

同符号間で有意差あり (a-a, b-b: $P < 0.05$)

表10. 血清ビタミンE濃度 (μ g/dl) の推移

		低ビタミンE群	高ビタミンE群	未接種群
例数		4	4	4
ワクチン接種後週	0	67.1 \pm 7.1 ^{a b}	160.1 \pm 18.8 ^a	142.4 \pm 24.0 ^b
	2	73.0 \pm 7.6	66.0 \pm 10.6	71.8 \pm 7.4
	4	63.0 \pm 5.6	57.0 \pm 0.7	65.0 \pm 8.1
	8	86.0 \pm 9.9	82.0 \pm 20.0	100.0 \pm 4.7
	12	74.0 \pm 9.1	80.0 \pm 13.0	77.0 \pm 7.1

平均 \pm 標準誤差

低ビタミンE群 : 血清ビタミンE 100 μ g/dl 未満

高ビタミンE群 : 血清ビタミンE 100 μ g/dl 以上

未接種群: ワクチン未接種

同符号間で有意差 (a-a, b-b: $P < 0.05$) あり

低ビタミン E 群、高ビタミン E 群および未接種群の 3 群における *M.haemolytica* 不活化ワクチン接種後における Lkt 中和抗体価の推移を図 5 と表 11 に示した。

ワクチン接種日、ワクチン接種した 2 週後、4 週後、8 週後および 12 週後における Lkt 中和抗体価は、低ビタミン E 群がそれぞれ 1.2 \pm 0.3 倍、3.4 \pm 1.4 倍、4.8 \pm 1.5 倍、27.0 \pm 11.5 倍および 32.0 \pm 0、高ビタミン E 群が 1.0 \pm 0.0 倍、5.7 \pm 7.3 倍、38.1 \pm 12.0 倍、54.0 \pm 8.0 倍および 53.8 \pm 8.0、未接種群が 1.4 \pm 0.3 倍、1.0 \pm 0.0 倍、3.4 \pm 1.4 倍、19.0 \pm 13.3 倍および 19.0 \pm 6.0 であり、高ビタミン E 群はワクチン接種 4 週後に低ビタミン E 群と、ワクチン接種 12 週後に未接種群と比較して有意 ($P < 0.05$) な高値が認められた。低ビタミン群と未接種群の Lkt 中和抗体価の推移には有意差は認められなかった。

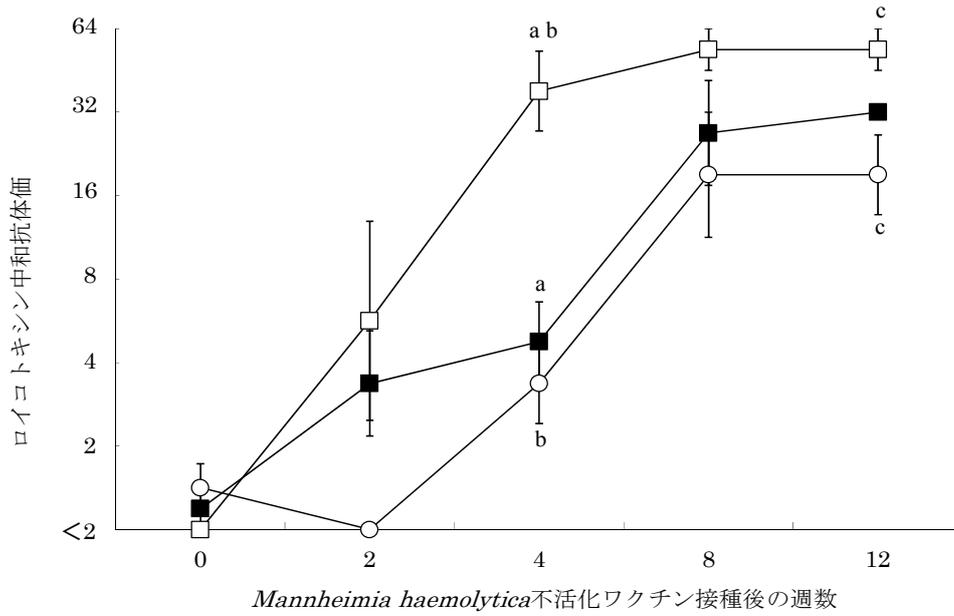


図5. ロイコトキシン中和抗体価の推移

ワクチン接種時血清ビタミンE100 μ g/dl未満群 (■:N=4), 血清ビタミンE100 μ g/dl以上群 (□:N=4)
 ワクチン未接種群 (○:N=4)

同符号間で有意差あり (a-a, b-b, c-c: $P < 0.05$)

表11. ロイコトキシン中和抗体価の推移

		低ビタミンE群	高ビタミンE群	未接種群
例数		4	4	4
ワクチン接種後週	0	1.2 ± 0.3	1.0 ± 0.0	1.4 ± 0.3
	2	3.4 ± 1.4	5.7 ± 7.3	1.0 ± 0.0
	4	4.8 ± 1.5 ^a	38.1 ± 12.0 ^{a,b}	3.4 ± 1.4 ^b
	8	27.0 ± 11.5	54.0 ± 8	19.0 ± 13.3
	12	32.0 ± 0.0	53.8 ± 8.0 ^c	19.0 ± 6.0 ^c

幾何平均±標準誤差

低ビタミンE群 : 血清ビタミンE 100 μg/dl 未満

高ビタミンE群 : 血清ビタミンE 100 μg/dl 以上

未接種群: ワクチン未接種

同符号間で有意差あり(a-a, b-b, c-c : $P < 0.05$)

2) ビタミン E 添加による血清ビタミン E 濃度と BHV-1 抗体価の推移

代用乳にビタミン E を添加したビタミン E 群と対照群における血清ビタミン E 濃度の推移を図 6 と表 12 に示した。

ビタミン E 添加前の 1 ヶ月齢における血清ビタミン E 濃度は、ビタミン E 添加群が $360.0 \pm 29.1 \mu\text{g/dl}$ 、対照群が $291.0 \pm 24.9 \mu\text{g/dl}$ であり両群に差はなかった。2、3 および 4 ヶ月齢では、対照群における血清ビタミン E 濃度はそれぞれ $254.4 \pm 21.4 \mu\text{g/dl}$ 、 $201.3 \pm 28.5 \mu\text{g/dl}$ および $107.9 \pm 15.2 \mu\text{g/dl}$ であったのに対して、ビタミン E を添加したビタミン E 添加群は $533.7 \pm 51.5 \mu\text{g/dl}$ 、 $356.3 \pm 34.1 \mu\text{g/dl}$ および $168.3 \pm 19.4 \mu\text{g/dl}$ であり、ビタミン E 添加群は対照群に比較し高値を示し 2 ヶ月齢 ($P < 0.01$)、3 ヶ月齢 ($P < 0.01$) および 4 ヶ月齢 ($P < 0.05$) にそれぞれ有意差が認められた。

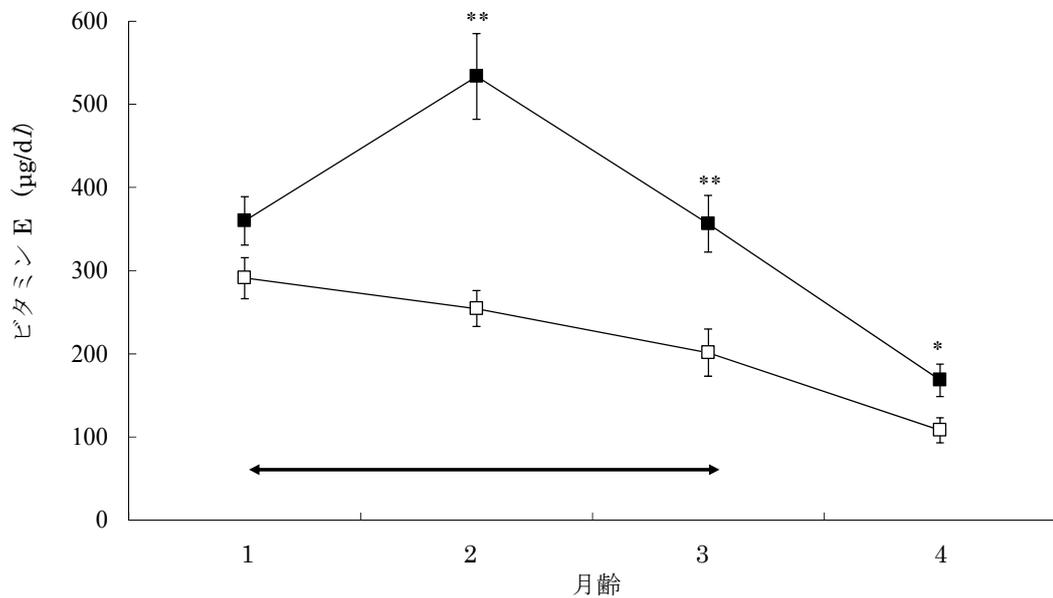


図6. 血清ビタミンE濃度の推移

ビタミンE添加群(■:N=15), 対照群(□:N=15). 矢印はビタミンE添加期間
群間で有意差あり(*:P<0.05, **:P<0.01)

表12. 血清ビタミンE濃度(µg/dl)の推移

	ビタミンE添加群	対照群	有意差
例数	15	15	
品種	黒毛和種	黒毛和種	
1ヵ月齢	360.0 ± 29.1	291.0 ± 24.9	
2ヵ月齢	533.7 ± 51.5	254.4 ± 21.4	P<0.01
3ヵ月齢	356.3 ± 34.1	201.3 ± 28.5	P<0.01
4ヵ月齢	168.3 ± 19.4	107.9 ± 15.2	P<0.05

平均±標準誤差

代用乳にビタミンEを添加したビタミン添加E群と対照群におけるBHV-1に対する抗体価の推移を図7と表13に示した。

1ヵ月齢、2ヵ月齢、3ヵ月齢および4ヵ月齢におけるBHV-1抗体価は、ビタミンE添加群がそれぞれ 31.4 ± 16.3 倍、 19.4 ± 4.6 倍、 7.8 ± 2.0 倍および 16.5 ± 4.0 倍、対照群が 36.0 ± 19.4 倍、 20.0 ± 5.1 倍、 10.2 ± 2.7 倍および 8.2 倍であり、両群ともに最も高値を示した。対照群は2ヵ月齢以降、抗体価が漸次減少して4ヵ月齢に最低値を示した。一方、ビタミンE添加群は2ヵ月齢以降に減少して3ヵ月齢に最低値を示した後、4ヵ月齢に再び増加し、4ヵ月齢において対照群との間に有意な差 ($P < 0.01$) が認められた。

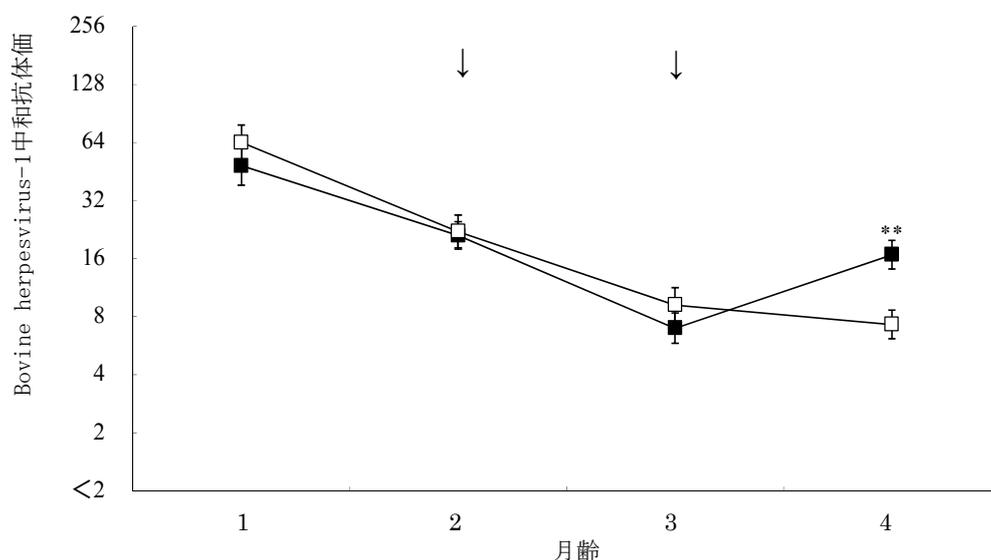


図7. Bovine herpesvirus-1中和抗体価の推移
 ビタミンE添加群(■: N=15), 対照群(□: N=15). 矢印はワクチン接種
 群間で有意差あり (**: $P < 0.01$)

表13. Bovine herpesvirus-1 中和抗体価の推移

	ビタミンE添加群	対照群	有意差
例数	15	15	
品種	黒毛和種	黒毛和種	
1ヵ月齢	48.5 ± 16.3	64.0 ± 19.4	
2ヵ月齢	21.1 ± 4.6	22.1 ± 5.1	
3ヵ月齢	7.0 ± 2.0	9.2 ± 2.7	
4ヵ月齢	16.8 ± 4.0	7.3 ± 1.8	<i>P</i> <0.01

幾何平均±標準誤差

4. 考 察

子牛において最大限のワクチン効果を得るためには、子牛の移行抗体の推移に基づいた日齢に接種すると同時に、ワクチン接種する子牛の栄養状態が重要であり、近年、ワクチン効果に関与する子牛の栄養要因の一つとして血中ビタミン E 濃度が注目されている[37]。

ビタミン E は動物の CD4⁺T 細胞の活性と増殖を促進することが知られている[24, 41, 75]。また、ヒトではビタミン E の投与によって血中インターロイキン(IL) -4 が上昇することが報告されている[58]。ヘルパーT (Th) 細胞が主である CD4⁺T 細胞は、産生するサイトカインにより Th1 細胞と Th2 細胞に分類される[47]。Th2 細胞は B 細胞からの抗体産生を促進させて体液性免疫を誘導する IL-4 や IL-6 などのサイトカインを産生する[47]。一方、血清ビタミン E 濃度が低下している動物では、マクロファージなどの樹状細胞

の貪食能と抗原提示能が減弱し、その後の免疫記憶能も低下すると報じられている[22, 24, 66]。さらに、血清ビタミン E 濃度が低下すると、T 細胞および B 細胞の活性と増殖が減弱して、Th1 細胞から分泌されるサイトカインと Th2 細胞から分泌される IL-4 などのサイトカインが減少することが確認されている[1, 8, 20]。また、血清ビタミン E 濃度が低値なヒトやビタミン E 給与が不足したマウスでは抗原接種後の抗体産生が低く推移したとの報告がある[25, 75]。

本研究において、黒毛和種子牛における血清ビタミン E 濃度と *M.haemolytica* 不活化ワクチン接種後における Lkt 中和抗体価の推移との関連性を検討したところ、高ビタミン E 群の抗体価は低ビタミン E 群と未接種群に比べてワクチン接種 2 週後以降、高値で推移することが確認された。また、低ビタミン E 群の Lkt 中和抗体価は、未接種群と同様に推移を示したことから、低ビタミン E 群ではワクチン接種時におけるビタミン E 低下により、マクロファージなどの樹上細胞の貪食能と抗原提示能の減弱、および B 細胞の活性と増殖の減弱によってワクチン抗原に対する反応性が低く、抗体産生能が低下していたと推察した。したがって、血清ビタミン E 濃度が低値の子牛に比べて高値の子牛の方が有益なワクチン効果を得ることが確認され、感染症の予防対策としてワクチン接種を行う際にはビタミン E が栄養要因の一つであることが推察された。

さらに、本研究において、黒毛和種子牛における血清ビタミン E 濃度とワクチン抗体産生との関連性を知る目的で、代用乳にビタミン E を添加したビタミン E 添加群と対照群との血清ビタミン E 濃度と BHV-1 のワクチン抗体価との推移を比較した。その結果、対照群の血清ビタミン E 濃度は 2 ヶ月齢以降、漸次低下したのに対して、ビタミン E 添加群における血清ビタミン E 濃度は対照群に比べて高値で推移したことから、ビタミン E の添加によって

黒毛和種子牛の血清ビタミン濃度が高値で維持されることが確認された。また、黒毛和種子牛のビタミン E 添加群における血清ビタミン濃度は 2 ヶ月齢に最高値を示した後、漸次低下する傾向を示したが、この血清ビタミン濃度の推移はホルスタイン種子牛に対するビタミン E の経口投与試験の報告[65]とほぼ同様な推移であった。この血清ビタミン E 濃度の推移は離乳に伴うビタミン E の吸収量の低下が関与[2, 67]していると考えられており、本研究の黒毛和種子牛における血清ビタミン E 濃度の推移も同様な要因であったと推察した。

さらに、対照群とビタミン E を添加したビタミン E 添加群の黒毛和種子牛の両群に対して生後 2 ヶ月齢と 3 ヶ月齢の 2 回、BHV-1 生ワクチンを接種したところ、対照群の BHV-1 ワクチン抗体価は漸次低下したのに対して、ビタミン E 添加群では 2 回目ワクチン接種後の 4 ヶ月齢に増加したが、この抗体価の増加はワクチンのブースター効果に起因するものであると考えられた。血中ビタミン E 濃度が高い動物では、マクロファージの貪食能が高く、T 細胞および B 細胞の活性と増殖が促進されると報じられている[11, 46, 60, 66]。また、バッファロー子牛にビタミン E を経口投与したところ、血清ビタミン E 濃度が上昇して *P.multocida* ワクチン接種による抗体産生が増加したとする報告[64]があるが、本研究で得られた成績はそれらの報告を指示するものであると考えられた。さらに、ビタミン E を経口投与したホルスタイン種子牛に対して BHV-1 生ワクチンの接種を行ったところ、ワクチンの抗体産生が助長されたとする報告[66]があることから、本研究のビタミン E 群で確認されたワクチンのブースター効果は、ビタミン E の添加によって黒毛和種子牛の免疫機能が増加したことに起因するものであると推察した。

今回の研究において、血清ビタミン E 濃度が高値の黒毛和種子牛は低値の子牛に比べて *M.haemolytica* 不活化ワクチン接種後の抗体価が高く推移する

ことが認められ、また、ビタミン E を添加したビタミン E 添加群において血清ビタミン E 濃度が高値で維持され、BHV-1 生ワクチン接種後にワクチンのブースター効果が認められた。すなわち、黒毛和種子牛に対して有益な最大限のワクチン効果を得るためには、ビタミン E が子牛の重要な栄養要因の一つであることが確認された。したがって、黒毛和種子牛に対する呼吸器病の予防対策を目的にした効果的な呼吸器病ワクチン接種を行う際には、ビタミン E の添加による血清ビタミン E 濃度の増加が重要な対策であると考えられた。今後は、子牛に対するビタミン E の添加の量と期間に基づく最適な血清ビタミン E 濃度の検証ならびにビタミン E と免疫機能の増加の機序を明らかにすることが必要であると考ええる。

5. 小 括

子牛における最大限のワクチン効果を得るためには、ワクチン接種する子牛の栄養状態が重要であり、近年、ワクチン効果に関与する子牛の栄養要因の一つとして血中ビタミン E 濃度が注目されている。

そこで本章では、黒毛和種子牛における血清ビタミン E とワクチン接種による抗体産生との関連性を明らかにする目的で、*M. haemolytica* 不活化ワクチン接種時に血清ビタミン E 濃度が 100 μ g/dl 未満の低ビタミン E 群、100 μ g/dl 以上の高ビタミン群、ワクチン未接種の未接種群の 3 群に分類して、ワクチン接種時の血清ビタミン E 濃度とワクチン接種後の抗体産生との関連性を検討すると同時に、代用乳に日量 300IU のビタミン E 添加によるワクチン接種後の抗体産生への効果について検討した。

その結果、高ビタミン E 群の Lkt 中和抗体価の推移は低ビタミン E 群および未接種群に比べて高値で推移したことから、ワクチン接種時に血清ビタミン E 濃度が高値の子牛はワクチン接種に対する抗体産生能が高いことが確認された。また、ビタミン E を添加したビタミン E 添加群において血清ビタミン E 濃度が高値で維持され、BHV-1 生ワクチン接種後にワクチンのブースター効果が認められた。すなわち、黒毛和種子牛に対して有益なワクチン効果を得るためには、ビタミン E が子牛の重要な栄養素の一つであることが確認された。したがって、黒毛和種子牛に対する呼吸器病の予防対策を目的にした効果的な呼吸器病ワクチン接種を行う際には、ビタミン E の添加による血清ビタミン E 濃度の増加が重要であると考えられた。

総 括

呼吸器病は子牛の主要な疾病であり、その損害は甚大である。近年、多頭化の飼養に伴って子牛は群飼形態で飼育され、過密な飼育環境下におけるストレスや病原微生物保有牛との接触機会が増加することによって呼吸器病の発症のリスクが従来に比べてさらに増大している。

特に、病原性の高い *M.haemolytica* 感染による呼吸器病を発病した重症例の子牛は死亡あるいは廃用になる例が多く、治癒例においても増体量が減少するなど、マンヘミア性肺炎は子牛における重要な生産性の阻害要因になっており、牛肉生産の目的で飼養されている黒毛和種子牛にとっては重要な疾病である。したがって、現在、主に *M.haemolytica* 感染による子牛の呼吸器病に対しては治療よりも予防に重点を置いた対策が強く望まれており、その予防対策として最も期待されているのがワクチン接種である。しかし、子牛に対するワクチン接種の方法は実験モデル子牛の成績に基づいたものであり、野外の子牛、特に黒毛和種子牛に対する効果的なワクチン接種の方法はまだ確立されていない。

本研究では、野外における子牛の呼吸器病、特に病原性の最も高い *M.haemolytica* 感染によるマンヘミア性肺炎の予防対策を目的としたワクチン接種の有効な方法を確立するために、まず、*M.haemolytica* が鼻腔スワブから分離された呼吸器病子牛における臨床例および血液学的病態を解明すると同時に、黒毛和種子牛の出生後からの *M.haemolytica* の抗体価の推移、*M.haemolytica* 不活化ワクチンによる Lkt 中和抗体価の産生と *P. multocida*, *M.haemolytica* および *H.somni* 不活化ワクチンによる ELISA 抗体価の産生ならびに呼吸器病の予防効果についての検討を行った。さらに、子牛の栄養要因の一つであるビタミン E とワクチン接種後の抗体産生との関連性を明ら

かにする目的で、黒毛和種子牛における血清ビタミン濃度とワクチン抗体産生との関連性について検討すると共に、臨床試験を行ってビタミン E 添加とワクチン接種後の抗体産生との関連性についての検討を行った。

1. *M.haemolytica* 感染子牛における臨床および血液学的病態

病原性の高い *M.haemolytica* が鼻腔スワブから分離された呼吸器病子牛の臨床例における臨床および血液学的病態を明らかにする目的で、臨床検査ならびに一般血液、動脈血ガス分圧、末梢血白血球ポピュレーションおよび TNF 活性の血液学的病態の解析を行った。その結果、*M.haemolytica* に罹患した呼吸器病子牛の臨床例は心拍数と呼吸数の増数、動脈血ガス分圧の酸素分圧 (pO_2) と酸素飽和度 (O_2SAT) の低下、好中球の増数に伴う白血球数の増数、末梢血白血球ポピュレーションの CD3⁺T 細胞数、CD4⁺T 細胞数および CD8⁺T 細胞数の低下、ならびに血清 TNF 活性が高値を示すことが確認され、*M.haemolytica* に罹患した呼吸器病の子牛は高度な肺組織の炎症病変に起因する肺機能の著しい低下、炎症性の血液変化およびサイトカインの産生を伴う重篤な臨床症状を示す難治性の呼吸器病であることが確認された。

2. 黒毛和種子牛における *M.haemolytica* 抗体価の推移と不活化ワクチンの有効性の検討

子牛におけるワクチネーションを行う適正な時期を特定する目的で、黒毛和種子牛における出生時からの *M.haemolytica* に対する抗体価の推移を測定し、さらに、市販されている *M.haemolytica* 不活化ワクチンと *P. multocida*, *M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンによる黒毛和種子牛の呼吸器病の予防効果について検討する目的で、ワクチン接種群とワクチンを接種しなかった対照群における Lkt 中和抗体価と呼吸器病の発病率の比較を行

った。その結果、黒毛和種子牛における *M.haemolytica* 抗体価は生後 8 週齢に最低値であったことから黒毛和種子牛に対する *M.haemolytica* 不活化ワクチン接種の時期は生後 8 週齢前後に行うことが有益であることが確認された。また、*M.haemolytica* 不活化ワクチンの接種は子牛に早期かつ確実な抗体賦与が可能であり、*P.multocida*、*M.haemolytica* および *H.somni* 混合不活化ワクチンの接種によって抗体価が増加して呼吸器病が減少することが確認された。

3. 黒毛和種子牛における血清ビタミン E 濃度と呼吸器病ワクチン接種による抗体産生との関連性

黒毛和種子牛における血清ビタミン E とワクチン接種による抗体産生との関連性を明らかにする目的で、*M.haemolytica* 不活化ワクチン接種時に血清ビタミン E 濃度が $100 \mu\text{g/dl}$ 未満の低ビタミン E 群、 $100 \mu\text{g/dl}$ 以上の高ビタミン E 群、ワクチン未接種の未接種群の 3 群に分類して、ワクチン接種時の血清ビタミン E 濃度とワクチン接種後における抗体産生との関連性を検討すると同時に、代用乳に日量 300IU のビタミン E 添加によるワクチン接種後の抗体産生への効果について検討した。その結果、高ビタミン E 群の Lkt 中和抗体価の推移は低ビタミン E 群および未接種群に比べて高値で推移したことから、ワクチン接種時に血清ビタミン E 濃度が高値の子牛はワクチン接種に対する抗体産生能が高いことが確認された。また、ビタミン E を添加したビタミン E 添加群において血清ビタミン E 濃度が高値で維持され、BHV-1 生ワクチン接種後にワクチンのブースター効果が認められ、ワクチン抗体産生にとってビタミン E が子牛の重要な栄養要因の一つであることが確認された。したがって、黒毛和種子牛に対する呼吸器病の予防対策を目的にした効果的な呼吸器病ワクチン接種を行う際には、ビタミン E の添加による血清ビ

タミン E 濃度の増加が重要であると考えられた。

以上の本研究による成績から、病原性の高い *M.haemolytica* に罹患した呼吸器病の子牛における臨床および血液学的病態が極めて重篤であることが明らかになり、その有効な予防対策であるワクチンの適正な時期を立証し、野外における臨床試験によって子牛の呼吸器病に対するワクチンの効果を証明した。さらに、子牛にとって重要な栄養素であるビタミン E を添加することによって、子牛の呼吸器病に対するワクチンの効果がさらに増加することを確認した。すなわち、本研究は野外におけるワクチン接種による黒毛和種子牛の呼吸器病の予防対策の礎となるとともに、子牛の呼吸器病による経済的損失の軽減に寄与するものである。

謝 辞

本研究をまとめるにあたり、終始ご指導と御校閲を賜りました酪農学園大学獣医学研究科の小岩政照教授、菊池直哉教授、永幡肇教授に深謝いたします。

本研究の実施の契機は、北里大学獣医学部獣医学科の大塚浩通講師との出会いから始まりました。先生は、臨床現場で研究を実施する事の重要性を説いて下さいました。また、研究を行う上での手法を丁寧かつ熱心にご教授して下さいました。大塚先生に深甚なる謝意を表します。

本研究の実施にあたり、呼吸器病ワクチンを提供していただいたゾエティス・ジャパン株式会社の田中伸一先生に心から感謝申し上げます。また、研究遂行を支えていただいた元 NOSAI 北薩の山下和徳先生、有木洋一先生、NOSAI 北薩の米重隆一先生、時森麻紀子先生、NOSAI 山形の加藤敏英先生、小比類巻家畜診療サービスの小比類巻正幸先生、微生物化学研究所の福山新一先生、久保田整先生、ほか諸先生に心からお礼申し上げます。

最後に、本研究を遂行可能とさせていただいた薩摩キャトルセンターの上浦貢様、上薄畜産の上薄ゆか様、ほか畜産農家の方々のご協力に対して心から深謝いたします。

引用文献

1. Albers, R., Bol, M., Bleumink, R., Willems, A., Blonk, C. and Pieters, R. 2002. Effects of dietary lipids on immune function in a murine sensitisation model. *Br. J. Nutr.* 88:291-299.
2. Alderson, N.E., Mitchell, G.E. Jr, Little, C.O., Warner, R.E. and Tucker, R.E. 1971. Preintestinal disappearance of vitamin E in ruminants. *J.Nutr.* 101:655-659.
3. Allen, J.W., Viel, L., Bateman, K.G., Rosendal, S., Shewen, P.E. and Physick-Sheard, P. 1991. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Can. J. Vet. Res.* 55:341-346.
4. Ames, T.R., Markham, R.J., Opuda-Asibo, J., Leininger, J.R. and Maheswaran, S.K. 1985. Pulmonary response to intratracheal challenge with *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida*. *Can. J. Comp. Med.* 49:395-400.
5. Antonis, A.F., Claassen, E.A., Hensen, E.J., De Groot, R.J., De Groot-Mijnes, J.D., Schrijver, R.S. and Van Der Most, R.G. 2006. Kinetics of antiviral CD8 T cell responses during primary and post-vaccination secondary bovine respiratory syncytial virus infection. *Vaccine* 24:1551-1561.
6. Ayoub, I.A. and Yang, T.J. 1996. Age-dependent changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in cattle: a longitudinal study. *Dev. Comp. Immunol.* 20:353-363.
7. Barrington, G.M. and Parish, S.M. 2001. Bovine neonatal immunology.

- Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 17:463-476.
8. Bendich, A., Gabriel, E. and Machlin, L.J. 1983. Effect of dietary level of Vitamin E on the immune system of the spontaneously hypertensive (SHR) and normotensive Wistar Kyoto (WKY) rat. *J. Nutr.* 113:1920-1926.
 9. Bienhoff, S.E., Allen, G.K. and Berg, J.N. 1992. Release of tumor necrosis factor-alpha from bovine alveolar macrophages stimulated with bovine respiratory viruses and bacterial endotoxins. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 30:341-357.
 10. Bitsch, V. 1978. The P 37/24 modification of the infectious bovine rhinotracheitis virus-serum neutralization test. *Acta Vet. Scand.* 19:497-505.
 11. Boa-Amponsem, K., Picard, M., Blair, M.E., Meldrum, B. and Siegel, P.B. 2006. Memory antibody responses of broiler and leghorn chickens as influenced by dietary vitamin E and route of sheep red blood cell administration. *Poult. Sci.* 85:173-177.
 12. Brar, J.S., Johnson, D.W., Muscoplat, C.C., Shope, R.E.Jr. and Meiske, J.C. 1978. Maternal immunity to infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea viruses: duration and effect on vaccination in young calves. *Am. J. Vet. Res.* 39:241-244.
 13. Burciaga-Robles, L.O., Step, D.L., Krehbiel, C.R., Holland, B.P., Richards, C.J., Montelongo, M.A., Confer, A.W. and Fulton, R.W. 2010. Effects of exposure to calves persistently infected with bovine viral diarrhea virus type 1b and subsequent infection with *Mannheimia haemolytica* on clinical signs and immune variables: model for bovine

- respiratory disease via viral and bacterial interaction. *J. Anim. Sci.* 88:2166-2178.
14. Confer, A.W., Wright, J.C., Cummins, J.M., Panciera, R.J. and Corstvet, R.E. 1983. Use of a fluorometric immunoassay to determine antibody response to *Pasteurella haemolytica* in vaccinated and nonvaccinated feedlot cattle. *J. Clin. Microbiol.* 18:866-871.
 15. Constant, S., Pfeiffer, C., Woodard, A., Pasqualini, T. and Bottomly, K. 1995. Extent of T cell receptor ligation can determine the functional differentiation of naive CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 182:1591-1596.
 16. Damas, P., Reuter, A., Gysen, P., Demonty, J., Lamy, M. and Franchimont, P. 1989. Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit. Care Med.* 17:975-978.
 17. Da Roden, L., Smith, B.P., Spier, S.J. and Dilling, G.W. 1992. Effect of calf age and *Salmonella* bacterin type on ability to produce immunoglobulins directed against *Salmonella* whole cells or lipopolysaccharide. *Am. J. Vet. Res.* 53:1895-1899.
 18. De Leenheer, A.P., De Bevere, V.O., Cruyl, A.A. and Claeys, A.E. 1978. Determination of serum alpha-tocopherol (vitamin E) by high-performance liquid chromatography. *Clin. Chem.* 24:585-590.
 19. Ellis, J.A., Hassard, L.E. and Morley, P.S. 1995. Bovine respiratory syncytial virus-specific immune responses in calves after inoculation with commercially available vaccines. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 206:354-361.
 20. Eskew, M.L., Scholz, R.W., Reddy, C.C., Todhunter, D.A. and Zarkower, A. 1985. Effects of vitamin E and selenium deficiencies on rat immune

- function. *Immunology* 54:173-180.
21. Foote, M.R., Nonnecke, B.J., Beitz, D.C. and Waters, W.R. 2007. Antigen-specific B-cell responses by neonatal calves after early vaccination. *J. Dairy Sci.* 90:5208-5217.
 22. Gebremichael, A., Levy, E.M. and Corwin, L.M. 1984. Adherent cell requirement for the effect of vitamin E on *in vitro* antibody synthesis. *J. Nutr.* 114:1297-1305.
 23. Gibbs, H.A., Allan, E.M., Wiseman, A. and Selman, I.E. 1984. Experimental production of bovine pneumonic pasteurellosis. *Res. Vet. Sci.* 37:154-166.
 24. Gore, A.B. and Qureshi, M.A. 1997. Enhancement of humoral and cellular immunity by vitamin E after embryonic exposure. *Poult. Sci.* 76:984-991.
 25. Hara, M., Tanaka, K. and Hirota, Y. 2005. Immune response to influenza vaccine in healthy adults and the elderly: association with nutritional status. *Vaccine* 23:1457-1463.
 26. Herbein, G., Doyle, A.G., Montaner, L.J. and Gordon S. 1995. Lipopolysaccharide (LPS) down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumour necrosis factor (TNF) and IL-1 beta. *Clin. Exp. Immunol.* 102:430-437.
 27. Hodgins, D.C. and Shewen, P.E. 1994. Passive immunity to *Pasteurella haemolytica* A1 in dairy calves: effects of preparturient vaccination of the dams. *Can. J. Vet. Res.* 58:31-35
 28. Hodgins, D.C. and Shewen, P.E. 1998. Serologic responses of young colostrum fed dairy calves to antigens of *Pasteurella haemolytica* A1.

- Vaccine* 16:2018-2025.
29. Hodgins, D.C. and Shewen, P.E. 2000. Vaccination of neonatal colostrum-deprived calves against *Pasteurella haemolytica* A1. *Can. J. Vet. Res.* 64:3-8.
 30. Horimoto, M. and Sakai, T. 1990. Maternally derived antibodies to Japanese encephalitis virus in cattle. *J. Jpn. Assoc. Inf. Dis.* 64:1205-1208.
 31. Hosken, N.A., Shibuya, K., Heath, A.W., Murphy, K.M. and O'Garra, A. 1995. The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model. *J. Exp. Med.* 182:1579-1584.
 32. Jeyaseelan, S., Sreevatsan, S. and Maheswaran, S.K. 2002. Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis. *Anim. Health Res. Rev.* 3:69-82.
 33. Jones, C. and Chowdhury, S. 2007. A review of the biology of bovine herpesvirus type 1 (BHV-1), its role as a cofactor in the bovine respiratory disease complex and development of improved vaccines. *Anim. Health Res. Rev.* 8:187-205.
 34. Kampen, A.H., Olsen, I., Tollersrud, T., Storset, A.K. and Lund, A. 2006. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 113:53-63.
 35. 加藤敏英, 小屋正人, 渡辺栄次, 酒井淳一, 小形芳美, 曳沼徹. 1996. 肺炎罹患牛の鼻汁由来細菌およびマイコプラズマの薬剤感受性. *日獣会誌.* 49:81-84.
 36. 加藤敏英, 山本高根, 小形芳美, 漆山芳郎, 萩野祥樹, 斎藤博水. 2008. 薬

- 剤感受性に基づいた牛呼吸器感染症治療プログラムの臨床効果. 日獣会誌. 61:294-298.
37. Kelleher, J. 1991. Vitamin E and the immune response. *Proc. Nutr. Soc.* 50:245-249.
38. King, N.B. and Frank, N.A. 1961. Effect of age on resistance and retention of titer in cattle vaccinated with strain 19 *Brucella abortus* vaccine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 139:100-103.
39. 小池新平, 井上恭一, 米山州二, 市川優, 田島和彦. 2009. 栃木県で過去 16 年間に分離された牛呼吸器病の薬剤感受性調査. 日獣会誌. 62:533-537.
40. Laichalk, L.L., Kunkel, S.L., Strieter, R.M., Danforth, J.M., Bailie, M.B. and Standiford, T.J. 1996. Tumor necrosis factor mediates lung antibacterial host defense in murine *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 64:5211-5218.
41. Lee, C.Y., Man-Fan, W. J. 2000. Vitamin E supplementation improves cell-mediated immunity and oxidative stress of Asian men and women. *J. Nutr.* 130:2932-2937.
42. Maheswaran, S.K., Kannan, M.S., Weiss, D.J., Reddy, K.R., Townsend, E.L., Yoo, H.S., Lee, B.W. and Whiteley, L.O. 1993. Enhancement of neutrophil-mediated injury to bovine pulmonary endothelial cells by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin. *Infect. Immun.* 61:2618-2625.
43. Martin, S.W., Harland, R.J., Bateman, K.G. and Nagy, E. 1998. The association of titers to *Haemophilus somnus*, and other putative pathogens, with the occurrence of bovine respiratory disease and weight gain in feedlot calves. *Can. J. Vet. Res.* 62:262-267.

44. Menanteau-Horta, A.M., Ames, T.R., Johnson, D.W. and Meiske, J.C. 1985. Effect of maternal antibody upon vaccination with infectious bovine rhinotracheitis and bovine virus diarrhoea vaccines. *Can. J. Comp. Med.* 49:10-14.
45. Metcalf, D., Robb, L., Dunn, A.R., Mifsud, S. and Di. Rago, L. 1996. Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte colony-stimulating factor in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice. *Blood* 88:3755-3764.
46. Meydani, S.N., Meydani, M., Blumberg, J.B., Leka, L.S., Siber, G., Loszewski, R., Thompson, C., Pedrosa, M.C., Diamond, R.D. and Stollar, B.D. 1997. Vitamin E supplementation and in vivo immune response in healthy elderly subjects. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 277:1380-1386.
47. Mosmann, T.R. and Coffman, R.L. 1989. Heterogeneity of cytokine secretion patterns and functions of helper T cells. *Adv. Immunol.* 46:111-147.
48. Nagy, O., Seidel, H., Paulikova, I., Mudron, P. and Kovac, G. 2006. Use of blood gases and lactic acid analyses in diagnosis and prognosis of respiratory diseases in calves. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 50:149-152.
49. 中家一郎, 池内 俊久, 富田 啓介, 鳥飼 善郎. 2000. 子牛の肺炎病巣から分離された *Pasteurella multocida* A型および *Haemophilus somnus* の薬剤感受性. 日獣会誌. 53:7-11.
50. Nonnecke, B.J., Waters, W.R., Foote, M.R., Palmer, M.V., Miller, B.L., Johnson, T.E., Perry, H.B. and Fowler, M.A. 2005. Development of an adult-like cell-mediated immune response in calves after early

vaccination with *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *J. Dairy Sci.* 88:195-210..

51. 大塚浩通, 高橋秀彰, 工藤美穂, 初谷敦, 太田浩運, 永井文紀, 伊東登, 吉野知男, 高橋淳吉, 小岩政照. 2000. 大腸菌性乳房炎を発症した重症および軽症例における単核球サブセットと血清 IL-1 活性の変化. 日獣会誌.53:810-814.
52. 大塚浩通, 小松勝一, 今内覚, 福田茂夫, 菊佳男, 吉野知男, 小岩政照, 川村清市. 2002. 黒毛和種とホルスタイン種の子牛における末梢血白血球の比較. 日獣会誌. 55:789-795.
53. 大塚浩通, 晴山寛子, 小比類卷正幸, 今瀬留以, 増井真知子, 安藤貴朗, 渡辺大作, 川村清市, 佐藤繁. 2006. 乳牛の炎症性疾患における末梢血白血球ポピュレーションとリンパ球幼若化反応. 家畜臨床誌. 29:47-52.
54. 大塚 浩通, 乙丸 孝之介, 小岩 政照. 2007. 肺炎子牛における血清腫瘍壊死因子と末梢血白血球ポピュレーション. 日本家畜臨床学会誌. 30:39-44.
55. Ohtsuka, H., Ono, M., Saruyama, Y., Mukai, M., Kohiruimaki, M. and Kawamura, S. 2011. Comparison of the peripheral blood leukocyte population between Japanese Black and Holstein calves. *Anim. Sci. J.* 82:93-98.
56. 乙丸孝之介. 2013. 育成牛におけるワクチネーションによる呼吸器病対策. 家畜感染症学会誌 3:105-110.
57. Pace, L.W., Kreeger, J.M., Bailey, K.L., Turnquist, S.E. and Fales, W.H. 1993. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha in calves experimentally infected with *Pasteurella haemolytica* A1. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 35:353-364.
58. Pallast, E.G., Schouten, E.G., De Waart, F.G., Fonk, H.C., Doekes, G.,

- von Blomberg, B.M. and Kok, F.J. 1999. Effect of vitamin E supplementation on leukocyte function. *Am. J. Clin. Nutr.* 69:1273-1281.
59. Panciera, R.J. and Corstvet, R.E. 1984. Bovine pneumonic pasteurellosis: model for *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* induced pneumonia in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 45:2532-2537.
60. Packer, L. 1991. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am. J. Clin. Nutr.* 53:1050-1055.
61. Patrick, R.L. 2009. A dairy producer's view of respiratory disease. *Anim. Health Res. Rev.* 10:111-112.
62. Peplowski, M.A., Mahan, D.C., Murray, F.A., Moxon, A.L., Cantor, A.H. and Ekstrom, K.E. 1980. Effect of dietary and injectable vitamin E and selenium in weanling swine antigenically challenged with sheep red blood cells. *J. Anim. Sci.* 51:344-351.
63. Prado, M.E., Prado, T.M., Payton, M. and Confer, A.W. 2006. Maternally and naturally acquired antibodies to *Mannheimia haemolytica* and *Pasteurella multocida* in beef calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 111:301-307.
64. Rajeesh, M., Dass, R.S., Garg, A.K. and Chaturvedi, V.K. 2008. Effect of vitamin E supplementation on serum alpha tocopherol and immune status of Murrah buffalo (*Bubalus bubalis*) calves. *J. Anim. Feed. Sci.* 17:19-29.
65. Reddy, P.G., Morrill, J.L. and Frey, R.A. 1987. Vitamin E requirements of dairy calves. *J. Dairy Sci.* 70:123-129.
66. Reddy, P.G., Morrill, J.L., Minocha, H.C. and Stevenson, J.S. 1987.

- Vitamin E is immunostimulatory in calves. *J. Dairy Sci.* 70:993-999.
67. Samanta, A.K, Dass,R.S., Rawat,M., Mishra, S.C. and Mehra, U.R. 2006. Effect of Dietary Vitamin E Supplementation on Serum alpha-Tocopherol and Immune Status of Crossbred Calves. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 19:500-506.
68. 澤田拓士. 2002. 動物の感染症. 第二版. pp.123-124. 近代出版, 東京.
69. Slocombe, R.F., Derksen, F.J. and Robinson, N.E. 1984. Interactions of cold stress and *Pasteurella haemolytica* in the pathogenesis of pneumonic pasteurellosis in calves: changes in pulmonary function. *Am. J. Vet. Res.* 45:1764-1770.
70. Snowder, G.D., Van Vleck, L.D., Cundiff, L.V. and Bennett, G.L. 2006. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. *J. Anim. Sci.* 84:1999-2008.
71. Stanton, A.L., Kelton, D.F., Leblanc, S.J., Millman, S.T., Wormuth, J., Dingwell, R.T. and Leslie, K.E. 2010. The effect of treatment with long-acting antibiotic at postweaning movement on respiratory disease and on growth in commercial dairy calves. *J. Dairy Sci.* 93:574-581.
72. Stephens, L.R., Little, P.B., Wilkie, B.N. and Barnum, D.A. 1984. Isolation of *Haemophilus somnus* antigens and their use as vaccines for prevention of bovine thromboembolic meningoencephalitis. *Am. J. Vet. Res.* 45:234-239.
73. Spaner, D., Raju, K., Radvanyi, L., Lin, Y. and Miller, R.G. 1998. A role for perforin in activation-induced cell death. *J. Immunol.* 160:2655-2664.
74. 田村豊. 2003. 動物用抗菌剤の使用動向と薬剤耐性菌対策. 日獣会誌.

56:685-691.

75. Tanaka, J., Fujiwara, H. and Torisu, M. 1979. Vitamin E and immune response. I. Enhancement of helper T cell activity by dietary supplementation of vitamin E in mice. *Immunology* 38:727-734.
76. Ulich, T.R., del Castillo, J., Watson, L.R., Yin, S.M. and Garnick, M.B. 1990. In vivo hematologic effects of recombinant human macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 75:846-850.
77. Van der Poll, T., Keogh, C.V., Buurman, W.A. and Lowry, S.F. 1997. Passive immunization against tumor necrosis factor-alpha impairs host defense during pneumococcal pneumonia in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 155:603-608.
78. Van Donkersgoed, J., Schumann, F.J., Harland, R.J., Potter, A.A. and Janzen, E.D. 1993. The effect of route and dosage of immunization on the serological response to a *Pasteurella haemolytica* and *Haemophilus somnus* vaccine in feedlot calves. *Can. Vet. J.* 34:731-735.
79. Watts, J.L., Yancey, R.J. Jr., Salmon, S.A. and Case, C.A. 1994. A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America. *J. Clin. Microbiol.* 32:725-731.
80. Welsh, R.D., Dye, L.B., Payton, M.E. and Confer, A.W. 2004. Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia: 1994-2002. *J. Vet. Diagn. Invest.* 16:426-431.
81. Wesselius, L.J., Smirnov, I.M., O'Brien-Ladner, A.R. and Nelson, M.E. 1995. Synergism of intratracheally administered tumor necrosis factor with interleukin-1 in the induction of lung edema in rats. *J. Lab. Clin.*

Med. 125:618-625.

82. Wood, P.R. and Seow, H.F. 1996. T cell cytokines and disease prevention. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 54:33-44.
83. Yamashita, K., Fujinaga, T., Hagio, M., Miyamoto, T., Izumisawa, Y. and Kotani, T. 1994. Bioassay for interleukin-1, interleukin-6, and tumor necrosis factor-like activities in canine sera. *J. Vet. Med. Sci.* 56:103-107.
84. Yang, Z., Khemlani, L.S., Dean, D.F., Carter, C.D., Slauson, D.O. and Bochsler, P.N. 1994. Serum components enhance bacterial lipopolysaccharide-induced tissue factor expression and tumor necrosis factor-alpha secretion by bovine alveolar macrophages *in vitro*. *J. Leukoc. Biol.* 55:483-488.
85. Yates, W.D., Babiuk, L.A. and Jericho, K.W. 1983. Viral-bacterial pneumonia in calves: duration of the interaction between bovine herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*. *Can. J. Comp. Med.* 47:257-264.
86. Yoo, H.S., Maheswaran, S.K., Srinand, S., Ames, T.R. and Suresh, M. 1995. Increased tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta expression in the lungs of calves with experimental pneumonic pasteurellosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 49:15-28.