

子牛の呼吸器病重篤化阻止対策として
臨床応用可能なワクチン接種方法の確立

加藤 肇

子牛の呼吸器病重篤化阻止対策として
臨床応用可能なワクチン接種方法の確立

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

加藤 肇

生産動物内科学 I

指導教員 教授 田島誉士

2017 年度

目 次

	頁
緒言	1
第1章 牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）を含む混合生ワクチンと BVDV の不活化抗原を含む混合生ワクチン接種による子牛の抗体応答	
I. 小 緒	7
II. 材料および方法	8
1 試験農場の概要	8
2 供試牛	8
3 ワクチン	10
4 ワクチン接種プログラムと血清の採取	11
5 中和抗体価の測定	12
6 統計解析	12
III. 成 績	13
1 BHV1 に対するワクチンの免疫効果	13
2 BRSV に対するワクチンの免役効果	15
3 BVDV1 に対するワクチンの免役効果	17
4 BVDV2 に対するワクチンの免役効果	20
IV. 考 察	23
V. 小 括	26
第2章 牛ウイルス性下痢ウイルスワクチンによる中和抗体維持期間の検討	
I. 小 緒	28
II. 材料および方法	30
1 試験農場の概要	30
2 供試牛	30
3 ワクチン接種プログラムと血清の採取	32
4 BVDV に対する中和抗体価の測定	34
5 統計解析	34

Ⅲ. 成績	35
1 BVDV1 に対するワクチンの免疫効果	35
2 BVDV2 に対するワクチンの免役効果	38
Ⅳ. 考察	41
Ⅴ. 小括	44

第3章 牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)を含む混合生ワクチンと混合不活化ワクチンの接種方法の違いによる BVDV に対する免役効果に関する調査。

Ⅰ. 小 緒	45
Ⅱ. 材料および方法	46
1 試験農場の概要	46
2 供試牛	46
3 ワクチン接種プログラムと血清の採取	48
4 中和抗体価の測定	49
5 統計解析	50
Ⅲ. 成績	51
1 BVDV1 に対するワクチンの免疫効果	51
2 BVDV2 に対するワクチンの免役効果	54
Ⅳ. 考察	57
Ⅴ. 小括	60

第4章 *Mannheimia haemolytica* の莢膜抗原とロイコトキソイドを含むワクチンの早期接種による子牛の抗体応答

Ⅰ. 小 緒	61
Ⅱ. 材料および方法	63
1 試験農場の概要	63
2 供試牛	63
3 ワクチン接種プログラムと血清の採取	65
4 抗体価の測定	67
5 統計解析	67
Ⅲ. 成績	69
1 全菌体凝集抗原に対する抗体価の推移	69

2 LKT に対する抗体価の推移	72
IV. 考 察	75
V. 小 括	77
総 括	78
謝 辞	83
引用文献	84

緒 言

子牛の呼吸器病は肉牛産業においては、出荷のための移動時における死亡や臨床疾患、および経済的損失の主な原因である。酪農産業においては、出生から離乳時にかけての呼吸器病は、その後の生産性に最も影響を与える疾患と考えられている[75]。子牛の呼吸器病による損失については多くの報告がある[67,75-77]。生後3ヵ月齢以前に、呼吸器病に罹患し獣医師の治療を受けた子牛は、治療歴がない子牛と比較してその後2.5倍の斃死率を示す。また、3ヵ月齢以前に呼吸器病を罹患した牛は3ヵ月～2歳半までの斃死率が健康な育成牛の2.4倍となり、生後6ヵ月間の成長が約10kg遅延する。さらに、難産を生じるリスクが2.4倍高くなることや初産月齢が2ヵ月遅延することなどが報告されている[2,68,75-78]。無事初回分娩しても、初産乳期の中に、疾病等で廃用になる確率が呼吸器病を罹患しなかった牛と比べて1.84倍増加するとされている[2]。これらのおり、子牛の呼吸器病は乳牛の生産性に多大な負の影響を与えると考えられている。とくに、子牛の呼吸器病はその臨床症状が重篤化した場合、その後の著しい生産性の低下を引き起こすことが報告されている[17]。したがって、子牛の生産性を向上させるには、適切な飼養管理により呼吸器病を予防することはもちろんであるが、罹患した場合その臨床症状を重篤化させないことが同様に重要となる。

子牛の呼吸器病の予防としては、飼養環境の改善[63]、適切な初乳の給与[74]、抗生物質による集団治療[23]、ワクチネーション[12]などがあげられる。飼養環境については、野外において雨や風を防ぐことが可能な個別飼い飼養が、舎内における集団飼養より呼吸器病に罹患するリスクは低いとされている[4,50,62]。さらに、舎内において一区画9頭以下で飼養する場合と舎内で一区画10頭以上を飼養する場合とでは、明らかに10頭以上で飼養する場合のほうが呼吸器病に罹患するリスクが高まるとされている[45,63]。しかし近

年、乳牛の多頭数飼養化が進み、子牛の預託農場での飼養やロボット式哺乳による集団過密飼養、すなわち一区画 10 頭以上の密飼いが増加傾向にある。これらの飼養環境の変化は、子牛が呼吸器病に罹患し、その臨床症状を著しく重篤化させる危険性を高めることが報告されている[45,53,63,64]。

適切な初乳の給与は、最も有効な子牛の肺炎の予防手段の一つである[54,55,62-64,74]。近年、ヨーネ病、白血病、マイコプラズマ感染症などの初乳を介した感染症予防のために初乳を加熱殺菌、冷凍保存あるいは醗酵処置する方法が普及してきている。これらの処置をすることによって、通常であれば生きて子牛に哺乳される初乳中の白血球やサイトカインが失活してしまい、それが持つ液性免疫の増強作用や食作用といった重要な免疫活性が低下し、結果的に初乳の免疫付与能力を大幅に低下させてしまう[53,55,59]。したがって、十分量の加熱処理初乳を給与しても、感染に対する十分な抵抗力を初乳給与だけでは付与できなくなっている[53,55]。

子牛の移動時および離乳時の個別飼いから集団飼養になる際の同居牛に対して全頭抗生物質を予防的に投与する方法は、呼吸器病の重篤化を防ぐにあたり一定の効果があることが報告されている[31]。しかしこの方法は、二次治療の是非の判定が難しく、耐性菌を容易に出現させてしまうだけではなく、人間に多剤耐性菌を感染させてしまうリスクもある[14,23,69]。したがって、予防的に抗生物質を使用することは、公衆衛生上の観点から、できるだけ使用頻度を少なくすることが望まれる。

以上のように、子牛を取り巻く飼養環境の変化、初乳管理の変化に伴い、子牛が早期に呼吸器病に罹患し、その臨床症状を重篤化させるリスクは増大している。また、薬剤耐性菌発育阻止の観点から、抗生物質にできるだけ頼らない、子牛の呼吸器病の制御方法を用いる必要がある。

呼吸器病患を重篤化させる要因として、環境の変化やストレスに加えてウイルスと細菌との混合感染が大きな要因と考えられている。

とくに牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)と *Mannheimia haemolytica* (*Mh*)の混合感染は重篤な線維素性肺炎の原因となる [8,17,46,60,75]。Booker ら [5]は、重症の肺炎に罹患した子牛 90 頭の肺の免疫組織化学検査を実施し、*Mh* の感染が 29%と最も高頻度で認められ、そのうちの 96%は BVDV の感染が認められたとされている。Fulton ら [28]は、237 頭の重症の肺炎に罹患した育成牛の肺の免疫組織化学検査を実施し、他の呼吸器病に関与するウイルスの中では最も高い 10.4%の肺から BVDV が分離され、呼吸器病の二次感染に関与する細菌の中では最も高い 25%の肺から *Mh* が検出されたとされている。このように、BVDV と *Mh* の混合感染は子牛と育成牛の肺炎の重症化に最も深く関与していると考えられている。

BVDV 感染時には、多くの牛で白血球数の低下が認められる。ヘルパー (CD4⁺)細胞、細胞障害性 (CD8⁺)細胞、ガンマデルタ (γ/δ) T 細胞も B 細胞や好中球同様に減少がみとめられ、その程度は感染した株により異なるとされている [9,27]。さらに、BVDV 感染時にはリンパ球、好中球、単球およびマクロファージの機能低下やインターフェロン分泌の抑制が認められる [41,58,79]。これらの免疫担当細胞の量的あるいは質的な低下によって、免疫抑制が惹起され、環境の変化、管理失宜および他の呼吸器病病原体の同時感染と相まって、呼吸器病の臨床症状は重篤化すると考えられている。また、BVDV と *Mh* との混合感染が重篤な線維素性肺炎を招く理由として、鼻介腔や気管のクリアランス機能の低下がある [8,60]。BVDV の感染により鼻介腔や気管における粘膜絨毛が障害を受け、粘膜絨毛が担う細菌のクリアランス機構が機能しなくなる。このことにより肺内に *Mh* が付着し増殖する。さらに、BVDV 感染により、肺内におけるマクロファージや好中球の機能低下および B 細胞や T 細胞の活性の抑制が引き起こされる。このような、鼻介腔と気管における *Mh* を排除する機構の低下と肺内における免疫応答能の低下により、BVDV と *Mh* の同時感染は呼吸器器官の重篤な障害を発生させる [27]。

さらに、BVDVと *Mh* の混合感染は *Pasteurella multocida* (*Pm*)、*Histophilus somni* (*Hs*) の肺内感染のリスクを増大させる [51,80]。その大きな要因として、*Mh* が産生する外毒素ロイコトキシン (LKT) がある。鼻腔内で *Mh* が増殖し、BVDV 感染により惹起される免疫抑制効果により、*Mh* はその保有する莢膜の働きで容易に肺胞内に定着してコロニーを形成する。そして、急激な増殖と同時に LKT を産生する。LKT は好中球の細胞膜表面に付着する。好中球の細胞膜に付着した LKT は好中球細胞質内の Ca^{2+} チャンネルを刺激し、結果として好中球の細胞膜リン脂質より、ロイコトリエン B4 の産生を促す。産生されたロイコトリエン B4 により *Mh* コロニー周囲に好中球が集簇する。集まった好中球に LKT がさらに付着し、好中球の集簇が加速される。このようにして集まった好中球は、LKT の作用により細胞膜に変化が生じ、小孔 (約 100nm) が形成され、最終的には溶解し、リソソーム内の加水分解酵素や化学物質 (H_2O_2 、活性酸素など) が肺組織内に放出される。好中球により放出された酵素や化学物質は肺組織に損傷を与える。このように、LKT が作用した好中球の溶解によって損傷を受けた肺組織に *Pm* および *Hs* の感染が加わるとさらに病勢が悪化進行し、臨床症状はより重篤化し、その後の生産性を著しく低下させる [10,46,49]。子牛の呼吸器病は BVDV や *Mh* のみならず、種々のウイルスとバクテリアの混合感染により症状は重篤化する [29,82]。したがって、種々の病原体に対する多様で、かつ豊富な免疫を子牛に獲得させることが重要ではあるが、BVDV と *Mh* は子牛の呼吸器病の重症化要因として特に重要であることを念頭において対策を講じる必要がある。

種々のウイルスおよびバクテリアの感染による臨床症状の重篤化を防止する有用な手段としてワクチン接種が挙げられる [65,72,73,75]。しかし、離乳前の子牛に対するワクチン接種は移行抗体の影響を受けて、十分な免疫効果が得られないと考えられている [19,35,71]。その解決策の一つとして、母牛に対してワクチン接種することによって、母牛の血中 IgG 濃度を高め、高濃度の IgG を初乳中に分

泌させて、その初乳を子牛に提供するという方法がある[53]。IgGは熱処理や凍結および醗酵でもその効力を失わず有効な方法と考えられている[53]。したがって、我国で市販されている呼吸器病のワクチンを用い、種々の病原体に対する多様で豊富な抗体を、どのような接種方法によって効率的に獲得させられるかを検討することは、子牛期の健康状態を維持するための重要な課題である。我国においては2015年現在、呼吸器病ワクチンとして主に、牛ヘルペスウイルス1型(BHV1)、BVDV1、BVDV2、牛RSウイルス(BRSV)、パラインフルエンザウイルス3型(PI-3)、アデノウイルス(ADV)の弱毒株を含む混合生ワクチン、BHV1、BVDV1、BVDV2、BRSV、PI-3の不活化抗原を含む混合不活化ワクチン、BHV1、BRSV、PI-3およびADVの弱毒株とBVDV1とBVDV2の不活化抗原を含む生不活化混合ワクチン、BHV-1とPI-3の温度感受性変異株(体温39.0以下で増殖可能な株)を含む経鼻式の混合生ワクチン、*Mh*の莢膜抗原とロイコトキソイドを含む不活化ワクチン、*Mh*、*Pm*、*Hs*の不活化抗原を含む混合不活化ワクチンが市販されている。呼吸器病対策としてこれらのワクチンの子牛に使用する場合、ワクチン接種による子牛の免疫状態を把握しておくことは、多頭数飼育化が進む畜産状況において重要である。混合ワクチンに含まれるワクチン抗原のなかで、BVDVに関しては、野外で流行しているBVDVは抗原性が多様であるため、ワクチン接種によって誘導される交差性の高い免疫応答を、十分に高めておく必要がある。そのためには生ワクチンが最適であるが[6,21,56]、胎子へのワクチン株の感染による持続感染牛産出の懸念から、育成後期の妊娠牛での生ワクチン使用が回避されている。二次感染や日和見感染など様々な悪循環を引き起こす可能性のある病原体に対する抗体を子牛期に十分高めておくことは、より確実な呼吸器病対策の一つになると考えられる。

本研究では、臨床現場で応用可能な子牛の呼吸器病対策として、2015年現在我国で市販流通しているワクチンを用いてどのような接種方法によれば接種牛に効果的に、しかも抗原的に多様な中和抗

体を獲得させられるかに関して以下の点について検討した。

第 1 章においては、BVDV を含む混合ウイルス生ワクチンと BVDV の不活化抗原を含む混合生ワクチンを用いて、効果的に抗体を獲得させる方法を検討した。

第 2 章では、移行抗体のほとんど消失した育成牛に対して BVDV1 を含む生ワクチンを一回接種することによって血中の BVDV に対する抗体価がどれだけ維持されるかを検討した。BVDV の生ワクチンは、1 回の接種により長期にわたり免疫を維持することは知られている [21,73] が、その維持期間を精査した報告は現在までになされていない。

第 3 章においては、ドイツで用いられている BVDV のワクチンの接種方法 [47, 52] を参考に、移行抗体が残存している時期の子牛の場合で、移行抗体が交差反応性を示さない野外株に対する感染抵抗性の付与について検討した。

第 4 章では、子牛の呼吸器病の臨床症状の重篤化を防ぐには、種々のウイルスだけではなく、種々のバクテリアに対する抗体を獲得させることが必須である [1,11,12]。呼吸器病に強く関与するバクテリアの中で、外毒素 (LKT) の作用により重要な線維素性肺炎となり、*Pm* や *Hs* の二次感染を惹起する *Mh* ワクチンに対する抗体応答に着目し、若齢期の *Mh* ワクチン接種によって有効な抗体応答を誘導できるかを検討した。

以上の結果を基に、子牛期における呼吸器病対策として、臨床上活用可能なワクチン接種方法の確立を試みた。

第 1 章

牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）を含む混合生ワクチンと BVDV の不活化抗原を含む混合生ワクチン接種による 子牛の抗体応答

1. 小 緒

子牛に多様な病原体に対する免疫を獲得させるために、我国では注射型混合ワクチンが頻用されている。呼吸器病の原因となるウイルスに対しては経費と作業性の観点から、混合生ワクチンと混合不活化ワクチンが用いられてきている。呼吸器病の原因となる種々のウイルスの中では、牛ヘルペスウイルス 1 型 (BHV1)、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV1 および BVDV2) および牛 RS ウイルス (BRSV) に対する免疫を獲得することが重要と考えられている [7,57,73]。BHV1 と BRSV に対する免疫をワクチンにより獲得させるためには、生ワクチン単回接種では不十分であり、生ワクチンの複数回接種が有効とされている [18,57]。BVDV に対しては、我国では生ワクチン接種後に不活化ワクチンを接種して免疫増強する方法「LK 方式」がとられているが、その免疫効果は詳しく検討されていない。そこで、我国で市販されている BVDV1 を含む混合生ワクチン（すべて弱毒生ウイルスを含む）と BVDV1 および BVDV2 の不活化ウイルスを含む混合生ワクチン（BVDV のみ不活化ウイルス、それ以外はすべて弱毒生ウイルスを含む）を用い、より効果的なワクチンの組み合わせと接種方法に関して、その効果を抗体価の推移を基に検討した。

2. 材料および方法

1) 試験農場の概要

北海道根室管内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、4～15ヶ月齢牛を飼養する育成牛舎および搾乳牛と妊娠後期の育成牛および乾乳牛を飼養する成牛舎の2棟があり、それぞれ独立していた。妊娠した育成牛は同牧場内の放牧地で飼養された。試験開始時点において成牛275頭、育成牛89頭、子牛42頭（本農場内のカーフハッチにて飼養）を飼養していた。試験開始の5年前より試験期間中において、牛の導入は行われなかった。試験期間中、本農場の牛と外部の牛が接触する機会はなかった。既報の方法[43]に準じてバルク乳からのBVDV遺伝子検出を実施した。試験開始日から半年後と1年半後のバルク乳を対象としたいずれの検査からもBVDV遺伝子は検出されなかった。

2) 供試牛

供試牛の概要、試験開始時および採血日の月齢は表1に示した。本酪農場で飼養され、ワクチンの接種歴がないホルスタイン種の育成牛20頭を試験に用いた。供試牛は9～11ヶ月齢で、発育や一般状態が良好な牛を選定した。供試牛を5頭ずつA～Dの4群に分けて使用した。試験期間中、牛は成長とともに育成牛舎から放牧地を経てフリーストール牛舎へと飼養場所が移動された。

表 1. 供試牛の概要、試験開始時および採血日の月齢

試験群	牛NO	試験開始時の月齢(0日目)	27日目	57日目	157日目	190日目	330日目
A	1	9	10	11	14	15	ND
A	2	9	10	11	14	15	30
A	3	9	10	11	14	15	ND
A	4	9	10	11	14	15	30
A	5	9	10	11	14	15	30
		9.00±0.00**	10.00±0.00	11.00±0.00	14.00±0.00	15.00±0.00	30.00±0.00
B	6	9	10	11	14	15	30
B	7	9	10	11	14	15	30
B	8	9	10	11	14	15	30
B	9	9	10	11	14	15	30
B	10	9	10	11	14	15	ND
		9.00±0.00	10.00±0.00	11.00±0.00	14.00±0.00	15.00±0.00	30.00±0.00
C	11	9	10	11	14	15	30
C	12	9	10	11	14	15	30
C	13	10	11	12	ND	16	31
C	14	10	11	12	15	16	ND
C	15	10	11	12	15	16	ND
		9.60±0.55	10.60±0.55	11.60±0.55	14.50±0.58	15.60±0.55	30.33±0.58
D	16	10	11	12	15	16	ND
D	17	10	11	12	15	16	31
D	18	11	12	13	16	17	31
D	19	11	12	13	16	17	31
D	20	11	12	13	16	17	31
		10.60±0.55	11.60±0.55	12.60±0.55	15.60±0.55	16.60±0.55	31.00±0.00

A群は0日目と27日目に不活化BVDV混合生ワクチンを接種を接種

B群は0日目と157日目に不活化BVDV混合生ワクチンを接種を接種

C群は0日目に混合生ワクチンを157日目に不活化BVDV混合生ワクチンを接種

D群は0日目に混合生ワクチンを接種

*ND:採血せず

**平均値±標準偏差

3) ワクチン

ワクチンとして、抗原がすべて弱毒生ウイルスである市販製剤（混合生ワクチン）および BVDV のみが不活化されている市販製剤（不活化 BVDV 混合生ワクチン）を用いた。混合生ワクチンとしては、京都微研 5 種混合生ワクチン（（株）微生物化学研究所、京都）を、不活化 BVDV 混合生ワクチンとしては、京都微研 キャトルウイン-6（（株）微生物化学研究所、京都）を用いてそれぞれ添付の指示書に即して筋肉内投与した。それぞれのワクチン株に含まれるウイルス株を、表 2 に示した。

表 2. 使用したワクチンのウイルス株

ワクチン名	ウイルス株	抗原の種類
混合生ワクチン	牛ウイルス性下痢ウイルス1型(BVDV1): No.12-43株	生
	牛伝染性鼻気管炎ウイルス(BHV-1): No.758-43株	生
	牛RSウイルス(BRSV): rs-52株	生
	牛パラインフルエンザ3型ウイルス(PI3V): BN-CE株	生
	牛アデノウイルス7型(ADV7):TS-GT株	生
不活化BVDV混合生ワクチン	牛ウイルス性下痢ウイルス1型(BVDV1): Nose/T株	不活化
	牛ウイルス性下痢ウイルス2型(BVDV2): KZ-cp/T株	不活化
	牛伝染性鼻気管炎ウイルス(BHV-1): No.758-43株	生
	牛RSウイルス(BRSV): rs-52株	生
	牛パラインフルエンザ3型ウイルス(PI3V): BN-CE株	生
	牛アデノウイルス7型(ADV7):TS-GT株	生

4) ワクチン接種プログラムと血清の採取

ワクチン接種時期と採血日を図 1 に示した。試験開始日に、A および B 群には不活化 BVDV 混合生ワクチンを、C および D 群には混合生ワクチンをそれぞれ接種した。その後、A 群は 27 日目に、B および C 群は 157 日目に不活化 BVDV 混合生ワクチンを追加接種した。初回ワクチン接種時 (0 日目)、初回ワクチン接種後 57、157、190 および 330 日目の 5 回採血を行い、分離した血清を抗体価測定時まで -20°C 以下で凍結保存した。

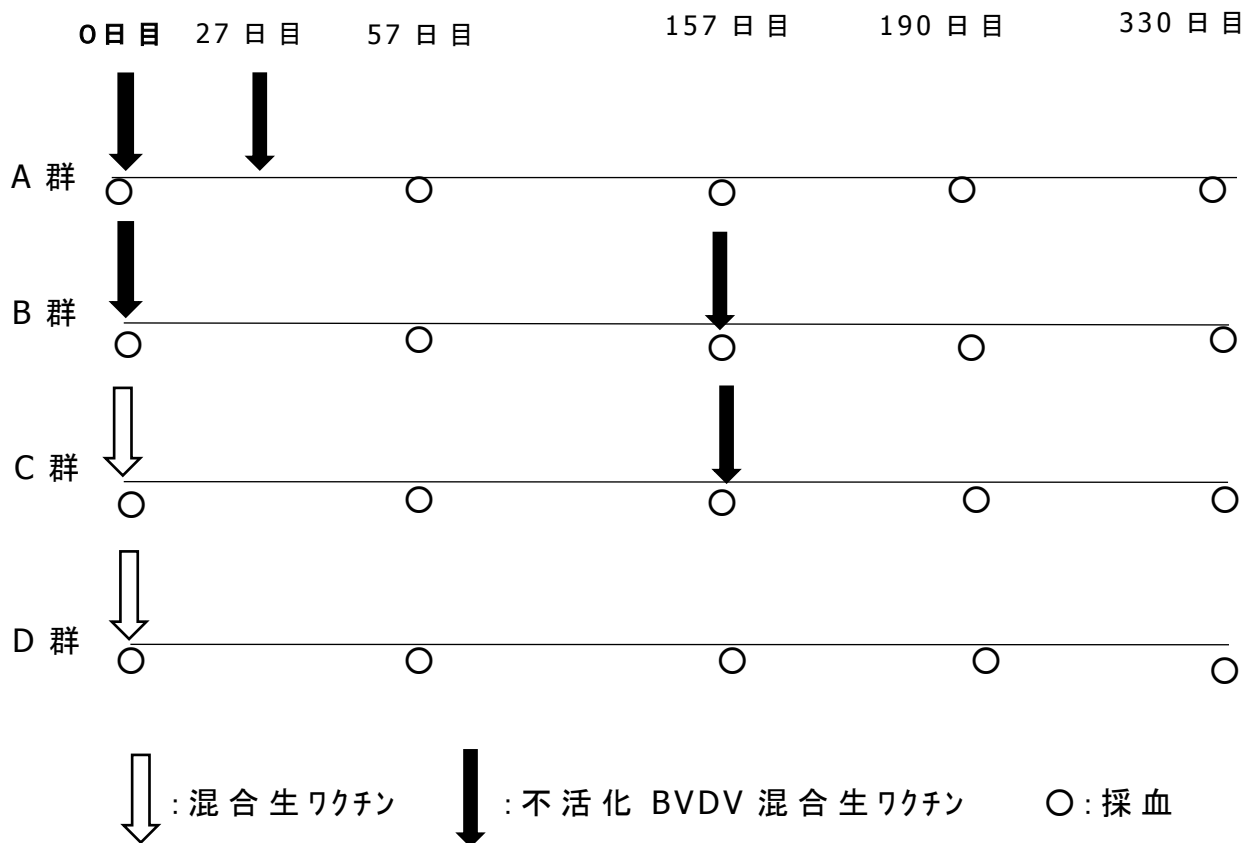


図 1. ワクチン接種および採血スケジュール

5) 中和抗体価の測定

すべての血清を採取後、まとめて中和抗体価を測定した。各ウイルスの抗体価の測定方法は以下のとおりである。

BHV1：細胞培養用 96 穴のマイクロプレートを用いて、非働化した血清 50 μ l を 2 倍階段希釈した後、200TCID₅₀/100 μ l の中和試験用ウイルス 50 μ l と混合し、37 $^{\circ}$ C で一夜感作した。この混合液に牛精巢継代細胞浮遊液 100 μ l を添加した後、37 $^{\circ}$ C で 7 日間静置培養し、観察した。中和用ウイルスとして No.758 株を用い、細胞変性効果の抑制を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とした。

BRSV：細胞培養用 96 穴のマイクロプレートを用いて、非働化した血清 100 μ l を 2 倍階段希釈した後、200TCID₅₀/100 μ l の中和試験用ウイルス 100 μ l と混合し、22 $^{\circ}$ C で一夜感作した。この混合液 100 μ l を試験管に培養したアフリカミドリザル腎由来株化細胞 (Vero 細胞) に接種し、37 $^{\circ}$ C で 60 分間吸着させた後、培養液を加え 7 日間静置培養し、観察した。中和用ウイルスとして MNK7 株を用い、細胞変性効果の抑制を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とした。

BVDV：細胞培養用 96 穴のマイクロプレートを用いて、非働化した血清 50 μ l を 2 倍階段希釈した後、200TCID₅₀/100 μ l の中和試験用ウイルス 50 μ l と混合し、37 $^{\circ}$ C で 60 分間感作した。この混合液に牛精巢継代細胞浮遊液 100 μ l を添加した後、37 $^{\circ}$ C で 7 日間静置培養し、観察した。中和用ウイルスとして、BVDV1 は Nose 株、BVDV2 は KZ-91-cp 株を用い、細胞変性効果の抑制を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とした。

6) 統計解析

A、B、C および D 群の 4 群間における各採血日の抗体価は Dunn の多重比較検定を用い解析した。

3. 成 績

1) BHV1 に対するワクチンの免疫効果

混合生ワクチン接種後の BHV1 に対する抗体価の推移を表 3 および図 2 に示した。全群の牛においてワクチン接種後 2 から 256 倍の抗体が検出された。57 日目において、27 日間隔で BHV-1 の生ワクチン（不活化 BVDV 混合生ワクチン）を 2 回接種した A 群の抗体価は、BHV1 の生ワクチンを 1 回のみ接種した B、C および D 群より高い抗体価を示す傾向が認められた。接種後 190 日目において 157 日間隔で BHV1 の生ワクチン（不活化 BVDV 混合生ワクチン）を 2 回接種した B 群と、同じく 157 日間隔で BHV1 の異なる生ワクチン製剤（混合生ワクチンと不活化 BVDV 混合生ワクチン）を 2 回接種した C 群の抗体価は BHV1 の生ワクチンを 1 回しか接種しなかった D 群と比較して有意（ $P < 0.05$ ）に高かった。

表 3. BHV1 に対する中和抗体価の推移

牛No	群	0日目	57日目	157日目	190日目	330日目
1	A	<2	256	32	16	ND*
2	A	<2	32	16	16	8
3	A	<2	128	64	64	ND
4	A	4	32	256	128	128
5	A	<2	256	128	64	64
6	B	<2	256	64	256	128
7	B	<2	4	16	256	256
8	B	<2	64	64	128	128
9	B	<2	16	16	32	16
10	B	<2	4	2	64	ND
11	C	<2	16	16	128	64
12	C	<2	16	32	256	128
13	C	<2	4	ND	256	64
14	C	<2	32	16	256	ND
15	C	<2	64	16	128	ND
16	D	<2	4	8	8	ND
17	D	<2	32	32	32	32
18	D	<2	16	16	16	16
19	D	<2	16	16	4	8
20	D	<2	8	8	8	8

*ND:採血せず

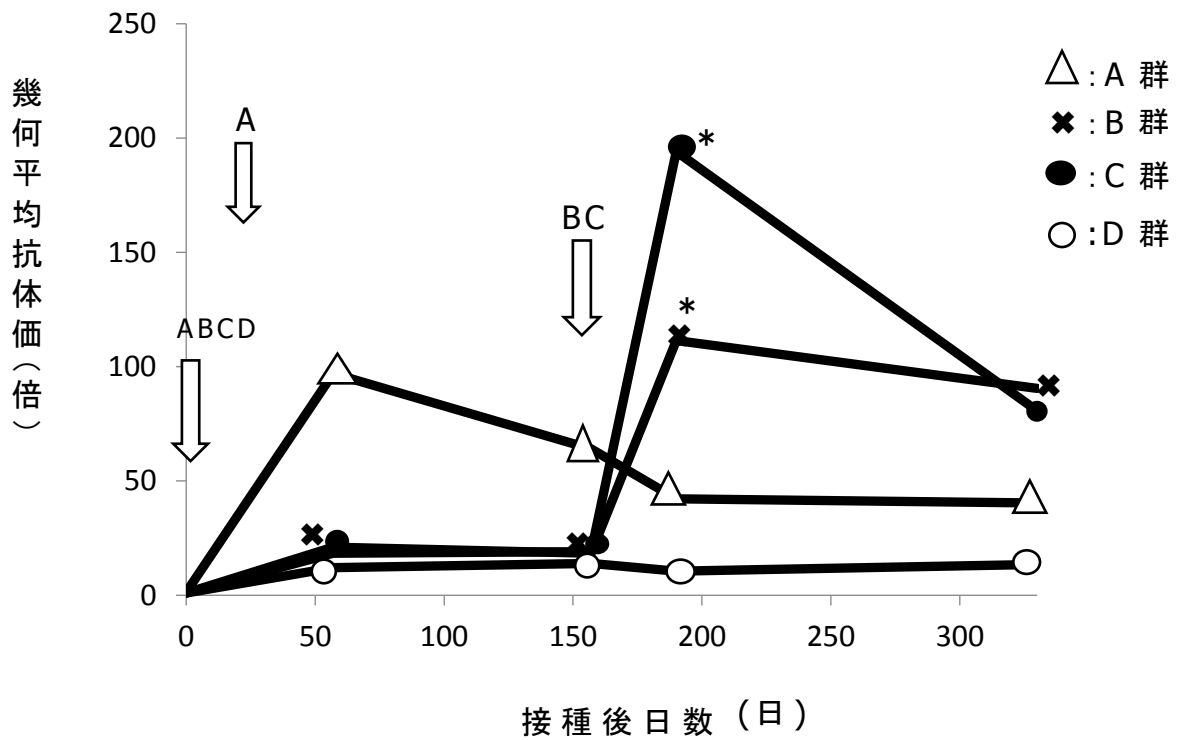


図 2. BHV1 に対する抗体価の推移

各群の幾何平均抗体価を示す。生ワクチン接種時期を白矢印で示した。A 群は 0 および 27 日目、B および C 群は 0 および 157 日目に、D 群は 0 日目のみに接種した。

* : 採血日における群間での有意差($p < 0.05$)あり

2) BRSV に対するワクチンの免疫効果

混合生ワクチン接種後の BRSV に対する抗体価の推移を表 4 および図 3 に示した。全群の牛から 2～512 倍の抗体価が検出された。接種後 190 日目と 330 日目において、BRSV の生ワクチンを 2 回接種した A、B および C 群の抗体価は BRSV の生ワクチンを 1 回しか接種しなかった D 群と比較して高くなる傾向が認められた。

表 4. BRSV に対する中和抗体価の推移

牛No	群	0日目	57日目	157日目	190日目	330日目
1	A	8	512	32	128	ND*
2	A	128	128	32	128	128
3	A	8	128	32	64	ND
4	A	32	32	128	128	128
5	A	32	512	32	128	128
6	B	32	128	32	128	128
7	B	8	32	32	64	128
8	B	8	128	32	128	32
9	B	8	128	128	64	64
10	B	8	32	8	64	ND
11	C	8	8	2	16	64
12	C	128	128	128	128	128
13	C	128	32	ND	128	64
14	C	32	32	32	128	ND
15	C	8	8	2	32	ND
16	D	32	8	128	128	ND
17	D	128	512	128	128	64
18	D	8	8	32	32	64
19	D	8	32	32	64	32
20	D	2	2	2	4	4

*ND:採血せず

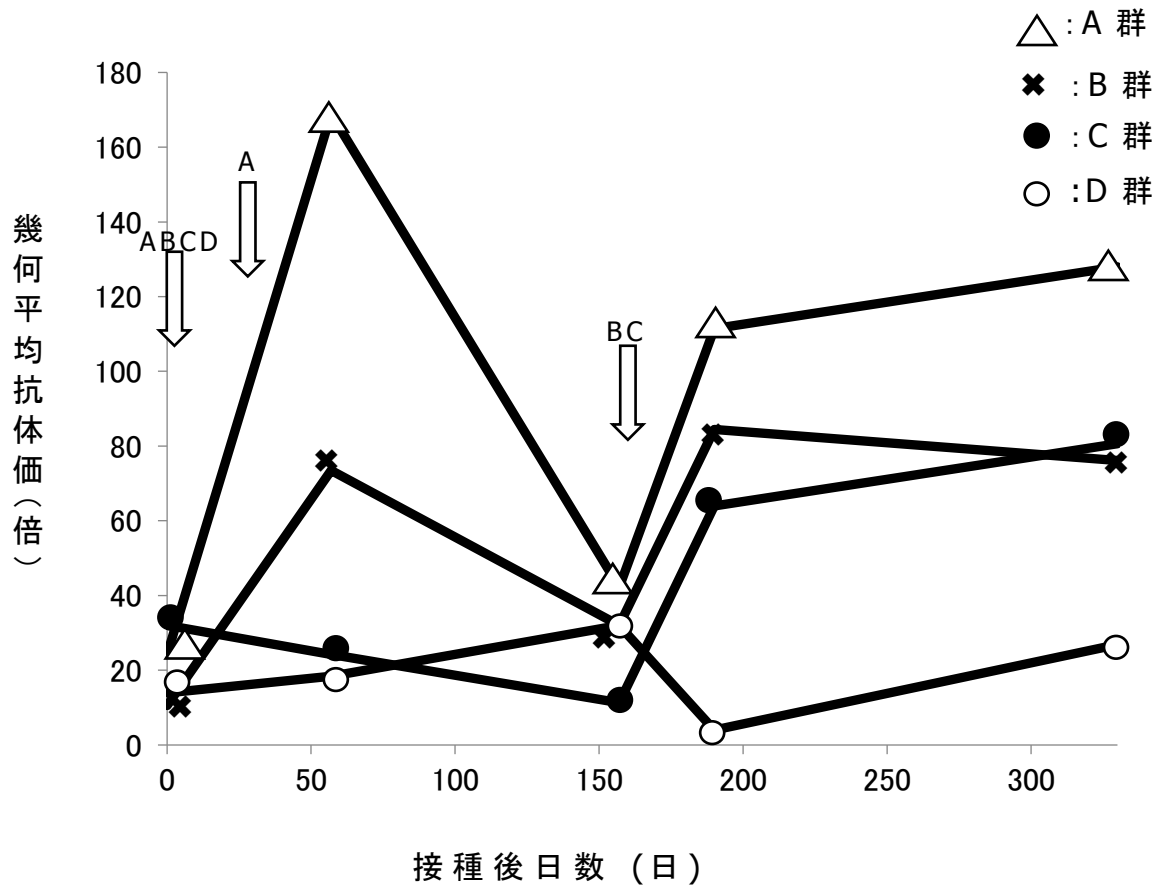


図 3. BRSV に対する抗体価の推移

各群の幾何平均抗体価を示す。生ワクチン接種時期を白矢印で示した。A 群は 0 及び 27 日目、B および C 群は 0 及び 157 日目に、D 群は 0 日目のみに接種した。

3) BVDV1 に対するワクチンの免疫効果

混合ワクチン接種による BVDV1 に対する抗体価の推移を表 5 および図 4 に示した。不活化 BVDV 混合生ワクチンを 2 回接種した A および B 群は混合生ワクチンを接種した C および D 群に比較して低い抗体価を示した。さらに A 群では、接種後 190 日および B 群では 190 日と最終測定日の 330 日を除いて抗体が検出されない個体が認められた。検出された抗体価も C および D 群の 128~2,048 倍であったのに対して A および B 群では 2~512 倍と低い値を示した。抗体価は、接種後 57 日目において BVDV1 弱毒生ウイルスを含むワクチン（混合生ワクチン）を 1 回接種した C 群と D 群は、BVDV1 と BVDV2 の不活化ウイルスを含むワクチン（不活化 BVDV 混合生ワクチン）を 1 回のみ接種した B 群と比較して有意 ($P<0.05$) に高かった。また、157 日目において、BVDV1 弱毒生ウイルスを含むワクチン（混合生ワクチン）1 回のみ接種の D 群は BVDV1 と BVDV2 の不活化ウイルスを含むワクチン（不活化 BVDV 混合生ワクチン）を 1 回のみ接種した B 群に対して有意 ($P<0.05$) に高かった。接種後 190 日目において、混合生ワクチンを接種後 157 日目に不活化 BVDV 混合生ワクチンを接種した C 群と混合生ワクチン 1 回のみ接種の D 群の抗体価は、BVDV1 と BVDV2 の不活化ウイルスを含むワクチン（不活化 BVDV 混合生ワクチン）を 27 日間隔で 2 回接種した A 群に対して有意 ($P<0.05$) に高かった。BVDV1 弱毒生ウイルスを含むワクチン（混合生ワクチン）接種後 157 日目に BVDV1 と BVDV2 の不活化ウイルスを含むワクチン（不活化 BVDV 混合生ワクチン）を接種した C 群と BVDV1 弱毒生ウイルスを含むワクチンを 1 回のみ接種した D 群との間で、試験期間中に C 群が D 群に対して有意に高い BVDV1 に対する抗体価を示すことはなかった。

表 5. BVDV1 に対する中和抗体価の推移

牛No	群	0日目	57日目	157日目	190日目	330日目
1	A	<2	32	8	4	ND*
2	A	<2	<2	<2	64	<2
3	A	<2	64	16	2	ND
4	A	<2	2	<2	2	<2
5	A	<2	512	32	32	64
6	B	<2	64	64	256	32
7	B	<2	<2	<2	64	64
8	B	<2	<2	<2	16	2
9	B	<2	<2	2	4	2
10	B	<2	4	4	16	ND
11	C	<2	1024	1024	512	256
12	C	<2	2048	256	512	256
13	C	<2	512	ND	256	512
14	C	<2	1024	1024	2048	ND
15	C	<2	1024	1024	1024	ND
16	D	<2	1024	2048	1024	ND
17	D	<2	2048	2048	1024	2048
18	D	<2	512	128	256	256
19	D	<2	2048	512	1024	2048
20	D	<2	2048	1024	512	512

ND : 採血せず

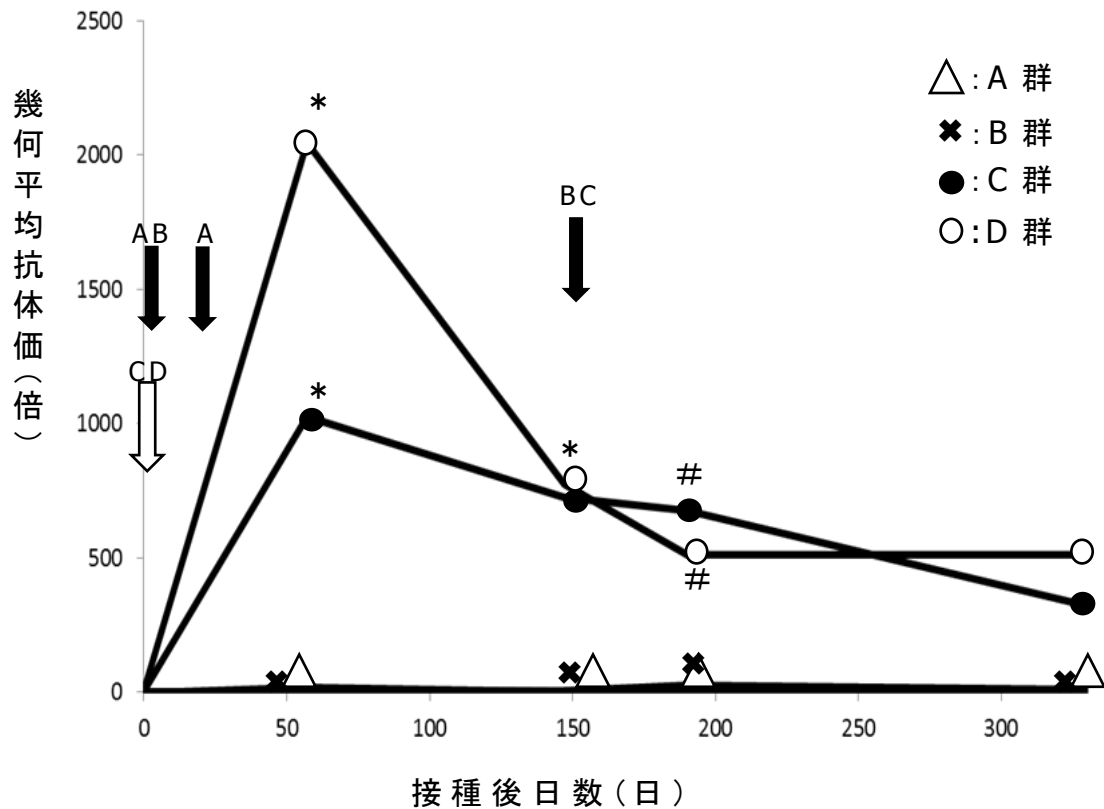


図 4. BVDV1 に対する抗体価の推移

縦軸は幾何平均抗体価。黒矢印は不活化ワクチン、白矢印は生ワクチン接種時期を示す。A 群は 0 および 27 日目に、B および C 群は 0 および 157 日目に、D 群は 0 日目に接種した。

* : B 群に対して有意差あり $P < 0.05$

: A 群に対して有意差あり $P < 0.05$

4) BVDV2 に対するワクチンの免疫効果

混合ワクチン接種後の BVDV2 に対する抗体価の推移を表 6 および図 5 に示した。A 群では接種後全ての時期において、B 群では接種後 190 日および 330 日目を除いて抗体の検出されない個体が認められた。また検出された抗体価は 2~128 倍であった。これに対して混合生ワクチンを接種した C および D 群は接種後 57 日目に全ての牛において 4~32 倍の抗体が検出され、調査期間中全ての牛から 4~512 倍の抗体が検出された。接種後 157 日目において、BVDV1 弱毒生ウイルスを含むワクチン（混合生ワクチン）を 1 回のみ接種した D 群は、BVDV1 と BVDV2 の不活化ウイルスを含むワクチン（不活化 BVDV 混合生ワクチン）を 1 回のみ接種した B 群より有意に ($P < 0.05$) 高い抗体価を示した。BVDV1 弱毒生ウイルスを含むワクチン（混合生ワクチン）接種後 157 日目に BVDV1 と BVDV2 の不活化ウイルスを含むワクチン（不活化 BVDV 混合生ワクチン）を接種した C 群と BVDV1 弱毒生ウイルスを含むワクチンを 1 回のみ接種した D 群との間で、試験期間中に C 群が D 群に対して有意に高い BVDV2 に対する抗体価を示すことはなかった。

表 6. BVDV2 に対する中和抗体価の推移

牛No	群	0日目	57日目	157日目	190日目	330日目
1	A	<2	8	4	2	ND*
2	A	<2	<2	<2	<2	<2
3	A	<2	32	16	8	ND
4	A	<2	<2	<2	<2	2
5	A	<2	128	32	16	32
6	B	<2	16	4	32	8
7	B	<2	4	<2	64	64
8	B	<2	<2	<2	32	16
9	B	<2	4	<2	2	2
10	B	<2	4	<2	16	ND
11	C	<2	4	16	8	64
12	C	<2	16	16	16	8
13	C	<2	4	ND	8	8
14	C	<2	32	64	32	ND
15	C	<2	16	8	32	ND
16	D	<2	16	8	8	ND
17	D	<2	16	64	32	32
18	D	<2	8	16	4	8
19	D	<2	16	64	4	128
20	D	<2	16	512	128	256

ND : 採血せず

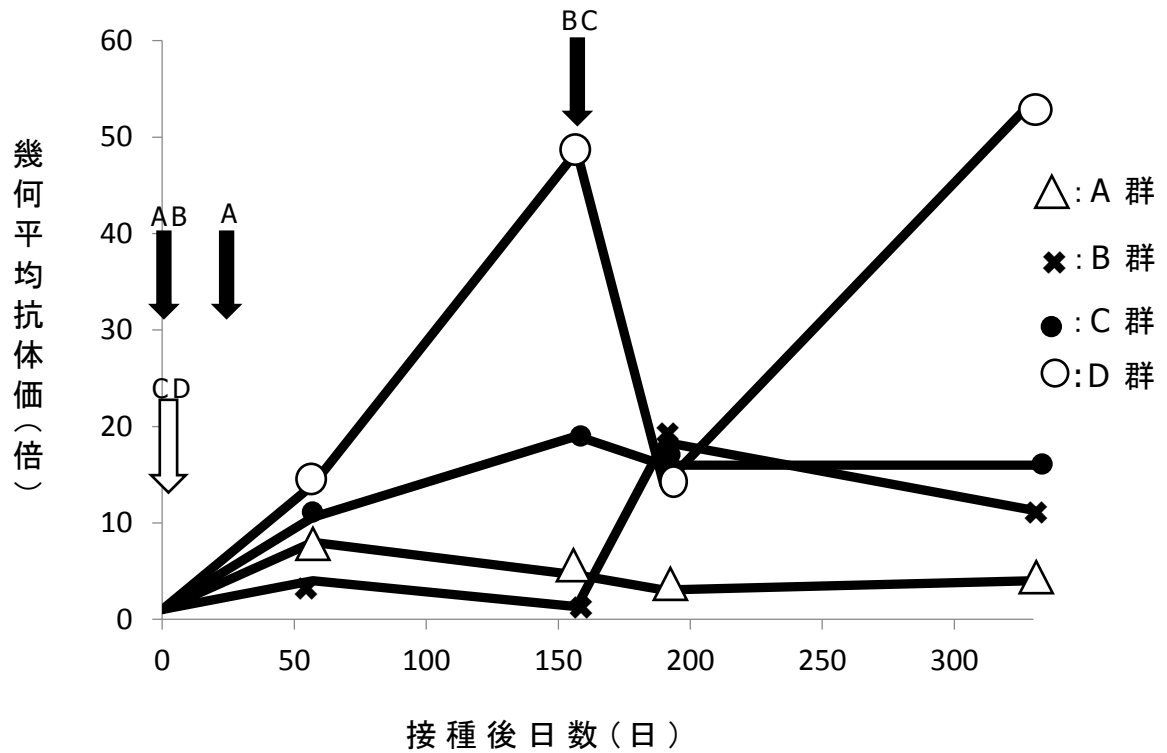


図 5. BVDV2 に対する抗体価の推移

縦軸は幾何平均抗体価。黒矢印は不活化ワクチン、白矢印は生ワクチン接種時期を示す。A 群は 0 および 27 日目に、B および C 群は 0 および 157 日目に、D 群は 0 日目に接種した。

* : 採血日における群間で有意差あり $P < 0.05$

4. 考 察

BHV1 生ワクチンの十分な免疫効果は単回接種では 126 日間持続し、追加接種することで接種後 1 年以上の免疫効果が期待できるとされている[18]。本章での研究において、57 日目において、27 日間隔で BHV-1 の生ワクチン（不活化 BVDV 混合生ワクチン）を 2 回接種した A 群の抗体価は、BHV-1 の生ワクチンを 1 回のみ接種した B、C および D 群より高い抗体価を示す傾向が認められた。157 日間隔で BHV1 の生ワクチンを 2 回接種した B 群と C 群は BHV1 の生ワクチンを 1 回しか接種しなかった D 群と比較して 190 日目の抗体価が有意に高かった。このことから今回用いたワクチン株の No.758-43 株も既報の成績[18, 65,73]と比べて追加接種の時期は異なるが、複数回接種は免疫効果が高まることが確認された。

今回用いたワクチンに含まれる BRSV は、子牛の呼吸器病の主要な原因ウイルスであり、世界中に広く蔓延していて、育成期まで多くの牛がこのウイルスの感染を受けるとされている[3]。本研究において、ワクチン接種前の時点ですべての供試牛に 2~128 倍の抗体が認められ、試験期間を通じてほとんどの牛で 2~512 倍の抗体価が維持された。さらに、試験期間を通じて抗体価に有意差は認められなかった。このことは、既報[3]のとおり、試験開始前および試験期間中に供試牛に野外感染が生じた可能性が考えられた。しかし、生ワクチンを 2 回接種する A、B および C 群は、1 回接種の D 群より 190 日目と 330 日目において高い抗体価となる傾向が認められ、生ワクチン 2 回接種の有効性が強く示唆された[57]。母牛に対する注射型の BRSV ワクチンは接種後強い副反応を起すことも報告されている[30,42]。したがって、BRSV に関しては、母牛の抗体を移行抗体として子牛に給与する方法ではなく、子牛に対して経鼻式ワクチンを用いて免疫を付与する方法[72]が有効と考えられた。しかし、BRSV と BVDV を含む経鼻式ワクチンは現在我が国で市販されていない。BRSV と BVDV の混合感染は重篤な呼吸器病を生ずることが

報告されている[7]。したがって、現段階において、BRSVによる呼吸器病の重症化を防ぐ手段として、注射型呼吸器病混合ウイルスワクチンを用いて、BVDVに対する多様で豊富な液性免疫を獲得させることが最も効果的な手段の一つであると考えられた。

本研究において用いた育成牛は調査期間中に外部の牛と接触する機会はなかった。ワクチン接種前の牛からBVDVの抗体は検出されなかった。さらに、初回ワクチン接種後と1年半後に実施したバルク乳検査でBVDVの遺伝子は検出されず、調査期間中に本農場の牛群内に持続感染牛がいた可能性は極めて低いと考えられた[16,43,54]。これらのことから、供試牛は外部からの感染によることなく、ワクチンによってBVDVに対する抗体を獲得したと考えられた。

BVDV生ワクチンはBVDV不活化ワクチンと比較して免疫効果が高いとされている[6,21,56,65]。本研究において、BVDV不活化ワクチンを2回接種したAおよびB群は、BVDV生ワクチンを接種したCおよびD群と比較して、BVDV1に対する抗体産生が少なかった。さらにその抗体価はCおよびD群が有意($P<0.05$)に高かった。これは、BHV1やBRSVに関する検討で得られた結果と同じく、生ワクチンの方がより確実にウイルス中和抗体を誘導できるためであると考えられた。さらに、BVDV2に対して、接種後157日目において、BVDV1弱毒生ウイルスを含むワクチンを接種したD群はBVDV1とBVDV2の不活化ウイルスを含むワクチン(不活化BVDV混合生ワクチン)を1回のみ接種したB群より有意に($P<0.05$)高い抗体価を示した。すなわち、生ワクチンはBVDV1しか含まないにも関わらず、その生ワクチンを接種した場合(CおよびD群)の方が、高いBVDV2に対する抗体価が得られる傾向が認められた。これらの結果から本ワクチンに含まれるBVDV1(No.12-43株)および不活化したBVDV1(Nose/T株)とBVDV2(KZ-cp/T株)も既報の成績[6,12,15,22,56,65]同様に弱毒株のほうが交差性抗体の誘導効果は高いと考えられた。

BVDV1弱毒生ウイルスを含む生ワクチンを1回のみ接種したC

群および D 群と BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含む不活化ワクチンを 2 回接種した A 群および B 群との間で 2 回接種後の 190 日目以降の BVDV2 を含む抗体価に有意な差は認められなかった。

BVDV1 弱毒生ウイルスを含む生ワクチンを接種後 157 日に BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含む不活化ワクチンを接種した C 群と BVDV1 弱毒生ウイルスを含む生ワクチン 1 回のみ接種の D 群との間で、BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含む不活化ワクチン接種後である 190 日目と 330 日目で BVDV2 に対する抗体価に有意差は認められなかった。さらに C 群はワクチン接種後の 190 日目以降の BVDV1 に対する抗体価が 256～2,048 倍と高い値で推移したのに対して、BVDV2 に対する抗体価は 8～64 倍と低い値で推移した。以上の結果から、BVDV1 弱毒生ウイルスを含む生ワクチン接種後に BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含む不活化ワクチンを接種して免疫を増強する方法は、BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含む不活化ワクチンを 2 回接種する方法と同等のウイルス中和抗体誘導効果は認められたが、BVDV2 に対する交差性抗体誘導効果は BVDV1 同様の高い抗体価は認められず不十分であると考えられた。野外で分離される BVDV には非常に多くの遺伝的および抗原的変異が認められている [15,73]。BVDV1 の弱毒生ウイルスを含むワクチンと BVDV1 と BVDV2 の不活化ウイルスを含むワクチンを用いて多様なウイルス株に対する液性免疫を獲得させるには、BVDV ワクチンの接種方法を検討する必要があると考えられた。

5. 小 括

牛ウイルス性下痢ウイルス BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含むウイルス性呼吸器病対策用の混合生ワクチンと、BVDV1 弱毒株を含む相同の混合生ワクチンを用い、子牛の抗体応答を比較検討した。4種類の異なるワクチン接種法における抗体価の推移を 330 日間観察した。BVDV1、BVDV2、牛ヘルペスウイルス 1 型 (BHV1) および牛 RS ウイルス (BRSV) に対する抗体価を測定した。BHV1 に関して、生ワクチンを 1 回だけ接種した群と 157 日間隔で生ワクチンを 2 回接種した群との間で、接種後 190 日目に 2 回接種群の抗体価が有意に高かった ($P < 0.05$)。また、BRSV に関して、生ワクチンを 2 回接種した群のほうが生ワクチンを 1 回のみ接種した群より高い抗体価を示す傾向が認められた。すなわち、BHV1 と BRSV に関しては生ワクチン 2 回接種の有効性が確認された。

BVDV1 に対する抗体価は、BVDV1 弱毒株を含む生ワクチンを接種後 157 日に BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含む不活化ワクチンを接種した C 群と、BVDV1 弱毒株を含む生ワクチン 1 回のみ接種の D 群は、BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含む不活化ワクチンを 2 回接種した A 群に対して 190 日目において有意に高かった。その C 群と BVDV1 弱毒株を含む生ワクチン 1 回のみ接種の D 群との間で接種後 BVDV1 と BVDV2 に対する抗体価に有意差は認められなかった。以上の結果から、BVDV1 弱毒株を含む生ワクチン 1 回接種は BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含む不活化ワクチン 2 回接種より BVDV1 に対してウイルス中和抗体誘導効果が認められた。しかし、BVDV1 弱毒株を含む生ワクチン接種後に BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含む不活化ワクチンを接種しても、BVDV2 に対するウイルス中和抗体誘導効果は不十分であると考えられた。野外で分離される BVDV は、非常に多くの遺伝的および抗原的多様性が認められていることから、BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含む不活化ワクチンと BVDV1 弱毒株のみを含む生ワクチンを用いて、

多様でかつ豊富な BVDV に対する抗体を獲得させるためには、BVDV ワクチンの接種方法の検討が必要であると考えられた。

(本章の内容の一部は、加藤肇、江村有希子、中尾茂、佐藤礼一郎、大西守、田島誉士 2010、牛ウイルス性下痢ウイルス不活化抗原を含む呼吸器病混合ワクチンの免疫効果. 家畜診療 57、221-226[36]、Kato, H., Sato, R., Oonishi, M., Tajima, M. 2015 Comparison of vaccination protocols for bovine herpesvirus type1 and bovine viral diarrhea virus. J. Vet. Med. Res. 2; 1034-1037 [39] として公表した。)

第 2 章

牛ウイルス性下痢ウイルスワクチンによる 中和抗体維持期間の検討

1. 小 緒

Victor ら [73] の報告によれば、近年牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 感染に対するワクチン接種によって、子牛の消耗率低減効果は急速に向上してきているとされている。BVDV ワクチンには、生ワクチン、高温時非増殖性ワクチン、不活化ワクチンの 3 種類のワクチンがある [73]。わが国においては、生ワクチンと不活化ワクチンが現在市販されている。生ワクチンは不活化ワクチンに比べて幾つかの利点があるとされている [6,22,56,73]。利点の主なものとして Roth [56] は、価格が安いこと、より豊富なウイルス中和抗体が得られること、および多様な交差抗体の産生を誘導できることを挙げている。さらに 1 回の接種で速やかに (7-10 日以内) 免疫が獲得されることや免疫効果が長期間持続することも報告されている [6,13,21]。これは第 1 章においても、5 種混合ワクチンによる牛ヘルペスウイルス 1 型や牛 RS ウイルスに対する抗体価の検討によっても確認された。

一方、BVDV 生ワクチンは妊娠牛への投与によって胎子への悪影響が懸念されている [26, 73,83]。それを回避するため、Victor ら [73] は育成牛においては初回授精 3 週間前までの生ワクチン接種を奨励している。初回ワクチン接種時期や追加接種時期を設定するには生ワクチン 1 回接種による免疫能力の維持期間を把握することは必要不可欠である。BVDV ワクチン接種後の抗体価は 1 年程度持続するとされているが [22,34,56]、それらは免疫応答能やウイルス汚染状況が異なる牛群から得られた成績であり、供試牛の免疫状態と環境的要因をできるだけ一致させた条件下での調査結果は報告されてい

ない。さらに、1年以上にわたり抗体価を継続調査した報告もない。そこで本章においては、呼吸器病ワクチンとして BVDV を含む混合生ワクチンとして市販されているワクチンの、より有効な活用法を検討するために、生ワクチン 1 回接種後の BVDV 抗体価の推移を長期間にわたり検討した。

2.材料および方法

1) 試験農場の概要

北海道根室管内の第1章で用いた農場とは異なる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、3から22ヶ月齢牛を飼養する育成牛舎、妊娠後期の育成牛および乾乳牛を飼養する乾乳牛舎、搾乳牛を飼養するフリーストール式牛舎の3棟があり、それぞれ独立していた。試験開始時点において成牛132頭、育成牛32頭、子牛19頭（本農場内のカーフハッチにて飼養）を飼養していた。試験期間中に44頭の外部導入があった。既報の方法[43]に準じてバルク乳からのBVDV遺伝子検出を実施した。1回目のワクチン接種から半年後と1年半後のバルク乳を検査対象とした。いずれの検査においても、BVDV遺伝子は検出されなかった。

2) 供試牛

試験実施酪農場で飼養され、ワクチンの接種歴がないホルスタイン種の育成牛20頭を試験に用いた。供試牛は6～16ヶ月齢で、発育や一般状態が良好な牛を選定した。供試牛の試験期間中における月齢の推移を表7に示した。観察期間中、供試牛は成長とともに育成牛舎から乾乳牛舎を経てフリーストール牛舎へと飼養場所が移動された。調査期間中に導入した初妊牛以外に本農場以外の牛と供試牛が接触する機会はなかった。

表 7. 供試牛の概要：試験開始時および採血日の月齢

試験群	牛NO	試験開始時の月齢(0日目)	31日目	172日目	339日目	458日目	492日目	578日目	748日目	1132日目
A	1	8	9	13	18	22	23	26	31	44
A	2	16	17	21	26	30	31	34	39	52
A	3	13	14	18	23	27	28	31	ND	ND
A	4	10	11	15	20	24	25	28	33	46
A	5	6	7	11	16	20	21	24	29	42
		10.60±3.97**	11.60±3.97	15.60±3.97	20.60±3.97	24.60±3.97	25.60±3.97	28.60±3.97	33.00±2.46	46.00±4.32
B	6	8	9	13	18	22	ND	26	31	44
B	7	13	14	18	23	ND*	ND	ND	ND	ND
B	8	12	13	17	22	26	27	30	35	48
B	9	9	10	14	19	23	24	27	32	45
B	10	9	10	14	19	23	24	27	32	45
B	11	8	9	13	18	22	23	26	31	44
B	12	14	15	19	24	28	29	32	37	50
B	13	14	15	19	24	28	29	32	37	50
B	14	12	13	17	22	26	27	30	35	48
B	15	9	10	14	19	23	24	27	32	ND
		10.80±2.44	11.80±2.44	15.80±2.44	20.80±2.44	24.55±2.46	25.87±2.41	28.56±2.46	33.56±2.46	46.75±2.45
C	16	16	17	21	26	30	31	34	39	52
C	17	15	16	20	25	29	30	33	38	51
C	18	15	16	20	25	29	30	33	38	51
C	19	16	17	21	26	30	31	34	39	52
C	20	15	16	20	25	29	30	33	38	51
		15.40±0.55	16.40±0.55	20.40±0.55	25.40±0.55	29.40±0.55	30.40±0.55	33.40±0.55	38.40±0.55	51.40±0.55

A 群および B 群には試験開始日に生ワクチンを接種

B 群には 458 日目に不活化ワクチンを接種

*ND: 採血せず

**平均値±標準偏差

3) ワクチン接種プログラムと血清の採取

ワクチンの接種プログラムと採血のスケジュールを図6に示した。生ワクチンとして、BVDV1の弱毒生ウイルス(No.12-43株)を含む牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢・粘膜病・牛パラインフルエンザ混合生ワクチン(IBR・BVD-MD・PI生ワクチン、Lot60-1、(株)微生物化学研究所、京都；以下「生ワクチン」)を用いた。不活化ワクチンとして、BVDV1(Singer株)とBVDV2(5912株)の不活化抗原を含有するIBR・BVD-MD2価・PI・牛RSウイルス感染症混合(アジュバント加)不活化ワクチン(ストックガード5、Lot178179A、共立製薬(株)、東京；以下「不活化ワクチン」)を用いた。

ワクチンを接種しないA群(5頭、試験開始時6~16ヶ月齢)、生ワクチンを1回接種したB群(10頭、試験開始時8~14ヶ月齢)、生ワクチンを接種し、初回接種から458日後に不活化ワクチンを接種したC群(5頭、試験開始時15~16ヶ月齢)に供試牛を区分した。まず、全頭から血清を採取した。さらに同日にB群とC群に生ワクチンを接種し、C群には15ヶ月後に、不活化ワクチンを接種した。生ワクチン接種後は31、172、339、458(不活化ワクチン接種直後)、492、578、748および1132日目の計8回、血清を採取した。抗体価測定までの期間、血清は-20℃以下で凍結保存した。

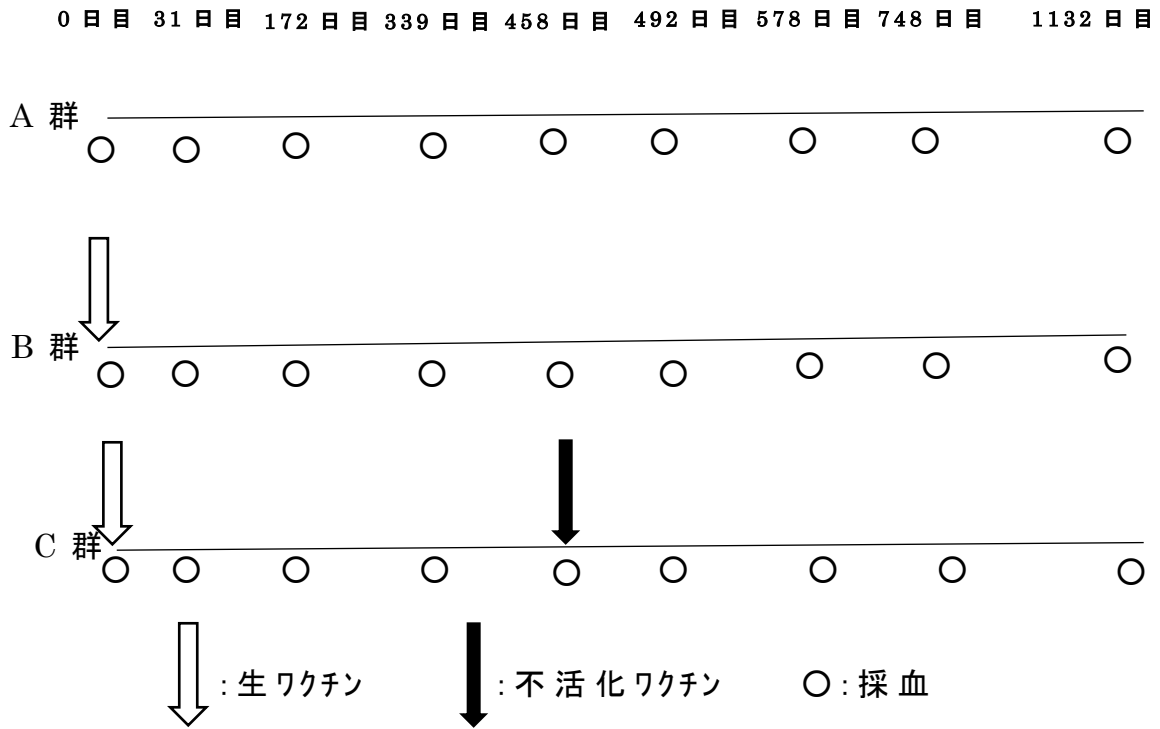


図 6 . ワクチン接種および採血スケジュール

4) BVDV に対する中和抗体価の測定

BVDV1 は Nose 株および BVDV2 は KZ-91cp 株を指示ウイルスとし、牛胎子筋肉 (BFM) 細胞を用い、マイクロタイター法によって中和試験を行った。すなわち、細胞培養用 96 穴プレートを用いて非働化血清 50 μ l を 2 倍階段希釈した後に、200TCID₅₀/0.1ml の指示ウイルス液 50 μ l と混合した。37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応後、BFM 細胞浮遊液を 100 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C で 5 日間培養した。指示ウイルスの細胞変性効果を指標とし、中和を示した血清の最大希釈倍数を中和抗体価とした。

5) 統計解析

各採血日における抗体価を Mann-Whitney の U 検定を用い解析し、有意差を検討した。

3. 成 績

1) BVDV1 に対するワクチンの免疫効果

供試牛の BVDV1 に対する抗体価を表 8 に、それらの推移を図 7 に示した。B 群の牛 10 頭すべてにおいてワクチン接種後 31 日目で 16 から 2,048 倍の BVDV1 に対する中和抗体が検出された。C 群の牛においてもワクチン接種後 31 日目に 256 から 2,048 倍の BVDV1 に対する中和抗体が検出された。その後 7 回の測定では、64 から 2,048 倍の抗体が検出された。すなわち、ワクチン接種群では、初回ワクチン接種後に抗体価が上昇し、個体差は認められたものの約半年後にピークに達し、徐々に低下した。約 1 年後に不活化ワクチンを接種した C 群では、2 回目ワクチン接種後に軽度の抗体価上昇が認められたが、その約半年後には生ワクチン 1 回接種の B 群とほぼ同じ抗体価の推移であった。ワクチン接種群では、B 群と C 群の測定日ごとの中和抗体価に有意な差は認められず、第 1 章で確認したとおり、不活化抗原として、第 1 章と異なる株を用いても不活化抗原の追加接種による免疫増強効果は認められなかった。A 群の牛においても B および C 群への生ワクチン接種後 31 日目に 8~1,024 倍の抗 BVDV 中和抗体が検出された。その後 7 回の測定では 1 頭に 64~2,048 倍の BVDV1 に対する中和抗体が検出されたがその他 4 頭の牛からは BVDV1 に対する中和抗体は検出されなかった。

表 8. ワクチン接種による BVDV1 に対する中和抗体価の推移

試験群	牛NO	接種前	接種後31日	接種後172日	接種後339日	接種後458日	接種後492日	接種後578日	接種後748日	接種後1132日
A	1	<2	8	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
A	2	4	1024	1024	2048	512	64	256	128	64
A	3	8	16	<2	<2	<2	<2	<2	ND*	ND
A	4	8	8	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
A	5	32	8	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
B	6	<2	256	512	512	512	ND	64	256	256
B	7	<2	2048	256	1024	ND	ND	ND	ND	ND
B	8	<2	64	2048	1024	512	512	64	256	256
B	9	4	16	1024	256	512	128	1024	256	1024
B	10	<2	128	1024	512	512	1024	2048	512	1024
B	11	8	256	2048	1024	256	128	512	128	256
B	12	4	128	512	1024	256	256	256	512	512
B	13	4	1024	2048	256	256	256	512	512	512
B	14	4	512	2048	512	1024	512	256	128	256
B	15	<2	256	1024	1024	512	1024	2048	512	ND
C	16	<2	256	1024	1024	512	2048	256	128	64
C	17	<2	256	1024	512	512	512	1024	256	1024
C	18	<2	512	1024	512	512	1024	512	256	256
C	19	<2	512	2048	1024	512	1024	512	256	1024
C	20	8	2048	1024	128	128	256	64	512	256

* ND : 採血せず。

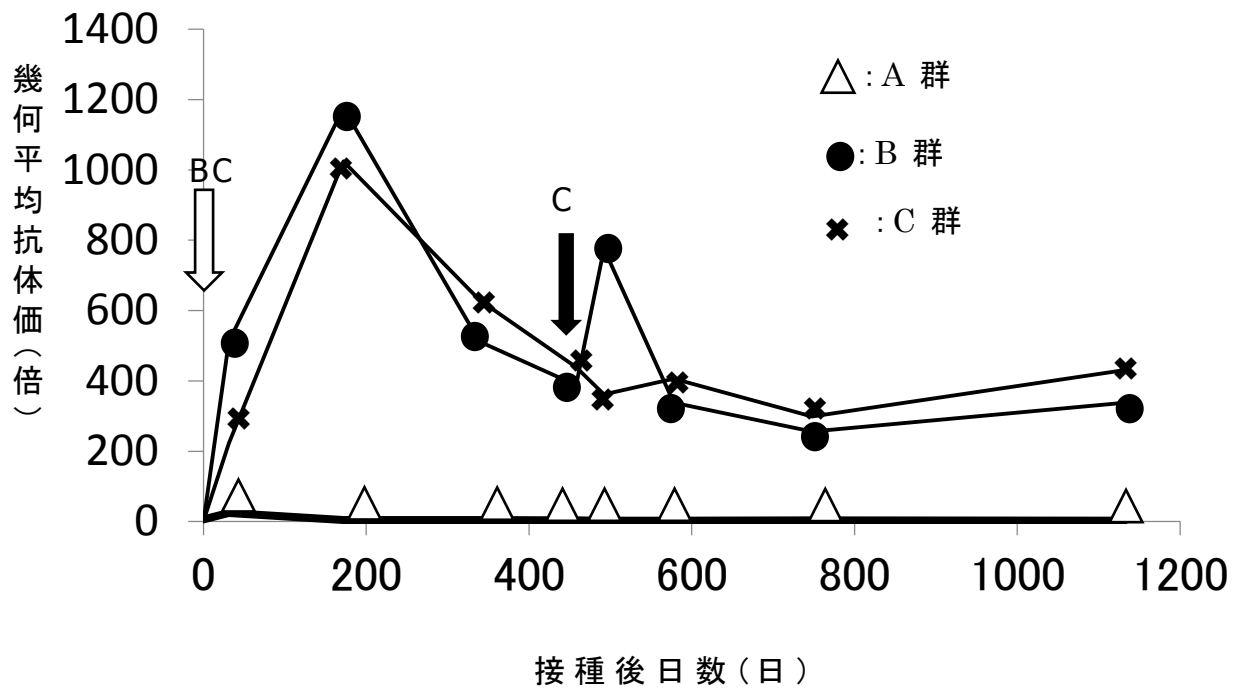


図 7. BVDV1 に対する抗体価の推移

各群の幾何平均抗体価を示す。A 群はワクチンを接種しなかった群。B 群は 0 日目に BVDV1 の生ワクチン（白矢印）を接種、C 群は 0 日目に BVDV1 を含む生ワクチン（白矢印）、458 日目に BVDV1 と BVDV2 の不活化ワクチン（黒矢印）を接種した。

2) BVDV2 に対するワクチンの免疫効果

供試牛の BVDV2 に対する抗体価を表 9 に、それらの推移を図 8 に示した。ワクチン抗原として弱毒 BVDV1 しか含まない生ワクチンを接種した B 群では、10 頭中 9 頭からワクチン接種後 31 日目に 2 から 8 倍の BVDV2 に対する中和抗体が検出された。その後 7 回の測定では全ての期間において 2 から 128 倍の抗体が検出された。C 群においても B 群同様、すべての牛からワクチン接種後 31 日目に 2 から 8 倍の BVDV2 に対する中和抗体が検出された。その後 7 回の測定では、全ての時点において 2 から 64 倍の BVDV2 に対する抗体が検出された。BVDV2 不活化抗原を含む 2 回目のワクチン接種後、すなわち 458 日目以降も抗体価の大きな変動は認められなかった。ワクチン接種群である B 群と C 群の測定日ごとの抗体価に有意な差は認められず、第 1 章とは異なる不活化抗原株を用いても、追加接種による有意な交差免疫誘導効果あるいは免疫増強効果は認められなかった。A 群では 31 日目に 3 頭の牛において 4 から 32 倍の抗 BVDV2 中和抗体が検出された。その後 1 頭は 7 回の測定で 2 から 32 倍の BVDV2 に対する中和抗体が検出された。その他 4 頭の牛からは BVDV2 に対する中和抗体は検出されなかった。

表 9. ワクチン接種による BVDV 2 に対する中和抗体価の推移

試験群	牛NO	0日目	31日目	172日目	330日目	458日目	492日目	578日目	748日目	1132日目
A	1	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
A	2	<2	4	16	16	32	16	2	16	16
A	3	16	4	<2	<2	<2	<2	<2	ND*	ND
A	4	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
A	5	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
B	6	<2	4	8	4	8	ND	8	4	8
B	7	<2	4	8	8	ND	ND	ND	ND	ND
B	8	<2	2	16	32	32	32	8	4	8
B	9	2	4	16	16	16	32	16	4	4
B	10	4	4	32	16	32	128	64	16	4
B	11	4	4	32	64	8	8	16	16	8
B	12	16	4	32	4	4	4	4	8	4
B	13	<2	4	32	2	8	16	8	8	4
B	14	<2	8	64	64	32	64	32	16	16
B	15	<2	2	128	32	32	128	128	128	ND
C	16	<2	2	64	32	16	64	32	8	2
C	17	<2	4	32	16	32	32	32	16	16
C	18	<2	4	8	16	16	16	8	16	4
C	19	<2	8	16	32	32	64	8	16	4
C	20	<2	8	16	16	8	32	2	4	2

* ND : 採血せず

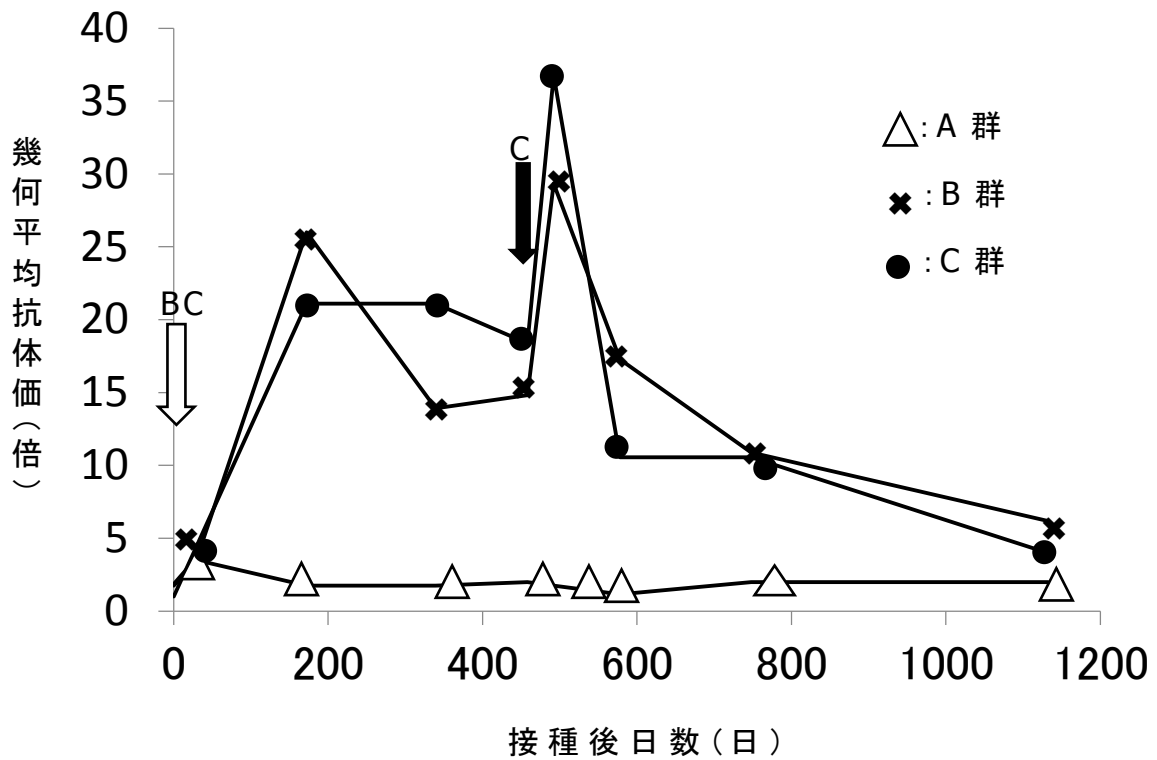


図 8. BVDV2 に対する抗体価の推移

各群の幾何平均抗体価を示す。A 群はワクチンを接種しなかった群。B 群は 0 日目に BVDV1 の生ワクチン（白矢印）を接種、C 群は 0 日目に BVDV1 を含む生ワクチン（白矢印）、458 日目に BVDV1 と BVDV2 の不活化ワクチン（黒矢印）を接種した。

4. 考 察

本研究において BVDV1 の抗体価の測定に用いた Nose 株に対する抗体はワクチン株の No.12-43 株に対して高い抗原交差性を示す[48]。本調査の成績において、B 群と C 群における BVDV1 に対する中和抗体価は、多少の変動はあったものの、調査期間中は高い抗体価を維持していた。調査期間中に 1 年間隔で実施した 2 回のバルク乳検査において BVDV 遺伝子は検出されず、搾乳牛群内に持続感染牛がいた可能性は極めて低い[16,43,54]こと、さらに A 群では、中和抗体価の大きな上昇が認められなかったことから、調査期間中に供試牛群内で BVDV の野外株侵入による自然感染が生じた可能性は低いと考えられた。以上の結果から、B 群と C 群はワクチン接種により抗体を獲得したと考えられた。

BVDV2 の抗体価の測定に用いた KZ-91c p 株に対する抗体は BVDV1 に対して低いながらも抗原交差性を示す[48]。BVDV1 を含むワクチンに BVDV2 に対する防御効果があることが報告されている[61]。Shimazaki ら[61]は、BVDV1 生ワクチン接種後に BVDV2 に対する抗体が検出されない牛においても BVDV2 に対する防御効果があることを報告している。Endsley ら[20]は、BVDV ワクチン接種後の液性免疫が不十分でも、細胞性免疫が防御効果を示すことを明らかにしている。本研究では、BVDV2 の中和抗体価が生ワクチン接種後に低いながらも上昇維持されることが確認された。このことから今回用いた生ワクチン用の BVDV1 株は BVDV2 に対する交差免疫を誘導し、BVDV2 に対して一定の感染防御効果が期待できると考えられた。しかし、BVDV1 のみを含むワクチンは BVDV1 と BVDV2 を含むワクチンと比較して子宮内感染の防御効果は低いことが報告されている[21]。BVDV1 弱毒生ウイルスを含むワクチンを接種して 15 ヶ月後に BVDV1 と BVDV2 の不活化ウイルスを含むワクチンを接種した C 群は BVDV1 弱毒生ウイルスを含むワクチンを 1 回のみ接種した B 群に対して、不活化ウイルス接種後に有意に

高い抗体価は示されなかった。これは、第 1 章で用いた BVDV 株と異なる株を用いて、かつ不活化ワクチンの接種時期を変えても、BVDV1 弱毒株接種後に BVDV1 と BVDV2 の不活化ウイルスを接種する方法では BVDV2 に対する液性免疫誘導効果は不十分であるためと考えられた。逆に、2 回目接種後に C 群に認められた抗体価の上昇は B 群にも認められた(図 8)ことから、抗体価の軽度な上昇は測定誤差の範囲内での変化とも考えられた。第 1 章で提起された課題同様に、我国で 2015 年現在市販されている BVDV ワクチンを用いて、多様な BVDV に対する液性免疫を接種牛に付与するためには、やはり BVDV ワクチンの接種方法を改良する必要性が確認された。

BVDV の現行の生ワクチンは子宮内感染のリスクを軽減させるが、胎子への感染を完全に防ぐことはできないとされている [15,22,73]。しかしながら生ワクチンは抗原性状が異なる野外株に対しても、その臨床症状を緩和することによって経済的損失を軽減させる効果が評価されている [15,73]。本症の防疫は、持続感染牛の摘発淘汰ならびに新たな持続感染牛の浸入阻止が必要不可欠である [15]。また、今回の結果から、BVDV 生ワクチン 1 回投与により得られた抗体は少なくとも 3 年間は維持されることが確認された。このことから、生ワクチンの 1 回接種は費用対効果の観点から本症の対策の一つとして有用な手段と考えられた。

一般的には 4 倍以上の抗体価の上昇は、BVDV の感染が生じたことを示している [66]。本研究では生ワクチン接種後にワクチン未接種牛 2 頭に BVDV1 と BVDV2 に対する中和抗体価の上昇が認められ、1 頭 (A 群 No.1) はその後抗体が消失し 1 頭 (A 群 No.2) は調査期間中も抗体が維持された。Cortese ら [13] は抗原刺激が不十分な場合、記憶 B 細胞の親和性成熟度が未熟で一時的な抗体産生にとどまる感染があることを報告している。ワクチン未接種牛 A 群は接種後 1 ヶ月の間 B 群と C 群の牛と育成牛舎内で同居し、お互いに接触可能であった。この間に授精業務や診療行為はなく、飼養者以外の人との接触の機会はなかった。さらにこの間に育成牛の導入はな

く、育成牛舎内の牛と外部の牛が接触する機会はなかった。これらのことから、ワクチン接種後に接種牛体内で増殖したワクチン株が排出され、未接種牛において親和性成熟度の異なる2種類の感染が生じた可能性が考えられた。

Fredriksen ら [24] は、BVDV 感染後は 14 から 28 日後に抗体価は 64～512 倍のピークに達しその後変動をともなうて維持されるとしている。乳牛における IgG の半減期は 21 日である [32]。抗体が維持される理由として BVDV のリンパ組織内の定住 [84]、あるいは 1 回の感染が強い抗原刺激を惹起することで免疫記憶や応答パターンの永続的な変化が起こり、その結果 B 細胞からの抗体産生が継続する [24] などが考えられた。

5. 小 括

牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)を含む生ワクチンを、移行抗体がほとんど消失した育成牛に対して接種した後の抗体の維持期間について調査した。北海道根室地区の酪農場で飼養される育成牛 20頭を試験に用い、ワクチン未接種の A 群 5 頭、BVDV1 弱毒株を成分に含む生ワクチンを 1 回接種した B 群 10 頭、生ワクチン接種後に BVDV1 と BVDV2 の不活化ウイルスを含む不活化ワクチンを接種した C 群 5 頭に区分した。B 群は 3 年間の調査期間に BVDV1 と BVDV2 に対する抗体価が上昇し維持された。A 群は抗体価の大きな上昇が認められなかったことから、調査期間中に野外株が牛群に侵入した可能性は低いと考えられた。BVDV1 生ワクチン 1 回接種によって BVDV1 および BVDV2 に対する抗体誘導が可能であり、さらに得られた抗体は少なくとも 3 年間は維持されることが確認された。試験期間中に B 群と C 群との間で抗体価に有意な差は認められなかった。第 1 章とは異なる BVDV1 弱毒ウイルス株と BVDV1 と BVDV2 の不活化ウイルス株を用い、かつ接種時期を変えて追加接種しても BVDV2 に対する十分な液性免疫誘導効果は認められなかった。多様な BVDV に対する液性免疫を付与させるためには、第 1 章で示された課題同様、BVDV ワクチンの接種方法の改良が必要であると考えられた。

(本章の内容の一部は、加藤肇、一條祐一、江村有希子、佐藤礼一郎、高久英徳、大西守、田島誉士 2010、牛ウイルス性下痢ウイルスワクチンによる中和抗体価維持期間に関する調査. 日獣会誌 63、33-37 [37]として公表した。)

第 3 章

牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）を含む混合生ワクチンと 混合不活化ワクチンの接種方法の違いによる BVDV に対する免疫効果に関する調査

1. 小 緒

第 2 章で示したとおり、わが国で市販されている牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）弱毒生ワクチンは、1 回の接種によって、長期間の免疫能を付与することが可能であった。このことは、育成期における BVDV 生ワクチン 1 回接種は、その後接種牛が分娩時に、初乳による移行抗体によって、BVDV の抗体を子牛に獲得させることが可能であり、子牛の呼吸器病の重篤化を阻止する重要な手段であると考えられた。

しかしながら、わが国においては BVDV2 を含む弱毒生ワクチンが市販されていなかった。そのため BVDV2 に対して、BVDV1 生ワクチン接種によって BVDV2 生ワクチン接種と同様の効果が得られるかどうかは不明であった。日本と同じく BVDV2 に対する生ワクチンが市販流通していないドイツにおいては、初回に BVDV1 の不活化ワクチンを接種し 4 週間後に BVDV1 を含む生ワクチンを接種し免疫増強する方法（Two-step vaccine program、以下 TSVP と略）が考案され実用化されている [47,52]。この方法を用いることで BVDV1 と BVDV2 の両方に対する十分な免疫能を獲得するとされている。そこで、わが国で市販されている BVDV1 と BVDV2 を含む不活化ワクチンと BVDV1 を含む生ワクチンを用いて、生産現場における TSVP の BVDV1 と BVDV2 に対する抗体応答を調べ、臨床応用の実用性について検討した。

2.材料および方法

1) 試験農場の概要

北海道根室管内の一酪農場において試験を実施した。この農場は第1章で用いた農場と同じ生産農場で、第1章の研究とは異なる時期に実施した。本農場はフリーストール式牛舎で、4～15ヶ月齢牛を飼養する育成牛舎および搾乳牛と妊娠後期の育成牛および乾乳牛を飼養する成牛舎の2棟があり、それぞれ独立していた。妊娠した育成牛は同牧場内の放牧地で飼養された。試験開始時点において成牛311頭、育成牛91頭、子牛51頭を飼養していた。子牛は、本農場のカーフハッチにて飼養されていた。過去8年間に、外部からの牛の導入はなく、試験期間中も外部導入はなかった。さらに過去8年間に本農場の3ヶ月齢以上の牛すべてにBVDV1の弱毒生ウイルスを含有する5種混合生ワクチン((株)微生物化学研究所、京都)の接種歴があった。Kozasaら[43]に準じてバルク乳からのBVDV遺伝子検出を実施した。試験開始前の4年間および試験期間中のバルク乳検査結果はすべて陰性であった。

2) 供試牛

供試牛の概要を表10に示した。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15頭を試験に用いた。試験開始時の供試牛の月齢は1～3ヶ月齢であり、出生後4時間以内に初乳4Lをストマックチューブで強制投与され、発育や一般状態が良好な牛を選定した。以後、本農場内のカーフハッチにおいて個別に飼養され、4ヶ月齢以降は育成牛舎に移動された。調査期間中、試験実施農場以外の牛と供試牛が接触する機会は無かった。

表 10. 供試牛の概要：試験開始時および採血日の月齢

試験群	牛NO	試験開始時の月齢(0日目)	31日目	54日目	93日目	124日目	268日目
A	1	1	2	3	5	5	10
A	2	3	4	4	6	7	11
A	3	2	3	4	5	6	11
A	4	2	3	4	5	6	11
A	5	1	2	3	5	6	10
		1.8±0.84*	2.80±0.84	3.60±0.55	5.20±0.45	6.00±0.71	10.60±0.55
B	6	2	3	4	5	6	11
B	7	2	3	4	5	6	11
B	8	2	3	4	5	6	11
B	9	2	3	4	5	6	11
B	10	1	2	3	5	6	10
		1.80±0.45	2.80±0.45	3.80±0.45	5.00±0.00	6.00±0.00	10.80±0.45
C	11	1	2	3	4	6	10
C	12	2	3	4	5	6	11
C	13	2	3	4	5	7	11
C	14	2	3	4	5	7	11
C	15	1	2	3	5	6	10
		1.60±0.55	2.60±0.55	3.60±0.55	4.80±0.45	6.40±0.55	10.60±0.55

*：平均値±標準偏差

3) ワクチン接種プログラムと血清の採取

ワクチンの接種プログラムと採血のスケジュールを図 9 に示した。ワクチンとして、抗原がすべて弱毒生ウイルスである市販製剤（混合生ワクチン：以下生ワクチン）および BVDV のみが不活化されている市販製剤（不活化 BVDV 混合生ワクチン：以下：不活化ワクチン）を用いた。生ワクチンとしては、京都微研 3 種混合生ワクチン（Lot67（株）微生物化学研究所、京都）を、不活化ワクチンとしては、京都微研 キャトルウイン-6（Lot15（株）微生物化学研究所、京都）を用いてそれぞれ添付の指示書に即して筋肉内投与した。それぞれのワクチン株に含まれるウイルス株を表 11 に示した。

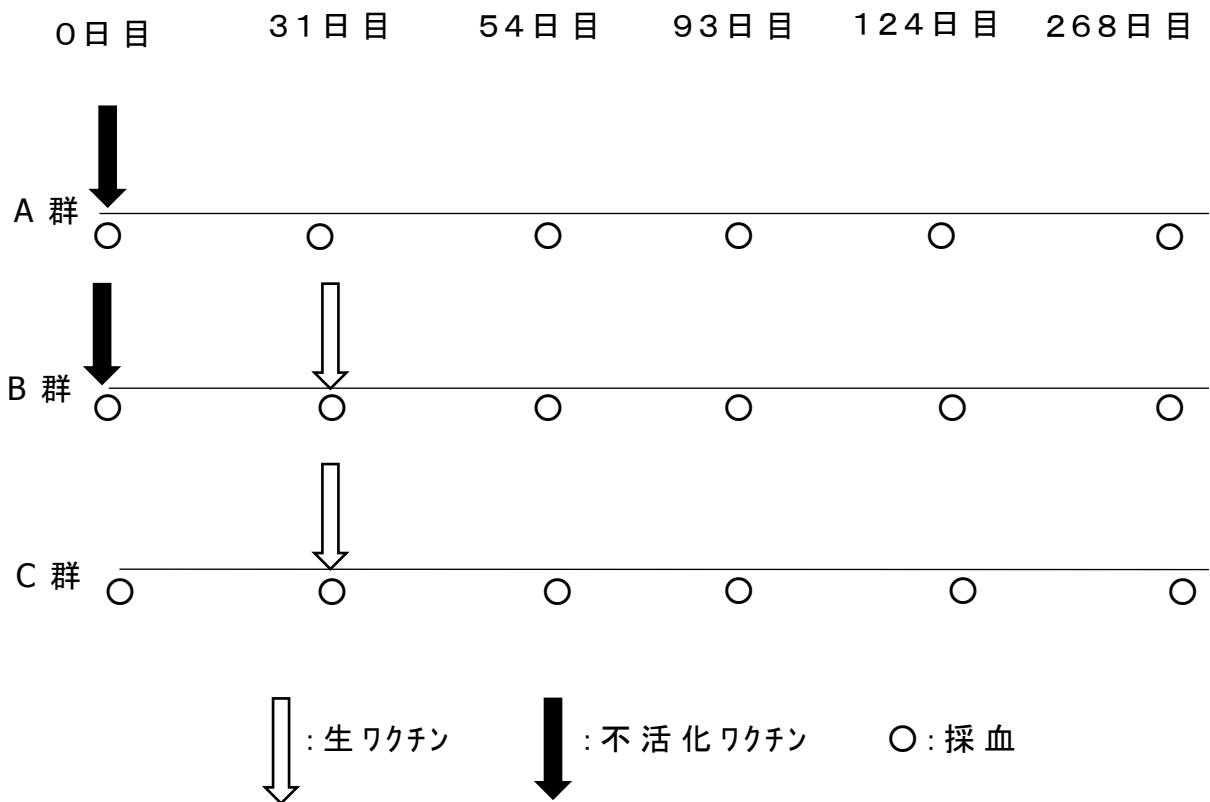


図 9. ワクチン接種および採血スケジュール

表 11. 使用したワクチンのウイルス株

ワクチン名	ウイルス株	抗原の種類
混合生ワクチン(生ワクチン)	牛ウイルス性下痢ウイルス1型(BVDV1): No.12-43株 牛伝染性鼻気管炎ウイルス(BHV-1): No.758-43株 牛RSウイルス(BRSV): rs-52株	生 生 生
不活化BVDV混合生ワクチン(不活)	牛ウイルス性下痢ウイルス1型(BVDV1): No.12-43株 牛ウイルス性下痢ウイルス2型(BVDV2): KZ-cp/T株 牛伝染性鼻気管炎ウイルス(BHV-1): No.758-43株 牛RSウイルス(BRSV): rs-52株 牛パラインフルエンザ3型ウイルス(PI3V): BN-CE株 牛アデノウイルス7型(ADV7):TS-GT株	不活化 不活化 生 生 生 生

不活化ワクチンを1回接種するA群5頭(試験開始時1~3ヶ月齢、不活化ワクチン接種時1~3ヶ月齢)、不活化ワクチンを接種し、初回接種から1ヶ月後に生ワクチンを接種するB群5頭(試験開始時1~2ヶ月齢、不活化ワクチン接種時1~2ヶ月齢、生ワクチン接種時2~3ヶ月齢)、生ワクチンを1回接種するC群5頭(試験開始時1~2ヶ月齢、生ワクチン接種時2~3ヶ月齢)に供試牛を区分した。ワクチン接種前に全頭から血清を採取した。さらに同日にA群とB群に不活化ワクチンを接種した。B群とC群には試験開始後31日目に生ワクチンを接種した。AおよびB群に不活化ワクチンを接種した日を0日とし、接種後31、54、93、124および268日目に採血して、血清を採取した。抗体価測定までの期間、血清は-20℃以下で凍結保存した。

4) 中和抗体価の測定

すべての血清を採取後、まとめて中和抗体価を測定した。細胞培養用96穴のマイクロプレートを用いて、非働化した被検血清50μlを2倍階段希釈した後、200TCID₅₀/100μlの中和試験用ウイルス

50 μ l と混合し、37 $^{\circ}$ C で 60 分間感作した。この混合液に牛精巢継代細胞浮遊液 100 μ l を添加した後、37 $^{\circ}$ C で 7 日間静置培養し、観察した。指示ウイルスとして、BVDV1 は Nose 株、BVDV2 は KZ-91-cp 株を用い、細胞変性効果の抑制を認めた血清の最高希釈倍数を中和抗体価とした。

5) 統計解析

3 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。

3. 成 績

1) BVDV1 に対するワクチンの免疫効果

BVDV1 に対する抗体価は表 12 に、その推移を図 10 に示した。調査期間中の抗体価は、A 群は < 2~64 倍、B 群は 8~2,048 倍、C 群は 4~2,048 倍で推移した。0 日目における供試牛の抗体価は 4~512 倍であった。不活化ワクチン接種 1 ヶ月後に生ワクチンを接種した B 群における、試験開始後 54 日目の抗体価は生ワクチン接種前である 31 日目の抗体価より上昇する傾向が認められた。試験開始 31 日目に生ワクチンを接種した C 群では 54 日目の抗体価は 31 日目の抗体価と比較して下降する傾向が認められた。0 日目の AC 群間 ($P < 0.05$)、93 日目の AB と AC 群間 ($P < 0.01$)、124 日目の AB と AC 群間 ($P < 0.01$) および 268 日目の AB と AC 群間 ($P < 0.01$)、BC 群間 ($P < 0.05$) で有意差を認めた。すなわち BVDV1 に対する B 群の抗体価は A 群に対して 93、124 および 268 日目において、また C 群の抗体価は A 群より 0、93、124 および 268 日目において有意に高かった。さらに、B 群は C 群に対して 268 日目において有意に高かった。

表 12. BVDV1 に対する中和抗体価の推移

試験群	牛NO	0日目	31日目	54日目	93日目	124日目	268日目
A	1	64	32	8	2	<2	<2
A	2	4	2	<2	<2	<2	<2
A	3	16	16	8	<2	<2	<2
A	4	64	32	16	4	<2	<2
A	5	64	16	16	2	2	<2
B	6	32	16	64	64	256	512
B	7	32	8	32	512	512	512
B	8	32	8	32	1024	512	2048
B	9	64	16	16	128	256	512
B	10	128	16	16	128	512	1024
C	11	256	128	32	128	2048	512
C	12	64	16	32	64	512	256
C	13	64	16	4	128	256	512
C	14	128	64	64	64	512	128
C	15	512	256	64	512	2048	128

A および B 群における不活化ワクチン接種日を 0 日目とした。

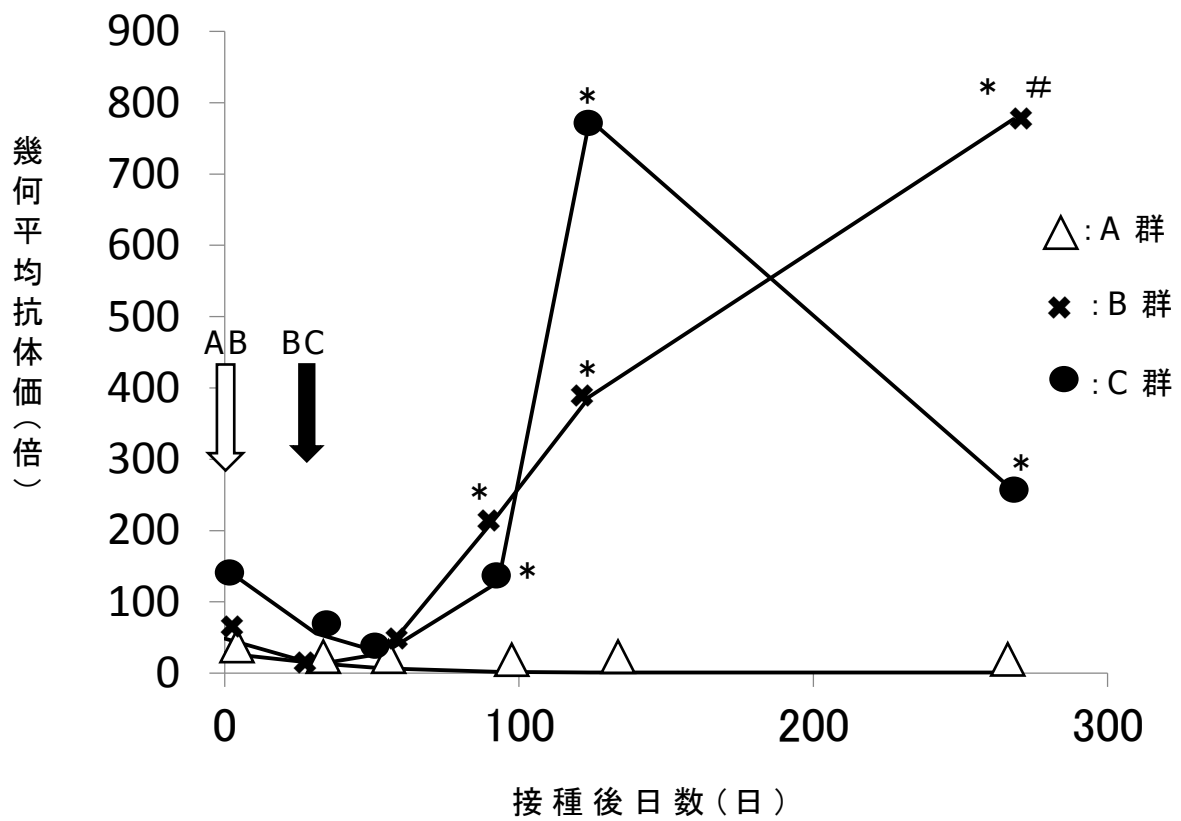


図 10. BVDV1 に対する抗体価の推移

黒矢印は不活化ワクチン、白矢印は生ワクチン接種時期を示す。A 群は 0 日目に、B 群は 0 日目と 31 日目に、C 群は 31 日目に接種した。

* : 各採血日において A 群に対して有意差あり $P < 0.05$

: C 群に対して有意差あり $P < 0.05$

2) BVDV2 に対するワクチンの免疫効果

BVDV2 に対する抗体価は表 13 に、その推移を図 11 に示した。調査期間中の抗体価は、A 群は $< 2 \sim 512$ 倍、B 群は $4 \sim 4096$ 倍、C 群は $< 2 \sim 1,024$ 倍で推移した。0 日目における供試牛の抗体価は $4 \sim 1,024$ 倍であった。不活化ワクチン接種 1 ヶ月後に生ワクチンを接種した B 群における試験開始後 54 日目の抗体価は、生ワクチン接種前である 31 日目の抗体価より上昇する傾向が認められた。試験開始 31 日目に生ワクチンを接種した C 群では 54 日目の抗体価は、31 日目の抗体価と比較して下降する傾向が認められた。これは、BVDV1 の傾向と類似していた。B 群の 1 頭は TSVP 後に BVDV2 に対する高い抗体価 ($512 \sim 4096$ 倍) を示した。54 日目の AB と BC 群間 ($P < 0.05$)、93 日目の AB と BC 群間 ($P < 0.01$)、124 日目の AB 群間 ($P < 0.05$) および 268 日目の AB ($P < 0.01$)、AC、BC 群間 ($P < 0.05$) で有意差を認めた。すなわち、BVDV2 に対する B 群の抗体価は A 群に対して 54 日目以後すべての採血時において、C 群に対して 54、93 日および 268 日目において有意に高かった。

以上の成績から、移行抗体の残存している子牛に対しても不活化ワクチン接種 1 ヶ月後に生ワクチンを接種する TSVP によって、有意な BVDV2 に対する抗体上昇が認められることが明らかとなった。

表 13. BVDV2 に対する中和抗体価の推移

試験群	牛NO	0日目	31日目	54日目	93日目	124日目	268日目
A	1	128	8	8	<2	<2	<2
A	2	32	2	4	<2	4	2
A	3	4	4	<2	<2	<2	<2
A	4	512	32	8	2	2	<2
A	5	128	16	8	2	<2	<2
B	6	16	4	64	128	32	32
B	7	64	4	64	128	32	32
B	8	16	2	512	4096	2048	512
B	9	128	16	8	4	8	16
B	10	64	16	32	128	16	32
C	11	1024	64	32	4	16	8
C	12	8	2	<2	<2	8	16
C	13	4	2	<2	2	<2	16
C	14	128	4	<2	2	32	2
C	15	256	32	16	8	64	16

A および B 群における不活化ワクチン接種日を 0 日目とした。

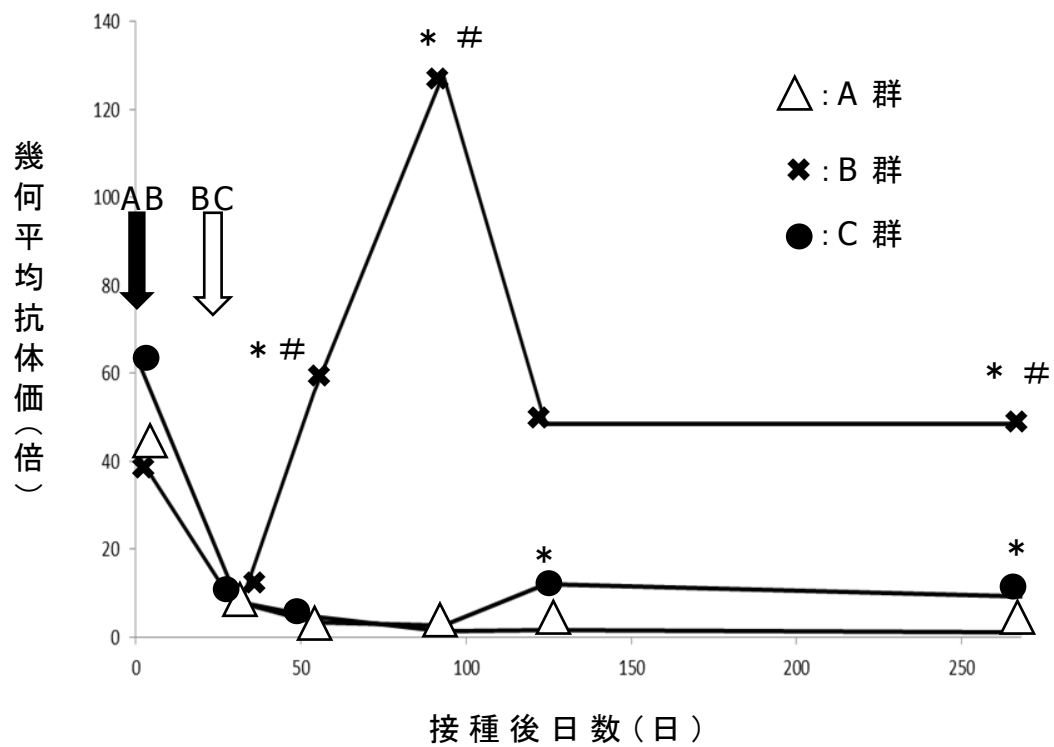


図 11. BVDV2 に対する抗体価の推移

黒矢印は不活化ワクチン、白矢印は生ワクチン接種時期を示す。A 群は 0 日目に、B 群は 0 日目と 31 日目に、C 群は 31 日目に接種した。

* : 各採血日において A 群に対して有意差あり $P < 0.05$

: C 群に対して有意差あり $P < 0.05$

4. 考 察

調査期間前に約 1 年間隔で 3 回実施したバルク乳検査において BVDV 遺伝子は検出されず、当農場の搾乳牛群内に持続感染牛がいた可能性は極めて低かった[16,43,54]。さらに 8 年前から調査期間中に本農場への外部からの牛の導入はなく、本農場の牛と外部の牛が接触する機会はなかった。また、本農場は 3 ヶ月齢以上すべての牛に BVDV1 を含む生ワクチンの接種歴があり、供試牛は十分な量の初乳が給与されていた。以上のことから、ワクチン接種前の A、B および C 群における BVDV1 と BVDV2 に対する抗体は移行抗体であると考えられた。

TSVP を実施した後の B 群における、試験開始後 54 日目の BVDV1 と BVDV2 に対する抗体価は、生ワクチン接種前である 31 日目の抗体価より上昇する傾向が認められたが、C 群の 54 日目における BVDV1 と BVDV2 に対する抗体価は生ワクチン接種前である 31 日目の抗体価と比較して下降する傾向が認められた。さらに 268 日目における BVDV1 と BVDV2 に対する抗体価は B 群が C 群に比較して有意に高かった。一般的に生ワクチンは、移行抗体の存在下では、ワクチン株の増殖が阻害され、免疫効果は不十分と考えられている[47,73]。TSVP では、先に接種した不活化ワクチンにより、移行抗体が消費されること、および免疫記憶細胞を刺激することにより、次の生ワクチン接種後に速やかな免疫応答が得られると予想されている[16,43,54]。今回の試験結果からも、TSVP は移行抗体が存在する条件下においても生ワクチン接種後に速やかな免疫効果が得られ、同様の結果となった。Oguzoglu ら[52]は TSVP を用いることにより、抗体価は BVDV1 に比較して低いものの BVDV2 に対する交差免疫が高まるとしている。Frey ら[25]は TSVP により BVDV2 に対する子宮内感染の防御効果が向上することを感染試験により証明している。本研究において BVDV2 に対する抗体価が B 群は A 群に対して 54 日目以後すべての採血時において、C 群に対して 54、93 お

よび 268 日目で有意に高かった。以上のことから、わが国で市販されているワクチンにおいても TSVP は BVDV1 を含む生ワクチン 1 回接種と比較して BVDV2 に対する抗体応答能が高まることが確認され、BVDV2 の感染予防効果が期待できる点で有用な手段であると考えられた。しかしながら、BVDV1 に関しては TSVP よりも BVDV1 の弱毒株を接種後に BVDV1 の不活化抗原を接種する LK 方式のほうが、より迅速な抗体応答が認められること [39] から、より多様な抗原性を有する BVDV1 対策としては、流行の程度によって接種方法を検討すべきであると考えられた。

第 1 章では、本章で用いたワクチンと同様のワクチンを用いて、BVDV1 を接種後に BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を接種する LK 方式を適用したが、BVDV1 単回接種と比較して、接種後 BVDV1 と BVDV2 に対する有意な抗体価の上昇は認められなかった。これに対して本章では、接種順番を変えて、BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原接種後に BVDV1 の弱毒株を接種し、BVDV1 単回接種群よりも BVDV1 および BVDV2 の両方に対する有意に高い抗体価が認められた。BVDV1 に対する抗体価が有意に高い値を示した理由については、BVDV1 の不活化抗原による移行抗体の消費と免疫記憶細胞刺激により BVDV1 弱毒ウイルス接種時に免疫増強効果が得られたため [47,73] と考えられた。BVDV2 に対する抗体価が有意に高い値を示した理由としては以下のことが考えられた。抗原の交差性について Cortese ら [12,13] は、BVDV1 を含む生ワクチンを接種することによって遺伝子亜型や抗原型の異なる 11 種類のウイルス株に対する交差免疫が得られたと報告している。交差免疫増強効果を証明した Oguzoglu ら [52] の接種方法は、初回感作用抗原として BVDV1 の不活化抗原のみを用いた。これに対して本章では初回感作用抗原として BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を用いた。さらに、本章において生ワクチン接種時点で他の 4 頭と比較して抗体価の低かった B 群の 1 頭は TSVP 後に BVDV2 に対する高い抗体応答 (512~4096 倍) を示した。一般的に生ワクチンは接種時に接種牛が保有する接

種抗原に対する抗体が少ないほど、接種後の抗体産生は高まるとされている[15,19,20,65]。以上から、本章の成績において BVDV2 に対する高い抗体価が得られた理由の一つとして、BVDV1 弱毒ウイルス接種による交差免疫のみではなく、初回に感作させた BVDV2 の不活化抗原により活性化された記憶 T および B 細胞の働きによって、BVDV1 弱毒ウイルス接種後に免疫増強効果が得られた可能性が考えられた[19]。初回に複数株の BVDV の不活化抗原を接種後に BVDV の弱毒株を接種する TSVP は、BVDV に対する免疫増強効果だけではなく、多様な免疫を獲得させるのに有効な方法と考えられた。

5. 小 括

牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）1 および BVDV2 の不活化ウイルスを接種後に BVDV1 弱毒ウイルスを免疫増強に用いるワクチン接種法（TSVP）により、BVDV1 と BVDV2 に対する十分な抗体応答を誘導できるか調査した。同一農場で出生し、十分に初乳を与えられた子牛 15 頭を 5 頭ずつ A、B、C の 3 群に分けて試験に用いた。BVDV1 と BVDV2 の不活化ウイルスを 1 回接種する A 群、TSVP の B 群および BVDV1 弱毒ウイルスを 1 回接種する C 群に区分して、中和抗体価を測定した。その結果、BVDV1 と BVDV2 に対する B 群の抗体価は A および C 群のそれらより有意に上昇した。この結果は第 1 章と第 2 章において BVDV1 弱毒ウイルス接種後 BVDV1 と BVDV2 の不活化ウイルスを接種する方法では認められなかった現象であった。BVDV2 弱毒ウイルスを含むワクチンが市販されていなかった 2015 年の段階では、TSVP は BVDV1 と BVDV2 に対する有効な抗体を付与するために有効であり、十分臨床応用可能であると考えられた。

（本章の内容の一部は、加藤肇、江村有希子、澤向陽一、佐藤洋平、西松栄光、佐藤礼一郎、大西守(2011)Two-step vaccine program の牛ウイルス性下痢ウイルス 2 型に対する有用性評価．日獣会誌 64、453-456[38]として公表した。）

第 4 章

Mannheimia haemolytica の莢膜抗原とロイコトキソイドを含む ワクチンの早期接種による子牛の抗体応答

1. 小 緒

Mannheimia haemolytica—serotype 1 (*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。離乳や移動によるストレスおよび牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の感染時に惹起される免疫抑制状態下で、肺組織に侵入増殖し、*Mh* の莢膜と放出される外毒素 (LKT) の作用により重篤な線維素性肺炎となり、*Pasteurella multocida* (*Pm*) や *Histophilus somni* (*Hs*) の二次感染を招き、さらに症状は重篤化する。*Mh* 感染症の臨床症状を緩和させるには、*Mh* に対する抗体応答を高めることが有効と考えられている [1]。したがって、子牛の呼吸器病の重篤化を防ぐためには、種々のウイルスに対する抗体を子牛に獲得させるだけでなく、*Mh* に対する抗体を獲得させることも重要な課題である。

Mh や *Hs* の不活化ワクチンは、抗体応答が長期間持続しないとされている [11]。したがって、子牛に移行抗体によって、*Mh* に対する抗体を獲得させるためには、分娩が近い母牛にワクチン接種して初乳中の抗体価を十分に高めておく必要がある。しかし、母牛に対する *Mh* ワクチンの接種は、製造過程で生じるワクチン由来のエンドトキシンによる母体の消耗や流産が懸念される [1]。そのため、母牛に接種してその初乳を介して子牛に免疫を付与する方法は取りにくい。子牛に対しては *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、生後早い時期のホルスタイン種の子牛について、移行抗体が存在する条件下でのワクチンの効果を検討した報告は少ない。前章までで、牛のウイルス性呼吸器感染症対策として臨床上有効なワクチン接種法を検討

した。いわゆる牛呼吸器複合疾患（BRDC）には、ウイルス性病原体以外にも複数の病因が関与していると考えられ、*Mh*に対する免疫付与は、その後の子牛期における呼吸器病重篤化阻止対策のうえで考慮すべき重要事項である。そこで、本章においては、呼吸器病重篤化阻止の対策の一つとして、生後早い段階で移行抗体が十分存在する時期の *Mh* ワクチン接種によって有効な抗体応答を誘導できるかを検討した。

2. 材料および方法

1) 試験農場の概要

前章までに実施した農場とは異なる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、出生直後から4ヵ月齢の子牛を飼養する子牛牛舎、5～15ヵ月齢牛を飼養する第1育成牛舎、受胎した育成牛および乾乳牛を飼養する第2育成牛舎および搾乳牛を飼養する成牛舎の4棟があり、それぞれ独立していた。試験開始時点において成牛412頭、育成牛126頭、子牛48頭が飼養されていた。

2) 供試牛

供試牛の採材時ごとの月齢を表14に示した。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ヵ月齢であり、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せ、以後は子牛牛舎内の自動哺乳施設で哺乳させた。4～5ヵ月齢で離乳し、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されなかった。

表 14. 供試牛の概要：試験開始時および採血日の月齢

試験群	牛NO	試験開始時の月齢(0日目)	36日目	106日目	132日目
A	1	2	3	5	7
A	2	2	3	5	7
A	3	2	3	5	7
A	4	1	2	4	6
A	5	1	2	4	6
		1.60±0.55*	2.60±0.55	4.60±0.55	6.60±0.54
B	6	1	2	4	6
B	7	1	2	4	6
B	8	1	2	4	6
B	9	1	2	5	6
B	10	1	2	5	6
		1.00±0.00	2.00±0.00	4.40±0.55	6.00±0.00
C	11	2	3	5	6
C	12	2	3	5	6
C	13	1	2	5	6
C	14	1	2	5	6
C	15	1	2	5	6
		1.40±0.55	2.40±0.55	5.00±0.00	6.00±0.00
D	16	1	2	5	6
D	17	1	2	5	6
D	18	1	2	5	6
D	19	1	2	5	6
D	20	1	2	5	6
		1.00±0.00	2.00±0.00	5.00±0.00	6.00±0.00

B 群および D 群には試験開始日(0 日目)にワクチンを接種

C 群および D 群には 106 日目にワクチンを接種

* : 平均値±標準偏差

3) ワクチン接種プログラムと血清の採取

ワクチンの接種プログラムと採血のスケジュールを図 12 に示した。ワクチンとして、*Mh*(A1 型 NL1009 株)のロイコトキソイド(LKT)および莢膜抗原を含む *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。

供試牛は 5 頭ずつ 4 群に区分しワクチンを接種しなかった A 群、1 ヶ月齢にワクチン接種した B 群、5 ヶ月齢にワクチンを接種した C 群、1 および 5 か月齢に 106 日間隔でワクチンを 2 回接種した D 群とした。ワクチン接種前の生後 1~2 ヶ月齢に全頭から血清を採取し、同日に B 群と D 群にワクチンを接種した。このワクチン接種日を試験開始日とし、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。試験開始日を 0 日とし、36、106 および 132 日目に血清を採取した。供試牛に初乳を提供した母牛 7 頭(ホルスタイン種、4~6 歳)の血清を試験開始 5 日後に採取した。抗体価測定までの期間、血清は -20℃ 以下で凍結保存した。

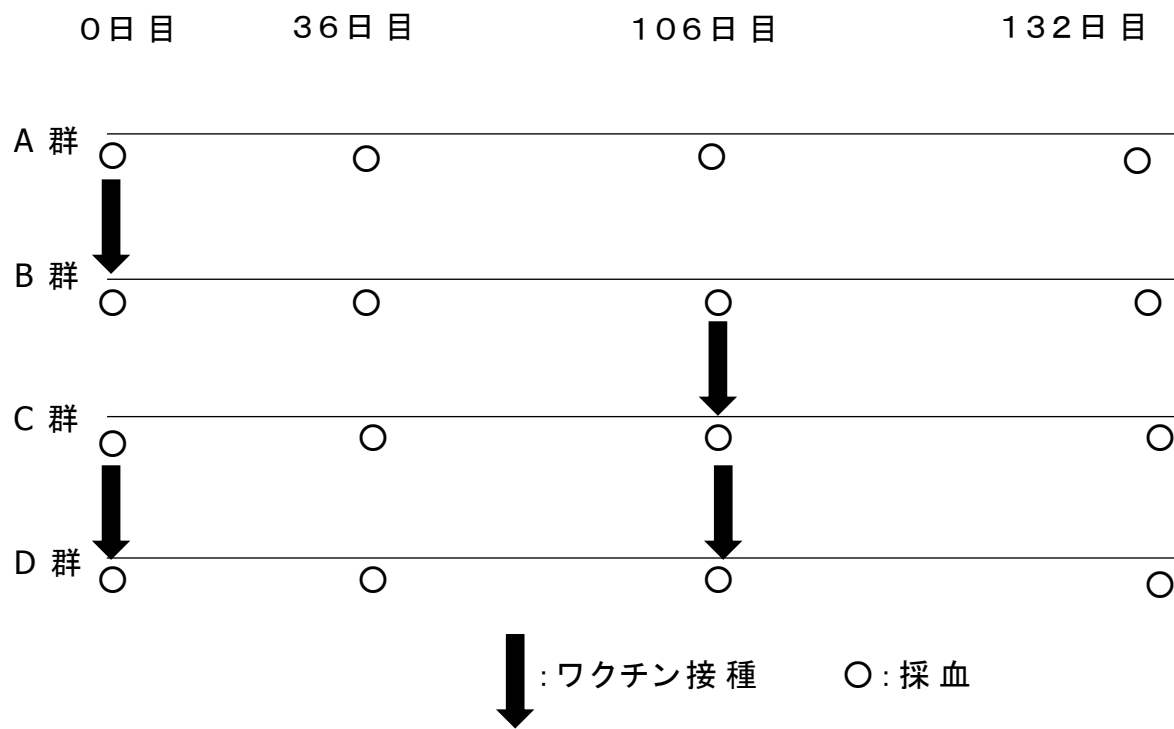


図 12. ワクチン接種および採血スケジュール

4) 抗体価の測定

Confer ら [11] の方法に準じて *Mh* 全菌体凝集抗体および *Mh* ロイコトキソイド中和抗体を測定した。すなわち、*Mh* 全菌体凝集抗体検査は被検血清を 56°C 30 分間非働化後に牛血清アルブミン加リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) にて 2 倍段階希釈した。*Mh*NL1009 株をホルマリン添加食塩液と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 100 μ l 分注し、被検血清 100 μ l と 37°C 2 時間反応させ、その後 4°C で 1 晩保存した。翌日、凝集の見られた被検血清を陽性とし、凝集のみられた最高希釈倍率を全菌体凝集抗原に対する抗体価 (凝集抗体価) とした。*Mh* ロイコトキソイドの中和抗体検査は、被検血清を 56°C 30 分で非働化後 RPMI-1640 培地にて 2 倍段階希釈した。*Mh*NL1009 株の 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 100 μ l 分注し、被検血清と 4°C 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 200 μ l 分注し、5%CO₂ 存在下 37 (±2) °C 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ウェルを陽性、変性細胞層がみられたウェルを陰性とした。陽性を示した血清の最高希釈倍率を LKT 中和抗体価とした。*Mh* 全菌体凝集抗体および *Mh* ロイコトキソイド中和抗体の測定は (株) ファイザー テクニカルサービス部 三島ラボラトリーの協力を得て測定した。

5) 統計解析

各採血日の凝集抗体価および LKT 中和抗体価は 2 を底とする抗体価の対数値に変換後に Tukey の多重比較検定法を用い各群間の

有意差を解析した。

3. 成 績

1) 全菌体凝集抗原に対する抗体価の推移

凝集抗体価を表 15 に、その推移を図 13 に示した。ワクチンを接種しなかった A 群の凝集抗体価は 8~128 倍で推移した。試験開始日に生後 1 か月齢でワクチンを 1 回接種した B 群の凝集抗体価は 16~256 倍で推移した。5 ヶ月齢でワクチンを接種した C 群の試験開始時の抗体価は 8~32 倍であり、ワクチン接種日までの凝集抗体価は A 群と同様の推移であった。ワクチン接種後の抗体価は 16~64 倍であった。1 および 5 ヶ月齢の 2 回ワクチンを接種した D 群の 2 回目ワクチン接種後の抗体価は 128~256 倍であった。すなわち 5 ヶ月齢まではワクチン接種の有無に関わらず、すべての牛において凝集抗体価の推移に違いは認められなかったが、1 ヶ月齢でワクチンを接種した B 群の 132 日目の抗体価は非接種群の A 群および 5 ヶ月齢でワクチンを接種した C 群より有意に高かった ($P<0.01$)。また、1 および 5 ヶ月齢の 2 回ワクチンを接種した D 群の 132 日目の抗体価は C 群のより有意に高かった ($P<0.01$) が、共に 1 ヶ月齢でワクチンを接種した B 群と D 群との間で有意差は認められなかった。

表 15. 全菌体に対する抗体価の推移

牛NO	試験群	0日目	36日目	106日目	132日目
1	A	8	32	8	64
2	A	32	64	16	128
3	A	32	64	16	64
4	A	64	64	16	128
5	A	128	16	16	128
6	B	32	32	16	256
7	B	32	64	16	256
8	B	32	32	32	256
9	B	16	32	256	256
10	B	32	32	16	256
11	C	8	64	16	64
12	C	32	64	8	64
13	C	8	64	32	64
14	C	16	64	16	16
15	C	16	64	16	64
16	D	32	32	16	128
17	D	64	64	16	128
18	D	32	64	32	128
19	D	128	64	64	256
20	D	8	64	8	256

B および D 群へのワクチン接種日を 0 日目とした。

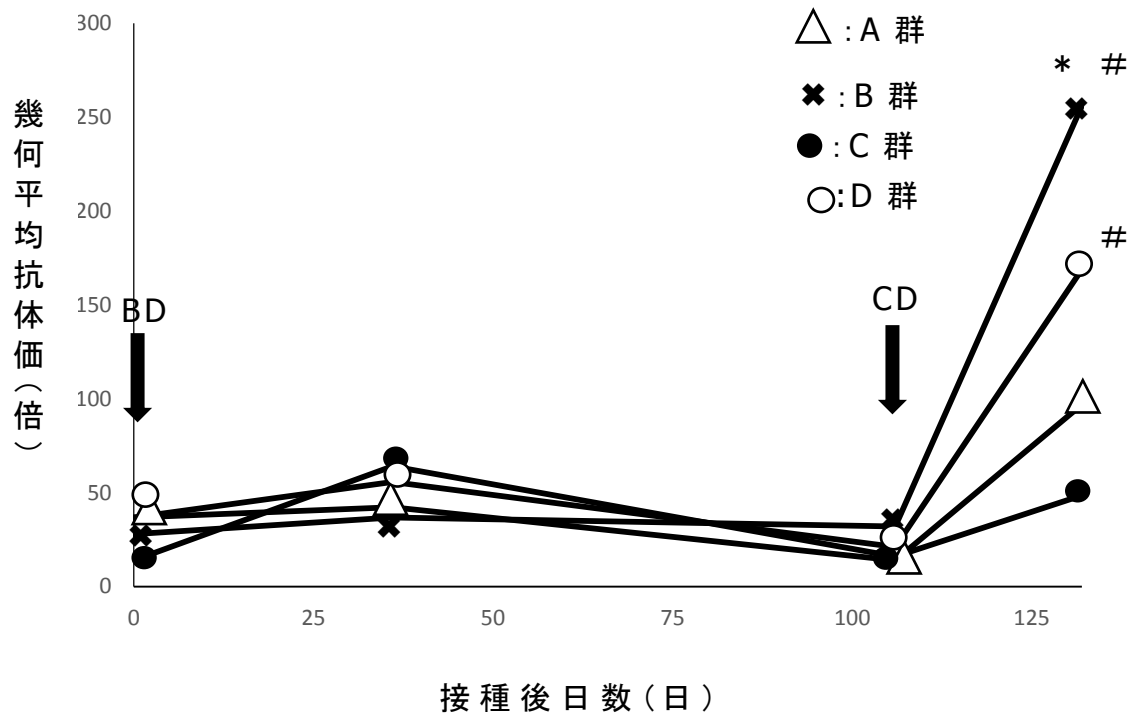


図 13. 全菌体に対する体価の推移

縦軸は幾何平均抗体価を示す。黒矢印はワクチン接種時期。

* : 各採血日において A 群に対して有意差あり $P < 0.01$

: C 群に対して有意差あり $P < 0.01$

2) LKT に対する抗体価の推移

LKT に対する中和抗体価を表 16 に、その推移を図 14 に示した。ワクチンを接種しなかった A 群の凝集抗体価は <2~32 倍で推移した。試験開始日に生後 1 か月齢でワクチンを 1 回接種した B 群の凝集抗体価は 2~32 倍で推移した。5 ヶ月齢でワクチンを接種した C 群の試験開始時の抗体価は 2~4 倍であり、ワクチン接種後の抗体価は 2~32 倍であった。1 および 5 ヶ月齢の 2 回ワクチンを接種した D 群の 2 回目ワクチン接種後の抗体価は 8~32 倍であった。すなわち、供試牛 20 頭中 16 頭において、2~3 ヶ月齢までの間、ワクチン接種の有無に関わらず 2~32 倍の LKT 中和抗体が認められた。3 ヶ月齢から 5 ヶ月齢にかけて LKT 中和抗体は上昇傾向を示した。5 ヶ月齢で 2 回目のワクチン接種後も (D 群)、LKT 中和抗体の有意な上昇は認められなかった。

表 16. LKT に対する抗体価の推移

牛NO	試験群	0日目	36日目	106日目	132日目
1	A	<2	<2	16	16
2	A	2	4	32	32
3	A	<2	<2	32	32
4	A	<2	<2	16	16
5	A	8	4	8	8
6	B	8	8	32	32
7	B	8	8	8	8
8	B	2	2	16	16
9	B	4	4	32	32
10	B	8	8	16	16
11	C	2	2	16	16
12	C	4	2	2	2
13	C	4	16	32	32
14	C	4	32	32	32
15	C	4	2	16	16
16	D	<2	16	32	32
17	D	4	2	8	8
18	D	4	2	8	8
19	D	2	<2	16	16
20	D	8	4	8	8

B および D 群へのワクチン接種日を 0 日目とした。

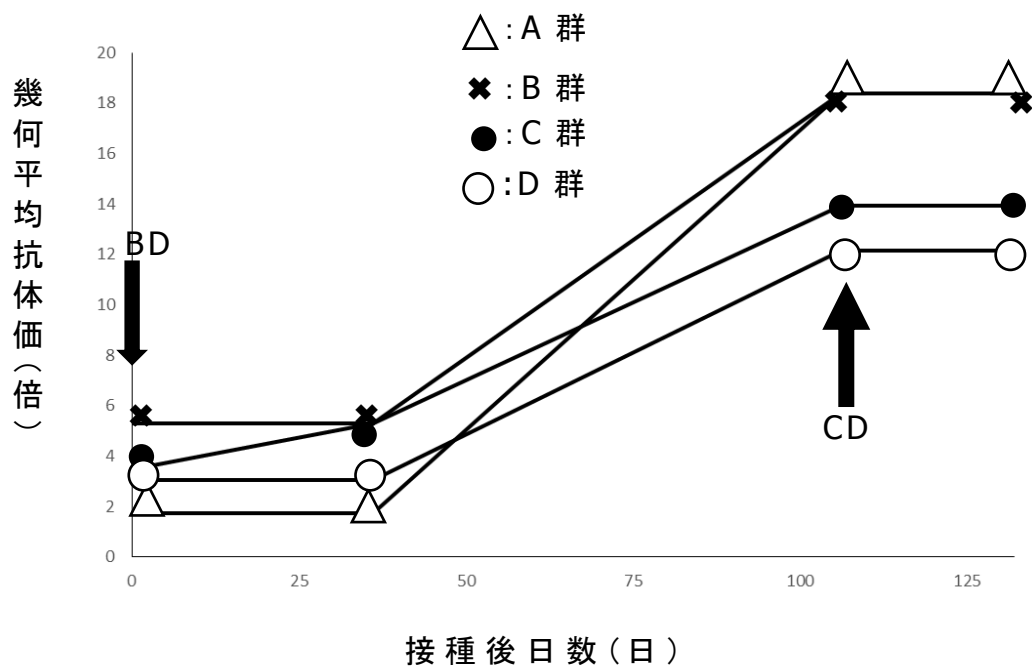


図 14. LKT に対する抗体価の推移

縦軸は幾何平均抗体価を示す。黒矢印はワクチン接種時期。

3) 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 および 256 倍であり、LKT 中和抗体価はそれぞれ 32、64、64、64、128、128 および 128 倍であった。したがって、本研究で使用した供試牛に給与されていた初乳は、十分な抗体を保有していたことが確認された。

4. 考 察

LKT 中和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 [44]。本試験において、初乳を提供した母牛は *Mh* および LKT に対する抗体を有しており、供試牛にはそれらの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であると考えられた。本ワクチンを 1 ヶ月齢で接種した B および D 群の接種後 36 日目の抗体価はワクチン未接種の A および C 群と比較してほぼ同様であった。これは、移行抗体が存在する条件下であったためと考えられた。

1 ヶ月齢でワクチンを接種した B 群はワクチン未接種の A 群および移行抗体が消失すると考えられている [44,74] 5 ヶ月齢でワクチンを接種した C 群と比べて、132 日目の *Mh* の凝集抗体価が有意 ($P<0.01$) に上昇していた。しかし、1 ヶ月齢で 1 回接種した B 群と 1 および 5 ヶ月齢の 2 回接種の D 群間の凝集抗体価には有意な差は認められなかった。さらに 132 日目の D 群は、1 ヶ月齢ではワクチンを接種しなかった C 群と比較して有意に上昇していた。AD 群間の凝集抗体価の有意差は認められなかったが、132 日目において D 群が A 群と比較して高い傾向を示した。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 [44]。各群の 132 日目は離乳から約 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* の感染に伴う肺組織内増殖によるものと考えられたが、抗体応答の程度にはワクチン接種の違いによって差が認められた。生ワクチン（弱毒株）を生体に接種することは、すなわち弱毒株を生体に感染させることを意味する [73]。本章で得られた結果は、3 章で明らかにされた BVDV の不活化抗原接種後に BVDV の弱毒株を接種することにより、BVDV の弱毒株の接種のみよりも効果的にウイルス中和抗体が得られたことと同様の結果となった。すなわちウイルスの不活化ワクチン同様バクテリアの不活化ワクチンにおいても移行抗体の存在

する時期に1回接種することで、当該病原体の感染時に効果的に中和抗体を誘導可能であることが明らかにされた。林ら[33]は、一次刺激を免疫記憶細胞に与えることにより、より活性化し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、1か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、次回の抗原感染時に抗体応答能が向上し、132日目の抗体価上昇の程度の差に影響したのではないかと考えられた。そのため、本ワクチンの子牛に対する早期の単回接種は、ワクチン接種によるワクチン自体の効力により抗体を獲得させることはできないが、*Mh*の感染に伴う肺組織内増殖時に急速かつ大量の抗体産生を誘導し、結果的に感染時に豊富な抗体を速やかに獲得可能なことが示唆された。

一方、試験期間を通して、各群間でLKT中和抗体価に有意差は認められなかった。ホルマリンでトキシイド化した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とされている[81]。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中和抗体価の有意差は認められなかった。これは、トキシイドワクチンは全菌体抗原ワクチンと異なり、移行抗体が存在する条件下では、抗体応答が不十分なだけでなく一次刺激を免疫細胞に与える点[33]でも不十分であるからと考えられた。

5. 小 括

Mannheimia haemolytica (*Mh*)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 か月齢でワクチンを 1 回接種する B 群 5 頭、5 か月齢でワクチンを 1 回接種する C 群 5 頭および 1 ヶ月齢と 5 か月齢でワクチンを 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 ($P < 0.01$)。すなわち 1 回接種の場合、5 ヶ月齢で接種するよりも 1 ヶ月齢で接種した方が抗体反応は大きいことが示唆された。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。以上から、*Mh* 不活化莢膜抗原を含むワクチンの子牛に対する早期の接種は、ワクチン接種による抗体応答は不十分であるが、*Mh* の肺内感染時に速やかに抗体応答を誘導し、結果的に豊富な抗体を速やかに獲得可能なことが示唆された。したがって、1 ヶ月齢に *Mh* ワクチンを接種しておくことは、離乳後の呼吸器病対策の備えとして臨床上有効であることが示唆された。

(本章の内容の一部は、加藤肇、杉山昌嗣、佐久間元希、米山修、大西守、田島誉士 2012、*Mannheimia haemolytica* ワクチンの早期接種による子牛の抗体応答調査. 日獣会誌 65、694-697 [40]として公表した。)

総 括

子牛の呼吸器病は乳牛の生産性に多大な負の影響を与えると考えられている。また、子牛の呼吸器病はその臨床症状が重篤化した場合、その後の著しい生産性の低下を起す。呼吸器病を重篤化させる要因として、環境の変化やストレスに加えてウイルスと細菌との混合感染が大きな要因と考えられている。とくに牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)と *Mannheimia haemolytica* (*Mh*) の混合感染は重篤な線維索性肺炎の原因となる。子牛の呼吸器病は BVDV や *Mh* のみならず、種々のウイルスとバクテリアの混合感染により症状は重篤化する。したがって、種々の病原体に対する多様で、かつ豊富な免疫を子牛に獲得させることが重要である。種々のウイルスおよびバクテリアの感染による臨床症状の重篤化を防止する有用な手段としてワクチン接種が挙げられる。しかし、我が国においては、呼吸器病のウイルスに対するワクチンは呼吸器病に強く関与する牛ヘルペスウイルス 1 型 (BHV1)、BVDV および牛 RS ウイルス (BRSV) の弱毒株あるいは不活化した株を含む混合ワクチンが用いられてきたが、その混合ワクチンをいつどのように接種したら有効な免疫効果が得られるか調べられてこなかった。近年、子牛が早期に肺炎に罹患する傾向があるため離乳前の早期の段階で *Mh* ワクチンが接種されてきているが、離乳前の *Mh* ワクチンの接種は移行抗体の影響を強く受けて液性免疫誘導は抑制されることから、その免疫効果は疑問視されてきた。*Mh* ワクチンの早期接種後の液性免疫誘導効果を一定の時期調査した報告はない。本研究では、我国で市販されている BHV1、BVDV および BRSV を含む混合ワクチンと *Mh* を含む混合ワクチンを用い、種々の病原体に対する多様で豊富な抗体を、どのような接種方法によって効率的に獲得させられるかを検討し、子牛期における呼吸器病対策として、臨床上活用可能なワクチンの接種法の確立を試みた。

第 1 章では、BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含有するウイルス

性呼吸器病対策用の混合生ワクチンと、BVDV1弱毒株を含む相同の混合生ワクチンを用い、子牛の抗体応答を比較検討した。4種類の異なるワクチン接種法における抗体価の推移を330日間観察した。その結果、BHV1とBRSV対策としては、BHV1とBRSVの弱毒株を含む混合ワクチンを2回接種することで、高いウイルス中和抗体誘導効果が得られることが明らかとなった。一方、BVDVについては、BVDV1弱毒株はBVDV1とBVDV2の不活化抗原と比較して高い液性免疫誘導効果があることが明らかにされたが、BVDV1弱毒株を含むワクチン接種後にBVDV1とBVDV2の不活化抗原を含むワクチンを接種しても、BVDV2に対する中和抗体誘導効果は不十分であると考えられた。野外で分離されるBVDVは非常に多くの遺伝的および抗原的変異が認められていることから、BVDV1とBVDV2の不活化抗原を含む混合生ワクチンとBVDV1弱毒株のみを含む混合生ワクチンを用いて、多様でかつ豊富なBVDVに対する抗体を獲得させるためには、BVDVワクチンの接種方法の検討が必要と考えられた。

第2章では、BVDV1の弱毒株を含む生ワクチンを、移行抗体がほとんど消失した育成牛に対して接種した後の抗体の維持期間について調査した。その結果、BVDV1弱毒株を含む生ワクチン1回接種によってBVDV1およびBVDV2に対する抗体誘導が可能であり、さらに得られた抗体は少なくとも3年間は維持されることが確認された。すなわち、育成期にBVDV1弱毒株を含む生ワクチンを1回接種することで、その後接種牛が分娩時に初乳による移行抗体によってBVDVの抗体を子牛に獲得させることが可能であり、子牛の呼吸器病の重篤化を阻止する重要な手段であると考えられた。しかし、試験期間にBVDV1弱毒株を含む生ワクチンを1回接種した群とBVDV1弱毒株を含むワクチン接種後にBVDV1とBVDV2の不活化抗原を含む不活化ワクチンを接種した群との間で抗体価に有意な差は認められなかった。このことは、第1章とは異なるBVDV1弱毒株とBVDV1とBVDV2の不活化抗原を用い、かつ接種時期を変え

て追加接種しても BVDV2 に対する十分な液性免疫誘導効果は認められない結果となった。多様な BVDV に対する液性免疫を付与させるためには、第 1 章で示された課題同様、BVDV ワクチンの接種方法の改良が必要と考えられた。

そこで、第 3 章では、我国同様 BVDV1 と BVDV2 の弱毒株を含む生ワクチンがないドイツにおけるワクチン接種方法、すなわち BVDV1 および BVDV2 の不活化抗原を含むワクチンを接種後に BVDV1 弱毒株を含むワクチンを免疫増強に用いるワクチン接種法 (TSVP) により、BVDV1 と BVDV2 に対する十分な抗体応答を誘導できるか検討した。その結果、BVDV1 と BVDV2 に対する TSVP 群の抗体価は BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含むワクチンを 1 回接種する群および BVDV1 弱毒株を含むワクチンを 1 回接種する群のそれらより有意に上昇した ($P < 0.05$)。この結果は、第 1 章および第 2 章において BVDV1 弱毒株を含む生ワクチン接種後に BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含むワクチンを接種する方法では認められなかった現象であった。BVDV2 弱毒株を含むワクチンが市販されていなかった状況では、TSVP は BVDV1 と BVDV2 に対する有効な抗体を付与するために有用であり、十分臨床応用可能であると考えられた。BVDV は地域、牛群の飼養形態および牛の移動状況によって流行している株や汚染状況が異なる。すべての状況において TSVP を用いるワクチン接種方法が最適であるとはいえないが、母牛に接種することにより移行抗体で子牛に免疫を付与して子牛の呼吸器病の重篤化を防ぐという観点では、第 2 章で明らかとなった BVDV 弱毒株の長期の免疫効果も考慮し、育成期の早い段階で TSVP を用いる方法が、BVDV1 と BVDV2 を含む生ワクチンが市販流通していなかった状況では最良の方法と考えられた。BHV1 と BRSV に対しては弱毒株を 2 回接種すること、BVDV に対しては TSVP を用いることで、これら主要ウイルスに対する豊富で多様な液性免疫を付与可能なことが明らかとなった。

第 4 章では、*Mh* の不活化莢膜抗原とロイコトキソイドを含むワ

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。その結果、1か月齢でワクチンを1回接種した群が、ワクチンを接種しない群と5か月齢でワクチンを1回接種した群に比べて、*Mh*に対する抗体価の上昇の程度が有意に大きかった($P<0.01$)。すなわち1回接種の場合、5か月齢で接種するよりも1ヶ月齢で接種した方が抗体反応は大きいことが示唆された。さらに、1か月齢でワクチンを1回接種した群と1ヶ月齢と5か月齢でワクチンを2回接種した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。以上から、*Mh*不活化炭膜抗原を含むワクチンの子牛に対する早期の接種は、ワクチン接種による抗体応答は不十分であるが、*Mh*の肺内感染時に速やかに液性免疫を誘導し、結果的に豊富な抗体を速やかに獲得可能なことが示唆された。これは、第3章で、BVDVの不活化抗原を接種後にBVDVの弱毒株を接種することで効果的にウイルス中和抗体が誘導できたことと類似する結果となった。以上から、1か月齢に*Mh*ワクチンを接種しておくことは、離乳後の呼吸器病対策の備えとして臨床上有効であることが示唆された。

現在、呼吸器病ワクチンの免疫効果は急速に向上しているが、注射型の混合ワクチンにより育成期の早い段階で母牛にワクチネーションして、移行抗体として子牛に免疫を付与する方法が最も安全で確実な方法である。ウイルスに対しては、今回用いたBVDV1の弱毒株を含む混合生ワクチンとBVDV1とBVDV2が不活化抗原でBHV1とBRSVが弱毒株の混合生ワクチンを用い、育成期の早い段階でこれを先に接種し、その後BVDV1の弱毒株を含む混合生ワクチンを接種することでBHV1、BRSV、BVDV1およびBVDV2に対する豊富な液性免疫を付与可能なことが明らかとなった。*Mh*ワクチンは生後早い段階でワクチンを接種する必要があるとされているが、この場合でも移行抗体の影響を受けて液性免疫誘導効果が期待できないとされてきた生後1か月齢での接種により、豊富な抗体を速やかに獲得可能なことが明らかとなった。ワクチンの接種方法は、

その牛群で流行している病原体、流行の時期、牛群の規模および他牛群との接触の有無や導入牛の有無に応じて変えていく必要がある。しかし、子牛の呼吸器病の重篤化を防ぐ観点でいえば、出生後の早期の段階で呼吸器病発症に強く関与する BHV1、BRSV、BVDV および *Mh* に対する液性免疫を付与させるワクチンの接種方法が最適である。本研究を通じて明らかにされたワクチン接種方法により、子牛に対して早期に呼吸器病に深く関与する病原体に対する抗体を、BVDV 弱毒株の胎子感染や *Mh* ワクチンの保有するエンドトキシンによる流産等の副反応の影響を最小にして獲得させることが可能であり、十分臨床応用可能であると考えられた。

謝 辞

本研究の遂行および本論文の作成にあたり、終始ご指導およびご校閲を賜りました酪農学園大学 獣医学群 獣医学類 生産動物医療学分野 生産動物内科学 1 ユニット 田島誉士教授に深甚なる謝意を表します。論文作成にあたり貴重なご助言とご校閲を賜った生産動物内科学 II ユニット小岩政照教授およびウイルス学ユニット萩原克郎教授に謝意を表します。また本論文の作成において終始適切にご指導ならびにご助言を賜りました元鳥取大学農学部獣医学科内科学研究室籠田勝基名誉教授ならびに(株)微生物化学研究所 函城悦司先生に深謝いたします。

種々のウイルス抗体価の測定に御協力いただいた(株)微生物化学研究所 久保田修一先生ならびに種々の細菌およびトキシソイドに対する抗体価測定に御協力いただいた(株)ファイザー 農産事業部 テクニカルサービス部 堀井忠夫先生に心から感謝申しあげます。

本研究の遂行にあたり、多大な協力をいただいた酪農研修牧場、日下信男牧場およびハイエストファームの方々に深甚なる感謝を申しあげます。

研究に御協力いただいた、旧根室地区 NOSAI 西春別支所および北海道ひがし農業共済組合根室南部センターの獣医師に感謝申しあげます。

最後に、常に私の精神的な支えとなってくれた妻礼子や大介、さやかの子供たちに感謝に意を込め付記いたします。

引用文献

1. Anthony, W. 2008. *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica, Pasteurella multocida, and Histophilus somni (Haemophilus somnus)*. pp1607-1610. In: Large Animal Internal Medicine. 4th ed (Smith, B.P. ed) **Mosby Inc., St.Louis**.
2. Bach, A. 2011. Association between several aspects of heifer development and cow survivability to second location. *J. Dairy Sci.* **94**: 1052-1057.
3. Baker, J.C., Ellis, J.A., Clark, E.G. 2010. Bovine respiratory syncytial virus. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* **26**: 575-593.
4. Bates, D.W., Anderson, J.F. 1984. Environmental design for a total animal health care system. *Bov. Pract.* **19**: 4-12
5. Booker, C.W., Abutarbush, S.M., Morley, P.S., Jim, G.K., Pittman, T.J., Schunicht, O.C., Perrett, T., Wildman, B.K., Fenton, R.K., Guichon, P.T., Janzen, E.D. 2008. Microbiological and histopathological findings in cases of fatal bovine respiratory disease of feedlot cattle in western Canada. *Can. Vet. J.* **49**: 473-471.
6. Brock, K.V., Widel, P., Walz, P., Walz, H.L. 2007. Onset of protection from experimental infection with type 2 bovine viral diarrhea virus following vaccination with a modified-live vaccine. *Vet. Ther.* **8**: 88-96
7. Brodersen, B.W., Kelling, C.L. 1998. Effect of concurrent experimentally induced bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea virus infection on respiratory tract and enteric diseases in calves. *Am. J. Vet. Res.* **59**:1423-1430.
8. Burciaga-Robles, L.O., Step, D.L., Krehbiel, C.R., Holland, B.P., Richards, C.J., Montelongo, M.A., Confer A.W, Fulton RW.

2010. Effects of exposure to calves persistently infected with bovine viral diarrhoea 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
9. Chase, C.C. 2013. The impact of BVDV infection on adaptive immunity. *Biologicals.* **41**: 52-60
10. Clarke, C.R., Burrows, G.E., Ames, T.R. 1991. Therapy of bovine bacterial pneumonia. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **7**: 669-694
11. Confer, A.W., Fulton, R.W., Clinkenbeard, K.D., Driskel, B.A. 1998. Duration of serum antibody responses following vaccination and revaccination of cattle with non-living commercial *Pasteurella haemolytica* vaccines. *Vaccine.* **16**: 1962-1970.
12. Cortese, V.S., West, K.H., Hassard, L.E., Carman, S., Ellis, J.A. 1998. Clinical and immunologic responses of vaccinated and unvaccinated calves to infection with a virulent type-II isolate of bovine viral diarrhoea virus. *Am. Vet. Med. Assoc.* **213**: 1312-1319.
13. Cortese, V.S., Whittaker, R., Ellis, J., Ridpath, J.F., Bolin, S.R. 1998. Specificity and duration of neutralizing antibodies induced in healthy cattle after administration of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhoea. *Am. J. Vet. Res.* **59**: 848-850.
14. Cusack, P.M. 2004. Effect of mass medication with antibiotics at feedlot entry on the health and growth rate of cattle destined for the Australian domestic market. *Aust. Vet. J.* **82**: 154-156
15. Daniel, L., John, C., Trevor, R. 2008. Disease caused by bovine

- virus diarrhea virus. pp791-798. *In*: Large Animal Internal Medicine, 4th ed. (Smith, B.D. ed) **Mosby Inc., St.Louis.**
16. Drew, T.W., Yapp, F., Paton, D.J. 1999. The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR. *Vet. Microbiol.* **64**: 145-154.
 17. Donovan, G.A, Dohoo, I.R, Montgomery, D.M., Bennett, F.L. 1998. Calf and disease factors affecting growth in female Holstein calves in Florida. USA. *Prev. Vet. Med.***33**: 1-10.
 18. Ellis, J., Waldner ,C., Rhodes, C., Ricketts, V. 2005. Longevity of protective immunity to experimental bovine herpesvirus-1 infection following inoculation with a combination modified-live virus vaccine in beef calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **227**: 123-128.
 19. Ellis, J., West, K., Cortese, V., Konoby, C., Weigel, D. 2001. Effect of maternal antibodies on induction and persistence of vaccine-induced immune responses against bovine viral diarrhea virus type II in young calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **219**: 351-356.
 20. Endsley, J.J., Roth, J.A., Ridpath, J., Neill, J. 2003. Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV. *Biologicals.* **31**: 123-125.
 21. Ficken, M.D., Ellsworth, M.A., Tucker, C.M. 2006. Evaluation of the efficacy of a modified-live combination vaccine against bovine viral diarrhea virus types 1 and 2 challenge exposures in a one-year duration-of-immunity fetal protection study. *Vet. Ther.* **7**: 283-394.
 22. Ficken, M.D., Ellsworth, M.A., Tucker, C.M., Cortese, V.S. 2006. Effects of modified-live bovine viral diarrhea virus vaccines containing either type 1 or types 1 and 2 BVDV on heifers and their offspring after challenge with

- noncytopathic type 2 BVDV during gestation. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **228**: 1559-1564.
23. Frank, G.H., Duff, G.C. 2000. Effects of tilmicosin phosphate, administered prior to transport or at time of arrival, and feeding of chlortetracycline, after arrival in a feedlot, on *Mannheimia haemolytica* in nasal secretions of transported steers. *Am. J. Vet. Res.* **61**:1479-1483.
24. Fredriksen, B., Sandvik, T., Løken, T., Odegaard, S.A. 1999. Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus. *Vet. Rec.* **144**: 111-114.
25. Frey, H.R, Eicken, K., Grummer, B., Kenklies, S., Oguzoglu, T.C., Moennig, V. 2002. Foetal protection against bovine virus diarrhoea virus after two-step vaccination. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health.* **49**:489-493.
26. 福富豊子、大内紀章、澤田勝志、平井伸明、秦守男、長井誠 2008. 岡山県で分離された牛ウイルス性下痢ウイルスの遺伝子解析. *日獣会誌.* **61**: 693-698.
27. Fulton, R.W. 2013. Host response to bovine viral diarrhoea virus and interactions with infectious agents in the feedlot and breeding herd. *Biologicals.* **41**: 31-38.
28. Fulton, R.W., Blood, K.S., Panciera, R.J., Payton, M.E., Ridpath, J.F., Confer, A.W., Saliki, J.T., Burge, L.T., Welsh, R.D., Johnson, B.J., Reck, A. 2009. Lung pathology and infectious agents in fatal feedlot pneumonias and relationship with mortality, disease onset, and treatments. *J. Vet. Diagn. Invest.* **21**: 464-477.
29. Fulton, R.W., Cook, B.J., Step, D.L., Confer, A.W., Saliki, J.T., Payton, M.E., Burge, L.J., Welsh, R.D., Blood, K.S. 2002. Evaluation of health status of calves and the impact on

- feedlot performance: assessment of a retained ownership program for postweaning calves. *Can. J. Vet. Res.* **66**: 173-180.
30. Gershwin, L.J. 2012. Immunology of bovine respiratory syncytial virus infection of cattle. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **35**: 253-257.
31. Griffin, D. 2010. Bovine pasteurellosis and other bacterial infections of the respiratory tract. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **26**: 57-71.
32. Halliwell, R.E.W., Gorman, N.T. 1989. The immunoglobins. pp19-54. *In*: Veterinary Clinical Immunology (Halliwell, R.E.W ed) Saunders, Philadelphia
33. 林智人. 2008. 「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.
34. 伊藤麻子、迫田義博、亀山健一郎、山崎幸夫、臼井明、喜田宏. 2008. 牛ウイルス性下痢病および牛伝染性気管支炎に対する市販混合ワクチン接種プログラムの中和抗体反応による評価. *日獣会誌*. **61**: 39-42.
35. Kaeberle, ML., Sealock, R., Honeyman, M.1998. Antibody responses of young calves to inactivated viral vaccines. *Proc. Am. Assoc. Bov. Pract.* **31**: 229-251.
36. 加藤肇、江村有希子、中尾茂、佐藤礼一郎、大西守、田島誉. 2010. 牛ウイルス性下痢ウイルス不活化抗原を含む呼吸器病混合ワクチンの免疫効果. *家畜診療*. **57**: 221-226.
37. 加藤肇、一條祐一、江村有希子、佐藤礼一郎、高久英徳、大西守、田島誉士. 2010. 牛ウイルス性下痢ウイルスワクチンによる中和抗体価維持期間に関する調査. *日獣会誌*. **63**: 33-37.
38. 加藤肇、江村有希子、澤向陽一、佐藤洋平、西松栄光、佐藤礼一郎、大西守、田島誉士. 2011. Two-step vaccine program の牛ウイルス性下痢ウイルス2型に対する有用性評価. *日獣会誌*.

- 64: 453-456.
39. Kato, H., Sato, R., Oonish, M. Tajima, M. 2015. Comparison of vaccination protocols for bovine herpesvirus type1 and bovine viral diarrhea virus. *J. Vet. Med. Res.* **2**: 1034-1037.
 40. 加藤肇、杉山昌嗣、佐久間元希、米山修、大西守、田島誉士. 2012. *Mannheimia haemolytica* ワクチンの早期接種による子牛の抗体応答調査. *日獣会誌*. **65**: 694-697.
 41. Kim, S.G., Anderson, R.R., Yu, J.Z., Zylich, N.C., Kinde, H., Carman, S., Bedenice, D., Dubovi, E.J. 2009. Genotyping and phylogenetic analysis of bovine viral diarrhea virus isolates from BVDV infected alpacas in North America. *Vet. Microbiol.* **136**: 209-216.
 42. Kimman, T.G., Sol, J., Westenbrink, F., Straver, P.J. 1989. A severe outbreak of respiratory tract disease associated with bovine respiratory syncytial virus probably enhanced by vaccination with modified live vaccine. *Vet. Q.* **11**:250-253.
 43. Kozasa, T., Tajima, M., Yasutomi, I., Sano, K., Ohashi, K., Onuma, M. 2005. Relationship of bovine viral diarrhea virus persistent infection to incidence of diseases on dairy farms based on bulk tank milk test by RT-PCR. *Vet. Microbiol.* **106**: 41-47.
 44. 車戸久寿. 2008. 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
 45. Lago, A., McGuirk, S.M., Bennett, T.B., Cook, N.B., Nordlund, K.V. 2006. Calf respiratory disease and pen microenvironments in naturally ventilated calf barns in winter. *J. Dairy Sci.* **89**: 4014-4025
 46. Louis, J., Perino, D., Mike, A. 1999. Bovine Respiratory Disease. Current veterinary therapy 4. *Food Anim. Pract.* **10**:

653-664

47. Moennig, V., Eicken, K., Flebbe, U., Frey, H.R., Grummer, B., Haas, L., Greiser-Wilke, I., Liess, B. 2005. Implementation of two-step vaccination in the control of bovine viral diarrhoea (BVD). *Prev. Vet. Med.* **72**: 109-114.
48. Nagai, M., Ito, T., Sugita, S., Genno, A., Takeuchi, K., Ozawa, T., Sakoda, Y., Nishimori, T., Takamura, K., Akashi, H. 2001. Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan. *Arch. Virol.* **146**: 685-696.
49. 中家一郎、富田啓介、池内俊久、鳥飼善郎. 1998. 肺炎子牛肺炎組織からの分離細菌. *日獣会誌*. **51**: 136-140.
50. Nordlund, K.V. 2008. Practical considerations for ventilating calf barns in winter. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **24**: 41-54.
51. O'Connor, A., Martin, S.W., Harland, R., Shewen, P., Menzies, P. 2001. The relationship between the occurrence of undifferentiated bovine respiratory disease and titer changes to *Haemophilus somnus* and *Mannheimia haemolytica* at 3 Ontario feedlots. *Can. J. Vet. Res.* **65**: 143-150.
52. Oguzoglu, T.C., Frey, H.R., Eicken, K., Grummer, B., Liess, B., Moennig, V. 2003. Kinetics and persistence of neutralizing antibodies against bovine viral diarrhoea virus-1 and -2 and border disease virus after two step vaccination of cattle. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **110**: 14-17.
53. Pavlata, L., Pechová, A., Dvořák, R. 2004. Microelements in colostrum and blood of cows and their calves during colostrum nutrition. *Acta Veterinaria Brno.* **73**: 421.
54. Radwan, G.S., Brock, K.V., Hogan, J.S., Smith, K.L. 1995. Development of a PCR amplification assay as a screening test

- using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus. *Vet. Microbiol.* **44**: 77-91.
55. Riedel-Caspari, G. 1993. The influence of colostrum leukocytes on the course of an experimental *Escherichia coli* infection and serum antibodies in neonatal calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **35**: 275-288.
56. Roth, J.A. 1992. Building Immunity. National Hog Farmer. Spring: 1-48.
57. Roth, J.A. 2002. T-cell populations responsive to bovine respiratory syncytial virus in seronegative calves. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **84**: 111-123.
58. Roth, J.A., Kaeberle, M.L. 1983. Suppression of neutrophil and lymphocyte function induced by a vaccinal strain of bovine viral diarrhoea virus with and without the administration of ACTH. *Am. J. Vet. Res.* **44**: 2366-2372.
59. Sacerdote, P., Mussano, F., Franchi, S., Panerai, A.E., Bussolati, G., Carossa, S., Bartorelli, A., Bussolati, B. 2013. Biological components in a standardized derivative of bovine colostrum. *J. Dairy Sci.* **96**: 1745-1754.
60. Shahriar, F.M., Clark, E.G., Janzen, E., West, K., Wobeser, G. 2002. Coinfection with bovine viral diarrhoea virus and *Mycoplasma bovis* in feedlot cattle with chronic pneumonia. *Can. Vet. J.* **43**: 863-868.
61. Shimazaki, T., Nakamura, S., Taguchi, K., Inoue, Y. 2003. Efficacy of bovine viral diarrhoea vaccine used in Japan against bovine viral diarrhoea virus type 2 strain 890. *J. Vet. Med. Sci.* **65**: 263-266.
62. Sivula, N.J., Ames, T.R., Marsh, W.E. 1996. Descriptive epidemiology of morbidity and mortality in Minnesota dairy heifer calves. *Prev. Vet. Med.* **27**: 155-168.

63. Svensson, C., Liberg, P. 2006. The effect of group size on health and growth rate of Swedish dairy calves housed in pens with automatic milk-feeders. *Prev. Vet. Med.* 73: 43-53.
64. Svensson, C., Lundborg, K., Emanuelson, U., Olsson, S.O. 2003. Morbidity in Swedish dairy calves from birth to 90 days of age and individual calf-level risk factors for infectious diseases. *Prev. Vet. Med.* 58: 179-197.
65. Tizard, I. 1992. General principles of vaccination and vaccines. pp215-228. *In: Veterinary immunology* 4th ed(Tizard I.R. ed) Saunders, Philadelphia.
66. Tyler, J.W., Cullor, J.S. 1989. Titters, tests, and truisms: rational interpretation of diagnostic serologic testing. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 194: 1550-1558.
67. Vanderfels-Klerx, H.J., Martin, S.W., Nielen, M.M., Huirne, R.B. 2002. Effect on productivity and risk factors of bovine respiratory disease in dairy heifers ; a review for the Netherland, Netherlands *J. Agricul. Sci.* 50: 27-45.
68. Van der Fels-Klerx, H.J., Saatkamp, H.W., J,Verhoeff, A. 2002. Effect of bovine respiratory disease on the productivity of dairy heifers quantified by experts. *Livestock Prod. Sci.* 75: 157-166.
69. Van Donkersgoed, J. 1992. Meta-analysis of field trials of antimicrobial mass medication for prophylaxis of bovine respiratory disease in feedlot cattle. *Can. Vet. J.* 33: 786-795.
70. Van Donkersgoed, J., Guenther, C., Evans, B.N., Potter, A.A., Harland, R.J. 1995. Effects of various vaccination protocols on passive and active immunity to *Pasteurella haemolytica* and *Haemophilus somnus* in beef calves. *Can. Vet. J.* 36: 424-429.
71. Van Donkersgoed, J., Potter, A.A., Mollison, B., Harland, R.J.

1994. The effect of a combined *Pasteurella haemolytica* and *Haemophilus somnus* vaccine and a modified-live bovine respiratory syncytial virus vaccine against enzootic pneumonia in young beef calves. *Can. Vet. J.* **35**: 239-241.
72. Vangeel, I., Antonis, A.F, Fluess, M., Riegler, L., Peters, A.R., Harmeyer, S.S. 2007. Efficacy of a modified live intranasal bovine respiratory syncytial virus vaccine in 3-week-old calves experimentally challenged with BRSV. *Vet. J.* **174**: 627-635.
73. Victor, S. 2008. Bovine vaccine and herd vaccination program. pp1591- 1605 *In*: Large Animal Internal Medicine 4th ed (Smith BD ed.) **Mosby Inc., St.Louis.**
74. Virtala, A.M., Gröhn, Y.T., Mechor, G.D., Erb, H.N. 1999. The effect of maternally derived immunoglobulin G on the risk of respiratory disease in heifers during the first 3 months of life. *Prev. Vet. Med.* **39**:25-37.
75. Waltner-Toews, D., Martine, S.W., Meek, A.H. 1986. Dairy calf management, morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. I. The Data. *Prev. Vet. Med.* **4**:103-104.
76. Waltner-Toews, D., Martin, S.W., Mee, A.H. 1986. Dairy calf management morbidity and mortality in Ontario Holstein herds. III. Association of management with morbidity. *Prev. Vet. Med.* **4**: 137-158.
77. Waltner-Toews, D., Martin, S.W., Meek, A.H. 1986. The effect of early calthood health status on survivorship and age at first calving. *Can. J. Vet. Res.* **50**: 314-317.
78. Wathes, D.C., Brickell, J.S., Bourne, N.E., Swal, A., Cheng, Z.2008. Factors influencing heifer survival and fertility on commercial dairy farms. *Animal.* **2**: 1135-1143.
79. Welsh. M.D., Adair, B.M., Foster, J.C. 1995. Effect of BVD

- virus infection on alveolar macrophage functions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **46**: 195-210.
80. Welsh, R.D., Dye, L.B., Payton, M.E., Confer, A.W. 2004. Isolation and antimicrobial susceptibilities of bacterial pathogens from bovine pneumonia. 1994-2002. *J. Vet. Diagn. Invest.* **16**: 426-431.
81. Wernicki, A., Mikucki, P., Urban-Chmiel, R., Puchalski, A. 2008. Comparison of immunogenic properties of native and inactivated *Mannheimia haemolytica* LKT in calves. *Pol. J. Vet. Sci.* **11**: 83-88.
82. Yates, W.D., Kingscote, B.F., Bradley, J.A., Mitchell, D. 1983. The relationship of serology and nasal microbiology to pulmonary lesions in feedlot cattle. *Can. J. Comp. Med.* **47**: 375-378.
83. 横田修、渡辺卓俊、斎野仁、青木仁久、三上祐二. 1990. 牛ウイルス性下痢・粘膜病生ワクチンの乳牛における抗体応答と胎子感染. *日獣会誌*. **43**: 239-243.
84. Zinkrnagel, R.M. 1997. Immunology and immunity studied with viruses. *Ciba foundation symposium*. **204**: 105-129