

## 総 説

## 母牛へのワクチネーションによる子牛下痢症に対する効果の実際

岡田伸隆

株式会社 微生物化学研究所

(〒611-0041 京都府宇治市槇島町24、16番地)

TEL : 0774-22-4518

FAX : 0774-24-1407

## 【要約】

生産現場での牛へのワクチネーションの効果の実際として、母子免疫型の牛の下痢症ワクチンの子牛下痢症に対する効果について検討した。ワクチンとしては牛下痢5種混合不活化ワクチンを用いて、分娩前の母牛にワクチン注射を行い、効果の検討として、産子の糞便中への牛ロタウイルス排泄状況をワクチン未注射対照群と比較した。その結果、ワクチン注射群で72頭中19頭(26%)、対照群で50頭中23頭(46%)の子牛糞便からウイルスが分離され、ウイルス排泄に対する減少効果が確認された。しかし、ワクチン注射時において既に自然感染による抗体を保有しており、ワクチン注射後の抗体価において両群で違いが認められず、産子におけるウイルス排泄状況に差がない例も認められた。この例ではワクチン注射とは関係なく母牛血清中抗体価が低い子牛においてウイルス排泄が認められる傾向があり、このことより、ワクチン注射を行うにあたっては抗体価が低い牛群においてより高い効果が期待されることが示唆された。牛ロタウイルス感染子牛における糞便中抗体価とウイルスの排泄状況を確認した結果では、糞便中抗体価が低い検体においてよりウイルスが分離されることから、抗体を保有する初乳の重要性が示唆された。母子免疫型ワクチンはあくまでも受動免疫であり、初乳を介しての子牛における効果は限られている。子牛の能動的な免疫の開始時期が重要であり、特に下痢症の場合は腸管における粘膜免疫が有効であると思われる。早期に子牛の免疫を始動させ得る粘膜免疫型ワクチンの開発が望まれる。

【キーワード：牛ロタウイルス、ワクチン、子牛下痢症】

## 【はじめに】

牛の下痢症は、経済的損失に直結する主要な疾病の一つであり、その原因として、ウイルス性、細菌性及び原虫性等の感染性因子、食餌性や神経性等の非感染性因子等様々な要因があげられる。その感染性因子のうち、牛ロタウイルス病、牛コロナウイルス病及び牛の大腸菌症は発生数も多く、下痢を主徴とする重要な疾病である。牛ロタウイルスは、すべての年齢の牛に感染するが、若齢牛ほど発病率が高く症状も重篤である。

牛コロナウイルス病は、牛コロナウイルスの感染により発病する牛の伝染性下痢症で、子牛並びに成牛が感染、発病する [6, 9]。子牛が感染すると軽い発熱と白血球減少を伴って激しい下痢を起こし、発育不良や死亡する場合がある。

牛の大腸菌症は、大腸菌*Escherichia coli*に起因する疾患であり、病型は下痢、敗血症、関節炎など多彩である。特に、下痢は子牛における死亡・淘汰の主要な原因であり、その原因菌は毒素原性大腸菌(ETEC)、腸管病原性大腸菌、腸管組織侵入性大腸菌、ベロ細胞毒産生性大腸

菌、腸管凝集粘着性大腸菌などに分類される。このうち、子牛ではETECによる下痢が重要である。牛では、K99線毛が重要な付着因子であり[4]、K99線毛抗原のワクチンとしての有効性が報告されている[1]。

子牛の下痢症については、これら複数の病原体による重感染の形をとる場合も少なくない。そこで、効果的な牛の下痢症予防薬として開発した牛ロタウイルス、牛コロナウイルス及び大腸菌混合ワクチンについて、その効果を報告する。

本ワクチンの臨床試験を、4試験地で実施したところ、ワクチン注射により各ウイルス及び細菌に対する抗体応答が確認され、子牛における牛ロタウイルスの排泄状況について、ワクチン注射群と対照群とで有意差が認められた。本稿においては、下痢症ワクチンに含まれる病原体のうち、ワクチンの有効性について、牛ロタウイルスを中心にその成績を報告する。

**【母子免疫型下痢症ワクチン】**

牛ロタウイルスとしてはGunma 8701株 (G6P[1]型)、Hyogo 9301株 (G6P[5]型)、及びShimane 9501株 (G10P [11]型) のウイルス培養液を、牛コロナウイルスについては、“京都微研”牛コロナワクチンと同一の製造用株であるNo.66/H株を用い、同一の製造方法で作製する可溶性抗原を、大腸菌については、“京都微研”豚大腸菌ワクチンの製造用株の一つであり、牛にも病原性を示すK99線毛保有大腸菌であるT-2株の精製線毛を抗原としている。

各抗原をホルマリンで不活化後混合し、リン酸アルミニウムゲルを添加したワクチンである。

**【糞便中への牛ロタウイルスの排泄頭数減少効果】**

黒毛和種およびホルスタイン種の妊娠牛をワクチン注射群72頭および対照群50頭に分け、

子牛の糞便中へのウイルス排泄状況を比較した。ワクチン注射群には分娩約1.5か月前および0.5か月前の2回、ワクチン1mLを筋肉内に注射した。母牛の血清中抗体価および子牛の糞便中への病原体の排泄について検討を行った。表1に分娩後の母牛の血清中抗体価を示した。いずれの病原体においても、試験群で対照群と比較して高い抗体価が確認された。抗体応答の成績については、野外における浸潤状況を反映する形で、ワクチン注射時において牛ロタウイルス及び牛コロナウイルスに対する抗体保有牛が多く認められ、特に牛ロタウイルスG10P [11]型および牛コロナウイルスでは他と比べてワクチン注射群と対照群との差が少ない成績であった。大腸菌については、抗体陰性牛がほとんどであり、ワクチン注射群と対照群とで明

表1 ワクチン注射群および対照群の母牛の血清中抗体価 (幾何平均値)

試験地	病原体	注射群	対照群	
A	牛ロタウイルス	G6P[1]	624.4	107.7
		G6P[5]	148.5	40.0
		G10P[11]	137.9	80.0
	牛コロナウイルス	88.3	59.4	
	大腸菌	499.8	51.7	
	B	牛ロタウイルス	G6P[1]	861.4
G6P[5]			176.7	153.2
G10P[11]			160.0	128.8
牛コロナウイルス		131.3	110.6	
大腸菌		2377.6	80.5	
C		牛ロタウイルス	G6P[1]	1451.9
	G6P[5]		248.7	190.3
	G10P[11]		109.6	95.1
	牛コロナウイルス	90.7	5.9	
	大腸菌	852.0	118.9	
	D	牛ロタウイルス	G6P[1]	320.0
G6P[5]			111.1	37.0
G10P[11]			83.0	31.7
牛コロナウイルス		117.6	50.4	
大腸菌		446.3	50.0	
合計		牛ロタウイルス	G6P[1]	622.5
	G6P[5]		152.8	68.7
	G10P[11]		121.3	80.0
	牛コロナウイルス	98.3	57.8	
	大腸菌	756.8	63.3	

確な違いが認められた。

子牛において病原体の排泄が確認された頭数について、ワクチン注射群と対照群を比較したところ、牛コロナウイルスと大腸菌では排泄が確認された頭数が少なかったため、有意差が認められなかったが、牛ロタウイルスについては、有意差が認められ、注射群で排泄している頭数が少ない成績が得られた。(表2～5)。

有意差検定については、病原体の排泄が確認された頭数について、試験群と対照群を比較し $\chi^2$ 検定及びFisherの直接法による検定を行った。

牛ロタウイルスの排泄と抗体価の関係について、より詳細に解析するために、型特異的ブラ

イマーを用いたPCRによる牛ロタウイルスの型別を実施した。牛ロタウイルスの型は、試験地Aにおいて、G6P[5]型およびG10P[11]型、試験地BにおいてG10P[11]型、試験地CおよびDにおいてG6P[5]型であった(表6)。ワクチン注射群においても牛ロタウイルスの排泄は認められており、中でも試験地BのG10P[11]型についてはワクチン注射群、対照群ともに多数の子牛でウイルスの排泄が確認された。この試験地Bにおいては、大腸菌以外の病原体に対する抗体価が両群において同程度であり、自然感染抗体の存在が成績に影響を及ぼしていると考えられた。

表2 子牛における牛ロタウイルスの排泄

試験地	群	試験頭数	排泄の有無 <sup>1)</sup>	
			有	無
A	注射群	28	4	24
	対照群	19	8	11
B	注射群	14	7	7
	対照群	16	8	8
C	注射群	11	3	8
	対照群	4	1	3
D	注射群	19	5	14
	対照群	11	6	5
合計	注射群	72	19	53
	対照群	50	23	27

<sup>1)</sup> 頭数

表3 子牛における牛コロナウイルスの排泄

試験地	群	試験頭数	排泄の有無 <sup>1)</sup>	
			有	無
A	注射群	28	0	28
	対照群	19	2	17
B	注射群	14	0	14
	対照群	16	0	16
C	注射群	11	0	11
	対照群	4	0	4
D	注射群	19	0	19
	対照群	11	0	11
合計	注射群	72	0	72
	対照群	50	2	48

<sup>1)</sup> 頭数

表4 子牛における大腸菌の排泄

試験地	群	試験頭数	排泄の有無 <sup>1)</sup>	
			有	無
A	注射群	28	1	27
	対照群	19	1	18
B	注射群	14	1	13
	対照群	16	3	13
C	注射群	11	0	11
	対照群	4	0	4
D	注射群	19	0	19
	対照群	11	1	10
合計	注射群	72	2	70
	対照群	50	5	45

<sup>1)</sup> 頭数

表5 ワクチン注射群と対照群との病原体排泄頭数の比較(合計頭数での有意差検定)

病原体	P 値	有意差の有無
ロタウイルス	0.0076	有
牛コロナウイルス	0.1660	無
大腸菌	0.1214	無

表6 牛ロタウイルスのPCRによる型別

試験地	型	排泄頭数 / 試験頭数 (%)	
		注射群	対照群
A	G6P[1]	0/28 (0%)	0/19 (0%)
	G6P[5]	0/28 (0%)	2/19 (10.5%)
	G10P[11]	4/28 (14.3%)	6/19 (31.6%)
B	G6P[1]	0/14 (0%)	0/16 (0%)
	G6P[5]	0/14 (0%)	0/16 (0%)
	G10P[11]	7/14 (50%)	8/16 (50.0%)
C	G6P[1]	0/11 (0%)	0/4 (0%)
	G6P[5]	3/11 (27.3%)	1/4 (25%)
	G10P[11]	0/11 (0%)	0/4 (25%)
D	G6P[1]	0/19 (0%)	0/11 (0%)
	G6P[5]	5/19 (26.3%)	5/11 (45.5%)
	G10P[11]	0/19 (0%)	0/11 (0%)
合計	G6P[1]	0/72 (0%)	0/50 (0%)
	G6P[5]	8/72 (11.1%)	9/50 (18.0%)
	G10P[11]	11/72 (15.3%)	14/50 (28%)

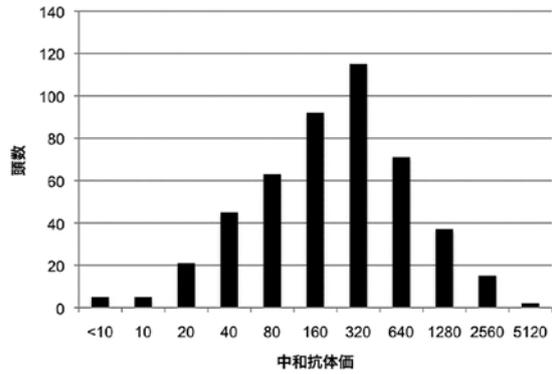


図1 G6P[1]型牛ロタウイルスに対する抗体価

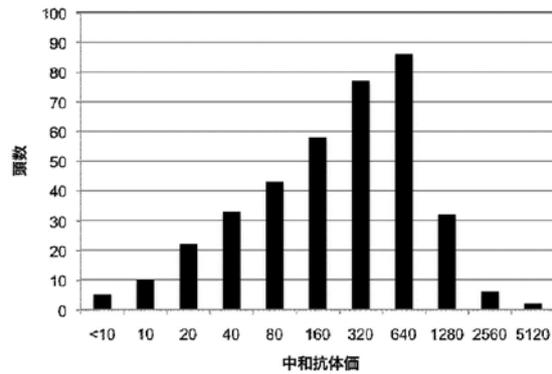


図2 G6P[5]型牛ロタウイルスに対する抗体価

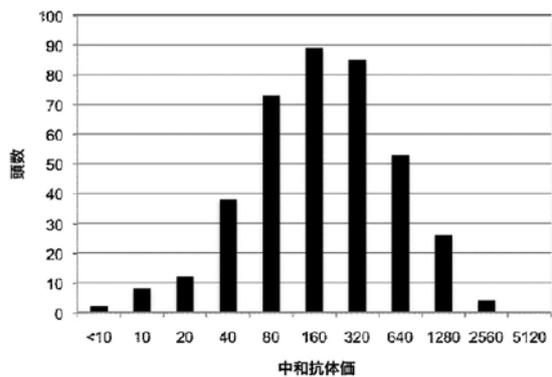


図3 G10P[11]型牛ロタウイルスに対する抗体価

そこで、次に自然感染抗体レベルの把握を目的として、野外における牛ロタウイルスに対する抗体保有状況の確認を行った。牛ロタウイルスに対するワクチン未接種であることが明らか母牛約400頭について、G6P[1]型、G6P[5]型およびG10P[11]型に対する中和抗体価測定を実施した。その結果、それぞれ幾何平均値でG6P[1]型に対して208倍、G6P[5]型に対して207倍、G10P[11]型に対して177倍の抗体価が確認され、野外における牛ロタウイルスの浸潤および自然感染抗体のレベルが明らかとなった(図1～3)。

### 【母牛血清中抗体価と子牛糞便中へのウイルス排泄との関係】

多数の子牛からウイルス排泄が認められた試験地Bについて、母牛の血清中抗体価と子牛におけるウイルス排泄との関係を確認するために、母牛の血清中抗体価をワクチンでの最低有効抗体価と設定している80倍を基準として二群に分け、比較を行った。その結果、中和抗体価80倍未満において5頭中5頭でウイルス排泄があり、母牛血清中抗体価と子牛糞便中へのウイルス排泄との関係が確認された ( $P=0.0421$ ) (表7)。

### 【血清中抗体価とワクチンに対する抗体応答】

抗体価の低い母牛に対してのワクチンによる抗体誘導がより重要であると考えられたため、ワクチン注射時の抗体価と抗体応答の関係についての確認を行った。その結果、ワクチン注射時における抗体価が低い個体において、より良好な抗体応答が認められた(表8)。

### 【糞便中抗体価とウイルス排泄との関係】

母牛が抗体を保有している場合でも、その子牛において糞便中からロタウイルスが分離される例は多数見受けられる。試験地Bにおいて試験牛30頭から生後28日齢までの期間に採剤した糞便計563例について、糞便中中和抗体価とウイルス分離との関係を確認したところ、糞便中抗体価は日齢とともに低下し、その後にウイルスが分離される傾向が認められ、2倍以上の中和抗体価を示した糞便からは、ウイルスが分離されない結果であった(表9)。

### 【おわりに】

母子免疫型の牛の下痢症ワクチンの子牛下痢症に対する効果については、数々の報告があるが、その評価は様々である [2, 3, 5, 7]。今回、牛下痢症ワクチンの効果について、糞便中への

表7 試験地Bにおける母牛血清中抗体価と子牛糞便中へのウイルス排泄との関係

抗体価	頭数	排泄の有無	
		有	無
80倍未満	5	5	0
80倍以上	25	10	15

表8 ワクチン注射時の抗体価と抗体応答

ワクチン注射時の抗体価	牛ロタウイルス		
	G6P[1]	G6P[5]	G10P[11]
<10	1/1 (100)		
10	5/5 (100)	7/7 (100)	2/2 (100)
20	9/9 (100)	8/8 (100)	5/6 (83)
40	18/24 (75)	19/21 (90)	15/22 (68)
80	25/36 (69)	16/25 (64)	35/51 (69)
160	26/43 (60)	17/28 (61)	15/44 (34)
320	17/48 (35)	13/38 (34)	7/52 (13)
640	12/28 (43)	12/41 (29)	2/31 (6)
1280	4/19 (21)	2/11 (18)	1/17 (6)
2560	0/6 (0)	0/2 (0)	0/3 (0)
5120	1/1 (100)		

抗体価が陽転した頭数または抗体価が2倍以上上昇した頭数/試験頭数( )は100分比

表9 糞便中中和抗体価とウイルス分離との関係

糞便中中和抗体価*	ウイルス分離			
	陽性	陰性	合計	陽性率 (%)
<1	40	108	148	27.0
1	4	74	78	5.1
2	0	115	115	0.0
4	0	81	81	0.0
8	0	58	58	0.0
16	0	44	44	0.0
32	0	27	27	0.0
64	0	8	8	0.0
128	0	4	4	0.0
合計	44	519	563	7.8

\*糞便をPBSで10w/v%となるように浮遊、糞便乳剤とし、その遠心上清を56℃で30分間熱処理したものを検体とした。

病原体の排泄状況を指標とした解析を行った結果、牛コロナウイルスの排泄状況において、ワクチンの効果を示す成績が得られた。しかし、試験地別およびウイルスの型別に解析を行うと、ワクチン注射群と対照群とでその排泄状況が同程度であるケースも認められた。また、ワクチン注射とは無関係に、自然感染により高い抗体を保有している母牛も多数認められることから、特に抗体価が低い母牛へのワクチン注射がより効果的であると考えられた。自然感染例では、糞便中の抗体価が低下した時期に糞便中から多数のウイルスが分離される傾向が認められたことから、初乳中の抗体価の重要性が伺えたが、ワクチンにより高められた母牛の抗体価が初乳を介して子牛に影響を与える期間は限られるため、子牛の能動的な免疫の開始時期が重要であると思われる。特に下痢症の場合は腸管における粘膜免疫が有効であると思われるため、早期に子牛自身の免疫を始動させ得る粘膜免疫型ワクチンの開発が望まれる。

#### [引用文献]

1. Acres, S. D., Isaacson, R. E., Babiuk, L. A. and Kapitan, R. A. 1979. Immunization of calves against enterotoxigenic colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins. *Infect. Immun.* 25 : 121-126.
2. 石田充亮. 2007. 牛下痢5種混合ワクチンを用いた黒毛和種子牛の下痢予防. *臨床獣医.* 25 : 13-17.
3. 小原潤子. 2007. ワクチネーションによる子牛下痢症のコントロールと野外応用例. *日本家畜臨床感染症研究会誌.* 2(2) : 17-27.
4. 中澤宗生. 1992. 牛の大腸菌症と大腸菌性下痢ワクチン. *獣医畜産新報* 45 : 679-687.
5. 関 慶久, 大池裕治, 清宮幸男, 八重樫岳司. 2005. ワクチンによる新生子牛のA群コロナウイルス予防. *日獣会誌.* 58 : 602-606.
6. 谷口佐富, 岩本仁司, 福浦弘幸, 伊藤英雄, 界外 昇, 長門芳一郎. 1986. 成牛における牛コロナウイルス感染症の再発生例. *日獣会誌.* 39 : 298-302.
7. 高橋純子, 高橋浩吉, 藤倉尚士, 渡辺栄次, 小形芳美, 阿部 栄. 2007. 黒毛和種子牛の感染性下痢症を再考する. *日本家畜臨床感染症研究会誌.* 2(1) : 29-34.
8. Tsunemitsu, H., Yonemichi, H., Hirai, T., Kudo, T., Onoe, S., Mori, K. and Shimizu, M. 1991. Isolation of bovine coronavirus from feces and nasal swabs of calves with diarrhea. *J. Vet. Med. Sci.* 53 (3) : 433-437.

## Effect of the maternal vaccination on the calf diarrhea

Nobutaka Okada

Kyoto Biken Laboratories, Inc.

(24-16, Makishima, Uji, Kyoto 611-0041, Japan)