

エンドトキシン中和剤を含む牛サルモネラ不活化 ワクチン接種牛の臨床病理学的所見

加藤 肇^{1)†} 中尾 茂¹⁾ 中田悟史²⁾ 佐藤礼一郎³⁾
大西 守¹⁾ 田島誉士⁴⁾

- 1) 北海道ひがし農業共済組合根室南部事業センター（〒086-0214 野付郡別海町別海緑町119番地2）
- 2) 北海道ひがし農業共済組合根室北部事業センター（〒086-1137 標津郡中標津町俵橋14線37番地3）
- 3) 麻布大学獣医学部（〒252-5201 相模原市中央区淵野辺1-17-71）
- 4) 酪農学園大学獣医学群（〒069-0836 江別市文京台緑町582）

（2014年7月7日受付・2015年3月3日受理）

要 約

サルモネラ・ティフィムリウム及び同ダブリンの不活化菌体抗原を主成分とし、エンドトキシン中和剤であるポリミキシンB硫酸塩を含む牛サルモネラ症不活化ワクチンを、健康なホルスタイン種育成牛8頭に接種した際の生体の反応を、臨床病理学的に観察した。ワクチン接種後に食欲の低下や一般状態の悪化は認められなかった。注射部位に一過性の腫脹及び硬結が認められた。血液検査所見では、ワクチン接種後24時間以内に、急性炎症の指標となるヘマトクリット値、血清総蛋白質濃度、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性値、クレアチンキナーゼ活性値及びシアル酸濃度の有意な上昇が認められた。一方、ワクチン接種後にエンドトキシンショックや過敏症反応を疑わせる臨床症状は認められなかった。免疫学的な有効性が認められて市販されている本ワクチンは、接種部位の局所的な急性炎症を起こすが、重篤な副反応を引き起こす可能性は低いと考えられた。

——キーワード：牛サルモネラワクチン，エンドトキシン，ポリミキシンB硫酸塩，副反応。

-----日獣会誌 68, 379~383 (2015)

近年、牛由来多剤耐性サルモネラ菌の人への感染拡大が、公衆衛生上世界的に懸念されている [1]。獣医医療において、牛サルモネラ症はその疾病制御に多大な労力を要するが、薬剤耐性獲得阻止の観点から、抗生物質を用いない制御法の開発が急務となっている [2]。牛サルモネラワクチンは移行抗体による子牛への感染防御や [3]、能動免疫による感受性個体の減少、多臓器感染を阻止して乳汁や糞便への排菌を抑制することなどが明らかにされている [4-7]。またそのワクチンには、これらの作用によって牛群内の大流行を防止し、本症の清浄化に要する期間を大幅に短縮する効果も期待されている。

国内において、サルモネラ・ティフィムリウムとサルモネラ・ダブリンの不活化菌を主成分とするワクチン

が、1999年以降市販流通している。しかし当該ワクチンは製造工程で生じるワクチン株由来のエンドトキシン(LPS)の作用による副反応が起きる事例も報告され [3]、ワクチン普及の大きな障害となってきた。

一方、2014年にLPS中和剤であるポリミキシンB [8]を含んだ同様のサルモネラ菌を成分としたワクチンが、国内で利用可能となった。本研究では、免疫学的有効性が確認されているこの市販ワクチンを健康牛に接種し、接種後のエンドトキシンの影響を臨床病理学的に観察し、その安全性を検証した。

材料及び方法

試験農場の概要：北海道根室地区の一酪農場において試験を実施した。本農場はフリーストール式牛舎で、第

† 連絡責任者：加藤 肇（北海道ひがし農業共済組合根室南部事業センター）

〒086-0214 野付郡別海町別海緑町119番地2 ☎0153-74-0543 FAX0153-74-0783

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

表1 ワクチン接種群の体温の推移 (°C)

牛 No.	群	第1回目接種後			接種前 (第1回目接種後21日目)	第2回目接種後		
		接種前	1時間	24時間		1時間	24時間	30日目
1	接種群	39.0	39.4	39.4	39.5	39.6	39.1	39.4
2	接種群	39.5	39.4	39.4	39.8	39.8	39.8	40.0
3	接種群	39.5	39.5	40.7	39.6	40.0	39.6	39.0
4	接種群	39.5	39.5	39.5	39.2	39.5	39.2	39.4
5	接種群	38.5	39.1	39.1	38.9	39.0	39.0	39.0
6	接種群	39.2	38.7	38.7	39.0	38.6	39.3	39.4
7	接種群	39.5	39.5	39.6	39.4	39.2	39.6	39.8
8	接種群	39.0	39.5	39.5	39.4	39.3	39.6	38.3

一育成牛舎（出生～3カ月齢牛を飼養）、第二牛舎（4～15カ月齢牛を飼養）及び成牛舎（搾乳牛と妊娠後期の育成牛及び乾乳牛を飼養）の3棟があり、それぞれ独立していた。試験開始日の飼養頭数は成牛290頭、育成牛並びに子牛約120頭であった。

供試牛：試験実施農場で出生し、ワクチンの接種歴がない临床上健全な5～10カ月齢のホルスタイン種の育成牛14頭（接種牛8頭、非接種牛6頭）を供した。今回の研究期間中、試験牛はすべて同一環境下で飼養され、本農場以外の牛と試験牛が接触する機会はなかった。すべての試験牛の糞便培養検査を常法 [3] に準じて実施し、サルモネラ非感染牛であることを確認した。

ワクチン接種プログラムと血清の採取：サルモネラ・ダブリン、サルモネラ・ティフィムリウム、ポリミキシンB硫酸塩及び水酸化アルミニウムゲルを含む牛サルモネラ症不活化ワクチン（ボビリス®S；製造番号1、(株)インターベット、東京、以下「ワクチン」）を用いた。接種牛8頭（5～7カ月齢）に、ワクチン2mlを3週間隔で2回接種した。第1回目の接種部位は頸部右側皮下、21日後の第2回目接種部位は頸部左側皮下とした。エンドトキシンの影響は甚急性のものと慢性的なものがあること [9] から、採血は第1回目ワクチン接種日を0日とし、接種1、21、22及び51日目に実施した。非接種牛6頭は無処置とし、接種牛と同時期に臨床症状の観察と採血を実施した。

臨床所見：それぞれのワクチン接種直前、ワクチン接種1及び24時間後、51日目の血液採取直前に、全頭の直腸温を水銀式体温計により測定するとともに、臨床症状を観察した。ワクチン接種24時間後の注射部位の腫脹及び硬結の有無を確認し、認められた場合にはその大きさを測定した。

血液生化学的検査：血液採取後ただちに血液生化学検査を実施した。血液を4°C、3,000rpmで15分間遠心し、血清を分離した。白血球数、血小板数、ヘマトクリット値、リンパ球数、好酸球数、好塩基球数の測定は多項目



図 右側頸部長径15cmの注射痕

自動血球分析装置 (XT-1800i, シスメックス(株), 神戸) を用いた。アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性値, クレアチンキナーゼ (CK) 活性値, 血清総蛋白質濃度, 血糖値, 乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性値及びシアル酸濃度の測定はディスクリット方式臨床化学自動分析装置 (TBA™-120FR, 東芝メディカルシステムズ(株), 栃木) を用いた。血清蛋白質分画は電気泳動分析装置 (自動電気泳動装置 BECKMAN COULTER AES320, ベックマン・コールター(株), 東京) を用いて分析し、A/G比を算出した。

統計解析：血液生化学検査の測定値を正規分布させるために、AST活性値, CK活性値及びLDH活性値は自然対数値に変換した。白血球数及びシアル酸濃度は平方根 (0.5乗) に変換した。他の値は実数値を用いた。測定値の有意差検定にはStudentのt検定を用い、危険率5%未満を有意な差とした。

成 績

臨床所見及び体温 (表1)：ワクチン接種後、食欲の低下や下痢症状は認められなかった。また、直腸温で40°C以上を示した個体が、1回目及び2回目ワクチン接

表2 ワクチン接種前と接種後の血液検査所見

	第1回目接種後		第2回目接種後		
	接種前	24時間	接種前 (第1回目接種後 21日目)	24時間	30日目
TP (g/dl)	6.76±0.36	6.50±0.47	5.91±0.83	6.17±0.42*	6.43±0.35
A/G	1.17±0.17	1.10±0.12*	0.87±0.16	0.93±0.10	0.74±0.08
Glu (mg/dl)	79.28±12.62	86.87±7.69	84.50±8.21	87.25±6.76	91.12±10.83
WBC (10 ² /μl) ^(注)	123.17±40.85	134.01±56.45	111.04±20.23	135.86±26.82*	107.10±30.07
リンパ球数 (10 ² /μl)	73.27±31.30	62.86±26.59*	63.66±7.86	69.99±12.53	58.31±3.53
好塩基球数 (10 ² /μl)	2.19±3.26	2.11±3.80	1.33±0.87	0.98±0.54	1.09±0.43
好酸球数 (10 ² /μl)	1.74±1.15	0.89±0.38*	1.96±1.68	2.11±1.52	1.68±0.64
血小板数 (10 ³ /μl)	43.37±22.26	43.39±21.4	33.73±14.69	25.76±13.92	34.58±19.39
Ht (%)	35.28±4.54	32.58±4.30	31.42±2.98	32.47±2.78*	32.91±2.23
AST (IU/l)	81.57±32.80	78.71±15.81	78.37±5.70	82.71±4.24*	4.33±0.10
CK (IU/l)	273.00±73.03	228.86±232.49*	295.12±140.31	542.86±248.74*	585.15±504.85
LDH (IU/l)	966±211.64	964.00±189.79	912.50±102.76	917.29±241.96	393.22±226.80
シアル酸 (10 ⁴ /mg/dl)	66.60±11.28	64.79±9.34	61.50±6.57	65.72±5.84*	66.80±8.37

n=8

(注) いずれの検査時も WBC において骨髄球及び後骨髄球は認めず、桿状核好中球は 0~3% の割合であった。

* 接種前と比較して有意差あり P<0.05.

表3 ワクチン非接種牛の血液検査所見 (接種日は接種群の接種日)

	第1回目接種日後		第2回目接種日後		
	接種日前	24時間	接種日前 (第1回目接種日 後21日目)	24時間	30日目
TP (g/dl)	6.83±0.57	6.08±2.53	5.70±0.38	6.13±0.55*	6.30±0.45
A/G	0.98±0.06	0.92±0.06	0.90±0.12	0.95±0.08	0.84±0.08
Glu (mg/dl)	70.83±9.27	73.50±3.51	75.00±5.83	79.83±5.56	81.83±5.74
WBC (10 ² /μl)	110.75±9.27	117.02±21.12	102.97±26.42	119.65±28.70*	106.57±20.47
リンパ球数 (10 ² /μl)	64.07±7.41	67.77±11.43	67.03±11.42	75.15±9.66	63.07±6.76
好塩基球数 (10 ² /μl)	1.38±0.32	1.47±0.41	0.98±0.34	1.08±0.21*	1.17±0.35
好酸球数 (10 ² /μl)	3.57±1.38	3.85±2.47	4.10±2.85	4.97±3.44	1.97±0.77
血小板数 (10 ³ /μl)	46.33±13.60	38.48±17.55	36.32±22.60	42.58±17.69	33.02±12.75
Ht (%)	31.68±2.34	29.75±1.66*	29.83±2.00	31.23±1.83*	27.86±1.96
AST (IU/l)	82.83±9.15	83.50±8.31	96.17±20.49	98.00±16.47	74.00±7.80
CK (IU/l)	312.33±74.88	290.17±89.87	376.83±258.99	372.55±169.65	249.33±50.12
LDH (IU/l)	929.83±84.25	931.17±60.16	985.67±82.68	1053.83±61.27	644.33±338.37
シアル酸 (10 ⁴ /mg/dl)	62.05±3.89	59.95±4.18	58.92±3.43	59.60±3.50	55.78±3.34

n=6

(注) いずれの検査時も WBC において骨髄球及び後骨髄球は認めず、桿状核好中球は 0~3% の割合であった。

* 接種日前と比較して有意差あり P<0.05.

種後と 51 日目にそれぞれ 1 頭ずつ認められた。

接種反応 (図) : 1 回目及び 2 回目のワクチン接種後、接種部位を中心とした直径 2~15cm の大きさの腫脹及び硬結が、接種牛すべてに認められた。熱感は認められず、腫脹による機能障害も確認されなかった。これらの腫脹は、それぞれ 21 日目には消失した。

血液生化学検査結果 (表 2, 3) : それぞれのワクチン接種後、エンドトキシンショックの徴候とされる [3] 白血球数の減少、好中球の核の左方移動、血小板数の減少及び好酸球数と好塩基球数の増加は認められなかった。

1 回目のワクチン接種の 24 時間後において、A/G 比、好酸球数、リンパ球数及び CK 活性値が有意に低下した。2 回目のワクチン接種の 24 時間後には、血清総蛋白質濃度、Ht 値、AST 活性値、CK 活性値、白血球数、シアル酸が有意に上昇した。観察期間を通じて、非接種牛 6 頭には第 2 回目のワクチン接種の 24 時間後において、血清総蛋白質濃度、Ht 値及び白血球数の有意な上昇が認められたが、AST 活性値、CK 活性値及びシアル酸の有意な上昇は認められなかった。

考 察

今回試験に用いたワクチンは、従来わが国において市販流通していたサルモネラ不活化ワクチンと比較して、ポリミキシン B 硫酸塩を含む点で異なる。ポリミキシン B 硫酸塩は、ワクチン基剤中ではプラス荷電状態である [9]。エンドトキシンは化学的に多くのリン酸基を有していることから、全体としてマイナス荷電状態にある。したがって、エンドトキシンはプラス荷電の物質に吸着されやすい特性を持ち、ポリミキシン B 硫酸塩は強力なエンドトキシン中和剤とされている [9]。

ホルスタイン種乳牛は遺伝的にグラム陰性菌のエンドトキシンに対して高い感受性を持つ系統種であり、特に *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Moraxella bovis* を含むワクチン接種時には、高頻度でエンドトキシンショックが生ずるとされている [10-11]。根室管内において 2001 年に 3,299 頭のホルスタイン種乳牛にポリミキシン B 硫酸塩を含まないサルモネラ不活化ワクチンを接種した際に、多くの妊娠牛で流産が認められた (加藤肇：根室地区におけるサルモネラ症への取り組み，北獣会誌，48，2-8 (2004))。ワクチン接種によってエンドトキシン血症が生じるため、PGF_{2α} の分泌が誘発され、黄体が退行することによって流産を起こすとされている [3]。さらに、エンドトキシン血症が起きた場合、ホルスタイン種乳牛においては白血球数の減少と好中球の核の左方移動が高頻度で起きるとされている [3]。一般的に不活化ワクチンは生ワクチンと比較して、生体内で抗原が増殖しないため、大量の抗原を接種する必要がある [11]。サルモネラワクチンは多くの菌体抗原を含むため結果的に大量のエンドトキシンを含み、接種牛に対して高頻度でエンドトキシン血症を起こす [3]。本研究では、離乳後の生体重の少ない 5~10 カ月齢のホルスタイン種育成牛を用いて、大量のエンドトキシンを含むワクチンを接種した際の接種牛の生体反応を、最も鋭敏に反応する白血球数の動き [3] に着目して経過観察を行った。

今回の接種牛において、1 回目接種後と 2 回目接種後で好中球の減少を示した個体は認められなかった。さらに、ワクチン接種後の好中球の核の左方移動や血小板数の低下も認められなかった。LPS が生体に与える影響は、ホルスタイン種の間でも系統的及び遺伝的に差異があることが報告されている [3]。今回、試験牛の母牛と種雄牛はすべて異なっており、さまざまな系統の牛を用いた。

以上から、感受性の高いホルスタイン種乳牛に、大量のエンドトキシンを含むワクチンを接種したにもかかわらず、最も鋭敏に反応する白血球がエンドトキシン血症時における特有な反応を示さなかったことから、ワクチンに含まれるポリミキシン B 硫酸塩が有効に機能し

ていたことが強く示唆され、本ワクチンに含まれるエンドトキシンが生体に与える影響はきわめて小さいと考えられた。

また本研究においては、ワクチン接種後に好酸球数や好塩基球数の有意な上昇は認められなかった。このことから、本ワクチン接種によって IgE 産生による過敏症やアナフィラキシー反応 [12] は誘発されなかったと考えられた。

接種牛すべてに、顕著な注射部位の炎症反応が認められた。さらに、接種牛では血清総蛋白質濃度、Ht 値、AST 活性値、CK 活性値及びシアル酸濃度の上昇がワクチン接種 24 時間以内に認められ、軽度の急性炎症が疑われた。これらの炎症反応は、ワクチン接種による可能性が高いと考えられた。エンドトキシンは強力な発熱物質である [9]。本研究では、1 頭において 1 回目接種 24 時間後及び 2 回目接種 1 時間後に発熱が認められたが、元気や食欲の低下は認められず、他の接種牛と異なる臨床所見は確認されなかった。また 7 頭においては、接種後 24 時間以内の発熱は認められなかった。1 頭だけに認められた発熱は、ワクチンに含まれるアジュバントに起因する接種部位の炎症反応や接種行為のストレス [11, 12] による可能性が高いと考えられた。しかし、今回の検査では、接種牛は 8 頭であり、さらに頭数を増やして、試験することも必要である。

ワクチンは分娩前の母牛に接種することによって、移行抗体による子牛の感染防御に高い効果が期待できること、及び 3 カ月齢以上の育成牛や成牛に接種した際には、高い感染予防効果が期待できることはすでに報告されている [10]。しかし、ワクチン株と血清型の異なるサルモネラ菌に対する有効性に関する報告はない。北海道の酪農場においては近年、監視伝染病に指定されていない血清型によるサルモネラ症が急増している [13]。ワクチン株以外のサルモネラ菌に対する本ワクチンの抗原交差性及び有効性については、今後フィールドでの活用と調査の蓄積により明らかにされることが期待される。

引用文献

- [1] Soyer Y, Richards J, Hoelzer K, Warnick LD, McDonough P, Dumas NB, Grohn YT, Wiedmann M: Antimicrobial drug resistance patterns among cattle- and human-associated salmonella strains, *J Food Prot*, 76, 1676-1688 (2013)
- [2] Nielsen LR, Dohoo I: Time-to-event analysis for recovery from Salmonella Dublin infection in Danish dairy herds between 2002 and 2012, *Prev Vet Med*, 110, 370-378 (2013)
- [3] Smith BD: Salmonellosis in ruminants, *Large Animal Internal Med*, Smith BD ed, 4th ed, 877-879, Mosby Inc, St Louis (2009)
- [4] Edrington TS, Loneragan GH, Hill J, Genovese KJ,

- Brichta-Harhay DM, Farrow RL, Krueger NA, Callaway TR, Anderson RC, Nisbet DJ : Development of challenge models to evaluate the efficacy of a vaccine to reduce carriage of *Salmonella* in peripheral lymph nodes of cattle, *J Food Prot*, 76, 1259-1263 (2013)
- [5] Hermes DR, Thomson DU, Loneragan GH, Renter DR, White BJ : Effects of a commercially available vaccine against *Salmonella enterica* serotype Newport on milk production, somatic cell count, and shedding of *Salmonella* organisms in female dairy cattle with no clinical signs of salmonellosis, *Am J Vet Res*, 69, 1229-1234 (2008)
- [6] Heider LC, Meiring RW, Hoet AE, Gebreyes WA, Funk JA, Wittum TE : Evaluation of vaccination with a commercial subunit vaccine on shedding of *Salmonella enterica* in subclinically infected dairy cows, *J Am Vet Med Assoc*, 233, 466-469 (2008)
- [7] Mizuno T, McLennan M, Trott D : Intramuscular vaccination of young calves with a *Salmonella* Dublin metabolic-drift mutant provides superior protection to oral delivery, *Vet Res*, 39, 26-42 (2008)
- [8] Davit CM, Dian MJ : Binding of polymyxin B to the lipid a portion of bacterial lipopolysaccharides, *Immunochem*, 13, 813-818 (1976)
- [9] 棚元憲一 : エンドトキシンと医薬品の品質管理, *Bull Natl Inst Health Sci*, 126, 19-33 (2008)
- [10] Cortese VR, Hjerpe CS : Bacterial scours vaccines, *Large Animal Internal Med*, Smith BD ed, 4th ed, 1615-11620, Mosby Inc, St Louis (2009)
- [11] Cortese VR : Bovine Vaccines and herd vaccination, programs, *Large Animal Internal Med*, Smith BD ed, 4th ed, 1591-1598, Mosby Inc, St Louis (2009)
- [12] Terra RD : Ruminant history, physical examination, and record, *Large Animal Internal Med*, Smith BD ed, 4th ed, 3-14, Mosby Inc, St Louis (2009)
- [13] 中岡祐司, 立花 智 : 北海道における牛サルモネラ症の現状と対策, *家畜診療*, 57, 279-285 (2010)

Clinicopathologic Findings in Cows Inoculated with an Inactivated Bovine *Salmonella* Vaccine Containing a Lipopolysaccharide Neutralizer

Hajime KATO^{1)†}, Shigeru NAKO¹⁾, Futoshi NAKADA²⁾, Reiichiro SATO³⁾, Mamoru OONISHI¹⁾ and Motoshi TAJIMA⁴⁾

- 1) Southern Nemuro Operation Center, Hokkaido Higashi Agricultural Mutual Aid Association, 119-2 Bekkai Midori-machi, Bekkai-cho, Notsuke-gun, 086-0214, Japan
- 2) Northern Operation Center, Nemuro Agricultural Mutual Aid Association, 14-37-3 Tawarabashi, Hakashibetu-cho, Shibetu-gun, 086-1137, Japan
- 3) Internal Medicine, Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Azabu University, 1-17-1 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagami-hara-shi, 252-5201, Japan
- 4) School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Midori-machi, Bunkyo-dai, Ebetsu-shi, 069-0836, Japan

SUMMARY

Eight healthy Holstein dairy cows were inoculated with an inactivated bovine salmonellosis vaccine that was composed primarily of inactivated somatic antigens of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella enterica* serovar Dublin and contained polymyxin B sulfate, an endotoxin neutralizer. Clinicopathologic responses were observed. After vaccination, neither a decline in appetite nor deterioration in their general condition was noted. Swelling and induration were recognized at the inoculation site. A hematological examination revealed significant post-vaccination changes in the hematocrit, albumin-to-globulin ratio, total protein concentration, aspartate aminotransferase activity, creatine kinase activity and sialic acid concentration in the serum, all of which are markers of acute inflammation. However, no clinical manifestations suggestive of endotoxic shock or anaphylactoid reaction were noted after the vaccination. Although this vaccine causes local acute inflammation at the inoculation site, the likelihood of severe side-effects is low. Therefore, the vaccine can be used effectively in clinical settings. — Key words : bovine *Salmonella* vaccine, endotoxin, polymyxin B sulfate, side effects.

† Correspondence to : Hajime KATO (Southern Nemuro Operation Center, Hokkaido Higashi Agricultural Mutual Aid Association)

119-2 Bekkai Midori-machi, Bekkai-cho, Notsuke-gun, 086-0214, Japan

TEL 0153-74-0543 FAX 0153-74-0783 E-mail : nosaikatohajime@isis.ocn.ne.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 68, 379~383 (2015)