

黒毛和種若齢子牛に対する *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* 混合不活化ワクチンの呼吸器病予防効果

乙丸孝之介^{1)†} 大石祥子¹⁾ 藤村 裕¹⁾ 永井克尚¹⁾ 脇 一志²⁾

1) 鹿児島大学共同獣医学部 (〒 890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24)

2) 肝属農業共済組合 (〒 893-0045 鹿屋市田淵町 1475-5)

(2020年6月18日受付・2020年8月7日受理)

要 約

黒毛和種若齢子牛に対する *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Histophilus somni* 混合不活化ワクチン投与による呼吸器病の予防効果を評価するために、1農場で飼養されていた230頭の黒毛和種子牛を2群に区分し、113頭の子牛には1週齢及び4週齢時にワクチンを投与し(投与群)、117頭の子牛にはワクチンを投与しなかった(対照群)。出生から12週齢までの呼吸器病の発症率は、投与群113頭中41頭(36.3%)、対照群117頭中73頭(62.4%)であり、投与群では対照群と比較し有意に低かった($P<0.01$)。各群14頭ずつの抗体調査について、*P. multocida*, *M. haemolytica* 及び *H. somni* に対する抗体価は、投与群では対照群と比較し、ワクチン投与後において、それぞれ有意に高値であった($P<0.05$)。これらのことから、黒毛和種子牛に対する早期の不活化細菌ワクチンの投与は、呼吸器病予防の一助となる可能性が窺えた。——キーワード：牛呼吸器病、不活化細菌ワクチン、黒毛和種子牛。

-----日獣会誌 74, 127~131 (2021)

牛呼吸器病は、多くの肉用牛農場でみられ、その損害は非常に大きい [1]。近年、多くの肉用牛農場では多頭化が進み、子牛は出生後、早期に母牛分離されて群飼育されるなど大規模に管理されるケースが増加している。また、群飼育された子牛は、個別飼育された子牛と比較し、順位争いなどのストレスの影響により、疾患リスクは高いとされている [2, 3]。黒毛和種牛は、日本固有の肉用種の一つであり [4]、黒毛和種牛子牛は、ホルスタイン種と比較して免疫細胞の数や機能が低いことから、疾病リスクは高いとされている [5]。

Pasteurella multocida (*P. multocida*)、*Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) 及び *Histophilus somni* (*H. somni*) は、健康な子牛の上部気道の常在菌である [6]。また、これらの細菌は呼吸器病の主要な起因菌であり、呼吸器病発症牛からも高率に分離され [6, 7]、化膿性気管支肺炎や繊維素性気管支肺炎を引き起こすなど [8]、子牛の生産性阻害要因となっている [1]。子牛の呼吸器病の治療には、一般的に抗菌剤が使用される

が、現在、抗菌剤の慎重使用の推奨により、家畜への抗菌剤使用は厳しく制限されている [9]。そのため、ワクチンの活用など予防を中心とした対策が注目されている。

本研究では、哺乳期より群飼育され、若齢期に呼吸器病が多発する1農場の黒毛和種子牛に対して、呼吸器病発症予防を目的に、*P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* 混合不活化ワクチンを投与し、血液中の抗体価並びに呼吸器病予防効果を調査した。

本研究は、2018年1月~2019年12月に鹿児島県の1繁殖農場で飼育されていた230頭の黒毛和種子牛を供試した。すべての子牛は、出生後5日間は母牛と同居後、母子分離され、1パドック18頭の群にて人工哺乳にて飼育された。子牛は12週齢で離乳され、その後、1群6頭の群にて飼育された。当該農場においては、1~3カ月齢の若齢期に呼吸器病が多発していた。また、2018年10月に臨床的に健康な0~4カ月齢の子牛18頭より得た鼻腔拭い液の細菌検査により、10頭より *P.*

† 連絡責任者：乙丸孝之介 (鹿児島大学共同獣医学部)

〒 890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24

☎ 099-285-8750 FAX 099-285-8751

E-mail : otomaru@vet.kagoshima-u.ac.jp

表1 供試牛における飼料給与状況

給与量(乾物量)	1週齢	4週齢	8週齢	12週齢
代乳 ¹⁾ (g)	518	778	778	260
配合飼料A ²⁾	自由採食	自由採食	自由採食	自由採食
配合飼料B ³⁾		自由採食	自由採食	自由採食
乾草 ⁴⁾	自由採食	自由採食	自由採食	自由採食

- 1) 可消化養分総量 105%, 粗たんぱく質 28%, 粗脂肪 18.0%
- 2) 可消化養分総量 81%, 粗たんぱく質 21%, 粗脂肪 2.9%
- 3) 可消化養分総量 75%, 粗たんぱく質 15%, 粗脂肪 4.5%
- 4) 可消化養分総量 60%, 粗たんぱく質 9.3%, 粗脂肪 1.3%

multocida, 1頭より *H. somni* が分離されていた。

本研究では、供試牛を無作為に2群に区分し、113頭の子牛には1週齢(7~13日齢)及び4週齢(28~34日齢)時に *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* 混合不活化ワクチン(“京都微研”キャトルバクト3, (株)微生物化学研究所, 京都)を製品の用量用法に従って、2ml 筋肉内に投与した(投与群)。一方、117頭の子牛にはワクチンを投与しなかった(対照群)。すべての子牛は、日本飼養標準(日本飼養標準・肉用牛(2008年版), 農業・食品産業技術総合研究機構編, 55-71, 中央畜産会, 東京(2009))に基づく栄養要件を満たすように飼養された(表1)。

本研究は、鹿児島大学共同獣医学部のガイドラインに従って実施された。すべての供試牛は、出生から12週齢までの観察期間中、臨床的にモニターされ、過去の報告[10]と同様に、直腸温39.7℃以上、発咳、鼻汁、食欲不振及び聴診による呼吸音異常などを呈し、臨床的に治療を必要と認めた子牛を、呼吸器病の発症例とした。*P. multocida*, *M. haemolytica* 及び *H. somni* に対する抗体価の推移を調査するために、子牛を無作為に選定し経時的に採血した。血液は子牛の頸静脈から、生後1週齢(7~13日齢)、4週齢(28~34日齢)、8週齢(56~62日齢)及び12週齢(84~90日齢)時に真空採血管に採取され、遠心分離により血清を分離し、分析日まで-30℃で保存した。採血した子牛のうち、観察期間中、臨床的に健康であり、呼吸器病及び消化器病を含む疾病の発症はなかった投与群14頭、及び対照群14頭の子牛について抗体価の測定を行った。

P. multocida に対する抗体価の測定は、Otomaruら[11]の方法に準じて実施した。血清型A3型(BP165株)の精製菌体莢膜抗原を炭酸緩衝液で希釈した後、マイクロプレート(Nunc Immunoplate 449824, サーモフィッシャーサイエンティフィック(株), 東京)の全ウェルに添加したものを抗体価測定用プレートとした。被検血清及び参照血清をTween20添加PBS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℃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 Laboratories, U.S.A.)を

全ウェルに添加し、30℃で30分感作した。プレート洗浄後、発色液を全ウェルに添加し、30℃で30分感作した後、反応停止液を全ウェルに添加した。ELISAプレートリーダー(Multiskan FC 51119050, サーモフィッシャーサイエンティフィック(株), 東京)を用い、測定は主波長492nm及び副波長630nmで測定を行った。これらの吸光度の差が0.4以上を示す最高希釈倍数を抗体価とした。*M. haemolytica* に対する抗体価の測定は、Otomaruら[12]の方法に準じて実施した。血清型1型(HL2株)の濃縮培養上清を炭酸緩衝液で希釈した後、マイクロプレートに添加したものを抗体価測定用プレートとした。血清を100倍希釈から抗体価測定用プレートに添加し、37℃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抗体を添加し、37℃で1時間感作した。測定は主波長492nm及び副波長630nmで行った。これらの吸光度の差が0.4以上を示す最高希釈倍数を抗体価とした。*H. somni* に対する抗体価の測定は、Cantoら[13]の方法を一部改変して実施した。*H. somni* (M-1Br株)を培養後、遠心分離により菌体を回収した。回収した菌体を生理食塩液に浮遊させ、遠心分離で菌体を洗浄後、回収した上清を炭酸緩衝液で希釈したものをELISA抗原とした。ELISA抗原をマイクロプレートの各ウェルに分注したものを抗体価測定用プレートとした。プレートに希釈した血清を各ウェル100µl添加し、30℃で1時間感作させた。プレート洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ウシIgG抗体を添加し、30℃で30分感作させた。反応後プレートを洗浄し、発色液を全ウェルに添加後、30℃で30分間の感作を行い、反応停止液を全ウェルに添加した。主波長492nm及び副波長630nmで吸光度(Absorbance)を測定し、測定した主波長の測定値から副波長の測定値を差分した値をAbsorbance値とした。

両群の呼吸器病発症率は χ^2 検定により比較した。*P. multocida* 及び *M. haemolytica* に対する抗体価は幾何学平均±標準誤差、*H. somni* に対する抗体価は平均±標準誤差で示し、各群の各週齢についての比較はFriedman検定にて行った。また、各週齢における群間の比較は、Mann-WhitneyのU検定にて行った。統計解析には、市販のソフト(SPSS Statistics 26, 日本アイ・ビー・エム(株), 東京)を用いた。

呼吸器病発症率は、投与群で113頭中41頭(36.3%)、対照群で117頭中73頭(62.4%)であり、統計的に有意であった($P<0.01$) (表2)。図1~3は、それぞれ *P. multocida*, *M. haemolytica* 及び *H. somni* に対する抗体価を示した。

P. multocida について、投与群の8週齢の抗体価は4週齢と比較し有意に高値、12週齢の抗体価は1及び4

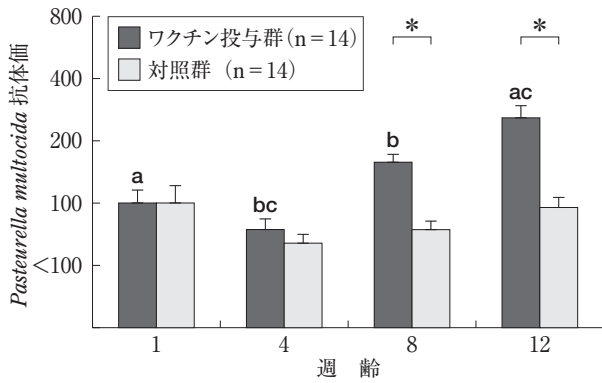


図1 *Pasteurella multocida* の抗体価の推移
幾何平均±標準誤差
同一週齢においてワクチン投与群と対照群に有意差あり (* : $P < 0.05$)
各群において同符号間に有意差あり (a-c : $P < 0.05$)

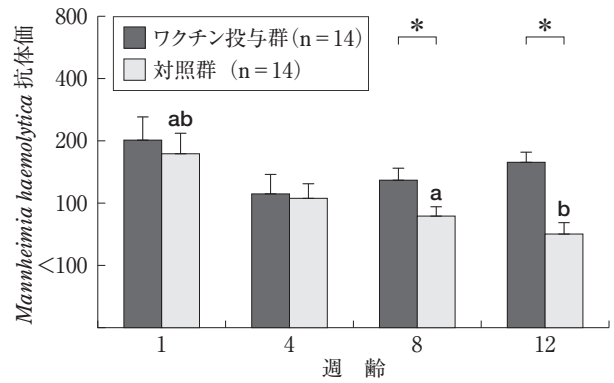


図2 *Mannheimia haemolytica* の抗体価の推移
幾何平均±標準誤差
同一週齢においてワクチン投与群と対照群に有意差あり (* : $P < 0.05$)
各群において同符号間に有意差あり (a-b : $P < 0.05$)

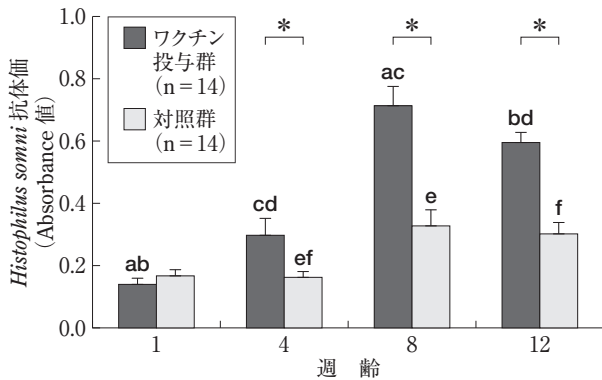


図3 *Histophilus somni* の抗体価の推移
平均±標準誤差
同一週齢においてワクチン投与群と対照群に有意差あり (* : $P < 0.05$)
各群において同符号間に有意差あり (a-f : $P < 0.05$)

週齢と比較し有意に高値であった ($P < 0.05$)。また、投与群では対照群と比較し8及び12週齢において有意に高値であった ($P < 0.05$)。 *M. haemolytica* については、対照群の8及び12週齢の抗体価は1週齢と比較し有意な低値であった ($P < 0.05$)。また、投与群では対照群と比較し8及び12週齢において有意に高値であった ($P < 0.05$)。 *H. somni* に対する抗体価については、対照群の8及び12週齢の抗体価は4週齢と比較し有意な高値であった ($P < 0.05$)。投与群の8及び12週齢の抗体価は1及び4週齢と比較し有意な高値であった ($P < 0.05$)。また、投与群では対照群と比較し4, 8及び12週齢において有意に高値であった ($P < 0.05$)。

子牛のほとんどの呼吸器病は、細菌、 *Mycoplasma* 及びウイルス感染によって引き起こされ、 *P. multocida*, *M. haemolytica* 及び *H. somni* は、呼吸器病を引き起こ

表2 呼吸器病の発生状況

群	発症頭数	未発症頭数	発症率 (%)
投与群 (n=113)	41	72	36.3*
対照群 (n=117)	73	44	62.4

群間における有意差あり (* : $P < 0.01$)

す主要な細菌である [6, 7]。また、これらの細菌が Bovine herpesvirus-1 あるいは Bovine respiratory syncytial virus と混合感染すると、呼吸器病症状はさらに重篤化するとされている [14, 15]。

子牛の効果的な呼吸器病対策の一つとしてワクチンの活用があげられる [16]。子牛へのワクチン投与に対する抗体産生に影響を及ぼす要因として栄養状態があげられ、栄養状態が低下している子牛では、ワクチンに対する抗体産生は低下することが報告されている [17]。

本研究における飼料給与状況について、配合飼料及び乾草は、すべて自由採食であり、各子牛の正確な採食量は不明ではあったが、各子牛は給与された代用乳を確実に摂取し、飼料設計上、日本飼養標準の基準を満たしていた。このことから、本研究において、子牛の栄養状態は大きな問題はなかったと考えられた。また、子牛へのワクチン投与に対する抗体産生に影響を及ぼす要因として、移行抗体の存在があげられ [16, 18]、子牛が移行抗体を保有しているとワクチンに対する抗体産生は減弱化するとされている [16, 18]。さらに、子牛が若齢であるとワクチンに対する抗体産生能は低いとされている [19, 20]。一方、最近のいくつかの研究では、移行抗体を保有する若齢子牛に対するワクチン投与により、抗体価は上昇したことが報告されている [21-23]。Moriら [23] は、本研究で使用したワクチンと同一のワクチンを用い、移行抗体を保有するホルスタイン種子牛に対して、5~12日齢時に1回目のワクチン投与、1回目ワクチン投与

後、2～4週後に2回目ワクチン投与を行い、2回目ワクチン投与後に抗体価は上昇し、ブースター効果を得たことを報告している。それゆえ、若齢期の子牛に呼吸器病が多発する農場において、早期にワクチン投与を行うことは呼吸器病の発症を低減することが期待される。

本研究に使用したワクチンは不活化ワクチンであったが、一般的に、不活化ワクチンはブースター効果を得るために2回の投与が必要とされる [16, 24]。また、不活化ワクチンは、生ワクチンと比較し、移行抗体の影響が少ないと報告されている [25]。そこで、本研究では、1週齢及び4週齢時にワクチン投与を行った。その結果、呼吸器病の発症率は、投与群では対照群と比較して有意に低値であった。

本研究における抗体価の調査は、限られた頭数ではあったが、*P. multocida* については、投与群の8及び12週齢の抗体価は2回目のワクチン投与時である4週齢と比較し有意に高値であり、投与群の8及び12週齢の抗体価は対照群と比較し有意な高値であったことから、投与群では2回のワクチン投与により確実に抗体産生したと考えられた。*M. haemolytica* については、投与群の抗体価は各週齢において有意な変化はなかったが、対照群の8及び12週齢の抗体価は1週齢と比較し有意な低値であった。また、投与群の8及び12週齢の抗体価は対照群と比較し有意な高値であった。移行抗体を保有している子牛に対するワクチン投与では、ワクチンによる抗体産生は減弱化するが、抗体産生細胞であるB細胞は免疫記憶細胞へと分化するなど機能的能力を維持することが報告 [26] されていることから、本研究においても、投与群ではワクチン投与により *M. haemolytica* に対する抗体価の有意な増加が認められなくても免疫記憶細胞への分化などの機能的能力が維持され、*M. haemolytica* の感染を予防した可能性が考えられた。*H. somni* については、対照群においても8及び12週齢の抗体価は4週齢と比較し有意な高値であったが、投与群の1回目ワクチン投与後の4週齢並びに2回目ワクチン投与後の8及び12週齢の抗体価は対照群と比較し有意な高値であったことから、投与群では1回目あるいは2回目のワクチン投与により免疫応答し、自然感染に先行して早期かつ確実に抗体産生したと考えられた。

以上のことから、黒毛和種子牛に対する1週齢及び4週齢時における *P. multocida*, *M. haemolytica*, *H. somni* 混合不活化ワクチンの投与は若齢期の呼吸器病予防の一助になると考えられた。しかしながら、本研究では、移行抗体を保有する子牛へのワクチン投与による抗体産生の機序や呼吸器病予防の機序、ワクチンに含まれる細菌以外の病原微生物の影響による呼吸器病の発症についてなど不明な点も多く、今後、さらなる調査が必要であると考えられた。

本研究において、申告すべき利益相反はない。

本研究において、*P. multocida*, *M. haemolytica* 及び *H. somni* に対する抗体価を測定していただいた微生物化学研究所の兼重貴裕氏に深謝する。

引用文献

- [1] Snowden GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL : Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors, *J Anim Sci*, 84, 1999-2008 (2006)
- [2] Hulbert LE, Ballou MA : Innate immune responses and health of individually reared Holstein calves after placement into transition-pens 23 d after weaning, *J Dairy Res*, 79, 333-340 (2012)
- [3] Hulbert LE, Moisa SJ : Stress, immunity, and the management of calves, *J Dairy Sci*, 99, 3199-3216 (2016)
- [4] Gotoh T, Albrecht E, Teuscher F, Kawabata K, Sakashita K, Kawamoto H, Wegner J : Differences in muscle and fat accretion in Japanese Black and European cattle, *Meat Sci*, 82, 300-308 (2009)
- [5] Ohtsuka H, Ono M, Saruyama Y, Mukai M, Kohiruimaki M, Kawamura S : Comparison of the peripheral blood leukocyte population between Japanese Black and Holstein calves, *Anim Sci J*, 82, 93-98 (2011)
- [6] Allen JW, Viel L, Bateman KG, Rosendal S, Shewen PE, Physick-Sheard P : The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures, *Can J Vet Res*, 55, 341-346 (1991)
- [7] Gagea MI, Bateman KG, Van Dreumel T, Mcewen BJ, Carman S, Archambault M, Shanahan RA, Caswell JL : Diseases and pathogens associated with mortality in Ontario beef feedlots, *J Vet Diagn Invest*, 18, 18-28 (2006)
- [8] 播谷 亮 : 子牛の呼吸器疾患の病理, *家畜感染症学会誌*, 6, 35-43 (2017)
- [9] Schrijver R, Stijntjes M, Rodríguez-Baño J, Tacconelli E, Babu Rajendran N, Voss A : Review of antimicrobial resistance surveillance programmes in livestock and meat in EU with focus on humans, *Clin Microbiol Infect*, 24, 577-590 (2018)
- [10] Galyean ML, Gunter SA, Malcolm-Callis KJ : Effects of arrival medication with tilmicosin phosphate on health and performance of newly received beef cattle, *J Anim Sci*, 73, 1219-1226 (1995)
- [11] Otomaru K, Kubota S, Tokimori M : Maternally and naturally acquired antibodies to *Pasteurella multocida* in Japanese Black calves, *Pak Vet J*, 35, 108-110 (2015)
- [12] Otomaru K, Kubota S, Tokimori M : Maternally and naturally acquired antibody to *Mannheimia haemolytica* in Japanese Black calves, *J Vet Med Sci*, 75, 1675-1677 (2013)
- [13] Canto J, Biberstein EL, Schulte TA, Behymer D : Cross-reactivity of *Haemophilus somnus* antibody in agglutination and complement fixation tests and in the enzyme-linked immunosorbent assay, *J Clin Microbiol*, 17, 500-506 (1983)
- [14] Gershwin LJ : Bovine respiratory syncytial virus

- infection: immunopathogenic mechanisms, *Anim Health Res Rev*, 8, 207-213 (2007)
- [15] Yates WD, Jericho KW, Doige CE : Effect of viral dose on experimental pneumonia caused by aerosol exposure of calves to bovine herpesvirus 1 and *Pasteurella haemolytica*, *Can J Comp Med* 47, 57-63 (1983)
- [16] Chase CC, Hurley DJ, Reber AJ : Neonatal immune development in the calf and its impact on vaccine response, *Vet Clin N Am-Food A*, 24, 87-104 (2008)
- [17] Griebel PJ, Schoonderwoerd M, Babiuk LA : Ontogeny of the immune response: effect of protein energy malnutrition in neonatal calves, *Can J Vet Res*, 51, 428-435 (1987)
- [18] Van der Sluijs MT, Kuhn EM, Makoschey B : A single vaccination with an inactivated bovine respiratory syncytial virus vaccine primes the cellular immune response in calves with maternal antibody, *BMC Vet Res*, 6, 2 (2010)
- [19] King NB, Frank NA : Effect of age on resistance and retention of titer in cattle vaccinated with strain 19 *Brucella abortus* vaccine, *J Am Vet Med Assoc*, 39, 100-103 (1961)
- [20] Woolums AR, Berghaus RD, Berghaus LJ, Ellis RW, Pence ME, Saliki JT, Hurley KA, Galland KL, Burdett WW, Nordstrom ST, Hurley DJ : Effect of calf age and administration route of initial multivalent modified-live virus vaccine on humoral and cell-mediated immune responses following subsequent administration of a booster vaccination at weaning in beef calves, *Am J Vet Res*, 74, 343-354 (2013)
- [21] Çokçalışkan C, Türkoğlu T, Uzunlu E, Sareyyüpoğlu B, Hancı İ, İpek A, Arslan A, Babak A, İldeniz G, Gülyaz V : Influence of vaccine potency and booster administration of Foot-and-mouth disease vaccines on the antibody response in calves with maternal antibodies, *J Vet Sci*, 18, 315-322 (2017)
- [22] Selim SA, Cullor JS, Smith BP, Blanchard P, Farver TB, Hoffman R, Dilling G, Roden LD, Wilgenburg B : The effect of *Escherichia coli* J5 and modified live *Salmonella dublin* vaccines in artificially reared neonatal calves, *Vaccine*, 13, 381-390 (1995)
- [23] Mori K, Kato T, Yokota O, Ohtsuka H : Field trial of primary and booster dose of inactivated vaccine against bovine respiratory bacteria in young Holstein calves, *J Vet Res*, 64, 223-230 (2020)
- [24] Baxter D : Active and passive immunity, vaccine types, excipients and licensing, *Occup Med*, 57, 552-556 (2007)
- [25] Mawhinney IC, Burrows MR : Protection against bovine respiratory syncytial virus challenge following a single dose of vaccine in young calves with maternal antibody, *Vet Rec*, 156, 139-143 (2005)
- [26] Foote MR, Nonnecke BJ, Beitz DC, Waters WR : Antigen-specific B-cell responses by neonatal calves after early vaccination, *J Dairy Sci*, 90, 5208-5217 (2007)

Effect of *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, and *Histophilus somni*
Inactivated Bacterial Vaccine for Respiratory Disease
in Young Japanese Black Calves in the Field

Konosuke OTOMARU^{1)†}, Shoko OISHI¹⁾, Yu FUJIMURA¹⁾,
Kathuhisa NAGAI¹⁾ and Hitoshi WAKI²⁾

1) *Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan*

2) *Kimothuki Agricultural Mutual Aid Association, 1475-5 Tabuchicho, Kanoya, 893-0045, Japan*

SUMMARY

To evaluate the preventive effects of inactivated combined vaccine for *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, and *Histophilus somni* on respiratory diseases in young Japanese Black calves, 230 calves at one farm were alternately assigned to two groups; 113 calves received the vaccine at 1 and 4 weeks of age (vaccination group), and the other 117 calves did not receive a vaccine (control group). The incidence of respiratory disease was significantly lower in the vaccination group compared to the control group ($P < 0.01$). In the antibody titer survey of 14 calves in each group, the antibody titers against *P. multocida*, *M. haemolytica*, and *H. somni* in the vaccination group were significantly higher than in the control group after vaccination ($P < 0.05$). Administration of the inactivated bacterial vaccine at 1 and 4 weeks of age to young Japanese Black calves might be an effective measure for the prevention of respiratory diseases.

— Key words : Bovine respiratory disease, inactivated bacteria vaccine, Japanese Black calves.

† Correspondence to : Konosuke OTOMARU (Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan

TEL 099-285-8750 FAX 099-285-8751 E-mail : otomaru@vet.kagoshima-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 74, 127 ~ 131 (2021)