

野外における黒毛和種子牛に対する *Mannheimia haemolytica* 不活化ワクチンの有効性の検討

乙丸孝之介^{1)†} 大塚浩通²⁾ 安藤貴朗³⁾ 小岩政照³⁾

1) 北薩農業共済組合川薩家畜診療所 (〒895-1813 薩摩郡さつま町轟町13-1)

2) 北里大学獣医畜産学部 (〒034-8628 十和田市東23番町35-1)

3) 酪農学園大学獣医学部 (〒069-8501 江別市文京台緑町582)

(2011年2月14日受付・2011年4月25日受理)

要 約

Mannheimia haemolytica (Mh) 不活化ワクチンの有効性をワクチン投与群 (n = 12), 対照群 (n = 12) の2群を比較し, 検討した. その結果, ロイコトキシン中和抗体価について, 投与群では投与日と比較し2週後には有意 ($P < 0.05$) な抗体上昇が認められ, 12週後においては対照群と比較し有意差 ($P < 0.05$) が認められた. また, 呼吸器病発症率, 平均治療回数は投与群で低かった. 以上のことからMh不活化ワクチン投与は, 早期に確実な抗体賦与が可能であり, 呼吸器病発生率低減対策として有効であると考えられた.

—キーワード: 抗体, 子牛, *Mannheimia haemolytica*, 呼吸器病, ワクチン.

----- 日獣会誌 64, 787~790 (2011)

Mannheimia haemolytica (Mh) はグラム陰性の通性嫌気性短桿菌であり, 牛呼吸器病の主要な原因菌とされている [1]. 牛呼吸器病の対策として抗菌剤が用いられることが多いが, 近年, Mhで薬剤耐性菌の分離頻度が上昇していることが報告されている [2-4]. また, 食用動物に使用される抗菌薬によって薬剤耐性菌が出現し, 動物から人へと伝播した場合, 人医療での抗菌剤治療を困難にする可能性が指摘されており, 獣医療における抗菌薬の慎重使用について提言がなされている [5, 6]. このため牛呼吸器病では治療よりも予防に重点を置いた対策が望まれている. Mh不活化ワクチンは日本国内では2004年度より市販され実用化されているが, その有効性について科学的に検証した報告はきわめて少ない. 本研究では, Mh不活化ワクチンの有効性を, ロイコトキシン (Lkt) 抗体価, 呼吸器病発症率, 治療回数等を指標として検討した.

材料及び方法

供試農場: 飼養頭数約300頭の黒毛和種子牛育成農場で試験を行った. 供試農場は3~5カ月齢の子牛を導入し, 9, 10カ月齢まで飼養し, 市場に搬出していた.

2005年3月には, 供試農場の健康子牛9頭より鼻腔ス

ワブを採取して細菌検査を実施した結果, 9頭中2頭よりMhが分離され, この農場はMh浸潤農場であることが確認されていた.

供試牛: 2005年4月に導入された臨床的に健康な子牛24頭を無作為に抽出し, Mhワクチン投与群として12頭 (平均日齢 = 131.6日; SD = 4.90, 平均体重 = 126.8kg; SD = 8.30), 対照群として12頭 (平均日齢 = 129.5日; SD = 4.3, 平均体重 = 125.6kg; SD = 6.4) の2群に区分した. 投与群には農場導入後, ただちにMh血清型1型不活化ワクチン (リスポバル, ファイザー(株), 東京) を右頸部に皮下投与した. 調査期間は2005年4~8月までの農場導入時から導入16週間までとした (図1). 牛舎内では6, 7頭が1群として飼養され, 牛群間で環境などに大きな差は認められなかった. 餌は自由採食とされていた.

抗体検査及び血液生化学検査: 供試牛は投与日, 2週後, 4週後, 8週後, 12週後に頸静脈より採血された. 採血後, 遠心分離により得られた血清は-20℃に測定日まで保存し, 血清を用いてLkt中和抗体価及び血液生化学検査測定を実施した.

Lkt中和抗体価の測定: 検体血清を56℃で30分間加温し非働化後, RPMI-1640培地にてマイクロタイター

† 連絡責任者: 乙丸孝之介 (鹿児島県農業共済組合連合会家畜臨床検査研修センター)

〒891-0132 鹿児島市七ツ島1-6-24 ☎099-261-0821 FAX 099-261-1063 E-mail: otomaru@nosai-net.or.jp

子牛に対する *Mannheimia* ワクチンの有効性の検討

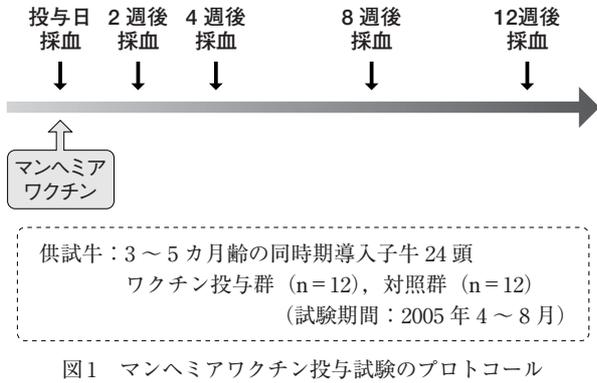


図1 マンヘミアワクチン投与試験のプロトコル

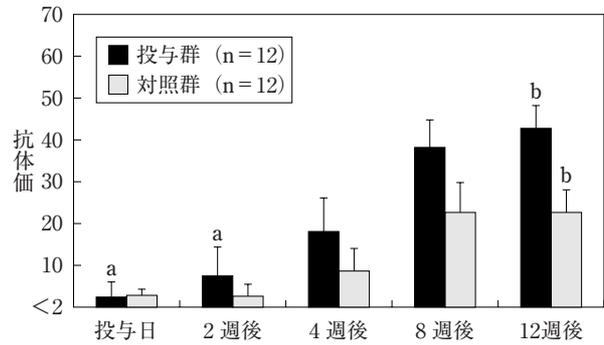


図2 ロイコトキシン中和抗体価 (a, b: $P < 0.05$)

表1 各群の血液生化学所見

検査項目	投与日		2 週後		12 週後	
	投与群	対照群	投与群	対照群	投与群	対照群
AST (IU/l)	60.50 ± 3.29	71.75 ± 7.79	53.15 ± 1.74	51.42 ± 2.51	58.25 ± 8.98	53.58 ± 5.09
GGT (IU/l)	18.58 ± 1.52	16.58 ± 0.85	15.23 ± 1.28	14.00 ± 1.00	17.50 ± 2.56	15.75 ± 0.92
TBil (mg/dl)	0.11 ± 0.02	0.13 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01
Cre (mg/dl)	0.77 ± 0.04	0.75 ± 0.02	0.71 ± 0.03	0.72 ± 0.02	0.74 ± 0.02	0.72 ± 0.02
BUN (mg/dl)	10.34 ± 1.15	9.63 ± 0.79	9.92 ± 0.64	11.08 ± 0.49	10.68 ± 0.59	9.96 ± 0.52
TP (g/dl)	6.32 ± 0.14	6.28 ± 0.13	6.15 ± 0.12	6.09 ± 0.10	6.44 ± 0.10	6.27 ± 0.13
Alb (g/dl)	3.09 ± 0.08	3.23 ± 0.06	2.94 ± 0.08	3.12 ± 0.07	3.09 ± 0.06	3.11 ± 0.09
Glb (g/dl)	3.23 ± 0.18	3.05 ± 0.13	3.23 ± 0.15	2.97 ± 0.11	3.35 ± 0.13	3.16 ± 0.07
A/G	0.99 ± 0.07	1.08 ± 0.05	0.94 ± 0.06	1.07 ± 0.05	0.94 ± 0.05	0.99 ± 0.04
TCho (mg/dl)	107.58 ± 9.74	121.58 ± 5.91	96.62 ± 5.53	96.00 ± 6.39	89.75 ± 6.79	87.25 ± 7.25
TG (mg/dl)	12.17 ± 1.40	11.58 ± 1.46	15.77 ± 1.75	13.33 ± 1.12	14.00 ± 1.37	14.67 ± 1.46

平均値 ± 標準誤差

プレートの各ウェルに2倍階段希釈した。Lkt培養上清を希釈し、Lkt液とした。Lkt液をマイクロプレートの全ウェル（陽性対照は除く）に分注し、4℃で一晩静置し中和反応させた。陽性対照はPBS+RPMI-1640培地、陰性対照はPBS+Lkt液とした。健康な牛より採取した血液を遠心管に分注し、脱イオン水を加えて溶血させた。PBSを加えて混合後遠心した。遠心後白血球沈査を集め、RPMI-1640培地にて調整した白血球懸濁液をマイクロプレートの全ウェルに分注し、5% CO₂存在下にて、37℃ (± 2℃) で1時間加温した。プレートを遠心後、上清を除去した。各ウェルにホルマリン溶液を加え、細胞沈査を固定した。ホルマリン溶液を除去し、クリスタルバイオレット溶液を加え、細胞沈査を染色した。水道水にて洗浄した後に乾燥させ、各ウェルの染色された細胞層変性の有無を確認した。正常細胞層は陽性、変性細胞層は陰性とした。中和反応を示した血清の最高希釈倍率を用い、Lkt中和抗体価とした。なお中和抗体価の測定は、ファイザー(株)三島ラボラトリーに依頼した。

血液生化学検査: 総蛋白 (TP), アルブミン (Alb), グロブリン (Glb), 総コレステロール (TCho), グルタミン酸オキザロ酢酸トランスアミナーゼ (AST), γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT), トリグリセリ

ド (TG), 総ビリルビン (TBil), 血液尿素窒素 (BUN), 及びクレアチニン (Cre) について自動分析装置 (7180形, 日立ハイテクフィールディング(株), 東京) にて測定を行った。

呼吸器病発症率調査: 導入時より16週後までを観察期間とし各群の呼吸器病発症率及び治療回数を調査した。観察期間中に39.5℃以上の発熱, 食欲減退を伴い, 発咳, 鼻汁や活力及び聴診による呼吸音異常などの呼吸器病症状を呈し, 臨床的に治療が必要と認められたものを発症例とした。

統計処理: 抗体価は幾何学平均 (GM) ± 標準誤差 (SE) で示し, 血液生化学値は平均 ± 標準誤差 (SE) で示した。Student's *t*-検定にて導入時及び群間で比較した。呼吸器病発症率は, 両群の発症率を χ^2 検定により比較した。

成 績

Lkt中和抗体価の推移を図2に示した。導入時では投与群2.4 ± 3.5倍, 対照群2.8 ± 1.6倍であったが, 12週後では投与群42.7 ± 5.4倍, 対照群22.6 ± 5.6倍とともに上昇がみられた。投与群では, 投与日と比較し2週後には有意 ($P < 0.05$) な抗体の上昇が認められた。また投与12週後において, 対照群と比較して投与群で有意

表2 呼吸器病治療状況

	投与群 (n=12)	対照群 (n=12)
治療頭数	1	5
発症率(%)	8	42
総治療回数	8	24
平均治療回数	0.7	2

な ($P < 0.05$) 高値が認められた。血液生化学検査では、試験期間を通していずれの項目においても投与群と対照群の間に有意な差は認められなかった (表1)。

Mh ワクチン投与後の呼吸器病発生状況を表2に示した。呼吸器病の発症率は、投与群で8%、対照群で42%と投与群の方が低くなった ($P = 0.0593$)。また、対照群の呼吸器病発症牛5頭中3頭は呼吸器病の発症前後において4倍以上の抗体上昇が認められた。

平均治療回数は、投与群0.7回、対照群2.0回と減少する傾向にあった。

考 察

Mhの血清型は12種類に分類され、呼吸器病罹患牛からは血清型1型の分離頻度が最も高いとされている [7-10]。本研究で用いたMhワクチンは血清型1型に対するものであった。MhはLkt外毒素を分泌することによって好中球を主体とする白血球を破壊し、その際に放出される H_2O_2 、活性酸素、蛋白分解酵素などにより肺組織に障害を与えて繊維素性肺炎を引き起こすとされており、さらに他の病原体との複合感染することにより病態は悪化するとされている [11-13]。

本研究におけるLkt中和抗体価は、対照群では緩やかな上昇を示した。この抗体価が上昇した要因として、本研究で用いた供試農場はMhの浸潤が確認されているため、農場内でMhに自然感染したためであると考えられた。一方、投与群では投与日と比較し2週後には有意な抗体価の上昇を認め、12週後においては対照群と比較し有意な高値を示したことから、投与群では自然感染に先行してワクチン由来の抗体産生が促されたと考えられた。

呼吸器病の発症率は、投与群で8%、対照群で42%とワクチン投与による呼吸器病の減少が認められた。また、平均治療回数についても投与群0.7回、対照群2.0回と減少が認められた。一方、血液生化学検査においては、いずれの項目についても投与群と対照群で有意な差は認められず、正常範囲内であることからMh不活化ワクチン投与以外には両群に臨床的な差がなかったと考えられる。投与群は、Mh不活化ワクチン投与によって

Mhに対して早期かつ確実に抗体賦与され、Mhの関与する呼吸器病に罹患するリスクが減少したことにより、呼吸器病の発症率が減少したと考えられた。本研究の結果から、野外におけるMh不活化ワクチン投与は、呼吸器病発生率低減対策として有効であると考えられた。

引用文献

- [1] 澤田拓士：動物の感染症，小沼 操編，第二版，123-124，近代出版，東京（2002）
- [2] 加藤敏英，山本高根，小形芳美，漆山芳郎，萩野祥樹，斎藤博水：薬剤感受性に基づいた牛呼吸器感染症治療プログラムの臨床効果，日獣会誌，61，294-298（2008）
- [3] Katsuda K, Kohmoto M, Mikami O, Uchida I: Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle with bovine pneumonia, *Vet Microbiol*, 139, 74-79 (2009)
- [4] 小池新平，井上恭一，米山州二，市川 優，田島和彦：栃木県で過去16年間に分離された牛呼吸器病の薬剤感受性調査，日獣会誌，62，533-537（2009）
- [5] 田村 豊：動物用抗菌剤の使用動向と薬剤耐性菌対策，日獣会誌，56，685-691（2003）
- [6] 田村 豊：動物用抗菌剤の正しい使い方，家畜診療，52，533-542（2005）
- [7] Katsuda K, Kamiyama M, Kawashima K, Tsunemitsu H, Eguchi M: Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987-2006, *Vet J*, 178, 146-148 (2008)
- [8] 須賀幸司，西野 豊，中島一郎，御村宗人，佐藤俊策，後藤清次，松岡俊和，鴻巣 泰，鉢巣桂一，飯島雄二，成田和枝，入江 壯：肉用牛で集団発生した *Pasteurella haemolytica* 感染症とその防疫対策，日獣会誌，42，319-323（1989）
- [9] Nakazawa M, Ishino S: Serovars and biovars of *Pasteurella haemolytica* isolated from calves, *Jpn J Vet Sci*, 44, 459-463 (1982)
- [10] 富永 潔，中澤宗生：牛の *Pasteurella haemolytica* 感染症の病型と分離株の血清型，日獣会誌，45，79-83（1992）
- [11] Jeyaseelan S, Sreevatsan S, Maheswaran SK: Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis, *Anim Health Res Rev*, 3, 69-82 (2002)
- [12] 桜井健一，松岡俊和，鴻巣 泰，飯島雄二，成田和枝，沖 三雄，新井則雄，漆畑憲二，梅沢正親，飯田 潔：乳用牛に発生した *Pasteurella haemolytica* 感染症，日獣会誌，41，731-734（1988）
- [13] Maheswaran SK, Kannan MS, Weiss DJ, Reddy KR, Townsend EL, Yoo HS, Lee BW, Whiteley LO: Enhancement of neutrophil-mediated injury to bovine pulmonary endothelial cells by *Pasteurella haemolytica* leukotoxin, *Infect Immun*, 61, 2618-2625 (1993)

Evaluation of the Effect of *Mannheimia haemolytica* Inactivation Vaccine
on Japanese Black Cattle in the Field

Konosuke OTOMARU*†, Hiromichi OHTSUKA, Takaaki ANDO and Masateru KOIWA

* *Veterinary Clinical Inspection Training Center, Kagoshima Prefectural Federation of Agricultural Mutual Aid Associations, 1-6-24 Nanatujima, Kagoshima, 891-0132, Japan*

SUMMARY

To evaluate the effect of *Mannheimia haemolytica* (Mh) inactivation vaccine on Japanese Black cattle the cattle were divided into a vaccination group (n= 12) and a control group (n= 12). Leukotoxin neutralizing antibody titers at two weeks after vaccine injection showed a significant increase compared with the day of injection ($P < 0.05$). Leukotoxin neutralizing antibody titers in the vaccination group showed a significant increase compared to the control group ($P < 0.05$). The incidence and frequency of treatment for respiratory disease were lower in the vaccination group. The results suggested that Mh inactivation vaccine may permit fast and steady antibody production, making it effective for preventing respiratory disease.

— Key words : antibody, cattle, *Mannheimia haemolytica*, respiratory disease, vaccine.

† *Correspondence to : Konosuke OTOMARU (Veterinary Clinical Inspection Training Center, Kagoshima Prefectural Federation of Agricultural Mutual Aid Associations)*

1-6-24 Nanatujima, Kagoshima, 891-0132, Japan

TEL 099-261-0821 FAX 099-261-1063 E-mail : otomaru@nosai-net.or.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 787 ~ 790 (2011)