

# 黒毛和種導入子牛に対する *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<sup>1)†</sup> 久保田 整<sup>2)</sup> 大塚浩通<sup>3)</sup> 安藤貴朗<sup>4)</sup> 小岩政照<sup>4)</sup>

1) 北薩農業共済組合 (〒895-1813 薩摩郡さつま町轟町13-1)

2) 微生物化学研究所 (〒611-0041 京都府宇治市横島町24-16)

3) 北里大学獣医学部 (〒034-8628 十和田市東23番町35-1)

4) 酪農学園大学獣医学部 (〒069-8501 江別市文京台緑町582)

(2012年1月19日受付・2012年6月15日受理)

## 要 約

黒毛和種子牛育成農場に導入され、臨床的に健康な3～4カ月齢の子牛に、*Pasteurella multocida* (Pm), *Mannheimia haemolytica* (Mh), *Histophilus somni* (Hs) 混合不活化ワクチンを投与し、その予防効果を検討した。投与群の呼吸器病発症率は524頭中242頭(46.2%)であり、対照群の534頭中341頭(63.9%)より有意に低かった。投与群9頭の平均Pm, Mh及びHs血清抗体価は投与4週後に投与前より有意に上昇した。一方、対照群9頭の平均Pm及びMh血清抗体価は、導入日より経過に従い上昇し、平均Hs抗体価は導入4～12週後に緩徐に上昇した。以上の成績から、当農場での呼吸器病の発生にPm, Mh及びHsの1種類以上の細菌が関与し、ワクチン投与により呼吸器病発症率が低値であった可能性が伺われた。——キーワード：細菌ワクチン, 子牛, 呼吸器病。

----- 日獣会誌 65, 767～770 (2012)

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]。鹿児島県においては肉用子牛の病傷事故の約30%が呼吸器病であり、肉用子牛の重要な生産性阻害要因となっている。この呼吸器病の原因として、鼻腔の常在菌とされる *Pasteurella multocida* (Pm), *Mannheimia haemolytica* (Mh), *Histophilus somni* (Hs) 等による日和見感染が示唆されている [2-5]。

牛呼吸器病の治療及び予防対策として抗菌剤が用いられることが多いが、近年、薬剤耐性を示すPm, Mh及びHsの分離頻度が上昇している [4-6]。このためPm, Mh及びHsによる牛呼吸器病に対して、抗菌剤よりもワクチンに重点を置いた対策が望まれている。このような状況の中、近年Pm, Mh及びHsに対するワクチンが開発され実用化されている。

本研究では、呼吸器病発症予防を目的に黒毛和種導入子牛にPm, Mh, Hs混合不活化ワクチンを投与し、その効果について検討したので報告する。

## 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。供試農場では、鹿児島県内にて飼養された3～4カ月齢の子牛をトラック輸送により導入し、9～10カ月齢まで飼養した後、市場に搬出していた。農場での呼吸器病は年間を通して発生していた。2006年6月に農場導入1～4カ月後の臨床的に健康な4～8カ月齢の子牛20頭より得た鼻腔拭い液の細菌検査により、15頭よりPm, 4頭よりMhが分離されていた。

**供試牛及び供試ワクチン：**2006年11月から2008年10月の間に導入された106農場由来の臨床的に健康な子牛1,058頭を供試した。全供試牛に農場導入後、ただちにペニシリン、ストレプトマイシン合剤を投与した。農場では子牛の導入を毎月1回あるいは2回行い、1回の導入頭数は10～40頭であった。群分けは、同一導入日に導入された子牛は、すべて同じ群として、56農場

† 連絡責任者(現所属)：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

由来の524頭を投与群、82農場由来の534頭を対照群として区分した。投与群には、導入日及び導入4週後にPm, Mh, Hs混合不活化ワクチン（キャトルバクト3, 微生物化学研究所㈱, 京都）を製品の用法, 用量に従って, 2mlを筋肉内に投与した。

農場では6～7頭を一つのパドックにて飼養した。パドック間の仕切りは4本の鉄棒であり、隣接するパドックの子牛は互いに接触することが可能であった。同1日の導入にて満杯にならないパドックが存在した場合、同パドックに次の導入牛が追加されることもあった。また、導入2週～2カ月後には子牛の体格などによりパドック間で数頭ずつを入れ替え、投与群と対照群の子牛を同一あるいは隣接パドックにて飼養した。飼料は自由採食とした。いずれの供試牛も事前にPm, Mh, Hs混合不活化ワクチンを投与されていなかった。

**臨床調査：**農場の導入日より120日後までの観察期間中に、39.5℃以上の発熱、発咳、活力低下及び聴診による呼吸音異常の確認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子牛を発症例とした。

**抗体検査：**2008年2～3月に導入した子牛のうち投与群から3農場由来の9頭（日齢：131.1±15.8, 平均±SD）、対照群から1農場由来の9頭（日齢：129.8±9.1, 平均±SD）を抽出し、抗体検査を行った。抗体検査牛のうち投与群では観察期間中に呼吸器病を発症しなかったが、対照群の9頭中4頭は発症した。抗体検査牛は導入日のワクチン投与前、導入4週、8週、12週及び16週時に採血し、血清は-20℃で測定日まで保存した。

Pm抗体価の測定は、血清型A3型（BP165株）の抗粗精製菌体莢膜ポリクローナル血清（凝集抗体価2,048倍）を炭酸緩衝液で希釈した後、マイクロプレートの全ウェルに添加し30℃で2時間感作した。プレート洗浄後、ブロック液を全ウェルに添加し4℃で一晩感作後プレート洗浄し、次に粗精製菌体表面抗原を全ウェルに添加し、30℃で30分感作後、洗浄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TweenPBS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。測定は主波長492nm及び副波長630nmで行い、これらの吸光度の差が0.4以上を示す最高希釈倍数をELISA抗体価とした。

Mh抗体価の測定は、Pm抗体価測定法を以下のように変更して実施した。血清型1型（HL2株）の濃縮培養上清（ELISA抗体価160倍）を炭酸緩衝液で希釈した後、マイクロプレートに添加し4℃で一晩感作した。プ

レート洗浄後、ブロック液を添加し37℃で1時間感作後、洗浄したものを抗体価測定用プレートとした。血清を200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。

Hs抗体価の測定はStephensら[7]の方法に準じて実施した。Pmの抗体価は100倍以上、Mhの抗体価は200倍以上、HsのOD値は0.6以上を抗体陽性とした。100倍未満のPm抗体価を50倍、200倍未満のMh抗体価を100倍として抗体価の平均値を算出した。

**統計処理：**両群の呼吸器病発症率を $\chi^2$ 検定により比較した。Pm及びMh抗体価は幾何学平均±標準偏差、Hs抗体価は平均±標準偏差で示し、Student's *t*検定にて投与前及び群間で比較した。

## 成 績

**呼吸器病発症調査：**投与群では524頭中242頭(46.2%)、対照群では534頭中341頭(63.9%)がそれぞれ発症し、両群間で有意差が認められた( $P<0.01$ )。呼吸器病発症と導入後日数については、投与群の導入～30日後、導入31～60日後、61～90日後及び91～120日後の発症率は、19.5% (524頭中102頭)、11.8%、7.6%及び7.3%であり、対照群のそれらは同順序で23.4% (534頭中125頭)、18.7%、12.7%及び9.0%であった。呼吸器病発症に大きな季節的变化はなかった。

**抗体検査：**ワクチン投与前のPm抗体価は両群ともに9頭中6頭が抗体陽性、Mh抗体価は対照群の1頭、Hs抗体価は対照群の2頭がそれぞれ抗体陽性であった(表1～3)。投与群のPm, Mh及びHsのいずれの抗体価も4週後には投与前と比較し有意( $P<0.01$ )な上昇を示し高値を維持した。投与群の8週後のPm及びMh抗体価並びに16週後のHs抗体価は、それぞれ対照群と比較して有意( $P<0.05$ )な高値であった。対照群のPm及びMh抗体価は、導入日から経過に従い上昇し16週後にはすべての個体で抗体陽性であった。対照群の呼吸器病発症牛4頭中2頭のMh抗体価及び他の1頭のPm抗体価は、発症前後において4倍以上上昇を示した。対照群のHs抗体価は、導入4～12週後に緩徐に上昇した。

## 考 察

黒毛和種牛に対するPm, Mh及びHsワクチンの臨床的な予防効果に関する報告は、これまで榎谷ら[8]がHsワクチン、乙丸ら[9]がMhワクチンを用いた成績を報告した以外にはほとんど見当たらない。そこで今回、Pm, Mh, Hs混合不活化ワクチンによる呼吸器病発症予防を試みた。

表1 *Pasteurella multocida* のELISA抗体価の推移

	投与前	4週後	8週後	12週後	16週後
ワクチン投与群	92.6±58.3 (6/9)*	233.3±130.2 <sup>f</sup> (8/9)	370.3±66.7 <sup>f‡</sup> (9/9)	400.0±156.3 <sup>f</sup> (9/9)	400.0±218.6 <sup>f</sup> (9/9)
対 照 群	100.0±112.1 (6/9)	171.4±122.5 (9/9)	200.0±224.2 (9/9)	252.0±220.5 <sup>f</sup> (9/9)	252.0±136.4 <sup>f</sup> (9/9)

幾何学平均±標準偏差

\*：抗体陽性牛/供試牛，ELISA抗体価100倍以上を抗体陽性とした

f：P&lt;0.01，投与前との比較

‡：P&lt;0.05，対照群との比較

表2 *Mannheimia haemolytica* のELISA抗体価の推移

	投与前	4週後	8週後	12週後	16週後
ワクチン投与群	100.0±0.0 (0/9)*	342.9±290.6 <sup>f</sup> (8/9)	466.6±147.0 <sup>f‡</sup> (9/9)	342.9±190.0 <sup>f</sup> (9/9)	317.5±194.4 <sup>f</sup> (9/9)
対 照 群	108.0±33.3 (1/9)	200.0±300.0 (4/9)	185.2±229.7 (5/9)	272.2±464.9 <sup>f</sup> (8/9)	342.9±185.6 <sup>f</sup> (9/9)

幾何学平均±標準偏差

\*：抗体陽性牛/供試牛，ELISA抗体価200倍以上を抗体陽性とした

f：P&lt;0.01，投与前との比較

‡：P&lt;0.05，対照群との比較

表3 *Histophilus somni* のOD値の推移

	投与前	4週後	8週後	12週後	16週後
ワクチン投与群	0.18±0.11 (0/9)*	0.46±0.24 <sup>f</sup> (1/9)	0.82±0.33 <sup>f</sup> (5/9)	0.68±0.21 <sup>f</sup> (5/9)	0.85±0.31 <sup>f‡</sup> (8/9)
対 照 群	0.45±0.22 (2/9)	0.38±0.15 (1/9)	0.55±0.27 (2/9)	0.65±0.30 (4/9)	0.47±0.08 (1/9)

平均±標準偏差

\*：抗体陽性牛/供試牛，OD値0.6倍以上を抗体陽性とした

f：P&lt;0.01，投与前との比較

‡：P&lt;0.05，対照群との比較

本研究における抗体検査について，調査時期，調査頭数及び由来農場など限定された条件ではあるが，投与前のPm，Mh及びHs抗体価は，いずれも投与前と比較し4週後には有意な抗体上昇を示し高値を維持した．一方，対照群のPm及びMh抗体価は，導入日から経過に従い上昇し，呼吸器病発症牛4頭中3頭において発症前後にPmあるいはMh抗体価が4倍以上上昇した．対照群のHs抗体価は，導入4～12週後に緩徐に上昇した．当農場では過去に健康子牛の鼻腔スワブからPm，Mhが分離されていた．これらのことから，当農場での呼吸器病の発生に，ワクチンに含まれる1種類以上の細菌が直接的あるいは間接的に関与した可能性が伺えた．

呼吸器病発症率は，投与前46.2%であり，対照群の63.9%より有意に低かった．このことから，投与前ではワクチン投与により獲得した抗体の存在によりPm，Mh及びHsが関与する呼吸器病の発症を最小限に留めた可能性が示唆された．今後，呼吸器病の正確な要因を明らかにし，ワクチン効果について詳細に検討する必要

があると考えられた．

## 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] 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)
- [3] 加藤敏英, 齊藤雅一, 庄司和明, 板垣昌志: *Pasteurella multocida* および *Mycoplasma* が関与した導入牛の呼吸器病に対するエンロフロキサシンとチルミコシンの予防効果, 日獣会誌, 56, 7-11 (2003)
- [4] 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)
- [5] 加藤敏英, 小屋正人, 渡辺栄次, 酒井淳一, 小形芳美, 曳沼 徹: 肺炎罹患牛の鼻汁由来細菌およびマイコプラ

- ズマの薬剤感受性, 日獣会誌, 49, 81-84 (1996)
- [6] Watts JL, Yancey RJ Jr, Salmon SA, Case CA : A 4-year survey of antimicrobial susceptibility trends for isolates from cattle with bovine respiratory disease in North America, J Clin Microbiol, 32, 725-731 (1994)
- [7] Stephens LR, Little PB, Wilkie BN, Barnum DA : Isolation of *Haemophilus somnus* antigens and their use as vaccines for prevention of bovine thromboembolic meningoencephalitis, Am J Vet Res, 45, 234-239 (1984)
- [8] 榎谷勝弘, 森倉 徹 : 和牛肥育農家における *Histophilus somni* ワクチン接種後の抗体追跡調査, 家畜診療, 55, 629-634 (2008)
- [9] 乙丸孝之介, 大塚浩通, 安藤貴朗, 小岩政照 : 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, 日獣会誌, 64, 787-790 (2011)

---

Field Application of Mixed Vaccine Including Inactivated *Pasteurella multocida*,  
*Mannheimia haemolytica* and *Histophilus somni* to Japanese Black Calves  
for Preventing Development of Respiratory Disease

Konosuke OTOMARU\*†, Sei KUBOTA, 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

After Japanese Black calves aged 3 to 4 months were introduced to a farm, the calves were administered mixed vaccine including inactivated *Pasteurella multocida* (Pm), *Mannheimia haemolytica* (Mh) and *Histophilus somni* (Hs) to evaluate the effect of the vaccine in preventing respiratory disease. The incidence of respiratory disease in the vaccination group were 46.2% (242 of 524 heads), significantly lower than the 63.9% (341 of 534 heads) in the control group without vaccination. Mean serum antibody titers against Pm, Mh and Hs in the vaccination group (9 heads) were significantly increased 4 weeks post-administration compared with those pre-administration. Meanwhile, the mean titers against Pm and Mh in the control group (9 heads) increased after introduction to the farm, and the mean titer against Hs was gradually increased from 4 to 12 weeks after introduction to the farm. These results suggest that one or more of Pm, Mh, and Hs could be associated with the development of respiratory disease on the farm and that anti-Pm, anti-Mh, and anti-HS serum antibodies induced by the vaccine decreased the incidence. — Key words : bacteria vaccine, calf, respiratory disease.

† Correspondence to (Present address) : 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., 65, 767 ~ 770 (2012)