

黒毛和種子牛に対する *Histophilus somni* 不活化ワクチン投与後の抗体応答

乙丸孝之介^{1)†} 永井克尚¹⁾ 百武幸治¹⁾ 久保田修一²⁾
兼重貴裕²⁾ 窪田 力¹⁾

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

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

(2019年2月7日受付・2019年4月3日受理)

要 約

黒毛和種子牛における *Histophilus somni* ワクチンの抗体応答を調査するため、2農場（それぞれ A, B 農場）で飼養されていた60頭の子牛を供試した。A農場では32頭の子牛を投与群16頭及び対照群16頭、B農場では28頭の子牛を投与群14頭及び対照群14頭に区分した。投与群には4及び8週齢時に *H. somni* 不活化ワクチンを投与した。すべての供試牛から生後1, 4, 8, 12, 16及び20週齢で血液を採取し、*H. somni* に対する抗体価を測定した。その結果、2農場の投与群の8週齢以降の抗体価は、1及び4週齢時の抗体価と比較し有意に上昇した。また、2農場の投与群の抗体価は対照群と比較して、それぞれ有意に高値で推移した。このことから、子牛に対する *H. somni* ワクチンの投与は、抗体価を増加させることが示唆された。——キーワード：*Histophilus somni*, 黒毛和種子牛, ワクチン。

-----日獣会誌 72, 477~480 (2019)

Histophilus somni はグラム陰性の通性嫌気性短桿菌であり、健康牛の上部気道に常在し、髄膜脳脊髄膜炎や呼吸器病など、さまざまな疾病を引き起こす [1, 2]。牛呼吸器病は、多くの肉用牛農場で見られ、その損害は非常に大きい [3]。

子牛の呼吸器病は、一般的に離乳後、摂取飼料の変化や群編成によってストレスのかかる3~6カ月齢の時期に多発する [4, 5]。この呼吸器病の原因の一つとして、*H. somni* による日和見感染が示唆されている [5-7]。*H. somni* 感染症の治療には、一般的に抗菌剤が使用されているが、近年、抗菌剤の慎重使用が提唱されている [8]。そのため、*H. somni* による疾病の予防には、抗菌剤よりもワクチネーションに重点を置いた対策が望まれている。

このような状況のなか、*H. somni* に対するワクチンが開発され、実用化されているが、その効果については、海外のホルスタイン種子牛、交雑種子牛及びフィードロット牛における報告のみであり [9-11]、国内においては報告されていない。

一般的に子牛は、成牛と比較して免疫機能が未熟であり、呼吸器疾患や消化器疾患などを発症しやすい [12,

13]。また、黒毛和種は、日本固有の肉用種牛であり、黒毛和種子牛はホルスタイン種子牛と比較して、免疫機能が未熟である [14]。それゆえ、黒毛和種子牛において、ワクチネーションにより免疫を獲得することは、疾病発症のリスクを軽減するうえで、特に重要であると考えられる。そこで、本研究では、黒毛和種子牛に *H. somni* 不活化ワクチンを投与し、その抗体応答について検討した。

鹿児島県内の2農場（それぞれ A, B 農場）で飼養されていた臨床的に健康な黒毛和種子牛60頭を供試し、A農場では32頭の子牛を無作為に投与群16頭及び対照群16頭に区分し、B農場では28頭の子牛を無作為に投与群14頭及び対照群14頭に区分した。A農場及びB農場の子牛は出生後4日齢まで母牛と同居飼養された後に母子分離された。A農場の子牛は、個別ハッチで12週齢まで人工哺乳にて飼養され、その後離乳し1パドック当たり5頭で飼養された。B農場の子牛は、1パドック当たり12頭で12週齢まで人工哺乳にて飼養され、その後離乳し1パドック当たり4頭で飼養された。投与

† 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

群には、4及び8週齢時に *H. somni* 不活化ワクチン（ヘモフィルスワクチン、(株)微生物化学研究所、京都）を製品の用法、用量に従って、筋肉内に2ml投与した。

供試牛は1週齢（7～12日齢）、4週齢（28～34日齢）、8週齢（56～62日齢）、12週齢（84～90日齢）、16週齢（112～118日齢）及び20週齢（140～146日齢）時に、頸静脈より血清分離用真空採血管（ベノジェクトII VP-S100K、テルモ(株)、東京）を用いて採血された。採取した血液は遮光下で30分間常温に静置した後、3,000rpmで20分間遠心して血清を分離し、測定時まで-30℃に保存した。すべての子牛は、鹿児島大学共同獣医学部のガイドラインに従って飼養管理された。すべての供試牛は、出生から20週齢までの観察期間中、呼吸器病の発症はなく、臨床的に健康であった。

H. somni 抗体価の測定は、Cantoら [15] の方法を一部改変し、ELISA法にて実施した。*H. somni* (M-1Br株) をブレインハートインフュージョン培地にて37℃で3日間培養後、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、ふたたび菌体を生理食塩液に浮遊させ、4℃で24時間攪拌した後、遠心分離で上清を回収した。その後、回収した上清を0.22 μ mのメンブランフィルターでろ過し、炭酸緩衝液で希釈したものをELISA抗原とした。ELISA抗原をマイクロタイタープレートの各ウェルに分注し30℃で2時間固相化させELISA抗原固相プレートとした。0.05% Tween20添加リン酸緩衝液で抗原固相プレートを洗浄した後、ブロックエース（DSファーマバイオメディカル(株)、大阪）を添加し、4℃で18時間静置し、ブロッキング処理を行った。

被験血清はTween20添加リン酸緩衝液で400倍希釈して用いた。抗原固相プレートに希釈した血清を各ウェル100 μ l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（Cappel Laboratories, U.S.A.）を添加し、30℃で30分間感作させた。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（Optical Density）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OD値とした。*H. somni* のOD値は0.6以上を発症防御に十分な抗体とし、抗体陽性とした。

各農場の子牛の抗体価は、週齢ごとに平均 \pm 標準偏差で示した。群内における週齢ごとの抗体価の比較は、一元配置分散分析を行い、有意な差を認めた場合にはTukey-Kramer法により検定した。群間における抗体価の推移の比較は、反復測定二元配置分散分析により検定した。いずれも、5%未満の危険率を有意な差とした（ $P<0.05$ 及び $P<0.01$ ）。統計解析には、市販のソフト

（SPSS Statistics 24、日本IBM(株)、東京）を用いた。

表1及び表2に、各農場の子牛の抗体価の推移を示した。A農場では、投与群の8、12、16及び20週齢時の *H. somni* に対する抗体価は、1週齢及び4週齢の抗体価と比較し、有意に高値であった（ $P<0.05$ ）。また、投与群の *H. somni* に対する抗体価は、対照群と比較し、有意に高値で推移した（ $P<0.01$ ）。B農場では、投与群の8、12、16及び20週齢時の *H. somni* に対する抗体価は、1週齢及び4週齢時の抗体価と比較し、有意に高値であった（ $P<0.05$ ）。また、投与群の *H. somni* に対する抗体価は、対照群と比較し、有意に高値で推移した（ $P<0.01$ ）。

牛呼吸器病は、各種ウイルス、細菌、マイコプラズマの感染によるものが多い [16]。なかでも、*H. somni* は牛呼吸器病を引き起こす重要な細菌の一つであり、単独でも呼吸器病を発症させるが、牛RSウイルスと混合感染すると呼吸器病の病害はさらに悪化するとされている [17]。また、脳炎や繁殖障害も引き起こすことなどから [6]、牛において *H. somni* は潜在的な脅威であるとされている [18]。それゆえ、子牛を健全に飼養するには、*H. somni* への対策は重要であると考えられ、その対策の一つとしてワクチネーションがあげられる。

ワクチネーションによる抗体産生において、単球やヘルパーT細胞及び抗体産生細胞となるB細胞などが重要な役割を担うとされているが [19]、黒毛和種子牛は、ホルスタイン種子牛と比較し、血液中の単球及びB細胞数は少ない [14]。そのため、黒毛和種子牛の抗体産生能は、ホルスタイン種子牛より低い可能性がある。

H. somni ワクチンの投与による抗体応答については、Groomら [9] は、10週齢のホルスタイン種子牛に対する *H. somni* 不活化ワクチンの投与により、投与後の *H. somni* に対する抗体価は投与前と比較して、有意に上昇したと報告している。また、Vanら [10] は、牧草地にて母牛と飼養されていた交雑種子牛に対して、1及び2カ月齢時に *H. somni* 不活化ワクチンを投与したところ、*H. somni* に対する抗体価は対照群と比較して、4及び6カ月齢時に有意に高値であったと報告している。一方、Vanら [11] は、導入されたフィードロット牛に対して、導入日及び導入2週後に *H. somni* 不活化ワクチンを投与しても、*H. somni* に対する抗体価は、対照群と比較して有意な差はみられなかったと報告している。

黒毛和種子牛への *H. somni* ワクチンの投与適期について、乙丸ら [20] は、抗体価の最も減少する時期である4週齢前後に行うことが望ましいと報告している。また、不活化ワクチンは、一般的に単回投与では免疫効果が低く、ブースター効果を得るために複数回の投与が望ましいとされている [19]。

表1 A農場の *Histophilus somni* の抗体価 (OD 値) の推移

	1 週齢	4 週齢	8 週齢	12 週齢	16 週齢	20 週齢	
ワクチン投与群 (n=16)	0.22±0.09 ^a (0/16) [‡]	0.20±0.08 ^a (0/16)	0.64±0.17 ^b (11/16)	0.87±0.15 ^c (15/16)	0.68±0.17 ^b (12/16)	0.82±0.18 ^c (14/16)	**
対照群 (n=16)	0.22±0.07 ^{d,e} (0/16)	0.15±0.04 ^d (0/16)	0.20±0.08 ^{d,e} (0/16)	0.29±0.13 ^e (0/16)	0.43±0.10 ^f (0/16)	0.48±0.19 ^f (0/16)	

平均±標準偏差

群内における週齢による比較, 異符号間にて有意差あり (a~f: P<0.05)

群間における比較, 投与群と対照群の間に有意差あり (**: P<0.01)

‡: 抗体陽性牛/供試牛, OD 値 0.6 以上を抗体陽性とした

表2 B農場の *Histophilus somni* の抗体価 (OD 値) の推移

	1 週齢	4 週齢	8 週齢	12 週齢	16 週齢	20 週齢	
ワクチン投与群 (n=14)	0.17±0.09 ^a (0/14) [‡]	0.15±0.06 ^a (0/14)	0.40±0.15 ^b (1/14)	0.65±0.17 ^c (7/14)	0.61±0.18 ^c (6/14)	0.62±0.15 ^c (7/14)	**
対照群 (n=14)	0.16±0.07 ^{d,e} (0/14)	0.16±0.05 ^d (0/14)	0.27±0.12 ^e (0/14)	0.26±0.12 ^{d,e} (0/14)	0.40±0.12 ^f (1/14)	0.39±0.09 ^f (0/14)	

平均±標準偏差

群内における週齢による比較, 異符号間にて有意差あり (a~f: P<0.05)

群間における比較, 投与群と対照群の間に有意差あり (**: P<0.01)

‡: 抗体陽性牛/供試牛, OD 値 0.6 以上を抗体陽性とした

本研究で用いた *H. somni* 不活化ワクチンは, 3~4 週間隔で 2 回の投与を必要とする製品であり, 本研究では, 投与群の子牛に対して 4 及び 8 週齢時に 2 回の投与を行った. その結果, 2 農場ともに投与群の 8 週齢以降の *H. somni* に対する抗体価は, 1 及び 4 週齢時の抗体価と比較して, 有意に上昇した. また, 2 農場の投与群の *H. somni* に対する抗体価は, 対照群と比較し, それぞれ有意な高値で推移した.

2 農場の投与群の *H. somni* に対する抗体価を比較すると, B 農場の投与群の抗体価は, A 農場の投与群と比較し低い傾向で推移した. 2 農場の飼養形態について, A 農場では子牛は 12 週齢まで個別飼養されていたのに対して, B 農場では 12 週齢まで 1 パドック 12 頭にて多頭飼養されていた. 多頭飼養では, 社会的順位の違いなどが生じることから, 少頭飼養と比較して, 子牛はストレスを受けやすいと報告されている [21, 22]. ワクチネーションによる抗体産生には, さまざまな要因が関係するが, B 農場の投与群の子牛の抗体価が, A 農場の子牛と比較して低かった要因の一つとして, 多頭飼養によるストレスの影響があった可能性も考えられた.

本研究では, 黒毛和種子牛に対する *H. somni* 不活化ワクチンの投与により, *H. somni* に対する抗体価を増加させることが可能であることが示唆された. 本研究における調査農場数及び調査頭数などは, 限定された条件ではあったが, 本研究の結果は, 今後, 黒毛和種子牛の *H. somni* に対するワクチネーションプログラムを構築するうえでの一助となると考えられた.

本研究において, 申告すべき利益相反はない.

本研究は(国研)農業・食品産業技術総合研究機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業(うち地域戦略プロジェクト)」の支援を受けて行った.

引用文献

- [1] 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)
- [2] Harris FW, Janzen ED: The *Haemophilus somnus* disease complex (Hemophilosis): A review, *Can Vet J*, 30, 816-822 (1989)
- [3] 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)
- [4] Gorden PJ, Plummer P: 乳用子牛および成牛における呼吸器病の制御と管理と予防, 牛の呼吸器病, 及川 伸 訳, 71-90, デーリイマン, 北海道 (2013)
- [5] 中家一郎, 池内俊久, 富田啓介, 鳥飼善郎: 子牛の肺炎病巣から分離された *Pasteurella multocida* A 型および *Haemophilus somnus* の薬剤感受性, *日獣会誌*, 53, 7-11 (2000)
- [6] Corbeil LB, Widders PR, Gogolewski R, Arthur J, Inzana TJ, Ward AC: *Haemophilus somnus*: bovine reproductive and respiratory disease, *Can Vet J*, 27, 90-93 (1986)
- [7] 後藤一: 北海道十勝地区の屠畜場搬入子牛における *Haemophilus somnus* 分離と抗体調査, *日獣会誌*, 38,

- 728-733 (1985)
- [8] 田村 豊：食用動物に由来する薬剤耐性菌の現状と対策, 日本環境感染学会誌, 32, 322-329 (2009)
- [9] Groom SC, Little PB : Effects of vaccination of calves against induced *Haemophilus somnus* pneumonia, Am J Vet Res, 49, 793-800 (1988)
- [10] Van Donkersgoed J, Guenther C, Evans BN, Potter AA, Harland RJ : Effects of various vaccination protocols on passive and active immunity to *Pasteurella haemolytica* and *Haemophilus somnus* in beef calves, Can Vet J, 36, 424-429 (1995)
- [11] Van Donkersgoed J, Schumann FJ, Harland RJ, Potter AA, Janzen ED : The effect of route and dosage of immunization on the serological response to a *Pasteurella haemolytica* and *Haemophilus somnus* vaccine in feedlot calves, Can Vet J, 34, 731-735 (1993)
- [12] Kampen AH, Olsen I, Tollersrud T, Storset AK, Lund A : Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life, Vet Immunol Immunop, 113, 53-63 (2006)
- [13] 保田昌宏, 林 英明, 鈴木一由, 小岩政照, 片本 宏, 猪熊 壽, 大塚浩通, 田島誉士, 堀井洋一郎, 岡田啓司 : 消化器疾患, 子牛の医学, 家畜感染症学会編, 第1版, 209-241, 緑書房, 東京 (2014)
- [14] Ohtsuka H, Ono M, Saruyama Y, Mukai M, Kohirumaki M, Kawamura S : Comparison of the peripheral blood leukocyte population between Japanese Black and Holstein calves, Anim Sci J, 82, 93-98 (2011)
- [15] 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)
- [16] Bryson DG : Calf pneumonia, Vet Clin N Am-Food A, 1, 237-257 (1985)
- [17] Gershwin LJ, Berghaus LJ, Arnold K, Anderson ML, Corbeil LB : Immune mechanisms of pathogenetic synergy in concurrent bovine pulmonary infection with *Haemophilus somnus* and bovine respiratory syncytial virus, Vet Immunol Immunop, 107, 119-130 (2005)
- [18] Headley SA, Alfieri AF, Oliveira VH, Beuttemüller EA, Alfieri AA : *Histophilus somni* is a potential threat to beef cattle feedlots in Brazil, Vet Rec, 175, 249 (2014)
- [19] 本川賢司 : ワクチン免疫の基礎と臨床, 日本家畜臨床感染症研究会誌, 4, 39-47 (2009)
- [20] 乙丸孝之介, 久保田修一, 兼重貴裕 : 黒毛和種子牛における *Histophilus somni* に対する抗体価の推移, 日獣会誌, 71, 298-301 (2018)
- [21] Abdelfattah EM, Karousa MM, Schutz MM, Lay DC Jr, Marchant-Forde JN, Eicher SD : Acute phase cytokines, TAC1, and toll-like receptor4 mRNA expression and health associated with group size in veal calves, Vet Immunol Immunop, 164, 118-126 (2015)
- [22] 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)

Evaluation of Antibody Response to Inactivated *Histophilus somni* Vaccine in Young Japanese Black Calves

Konosuke OTOMARU^{1)†}, Katsuhisa NAGAI¹⁾, Koji HYAKUTAKE¹⁾, Shuichi KUBOTA²⁾, Takahiro KANESHIGE²⁾ and Chikara KUBOTA¹⁾

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

2) Kyoto Biken Laboratories, Inc. Technical Service Section, 24-16 Makishima, Uji 611-0041, Japan

SUMMARY

To investigate the antibody response of the *Histophilus somni* vaccine in Japanese black calves, 60 calves fed at two farms (Farms A and B) were studied. On Farm A, 32 calves were treated, with 16 calves in the treatment group and 16 in the control group, and on Farm B, 28 calves were treated, with 14 calves in the treatment group and 14 in the control group. In the treatment group, *H. somni* inactivated vaccine was administered at 4 and 8 weeks of age. Blood was collected from all tested calves at 1, 4, 8, 12, 16 and 20 weeks of age, and the antibody titer against *H. somni* was measured. The antibody titer after 8 weeks of age in the treatment groups of both farms increased significantly as compared with the antibody titer at 1 and 4 weeks of age ($P < 0.05$). In addition, the antibody titers of the treatment groups of both farms were significantly higher than those of the control group ($P < 0.01$). These results suggest that the administration of *H. somni* inactivated vaccine to Japanese Black calves increases the antibody titer to *H. somni*. — Key words : *Histophilus somni*, Japanese Black calf, vaccine.

† Correspondence to : Konosuke OTOMARU (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., 72, 477 ~ 480 (2019)