ワクチンによる新生子牛のA群ロタウイルス病予防

関 慶久^{1)†}大池裕治²⁾清宮幸男¹⁾八重樫岳司¹⁾

1) 岩手県中央家畜保健衛生所 (〒020-0173 岩手郡滝沢村滝沢字砂込390-5)

2) 岩手県農業研究センター畜産研究所 (〒028-2711 岩手郡玉山村藪川字大の平40)

(2005年1月6日受付・2005年3月17日受理)

要 約

2002年12月から翌年4月に出生し、自然哺乳で飼育されていた1肉用牛繁殖農場の新生子牛60頭中47頭(78.3%)が下痢を呈し、検索した32頭中30頭(93.8%)の下痢便からA群ロタウイルス遺伝子が検出された。分娩時に1,100倍以上の同ウイルス血清中和抗体価を有した母牛由来の子牛の下痢発生率は65.6%(32頭中21頭)であり、同抗体価未満のそれらの92.9%(28頭中26頭)と比べて有意に低い値を示した($P<0.05$)。5歳未満の30頭中5頭(16.7%)および5歳以上の30頭中23頭(76.7%)がワクチン接種前に1,100倍以上の抗体価を有した。ワクチン接種後に母牛の血清抗体価は有意に上昇した。27頭の接種前後の抗体価より得た回帰式から、接種前の抗体価が1,100倍未満である5歳未満の25頭中19頭(76.0%)および同5歳以上の7頭中7頭(100%)が、2回のワクチン接種により1,100倍以上の抗体価を得ると推測された。——キーワード：下痢、牛A群ロタウイルス、新生子牛、血清中和抗体、ワクチン。

----- 日獣会誌 58, 602~606 (2005)

牛A群ロタウイルス(BRV)は子牛の下痢便から最も高率に検出される病原微生物のひとつである[11, 14, 20]。本ウイルス病は新生子牛に好発する[10, 21]ことから、予防には受動免疫が重要な役割を演じる[1, 10, 15, 17, 21]。2003年2月以来、本ウイルス不活化ワクチン^{a)}(ワクチン)がわが国で市販されているが、ワクチン株には同国の子牛から高率に検出される血清型株[5, 8, 18]が含まれており、諸外国[3, 9, 13]と同様に、本ウイルス病の予防を目的としたワクチンの利用が可能となった。しかしながら、わが国の野外における本ワクチンの活用法について詳細に検討した報告は少ない。

この報告では、母牛の血清抗体価を指標とした本ワクチンの活用法を検討する目的で、病原学および血清学的に検索した1牛群の成績を述べる。

材 料 お よ び 方 法

岩手県内の1農場で2002年12月8日から2003年4月23日の期間に60頭の母牛から60頭の子牛が出生し、47頭(78.3%)が4~29日齢時に下痢を呈した。下痢症は出生頭数が増加する時期に多発し、その日齢別ピークは11~16日齢時に存在した。いずれの母牛も当該農場産であり、分娩時の年齢は1.9~10.8歳であった。子牛の品種別に31頭が黒毛和種、20頭が日本短角種および9頭が両者の交雑種であった。各子牛は自然哺乳により飼

育され、7日齢までは個別の分娩房で母牛とともに管理され、その後はパドックで他の母牛や子牛とともに群飼されていた。当該農場では、十数年前から分娩が集中する冬季および春季に新生子牛が高率に下痢を呈していた。

ワクチン接種：分娩前の母牛27頭を任意に抽出して本ワクチンを接種した。27頭中11頭(2回接種群)には2003年2月6日および3月4日に、他の16頭(1回接種群)には前述のいずれかの日に接種した。これらの接種日は、2回接種群では1回目が分娩前35~70日および2回目が分娩前9~44日に、1回接種群では分娩前15~37日にそれぞれ相当した。ワクチンを接種しなかった他の母牛33頭中11頭を対照とした。

病原学的検査：4~29日齢の32頭の子牛より得た39検体の下痢便から、VP7遺伝子を標的としたRT-PCR法[5]によりBRVの検出を試みた。陽性例のVP7[5]およびVP4[4]の各遺伝子型を、Nested-PCR法により検索した。

下痢症が多発した2003年4月2日に発症した13~16日齢の3頭の下痢便は下記の検査にも供した。すなわち、材料をアカゲザル株化腎(MA104)、牛初代腎および精巢ならびに牛胎子筋肉(BFM)の各細胞に接種した。前3者の回転培養を3代実施し、細胞変性効果

a) 牛下痢5種混合不活化ワクチン, (株)微生物化学研究所, 京都。

† 連絡責任者：関 慶久 (岩手県中央家畜保健衛生所)

〒020-0173 岩手郡滝沢村滝沢字砂込390-5 ☎019-688-4111 FAX 019-688-4012

(CPE) の出現の有無を観察した。MA104細胞を用いた分離培養は既報 [12] に準じ、CPEを示した細胞にはFITC標識抗BRV免疫ウサギ血清^{b)}を用いた蛍光抗体法を行った。BFM細胞では牛ウイルス性下痢ウイルスNose株を用いた干涉法 [16] を実施した。また、牛コロナウイルス、B群ロタウイルスおよびC群ロタウイルスの各遺伝子をRT-PCR法 [2, 6, 19] により検索した。さらに、ハーナテトラチオン酸塩培地およびDHL寒天培地を用いてサルモネラの分離を試み、後者では大腸菌数も定量した。また、直接塗沫標本を作製して寄生虫卵を鏡検し、市販キット^{c)}により*Cryptosporidium parvum*抗原を検索した。

BRV中和試験：2回および1回接種群の母牛から各ワクチン接種日に、対照の母牛からは2回接種群のワクチン接種日にそれぞれ血清を採取した。分娩2日後にすべての母牛から血清を得て分娩時血清とした。11頭の母牛（2回接種群：6頭、対照群：5頭）から分娩直後、2日および7日後の乳汁を、それらの子牛から2日、7日、14日および30日齢時の血清を採取した。乳清の分離は乳汁を低速遠心（3,000rpm, 15分, 室温）後、脱脂乳1mlあたり40 μ lの2%レンネット^{d)}溶液を添加して混合した。次に、37℃で10分間の加温後に低速遠心し、上清を回収した。

非働化（56℃, 30分）した血清および乳清を材料とし、BRV Lincoln株（G6P[1]）を用いて50%プラーク減少法により中和抗体価を測定した。すなわち、4倍階段希釈した検体に等量のウイルス（200PFU/0.1ml）を混合し、37℃で1時間感作させた。12穴プレート^{e)}で単層培養されたMA104細胞をEarle液で2回洗浄した後に感作液0.1mlを接種し、37℃で1時間吸着させた。接種液を除去後、2回洗浄した細胞に1次寒天を重層した。37℃で3日間の培養後に2次寒天を重層し、その翌日にプラーク数を計測した。プラーク出現数を50%抑制した希釈倍数の逆数を中和抗体価とし、10倍以上を陽性とした。寒天の組成は0.8%のBacto Agar, 0.3%のTryptose Phosphate Broth, 50 μ g/mlのDEAE-Dextran^{f)}および0.15%の重炭酸ナトリウムを含むイーグルMEM^{g)}を基本とし、1次寒天にはTrypsin Type I^{d)}を0.5 μ g/ml, 2次寒天にはニュートラルレッドを0.005%添加した。

ワクチン接種、母牛血清抗体価、子牛の下痢発生率およびBRV検出率間の関係：母牛へのワクチン接種の有無に基づき子牛を2群に分類し、両者の下痢発生率および下痢便からのBRV検出率を比較した。また、1,000～3,000倍の間で設定した母牛の分娩時血清抗体価に基づき子牛を2群に分類した。各設定抗体価における両群の下痢発生率を比較し、有意差が認められる最も低い母牛の分娩時血清抗体価を有効抗体価とした。この有効抗体

価に基づき子牛を2群に分類して、両者の下痢便からのBRV検出率を比較した。

母牛血清、乳清および子牛血清の各抗体価間の関係：11組の母牛の分娩時血清と乳清ならびに前者と子牛血清の各抗体価間の関係の強さを解析した。

ワクチン接種、母牛の年齢および血清抗体価間の関係：2回および1回接種ならびに対照の各群における血清抗体価の幾何平均値を各群の採血日間で比較した。同一の採血日における各群の血清抗体価の幾何平均値も比較した。27頭のワクチン接種牛を用いて、接種前の抗体価をX、接種後の抗体価上昇倍率（接種後の抗体価を接種前のそれで除した値）をYとし、両者の対数変換値間の関係の強さを解析し、単回帰分析を行った。

また、ワクチン接種前の母牛60頭の年齢と血清抗体価との関係の強さを解析した。1～10歳の母牛60頭を2歳齢毎の5群に分類し、有効抗体価以上の抗体価を示す頭数の比率を比較した。複数回の採血が行われた母牛は、初回に得た血清を用いて比較した。

統計処理 [7]：比率の比較には χ^2 検定を用いた。ワクチン接種ならびに対照の各群内における血清抗体価の幾何平均値の比較には一標本t検定を、各群間におけるそれらの比較にはStudentのt検定を採用した。2変量データの関係の強さはピアソンの相関係数により解析し、単回帰分析には最小二乗法を用いた。いずれも危険率5%未満を統計的有意差と判定した。

成 績

病原学的検査：BRV遺伝子が32頭39検体中30頭（93.8%）31検体（79.5%）より検出された。0～9日齢時に9検体中5検体（55.6%）、10～19日齢時に23検体中21検体（91.3%）および20～29日齢時に7検体中5検体（71.4%）が陽性を示し、下痢発生頭数の日齢別ピークに該当する10～19日齢時に最も高い陽性率が得られた。陽性例のVP7遺伝子型はいずれもG6に分類された。BRV遺伝子が検出された30頭31検体中27頭28検体のVP4遺伝子型はP[5]を示したが、3頭のそれは不明であった。

流行最盛期に得た3頭全例の下痢便が前述のRT-PCR法で陽性を示し、G6P[5]の遺伝子型に分類された。1検体のMA104細胞にCPEがみられ、細胞質内にBRVの特異抗原が観察された。BRV以外の病原微生物の検索において下痢との関連を示唆する成績は得られなかった。

ワクチン接種、母牛血清抗体価、子牛の下痢発生率およびBRV検出率間の関係：ワクチン接種牛から出生し

b) 独動物衛生研究所七戸研究施設, 青森。

c) Bio X diagnostics, Belgium. d) Sigma, U.S.A.

e) 株グライナージャパン, 東京。

f) ICN Biomedicals, U.S.A. g) 日水製薬株, 東京。

ワクチンによる新生子牛のA群ロタウイルス病予防

図1 母牛の分娩時血清抗体価別の子牛下痢発生率

*～****：両群間に有意差あり (*： $P < 0.05$, **： $P < 0.01$, ***： $P < 0.005$, ****： $P < 0.001$)。

表1 ワクチン接種前後の血清BRV中和抗体価

ワクチン接種回数	頭数	年齢 (歳) ¹⁾	血清BRV中和抗体価 ($\log_{10}$) ²⁾		
			1回目接種日	2回目接種日	分娩日
2回	11	5.3±3.0	2.92±0.46 ^{a, b)}	3.12±0.39 ^{a, c)}	3.33±0.32 ^{b, c)}
1回	16	4.8±3.3	2.70±0.76 ^{d)}	—	2.98±0.56 ^{d)}
未接種	11	6.3±2.7	3.02±0.59	3.02±0.62	3.02±0.58

1) 平均±標準偏差, 2) 幾何平均±標準偏差.

a～d) 同一文字間に有意差あり ($P < 0.005$).

た子牛の27頭中21頭 (77.8%) および未接種牛のそれら33頭中26頭 (78.8%) が下痢を呈した. BRVは前者の18頭中18頭 (100%) および後者の14頭中12頭 (85.7%) より検出された. 両群の下痢発生率およびBRV検出率に有意差は認められなかった.

子牛の下痢発生率に有意差が認められた最も低い母牛の分娩時血清抗体価は1,100倍であった (図1). すなわち, 分娩時に1,100倍以上の血清抗体価を示す母牛から出生した子牛では32頭中21頭 (65.6%) が, 1,100倍未満のそれらでは28頭中26頭 (92.9%) が下痢を呈し, 前者が有意に低い値を示した ($P < 0.05$). BRVは前者の15頭中14頭 (93.3%) および後者の17頭中16頭 (94.1%) より検出され, 検出率に有意差は認められなかった. 設定抗体価以上の分娩時血清抗体価を有する母牛から出生した子牛の下痢発生率には, 設定抗体価の上昇に伴い低下する傾向が認められた (図1).

母牛血清, 乳清および子牛血清の各抗体価間の関係: 母牛の分娩時血清と分娩直後 ($r = 0.86$), 2日 ($r = 0.82$) および7日後 ($r = 0.61$) の乳清ならびに母牛の分娩時血清と2日 ($r = 0.64$), 7日 ($r = 0.61$), 14日 ($r = 0.65$) および30日齢時 ($r = 0.61$) の子牛血清の

各抗体価間には正の相関関係が認められた (分娩直後および2日後の乳清: $P < 0.005$, その他: $P < 0.05$).

ワクチン接種, 母牛の年齢および血清抗体価間の関係: 表1に示すように, 2回および1回接種の両群において接種後に抗体価の有意上昇が観察された ($P < 0.005$). 接種前の抗体価 (X) は10倍未満～3,571倍を, 接種後の抗体価上昇倍率 (Y) は接種前の1.06～14.80倍を示し, 両者間には負の相関関係 ($r = -0.75$, $P < 0.001$) が認められ, $\log Y = 1.04 - 0.28 \log X$ ($P < 0.001$) の回帰式が得られた (図2). 対照群に抗体価の上昇は観察されなかった. 抗体価を3群間で比較したが, 有意差は認められなかった.

母牛の年齢と血清抗体価間には正の相関関係が認められた ($r = 0.53$, $P < 0.001$). 母牛60頭の年齢別に, 1～2歳の18頭中3頭 (16.7%), 3～4歳の12頭中2頭 (16.7%), 5～6歳の11頭中9頭 (81.8%), 7～8歳の12頭中9頭 (75.0%) および9～10歳の7頭中5頭 (71.4%) が1,100倍以上の血清抗体価を有し, 前2者が後3者に比べて有意に低い値を示した ($P < 0.05 \sim 0.001$). すなわち, 5歳未満では30頭中5頭 (16.7%) が, 5歳以上では30頭中23頭 (76.7%) がワクチン接

図2 ワクチン接種前の抗体価 (X) と接種後の抗体価上昇倍率 (Y)

種前に1,100倍以上の血清抗体価を保有した。回帰式の利用により、ワクチン接種前の抗体価が1,100倍未満である5歳未満の25頭中8頭(32.0%)および5歳以上の7頭中4頭(57.1%)が1回のワクチン接種により、前者の25頭中19頭(76.0%)および後者の7頭中7頭(100%)が2回のワクチン接種により1,100倍以上の抗体価を得ると推測された。

考 察

1 肉用牛繁殖農場で出生した子牛60頭中47頭(78.3%)が下痢を呈した。下痢の発生は出生頭数が増加する時期に集中した。BRVが下痢便より高率に検出され、発症のピーク時に23検体中21検体(91.3%)の高い検出率が得られた。3頭の下痢便の検索ではあるが、本ウイルス以外の病原微生物の関与を示唆する成績は得られなかった。これらの成績より、当該農場に多発した子牛の下痢症には本ウイルス感染が主要な役割を演じていたと考えられた。

中和試験に用いたLincoln株のVP4遺伝子型はP[1]であり、当該農場の流行株であったP[5]とは相違したが、両株のVP7遺伝子型はともにG6であった。VP7タンパクはVP4タンパクに比べて高い免疫原性を示す[10]ことから、Lincoln株を用いて得られた中和抗体価は流行株に対するそれらを反映すると考えられた。11組の母子において、母牛の分娩時血清と乳清ならびに前者と子牛血清の各抗体価間に相関関係が認められ、当該農場において子牛がおおむね良好に初乳を摂取している状況が伺われた。

ワクチン接種後に血清抗体価の有意上昇が観察され、対照群の血清抗体価に変化は認められなかった。これら

の成績は前者の抗体価の上昇が野外感染により得られた反応ではなく、ワクチン接種に起因することを示唆する。分娩時に1,100倍以上の血清抗体価を有する母牛由来の子牛の下痢発生率(32頭中21頭: 65.6%)は、1,100倍未満のそれ(28頭中26頭: 92.9%)より有意に低下した。また、母牛の分娩時血清抗体価の上昇に伴い、子牛の下痢発生率は低下する傾向を示した。これらの成績は受動免疫を介して新生子牛のBRV病を予防する際には、少なくとも分娩時の各母牛に1,100倍以上の血清抗体価を保有させることが必要であることを示唆するように思われた。

Crouchら[3]はBRV不活化ワクチンの1回接種後に、接種前の保有血清抗体価が低い牛において最大で接種前の128倍の抗体上昇を得たが、保有抗体価が高い牛では有意上昇を認めなかったと報告している。検索例では2回および1回のワクチン接種後、ともに血清抗体価の有意上昇がみられたが、その上昇倍率は接種前の抗体価と負の相関関係を示した。検索例およびCrouchら[3]の抗体価測定法が相違することから、両者の抗体価上昇倍率を正確に比較することはできないが、両者のそれは同様の傾向を示すと思われた。

ワクチン接種前の母牛の年齢と血清抗体価間に正の相関関係が認められた。当該農場では十数年前から新生子牛の下痢症が多発していたことから、過去の下痢症にもBRV感染が主要な要因として関与し、本ウイルスへの継続的な曝露により母牛の血清抗体価が加齢に伴い上昇した可能性が高いと推察された。BRV汚染農場にもかかわらず、母牛の血清抗体価はさまざまであり、1,100倍以上の血清抗体価を保有していた母牛の割合は5歳未満では30頭中5頭(16.7%)、5歳以上では30頭中23

頭 (76.7%) であった。この成績は同血清抗体価を獲得するためには5年以上のBRV流行を経験する必要があることを示唆するかも知れない。得られた回帰式から、抗体価が1,100倍未満である5歳未満の母牛25頭中8頭 (32.0%) および19頭 (76.0%) ならびに同5歳以上の7頭中4頭 (57.1%) および7頭 (100%) が1回および2回のワクチン接種により1,100倍以上の抗体価を得ると推察された。これらの結果は、BRV汚染農場において受動免疫効果を期待するためには、少なくとも5歳未満の母牛への2回のワクチン接種が必要であり、より高い効果を得るためには年齢にかかわらず2回接種が必要であることを示すように思われた。

引用文献

- [1] Besser TE, Gay CC, McGuire TC, Evermann JF : J Virol, 62, 2238-2242 (1988)
- [2] Chinsangaram J, Akita GY, Osburn BI : J Vet Diagn Invest, 6, 302-307 (1994)
- [3] Crouch CF, Oliver S, Francis MJ : Vet Rec, 149, 105-108 (2001)
- [4] Falcone E, Tarantino M, Di Trani L, Cordioli P, Lavazza A, Tollis M : J Clin Microbiol, 37, 3879-3882 (1999)
- [5] Fukai K, Sakai T, Kamata H : Aust Vet J, 76, 418-422 (1998)
- [6] Fukutomi T, Tsunemitsu H, Akashi H : Arch Virol, 144, 997-1006 (1999)
- [7] 市原清志 : バイオサイエンスの統計学, 南江堂, 東京 (1994)
- [8] Ishizaki H, Sakai T, Shirahata T, Taniguchi K, Urasawa T, Urasawa S, Goto H : Vet Microbiol, 48, 367-372 (1996)
- [9] Kohara J, Hirai T, Mori K, Ishizaki H, Tsunemitsu H : J Vet Med Sci, 59, 1023-1025 (1997)
- [10] Kohara J, Tsunemitsu H : J Vet Med Sci, 62, 219-221 (2000)
- [11] Lucchelli A, Lance SE, Bartlett PB, Miller GY, Saif LJ : Am J Vet Res, 53, 169-174 (1992)
- [12] Murakami Y, Nishioka N, Hashiguchi Y, Kuniyasu C : Vet Microbiol, 8, 135-139 (1983)
- [13] Recca A, Calvo E, Crouch CF, Navetat H, Rizet C, Guisjarro R, Perez-Garcia J, Francis MJ : Vet Rec, 152, 751-752 (2003)
- [14] Reynolds DJ, Morgan JH, Chanter N, Jones PW, Bridger JC, Debney TG, Bunch KJ : Vet Rec, 119, 34-39 (1986)
- [15] Saif LJ, Redman DR, Smith KL, Theil KW : Infect Immun, 41, 1118-1131 (1983)
- [16] Shimizu M, Satou K : Jpn J Vet Sci, 49, 1045-1051 (1987)
- [17] Snodgrass DR, Fahey KJ, Wells PW, Campbell I, Whitelaw A : Infect Immun, 28, 344-349 (1980)
- [18] Suzuki Y, Sanekata T, Sato M, Tajima K, Matsuda Y, Nakagomi O : J Clin Microbiol, 31, 3046-3049 (1993)
- [19] Tsunemitsu H, Jiang B, Saif LJ : Arch Virol, 141, 705-713 (1996)
- [20] 恒光 裕, 工藤卓二, 八田忠雄, 森 清一, 尾上貞雄, 平井網雄, 清水実嗣 : 日獣会誌, 39, 631-635 (1986)
- [21] Tsunemitsu H, Shimizu M, Hirai T, Yonemichi H, Kudo T, Mori K, Onoe S : Jpn J Vet Sci, 51, 300-308 (1989)

Vaccine Prophylaxis of Group A Bovine rotavirus Diarrhea in Neonatal Calves

Yoshihisa SEKI^{*†}, Yuji OIKE, Yukio M. SEIMIYA and Gakuji YAEGASHI

** Iwate Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center, 390-5 Sunagome, Takizawa-mura, 020-0173, Japan*

SUMMARY

On a farm breeding beef cattle, 47 (78.3%) of 60 neonatal calves born between December 2002 and April 2003 and nursed by their dams developed diarrhea within 29 days after birth. RT-PCR detected the group A bovine rotavirus (BRV) VP7 gene in 30 (93.8%) of 32 diarrheic calves. For calves from cows possessing serum neutralizing (SNA) titers against BRV of 1,100 or more at parturition, the morbidity rate from diarrhea was 65.6% (21 of 32 head). The rate was 92.9% (26 of 28 head) for calves with less than 1,100. The former morbidity is significantly ($P < 0.05$) lower than the latter. SNA titers of 1,100 or more were found in 5 (16.7%) of 30 pre-vaccinated cows younger than 5 years and in 23 (76.7%) of 30 cows older than that. The titers in cows increased significantly after vaccination. The formula obtained from the titers of 27 vaccinated cows suggests that a second vaccination would bring titer rates from less than 1,100 to 1,100 or more in 19 (76.0%) of the 25 cows less than 5 years old and in 7 (100%) of the 7 cows older than that.

— Key words : diarrhea, group A bovine rotavirus, neonatal calf, serum neutralizing antibody, vaccine.

† Correspondence to : Yoshihisa SEKI (Iwate Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center)

390-5 Sunagome, Takizawa-mura, 020-0173, Japan TEL 019-688-4111 FAX 019-688-4012

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 58, 602 ~ 606 (2005)