

博士論文

大腸菌不活化ワクチンの接種が
ウシ乳腺の免疫機能に及ぼす影響に関する研究

平成 25 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

森本和秀

博士論文

大腸菌不活化ワクチンの接種が
ウシ乳腺の免疫機能に及ぼす影響に関する研究

平成 25 年 3 月

広島大学大学院生物圏科学研究科

生物資源科学専攻

森本和秀

目次

第1章 緒論	1
第2章 大腸菌不活化ワクチンの接種がウシの乳房炎の発生率，死廃率および 乳汁，血液成分に及ぼす影響	
緒言	16
実験1 大腸菌不活化ワクチンの接種が乳房炎発生率および死廃率に及ぼす影響	
材料と方法	18
結果	25
実験2 大腸菌不活化ワクチンの接種が大腸菌性乳房炎発生牛の血液成分および 乳汁中生菌数に及ぼす影響の解析	
材料と方法	30
結果	38
考察	47
要約	60
第3章 大腸菌不活化ワクチンの接種が LPS を注入したウシ乳腺の自然免疫機能に 及ぼす影響	
緒言	62
材料と方法	65
結果	72
考察	88
要約	93

第4章 総合考察 95

第5章 総括 105

引用文献 108

謝辞 121

本論文で用いた主な略語一覧表

ACM	acute coliform mastitis, 急性大腸菌性乳房炎
BSA	bovine serum albumin
BT	body temperature
BUN	blood urea nitrogen
CD14	cluster of differentiation 14
CFU	colony forming unit
CK	creatine kinase
CRP	C-reactive protein
CS31A	<i>Escherichia coli</i> の線毛抗原, 付着因子
DHL	desoxycholate-hydrogen sulfide-lactose agar
DIC	disseminated intravascular coagulation, 播種性血管内血液凝固
ETEC	enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>
FCM	fat-corrected milk 4%脂肪補正乳量
FY	F17, Att 25, <i>Escherichia coli</i> の線毛抗原, 付着因子
Hp	haptoglobin
HRP	horseradish peroxidase
IgG	immunoglobulin G
IL-1	interleukin-1
J5	<i>Escherichia coli</i> O111: B4 strain J5
K99	F5, <i>Escherichia coli</i> の線毛抗原, 付着因子
LAP	lingual antimicrobial peptide
LBP	lipopolysaccharide binding protein
LF	lactoferrin
LPO	lactoperoxidase
LPS	lipopolysaccharide
MHC	major histocompatibility complex, 主要組織適合遺伝子複合体
NEFA	non esterified fatty acid
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBS-Tween	2% Tween20 加 phosphate buffered saline
PLT	platelet
PMNs	polymorphonuclear leukocytes
Q-milk	LPS 投与 24 h 後の分房乳量, 投与前に対するパーセンテージ
SCC	somatic cell count
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SRID	single radial immunodiffusion
T-Bil	total bilirubin
TLR	toll-like receptor
TMR	total mixed ration
TNF- α	tumor necrosis factor- α
WBC	white blood cell

第1章 緒論

ウシの乳房炎は、乳房内に細菌、マイコプラズマ、真菌などの微生物が侵入、増殖して起きる乳腺の炎症と定義される（浜名ら，2012）。乳房炎は乳質の悪化をもたらし、症状が著しい場合には生乳を廃棄する必要が生じたり乳量の低下を引き起こしたりすることから、酪農経営において重大な生産性阻害要因となっている。その損失額は、減乳や乳質低下のための販売利益損失の他に診療費や淘汰、治療中の飼料費、薬代、生乳の廃棄などを含めると、日本全体で年 800 億円に上るといわれる（林，2012）。乳房炎は、症状の進行による分類（甚急性，急性，慢性）の他，原因菌による分類（大腸菌，黄色ブドウ球菌，レンサ球菌，マイコプラズマ，酵母様真菌，プロトセカ等），感染様式による分類（環境性，伝染性），病態による分類（臨床型，潜在性），発生時期による分類（泌乳期，乾乳期）などがあり，それぞれ病態や発生様式に違いがみられる。乳房炎の原因となる微生物は，伝染性と環境性に群別することができる。伝染性には *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, コアグラージェ陰性ブドウ球菌 (CNS), *Streptococcus dysgalactiae* 等が含まれ，環境性には *Streptococcus uberis*, 大腸菌群 (*Escherichia coli*, *Klebsiella*) 等が含まれる。近年は伝染性乳房炎の発生件数が減少している一方で，環境性乳房炎は減少していない（浜名ら，2012）。

Hogan and Smith (2003) は，臨床型乳房炎で全身症状を示すものの多くが大腸菌群の細菌によって引き起こされると述べている。また，平成 21 年度家畜共済統計によると，乳牛の雌の死産事故頭数 162,731 頭，病傷事故頭数 1,416,584 頭のうち，乳房炎によるものがそれぞれ 13,993 頭で 8.6%，410,217 頭で 29.0%を占める。乳房炎による死産事故のうち，大腸菌によるものが 4,486 頭（32%）で最も多く，病傷事故では 42,536 頭（10%）で，レンサ球菌（74,656 頭，18.2%）に次いで 2 番目に多い（図 1-1）。このように，大腸菌性乳房炎の重要性が高いため，本研究では，この大腸菌性乳房炎に焦点を当てた。

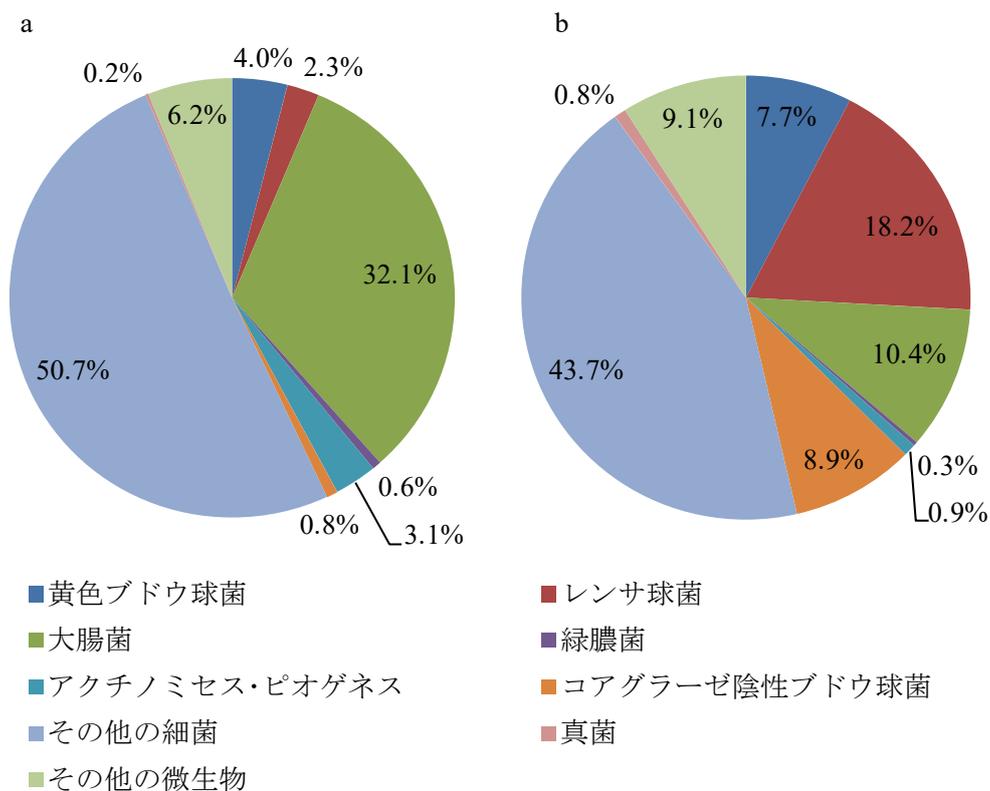


図 1-1 原因菌別事故頭数割合（平成 21 年度家畜共済統計）

a: 乳房炎死産事故 b: 乳房炎病傷事故

急性大腸菌性乳房炎

急性大腸菌性乳房炎（acute coliform mastitis, 以下 ACM）は、グラム陰性桿菌（主に腸内細菌）が原因で起きる乳房炎であり、一般に、大腸菌（*Escherichia coli*, 以下 *E. coli*）の他、*Klebsiella* sp., *Enterobacter* sp. が原因菌となり、その他 *Serratia*, *Pseudomonas*, *Proteus* 属の菌が原因になることもある（Hogan and Smith, 2003）。ACM は、日本では「急性大腸菌性乳房炎」という呼称が一般的であるが、coliform の名が示すように本疾病の原因菌は *E. coli* のみではなく、その他のグラム陰性桿菌による乳房炎も含まれる。原因菌種により生息場所が異なり、*E. coli* は糞便、*Klebsiella* はオガクズ、*Proteus* は汚水に生息する（安里ら, 2005）ため、乳房炎の発生はウシをとりまく環境の影響を受ける。また、これらの細菌は気温が高いと活発に増殖するため（Hogan et al., 1989）、気温が上昇する夏から秋に

かけて乳房炎の発生率が高くなる。

ACM の症状は、軽症の場合局所の炎症のみが現れ、全身症状をほとんど伴わないが、重症例では重篤な全身症状を伴い生産性に大きな影響を及ぼすなど、病態のばらつきが大きい。Hogan and Smith (2003) は、大腸菌群に感染したウシの約 85%が臨床型乳房炎をひきおこし、そのうちの約 10%が全身症状を示すが、その一方で、全身症状を示すような乳房炎の大部分が大腸菌群によって引き起こされると報告している。ACM の重症例では、発熱、第一胃運動の停止、食欲廃絶、眼結膜充血、下痢、泌乳停止、起立不能、沈うつ、脱水などを呈し、死亡あるいは廃用に至ることが少なくない。野村 (1986) は、ACM の中でも特に症状の重い甚急性乳房炎の死廃率（乳房炎発症頭数に対する死亡・廃用頭数の割合）が 30%であったと報告している。このような ACM の症状のばらつきは、乳房内に侵入した菌の増殖速度と、それに対するウシ側の免疫応答開始時期およびその強さのどちらが勝るかによって決まり（浜名ら, 2012）、Hill (1981) は、好中球の出現前に *E. coli* の数が $10^6/\text{ml}$ に達すると食作用に不適當になると報告した。病原菌側の要因は小さいことから、ACM の症状の重さは主にウシ側の要因によって決定される（Burvenich *et al.*, 2003）。

ACM の原因となるグラム陰性桿菌は、増殖・死滅する際にエンドトキシン（endotoxin, 内毒素）を放出する。放出されたエンドトキシンは、lipopolysaccharide binding protein (LBP) および Cluster of differentiation 14 (CD14) に結合して、乳腺上皮細胞やマクロファージの細胞膜表面に存在する受容体タンパク質 toll-like receptor 4 (TLR 4) によって認識され、標的細胞を活性化する。活性化された細胞は、組織因子（tissue factor, 血液凝固第Ⅲ因子）、leukotriene, 血小板活性化因子, tumor necrosis factor- α (TNF- α) や interleukin-1 (IL-1) などの炎症性サイトカインを遊離し、これらが全身の炎症反応をひきおこす(矢田, 2005)。このような重症の ACM の病態は、全身性炎症反応症候群（systemic inflammatory response syndrome; SIRS）と呼ばれる（篠塚, 2010）。

Wenz *et al.* (2001b) は 6 農場の 144 頭を調査し、発生した ACM を、初診時の直腸温、脱水の程度、第一胃の収縮の程度、および活力をもとに、軽症、中程度、重症のグループ

に分類し、グループ間で血液の培養結果を比較した。その結果、ACM を発症したウシの 32%で菌血症が起き、ACM を起こしていないウシの 7.1%に比べて有意に高かった。また、軽症と判断されたウシの 4.3%、中程度の 9.1%、重症例の血液の 42%から腸内細菌等が分離され、重症のウシからの菌分離率が高かった。このように ACM が菌血症を伴っていることも、症状が乳腺局所にとどまらず、重篤な全身症状をもたらす原因になっていると考えられる。

わが国における乳房炎の予防・治療法の現状

乳房炎の発生要因には、微生物の種類・量、搾乳作業、飼養環境、栄養管理、ストレス、ウシの抵抗力、人間（搾乳従事者）の手技などが関与していることから、総合的な予防対策が必要である（林，2012）。搾乳作業については、搾乳前の乳頭刺激を兼ねた前搾り、プレディッピングによる搾乳前の乳頭消毒、丁寧な拭き取りによる乳頭の乾燥、泌乳生理に基づくミルク（搾乳器械）装着タイミングの適正化、過搾乳を避けること、ポストディッピングによる搾乳後の乳頭消毒などが推奨されている（安里ら，2005；浜名ら，2012）。

板垣（2005）は、搾乳中のミルクのティートカップ内に中心静脈カテーテルを装着し、搾乳中および搾乳終了時に 1%デンプン液を注入し、その直後にミルクを取り外して手搾りで乳頭乳槽内の乳汁を搾乳した。採取した乳汁を着色して鏡検した結果、搾乳中および搾乳終了時のサンプルからデンプン顆粒が検出された。このことから、ミルクを取り外す際に乳頭内への乳汁の逆流現象が起きたと報告した。この逆流現象が菌の侵入の原因になることから、乳房内への菌の侵入は日常的に起きており、搾乳前の乳頭消毒により侵入する菌数を減少させられると考えられる。

ACM は環境性乳房炎に分類され、牛舎環境中に常在する腸内細菌が感染することにより発生する。また、飼養環境中の菌数が増えると発生しやすくなり（Bramley and Neave, 1975）、牛床中の大腸菌群数が 10^6 /g（敷料原物重量）以上になると乳房炎の問題が起こる。したがって、ACM は腸内細菌の増殖しやすい夏季に発生頻度が高まる特徴を持つ（Smith *et*

al., 1985; Todhunter *et al.*, 1991; 安里ら, 2005; Olde Riekerink *et al.*, 2007)。腸内細菌の増殖には適度な水分が必要である。したがって、ACMを防ぐためには牛舎内の清掃・乾燥および消毒により環境中の菌数を減らすこと、乳頭消毒により搾乳作業中および搾乳後の乳房内感染を防ぐことが重要である。

繋ぎ飼養では、牛床にオガクズ、砂、発酵済み堆肥などの敷料が用いられるが、入手のしやすさなどからオガクズが用いられることが多い。オガクズ中には腸内細菌の *Klebsiella* 属菌が生息しており、ACMの原因になる (Newman and Kowalski, 1973; 浜名ら, 2012)。また、オガクズに糞尿が混ざると腸内細菌の増殖が急速に進むことが知られ、これらの対策としてオガクズに石灰を混ぜる消毒方法がとられているが、この方法は1日程度で消毒効果が無くなり、再び菌が増殖するとも言われている (石田と城田, 2005)。このように、ACM予防のために敷料にも気を配る必要がある。

また、栄養管理の不備やストレスが原因でウシの免疫機能が低下することが知られており、乳房炎予防においてこれらのコントロールは重要である。実際、重篤な症状を伴う ACM は、ストレスのかかる分娩直後と、エネルギー不足に陥りやすい泌乳初期に好発する (Burvenich *et al.*, 2003)。

乳房炎の治療法としては抗菌剤の乳房内注入が一般的であるが、ACMにおいては、抗菌剤の投与により菌体から新たにエンドトキシンが放出され、症状を悪化させる危険性が指摘されている (Shinozuka *et al.*, 2009, 浜名ら, 2012)。また、抗菌剤の多用は、生乳中に薬剤が残留する恐れがあることや、薬剤耐性菌の出現リスクがあることなどから慎重な使用が求められている。そのため近年では、過剰な炎症を避ける目的で抗炎症作用のあるグリチルリチン製剤を用いた乳房内注入剤 (製品名マストリチン, 共立製薬, 東京) も開発され、抗生物質と併用することにより原因菌の殺滅と同時に炎症のコントロールも行われるようになっている。また、抗菌剤ではなく、鉄キレート剤の注入によって乳房内から鉄を取り除き、腸内細菌の増殖を抑制して治癒を促す試みもされている (篠塚, 2010)。

一方、抗菌剤の使用法としては、乳房炎発症時の投与の他に、乾乳開始時に乳房内

に抗菌製剤を注入する方法が推奨されているが、ACM における乾乳期治療の効果は無かったという報告もある (Smith *et al.*, 1985)。

以上のように、現在の搾乳システムでは離脱時に乳汁の逆流が起きることから乳房内への菌の侵入を完全には防ぐことができず、菌侵入後の乳房炎発症には多くのウシ側の要因も関与するので、乳房炎の予防には多くの課題がある。

海外における乳房炎予防ワクチンの研究状況

感染症予防の手段としてワクチンの接種が行われる。病原性を弱めた病原体を用いたものを生ワクチン、病原体を死滅させたものを不活化ワクチンと呼ぶ。ワクチン接種の主な目的は、動物に接種することにより、その病原体（抗原）に対する特異的抗体を作らせたり、あるいは抗原の記憶をとどめておき、同種の病原体が再び体内に侵入した際に速やかに排除することによって、感染・発症を予防することにある。

海外では、ACM の対策として、*E. coli* O111: B4 J5 株 (J5; Overbeek *et al.*, 1987) あるいは *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Typhimurium (*Salmonella* Typhimurium) Re-17 変異株 (McClure *et al.*, 1994) から製造された乳房炎ワクチン（不活化）が使用されている。主な製品として、ENVIRACOR J-5 (Pfizer, 米国), J5 Shield (NOVARTIS, 米国), STARTVAC (HIPRA, スペイン), J-VAC (Merial, 米国), ENDOVAC-Dairy (IMMVAC, 米国) がある。これらの多くは J5 を用いているが、ENDOVAC-Dairy のみ *Salmonella* Typhimurium Re-17 変異株を用いている。

González *et al.* (1989) は、2 農場 246 頭のウシにアジュバントを添加した J5 ワクチンを乾乳期に 2 回、分娩後に 1 回皮下接種し、非接種の 240 頭と比較した。その結果、分娩後 3 カ月間、グラム陰性菌による臨床型乳房炎の発生率は、非接種牛 12.8% に比べて接種牛 2.6% と有意に低かったと報告した。

Hogan *et al.* (1992a) は乳牛 225 頭を供試し、2.5 年間にわたり J5 ワクチンの野外試験を行った。接種牛には、乾乳開始時、乾乳 30 日後、分娩後の 3 回ワクチンを皮下接種した。

その結果、分娩時の乳房内感染率には差が無かったが、接種牛では、分娩後 90 日間のグラム陰性菌による臨床型乳房炎の発生率が対照牛より有意に低かったと報告した。

Hill (1991) は、2 種類の大腸菌変異株の加熱死菌をウシに皮下接種して免疫した後、別の型の大腸菌を 150 colony forming unit (CFU) 乳房内に接種した。その結果、ワクチン接種、非接種いずれのウシにおいても急性で重症の臨床型乳房炎を発症したことから、これらの死菌ワクチンでは ACM の発症を予防することはできなかつたと報告した。

Hogan *et al.* (1992b) は、J5 ワクチンを乳牛の乾乳開始時、乾乳 30 日後、および分娩後 48 時間以内の 3 回皮下接種し、分娩 30 日後に J5 とは別の型の大腸菌を 30 CFU 乳房内に注入したところ、ワクチン接種牛、非接種牛いずれにおいても乳房炎を発症したが、ワクチン接種牛では非接種牛に比べて乳汁中の生菌数と直腸温度が有意に低かった。このことから、J5 ワクチンの接種により乳房炎の発生率を低下させることはできなかつたが、臨床症状が軽減したと報告した。

Hogan *et al.* (1995) は、J5 ワクチンを乳牛の乾乳開始時、乾乳 30 日後、分娩後 48 時間以内の 3 回皮下接種し、対照牛にはアジュバントのみを投与した。分娩 30 日後に J5 とは別の型の大腸菌を平均 61.2 CFU 乳房内に注入したところ、接種牛の 7 日後の乳汁中体細胞数および 2, 3, 4 日後の乳汁中の菌数が対照牛に比べて有意に少なく、接種牛の 1, 7 日後の乳汁中 bovine serum albumin (BSA, 乳汁中への血漿漏出の指標) 濃度が対照牛より低く、接種牛の直腸温度の低下が対照牛より早かった。このことから、軽症の大腸菌性乳房炎においては、J5 ワクチンの接種は全身症状に影響を及ぼさないが、乳房内感染の持続時間を短くし、局所症状を軽減すると報告した。

Wilson *et al.* (2007a) は、乳牛 251 頭に対し、J5 ワクチンを乾乳開始時および分娩予定日の 21 から 28 日前に乳腺上リンパ節付近に接種し、306 頭を無処置対照牛として、分娩後 200 日以内の臨床型乳房炎の発症を調査した。その結果、臨床型乳房炎による死亡または廃用は、対照牛で 13 頭 (4.3%)、接種牛で 4 頭 (1.6%) で、対照牛の死亡・廃用のハザード (瞬間死亡率 (金, 2007), ここでは死亡・廃用の確率を意味する) が対照牛に比べて

大きく、泌乳期の、より早期に発生していた ($P=0.07$)。その内、*Klebsiella* 属菌による乳房炎では接種牛の廃用が対照牛より有意に少なかった。このことから、J5 ワクチンの接種は乳房炎発生率を低下させなかったが、臨床型乳房炎による死廃率を低下させたと報告した。

Wilson *et al.* (2007b) は、前回の産次に乳房炎の記録がなく、体細胞数の少ないウシを選んでワクチンの接種試験を実施した。4頭に分娩予定日の8週間前と4週間前にJ5 ワクチンを皮下接種し、4頭を対照とした。分娩8~16日後に、1,000 CFUの*E. coli*を乳房内に注入したところ、乳汁中体細胞数は、21時間から132時間後の間、対照牛の方が接種牛より有意に多く、1日後の乳量は対照牛が接種前に比べて8 kg減少したのに対して、接種牛では逆に0.5 kg増加した。乳汁中の菌数は、6時間から21時間後の間、対照牛の方が有意に多かった。また、ワクチン接種牛におけるJ5 特異的IgG1 およびIgG2 抗体価の上昇も確認された。このことから、J5 ワクチンの接種は泌乳初期のJ5 特異的IgG1 およびIgG2 抗体の産生、体細胞数の減少、乳汁からの*E. coli*のより早い除去、乳房内感染後の乳量損失の減少に関連すると報告した。

以上のように、J5 ワクチンを接種することにより、乳房炎の症状が軽減されたり死廃率が低下すると報告されているが、乳房炎の発生自体を予防する効果については一定の結果は得られていない。

J5 ワクチンの接種回数について、Erskine *et al.* (2007) は、2産以上のホルスタイン種乳牛1,012頭を供試し、J5 ワクチンを乾乳開始時、分娩約3週間前、分娩の5から11日後の3回皮下接種した群と、3回目の接種のさらに28, 56, 84日後に接種して計6回接種した群とを比較した。6回接種した牛群は、4, 5, 6回目の接種から28日後の血清中の抗J5 IgG2濃度が3回接種した群に比べて有意に高かった。また、臨床型乳房炎が発生したウシの割合には差がなかったが、3回接種群の方が6回接種群に比べて重症になりやすく、分娩の305日後まで牛群に残る割合が有意に低かったと報告した。このように、分娩前後に3回よりも6回接種した方が乳房炎の症状軽減効果が高いことが報告された。

Erskine *et al.* (2010) はウシ 28 頭を 4 群に分け、処理内容は J5 ワクチンを①頸部左側に 3 回皮下接種、②頸部左側に 5 回接種、③頸部左側、右側、胸部右側、左側、頸部左側に順次計 5 回接種、および④非接種とした。その結果、5 回接種した 2 群のウシの抗 J5 IgG1 および IgG2 濃度は 3 回接種した群のそれらより有意に高く、5 回接種したウシの中でも 1 ヶ所に接種したウシよりも、異なる 5 ヶ所に接種したウシの方がそれらの値は有意に高かった。このことから、3 回より 5 回の反復接種、および異なる場所への接種が効果的であることを報告した。

ワクチンの投与場所について、Hogan *et al.* (1997) は、ウシ 18 頭を 3 群に均等に分け、①分娩前に J5 ワクチンを 2 回皮下接種、1 回乳房内接種、②分娩前に 3 回皮下接種、③非接種として比較した。その結果、乳房内に接種したウシの分娩 21 日後の血清中抗 J5 IgG および IgM は、皮下接種したウシに比べて有意に高かったと報告した。

Smith *et al.* (1999) は、ウシ 24 頭を 3 群に均等に分け、①分娩前に J5 ワクチンを 2 回皮下接種、1 回乳房内接種、②分娩前後に 3 回皮下接種、③非接種とした。分娩 30 日後に *E. coli* 727 を乳房内接種したところ、乳房内にワクチン接種したウシの乳清中の抗 J5 および抗 *E. coli* 727 IgG 抗体価が、皮下接種のみのウシに比べて、*E. coli* 727 接種時および接種 7 日後に有意に高かった。乳房内にワクチン接種したウシの血清中抗 *E. coli* 727 IgG 抗体価は、接種 7 日後に、皮下接種のみのウシに比べて有意に高かった。また、分娩時の血清中抗 *E. coli* 727 IgM も、皮下接種のみの牛に比べて有意に高かった。しかし、これらのワクチン接種方法の違いが、*E. coli* 727 接種後の臨床型乳房炎における全身および局所症状に及ぼす影響は小さかったと報告した。

このように、ワクチンの接種回数を増やしたり乳房内に投与したりすることで、抗体価上昇など一定の効果が認められている。

以上のように、海外では乳房炎用のワクチンが開発され、それを用いた研究が盛んに実施されている。

日本における乳房炎ワクチンの研究状況

日本には乳房炎予防用として認可されたワクチンはないが、下痢症の予防用として認可を受けたワクチンはある。これは、新生子牛の大腸菌性下痢症の予防用に開発された、毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*, 以下 ETEC) ワクチン (Imocolibov, 製造: Merial, フランス; 輸入・販売: 科学飼料研究所, 東京) である。ETEC ワクチンは、*E. coli* の線毛抗原 (付着因子) の K99 (F5), FY (F17), CS31A を保有する菌株および O78 の不活化菌体が含まれており、本ワクチンで免疫された動物の血液中には、線毛および菌体抗原に対する抗体が産生される。このワクチンが妊娠牛に接種されると、これらの抗体は初乳を介して新生子牛に移行し、ETEC の小腸粘膜への付着を阻止し、下痢の発症を予防する (中澤, 1992)。その他のワクチンとして牛下痢 5 種混合不活化ワクチン (微生物化学研究所, 京都) にも大腸菌株が含まれており、同様に初乳を介した子牛の下痢症予防に用いられる。日本で認可を受けた乳房炎ワクチンはないので、この ETEC ワクチンを乳房炎予防用に用いる方法が考えられた。

平田ら (1991) はホルスタイン種乳用牛 97 頭を用い、妊娠後期に 2~3 週間間隔で 2 回 ETEC ワクチンを筋肉内注射し、対照牛 110 頭と比較した。その結果、分娩後 2 ヶ月間の体細胞数には投与牛と対照牛で有意な差は認められず、臨床型乳房炎の発生率にも差が認められなかったと報告した。

溝渕ら (1997) は、香川県内の一地区の農家を ETEC ワクチン接種農家 10 戸 (平均飼養頭数 61.8 頭) と未接種農家 16 戸 (平均飼養頭数 35.9 頭) に分け、接種農家では分娩予定日の 5 および 3 週間前に ETEC ワクチンを筋肉内注射した。接種農家について、接種前 3 年間と接種後 3 年間を比較したところ、乳房炎発生率は接種前と接種後で有意差は見られなかったが、乳房炎死廃率は 9.0% から 3.4% へ有意に低下した。また、接種開始後 3 年間における接種農家の乳房炎発生率は非接種農家のそれに比べて有意に低かった。ETEC ワクチンがウシの乳房炎に及ぼす影響に関する報告は、これらの他には見当たらない。

大腸菌ワクチンによる抗体産生

グラム陰性菌の LPS は、外側から順に O 抗原多糖、R コア多糖、リピド A が結合した層構造をしている (図 1-2 ; 平田, 2002)。LPS の抗原性は多糖部分に依存する。O 抗原多糖は菌株ごとに異なる部分であるが、R コア多糖はグラム陰性菌では菌種間で類似しており、血清学的に交差することが報告されている (Tyler *et al.*, 1991; Tomita *et al.*, 1995)。リピド A は LPS の活性中心であり、LPS の示す生物活性はリピド A によって引き起こされる。しかし、リピド A に対する抗体は産生されにくく、毒性を中和するような抗体は通常得られないとされる (横地, 2002)。J5 は、O 抗原多糖を欠くことにより R コア多糖が露出するという特徴を持つ (Ziegler *et al.*, 1982; Cross *et al.*, 2001; Wilson and González, 2003)。したがって、この J5 ワクチンの接種により血液中に産生された抗体は、菌種間で類似性の高い R コア多糖を認識する抗体が含まれるため、他のグラム陰性菌に対しても交差反応を

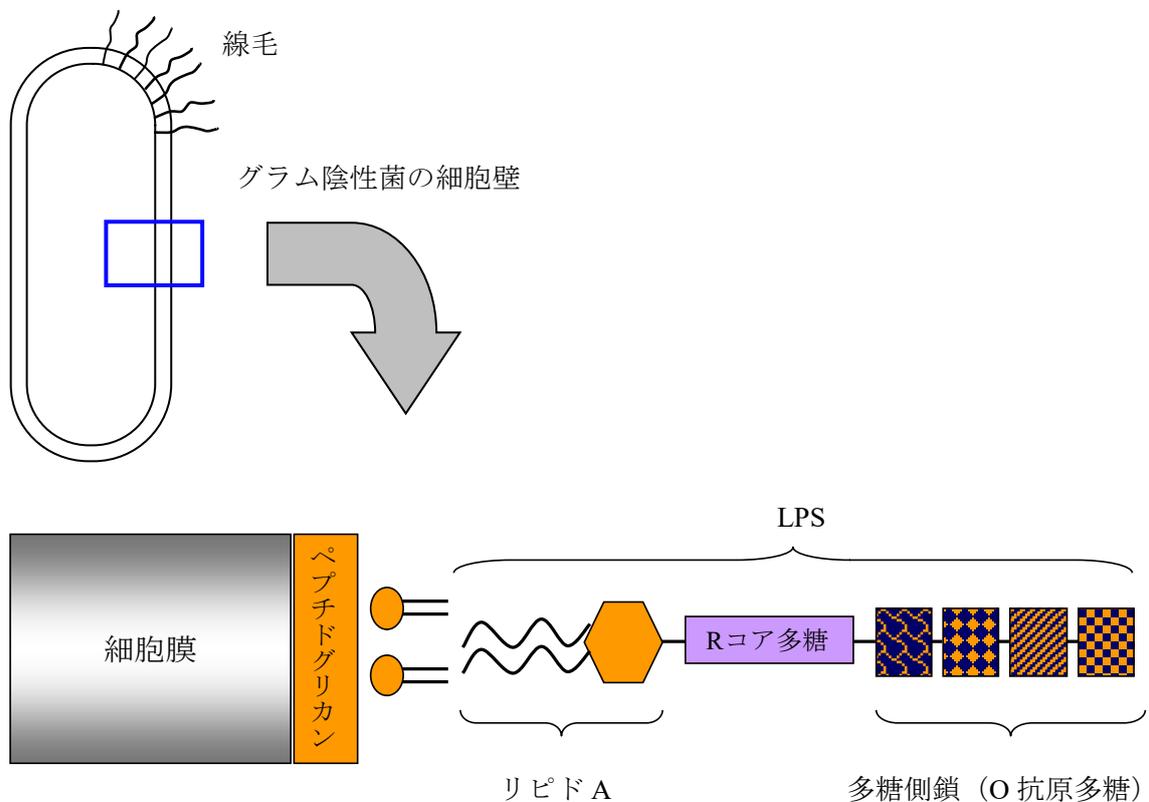


図 1-2 グラム陰性菌の細胞壁の構造 (模式図)

示すと考えられている (Tyler *et al.*, 1991, 1992; Tomita *et al.*, 1995)。そこで、J5 ワクチンにより産生された抗体を用いて様々な治療や試験が行われた。

Braude *et al.* (1977) は、J5 ワクチンでウサギを免疫した抗血清をマウスの腹腔内あるいは静脈内に投与し、6 時間後にエンドトキシンを静脈内に投与したところ、播種性血管内血液凝固 (disseminated intravascular coagulation; DIC) および腎皮質壊死症を防いだことから、J5 に対する抗血清はエンドトキシンからマウスを防御したと報告した。

Ziegler *et al.* (1982) は、ヒトの抗 J5 免疫血清あるいは免疫前血清をそれぞれ菌血症患者に静脈内投与したところ、患者の死亡率は、対照群が 39% (42/109) で、抗 J5 免疫血清投与群の 22% (23/103) に対して有意に高い値であった。また、激しいショック症状を呈する患者の場合、対照群の死亡率は 77% (30/39) で、抗 J5 血清投与群の 44% (18/41) に対して有意に高い値であった。これらのことから、ヒトの抗 J5 免疫血清はグラム陰性菌による菌血症の死亡率を大幅に下げることができたと報告した。

Baumgartner *et al.* (1985) は、グラム陰性菌感染の危険性が高い外科患者を対象に抗 J5 抗体の治療効果を検討した。集中治療室に入った外科患者に対し、J5 ワクチンを皮下接種したドナーの免疫前血漿 (対照) と接種後血漿をそれぞれランダムに投与した。対照患者の 11% および抗 J5 抗体投与患者の 5% がグラム陰性菌による敗血症性ショックを起こし、それぞれ 9 人および 2 人が死亡した。このことから、抗 J5 抗体は感染率を下げなかったが、グラム陰性菌感染症の重症化を防いで予後を改善したと報告した。

Spier *et al.* (1989) は、J5 ワクチンをウマに筋肉内接種し、接種前後の血漿をエンドトキシンショックを呈した別のウマに投与した。免疫後血漿を投与されたウマの死亡率は 13% で、前血漿を投与されたウマの死亡率の 47% に対して有意に低かった。また、J5 免疫血漿を投与されたウマは投与 48 時間後の臨床スコア (活力、疼痛、直腸温度、心拍、呼吸数、呼吸の特徴、粘膜の色、糞の状態) が有意に改善されたと報告した。

Tyler *et al.* (1988) は、乳牛の血清中の抗 J5 IgG1 抗体価を調査したところ、抗体価が 1:240 未満のウシは臨床型大腸菌性乳房炎に罹患するリスクが 5.33 倍になったと報告し、抗体価

と、大腸菌性乳房炎に対するウシの感受性との関連を示唆した。

以上のように、抗 J5 抗体を含む血清や血漿は、菌血症や内毒素血症に対する治療効果や臨床型 ACM の予防との関連性が示唆されているが、抗血清や血漿が乳房炎の治療に使われた報告は無い。

一方、*Dosogne et al.* (2002) は、J5 ワクチンの接種が T ヘルパー1 (Th1) 細胞の応答により、乳腺内の記憶細胞が介在して乳腺の過剰反応をひきおこし、結果的に乳房内感染に対する多形核白血球 (PMNs) の漏出を促進して、大腸菌性乳房炎の症状を軽減するという、抗体が関与しない仮説を示した。

以上のように、J5 ワクチンの効果は抗体を介することが通説となっているが、日本国内で市販されている下痢症予防用ワクチンでも同様の効果があるのか、またそれ以外の自然免疫に対する効果はあるのかどうかは知られていない。

乳腺の構造と免疫機能

乳汁は乳腺深部の乳腺胞から分泌される。乳腺胞を内張りしている乳腺上皮細胞は、血液中から前駆物質を取り込んで細胞内で乳合成を行い、腺胞腔へ乳汁を分泌する (安里ら, 2005)。乳汁は乳管を通過して乳腺槽に入り、一時貯留される。乳腺槽に貯留された乳汁は乳頭槽へ降りていく。乳頭の先端にある乳頭口と乳頭管は微生物の侵入門戸となるが、搾乳時以外は括約筋によって閉鎖されている。また、乳頭管を内張りしているケラチンと脂質の層が細菌の侵入を阻んでいる (Kehrli and Harp, 2001; 浜名ら, 2012)。細菌がこれらの機構を突破して乳房内に侵入し、感染することを阻止するため、自然免疫および獲得免疫が発動する。局所を防御する自然免疫因子には、*lactoferrin*, *lactoperoxidase*, 補体, 常在の免疫細胞などがあり、これらは細菌侵入後早期に働き、非特異的に作用する。細菌が侵入すると乳汁中への好中球の集積が起こり、体細胞数 (SCC) が増加し異常乳を排出する。細菌の侵入後、初期の重要な因子として、補体の活性化断片、血小板活性化因子、アラキドン酸代謝産物 (*leukotriene* および *prostaglandin*)、酸化窒素生産物、*thromboxane A₂*, およ

び prostacyclin が働く。これらの因子は乳汁中の SCC（特に好中球）や、乳頭および乳管洞を内張りしている内皮細胞から放出される。補体の走化性成分 C5a は、乳汁中へ好中球を誘導する。好中球などの白血球は細菌を識別する時、病原体間で共通の部分である pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) を認識する。ACM の原因となるグラム陰性菌の細胞壁を構成する lipopolysaccharide (LPS) も PAMPs の一種であり、これを認識する受容体が好中球や上皮細胞の有する TLR4 である。LPS は乳腺上皮細胞やマクロファージ表面の TLR4 によって認識され、炎症性サイトカインが遊離されるが、乳房炎に主に関与するのは IL-1 および TNF- α である。サイトカインにより、乳房に多量の好中球が移行する他、抗菌性タンパク質や抗菌性ペプチド、補体、soluble CD14 (sCD14)、LBP 等の濃度が上昇して、侵入した細菌の貪食、殺菌が行われる (Shuster *et al.*, 1991; Hyvönen *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012; Isobe *et al.*, 2009b; Bannerman *et al.*, 2003; 2004a)。一方、TLR4 で LPS に反応して活性化されたマクロファージは、殺菌を行うとともに処理した細菌抗原を MHC 分子とともに表出し、T 細胞に抗原を提示する。さらに、T 細胞を活性化する IL-12 を放出する。T 細胞は T 細胞レセプターを介して抗原提示細胞上の MHC 分子と細菌抗原との組み合わせを認識する。ヘルパー T 細胞には、サイトカインを産生して、抗原と反応した B 細胞が抗体産生細胞に分化するのを助ける働きがある。B 細胞レセプターを介して抗原と反応した B 細胞は、増殖した後、抗体産生細胞に分化して大量の抗体を産生・分泌する。

研究の目的

本研究では、乳牛の ACM 予防用として下痢用 ETEC ワクチンの実用化を目指し、ETEC ワクチンの接種が乳腺の免疫機能に及ぼす影響を調べることを目的とした。第 2 章では、自然発生の乳房炎に対する ETEC ワクチン接種の効果について検討した。まず、ワクチン接種牛および非接種牛に区分けして、乳牛の乳房炎発生率および乳房炎罹患牛の死亡・廃用率に及ぼす ETEC ワクチン接種の効果調べた。次に、ACM を発症したウシを用いて、それらの過去のワクチン接種の有無を調べ、ETEC ワクチンの接種が、ACM 発症時の臨床

病理学的検査値およびその後の転帰（治癒・死亡・廃用）に及ぼす影響を調べた。さらに、ETEC ワクチンを個体ごとに逐次分娩前に接種した場合と、初夏に分娩とは無関係に接種した場合における死産率の違いについても検討した。第3章では、泌乳牛の乳房内にグラム陰性菌の細胞壁の成分である LPS を注入して、人為的に ACM を惹起した時の乳腺の自然免疫応答をワクチン接種牛と非接種牛とで比較した。また、ワクチン抗体価と症状の強さとの関係についても検討した。

第2章 大腸菌不活化ワクチンの接種がウシの乳房炎の発生率，死廃率および乳汁，血液成分に及ぼす影響

緒言

急性大腸菌性乳房炎（ACM）は全身症状を引き起こすことが多く，死亡あるいは泌乳停止に陥り廃用に至ることもある。細菌感染症を防ぐ手段としては，ワクチンを利用して ACM を予防する方法が考えられる。海外では，*Escherichia coli* O111:B4 J5 株（Overbeek *et al.*, 1987）あるいは *Salmonella* Typhimurium Re-17 変異株（McClure *et al.*, 1994）からつくられた乳房炎ワクチンが市販されており，これらを用いることにより乳房炎発生率の低下，症状の緩和，死廃率の低下などが起きると報告されている（Hogan and Smith, 2003）。これに対し，日本には認可された乳房炎用大腸菌ワクチンが無いが，新生子牛の下痢の予防用に開発された毒素原性大腸菌（ETEC）ワクチン（製品名：Imocolibov，製造：Merial，輸入・販売：科学飼料研究所）は認可されている。そこで，この ETEC ワクチンを乳房炎予防のために用いることが考えられた。溝渕ら（1997）は，ETEC ワクチンを接種した農家と接種していない農家で乳房炎の発生率および死廃率を調査した結果，接種農家の接種開始後 3 年間の死廃率が接種前 3 年間に比べて有意に低く，接種農家の乳房炎発生率が非接種農家に比べて有意に低かったと報告した。しかし，この実験では接種区と非接種区の調査時期や農家が異なっており，区間の条件が一定ではない。その他には ETEC ワクチンを用いた乳房炎予防に関する報告はほとんどない。

Hogan *et al.*（1992b）は，J5 ワクチンを接種したウシと非接種のウシの乳房内にそれぞれ *E. coli* を接種し，直腸温度，乳汁中の生菌数，SCC および乳量の推移を調べた。その結果，体細胞数は J5 ワクチン接種牛と非接種牛の間で有意差がなかったが，ワクチン接種牛では非接種牛に比べて乳汁中の生菌数と直腸温度が有意に低かった。また，*E. coli* 接種の 3, 4, 5, 6 日後の乳量は J5 ワクチン接種牛に比べて非接種牛の方が有意に減少していたと報告した。また，Hogan *et al.*（1995）は，J5 ワクチンを接種したウシとアジュバントのみを

注射したウシの乳房内にそれぞれ *E. coli* を接種し、乳汁中の生菌数、SCC および乳清中の bovine serum albumin (BSA) 濃度の推移を調べた。その結果、J5 ワクチン接種牛の *E. coli* 接種 24 時間後の乳清中 BSA 濃度は、アジュバントを注射したウシのそれに比べて有意に低かった。また、SCC は *E. coli* 接種の 168 時間後に、J5 ワクチン接種牛がアジュバントを注射したウシに比べて有意に低かった。乳汁中の生菌数は、*E. coli* 接種の 3, 6, 9 時間後は、J5 ワクチン接種牛の生菌数がアジュバントを注射したウシに比べて有意に多かったが、48, 72, 96 時間後は、逆にアジュバントを注射したウシの生菌数が J5 ワクチン接種牛の生菌数よりも有意に多かったと報告した。Wilson *et al.* (2007b) は、J5 ワクチン接種牛と非接種牛の乳房内にそれぞれ *E. coli* を接種し、SCC および乳量の推移を調べた。その結果、*E. coli* 接種の 21, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 132 時間後の非接種牛の SCC が J5 接種牛に比べて有意に多く、*E. coli* 接種 1 日後の J5 ワクチン接種牛の乳量が非接種牛より有意に多かったと報告した。以上のように、今までの J5 ワクチンの乳房炎に対する効果の研究では、主に SCC、乳汁中の生菌数、乳量などを測定するのみであり、それ以上の詳細な解析は行われていない。

そこで本章では、大腸菌不活化ワクチンの接種が乳房炎に及ぼす影響をより詳細に調べることを目的として、ワクチン接種が乳房炎発生率、死産率に及ぼす影響を調べるとともに、乳汁および血液成分を調べ、それらとワクチン接種、乳房炎発生率および死産率との関係を検討した。

実験 1 大腸菌不活化ワクチンの接種が乳房炎発生率および死廃率に及ぼす影響

材料と方法

(1) 実験デザイン

乳牛の乳房炎発生率に対する大腸菌不活化ワクチンの効果について、農家の要因を考慮して検討するため、ランダム化比較試験を行った（図 2-1；木原ら，2010）。ランダム化比較試験では対象動物を処理群と対照群にランダムに割り付け、各群の対象動物をある期間観察し、両群を比較する。同一農家のウシを大腸菌ワクチン接種群と非接種群とに区分けし、接種後約 1 年間観察し、その後の乳房炎の発生状況や乳房炎発生後の転帰（治癒，死亡または廃用）などを群間で比較した。

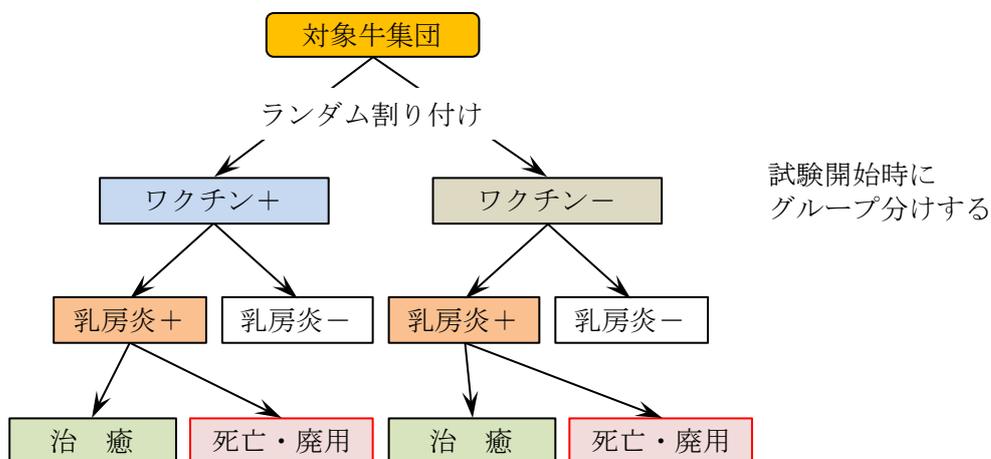


図 2-1 実験 1 のデザイン

(2) 動物

乳房炎による死亡あるいは廃用事故が起きている 5 戸 (A, B, C, D, E) の酪農家のホルスタイン種乳牛を用いた。飼養形態は，A, B 農家がフリーバーン，C, D, E 農家が敷料にオガクズを使ったタイストールであった。2007 年は 273 頭 (A 農家：152 頭，B 農家：24 頭，

C 農家 : 41 頭, D 農家 : 56 頭), 2008 年は 207 頭 (A 農家 : 141 頭, C 農家 : 40 頭, E 農家 : 26 頭) を供試した。廃用予定のウシ, 妊娠していない育成牛, および開始時に診療中であるなど不健康なウシは除外した。ワクチン接種牛と非接種牛の平均年齢は, 2007 年は 4.4 歳および 4.5 歳, 2008 年は 4.7 歳および 4.3 歳で, それぞれ接種牛と非接種牛との間に有意差はなかった。2002 年度から 2006 年度における, 乳房炎に起因する死亡または廃用頭数が乳房炎発生頭数に占める割合の平均は A: 9%, B: 15%, C: 21%, D: 16%, E: 33% であった。

(3) ワクチン接種

本研究に使用したワクチン (Imocolibov, 科学飼料研究所, 東京) は, 培養した大腸菌の全菌体をホルマリンで不活化し, 水酸化アルミニウム (Gupta, 1998) とサポニン (Rajput *et al.*, 2007) を添加した, ウシとヒツジの新生子の大腸菌性下痢症に対するワクチンで, 注射液として供給されているものである。大腸菌株の血清型は O8, O9, O15, O78, O101, O117 で, 本ワクチン 1 ml 中にそれぞれ 3×10^9 個の菌体が含まれている。抗原の量としては, 1ml 中に病原因子 K99 (≥ 1.22 SA. U), FY (≥ 1.80 SA. U), CS31A (≥ 1.27 SA. U) および O78 株 (吸光度 ≥ 1.14) が含まれている。1 SA. U は, ワクチン 2 回接種後のモルモットにおいて, 1 log₁₀ の凝集抗体価を得られる用量と定義されている。このワクチンを妊娠牛に皮下接種すると血液中に線毛抗原や菌体抗原に対する特異抗体が産生され, 分娩後に初乳を介して抗体が子牛に移行し, これによって子牛の下痢症を予防することができる。したがって, 通常このワクチンの接種は, 初回は分娩予定日の 2 ヶ月前および 1 ヶ月前, 次回の分娩以降は分娩予定日の 1 ヶ月前に実施される。

このワクチンを 5 月から 7 月の間に皮下接種し, その約 1 ヶ月後に追加接種した。この時期に接種した理由は, ACM が夏季に頻発すると報告されている (野村, 1986; Hogan and Smith, 2003; 安里ら, 2005) ので, この時期までに特異抗体が産生されることを狙ったからである。われわれの調査では, ワクチン接種後 2 週間で抗体価が非接種牛に比べて有意に

高くなることが確認されている（森本ら，2010）。各農家の約半数のウシの頸部あるいは後肢の皮下に 5 ml のワクチン液を注射し，残りの半数のウシは無処置とした。ワクチン接種牛の数は 2007 年が 133 頭（A 農家：70 頭，B 農家：13 頭，C 農家：20 頭，D 農家：30 頭），2008 年が 102 頭（A 農家：67 頭，C 農家：20 頭，E 農家：15 頭）であった。

(4) 乳房炎の定義

異常乳（乳汁に血液や凝固物が混じる，あるいは白濁しておらず半透明になる，黄色味を帯びる等の状態）を排出し，乳房に発赤や腫脹，硬結が現れる等の明らかな臨床症状を示す臨床型乳房炎で，家畜診療所の獣医師によって診断された例を「乳房炎」と定義した。乳房炎の発生率および死廃率は，獣医師の診療記録をもとに発生件数および死亡・廃用件数から算出した。発生率（%）は供試頭数に対する臨床型乳房炎発生頭数の割合，死廃率（%）は臨床型乳房炎発生頭数に対する死亡・廃用頭数の割合と，それぞれ定義した。乳房炎症例のうち，発熱，沈うつ，起立不能，眼結膜充血，第一胃運動の停止，食欲不振のような重篤な全身症状を伴う乳房炎を甚急性乳房炎と定義し，その他の乳房炎と区別した。調査開始後に牛群に導入されたウシは供試牛に含めなかった。

(5) 乳汁サンプルの採取および病原菌の分離

2007 年は酪農家 A，2008 年は酪農家 A, C, E において，初回のワクチン接種からその年の 12 月までの期間，乳房炎を発症した全てのウシから乳汁サンプルを採取した。乳汁サンプルは初診時に 1 回無菌的に採取し，4℃で冷蔵するか，あるいは−20℃で凍結して実験室へ運搬した。サンプルを滅菌蒸留水で 10 倍に希釈し，原液と 10 倍希釈液を 50 μl ずつ 5% ヒツジ血液寒天培地（栄研化学，東京），ベアードパーカー寒天培地（シスメックス・ビオメリュー，東京），DHL 寒天培地（日水製薬，東京）に接種し，37℃で 24 時間好気培養して，培地上に形成されたコロニーを観察した。

分離菌のグラム染色は，フェイバーG（日水製薬）を用いた。スライドグラス上に滅菌

蒸留水を1滴置き、白金耳で釣菌した菌を懸濁し風乾させた後、スライドグラスをガスバーナーの炎に数回くぐらせて加熱し、火炎固定した。冷却後、染色液A（ビクトリアブルー）を滴下し1分間染色した後、水洗して水分を除去し、完全に乾燥する前に脱色液を滴下した。約45秒間スライドグラスを揺らしながら脱色した後、水洗して水分を除去した。染色液B（フクシン）を滴下して1分間染色した後、水洗し風乾した。1,000倍で鏡検し、菌の形態および染色性を観察した。形態により桿菌と球菌に判別し、青色に染まったものをグラム陽性、赤色に染まったものをグラム陰性と判定した。カタラーゼ反応は、白金耳でコロニーを釣菌して3%過酸化水素水（ H_2O_2 、ナカライテスク、市販の30%液を蒸留水で10倍希釈して試験管に0.5ml分注）に浸漬し、気泡の生じたものを陽性と判定した。オキシダーゼ反応は、チトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙（日水製薬）を蒸留水で湿らせ、釣菌したコロニーを塗抹して1分以内に深青色に変色したものを陽性と判定した。分離菌は、培地上のコロニーの発育状況や、グラム染色像、カタラーゼ、オキシダーゼ反応の成績などから以下の様に腸内細菌、*Staphylococcus* 属、*Streptococcus* 属、その他の病原体の4つに分類した（坂崎，1993）。

腸内細菌：血液寒天、DHL寒天に発育し、ベアードパーカー寒天上には発育しない。DHL寒天上でピンク～赤色のコロニーを形成し、グラム陰性桿菌でカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性。

Staphylococcus 属菌：血液寒天、ベアードパーカー寒天培地に発育し、DHL寒天には発育しない。ベアードパーカー寒天上では灰色～黒色のコロニーを形成する。グラム陽性球菌でカタラーゼ陽性、特に、*Staphylococcus aureus* 等は、コロニーの周囲の培地が白濁する現象（ハロー形成、コアグララーゼ陽性の反応）が見られる。厳密には、さらに麦芽糖（マルトース）を含む培地に接種して麦芽糖を分解し酸を産生する能力の有無を確認する必要があるが、今回は実施せずコアグララーゼ陽性の段階で *Staphylococcus aureus* として扱った。

Streptococcus 属菌：血液寒天に発育するが、ベアードパーカー寒天、DHL寒天上には発育しない。血液寒天上のコロニーも上記の2菌種に比べて小さいことが多い。グラム陽性

球菌だがグラム染色性は *Staphylococcus* 属菌ほど明瞭ではなく、一部がグラム陰性に染まることがある。菌体は *Staphylococcus* 属菌よりも小さく、短桿菌様に見えることもある。カタラーゼ陰性だが弱い陽性反応が見られることがある。

腸内細菌の菌種同定には API 20E あるいは API rapid 20E (シスメックス・ビオメリュー) を用いた。API 20E は腸内細菌およびグラム陰性桿菌，API rapid 20E は腸内細菌同定用の簡易キットで、それぞれ 20 項目の生化学検査を行うことができる。コロニーを釣菌して滅菌精製水に規程の濃度で浮遊させ、マイクロピペットを用いてテストストリップのカップに滴下し、所定のカップには滅菌ミネラルオイルを重層した。専用ケースに入れ蓋を閉め、API 20E は 18~24 時間，API rapid 20E は 4 時間，37°C でインキュベートした。その際、API 20E は乾燥を防ぐためケース内に少量の水を入れた。インキュベート後、Voges-Proskauer (VP)，インドールなどのカップには所定の試薬を加え、それ以外はそのまま呈色反応を記録用紙に記入した。細菌名検索用のソフトウェア (アピラボソフト) にデータを入力して検索し、菌種を同定した。

(6) 乳量

酪農家 A において、月 1 回記録されている乳量および乳成分データを用いて解析した。4%脂肪補正乳量 (fat-corrected milk; FCM) は次式により計算した。

$$4\% \text{ FCM (kg)} = 0.4 \times \text{乳量 (kg)} + 15 \times \text{乳脂量 (kg)}$$

初産牛は分析から除外した。

(7) 統計学的処理

統計処理は、Windows OS 用コンピューターソフトウェア、R (Ihaka and Gentleman, 1996) version 2.10.1 を用いて行った。基本パッケージに加えて、簡易操作の Rcmdr (舟尾, 2007) と生存時間分析用の survival パッケージを使用した。ワクチン接種牛と非接種牛の臨床型乳房炎発生率および甚急性乳房炎発生率の比較は、全供試牛について行った。ワクチン接

種牛と非接種牛の死廃率の比較は、臨床型乳房炎が発生したウシについて行った。死廃率は、フィッシャーの正確確率検定 (Fisher's exact test) により、ワクチン接種牛と非接種牛を比較した。

乳房炎発症牛について生存時間分析を行った。 Kaplan-Meier 法 (Kaplan-Meier method) で生存曲線を推定し、ログ・ランク検定 (log-rank test) により接種牛と非接種牛の生存曲線の比較を行った。生存時間分析 (survival analysis) とは、イベント (event) が起きるまでの時間とイベントとの間の関係に焦点をあてる分析方法で、医学分野においては病気の再発や死亡などを対象とした研究分野である (金, 2007)。イベントが起きないまま、それ以上観察を続けることができなくなったものを打ち切り (censor) と呼ぶ。本実験では、イベントは乳房炎による死亡・廃用、打ち切りは乳房炎の発生に該当する。乳房炎が発生し、そのウシが死亡・廃用に至った場合はイベントと同時に打ち切りが発生し、その時点で生存率が再計算される。治癒した場合は打ち切りのみが発生し、生存率は変化しない。この生存時間分析により、ワクチン接種後 ACM 発生までの日数と乳房炎発症牛の生存率との関係を分析した。 Kaplan-Meier 法は生存関数を求める手法のひとつで、ログ・ランク検定は各群の母生存関数に差異が認められるか否かを検討するための検定である (高橋, 2007)。さらに Cox 回帰分析を行い、パラメーターごとにハザード比を求めた。パラメーターの選択は赤池の情報量規準 (Akaike's Information Criterion) に基づいて行い、ハザードの比例性を分析した。

2008 年に実施した農家は 2007 年の農家と一部異なっているため、年ごとに別々に分析した。乳房炎原因菌の分離率の比較にはフィッシャーの正確確率検定を実施した。

農家 A の泌乳成績は、初産牛のデータを除外し、経産牛の泌乳データを用いて分析した。これらのデータは、ワクチン接種後日数と泌乳日数によって区分した。ワクチン接種後日数は、-100~0, 1~100, 101~200, 201~300 日の 4 つのカテゴリーに分け、泌乳日数は 0~100, 101~200, 201~300, 301 日以上の 4 つのカテゴリーに分けた。4% FCM を従属変数 (応答変数) として多元配置分散分析 (Multi-way analysis of variance) を実施した。独立変

数（説明変数）には，個体（COW），ワクチン接種の有無（VAC），ワクチン接種後日数の
カテゴリー（CDV），泌乳日数のカテゴリー（CDM）を用いた。分析モデルは $MILK = COW$
 $+ VAC + CDV + CDM + e$ とした。

MILK: 4% FCM; e: 誤差

次に，泌乳日数の影響を除くため泌乳日数カテゴリー別に分析した。4% FCM を従属変
数として，それぞれ多元配置分散分析を行った。独立変数は個体（COW），ワクチン接種
の有無（VAC），ワクチン接種後日数のカテゴリー（CDV）である。分析モデルは， $MILK$
 $= COW + VAC + CDV + e$ である。

$P < 0.05$ を統計的有意と判断した。

結果

(1) 乳房炎の発生状況

2007年の4農場における臨床型乳房炎発生件数の合計は、接種牛27件、非接種牛24件であり、そのうち甚急性乳房炎は接種牛7件、非接種牛6件であった(表2-1)。乳房炎発生率および甚急性乳房炎発生率は、接種牛と非接種牛の間に有意差は認められなかった。

2008年の3農場の乳房炎発生件数の合計は接種牛27件、非接種牛26件であり、両者の間に有意な差は認められなかった。甚急性乳房炎発生件数は接種牛が8件(7.8%)、非接種牛が5件(4.8%)であり、両者間に有意差はなかった。

2007年と2008年の乳房炎発生率を比較すると、2007年の18.7%に対し2008年は25.6%と高かったが、有意な差ではなかった。

(2) 乳房炎による死廃率

2007年のワクチン接種牛における乳房炎発症牛の死廃率(7.4%)は、非接種牛(29.2%)に比べて有意差はなかったものの、低い傾向があった($P=0.07$; 表2-2)。甚急性乳房炎による死廃率は、ワクチン接種牛(14.3%)が非接種牛(83.3%)に比べて有意に低かった($P=0.03$)。一方、甚急性乳房炎以外の乳房炎が発生したウシの死廃率は、ワクチン接種の有無による有意な差は認められなかった。

2008年の乳房炎死廃件数は接種牛で1件であり、それは甚急性乳房炎によるものであったが、非接種牛では死廃例はなかった。

カプラン・マイヤー法による2007年の生存曲線を接種牛と非接種牛で比較すると、非接種牛では供試開始100日目で生存率は80%以下に低下したが、接種牛では250日以降でようやく80%以下になった。これらの生存曲線は接種牛と非接種牛で有意に異なり、接種牛の生存率が非接種牛に比べて高く推移した($P=0.02$, 図2-2)。Cox回帰分析の結果、ワクチン接種の有無、甚急性乳房炎発生の有無、および発生時の年齢がパラメーターとして選択された。ハザード比は、ワクチン接種が0.09($P<0.01$; 95%信頼区間0.02~0.54)、甚急

性乳房炎が 26.22 ($P<0.01$; 95%信頼区間 4.37~157.22), 年齢が 0.67 ($P=0.06$; 95%信頼区間 0.44~1.02) であった。ハザードの比例性に関して問題点は認められなかった。

(3) 農家 A の泌乳成績

乳量データの総数は 1,535 件であった。4% FCM に対する多元配置分散分析の結果、個体、ワクチン接種後日数カテゴリー、および泌乳日数カテゴリーにより有意差が認められた。4% FCM 量は、ワクチン接種牛が非接種牛に比べて多くなる傾向が認められた ($P=0.051$)。各泌乳日数カテゴリーについて 4% FCM の多元配置分散分析の結果、有意差は認められなかった。

(4) 乳房炎原因菌の分離状況

2007 年は乳房炎の乳汁 26 検体 (接種牛 12, 非接種牛 14) から菌分離を試み、17 検体 (接種牛 8, 非接種牛 9) から細菌および真菌が分離された (表 2-3)。 *E. coli* の分離率は、接種牛と非接種牛とで有意な差はなかった。2008 年は 32 検体 (接種牛 20, 非接種牛 12) の乳房炎乳汁を検査し、23 検体 (接種牛 13, 非接種牛 10) から細菌が分離された。 *E. coli* の分離率は、接種牛と非接種牛との間に有意な差はなかったが、接種牛の方が低い傾向を示した。また、 *Klebsiella pneumoniae* が分離されたのは、C および E 農家のみであった。

表 2-1 2007 年および 2008 年の乳房炎発生状況

	2007 年		2008 年	
	非接種牛頭数	接種牛頭数	非接種牛頭数	接種牛頭数
	(%)	(%)	(%)	(%)
供試牛頭数	140	133	105	102
乳房炎発生数	24 (17.1)	27 (20.3)	26 (24.8)	27 (26.5)
甚急性乳房炎	6 (4.3)	7 (5.3)	5 (4.8)	8 (7.8)
その他の乳房炎	18 (12.9)	20 (15.0)	21 (20.0)	19 (18.6)
死廃件数	7 (29.2)	2 (7.4)	0 (0)	1 (3.7)
甚急性乳房炎	5 (83.3*)	1 (14.3)	0 (0)	1 (12.5)
その他の乳房炎	2 (11.1)	1 (5.0)	0 (0)	0 (0)

* : 接種牛と非接種牛の間で死廃率に有意差あり ($P=0.03$, フィッシャーの正確確率検定)

乳房炎発生数の括弧内は供試牛頭数に対する乳房炎発生数の割合を示す。

死廃件数の括弧内は乳房炎発生数に対する死廃件数の割合を示す。

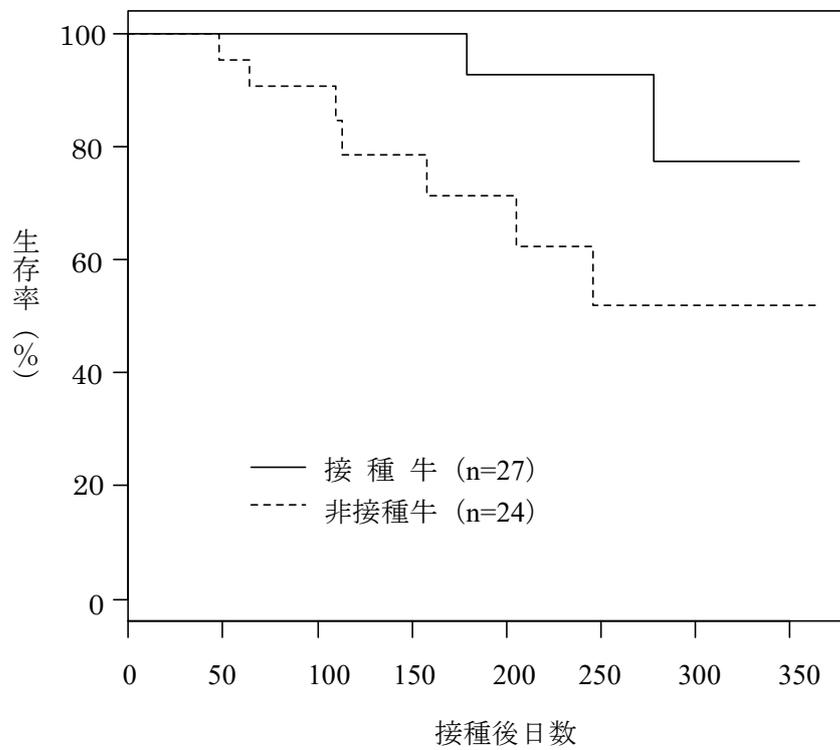


図 2-2 カプラン・マイヤー法による 2007 年の生存曲線の比較

ETEC ワクチン接種牛と非接種牛との間で生存曲線に有意差あり ($P=0.02$, ログ・ランク検定)

表 2-3 臨床型乳房炎の症例から分離された病原菌の分離率

分離菌	2007 年の件数 (%)†		2008 年の件数 (%)‡	
	非接種牛	接種牛	非接種牛	接種牛
<i>Escherichia coli</i>	3 (21)	2 (17)	3 (25)	2 (10)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (15)
その他の腸内細菌	0 (0)	1 (8)	0 (0)	3 (15)
<i>Staphylococcus</i> sp.	3 (21)	2 (17)	1 (8)	2 (10)
<i>Streptococcus</i> sp.	1 (7)	3 (25)	5 (42)	2 (10)
その他の病原菌 (真菌)	2 (14)	0 (0)	1 (8)	1 (5)
分離菌なし, または複数菌種を分離	5 (36)	4 (33)	2 (17)	7 (35)
	14 (100)	12 (100)	12 (100)	20 (100)

† : A 農家から分離された件数 (%)

‡ : A, C, E 農家から分離された件数 (%)

実験 2 大腸菌不活化ワクチンの接種が大腸菌性乳房炎発生牛の血液成分および乳汁中生菌数に及ぼす影響の解析

材料と方法

(1) 実験デザイン

乳房炎の中でも急性大腸菌性乳房炎（ACM）に限定して後ろ向きコホート研究を行った（図 2-3；木原ら，2010）。後ろ向きコホート研究は，調査対象群を決めた後，過去にさかのぼって調査し曝露群と非曝露群にグループ分けする方法である。そこで，ACM の発生時点を現在とし，ワクチン接種履歴によりワクチン接種群と非接種群とに分け，初診時の血清および乳汁を検査し，診療カルテの情報をもとに乳房炎発生時の症状や血液検査値等の情報を収集し，さらに未来に向かってそれぞれの転帰を追跡調査した。そうして得られた情報をもとに，ワクチン接種牛に ACM が発生した際の死廃事故に関連する因子を探索した。また，診療カルテから得られる情報の他に大腸菌ワクチンの接種日およびワクチンプログラムを獣医師から聞き取り調査を行い，乳汁中の乳房炎原因菌の種類・生菌数，初診時の血清中のワクチン抗体価，抗 J5 抗体価，IgG 濃度，急性期タンパク濃度等を追加検査し，どの因子にワクチンが影響を及ぼしているのかを検討した。

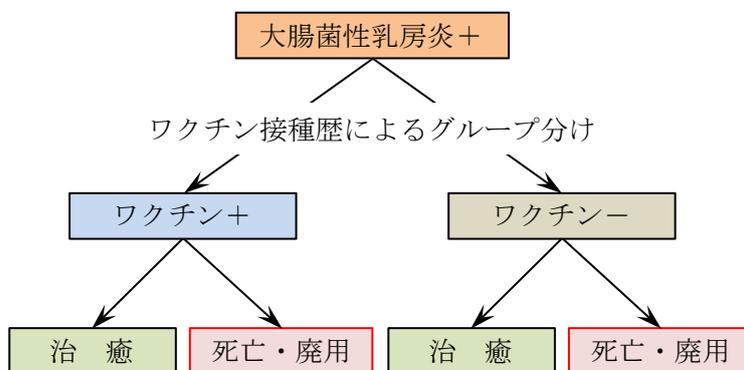


図 2-3 実験 2 のデザイン

(2) 供試動物

2008年6月から2010年12月までに発生した甚急性および急性大腸菌性乳房炎59例のうち、乳汁からグラム陰性桿菌が分離された56例を用いた。個々のウシの誕生した日、最終分娩日、乳房炎発生日、転帰（治癒、死亡または廃用）、治療回数、最終治療実施日、初回治療時の乳房局所への抗生物質投与の有無、初回治療時の全身への抗生物質投与の有無、乳房洗浄の実施の有無、乳房の状態（腫脹、硬結の有無）、乳汁の状態（水様性か否か）、第一胃運動の有無、および家畜診療所の獣医師が初診時に採取した血液の検査データを診療カルテから得た。乳房洗浄とは、乳房内に滅菌生理食塩水や中性電解水を注入・排出して乳房内の細菌や凝固物等を洗い流す治療方法で、病原体やエンドトキシンの除去を目的に行われる（Shinozuka *et al.*, 2009）。また、ETEC ワクチン接種日およびワクチンプログラムも調査した。

(3) ETEC ワクチン

調査対象のワクチンは実験1で接種したものと同様である。ETEC ワクチンには2通りのワクチンプログラムが用いられており、農家ごとにどちらかを選択している。一つは、初回は分娩予定日の2ヶ月前と1ヶ月前に接種し、次の産次以降は分娩1ヶ月前に接種する方法。もう一つは、春から初夏の時期に子牛を除くすべてのウシに接種する方法で、最初の年は1ヶ月間隔で2回、翌年以降は1回接種する。ACMの発生した農家がどちらのワクチンプログラムを採用しているかについては、診療獣医師に聞き取り調査した。本実験では、過去に一度でも接種したことのあるウシは全て接種牛として扱い、その他のウシは非接種牛と定義した。

(4) 乳汁サンプル採取と病原菌の分離

乳汁サンプルは、家畜診療所の獣医師が酪農家で診療を行った際に15 ml 遠沈管に無菌的に採取し、4℃で冷蔵、あるいは-20℃で凍結して実験室へ送付した。採取から検査まで

の時間は、24～96 時間であった。培養検査は実験 1 と同様に行い、DHL 寒天培地においてピンク色～赤色のコロニーを形成し、グラム陰性桿菌でカタラーゼ陽性、オキシダーゼ陰性のものを腸内細菌と判定した。分離された腸内細菌は API 20E または API rapid 20E (シスメックス・ビオメリユー) を用いて菌種を同定した。分離菌は腸内細菌とその他の菌に分類し、生菌数 (colony forming unit, 以下 CFU/ml) を計算した。生菌数が多く数えられない場合は、培地上に $>10^3$ CFU のコロニーがあるものと解釈し、50 μ l を 1 ml に換算し、さらに希釈倍率の 10 をかけて $>2 \times 10^5$ CFU/ml と判断したが、集計の際は 10^6 CFU/ml として計算した。

(5) 血液サンプル採取

血液のサンプルは初診時に診療獣医師により採取された。真空採血管 (BD バキュティナ, 日本ベクトン・ディッキンソン, 東京) を用いて凝固阻止血液 (EDTA・Na 使用) と血清採取用血液を採取し、生乳サンプルと一緒に冷蔵で家畜臨床研修所へ宅配便で送付した。凝固阻止血液は全自動血球計数器 (セルタック, 日本光電, 東京) を用いて白血球数 (White blood cell; WBC), 血小板数 (platelet; PLT), ヘマトクリット (hematocrit; Ht, PCV) を測定した。臨床化学自動分析装置 (アキュート, 東芝メディカルシステムズ, 栃木) を用いて, aspartate aminotransferase (AST, GOT), gamma glutamyl transpeptidase (γ -GTP), alkaline phosphatase (ALP), lactic acid dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK) 活性値, および total protein (TP), total cholesterol (T-Chol), blood urea nitrogen (BUN), total bilirubin (T-Bil), non esterified fatty acid (NEFA), calcium (Ca), inorganic phosphate (P), magnesium (Mg) 濃度を測定した。

(6) 血清中 haptoglobin 濃度

血清中 haptoglobin 濃度 (Hp) を市販の測定キット (エコスチェック ウシ Hp プレート, エコス研究所, 宮城) を用いて一元放射免疫拡散法 (Single radial immunodiffusion; SRID)

で測定した。被検血清は使用直前に調製したシステイン溶液（40 mM; 4.8 mg/ml）で2倍に希釈して還元処理を行った後、マイクロシリンジを用いて寒天平板の検体注入穴に5 μ l ずつ入れた。キットには2種類の基準液が同梱されており、これらも同時に検査した。基準液および検体を注入後、寒天平板の蓋を閉めて湿潤箱に入れ、水平状態に保って25°Cで72時間静置した。反応後寒天平板の蓋を外し、裏面からノギスを用いて沈降リングの直径（外縁）を測定した。キットに添付された片対数グラフ用紙に基準液A（500 μ g/ml）およびB（125 μ g/ml）の直径をプロットし、この2点を通る直線を引いて検量線とした。検量線は横軸がHp濃度（単位 μ g/ml, 実数軸）、縦軸が沈降リングの直径（単位 mm, 対数軸）で描画した。この検量線を用いて検体の沈降リング直径から希釈検体中のHp濃度を求め、さらに希釈倍率（2倍）を乗じて被検血清中のHp濃度（ μ g/ml）を求めた。本キットの測定範囲は25~750 μ g/ml（希釈倍率を乗じると50~1,500 μ g/ml）であった。沈降リングが過大で判定できない血清は、生理食塩水で希釈後にシステイン溶液による還元処理を行い、再検査した。沈降リングが全く形成されない場合は20 μ g/ml以下とみなされるが、今回は10 μ g/ml（希釈倍率を乗じて20 μ g/ml）として集計した。

(7) 血清中ワクチン抗体価の測定

ETEC ワクチンに対する抗体価は、Tyler *et al.* (1991) の方法を一部変更して酵素免疫測定法により測定した。

約6カ月齢のホルスタイン種雌子牛の頸部皮下にETEC ワクチン5 mlを2週間間隔で3回接種し、最後の接種から2週間後に真空採血管（VP-P100K, テルモ, 東京）を用いて頸静脈から約100 ml採血した。採血管を室温に静置し血液が凝固した後、1,500 \times g, 10分間、4°Cで遠心分離して血清を採取し、陽性血清として使用した。また、同じ個体のワクチン接種前の血清をあらかじめ採取し、陰性血清として使用した。これらの血清は使用時まで-20°Cで凍結保存し、融解後は再凍結を避けた。陽性血清および陰性血清の抗体価をそれぞれ100%および0%とし、4:1, 3:2, 2:3, 1:4の比で混合し、それぞれ80, 60, 40, 20%の

抗体を含むとみなして、得られた吸光度をグラフ上にプロットし、検量線を作成した。

EPEC Wワクチンをアンプルから 50 ml 遠沈管 (labcon, 米国) に移し, 1,500×g, 20 分間, 4°Cで遠心分離し, 上清を除いた後リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffered saline; PBS), pH 7.4 を加えて再懸濁した。これを再び遠心分離して上清を捨て, 同じ操作をさらに 2 回繰り返して沈澱を洗った後, 0.02% thimerosal (ナカライテスク, 京都) 加 PBS, pH 7.4 に再懸濁した。懸濁した菌液を超音波ホモジナイザー (UR-20P, トミー精工, 東京) で 1 分間処理した後, 分光光度計 (U-2000A, 日立ハイテクノロジーズ, 東京) を用いて波長 610 nm での透過率が 25% (吸光度 0.6) になるよう PBS を用いて濃度を調整し, 酵素免疫測定法の抗原液として使用した。96 ウェルマイクロタイタープレート (Nunc イムノプレート マキシソープ F 底, サーモサイエンティフィック, 神奈川) に, 調製した抗原液を 100 µl/well 注入し, プレートを攪拌した後, シールして 37°C 18 時間静置した。プレートのシールを除いてウェル内の液を捨て, 0.1% Tween20 (polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate, ナカライテスク) 加 0.85% NaCl (ナカライテスク) 水溶液 (以下, 洗浄液) を用いて 3 回洗浄後, プレートを逆さにしてペーパータオルの上にたたきつけてウェル内の液を除いた。洗浄操作は自動プレート洗浄機 (マイウォッシャーオートミニ MA-1, 旧 三光純薬 現 エーディア, 東京) を使用した。1% ゼラチン (ナカライテスク) 加 PBS を 300 µl/well 注入し, プレートをシールして 25°C で 1 時間静置してブロックし, プレートへの非特異的結合を防止した。シールを除き, プレートを洗浄液で 3 回洗浄後, 0.05% Tween20 加 PBS pH 7.0 (以下, 希釈液) を用いて 10,000 倍に希釈した被検血清を 100 µl ずつ注入し, プレートをシールして 37°C で 30 分間恒温振とう機 (バイオシェーカー BR-40LF, タイテック, 埼玉) を用いて 50 rpm. で振とうした。シールを除いてプレートを洗浄液で 3 回洗浄後, プレートを逆さにしてペーパータオルの上にたたきつけてウェル内の液を除き, 希釈液で 14,000 倍に希釈した horseradish peroxidase (HRP) 標識ヤギ抗ウシ IgG 血清 (EY Laboratories Inc., CA, 米国) を 100 µl/well 注入し, プレートをシールして 37°C, 30 分間, 恒温振とう機を用いて 50 rpm. で振とうした。シールを除いてプレートを洗浄液で 3 回洗浄後, ペーパータオル

にたたきつけてウェル内の液を除き、TMB液（発色基質）を125 μ l/well 注入し、21°Cで30分間静置した後、マイクロプレートリーダー（オートリーダーER-8100, 旧 三光純薬 現 エーディア）を用いて630 nmの波長で吸光度を測定した。得られた吸光度は検量線をもとに抗体価（%）に変換した。

PBSは、NaCl 6.8 g, Na₂HPO₄（ナカライテスク）1.2 g, KH₂PO₄（ナカライテスク）0.7 gを蒸留水に溶解、pHを調整した後、1Lにメスアップした。TMB液はA液とB液を調製し、遮光・冷蔵保存しておき、使用時に室温に戻し、A液とB液を等量混合して使用した。A液は、citric acid monohydrate（ナカライテスク）2.575 g, urea hydrogen peroxide（シグマアルドリッチ、東京）0.25 g, Na₂HPO₄·12H₂O（ナカライテスク）8.5 gを蒸留水に溶解し、250 mlにメスアップして作製した。B液は、3,3',5,5'-tetramethylbenzidine（シグマアルドリッチ）0.125 gをDMSO（dimethyl sulfoxide, ナカライテスク）10 mlに溶解した後、citric acid monohydrate 2.575 gを蒸留水に溶解した液に添加し、全体を蒸留水で250 mlにメスアップした。

(8) 血清中抗J5抗体価の測定

抗J5抗体価は、抗ETECワクチン抗体価と同様に酵素免疫測定法により測定した。*E. coli* O111:B4 J5株（ATCC 43745, 住商ファーマインターナショナル、東京）を普通寒天培地（日水製薬）に接種、画線培養して単コロニーを釣菌しトリプトソーヤソイブイオン（日水製薬）100 mlに移植し、37°Cで22時間培養した後、formalin（ナカライテスク）を2%添加して37°Cで24時間静置して不活化した。これを50 ml遠沈管に移し替え、1,500×g, 10分間、4°Cで遠心分離して上清を捨て、0.02% thimerosal 加PBS pH 7.4に再懸濁した。遠心分離と再懸濁をさらに2回繰り返して沈澱を洗浄した。分光光度計を用いて610 nmの吸光度が0.14になるようPBSで濃度を調整した。調製した菌液5 mlと Freund's adjuvant incomplete（シグマアルドリッチ）2 mlを混合して約6カ月齢のホルスタイン種雌子牛の頸部皮下に2週間間隔で4回接種し、最後の接種から2週間後に真空採血管（VP-P100K,

テルモ)を用いて採血した(Tyler *et al.*, 1990)。室温に静置して採血管内の血液が凝固した後、1,500×g, 10 分間, 4°Cで遠心分離して血清を採取し、陽性血清として使用した。また、同じ個体のワクチン接種前の血清をあらかじめ採取しておき、陰性血清として使用した。これらの陽性血清と陰性血清は、使用時まで−20°Cで凍結保存し、ETEC ワクチン抗体価の測定と同様に 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 の割合で混合したものを調製して抗体価を測定し、検量線の作成に使用した。

子牛への接種に使用した菌液と同様に J5 を純培養後 formalin で不活化し、PBS で 3 回洗浄した後、0.02% thimerosal 加 PBS pH 7.4 に再懸濁し、超音波ホモジナイザー(トミー精工)で 1 分間処理後、分光光度計を用いて 610 nm の透過度が 25% (吸光度 0.6) になるよう、PBS を用いて濃度を調整し、酵素免疫測定法の抗原液として使用した。酵素免疫測定法および吸光度からの抗体価の算出はワクチン抗体価の測定と同様に行い、陽性血清の抗体価に対するパーセンテージで示した。

(9) 血清中 IgG 濃度の測定

ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Sato *et al.*, 2011) を炭酸バッファーで 100 倍 (20 µg/ml) に希釈し、96 ウェル平底マイクロタイタープレート (ELISA 用プレート H, 住友ベークライト, 東京) に 100 µl/well 注入し、室温で 2 時間静置した。炭酸バッファー (carbonate buffer, pH 9.7) は sodium carbonate (Na₂CO₃, ナカライテスク) 1.73 g と NaHCO₃ (ナカライテスク) 0.73 g を蒸留水 500 ml に溶解して作製した。2% Tween20 加 PBS でプレートを洗浄後、ホウ酸バッファーを 300 µl/well 添加し、室温で 30 分間静置してブロックし、プレートへの非特異的結合を防止した。ホウ酸バッファーは boric acid (ナカライテスク) 1.55 g を 500 ml の蒸留水に溶解した後、1 N NaOH 水溶液を用いて pH 7.8 に調整し、さらに bovine serum albumin (シグマアルドリッチ) 0.5 g と potassium dichromate (K₂Cr₂O₇, 純正化学, 東京) 25 mg を加えて作製した。プレートを逆さにしてウェル内の液を捨て、ペーパータオルにたたきつけて液を除いた。続いてホウ酸バッファーで 100,000 倍に希釈した被検血清を 50

μl/well, HRP 標識ウシ IgG を 50 μl/well, ホウ酸バッファーで 5,000 倍に希釈したウサギ抗ウシ IgG 抗体 (Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, TX, 米国) を 50 μl/well 添加し, 攪拌して室温で 4 時間静置した。各ウェルを 0.02% Tween20 加 PBS で 3 回洗浄後, プレート逆さにしてペーパータオルにたたきつけてウェル内の液を除いた後, TMB 液を 150 μl/well 添加し, 室温で 30 分間反応させた後, マイクロプレートリーダー (Bio-Rad model 550, CA, 米国) を用いて 655 nm の波長で吸光度を測定した。発色基質となる TMB A および B 液は, (7)ワクチン抗体価測定と同様に作製した。スタンダードとして, 10, 3.3, 1.1 μg/ml, 370, 120, 41, 14 ng/ml の IgG を含む溶液をホウ酸バッファーを用いて調製し, 被検血清と同時に測定した。標識 IgG は, 過ヨウ素酸法を用いてウシ IgG (MP Biomedicals LLC, Solon, OH, 米国) を HRP (シグマ) で標識した (Wilson and Nakane, 1978)。

(10) 統計学的処理

供試した症例をワクチン接種の有無および転帰 (治癒, 死亡または廃用) によって分類し, それぞれの平均値を比較し, 差の有意性の検定にはスチューデントの t 検定を用いた。調査項目には分娩後日数 (分娩日から ACM 発生までの日数), 接種後日数 (ワクチン接種後 ACM 発生までの日数), 治療日数, 治療回数, 乳汁の状態 (水様性か否か), 第一胃運動 (停止しているか否か), 乳房の腫脹の有無, 初回治療時の乳房への抗生物質投与の有無, 初回治療時の全身への抗生物質投与の有無, ワクチンプログラム (初夏の一斉接種あるいは分娩前接種), 乳汁からの分離菌の種類を加え, 量的変数はスチューデントの t 検定を用い, 質的変数 (カテゴリー変数) はフィッシャーの正確確率検定を用いて死廃率の差の検定を行った。

これらの統計分析は実験 1 と同様に, R Version 2.10.1 を用いて実施し, Rcmdr (舟尾, 2007) および MASS パッケージを併用した。乳汁からの分離菌数は, 事前に常用対数に変換して行った。ワクチン接種牛と非接種牛の転帰 (治癒, 死亡または廃用) の比較は, フィッシャーの正確確率検定を用いて行った。検定の結果は $P < 0.05$ を有意と判断した。

結果

(1) 症例の概要

甚急性および急性乳房炎と診断された症例は非接種牛 25 例，接種牛 31 例であり（表 2-4），非接種牛では 44%が死亡あるいは廃用となったが，接種牛ではその割合は 29%となった。しかし，これらの発生頭数に対する死亡・廃用頭数の割合は，接種牛と非接種牛との間に有意な差は認められなかった。

月別の ACM 発生頭数は，6 月が 13 例と最も多く，次いで 7，8 および 9 月に各 9 例であった（図 2-4）。6 月から 9 月の間に症例の 71%（40/56）が集中していた。死廃頭数は 6 月が 8 例と最も多く，次いで 8 月が 4 例であった。非接種牛と接種牛で発生時期の違いは認められなかった。

分娩後日数（分娩日から ACM 発生までの日数）では，分娩後 10 日以内の症例が全体の 14%（8/56）を占めており，最も多かったが，その後の発生頻度に大きな変化は認められなかった（図 2-5）

乳汁からの分離菌は，接種牛 25 頭および非接種牛 19 頭から *Klebsiella* sp.，接種牛 4 頭および非接種牛 3 頭から *E. coli*，接種牛 1 頭および非接種牛 2 頭から *Enterobacter* sp.，接種牛 1 頭および非接種牛 1 頭からその他のグラム陰性菌が分離された（表 2-5）。接種牛と非接種牛の間にはいずれの分離菌においても有意差は認められなかった。

56 例中 15 例（接種牛 10 例，非接種牛 5 例）が起立不能あるいは起立困難な状態であった。これらの起立に問題のあるウシは，体温，血清中 Ca 濃度が有意に低く，Ht，T-Bil，NEFA 濃度，および CK 活性値が有意に高かった。

(2) 血液および乳汁の検査項目とワクチン接種との関係

治癒牛において，ワクチン接種牛と非接種牛を比較すると，接種牛のワクチン抗体価が非接種牛に比べて有意に高く，接種牛の IgG 濃度が非接種牛に比べて有意に低かった（表 2-6）。また，死亡・廃用牛においても，接種牛のワクチン抗体価は，非接種牛に比べて有

意に高かった。その他の項目については、接種牛および非接種牛の間に有意な差は認められなかった。

非接種牛において、年齢および BUN は、治癒牛に比べて死亡・廃用牛のそれらが有意に高い値を示したが、接種牛では治癒牛と死亡・廃用牛の間に有意な差がなかった（表 2-6）。非接種牛において、PLT は治癒牛に比べて死亡・廃用牛のそれが有意に低い値を示したが、接種牛では治癒牛と死亡・廃用牛の間に有意な差はなかった。非接種牛および接種牛のいずれにおいても、死亡・廃用牛の T-Bil および乳汁中の分離菌数は治癒牛のそれらに比べて有意に高い値を示した。非接種牛において、治癒牛と死亡・廃用牛の間に血清中 CK 活性値および Hp 濃度に有意な差は認められなかったが、接種牛においては治癒牛に比べて死亡・廃用牛のそれらが有意に高い値を示した。

体温、WBC、Ca、NEFA、分娩後日数においては、接種牛および非接種牛いずれにおいても治癒牛と死亡・廃用牛の間に有意な差は認められなかった。

ワクチンプログラムの違いにより症例を分類すると、初夏に一斉接種したウシ（n=18）の死亡・廃用の割合は 11%となり、個体ごとに分娩前に接種したウシ（n=13）の死廃率 54% に比べて有意に低かった（表 2-7）。

ワクチン抗体価を、非接種牛と分娩前接種牛および初夏一斉接種牛とで比較すると、非接種牛よりも分娩前接種牛が有意に高い値であったが（図 2-6）、初夏一斉接種牛は分娩前接種よりもやや抗体価が低くなる傾向にあり、非接種牛と比べて有意差は認められなかった。

また、接種後日数を転帰で比較すると、分娩前接種および初夏一斉接種のいずれにおいても、治癒牛と死亡・廃用牛との間に有意な差は認められなかったが、治癒牛の接種後日数の中央値がやや低い傾向が認められた。（図 2-7）。

治療日数、治療回数、乳汁の状態（水様性か否か）、第一胃運動（停止しているか否か）、乳房の状態（腫脹の有無）、起立の可否、初回治療時の乳房への抗生物質投与の有無、初回治療時の全身への抗生物質投与の有無、乳汁からの分離菌の種類については、接種牛およ

び非接種牛いずれにおいても治癒牛と死亡・廃用牛との間に有意な差は認められなかった。

(3) ワクチン接種の有無と、血清中ワクチン抗体価、抗 J5 抗体価、IgG 濃度との関係

ワクチン接種牛は、非接種牛に比べて有意に高いワクチン抗体価および抗 J5 抗体価を示したが（図 2-8）、IgG 濃度は非接種牛に比べて有意に低かった。

表 2-4 ワクチン接種と ACM 発生後の転帰との関係

ワクチン	治癒牛頭数 (%)	死亡・廃用牛頭数 (%)	計
非接種牛	14 (56)	11 (44)	25
接種牛	22 (71)	9 (29)	31
計	36 (64)	20 (36)	56

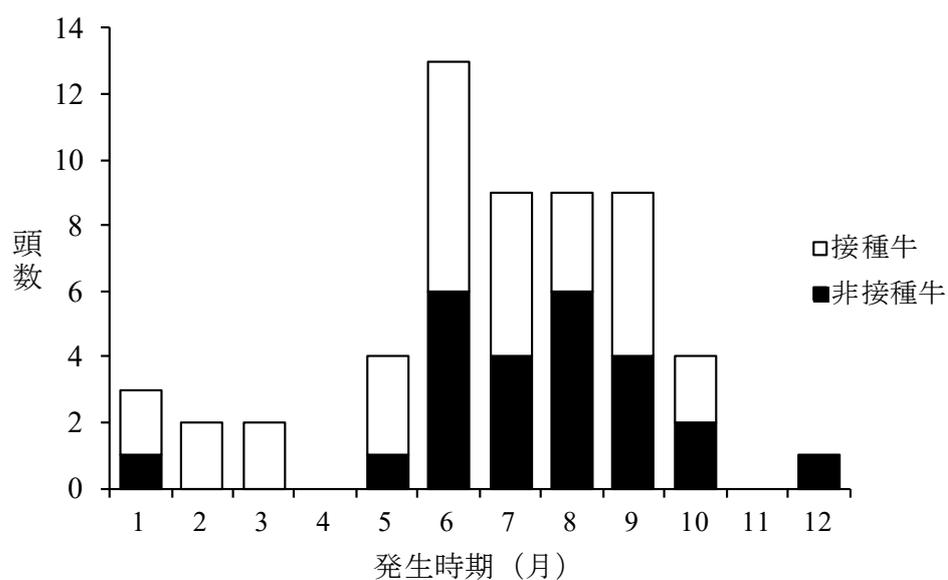


図 2-4 大腸菌性乳房炎の月別発生頭数

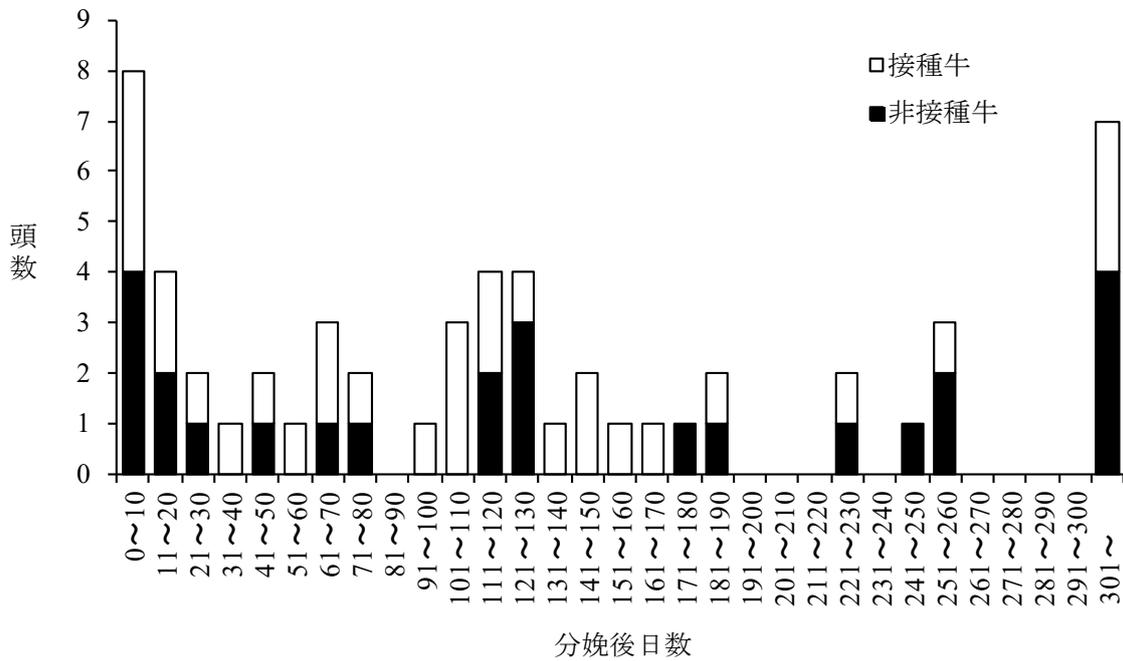


図 2-5 分娩後日数と大腸菌性乳房炎発生頭数との関係

表 2-5 乳汁から分離された菌の内訳

分離菌種	非接種牛頭数 (%)		接種牛頭数 (%)	
	治癒 n=14	死亡・廃用 n=11	治癒 n=22	死亡・廃用 n=9
<i>Klebsiella</i> sp.	11 (79)	8 (73)	19 (86)	6 (67)
<i>Escherichia coli</i>	2 (14)	1 (9)	2 (9)	2 (22)
<i>Enterobacter</i> sp.	1 (7)	1 (9)	1 (5)	0 (0)
その他のグラム陰性菌	0 (0)	1 (9)	0 (0)	1 (11)

表 2-6 初診時の臨床病理学的検査成績のワクチン接種の有無による比較

検査項目 ¹	非接種牛 n=25		接種牛 n=31	
	治癒 n=14	死亡・廃用 n=11	治癒 n=22	死亡・廃用 n=9
年齢 (歳)	4.2 ± 0.5	6.3*± 0.6	4.6 ± 0.4	5.6 ± 0.6
体温 (°C)	40.1 ± 0.2	40.0 ± 0.2	40.0 ± 0.2	40.0 ± 0.4
WBC (cells/μl)	3,414 ± 987	2,626 ± 758	3,959 ± 1,036	2,863 ± 637.5
PLT (×10 ⁴ /μl)	32.9 ± 4.1	16.6**± 2.6	30.6 ± 2.2	23.3 ± 2.4
Ca (mg/dl)	8.2 ± 0.3	7.8 ± 0.3	8.1 ± 0.3	7.7 ± 0.4
T-Bil (mg/dl)	0.37 ± 0.10	0.81* ± 0.17	0.35 ± 0.04	0.57*± 0.11
BUN (mg/dl)	16.1 ± 1.2	21.7*± 2.0	20.0 ± 1.6	21.9 ± 0.9
NEFA (μEq/l)	344.3 ± 95.3	538.4 ± 78.0	377.3 ± 43.8	532.1 ± 112.4
CK (IU/l)	312.8 ± 114.1	539.5 ± 165.7	221.3 ± 19.5	500.9*± 224.9
Hp (μg/ml)	752.6 ± 236.3	1,004.2 ± 413.5	925.5 ± 178.2	1,919.8*± 468.9
乳汁中の生菌数 (log ₁₀ CFU/ml)	4.5 ± 0.4	5.7*± 0.3	4.1 ± 0.3	5.4*± 0.4
ワクチン抗体価 (%)	1.8† ± 0.3	2.4‡ ± 0.8	19.1 ± 6.2	20.3 ± 6.3
抗 J5 抗体価 (%)	15.8 ± 3.9	10.0 ± 2.5	30.8 ± 6.5	38.3 ± 16.0
IgG 濃度 (μg/ml)	332.9† ± 70.1	241.7 ± 63.5	175.4 ± 36.8	167.8 ± 45.6
分娩後日数	175.2 ± 37.2	131.2 ± 48.5	125.2 ± 26.6	116.1 ± 25.0
接種後日数	—	—	188.9 ± 44.4	270.3 ± 63.5
治療回数 (回)	4.5 ± 0.6	6.1 ± 1.3	6.3 ± 0.8	8.7 ± 0.8
治療期間 (日)	18.6 ± 4.7	11.9 ± 4.1	20.8 ± 4.6	14.0 ± 2.8

¹ WBC = white blood cell; PLT = platelet; Ca = 血清中 calcium 濃度; T-Bil = 血清中 total bilirubin 濃度; BUN = blood urea nitrogen 濃度; NEFA = 血清中 non esterified fatty acid 濃度; CK = creatine kinase 活性; Hp = 血清中 haptoglobin 濃度
数値は平均値 ± 標準誤差

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (治癒牛と死亡・廃用牛の間で有意差あり)

†: $P < 0.05$, ‡: $P < 0.01$ (非接種牛と接種牛の間で有意差あり)

表 2-7 ワクチンプログラムと急性大腸菌性乳房炎の転帰との関係

ワクチンプログラム	n	転帰	
		治癒牛頭数 (%)	死亡・廃用牛頭数 (%)
初夏一斉接種	18	16 (89)	2 (11 ^a)
分娩前接種	13	6 (46)	7 (54 ^b)

a,b: 異文字間に有意差あり ($P<0.05$, フィッシャーの正確確率検定)

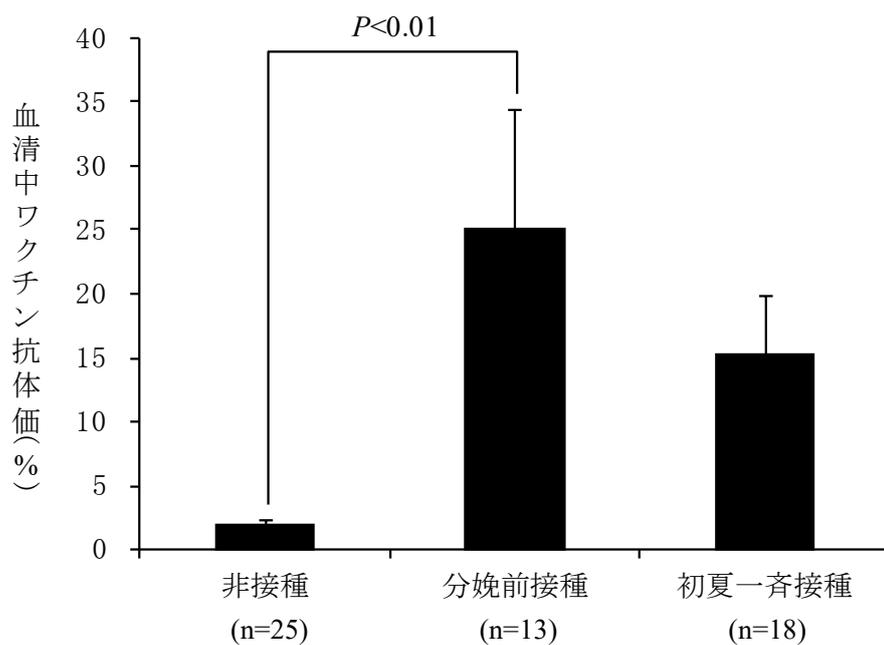


図 2-6 ワクチンプログラムによる血清中ワクチン抗体価の比較

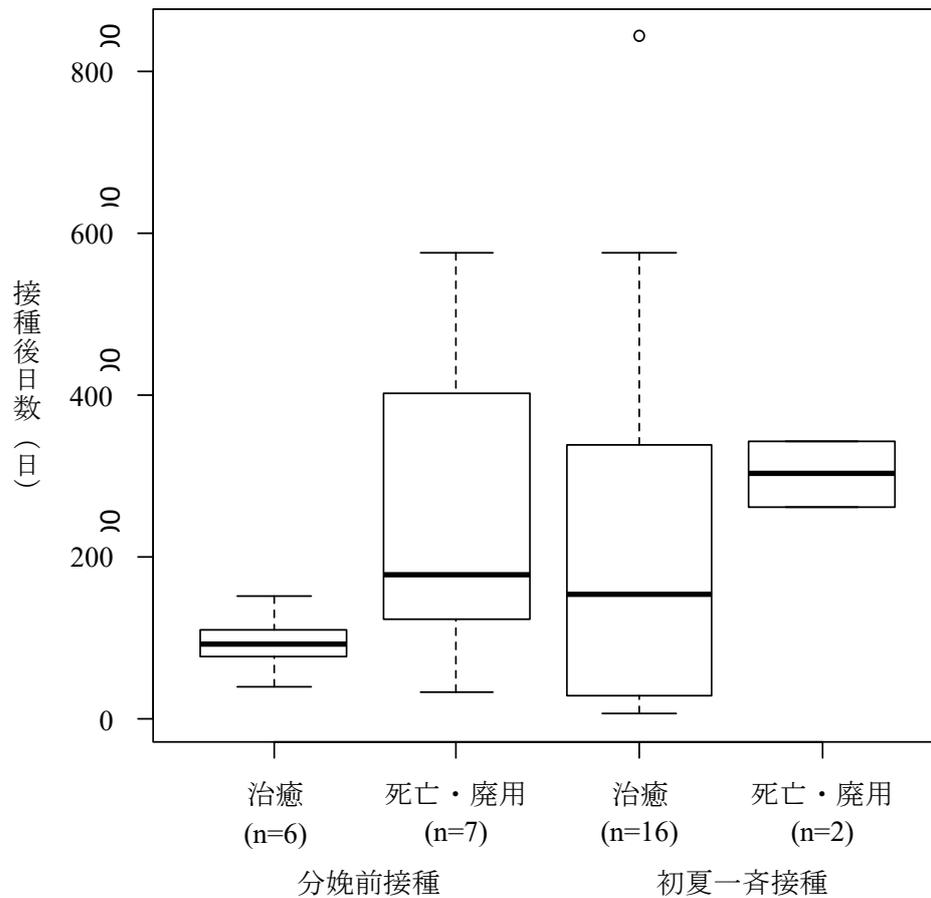


図 2-7 ETEC ワクチン接種後日数と転帰の関係

長方形の下辺：第 1 四分位数，上辺：第 3 四分位数，長方形の中の線：中央値，
 長方形の下辺から伸びる点線の先端：データ中，第 1 四分位数 $-1.5 \times \text{IQR}$ より大
 きいデータ点，長方形の上辺から伸びる点線の先端：データ中，第 3 四分位数 $+1.5 \times \text{IQR}$ より小さいデータ点，○：外れ値

$\text{IQR} = \text{第 3 四分位数} - \text{第 1 四分位数}$

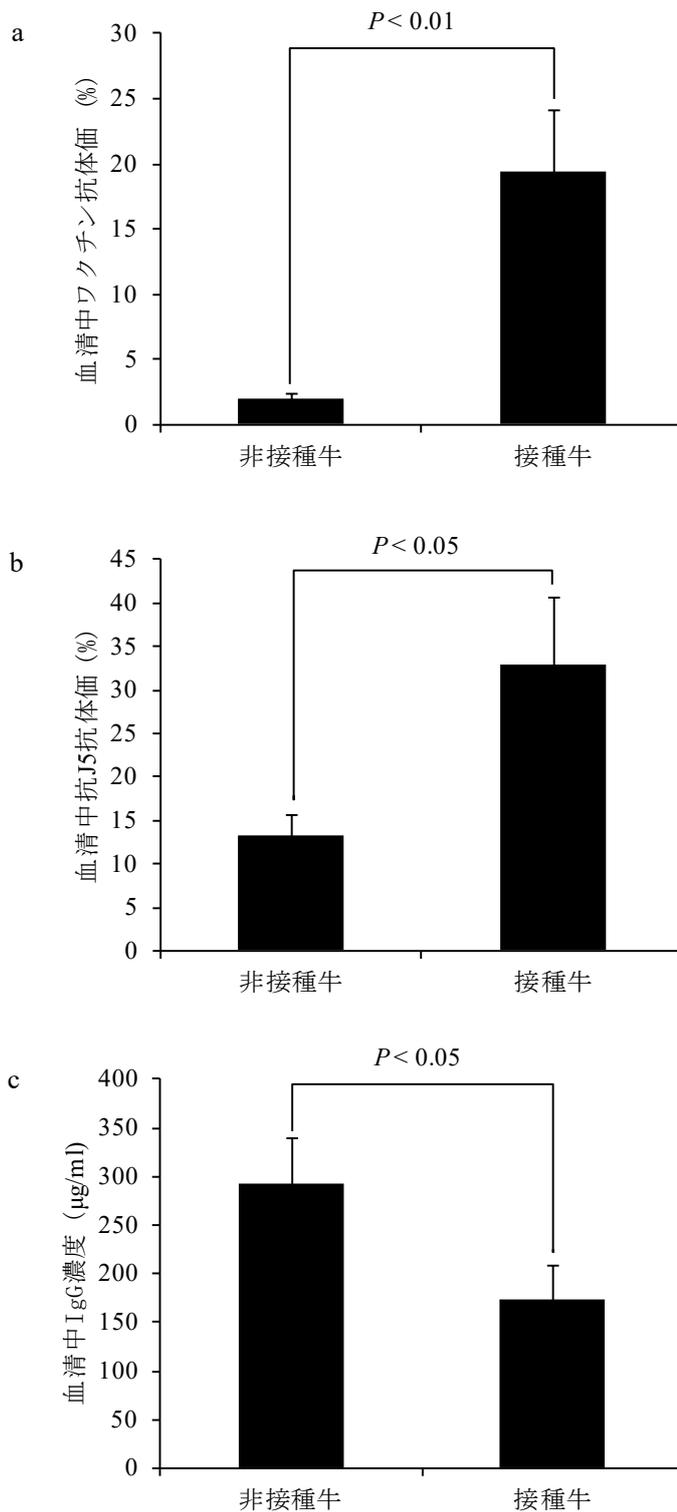


図 2-8 ワクチン接種の有無と初診時の血清中成分の比較

a: ワクチン抗体価, b: 抗 J5 抗体価, c: IgG 濃度

バーは平均値および標準誤差を示す

非接種牛 : n=25, 接種牛 : n=31

考察

本章では、ETEC ワクチンをウシに接種することにより、ウシの乳房炎発生率や、乳房炎発生時の転帰（治癒、死亡または廃用）にどのような影響を及ぼすのかを検討した。また、ワクチン接種の有無および転帰と関連する要因を検討し、ACM 発生牛の死廃率の低減方法を探った。

1. 大腸菌不活化ワクチンの接種が乳房炎発生率および死廃率に及ぼす影響

実験 1 において、ワクチン接種牛と非接種牛の間で、乳房炎および甚急性乳房炎の発生率に有意な差はなかった（表 2-1）。このことから、ETEC ワクチンは、乳房炎の発生を防ぐことはできないと考えられた。溝渕ら（1997）は、ワクチン接種農家の乳房炎発生率が非接種農家に比べて低かったと報告した。J5 ワクチンの場合は、González *et al.*（1989）が、J5 ワクチン接種は臨床型グラム陰性菌による乳房炎の発生率を下げると報告したが、Wilson *et al.*（2007a）は、J5 による免疫は臨床型乳房炎の全体的な減少には関与しないと報告した。これらの成績の違いは、Wilson *et al.*（2007a）が、調査対象をグラム陰性菌による乳房炎に限定しなかったことによるものと考えられた。本実験においても、グラム陰性菌による乳房炎に限定せず、全乳房炎の発生率を、非接種牛とワクチン接種牛とで比較した。したがって、発生率への影響を確認するためには、グラム陰性菌に限定した調査を行う必要があると考えられた。

実験 1 の 2007 年の結果から、ワクチン接種牛の甚急性乳房炎による死廃率は非接種牛に比べて有意に低かった（表 2-1）。また、ワクチン接種牛の生存曲線は非接種牛と有意に異なり、乳房炎発生牛の生存率は非接種牛よりも高く推移した（図 2-2）。Cox 回帰分析では、ワクチン接種の有無、年齢、および甚急性乳房炎発生の有無がパラメーターとして選択され、ワクチン接種のハザード比が 1 未満であったことから、ワクチン接種牛の死廃率が非接種牛に比べて低いことが示唆された。したがって、ETEC ワクチンは、乳房炎発生時の死廃率低減に有用であることが示唆された。溝渕ら（1997）は、ETEC ワクチン接

種農家の接種前3年間と接種開始後3年間とを比較し、接種後の乳房炎死廃率が有意に低かったことを報告しており、本実験の結果と一致していた。一方、2008年には、接種牛と非接種牛の間で乳房炎死廃率に有意差はなかった。乳房炎の原因菌の分離成績は2007年と2008年で有意な差がなかったことから（表2-3）、ウシをとりまく細菌的な環境は、2007年と2008年とで大きな違いは無かったと考えられた。一方、大腸菌による乳房炎の症状の重さは主にウシ側の要因によって決定される（Burvenich *et al.*, 2003）。したがって、本実験において2008年の死廃頭数が少なかった事が、ウシ側の要因により引き起こされたのかもしれない。農家AおよびCでは、2008年の試験は2007年の試験で生き残ったウシと、新たに供試牛に加わった初産牛を使って行われたため、これらのウシが乳房炎の症状を悪化させていく性質を持っていたために、2008年の死廃率が接種牛と非接種牛で有意差がなかった可能性も考えられた。

一方、実験2では、ETECワクチン接種牛の死廃率が29%であり、非接種牛の死廃率44%に比べて低い傾向にあったが、有意な差ではなかった（表2-4）。野村（1986）は、グラム陰性菌による甚急性乳房炎の30%が死亡または廃用になったと報告しており、本実験の死廃率36%（20/56）は、それよりもやや高い値であった。実験2において、接種牛と非接種牛との間で死廃率に有意な差が見られなかった原因として、治療法や農場、ワクチンプログラムの違いが転帰に影響したことや、重症例が多かった等、症例の収集に偏りがあつた可能性が考えられた。特に、ワクチンプログラムの違いにより死廃率に有意差が生じていたことから（表2-7）、影響が大きかったことが示唆された。

2. ワクチン接種の経済効果（費用対効果）の推定

ワクチン接種の妥当性を判断する目安となるのは、ETECワクチンの費用対効果である。その効果の推定的前提条件を、1頭のウシが分娩直後に死亡し、当該牛の生乳出荷による収入が皆無であり、その代替として初妊牛（未経産の妊娠牛）を新たに導入すると定義した。死亡したウシが、もし死亡しなければ分娩後305日間搾乳できたと仮定した。

算定に用いた数値は、生乳の販売価格：90 円/kg，305 日間乳量：9,720 kg（平成 21 年度牛群検定成績における広島県の平均乳量），飼料費：1,300 円/日，代替初妊牛導入費：510,000 円（ホクレン家畜市場価格，2012 年 6 月），ETEC ワクチン接種費用：3,140 円（1,570 円×2，広島県家畜畜産物衛生指導協会），死亡牛処理料：20,000 円，家畜共済掛金：48,000 円，家畜死亡時の共済金：203,500 円（広島県農業共済組合連合会平成 23 年度平均）である。

搾乳牛 1 頭が分娩直後に死亡したと仮定すると，その後 305 日間に搾乳されるはずであった生乳の価値は，90 円/kg × 9,720 kg = 874,800 円である。一方，その間の飼料代が必要ないため，1,300 円/日 × 305 日 = 396,500 円のコストが減少する。また，死亡・廃用牛の処理費用 20,000 円と家畜共済掛金 48,000 円を加算し，共済金 203,500 円を差し引くと，合計で 342,800 円マイナスとなる。さらに，代替初妊牛を導入したとすると 510,000 円がかかるが，この牛が 305 日間生乳を生産したとすると，874,800 円の収入をもたらす。この間の飼料代が 396,500 円かかり，家畜共済掛け金の 48,000 円を加算すると，422,500 円の損失になる。

次に，2007 年の結果から，ワクチン接種牛の乳房炎死廃率は 7.4%，非接種牛は 29.2% であった（表 2-1）。したがって，ワクチンを接種したことにより，死亡・廃用のリスクは，7.4 (%) ÷ 29.2 (%) ≒ 0.25 すなわち，0.25 倍になると考えられた。ワクチンの接種費用は一頭あたり 3,140 円である。飼養頭数を a，乳房炎発生率を b，ワクチン非接種時の乳房炎発生牛の死廃率を c とすると，ワクチンを接種した場合の死廃率は，c×0.25 となる。b はワクチン接種牛と非接種牛の間に差がなかったことから，同じ値を用いる。左辺にワクチン非接種時に生じる損失，右辺にワクチン接種時に生じる損失をおくと，以下の条件を満たせばワクチン接種のメリットが生じる計算になる。

$$a \times b \times c \times 422,500 > a \times b \times c \times 0.25 \times 422,500 + 3,140 \times a$$

$$b \times c \times (1 - 0.25) \times 422,500 > 3,140$$

$$b \times c > 0.0099$$

したがって，飼養頭数に占める年間の乳房炎死廃頭数の割合が 1% 以上になる酪農家で

あれば、ワクチン接種のメリットが生じる計算になった。

3. ETEC ワクチン抗体および抗 J5 抗体が ACM の転帰に及ぼす影響

ETEC ワクチンは 6 株の *E. coli* から成り、それらは K99 (F5), FY (F17), CS31A といった付着因子を有する株と、O78 の不活化菌体を含んでいる。ETEC ワクチンの接種に伴い、血液中にワクチン特異的抗体がつくられ、初乳中に分泌される。グラム陰性桿菌の細胞壁を構成する LPS は、多糖側鎖 (O 抗原), R コア多糖, リピド A から成る (図 1-2; 平田, 2002)。R コア多糖はグラム陰性菌の間で相互に違いが少ないとされ、抗 J5 抗体は R コア多糖に対する抗体を含むことから、菌種の異なるグラム陰性菌由来の LPS とも交差反応を示す (Tyler *et al.*, 1992)。

実験 2 において、ワクチン接種牛は非接種牛に比べてワクチン抗体価および抗 J5 抗体価が有意に高い値を示した (図 2-8)。ETEC ワクチンと J5 は血清学的に交差することが確かめられていることから (森本ら, 2009), ETEC ワクチンを接種した場合であっても、抗 J5 抗体が産生されることが示唆された。しかし、ETEC ワクチンは J5 の血清型である O111 を含んでいないため、ワクチン接種牛における抗 J5 抗体には、ETEC ワクチンの、O 抗原以外の抗原に対する抗体が含まれていると考えられた。また、J5 は多様なグラム陰性菌と交差反応を示すことが知られており (Tyler *et al.*, 1991; Tomita *et al.*, 1995), 抗 J5 抗体価は、そのウシのグラム陰性菌による感染歴を反映している可能性が考えられた。しかし、ワクチン抗体価および抗 J5 抗体価は、いずれも治癒牛と死亡・廃用牛の間に有意な差が認められなかったことから (表 2-6), 抗体価の多寡と ACM の転帰との関連は認められなかった。

4. ETEC ワクチンの接種が乳量に及ぼす影響

実験 1 では、酪農家 A において、接種牛と非接種牛との乳量の比較を経産牛を用いて行ったところ、両者に有意差はなかったが、接種牛の乳量が多くなる傾向が認められた。

Wilson *et al.* (2008) は、J5 ワクチンを接種されたウシは、分娩後 50 日間、大腸菌性乳房炎発生後 21 日間の乳量損失が対照牛に比べて有意に少なかったと報告した。本実験では 1 つの農家の結果だけなので、さらに多くの農家を対象にしてデータを集計し比較する必要がある。

5. ACM 発生牛の転帰に影響を及ぼす要因の解析

実験 2 において、ACM の症例を ETEC ワクチン接種牛と非接種牛とに分け、それぞれの測定値、臨床症状および治療方法等を治癒牛と死亡・廃用牛とで比較した (表 2-6)。その結果、年齢および PLT は、非接種牛では治癒牛と死亡・廃用牛の間で有意差が認められたが、接種牛では有意差がなかった。また、BUN、CK および Hp は、接種牛では治癒牛と死亡・廃用牛の間に有意差があったが、非接種牛では有意差がなかった。このように、治癒牛と死亡・廃用牛の間に有意差が認められた因子には、ワクチン接種、非接種間で違いが認められた。したがって、ETEC ワクチンの接種が、これらの項目に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(1) 年齢

非接種牛において、治癒牛に比べて死亡・廃用牛の年齢が有意に高かった (表 2-6)。Van Werven *et al.* (1997) は、2, 4, 5 産の乳牛 12 頭を供試し、乳房内に *E. coli* を注入して、乳汁中の生菌数の推移と非感染分房の乳量で症状の重篤度を評価した。その結果、産次数が乳汁中の生菌数と乳量の減少に関連し、産次数の多いウシは ACM 発生後の乳汁中の生菌数が多く、乳量が顕著に低下すると報告した。産次数は年齢と関連があり、年齢が高いほど ACM の症状が重くなると解釈できることから、今回の成績と同様であったと考えられた。しかし、ワクチン接種牛では、治癒牛と死亡・廃用牛の間で年齢に有意差が認められなかったことから、ワクチン接種により高齢のウシの転帰が改善されていることが示唆された。高齢のウシは、ACM に対して、より感受性が高いことが知られている (Smith *et al.*,

1985; Hogan and Smith, 2003) ことから、ETEC ワクチンの接種は若齢のウシに比べて高齢のウシの方がより効果的であると考えられた。

(2) 血小板数 (PLT)

非接種牛において、治癒牛に比べて死亡・廃用牛の PLT が有意に低かった (表 2-6)。ACM の症例において、血小板減少症が起きることが知られている (初谷ら, 1990; Ohtsuka *et al.*, 2001; 和田ら, 2001; Ismail and Dickinson, 2010; Hisaeda *et al.*, 2011)。ACM においては、グラム陰性菌から放出されたエンドトキシンが血小板を活性化し、血管内皮に白血球と血小板を凝固させ、微小血管に血栓を形成して播種性血管内血液凝固 (Disseminated intravascular coagulation; DIC) を発症し、それに伴って凝固因子が消費されるために血小板減少症などが起きると考えられる (高橋, 1993; Ismail and Dickinson, 2010)。今回認められた、PLT の数と ACM の症状の重さの相関性は既報と同様であり、重症例の PLT の値が軽症例に比べて有意に低い値であったと報告されている (Ohtsuka *et al.*, 2001; Hisaeda *et al.*, 2011)。一方、久枝ら (2010) は、大腸菌群による甚急性乳房炎の症例を治癒牛群と死亡牛群に分け、血液検査結果を比較したところ、血小板数には、有意な差は認められなかったと報告した。

Ismail and Dickinson (2010) は、*E. coli* による ACM が発生したウシの血液凝固系の機能検査を実施したところ、活性化部分トロンボプラスチン時間およびプロトロンビン時間の有意な延長と、血小板数の有意な減少が認められたことから、供試牛が DIC を発症していたと報告した。プロトロンビン時間の延長は、血液凝固因子の消費の増加により生じる。したがって、実験 2 で非接種牛の症例において認められた血小板の減少は DIC の発症を示唆すると考えられ、DIC の発症と転帰 (治癒, 死亡・廃用) との関連性が疑われたが、PLT 以外の血液凝固機能検査を実施していないため、明確に DIC と診断することはできなかった。一方、ワクチン接種牛では、治癒牛と死亡・廃用牛の間で PLT の値に有意な差は認められなかった。このことから、ワクチン接種牛では血液凝固系の異常が緩和された可能性

が示唆された。

(3) 総ビリルビン (T-Bil)

ビリルビンはそのほとんどが組織でのヘモグロビンの破壊により生じ、大部分は肝臓でグルクロン酸と抱合する (三木, 2011)。T-Bil は、非抱合型ビリルビンと抱合型ビリルビンの合計であり、高い T-Bil 濃度は、肝機能の低下あるいは溶血の指標の一つである (井谷・足立, 2007)。死亡・廃用牛および治癒牛の値は、いずれも正常範囲から大きく逸脱するものではなかったが、死亡・廃用牛の平均 T-Bil 濃度は治癒牛に比べて有意に高い値を示したことから (表 2-6)、肝機能の低下と ACM の重症化との関係が示唆された。このような、治癒牛に比べて死亡・廃用牛の値が有意に高いという結果は、既報に一致していた (Wenz *et al.*, 2001a)。

(4) 血液尿素窒素 (BUN)

BUN は血液中の尿素の量を示す。反芻動物においては、第一胃でタンパク質やアミノ酸等が分解されてアンモニアを生成し、一部は胃壁から吸収されて肝臓へ行き、肝臓で尿素を生成し、尿素は腎臓から尿中へ排泄される。BUN は、タンパク質飼料を多給した場合や、腎機能異常の際に濃度が上昇するが、ACM 発症牛では発熱が認められることが多く、このことにより BUN の値が上昇した可能性が考えられた (全国農業共済協会, 2005)。また、ACM においては、循環障害により腎臓の血流量が減り、腎臓からの尿素の排泄が滞ることにより上昇するという考え方もある (山本, 2006)。E. coli による乳房炎を発症したウシで BUN 濃度が上昇することが知られており (Hirvonen *et al.*, 1999; Ismail and Dickinson, 2010)、ACM の症状の重さに関連することも報告されている (Hirvonen *et al.*, 1999; 和田ら, 2001)。実験 2 でも、非接種牛では死亡・廃用牛の BUN が治癒牛のそれに比べて有意に高い値を示したことから (表 2-6)、BUN と ACM の重篤度は関係していることが示唆された。一方、ワクチン接種牛では両者間に有意差は認められなかったが、死亡・廃用牛の平

均値が接種牛と非接種牛とではほぼ等しいのに対して、接種牛における治癒牛の平均値は、非接種牛における治癒牛のそれより高くなっていた。つまり、接種牛で有意差が現れなかった原因は、死亡・廃用牛のBUNが低かったためではなく、治癒牛のBUNが高かったためと考えられた。治癒牛のBUNが高くなった原因は不明だが、ワクチン接種牛におけるBUNの診断的価値についてはさらに検討する必要がある。

(5) 乳汁中の生菌数

乳汁中の生菌数が乳房炎の症状の重さに関係していることはこれまでも報告されていた (Hirvonen *et al.*, 1999; Shuster *et al.*, 1996; Vandeputte-van Messom *et al.*, 1993; Wenz *et al.*, 2001a; Lohuis *et al.*, 1990b; Burvenich *et al.*, 2003)。この所見は、ACMの初期に病原菌を排除することが、症状の重さと転帰に影響することを示唆していた (Hill, 1981; Vandeputte-van Messom *et al.*, 1993)。実験2において、ワクチン接種牛および非接種牛いずれにおいても、死亡・廃用牛の乳汁中の生菌数は治癒牛に比べて有意に高い値であり (表2-6)、初診時の乳汁中の生菌数とその後の転帰に関係していることが示唆された。

以上のように、ETECワクチン非接種牛の転帰と各測定値との関係は、既報とほぼ同様であり、年齢、PLT、T-Bil、BUNおよび乳汁中の生菌数が、ACMの転帰に関係していることが示唆された。PLT、T-BilおよびBUNは、家畜診療所で日常的に測定される項目である。ACMの重篤度を客観的数値から判断することは、適切な治療と管理方法を決定する上で有用と考えられる (Burvenich *et al.*, 2003)。

ETECワクチン接種牛においては、T-Bil、CK、Hpおよび分離菌数の平均値に、治癒牛と死亡・廃用牛の間で有意差があり、いずれも治癒牛に比べて死亡・廃用牛の値が有意に高かった (表2-6)。

(6) creatine kinase (CK)

CKは筋肉中や脳に多く含まれる酵素で、血液中のCK活性値が高い場合、筋肉の障害

が疑われる（高木，2007）。和田ら（2001）は，グラム陰性菌が分離された急性乳房炎の症例を調査し，予後不良群と回復群に分けて血液化学検査所見を比較した。その結果，予後不良群の CK 活性値が回復群に比べて有意に高かったと報告しており，今回のワクチン接種牛における結果と同様であった。今回の症例のうち，起立不能に陥っていたウシが，起立可能なウシに比べて有意に高い CK 活性値を示したことから，起立不能となったウシの脚部などの筋肉が体重で圧迫され，損傷したことがその一因ではないかと考えられた。

(7) haptoglobin (Hp)

Hp は急性期タンパクの一種で，急性感染症などの際に血液中に現れる。急性期タンパクには，Hp の他に，C-reactive protein, serum amyloid A, α 1-acid protein 等が知られている。Hp は反芻動物における主要な急性期タンパクであり，乳房炎における有効な指標とされている（Eckersall and Bell, 2010）。Hp は，乳房炎のウシにおいて，炎症反応の発生と重篤度を測るための臨床上有益なパラメーターと考えられている（Murata *et al.*, 2004; Suojala *et al.*, 2008）。実験 2 で，ワクチン接種牛における治療牛と死亡・廃用牛の間で Hp 濃度に有意な差が認められたが，非接種牛では両者間に有意差は認められなかった（表 2-6）。したがって，ワクチン接種により，Hp が指標となる炎症が治療牛と死亡・廃用牛とで明瞭になるのかもしれない。Hisaeda *et al.* (2011) は，自然発生の *Klebsiella pneumoniae* 乳房炎を発症したウシから得られた血清と乳清中の Hp 濃度を測定し，これらが疾病の重さを反映していることを報告しており，今回の接種牛の結果と同様であった。

(8) 白血球数 (WBC)

ACM の症例において，白血球減少症が見られることが知られている（初谷ら，1990; Ohtsuka *et al.* 2001; Wenz *et al.* 2001a; DeGraves and Anderson, 1993; 久枝ら，2010）。白血球減少症は，血液中の白血球（主に好中球）が乳房内へ大量に動員されるために起きると考えられている。Ohtsuka *et al.* (2001) は，ACM 症例を全身および乳房の炎症反応の程度に

より重症例と軽症例に分類し、WBCの減少はACMの症状の重さを反映していたと報告した。一方、久枝ら(2010)は、大腸菌群による甚急性乳房炎の症例を治癒牛群と死亡牛群に分け、血液検査結果を比較したところ、WBCには有意な差が認められなかったと報告した。Wenz *et al.* (2001a)はJ5ワクチン接種牛を供試し、ACMの症例を、直腸温度、脱水の程度、第一胃の収縮、活力の程度により、軽症、中程度、重症の3つに分類して比較したところ、軽症例のWBCは、中程度および重症例のそれらと比べて有意に高い値を示したが、48時間後には3者間に有意差はなかったと報告した。しかし、実験2では、ワクチン接種牛および非接種牛のいずれにおいても、治癒牛と死亡・廃用牛の間でWBCに有意差はなかった(表2-6)。本研究では転帰を重篤度の指標としたが、Ohtsuka *et al.* (2001)やWenz *et al.* (2001a)は、全身症状をもとに重篤度を決定していたため、このような違いが生じたのかもしれない。したがって、ACM初診時のWBCは、治療効果や病勢の確認手段とはなりえても、それらの転帰と直接的には関連しない可能性が考えられた。

(9) calcium (Ca)

ACMの症例において、低カルシウム血症が見られることが知られている(DeGraves and Anderson, 1993; Wenz *et al.*, 2001a; 久枝ら, 2010)。一方、ウシの静脈内へのエンドトキシン投与(Griel *et al.*, 1975)や、ウマの静脈内へのエンドトキシン投与(Toribio *et al.*, 2005)、敗血症患者(Zaloga *et al.*, 1988)、ブタのエンドトキシンショック(Carlstedt *et al.*, 2000)においても低カルシウム血症が起きることが報告されている。血中Ca濃度は、主に副甲状腺ホルモン(PTH)、活性ビタミンD₃、カルシトニンによりコントロールされ、腸管からのCa吸収、便および尿中へのCa排泄、骨への貯蔵などを介して一定の範囲に維持されている(多久和, 2011)。また、血液凝固系もCaイオンが重要な役割を果たしていることから、DICの進行と低カルシウム血症の関連も考えられる。その他、エンドトキシンにより細胞外から細胞内へカルシウムイオンが流入すると報告されている(坂口, 2004)。ACMがこれらのいずれかに影響した結果、血清中Ca濃度の低下が生じたと考えられるが、こ

れまでのところ機序はよくわかっていない (Wang *et al.*, 2006)。Wenz *et al.* (2001a) は、ACM の症例を全身症状の重さの違いによって軽症、中程度、重症に分類したところ、初診時および 48 時間後の Ca の値は、軽症例は中程度および重症と比べて有意に高い値を示したが、中程度と重症との間には有意な差がなかったと報告した。一方、久枝ら (2010) は、愛媛県内において収集した大腸菌群による甚急性乳房炎の症例を治癒牛群と死亡牛群に分け、血液検査結果を比較したところ、死亡牛群の Ca 濃度が治癒牛群に比べて有意に低かったと報告した。本実験においては接種牛と非接種牛いずれにおいても治癒牛と死亡・廃用牛の間で血清中 Ca 濃度に有意差が無く (表 2-6)、転帰を予測する指標とはならなかった。

実験 2 では、非接種牛の年齢および PLT は治癒牛と死亡・廃用牛の間で有意差が認められたが、ワクチン接種牛では、両者間に有意差はなかった (表 2-6)。このことから、ETEC ワクチン接種牛の症状の重さを評価する際は、年齢および PLT は慎重に扱う必要があると考えられた。すなわち、ETEC ワクチンの接種を受けた高齢牛の ACM 症例において、PLT の低下が顕著でない場合、治癒すると予測されるかもしれないが、接種牛の転帰と関連が認められた、乳汁中の生菌数、CK 活性値および Hp 濃度が高ければ、死亡あるいは廃用に至る可能性があると思われる。乳汁中の生菌数および Hp 濃度は、家畜診療所の通常の検査では測定されていないが、ワクチン接種牛については重要な測定項目であると考えられた。また、乳汁中の生菌数を速やかに減少させることで、死廃率をさらに低下させられる可能性が考えられた。

ワクチン接種牛の血清中 IgG 濃度は、非接種牛に比べて有意に低かった (図 2-8c)。この原因は不明だが、考えられる原因として、ワクチン接種により IgG 全体に占めるグラム陰性菌特異的 IgG の割合が増加し、それが ACM 感染に伴う乳房内への漏出や、菌体に対するオプソニン化のために消費されて接種牛の IgG 濃度が低下したが、非接種牛ではグラム陰性菌特異的 IgG の割合が少なく、あまり消費されなかった可能性が考えられた。

6. ETEC ワクチンの接種プログラムと ACM の転帰との関係

実験 2 において、初夏に ETEC ワクチンを一斉接種したウシが ACM を発症した際の死廃率は、分娩 1 ヶ月前に接種したウシに比べて有意に低かった（表 2-7）。一方、ワクチン接種後日数を治癒牛と死亡・廃用牛で比較すると、有意な差ではないが、死亡・廃用牛の中央値は治癒牛よりも高かった（図 2-7）。ACM の発生率は冬に比べて夏に高いと報告され（Smith *et al.*, 1985; 野村, 1986; Todhunter *et al.*, 1991; 安里ら, 2005; Olde Riekerink *et al.*, 2007）、今回供試した症例も、6 月から 9 月の間に 71% が発症していた（図 2-4）。したがって、初夏にワクチンを接種したことでワクチン接種から ACM 発症までの期間が短くなり、症状軽減効果が強く現れ、結果的に治癒した症例の割合が高かったのではないかと考えられた。このことから、ETEC ワクチンの死廃率低減効果は、ワクチン接種後比較的短期間しか持続しないと考えられた。そのためワクチン接種は、初夏、とりわけ 5 月までに実施するのが望ましいと思われた。広島県における乳牛の分娩間隔は平均 445 日である（平成 21 年度乳用牛群検定成績）。したがって、分娩前接種の場合、ワクチンの接種間隔は平均 445 日になると考えられる。ETEC ワクチンの効果がそれ以上長く持続するのであれば、分娩前接種と初夏一斉接種とで、死廃率に有意差は生じないと考えられるが、実際には初夏一斉接種の死廃率が有意に低かった。したがって、ETEC ワクチンの効果の持続は少なくとも 445 日未満であると考えられた。本実験における接種後日数の平均が、治癒牛が 188.9 ± 44.4 日、死亡・廃用牛が 270.3 ± 63.5 日であったことを考慮すると（表 2-6）、持続期間は 6~7 ヶ月程度かもしれない。したがって、年間を通じてワクチンの効果を發揮させるためには、年 1 回接種では不十分な可能性が考えられた。

函城ら（1980）は、兵庫県淡路地方における壊疽性乳房炎の発生状況に関して、年間を通じて発生が見られたと報告した。函城らの調査は、グラム陰性菌以外に黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、レンサ球菌およびコリネバクテリウムなどのグラム陽性菌による乳房炎も含んでいるが、個々の酪農家で、ACM の発生する時期が異なっていた可能性も考えられた。また、野村（1986）は、グラム陰性菌による甚急性乳房炎の 67% が分娩後 7 日以内

に発生していたと報告し、函城ら（1980）も、壊疽性乳房炎の 81.3%が分娩後 7 日以内に発生していたと報告したが、実験 2 の症例では、分娩後 10 日以内の発生は 14%であり、分娩直後の発生が既報と比べて少なかった（図 2-5）。このことが、初夏一斉接種の死廃率が低かったことに関連している可能性がある。したがって、農家や地域により発生状況が異なる可能性があるため、事前に調査した上で、ACM が多発する時期にあわせたワクチンプログラムを選択するのが望ましいと考えられた。

ETEC ワクチンを分娩前に接種する場合、個々のウシの分娩に合わせて 1 頭ずつ接種することになるが、初夏一斉接種の場合、接種対象となるウシに一度に接種できることから、省力的と考えられる。また、分娩間隔が開いた際にも接種間隔が開くことがなく、接種もれも生じにくくなると考えられる。また、接種の際には分娩前の乾乳牛もしくは未経産牛も接種することにより、最も発症リスクが高い夏季に分娩を迎えるウシの乳房炎死廃事故を防ぐことができると考えられた。

ワクチン抗体価を、非接種牛と分娩前接種牛および初夏一斉接種牛とで比較すると、非接種牛と分娩前接種牛の比較では分娩前接種牛が有意に高い値であったが（図 2-6）、非接種牛と初夏一斉接種牛との比較では抗体価に有意な差はなかった。このことから、初夏一斉接種牛の下痢予防効果について、さらに検討が必要と思われた。

以上のように、ETEC ワクチンを投与すると、乳房炎の発生自体は変化しないが、それによる死廃率は低下させられることが明らかになった。また、いくつかの血液中の成分および乳汁中の生菌数を調べることにより、乳房炎発生後の症状の悪化を予想できる可能性が示唆された。さらに、ワクチン接種は、ウシ個体ごとに分娩前に接種するよりは、初夏に全頭一斉に実施することが効果的と考えられた。

要約

本章では、大腸菌ワクチン（ETEC ワクチン）の接種が、ウシの乳房炎の症状や転帰に及ぼす影響を明らかにし、ワクチン接種の有効性について検討することを目的とした。

1. 大腸菌不活化ワクチンの接種が乳房炎発生率および死廃率に及ぼす影響

2007 年は 4 戸 273 頭、2008 年は 3 戸 207 頭のホルスタイン種乳牛を供試し、農家ごとに飼養牛の約半数に ETEC ワクチンを接種し、残りのウシには接種しなかった。その後 1 年間、乳房炎の発生率や乳房炎発症牛の死亡・廃用の割合を調べた。また、著しい全身症状を伴うものを甚急性乳房炎とした。2007 年に 1 戸と、2008 年に 3 戸の農家において、乳汁から原因菌の分離を行った。2007 年および 2008 年の 2 年間、1 戸の農家において、月 1 回の牛群検定成績をもとに、2 産以上のウシを対象に泌乳量を調査し、4%脂肪補正乳量に変換してワクチン接種牛と非接種牛とを比較した。2007 年の成績において、乳房炎発生率および甚急性乳房炎発生率には差が認められなかったが、ETEC ワクチン接種牛の生存曲線は非接種牛とは有意に異なり、生存率が高かった。2007 年における甚急性乳房炎発症牛の死廃率は、接種牛が非接種牛に比べて有意に低かった。2008 年においては、乳房炎および甚急性乳房炎の発生率および死廃率いずれにも接種牛と非接種牛の間に有意な差は認められなかった。泌乳量は、ワクチン接種牛と非接種牛の間に有意な差は認められなかったものの、接種牛の方が多くなる傾向が認められた。乳汁からの分離菌は、2007 年および 2008 年のいずれにおいても、グラム陰性菌の分離率は、接種牛と非接種牛の間で有意な差は認められなかった。ワクチン接種牛と非接種牛の死廃率をもとにワクチンの経済効果を計算すると、飼養頭数に占める年間の乳房炎死廃頭数の割合が 0.8%以上になる場合に、ワクチン接種のメリットが生じると計算された。

2. 大腸菌不活化ワクチンの接種が大腸菌性乳房炎発生牛の血液成分および乳汁中生菌数に及ぼす影響の解析

家畜診療所の獣医師が診察した臨床型乳房炎のうち、乳汁中から腸内細菌が分離された56例を供試し、初診時の臨床病理学的検査成績、その後の転帰を調査した。また、初診時に採取された血清を用いて様々な成分、haptoglobin濃度(Hp)、ワクチン抗体価、抗J5抗体価、IgG濃度を測定した。56例中、31例がワクチン接種牛、25例が非接種牛であった。接種牛の死廃率は29%(9/31)で、非接種牛の44%(11/25)と比べて有意な差は認められなかった。月別の発生頭数は、6月が13頭と最も多く、6月から9月の間に全体の71%(40/56)が発生していた。また、ACM発症時の分娩後日数は、分娩後10日以内の発症が14%と最も多かった。初診時の臨床病理学的検査成績と転帰との関係を、ワクチン非接種牛および接種牛それぞれについて比較すると、ワクチン非接種牛では、死亡・廃用牛の年齢、T-Bil、BUNおよび乳汁中の生菌数が治癒牛に比べて有意に高く、死亡・廃用牛のPLTが治癒牛に比べて有意に低かった。ワクチン接種牛では、死亡・廃用牛のT-Bil、CK、Hpおよび乳汁中の生菌数が治癒牛に比べて有意に高かったが、年齢およびPLTについては両者の間に有意差はなかった。ワクチン接種牛は、非接種牛に比べて血清中ワクチン抗体価および抗J5抗体価が有意に高かったが、血清中IgG濃度は有意に低かった。また、ETECワクチンの接種プログラムは、初夏に一斉接種したウシの方が、個体ごとに分娩前に接種したウシに比べて死亡・廃用牛の割合が有意に低かった。これらのことから、乳房炎発生後の転帰は、総ビリルビン濃度や乳汁中の生菌数を指標にすることにより、予測することが可能と考えられた。また、大腸菌性乳房炎を予防するには、個別にワクチン接種を行うのではなく、5月までに全頭一斉にワクチンを接種することが望ましいと考えられた。

本章の結果から、ETECワクチンを乳牛に接種することにより、乳房炎発生率には影響を及ぼさないが、乳房炎発生時の死廃率を低下させることが可能と考えられた。また、ワクチン接種プログラムについては、ワクチン本来の用法である分娩前接種よりも、初夏に一斉に接種する方が死廃率低減に有効であることが示唆された。

第3章 大腸菌不活化ワクチンの接種がLPSを注入したウシ乳房の自然免疫機能に及ぼす影響

緒言

第2章において、下痢を予防する目的で作られた毒素原性大腸菌 (enterotoxigenic *E. coli*; ETEC) 不活化ワクチンの接種により、乳房炎による死亡または廃用になるウシの割合は減少傾向にあり、甚急性乳房炎が発生したウシの死廃率は有意に低下した。また、急性大腸菌性乳房炎 (ACM) の症例において ETEC ワクチン接種牛と非接種牛を比較したところ、非接種牛では、ACMにより死亡・廃用となったウシは治癒したウシに比べて年齢、T-Bil, BUN, 乳汁中の生菌数が有意に高く、PLT が有意に低かった。しかし、ワクチン接種牛では、年齢、BUN および PLT に転帰による有意な差は認められなかった。ワクチン接種牛と非接種牛の血液成分の比較では、ワクチン接種により抗体価が有意に増加した。

哺乳類の免疫系は、大きく分けて自然免疫と獲得免疫があり、自然免疫は感染成立後数時間以内に働き、獲得免疫は数日後から働き始める。抗体価の増加は獲得免疫によるものであるが、獲得免疫は自然免疫担当細胞から遊離されるサイトカインにより誘導されるため、自然免疫の影響を受けている。ACMの初期症状は主に自然免疫によってもたらされ、乳房内に遊走した食細胞 (好中球, マクロファージ), NK細胞, NKT細胞, 補体, 抗菌性タンパク, 抗菌性ペプチド等が細菌の処理を担当する (矢田, 2005)。また、自然免疫は獲得免疫が持つような特異的記憶は持っていないと考えられている (Kurz, 2005; 古澤ら, 2011)。しかし、大腸菌ワクチン接種と乳房の自然免疫機能との関係は、ほとんど知られていない。

ACMの際の自然免疫応答は、乳房内へ侵入したグラム陰性菌の細胞壁を構成する lipopolysaccharide (LPS) によって主に引き起こされる。エンドトキシン (endotoxin, 内毒素) という言葉は LPS とほぼ同義語として使われる。LPS はグラム陰性菌が増殖する際や死滅する際に放出され (浜名ら, 2012), 乳腺上皮細胞と、マクロファージや好中球のよう

な免疫担当細胞によって認識される (Bannerman *et al.*, 2004a)。これらの細胞は種々のサイトカインを合成し、これらを介して局所および全身の炎症反応が引き起こされる。乳房内に LPS を注入することにより、ACM と同様の局所症状を再現できることから、ACM による自然免疫応答のモデルとして LPS 投与法はしばしば用いられてきた (Shuster *et al.*, 1991; DeGraves and Anderson, 1993; Welles *et al.*, 1993; Tyler *et al.*, 1994; Lohuis *et al.*, 1988, 1990a; Banneraman *et al.*, 2003; Lehtolainen *et al.*, 2003; Hiss *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2006; Corl *et al.*, 2008; Isobe *et al.*, 2009b; Hyvönen *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012)。

牛乳中に見られる自然免疫成分として、lactoferrin (LF), lactoperoxidase (LPO), lingual antimicrobial peptide (LAP) 等が知られている。LF は鉄キレートタンパク質で、静菌作用を持つことが示唆されている (Reiter, 1978)。また、LF は一部の細菌の表面に付着し、直接殺菌する作用も報告されているが、*E. coli* に対する殺菌作用は認められなかったと報告されている (Arnold *et al.*, 1977)。ヒトの LF は細菌の LPS のリピド A に高い特異性で結合し、LPS を中和する (Legrand *et al.*, 2004)。また、乳房内に LPS を注入すると、乳汁中の LF 濃度が上昇することが報告されている (Shuster *et al.*, 1991; Hyvönen *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2012)。

LPO は抗菌性因子として知られる酵素で、唾液、乳汁、涙、気道分泌物中に存在する (Geiszt *et al.*, 2003)。LPO は H_2O_2 の存在下でチオシアン酸塩 (thiocyanate, SCN^-) からヒポチオシアン酸塩 (hypothiocyanate, $OSCN^-$) を生成し、これが抗菌活性を示す (Wijkstrom-Frei *et al.*, 2003; 浜名ら, 2012)。乳房内に LPS を投与すると、乳汁中の LPO 活性の増加が認められたと報告されている (Isobe *et al.*, 2009b)。また、LPO 活性と乳汁中の SCC との間には相関があり、LPO 活性が SCC の指標になることが示唆されている (Isobe *et al.*, 2011)。

LAP は β -defensin 類に属する抗菌性ペプチドで、炎症を起こしたウシの舌の上皮組織から最初に分離され (Schonwetter *et al.*, 1995)、広い抗菌・抗カビスペクトルを持つことも報告されている。その後の研究で、LAP mRNA は感染症を起こしたウシの腸管および呼吸

器の組織に広く発現していることが明らかになった (Swanson *et al.*, 2004)。Swanson *et al.*

(2004) は、LAP mRNA の発現は乳房炎発生時に増加し、乳汁中の SCC と LAP 発現に正の相関が認められたと報告した。Isobe *et al.* (2009b) は、乳汁中の LAP 濃度が乳房内への LPS 投与後に有意に上昇すると報告した、したがって、LAP は乳房炎に対する自然免疫の役割を持つと考えられている。

第 2 章で示したように、ETEC ワクチンが自然免疫応答の過剰反応を抑制し症状を緩和しているのであれば、乳房内に LPS を投与した際、ワクチン接種牛の症状は非接種牛に比べて弱くなると考えられる。しかし、反対に Dosogne *et al.* (2002) が述べているように、むしろ PMNs の乳房内への移行を促し、殺菌能力を高めることによって乳房炎を早期に終息させる作用を持つのであれば、ワクチン接種牛では LPS 投与に対する反応が強まると考えられる。しかし、これらのことは全く不明である。そこで本章では、LPS 投与後の乳腺の自然免疫応答に及ぼす ETEC ワクチンの影響を明らかにすることを目的とし、ワクチン接種牛と非接種牛の乳房にそれぞれ LPS を注入し、その後の臨床症状と血液および乳汁中成分の推移を比較検討した。

材料と方法

(1) 供試牛および LPS 投与

臨床的に健康な、泌乳中期のホルスタイン種雌牛 14 頭を用いた。分娩後日数は 91 日から 103 日であり、初産牛 11 頭、経産牛 3 頭であった。これらの牛は、試験の前日までフリーストール牛舎で飼養し、混合飼料 (Total Mixed Ration; TMR) を自由採食させた。搾乳はミルクングロボットにより 2~3 回/日、自発的に行われた。LPS 投与の 3 週間前に、7 頭の頸部へ 5 ml の ETEC ワクチン (Imocolibov) を皮下注射した。残りの 7 頭は無処置とした。ETEC ワクチンは第 2 章と同様のものを用いた。LPS 投与前日に、同じ牛舎内に設置されているタイストールに繋留した。それぞれ TMR を給与し、その日は 9 時と 16 時にバケットミルクカーを使用して搾乳した。LPS 投与前の 1 日当たりの乳量は、接種牛が 40.2 ± 2.7 kg (平均値 \pm 標準誤差)、非接種牛が 33.6 ± 5.2 kg であった。LPS 溶液は既報に従い (Bannerman *et al.*, 2003) 調製した。すなわち、*E. coli* O111: B4 株由来 LPS (L2360, シグマアルドリッチ) を 0.85% NaCl 水溶液で 10 μ g/ml の濃度に溶解し、ポアサイズ 0.45 μ m のシリンジフィルター (Millex-HV, Merck Millipore, MA, 米国) で濾過滅菌後、15 ml 遠沈管に分注し、使用時まで -20°C で凍結保存した。LPS 注入前に必要本数を融解して使用した。注入は、ディスポーザブルシリンジ (テルモ) に、エチレンオキサイドガスで滅菌した乳房炎治療用ペニシリン針 (富士平工業, 東京) を接続したものを用いた (図 3-1)。全分房を 9 時 (0 h) に搾乳し、その際、PL テスター (日本全薬工業, 福島) を使用し、カリフォルニア・マスタイティス・テスト (CMT) 変法を行って乳質が異常が無いことを確認した。その後、乳頭に付着したディッピング剤を拭き取り、さらに乳頭口をアルコール綿で清拭した後、乳頭口にペニシリン針を挿入して LPS 溶液 10 ml (LPS として 100 μ g) を、後ろ側の左右いずれかの 1 分房に注入した。注入後はポストディッピングを行って感染を予防し、投与した分房を軽くマッサージして LPS 溶液を乳房内に拡散させた。LPS 投与前の生乳中体細胞数 (somatic cell count; SCC) は、すべての牛で 150,000 cells/ml 未満であり、ワクチン接種牛が $62,000 \pm 18,000$ cells/ml (平均値 \pm 標準誤差)、非接種牛は $60,000 \pm 17,000$

cells/ml であった。LPS 投与は、供試牛の分娩後日数が 100 日前後になった段階で順次実施した。ウシは 2 つのグループに交互に割り当て、同時に 1~4 頭を供試した。また、暑熱ストレスの影響を避けるため、LPS 投与は 12 月から 3 月の間に実施した。本実験は広島大学動物取扱規程に基づいて行い、LPS 投与の影響による発熱が続いている間は常に獣医師の監視のもとで実験を遂行した。

(2) 臨床検査とサンプル採取

LPS 投与から 12 h 後まで、投与した分房から乳汁を 1 時間おきに採取した。その他の 3 分房は、注入した日の 16 時に搾乳した。LPS 投与 1 日~4 日後は、1 日 2 回 (9 時, 16 時), LPS を注入した分房からクォーターミルカーを用いて搾乳した。すべての搾乳時に直腸温度を測定した。血液サンプルは、LPS 注入後 0, 4, 8, 24, 48, 72, 96 h に頸静脈から真空採血管 (VP-P100K, テルモ) に採取して、血液凝固後、 $1,500\times g$, 10 分間、 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で遠心分離して血清を分離し、使用時まで $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ で保存した。また、抗凝固剤として EDTA2K を含む真空採血管 (インセパック II-D, 徳山積水工業, 山口) に血液を採取し、よく混和した後 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ に保存し、血球数の計数に用いた。血液検査は多項目自動血球分析装置 XE-2100 (シスメックス) を用いて、血液生化学検査は 7020 臨床化学自動分析装置 (日立ハイテクノロジーズ, 東京) を用いてそれぞれ実施した。検査項目は白血球数 (WBC), 赤血球数 (RBC), 白血球分画, aspartate amino transferase (AST または glutamic oxaloacetic transaminase; GOT), alanine transaminase (ALT または glutamic pyruvic transaminase; GPT), alkaline phosphatase (ALP), lactate dehydrogenase (LDH), gamma glutamyl transpeptidase (γ -GTP), creatine kinase (CK), ナトリウム (Na), カリウム (K), 塩素 (Cl), calcium (Ca), inorganic phosphate (P) であった。

(3) 分析方法

① 乳汁中体細胞数 (SCC) 測定

SCC は、ブリード法 (Prescott and Breed, 1910) を用いて測定した。乳汁 2.5 μl をマイクロピペットを用いてスライドガラス (10 mm 角 \times 4 特殊印刷スライドガラス, 松浪硝子工業, 大阪) 上に滴下し, ピペットチップの先端を使ってマス目 (1 cm^2) に塗り拡げて乾燥させた。スライドガラスにキシレン (米山薬品工業) を滴下して 2 分間脱脂した後, 一度乾燥させ, 次に 2-プロパノール (ナカライテスク) を滴下して 2 分間固定し, 乾燥させた。蒸留水で 1.5 倍に希釈したブロードファーストバーレイ液 (武藤化学, 東京) で数秒間染色した (Broadhurst and Paley, 1939) 後, 蒸留水で洗い, 乾燥させた。顕微鏡下 (油浸, 1,000 倍) で 50 視野を観察した (図 3-2)。

視野の直径	0.21 mm
視野の面積	$0.105 \times 0.105 \times 3.14 = 0.0346185 \text{ mm}^2$
1 cm^2 の視野数	$10 \times 10 \div 0.0346185 \approx 2,888.6$
1 ml 当たりの換算視野数	$2,888.6 \div 2.5 \times 1000 \approx 1,155,451.5$

したがって, 50 視野の平均体細胞数に 1,155,451.5 を乗じて SCC を計算した。50 視野を観察して体細胞数が 0 であった場合, 50 視野の平均体細胞数は $1 \div 50 = 0.02 \text{ cell}$ 未満となり, SCC は $1,155,451.5 \times 0.02 \approx 23,109 \text{ cells/ml}$ 未満と計算されるが, 15,000 cells/ml とみなして以後の集計を行った。

②乳汁中の LPO 活性測定

LPO 活性値の測定は既報 (Isobe *et al.*, 2011) に従い実施した。乳汁を 1.5 ml チューブに 1 ml 入れ, $15,000 \times g$ 1 分間 4°C で遠心分離し脂肪層を除去した後, 再度 $15,000 \times g$ 30 分間 4°C で遠心分離し上清を採取した。この脱脂した乳汁 10 μl を 1.5 ml マイクロチューブに入れて TMB 液 (第 2 章と同様) 100 μl を添加, 混合し, 37°C , 30 分間インキュベートした。 $6,000 \times g$, 1 分間遠心分離した後, 上清を 96 ウェル平底マイクロタイタープレートに 100 μl 入れ, マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を用いて 655 nm の波長で吸光度を測定した。1 サンプルにつき 2 ウェル測定し, 平均値を算出した。スタンダードには,

lactoperoxidase (シグマアルドリッチ) を蒸留水で 10, 7, 4.9, 3.4, 2.4, 0 U/ml の濃度に調製したものをを用いた。1 U は, pH 6.0, 20°C の条件下でピロガロール (pyrogallol) から 1 mg のプルプロガリン (purpurogallin) を形成する濃度である。スタンダードは, 10 U/ml に調製した溶液を小分けして凍結保存しておき, 使用時に融解し, 段階希釈して使用した。

③乳汁中の LAP 濃度測定

②と同様にして脱脂処理した乳汁を用いて, 既報 (Isobe *et al.*, 2009b) に従い競合酵素免疫測定法により LAP 濃度を測定した。96 ウェル平底マイクロタイタープレート (住友ベークライト) に, 炭酸バッファー (pH 9.7, 第 2 章と同様) で 2 µg/ml の濃度に調整したウサギ抗 LAP 抗体 (Isobe *et al.*, 2009a) を 100 µl/well 入れ, プレートミキサーで軽く攪拌した後, 室温で 2 時間静置し固相化した。プレートの中身を振り棄て, プレートを逆さにしてペーパータオルにたたきつけてウェル中の液を除き, ホウ酸バッファー (第 2 章と同様) を 300 µl/well 入れて 1 時間静置してブロックし, プレートへの非特異的結合を防止した。その後, プレートを逆さにして液を振り棄て, ペーパータオルにたたきつけてウェル内の液を除いた。脱脂乳サンプルはホウ酸バッファーで 10 倍に希釈し, 50 µl/well をプレートに入れ 4 時間静置した。HRP 標識 LAP (Isobe *et al.*, 2009a) を 50 µl/well 添加してさらに 1 時間室温に静置した。2% Tween20 加 PBS (第 2 章と同様, 以下 PBS-Tween) で 3 回洗浄し, プレートを逆さにしてペーパータオルにたたきつけてウェル中の液を除いた。TMB 液 (第 2 章と同様) を 150 µl/well 入れて室温で 30 分間プレートミキサーで攪拌し, マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を用いて 655 nm で吸光度を測定した。1 サンプルにつき 2 ウェル測定して平均値をとった。スタンダードとして, 10, 3.16, 1, 0.316, 0.1 ng/ml の濃度に希釈した合成 LAP (アミノ酸 11 個で合成, Isobe *et al.*, 2009a) を同時に測定した。また, コントロールとして過去に測定したサンプルを測定し, 測定間の誤差の修正に利用した。

④乳汁中 LF 濃度測定

LF 濃度の測定は既報に従い実施した (Huang *et al.*, 2012)。②と同様にして脱脂処理した乳汁 50 μ l を, 1.5 ml マイクロチューブに入れた飽和硫酸アンモニウム (ナカライテスク) 水溶液 150 μ l に加えて攪拌し, タンパク質を沈澱させた。1,500 \times g, 5 分間, 室温で遠心分離し, 上清を捨てた。沈澱に蒸留水を 1 ml 添加して溶解し, さらに炭酸バッファーで 500 倍に希釈した。希釈したサンプルを 96 ウェル平底マイクロタイタープレート (住友ベークライト) に 100 μ l/well 入れ, シールをして室温で一晩コーティングした。PBS-Tween で 2 回洗浄した後, プレートを逆さにしてペーパータオルにたたきつけてウェル内の液を除いた。マウス抗 LF 抗体 (Santa cruz, LA, 米国) をホウ酸バッファーで 2,000 倍に希釈し, 100 μ l/well 入れ, 攪拌して室温で 4 時間静置した。PBS-Tween で 3 回洗浄後プレートを逆さにしてペーパータオルにたたきつけてウェル内の液を除き, HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) をホウ酸バッファーで 4,000 倍に希釈して 100 μ l/well 入れ, 1 時間静置した。プレートを PBS-Tween で 3 回洗浄後, 逆さにしてペーパータオルにたたきつけてウェル内の液を除き, TMB 液を 150 μ l/well 入れて 30 分間室温でプレートを攪拌した。マイクロプレートリーダー (Bio-Rad) を用いて 655 nm の波長で各ウェルの吸光度を測定した。スタンダードとして, 炭酸バッファーを用いて 300, 30, 10, 3.3, 1.1 ng/ml の濃度に希釈した LF 溶液をサンプルと同時に測定し, 検量線を作成してサンプルの濃度を決定した。

⑤血清中 haptoglobin (Hp) 濃度

Hp 濃度は, 第 2 章と同様に, 市販の測定キット (エコス研究所) を用いて SRID で測定した。

⑥血清中 C-reactive protein (CRP) 濃度

CRP 濃度は, 生化学自動分析装置 (AU480, Beckman Coulter, CA, 米国) を用いて測定した。製造元のスタンダードを使用して濃度を求めた。

⑦血清中抗 ETEC ワクチン抗体価の測定

血清中ワクチン抗体価を，第 2 章と同様に酵素免疫測定法で測定した。

⑧血清中抗 J5 抗体価の測定

血清中抗 J5 抗体価を，第 2 章と同様に酵素免疫測定法で測定した。

⑨血清中 IgG 濃度

LPS 注入前 (0 h) の血清中 IgG 濃度を，第 2 章と同様の方法で，競合酵素免疫測定法により測定した。

(4)統計学的解析

統計解析は，パーソナルコンピュータ用ソフトウェア，R Version 2.10.1 ウィンドウズ OS 用を使用して行った。追加パッケージとして簡易操作用の Rcmdr (舟尾, 2007) を使用した。SCC は常用対数に変換して集計した。LPS 注入前と注入後の各測定値の平均値の比較は，対応のある t 検定 (paired t -test) で有意性の検定を行い，ワクチン接種牛と非接種牛との比較にはスチューデントの t 検定を行った。 $P < 0.05$ を統計的に有意とみなした。相関分析は，まず，ワクチン接種牛および非接種牛全頭に対して実施し，SCC, LPO, LAP, LF, Hp, 体温 (BT) については最も平均値の高かった時点，LPS 注入分房の乳量 (Q-milk) については最も低かった時点のデータを用いて，ピアソンの積率相関係数 (Pearson product-moment correlation coefficient) を求め，無相関検定を行った。次に，乳汁中の自然免疫因子 (SCC, LPO, LAP, LF) と，LPS 注入前 (0 h) の血清中抗体価および IgG 濃度との相関関係をワクチン接種牛と非接種牛とに分類して分析した。搾乳間隔を一定にするため，7~12 h 後の乳量は 24 h 後の乳量に加算した。ワクチン接種牛と非接種牛との乳量の比較には 0 h の乳量に対するパーセンテージを使用した。これらは 24, 48, 72, 96 h 後の乳

量比率を 0 h と比較したが，1～6, 31, 55, 79, 103 h 後の乳量は比較に使用しなかった。

a



b

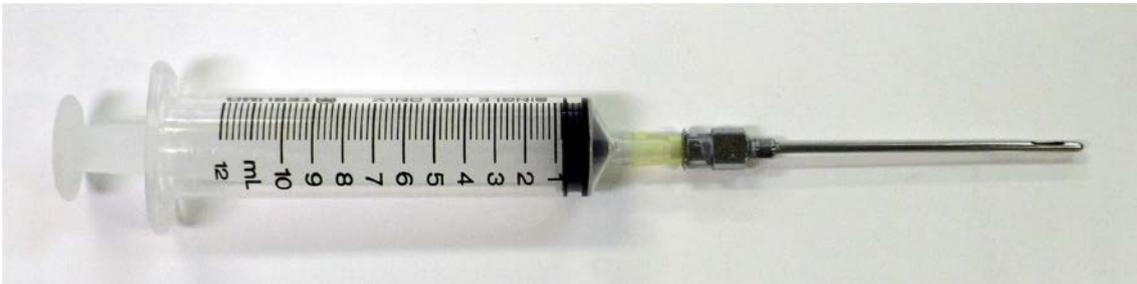


図 3-1 LPS 注入器具。シリンジに乳房炎治療用ペニシリン針を装着した。

a : ペニシリン針 (右) の内径がシリンジ (左) 先端の外径より大きいため、
接続にはマイクロピペット用チップの先端を切断して使用した。

b : LPS 注入器具を組み立てた状態

結果

すべてのウシにおいて、LPS を注入した分房が臨床型乳房炎の症状を示し、腫脹と硬結が認められた。乳汁は、次第にわずかに黄色味を帯びた漿液様半透明となり、凝固物を含んでいた（図 3-3）。乳汁が半透明化する時期はウシによって異なっていた。全身症状としては 41°C 以上の発熱、眼結膜の充血、一時的な食欲廃絶が認められたが、それらは乳房内注入後 10 時間以内に消失した。また、実験終了後は全頭後遺症を残すことなく回復し、乳量も投与前の量に戻った。

(1) 体温 (BT)

LPS 注入前の直腸温度は、非接種牛が $38.90 \pm 0.09^\circ\text{C}$ (平均値 \pm 標準誤差)、ワクチン接種牛が $38.76 \pm 0.06^\circ\text{C}$ であった（図 3-4）。非接種牛では LPS 投与 1 h 後に投与前に比べて有意に低下したが、非接種牛および接種牛ともに 2 h 後から上昇を始め、5 h 後に最高値を示し、以後は両者とも低下を始めた。非接種牛は 7 h 後、接種牛は 9 h 後まで LPS 投与前に比べて有意に高い値を示した。また、ワクチン接種牛の 10 h 後の平均体温は非接種牛のそれと比べて有意に高かった。

(2) 乳量 (Q-milk)

LPS を投与した分房の投与前の平均乳量は、非接種牛が 7.6 ± 0.8 kg、ワクチン接種牛が 7.5 ± 0.4 kg であった。LPS 投与 24 h 後の非接種牛の LPS 投与前の平均乳量は、LPS 投与前に比べて有意に少なかった（図 3-5）。しかし、ワクチン接種牛では有意な低下は認められなかった。非接種牛の乳量は 48 h 後には回復し、LPS 投与前と有意差がなくなった。また、ワクチン接種牛と非接種牛の間に有意な差はなかった。

(3) SCC

非接種牛および接種牛ともに LPS 投与の 1 h 後の SCC は、投与前に比べて有意に高い値

を示した ($P<0.01$; 図 3-6)。非接種牛では 12 h 後、接種牛では 10 h 後に最高値を示し、以後は両者とも徐々に低下した。しかし、LPS 投与 103 h 後においても投与前に比べて有意に高い値を維持していた。LPS 投与 12 h および 55 h 後の接種牛の SCC は、非接種牛のそれに比べて有意に少なかった。

(4) 乳汁中 LPO 活性値

LPS 投与後、一時的に LPO 活性が低下する傾向が認められたが、4~5 h 後から増加を始めた (図 3-7)。非接種牛では 10, 12, 24, 31, 48 h 後、接種牛では 6, 8, 12, 24 h 後に LPS 投与前と比較して有意に高い値を示した。接種牛と非接種牛との比較では、有意な差は認められなかったが、24 および 31 h 後に非接種牛の LPO 活性が接種牛に比べて高い傾向が認められた。

(5) 乳汁中 LAP 濃度

非接種牛および接種牛で、LPS 投与 1~5 h 後に一時的に LAP 濃度が増加する傾向が認められたが、標準誤差が大きいため有意差は認められなかった (図 3-8)。非接種牛では 7, 8 h 後に LPS 投与前と比較して有意に高い LAP 濃度を示した。接種牛では、LPS 投与前に比べて有意な上昇は認められなかったが、接種牛と非接種牛との比較では 8 h 後の時点で非接種牛が接種牛に比べて有意に高い値を示した。

(6) 乳汁中 LF 濃度

非接種牛、接種牛ともに LPS 投与 12 h 後までは LF 濃度に変化はほとんど認められなかったが、非接種牛では 24 h 後から平均濃度が上昇を始め、LPS 投与 31, 48 および 55 h 後の濃度が LPS 投与前に比べて有意に高い値を示した (図 3-9)。接種牛は 31 h 後から LF 濃度が上昇を始め、55 h および 79 h 後の濃度が LPS 投与前に比べて有意に高い値を示した。接種牛と非接種牛との比較では、非接種牛の 55 h 後の LF 濃度が接種牛と比べて有意に高

い値を示した。

(7) 血清中 Hp 濃度

非接種牛および接種牛で、LPS 投与 8 h 後までは血清中 Hp 濃度は増加しなかった（図 3-10）。しかし、それ以後有意に増加し、非接種牛では 48 h 後に平均 Hp 濃度が最高値を示した後減少に転じたが、96 h 後でも投与前に比べて有意に高値であった ($P<0.05$)。接種牛でも 48 h 後に最高値を示し、投与前のそれに比べて有意に高かったが、その後急激に減少し投与 96 h 後では投与前の値と比べて有意な差はなかった。投与 24~96 h 後では接種牛に比べて非接種牛の方が高い Hp 濃度を示したが有意差はなかった。

(8) 血清中 CRP 濃度

非接種牛および接種牛で、LPS 投与後血清中 CRP 濃度は一時的に低下し、非接種牛では 8 h 後の濃度が LPS 投与前に比べて有意に低い値を示した（図 3-11）。その後は再び CRP 濃度は上昇したが、非接種牛および接種牛ともに 96 h 後においても LPS 投与前に比べて有意差はなかった。

(9) 血清中抗 ETEC ワクチン抗体価、抗 J5 抗体価および IgG 濃度

接種牛の LPS 投与前のワクチン抗体価および抗 J5 抗体価は、非接種牛に比べて有意に高かった（図 3-12 a, b）。LPS 投与前の IgG 濃度は非接種牛と接種牛の間に差は認められなかった（図 3-12 c）。

接種牛のワクチン抗体価および抗 J5 抗体価は LPS 投与後徐々に低下する傾向が認められたが、LPS 投与前と比べて有意差はなかった（図 3-13）

(10) 測定値間の相関関係

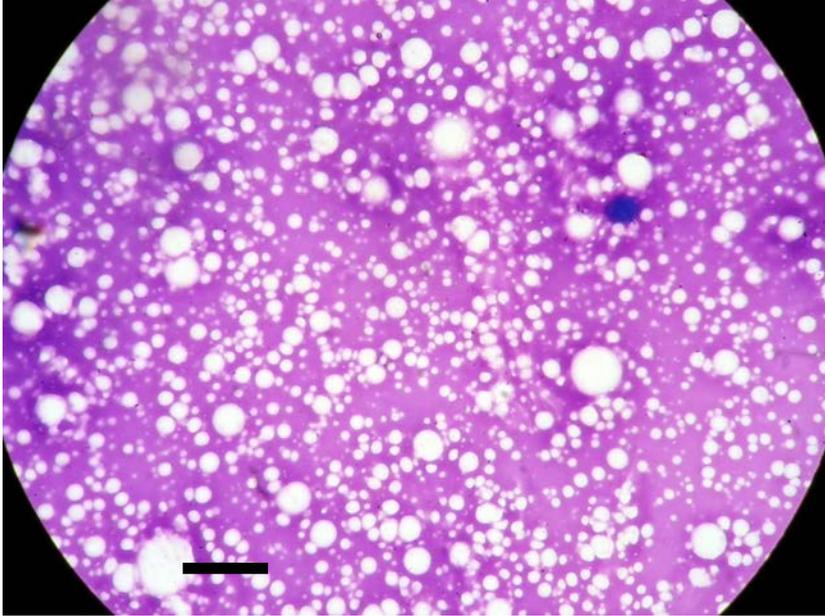
全供試牛の SCC, LPO, LAP, LF, Q-milk, Hp, BT の平均値は、それぞれ 12, 31, 11, 48, 24, 48,

5 h 後の時点でピークとなったため、その時点の各個体のデータを相関分析に用いた（表 3-1）。なお、LPS 投与 3 h 後の LAP 濃度の平均値は 11 h 後の値よりも高かったが、LPS 投与前と 3 h との間に有意な差が認められなかったため 11 h 後のデータを分析に用いた。

SCC, LPO および LF のいずれの間にも有意な正の相関関係が認められた。Q-milk と、SCC, LPO, LAP および LF の間に有意な負の相関が認められた。Hp と、LF および BT との間に有意な正の相関が認められた。

非接種牛と接種牛を分けてそれぞれ相関係数を算出すると、非接種牛において、LF 濃度と抗 J5 抗体価の間に有意な正の相関が認められた（表 3-2）が、接種牛では有意な相関ではなかった。同様に、非接種牛の SCC と IgG 濃度の間に有意な正の相関が認められたが、接種牛では有意な相関ではなかった。ワクチン接種牛において、ワクチン抗体価と LPO 活性および LF 濃度との間に有意な正の相関が認められたが、どちらも非接種牛では有意な相関ではなかった。

a



b

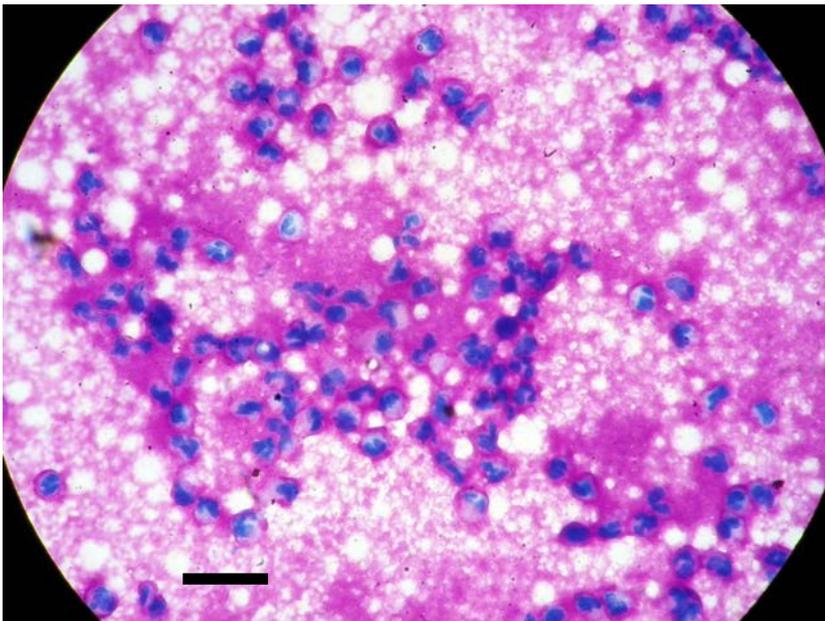
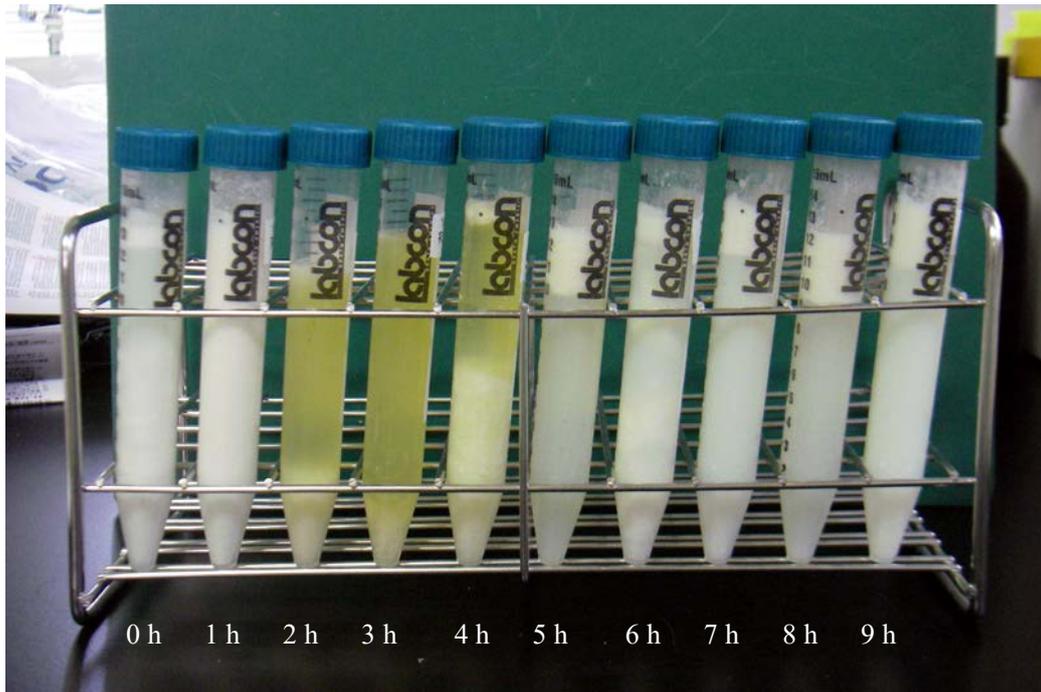


図 3-2 ブロードファーストバーレイ液による乳汁の染色像
スケールバーは 20 μm を示す
a: LPS 投与前の乳汁 b: LPS 投与 8 h 後の乳汁

a



b

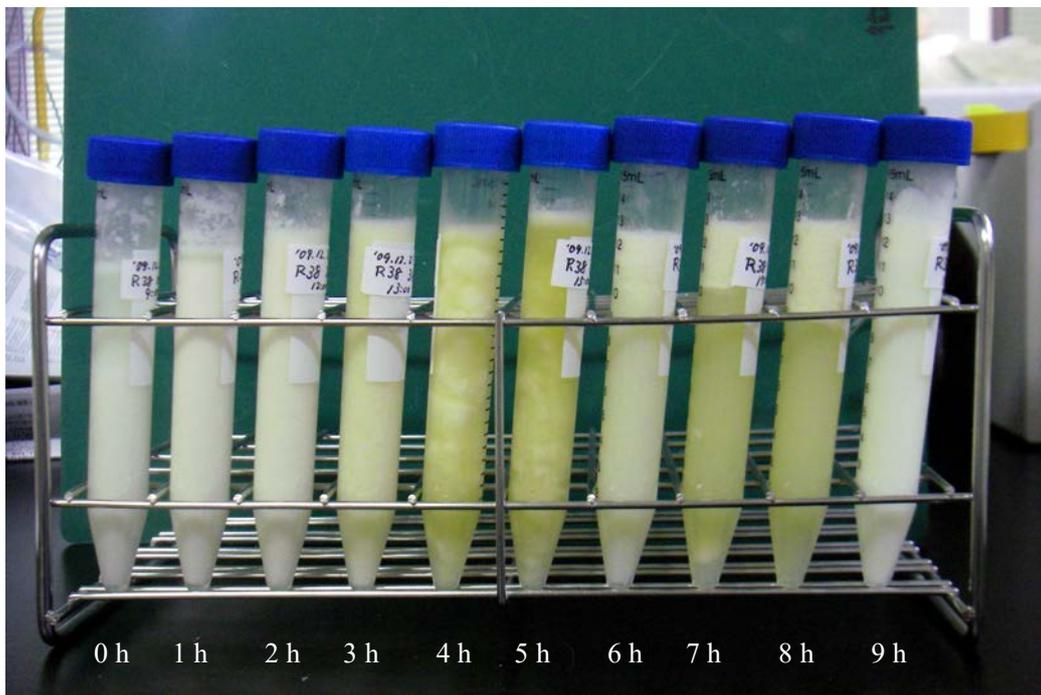


図 3-3 LPS 注入後の生乳の性状の変化。黄色味を帯び、半透明となった
a, b は異なるウシから採取した

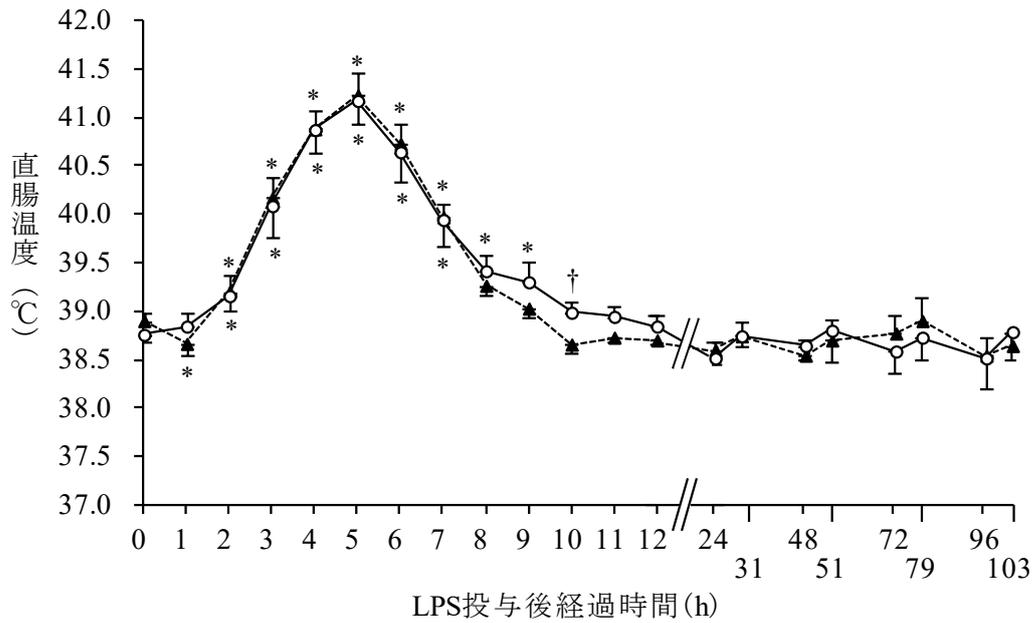


図3-4 LPS投与後の直腸温度の推移

○：接種牛 (n=7), ▲：非接種牛 (n=7), 値は平均値±標準誤差

*：0 hと比較して有意差あり(P<0.05)

†：接種牛, 非接種牛間に有意差あり(P<0.05)

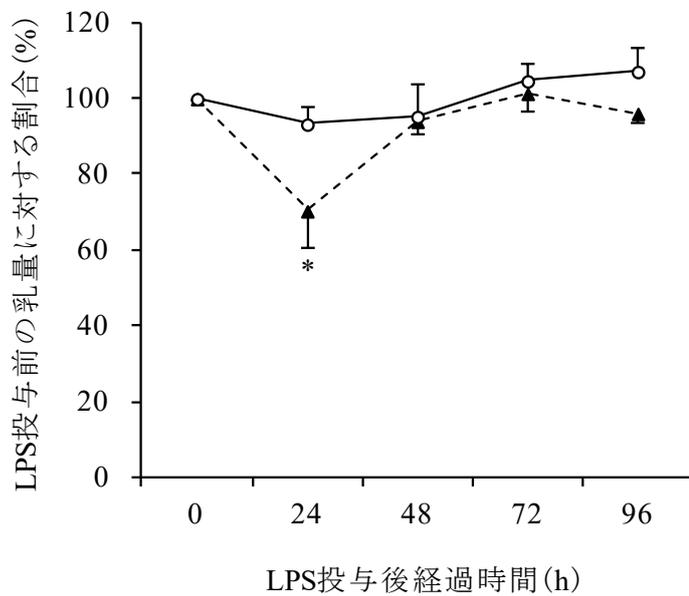


図3-5 LPS投与分房の乳量の推移

○：接種牛 (n=7), ▲：非接種牛 (n=7), 値は平均値±標準誤差

*：0 hと比較して有意差あり(P<0.05)

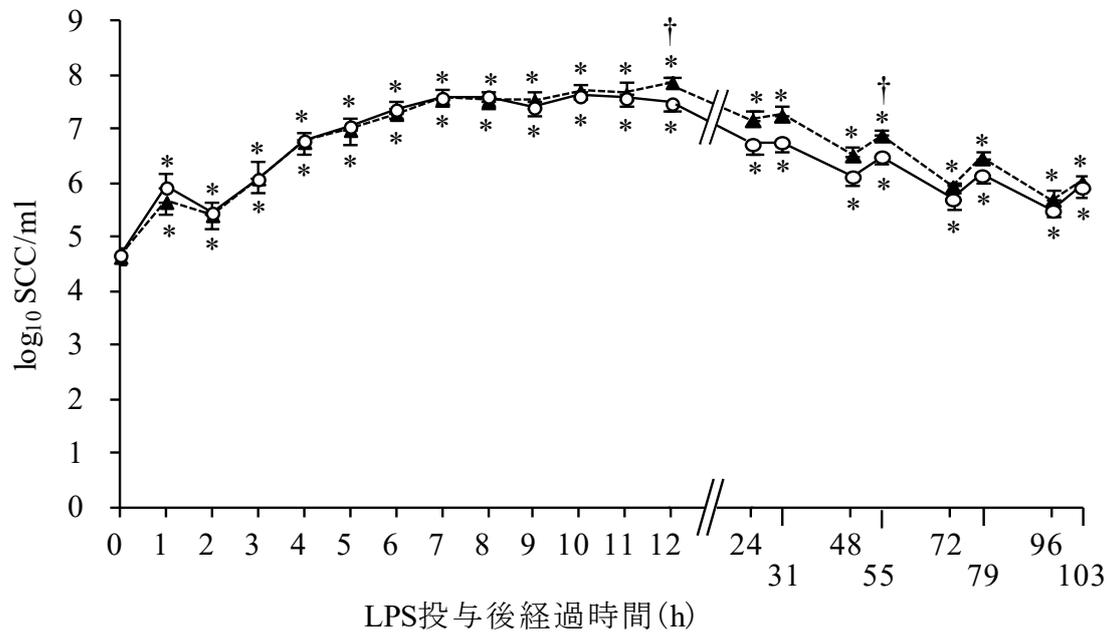


図3-6 LPS投与分房の乳汁中体細胞数（SCC）の推移

○：接種牛（n=7），▲：非接種牛（n=7），値は平均値±標準誤差

*：0hと比較して有意差あり（ $P<0.05$ ）

†：接種牛，非接種牛間に有意差あり（ $P<0.05$ ）

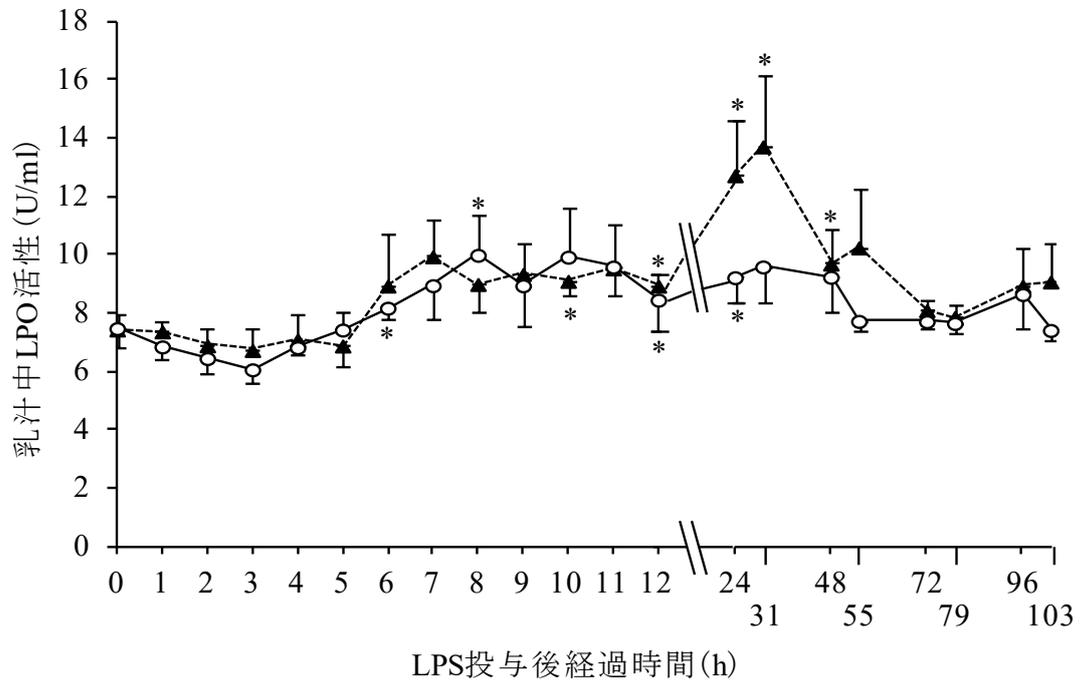


図3-7 LPS投与分房の乳汁中 lactoperoxidase (LPO) 活性値の推移

○ : 接種牛 (n=7), ▲ : 非接種牛 (n=7), 値は平均値±標準誤差

* : 0hと比較して有意差あり (P<0.05)

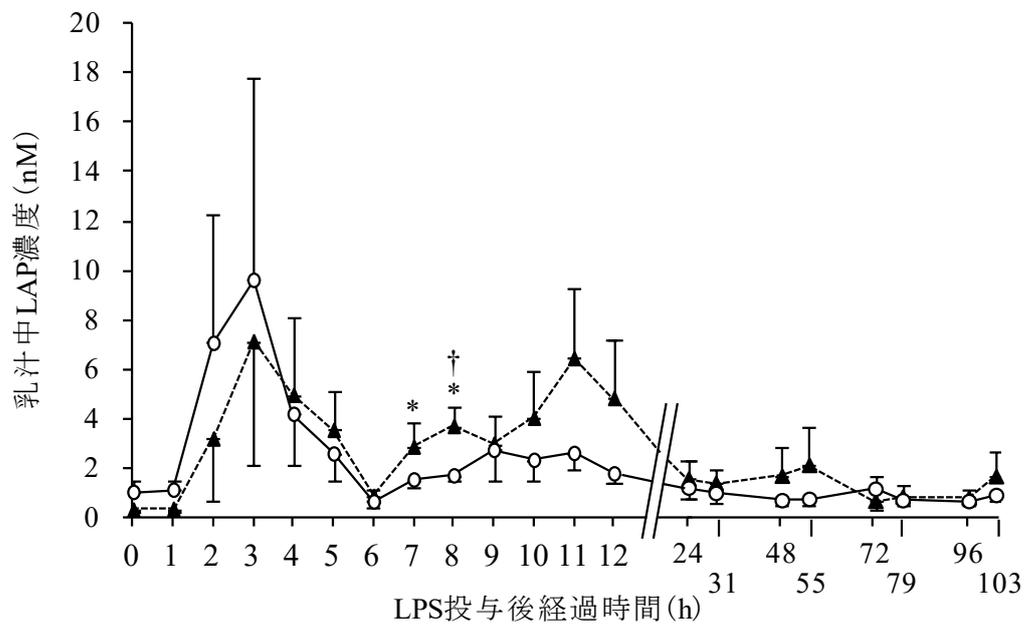


図3-8 LPS投与分房の乳中 lingual antimicrobial peptide (LAP) 濃度の推移

○：接種牛 (n=7)，▲：非接種牛 (n=7)，値は平均値±標準誤差

*：0 h と比較して有意差あり ($P<0.05$)

†：接種牛，非接種牛間に有意差あり ($P<0.05$)

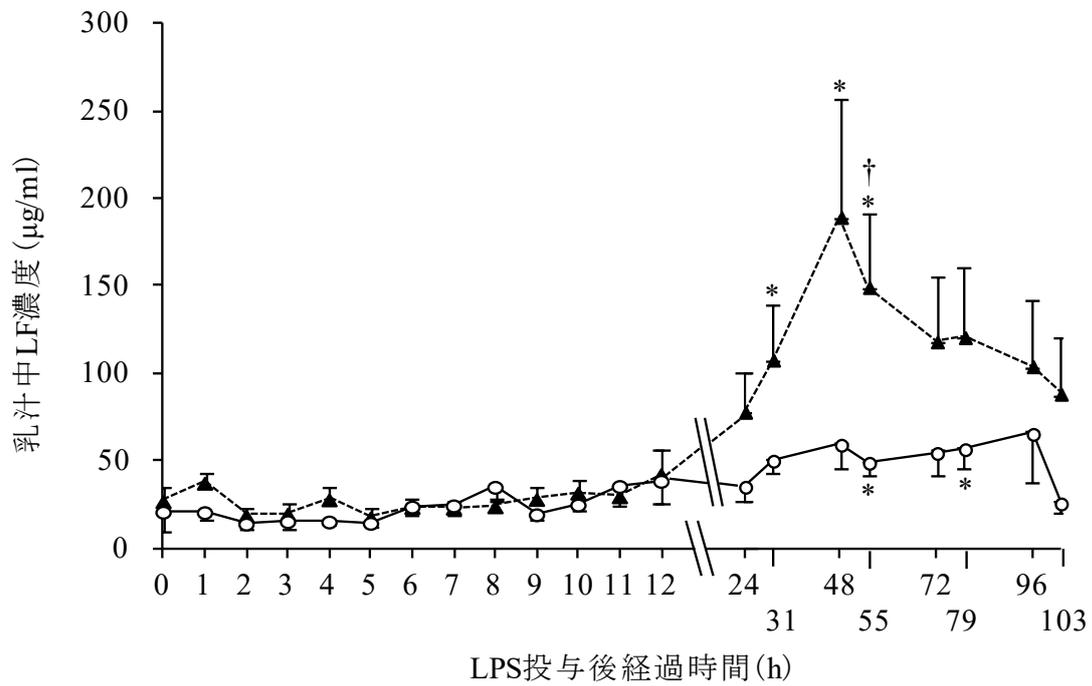


図3-9 LPS投与分房の乳汁中 lactoferrin (LF) 濃度の推移

○：接種牛 (n=7), ▲：非接種牛 (n=7), 値は平均値±標準誤差

*：0hと比較して有意差あり ($P<0.05$)

†：接種牛, 非接種牛間に有意差あり ($P<0.05$)

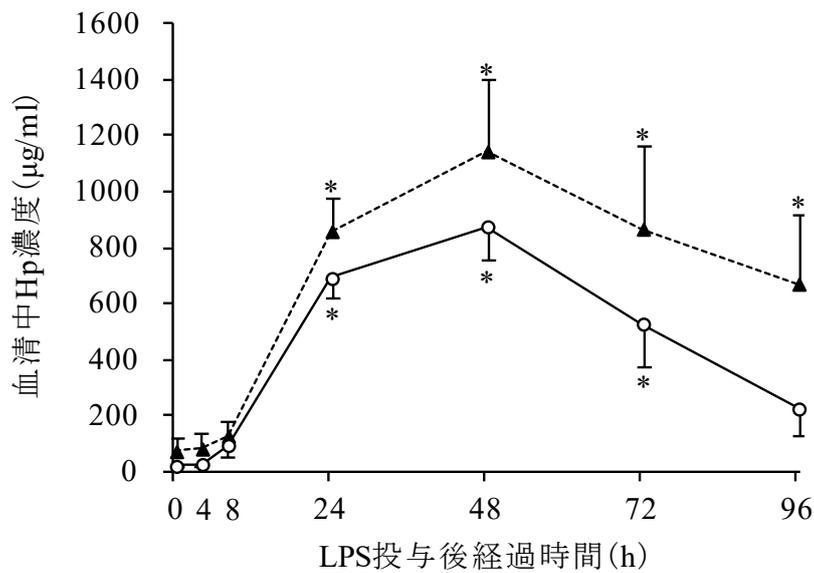


図3-10 血清中 haptoglobin (Hp) 濃度の推移
 ○ : 接種牛 (n=7), ▲ : 非接種牛 (n=7), 値は平均値±標準誤差
 * : 0 h と比較して有意差あり ($P<0.05$)

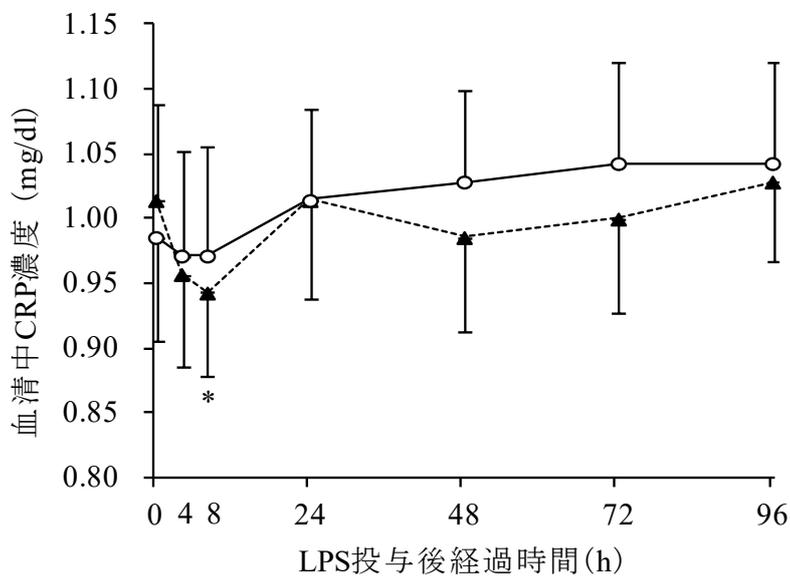


図3-11 血清中 C-reactive protein (CRP) 濃度の推移
 ○ : 接種牛 (n=7), ▲ : 非接種牛 (n=7), 値は平均値±標準誤差
 * : 0 h と比較して有意差あり ($P<0.05$)

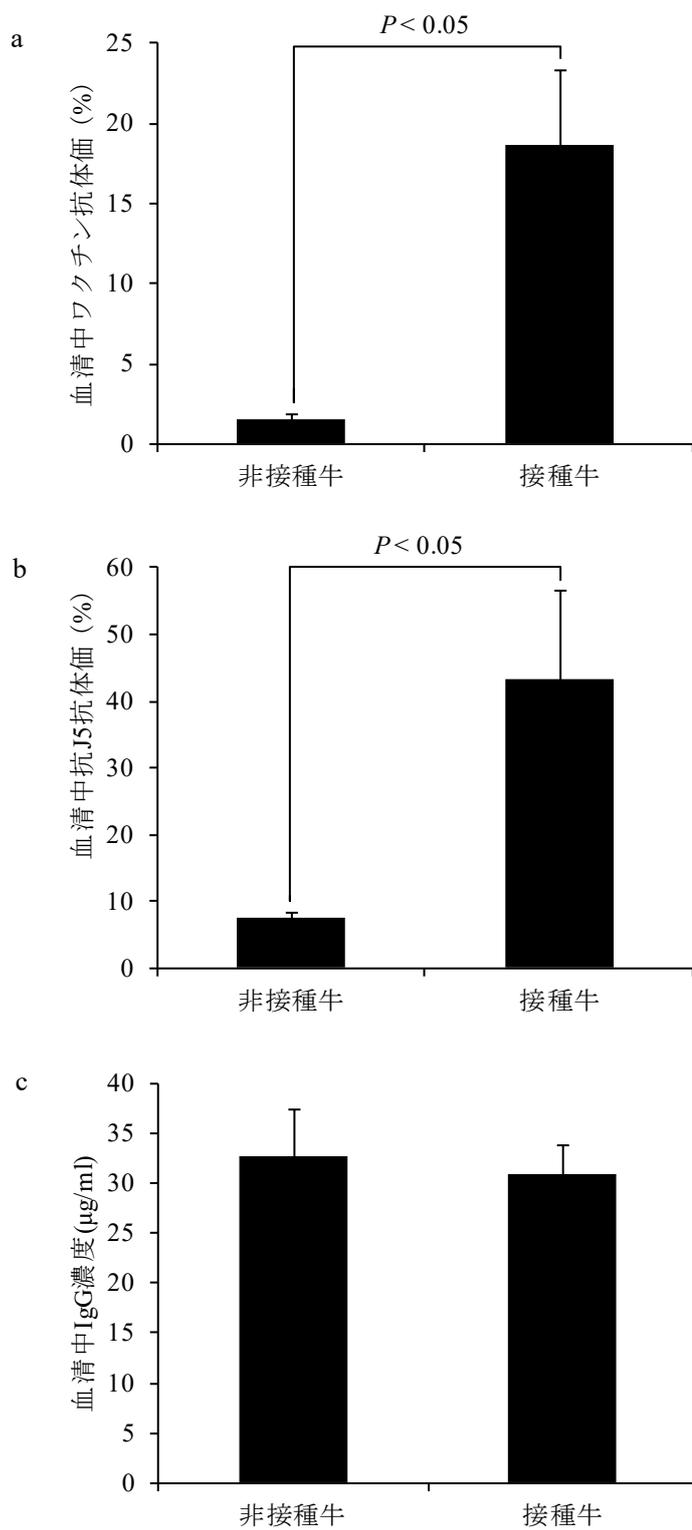


図3-12 LPS投与前の血清中抗体価およびIgG濃度
 a: ワクチン抗体価, b: 抗J5抗体価, c: IgG濃度
 バーは平均値および標準誤差を示す

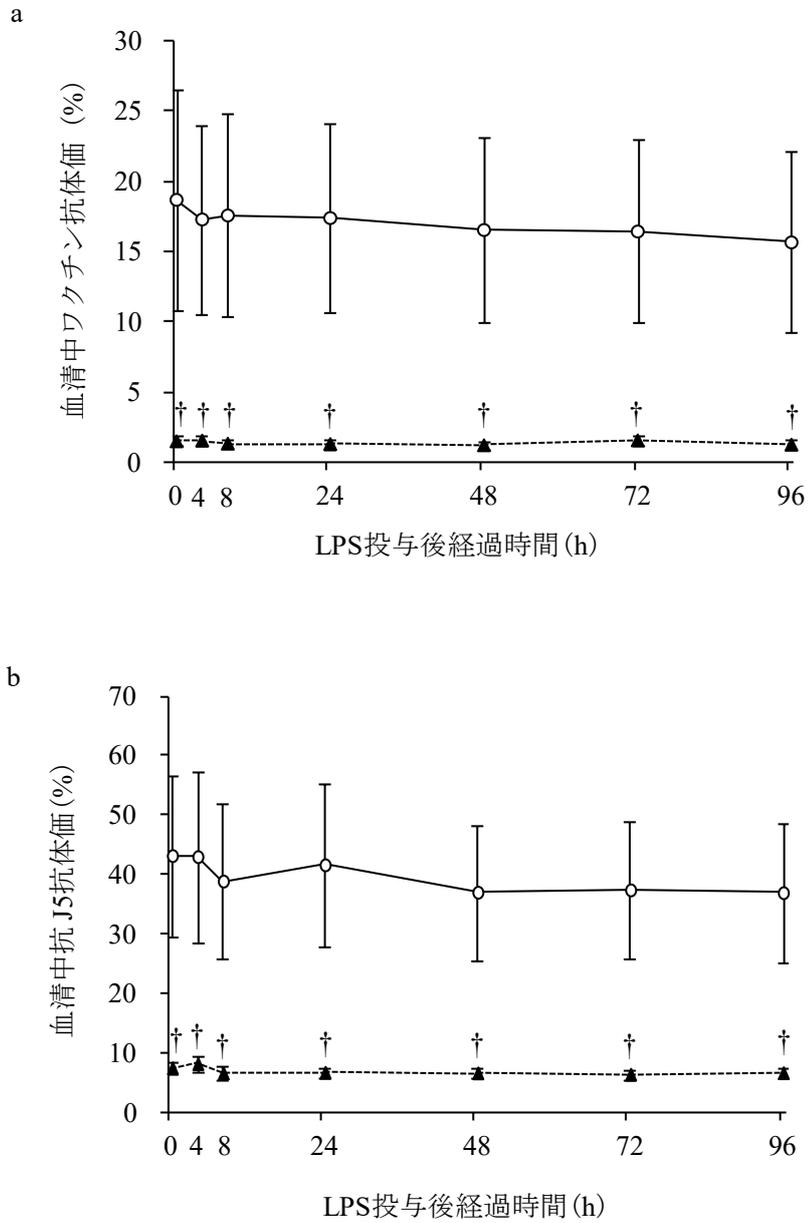


図 3-13 血清中ワクチン抗体価と抗 J5 抗体価の推移

a : ワクチン抗体価, b : 抗 J5 抗体価

○ : 接種牛 (n=7), ▲ : 非接種牛 (n=7), 値は平均値±標準誤差

† : 接種牛, 非接種牛間に有意差あり ($P < 0.05$)

表3-1 平均値が最も高かった時点の検査値相互の相関係数

検査項目 ¹	SCC	LF	LPO	LAP	Q-milk	WBC	Ca	Hp	BT	IgG
SCC (12)	—									
LF (48)	0.638*	—								
LPO (31)	0.657*	0.754**	—							
LAP (11)	0.420	0.474	0.810**	—						
Q-milk (24)	-0.654*	-0.758**	-0.787**	-0.589*	—					
WBC (8)	-0.555*	-0.629*	-0.767**	-0.569*	0.603*	—				
Ca (8)	-0.604*	-0.350	-0.690**	-0.357	0.581*	0.666**	—			
Hp (48)	0.329	0.635*	0.328	0.313	-0.519	-0.419	-0.150	—		
BT (5)	0.181	0.345	0.195	-0.141	0.362	-0.375	-0.542*	0.577*	—	
IgG (0)	0.463	0.497	0.307	-0.003	-0.358	-0.468	-0.483	0.545*	0.592*	—

SCC = 体細胞数 (cells/ml), LF = 乳汁中lactoferrin濃度 (µg/ml), LPO = 乳汁中lactoperoxidase活性 (U/ml),

LAP = 乳汁中lingual antimicrobial peptide 濃度 (nM), Q-milk = LPS投与乳房の 9:00の乳量 (kg), WBC = 末梢血中白血球数 (cells/µl),

Ca = 血清中calcium濃度 (mg/dl), Hp = 血清中haptoglobin濃度 (µg/ml), BT = 直腸温度 (°C), IgG = 免疫グロブリン G 濃度 (mg/ml)

¹カッコ内の数値はLPS投与後最も高値を示した経過時間 (h)

*: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ (項目間に統計学的に有意な相関関係あり, $n=14$)

表 3-2 各自然免疫因子と，非接種牛およびワクチン接種牛のワクチン抗体価，
抗 J5 抗体価および IgG 濃度との相関係数¹

検査項目 ²	検査項目					
	ワクチン抗体価 (0)		抗 J5 抗体価 (0)		IgG 濃度 (0)	
	非接種牛	接種牛	非接種牛	接種牛	非接種牛	接種牛
SCC (12)	0.542	0.706	0.574	0.442	0.882**	0.225
LPO (31)	0.196	0.769*	0.300	0.458	0.290	0.416
LAP (11)	-0.080	0.556	-0.471	-0.458	-0.053	0.242
LF (48)	0.118	0.871*	0.746**	0.285	0.603	0.362

¹ ワクチンおよび J5 抗体価，IgG 濃度：0 h 時点の値を用いた。

SCC = SCC の常用対数値，LPO = 乳汁中 lactoperoxidase 活性値(U/ml)，

LAP = 乳汁中 lingual antimicrobial peptide 濃度(nM)，LF = 乳汁中 lactoferrin 濃度(μg/ml)

² カッコ内の数値は LPS 投与後最高値を示した経過時間(h)

*: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ (統計学的に有意な相関関係あり，非接種牛，接種牛ともに n=7)

考察

LPS 投与後の乳汁中 LAP 濃度は、8 h 後で接種牛が非接種牛に比べて有意に低い値を示した (図 3-8)。同様に LF 濃度は LPS 投与 55 h 後に接種牛が非接種牛に比べて有意に低い値を示した (図 3-9)。以上の結果から、ワクチン接種が乳汁中のこれらの自然免疫因子の濃度を低下させる可能性が示唆された。一方、LPS 投与前の血液中における ETEC ワクチンに対する抗体価は非接種牛に比べて接種牛が有意に高い値を示した (図 3-12a)。ワクチン接種牛において、LPS 投与前の ETEC ワクチン抗体価と LPS 投与 31 h 後の LPO 活性値および 48 h 後の LF 濃度の間に有意な正の相関が認められた (表 3-2)。すなわち、ワクチン特異的抗体価の高い個体は、LPS 投与後に乳汁中自然免疫因子を、より高濃度に有していたことになる。これらのことをまとめると、図 3-14 のような関係になっていると考えられる。接種牛は非接種牛に比べてワクチン抗体価は高いものの、自然免疫因子の乳汁中濃度は低い。しかも低いにもかかわらず両者に正の相関を持っている。なぜワクチン抗体価が高いと自然免疫因子濃度が高くなるのかは明らかでないが、抗体が LPS と結合し、オプソニン効果を示して上皮からの自然免疫因子の分泌を促したのかもしれない。あるいは、1 回のワクチン接種に対して高濃度の抗体を産生する個体は LPS の侵入に対する反応性がもともと強く、それがそのまま乳房局所の自然免疫応答の強さにも反映され、乳汁中の自然免疫因子の濃度が高くなったのかもしれない。すなわち、免疫応答の強弱が、抗体価と乳房の自然免疫応答の両方に反映されたのかもしれない。

海外では、*E. coli* O111:B4 J5 株あるいは *Salmonella* Typhimurium Re-17 変異株からつくられた乳房炎ワクチン接種が ACM の症状を軽減することが示唆されているが (Hogan *et al.*, 1992b, 1995; Wilson *et al.*, 2007b; McClure *et al.*, 1994), そのメカニズムはよくわかっていない。Dosogne *et al.* (2002) は、J5 ワクチン接種が、乳腺内の記憶細胞が介在して T ヘルパー 1 細胞による乳腺組織の過剰反応を起こし、ACM の症状を軽減するという仮説を示した。本実験では、生菌ではなく LPS を投与したにもかかわらず、ワクチン接種牛の LAP および LF 濃度は非接種牛に比べて有意に低かった (図 3-8, 9)。したがってワクチン接種は、

むしろ ACM に対する過剰な免疫応答を防いでいると考えられた。

LPS 投与分房の乳量（相対値）の平均値は、非接種牛が 24 h 後に有意な低下を示したのに対し、ワクチン接種牛では有意な低下がみられなかった（図 3-5）。ACM を発症したウシは一時的に泌乳量が低下することが知られている（Bannerman *et al.*, 2003; 2004b; Wilson *et al.*, 2007b; Suojala *et al.*, 2008）。泌乳量低下の原因は、重度の循環障害により乳房の血流量が減少することや、感染症のストレスにより糖質コルチコイドが分泌されて泌乳が抑制されること、第一胃運動の低下や食欲不振により栄養不足に陥ることなどが原因と考えられる。したがって、泌乳量低下の程度は全身症状（循環障害等）の程度を反映していると考えられる。一方、全身症状の指標となる血清中 Hp 濃度の平均値は、非接種牛に比べてワクチン接種牛の方が早く低下した。これらのことから、非接種牛に比べてワクチン接種牛の全身症状が軽いことが示唆された。

非接種牛とワクチン接種牛との乳汁中自然免疫因子の濃度や泌乳量、血清中急性期タンパク濃度等の差は、個体のばらつきの大きさに比べて小さかった。このことは、本研究で試験した牛が泌乳中期牛であったことが関係している可能性がある。乳期により乳房の反応が異なることが知られており（Lehtolainen *et al.*, 2003; 2004）、泌乳初期のウシであれば、より大きな差が生じた可能性が考えられる。また、ACM は分娩直後に発生することが多いことから、今後は泌乳初期のウシによる実験でワクチンの影響を確認する必要があると考えられた。

非接種牛の SCC は、LPS 投与の 12 および 55 h 後に、接種牛に比べて有意に高い値を示した（図 3-6）。この結果は乳汁中 LAP および LF 濃度の結果とも一致する。このことから、非接種牛の乳房局所の炎症反応が、接種牛のそれに比べて強いことが示唆された。

非接種牛において、LPS 投与前の血清中 IgG 濃度とピーク時の SCC の値との間には有意な正の相関が認められたことから（表 3-2）、IgG 濃度の高いウシは LPS 投与時の SCC が多くなることが示唆された。LPS により引き起こされた乳房炎では生菌が存在しないため、時間の経過に伴う菌の増殖は起きない。*E. coli* による乳房内感染症においては、白血球に

よる効果的な病原体の殺菌が感染症の回復と乳房炎の転帰にとって重要である (Burvenich *et al.*, 2003)。したがって、血液から乳房内への好中球の迅速な移行は、侵入した病原体から乳腺を防御し乳房内感染の成立を防ぐ上で有利となる可能性がある (Paape *et al.*, 2002)。今回、非接種牛において SCC と IgG 濃度に高い正の相関が認められたことから、血清中 IgG 濃度は乳房内感染時における乳房内への SCC 動員能を予測するための指標として利用できるかもしれない。

非接種牛において、LPS 投与前の抗 J5 抗体価と 48 h 後の LF 濃度が有意な正の相関を示したことから (表 3-2)、抗 J5 抗体価の高いウシはピーク時の LF 濃度が高くなることが示唆された。この現象は、前述した、接種牛の ETEC ワクチン抗体価と 31 h 後の LPO 活性値および 48 h 後の LF 濃度が有意な正の相関を示したことに類似していたが、非接種牛にみられたという点が異なる。J5 は多様なグラム陰性菌と交差反応を示すことが知られており (Tyler *et al.*, 1991, 1992; Tomita *et al.*, 1995)、非接種牛の抗 J5 抗体価はグラム陰性菌による感染歴を反映している可能性が考えられた。これらのことから、非接種牛では、グラム陰性菌感染歴の程度に比例してピーク時の LF 濃度が高くなった可能性が考えられた。

Hp は急性期タンパクの一種で、急性感染症などの際に血液中に現れるため、乳房炎における有効な指標とされている (Eckersall and Bell, 2010)。非接種牛及び接種牛の血清中 Hp 濃度は LPS 投与の 24 h 後には LPS 投与前に比べて有意に高い値を示し、接種牛では 72 h 後まで、非接種牛では 96 h 後まで有意差があり、LPS 投与に対して鋭敏に反応していた (図 3-10)。急性期タンパクには、Hp の他に C-reactive protein (CRP), serum amyloid A (SAA), α 1-acid protein 等が知られている。反芻動物において CRP は主要な急性期タンパクとは考えられていないが、Lee *et al.* (2003) は乳牛の血清中 CRP 濃度を調査し、慢性乳房炎などの炎症を起こした牛群の CRP 濃度が健康なウシに比べて有意に高かったと報告した。今回の調査では、非接種牛および接種牛のいずれにおいても、LPS 投与後一時的に低下して、非接種牛では 8 h 後に 0 h と比べて有意に低い値となり、その後上昇する傾向が認められたが、LPS 投与の 96 h 後においても LPS 投与前に比べて有意差はなかった (図 3-11)。こ

のことから、LPS 投与によるウシの急性乳房炎における CRP の臨床的意義は、Hp に比べて低いと考えられた。一方、CRP は乳の分泌に関連したタンパク質として知られており（古澤ら，2011），LPS 投与後の CRP 濃度の一時的な低下は、泌乳量の低下に関連していると考えられた。

接種牛の直腸温度の平均値は 8 および 9 h 後で 0 h に比べて有意に高かったが、非接種牛ではその時既に 0 h との有意差はなかった（図 3-4）。また、LPS 投与の 10 h 後に非接種牛のそれに比べて有意に高い値を示した。体温の上昇は、LPS 投与によってマクロファージなどから分泌された IL-1 や IL-6, TNF- α が脳の温度制御中枢に拡散することによって起きたと考えられる（古澤ら，2011）。一方、LAP, LF および SCC は接種牛の方が非接種牛に比べて有意に低かったことから、乳腺局所における炎症が弱かったと考えられるが、この考え方は直腸温度の結果と矛盾する。この理由は明らかでないが、局所ではなく、全身の体温を上昇させるような生理的变化が接種牛では強かったのかもしれない。

接種牛および非接種牛の乳汁中の平均 LAP 濃度は LPS 投与前と比べて有意差はなかったが、LPS 投与の 2~5 h 後に一時的な上昇が認められた（図 3-8）。Isobe *et al.* (2009b) の報告では、乳汁中 LAP 濃度は LPS 投与 2 h 後から有意に上昇し始めた後、高値を維持し、12 h 後にピークとなり 72 h 後に低下した。本実験では LPS 投与 2~4 h 後に、有意差はなかったものの一時的に増加した後、6 h 後に低下し、その後再び上昇し、7 および 8 h 後に投与前と比べて有意差があった。このような LPS 投与後の LAP 濃度の変化に違いが生じた理由は、本実験において個体差が大きかったためと思われる。すなわち、ウシによって、2~5 h 後のみ濃度が高くなるウシと 10~12 h 後のみ濃度が高くなるウシが存在していたが、これらを平均したため今回のような結果になったと考えられる。しかし、このような LPS 投与後の LAP 濃度の上昇パターンが違うことが何によるものなのか興味深い。また、本実験で 6 h 後に LAP 濃度が一時的に減少したもう一つの理由として、LPS を投与していない 3 分房を 16 時に搾乳した直後だったため、オキシトシンが分泌されて乳腺から乳槽内へ乳汁が分泌され、乳量が一時的に増加したために LAP 濃度が低下したためだったのかもしれない。

い。

乳汁中 LF 濃度は非接種牛では LPS 投与の 31, 48 および 55 h 後に, 接種牛では 55 および 79 h 後に LPS 投与前に比べて有意に高い値を示した (図 3-9)。Huang *et al.* (2012) の成績では, 2 日後の朝および夕方 (48, 51 h), 3 日後の朝 (72 h), 5 日後の朝 (120 h) の LF 濃度が, LPS 投与前に比べて有意に高い値を示しており, 今回とほぼ同様の成績であった。

以上のように, ETEC ワクチンの接種により, 血清中の抗体価が高くなり, LPS 投与時における乳汁中の SCC, LF および LAP 濃度が低くなり, 乳量の低下が緩和され, 血清中 Hp 濃度が早く低下することが示唆され, 乳房炎の症状が軽減されたと考えられた。

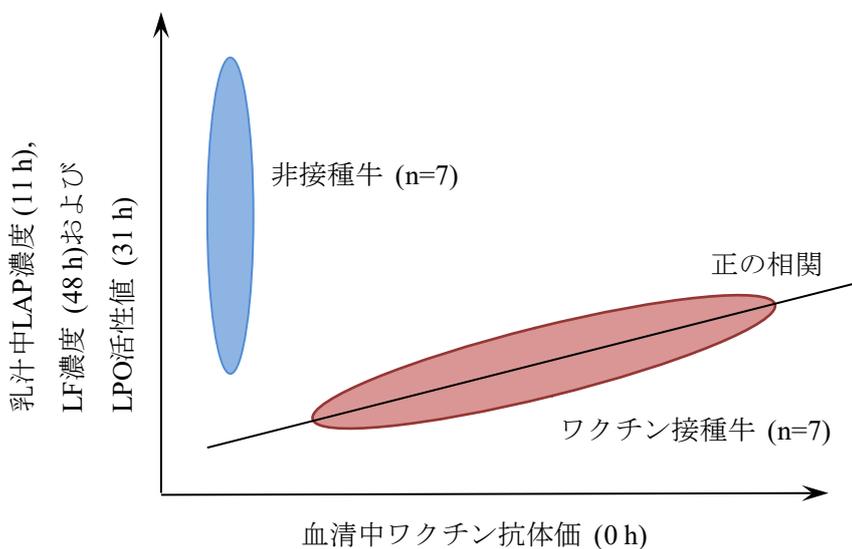


図 3-14 血清中ワクチン抗体価と, 乳汁中 LPO 活性値, LAP 濃度および LF 濃度との関係 (模式図)

要約

本章では、LPS 投与後の乳腺の自然免疫機能に及ぼす ETEC ワクチンの影響を明らかにすることを目的とし、ワクチン接種牛と非接種牛の乳房にそれぞれ LPS を投与し、その後の臨床症状、血液成分および乳汁中自然免疫因子の変化を比較検討した。

泌乳中期の乳牛 14 頭を供試し、うち 7 頭には ETEC ワクチンを接種し、残りの 7 頭は無処置とした。ワクチン接種の 3 週間後、全頭の後ろの 1 分房に 10 µg/ml LPS 溶液を 10 ml 投与した。投与の 12 時間 (12 h) 後までは 1 時間おきに、LPS 投与 1~4 日後は 1 日 2 回 (9 時, 16 時) 生乳サンプルを採取し、それと同時に直腸温度 (体温) を測定した。血液サンプルを LPS 注入 0, 4, 8, 24, 48, 72, 96 h 後に頸静脈から採取した。乳汁については、体細胞数 (SCC), Lactoperoxidase (LPO) 活性, Lingual antimicrobial peptide (LAP) 濃度, Lactoferrin (LF) 濃度を測定し、血清については Haptoglobin (Hp) 濃度, C-reactive protein (CRP) 濃度, ワクチン抗体価, 抗 J5 抗体価, IgG 濃度を測定した。

LPS 投与 10 h 後の接種牛の平均体温は、非接種牛のそれに比べて有意に高かった。LPS 投与 24 h 後の LPS 投与分房の乳量 (Q-milk) は、非接種牛では LPS 投与前に比べて有意に少なかったが、接種牛では有意な低下は認められなかった。LPS 投与 12 および 55 h 後の SCC, 8 h 後の LAP 濃度, 55 h 後の LF 濃度は、それぞれ接種牛が非接種牛に比べて有意に低かった。非接種牛および接種牛の血清中 Hp 濃度は LPS 投与の 24 h 後に LPS 投与前に比べて有意に高い値となり、非接種牛では 96 h 後まで、接種牛では 72 h 後まで LPS 投与前に比べて有意に高い値となった。血清中 CRP 濃度は LPS 投与前に比べて有意な濃度上昇は認められなかった。0 h の接種牛のワクチン抗体価および抗 J5 抗体価は非接種牛に比べて高かったが、IgG 濃度は両区間に有意差は認められなかった。

乳汁中の SCC, LPO 活性, および LF 濃度の間に有意な正の相関が認められた。また、Q-milk と、SCC, LPO 活性, LAP 濃度, LF 濃度の間に有意な負の相関が認められた。非接種牛の SCC と IgG 濃度との間および抗 J5 抗体価と LF 濃度の間に有意な正の相関が認められた。接種牛のワクチン抗体価と LPO 活性, LF 濃度との間に有意な正の相関が認められたが、

非接種牛には認められなかった。

以上の結果から、ワクチン接種により抗体価が高まり、LPS に対する乳腺の SCC, LAP 濃度, LF 濃度の上昇が弱まり、これらに伴って乳房炎による過剰な炎症が防止されている可能性が示唆された。

第4章 総合考察

世界的な気候変動による穀物生産量の不安定化やバイオエタノールの増産による穀物需要の増加などにより、近年は穀物飼料の価格が上昇傾向にあり、輸入飼料に依存する我が国の畜産業は慢性的な高コスト体質になっている。その一方で市販の牛乳は小売店の特売商品として扱われることも多く、販売価格を抑える必要から、乳業メーカーの生乳買い取り価格は、飼料コストの上昇分を吸収できるほどには上がっていない。安定した経営のためには乳房炎などの病傷事故による損失を抑制する必要性がある。乳房炎が発生すると、乳汁中の体細胞数の増加や牛乳の風味の変化などが生じて品質が低下し、著しい場合は生乳の買い取り価格が引き下げられたり、生乳の引き取りを拒絶される場合もある。また、治療のために抗菌製剤を投与すれば、定められた期間生乳の出荷が禁止されるため、収入の減少に直結する。大腸菌性乳房炎は乳房炎による死産事故の32%と最も多い（平成21年度家畜共済統計）。その中でも急性大腸菌性乳房炎（ACM）は全身症状を伴う場合があり、重症の場合は死に至るか、あるいは回復した場合であっても泌乳量が著しく減少して経済的価値を失い、廃用せざるを得なくなることになるため、酪農家が被る損失は大きい。また、ACMは分娩直後に好発するため、乳生産を開始する前に廃用になった場合、それまでに投資した飼養コストを回収できなくなるため、さらに損失が大きくなる。

ACMはウシの周囲の環境中に存在するグラム陰性桿菌が感染して発症する乳房炎で、*E. coli*（糞便由来）、*Klebsiella*（オガクズ由来）、*Enterobacter*、*Serratia*、*Pseudomonas*（汚水由来）、*Proteus*（汚水由来）などがこれに含まれる。グラム陰性桿菌の細胞壁にはLPSが含まれ、これが病原体関連分子パターン（PAMPs）としてウシの免疫系に検知されることにより、症状が発現する。しかし、LPSそのものに酵素活性があるわけではなく、生体側の反応が疾病を発現させている（横地，2002）。LPSを検知した細胞（乳腺上皮細胞やマクロファージ等）は炎症性サイトカインを分泌するが、過剰になると全身性炎症反応症候群（SIRS）

を発症する（篠塚，2008）。

ACM は環境性乳房炎に分類されることから、環境中の大腸菌群数を減らすことが ACM の予防につながる。しかしながら、気温が上昇する夏から秋にかけての時期は、環境中の大腸菌群数が増加する（Hogan *et al.*, 1989）ため、乳房が接触する牛床中の菌数も増加し、乳房炎のリスクが増加すると報告されている（Bramley and Neave, 1975）。また、現在の搾乳システムではミルカー離脱時に乳汁の乳房内への逆流が避けられず（板垣，2005）、その際、乳頭に付着した細菌を乳房内に吸引してしまう恐れがあるため、衛生対策による乳房内感染症の予防には限界がある。

海外では、ACM の対策として大腸菌あるいはサルモネラの変異株から製造されたワクチンが乳房炎予防用に使用されてきた。González *et al.*（1989）は、前向きコホート研究を行い、分娩後 3 ヶ月間、J5 ワクチン接種牛のグラム陰性菌による乳房炎の発生率が非接種牛より低かったと報告した。しかし、Hill（1991）は、ワクチン接種後に乳房内へ大腸菌を接種する実験を行ったところ臨床型乳房炎を発症したことから、ワクチンでは ACM を防御できなかったと報告した。これに対し、Hogan *et al.*（1992b）は、J5 ワクチン接種牛および非接種牛に対し分娩 30 日後に大腸菌を注入したところ、乳房炎を発症したがワクチン接種牛では臨床症状が軽減されたと報告した。また、Hogan *et al.*（1995）は、非接種牛にアジュバントのみを注射して、分娩 30 日後に大腸菌を乳房内へ注入し、J5 ワクチンを接種したウシと比較したところ、J5 ワクチン接種牛は非接種牛に比べて乳房内感染の持続期間が短く、局所症状が軽減されたと報告した。Wilson *et al.*（2007a）は、3 農場のウシでランダム化比較試験を行って J5 ワクチン接種牛と非接種牛を比較し、ワクチン接種により重症の乳房炎や死産事故は減るが、乳房炎発生率は減らないと報告した。Wilson *et al.*（2007b）は、分娩 8～16 日後に *E. coli* を乳房内に注入したところ、J5 ワクチンを接種したウシでは乳汁中の菌の除去が早く、乳量損失が減ったと報告した。

以上のように、J5 ワクチンを接種した場合、乳房炎の症状の軽減や死廃事故の減少が起きると報告されている。

一方、日本には認可を受けた乳房炎ワクチンが無いが、下痢予防用の大腸菌ワクチン (ETEC ワクチン) は市販されているため、これを乳房炎予防用に用いることが考えられる。しかし、このような実験はほとんど行われていない。そのため、本研究では、ETEC ワクチンが乳房炎の発生率および死廃率に及ぼす影響を調べるため、ランダム化比較試験を実施した。

第2章実験1では、2007年に4戸273頭、2008年に3戸207頭を供試し、それぞれ133頭および102頭にETECワクチンを1ヶ月間隔で2回皮下接種した。その後1年以内の乳房炎発生件数およびそれらの転帰（治癒、死亡・廃用）を調査した。その結果、2007年の乳房炎発生率は接種牛と非接種牛で有意差はなかったが、乳房炎発生牛の生存曲線は接種牛と非接種牛とで有意に異なり、生存率は接種牛の方が高く推移した（図2-2）。症状の重い甚急性乳房炎発生牛の死廃率は接種牛が非接種牛に比べて有意に低かった（表2-1）。2008年は乳房炎発生率および死廃率ともに接種牛と非接種牛で有意差はなかった。

以上のことから、ETEC ワクチンの接種により乳房内感染を予防する効果については認められなかったが、乳房炎発生後の死廃率は低下することが示唆された。しかし、第2章実験1ではグラム陰性菌に起因する乳房炎に限定した調査を実施していないため、ACMの発生を抑制するか否かについては、より詳細な調査が必要と思われる。また、ETEC ワクチンを接種したウシであっても重症の乳房炎が発生し、死亡または廃用に至った例がなお存在していた。したがって、ワクチン接種によりウシの生理状態がいかに変化するのか、そしてACM発生時にどのような応答をするのかについて詳細な検討が必要である。そこで、第2章実験2では、ワクチン接種がACMを発症したウシの血液成分に及ぼす影響について検討した。乳汁からグラム陰性菌が分離されたACM発生牛56症例を供試し、乳汁からの分離菌種と生菌数、初診時の臨床病理学的検査成績、ワクチン接種の有無、ワクチン接種日、ワクチンプログラムの種類を調査し、血清中のワクチン抗体価、抗J5抗体価、IgG濃度、

Hp 濃度を測定した。これらの項目について治癒牛と死亡・廃用牛を比較し、ACM の転帰に関連する要因を抽出してワクチン接種牛と非接種牛とを比較した。接種牛 31 例（治癒 22, 死亡・廃用 9）、非接種牛 25 例（治癒 14, 死亡・廃用 11）であり、発生時期は 6 月が 23%（13 例）で最も多く、6～9 月に 71%（40 例）が発生していた（図 2-4）。また、分娩後日数では、分娩後 10 日以内が最も多く、14%（8 例）が発生していた（図 2-5）。

非接種牛では、治癒牛の年齢、T-Bil, BUN および生菌数は死亡・廃用牛に比べて有意に低く、PLT は有意に高かった（表 2-6）。しかし、接種牛では治癒牛の T-Bil, CK, Hp および乳汁中の生菌数が死亡・廃用牛のそれらに比べて有意に低かったものの、年齢や PLT では両者間に有意差が無かった。このように、治癒牛と死亡・廃用牛との間に有意差が認められた因子には、ワクチン接種、非接種間で違いが認められた。ワクチンプログラムによる比較では、分娩とは無関係に初夏に一斉接種した時（n=18）の死廃率（11%）は、季節に関係なく分娩前に接種時（n=13）の死廃率（54%）に比べて有意に低かった（表 2-7）。ワクチン抗体価は、非接種牛に比べて接種牛が有意に高かった（図 2-8）。

以上のように、ワクチン非接種牛では、治癒牛が死亡・廃用牛に比べ、有意に低い年齢であり、有意に高い PLT 値を示したが、ワクチン接種牛では有意差がなかった。このことからワクチン接種牛では、高齢牛の重篤度や血液凝固系の異常が軽減される可能性が考えられた。また、ワクチンプログラムは初夏一斉接種の方が分娩前接種よりも効果が高いことが示唆された。ワクチンの接種方法および回数に関しては、通常、子牛の下痢を予防する観点から、初回は分娩前に 2 回、次回の分娩時には 1 回、それぞれ皮下接種することとされている。平田ら（1991）および溝渕ら（1997）は、ともに ETEC ワクチンの接種を分娩前に実施していた。泌乳期のウシに ETEC ワクチンを接種した場合、次回分娩時に子牛の下痢を防ぐことができるかという点は明らかでないため、今後検討する必要がある。一方、泌乳期のウシへの ETEC ワクチンの接種は、ワクチンに含まれる LPS がウシの健康に悪影響を及ぼすことが懸念される（中澤, 1992; 小峯, 2011; 2012）。本ワクチンの説明書には、一時的な体温上昇が起きる可能性があるが 1～2 日で回復するとされている。Musser and

Anderson (1996) は、J5 ワクチン-トキソイドを泌乳牛に接種すると短期間乳量が減少したと報告した。また、泌乳牛に ETEC ワクチンを接種すると、直後に白血球数、LPS-binding protein (LBP) および haptoglobin 濃度の一時的な増加が観察され、急性炎症が起きたことが示唆されたが、これらは 5 日以内に接種前の水準に戻り、乳量にも影響は現れなかった (森本ら, 2010)。本ワクチンの接種に関して、肉および生乳の出荷についての制限は定められていないことから、現在のところ泌乳期の接種に対する法的な障害は無い。以上のことから、泌乳期のウシへの ETEC ワクチンの接種は十分可能と考えられた。

第 2 章実験 1 の 2007 年の成績をもとに、ETEC ワクチンの費用対効果について、現在の生乳、飼料、初妊牛導入牛価格から試算を試みたところ、年間の乳房炎死廃頭数が搾乳牛頭数に占める割合が 1%以上であれば、有利な経済効果が現れることが示唆された。乳房炎死廃率は農家ごとに異なると考えられるため、ワクチン接種の妥当性は個々の乳房炎死廃状況を考慮して判断すべきと考えられる。したがって、飼料コストや初妊牛導入費用などをもとに個別に費用対効果を試算し、検討するべきと考えられる。

ワクチンの投与経路に関しては、Hogan *et al.* (1997) および Smith *et al.* (1999) が J5 ワクチンの乳房内投与を試み、皮下接種に比べて IgG および IgM 濃度が有意に高かったと報告した。乳房炎のような粘膜の感染予防では、免疫グロブリンのうち分泌型 IgA が関与している。抗原特異的 IgA を誘導するには経粘膜的にワクチンを投与する必要があることから (矢田, 2005)、乳房炎予防を目的にワクチンを用いる場合も経粘膜的に投与することによって効果を高められる可能性が考えられ、本研究で用いた下痢用ワクチンも乳房内投与を検討する必要があるだろう。

ACM の症例では血小板減少症が起きることが知られている。第 2 章実験 2 では、非接種牛において、治癒牛に比べて死亡・廃用牛の PLT 値が有意に少なかったが、接種牛では両

区間で PLT 値に有意差はなかった (表 2-6)。これらのことから、ワクチン接種により乳房炎発症時の PLT の減少が抑制されたと考えられた。この血小板減少症は、播種性血管内血液凝固 (DIC) の進行に伴って起きると考えられる (Ismail and Dickinson, 2010)。初谷ら (1990) は ACM の発症に伴う血小板数の減少に着目し、ヘパリン併用輸液と輸血療法によって治癒率が大幅に上がったと報告した。以上のことから、ETEC ワクチン接種牛に ACM が発生した際の血小板減少症の抑制が、死廃率低減に関与した可能性が考えられた。DIC の治療法としてはアンチトロンビンの投与が一般的であり (Iba *et al.*, 2012)、初谷らが行った輸血療法はその補給を意図したものであるが、輸血という手段は牛白血病などを伝播する恐れがあることから、安易な応用は難しい。したがって、より現実的な方法として、アンチトロンビン製剤による代用が考えられる。

以上のように、第 2 章ではワクチン接種により乳房炎による死廃率が減少できた。ワクチン接種はワクチン抗体価の増加と関係していたが、抗体価の多寡と ACM 発症牛の転帰との関連性は見出せなかった。抗体産生、いわゆる獲得免疫は自然免疫と密接に関係しているが、ワクチン投与が自然免疫に及ぼす影響についての報告はほとんどない。そこで、第 3 章では LPS 溶液の乳房内投与を行い、それによって生じた自然免疫応答について、ETEC ワクチン接種牛と非接種牛とを比較した。泌乳中期牛 14 頭を供試し、7 頭に ETEC ワクチンを 1 回接種し、3 週間後に全頭に対し LPS 100 μg を後ろの 1 分房に投与後、生乳サンプルおよび血液サンプルを 4 日間採取した。

その結果、ワクチン投与により体温は上昇し (図 3-4)、乳量は増加し (図 3-5)、SCC (図 3-6)、乳汁中 LAP 濃度 (図 3-8)、乳汁中 LF 濃度 (図 3-9)、血清中 Hp 濃度は低下した (図 3-10)。また、LPS 投与前の血清中抗体価および抗 J5 抗体価は接種牛が非接種牛に比べて有意に高い値を示したが、IgG 濃度は両群間で有意な差はなかった (図 3-12)。

自然免疫応答は、主に LPS や cytosin phosphate guanine (CpG) motif などの PAMPs に対して起きる反応であり、特異的記憶は生じないとされている (Kurtz, 2005; 古澤ら, 2011) こ

とから、LPS 投与に対する自然免疫応答は、ワクチン接種牛と非接種牛との間で差が無いのではないかと考えられる。しかし第3章の実験の結果、ETEC ワクチンはLPS 投与後の SCC, LAP, および LF の応答を緩和することが示唆された。また、ワクチン抗体価はワクチン接種牛が非接種牛に比べて高かったことから ETEC ワクチン接種後に抗体価が上昇することにより、乳腺局所の SCC, LAP, LF の応答が抑制されたのかもしれない。乳汁中の LAP および LF は主に乳腺上皮細胞から分泌されることから、乳汁中の自然免疫因子の減少は、乳腺局所の炎症反応の程度を示していると考えられる。また、これらと血液中の WBC, Ca, Hp が有意な相関を示したことから (表 3-1), 局所の自然免疫応答は、全身症状の程度と正の相関があると考えられた。すなわち、ETEC ワクチンをウシに接種することにより血液中の抗体価が上昇し、抗体が乳房内に侵入した腸内細菌の菌体から遊離した LPS と結合することによって、LPS が TLR4 と結合するのを妨げ、乳腺局所の自然免疫応答を低下させる。また、それに伴って全身の炎症反応の抑制も起こり、過度の炎症反応が抑制されて、結果として死産率が低下したと考えられた (図 4-1)。

大腸菌ワクチンの作用機序については、海外で使用される J5 ワクチンについて調べられている。特異抗体が乳房炎の症状を軽減するとする説が旧来からあり、これを裏付けるものとして、抗 J5 抗体を含む血清あるいは血漿をヒトの敗血症患者に投与すると死亡率が低下するという報告がある (Braude *et al.*, 1977; Ziegler *et al.*, 1982; Baumgartner *et al.*, 1985)。この他、ウマや (Spier *et al.*, 1989), モルモットでも同様の報告がある (Dunn and Ferguson, 1982)。J5 は多様なグラム陰性菌と血清学的に交差することが報告されており (Tyler *et al.* 1991; Tomita *et al.*, 1995), ETEC ワクチンの場合も J5 と血清学的に交差することがわかっている (森本ら, 2009) ことから、ETEC ワクチンの場合も J5 ワクチン同様、乳房炎死産率の低減効果にワクチン抗体が関与している可能性が考えられた。一方、Dosogne *et al.*, (2002) は、ワクチン接種をすると ACM 発生時に乳腺の過剰反応を起こし、多形核白血球 (PMNs) の漏出を強化するという説を採用し、これには局所の免疫記憶細胞が関わるとしている。すなわち、乳房内に侵入した大腸菌を早期に貪食・殺菌することによって症状の重篤化・

長期化を防ぐとする仮説である。これらの仮説は、いずれも J5 ワクチンの接種により *E. coli* に対する獲得免疫が得られるとの考え方に基づいている。

第3章の結果から、ETEC ワクチン接種牛では、非接種牛に比べて乳腺の SCC, LAP, LF の応答が抑制されていることが示唆された。したがって、何らかの免疫制御が働いたと考えられ、免疫の制御が起きたことにより過剰な免疫応答が抑えられ、死産率を低下させたと考えられた。萩原 (2006) は、急性乳房炎発症牛の初診時の血清および乳清中のサイトカイン濃度を調べ、予後 (治癒あるいは廃用) により比較したところ、炎症性サイトカインの IL-1 の作用を調整する IL-1 receptor antagonist (IL-1ra) の血清中濃度が、治癒牛に比べて廃用牛で低く、乳清中 IL-1 receptor type 2 (IL-1R2) 濃度も同様であった。これらのことから、治癒に至るウシは、既に初診時の段階で IL-1 に対する抑制性分子の産生が多く、それにより過度の IL-1 の作用が調節されている可能性があるとして報告した。このように、初診時の段階で既に過剰な炎症を抑制するメカニズムが働いている可能性が示されている。

本研究では腸内細菌を主な原因菌とする ACM に焦点を当てたが、その他にも黄色ブドウ球菌やレンサ球菌、コアグララーゼ陰性ブドウ球菌も乳房炎乳からの分離率が高い (図 1-1b)。これらの菌による乳房炎に対し ETEC ワクチンが効果を発揮するか否かは不明だが、これらはいずれもグラム陽性菌でありグラム陰性菌とは細胞壁の構成成分が一部異なり、それに対するレセプターも異なる。また、大腸菌と黄色ブドウ球菌とでは自然免疫応答に違いがあるとされている (Bannerman *et al.*, 2004b)。したがって、ETEC ワクチンの接種はグラム陽性菌による乳房炎に対しては効果が低い可能性がある。

現在、ウシ用として日本で認可されているワクチンの中に、大腸菌以外のグラム陰性菌を使用したものがいくつかある。大腸菌ワクチン同様、下痢予防用として牛サルモネラ 2 価ワクチン (北里第一三共ワクチン, 埼玉)、肺炎の予防用としてキャトルバクト 3 (微生物化学研究所)、牛ヘモフィルスワクチン-C (微生物化学研究所)、牛ヒストフィルス・ソ

ムニワクチン(化血研)がある。キャトルバクト3は *Histophilus somni*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* の3種類が含まれている。ETEC ワクチンの持つ乳房炎死廃事故低減効果がワクチンに含まれる菌体抗原によってもたらされるのだとすれば、これらのグラム陰性菌ワクチンも、ACM の症状軽減に効果を示す可能性が考えられる。なお、同じく肺炎予防用のリスポバル (Pfizer, 東京) は *Mannheimia haemolytica* が使用されているが、本ワクチンは全菌体ではなくロイコトキソイドと莢膜多糖体を抗原としており、本研究で用いた大腸菌不活化ワクチンとは含まれる抗原が大きく異なるため、該当しない可能性がある

第2章実験2では、ACM の野外症例において、ETEC ワクチン接種牛の血清中 IgG 濃度は、非接種牛に比べて有意に低かった (図2-8)。一方、第3章においては、LPS 投与前のワクチン接種牛および非接種牛の間に、血清中 IgG 濃度に有意な差はなかった (図3-12)。したがって、第2章実験2において、接種牛の IgG 濃度が非接種牛に比べて低いという結果は、ETEC ワクチンの接種により IgG 濃度が低下したのではなく、ACM 発生後に接種牛の IgG 濃度が低下した可能性がある。

本研究を通じて、大腸菌不活化ワクチン (ETEC ワクチン) の接種により ACM 発生時の乳房における SCC, LAP, LF の応答が抑制され、それに伴って免疫の過剰反応が抑制されることにより、乳房炎死廃事故が低減することが考えられた。また、従来行われていた分娩前の逐次接種よりも、初夏一斉接種の方が効果的であることが示唆された。

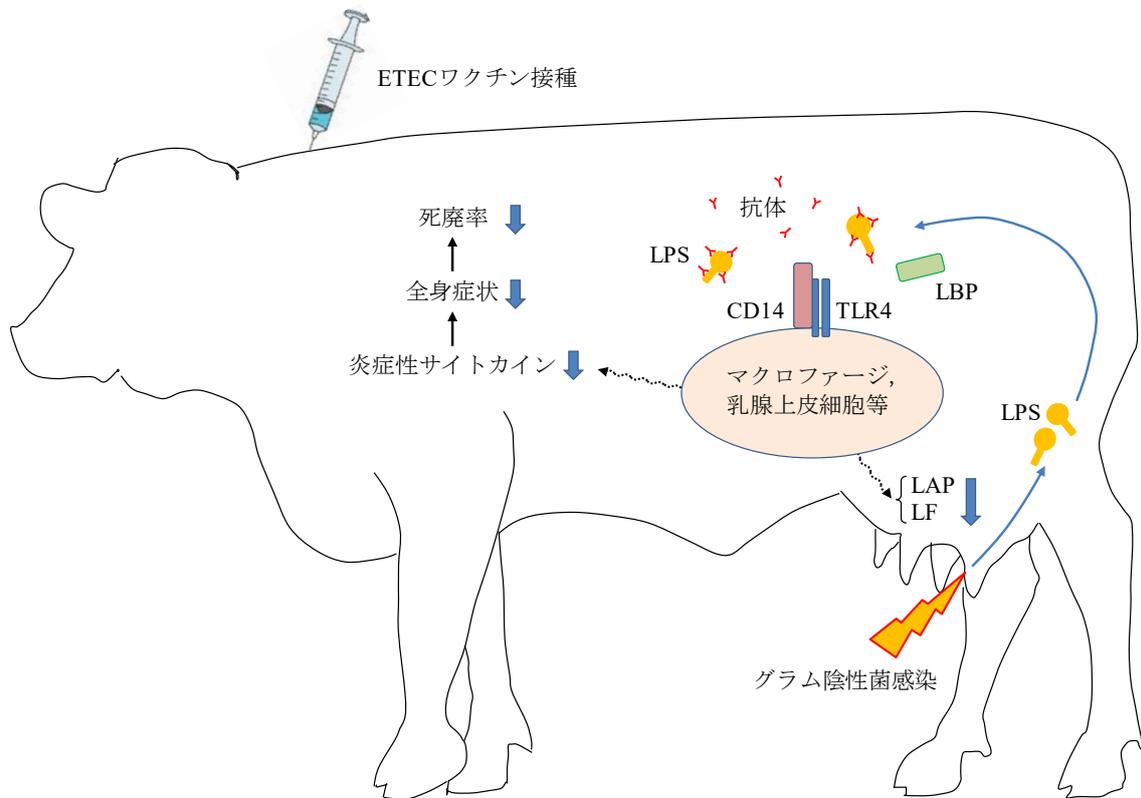


図 4-1 ワクチン抗体による乳腺および全身の自然免疫応答抑制メカニズム
(古澤ら, 2011 を参考に作図)

LPS = lipopolysaccharide, LBP = lipopolysaccharide binding protein,

CD14 = cluster of differentiation 14, TLR4 = toll-like receptor 4,

LAP = lingual antimicrobial peptide, LF = lactoferrin

第5章 総括

本研究は、乳牛の大腸菌性乳房炎予防のための大腸菌不活化ワクチンの応用を目指し、下痢予防用の大腸菌不活化ワクチンの接種が乳牛の乳腺の免疫機能に及ぼす影響を調べることを目的とした。このため、野外研究において大腸菌不活化ワクチンが乳房炎の発生率およびそれによる死廃率に及ぼす影響を調べた。さらに、大腸菌不活化ワクチンの接種が、lipopolysaccharide (LPS) を乳房内に投与した際の自然免疫応答に及ぼす影響を調べた。

1. 大腸菌不活化ワクチンの接種が牛の乳房炎の発生率、死廃率および乳汁、血液成分に及ぼす影響

(1) 大腸菌不活化ワクチンの接種が乳房炎発生率および死廃率に及ぼす影響

2007 および 2008 年に酪農家 5 戸の乳牛を用いてランダム化比較試験を行った。供試牛は、2007 年は 4 戸 273 頭、2008 年は 3 戸 207 頭を用いた。各戸のウシをランダムにワクチン接種牛と非接種牛とに区分けし、接種牛には大腸菌不活化ワクチンを約 1 ヶ月間隔で 2 回接種した。使用した大腸菌ワクチンは、本来妊娠母牛に接種し、初乳を介して子牛に抗体を付与し、子牛の大腸菌性下痢症を防ぐ目的で使われるものだが、実験では接種を 5~7 月に農家ごとに 1 日で行った。家畜診療所の治療を受け、カルテに記録された臨床型乳房炎を乳房炎と定義し、供試頭数に対する乳房炎発生頭数の割合を発生率とした。また、乳房炎発生後の転帰（治癒あるいは死亡・廃用）に基づいて、乳房炎発生頭数に対する死亡・廃用牛の割合を死廃率と定義した。2007 年の試験の結果、接種牛と非接種牛で乳房炎発生率に差はなかったが、接種牛の死廃率が非接種牛に比べて低くなる傾向があり、生存時間分析において両者の生存関数に有意差が認められた。また、症状の重い甚急性乳房炎の発生率は接種牛と非接種牛で差はなかったが、接種牛の死廃率が非接種牛に比べて有意に低かった。2008 年は乳房炎発生率および死廃率ともに差は認められなかった。

以上の結果から、大腸菌不活化ワクチンの接種により、乳房炎発生率は変化しないが、

乳房炎発生時の死廃率が低下することが示唆された。

(2) 大腸菌不活化ワクチンの接種が大腸菌性乳房炎発生牛の血液成分および乳汁中生菌数に及ぼす影響

罹患乳房からグラム陰性桿菌が分離された大腸菌性乳房炎の乳牛 56 頭を用いて後ろ向きコホート研究を行った。これらのウシをワクチン接種歴により接種牛と非接種牛とに区分けし、それぞれその後の死廃率を比較検討した。また、大腸菌性乳房炎と診断された時の血液および乳汁検査データについて、大腸菌不活化ワクチン接種牛と非接種牛との比較および治癒した症例と死亡・廃用となった症例との比較を行った。56 例中ワクチン接種牛 31 例（治癒 22，死亡・廃用 9），非接種牛 25 例（治癒 14，死亡・廃用 11）であった。接種牛は非接種牛に比べてワクチン抗体価が有意に高く，IgG 濃度が有意に低かった。非接種牛において，年齢，総ビリルビン，血液尿素窒素，生菌数は治癒牛に比べて死廃牛が有意に高く，血小板数は逆に死廃牛が有意に低かった。接種牛においては，総ビリルビン，クレアチンキナーゼ活性，ハプトグロビン濃度および乳汁中の生菌数が治癒牛に比べて死廃牛の方が有意に高かったが，年齢および血小板数については，両者間に有意差は認められなかった。

ワクチンを分娩に関係なく初夏に一斉接種したウシと，季節に関係なく分娩前に接種したウシとを比較すると，初夏一斉接種の死廃率（11%，2/18）が分娩前接種の死廃率（54%，7/13）より有意に低かった。

以上の結果から，大腸菌不活化ワクチンを接種すると高齢牛でも治癒する可能性が高くなり，大腸菌性乳房炎発生時の血小板の減少が緩和されると考えられた。また，ワクチンの接種時期は分娩前の逐次接種よりも初夏一斉接種の方が効果的であると考えられた。

2. 大腸菌不活化ワクチンの接種が LPS を注入したウシ乳腺の自然免疫機能に及ぼす影響

大腸菌不活化ワクチンを接種した際に起きる大腸菌性乳房炎の症状の緩和が，自然免疫

応答においても起きるか否かを明らかにするため、泌乳中期のホルスタイン種乳牛 14 頭を供試し、7 頭に大腸菌不活化ワクチンを 1 回皮下接種した。その 3 週間後、全頭の後ろの片側の乳房内に LPS を投与した。生乳は、1 日目は LPS 投与前 (0 h) および 1 時間 (1 h) 後から 12 h 後まで 1 時間おきに採取し、2 日目から 4 日目まで 1 日 2 回 9 時と 16 時に採取した。血液は 0, 4, 8, 24, 48, 72, 96 h 後に採取した。生乳は体細胞数 (SCC), lactoperoxidase (LPO) 活性, lingual antimicrobial peptide (LAP), lactoferrin (LF) 濃度を測定した。各検査値の平均値がピークとなった時点の値を用いて相関分析を行った。血液成分は、血球数、血清の生化学的検査の他、ワクチン抗体価および抗 J5 抗体価、haptoglobin 濃度を測定した。

12, 55 h 後の SCC, 8 h 後の LAP 濃度, 55 h 後の LF 濃度は、それぞれ非接種牛に比べて接種牛の方が有意に低かった。ワクチン接種牛において、0 h のワクチン抗体価と 31 h 後の LPO 活性, 48 h 後の LF 濃度が有意な正の相関を示したが、非接種牛では相関が見られなかった。非接種牛の 0 h の IgG 濃度は 12 h 後の SCC との間に有意な正の相関を示したが、接種牛では両者間に相関が無かった。24 h 後の LPS 投与前の乳房の乳量は、非接種牛では投与前に比べて有意に減少したが、接種牛では有意な減少は認められなかった。

以上の結果から、大腸菌不活化ワクチンを接種すると、乳房に LPS を投与した時の乳汁中の SCC, LAP, LF 濃度の上昇が緩和されることが示唆された。また、ワクチン非接種牛については、IgG 濃度によってそのウシの体細胞動員能力の程度を予測できる可能性が示唆された。

3. 結論

本研究の結果、下痢予防用大腸菌不活化ワクチンの接種により、大腸菌性乳房炎発生時の反応が抑制されて乳汁中の SCC, LAP, LF の値の上昇が抑制され、それに伴って過剰な炎症反応が抑制され、乳房炎死産事故が低減することが示唆された。また、下痢予防用不活化ワクチンの接種方法については、従来行われていた分娩前の逐次接種よりも、初夏の一斉接種の方が効果的であると推察された。

引用文献

- 安里 章, 河合一洋, 大林 哲 (監修), 2005. MASTITIS CONTROL, 十勝乳房炎協議会 (TMC), 北海道.
- Arnold, R. R., M. F. Cole, and J. R. McGhee, 1977. A bactericidal effect for human lactoferrin. *Science* 197: 263-265.
- Bannerman, D. D., M. J. Paape, W. R. Hare, and J. C. Hope, 2004a. Characterization of the bovine innate immune response to intramammary infection with *Klebsiella pneumoniae*. *J. Dairy Sci.* 87: 2420-2432.
- Bannerman, D. D., M. J. Paape, W. R. Hare, and E. J. Sohn, 2003. Increased levels of LPS-binding protein in bovine blood and milk following bacterial lipopolysaccharide challenge. *J. Dairy Sci.* 86: 3128-3137.
- Bannerman, D. D., M. J. Paape, J. -W. Lee, X. Zhao, J. C. Hope, and P. Rainard, 2004b. *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* elicit differential innate immune responses following intramammary infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 11: 463-472.
- Baumgartner, J. -D., M. P. Glauser, J. A. McCutchan, E. J. Ziegler, G. van Melle, M. R. Klauber, M. Vogt, E. Muehlen, R. Luethy, R. Chiolero, and S. Geroulanos, 1985. Prevention of gram-negative shock and death in surgical patients by antibody to endotoxin core glycolipid. *Lancet* 2(8446): 59-63.
- Bramley, A. J., and F. K. Neave, 1975. Studies on the control of coliform mastitis in dairy cows. *Br. Vet. J.* 131: 160-169.
- Braude, A. I., E. J. Ziegler, H. Douglas, and J. A. McCutchan, 1977. Antibody to cell wall glycolipid of gram-negative bacteria: Induction of immunity to bacteremia and endotoxemia. *J. Infect. Dis.* 136 Supplement: S167-S173
- Broadhurst J., and C. Paley, 1939. A single-dip stain for the direct examination of milk. *J. Am. Vet.*

- Med. Assoc. 94: 525-526.
- Burvenich C., V. Van Merris, J. Mehrzad, A. Diez-Fraile, and L. Duchateau, 2003. Severity of *E. coli* mastitis is mainly determined by cow factors. Vet. Res. 34: 521-564.
- Carlstedt, F., M. Eriksson, R. Kiiski, A. Larsson, and L. Lind, 2000. Hypocalcemia during porcine endotoxemic shock: Effects of calcium administration. Crit. Care Med. 28: 2909-2914.
- Corl, C. M., J. C. Gandy, and L. M. Sordillo, 2008. Platelet activating factor production and proinflammatory gene expression in endotoxin-challenged bovine mammary endothelial cells. J. Dairy Sci. 91: 3067-3078.
- Cross, A. S., S. M. Opal, H. S. Warren, J. E. Palardy, K. Glaser, N. A. Parejo, and A. K. Bhattacharjee, 2001. Active immunization with a detoxified *Escherichia coli* J5 lipopolysaccharide group B meningococcal outer membrane protein complex vaccine protects animals from experimental sepsis. J. Infect. Dis. 183: 1079-1086.
- DeGraves, F. J., and K. L. Anderson, 1993. Ibuprofen treatment of endotoxin-induced mastitis in cows. Am. J. Vet. Res. 54: 1128-1132.
- Dosogne H., F. Vangroenweghe, and C. Burvenich, 2002. Potential mechanism of action of J5 vaccine in protection against severe bovine coliform mastitis. Vet. Res. 33: 1-12.
- Dunn, D. L., and R. M. Ferguson, 1982. Immunotherapy of gram-negative bacterial sepsis: Enhanced survival in a guinea pig model by use of rabbit antiserum to *Escherichia coli* J5. Surgery 92: 212-219.
- Eckersall, P. D., and R. Bell, 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. Vet. J. 185: 23-27.
- Erskine, R. J., A. R. Brockett, N. D. Beeching, R. W. Hull, and P. C. Bartlett, 2010. Effects of changes in number of doses and anatomic location for administration of an *Escherichia coli* bacterin on serum IgG1 and IgG2 concentrations in dairy cows. Am. J. Vet. Res. 71: 120-124.
- Erskine, R. J., E. J. VanDyk, P. C. Bartlett, J. L. Burton, and M. C. Boyle, 2007. Effect of

- hyperimmunization with an *Escherichia coli* J5 bacterin in adult lactating dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 231: 1092-1097.
- 舟尾暢男, 2007. R Commander ハンドブック, 九天社, 東京.
- 古澤修一, 保田昌宏, 多田富雄 (監訳), 2011. イラストでみる獣医免疫学—免疫疾患の仕組みから治療まで—. Tizard, I. R. (著), 第7版, インターズー, 東京.
- Geiszt, M., J. Witta, J. Baffi, K. Lekstrom, and T. L. Leto, 2003 Dual oxidases represent novel hydrogen peroxide sources supporting mucosal surface host defense. FASEB J. 17: 1502-1504.
- González, R. N., J. S. Cullor, D. E. Jasper, T. B. Farver, R. B. Bushnell, and M. N. Oliver, 1989. Prevention of clinical coliform mastitis in dairy cows by a mutant *Escherichia coli* vaccine. Can. J. Vet. Res. 53: 301-305.
- Griel, L. C., A. Zarkower, and R. J. Eberhart, 1975. Clinical and clinico-pathological effects of *Escherichia coli* endotoxin in mature cattle. Can. J. comp. Med. 39: 1-6.
- Gupta, R. K., 1998. Aluminum compounds as vaccine adjuvants. Adv. Drug Deliv. Rev. 32 (3): 155-172.
- 萩原克郎, 2006. サイトカインと予後診断. 獣医畜産新報 59: 453-457.
- 函城悦司, 春海礼二, 余田 岬, 蓬萊英造, 西 剛, 皆木敏夫, 伊藤郁夫, 久米常夫, 1980. 乳牛の壊疽性乳房炎に関する研究 1. 発生状況. 日獣会誌 33: 319-324.
- 浜名克己 (監訳), 河合一洋, 竹内和世 (訳), 2012. 牛の乳房炎コントロール. Blowey, R., and P. Edmondson (著), 増補改訂版, 緑書房, 東京.
- 初谷 敦, 小岩政照, 安倍健彦, 南 繁, 鈴木隆秀, 1990. グラム陰性菌による牛の甚急性乳房炎に対する治療法の検討—特にヘパリン併用輸液の治療効果について—. 家畜診療 322: 17-24.
- 林 智人, 2012. 乳房炎による損失と発症要因, 乳房炎の防除. 139-145. デーリィ・ジャパン社, 東京

- Hill, A. W., 1981. Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* mastitis in the dairy cow. Res. Vet. Sci. 31: 107-112.
- Hill, A. W., 1991. Vaccination of cows with rough *Escherichia coli* mutants fails to protect against experimental intramammary bacterial challenge. Vet. Res. Commun. 15: 7-16.
- 平田 昇, 橋本芳昌, 岩瀬慎司, 斉藤伸一, 1991. 乾乳期に牛毒素原性大腸菌不活化ワクチンを投与した乳牛の分娩後における体細胞数の変化と臨床型乳房炎の発症率. 紫葉 36: 85-87.
- 平田陸正, 2002. エンドトキシンー概説, 細菌毒素ハンドブック. サイエンスフォーラム, 千葉, 481-486.
- Hirvonen, J., K. Eklund, A. M. Teppo, G. Huszenicza, M. Kulcsar, H. Saloniemi, and S. Pyörälä, 1999. Acute phase response in dairy cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. Acta. Vet. Scand. 40: 35-46.
- Hisaeda, K., H. Arima, T. Sonobe, M. Nasu, K. Hagiwara, R. Kirisawa, T. Takahashi, N. Kikuchi, and H. Nagahata. 2011. Changes in acute-phase proteins and cytokines in serum and milk whey from dairy cows with naturally occurring peracute mastitis caused by *Klebsiella pneumoniae* and the relationship to clinical outcome. J. Vet. Med. Sci. 73: 1399-1404.
- 久枝啓一, 今村智子, 有馬春樹, 園部隆久, 杉山美恵子, 井原晴喜, 永幡 肇, 2010. 乳牛の大腸菌群による甚急性乳房炎における低カルシウム血症とサイトカインの関係. 家畜診療, 57: 371-376.
- Hiss, S., M. Mielenz, R. M. Bruckmaier, and H. Sauerwein, 2004. Haptoglobin concentrations in blood and milk after endotoxin challenge and quantification of mammary Hp mRNA expression. J. Dairy Sci. 87: 3778-3784.
- Hogan, J., and K. L. Smith, 2003. Coliform mastitis. Vet. Res. 34: 507-519.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, K. H. Hoblet, D. A. Todhunter, P. S. Schoenberger, W. D. Hueston, D. E. Pritchard, G. L. Bowman, L. E. Heider, B. L. Brockett, and H. R. Conrad, 1989. Bacterial

- counts in bedding materials used on nine commercial dairies. *J. Dairy Sci.* 72: 250-258.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, D. A. Todhunter, and P. S. Schoenberger, 1992a. Field trial to determine efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine. *J. Dairy Sci.* 75 78-84.
- Hogan, J. S., K. L. Smith, P. Schoenberger, S. Romig, and L. Thompson, 1997. Responses of antibody titers to intramammary immunization with *Escherichia coli* J5 bacterin. *J. Dairy Sci.* 80: 2398-2402.
- Hogan, J. S., W. P. Weiss, K. L. Smith, D. A. Todhunter, and P. S. Schoenberger, 1995. Effects of an *Escherichia coli* J5 vaccine on mild clinical coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 78: 285-290.
- Hogan, J. S., W. P. Weiss, D. A. Todhunter, K. L. Smith, and P. S. Schoenberger, 1992b. Efficacy of an *Escherichia coli* J5 mastitis vaccine in an experimental challenge trial. *J. Dairy Sci.* 75: 415-422.
- Huang, Y. Q., K. Morimoto, K. Hosoda, Y. Yoshimura, and N. Isobe, 2012. Differential immunolocalization between lingual antimicrobial peptide and lactoferrin in mammary gland of dairy cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 145: 499-504.
- Hyvönen, P., T. Haarahiltunen, T. Lehtolainen, J. Heikkinen, R. Isomäki, and S. Pyörälä, 2010. Concentrations of bovine lactoferrin and citrate in milk during experimental endotoxin mastitis in early- versus late-lactating dairy cows. *J. Dairy Res.* 77: 474-480.
- Iba, T., D. Saito, H. Wada, and H. Asakura, 2012. Efficacy and bleeding risk of antithrombin supplementation in septic disseminated intravascular coagulation: A prospective multicenter survey. *Thromb. Res.* 130: e129-133.
- Ihaka R, and R. Gentleman, 1996. R: A language for data analysis and graphics. *J. Comput. Graph. Stat.* 5: 299-314.
- 石田恭子, 城田圭子, 2005. 敷料改善による大腸菌性乳房炎の防除対策. 第42回広島県畜産関係業績発表会集録.
- Ismail, Z. A. B., and C. Dickinson, 2010. Alterations in coagulation parameters in dairy cows

- affected with acute mastitis caused by *E. coli* and *S. aureus* pathogens. *Vet. Res. Commun.* 34: 533-539.
- Isobe, N., K. Hosoda, and Y. Yoshimura, 2009a. Immunolocalization of lingual antimicrobial peptide (LAP) in the bovine mammary gland. *Anim. Sci. J.* 80: 446-450.
- Isobe, N., H. Kubota, A. Yamasaki, and Y. Yoshimura, 2011. Lactoperoxidase activity in milk is correlated with somatic cell count in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94: 3868-3874.
- Isobe, N., K. Morimoto, J. Nakamura, A. Yamasaki, and Y. Yoshimura, 2009b. Intramammary challenge of lipopolysaccharide stimulates secretion of lingual antimicrobial peptide into milk of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 92: 6046-6051.
- 井谷俊夫, 足立幸彦, 2007. ビリルビン. 臨床検査ガイド 2007~2008, 文光堂, 東京, 259-261.
- 板垣昌志, 2005. 飼養管理改善による乳房炎予防の実例. 臨床獣医 23: 16-20.
- Kehrli, M. E., and J. A. Harp, 2001. Immunity in the mammary gland. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 17: 495-516.
- 木原正博, 木原雅子, 加治正行 (訳), 2010. ランダム化比較試験, コホート研究, 疫学, Leon Gordis (著) . *Epidemiology* 4th edition, メディカル・サイエンス・インターナショナル, 東京, 133-169, 173-182.
- 金 明哲, 2007. 生存分析. R によるデータサイエンス, 森北出版, 東京, 183-199.
- 小峯範公, 2011. 乳牛における大腸菌ワクチンの接種時期の検討. 平成 22 年度鳥取県畜産技術業績発表会集録 16.
- 小峯範公, 2012. 乳牛における大腸菌ワクチン接種効果の検討. 平成 23 年度鳥取県畜産技術業績発表会集録 20.
- Kurtz, J., 2005. Specific memory within innate immune systems. *Trends Immunol.* 26: 186-192.
- Lee, W. -C., H. -C. Hsiao, Y. -L. Wu, J. -H. Lin, Y. -P. Lee, H. -P. Fung, H. -H. Chen, Y. -H. Chen, and R. -M. Chu, 2003. Serum C-reactive protein in dairy herds. *Can. J. Vet. Res.* 67: 102-107.

- Legrand, D., E. Elass, A. Pierce, and J. Mazurier, 2004. Lactoferrin and host defence: an overview of its immuno-modulating and anti-inflammatory properties. *Biometals* 17: 225-229.
- Lehtolainen, T., C. Røntved, and S. Pyörälä, 2004. Serum amyloid A and TNF α in serum and milk during experimental endotoxin mastitis. *Vet. Res.* 35: 651-659.
- Lehtolainen, T., S. Suominen, T. Kutila, and S. Pyörälä, 2003. Effect of intramammary *Escherichia coli* endotoxin in early- vs. late-lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86: 2327-2333.
- Lohuis, J. A. C. M., W. Kremer, Y. H. Schukken, J. A. H. Smit, J. H. M. Verheijden, A. Brand, and A. S. J. P. A. M. Van Miert, 1990a. Growth of *Escherichia coli* in milk from endotoxin-induced mastitic quarters and the course of subsequent experimental *Escherichia coli* mastitis in the cow. *J. Dairy Sci.* 73: 1508-1514.
- Lohuis, J. A. C. M., Y. H. Schukken, J. H. M. Verheijden, A. Brand, and A. S. J. P. A. M. Van Miert, 1990b. Effect of severity of systemic signs during the acute phase of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis on milk production losses. *J. Dairy Sci.* 73: 333-341.
- Lohuis, J. A. C. M., W. Van Leeuwen, J. H. M. Verheijden, J. A. H. Smit, A. Brand, and A. S. J. P. A. M. Van Miert, 1988. Growth of *Escherichia coli* in whole and skim milk from endotoxin-induced mastitic quarters: in vitro effects of deferoxamine, zinc, and iron supplementation. *J. Dairy Sci.* 71: 2772-2781.
- McClure, A. M., E. E. Christopher, W. A. Wolff, W. H. Fales, G. F. Krause, and J. Miramonti, 1994. Effect of Re-17 mutant *Salmonella typhimurium* bacterin toxoid on clinical coliform mastitis. *J. Dairy Sci.* 77: 2272-2280.
- 三木隆司 (訳), 2011. ギャノン生理学. Barrett, K. E., S. M. Barman, S. Boitano, and H. L. Brooks. (著), 原書 23 版, 丸善, 東京, 562-572
- 溝渕俊二, 藤明美洋, 佐々木光, 山本久光, 前場重紀, 坂本 貢, 川田周子, 1997. 牛毒素原性大腸菌不活化ワクチン接種による乳房炎死廃事故低減の試み. *家畜診療* 408: 13-16.

- 森本和秀, 神田則昭, 磯部直樹, 2010. 牛用大腸菌不活化ワクチンの接種が泌乳期の牛の乳量, 乳成分および血液成分に及ぼす影響. 第53回広島県獣医学会講演要旨 産業動物部門 6.
- 森本和秀, 吉村知子, 大坂隆志, 長尾かおり, 新出昭吾, 磯部直樹, 2009. 下痢予防用牛大腸菌不活化ワクチンと *Escherichia coli* J5 株の血清学的交差性の解析. 広島県獣医学会雑誌 24: 51-54.
- Musser, J. M., and K. L. Anderson, 1996. Effect of vaccination with an *Escherichia coli* bacterin-toxoid on milk production in dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 209: 1291-1293.
- Murata, H., N. Shimada, and M. Yoshioka, 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. Vet. J. 168: 28-40.
- 中澤宗生, 1992. 牛の大腸菌症と大腸菌性下痢ワクチン. 獣医畜産新報 45: 679-687.
- Newman, L. E., and J. J. Kowalski, 1973. Fresh Sawdust bedding – a possible source of *Klebsiella* organisms. Am. J. Vet. Res. 34: 979-80.
- 野村 武, 1986. グラム陰性菌による牛の甚急性乳房炎の実態とその治療. 家畜診療 282: 21-40.
- Ohtsuka, H., K. Kudo, K. Mori, F. Nagai, A. Hatsugaya, M. Tajima, K. Tamura, F. Hoshi, M. Koiwa, and S. Kawamura, 2001. Acute phase response in naturally occurring coliform mastitis. J. Vet. Med. Sci. 63: 675-678.
- Olde Riekerink, R. G. M., H. W. Barkema, and H. Stryhn, 2007. The Effect of Season on Somatic Cell Count and the Incidence of Clinical Mastitis. J. Dairy Sci. 90: 1704-1715.
- Overbeek, B. P., J. F. P. Schellekens, W. Lippe, B. A. T. Dekker, and J. Verhoef, 1987. Carumonam enhances reactivity of *Escherichia coli* with mono- and polyclonal antisera to rough mutant *Escherichia coli* J5. J. Clin. Microbiol. 25: 1009-1013.
- Paape, M., J. Mehrzad, X. Zhao, J. Detilleux, and C. Burvenich, 2002. Defense of the bovine mammary gland by polymorphonuclear neutrophil leukocytes. J. Mammary Gland Biol.

- Neoplasia 7: 109-121.
- Prescott, S. C., and R. S. Breed, 1910. The determination of the number of body cells in milk by a direct method. *Am. J. Public Hygiene* 20: 663-664.
- Rajput, Z. I., S. H. Hu, C. W. Xiao, and A. G. Arijo, 2007. Adjuvant effect of saponins on animal immune responses. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 8: 153-161.
- Reiter, B., 1978. Review of the progress of dairy science: antimicrobial systems in milk. *J. Dairy Res.* 45: 131-147.
- 坂口修平, 2004. 敗血症性ショックモデルとしてのエンドトキシンの病態生理—酸化ストレスからのアプローチ—. *YAKUGAKU ZASSHI* 124: 69-87.
- 坂崎利一 (監訳), 1993. 医学細菌同定の手引き. Barrow, G. I., and R. K. A. Feltham. (編), 第3版, 近代出版, 東京.
- Sato, M., T. Sugino, Y. Yoshimura, and N. Isobe, 2011. Follicular persistence induced by adrenocorticotrophic hormone administration in goats. *J. Reprod. Dev.* 57: 212-216.
- Schonwetter, B. S., E. D. Stolzenberg, and M. A. Zasloff, 1995. Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation. *Science* 267: 1645-1648.
- Shinozuka Y., H. Hirata, I. Ishibashi, Y. Okawa, A. Kasuga, M. Takagi, and Y. Taura, 2009. Therapeutic efficacy of mammary irrigation regimen in dairy cattle diagnosed with acute coliform mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 269-273.
- 篠塚康典, 2010. 鉄キレート剤により治療した牛急性大腸菌性乳房炎2症例. *家畜診療* 57: 405-410.
- 篠塚康典, 平田晴美, 中谷啓二, 石橋一郎, 大川雄三, 2008. 乳牛の大腸菌性乳房炎における初診時非抗生物質療法の検討. *広島県獣医学会雑誌* 23: 9-13.
- Shuster, D. E., R. J. Harmon, J. A. Jackson, and R. W. Hemken, 1991. Suppression of milk production during endotoxin-induced mastitis. *J. Dairy Sci.* 74: 3763-3774.
- Shuster, D. E., E. K. Lee, and M. E. Kehrli, 1996. Bacterial growth, inflammatory cytokine

- production, and neutrophil recruitment during coliform mastitis in cows within ten days after calving, compared with cows at midlactation. *Am. J. Vet. Res.* 57: 1569-1575.
- Smith, J. L., J. S. Hogan, and K. L. Smith, 1999. Efficacy of intramammary immunization with an *Escherichia coli* J5 bacterin. *J. Dairy Sci.* 82: 2582-2588.
- Smith, K. L., D. A. Todhunter, and P. S. Schoenberger. 1985. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J. Dairy Sci.* 68: 1531-1553.
- Spier, S. J., J. -P. Lavoie, J. S. Cullor, B. P. Smith, J. R. Snyder, and W. M. Sischo, 1989. Protection against clinical endotoxemia in horses by using plasma containing antibody to an Rc mutant *E. coli* (J5). *Circ. Shock* 28: 235-248.
- Suojala, L., T. Orro, H. Järvinen, J. Saatsi, and S. Pyörälä, 2008. Acute phase response in two consecutive experimentally induced *E. coli* intramammary infections in dairy cows. *Acta Vet. Scand.* 50: 18.
- Swanson, K., S. Gorodetsky, L. Good, S. Davis, D. Musgrave, K. Stelwagen, V. Farr, and A. Molenaar, 2004. Expression of a β -Defensin mRNA, lingual antimicrobial peptide, in bovine mammary epithelial tissue is induced by mastitis. *Infect. Immun.* 72: 7311-7314..
- 高橋清志, 1993. 牛の大腸菌性乳房炎の病態と治療. *家畜診療* 364: 27-37
- 高橋 信, 2007. すぐ読めるカプラン・マイヤー法. すぐ読める生存時間解析, 東京図書, 27-51.
- 高木 康, 2007. クレアチンキナーゼ(CK)とアイソザイム. *臨床検査ガイド 2007~2008*, 文光堂, 東京, 92-94.
- 多久和 陽 (訳), 2011. ギャノン生理学. Barrett, K. E., S. M. Barman, S. Boitano, and H. L. Brooks. (著), 原書 23 版, 丸善, 東京, 428-444.
- Todhunter, D. A., K. L. Smith, J. S. Hogan, and P. S. Schoenberger, 1991. Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows. *Am. J. Vet. Res.* 52:184-188.
- Tomita, G. M., D. A. Todhunter, J. S. Hogan, and K. L. Smith, 1995. Antigenic crossreactivity and

- lipopolysaccharide neutralization properties of bovine immunoglobulin G. *J. Dairy Sci.* 78: 2745-2752.
- Toribio, R. E., C. W. Kohn, J. Hardy, and T. J. Rosol, 2005. Alterations in serum parathyroid hormone and electrolyte concentrations and urinary excretion of electrolytes in horses with induced endotoxemia. *J. Vet. Intern. Med.* 19: 223-231.
- Tyler, J. W., J. S. Cullor, and J. D. Dellinger, 1990. Cross-reactive affinity purification of immunoglobulin recognizing common gram-negative bacterial core antigens. *J. Immunol. Methods* 129: 221-226.
- Tyler, J. W., J. S. Cullor, B. I. Osburn, R. B. Bushnell, and B. W. Fenwick, 1988. Relationship between serologic recognition of *Escherichia coli* O111:B4 (J5) and clinical coliform mastitis in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 49:1950-1954.
- Tyler, J. W., F. J. DeGraves, R. J. Erskine, M. G. Riddell, H. C. Lin, and J. H. Kirk, 1994. Milk production in cows with endotoxin-induced mastitis treated with isotonic or hypertonic sodium chloride solution. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204: 1949-1952.
- Tyler, J., H. Spears, J. Cullor, W. Smith, R. Nelson, and J. Martin, 1991. Antigenic homology among gram-negative organisms isolated from cattle with clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 74: 1235-1242.
- Tyler, J. W., H. Spears, and R. Nelson, 1992. Antigenic homology of endotoxin with a coliform mastitis vaccine strain, *Escherichia coli* O111:B4 (J5). *J. Dairy Sci.* 75: 1821-1825.
- Vandeputte-van Messom, G., C. Burvenich, E. Roets, A. -M. Massart-Leën, R. Heyneman, W. D. J. Kremer, and A. Brand, 1993. Classification of newly calved cows into moderate and severe responders to experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Res.* 60: 19-29.
- Van Werven, T., E. N. Noordhuizen-Stassen, A. J. J. M. Daemen, Y. H. Schukken, A. Brand, and C. Burvenich, 1997. Preinfection in vitro chemotaxis, phagocytosis, oxidative burst, and expression of CD11/CD18 receptors and their predictive capacity on the outcome of mastitis

- induced in dairy cows with *Escherichia coli*. J. Dairy Sci. 80: 67-74.
- 和田恭則, 深井綾子, 山田麻帆, 恩田 賢, 小野 啓, 池田輝雄, 印牧信行, 松浦健二, 田村弘志, 田中重則, 2001. 乳房炎牛の検出細菌, エンドトキシン濃度, 臨床検査所見, 臨床病理検査所見による病態の解析. 日獣会誌 54: 521-525.
- Wang, J. F., M. Wang, J. L. Ma, L. G. Jiao, X. Y. Zhou, and J. E. Lindberg, 2006. The influence of intramammary lipopolysaccharide infusion on serum Ca, P, vitamin D, cytokines and cortisol concentrations in lactating sows. J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med. 53: 113-118.
- Welles, E. G., M. A. Williams, J. W. Tyler, and H. C. Lin, 1993. Hemostasis in cows with endotoxin-induced mastitis. Am. J. Vet. Res. 54: 1230-1234.
- Wenz, J. R., G. M. Barrington, F. B. Garry, R. P. Dinsmore, and R. J. Callan, 2001a. Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218: 567-572.
- Wenz, J. R., G. M. Barrington, F. B. Garry, K. D. McSweeney, R. P. Dinsmore, and R. J. Callan, 2001b. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 219: 976-981.
- Wijkstrom-Frei, C., S. El-Chemaly, R. Ali-Rachedi, C. Gerson, M. A. Cobas, R. Forteza, M. Salathe, and G. E. Conner, 2003. Lactoperoxidase and human airway host defense. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 29: 206-212.
- Wilson, D. J., and R. N. González, 2003. Vaccination strategies for reducing clinical severity of coliform mastitis. Vet. Clin. Food Anim. 19: 187-197.
- Wilson, D. J., Y. T. Grohn, G. J. Bennett, R. N. González, Y. H. Schukken, and J. Spatz, 2007a. Comparison of J5 Vaccinates and Controls for Incidence, Etiologic Agent, Clinical Severity, and Survival in the Herd Following Naturally Occurring Cases of Clinical Mastitis. J. Dairy Sci. 90: 4282-4288.
- Wilson, D. J., Y. T. Grohn, G. J. Bennett, R. N. González, Y. H. Schukken, and J. Spatz, 2008. Milk

- production change following clinical mastitis and reproductive performance compared among J5 vaccinated and control dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 91: 3869-3879.
- Wilson, D. J., B. A. Mallard, J. L. Burton, Y. H. Schukken, and Y. T. Gröhn, 2007b. Milk and serum J5-specific antibody responses, milk production change, and clinical effects following intramammary *Escherichia coli* challenge for J5 vaccinate and control cows. *Clin. Vaccine Immunol.* 14: 693-699.
- Wilson, M. B., and P. K. Nakane, 1978. In: W. Knapp, K. Holubar, and G. Wick, ed. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies.: *Immunofluorescence and Related Staining Techniques*. Elsevier: North Holland Biomedical Press, Amsterdam, the Netherlands, 215–225.
- 山本高根, 2006. ショック症状を発現した乳牛の甚急性乳房炎. *家畜診療* 53: 237-240.
- 矢田純一, 2005. 感染防御免疫機構, 医系免疫学. 改訂9版, 中外医学社, 東京, 345-383.
- 横地高志, 2002. エンドトキシンー生物活性 I, 細菌毒素ハンドブック. サイエンスフォーラム, 千葉, 519-522.
- Zaloga, G.P., D. Malcolm, B. Chernow, and J. Holaday, 1988. Endotoxin-induced hypocalcemia results in defective calcium mobilization in rats. *Circ. shock* 24: 143-148.
- 全国農業共済協会, 2005. 非蛋白態窒素の測定. 家畜共済における臨床病理検査要領. 全国農業共済協会, 東京, 77-80.
- Ziegler, E. J., J. A. McCutchan, J. Fierer, M. P. Glauser, J. C. Sadoff, H. Douglas, and A. I. Braude, 1982. Treatment of gram-negative bacteremia and shock with human antiserum to a mutant *Escherichia coli*. *N. Engl. J. Med.* 307: 1225-1230.

謝辞

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なるご指導を賜った広島大学大学院 生物圏科学研究科 家畜生体機構学研究室 磯部直樹准教授に深く感謝の意を表します。

本研究の遂行にあたり、数々の助言と多大なるご配慮を頂いた同研究室 吉村幸則教授、家畜飼養学研究室 谷口幸三教授、免疫生物学研究室 古澤修一教授に深く感謝致します。

本研究を進める上で適切なお助言を頂いた Liao Lawrence Manzano 外国人特任教授、Das Shubash Chandra 博士に深く感謝致します。

本研究を進める上で多大なるご理解・ご配慮を賜った、広島県立総合技術研究所 畜産技術センター 新出昭吾博士，神田則昭さん，岸本一郎さん，河野幸雄さん，沖山恒明さん，城田圭子さん，長尾かおりさん，福馬敬紘さん，塚崎由子さん，吉岡秀美さん，伊藤健一さん，佐原重行さん，須田 渉さん，岩水 正さん，奥山 博さん，搾乳牛班のみなさん，食品工業技術センター 大坂隆志さん，農業技術センター 吉村知子さん，高桑将滋さん，広島県西部家畜保健衛生所 清水 和さんに深く感謝の意を表します。

本研究を進める上で適切なお助言・ご配慮を頂いた広島県農業共済組合連合会 家畜診療所 篠塚康典博士，大下克史先生，中谷啓二先生，秋田真司先生，黒瀬智泰先生，前田陽平先生，金子宗平先生に深く感謝の意を表します。

本研究を進める上でご協力いただいた，畑 耕二さん，尾崎昭則さん，沖 正文さん，田辺輝之さん，中丸 仁さんに深く感謝の意を表します。

最後に、本研究を行う過程において、絶えず希望を与え、温かく励ましてくれた家族に深く感謝します。本当にありがとうございました。

平成 25 年 3 月

森本和秀