

原著論文

感染症の多発した1農場における導入子牛への イソマルトオリゴ糖製剤給与による疾病予防効果

向井真知子^{1)*} 近藤夏子²⁾ 大塚浩通²⁾ 藤原めぐみ²⁾
小比類巻正幸¹⁾ 勝田 賢³⁾ 安藤貴朗²⁾ 及川正明²⁾

- 1) 小比類巻家畜診療サービス (〒039-2683 青森県上北郡東北町字大平63-3)
2) 北里大学獣医学部 (〒034-8628 十和田市東23番町35-1)
3) 動物衛生研究所東北支所 (〒039-2586 青森県上北郡七戸町字海内31)

*連絡担当者：向井真知子
小比類巻家畜診療サービス
(〒039-2683 青森県上北郡東北町字大平63-3)
TEL 0175-64-2710

【要約】

子牛へのイソマルトオリゴ糖 (IO) 製剤給与による下痢発生予防の有効性を評価するために、肥育牛育成農場において導入された子牛に対してIO製剤を給与し、その後の下痢の発生状況と免疫機能を調査した。供試牛群は、青森県内にある育成肥育一環経営の1農場であり、当該農場では子牛導入後に子牛の下痢が多発したために抗菌剤を常用していた。そこで、対象農場の導入子牛に対して20 g/頭/回、3回/日の条件で、哺乳期間である導入後1ヶ月間にIO製剤の給与を指導した。当該牧場における疾病の発生状況の観察はIO製剤給与前の3ヶ月から給与開始後の6ヶ月までの計9ヶ月間とし、給与前、給与後3ヶ月ならびに3ヶ月から6ヶ月の各3ヶ月の期間に一回ずつ計3回、対象子牛から血液ならびに糞便を採取した。採取対象子牛は導入後1ヶ月と導入後3ヶ月とした。白血球表面抗原の解析、real-time PCR法によるサイトカインmRNA解析、および糞便中の大腸菌の薬剤感受性試験、大腸菌病原因子の特定を行った。IO製剤給与開始前の3ヶ月間に比べ給与後の6ヶ月間では、疾病治療頭数および平均治療日数が減少した。給与6ヶ月後の導入子牛の末梢血単核球数ならびにT細胞数が給与前および3ヶ月後に比べて高値を示した。また給与前の導入牛では導入後1ヶ月の3頭、導入後3ヶ月の1頭において糞便中に大腸菌病原因子を認めしたが、給与6ヶ月後には全ての対象牛に因子を認めなかった。以上より、導入子牛の下痢の多発する農場において、IO製剤の給与後、疾病の軽減、病原因子の減少や免疫機能の向上の効果が認められたことから、IO製剤の給与は子牛の下痢の予防に有効であると考えられた。

【キーワード：子牛、下痢、大腸菌、免疫細胞、イソマルトオリゴ糖】

【緒言】

子牛は下痢や肺炎などの感染症を発症しやすいため、予防・治療の目的に抗菌剤を使用することが多い。しかし、人医療の現場においては、抗菌剤の使用による菌交代症の発生の懸念から、抗菌剤の使用が見送られることもよくあ

る。また現在では、消費者の食の安全性に対する意識が向上したために、家畜への抗菌剤投与に関して使用を最小限にすることを求める意見もある [18]。

皮膚や気管、消化管などの体外と接する組織には一定の細菌叢が存在している。これら生体

各所における常在微生物の数や種類は、栄養素量、宿主の分泌する抗微生物物質の量、湿潤の度合いなどの条件が異なっており、さらに微生物同士の相互作用なども関わってそれぞれに一定の細菌叢が形成されている。そのために一定の微生物叢が保たれている組織に対して新たな病原菌が侵入しても、侵入した組織において簡単に感染を成立させることはできない [6]。また腸管内細菌叢は全身免疫あるいは腸管免疫の調整にも重要な役割を持っているため、生菌剤などのサプリメントの有用性が注目されている [1, 4, 15, 17]。

オリゴ糖はビフィズス菌や乳酸菌など腸内細菌叢を正常に維持する細菌の増殖を助ける物質であり、以前から様々な人の健康食品に添加されている [2, 7]。Mizubuchiら [8] は、イソマルトオリゴ糖 (IO) をマウスに投与することによってTh1細胞の反応性を促進させて宿主の防御機構に有益に働くことを報告しており、腸管内の粘膜免疫機能に対しての有効性から、抗菌剤の使用量を軽減させる新たなプレバイオ製剤としても期待できるとしている。しかし生産現場において子牛の下痢や肺炎などの疾病予防にIO製剤の給与が有効かどうかは不明である。そこで本研究では、子牛導入後に下痢が多発し抗菌剤を多用していた肥育牛育成農場において、導入子牛に対しIO製剤を給与して、その後の疾病発生状況を調査し、IO製剤による疾病発生への予防の有効性を評価した。

【材料と方法】

動物と観察：供試牛群は、1ヶ月あたり20頭前後の子牛を導入している青森県内の育成肥育一環経営の1農場であり、当該農場では子牛導入後に下痢や肺炎が多発したため、抗菌剤を常用していた。そこで、対象農場の全ての導入子牛に対して、哺乳期間である導入後1ヶ月間に20g/頭/回、3回/日の条件でIO製剤（昭和産業、

東京、日本）の給与を指導した。本研究の観察期間は、IO製剤給与前の3ヶ月から給与開始後の6ヶ月の計9ヶ月間とし、給与前の3ヶ月間、給与開始から給与後3ヶ月、給与後3ヶ月から6ヶ月の間の計9ヶ月間であり、各3ヶ月間における疾病の発生状況と、プロファイルテストのために子牛から血液ならびに糞便の採取を計3回実施した (Fig.1)。採取対象子牛は導入後1ヶ月以内（導入後1ヶ月群、2から3ヶ月齢）と導入後3ヶ月から5ヶ月まで（導入後3ヶ月群、4から6ヶ月齢）とした。プロファイルテストに供した頭数は給与前の導入後1ヶ月群および導入後3ヶ月群がそれぞれ（7頭、6頭）、給与後1（8頭、5頭）、給与後2（7頭、5頭）であった。

白血球サブポピュレーションの解析：白血球表面抗原の解析は、定法に従い実施した [12]。白血球表面抗原の解析に使用した抗ウシモノクローナル抗体はVMRD社 (Pullman, WA, U.S.A.) 製のMMIA（抗CD3；総T細胞）、CAT82A（抗MHC class II；単球、B細胞）とCoulter Immunology社 (Hialeah, Florida, USA) 製のMY-4（抗CD14；単球）であった。標識はfluorescein isothiocyanate (FITC) または phycoerythrin (PE) 標識された二次抗体 (Cappel, Durham, NC, USA) を用いた二色染色により実施した。各細胞の数値はフローサイトメーター (FACScan, Becton Dickinson, U.S.A.) により解析した比率とWBC値から算出した実数値によって数を求めた。結果はLysis II software by FACScan (BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, Cal.) を用いて解析した。なお、白血球数 (WBC) は自動血球計算装置 (PC607, ERMA, Germany) により測定した。

サイトカイン遺伝子の発現量の解析：末梢血単核球の培養は血液から分離し、 5×10^6 個/ μ lとなるように調整した。これまで報告されている方法と同様に [12]、細胞には $5 \mu\text{g/ml}$ の

フィットヘマグルチン (PHA-P; Sigma-Aldrich CO, St. Louis, USA) を加え、12時間培養した。培養した細胞からRNAを抽出し、サンプルのRNA濃度を測定した。抽出したRNAから定法により [11]、cDNAの合成 (逆転写反応) およびリアルタイムPCRを実施した。またインターフェロン(IFN)- α 、インターロイキン(IL)-4の各種サイトカインおよび β -ActinのPCRプライマーデザインはRiolletら [11] の報告を参考にし、各サイトカイン産生能は β -Actinを内部標準として、無刺激の培養細胞でのサイトカインのmRNA発現量を1とした場合のPHA刺激培養細胞におけるサイトカインのmRNA発現量を比較する比較定量法 ($\Delta\Delta$ Ct法) によって算出した。

糞便中の大腸菌の薬剤感受性試験および大腸菌病原因子の特定: 採取した糞便は4°Cに保存後、希釈法による薬剤感受性試験 (エンロフロキサシン; ERFX、ナリジクス酸; NA、セファゾリン; CEZ、クロラムフェニコール; CP、コリスチン; CL) および大腸菌病原因子の特定 (F5、Intimin、VT1、VT2、LT、STa、STb) を行った。糞便中のコクシジウムオーシストの検査: 採取した糞便はウィスコンシン変法により検査を行った。

統計: 成績は平均 \pm 標準誤差により表現し、各期間の統計的有意差の検定として2群間の比較はStudentのt-testにより解析し、3群間以上の比較は一元配置分布後にScheffe検定により群間の比較を行い解析した。分散分布が正しくないものについては、nonparametric testの一つであるKruskal-Wallis testを用いた。

【結果】

疾病発生状況の観察において、下痢・肺炎罹患頭数がIO製剤の給与開始後から経過をおって減少する傾向にあった。コクシジウム症は、給与開始前後での差はみられなかったが、その

他の下痢症は、疾病罹患子牛の平均頭数と平均治療日数において、有意差はみられなかったもののIO製剤の給与後には減少する傾向にあった (Fig. 2)。

糞便中大腸菌の大腸菌病原因子の特定において、導入後1ヶ月群では給与前に比べVT2、STa、Tbの病原因子を保有しており、給与後1にもVT1、VT2、LTの病原因子が見られたが、給与後2には全ての因子が検出できなかった (Table 1)。導入後3ヶ月群においては、給与前にはSTaの大腸菌病原因子を保有していたが、給与後には全ての因子が検出できなかった。

糞便中の大腸菌の薬剤感受性試験において、導入後1ヶ月群では、エンロフロキサシンとクロラムフェニコールのMIC90の値と、ナリジクス酸のMIC50の値が給与後2で給与前に比べて有意差はみられないものの低値を示した (Table 2)。コリスチンのMIC50とMIC90の値は給与前に比べ給与後2で低値を示した。また導入後3ヶ月群の薬剤感受性は、導入後1ヶ月群と比較して全般に低い値を示す傾向にあった。

導入後1ヶ月群における単核球数は給与後から緩やかな増加傾向にあり、導入後3ヶ月群における給与後2では給与前と比較して増加傾向にあった (Fig. 3)。導入後3ヶ月群における顆粒球数は、給与後1で高値を示したが、そのほかに明らかな差は認められなかった。

末梢血白血球サブpopulation細胞数の比較はFig. 4に示した。導入後1ヶ月群および導入後3ヶ月群におけるCD3⁺細胞数とMHC class II⁺CD14⁻細胞数は、IO製剤給与後から緩やかな増加傾向を示した。

末梢血サイトカインmRNA発現量相対比の比較はFig. 5に示した。導入後1ヶ月群における給与後2のIL-4およびIFN- γ 量は給与前群に比べて高い傾向にあり、導入後3ヶ月群における給与後2の各サイトカイン量は給与前群に比

べて増加する傾向を示した。

【考察】

本研究では、導入後の子牛に下痢の多発した農場において、導入子牛に対するIO製剤の給与によって、疾病の軽減、腸内の大腸菌が持つ病原因子の減少や免疫機能の向上の効果が認められた。グルコースを構成糖とするオリゴ糖であるIOは、他の糖類に比べて熱や酸に強いといわれており、さらに発酵されにくい特性があって、特に腸内のビフィズス菌や乳酸菌といった有用菌を適正に増殖する効果があるとされている [19, 20]。ビフィズス菌が増えると腸内が酸性になり、有害菌の活動が抑えられるために、腸内の環境を良好に保つことができる。本研究で調査対象とした牛群において下痢の発生率が軽減したのは、IO製剤の給与によって子牛の腸内細菌叢の乱調を防ぎ、少なくとも異常発酵が起きにくい腸内環境をもたらしたことが影響したものと示唆された。

本研究では、コクシジウム症の発生数にはIO製剤の給与前後に変化がみられなかったものの、コクシジウム症以外の下痢や肺炎の発生数では、平均頭数と平均治療日数が徐々に減少する傾向にあった。また子牛での細菌性下痢の原因の1つである大腸菌病原因子保有状況においても、導入後1ヶ月群でIO製剤の給与後に保有数が減少し、3回目の調査では全ての病原因子の保有が見られなくなった。Quigleyら [10] は子牛へのオリゴ糖を含んだ添加物給与が下痢予防に有効であることを指摘しており、肉用牛に対するデキストランオリゴ糖が増体や下痢予防に対して効果があることも確かめられている [16]。本研究においても牛群へのIO製剤の給与により、子牛の腸内大腸菌の病原因子保有率を減少させることができたと考えられた。一方、本研究では、薬剤感受性試験においてIO製剤の給与後に導入後1ヶ月のERFX、

NA、CL、CPなどの抗菌剤に対する感受性が高くなった。肺炎や下痢などの感染症が発症すると、治療に各種抗菌剤が広く使用されているが、中には抗菌剤の総使用量増加や不適切な投与などにより耐性菌が増加することもある [5]。その結果、出現した耐性菌によって家畜の抗菌剤に対する感受性が下がり、治療効果が低下する。本研究では、IO製剤給与後に細菌感染が疑われる下痢症が減少したことにより、抗菌剤を用いた治療の頻度が下がり、そのため一部の抗生物質に対する感受性が高くなったものと示唆された。

子牛の免疫システムにおいて、最前線に位置する消化管粘膜には種々の生体防御システムが備わっており、免疫細胞の60~70%が集まっている。腸内には100兆個ともされる膨大な腸内細菌が定住して腸内フローラを形成しており、特に反芻動物において重要な共生関係にあって、腸管内の抗病性が維持されている [9]。IO製剤は、有用菌であるBifidobacteriumに利用されて増殖を促進させ、腸内細菌による糖代謝を活性化させて腸内の腐敗を抑制する作用を持っている。そのため、腸内における有用微生物の発酵によって腸管の生理的機能が改善され、毒性物質による炎症反応がなくなることで消化吸收機能が促進される。Bifidobacteriumはオリゴ糖を捕食して有機酸を生成し、この有機酸は粘膜が機能する上でのエネルギー源となって腸粘膜の腺窩における細胞増殖に関与しており、免疫細胞の増殖を促進するとも考えられている [3]。一方で、下痢に罹患した子牛ではその後のリンパ球数が低値で推移する危険性が指摘されている [13]。本研究ではIO製剤の給与後にT細胞数(CD3⁺細胞数)やB細胞数(MHC class II⁺CD14⁻細胞数)、ならびにサイトカイン遺伝子発現率が高値を示した。このことはIO製剤給与後に下痢の発生が軽減したことと同時に、腸管内発酵の安定によって免疫機

能の活性が促された可能性がある。

本研究では、免疫反応を促進する中心的な細胞であるT細胞数およびB細胞数とサイトカイン遺伝子発現量が、IO製剤給与前に比べて給与後に高くなる傾向にあった。子牛の末梢血T細胞数は出生後から徐々に増加し、出生後2～3ヶ月で最高値に達した後、徐々に減少する[14]。一方、哺乳期に下痢を発症した子牛では末梢血T細胞数が減少することが明らかにされており[13]、なかでもメモリーT細胞の減少が観察されやすい。本研究でも給与前において、他の時期に比べてサイトカイン遺伝子発現量が低いことから、免疫機能の低下があったものと考えられる。その後IO製剤給与によって腸内細菌叢が安定化したために、全身免疫が適正に成熟した可能性がある。以上のことから子牛へのIOの経口投与は、哺乳・育成期の免疫システムの成熟を安定化させるものと示唆された。一方、IO製剤のマウスへの投与試験では細胞性免疫機能の活性化が認められているが、今回は明らかにすることは出来なかった。本研究では哺乳期の子牛を対象にしており、経口物、種差や年齢、何らかの感染が免疫機能に影響した可能性がある。

哺乳期の免疫システムの成熟不良は、その後の免疫機能を低下されるため、肺炎や皮膚糸状菌症などの発症を容易にし、生産性の低下を招く。本研究結果により、感染症の多発した肥育牛育成農場において、哺乳期にIOを投与することによって消化管発酵を安定化させ、疾病の発生を軽減させる可能性が示された。IO製剤はビフィズス菌や乳酸菌などの栄養源となるために、これらの生菌製剤と併用して子牛の下痢予防を目的としたプレバイオ製剤としての相乗効果が得られる可能性もあり、今後の臨床応用が期待される。

[参考文献]

1. Berg, E. L., Fu, C. J., Porter, J. H. and Kerley, M. S. 2005. Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horse: effects on fecal pH, microbial content, and volatile fatty acid concentrations. *J. Anim. Sci.* 83: 1549-1553.
2. Grizard, D. and Barthomeuf, C. 1999. Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: Mode of production and beneficial effects on animal and human health. *Reprod. Nutr. Dev.* 39: 563-588.
3. Gostner, A., Blaut, M., Schaffer, V., Kozianowski, G., Theis, S., Klingenberg, M., Dombrowski, Y., Martin, D., Ehrhardt, S., Taras, D., Schwiertz, A., Kleessen, B., Luhrs, H., Schaubert, J., Dorbath, D., Menzel, T. and Tschoppach, W. 2006. Effect of isomalt consumption on faecal microflora and colonic metabolism in healthy volunteers. *Br. J. Nutr.* 95: 40-50.
4. Isolauri, E., Salminen, S. and Ouwehand, A. C. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best. Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 18: 299-313.
5. 加藤敏英, 齋藤雅一, 石橋愛, 庄司和明, 渡辺栄次, 安孫子茂樹, 安藤健弥. 2004. 牛呼吸器感染症起因菌の薬剤耐性の推移と治療対策. *家畜診療.* 51: 221-228
6. 光岡知足. 1998. 腸内菌の世界. 叢文社. 東京.
7. 光岡知足. 1998. 腸内フローラとプロバイオティクス. 学会出版センター. 東京.
8. Mizubuchi, H., Yajima, T., Aoi, N., Tomita, T. and Yoshikai, Y. 2005. Isomalto-

- oligosaccharides polarize Th1-like responses in intestinal and systemic immunity in mice. *J. Nutr.* 135: 2857-2861.
9. 百溪英一. 2000. 牛の消化管免疫. *家畜診療* 47:265-278.
 10. Quigley, J. D. 3rd., Kost, C. J. and Wolfe, T. A. 2002. Effects of spray-dried animal plasma in milk replacers or additives containing serum and oligosaccharides on growth and health of calves. *J. Dairy Sci.* 85: 413-421.
 11. Riollet, C., Rainard, P. and Poutrel, B. 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy Sci.* 84: 1077-1084.
 12. Ohtsuka, H., Watanabe, C., Kohiruimaki, M., Ando, T., Watanabe, D., Masui, M., Hayashi, T., Abe, R., Koiwa, M., Sato, S. and Kawamura, S. 2006. Comparison of two different nutritive conditions against the changes in peripheral blood mononuclear cells of periparturient dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 1161-1166.
 13. 大塚浩通. 2007. 知っておきたい子牛の免疫防御. *日家臨感染研誌*. 2(3):7-15.
 14. 大塚浩通, 小松勝一, 今内覚, 福田茂夫, 菊佳男, 吉野知男, 小岩政照, 川村清市. 2002. 黒毛和種とホルスタイン種の子牛における末梢血白血球の比較. *日獣会誌* 55:789-795.
 15. Perdigon, G., Alvarez, S., Rachid, M., Agüero, G. and Gobbato, N. 1995. Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci.* 78: 1597-1606.
 16. 佐藤友吾. 2001. 肉用牛の増体・下痢に対するデキストランオリゴ糖の効果. *家畜診療* 48:653-657.
 17. Swanson, K. S., Grieshop, C. M., Flickinger, E. A., Bauer, L. L., Chow, J., Wolf, B. W., Garleb, K. A. and Fahey, G. C. Jr. 2002. Fructooligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* modify gut microbial populations, total tract nutrient digestibilities and fecal protein catabolite concentrations in healthy adult dogs. *J. Nutr.* 132: 3721-3731.
 18. 田村 豊. 2004. 畜産食品の安全性確保における獣医師の役割. *家畜診療* 51,291-299.
 19. Waligora-Dupriet, A. J., Campeotto, F., Nicolis, I., Bonet, A., Soulaines, P., Dupont, C. and Butel, M. J. 2007. Effect of oligofructose supplementation on gut microflora and well-being in young children attending a day care centre. *Int. J. Food. Microbiol.* 113: 108-113.
 20. Ward, R. E., Ninonuevo, M., Mills D, A., Lebrilla, C. B. and German, J. B. *Appl Environ Microbiol.* 2006. In vitro fermentation of breast milk oligosaccharides by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus gasseri*. 72: 4497-4499.

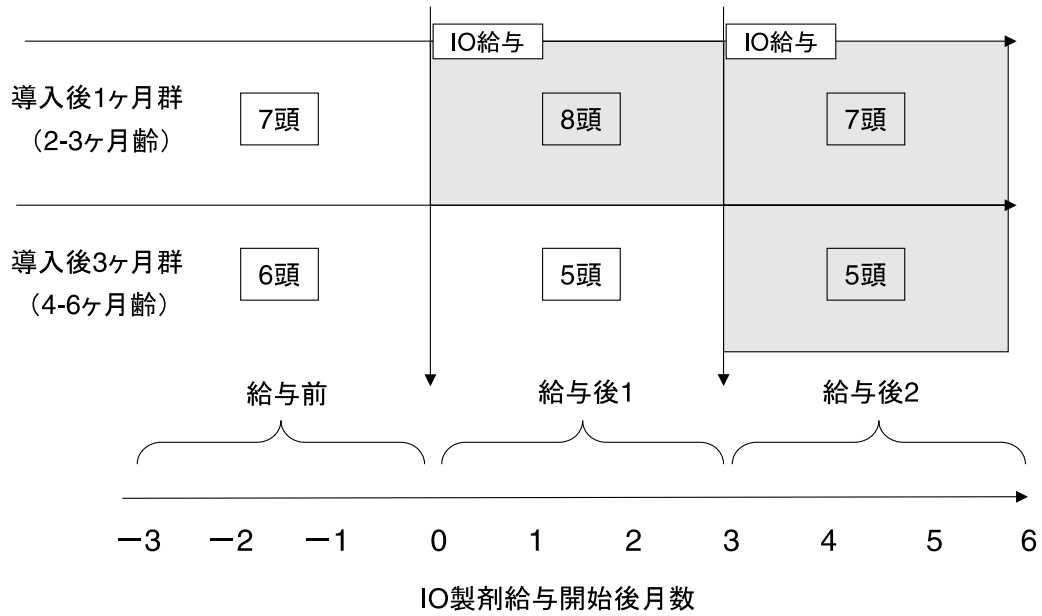


Fig. 1 Overview of the animals and protocol.

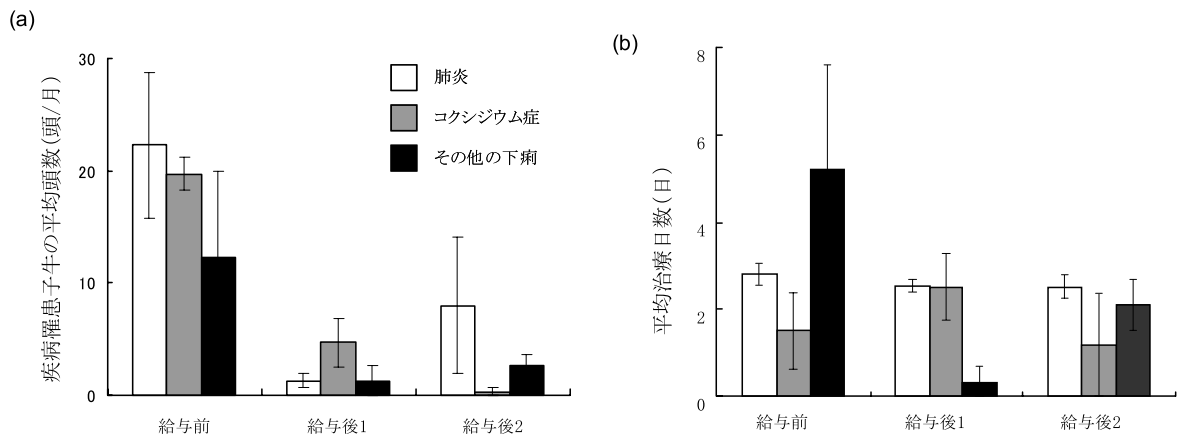


Fig. 2 Occurrence of infectious disease between the groups
 (a) Mean number of calves received the medical treatment.
 (b) Mean days of calves received the medical treatment.
 Values are expressed as means \pm S.E.

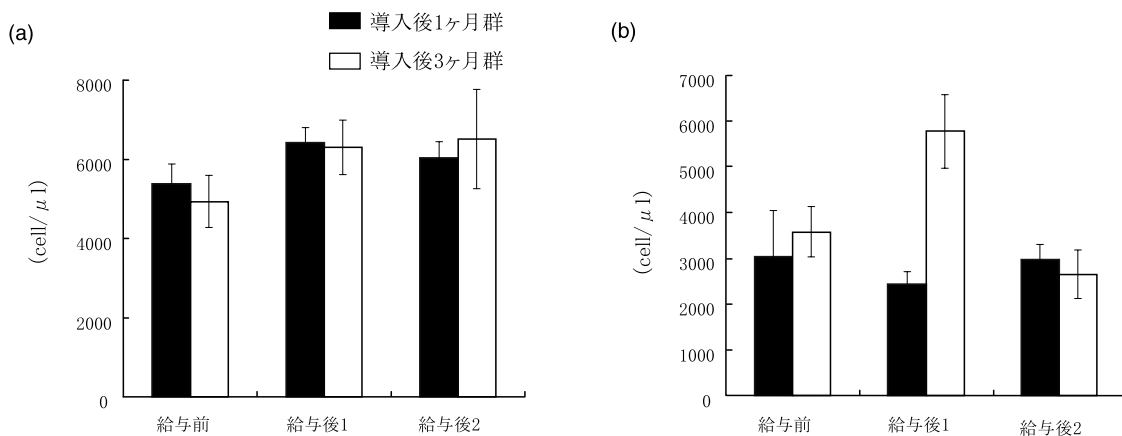


Fig. 3 Change in the number of peripheral blood mononuclear cells (a) and granulocytes (b) between the groups
 Values are expressed as means \pm S.E.

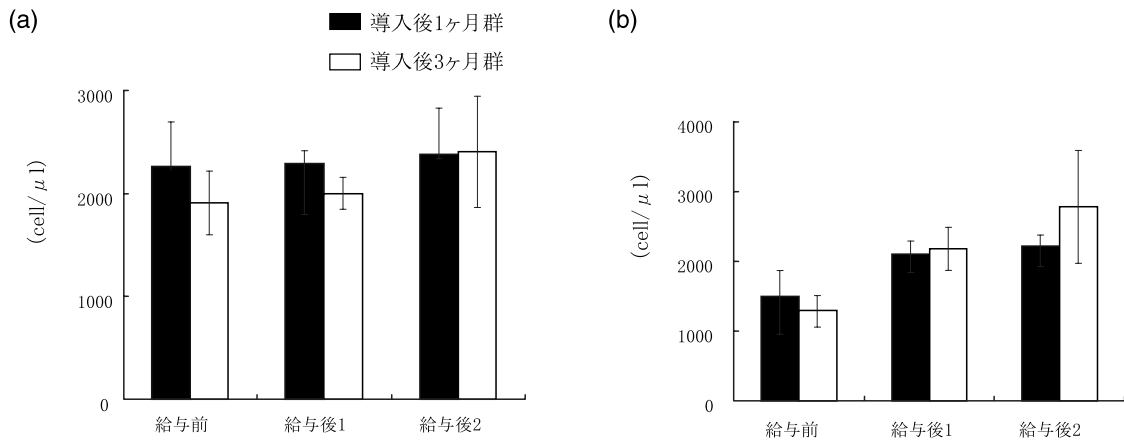


Fig. 4 Change in the number of CD3⁺ T cells (a) and MHC class II⁺ CD14⁻ B cells (b) between the groups
Values are expressed as means ± S.E.

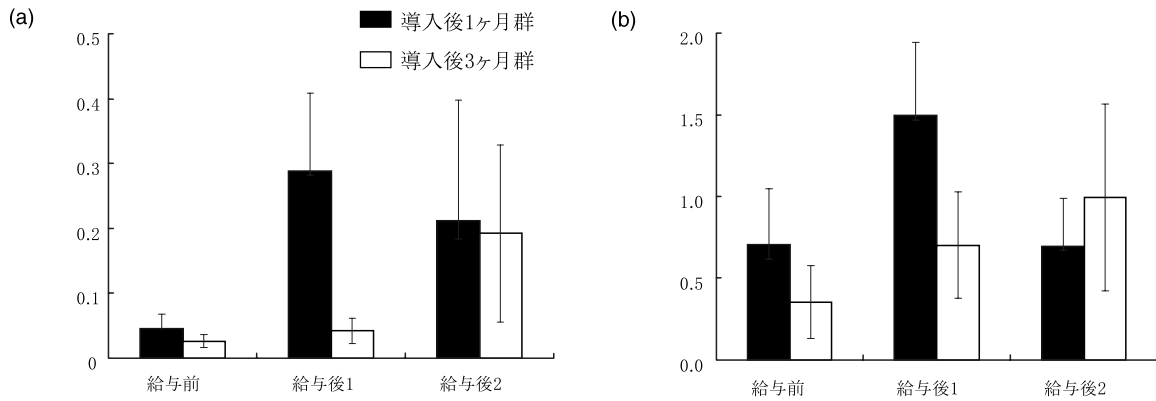


Fig. 5 Change of the levels of IL-4 (a) and IFN- γ (b) between the groups
Values are expressed as means ± S.E.

Table 1 Prevalence of pathogenic Escherichia coli (%)

	F5	Intimin	VT1	VT2	LT	STa	STb
導入後1ヶ月群							
給与前	0	0	0	14.3	0	28.6	42.9
給与後1	0	0	12.5	12.5	25.0	0	0
給与後2	0	0	0	0	0	0	0
導入後3ヶ月群							
給与前	0	0	0	0	0	25.0	0
給与後1	0	0	0	0	0	0	0
給与後2	0	0	0	0	0	0	0

Table 2 Results of drug susceptibility test

	ERFX		NA		CEZ		CP		CL	
	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90	MIC50	MIC90
導入後1ヶ月群										
給与前	0.25	8	256	256	4	16	8	128	1	4
給与後1	0.25	8	256	256	4	16	128	128	0.5	0.5
給与後2	0.5	0.5	4	256	8	128	8	32	0.25	1
導入後3ヶ月群										
給与前	0.25	0.25	4	8	4	4	8	32	0.5	8
給与後1	0.25	0.25	4	4	4	4	8	16	0.5	1
給与後2	0.25	0.5	4	4	16	64	8	32	0.25	1

Effect of Isomalto-oligosaccharide administration to adoptive calves on prevention of disease in a farm with high incidence of infectious disease

Machiko Mukai¹⁾, Natsuko Kondo²⁾, Hiromichi Ohtsuka²⁾, Megumi Fujiwara²⁾,
Masayuki Kohiruimaki¹⁾, Ken Katsuta³⁾, Takaaki Ando²⁾ and Masaaki Oikawa²⁾

1) Kohiruimaki Animal Medical Service, 2) Kitasato University and

3) National Institute of Animal Health

(63-3, Ohdaira, Tohoku, Aomori 039-2683, Japan)

ABSTRACT

To evaluate the effect of Isomalto-oligosaccharide (IO) oral administration on prevention of diarrhea, adoptive calves in one beef farm on Aomori prefecture, where high incidence of diarrhea was observed and antibiotics were frequently used, we observed the occurrence of diarrhea and immune condition after IO oral administration. The calves were administered with three times of IO product at a dose of 20 g/head/day (t.i.d.) for one month after adoption. The incidence of disease was investigated between 3 months before and 6 months after IO oral administration, and blood samples and feces were collected three times before, three months and 6 months after the oral administration from 1 and 3 months old calves after adoption. The blood samples were used for analyses of the leukocyte population and cytokines mRNA by real-time RT-PCR method, and the feces were used the drug susceptibility test and identification of *Escherichia coli* (*E. coli*). The number of calves received medical treatment and duration of the treatment were reduced after IO administration. The numbers of peripheral blood mononuclear cells and T cells at 6 months after administration were significantly higher than those before and at 3 months after the administration. The pathogenic *E. coli* was isolated from three calves before feeding and one calf during 3 months after the administration, however no calves showed it 6 months after the administration. These results indicated that IO oral administration was effective for prevention of the occurred of diarrhea to the calves in one beef farm, where high incidence of diarrhea.

【Key word : calf, diarrhea, *Escheria coli*, immune cells, Isomalto-oligosaccharide】