

短 報

黒毛和種子牛に対する *Mannheimia haemolytica* 不活化ワクチン 投与後の抗体応答とビタミン E の関連性

乙丸孝之介^{1)*} 稲富多樹夫¹⁾ 大塚浩通²⁾ 安藤貴朗³⁾ 小岩政照³⁾

1) 北薩農業共済組合川薩家畜診療所 (〒895-1813 薩摩郡さつま町轟町 13-1)

2) 北里大学獣医学部 (〒034-8628 十和田市東 23 番町 35-1)

3) 酪農学園大学獣医学群 (〒069-8501 江別市文京台緑町 582)

連絡責任者：乙丸孝之介

鹿児島県農業共済組合連合会 家畜臨床検査研修センター

(〒891-0132 鹿児島県鹿児島市七ツ島 1 丁目 6-24)

TEL099-261-0821 FAX099-261-1063 E-mail: otomaru@nosai-net.or.jp

[要 約]

黒毛和種子牛における *Mannheimia haemolytica* (Mh) 不活化ワクチン投与の抗体応答とビタミン E の関連性を調査した。供試牛は同一農場において飼育されていた黒毛和種子牛で、ワクチン投与時に血清ビタミン E 濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 未満であった子牛 (低ビタミン E 群: n=4)、100 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上であった子牛 (高ビタミン E 群: n=4)、血清ビタミン E 濃度 100 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 以上かつワクチン未投与であった子牛 (未投与群: n=4) の 3 群とし、これらの抗体応答および血清ビタミン E 濃度を観察した。その結果、低ビタミン E 群のロイコトキシン中和抗体価は 4 週後においても上昇が認められず、高ビタミン E 群に比べて投与 2 週後から 12 週後まで低い傾向にあって、4 週後には高ビタミン群と比較し有意な低値が認められ ($p < 0.01$)、未投与群とほぼ同様の变化であった。このことからワクチン投与時に血清ビタミン E 濃度が不足している個体では Mh 不活化ワクチンに対する抗体産生能が低いことが示唆された。

キーワード：抗体、ワクチン、ビタミン E

ビタミン E は、生体の抗酸化剤および抗活性酸素剤として作用し、生体膜のリン脂質中の高度不飽和脂肪酸の過酸化を防止して生体膜の安定性を保持している [10]。またビタミン E 濃度が低い人やマウスに対してワクチン投与を実施しても抗体産生が低いことが明らかにされている [9, 18]。ビタミン E 不足のラットでは、末梢血リンパ球の T 細胞、B 細胞の活性化がともに低下するとされており [2, 4]、低ビタミン E では抗体産生の低下だけでなく、免疫

機能全般を低下させる可能性がある。しかし低ビタミン E の牛におけるワクチン投与後の抗体価の変化に関しては殆ど明らかにされていない。そこで本研究では、低ビタミン E 状態にあった黒毛和種子牛に対する *Mannheimia haemolytica* (Mh) 不活化ワクチン投与後の抗体価の推移とビタミン E の関連性を調査した。

[材料および方法]

供試農場：飼養頭数約 300 頭の黒毛和種子牛育成農場で試験を行った。供試農場は 3～5 ヶ月齢の子牛を導入し、9、10 ヶ月齢まで飼養し、市場へ搬出していた。2005 年 3 月には、供試

受付：2011 年 8 月 20 日

受理：2011 年 10 月 20 日

農場の健康子牛9頭より鼻腔スワブを採取して細菌検査を実施した結果、9頭中2頭よりMhが分離され、この農場はMh浸潤農場であることが確認されていた。

供試牛：2005年4月に導入された臨床的に健康な子牛を24頭抽出し、ロイコトキシン(Lkt)中和抗体価の上昇の認めない12頭を供試した。血清ビタミンE濃度についてはReddyら[14]の報告を参考値とし、ワクチン投与時に、血清ビタミンE濃度100 µg/dl未満の4頭を低ビタミンE群(日齢:130.8±9.4、体重:131.3±25.2、平均±SD)、ビタミンE濃度100 µg/dl以上の4頭を高ビタミンE群(日齢:145.5±8.1、体重:128.8±7.2、平均±SD)、ワクチン未投与かつビタミンE濃度100 µg/dl以上の4頭を未投与群(日齢:125.3±4.8、体重:114.3±9.2、平均±SD)の3群に区分した。低ビタミンE群および高ビタミンE群には農場導入後、直ちにMh不活化ワクチン(リスポバル、ファイザー(株)、東京)を右頸部に皮下投与した。調査期間は2005年4月～8月までの農場導入時から導入12週後までとした。牛舎内では6、7頭が1群として飼育され、牛群間で飼養環境などに大きな差は認められなかった。餌は自由採食とされていた。

供試牛は投与日、2週後、4週後、8週後、12週後に頸静脈より採血された。採血後、遠心分離により得られた血清は-20℃に測定日まで保存した。

Lkt中和抗体価の測定：検体血清を56℃で30分間加温し非働化後、RPMI-1640培地にてマイクロタイタープレートの各ウェルに2倍階段希釈した。Lkt培養上清を希釈し、Lkt液とした。Lkt液をマイクロプレートの全ウェル(陽性対照は除く)に分注し、4℃で一晩静置し中和反応させた。陽性対照はPBS+RPMI-1640培地、陰性対照はPBS+Lkt液とした。健康な牛より採取した血液を遠心管に分注し、脱イオン水を加えて溶血させた。PBSを加えて混合後遠心した。遠心後白血球沈査を集め。RPMI-1640培地にて調整した白血球懸濁液をマイクロプレートの全ウェルに分注し、5% CO₂存在下にて、37℃(±2℃)で1時間加温した。プレートを遠心後、上清を除去した。各ウェルにホルマリン溶液を加え、細胞沈査を固定した。ホル

マリン溶液を除去し、クリスタルバイオレット溶液を加え、細胞沈査を染色した。水道水にて洗浄した後に乾燥させ、各ウェルの染色された細胞層変性の有無を確認した。正常細胞層は陽性、変性細胞層は陰性とした。中和反応を示した血清の最高希釈倍率を用い、Lkt中和抗体価とした。なお中和抗体価の測定は、ファイザー(株)三島ラボラトリーに依頼した。

ビタミンAおよびE濃度の測定：血清ビタミンEおよびA濃度の測定は高速液体クロマトグラフィー法(高速液体クロマトグラフLC-2000、日本分光(株)、東京)により測定した[3, 8]。

統計方法：統計解析にはエクセル統計2010(社会情報サービス(株)、東京)を用いた。抗体価は幾何平均±標準誤差で示し、ビタミンAおよびE濃度は平均±標準誤差で示した。Tukey検定にて群間で比較し、5%以下の危険率で有意差ありとした。

[成績]

Lkt中和抗体価の推移をFig.1に示した。Lkt中和抗体価はワクチン投与時、低ビタミンE群1.2±1.2倍、高ビタミンE群1.0±1.0倍、未投与群1.4±1.2倍であった。4週後、低ビタミンE群4.8±1.4倍、高ビタミンE群38.0±1.4倍、未投与群3.4±1.4倍であり高ビタミンE群は低ビタミンE群および未投与群と比較し、有意(p<0.01)な高値が認められた。12週後、低ビタミンE群32.0±1.0倍、高ビタミンE群53.8±1.2倍、未投与群19.0±1.4倍であり高ビタミンE群は未投与群と比較し、有意(p<0.05)な高値が認められた。低ビタミン群と未投与群のLkt中和抗体価の推移は、ほぼ同様であった。ビタミンE濃度はワクチン投与時、低ビタミンE群67.1±7.2 µg/dl、高ビタミンE群160.1±18.8 µg/dl、未投与群142.4±24.0 µg/dlであり、低ビタミンE群は高ビタミンE群および未投与群と比較し有意(p<0.05)な低値であった(Fig.2)。2週後以降、低ビタミンE群、高ビタミンE群および未投与群のビタミンE濃度は低値で推移した。ビタミンA濃度はいずれの群も60 IU/dl以上で推移した(Fig.3)。

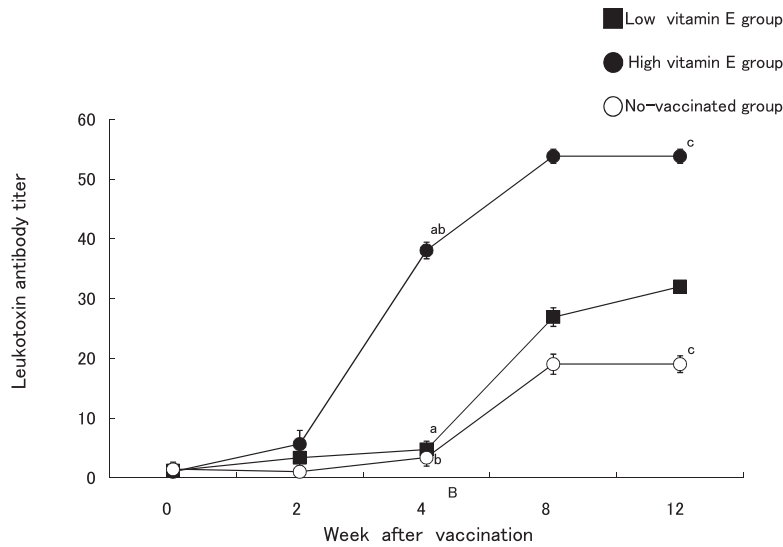


Fig. 1 Change of leukotoxin neutralizing antibody titer
Same letters indicate significant difference between the groups (a-a, b-b: $P < 0.01$, c-c: $P < 0.05$)

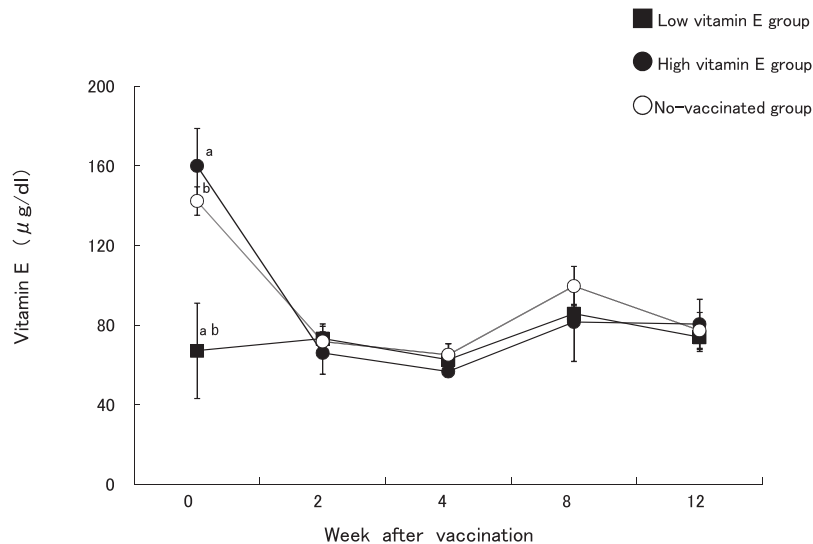


Fig. 2 Change of serum vitamin E concentrations
Same letters indicate significant difference between the groups (a-a, b-b: $P < 0.05$)

[考 察]

本研究では低ビタミンEにある黒毛和種子牛に対するMh不活化ワクチン投与後のLkt中和抗体の産生が低下することが示された。これは低ビタミンにあった人やマウスに対するワクチン投与後の抗体産生が低く推移したとする報告と類似しており[9, 18]、牛においても低ビタミンEの状態ではワクチン効果が低いことが示唆された。牛に対して血清ビタミンE濃度が高いとワクチン投与後の抗体産生が助長され、ビタミンEの経口投与量が多いほどワク

チン投与後の抗体産生が促進されることが報告されている[13, 15]。ビタミンEはワクチンの効果を高めるために必要な物質の一つであることが示唆される。

ビタミンEは動物のCD4⁺T細胞の活性・増殖を促進する[7, 12, 17]。人ではビタミンEの投与により血中インターロイキン(IL)-4の上昇が報告されている[1, 2]。ほとんどがヘルパー(h)T細胞であるCD4⁺T細胞は、産生するサイトカインによりTh1とTh2に大別される[17]。Th2細胞はIL-4、IL-6などB細胞からの抗体産生を促進させて体液性免疫を誘

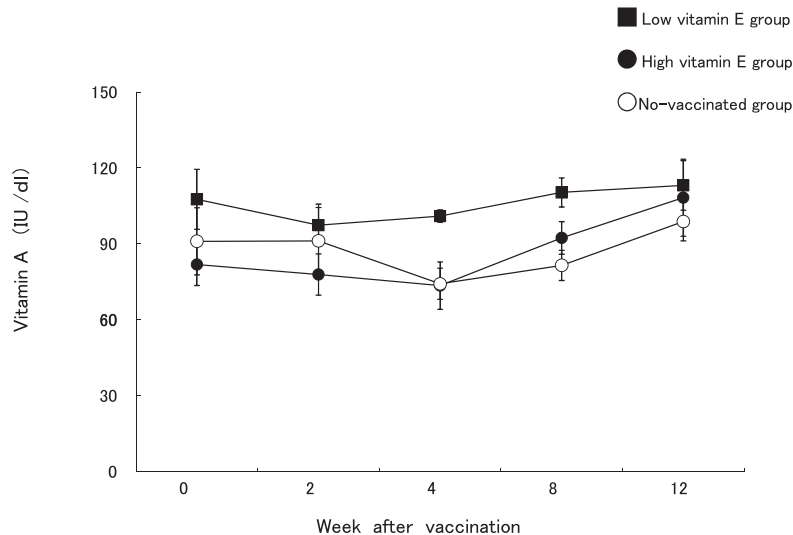


Fig. 3 Change of serum vitamin A concentrations

導するサイトカインを産生する [12]。低ビタミンEにある動物では、マクロファージなどの樹状細胞の貪食能、抗原提示能が減弱し、その後の免疫記憶能も低下する [5, 6, 15]。さらにT細胞およびB細胞の活性・増殖が減弱し、Th1細胞から分泌されるサイトカインおよび、B細胞への抗体産生誘導するTh2細胞からの分泌されるIL-4などのサイトカインも減少する [1, 2, 4]。ビタミンE濃度の低下は細胞性免疫のみでなく体液性免疫も低下させることから、低ビタミンE群の抗体産生能の低下の要因の一つとして、体液性免疫機能の低下が挙げられる。

本研究におけるLkt中和抗体価は、高ビタミンE群では低ビタミンE群、未投与群と比較し、2週後には上昇傾向を示し、4週後に有意な抗体上昇を示した。この変化は、野外におけるMhワクチン投与試験において、投与群のLkt抗体価は、未投与群と比較し、ワクチン投与2週後では、上昇傾向を示し、2週後の追加ワクチン投与により有意な上昇を示したとする報告と類似していた [19]。未投与群のLkt中和抗体価は、緩やかに上昇した。本研究の供試農場はMhの浸潤が確認されているため、農場内でMhに自然感染し緩やかに抗体価が上昇したと考えられた。一方、低ビタミンE群のLkt中和抗体価は、未投与群と同様の推移を示した。低ビタミンE群では、ワクチン投与時にビタミンE不足によりマクロファージなどの樹上細胞の貪食能および抗原提示能が減弱し、さら

にB細胞の活性・増殖が減弱したことなどにより、ワクチン抗原に対する反応性が低く、抗体産生能が低かったと考えられた。全ての供試牛は農場導入以降には、粗飼料としてビタミンE含有の少ないとされるオーツヘイが給与されていたことから、導入時にすでにビタミンEが不足していた低ビタミンE群のビタミンE濃度は2週以降には他の2群と同様に低値で推移を示したものと考えられた。ビタミンA濃度はいずれの群も正常範囲内であることから、ビタミンAの影響はなかったと考えられた。

本研究から、黒毛和種子牛に対するワクチン投与時の低ビタミンEは抗体産生能が低いことが示唆された。ホルスタイン種子牛では、ワクチン投与以前からビタミンE投与を行い、血清ビタミンE濃度を上昇させることによりワクチン投与後の抗体産生が助長されたと報告されている [15]。今後、黒毛和種子牛に対するワクチン投与に際して、ワクチン効果を高める1つの方法として、ビタミンE投与の有効性が期待される。また、ワクチンにより抗体価が上昇し安定した高い抗病性を確保するため、ワクチン投与前の牛の健康状態の評価が必要であると考えられた。

[引用文献]

1. Albers R., Bol M., Bleumink R., Willems A., Blonk C., Pieters R. 2002. Br. J. Nutr. 88, 291-299
2. Bendich A., Gabriel E., Machlin L. J. 1983. J.

- Nutr. 113, 1920-1926
3. De Leenheer A. P., De Bevere V. O., Cruyl A. A., Claeys A. E. 1978. Clin. Chem. 24, 585-590
 4. Eskew M. L., Scholz R. W., Reddy C. C., Todhunter D. A., Zarkower A. 1985. Immunology. 54, 173-180
 5. Gebremichael A., Levy E. M., Corwin L. M. 1984. J. Nutr. 114, 1297-1305
 6. Gore A. B., Qureshi M. A. 1997. Poult. Sci. 76, 984-991
 7. Lee C. Y., Man-Fan Wan J. 2000. J. Nutr. 130, 2932-2937
 8. 牧村 進、松尾修輔、薄井萬平、片山英美. 1991. 日獣会誌. 44, 328-332
 9. Meydani S. N., Meydani M., Blumberg J. B., Leka L. S., Siber G., Loszewski R., Thompson C., Pedrosa M. C., Diamond R. D., Stollar B. D. 1997. JAMA. 277, 1380-1386
 10. Packer L. 1991. Am. J. Clin. Nutr. 53, 1050S-1055S
 11. Pallast E. G., Schouten E. G., De Waart F. G., Fonk H. C., Doekes G., von Blomberg B. M., Kok F. J. 1999. Am. J. Clin. Nutr. 69, 1273-1281
 12. Paul W. E. 1987. FASEB J. 1, 456-461
 13. Rajeesh M., Dass R. S., Garg A. K., Chaturvedi V. K. 2008. J. Anim. Feed Sci. 17, 19-29
 14. Reddy P. G., Morrill J. L., Frey R. A. 1987. J. Dairy Sci. 70, 123-129
 15. Reddy P. G., Morrill J. L., Minocha H. C., Stevenson J. S. 1987. J. Dairy Sci. 70, 993-999
 16. Rivera J. D., Duff G. C., Galyean M. L., Walker D. A., Nunnery G. A. 2002. J. Anim. Sci. 80, 933-941
 17. Street N. E., Mosmann T. R. 1991. FASEB J. 5, 171-177
 18. Tanaka J., Fujiwara H., Torisu M. 197. Immunology. 38, 727-734.
 19. Van Donkersgoed J., Potter A. A., Mollison B., Harland R. J. 1994. Can. Vet. J. 35, 239-241

Relationship between *Mannheimia haemolytica* inactivated vaccine, serum vitamin E concentrations and antibody production in Japanese Black cattle

Konosuke Otomaru, Takio Inatomi, Hiromichi Ohtsuka, Takaaki Ando and Masateru Koiwa
Sensatu Veterinary Clinic, Hokusatu Agricultural Mutual Aid Association
(13-1 Todoro Sathuma-cho, Sathuma District 895-1813)

[Abstract]

This study investigated that the effect of serum vitamin(Vit)E concentration on antibody production after injection of *Mannheimia haemolytica* (Mh) inactivated vaccination on Japanese Black cattle. The cattle were housed in one herd, and they were divided into three groups. Two groups cattle were vaccinated and one group cattle were under 100 $\mu\text{g}/\text{dl}$ of serum VitE concentration (low VitE group: n = 4) and another group were over 100 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (high VitE group: n = 4) at vaccine day, and other group were over 100 $\mu\text{g}/\text{dl}$ of serum VitE concentration and no-vaccinated (no-vaccinated group: n = 4). The titer of leukotoxin neutralizing antibody in the low VitE group was lower than that in the high VitE group from 2 week to 12 week after vaccination, and significant differences were observed between the groups at 4 week after vaccine ($p < 0.01$). This change of titer in the low VitE group was similar to that in the no-vaccinated group. These results indicated that antibody response after injection Mh inactivated vaccine dependent on serum VitE concentration.

Key words; antibody, vaccine, vitamin E.