

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 加藤 肇

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第4項に該当

学位論文の題目 子牛の呼吸器病重篤化阻止対策として臨床応用可能なワクチン
接種方法の確立

審査委員

主査 教授 田島 誉士（生産動物内科学Ⅰ）

副査 教授 小岩 政照（生産動物内科学Ⅱ）

副査 教授 萩原 克郎（獣医ウイルス学）

要 旨

我国で市販されている牛ヘルペスウイルス 1 型 (BHV1)、牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) および牛 R S ウイルス (BRSV) を含む混合ワクチンと *Mannheimia haemolytica* (Mh) を含む混合ワクチンを用い、種々の病原体に対する多様で豊富な抗体を、どのような接種方法によって効率的に獲得させられるかを検討し、子牛期における呼吸器病対策として、臨床上活用可能なワクチンの接種法の確立を試みた。

第 1 章では、BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含有するウイルス性呼吸器病対策用の混合生ワクチンと、BVDV1 弱毒株を含む相同の混合生ワクチンを用い、子牛の抗体応答を比較検討した。4 種類の異なるワクチン接種法における抗体価の推移を 330 日間観察した。その結果、BHV1 と BRSV 対策としては、BHV1 と BRSV の弱毒株を含む混合ワクチンを 2 回接種することで、高いウイルス中和抗体疫誘導効果が得られることが明らかとなった。一方、BVDV については、BVDV1 弱毒株は BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原と比較して高い液性免疫誘導効果があることが明らかにされたが BVDV1 弱毒株を含むワクチン接種後に BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含むワクチンを接種しても、BVDV2 に対する中和抗体疫誘導効果は不十分であると考えられた。

第 2 章では、BVDV1 の弱毒株を含む生ワクチンを、移行抗体がほとんど消失した育成牛に対して接種した後の抗体の維持期間について調査した。その結果、BVDV1 弱毒株を含む生ワクチン 1 回接種によって BVDV1 および BVDV2 に対する抗体誘導が可能であり、さらに得られた抗体は少なくとも 3 年間は維持されることが確認された。

第 3 章では、BVDV1 および BVDV2 の不活化抗原を含むワクチンを接種後に BVDV1 弱毒株を含むワクチンを免疫増強に用いるワクチン接種法 (TSVP) により、BVDV1 と BVDV2 に対する十分な抗体応答を誘導できるか調査した。その結果、BVDV1 と BVDV2 に対する TSVP 群の抗体価は BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含むワクチンを 1 回接種する群および BVDV1 弱毒株を含むワクチンを 1 回接種する群のそれらより有意に上昇した ($P < 0.05$)。この結果は、第 1 章および第 2 章におい

て BVDV1 弱毒株を含む生ワクチン接種後に BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含むワクチンを接種する方法では認められなかった現象であった。BVDV2 弱毒株を含むワクチンが市販されていなかった状況では、TSVP は BVDV1 と BVDV2 に対する有効な抗体を付与するために有用であり、十分臨床応用可能と考えられた。

第 4 章では、*Mh* の不活化莢膜抗原とロイコトキソイドを含むワクチンをホルスタイン種子牛に早期接種した際の抗体応答を調べた。その結果、1 か月齢でワクチンを 1 回接種した群がワクチンを接種しない群と 5 か月齢でワクチンを 1 回接種した群に比べて *Mh* に対する抗体価の上昇の程度が有意に大きかった ($P < 0.01$)。すなわち 1 回接種の場合、5 か月齢で接種するよりも 1 ヶ月齢で接種した方が抗体応答は大きいことが示唆された。さらに、1 か月齢でワクチンを 1 回接種した群と 1 ヶ月齢と 5 か月齢でワクチンを 2 回接種した群間の抗体価の上昇の程度はほぼ同等であり、抗体価に有意な差は認められなかった。以上から、*Mh* 不活化莢膜抗原を含むワクチンの子牛に対する早期の接種はワクチン接種による抗体応答は不十分であるが、*Mh* の肺内感染時に速やかに液性免疫を誘導し、結果的に豊富な抗体を速やかに獲得可能なことが示唆された。

以上の結果から、本研究を通じて明らかにされたワクチン接種方法を組み合わせることにより、子牛に対して早期に呼吸器病に深く関与する病原体に対する抗体を、BVDV 弱毒株の胎子感染や *Mh* ワクチンの保有するエンドトキシンによる流産等の副反応の影響を最小にして獲得させることが可能であり、十分臨床応用可能であると考えられた。

論文審査の要旨および結果

1 論文審査の要旨および結果

本論文の審査は、1)学位論文としての体裁が整い、新規性があり、明確かつ十分な学術的根拠が示されているか、2)その成果は科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

研究の背景と目的

子牛の呼吸器病は臨床症状が重篤化した場合、その後の著しい生産性の低下を引き起す。呼吸器病を重篤化させる要因として、環境の変化やストレスに加えてウイルスと細菌との混合感染が大きな要因と考えられている。とくに牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) と *Mannheimia haemolytica* (*Mh*) の混合感染は重篤な線維素性肺炎の原因となる。子牛の呼吸器病は BVDV や *Mh* のみならず、種々のウイルスと細菌の混合感染により症状は重篤化する。したがって、種々の病原体に対する多様で、かつ豊富な免疫を子牛に獲得させることが重要である。ウイルスおよび細菌の感染による臨床症状の重篤化を防止する有用な手段としてワクチン接種が挙げられる。我国で市販されている呼吸器病対策ワクチンとして牛ヘルペスウイルス 1 型 (BHV1)、BVDV および牛 RS ウイルス (BRSV) を含む混合ワクチンと *Mannheimia haemolytica* (*Mh*) を含む混合ワクチンを用い、種々の病原体に対する多様で豊富な抗体を、どのような接種方法によって効率的に獲得させられるかを検討し、子牛期における呼吸器病対策として、臨床上活用可能なワクチンの接種方法の確立を試みた。

研究の成果

第1章では、BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含有するウイルス性呼吸器病対策用の混合生ワクチンと、BVDV1 弱毒株を含む相同の混合生ワクチンを用い、子牛の抗体応答を比較検討した。4種類の異なるワクチン接種法における抗体価の推移を330日間観察した。その結果、BHV1 と BRSV 対策としては、BHV1 と BRSV の弱毒株を含む混合ワクチンを2回接種することで、高いウイルス中和抗体疫誘導効果が得られることが明らかとなった。一方、BVDV については、BVDV1 弱毒株は BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原と比較して高い液性免疫誘導効果があることが明らかにされたが、BVDV1 弱毒株を含むワクチン接種後に BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含むワクチンを接種しても、BVDV2 に対する中和抗体誘導効果は不十分であると考えられた。

第2章では、BVDV1 の弱毒株を含む生ワクチンを、移行抗体がほとんど消失した育成牛に対して接種した後の抗体の維持期間について調査した。その結果、BVDV1 弱毒

株を含む生ワクチン 1 回接種によって BVDV1 および BVDV2 に対する抗体誘導が可能であり、さらに得られた抗体は少なくとも 3 年間は維持されることが確認された。すなわち、育成期に BVDV 1 弱毒株を含む生ワクチンを 1 回接種することで、その後接種牛が成長して分娩時に初乳によって BVDV の移行抗体を子牛に獲得させることが可能であり、子牛の呼吸器病の重篤化を阻止する重要な手段であると考えられた。しかし、試験期間に BVDV1 弱毒株を含む生ワクチンを 1 回接種した群と BVDV1 弱毒株を含むワクチン接種後に BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含む不活化ワクチンを接種した群との間で、抗体価に有意な差は認められなかった。すなわち、第 1 章とは異なる BVDV1 弱毒株と BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を用い、かつ接種時期を変えて追加接種しても BVDV2 に対する十分な液性免疫誘導効果は認められない結果となった。多様な BVDV に対する液性免疫を付与させるためには、第 1 章で示された課題同様、BVDV ワクチンの接種方法の改良が必要と考えられた。

第 3 章では、BVDV1 および BVDV2 の不活化抗原を含むワクチンを接種後に、BVDV1 弱毒株を含むワクチンを免疫増強に用いるワクチン接種法 (TSVP) によって、BVDV1 と BVDV2 に対する十分な抗体応答を誘導できるか調査した。その結果、BVDV1 と BVDV2 に対する TSVP 群の抗体価は BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含むワクチンを 1 回接種した群および BVDV1 弱毒株を含むワクチンを 1 回接種した群のそれらよりも有意に上昇した ($p < 0.05$)。この結果は、第 1 章および第 2 章において BVDV1 弱毒株を含む生ワクチン接種後に BVDV1 と BVDV2 の不活化抗原を含むワクチンを接種する方法では認められなかった現象であった。BVDV2 弱毒株を含むワクチンが市販されていなかった状況では、TSVP は BVDV1 と BVDV2 に対する有効な抗体を付与するために有用であり、十分臨床応用可能であると考えられた。

第 4 章では、*Mh* の不活化莢膜抗原とロイコトキソイドを含むワクチンを、ホルスタイン種子牛に早期接種した際の抗体応答を調べた。その結果、1 か月齢でワクチンを 1 回接種した群が、ワクチンを接種しない群および 5 か月齢でワクチンを 1 回接種した群に比べて *Mh* に対する抗体価の上昇の程度が有意に大きかった ($p < 0.01$)。すなわち 1 回接種の場合、5 か月齢で接種するよりも 1 ヶ月齢で接種した方が抗体応答は大きいことが示唆された。さらに、1 か月齢でワクチンを 1 回接種した群と 1 ヶ月齢と 5 か月齢でワクチンを 2 回接種した群間の抗体価の上昇の程度はほぼ同等であり、抗体価に有意な差は認められなかった。以上から、*Mh* 不活化莢膜抗原を含むワクチンの子牛に対する早期の接種は、ワクチン接種による抗体応答は不十分であるが、*Mh* の肺内感染時に速やかに液性免疫を誘導し、結果的に豊富な抗体を速やかに獲得可能なことが示唆された。

研究の評価

BVDV1 の弱毒株を含む混合生ワクチンと BVDV1 と BVDV2 が不活化抗原で BHV1 と BRSV が弱毒株の不活化混合生ワクチンを用い、育成期の早い段階でこれを先に接種し、その後 BVDV1 の弱毒株を含む混合生ワクチンを接種することで BHV1、BRSV、BVDV1 および BVDV2 に対する豊富な液性免疫を付与可能なことが明らかとなった。*Mh* ワクチンは生後早い段階でワクチンを接種する必要があるとされていたが、この場合でも移行抗体の影響を受けて液性免疫誘導効果が期待できないとされてきた生後 1 か月齢での接種によって、豊富な抗体を速やかに獲得可能なことが明らかとなった。子牛の呼吸器病の重篤化を防ぐ目的では、出生後の早期の段階で呼吸器病発症に強く関与する BHV1、BRSV、BVDV および *Mh* に対する液性免疫を付与させるワクチンの接種方法が最適である。本研究を通じて明らかにされたワクチン接種方法を組み合わせることによって、子牛に対して早期に呼吸器病に深く関与する病原体に対する抗体を、BVDV 弱毒株の胎子感染や *Mh* ワクチンの保有するエンドトキシンによる流産等の副反応の影響を最小にして獲得させることが可能であり、十分臨床応用可能であると考えられた。

以上のことから、加藤 肇 氏は、博士（獣医学）の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

2 最終試験の結果

審査委員 3 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2017年6月14日

審査委員

主査	教授	田島	誉士
副査	教授	小岩	政照
副査	教授	萩原	克郎