

初乳の効果的利用法 (2)

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	橋口, 裕治 村上, 洋介 広瀬, 公人 武隈, 俊和 橋本, 和典
巻/号	34巻5号
掲載ページ	p. 212-216
発行年月	1981年5月

初乳の効果的利用法

II. 下痢症状を呈した子牛への初乳およびプール牛乳の効果

橋口裕治* 村上洋介* 広瀬公人** 武隈俊和*** 橋本和典****

(昭和 56 年 1 月 16 日受理)

Studies on Effective Application of Colostrum

II. Colostrum and Pooled Milk Given to Calves for Prevention of Diarrhea
YUJI HASHIGUCHI (Hokkaido Branch Laboratory, National Institute of Animal
Health, Sapporo 061-04) et al.

SUMMARY

In the spring of 1978, contagious calf diarrhea occurred in a dairy herd in Hokkaido. It induced severe diarrhea, dehydration, depression, and anorexia. From the beginning 6 calves died one after another. Two agents were isolated from them and identified as Bovine rotavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli*.

Colostrum and pooled milk supplemented with antibiotics were given orally to 8 neonatal calves. As a results, seven calves, which had been born in the early period of the outbreak, were affected with only mild diarrhea. All of them recovered later, except one which died. Four calves born later were not affected at all. Changes in antibody titer against bovine rotavirus were observed in the sera of calves. The antibody titers of pre- and post-sera increased significantly in 4 of the 7 calves, but decreased in the latter 4 calves.

It was concluded that colostrum and pooled milk conferred lactogenic immunity to neonatal calves.

要 約

1978年3月末、北海道のある一貫経営の酪農場で下痢症状を呈する新生子牛の疾病が発生し、初産から約2週間の間に6頭が連続死亡した。病原検索の結果、牛ロタウイルスと毒素原性大腸菌が分離され、これらの混合感染と診断された。そこで初乳とともに当農場の搾乳牛から得たプール牛乳を混合して給与し、また抗生物質の投与を行なった。これらの投与後に生まれた子牛12頭のうち7頭は発病し、うち1頭は死亡したが6頭は回復した。その他の5頭は発病しなかった。母牛と子牛血清および乳汁の牛ロタウイルスに対する抗体価の消長を調べたところ、下痢初発後約1カ月以内に生まれた子牛群では感染を受けていたが、約7週間後に生まれた子牛群では感染を免がれ、初乳およびプール牛乳の乳汁免疫と抗生物質の効果が認められた。

子牛のウイルス性下痢症の予防には有効なワクチンが必要であり、米国では乳汁免疫を目的としたワクチンが開発され応用されている^{8,16,17)}。また実際的方法として高価の成牛血清やプール初乳を凍結保存しておき、これらを経口投与して予防する方法が行なわれている⁷⁾。

^{8,18)}。日本ではこれらウイルス性下痢症に対する有効なワクチンが未だ開発されておらず、対策に苦慮している現状である。

この報告は、下痢症状を呈する新生子牛の集団発生例に初乳とともに当農場の搾乳牛から得たプール牛乳を給与し、また抗生物質を併用することによってある程度の効果が認められたので報告する。

1. 材 料 お よ び 方 法

1) 試験牛：1978年3月下旬から5月上旬にかけて北海道斜里郡下の一貫経営を行なっている某酪農場の新生子牛群に死亡例を伴う下痢症の発生があった。飼養頭

* 農林水産省家畜衛生試験場北海道支場（札幌市豊平区羊ヶ丘4）
** 北海道網走家畜保健衛生所（北海道北見市北光56-2）
*** 北海道釧路家畜保健衛生所（北海道釧路市大楽毛127-1）
**** 農林水産省家畜衛生試験場（茨城県筑波郡谷田部町観音台3-1-1）

数はホルスタイン種雌成牛 40 頭、育成牛 32 頭、雄子牛 23 頭の計 95 頭であった。

2) 臨床観察と処置: No. 1~16の子牛 16 頭の食欲、体温、下痢、鼻鏡および歯齦、脱水症状等の臨床所見を毎日観察し、記録した。4月18日以降に出生した子牛からは、母牛の初乳と当農場の搾乳牛30数頭のプール牛乳を等量混合し、毎食 2 l 宛、1日4回、7~8日間給与させた。同時に細菌感染の予防治療のため、予想される大腸菌など、主としてグラム陰性菌に対して感受性のある抗生物質、すなわちクロラムフェニコール、硫酸カナマイシン、アムピシリン、合成ペニシリン、ナリジキシン酸等を使用量に従って適宜用い、さらに脱水状態に応じ大量のリンゲル輸液を実施した。また牛舎および周辺、飼育者など一般的な消毒を徹底して行なった。

3) 材料の採取: 死亡子牛については主要臓器、リンパ節および消化管とその内容物を採取した。母牛血清は4月15日、5月8日と6月13日に、子牛血清はNo. 5~12は5月8日、6月13日に、No. 13~16は6月13日と7月19日に採取した。乳汁は6月5日と6月30日に、プール牛乳は30数頭から搾乳した混合乳で6月3日、13日、23日に採取した。血清と乳清は56°C、30分非動化し使用直前まで-20°Cに保存した。

4) 初乳および常乳の処理: 初乳と常乳は1ml当たりレンニン(Difco) 2 mgを加え十分に混和後37°Cの温水中に1時間置いた。ついで2,500 rpm 15分間遠心分離を行ない脂肪層をさけ中間層の乳清を採取した。

5) 細菌の検査法: 細菌の分離は5%羊血液寒天とマッコネキー培地を用い、分離菌の同定はCOWANの法に従った¹⁾。分離した大腸菌は家畜試東北支場に送りK99抗原の有無の判定を求めた¹³⁾。No. 1~4の子牛の小腸上部由来大腸菌各3株についてDeの腸管結紮ループ試験²⁾を行なった。家兎は1子牛の分離菌について各1羽当たり計4羽を用い、対照菌株としてトリ由来O78と東北支場より分与を受けたK99保持のH1942(O101K(A)28K99)、H1946(O8K85K99)およびH1927(O9K(A+)35K99)を用い、また正常対照にはハート・インフュージョン・プロス(Difco)を用いた。

6) ウイルスの分離: 細胞培養は子牛腎(BK)細胞、牛腎株化MDBK細胞およびサル胎児腎株化MA104細胞の試験管(10×110 mm)培養を用いた。細胞はイーグルMEM(日水)液に10%子牛血清を加えた増殖用培地で培養した。維持培養液では5%牛アルブミン(Sigma)を2%に加えpH 7.6に調整した。

接種材料は死亡した子牛(No. 1~4)のそれぞれの空腸内容物、感染試験子牛から得た下痢便の10%乳剤を、隣酸緩衝食塩液(PBS)で作製し、2,500 rpm、15分間遠心分離した上清を、1,000、600、450 m μ のフィルターで順順に濾過した。あらかじめPBSで3回洗浄した各種細

胞培養の10本宛に各材料濾液を0.1 mlずつ接種し、37°Cに2時間吸着後PBSで3回洗浄してから維持液を加え、37°Cで7日間回転培養した。

生後18時間の初乳未摂取子牛1頭に、死亡子牛(No. 1~4)の腸内容濾液のプールしたもの10 mlを経口接種し、以後代用乳で飼育した。発症子牛の下痢便からウイルスの分離を行なった。

7) ウイルスとその特異抗血清の作製: 牛ロタウイルス(BRV)はLincoln株を用い、牛コロナウイルス(BCV)はMebus株を用いた。ウイルスの増殖にはBK細胞を用いた。

抗血清の作成はBRVとBCVの感染培養液を3,000 rpm 3時間遠心分離し、その沈渣をPBSでさらに2回洗浄遠心して得た沈渣を1/100量のPBSに浮遊した。抗体陰性のSPFモルモット(日生研)4頭宛の心臓内に各ウイルス液0.5 mlずつを接種し、4週後に腹腔内に1 mlを追加免疫し、10日後に全放血して血清を摂取した。この抗血清を用いてBRVとBCVに対するそれぞれの螢光色素(Fluorescein Isothiocyanate Isomer: BBL)抗体を作成した。

8) 血清および乳清の抗体価の測定: BRVおよびBCVの抗原はBK細胞感染培養液を用い、抗体価の測定は血球凝集抑制(HI)試験によって行なった^{6,15)}。

2. 成 績

1) 発生状況: これまで本農場では下痢症類似の疾病は全く発生がなかった。3月28日に生まれた子牛が生後2日後の3月30日に発症したのが当農場の初発例で、5月5日までに出生した14頭中13頭が相継いで発症した。初発例のAからNo. 4までの6頭は連続死亡し、その後No. 11と計7頭が死亡した。病勢は極めて急性で生後平均1.4日で発症し、平均死亡日数は3.1日であった。回復した子牛は12時間から16日まで平均4.5日で回復した(表1)。

2) 臨床症状: 初発例AからNo. 4までの6頭は突然水様性黄色下痢便を排し、元気消失、体温は微熱から40°Cまで、初乳の吸飲欲はなく、鼻鏡の周囲および歯齦が紫紅色を呈し、やがて眼球陥没、脱水症状が顕著となり起立不能に陥り死亡した。4月18日に生まれたNo. 5からNo. 16までの子牛は出生後ただちに母牛の初乳と当農場の搾乳牛からのプール牛乳を等量混合した混合乳を継続給与し、抗生物質の投与を行ない、脱水症状に応じた輸液を試みた。その結果、下痢症状は全般的に軽減し、No. 5~12のうち、水様性下痢を発現したのは5頭(No. 5, 8, 10, 11, 12)でそのうち1頭(No. 11)が死亡したが、他の2頭(No. 6, 9)は軟便程度で、1頭(No. 7)は発症しなかった。5月18日以降に生まれたNo. 13~16の4頭は発症しなかった(表1)。

初 乳 の 効 果 的 利 用 法

表1 試験牛の経過と母子血清および乳汁中の牛ロタウイルスに対する抗体価の消長

牛 番号	子 牛 の 経 過					母 牛 血 清			乳 汁		子 牛 血 清			摘 要
	生年月日	発症 月日	転 帰	下痢の 程度		4月15日	5.8	6.13	6.5	6.30	5.8	6.13	7.19	
A	53.3.28	3.30	2死*	卅										治療せず
B	4.3	4.5	2死	卅										治療せず
1	4.7	4.9	1死	卅		40***		160		<10				No.1 治療せず
2	4.8	4.9	2死	卅		10		80		<10				No.2~4 はクロラムフェニコール、塩酸クロルテトラサイクリン、合成ペニシリン、ナリジキシン酸を適宜注射、母牛血液10~20mlを筋肉内に注射した。
3	4.9	4.10	4死	卅		160		20		<10				
4	4.13	4.14	0.5死	卅		40		80		<10				
5	4.18	4.20	5回**	卅		20	40	40	<10	<10	20	80		No.5~16は、母牛の初乳とプール牛乳を等量混合し、1日に4回、2リットルを7~8日間継続給与した。
6	4.21	4.23	2回	+		20	20	40	<10	<10	40	320		
7	4.21			-		40		80	<10	<10	80	80		
8	4.22	4.24	16回	卅		40	80	320	<10	<10	20	640		
9	4.27	4.28	0.5回	+		40	20	80	<10	<10	40	80		
10	4.29	4.30	2回	卅		40		640	<10	20	20	160		分離菌に感受性のある抗生物質を投与する。脱水状態に応じてリンゲル液を大量輸液した。
11	4.29	4.30	1死	卅		40		160		<10				
12	5.5	5.6	2回	卅		20		80	10	<10	40	80		
13	5.18			-		80		160		10	160	10		プール牛乳の抗体価
14	5.29			-				40		<10	40	20		6月3日 10
15	6.1			-				160		10	160	10		6月13日 10
16	6.4			-				320		<10	640	160		6月23日 <10

* 発症2日後に死亡 ** 発症5日後に回復 *** 牛ロタウイルスに対する血球凝集抑制抗体価

表2 死亡子牛臓器からの細菌ならびにウイルスの検索成績

子 分 牛 離 番 菌 号 名	培 養 臓 器 名											病 原 性		牛ロタウイルス(BRV)分離					
	臓 器						リンパ節			消化管		空結腸	ルテ		死亡子牛小腸		子牛接種試験**		
	脳	脾	肝	腎	肺	心	頸下	肩前	ソイケ	腸膜間	胃	十二指腸	回腸	K99	1スト	分離	蛍光抗原	分離	蛍光抗原
1 大腸菌	-	∞	∞	∞	-	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	∞	3/3*	1/3*	-	+		
2 大腸菌	卅	-	-	-	-	+	卅	+	-	卅	卅	卅	1/3	3/3	-	-	+	+	
3 大腸菌	卅	∞	∞	-	-	+			∞	∞	∞	∞	1/2	3/3	-	+			
4 大腸菌	-	-	+	-	∞	+	-	-	卅	-	∞	∞	0/2	0/3	-	-			

* 陽性菌株数/供試菌株数 ** 死亡子牛(No.1~4)の空腸乳剤上清を450nmフィルターで濾過し、濾液10mlを初乳未摂取子牛へ経口接種した。発症下痢便からサル胎児腎MA104細胞で分離

3) 病理所見: No.1~4の死亡子牛4頭を剖検した。主病変は消化管のみに認められ、第四胃には凝乳があり、粘膜面のびまん性充血とうっ血が認められた。小腸の病変は十二指腸部では軽度であり、空腸、回腸終末部に至るほど重度であった。内容は漿液性または粘稠性の黄白色を呈し、粘膜は著るしく菲薄となり、びまん性充血、カタルを呈しやや水腫感を帯びパイヤー板には軽度の充血がみられた。

組織学的には小腸および大腸粘膜の変性壊死が共通し

てみられ、粘膜上皮はびまん性の変性壊死を示し、小腸絨毛は萎縮脱落していた。これらの剖検および組織所見は、これまでに報告^{8,9,12)}されているBRVと大腸菌の混合感染の病理所見と類似していた。

4) 細菌検査成績: 死亡子牛 No.1~4の諸臓器、リンパ節および小腸上部から溶血性大腸菌が多数分離された。No.1, 2, 3由来の大腸菌の中にK99保持の菌が認められた。ループテストの結果はNo.2とNo.3由来の各3株は全例が陽性であり、対照菌株H1946と同

程度の黒赤色ソーセージ状の病変を形成し、内容物から $10^9 \sim 10^{10}/g$ の大腸菌が回収された。No. 1 由来株を接種した家兎は接種翌朝に死亡し、開腹したところ3株中1株は陽性、2株は陰性であった。No. 4 は3株とも陰性であった(表2)。

昭和デスクー濃度法によって薬剤感受性を調べた。分離菌はクロラムフェニコール、カナマイシン、合成ペニシリン、ジハイドロオキシメチルフラトリジン、ナリジキシ酸に感受性であった。

5) ウイルスの分離と同定：死亡子牛 No. 1~4 のそれぞれの腸内容液を BK, MDBK および MA 104 細胞に3代まで継代したが細胞変性効果 (CPE) を伴うウイルスの分離はできなかった。しかし、BK 初代培養の細胞を集め蛍光抗体法による同定を行なったところ、抗 BRV 蛍光抗原が4頭中2頭 (No. 1, No. 3) に認められた(表2)。BCV 蛍光抗原はすべて陰性であった。

そこで、生後18時間の初乳未摂取子牛を代用乳で飼育し、No. 1~4 のそれぞれの腸内容液のプールしたものの10 ml を経口接種した。子牛は接種18時間後に激しい下痢を排して発症し、元気消失、食欲減退、脱水等の症状を呈したが、30時間後には軟便となり以後回復した。発症極期の下痢便液から MA 104 細胞に CPE を示して増殖し、継代可能なウイルスが分離された。CPE を示した MA 104 細胞は抗 BRV 蛍光抗体染色で明瞭な BRV 抗原が認められた(表2)。抗 BCV 抗原は陰性であった。BRV に対する HI 抗体価の消長は、接種前血清では10倍以下であったが、2週後から上昇し、4週後血清では640倍に達した。したがって分離ウイルスは BRV と同定された。

6) 血清学的検査：母牛および子牛血清と乳清について BRV に対する HI 試験を行なった(表1)。母牛の4月15日の血清抗体価は10~160倍であったが6月13日の血清では20~640倍で有意上昇を示すものが多かった。No. 5~12の子牛血清では5月8日では20~80倍であったが6月13日には80~640倍に上昇し7頭中4頭に抗体価の有意上昇が認められた。いっぽう、No. 13~16の母牛と子牛血清の抗体価は6月13日では40~640倍であったが、7月19日の子牛血清では10~160倍に低下した。

乳清の抗体価は6月5日が7例中1例が10倍、6例は10倍以下であり、6月30日では1例が20倍、2例が10倍、13例は10倍以下であった。プール牛乳の抗体価は6月3日と13日が10倍、6月23日が10倍以下であった(表1)。

BCV に対する母牛と子牛血清の HI 抗体価は10~40倍の範囲にあり、前血清と後血清間で有意上昇は認められなかった。

3. 考 察

北海道内の一酪農場で死亡例を伴う新生子牛下痢症の集団発生があった。病原分離、臨床症状、剖検所見および血清学的調査等から本病は BRV と毒素原性大腸菌の混合感染によると判断された。そこで、その対策として精密検査を実施することとし、初乳とプール牛乳の持続的な給与と抗生物質の適正使用を畜主に指導した。

多くのウイルス性消化器病では血液中の移行抗体は感染防御に効果がなく^{14,16,17)}、初乳や常乳に含まれている抗体が持続的に腸管粘膜を覆っていることが感染防御に重要であると考えられている^{8,14,16~18)}。当時農場には30数頭の搾乳牛がおり、これらの牛の中には子牛と同様にウイルス感染を受けているものがあると考えられた。そこで、初乳とともに多数の牛から得たプール牛乳を与えることによって、乳汁中の抗体による感染防御と抗生物質の相乗効果を期待した。

その結果、初発生から約4週後までに生まれた子牛 (No. 5~12) 8頭では発症死亡例1頭、回復例6頭、発症しなかった子牛1頭等種々の感染様相を示し、症状は全般的に緩和した。これら母牛と子牛の前血清の BRV 抗体価はいずれも低く、後血清では有意上昇を示すものが多かった。したがって子牛の飲んだ初乳中の抗体価はそれ程高くなく感染を防御するには量的に不十分と考えられた。いっぽう、約7週後に生まれた子牛 (No. 13~16) 4頭はすべて発症しなかった。これら母牛の前血清抗体価は4頭中3頭が160~640倍であり、妊娠中のウイルス感染が示唆された。初乳抗体価は分娩時母牛血清抗体価の数倍の力価を保有する成績^{4,5,16)}から考えて、子牛の飲んだ初乳中にはウイルス感染を防御するのに十分量の抗体を含んでいたことは疑いない。子牛血清の抗体価は前血清で高く、後血清ですべて低下していたことからウイルス感染を防御しえたものと考えられた。個々の母牛から得た常乳やプール牛乳中の抗体価は採取時期が適当でなかったためか低いものが多くその効果に疑問がもたれた。しかし Woodr 氏¹⁰⁾は、BRV 感染母牛の初乳抗体価の推移を調べ分娩日初乳抗体価の高い牛でも、1~2日後に急激に低下し、4日後では大部分の乳汁抗体が検出できなくなることを報告している。したがって、この試験で用いたプール牛乳3例中2例に抗体が検出されたこと、投与後に症状が緩和したことなどからある程度効果があったと思われる。

BRV の病原性は単独感染のみでも新生子牛に激しい下痢病状をおこさせるが、短時間で回復することが今回の初乳未摂取子牛への感染試験で明らかにされ、これまでの報告^{7,9)}とも一致していた。試験子牛下痢便からの大腸菌数は $10^5/g$ にすぎず、K99 抗原も陰性であった。しかし、BRV と大腸菌を同時接種した場合、病勢が著る

しく増悪し、致命率も高まることが報告されている^{7,9,10,12}。本症例も発生初期には BRV と毒素原性大腸菌の混合感染によって致死的経過をとったが、対策後は、初乳とプール牛乳の給与、抗生物質の投与、さらに大量輸液療法等の効果が相乗して症状が好転したものと考えられた。

著者ら^{8,11}は、集団子牛哺育場由来の下痢便中から BRV, BCV, 牛ウイルス性下痢症ウイルス、ほか未同定ウイルス、また K99 保持大腸菌、サルモネラ菌等を高頻度に分離しており、その組み合わせは所により多少の違いはあるが、下痢に關与する病原微生物の多様性がうかがわれた。

このように子牛下痢症の対策には常に種々の病原微生物の關与を念頭におき、各種ウイルス性疾患には初乳や常乳さらに前報⁹で記載した 0.5%プロピオン酸添加初乳の利用、細菌性疾患に対する抗生物質の適正使用等効果的な利用が望まれる。

終わりに、大腸菌菌株の分与と K99 抗原について同定いただいた家畜衛生試験場東北支場長の根本 久博士、中沢宗生技官、調査にご協力いただいた網走家畜保健衛生所および斜里町農業共済組合の諸氏に深甚の謝意を表します。

また有益なご助言を賜った、北海道支場長の東 量三博士および技術補助をいただいた当支場の西岡信義技官

に深謝いたします。

文 献

- 1) COWAN, S. T., 坂崎利一訳：医学細菌の手引き，106，近代出版，東京（1974）。
- 2) 合田 朗，ほか：感染モデルの組み方，腸管感染研究会編，75，近代出版，東京（1973）。
- 3) 橋口裕治，ほか：獣医学会（第84回）154（1977）。
- 4) 橋口裕治，ほか：獣医学会（第86回）18（1978）。
- 5) 橋口裕治，八田忠雄：日獣会誌，34，166～171（1981）。
- 6) INABA, Y., et al.: *Arch. Virol.*, 50, 339 (1977).
- 7) McNALTY, M. S., et al.: *Vet. Rec.*, 99, 229 (1976).
- 8) MEBUS, C. A., et al.: *Vet. Pathol.*, 8, 490 (1971).
- 9) MEBUS, C. A., et al.: *Vet. Pathol.*, 10, 45 (1973).
- 10) MEBUS, C. A., et al.: *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 163, 880 (1973).
- 11) 村上洋介，ほか：獣医学会（第90回）154（1980）。
- 12) NALDHAM, D. C., et al.: *Am. J. Vet. Rec.*, 30, 1573 (1969).
- 13) 根本 久：家畜衛生週報，No. 1556, 214 (1979).
- 14) POWTER, P., et al.: *Immunol.*, 18, 245 (1970).
- 15) SATO, K., et al.: *Vet. Microbiol.*, 2, 83 (1977).
- 16) WOODE, G. N., et al.: *Vet. Rec.*, 96, 85 (1975).
- 17) WOODE, G. N., et al.: *Vet. Rec.*, 97, 148 (1975).
- 18) WOODE, G. N., et al.: *Infect. Immune.*, 14, 804 (1976).

ノ ー ト

Acanthosis を主変化とする乳牛の趾間腐爛の一例

門倉武雄* 五十嵐幸男** 井上 勇***

(昭和 55 年 12 月 19 日受理)

A Case of Foot Rot of Dairy Cow with Acanthosis as Main Change
TAKEO KADOKURA (First Northern Veterinary Clinic, Saitama Prefectural Federation
of Agricultural Mutual Aid Associations, Fukaya, Saitama 366) et al.

SUMMARY

While a Holstein cow was under treatment of foot rot, a neoplasm developed between the hoofs of the right hind limb. It was proved histopathologically to be acanthosis after it had been left untreated for a considerably long time on account of the ignorance of her owner.

要 約

筆者らは、ホルスタイン種乳牛の右後肢の趾間に発生した腫瘤について、病理組織学的検索をおこなったところ、Acanthosis と判明した。当初趾間腐爛と診断して加療中に本症の発生を認めたもので、腫瘤発生初

* 埼玉県農業共済組合連合会北部第一家畜診療所（埼玉県深谷市上野台2990-1） ** 埼玉県 開業（埼玉県熊谷市佐谷田3083） *** 埼玉県大宮家畜保健衛生所（大宮市別所町107-1）