

# 牛ウイルス性下痢ウイルスワクチンによる中和抗体価維持期間に関する調査

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	加藤, 肇 一條, 祐一 江村, 有希子 佐藤, 礼一郎 高久, 英徳 大西, 守 田島, 誉士
巻/号	63巻1号
掲載ページ	p. 33-37
発行年月	2010年1月

## 牛ウイルス性下痢ウイルスワクチンによる 中和抗体価維持期間に関する調査

加藤 肇<sup>1)†</sup> 一條祐一<sup>1)</sup> 江村有希子<sup>1)</sup> 佐藤礼一郎<sup>1)</sup>

高久英徳<sup>2)</sup> 大西 守<sup>3)</sup> 田島誉士<sup>4)</sup>

- 1) 根室地区農業共済組合西春別支所 (〒088-2576 野付郡別海町西春別81-2)
- 2) 網走家畜保健衛生所 (〒090-0008 北見市大正323-5)
- 3) 根室地区農業共済組合検査室 (〒086-1105 標津郡中標津町西5条南11-5)
- 4) 北海道大学大学院獣医学研究科付属動物病院 (〒060-0818 札幌市北区北18条西9丁目)

(2009年1月22日受付・2009年8月17日受理)

### 要 約

牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 生ワクチンの接種プログラム設定の参考にするため、ワクチン接種後の抗体の維持期間についての調査を行った。北海道根室地区の酪農場で飼養される育成牛20頭を試験に用い、BVDV1を成分に含む生ワクチン1回接種群10頭 (A群)、生ワクチン接種後にBVDV1とBVDV2を成分に含む不活化ワクチンを接種した群5頭 (B群) およびワクチン未接種群5頭 (C群) に区分した。A群は3年間の調査期間中にBVDV1とBVDV2に対する抗体価が上昇し維持されB群との間で抗体価に有意な差は認められなかった。C群でも抗体価の大きな上昇が認められなかったことから、調査期間中に野外株が牛群に侵入した可能性は低いと考えられた。BVDV1生ワクチンの1回接種により得られた抗体は少なくとも3年間維持されることが確認された。本症対策として育成期における生ワクチンの1回接種は有用な手段の一つと考えられた。

—キーワード：抗体価維持期間，牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) ワクチン，BVDV1.

----- 日獣会誌 63, 33~37 (2010)

Victor [1] の報告によれば、近年牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 感染に対するワクチン接種による子牛の消耗率低減効果は急速に向上してきているとされている。BVDV ワクチンには、生ワクチン、高温非増殖性ワクチン、不活化ワクチンの3種類のワクチンがある [1]。わが国においては、生ワクチンと不活化ワクチンが現在市販されている。生ワクチンは不活化ワクチンに比べて幾つかの利点があるとされている [1-4]。利点のおもなものとしてRoth [2] は、価格が安いこと、より高いレベルの血清中和抗体価が得られること、および多様な抗原性状のウイルス株に有効なことを挙げている。さらに1回の接種で速やかに (7~10日以内) 免疫が獲得されること [3] や免疫効果が長期間持続すること [4] も報告されている。いっぽう、生ワクチンは妊娠牛への投与により胎子への悪影響が懸念されている [1, 5]。それを回避するため、Victor [1] は育成牛におい

ては初回受精3週間前までの生ワクチン接種を奨励している。初回ワクチン接種時期や追加接種時期を設定するには生ワクチン1回投与による免疫能力の維持期間を把握することは必要不可欠である。BVDV ワクチン接種後の抗体価は1年程度持続するとされているが [2, 6]、それらは免疫応答能やウイルス汚染状況が異なる牛群から得られた成績であり、供試牛の免疫状態と環境的要因をできるだけ一致させた条件下での調査結果は報告されていない。さらに、1年以上にわたり抗体価を継続調査した報告もない。そこで、野外における生ワクチン接種プログラム設定の参考にするため、生ワクチン1回投与後の抗体価がその後どのくらい持続するかを調べた。

### 材料および方法

**試験農場の概要：**北海道根室管内のA酪農場において試験を実施した。本農場はフリーストール式牛舎で、育

† 連絡責任者：加藤 肇 (根室地区農業共済組合西春別支所)

〒088-2576 野付郡別海町西春別81-2

☎0153-77-2301 FAX 0153-77-3577

E-mail : nosaikatohajime@isis.ocn.ne.jp

BVDV ワクチンによる中和抗体維持期間の調査

(1) 表1 ワクチン接種によるBVDV1(1) とBVDV2(2) 中和抗体価の推移

試験群	牛No.	接種前	接種後 31日	接種後 172日	接種後 339日	接種後 458日	接種後 492日	接種後 578日	接種後 748日	接種後 1132日
A	1	<2	256	512	512	512	ND	64	256	256
A	2	<2	2048	256	1024	ND*	ND	ND	ND	ND
A	3	<2	64	2048	1024	512	512	64	256	256
A	4	4	16	1024	256	512	128	1024	256	1024
A	5	<2	128	1024	512	512	1024	2048	512	1024
A	6	8	256	2048	1024	256	128	512	128	256
A	7	4	128	512	1024	256	256	256	512	512
A	8	4	1024	2048	256	256	256	512	512	512
A	9	4	512	2048	512	1024	512	256	128	256
A	10	<2	256	1024	1024	512	1024	2048	512	ND
B	11	<2	256	1024	1024	512	2048	256	128	64
B	12	<2	256	1024	512	512	512	1024	256	1024
B	13	<2	512	1024	512	512	1024	512	256	256
B	14	<2	512	2048	1024	512	1024	512	256	1024
B	15	8	2048	1024	128	128	256	64	512	256
C	16	<2	8	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
C	17	4	1024	1024	2048	512	64	256	128	64
C	18	8	16	<2	<2	<2	<2	<2	ND	ND
C	19	8	8	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
C	20	32	8	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2

(2)

試験群	牛No.	接種前	接種後 31日	接種後 172日	接種後 339日	接種後 458日	接種後 492日	接種後 578日	接種後 748日	接種後 1132日
A	1	<2	4	8	4	8	ND	8	4	8
A	2	<2	4	8	8	ND*	ND	ND	ND	ND
A	3	<2	2	16	32	32	32	8	4	8
A	4	2	4	16	16	16	32	16	4	4
A	5	4	4	32	16	32	128	64	16	4
A	6	4	4	32	64	8	8	16	16	8
A	7	16	4	32	4	4	4	4	8	4
A	8	<2	4	32	2	8	16	8	8	4
A	9	<2	8	64	64	32	64	32	16	16
A	10	<2	2	128	32	32	128	128	128	ND
B	11	<2	2	64	32	16	64	32	8	2
B	12	<2	4	32	16	32	32	32	16	16
B	13	<2	4	8	16	16	16	8	16	4
B	14	<2	8	16	32	32	64	8	16	4
B	15	<2	8	16	16	8	32	2	4	2
C	16	<2	32	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
C	17	<2	4	16	16	32	16	2	16	16
C	18	16	4	<2	<2	<2	<2	<2	ND	ND
C	19	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
C	20	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2

\*ND: 実施せず

成牛舎 (3~22カ月齢牛を飼養), 乾乳牛舎 (妊娠後期の育成牛および乾乳牛を飼養), フリーストール式牛舎 (搾乳牛を飼養) の3棟があり, それぞれ独立していた。2006年2月7日時点において成牛132頭, 育成牛32頭, 子牛19頭 (本農場内のカーフハッチにて飼養) を飼養していた。2006年9月27日から2007年12月10日の間に初妊牛を根室地区管内の酪農場より44頭導入した。

供試牛: A酪農場で飼養され, ワクチンの接種歴がないホルスタイン種の育成牛20頭を試験に用いた。供試牛は2004年9月15日生まれから2005年8月1日生まれで, 発育や一般状態が良好な牛を選定した。観察期間中, 供試牛は成長とともに育成牛舎から乾乳牛舎を経てフリーストール牛舎へと飼養場所が移動された。調査期間中に導入した初妊牛以外にA農場以外の牛と供試牛が

接触する機会はなかった。

**ワクチン：**生ワクチンとして、BVDV1の弱毒生ウイルス (No. 12-43株) を含む牛伝染性鼻気管炎・牛ウイルス性下痢-粘膜病・牛パラインフルエンザ混合生ワクチン (IBR・BVD-MD・PI生ワクチン, Lot60-1, (株)微生物化学研究所, 京都; 以下「生ワクチン」) を用いた。不活化ワクチンとして、BVDV1 (Singer株) とBVDV2 (5912株) の不活化抗原を含有するIBR・BVD-MD 2価・PI・牛RSウイルス感染症混合 (アジュバント加) 不活化ワクチン (ストックガード5, Lot178179A, 共立製薬(株), 東京; 以下「不活化ワクチン」) を用いた。

**ワクチン接種プログラムと血清の採取：**生ワクチンを1回接種するA群 (10頭, 試験開始時8~14カ月齢), 生ワクチンを接種し, 初回接種から15カ月後に不活化ワクチンを接種するB群 (5頭, 試験開始時6~16カ月齢), ワクチンを接種しないC群 (5頭, 試験開始時6~16カ月齢) に供試牛を区分した。まず, ワクチン接種前の2006年2月7日に全頭から血清を採取した。さらに同日にA群とB群に生ワクチンを接種した。B群には2007年5月10日, 不活化ワクチンを接種した。生ワクチン接種後はそれぞれ接種後31, 172, 339, 458, 492, 578, 748および1132日目の計8回, 血清を採取した。抗体価測定までの期間, 血清は凍結保存 (-20℃以下) した。

**BVDVに対する中和抗体価の測定：**すべての血清を採取後, まとめて中和抗体価を測定した。1型はNose株および2型はKZ-91cp株を指示ウイルスとし, 牛胎子筋肉 (BFM) 細胞を用い, マイクロタイター法による中和試験を行った。すなわち, 細胞培養用96穴プレートを用いて非働化済みの血清50 $\mu$ lを2倍階段希釈した後, 200TCID<sub>50</sub>/0.1mlの指標ウイルス液50 $\mu$ lと混合した。37℃で1時間反応後, BFM細胞浮遊液を100 $\mu$ l添加し, 37℃で5日間培養した。指示ウイルスの細胞変性効果を指標とし, 中和を示した血清の最大希釈倍数の逆数を中和抗体価とした。

**統計解析：**A群とB群の各採血日における抗体価, およびA群における生ワクチン接種後31日目と生ワクチン接種後1132日目の抗体価をMann-WhitneyのU検定を用い解析した。P<0.05で検定した。

**ウイルス学的検査：**既報の方法 [7] に準じてバルク乳からのBVDV遺伝子検出を実施した。1回目のワクチン接種から半年後と1年半後のバルク乳を検査対象とした。

## 成 績

**BVDV1に対するワクチンの免疫効果 (表1)：**A群の牛10頭すべてにおいてワクチン接種後31日目で16~

2048倍のBVDV1に対する中和抗体が検出された。B群の牛においてもワクチン接種後31日目に256~2048倍のBVDV1に対する中和抗体が検出された。その後7回の測定では, 64~2048倍の抗体が検出された。A群とB群の測定日ごとの中和抗体価およびA群における接種後31日と接種後1132日の中和抗体価に有意な差は認められなかった。C群の牛においてもAおよびB群への生ワクチン接種後31日目に8~1024倍の抗BVDV中和抗体が検出された。その後7回の測定では1頭に64~2048倍のBVDV1に対する中和抗体が検出されたがその他4頭の牛からはBVDV1に対する中和抗体は検出されなかった。

**BVDV2に対するワクチンの免疫効果 (表1)：**A群では9頭からワクチン接種後31日目に2~8倍のBVDV2に対する中和抗体が検出された。その後7回の測定ではすべての期間において2~128倍の抗体が検出された。B群においてもA群同様, すべての牛からワクチン接種後31日目に2~8倍のBVDV2に対する中和抗体が検出された。その後7回の測定では, すべての期間において2~64倍のBVDV2に対する抗体が検出された。BVDV2不活化抗原を含む2回目のワクチン接種後も抗体価の大きな変動は認められなかった。A群とB群の測定日ごとの抗体価およびA群における接種後31日と接種後1132日のBVDV2に対する中和抗体価に有意な差は認められなかった。C群では31日目に3頭の牛において4~32倍の抗BVDV2中和抗体が検出された。その後1頭は7回の測定で2~32倍のBVDV2に対する中和抗体が検出された。その他4頭の牛からはBVDV2に対する中和抗体は検出されなかった。それぞれのワクチン接種から半年後に実施した本農場のバルク乳検査では, いずれの検査においてもBVDV遺伝子は検出されなかった。

## 考 察

本研究において抗体価の測定に用いたNose株はワクチン株のNo. 12-43株に対して高い抗原交差性を示す [8, 9]。本調査の成績において, A群とB群におけるBVDV1に対する中和抗体価は, 多少の変動はあったものの, 調査期間中は高い抗体価を維持していた。調査期間中に1年間隔で実施した2回のバルク乳検査においてBVDV遺伝子は検出されず, バルク乳検査は感度が高いと報告されていることから [10, 11], 搾乳牛群内に持続感染牛がいた可能性はきわめて低いと考えられた。さらにC群では, 中和抗体価の大きな上昇が認められなかったことから, 調査期間中に供試牛群内でBVDVの自然感染が生じた可能性は低いと考えられた。以上の結果から, A群とB群はワクチン接種により抗体を獲得したことが強く示唆された。

抗体価の測定に用いた KZ-91cp 株は BVDV1 に対して低いながらも抗原交差性を示す [9]。BVDV1 を含むワクチンに BVDV2 に対する防御効果があることが報告されている [1, 12]。Shimazaki ら [12] は、BVDV1 生ワクチン接種後に BVDV2 に対する抗体が検出されない牛においても BVDV2 に対する防御効果があることを報告している。Endsley ら [13] は、BVDV ワクチン接種後の液性免疫が不十分でも細胞性免疫が防御効果を示すことを明らかにしている。本研究では、BVDV2 の中和抗体価が生ワクチン接種後に低いながらも上昇維持されることが確認された。このことから今回用いた生ワクチン用の BVDV1 株は BVDV2 に対する交差免疫を誘導し、BVDV2 に対して一定の感染防御効果が期待できると考えられた。しかし、BVDV1 のみを含むワクチンは BVDV1 と BVDV2 を含むワクチンと比較して子宮内感染の防御効果は低いことが報告されている [14]。今後、BVDV1 と BVDV2 の両方を含む生ワクチンの実用化が期待される。

BVDV の現行の生ワクチンは子宮内感染のリスクを軽減させるが、胎子への感染を完全に防ぐことはできないとされている [1, 14, 15]。しかしながら生ワクチンは抗原性状が異なる野外株に対しても、その臨床症状を緩和することによって経済的損失を軽減させる効果が評価されている [1, 15]。本研究においては、BVDV1 および BVDV2 を含む不活化ワクチンを接種した B 群と接種しなかった A 群との間で、接種後の BVDV1 および BVDV2 に対する中和抗体価に有意な差は認められなかった。さらに、生ワクチン接種後 1 カ月および 3 年目の抗体価に有意な差は認められず、BVDV 生ワクチン 1 回投与により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。本症の防疫は、持続感染牛の摘発淘汰ならびに新たな持続感染牛の浸入阻止が必要不可欠である [15] が、今回の結果から生ワクチンの 1 回接種は費用対効果の観点から本症の対策の一つとして有用な手段と考えられた。

一般的には 4 倍以上の抗体価の上昇は、BVDV の感染が生じたことを示している [16]。本研究では生ワクチン接種後にワクチン未接種牛 2 頭に BVDV1 と BVDV2 に対する中和抗体価の上昇が認められ、1 頭 (C 群 No. 16) はその後抗体が消失し 1 頭 (C 群 No. 17) は調査期間中も抗体が維持された。Cortese ら [17] は抗原刺激が不十分な場合、記憶 B 細胞の親和性成熟度が未熟で一時的な抗体産生にとどまる感染があることを示唆している。ワクチン未接種牛 C 群は接種後 1 カ月の間 A 群と B 群の牛と育成牛舎内で同居し、お互いに接触可能であった。この間に授精業務や診療行為はなく、飼養者以外の人との接触の機会はなかった。さらにこの間に牛の導入はなく、育成牛舎内の牛と外部の牛が接触する機会はない。

これらのことから、ワクチン接種後に接種牛体内で増殖したワクチン株が排出され、未接種牛において親和性成熟度の異なる 2 種類の感染が生じた可能性が考えられた。

乳牛における IgG の半減期は 21 日であるとされている [18] が、本研究では 1 回のワクチン接種で少なくとも 3 年間抗体が維持されることが推測された。抗体が維持される理由として、抗原物質のリンパ組織内の定住 [19]、強い抗原刺激による抗体産生の継続 [17] などが考えられる。また、Fredriksen ら [20] は、BVDV 感染後は 14～28 日後に抗体価はピークに達しその後変動をともなって (64～512 倍) 維持されるとしている。本研究において、1 回のワクチン接種によっていかなる機序で抗体が維持されたかは不明であるが、1 回の抗原感作によって長期間にわたり抗体が維持され得ることが示唆された。

周産期には著しい白血球の機能低下が認められる [21]。抗体価の変動要因として泌乳ストレスの影響 [18] が考えられたが、今回の研究では明らかにすることはできなかった。今後、フィールドにおける類似の調査の蓄積により、育成期における生ワクチンの有用性と安全性が明らかにされることが期待される。

## 引用文献

- [1] Victor S : Bovine virus diarrhea virus vaccine, Large Animal Internal Medicine, Smith BD ed, 4th ed, 1603-1605 Mosby Inc, St. Louis (2008)
- [2] Roth JA : Building Immunity, National Hog Farmer, Spring, 1-48 (1992)
- [3] Brock KV, Widel P, Walz P, Walz HL : Onset of protection from experimental infection with type 2 bovine viral diarrhea virus following vaccination with a modified-live vaccine, Vet Ther, 8, 88-96 (2007)
- [4] Ficken MD, Ellsworth MA, Tucker CM : Evaluation of the efficacy of a modified-live combination vaccine against bovine viral diarrhea virus types 1 and 2 challenge exposures in a one-year duration-of-immunity fetal protection study, Vet Ther, 7, 283-394 (2006)
- [5] 福富豊子, 大内紀章, 澤田勝志, 平井伸明, 秦 守男, 長井 誠 : 岡山県で分離された牛ウイルス性下痢ウイルスの遺伝子解析, 日獣会誌, 61, 693-698 (2008)
- [6] 伊藤麻子, 迫田義博, 亀山健一郎, 山崎幸夫, 白井 章, 喜田 宏 : 牛ウイルス性下痢病および牛伝染性気管支炎に対する市販混合ワクチン接種プログラムの中和抗体反応による評価, 日獣会誌, 61, 39-42 (2008)
- [7] Kozasa T, Tajima M, Yasutomi Y, Sano K, Ohashi K, Onuma M : Relationship of bovine viral diarrhea virus persistent infection to incidence of diseases on dairy farms based on bulk tank milk test by RT-PCR, Vet Microbiol, 106, 41-47 (2005)
- [8] 横田 修, 渡辺卓俊, 斎野 仁, 青木仁久, 三上祐二 : 牛ウイルス性下痢・粘膜病生ワクチンの乳牛における抗体応答と胎子感染, 日獣会誌, 43, 239-243 (1990)

- [9] Nagai M, Ito T, Sugita S, Genno A, Takeuchi K, Ozawa T, Sakoda Y, Nishimori T, Takamura K, Akashi H : Genomic and serological diversity of bovine viral diarrhoea virus in Japan, *Arch Virol*, 146, 685-696 (2001)
- [10] Drew TW, Yapp F, Paton DJ : The detection of bovine viral diarrhoea virus in bulk milk samples by the use of a single-tube RT-PCR, *Vet Microbiol*, 64, 145-154 (1999)
- [11] Radwan GS, Brock KV, Hogan JS, Smith KL : Development of a PCR amplification assay as a screening test using bulk milk samples for identifying dairy herds infected with bovine viral diarrhoea virus, *Vet Microbiol*, 44, 77-91 (1995)
- [12] Shimazaki T, Nakamura S, Taguchi K, Inoue Y : Efficacy of bovine viral diarrhoea vaccine used in Japan against bovine viral diarrhoea virus type 2 strain 890, *J Vet Med Sci*, 65, 263-266 (2003)
- [13] Endsley JJ, Roth JA, Ridpath J, Neill J : Maternal antibody blocks humoral but not T cell responses to BVDV, *Biologicals*, 31, 123-125 (2003)
- [14] Ficken MD, Ellsworth MA, Tucker CM, Cortese VS : Effects of modified-live bovine viral diarrhoea virus vaccines containing either type 1 or types 1 and 2 BVDV on heifers and their offspring after challenge with noncytopathic type 2 BVDV during gestation, *J Am Vet Med Assoc*, 228, 1559-1564 (2006)
- [15] Daniel L, John C, Trevor R : Disease caused by bovine virus diarrhoea virus, *Large Animal Internal Medicine*, Smith BD ed, 4th ed, Mosby Inc, St. Louis, 791-798 (2008)
- [16] Tyler JW, Cullor JS : Titers, tests, and truisms : Rational interpretation of diagnostic serologic testing, *J Am Vet Med Assoc*, 194, 1550-1558 (1989)
- [17] Cortese VS, Whittaker R, Ellis J, Ridpath JF, Bolin SR : Specificity and duration of neutralizing antibodies induced in healthy cattle after administration of a modified-live virus vaccine against bovine viral diarrhoea, *Am J Vet Res*, 59, 848-850 (1998)
- [18] Halliwell REW, Gorman NT : *The immunoglobulins*, Veterinary Clinical Immunology, Halliwell REW ed, Saunders, Philadelphia, 19-54 (1989)
- [19] Zinknagel RM : *Immunology and immunity studied with viruses*, Ciba foundation symposium 204, John Wiley & Sons, New York, 105-125 (1997)
- [20] Fredriksen B, Sandvik T, Løken T, Odegaard SA : Level and duration of serum antibodies in cattle infected experimentally and naturally with bovine virus diarrhoea virus, *Vet Rec*, 144, 111-114 (1999)
- [21] Burton JL, Madsen SA, Chang LC, Weber PS, Buckingham KR, Van Dorp R, Hickey MC, Earley B : Gene expression signatures in neutrophils exposed to glucocorticoids : a new paradigm to help explain "neutrophil dysfunction" in parturient dairy cows, *Vet Immunol Immunopathol*, 105, 197-219 (2005)

---

### Neutralizing Antibody Titer Persistence after Immunization with Bovine Viral Diarrhoea Virus Vaccine

Hajime KATO<sup>\*†</sup>, Yuichi ICHIJO, Yukiko EMURA, Reiichiro SATO, Hidenori TAKAKU, Mamoru ONISHI and Motoshi TAJIMA

*\* Nemuro District Agricultural Mutual Aid Association, Nishi-Shumbetsu Branch, 81-2 Nishi-Shumbetsu Betsukai-cho, Notsuke-gun, 088-2576, Japan*

#### SUMMARY

To develop a vaccination program against bovine viral diarrhoea virus (BVDV) using live vaccines, the persistence of antibody following vaccination was estimated. Twenty breeding cattle raised on a dairy farm in the Nemuro district of Hokkaido were used for the experiment. The cattle were divided into the following three groups : ten were vaccinated once with a live BVDV1 vaccine (Group A), five were vaccinated with an inactivated vaccine (containing BVDV1 and BVDV2) after being vaccinated with the live vaccine (Group B), and five were left unvaccinated (Group C). In Group A, both anti-BVDV1 and anti-BVDV2 antibody titers increased and persisted during the three years of the study; no significant difference was recognized between Group A and Group B. Group C showed no significant increase in antibody titer, so natural BVDV infection might not occur during the period. Antibody induced by one-off vaccination with BVDV1 live vaccine was maintained for at least three years. Therefore, the one-off vaccination with BVDV1 live vaccine in the breeding period was an available method for the control of BVDV infection.

— Key words : antibody titer persistence, bovine viral diarrhoea virus (BVDV) vaccine, BVDV1.

† Correspondence to : Hajime KATO (Nemuro District Agricultural Mutual Aid Association, Nishi-Shumbetsu Branch) 81-2 Nishi-Shumbetsu Betsukai-cho, Notsuke-gun, 088-2576, Japan  
TEL 0153-77-2301 FAX 0153-77-3577 E-mail : nosaikatohajime@isis.ocn.ne.jp

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 63, 33 ~ 37 (2010)