

卵黄抗体(IgY)製剤の投与がクリプトスポリジウム感染子牛のオーシスト排出量と血清および糞便中IgY濃度に及ぼす影響

誌名	産業動物臨床医学雑誌 = Japanese journal of large animal clinics
ISSN	1884684X
著者名	野寄,敢 伊藤,めぐみ 村越,ふみ 滄木,孝弘 芝野,健一 山田,一孝
発行元	日本家畜臨床学会
巻/号	10巻2号
巻号補足	
掲載ページ	p. 68-72
発行年月	2019年8月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター

Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



卵黄抗体 (IgY) 製剤の投与がクリプトスポリジウム感染子牛の オーシスト排出量と血清および糞便中 IgY 濃度に及ぼす影響

野 寄 敢¹⁾ 伊藤めぐみ^{1)†} 村越ふみ²⁾
 滄木孝弘¹⁾ 芝野健一³⁾ 山田一孝⁴⁾

1) 帯広畜産大学獣医学研究部門 臨床獣医学分野, 2) 京都府立医科大学感染病態学
 3) 岡山理科大学獣医学部, 4) 麻布大学獣医学部

(2019 年 5 月 25 日受付・2019 年 7 月 18 日受理)

要 約 クリプトスポリジウム感染症は生後 1 カ月以内の子牛に水様性下痢を引き起こす。クリプトスポリジウム症に有効な治療薬は存在しないが、子牛の下痢症に対する卵黄抗体 (IgY) 製剤が市販されており、これに抗クリプトスポリジウム IgY が含まれる。そこで本研究では、クリプトスポリジウム症に対する本製剤の効果を血清中および糞便中 IgY 動態から検討した。1 酪農場の子牛 12 頭を対照群 (通常哺乳), 初乳投与群 (初乳に製剤 60 g を混合して投与), 2 週投与群 (初乳に製剤 60 g, 生後 2 週間まで生乳に製剤 10 g/日を混合して投与) の 3 群に分けて供試牛とした。試験期間は生後 21 日目までとし、血液および糞便を採取した。すべての供試牛が *Cryptosporidium parvum* に感染し、水様性下痢を発症した。糞便 1 g あたりの平均オーシスト数は 2 週投与群が、初乳投与群および対照群より有意に少なかった ($p<0.05$)。また、血清および糞便中の総 IgY 濃度および抗クリプトスポリジウム IgY 濃度は、初乳投与群および 2 週投与群ともに高値を示し、糞便中の総 IgY 濃度は生後 5～14 日目までは 2 週投与群で初乳投与群よりも有意に高かった ($p<0.05$)。糞便中の抗クリプトスポリジウム IgY 濃度は生後 5 および 7 日目に 2 週投与群で初乳投与群よりも有意に高かった ($p<0.05$)。本製剤の 2 週間の連続的な経口投与はクリプトスポリジウム感染子牛のオーシスト排出量を減少させたことから、抗クリプトスポリジウム IgY はクリプトスポリジウム症予防に有用である可能性が示唆された。

——キーワード: 子牛, クリプトスポリジウム, ELISA, 卵黄抗体, オーシスト排出量

産業動物臨床医誌 10(2): 68-72, 2019

はじめに

クリプトスポリジウム症は、*Cryptosporidium parvum* による感染症であり、生後 1 カ月以内の子牛に水様性下痢を引き起こす [1]。下痢の長期化により子牛は衰弱し、重症例では斃死する場合もある。たとえ治療しても長期的には生産性に悪影響を及ぼす [2]。感染子牛が排出するオーシストは、ほとんどすべての消毒薬に耐性があるため予防が難しく [3-6]、クリプトスポリジウム症に対する特效薬も存在しない。また、クリプトスポリジウム症は人獣共通感染症でもあり、ヒトに感染した場合も激しい水様性下痢を引き起こす [7]。

産卵鶏に抗原を感作させると体内で抗体が産生され卵

黄中に移行する。この抗体は卵黄抗体 (Immunoglobulin egg yolk : IgY) とよばれている [8]。IgY が含まれる卵黄を粉末化したものが IgY 製剤である。下痢症による子牛の損耗を防止するために、クリプトスポリジウム、ロタウイルス、コロナウイルス、大腸菌およびサルモネラ菌に対する IgY 製剤が市販されている。

我々の臨床経験では、IgY 製剤はクリプトスポリジウム、ロタウイルスおよびコロナウイルスとの混合感染症例において下痢発症の予防効果が認められるが、クリプトスポリジウム単独感染での予防効果に関する報告はない。そこで、我々はすべての子牛が生後 2 週間以内にクリプトスポリジウム症を発症する酪農場において、IgY

† 連絡責任者: 伊藤めぐみ (帯広畜産大学獣医学研究部門 臨床獣医学分野)
 〒 080-8555 北海道帯広市稲田町西 2 線 11 番地 ☎ 0155-49-5396 FAX 0155-49-5398
 E-mail : itohmg@obihiro.ac.jp

製剤を新生子牛へ経口投与し、クリプトスポリジウム症に対する効果をオーシスト排出量、血清および糞便中 IgY 濃度から検討した。

材料および方法

北海道十勝管内の1酪農場において出生した新生子牛12頭（ホルスタイン種雌5頭、ジャージー種雌7頭）を試験に用いた。子牛はカーフハッチで1頭ずつ飼養されていたが、隣の子牛との接触は可能であった。本研究の直前に本農場で実施した実態調査では、品種に関わらずすべての子牛が生後6～10日の間にクリプトスポリジウムによる重度の水様性下痢を発症し、平均7日間 $10^3 \sim 10^5$ 個/gのオーシストを排出していた。供試牛は4頭ずつ対照群、初乳投与群および2週投与群の3群に分類した。対照群には初乳給与後通常哺乳を行い、初乳投与群には初乳にのみIgY製剤（グローアップ88：イーダブルニュートリション・ジャパン、岐阜）60gを添加、2週投与群には初乳にIgY製剤60gを添加し、さらに生後14日目まで生乳に毎日IgY製剤10g/日を添加し哺乳した。生後12時間以内にすべての子牛に母牛の初乳3ℓを哺乳瓶で給与し、それ以降は60℃で30分間低温殺菌した生乳（移行乳）を1日2回計4～6ℓ哺乳瓶で与えた。生後1, 2, 5, 7, 10, 14, 17, 21日目および下痢発症時に一般身体検査所見、直腸便および頸静脈血を採取した。なお、下痢発症牛には、対症療法による治療を行った。

採取した糞便は性状を確認し、ショ糖水浮遊法[9]を用いて顕微鏡下でクリプトスポリジウムのオーシスト数を計測し、糞便1gあたりのオーシスト数（oocyst per gram：OPG）を算出した。クリプトスポリジウムオーシストが最初に認められた日を、オーシスト排出開始日とした。下痢便の場合は、市販の検査キット（Tetra Calf Scours（Rota, Corona, Ecoli F5（K99）, Crypto）：BioX Diagnostics, ベルギー）を用いてロタウイルス、コロナウイルスおよび大腸菌の検査を行った。血液は3,000 rpm（1,600G）で15分間遠心分離後に血清分離した。血清および糞便中の総IgY濃度（抗クリプトスポリジウム、抗ロタウイルス、抗コロナウイルス、抗大腸

菌、抗サルモネラ菌IgYの総和）および抗クリプトスポリジウムIgY濃度は、本製剤の製造元であるイーダブルニュートリション・ジャパン岐阜免疫研究所のマニュアルに従いELISA法により測定した。

検討項目は、オーシスト排出期間、オーシスト排出期間中の平均OPG、血清中および糞便中の総IgY濃度および抗クリプトスポリジウムIgY濃度とした。

統計はKruskal Wallis検定を用い、群間に差が認められた場合はSteel Dwass法を用いて多重比較を行った。統計ソフトはRを用いた。

結 果

すべての子牛は生後7～10日目に粥状～水様性の下痢を発症した。これらの牛の下痢便中クリプトスポリジウムはすべて陽性で、ロタウイルス、コロナウイルスおよび大腸菌はすべて陰性であった。糞便中のオーシストは下痢の発症とともに検出され、7～9日間排出されたが、オーシスト排出開始日齢と排出日数に群間の差は認められなかった（表1）。オーシスト排出期間中の平均OPG（平均値±標準誤差）は対照群、初乳投与群および2週投与群でそれぞれ、 $(5.3 \pm 1.7) \times 10^4$ 個/g、 $(7.2 \pm 1.8) \times 10^4$ 個/g、 $(0.8 \pm 0.2) \times 10^4$ 個/gであった。2週投与群は初乳投与群および対照群よりもオーシスト排出量が有意に少なかった（ $p < 0.05$ ）（表1）。なお、糞便中のオーシストはPCR検査により*Cryptosporidium parvum*と同定された。これらの牛は適切な対症療法が施され、予後良好であった。

血清中の総IgY濃度は、初乳投与群および2週投与群において、生後1日目でそれぞれ $22.48 \pm 2.55 \mu\text{g/ml}$ および $14.69 \pm 2.51 \mu\text{g/ml}$ と高値を示したが、21日目にはそれぞれ $0.06 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ および $0.07 \pm 0.04 \mu\text{g/ml}$ まで低下した。両群間に有意差は認められなかった。対照群は試験期間を通して血清中の総IgY濃度は $0.01 \mu\text{g/ml}$ （検出限界）未満であった（図1）。糞便中の総IgY濃度は、初乳投与群では生後1日目が $93.94 \pm 55.93 \mu\text{g/ml}$ であったが、生後5日目は $0.17 \pm 0.08 \mu\text{g/ml}$ に低下し、14日目には全頭で $0.01 \mu\text{g/ml}$ 未満となった。2週投与群では生後1日目が $206.59 \pm 78.14 \mu\text{g/ml}$ 、14日目が 2.30

表1. 各群の下痢発症日齢、オーシスト排出日数およびオーシスト排出期間中の平均OPG

	対照群	初乳投与群	2週投与群
下痢発症（オーシスト排出開始）日齢	8.5 ± 0.6	7.0 ± 0.4	8.0 ± 0.5
オーシスト排出日数	7.5 ± 0.9	8.8 ± 0.7	7.3 ± 0.6
オーシスト排出期間中の平均OPG	$(5.3 \pm 1.7) \times 10^4^a$	$(7.2 \pm 1.8) \times 10^4^a$	$(0.8 \pm 0.2) \times 10^4^b$

数値は平均値±標準誤差、a, b：異符号間に有意差あり（ $p < 0.05$ ）

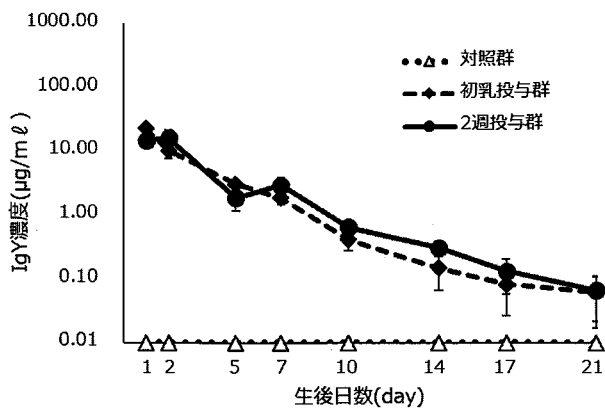


図 1. 血清中総 IgY 濃度
検出限界: $<0.01 \mu\text{g/ml}$

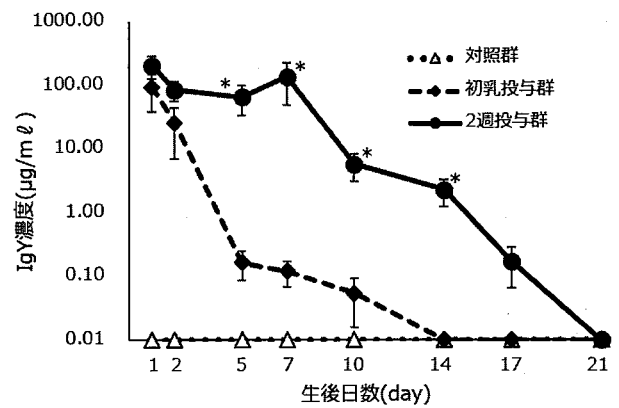


図 2. 糞便中総 IgY 濃度
検出限界: $<0.01 \mu\text{g/ml}$
*: $p < 0.05$ 初乳投与群 vs 2週投与群

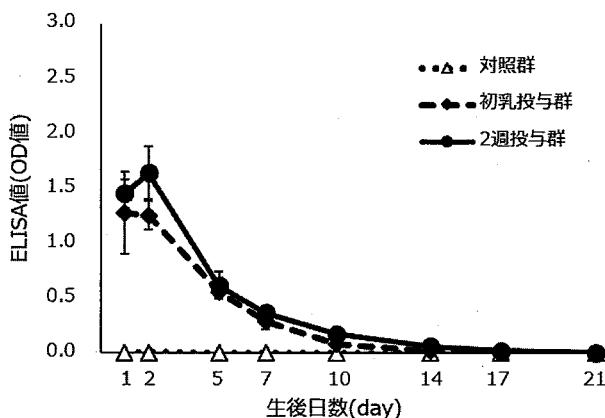


図 3. 血清中抗クリプトスポリジウム IgY 濃度

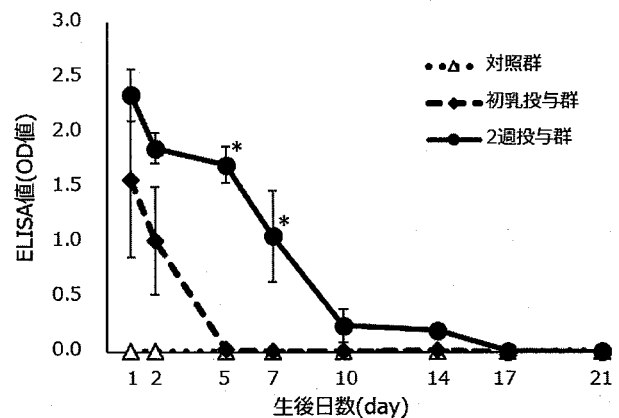


図 4. 糞便中抗クリプトスポリジウム IgY 濃度
*: $p < 0.05$ 初乳投与群 vs 2週投与群

$\pm 1.05 \mu\text{g/ml}$ であり、21日目に全頭 $0.01 \mu\text{g/ml}$ 未満となった。5～14日目の糞便中の総 IgY 濃度は2週投与群の方が初乳投与群よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。対照群は試験期間を通して糞便中の総 IgY 濃度は $0.01 \mu\text{g/ml}$ 未満であった (図2)。

血清中抗クリプトスポリジウム IgY は、対照群、初乳投与群および2週投与群ともに総 IgY 濃度と同様に推移し、初乳投与群と2週投与群との間に差は認められなかった (図3)。一方、糞便中抗クリプトスポリジウム IgY は、初乳投与群では生後5日目には OD 値 0.02 ± 0.01 まで減少した。2週投与群では生後1日目の OD 値 2.34 ± 0.24 をピークに7日目以降は急激に減少して 1.06 ± 0.41 となり、10日目には 0.20 ± 0.06 となった。生後5および7日目において2週投与群は初乳投与群よりも糞便中の抗クリプトスポリジウム IgY 濃度が有意に高かった ($p < 0.05$) (図4)。

考 察

IgY 製剤中に含まれる抗クリプトスポリジウム IgY は、初乳に添加して経口投与することで、生後24時間以内の子牛の腸管から吸収され血中に移行し、一部はその後腸管内に再移行すること、生乳あるいは代用乳に添加して長期間経口投与することにより腸管粘膜を被覆することが報告されている [10]。今回、血清中総 IgY および抗クリプトスポリジウム IgY 濃度は、初乳投与群と2週投与群ともに生後1日目で高値を示したことから、初乳に添加して経口投与した製剤中の IgY が血液に移行したことが示された。また、IgY 製剤を初乳にのみ添加して経口投与した場合でも、糞便中総 IgY 濃度が生後10日目まで検出されていたことから、初乳とともに血液中に吸収された製剤中の IgY が腸管内に再移行することが示唆された。しかし、初乳投与群では、糞便中の抗クリプトスポリジウム IgY 濃度は生後5日目で検出限界まで低下しており、クリプトスポリジウム症の発症時期である7～11日目まで濃度を維持できなかった。

た。そのため IgY 製剤の初乳への添加のみでは、クリプトスポリジウム症の予防には不十分と考えられた。2 週投与群では、糞便中のオーシスト数を有意に減少させることはできたが、オーシストの排出を完全に止めることはできなかった。糞便中の抗クリプトスポリジウム IgY 濃度は、2 週間製剤を経口投与したにもかかわらず 7 日目以降急激に低下した。これはオーシストの排出が開始される時期と一致している。児玉ら [10] は、抗クリプトスポリジウム IgY は、クリプトスポリジウムのスポロゾイト表面 P23 糖タンパク質に結合して、スポロゾイトの腸管微絨毛への侵入を阻害し、クリプトスポリジウムの感染を防御すると報告している。今回の試験においても、クリプトスポリジウムのスポロゾイトに抗クリプトスポリジウム IgY が結合したものの、大量のスポロゾイトが存在したために、腸管内の総 IgY のうち抗クリプトスポリジウム IgY のみが急速に消費され、生後 7 日目以降、糞便中の濃度が急激に低下したと考えられた。今回、製剤の 2 週間投与でもクリプトスポリジウムオーシストの排出を止めることはできなかったが、初乳群と比較すると長期間にわたり糞便中の抗クリプトスポリジウム IgY 濃度を維持することができており、このことが OPG の減少につながったと考えられた。今後は、抗クリプトスポリジウム IgY の至適投与量について検討が必要である。以上のことから IgY 製剤はクリプトスポリジウム症の予防に有用である可能性が示唆された。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、本製剤のご提供および IgY 濃度を測定して頂いた株式会社イーダブルニュートリション・ジャパン様に深謝申し上げます。

引用文献

1. Merle EO et al. : Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle, Trends Parasitol, 20, 185-191 (2004)
2. Anderson BC : Cryptosporidiosis in bovine and human health, J Dairy Sci, 81, 3036-3041 (1998)
3. Barbee SL et al. : Inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocyst infectivity by disinfection and sterilization processes. Gastrointest Endosc, 49, 605-611 (1999)
4. Chauret CP et al. : Chlorine dioxide inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts and bacterial spore indicators. Appl Environ Microbiol, 67, 2993-3001 (2001)
5. Angus KW et al. : Evaluation of the effect of two aldehyde-based disinfectants on the infectivity of faecal cryptosporidia for mice. Res Vet Sci, 33, 379-381 (1982)
6. Campbell I et al. : Effect of disinfectants on survival of *Cryptosporidium* oocysts. Vet Rec, 111, 414-415 (1982)
7. 金子光美 : 水系感染症の発生とその対策技術, 環境技術, 32, 426-432 (2003)
8. Li X et al. : Effect of yolk and egg weights on yolk antibody (IgY) in laying chickens, Poultry Science, 77, 266-270 (1998)
9. 内田明彦, 他 : 図説 獣医寄生虫学, 改訂第 2 版, 278, メディカグローブ, 青森 (2008)
10. 児玉義勝, 他 : クリプトスポリジウム P23 糖タンパク抗原に対する機能性リベチン (Immunoglobulin Yolk : IgY) を用いた経口受動免疫の野外応用 臨床獣医, 32, 41-45 (2014)

Effect of an egg yolk immunoglobulin (IgY) product on oocyst shedding and blood and fecal IgY concentrations in *cryptosporidium*-infected calves

I. Nozaki¹⁾, M. Itoh^{1)†}, F. Murakoshi²⁾, T. Aoki¹⁾, K. Shibano³⁾, K. Yamada⁴⁾

1) Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine

2) Department of Infectious Diseases, Kyoto Prefectural University of Medicine

3) Faculty of Veterinary Medicine, Okayama University of Science

4) School of Veterinary Medicine, Azabu University

ABSTRACT Cryptosporidiosis causes watery diarrhea in calves younger than one month of age. There is no treatment for cryptosporidiosis, but an egg yolk immunoglobulin (IgY) product, which contains the anti-cryptosporidium IgY, has been developed to prevent the calf diarrhea. In this study, the effect of this product on cryptosporidiosis was examined. Twelve calves were divided into three groups: an untreated control group; a colostrum group (received 60 g of IgY mixed in the colostrum) and a 2-week treatment group (received 60 g of IgY in the colostrum and then 10 g/day of IgY mixed in milk for two weeks). During the 21-day study period, all calves were naturally infected with *Cryptosporidium parvum* and developed watery diarrhea. The mean number of oocysts per gram of feces was significantly lower in the 2-week treatment group than in the colostrum and control groups ($p < 0.05$). The total IgY and anti-cryptosporidium IgY concentrations in the serum and feces increased in both the colostrum and 2-week treatment groups, and the total fecal IgY concentration was significantly higher in the 2-week treatment group than in the colostrum group from day 5 to day 14 ($p < 0.05$). The fecal anti-cryptosporidium IgY concentration was significantly higher in the 2-week treatment group on day 5 and 7 than in the colostrum group ($p < 0.05$). Thus, oral administration of IgY for two weeks reduced oocyst shedding in cryptosporidium-infected calves, indicating that anti-cryptosporidium IgY may be useful for the prevention of cryptosporidiosis.

—Key Words : calves, *Cryptosporidium*, ELISA, immunoglobulin egg yolk, oocyst shedding

† Correspondence to : Megumi Itoh (Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)
11 Nishi-2sen, Inada-cho, Obihiro-shi, Hokkaido 080-8555, Japan
E-mail : itohmg@obihiro.ac.jp

.....Jpn. J. Large Anim. Clin. 10(2): 68-72, 2019