

牛歩誌

2016年

第44号

岡山県農業共済組合連合会
家畜診療技術研究会

鶏卵黄抗体 (IgY) の経口受動免疫による下痢症予防効果の検討

水戸 康明 富永 由香¹⁾

家畜課 ¹⁾ 真庭家畜診療所

要 約

黒毛和種子牛に、鶏卵黄抗体 (IgY) を用い経口受動免疫による感染性下痢の予防効果を検討した。出生後にIgY含有製剤60gを給与した群 (60g群: n=10) と出生後からIgY含有製剤を1日2回5gずつ6日間投与した群 (5g群: n=5) の2群と出生後初乳乳清100mLを給与した群 (初乳乳清群: n=4) を対照群とし比較した。糞便状態は2週後 (2w後) で60g投与群が初乳乳清群より異常便の発生率が有意に低かった。病原体検査は2w後で5g、60g投与群が初乳乳清群よりクリプトスポリジウム (CR) の検出率が有意に低かった。IgYは病原体に対する受動免疫を付与することができ、感染性下痢の発症予防に有効と考えられた。

【キーワード: クリプトスポリジウム、下痢症、受動免疫、初乳、鶏卵黄抗体 (IgY)】

子牛の下痢症は、農場で頻繁に遭遇する病気のひとつである。下痢の原因は大きく感染性と非感染性に分けられているが、複数の因子が関与して発症していることが多い¹⁾。感染性の下痢症は、病原体によって発症時期に違いが見られるが、多くの病原体 (ロタウイルス、コロナウイルス、K99線毛抗原陽性大腸菌、クリプトスポリジウムなど) は生後30日齢以内に発症することが多い¹⁻³⁾。これは子牛の免疫応答能が未熟なためと考えられる。特に生後8日齢未満の新生子牛は腎臓機能も未熟であることから、重度の脱水に陥りやすく重篤になりやすい。そのため、子牛の下痢症において出生直後の子牛における下痢予防対策は重要であり、予防には様々な対策が講じられている。

牛は胎子期に胎盤を介して子牛へのグロブリンの移行がなく、出生後、初乳を摂取することによりグロブリンが血中に移行する。血中に移行したグロブリンは全身性の感染症を

防御するとともに一部は再度腸管に再分泌されることにより腸管内の感染症も防御する⁴⁾ (移行免疫)。また、乳汁中に含まれるグロブリンは腸管内をコーティングすることにより病原体を中和、付着阻止することにより腸管局所の感染防御に働く (乳汁免疫)。そのため、新生子牛の疾病予防には適切な初乳の給与による受動免疫が重要とされている。初乳の給与が適切に行われないと受動免疫移行不全となり疾病の罹患率や死亡率が増加することが知られている。

母子免疫を含む受動免疫を利用した下痢症対策として、母牛への下痢症に対するワクチン注射⁵⁻⁸⁾、免疫初乳の連続給与⁹⁾、代用初乳や初乳サプリメントの給与¹⁰⁻¹³⁾が行われているが、それぞれにメリットやデメリットがある。母牛へのワクチン注射は、母牛に免疫することにより初乳を介して子牛に病原体に対する特異的な免疫を付与することができる。しかしながら、母牛の初乳は個体ごとに

に乳量やグロブリン含有量にばらつきがみられること、生の初乳を摂取すれば白血病など他の感染症に感染する可能性も考えられる。また、初乳中のグロブリン含有量は生後2から3日で急激に低下することから、以降の乳汁免疫はあまり期待できない。初乳の連続給与は、冷凍庫など保存スペースが必要になること、繁殖和牛農家では初乳の確保がむずかしいことがあげられる。代用初乳や初乳サプリメントの活用については、他の対策に挙げられるような品質のばらつきなどは少ないと思われるが、初乳を原材料に使うことが多くコストがかかる。

そこで、今回、低コストで生産でき、さまざまな病原体に対する特異抗体を含む鶏の卵黄内に含まれるグロブリン (IgY) を経口投与することにより受動免疫を行い、下痢症予防効果について検討した。

材料および方法

試験1 (IgY体内動態調査) : 2014年7月から2015年3月に繁殖和牛飼育農場1農場で出生した黒毛和種子牛10頭を用いた。出生後6時間以内に代用初乳と同時にIgY含有製剤60gを投与し0~30日齢の間に1頭あたり3~4回、血液および糞便を採取し、血清中および糞便中のIgY濃度をELISA法にて測定した。

試験2 (IgY含有製剤の下痢症予防効果および投与方法の検討) : 2014年5月から2015年3月に試験1と同じ農場で出生した黒毛和種子牛を用いた。出生後6時間以内に代用初乳とIgY含有製剤60gを同時投与した群 (60g × 1回群 : n=10) と、出生後からIgY含有製剤を1日2回5gずつ6日間投与した群 (5g × 12回群 : n=5) の2群と出生後6時間以内に代用初乳と初乳乳清製剤を同時投与した群 (初乳乳清群 : n=4) を対照群として比較した。生後5日以内、2w後、4週後 (4w後)

に糞便採取、生後5日以内に採血を実施した。採材時に糞便の状態を確認し、血清はELISA法によるIgY濃度測定と抗体検査 (クリプトスポリジウム : P23抗原)、糞便は病原体の検出及びELISA法によるIgY濃度測定と抗体検査 (クリプトスポリジウム : P23抗原) を実施した。今回試験に使用したIgY含有製剤 (キャナルパウダープラス、共立製薬) のIgY含量および1g中に含まれる病原体に対する抗体価を表1に示す。

表1 IgY含有製剤に含まれる抗体の種類

K99線毛抗原保有腸管毒素原性大腸菌
サルモネラ・ダブリン
サルモネラ・ティフィムリウム
クロストリジウム・パーフリンゲンス
ウシロタウイルスG6血清型
ウシロタウイルスG10血清型
ウシコロナウイルス
クリプトスポリジウム・パルバム

備考 : 8種類の抗体ごとに抗体価の規格を設定した製剤

成績

試験1 : IgYの体内動態

出生後から日齢を経るごとに低下したが、生後18日齢までIgYが血中から検出された。糞便中からは10日齢まで、IgYが検出された (表2)。

表2 新生子牛経口投与時のIgY体内動態

	投与後週齢			
	0週齢 (0~7日齢)	1週齢 (8~14日齢)	2週齢 (15~21日齢)	4週齢
血清中 IgY濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	21.67 \pm 24.43	2.12 \pm 0.95	0.68 \pm 0.52	全頭 検出限界以下
糞便中 IgY濃度 ($\mu\text{g/g}$)	10.59 \pm 16.32	0.49 \pm 0.70	全頭 検出限界以下	全頭 検出限界以下

平均値 \pm 標準偏差 検出限界以下 : 血清中IgY < 0.156 $\mu\text{g/mL}$
糞便中IgY < 0.032 $\mu\text{g/g}$

試験2：IgY含有製剤の下痢症予防効果および投与方法の検討

試験群にて脱水や水様性下痢など重度の臨床症状を呈した牛はおらず、試験採材時の糞便の状態、粘液便や軟便から軽度の下痢を呈したものを異常便の排泄陽性とした。2w後で、初乳乳清群が60g×1回群より異常便陽性の割合が有意に高く、異常便からは主にクリプトスポリジウムが検出された。(表3)

表3 採材時の糞便状態

群	採材時期		
	出生後	2w後	4w後
lgY5g×12回	0/5	2/5 (K99大腸菌、 クリプトスポリジウム)	0/5
lgY60g×1回	0/10	1/10 ^a (なし)	2/10 (クリプトスポリジウム)
初乳乳清	0/4	4/4 ^b (クリプトスポリジウム)	1/4 (クリプトスポリジウム)

(粘液便、軟便～下痢陽性頭数/試験頭数) ()内は異常便の検出病原体
ab群間:P<0.01

糞便の病原体検出検査の結果で、ロタウイルスは60g×1回群の2w後から1例のみ検出された。クリプトスポリジウムは2w後と4w後にすべての群で検出された。2w後で5g×12回群と60g×1回群は初乳乳清群と比べて検出率が有意に低い値であった。K99線毛抗原陽性大腸菌は5g×12回群と60g×1回群で検出された。サルモネラは全例陰性であった(表4)。クリプトスポリジウムは定量検査の結果においても、2w後で60g×1回群のほうが初乳乳清群より有意に低い値であった(図1)。

表4 糞便中の病原体検査結果

群	採材時期	Rota virus	Cryptosporidium	K99 E.coli	Salmonella
lgY 5g×12回	出生後	0/5	0/5	1/5	0/5
	2w後	0/5	1/5 ^a	1/5	0/5
	4w後	0/4	1/4	0/4	0/4
lgY 60g×1回	出生後	0/10	0/10	2/10	0/10
	2w後	1/10	2/10 ^b	0/10	0/10
	4w後	0/10	7/10	2/10	0/10
初乳乳清	出生後	0/4	0/4 ^c	0/4	0/4
	2w後	0/4	4/4	0/4	0/4
	4w後	0/4	4/4	0/4	0/4

ab,ac群間P<0.05

陽性頭数/試験頭数

Log10 oocyst/g

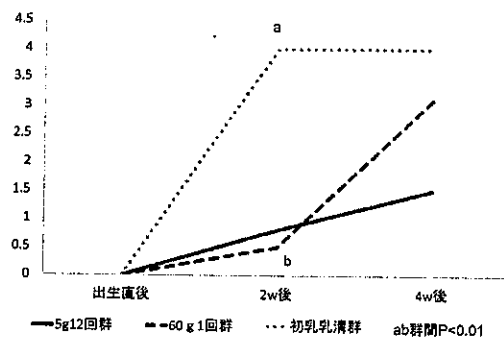


図1 糞便中のクリプトスポリジウム定量検査

出生後1～5日齢におけるIgY濃度は、血清中で60g×1回群が5g×12回群より高い値であり、糞便中では5g×12回群が60g×1回群より高い値であった。初乳乳清群からは血清中、糞便中ともにIgYは検出されなかった。抗Cryptosporidium P23のELISA値についてもIgY濃度と同様の傾向を示した(図2, 3)。

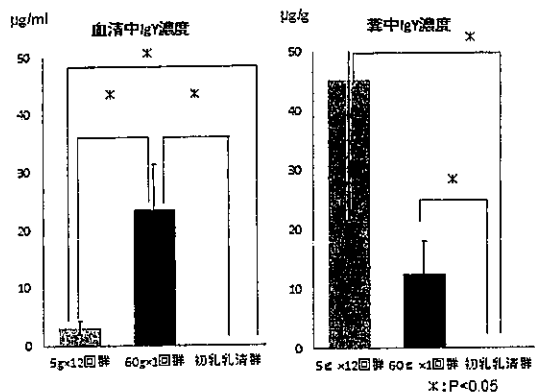


図2 給与方法による血中及び糞便中の総IgY濃度比較 (出生後1～5日齢)

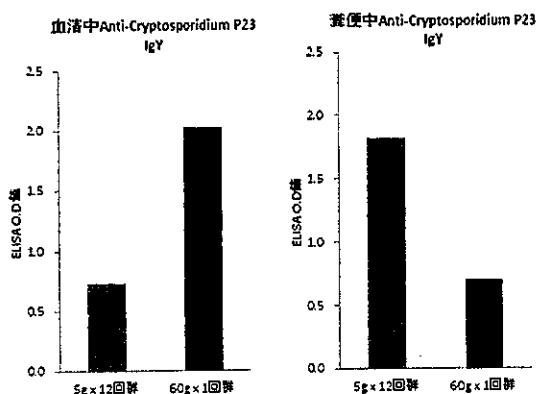


図3 給与方法による血中及び糞便中のAnti-Cryptosporidium P23 IgY ELISA値の比較

考 察

IgYは鶏の卵の卵黄に含まれる抗体である。鶏に牛の下痢を引き起こす病原体を抗原として注射すると、鶏の体内に病原体に対する特異的な抗体が産生され、この抗体が卵黄内に移行する¹⁴⁾。この卵を粉末化したものを利用している。鶏は大量飼育が可能で飼育コストが安く、1羽当たり年間約300個の卵を産卵し、採血の必要もないことから低コストで特異抗体を得ることができる¹⁵⁾。また、抗原を変えることにより様々な病原体にも対応することができる。攻撃試験を実施した結果、ロタウイルス、コロナウイルス、K99線毛抗原保有腸管毒素原性大腸菌、*Salmonella*

Typhimurium、*Salmonella Dublin*に対する特異IgYを新生子牛に経口投与することで、死亡率の低下や臨床症状の軽減などの受動免疫効果が確認されている¹⁶⁻²⁰⁾。

IgY含有製剤を出生直後に投与すると、血中からも糞便からもIgYは検出された。IgGと同様に、IgYも出生直後に腸管から子牛の血中に移行することが確認された。糞便には最長で10日齢までIgYが検出された。出生後7日齢の子牛へIgYを投与した場合、投与後6時間で盲腸から結腸に移行することが報告されており²¹⁾、投与したIgYが消化管内を通過して検出されたと考えるよりは、血中に移行したIgYが再び腸管腔に分泌されている可能性が高いと考えられた。

試験2における糞便検査にてK99線毛抗原陽性大腸菌が検出された個体は、1例のみ軽度の下痢を呈していたが、他の検体では臨床症状を伴わず、ロタウイルスも同様に検出されたが臨床症状を伴っていないことから不顕性に感染していたものと考えられた。今回の試験において、クリプトスポリジウムは検出率が高く、軽度ではあるが臨床症状を呈した個体からも検出されており、下痢の原因であると考えられた。IgYの経口投与によってクリプトスポリジウムによる異常便の発症や排出を抑える効果を確認した。クリプトスポリジウムによる下痢症は、生後2週齢以内に発症することが多く、ロタウイルスなど他の病原体と複合感染し、重篤化すると著しい脱水と代謝性アシドーシスを引き起こす²²⁻²⁶⁾。牛だけでなく人にも感染することから、公衆衛生上も重要な病気であるが、現在のところ有効な治療薬あるいはワクチンが開発されていないことから、対応に苦慮する病気である²⁷⁾。IgY含有製剤はクリプトスポリジウムによる腸粘膜細胞への付着侵入に関与するとされている共通糖タンパクP23に対する抗体が

含まれている^{28, 29)}。経口投与することにより、抗P23IgYが子牛の血清中や糞便中にも検出されたことから、この抗体がクリプトスポリジウムの腸粘膜細胞への付着侵入を阻害し、異常便を予防しているものと考えられた。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が培養細胞へ付着するのを阻害し、発育を阻止する。攻撃試験において免疫不全マウスに抗クリプトスポリジウムIgYを投与すると糞便中のクリプトスポリジウムオーシストが減少することが報告されている³⁰⁾。今回の試験結果から、哺乳子牛においてもIgY投与によってクリプトスポリジウム症を予防できる可能性が示唆された。

投与方法については、60g×1回群で、IgYが血中に移行することが確認され、投与して10日後まで糞便中にもIgYが検出されており、初乳と同時に大量にIgYを投与することにより、牛の抗体であるIgGと同様にIgYが腸管内から血中に移行し、これらの一部が再度腸管内に移行し予防効果が得られると考えられた。5g×12回群では、定期的にIgYを長期間給与することにより、腸管内をIgYでコーティングし病原体の中和や付着阻止に働き、移行抗体よりむしろ乳汁免疫の効果により予防効果が得られると考えられた。初乳中の抗体は、分娩後2～3日で急激に低下することから、これに伴い乳汁免疫の効果も急激に低下するので、IgYの投与は、母乳の乳汁免疫を補強することができ、下痢症予防に効果的な投与方法であると考えられる。ただし、母子同居で母牛に哺乳をさせている子牛に定期的にIgYを投与することは現実的に難しいことから、出生直後に大量にIgYを投与することにより移行免疫を補強する方法も下痢症予防の一つの手段となると考えられる。具体的には飼養管理状況や下痢の発症状況が農場によって様々であることから、農場ごとに

IgYの投与方法は検討が必要になると思われるが、今回の試験結果や今までの報告から、出生後2週間から4週間、1日5gから10gを2～3回、経口投与すると効果が高いと思われる。

最後になりましたが、試験にご協力いただいた大阪市立大学大学院医学研究科の寺本先生、EWNJの梅田先生及び共立製薬の皆様には深謝します。

引用文献

- 1) 酒井淳一：子牛の下痢症，新版主要症状を基礎にした牛の臨床，デーリイマン社，札幌（2002）
- 2) 末吉益雄：総論 黒毛和種子牛の下痢症について，臨床獣医，30，10-14(2012)
- 3) 高橋史：集団管理における子牛下痢症の予防対策，臨床獣医，31，44-49(2013)
- 4) Besser T, Mcguire T, Gay C *et al* : Transfer of Functional Immunoglobulin G (IgG) Antibody into the Gastrointestinal Tract Accounts for IgG Clearance in Calves, *J Virol*, 62, 2234-2237(1988)
- 5) 関慶久，大池裕治，清宮幸男ら：ワクチンによる新生子牛のA群ロタウイルス病予防，日獣会誌，58，602-606(2005)
- 6) 小原潤子：ワクチネーションによる子牛下痢症のコントロールと野外応用例，日本家畜臨床感染症研究会誌，2，17-27(2007)
- 7) 岡田伸隆：母牛へのワクチネーションによる子牛下痢症に対する効果の実際，日本家畜臨床感染症研究会誌，4，61-66(2009)
- 8) Ohashi S, Shiba F, Haga Y *et al* : Passive Immunizing Effect of Neonatal Calves by Vaccinating Dams with Escherichiacoli Bacterin Containing K99 Antigen against Experimental colibacillosis, *日獣畜大研報*, 3, 40-49 (1990)

- 9) Tsunemitsu H, Shimizu M, Hirai T *et al*: Protection against Bovine Rotavirus in Newborn Calves by Continuous Feeding of Immune Colostrum, *Jpn J Vet Sci*, 51, 300-308 (1989)
- 10) 上田茂樹, 橋本幸昌, 岡田大志ら: 虚弱子牛に対する牛初乳粉末製品の投与効果, *家畜診療*, 49, 515-520 (2002)
- 11) 小森学, 安本守宏, 羽生英樹ら: ホルスタイン種初産牛の子牛に対する粉末初乳製剤併用給与が移行抗体獲得に及ぼす効果, *家畜診療*, 56, 425-430 (2009)
- 12) 福島護之, 木伏雅彦, 坂瀬充洋ら: 黒毛和種母牛産次別子牛血中免疫グロブリン濃度と自然哺乳子牛へ凍結初乳又は粉末初乳を補助的に給与した場合の免疫補強効果, *兵庫農技総七研報*, 406-10 (2004)
- 13) Berge A, Besser T, Moore D *et al*: Evaluation of the effects of oral colostrum supplementation during the first fourteen days on the health and performance of preweaned calves, *J Dairy Sci*, 92, 286-295 (2009)
- 14) 中川和憲, 川端俊一郎, 居石克夫: ニワトリを用いた抗体の作製法, *血栓止血誌*, 9, 435-439 (1998)
- 15) 八田一: 検査薬や疾病予防への鶏卵卵黄抗体の利用, *オレオサイエンス*, 11, 147-153 (2011)
- 16) Ikemori Y, Kuroki M, Peralta RC *et al*: Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hen immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Am J Vet Res*, 53, 2005-2008 (1992)
- 17) Yokoyama H, Peralta RC, Umeda K *et al*: Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies, *AJVR*, 59, 416-420 (1998)
- 18) Kuroki M, Ohata M, Ikemori Y *et al*: Passive protection against bovine rotavirus in calves by specific immunoglobulins from chicken egg yolk, *Arch Virol*, 138, 143-148 (1994)
- 19) Ikemori Y, Ohata M, Umeda K *et al*: Passive protection of neonatal calves against bovine coronavirus-induced diarrhea by administration of egg yolk or colostrum antibody powder, *Vet Microbiol*, 58, 105-111 (1997)
- 20) Vega C, Bok M, Chacana P *et al*: Egg Yolk IgY, Protection against Rotavirus induced Diarrhea and Modulatory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves, *Vet Immunol Immunopathol*, 142, 156-169 (2011)
- 21) Ikemori Y, Ohta M, Umeda K *et al*: Passage of Chicken Egg Yolk Antibody Treated with Hydroxypropyl Methylcellulose Phthalate in the Gastrointestinal Tract of Calves, *J Vet Med Sci*, 58, 365-367 (1996)
- 22) 小岩政照, 坂田貴洋, 志賀御幸ら: クリプトスポリジウム下痢症子牛の重症例の病態と治療, *臨床獣医*, 21, 42-45 (2003)
- 23) 杉本圭祐, 佐藤雅彦, 松田賢史: クリプトスポリジウム感染症における枯草菌製剤による治療, *家畜診療*, 52, 715-720 (2005)
- 24) 黒瀬智泰: 管内一酪農家における子牛クリプトスポリジウム症の発生状況分析と対策, *家畜診療*, 59, 491-496 (2012)
- 25) 松林誠: 牛のクリプトスポリジウム症, *臨床獣医*, 33, 12-15 (2015)
- 26) Ichikawa-Seki M, Aita J, Suzuki M *et al*: Molecular characterization of

Cryptosporidium parvum from two different Japanese prefectures, Okinawa and Hokkaido. *Parasitol Int*, 64, 161–166 (2015)

27) 黒木俊郎, 泉山信司, 遠藤卓郎: クリプトスポリジウムの最近の知見, *モダンメディア*, 51, 75–80 (2005)

28) 兎玉義勝, ラハマシ・シヨフィクル, 梅田浩二ら: 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)

29) Omidian Z, Ebrahimzadeh E, Shahbazi P *et al*: Application of recombinant *Cryptosporidium parvum* P23 for isolation and prevention, *Parasitol Res*, 113, 229–237 (2014)

30) Chizu Kobayashi, Hideaki Yokoyama, Sa Van Nguyen *et al*: Effect of egg yolk antibody on experimental *Cryptosporidium parvum* infection in scid maize, *Vaccine*, 23, 232–235 (2004)