

哺乳子牛における鶏卵黄抗体(IgY)を用いた下痢症予防対策

▼岡山県農業共済組合 家畜課

水戸康明

▼岡山県農業共済組合 真庭家畜診療所

富永由香

▼大阪市立大学大学院医学研究科 寄生虫学

寺本 勲

▼共立製薬(株)

藤井岳人

▼(株)イーダブルニュートリション・ジャパン

梅田浩二

はじめに

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。

感染性下痢症は、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, 2, 3)}。これは子牛の免疫応答能や消化機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、重篤になれば死亡にいたる。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となる。

初乳を介した母子免疫および受動免疫を利用した下痢症対策

感染性下痢症の予防には様々な対策が講じられているが、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、付着阻止することで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, 6, 7, 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, 11, 12, 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乳量やグロブリン含有量にバラツキがみられることや、生の初乳を摂取すれば牛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2~3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。さらに、初乳の連続給与は、冷凍庫などの保存スペースが必要になり、繁殖和牛農家では初乳の確保が難しいなどが挙げられる。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バラツキ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、様々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(Immunoglobulin Yolk : IgY)を経口投与することにより受動

【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

【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
血清中総 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
糞便中総 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

出生後、初回の人工初乳投与時に鶏卵黄抗体(IgY)含有製剤 60 g 1 回投与した子牛における IgY 濃度の経時的推移
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 $\mu\text{g/g}$

免疫を行い、下痢症の予防効果について検討した。

IgY について

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⁾。今回の試験に使用した市販 IgY 含有製剤は、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, 17, 18, 19, 20)}。今回試験に使用した市販 IgY 含有製剤に含まれる病原体に対する特異抗体の種類を表-1 に示す。

IgY の体内動態

新生子牛へ出生直後に IgY を投与した際の、IgY の体内動態調査のために、以下の試験を行った。母牛の初乳を摂取していない出生直後の黒毛和種子牛 10 頭に、代用初乳投与時に卵黄粉末を 70% 含有する IgY 含有製剤 60 g を同時に投与し、0～30 日齢の間に 1 頭につき 3～4 回、血液および糞便を採取した。採取した検体は ELISA 法にて総 IgY 濃度を測定した。1 日齢から 18 日齢まで IgY が血中

から検出され、IgG と同様に、IgY も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(表-2)。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動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。

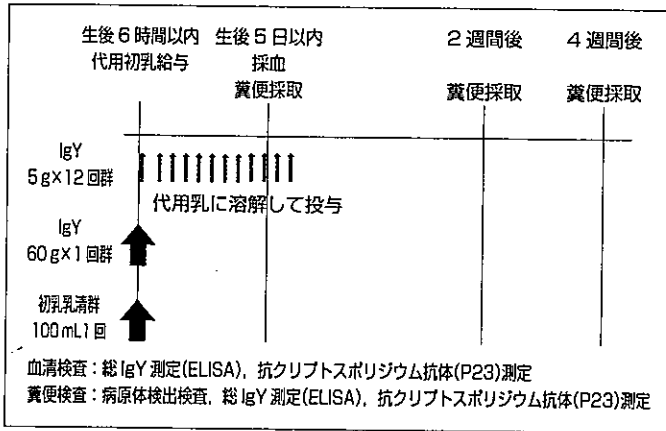
IgY 含有製剤の下痢症予防効果 および投与方法の検討

1. 試験方法(図-1)

IgY 体内動態の確認試験より、IgY を新生子牛へ投与すると IgY が血中へ移行し糞便中にも検出されたことから、野外の農場で下痢症の予防効果と投与方法を検討した。試験には母牛の初乳を摂取していない出生直後の黒毛和種子牛を用いた。出生直後から代用初乳とともに IgY 含有製剤 5 g を 1 日 2 回 6 日間、計 12 回投与した群を 5 頭【5 g \times 12 回群】、初回の代用初乳投与時に IgY 含有製剤 60 g を 1 回投与した群を 10 頭【60 g \times 1 回群】、対照群として、初回の代用初乳投与時に牛初乳乳清製剤 100 mL を投与した群を 4 頭【初乳乳清群】を設定した。生後 5 日以内、2 週間後、4 週間後に糞便の採取、生後 5 日以内に採血を実施した。採血した血液の血清を用いて、ELISA 法による総 IgY 濃度測定と抗クリプトスポリジウム抗体(P23)に対する抗体検査を行い、糞便については、病原体検出検査と ELISA 法による総 IgY 濃度測定と抗クリプトスポリジウム抗体(P23)に対する抗体検査を実施した。

2. 試験結果

試験群にて、脱水や水様性下痢など重度の臨床症状を呈



【図-1】 試験スケジュール

【表-3】 採材時の糞便の性状

群	採材時期		
	出生後	2週間後	4週間後
IgY 5g × 12回	0/5	2/5 (K99大腸菌, クリプトスポリジウム)	0/5
IgY 60g × 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。()内は異常便の病原体
ab 群間: P<0.01

した牛はならず、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。2週間後で、【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)。

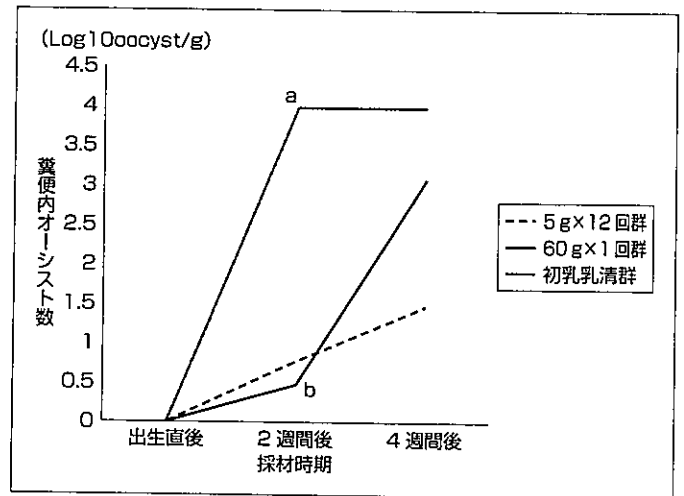
糞便の病原体検出検査結果を表-4に示した。ロタウイルスは【60g×1回群】の2週間後から1例のみ検出された。K99線毛抗原陽性大腸菌は【5g×12回群】と【60g×1回群】で検出された。サルモネラは全例陰性であった。クリプトスポリジウムでは2週間後と4週間後にすべての群で検出されたが、IgY含有製剤を投与した群の検出率は低く、2週間後で【5g×12回群】および【60g×1回群】ともに【初乳乳清群】と比べて有意な差を認めた。また、クリプトスポリジウム定量検査の結果においても、2週間後で【60g×1回群】の方が【初乳乳清群】より有意に低い値であった(図-2)。

IgY 検出結果は以下のとおりであった。生後1～5日齢における総IgY濃度は、血清中は【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(図-3)。加えて、

【表-4】 糞便中の病原体検査結果

群	採材時期	ロタウイルス	クリプトスポリジウム	K99大腸菌	サルモネラ
IgY 5g × 12回	出生後	0/5	0/5	1/5	0/5
	2週間後	0/5	1/5 ^a	1/5	0/5
	4週間後	0/4	1/4	0/4	0/4
IgY 60g × 1回	出生後	0/10	0/10	2/10	0/10
	2週間後	1/10	2/10 ^b	0/10	0/10
	4週間後	0/10	7/10	2/10	0/10
初乳乳清	出生後	0/4	0/4	0/4	0/4
	2週間後	0/4	4/4 ^a	0/4	0/4
	4週間後	0/4	4/4	0/4	0/4

陽性頭数 / 試験頭数。ac, bc 群間: P<0.05



ab 群間 P<0.01

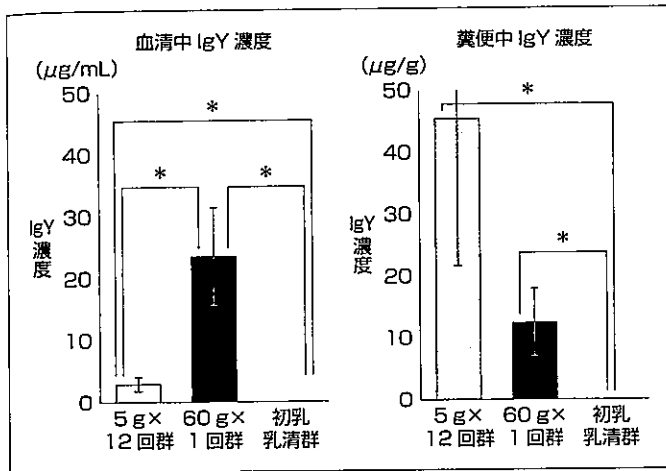
【図-2】 クリプトスポリジウムの定量検査結果

抗 *Cryptosporidium* P23 IgY の ELISA 値についても総 IgY 濃度と同様の傾向を示した(図-4)。【初乳乳清群】の血清および糞便検体から IgY は検出されなかった。

3. 考察

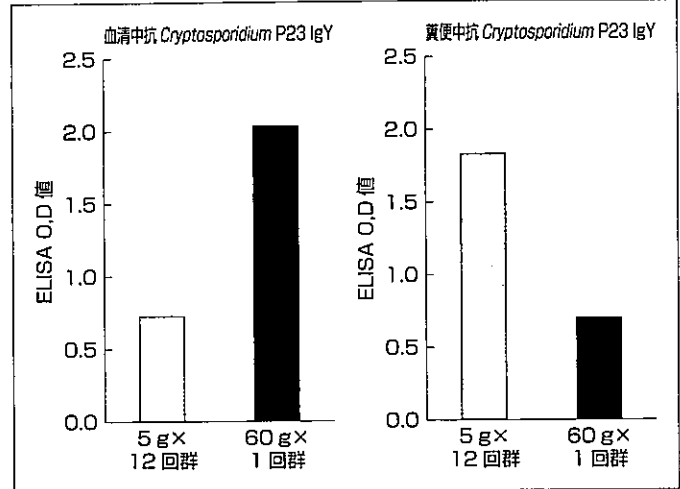
今回試験を実施した生産農場の供試子牛において、クリプトスポリジウムの検出率が高く、軽度ではあるが臨床症状を呈した個体からも検出されており、下痢の主要原因であると考えられた。K99線毛抗原陽性大腸菌が検出された個体は、1例のみ軽度の下痢を呈していたが、他の検体では臨床症状を伴わず、ロタウイルスも同様に検出されたが臨床症状を伴っていないことから不顕性に感染していたものと考えられた。

クリプトスポリジウムによる下痢症は、生後2週齢以内



* P<0.05

【図-3】 給与方法による血中および糞便中の総IgY濃度比較(出生後1~5日齢)



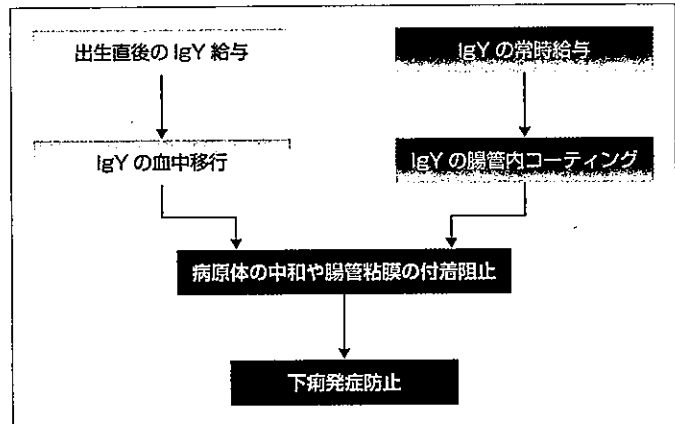
【図-4】 給与方法による血中および糞便中の抗Cryptosporidium P23 IgY ELISA値の比較(出生後1~5日齢)

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, 23, 24, 25, 26})。牛だけでなくヒト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ために対応に苦慮する病気である²⁷)。本試験に用いたIgY含有製剤には、クリプトスポリジウムが腸粘膜細胞に付着時と侵入時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おり、*in vitro* 試験にて付着侵入阻害効果などが報告されている^{28, 29})。今回の試験結果より、本IgY含有製剤を出生直後に経口投与したところ、抗Cryptosporidium P23 IgYが子牛の血清中や糞便中にも検出され、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、クリプトスポリジウム症による下痢を予防したことが示唆された。

また、【60g x 1回群】および【5g x 12回群】ともに下痢発症予防効果が認められたが、投与方法の違いによるIgYの作用機序は次のように考える。

【60g x 1回群】は、IgYが血中に多く移行することが確認され、投与して10日後程度まで糞便中からもIgYが検出されており、初乳と同時に大量にIgYを投与することで、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、主として移行免疫により予防効果が得られると考えられた。

一方【5g x 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



【図-5】 IgYの下痢発症予防機序

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の定期的な長期間投与は、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、下痢症予防のひとつの手段となると考えられる(図-5)。

推奨する具体的な給与方法は、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2~4週間、1日5~10gを2~3回、経口投与すると効果が高いと思われる。

まとめ

- ①クリプトスポリジウムは駆虫効果を示す薬剤や有効なワクチンが開発されておらず、対応に苦慮する病気であるが、今回の試験結果からIgY含有製剤はクリプトスポリジウム症の予防に効果がある可能性が示唆された。
- ②今回の試験に使用したIgY含有製剤と初乳乳清の値段を比較すると、コストは初乳乳清と比べて1/4～1/5であり、農場では低コストであることもメリットのひとつであると思われる。
- ③今回使用したIgY含有製剤は8種類の病原体に対する特異抗体が含まれており、経口投与することにより受動免疫を付与でき、ウイルスの中和や原虫、細菌の腸管への付着阻止に働くことから、哺乳子牛(特に生後30日齢未満の哺乳子牛)における感染性下痢症の予防に有用であると考えられた。

参考文献

- 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)，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(1)，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(7), 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(9)，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(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(2)，61～66(2009)
- 8) Ohashi S., Shiba F., Haga Y., et al. : Passive Immunizing Effect of Neonatal Calves by Vaccinating Dams with *Escherichia coli* Bacterin Containing K99 Antigen against Experimental colibacillosis, 日獣大研報，39, 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(2), 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(8)，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(7)，425～430(2009)
- 12) 福島謙之，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，兵庫農技総セ研報，40，6～10(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(1), 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(6)，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(5)，147～153(2011)
- 16) Ikemori Y., Kuroki M., Peralta R. C., 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(11), 2005～2008(1992)
- 17) Yokoyama H., Peralta R. C., Umeda K., et al. : Prevention of fatal salmonellosis in neonatal calves, using orally administered chicken egg yolk *Salmonella*-specific antibodies, AJVR, 59(4), 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(1-2), 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(2-4), 105～111(1997)
- 20) Vega C., Bok M., Chacana P., et al. : Egg Yolk IgY: Protection against Rotavirus induced Diarrhea and Modulagory effect on the systemic and mucosal antibody responses in newborn calves, Vet Immunol Immunopathol, 142(3-4), 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(4), 365～367(1996)
- 22) 小岩政昭，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(7)，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，510，715～720(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，590，491～496(2012)
- 25) 松林 誠：牛のクリプトスポリジウム症，臨床獣医，33(3)，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(2), 161～166(2015)
- 27) 黒木俊郎，泉山信司，逸藤卓郎：クリプトスポリジウムの最近の知見，モダンメディア，51(4)，75～80(2005)
- 28) 児玉義勝，ラハマン・ショフィクル，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(8)，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(1), 229～237(2014)