

2024 年度臨床研究推進研究費報告書

申請年月日:2025 年 4 月 1 日

代表者	氏名	今内 覚	所属	感染症学教室
	内線	5274	e-mail	konnai@vetmed.hokudai.ac.jp
研究課題	抗生剤に頼らないプロバイオティクスによる動物の疾病予防効果の検証			
研究チーム参加者	氏名	所属		役割
	今内 覚	感染症学教室		研究の統括、臨床研究の実施
	岡川朋弘	感染症学教室		免疫学的解析
	片桐成二	繁殖学教室		臨床研究実施の助言
	柳川洋二郎	繁殖学教室		臨床研究実施の助言
研究期間	2024 年 6 月 ~ 2025 年 3 月			
研究目的と成果の概要 (400 字以内)	酪農の現場では、仔牛において感染症を原因とする肺炎や腸炎が死因の約 6 割以上を占めており、大きな経済損失に繋がっている。仔牛は生後 1 ヶ月ほどから抗生物質の代わりに様々なワクチンを順番に接種されているが、既存のワクチンでは仔牛の感染症を防御できない場合もある。我々は、環境負荷を低減しつつ、乳牛の健康維持による酪農業の生産性の向上や畜産業の発展という観点で、ワクチンの効果を増強するプロバイオティクス（いわゆる「善玉菌」の効果）の研究を進めてきた。さらに、この下痢症予防効果は、プロバイオティクスによる牛での自然免疫の賦活が関与していることも明らかにした。そこで本研究では、健康な子牛の育成や酪農業の生産性向上、環境負荷を軽減した食料生産システムの確立に貢献することを目標として、ワクチンを増強するプロバイオティクスの効果を検証した。			

研究方法、結果、考察、成果の公表（上記書式、図表を含めて 3 ページ以内に纏めて下さい）

【方法】

1. 子牛に対するプロバイオティクスの給与とワクチン接種

子牛（ホルスタイン、オス、2 週齢）を 3 群（A 群：20 頭、B 群：18 頭、C 群：19 頭）に分け、A 群に対して陰性対照飼料（組成：米ぬか油かす 71.5%、ゼオライト 28.5%）、B 群に対して酪酸菌添加飼料（組成：米ぬか油かす 71.5%、ゼオライト 28.5%、酪酸菌株 10¹¹ 個/kg）、C 群に対して生菌入り混合飼料（商品名：ゼオサポ KB、組成：米ぬか油かす 71.5%、ゼオライト 28.5%、酪酸菌株 10⁹ 個/kg、乳酸菌株 10⁹ 個/kg、枯草菌株 10⁹ 個/kg）を毎日 30g ずつ、試験終了まで継続して給餌した。B 群の子牛は、一頭あたり約 3×10⁹ 個/日の酪酸菌株を毎日給与された。C 群の子牛は、一頭あたり約 3×10⁷ 個/日ずつの酪酸菌株、乳酸菌株、枯草菌株を毎日給与された。そして、これらの飼料の給与開始から 4 週間および 8 週後に混合弱毒ウイルス生ワクチンを筋肉内接種した。

2. 子牛の末梢血単核球の分離と培養

3 群の子牛から血液を採取し、密度勾配遠心法により末梢血単核球（PBMC）を分離した。PBMC を RPMI-1640 培地（10% FBS, 抗生物質, L-グルタミン含有）に懸濁し、96 穴プレートに播種して、抗原刺激なしの条件、あるいは、ワクチンに含まれるウシ RS ウイルス（BRV）、または牛ウイルス性下痢ウイルス 1 型（BVDV-1）の UV 不活化抗原で刺激した条件において、37°C、5% CO₂ で 5 日間培養した。

【結果】

1. ワクチン抗原に対する細胞性免疫応答の解析

上述の通り、ワクチン抗原刺激下で培養した PBMC において、T 細胞マーカーである CD3, CD4, CD8 ならびにリンパ球活性化マーカーである CD25, CD69 を蛍光標識抗体を用いて染色し、フローサイトメトリー法により CD25 ならびに CD69 を発現した活性化 T 細胞の割合を測定した。その結果、酪酸菌給与群 (B 群) および生菌入り混合飼料給与群 (C 群) において、陰性対照群 (A 群) と比べて BRSV ならびに BVDV-1 刺激に対して反応した CD25⁺CD69⁺CD4⁺ T 細胞の割合が増加しており、特に CD25 の発現上昇が顕著に認められた。さらに、PBMC の培養上清における Th1 サイトカイン (IFN- γ および TNF- α) の産生量を ELISA で測定したところ、酪酸菌給与群では IFN- γ および TNF- α の産生量が増加した。これらの結果より、子牛への酪酸菌を含むプロバイオティクスの給与により、ワクチンに対する CD4⁺ T 細胞応答ならびに Th1 応答が増強されることが示された。

2. 酪酸菌給与による子牛の体重増加および呼吸器感染症罹患への影響

各群のすべての子牛について、試験開始時点および試験終了時 (5 ヶ月後) における体重を測定したところ、酪酸菌給与群 (B 群) ならびに生菌入り混合飼料給与群 (C 群) においては、陰性対照群 (A 群) と比べて体重の増加率が高く、酪酸菌を含むプロバイオティクスの給与による増体促進作用が認められた。さらに、試験期間中において臨床症状を示す肺炎により治療した回数を調べたところ、陰性対照群 (A 群, 20 頭) は 10 回、酪酸菌給与群 (B 群, 18 頭) は 4 回、生菌入り混合飼料給与群 (C 群, 19 頭) は 6 回であり、特に酪酸菌給与群 (B 群) において他の群よりも肺炎による治療回数が少ない傾向が認められた。この結果より、子牛への酪酸菌を含むプロバイオティクスの給与により、臨床症状を呈する肺炎の発生回数が低減したことが示唆された。

【考察】

本実証試験により、酪酸菌の給与が子牛のワクチンに対する免疫応答を増強する効果を及ぼすことを発見し、酪酸菌の新たな用途を見出した。具体的には、酪酸菌を含む飼料を給与した子牛に弱毒ウイルス生ワクチンを接種し、接種したワクチン抗原に対する免疫応答を解析したところ、酪酸菌給与子牛において、ワクチン抗原に対して反応し活性化した CD4⁺ T 細胞の割合が増加していた。特に、リンパ球活性化マーカーでありサイトカイン (IL-2) の受容体でもある CD25 の発現率が顕著に増加していた。さらに、酪酸菌給与子牛においては、ワクチン (ウイルス) に対する細胞性免疫の誘導に重要なサイトカイン (IFN- γ や TNF- α) の産生量も増加していた。また、酪酸菌給与子牛は陰性対照子牛と比べて体重の増加率が高く、試験期間中における肺炎による治療回数が少ない傾向が認められた。以上により、子牛に対する酪酸菌の給与は、ワクチン接種によって誘導される細胞性免疫応答を増強し、ワクチンの効果を高めることが示された。今回の実証試験で得られた成果を基に、製品化に向けた課題の整理と解決を進めていきたい。

【成果の公表 (代表的なもの)】

・論文発表

今内 覚、岡川朋弘、哺育・育成牛の飼養管理ガイド

(担当:分担執筆, 範囲:第 4 章 給餌と飼養管理のポイント ③下痢予防のための発酵代用乳のつくり方と給与)

DAIRYMAN 2024 年 10 月

・学会発表

池端麻里、岡川朋弘、中村隼人、前川直也、村田史郎、大橋和彦、今内 覚

プロバイオティクスによる子牛のワクチン効果増強作用の検証

第 167 回日本獣医学会 日本獣医学会学術集会

日本獣医学会学術集会優秀発表賞受賞 (微生物学分科会)