

# 大腸菌ワクチン投与後のホルスタイン母牛の初乳を給与された 新生子牛におけるリンパ球動態とクリプトスポリジウム感染防御効果

青木美樹子<sup>1,2)</sup> 丹羽友一郎<sup>1)</sup> 小松 司<sup>1)</sup>  
岡田啓司<sup>1,2)†</sup> 安田 準<sup>1,2)</sup> 板垣 匡<sup>1,2)</sup>

1) 岩手大学農学部獣医学課程 生産獣医療研究室 (〒020-8550 盛岡市上田3-18-8)

2) 岐阜大学大学院連合獣医学研究科

(2011年3月1日受付・2011年5月12日受理)

**要 約** *Cryptosporidium parvum*は生後間もない子牛に感染し下痢を引き起こす消化管内寄生原虫である。本研究では*C. parvum*の感染制御において、あらかじめ大腸菌ワクチンを接種した母牛の初乳を介した新生子牛への免疫賦与が効果を持つか否かを検討した。まず、*C. parvum*が常在する農家の妊娠牛に、免疫を賦活する目的で大腸菌ワクチンを投与したところ、末梢血中のCD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞の増加がみられ、さらに分娩後の初乳ではCD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞あるいは $\gamma\delta$ T細胞の割合が増加した。その初乳を給与された子牛では末梢血中のそれらのT細胞サブセットが増加する傾向がみられたが、これらの新生子牛の糞便からは対照群と同様に*C. parvum*オーシストが検出され、その排出数や下痢の程度、下痢の発現時期にもほとんど差異がみとめられなかった。牛における*C. parvum*感染防御においてCD4<sup>+</sup>T細胞およびCD8<sup>+</sup>T細胞がいずれも重要であるとされているが、今回の研究で大腸菌ワクチン投与によって誘導される各リンパ球サブセットをはじめとする種々の免疫賦活物質を初乳を介して新生子牛に賦与しても*C. parvum*感染防御効果は得られなかった。今後さらに*C. parvum*特異的免疫の移入を含むその他の免疫賦活法を検討していく必要がある。

——キーワード：牛，クリプトスポリジウム，免疫，T細胞

.....産業動物臨床医誌 2(1): 7-13, 2011

## 1. はじめに

クリプトスポリジウムはコクシジウム類に属する原虫で、そのうち*Cryptosporidium parvum*は牛、羊、山羊、人などの哺乳類に感染する人獣共通寄生虫として最も注目されている。牛では主として子牛に感染し、激しい下痢を引き起こして時には脱水、起立不能、昏睡といった重篤な症状に陥ることから、獣医臨床上重要な子牛の下痢症の一因とされているが、これまでのところ有効な治療法や予防法は確立されていない [1]。一方、これまでの報告において、*C. parvum*感染動物における発症や自己治癒には宿主の免疫機構が深く関わる事が明らかにされており [2]、免疫付与や免疫増強による本原虫感染防御効果が検討されている [3-5]。特に、*C. parvum*感

染例の多くは生後間もない新生子牛がオーシストに曝露されることで起こり、その感染と発症にはオーシストを摂取した新生子牛の免疫状態が関与すると考えられるが、新生子牛への免疫賦与はほとんど全て初乳に依存している [6]。すなわち子牛は初乳に含まれる母牛由来の免疫細胞および抗体やサイトカインなどの免疫関連因子を腸管から直接吸収し、未熟な免疫能を活性化すると考えられている [6]。したがって免疫が活性化された母牛の初乳を給与することによってより多くの免疫活性物質を新生子牛に賦与できる可能性があり、例えば牛用大腸菌ワクチンを摂取した母牛の初乳に、新生子牛の大腸菌やその他の感染症の防御効果がみられたことが報告されている [7]。

† 連絡責任者：岡田啓司（岩手大学農学部獣医学課程 生産獣医療研究室）  
〒020-8550 盛岡市上田3-18-8 ☎ 019-621-6237 FAX 019-621-6237  
E-mail : keiji@iwate-u.ac.jp

本研究では、大腸菌ワクチン製剤を投与して免疫を増強した母牛の分娩前後におけるリンパ球動態を調べるとともにその初乳を新生子牛に給与し、子牛の末梢血リンパ球サブセットの発現にどのような変化がみられるかを調査した。さらに、それらの新生子牛における*C. parvum*感染や下痢の発現に影響がみられるか否かを検討した。

## 2. 材料および方法

### 供試牛および処置

岩手県内の*C. parvum*常在農家で飼養されている牛群において、臨床的に健康な妊娠ホルスタイン種乳牛11頭およびその新生子牛のうち異常産であった2頭を除いた9頭を実験に供試した。母牛は大腸菌ワクチン3回投与群4頭、1回投与群4頭、非投与群3頭の3群に分け、新生子牛は3回投与群の子牛3頭、1回投与群の子牛3頭、非投与群の子牛3頭に分類した。3回投与群の母牛には大腸菌ワクチン(牛用大腸菌ワクチン「ゼンノウ」, ローヌ・メリュエ社, フランス)を分娩予定日から6週前(-d42), 4週前(-d28), 2週前(-d14)の3回、それぞれ5mlを皮下注射した。1回投与群の母牛には-d28にのみ大腸菌ワクチンを5ml皮下注射し、-d42および-d14には同量の生理食塩水を皮下注射した。非投与群には-d42, -d28, -d14の3回、生理食塩水を5ml皮下注射した。子牛への初乳の給与は、分娩後2時間に哺乳瓶で3ℓ行った。

### 血液および初乳の採取

11頭の母牛について、分娩前の-d42, -d28, -d14の3回と、分娩後の3日目(d3), 1週目(d7), 2週目(d14), 3週目(d21)の4回、合計7回採血を行った。また分娩後、初搾乳時の乳汁を初乳として採取した。また、9頭の新生子牛よりd3, d7, d14, d21の計4回採血を行った他、同時点にd10, d17を加えた計6回、直腸より糞便の採取を行った。

母牛および新生子牛の採血は全て頸静脈から行い、ヘパリン入り採血管(滅菌済みバキュテイナ採血管: 日本ベクトン・ディッキンソン, 東京)に採取した血液を直ちに4℃, 暗所で保存した。母牛の初乳はミルクアーで搾乳バケツに搾乳された乳汁を、約500mlが入るビニル袋に採取し、4℃で保存した。

### 末梢血中のリンパ球サブセットの解析

採血後速やかに全自動血球計数器(MEK-6258, 日本光電工業, 東京)により総白血球数を測定した。また、血液塗抹標本作製してギムザ染色を施し、鏡検によって白血球百分率を算定した。また、末梢血白血球の分離

のために、50ml遠沈管に全血10mlと0.87%塩化アンモニウム溶液を30ml加え、室温で5分間静置した後に、2000rpmで10分間遠心し、滅菌したリン酸緩衝液(PBS)で2回洗浄した。細胞塊を1mlのPBSに浮遊させて十分に攪拌した後に、その10 $\mu$ lを100 $\mu$ lのチュルク液(和光純薬工業, 大阪)と混和して、Burker-Turk血球計算盤に注入し、鏡検にてリンパ球数を測定した。細胞浮遊液は最終的にリンパ球濃度が1 $\times$ 10<sup>7</sup>/mlとなるようにPBSを加えて調整し、フローサイトメトリーに供した。

すなわちFluorescein isothiocyanate (FITC) 標識されたマウス抗牛CD4抗体(MCA1653F), CD8抗体(MCA837F), WC1抗体(MCA838F), IgM抗体(AAI19F)と、マウス抗牛CD45R抗体(MCA1650)およびPhycoerythrin (PE) 標識F(ab')<sub>2</sub>ウサギ抗マウスIgG抗体(STAR12A)(いずれもSerotec, U.K.)を用いてリンパ球表面抗原の解析を行った。リンパ球濃度1 $\times$ 10<sup>7</sup>/mlに調整した細胞浮遊液を100 $\mu$ lずつ1.5mlマイクロチューブ6本に分注し、1mlのFACSFlow液(日本ベクトン・ディッキンソン, 東京)を加えて2回洗浄後、1) PBS(コントロール), 2) CD45R抗体とIgG抗体, 3) CD4抗体とCD45R抗体とIgG抗体, 4) CD8抗体とCD45R抗体とIgG抗体, 5) IgM抗体とCD45R抗体とIgG抗体 6) WC1抗体をそれぞれのマイクロチューブに各3 $\mu$ lずつ加え、4℃で30分間反応させた。FACSFlow液で2回洗浄(10000rpm, 5分)後、FACSFlow液1mlに浮遊させ、フローサイトメーター(FACScan, Becton Dickinson, USA)を用いて解析した。今回使用したそれぞれの抗体の使用説明書に基づいてCD45R<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞をCD4<sup>+</sup>T細胞, CD45R<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞をCD8<sup>+</sup>T細胞, CD45R<sup>-</sup>WC1<sup>+</sup>細胞を $\gamma\delta$ T細胞, CD45R<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>細胞をB細胞として各リンパ球サブセットの割合を測定した。

### 初乳中のリンパ球サブセット解析

初乳からのリンパ球分離はArchambaultら[8]およびConchaら[9]の方法を参考にして比重遠心法で行った。初乳25mlと同量の滅菌したリン酸緩衝液(PBS)をプラスチック遠心管内で混合し、550G, 20分間遠心分離した。滅菌スポイトで沈査を別の50ml遠沈管に移し、滅菌PBSで3回洗浄(550G, 5分間)した後、沈査を滅菌PBS 10mlに浮遊させた。比重1.084に調整したFicoll-conray液(Ficoll, SIGMA, USAおよびConray, 第一製薬, 東京)が4ml入った15ml遠沈管に細胞浮遊液を静かに重層し、550G, 10分間遠心分離した後、リンパ球層を回収し、滅菌PBSで2回洗浄した。細胞塊を1mlのPBSに浮遊させて十分に攪拌した後に、その10 $\mu$ lを100 $\mu$ lのチュルク液と混和し、Burker-Turk血球

計算盤に注入し、鏡検にて細胞数を測定した。細胞浮遊液は最終的に細胞濃度が  $1 \times 10^7/\text{ml}$  となるようPBSを加えて調整し、前項と同様にフローサイトメトリー解析を行った。

### 糞便検査

新生子牛の直腸から採取した糞便53検体を一般的なシヨ糖遠心浮遊法で処理し、FITC標識抗*Giardia*/*Cryptosporidium*抗体 (A100FLR-20X AQUA GLO G/C, Waterborne Inc, New Orleans, USA) を用いた直接蛍光抗体法を施して、蛍光顕微鏡 (BX51, OLYMPUS, Tokyo) で観察し、*Cryptosporidium* オーストを検索した。オーストが検出された場合は、1gの糞便中に含まれるオースト数を算定した。

### 統計処理

得られた数値はMicrosoft Excelを用いて統計処理を行い、Studentの*t*検定およびBonferoni/Dunn法による有意水準の補正を行って有意差検定を行った。

## 3. 結果

### 母牛末梢血中のリンパ球サブセット動態

大腸菌ワクチン3回投与群, 1回投与群, 非投与群の

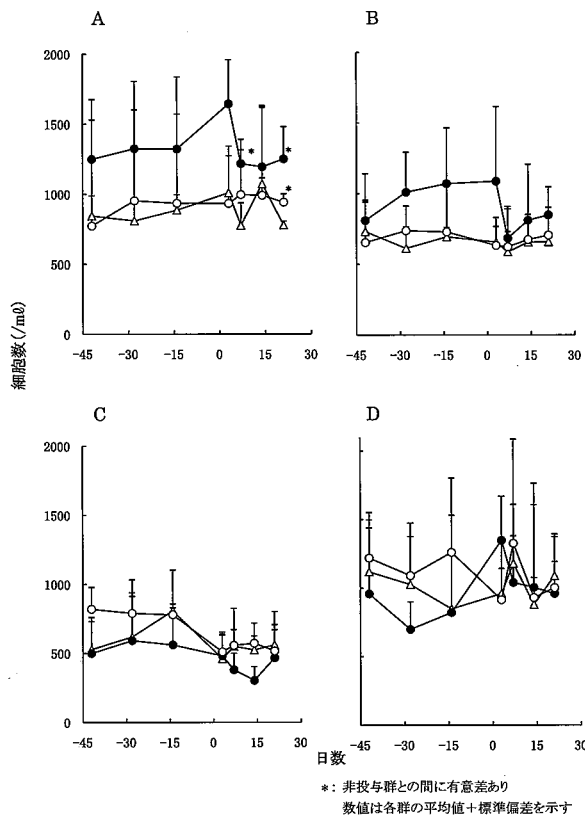


図1. 大腸菌ワクチン3回投与群 (●), 1回投与群 (○), 非投与群 (△) の母牛における各リンパ球サブセットの動態  
A. CD4<sup>+</sup>T細胞数, B. CD8<sup>+</sup>T細胞数, C.  $\gamma\delta$ T細胞数, D. B細胞数

母牛の末梢血におけるCD4<sup>+</sup>T細胞数の経時的変化を調べたところ、3回投与群の細胞数が調査期間を通して他の2群よりも多い傾向がみられ、d7, d21には非投与群よりも有意に増加していた (図1 A)。一方、1回投与群のCD4<sup>+</sup>T細胞数は調査期間中において、非投与群との有意な差異はみられなかった (図1 A)。また、同様にCD8<sup>+</sup>T細胞数の経時的変化を調べたところ、3回投与群の細胞数がワクチン投与後に増加し、d3まで他の2群よりも多い傾向がみられたが、他の2群と比較して推計学的に有意な差異はみられなかった (図1 B)。一方、1回投与群のCD8<sup>+</sup>T細胞数は調査期間中一貫して非投与群との差異はほとんどみられなかった (図1 B)。これに対して $\gamma\delta$ T細胞およびB細胞については、3群を比較して有意な差異はみられなかった (図1 C, D)。

### 初乳中のリンパ球サブセット

初乳中の各リンパ球サブセットの割合を調べたところ、CD4<sup>+</sup>T細胞は、3回投与群で平均9.7%、1回投与群で10.7%、非投与群で8.8%であり、3回投与群および1回投与群の割合が非投与群の平均よりもやや高い傾向がみられた (図2 A)。一方、CD8<sup>+</sup>T細胞が占める割合は、3回投与群で平均16.6%、1回投与群で12.1%、非投与群で11.6%であり、3回投与群で他の2群よりも

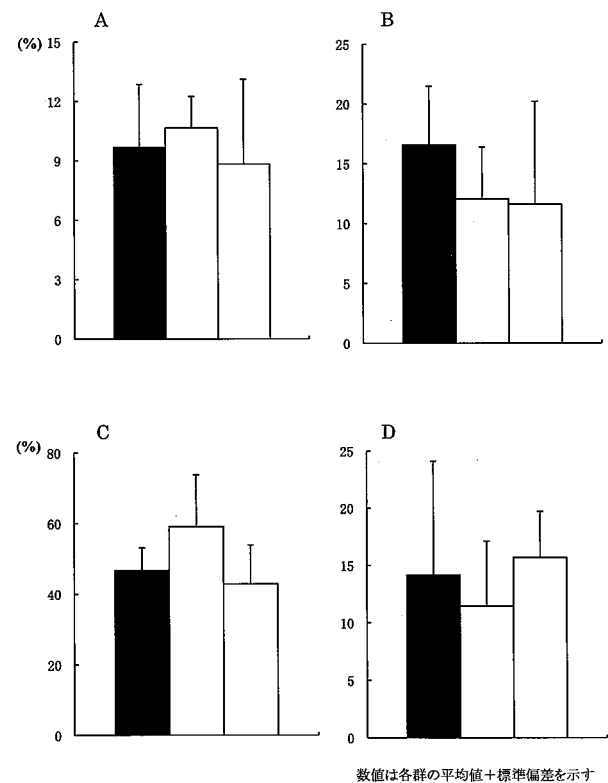


図2. 大腸菌ワクチン3回投与群 (■), 1回投与群 (□), 非投与群 (□) の初乳における各リンパ球サブセットの割合  
A. CD4<sup>+</sup>T細胞数, B. CD8<sup>+</sup>T細胞数, C.  $\gamma\delta$ T細胞数, D. B細胞数

多い傾向がみられた (図 2 B). それに対して  $\gamma\delta$ T細胞が占める割合は, 3回投与群で平均46.7%, 1回投与群で59.1%, 非投与群で42.8%であり, 1回投与群の割合が他の2群よりも高い傾向がみられた (図 2 C). B細胞での割合は, 3回投与群で平均14.2%, 1回投与群で12.0%, 非投与群で15.7%であり, T細胞が他の2群より少なかった非投与群で相対的に多くなる傾向がみられた (図 2 D). しかしながら, いずれのリンパ球サブセットにおいても推計学的に有意な差異はみられなかった.

#### 新生子牛末梢血中のリンパ球サブセット動態

大腸菌ワクチン3回投与群, 1回投与群, 非投与群のそれぞれの母牛から生まれた新生子牛末梢血において, CD4<sup>+</sup>T細胞数の経時的变化を調べたところ, 3回投与群の子牛において生後日数の経過に伴い細胞数が増加する傾向がみられ, d14においては非投与群よりも有意に増加していた (図 3 A). 一方, 1回投与群の子牛のCD4<sup>+</sup>T細胞数は非投与群と比較してほとんど差異がみられなかった (図 3 A). それに対してCD8<sup>+</sup>T細胞では, d3において3回投与群と1回投与群の子牛の細胞数が非投与群と比較して有意に多く, また, 3回投与群の子牛のCD8<sup>+</sup>T細胞数は経時的な増加が他の2群より大き

い傾向がみられた (図 3 B). 一方,  $\gamma\delta$ T細胞数は, 1回投与群の子牛で生後日数の経過に伴い増加する傾向が顕著にみられた (図 3 C). 3回投与群の子牛の $\gamma\delta$ T細胞数はd7において高い傾向がみられたが, その後は非投与群と同様のレベルの平均値であった (図 3 C). B細胞数については3群でほとんど差異はみられなかった (図 3 D).

#### 新生子牛のCryptosporidium検出状況

供試した9頭の新生子牛から3あるいは4日おきに直腸便を採取し糞便検査を行ったところ, 9頭中8頭から *C. parvum* のオーシストが検出された (表). いずれの群においても *C. parvum* のオーシストは生後7-17日に検出され, オーシスト排出数のレベルにも大きな差異はみとめられなかった. また, オーシストが検出された新生子牛は全て水様または泥状の下痢を発現していた.

#### 4. 考 察

新生子牛は, ほぼ無菌状態の母牛の子宮から離れることで, 出生後急激に微生物を大量に含む環境に曝されることになる. 牛は胎盤において母牛と胎子の血管が直結していないため, その免疫賦与はもっぱら初乳を介して行われるとされ [6], 初乳中には移行抗体として一般的に知られている免疫グロブリンをはじめとして, リゾチームやラクトフェリンなどの抗菌性物質, 免疫や神経および造血系等に働き生体内の恒常性を維持する上で重要なサイトカイン, そしてビタミンなどの新生子に必要な栄養分が多量に含まれている [10]. また, 細胞成分を含んだ初乳を摂取した新生子牛では, 細胞成分を摂取していない新生子牛よりも毒素原性大腸菌に対する抵抗性が強いとする報告 [11] もあり, 初乳中の細胞成分, 特にリンパ球の動態が注目されている [12].

我々が行った別の研究 [13] において, 大腸菌ワクチン製剤を分娩予定日の1カ月前に皮下投与することにより, 大腸菌ワクチン投与群の初乳中リンパ球数, CD4<sup>+</sup>T細胞数, CD8<sup>+</sup>T細胞数,  $\gamma\delta$ T細胞数, B細胞数の全てがコントロール群よりも増加することが示唆された. また, これらの初乳中リンパ球の幼若化能試験において, 大腸菌ワクチン投与群は非投与群と比較して, フィトヘマグルチニン (PHA) およびポークウィードマイトジェン (PWM) による刺激指数が有意に上昇したことから, さらに初乳中IgG1およびIgA抗体の濃度が大腸菌ワクチン投与群で有意に増加していたことから, 大腸菌ワクチン製剤を母牛に投与することは, 初乳中の大腸菌特異的免疫のみならず非特異的な液性免疫および細胞性免疫も増強する可能性がある. そこで本研究では, 大腸菌ワクチン投与によって免疫物質が増強された初乳を実際に新

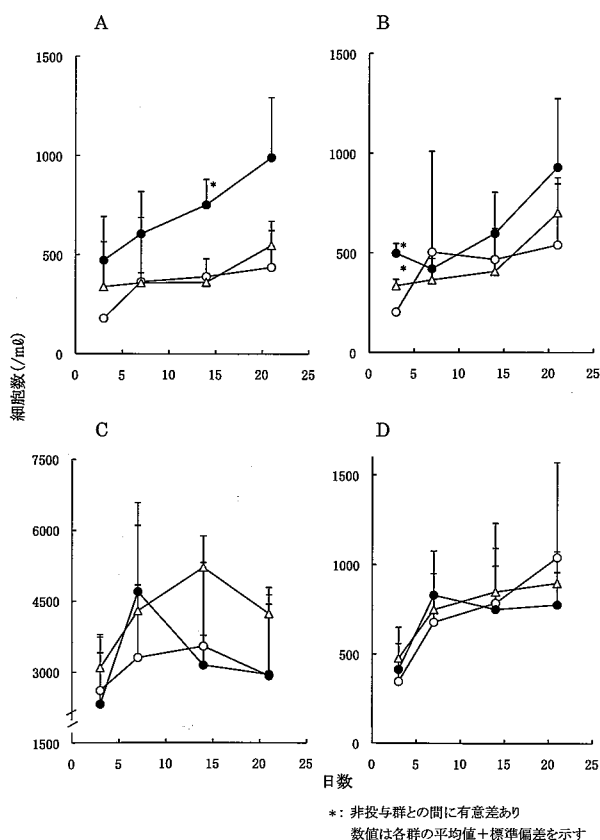


図 3. 大腸菌ワクチン3回投与群 (●), 1回投与群 (○), 非投与群 (△) の新生子牛における各リンパ球サブセットの動態  
A. CD4<sup>+</sup>T細胞数, B. CD8<sup>+</sup>T細胞数, C.  $\gamma\delta$ T細胞数, D. B細胞数

表. 新生子牛の糞便中の*Cryptosporidium*オーシストの検出成績

実験群	ウシ番号	生後日数					
		3	7	10	14	17	21
3回投与群	1	-*	+++	+++	++	-	-
	2	-	-	++	+++	+	-
	3	-	+++	+++	+	-	-
1回投与群	1	-	+++	+++	+	-	-
	2	-	+++	+++	+	-	-
	3	-	++	+++	++	+	-
非投与群	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	NT	+++	+++	-	-
	3	-	+++	++	+	-	-

\*: 糞便1gあたりのオーシスト数.

-; 0, +;  $<10^3$ , ++;  $10^3-10^4$ , +++;  $>10^4$

NT: 検査せず

生子牛に給与することで、*C. parvum*の感染および発症の制御に効果がみられるか否かを検討した。その結果、本研究の大腸菌ワクチン3回投与群における成績では、母牛の末梢血中リンパ球動態において、 $CD4^+$ T細胞数および $CD8^+$ T細胞数が非投与群よりも増加する傾向がみられた(図1A, B)。同様に、初乳中リンパ球においても $CD4^+$ T細胞と $CD8^+$ T細胞の割合が非投与群と比較し増加した(図2A, B)。さらに、同群の新生子牛の末梢血リンパ球動態においても、この2つのリンパ球サブセットの細胞数がd3において多い傾向がみられ、また、生後日数の経過に伴い細胞数が増加する傾向が顕著にみられた(図3A, B)。このことから、大腸菌ワクチン製剤を3回投与することによって、生体内のリンパ球前駆細胞を $\gamma\delta$ 型T細胞への分化を増加させるシグナル応答が増強された可能性が考えられた。一方、大腸菌ワクチン1回投与群における成績では、 $CD4^+$ T細胞と $CD8^+$ T細胞の増加はほとんどみられず、代わりに $\gamma\delta$ T細胞の増加がみられた。その傾向は母牛の末梢血リンパ球サブセット動態ではそれほど明らかでなかったものの(図1C)、初乳リンパ球中における割合および新生子牛の末梢血リンパ球サブセット動態における $\gamma\delta$ T細胞数は、1回投与群において非投与群と比較して明らかに増加する傾向がみられた(図2C, 図3C)。このことから、1回投与群では3回投与群とは異なり、 $\gamma\delta$ T細胞が優位な免疫応答が増強された可能性が考えられた。

しかしながら、3回投与群と1回投与群のいずれにおいても、*C. parvum*感染を防御することは出来なかった。すなわち大腸菌ワクチンによって誘導される種々の免疫活性因子を初乳を介して子牛に賦与しても、*C. parvum*オーシストの排出数および下痢の発現にほとんど影響のないことが示された。これまで、*C. parvum*感染に対する防御免疫において $CD4^+$ T細胞とそれらから

分泌されるサイトカインであるIFN- $\gamma$ およびIL-12が重要な役割を持ち、対照的に $CD8^+$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞などの役割は比較的小さいことがマウスの感染モデルにおいて示唆されている[14-16]。それに対して、新生子牛の*C. parvum*感染における各T細胞サブセットの役割に関する報告は多くないが、Wyattら[17]は、*C. parvum*に初感染した新生子牛の回腸粘膜において、 $CD8^+$ T細胞数は有意に増加するが、 $CD4^+$ T細胞数の増加は僅かであることを報告した。また、Abrahamsenら[18]は、*C. parvum*に初感染した新生子牛の回腸における腸絨毛、粘膜固有層およびパイエル板で、 $CD4^+$ T細胞、 $CD8^+$ T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞が有意に増加し、一方、本原虫の二次感染では、回腸において $CD4^+$ T細胞および $CD8^+$ T細胞が有意に増加したが $\gamma\delta$ T細胞の有意な増加はみられなかったこと、さらに $CD4^+$ T細胞の増加はパイエル板のみに局限しており、腸絨毛においては $CD8^+$ T細胞のみが大幅に増加することなどを報告している。これらの知見から、新生子牛におけるクリプトスポリジウム症の防御免疫には、 $CD4^+$ T細胞のみではなく、 $CD8^+$ T細胞も重要な構成要素である可能性が示唆されている[19]。本研究において大腸菌ワクチン3回投与群の母牛の末梢血、初乳および新生子牛の末梢血において $CD4^+$ T細胞と $CD8^+$ T細胞の増加がみとめられたが、子牛における*C. parvum*感染防御効果は見られなかった。しかしながら以前、*C. parvum*のリコンビナント蛋白(rC7)を妊娠後期の母牛に投与し、その初乳を新生子牛に与えることによって、下痢の発現が完全に抑制され、*C. parvum*オーシストの排出数は99.8%減少したとの報告がある[14]。これらのことを考え合わせると、本研究は新生子牛の*C. parvum*感染を受動免疫によって予防する試みの第一段階として母牛への大腸菌ワクチンの接種時期や回数など、より効果的な免疫賦活法を検討していく上で有用な

知見になると考えられた。

## 5. 謝 辞

薬剤および資料をご提供いただいた日本全薬工業株式会社およびメリアルジャパン株式会社に深謝します。

## 6. 引用文献

1. Fayer R, et al. : *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns, *Int J Parasitol*, 28, 49-56 (1998)
2. Riggs MW : Recent advances in cryptosporidiosis : the immune response, *Microbiol Infect*, 4, 1067-1080 (2002)
3. Akili D, et al. : Characterization of factor from bovine intestine that protect against *Cryptosporidium parvum* infection, *Vet Parasitol*, 142, 168-172 (2006)
4. Harp JA, Goff JP : Protection of calves with a vaccine against *Cryptosporidium parvum*, *J Parasitol*, 81, 54-57 (1995)
5. Perryman LE, et al. : Protection of calves against cryptosporidiosis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein, *Vaccine*, 17, 2142-2149 (1999)
6. McGovern PT : Placental structure and transmission of maternal immunity, *Vet Rec*, 95, 573-574 (1974)
7. Baelington N : Vaccination of cows with a K99 extract to protect newborn calves against experimental enterotoxigenic colibacillosis, *Infect Immun*, 27, 21-24 (1980)
8. Archambault D, et al. : Isolation of bovine colostrum lymphocytes. : *In vitro* blastogenic responsiveness to concanavalin A and bovine rotavirus, *Ann Rech Vet*, 19, 169-174 (1998)
9. Concha C, et al. : The proliferative responses of cow stripping milk and blood lymphocytes to pokeweed mitogen and ginseng *in vitro*, *Vet Res*, 27, 107-115 (1995)
10. Quigley JD, Drewry JJ : Nutrient and immunity transfer from cow to calf pre- and postcalving. *J Dairy Sci*, 81 : 2779-2790 (1998)
11. Gerd RC : The influence of colostrum leukocytes on the course of an experimental *Escherichia coli* infection and serum antibodies in neonatal calves. *Vet Immunol Immunopathol*, 35, 275-288 (1993)
12. Barrinton GM, Parish SM : Bovine neonatal immunology. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 17, 463-476 (2001)
13. 岡田啓司, 他 : 大腸菌ワクチン投与後のホルスタイン牛初乳中免疫成分とADA活性, *産業動物臨床医誌* (2011) (印刷中)
14. Chen W, et al. : Requirements for CD4<sup>+</sup> cells and gamma interferon in resolution of established *Cryptosporidium parvum* infection in mice, *Infect Immun*, 61, 3928-3932 (1993)
15. Guk SM, et al. : Role of murine intestinal intraepithelial lymphocytes and lamina propria lymphocytes against primary and challenge infections with *Cryptosporidium parvum*, *J Parasitol*, 89, 270-275 (2003)
16. Rohman VC, et al. : *Cryptosporidium parvum* infection after abrogation of natural killer cell activity in normal and severe combined immunodeficiency mice, *J Parasitol*, 79, 295-297 (1993)
17. Wyatt CR, et al. : Activation of intestinal intraepithelial T lymphocytes in calves infected with *Cryptosporidium parvum*, *Infect Immun*, 65, 185-190 (1997)
18. Abrahamsen MS, et al. : Localization of  $\alpha/\beta$  and  $\gamma/\delta$  T lymphocytes in *Cryptosporidium parvum*-infected tissues in naive and immune calves, *Infect Immun*, 65, 2428-2433 (1997)
19. Abrahamsen MS : Bovine T cell responses to *Cryptosporidium parvum* infection, *Int J Parasitol*, 28, 1083-1088 (1998)

---

## Effects of feeding colostrum from *E. coli* vaccinated dams on protection against *Cryptosporidium parvum* and lymphocyte subset population in neonatal calves

M. Aoki<sup>1,2)</sup>, Y. Niwa<sup>1)</sup>, T. Komatsu<sup>1)</sup>, K. Okada<sup>1,2)</sup>†, J. Yasuda<sup>1,2)</sup>, T. Itagaki<sup>1,2)</sup>

1) Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka 020-8550, Japan

2) The United Graduate School of Veterinary Medicine, Gifu University

**ABSTRACT** *Cryptosporidium parvum* is an enteric protozoan that infects neonatal calves and causes severe diarrhea. We examined whether colostrum from *E. coli* vaccinated dams would provide better protection against *C. parvum* in neonatal calves. Pregnant Holstein cows kept at a *C. parvum*-positive farm were vaccinated against *E. coli* during the dry period. The number of CD4<sup>+</sup> cells and CD8<sup>+</sup> cells in the peripheral blood was higher in the vaccinated cows after parturition compared to those in non-vaccinated cows. The colostrum from these vaccinated cows contained higher percentages of CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, and  $\gamma\delta$ T cells compared to that from non-vaccinated cows. The calves fed the colostrum from vaccinated dams showed increased numbers of T cell subsets in the peripheral blood compared to calves fed the colostrum from non-vaccinated dams. However, the number of *C. parvum* oocyst detected in the feces, the severity of diarrhea and the timing of onset of diarrhea were similar for both groups of calves. Although CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells are very important immune cells to protect calves from *C. parvum* infection, the colostrum from the *E. coli* vaccinated dams containing higher numbers of these T cells did not improve protection against *C. parvum* in calves. Further studies, including those focusing on *C. parvum*-specific immune protection, are needed to provide better immunity to calves.

—Key Words : Cow, *Cryptosporidium*, Immunity, T cell

† Correspondence to : Keiji Okada (Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University)  
3-18-8 Ueda, Morioka 020-8550, Japan  
TEL 019-621-6237 FAX 019-621-6237 E-mail : keiji@iwate-u.ac.jp

.....Jpn. J. Large Anim. Clin. 2(1): 7-13, 2011