

## 原著論文

## 乳牛の第四胃変位に罹患した症例における免疫状態

武井絵美<sup>1)</sup> 武田絢子<sup>1)</sup> 小井田歩<sup>2)</sup> 大塚浩通<sup>1)</sup>★ 安藤貴朗<sup>3)</sup>  
小比類巻正幸<sup>4)</sup> 佐藤光<sup>5)</sup> 加藤敏英<sup>5)</sup>

1) 北里大学獣医学部 (034 - 8628 青森県十和田市東二十三番町 35-1)

2) 関口動物病院奥中山家畜診療所 (028 - 5133 岩手県二戸郡一戸町中山字大塚 82-2)

3) 酪農学園大学 (069-8501 北海道江別市文京台緑町 582 番地)

4) 小比類巻家畜診療サービス (039-2683 青森県東北町大平 63-3)

5) NOSAI 山形 (995-0201 村山市大字長善寺仲田 266-2)

★連絡責任者：大塚浩通

TEL：0176-23-4371

FAX：0176-23-8703

E-mail otsuka@vmas.kitasato-u.ac.jp

## 【要約】

DA 罹患牛の免疫状態を明らかにするため、末梢白血球ポピュレーションとサイトカイン mRNA 発現量を解析した。供試牛は DA に罹患したホルスタイン種搾乳牛 26 頭で、第四胃左方変位 (LDA 群、N=18) と第四胃右方変位 (RDA 群、N=8) とに分類し、対照群として DA の発生がみられた牧場の健康なホルスタイン搾乳牛 (対照群、N = 15) を用いた。採血し、WBC、ケトン体、第四胃変位、コルチゾール、末梢白血球ポピュレーションならびにサイトカイン mRNA 発現量を解析した。RDA 群のコルチゾール濃度は LDA 群に比べて高値の傾向にあった。RDA 群の末梢血中 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>T 細胞数と MHC class II<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup>B 細胞は LDA 群に比べて低値の傾向にあり、DA 罹患牛では対照群に比べて有意な差を認めた。また DA の 2 群の IFN- $\gamma$  および IL-4 遺伝子発現量は対照群に比べ高い傾向にあった。DA 罹患牛では末梢 T 細胞ならびに B 細胞数が減少し、サイトカイン遺伝子発現量が高まることが示唆された。

【キーワード：乳牛、免疫機能、周産期】

## 【はじめに】

乳牛の (DA) は周産期に発生しやすい消化障害あるいは閉塞の症状を示す疾患であり、様々な要因が複雑に関連して発症する。本症は乳房炎や子宮内膜炎など感染症の発生との関連も示唆されており [4]、DA にともなう免疫機能の低下が感染症の発症に関与する可能性がある。

DA では第四胃を中心とした血液循環の低下、重篤になると酸素不足による第四胃組織の変性・壊死なども惹起され、炎症反応を誘発することもある [9]。人の急性虫垂炎では IL-8 や IL-10 などのサイトカインの血中濃度が上昇することが知られている [3]。さらに比較的軽症の症例に比べ虫垂の壊疽をともなう症例で Th1 応答が強く現れることも指摘されており

[20]、このような消化器疾患の病状と免疫応答とに関連のあることが示唆されている。しかし牛の DA における免疫状態に関してはこれまで全く報告がない。本研究では DA 罹患牛における、初診時の免疫状態を明らかにするため、末梢白血球ポピュレーションとサイトカイン遺伝子の解析を行った。

### [ 材料ならびに方法 ]

**供試牛：** 供試牛は青森県内と山形県内で飼育されていた、第四胃変位 (DA) に罹患したため整復手術を必要とした分娩 1 ヶ月以内のホルスタイン種乳牛 26 頭で、それらのうち第四胃右方変位 (RDA) を発症した牛群を RDA 群 (N=8)、第四胃左方変位 (LDA) を発症した牛群を LDA 群 (N=18) と分類した。採血は DA 整復手術直前に行った。さらに、DA 罹患牛と同牧場の分娩後 1 ヶ月以内の健康なホルスタイン搾乳牛 (N=15) を対照群として用いた。

**検査項目：** 血液一般検査、血液性化学検査、末梢白血球のフローサイトメトリー法による白血球表面抗原の解析を行った。血液一般検査、血液性化学検査、末梢白血球のフローサイトメトリー法による白血球表面抗原の解析、血中コルチゾール濃度の測定を行った。

**血液の採材と処理法：** 供試牛から採取した血液は、プレーン、EDTA-2K およびヘパリン添加入り採血管に分注した。なお、プレーン血液はホルモン濃度の測定に、EDTA-2K 添加血液は血液一般検査ならびに白血球表面抗原解析に、ヘパリン添加血液はサイトカイン遺伝子の解析に用いた。

**血液生化学検査：** 血清中の血清ケトン体は酵素法、コルチゾールの測定はマイクロプレートを使用した酵素免疫測定法により実施した [1]。

**末梢白血球表面抗原の解析：** 白血球表面抗原の解析は間接蛍光抗体法で染色し、フローサイ

トメーター (FACScan, Becton Dickinson 社、USA) で測定した。その概要は次の通りであった。EDTA-2K 添加血液 2 ml をスピッツ管に移し、0.83% 塩化アンモニウム溶液を血液の 2 倍量加え赤血球を溶血させた。さらに、1,500rpm で 3 分間遠心し、沈査に PBS (0.8%NaCl、0.02 % 塩化カリウム、0.02% リン酸水素二カリウム加 8mM リン酸水素二ナトリウム・十二水和物溶液) (pH7.32) を加えて数回洗浄した後、PBS で適宜希釈して白血球浮遊液を作製した。1 × 10<sup>2</sup> 倍の一次抗体をマイクロチューブに加え、希釈白血球浮遊液を分注し、4℃で 1 時間反応させた。使用した一次抗体は VMRD (Pullman,USA) の抗ウシ CD3 (MMIA)、CD4 (CACT183B)、CD8 (9ACT80C)、CD21 (GB25A)、TcR1-N12 (CACT61A)、MHC class II (TH14B) および抗ヒト CD14 (MY-4; ベックマン コールター、東京) である。反応後、PBS で洗浄し、2 × 10<sup>3</sup> 倍 (FITC 標識抗マウス IgM 抗体) および 4 × 10<sup>3</sup> 倍 (PE 標識抗マウス IgG 1 抗体) の二次抗体を加え、4℃で 30 分間反応させた。反応後 PBS で洗浄し、PBS で適宜希釈して測定した。測定データは Cell Quest を用いて解析を行った。

サイトグラムの結果から、側方散乱光が低い単球・リンパ球とそれ以外の白血球に分類し、単球とリンパ球は単核球とした。各表面抗原陽性細胞は各表面抗原の陽性率と白血球の実数 (× 10<sup>2</sup>/ μl) で、また単核球数はサイトグラムから得られた陽性率と白血球の実数値を用い算出した。

**real-time PCR：** ヘパリン添加血液から比重遠心法で単核球を分離し、mRNA を抽出した。これまでの報告 [18、19] を参考に、抽出した mRNA を用いて cDNA を合成し、real-time PCR に供した。PCR においては、ウシ内部標準遺伝子として β -actin を用い、IFN- γ

およびIL-4を解析した。SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) を利用し、7700 Sequence Detector を用いて real-time PCR を実施した。またサイトカイン遺伝子発現量は増幅した各遺伝子の Threshold Cycle (Ct 値) を用いて、  

$$\text{サイトカイン遺伝子発現量} = 2^{-(\text{サイトカインの Ct 値} - \beta\text{-actin の Ct 値})}$$
の計算式にて求めた。

2 群間の比較は Mann-Whitney の U 検定により解析した。また、2 系列間の相関性は Spearman の順位相関係数を求め、いずれも 5% 以下の危険率で有意な差とした。

### [ 成績 ]

RDA 群および LDA 群の総ケトン体値は対照群に比べて高値を示す傾向にあった。RDA 群および LDA 群の血中コルチゾール濃度は対照群に比べ高い傾向にあり、RDA 群と対照群との間には有意な差を認めた。

RDA 群および LDA 群の単核球数は対照群

に比べ有意な低値を示したが、RDA 群と LDA 群の間には有意な差は認められなかった。白血球数ならびに顆粒球数では、有意な差はなかった。RDA 群および LDA 群の CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> ならびに TcR1-N12<sup>+</sup>T 細胞数は、対照群に比べて有意な低値を示した。RDA 群のこれらの T 細胞数は、LDA 群に比べ低値の傾向にあったが 2 群間に有意な差は認められなかった。3 群間において、CD21<sup>+</sup>B 細胞、MHC class II<sup>+</sup>B 細胞数ならびに CD14<sup>+</sup> 単球数には有意な差を認めなかった。

DA 罹患牛群における IFN- $\gamma$  ならびに IL-4 遺伝子発現量は対照群に比べ高い傾向にあった。RDA 群の IFN- $\gamma$  /IL-4 比は LDA 群ならびに対照群に比べ低い傾向にあったが有意な差は認められなかった (表 1)。表 1 について、それぞれの N 数が記載されていません。

DA 罹患牛における血中コルチゾール濃度と単核球数 (R=-0.54)、末梢 CD21<sup>+</sup>B 細胞数 (R=-0.60) ならびに CD14<sup>+</sup> 単球数 (R=-0.71) には有意な負の相関性が認められた (図 1)。

Table 1 Serum ketone body, cortisol, peripheral leukocyte population and cytokines mRNA expression

項目	RDA group	LDA group	Control group
Total ketone body	2052.4±534.3	2990.3±491.2	1718.5±263.7
Cortisol	11.6±3.6 <sup>a</sup>	6.1±1.4 <sup>b</sup>	3.4±0.4 <sup>a</sup>
WBC	96.7±16.7	85.4±8.8	83.3±6.3
Mononuclear cell	20.8±1.8 <sup>a</sup>	26.8±2.3 <sup>b</sup>	31.3±3.2 <sup>ab</sup>
Granulocyte	66.2±17.1	47.8±7.9	50.5±4.8
CD3 <sup>+</sup> T cell	5.2±1.1 <sup>a</sup>	7.2±1.1 <sup>b</sup>	11.3±1.4 <sup>ab</sup>
CD4 <sup>+</sup> T cell	1.8±0.4 <sup>a</sup>	2.8±0.5 <sup>b</sup>	4.6±0.5 <sup>ab</sup>
CD8 $\beta$ <sup>+</sup> T cell	1.1±0.3 <sup>a</sup>	1.4±0.3 <sup>b</sup>	2.8±0.4 <sup>ab</sup>
TcR1-N12 <sup>+</sup> T cell	1.0±0.5 <sup>a</sup>	1.6±0.3 <sup>b</sup>	2.6±0.4 <sup>ab</sup>
CD21 <sup>+</sup> B cell	7.7±2.5	7.8±1.3	10.3±1.6
MHC class-II <sup>+</sup> CD14 <sup>-</sup> B cell	6.3±2.1	7.8±1.1	7.9±0.9
CD14 <sup>+</sup> monocyte	3.0±0.5	3.5±0.6	2.7±0.4
IFN- $\gamma$	0.460±0.364	0.870±0.497	0.019±0.004
IL-4	0.013±0.009	0.036±0.018	0.001±0.000
IFN- $\gamma$ /IL-4	48.7±16.4	88.7±29.6	92.9±28.0

average±SE

\*Same letters indicate significant difference between groups (P < 0.05).

Units: total ketone (mmol/L), cortisol (ng/mL), leukocyte ( $\times 10^2/\mu\text{L}$ )

Cytokines expression =  $2^{-(\text{cytokines Ct value} - \beta\text{-actin Ct value})}$

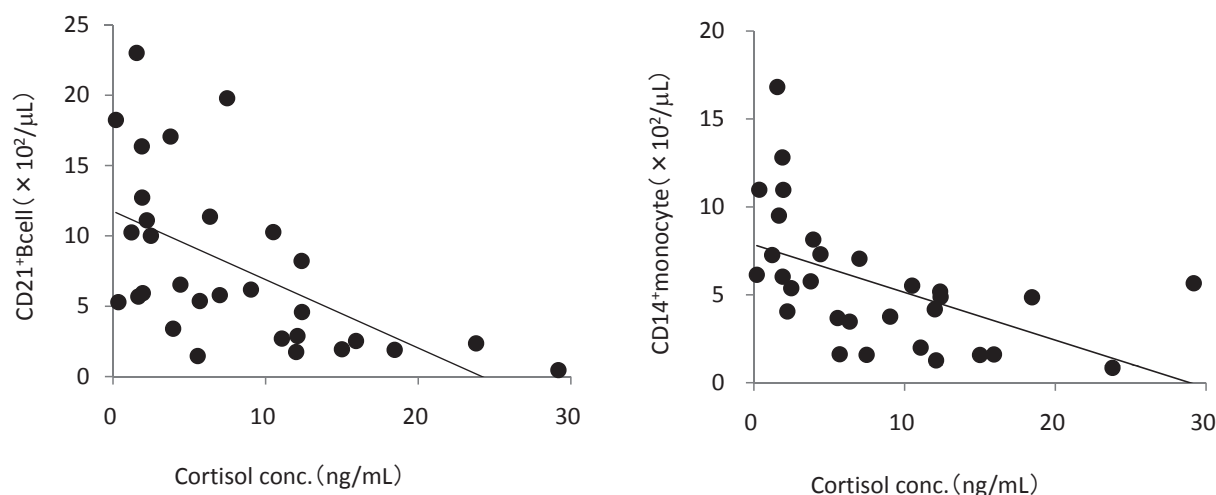


Figure 1 Relationship between serum cortisol concentration and peripheral leukocyte number in the cows with DA.

その他の項目において有意性のある相関は認められなかった。

**[ 考察 ]**

本研究では、DA に罹患した乳牛における免疫状態の解明の一環として、発症牛の末梢白血球ポピュレーションならびにサイトカイン遺伝子発現量を解析し血液性状と比較した。その結果、DA 牛では血中コルチゾール濃度の上昇、末梢 T 細胞数の低下および単核球のサイトカイン遺伝子発現量の上昇が明瞭であった。さらに血中コルチゾール濃度と B 細胞または単球数とに負の相関性が認められたことから、DA 牛においてストレスが強い症例ほど末梢免疫細胞数が減少すると示唆された。

周産期における乳牛では末梢 T 細胞や B 細胞の減少やサイトカイン産生能の低下が認められるが [10、18]、DA の 2 群では健康な対照牛に比べても明らかな T 細胞の減少が観察されたにもかかわらず、サイトカイン遺伝子発現量は高値の傾向にあった。DA は第四胃機能障害に起因した消化管疾患であり、DA 牛ではストレスホルモンであるコルチゾールが上昇する [16]。本研究においても DA の 2 群では血清コルチゾール濃度が高値を示しており、ストレ

ス下にあったものと考えられた。実験的なデキサメタゾンの投与による末梢リンパ球の減少が報告されていることから [14]、DA 群における CD21<sup>+</sup>B 細胞の減少の要因としてコルチゾールの高値が影響していることが示唆される。一方、ケトン体は免疫細胞に対して直接的な機能抑制効果のあることが知られているが [22]、本研究ではケトン体濃度と免疫細胞やサイトカイン遺伝子発現量との間には有意な相関性は認められなかった。以上の結果より、DA 罹患牛においてはケトン体よりむしろコルチゾールの方が免疫機能に影響する可能性があった。

RDA または LDA 罹患牛では発症時に急性総蛋白である血清アミロイド A やハプトグロビンの上昇が報告されている [9]。これらの物質の血中濃度は肺炎や乳房炎などの感染症において上昇することから [8、17]、DA の牛では炎症反応が誘導されるものと示唆される。DA では第四胃の虚血性障害が発生することもあるため [6]、これにともなった炎症刺激は急性総蛋白の産生を促進する一因と考えられる。虫垂炎の患者の中で、壊死をともなった症例では軽症例に比べて、単核球の IFN- $\gamma$  産生能や好中球ならびに単核球の IL-8 蛋白の発現量が高く、重篤な症例ほど Th1 サイトカインが優

位になりやすい [3, 20]。細胞の浸潤を調整する炎症反応では、組織での炎症性サイトカイン産生が誘導される [13, 15]。組織で産生されるサイトカインは、感染に対する好中球から T 細胞や B 細胞への速やかな免疫反応を誘導する必須の因子である。IFN- $\gamma$  は感染症だけでなく組織障害でも産生され、免疫応答を介してさらなる組織障害を誘導することが報告されている [2, 21]。組織障害などの炎症刺激は白血球の粘着レセプターの発現を促進し、血流中の白血球数が血管に粘着しやすくなるため [12]、末梢血の白血球数は低下する。また手術にともなって末梢血 CD4<sup>+</sup> や CD8<sup>+</sup>T 細胞が減少することも報告されている [23]。本研究の DA の症例では IFN- $\gamma$  遺伝子発現量の上昇傾向と末梢血 T 細胞の低下が観察されたことから、感染によらない免疫反応が誘導されている可能性がある。

本研究において RDA 群では LDA 群に比べ高コルチゾールならびに低 T 細胞の傾向にあったが、各検査項目において両群間に明らかな差を認めなかった。一般に LDA に比べ RDA では捻転などを伴い重篤化することもあるとされるが [5]、本研究では RDA 群と LDA 群の免疫機能の解析項目に明らかな差と認めなかったことから、第四胃の変位の方向ではなくストレスや炎症反応がより全身の免疫状態に影響を及ぼしているかもしれない。また、壊死性虫垂炎の患者では末梢血リンパ球数が減少するが [11]、本研究における DA 罹患牛の末梢リンパ球数の減少はこれに類似した現象であると示唆され、サイトカイン遺伝子が高値であったことから、少なくとも乳牛の DA の罹患時における免疫状態は機能低下というよりむしろ第四胃変位にともなった組織での炎症刺激に反応している可能性があった。

DA など乳牛の代謝性疾患は分娩後 2 週間に発生率が高く、その発症によって感染症の発症リスクが高まるが、これには免疫機能の低下が関与し

ていることが示唆される [7]。しかし DA においては、負のエネルギーバランスに伴った代謝異常や第四胃障害の重症度も免疫機能に影響する可能性があるため、これらの要因を十分に加味して DA と免疫防御性との関係について検証するべきである。

#### [引用文献]

1. Ando, T., Annaka, A., Ohtsuka, H., Kohiruimaki, M., Hayashi, T., Hasegawa, Y. and Watanabe, D. 2008. Effect of hoof trimming before the dry period on productive performance in perinatal dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 95-98.
2. Day, Y.J., Huang, L., Ye, H., Li, L., Linden, J. and Okusa, M.D. 2006. Renal ischemia-reperfusion injury and adenosine 2A receptor-mediated tissue protection: the role of CD4<sup>+</sup> T cells and IFN-gamma. *J. Immunol.* 176: 3108-3114.
3. Dalal, I., Somekh, E., Bilker-Reich, A., Boaz, M., Gorenstein, A. and Serour, F. 2005. Serum and peritoneal inflammatory mediators in children with suspected acute appendicitis. *Arch. Surg.* 140:169-173.
4. Doll, K., Sickinger, M. and Seeger, T. 2009. New aspects in the pathogenesis of abomasal displacement. *Vet. J.* 181: 90-96.
5. Geishauser, T. 1995. Abomasal displacement in the bovine—a review on character, occurrence, aetiology and pathogenesis. *Zentralbl. Veterinarmed.* A. 42: 229-251.
6. Goetze, L. and Müller, M. 1990. The

- therapy of hypovolemic shock in cows with right-sided abomasal displacement. Zentralbl. Veterinarmed. A. 37: 300-309.
7. Goff, J.P. and Horst, R.L. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. J. Dairy Sci. 80:1260-1268.
  8. Grönlund U, Hultén C, Eckersall PD, Hogarth C, Persson Waller K. 2003. Haptoglobin and serum amyloid A in milk and serum during acute and chronic experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis J.Dairy Sci. 70: 379-386.
  9. Guzelbektes, H., Sen, I., Ok, M., Constable, P.D., Boydak, M. and Coskun, A. 2010. Serum amyloid A and haptoglobin concentrations and liver fat percentage in lactating dairy cows with abomasal displacement. J. Vet. Intern. Med. 24: 213-219.
  10. Ishikawa, H., Shirahata, T. and Hasegawa, K. 1994. Interferon-gamma production of mitogen stimulated peripheral lymphocytes in perinatal cows. J. Vet. Med. Sci. 56: 735-738.
  11. Jahangiri, M. and Wyllie, J. H. 1990. Peripheral blood lymphopenia in gangrenous appendicitis Br. Med. J. 301: 215.
  12. Kirschfink, M. 1997. Controlling the complement system in inflammation. Immunopharmacology. 38, 51-62.
  13. Mantovani, A. 1999. The chemokine system: redundancy for robust outputs. Immunol. Today 20: 254-257.
  14. Menge, C. and Dean-Nystrom, E.A. 2008. Dexamethasone depletes gammadelta T cells and alters the activation state and responsiveness of bovine peripheral blood lymphocyte subpopulations. J.Dairy Sci. 91: 2284-2298.
  15. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. 2004. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. Trends Immunol. 25: 75-84.
  16. Mudron, P., Herzog, K., Höltershinken, M. and Rehage, J. 2007. Effects of abdominal surgery on thiobarbituric acid reactive substances and plasma anti-oxidative capacity in dairy cows. J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med. 54: 441-444.
  17. Nakagawa, H. and Kato, N. 1999. Reduced serum lecithin:cholesterol acyltransferase activity and cholesteryl ester concentration in calves experimentally inoculated with *pasteurella haemolytica* and bovine herpes virus-1. J.Vet.Med.Sci. 10: 1101-1106.
  18. Ohtsuka, H., Watanabe, C., Kohiruimaki, M., Ando, T., Watanabe, D., Masui, M., Hayashi, T., Abe, R., Koiwa, M., Sato, S. and Kawamura, S. 2006. Comparison of two different nutritive condition against the change in peripheral blood mononuclear cells of periparturient dairy cows, J. Vet. Med. Sci. 68: 1161-1166.
  19. Riollot, C., Rainard, P. and Poutrel, B. 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus*

- aureus infection. *J. Dairy Sci.* 84: 1077-1084.
20. Rubér, M., Berg, A., Ekerfelt, C., Olaison, G. and Andersson, R.E. 2006. Different cytokine profiles in patients with a history of gangrenous or phlegmonous appendicitis. *Clin. Exp. Immunol.* 143: 117-124.
21. Takada, M., Nadeau, K.C., Hancock, W.W., Mackenzie, H.S., Shaw, G.D., Waaga, A.M., Chandraker, A., Sayegh, M.H. and Tilney, N.L. 1998. Effects of explosive brain death on cytokine activation of peripheral organs in the rat. *Transplantation* 65: 1533-1542.
22. Targowski, S.P. and Klucinski, W. 1983. Reduction in mitogenic response of bovine lymphocytes by ketone bodies. *Am. J. Vet. Res.* 44: 828-830.
23. Toft, P., Hokland, M., Hansen, T.G. and Tønnesen, E. 1995. Changes in lymphocyte subpopulations and adhesion/activation molecules following endotoxemia and major surgery. *APMIS.* 103: 261-266.

## Immune Condition in the Cases of Dairy Cows with Abomasum Displacement

Emi Takei, Ayako Takeda, Koida Ayumu, Hiromichi Ohtsuka, Takaaki Ando,

Masayuki Kohiruimaki, Hikaru Sato and Toshihide Kato

School of Veterinary Medicine, Kitasato University, Towada, Aomori 034-8628.

### [ABSTRACT]

To clarify the immune condition in the dairy cows with abomasum displacement (DA), we analyzed peripheral leukocyte population and cytokines mRNA expression. Twenty-six dairy cows with DA were used in this study, and these cows were divided two groups; right side DA (RDA group, N=8) and left side DA (LDA group, N=18), and healthy dairy cows bred in same herd of DA cows (Control group, N=15). Blood samples were collected, and WBC, total ketone body, cortisol, leukocyte population and cytokines mRNA were analyzed. Serum cortisol concentration in RDA group tended to high compared to that in LDA group. Lower numbers of CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T cells and MHC class II<sup>+</sup>CD14<sup>-</sup> B cell in RDA were observed and there were significant low these cells in two DA groups compared to Control group. The levels of IFN- $\gamma$  and IL-4 mRNA in two DA groups tend to higher compared to control group. The results were suggested that peripheral T cells and B cells were decreased and cytokines mRNA expression enhanced in the cows with DA.

【Key Word: abomasums displacement, cortisol, dairy cow, immune condition】