

原著論文

乳牛に対する乾乳期前の削蹄が周産期の免疫機能に与える影響

安藤貴朗¹⁾★ 大塚浩通²⁾ 小比類巻正幸³⁾ 渡辺大作²⁾ 小岩政照¹⁾

1) 酪農学園大学獣医学部 (〒069-8501 北海道江別市文京台緑町 582)

2) 北里大学獣医学部 (〒034-8628 青森県十和田市東 23 番町 35-1)

3) 小比類巻家畜診療サービス (〒039-2683 青森県上北郡東北町字大平 63-3)

★連絡担当者：安藤貴朗

Tel : 011-388-4899

Fax : 011-386-2455

e-mail : ando@rakuno.ac.jp

【要約】

乾乳前の削蹄が周産期の免疫機能に及ぼす影響について調べるため、分娩 79.6 ± 8.6 日前に削蹄を行った乳牛 6 頭を削蹄群、無処置の 6 頭を対照群として用いた。血液は分娩前 90 日から分娩後 90 日を 6 期間に分けてそれぞれ採取し、コルチゾール濃度の測定および末梢血白血球サブポピュレーションの解析に用いた。Glu 濃度は、分娩前後で削蹄群が有意な高値を示し、NEFA 濃度は分娩後 15 日～30 日で対照群が有意な高値を示した。コルチゾール濃度は、分娩前 30 日～8 日および分娩後 61～90 日で対照群が有意な高値を示した。末梢血中 CD3⁺細胞数、CD4⁺細胞数、WC1⁺細胞数および MHCclass II⁺CD14⁺細胞数は削蹄群が分娩前後で有意な高値を示した。また、MHCclass II⁺CD14⁺細胞数は分娩後に削蹄群で有意な高値を示した。これらの結果から、乾乳前の削蹄はストレスを軽減する効果があり、周産期の乳牛における T 細胞数、B 細胞数、単球数の減少を抑える可能性が示唆された。

【キーワード：乳牛，削蹄，白血球サブポピュレーション，栄養，周産期】

【はじめに】

近年、酪農経営の規模拡大と高泌乳化が進む一方で、代謝病、乳房炎、繁殖障害、運動器病などの生産病と呼ばれる疾病が増加しており、それに伴い乳牛の供用年数の短縮と死廃および病傷事故の増加がクローズアップされている。乳牛では、分娩前後において免疫機能が抑制されることが報告されている [6]。これらの原因については不明な点もあるが、飼養管理、給与飼料、内分泌的变化などが要因であると考えられている [B]。乾乳期の牛の栄養状態は泌乳期の生産性に深く関与しており、この時期の飼養

管理は泌乳初期の代謝性疾患および感染症の発生に大きく関与している [12]。泌乳初期の、lipidosis や ketosis などの代謝性疾患や、様々なストレスによる負のエネルギーバランスは、乳牛の白血球機能を低下させる [5, 15, 16]。牛において、分娩前後にみられる乳房炎や産褥熱などの炎症性疾患の発生には、白血球機能の低下が深く関与していることが指摘されている [10]。周産期の乳牛では、生理的な変化として T 細胞数の減少が報告されており [4]、このことが周産期の易感染性と密接に関わっていると考えられている。牛に対する削蹄は、蹄型を維

持することにより歩行および起立時の快適性を向上すると報告されている [13]。また、削蹄による負重機能や姿勢の改善は、採食量を増加させることで第1胃発酵が改善することが指摘されている [9]。これらのことは、削蹄による負重機能の改善は牛の快適性向上によりストレスを軽減させ、また採食量を増加させることにより免疫機能を高める可能性があることを示している。本研究は、乾乳前の牛に対するストレスの軽減および栄養状態の改善を目的に行った削蹄が、周産期の末梢白血球サブpopulationに与える影響を明らかにする目的で行った。

【材料および方法】

供試牛：青森県の1農場（飼育頭数約150頭、うち搾乳牛約100頭）で、すべての乳期において繋留飼育されているホルスタイン種経産牛12頭を用いた。観察期間は2006年9月から2007年4月とし、12月に分娩予定の牛を供試牛として用いた。すべての牛は調査開始時の臨床検査で肢蹄の異常は認められず、6ヶ月以内に削蹄は実施されていなかったため、後肢外蹄の背壁は9cm以上と過長蹄になっていた。供試牛は、分娩前90～61日（79.6 ± 8.6日）に削蹄を実施された6頭を削蹄群（3.6 ± 1.2歳）、削蹄が実施されなかった6頭を対照群（3.7 ± 0.8歳）とした。削蹄は、熟練した削蹄師1人により同日内に実施し、四肢のすべての蹄をToussaint Ravenの機能的削蹄に準拠して行った。搾乳は午前と午後の1日2回行われ、搾乳前にTMR給与が実施された。飼料設計は削蹄群、対照群ともに同様で、NRC飼養標準（2001）に基づき以前の報告と同様に飼料計算を行った [9]。また供試牛は、分娩2ヶ月前から急速乾乳を行い、搾乳牛と分けて飼育を行った。

試験プロトコール：調査期間は分娩前90日から分娩後90日とし、生理的な変動の大きい分

娩前7日間および分娩後14日間を除いた6期間に分類し、それぞれの期間で体重とBCS（ボディコンディションスコア）の測定、および血液の採取を行った（分娩前90～61日（削蹄前）、分娩前60～31日、分娩前30～8日、分娩後15～30日、分娩後31日～60日、分娩後61日～90日）。血液は毎回14:00～16:00の間（午後の飼料給与および搾乳の前）に頸静脈から採取し、ヘパリンおよびEDTA-2Na添加真空採血管に分注した。ヘパリン血は遠心分離し、血漿を血液生化学検査およびコルチゾール濃度の測定に用いた。また、EDTA-2Na血は総白血球数の測定および白血球サブpopulationの解析に用いた。血漿中の生化学成分の検査は、生化学自動分析装置（AU400、Olympus光学工業株、東京）を用いて、血糖値（Glu）、総コレステロール（T-cho）、尿素窒素（UN）、遊離脂肪酸（NEFA）の測定を行った。血漿中コルチゾール濃度の測定は、以前の報告 [9] に基づき、1次抗体Anti Cortisol-3（コスモ・バイオ株、東京）と2次抗体GOAT ANTI-RABBIT IgG（CHEMICON International, USA）を用いた酵素免疫測定法により測定した。本実験におけるコルチゾール濃度の測定内変動係数は3.27%、測定間変動係数は4.17%であった。白血球表面抗原の解析は以前の報告 [10] に従い実施し、1次抗体として抗CD3（MM1A, VMRD, Pullman, WA, USA）、抗CD4（CACT183A, VMRD）抗CD8（BAT82A, VMRD）、抗WC1（CACTB32A, VMRD）、CD45R（GC6A, VMR）、抗MHC class II（CAT82A, VMRD）および抗CD14（MY-4, Coulter Immunology, Hialeah, Florida, USA）を、2次抗体としてFITC標識抗マウスIgM抗体およびPE標識抗マウスIgG抗体（Durham, NC, USA）を用いた。な

お、各細胞の数値はフローサイトメーター (FACSscan、Becton Dickinson、USA) により測定し、Cell Quest を用いて解析した比率と WBC 値より算出した実数値により求めた。

統計解析：削蹄群と対照群の各成績は、二元配置分散分析法により解析し、有意差が認められた場合には Tukey-Kramer 法により 2 群間の比較を行った。いずれも 5% 以下の危険率で有意差有りとした。また、すべてのデータは平均 ± 標準偏差で表した。

【結果】

試験期間を通じて、両群の牛で治療を必要とする疾患に罹患した牛は認められなかった。また、分娩前後の各期間における体重および BCS に、両群間の差は認められなかった。

Glu 濃度は、分娩前後で削蹄群が有意な高値を示した ($p < 0.05$, Fig.1)。T-cho 濃度および UN 濃度では全期間を通して有意な差は認められなかったが、分娩後には削蹄群で高値を示す傾向にあった。また、NEFA 濃度は分娩後 15 日～30 日では削蹄群ではあまり上昇せず、対照群が有意な高値 ($p < 0.05$) を示した。

コルチゾール濃度は、分娩前 30 日～8 日および分娩後 61～90 日で対照群が有意な高値を示した ($p < 0.05$, Fig.2)。削蹄群では分娩前後を通して対照群に比べて変動は小さく、また低値で推移する傾向にあった。

末梢血中の $CD3^+T$ 細胞数は、分娩前後で削蹄群が高値を示す傾向にあった (Fig.3)。特に、 $CD3^+CD45R^+T$ 細胞数は分娩前 30 日～8 日および分娩後 61～90 日において ($p < 0.05$)、 $CD3^+CD45R^-T$ 細胞数は分娩前 30 日～分娩後 60 日 ($p < 0.05$) において削蹄群が有意な高値を示した。 $CD4^+T$ 細胞数および $WC1^+T$ 細胞数は、分娩前後で削蹄群が対照群に比べて有意な高値を示したが (それぞれ

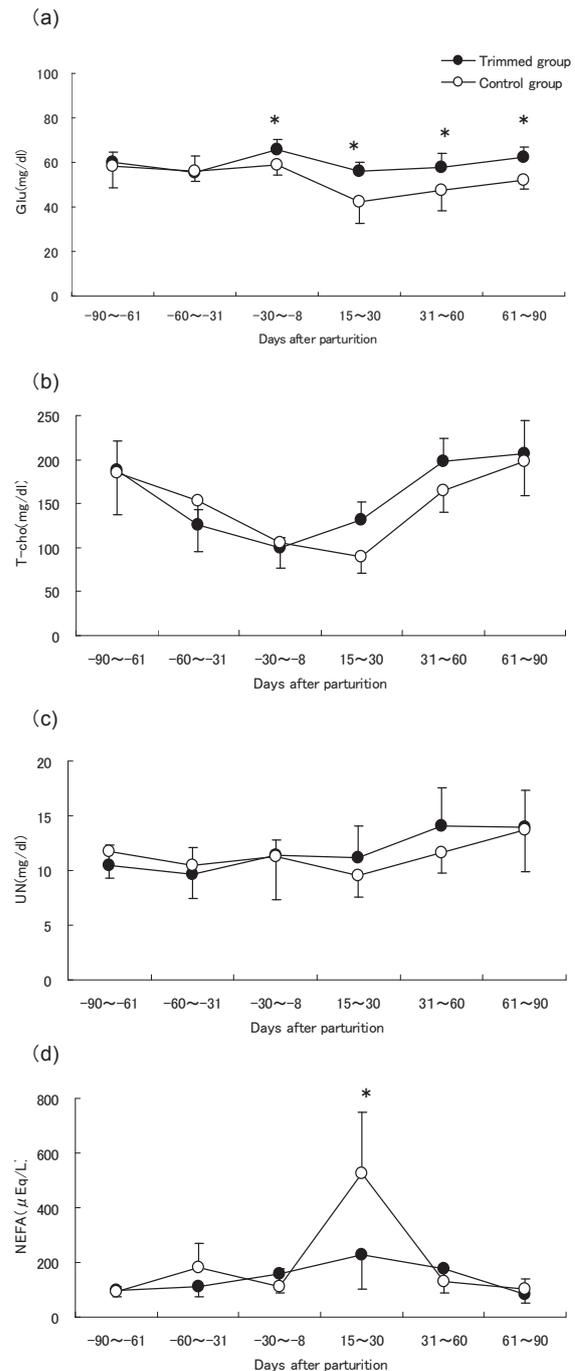


Fig. 1. Change of plasma Glu, T-cho, UN and NEFA concentrations in trimmed group and control group.

(a) Glu. (b) T-cho. (c) UN, (d) NEFA.

* : Significant difference between the both groups ($p < 0.05$).

$p < 0.05$)、 $CD8^+$ T 細胞数は分娩前後で削蹄群と対照群の間に有意な差は認められなかった (Fig. 4)。MHC class II $^+$ CD14 $^+$ 細胞数は分娩前 30~8 日および分娩後 31~60 日 (Fig. 5-a)、MHC class II $^+$ CD14 $^-$ 細胞数は分娩後 31~60 日 (Fig. 5-b)、削蹄群が対照群に比べ有意な高値を示した (それぞれ $p < 0.05$)。

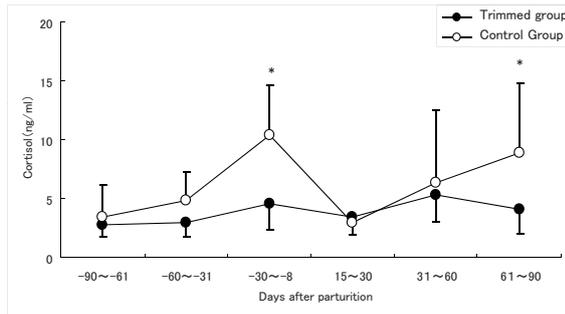


Fig. 2. Comparison of plasma cortisol concentration between the trimmed and control groups.
* : Significant difference between the both groups ($p < 0.05$).

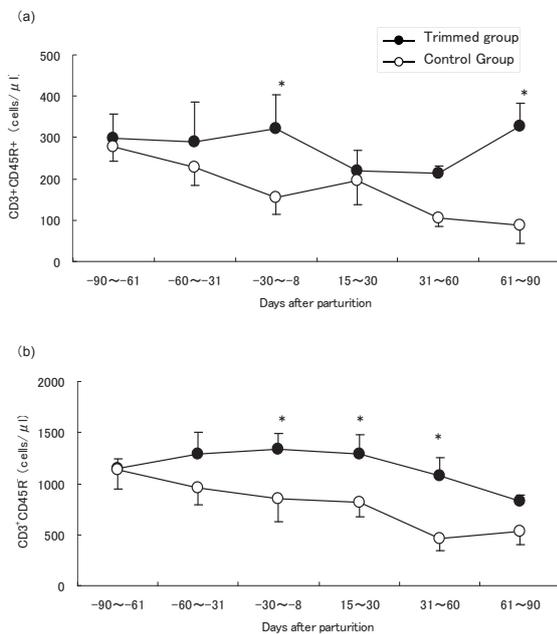


Fig. 3. Change of the number of $CD3^+$ T cells.
(a) $CD3^+CD45R^+$ T cells. (b) $CD3^+CD45R^-$ T cells
* : Significant difference between the both groups ($p < 0.05$).

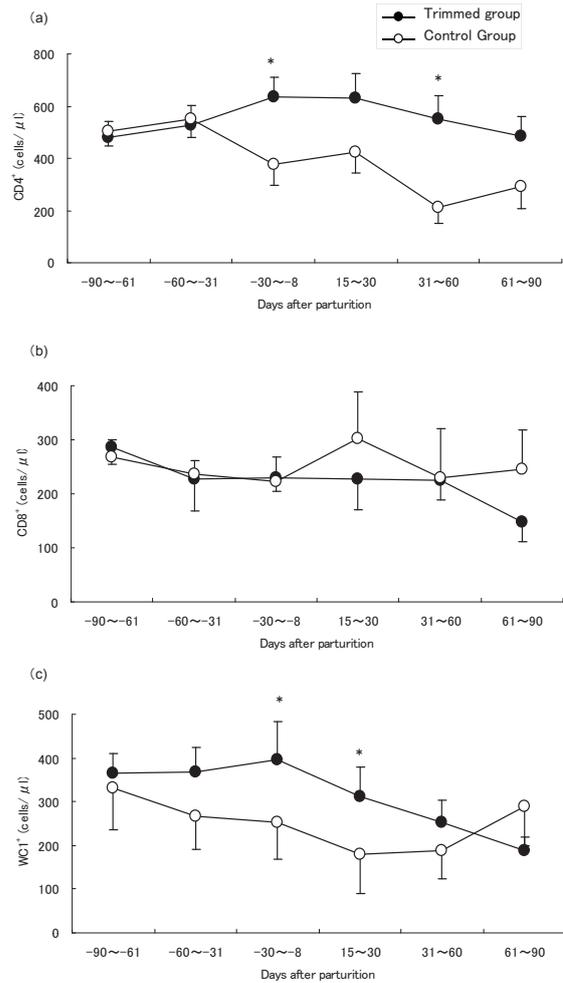


Fig. 4. Change of the number of $CD4^+$ T cells, $CD8^+$ T cells and $WC1^+$ T cells.
(a) $CD4^+$ T cells. (b) $CD8^+$ T cells. (c) $WC1^+$ T cells.
* : Significant difference between the both groups ($p < 0.05$).

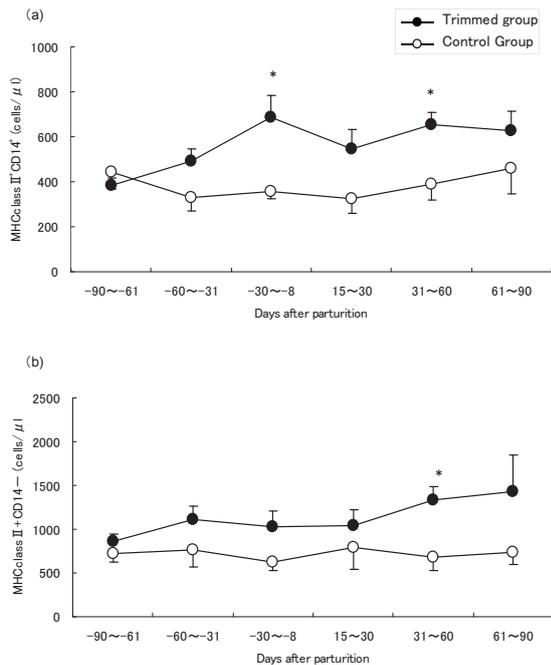


Fig. 5. Change of the number of CD14⁺ and CD14⁻ cells.

(a) MHCclass II⁺CD14⁺ cells. (b)

MHCclass II⁺CD14⁻ cells.

* : Significant difference between the both groups ($p < 0.05$).

【考察】

本研究では、牛に対する削蹄が周産期の免疫機能に与える影響について、末梢血白血球サブpopulationを基に調査を行った。周産期の牛に対する種々のストレスは、採食量を低下させることで負のエネルギーバランスを誘発し、さらに白血球機能を低下させることが報告されている [5]。コルチゾール濃度は、ストレス環境下の牛では高値を示すことからストレス指標として最も頻繁に用いられている。本研究では、コルチゾール濃度は削蹄群では分娩前 30 日～8 日および分娩後 61～90 日で対照群に比べて有意な低値を示した。本研究において、分娩によるコルチゾール濃度の変化が大きいと考えられる分娩前後の期間は観察の対象から除外しており、削蹄群で認められた分娩前 30 日～8 日の低値は、削蹄による負重の安定によるストレス軽減の効果であると推察される。一方、

分娩後 61～90 日でみられた低値は、分娩前のストレス軽減と産褥期の早期回復との関係が示唆されるが、詳細を明らかにするには削蹄効果の持続時間なども含めたさらなる研究が必要である。

CD3⁺細胞は総T細胞数を表しており、本研究ではCD3⁺CD45R⁺T細胞数は分娩前30～8日および分娩後61日～90日において、CD3⁺CD45R⁻T細胞数は分娩前30～8日および分娩後15～60日において削蹄群が対照群に比べ有意な高値を示した。周産期の乳牛では、CD3⁺細胞数の増加と栄養状態の回復は密接にかかわっていると報告されている [4]。これを裏付けるように、分娩前後に低栄養状態であった乳牛では、高栄養状態であった牛と比較してCD3⁺細胞数の回復が遅くなることが報告されている [10]。本研究では、Glu濃度は分娩前30日から分娩後90日にかけて削蹄群が有意な高値を示した。牛が多量の水溶性炭水化物を摂取したとき、ルーメン内にプロピオン酸が増加しGlu濃度の上昇を引き起こすことから、水溶性炭水化物摂取量の指標とすることができる [9]。一方、Glu濃度はストレスによって上昇するが、本研究の削蹄群では分娩後にコルチゾール濃度の上昇は認められていなかったことからストレスによる上昇ではなく、水溶性炭水化物摂取量の増加に起因するものと考えられた。本研究でみられた分娩前後のCD3⁺細胞数の高値も、我々の以前報告 [1]と同様に、乾乳期前の削蹄によるストレス軽減効果によって分娩後の栄養状態が改善したためであると考えられる。CD3⁺CD45R⁻細胞はメモリー型T細胞を、CD3⁺CD45R⁺細胞はナイーブ型T細胞を示しており、胸腺において成熟過程を経た $\alpha\beta$ 型T細胞はナイーブT細胞と呼ばれ、これらがマクロファージや樹状細胞の抗原提示を受けることでメモリーT細胞へと変化する。分娩後のCD45Rは非活性型T細胞に発現しており、T

細胞が活性化されると CD45R の発現は消失するとされている [2]。本研究の結果から、分娩前後のメモリー型の T 細胞の増加は、分娩前のナイーブ型 T 細胞が増加したことに起因すると考えられた。一方、ストレス時に分泌されるコルチゾールには免疫抑制作用、特に CD3⁺T 細胞や CD4⁺T 細胞などの単核球数を減少させる作用があることが知られている [10]。本研究において、削蹄群の分娩前後のコルチゾールの低値と CD3⁺CD45R⁺T 細胞数の高値は一致して認められることから、削蹄群でみられたコルチゾール抑制が、直接的に CD3⁺CD45R⁺T 細胞数の減少を抑制している可能性も示唆された。

α β 型 T 細胞の 1 つである CD4⁺T 細胞は、サイトカインの分泌パターンにより Th1 細胞と Th2 細胞に分類される [8]。Th1 細胞は IL-2 や INF- γ の分泌によって分化誘導され、単球の活性化を促して細胞性免疫を誘導する [17]。一方、Th2 細胞は IL-4 や IL-10 の分泌によって分化誘導され、B 細胞の抗体産生を誘導する液性免疫に関与する。また、 γ δ 型 T 細胞である WC1⁺細胞は、INF- γ や TNF- α などのサイトカインを産生しており [14]、乾乳期に低栄養の飼料を給与した乳牛では高栄養の飼料を給与した牛と比較して細胞数が低下することが報告されている [7]。本研究では、CD4⁺T 細胞数は分娩前 30 ~ 8 日および分娩後 31 ~ 60 日に、WC1⁺T 細胞数は分娩前 30 ~ 8 日および分娩後 15 ~ 30 日に、削蹄群で対照群と比較して高値を示した。本研究では、分娩後 15 ~ 30 日において対照群では NEFA が有意な上昇がみられたのに対し、削蹄群では軽度の上昇にとどまっていた。また、T-cho 濃度および UN 濃度は、分娩後には削蹄群で高値を示す傾向を示した。さらにこれらの期間では、コルチゾール濃度は削蹄群が低値を示していることから、削蹄群ではストレス減少により栄養状態が改善し

たことにより、対照群と比較して Th1 細胞が優位な状態であると推察される。さらに本研究では、活性型単球を表す MHC class II⁺CD14⁺細胞数も CD4⁺T 細胞数と同様に、分娩前 30 ~ 8 日および分娩後 31 ~ 60 日に削蹄群で有意な高値を示した。Th1 細胞や WC1⁺T 細胞数から分泌される INF- γ は、MHCclass II 発現の誘導および活性化因子となり、この活性型単球が T 細胞に抗原提示をするとともに腫瘍壊死因子 (TNF) - α などのサイトカインを産生し、T 細胞を活性化することで免疫反応を促進する [3, 17]。これらの結果から、削蹄群ではストレスの影響による Th1 細胞の減少を抑制し、また栄養状態を改善することで WC1⁺T 細胞数の減少を防ぐことにより、細胞性免疫機能を維持している可能性がある。

我々の以前の研究では、乳牛における周産期の低栄養状態は B 細胞数を減少させることを明らかにしている [11]。本研究では、B 細胞を表す MHC class II⁺CD14⁻細胞数が削蹄群で分娩後 31 ~ 60 日に有意な高値を示した。B 細胞は抗体を産生して細胞外に分泌することで非自己を認識するため、本研究でみられた分娩後の MHC class II⁺CD14⁻細胞数の増加は、液性免疫機能の維持に関与していると推察される。B 細胞の抗体産生は Th2 細胞により誘導されることから、分娩後 31 ~ 60 日で見られた CD4⁺T 細胞数の増加は、Th1 細胞のみでなく Th2 細胞も増加した結果である可能性も考えられる。これら分娩後にみられた CD4⁺T 細胞数の増加と、MHC class II⁺CD14⁺細胞数や MHC class II⁺CD14⁻細胞数の関係を解明するためには、今後サイトカイン分泌パターンの解析などを含めた検討が必要である。

本研究から、乾乳前の削蹄は周産期の乳牛におけるストレスを軽減および栄養状態を改善することで T 細胞数、B 細胞数、単球数の減少を抑制することが明らかとなった。今後は、削蹄

が免疫機能に及ぼす影響を明らかにするため、削蹄効果の持続時間や周産期以外での白血球サブポピュレーションの解析、サイトカイン分泌との関連なども含めたより総合的な調査を行う必要がある。

[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. Bembridge, G. P., Parsons, K. R., Sopp, P., MacHugh, N. D. and Howard, C. J. 1993. Comparison of monoclonal antibodies with potential specificity for restricted isoforms of the leukocyte common antigen (CD45R). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 39: 129-136.
3. Jungi, T. W., Bricic, M., Sager, H., Dobbelaere, D. A., Furger, A. and Roditi, I. 1997. Antagonistic effects of IL-4 and interferon-gamma (IFN-gamma) on inducible nitric oxide synthase expression in bovine macrophages exposed to gram-positive bacteria. *Clin. Exp. Immunol.* 109: 431-438.
4. Kimura, K., Goff, J. P., Kehrl, M. E. Jr. and Harp, J. A. 1999. Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 82: 315-319.
5. Kimura, K., Reinhardt, T. A. and Goff, J. P. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89: 2588-2595.
6. Mallard, B. A., Dekkers, J. C., Ireland, M. J., Leslie, K. E., Sharif, S., Vamkampen, C. L., Wagter, L. and Wilkie, B. N. 1998. Alteration in immune responsiveness during the peripartum period and its ramification in dairy cows and calf health. *J. Dairy. Sci.* 81: 585-595.
7. Meglia, G. E., Johannisson, A., Agenäs, S., Holtenius, K. and Persson, K. W. 2005. Effects of feeding intensity during the dry period on leukocyte and lymphocyte sub-populations, neutrophil function and health in periparturient dairy cows. *Vet. J.* 169: 376-384.
8. Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, E. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.* 136: 2348-2357.
9. Nishimori, K., Okada, K., Ikuta, K., Aoki, O., Sakai, T. and Yasuda, J. 2006. The effects of one-time hoof trimming on blood biochemical composition, milk yield, and milk composition in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 267-270.
10. Ohtsuka, H., Koiwa, M., Fukuda, S., Hayashi, T., Hoshi, F., Yoshino, T. and Kawamura, S. 2004. Changes in peripheral leukocyte subsets in dairy cows with inflammatory diseases after calving. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 905-909.
11. 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 conditions against the changes in peripheral blood mononuclear cells of periparturient dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 1161-1166.
12. Rukkwamsuk, T., Kruip, T. A. M. and Wensing, T. 1999. Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet. Quarterly.* 21: 71-77.
13. Sogstad, A. M., Østerås, O., Fjeldaas, T. and Refsdal, A. O. 2007. Bovine Claw and Limb Disorders at Claw Trimming Related to Milk Yield: *J. Dairy Sci.* 90: 749-759.
14. Sopp, P. and Howard, C. J. 2001. IFN γ and IL-4 production by CD4, CD8 and WC1 $\gamma \delta$ TCR⁺ T cells from cattle lymph nodes and blood. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81: 85-96.
15. Suriyasathaporn, W., Daemen, A. J., Noordhuizen-Stassen, E. N., Dieleman, S. J., Niele, M. and Schukken, Y. H. Beta-hydroxybutyrate levels in peripheral blood and ketone bodies supplement in culture media affect the in vitro chemotaxis of bovine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 68: 177-186.
16. Wetink, G. H., Rutten, V. P. M. G., van den Ungh, T. S. G. A. M., Hock, A., Muller, K. E. and Wensing, T. H. 1997. Impaired specific immunoreactivity in cows with hepatic lipidosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 56: 77-83.
17. Young, H. A. and Hardy, K. J. 1995. Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J. Leukoc. Biol.* 58: 373-381.

Effect of the Hoof Trimming before Dry Period on Immune Function in Perinatal Dairy Cows

Takaaki Ando [★], Hiromichi Ohtsuka, Masayuki Kohirumaki,
Daisaku Watanabe and Masateru Koiwa

[★]*School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, 582 Midori-cho, Bunkyo-dai,
Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan*

[Abstract]

To investigate the effect of hoof trimming before drying period on immune function in dairy cattle, 6 cows (trimmed group) were trimmed at 79.6 ± 8.6 days before parturition and the hooves of 6 cows were left untrimmed (control group). Blood samples were taken monthly between 90 days before and 90 days after parturition in each group, and used for measuring of the plasma cortisol concentrations and peripheral leukocyte subpopulation. Between 15 and 30 days after parturition, non-esterified fatty acids were significantly lower, and plasma glucose was significantly higher in the trimmed group before and after parturition. Plasma cortisol concentrations and the number of CD3⁺ T cells, CD4⁺ T cells, WC1⁺ T cells and MHCclass II⁺CD14⁺ cells in trimmed group were showed significantly higher before and after parturition than those in control group. The number of MHCclass II⁺CD14⁻ cells after parturition showed significant increasing in trimmed group. These results suggested that hoof trimming before dry period in dairy cows reduced stress and prevented sequentially reducing of the number of T cells, B cells and monocyte in perinatal period.

【Key words : dairy cow, hoof trimming, leukocyte subpopulation, nutrition, periparturient period】