

原著論文

## 黒毛和種肥育牛における導入後の除角時期の違いが 末梢血免疫細胞数に及ぼす影響

高橋知也<sup>1\*</sup> 松田敬一<sup>2)</sup> 高橋史昭<sup>3)</sup> 前田洋佑<sup>3)</sup> 大塚浩通<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> 宮城県農業共済組合 県北家畜診療センター

<sup>2)</sup> 宮城県農業共済組合 家畜診療研修所

<sup>3)</sup> 北里大学獣医学部

<sup>4)</sup> 酪農学園大学獣医学部

\* 連絡担当者：高橋知也

〒 987-0511 宮城県登米市迫町佐沼字中江 1-3-1

TEL：0220-22-2790

FAX：0220-22-2791

E-mail：tomoya@nosaimiyagi.or.jp

### 【要 約】

黒毛和種肥育牛の導入後の除角は有益だが、疼痛ストレスから呼吸器症候群を招く恐れがある。本試験では導入後の除角時期の違いが末梢血免疫細胞数に及ぼす影響を調査した。管内3農家で除角を実施した黒毛和種肥育牛21頭を供試し、導入後約16日に除角した5頭をDay 16群（導入後平均16.4 ± 標準偏差3.3日）、導入後約50日に除角した8頭をDay 50群（導入後50.5 ± 2.8日）、導入後約75日に除角した8頭をDay 75群（導入後75.0 ± 1.9日）とした。除角実施3日前、除角実施直後、除角実施3日後および除角実施7日後の各群の末梢血免疫細胞数の推移を比較した。ヘルパーT細胞数およびB細胞数は群間に有意差が認められ、いずれも除角実施3日後でDay 75群はDay 16群と比較して有意な高値を示した。WBC、Gran、総成熟T細胞数、キラーT細胞数および $\gamma\delta$ T細胞数は群間に有意差は認められなかったが、Day 50群およびDay 75群で除角実施直後から除角実施3日後にかけて増加する傾向がみられた。NK細胞数は群間に有意差が認められ、除角実施7日後でDay 75群はDay 16群およびDay 50群と比較して有意な高値を示した。除角実施直後から除角実施3日後の一過性のリンパ球数増加は急性ストレス反応であり、除角実施7日後のNK細胞数の増加は壊死した細胞を除去する免疫応答であることが推測された。また除角時の導入後日数が短い牛ほど移動や群飼等の慢性ストレスからこれら生理的な免疫応答が十分に反応しないことが推測された。

**キーワード**：急性ストレス、慢性ストレス、除角、免疫細胞、黒毛和種肥育牛

### 緒論

近年の肥育農家の多頭化経営に伴い、飼養管理や枝肉成績の向上を目的として導入後の除角実施が増加している。除角を実施することで畜

主が角を気にせず安心して飼養管理が行える利点のほかに、群飼によって生じる強弱による発育の遅れの防止や角による挫傷の減少等から枝肉成績の向上が報告されている [9, 16]。しかしながら除角が要因となって呼吸器症候群の発生リスクが上昇すると考えられている [5]。黒毛和種肥育牛の呼吸器症候群は、その後の肥育

受理：2020年8月7日

成績に悪影響を及ぼすほか、治療費用による経済的負担や最悪死亡事故を招く恐れもあり、肥育経営上、大きな問題となっている [15]。以上のことから、有益な経済効果をもたらす除角において有効な事故防止策を講じることは重要であると考えられる。

黒毛和種肥育牛においてストレスにより分泌されたコルチゾールは免疫力を抑制することが知られており [17]、また導入時において移動ストレスにより末梢血免疫細胞数が低下して免疫機能が弱化的ることが報告されている [11]。以上のことから我々は除角時に生じる疼痛ストレスが起因して、末梢血免疫細胞数が低下する仮説を立てた。さらに導入直後の肥育素牛において末梢血免疫細胞数の回復に 21 日以上要する報告もあり [12]、導入後の除角時期の違いから末梢血免疫細胞数に及ぼす影響が変化する可能性も考えられる。本試験では導入後の除角時期の違いが末梢血免疫細胞数に及ぼす影響を

調査した。

## 材料と方法

### 供試牛および調査方法：

調査期間は平成 25 年 6 月から平成 26 年 9 月までとし、宮城県内の 3 肥育農家（A、B および C 農家）で導入後の除角を実施した臨床的に健康な黒毛和種肥育牛 21 頭を供試した。供試牛の詳細は表 1 に示した通りである。導入後約 16 日経過してから除角した 5 頭を Day 16 群（導入後平均  $16.4 \pm$  標準偏差 3.3 日）、導入後約 50 日経過してから除角した 8 頭を Day 50 群（導入後  $50.5 \pm$  2.8 日）、導入後約 75 日経過してから除角した 8 頭を Day 75 群（導入後  $75.0 \pm$  1.9 日）とした。各農家の供試牛における飼料内容の詳細は表 2 に示した通りであった。飲水はウォーターカップにて自由飲水とした。除角実施 3 日前、除角実施直後、除角実施 3 日後、および除角実施 7 日後に採血を実施し、

表1 供試牛の概要

No	農家	性別	除角時の 日齢	除角時の 導入後日数	群
1	A	去勢	284	20	Day 16
2	A	去勢	293	20	
3	C	去勢	296	14	
4	C	去勢	333	14	
5	C	去勢	307	14	
			<b><math>302.6 \pm 18.9</math></b>	<b><math>16.4 \pm 3.3</math></b>	
6	A	去勢	317	49	Day 50
7	A	去勢	320	49	
8	A	去勢	324	49	
9	A	去勢	307	49	
10	B	去勢	312	49	
11	B	去勢	361	55	
12	B	去勢	354	55	
13	C	去勢	358	49	
			<b><math>331.6 \pm 22.2</math></b>	<b><math>50.5 \pm 2.8</math></b>	
14	A	去勢	332	74	Day 75
15	A	去勢	335	74	
16	A	去勢	344	74	
17	A	去勢	392	74	
18	B	去勢	385	74	
19	B	去勢	329	74	
20	C	去勢	411	78	
21	C	去勢	396	78	
			<b><math>365.5 \pm 33.7</math></b>	<b><math>75.0 \pm 1.9</math></b>	
平均値 ± 標準偏差					

表2 A、BおよびC農家における1日の飼料給餌内容

給与飼料名	A農家 給与量 (kg)	B農家 給与量 (kg)	C農家 給与量 (kg)
配合飼料 (TDN : 68%以上、CP : 14%以上、 VA : 3,200 IU/kg)	4	4	4
チモシー乾草	2	2	2
稲わら	2	2	2
ヘイキューブ	1		
大豆粕		0.5	0.5
飼料養分含量 (乾物中%)			
TDN	63.3	65.3	65.3
CP	12.7	14.7	14.7
NDF	39.2	37.3	37.3

各群の除角前後の末梢血免疫細胞数および血液生化学検査結果の推移を比較した。

#### 除角方法：

除角方法は、保定してから身体検査にて健康上問題ないことを確認したのち、キシラジン(セデラック2%注射液、ゼノアック、福島)を0.05 mg / kgの容量で頸部筋肉注射にて鎮静処置後、両側の角基部と外眼角を結ぶ線上の中央付近に塩酸プロカイン(動物用塩プロ注「KS」、共立製薬株式会社、東京)左右各10 mlの皮下注射処置し、角神経ブロックを行った。続いて両側の角基部にゴムバンドを巻いて駆血した後、油圧式除角器(油圧式除角器、オバヤナ・セメンテックス株式会社、愛知)を用いて角基部から5 cmの部位で切断した。切断面に生石灰乳を塗布後、除角用焼烙こて(ニューこてじゅう、富士平工業、東京)を用いて焼烙止血した。

#### 採血および血液検査方法：

供試牛の血液は頸静脈より血清分離剤入真空採血管(ベノジェクトII真空採血管VP-

ASI09K、テルモ株式会社、東京)およびEDTA加真空採血管(ベノジェクトII真空採血管VP-DK052K、テルモ株式会社、東京)を用いて採取した。得られたEDTA血からは、白血球数(WBC)の測定および末梢血免疫細胞数の測定を実施した。WBCの測定は、自動血球計算装置(PC607、ERMA社、ドイツ)を用いて行った。間接蛍光抗体法による白血球表面抗原解析は、採材後に約4℃で冷蔵保存した材料を用いて24時間以内にWyattら[20]の方法に準じてフローサイトメーター(FACScan, Becton Dickinson, U.S.A.)により実施した。本解析のウシー次抗体はCD3(MMIA, VMRD, U.S.A.)、CD4(CACT183B, VMRD, U.S.A.)、CD8(9ACT80C, VMRD, U.S.A.)、T cell receptor (TCR) 1-N12(CACT61A, VMRD, U.S.A.)、MHC class- II (TH14B, VMRD, U.S.A.)、およびCD335(MCA2365, AbDserotec, U.S.A.)を用いた。このうちMHC class- IIには蛍光強度が異なる2種類の陽性細胞群が存在したため、過去の報告[19]と同様、蛍光度弱陽性のMHC class-

II<sup>+low</sup> と蛍光度強陽性の MHC class- II<sup>+high</sup> に分類した。サイトグラムの結果から WBCのうち、単球およびリンパ球で構成される単核球数 (PBMC) とそれ以外の白血球で構成される顆粒球数 (Gran) に分類した。各表面抗原の陽性率と WBC の実測値を用いて各表面抗原陽性細胞数を算出した。CD3 陽性細胞数を総成熟 T 細胞数、CD4 陽性細胞数をヘルパー T 細胞数、CD8 陽性細胞数をキラー T 細胞数、TCRI-N12 陽性細胞数を  $\gamma\delta$ T 細胞数、MHC class- II 弱陽性細胞数を単球数、MHC class- II 強陽性細胞数を B 細胞数、および CD335 陽性細胞数を NK 細胞数とした。

血清分離剤入真空採血管は冷蔵保存後、採血から 1 時間以内に遠心分離機 (ヘマトクリット遠心機センテック 3220、久保田商事株式会社、東京) を用い、1700 × g で 10 分にて血清分離を行った。得られた血清から、ビタミン A (VA)、ビタミン E (VE)、コルチゾール (Corti)、および総コレステロール (T-cho) を測定した。VA および VE は逆相高速液体クロマトグラフィー法を用いて測定した。Corti は全自動化学発光酵素免疫測定装置 (Access2、ベックマン・コールター株式会社、東京) を用い、化学発光酵素免疫法で測定した。T-cho は生化学自動分析装置 (Dimension RL Max、シーメンス株式会社、東京) を用い、酵素法で測定した。

#### 統計方法：

測定値は平均値 ± 標準偏差 (SD) で示した。群間の統計的有意差を評価するために、反復測定二元配置分散分析を行った。群間に有意差が認められた場合、Turkey's multiple comparisons test による単純主効果検定を行い、各要因における主効果の検出を行った。また、各群の除角実施 3 日前とその後の測定値との比較は一元配置分散分析を行った。有意差が認められた場合、Dunn's multiple comparisons test による多重比較を実施した。各統計結果において、危険率 5% 未満を有意差ありとした。

#### 結果

除角実施前後における各群の末梢血免疫細胞数の推移を表 3 に示した。WBC は群間に有意な差は認められなかったが、Day 50 群におい

て除角実施 3 日前と比較して除角実施 3 日後で有意に増加した。Gran は群間に有意な差は認められなかったが、Day 50 群において除角実施 3 日前と比較して除角実施 3 日後で有意に増加した。総成熟 T 細胞数は群間に有意な差は認められなかったが、Day 75 群において除角実施 3 日前と比較して除角実施直後および除角実施 3 日後で有意に増加した。ヘルパー T 細胞数は群間に有意な差が認められ、除角実施 3 日後において、Day 75 群は Day 16 群と比較して有意な高値を示した。さらに Day 75 群において除角実施 3 日前と比較して除角実施 3 日後で有意に増加した。キラー T 細胞数は群間に有意な差は認められなかったが、Day 75 群において除角実施 3 日前と比較して除角実施直後および除角実施 3 日後で有意に増加した。 $\gamma\delta$ T 細胞数は群間に有意な差は認められなかったが、Day 50 群において除角実施 3 日前と比較して除角実施直後および除角実施 3 日後で有意に増加した。Day 75 群において除角実施 3 日前と比較して除角実施直後で有意に増加した。B 細胞数は群間に有意な差が認められ、除角実施 3 日後において、Day 75 群は Day 16 群と比較して有意な高値を示した。また、Day 16 群において除角実施 3 日前と比較して除角実施直後で有意に減少した。Day 75 群において除角実施 3 日前と比較して除角実施 3 日後で有意に増加した。NK 細胞数は群間に有意な差が認められ、除角実施 7 日後において、Day 75 群は Day 16 群および Day 50 群と比較して有意な高値を示した。また、Day 75 群において除角実施 3 日前と比較して除角実施 7 日後で有意に増加した。PBMC および単球数に関しては有意な変化は認められなかった。

除角実施前後における各群の血液生化学検査結果の推移を表 4 に示した。VA は群間に有意な差は認められなかったが、Day 75 群において除角実施 3 日前と比較して除角実施 3 日後で有意に減少した。Corti は群間に有意な差は認められなかったが、全ての群において除角実施 3 日前と比較して除角実施直後で有意に増加した。T-cho は群間に有意な差は認められなかったが、Day 16 群において除角実施 3 日前と比較して除角実施 3 日後および除角実施 7 日後で有意に減少した。VE に関しては有意な変化は

表3 各群における免疫細胞数の推移

項目	群	除角実施3日前	除角実施直後	除角実施3日後	除角実施7日後
WBC (/μl)	Day 16	7420.0 ± 2132.4	6600.0 ± 2346.3	7120.0 ± 1804.7	8374.0 ± 1472.7
	Day 50	7250.0 ± 2949.6	7712.5 ± 1413.6	10935.0 ± 3439.1 *	8825.0 ± 1375.0
	Day 75	6836.3 ± 2583.1	7287.5 ± 1725.0	8850.0 ± 2211.0	8718.8 ± 1850.1
PBMC (/μl)	Day 16	4023.6 ± 1263.3	3202.2 ± 1040.5	2924.4 ± 835.5	3226.6 ± 597.4
	Day 50	3642.3 ± 2255.0	3838.6 ± 886.6	4633.9 ± 1246.0	4372.8 ± 1255.2
	Day 75	2794.0 ± 1158.4	4119.0 ± 2179.6	4863.3 ± 2025.8	3856.0 ± 1125.9
Gran (/μl)	Day 16	3396.4 ± 1052.8	3397.8 ± 1333.5	4195.6 ± 1088.1	5147.4 ± 1010.3
	Day 50	3607.7 ± 1835.0	3873.9 ± 1843.2	6301.1 ± 4120.3 *	4452.2 ± 921.7
	Day 75	4042.3 ± 1775.7	3168.5 ± 2659.8	3986.7 ± 1639.4	4862.7 ± 2321.6
総成熟T細胞数 (/μl)	Day 16	1336.2 ± 430.6	1464.0 ± 535.6	1057.2 ± 602.6	1134.9 ± 350.4
	Day 50	991.5 ± 422.7	1844.6 ± 595.0	1685.6 ± 650.8	1648.8 ± 674.5
	Day 75	841.8 ± 421.9	1823.3 ± 980.1 *	1852.5 ± 1078.5 *	1150.1 ± 405.5
ヘルパーT細胞数 (/μl)	Day 16	547.7 ± 196.0	465.2 ± 164.0	305.4 ± 160.2 <sup>a)</sup>	369.7 ± 102.5
	Day 50	355.8 ± 170.0	491.5 ± 206.7	448.1 ± 164.5	500.3 ± 204.5
	Day 75	307.7 ± 156.5	490.7 ± 198.6	584.0 ± 311.6 <sup>* b)</sup>	380.4 ± 119.5
キラーT細胞数 (/μl)	Day 16	404.0 ± 135.1	364.7 ± 98.6	300.2 ± 141.6	283.2 ± 63.6
	Day 50	254.9 ± 112.6	486.2 ± 244.1	326.2 ± 96.7	373.0 ± 151.2
	Day 75	289.1 ± 154.5	524.8 ± 277.7 *	516.8 ± 305.6 *	373.4 ± 163.4
γδT細胞数 (/μl)	Day 16	549.8 ± 275.9	810.9 ± 577.7	604.6 ± 428.8	673.8 ± 202.1
	Day 50	336.6 ± 136.0	1032.6 ± 533.4 **	836.5 ± 403.0 *	695.6 ± 363.6
	Day 75	233.8 ± 125.4	774.2 ± 450.5 *	673.4 ± 360.6	462.1 ± 216.1
単球数 (/μl)	Day 16	632.7 ± 346.2	683.2 ± 247.0	819.9 ± 433.4	698.1 ± 205.2
	Day 50	854.4 ± 564.8	820.5 ± 309.4	1107.2 ± 452.7	690.6 ± 252.8
	Day 75	562.6 ± 362.7	643.8 ± 360.3	837.9 ± 387.1	512.5 ± 317.5
B細胞数 (/μl)	Day 16	1425.4 ± 582.8	649.8 ± 293.9 *	911.9 ± 189.8 <sup>a)</sup>	1012.5 ± 219.8
	Day 50	1632.7 ± 1454.4	1120.9 ± 398.1	1899.6 ± 1185.6	1920.2 ± 794.9
	Day 75	1217.8 ± 563.4	1482.7 ± 1127.7	2336.8 ± 1074.5 <sup>** b)</sup>	1832.8 ± 816.3
NK細胞数 (/μl)	Day 16	289.6 ± 142.6	259.6 ± 103.7	226.7 ± 96.4	307.9 ± 284.4 <sup>A)</sup>
	Day 50	202.9 ± 117.2	239.0 ± 103.7	210.9 ± 72.2	376.6 ± 172.8 <sup>A)</sup>
	Day 75	166.8 ± 93.2	219.6 ± 108.2	264.8 ± 133.2	774.1 ± 455.0 <sup>** B)</sup>

平均値 ± 標準偏差

\* : p < 0.05 vs 除角実施3日前      \*\* : p < 0.01 vs 除角実施3日前

異符号間は群間で交互作用が認められた場合の有意差を示す (A-B : p < 0.01, a-b : p < 0.05)。

認められなかった。

### 考察

Day 50 群および Day 75 群において WBC、Gran、総成熟 T 細胞数、ヘルパー T 細胞数、キラー T 細胞数、γδT 細胞数および B 細胞数

が除角実施3日前と比較して除角実施直後から除角実施3日後にかけて増加する傾向がみられた。一方で Day 16 群において、これら末梢血免疫細胞数は増加せず、ヘルパー T 細胞数および B 細胞数は除角実施3日後において Day 75 群と比較して有意な低値を示した。Day 50

表4 各群における血液生化学検査結果の推移

項目	群	除角実施3日前	除角実施直後	除角実施3日後	除角実施7日後
VA (IU/dl)	Day 16	140.0 ± 43.0	153.0 ± 45.4	149.6 ± 48.7	150.0 ± 30.9
	Day 50	162.5 ± 39.6	161.3 ± 37.7	146.0 ± 36.3	137.0 ± 37.0
	Day 75	160.1 ± 54.2	149.3 ± 43.0	126.0 ± 43.0 *	142.8 ± 46.9
VE (µg/dl)	Day 16	218.7 ± 65.7	209.6 ± 43.1	198.7 ± 32.4	210.8 ± 60.9
	Day 50	204.9 ± 63.6	201.3 ± 74.9	188.0 ± 93.1	193.8 ± 88.3
	Day 75	225.1 ± 96.4	224.8 ± 97.0	218.0 ± 106.5	239.6 ± 108.3
Corti (µg/dl)	Day 16	1.9 ± 0.7	5.3 ± 0.4 *	1.7 ± 1.3	2.3 ± 0.9
	Day 50	0.6 ± 0.3	4.7 ± 1.1 **	2.1 ± 1.6	0.9 ± 0.7
	Day 75	0.9 ± 0.7	4.4 ± 1.3 **	1.1 ± 0.6	1.0 ± 1.1
T-cho (mg/dl)	Day 16	107.2 ± 30.8	98.4 ± 25.7	93.6 ± 21.5 *	88.0 ± 24.7 *
	Day 50	93.9 ± 25.1	89.3 ± 23.8	91.5 ± 25.5	92.8 ± 30.8
	Day 75	106.3 ± 28.8	102.8 ± 27.2	104.8 ± 30.5	109.3 ± 33.3

平均値 ± 標準偏差

\* : p < 0.05 vs 除角実施 3 日前

\*\* : p < 0.01 vs 除角実施 3 日前

群および Day 75 群の結果は除角後の末梢血免疫細胞数が減少するという我々の予測に反した。ヒト医学領域では急激なストレスが加わることで交感神経優位となり好中球を主とした顆粒球が増加することが報告されている [2] ほか、急性ストレスにより一過性に免疫機能が亢進しキラー T 細胞を中心としたリンパ球数の増加が報告されている [10]。実際に乳用子牛の除角実施後においても好中球の増加が認められている [4]。一方で慢性ストレスは細胞性免疫および液性免疫の機能低下を引き起こすと考えられている [7]。以上より除角による疼痛ストレスは急性ストレスであり、リンパ球を中心とした末梢血免疫細胞数の増加に至った可能性が示唆された。また、Day 16 群において除角後にリンパ球数が増加しなかった要因は、導入後間もなく、移動や群飼といった慢性ストレスにより免疫機能が低下し、十分に免疫応答が行われなかったものと推察した。

NK 細胞数は群間に有意な違いが認められ、

除角実施 7 日後において Day 75 群は Day 16 群および Day 50 群と比較して有意な高値を示した。NK 細胞は自然免疫の役割を担う細胞障害性リンパ球であり、T 細胞と異なり主要組織適合抗原による抗原提示を必要とせず、非特異的かつ迅速に直接抗原を標的とする [3]。この除角実施 7 日後の NK 細胞数の増加は、除角後の焼烙止血に伴う熱ストレスから熱ショックタンパク質 (Heat shock protein ; HSP) が誘導され、免疫応答が行われた結果と考えた。HSP は熱、化学物質、虚血等のストレスにさらされた際に細胞内で発現が上昇し、細胞内立体構造を維持するよう細胞自身の防御機構として働くほか、細胞内タンパク質の損傷が酷い場合にはこれを排除するように働く [8]。また HSP と抗原の融合タンパク質は抗原単体と比較して有意に効率よく免疫活性がなされることが報告されている [18]。Shevtsov らは、グリア芽腫を罹患したラットの腫瘍内に活性化した HSP70 を注入したところ 1 週間内に NK 細胞が増加し

たことを報告している [13]。これは本試験の除角実施7日後にNK細胞数が増加したことと一致している。以上より、焼烙で生じた熱ストレスからHSPが発現し、焼烙により壊死した細胞と融合タンパク質を形成することでNK細胞に応答したものを捉えた結果と推察した。またNK細胞数がDay 75群においてDay 16群およびDay 50群と比較して有意な高値を示した理由は、仮説のとおりDay 16群およびDay 50群はDay 75群と比較して移動や群構成ストレスからの免疫機能回復が不十分であった可能性が考えられた。HSPにより腫瘍内でNK細胞を活性化させて癌細胞を破壊するという抗癌治療が注目されており、本試験における除角実施7日後のNK細胞数の増加は免疫応答の強弱を反映している可能性が示唆された。さらにShevtsovらは、HSP70を注入して2週間後に腫瘍細胞内にT細胞数の増加も報告しており [13]、今後、除角後の焼烙でも同様の反応が得られるか更なる調査が必要と考える。

VAに関して、Day 75群は除角実施3日前と比較して除角実施3日後に有意な減少を示した。またDay 50群において除角実施3日前と比較して除角実施7日後で減少する傾向がみられた ( $p < 0.10$ )。黒毛和種肥育牛において移動や寒冷ストレスにより血中VAが消費される [11] ほか、導入後の群構成ストレスによってもVAは消費されることが知られている [1]。一方で、牛へのストレス負荷はコルチゾールの分泌量を増加させることが報告されている [14]。本試験においていずれの群も除角実施直後のCortiが有意に増加しているが、導入後日数が長いものほど除角後のVA減少が大きくなる傾向があった。飼養管理上VAは充足されており、原因は不明だが、導入後日数が長いものほど血液上に現われない強いストレスや炎症があった可能性が示唆された。

除角実施による疼痛ストレスにより末梢血免疫細胞数は低下する仮説を立てたが、予測に反してDay 50群およびDay 75群で除角実施後に増加した。これは除角という急性ストレスが加わったことに対する生理的な免疫応答であることが推察された。また除角実施7日後におけるDay 75群のNK細胞数の増加はHSPと壊死した細胞が形成した融合タンパクに免疫応答

した生理的な結果であることが推察された。除角時に導入後日数が短いものほど、移動や群飼といった慢性ストレスにより免疫機能が低下し、これら生理的な免疫応答が十分に行われない可能性が示唆された。今後、除角後の免疫応答の大小が牛に与える影響について調査していきたい。

## 引用文献

- [1] Adachi, K., Fukumoto, K., Nomura, Y., Katsura, N., Arikawa, A., Tsuji, A., Onimaru, T. 1998. Significant decrease of serum vitamin A level in Japanese Black beef steers after introduction to a farm. *J. Vet. Med. Sci.* 60: 101-102.
- [2] Benschop, R. J., Rodriguez-Feuerhahn, M., Schedlowski, M. 1996. Catecholamine-induced leukocytosis: early observations, current research, and future directions. *Brain Behav Immun.* 10: 77-91.
- [3] Diefenbach, A., Raulat, D. H. 2003. Innate immune recognition by stimulatory immunoreceptors. *Curr Opin Immunol.* 15: 37-44.
- [4] Doherty, T. J., Kattesh, H. G., Adcock, R. J., Welborn, M. G., Saxton, A. M., Morrow, J. L., Dailey, J. W. 2007. Effects of a concentrated lidocaine solution on the acute phase stress response to dehorning in dairy calves. *J. Dairy. Sci.* 90: 4232-4239.
- [5] 犬塚一歩. 2010. 牛の呼吸器感染症の発生に関するリスクファクター. *日本家畜臨床感染症研究会誌*. 5: 41-46.
- [6] 石崎 宏. 2010. 育成期の子牛の免疫抵抗性を低下させる要因. *日本家畜臨床感染症研究会誌*. 5: 47-53.
- [7] Kubitz, K. A., Peavey, B. S., Moore, B. S. 1986. The effect of daily hassles of humoral immunity. An Interaction Moderated by Locus of Control. *Biofeedback Self Regul.* 11: 115-123.
- [8] Li, Z., Srivastava, P. 2004. Heat-shock proteins. *Curr Protoc Immunol.* Appendix 1: Appendix 1T.
- [9] 前原俊浩, 堤 知子. 1990. 肉用牛の除角と群管理. *日草九支報*. 20. 17-22.
- [10] Maes, M., Van Bockstaele, D. R., Gastel, A., Song, C., Schotte, C., Neels, H., DeMeester, I., Scharpe, S., Janca, A. 1999. The effects of psychological stress on leukocyte subset distribution in humans. Evidence of Immune Activation. *Neuropsychobiology.* 39: 1-9.
- [11] 松田敬一, 大塚浩通. 2011. 黒毛和種牛の冬季トラック輸送に対する保温ジャケットの効果. *日本家畜臨床感染症研究会誌*. 6: 1-8.

- [12] 松田敬一 . 2015. 黒毛和種肥育牛における飼養管理と炎症性疾患の関係 . 家畜感染症学会誌 . 4. 49-60.
- [13] Shevtsov, M. A., Pozdnyakov, A. V., Mikhrina, A. L., Yakovleva, L. Y., Nikolaev, B. P., Dobrodumov, A. V., Komarova, E. Y., Meshalkina, D. A., Ischenko, A. M., Pitkin, E., Guzhova, I. V., Margulis, B. A. 2014. Effective immunotherapy of rat glioblastoma with prolonged intratumoral delivery of exogenous heat shock protein Hsp70. *Int J Cancer*. 135: 2118-2128.
- [14] Villarreal, M., María, G., Sañudo, C., García-Belenguer, S., Chacón, G., Gebre-Senbet, G. 2003. Effect of commercial transport in Spain on cattle welfare and meat quality. *Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 110: 105-107.
- [15] Snowden, G. D., Van Vleck, L. D., Cundiff, L. V., Bennett, G. L. 2006. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: environmental, genetic, and economic factors. *J Anim Sci*. 84. 1999-2008.
- [16] 住 伸栄, 門田文隆, 小林斎司 他 . 1997. 黒毛和種肥育牛における除角の挫傷防止効果と増体への影響 . 家畜診療 . 44. 23-26.
- [17] 植松勝次 . 2008. 肥育素牛の損害防止のために . 家畜診療 . 55: 177-181.
- [18] Vabulas, R. M., Braedel, S., Hilf, N., Singh-Jasuja, H., Herter, S., Ahmad-Nejad, P., Kirschning, C. J., Da Costa, C., Rammensee, H. G., Wagner, H., Schild, H. 2002. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem*. 277: 20847-20853.
- [19] 渡辺大作, 小松 咲, 渡邊菜美, 安藤貴朗, 大塚浩通, 富岡美千子, 高岸聖彦, 大橋秀一 . 2011. 黒毛和種肥育去勢牛の月齢および血液成分と白血球サブポピュレーションとの関連性 . 産業動物臨床医誌 . 2: 20-29.
- [20] Wyatt, C. R., Madruga, C., Cluff, C., Parish, S., Hamilton, M. J., Goff, W., Davis, W. C. 1994. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 40: 187-199.

## Change in peripheral blood immune cell counts associated with the timing of dehorning after the introduction in Japanese Black Steers

Tomoya Takahashi<sup>1)</sup>, Keiichi Matsuda<sup>2)</sup>, Fumiaki Takahashi<sup>3)</sup>, Yousuke Maeda<sup>3)</sup>, Hiromichi Ohtsuka<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup> Kenhoku Veterinary Clinical Center, Miyagi Prefectural Agricultural Mutual Aid Association, 1-3-1 sanuma, hasamacho, tome, Miyagi 987-0511, Japan

<sup>2)</sup> Livestock Medical Training Center, Miyagi Prefectural Agricultural Mutual Aid Association

<sup>3)</sup> School of Veterinary Medicine, Kitasato University

<sup>4)</sup> School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University

### **[Abstract]**

The dehorning after introduction in Japanese Black Steers achieves amenities of the fattener management. However, Dehorning is possible to cause Bovine Respiratory Disease Complex by the pain stress. In the study, it was researched whether the timing of the dehorning after introduction in Japanese Black Steers exerted an influence upon immune cells in peripheral blood. Of 21 Japanese Black Steers in 3 farms to act dehorning, 5 steers were at about 16 days after introduction (Day 16), 8 steers were at about 50 days after introduction (Day 50), and 8 steers were at about 75 days after introduction (Day 75), at dehorning. To assess shift of immune cells in peripheral blood, 4 measurement points were set such as 3 days before dehorning (-D3), soon after dehorning (post), 3 days after dehorning (D3), and 7 days after dehorning (D7). In helper T cell counts and B cell counts, Day 75 was significantly higher on D3 than Day 16, respectively. In WBC, Gran, total mature T cell counts, killer T cell counts, and  $\gamma\delta$ T cell counts, Day 50 and Day 75 tended to increase from post to D3, though they did not show any significant differences variation between the groups. In NK cell counts, Day 75 was significantly higher on D7 than Day 16 and Day 50. It was presumed that the transient lymphocyte elevation from post to D3 was the acute stress reaction and NK cell counts increase at D7 were physiological response to remove necrotic cells. It was suggested that their immune response was not performed sufficiently by the chronic stress such as transport and group housing so that the number of days was short after introduction.

**Keywords:** acute stress, chronic stress, dehorning, immune cell, Japanese Black Steer

