

原著論文

分娩後の乳房炎の発生と白血球ポピュレーション、 リンパ球幼若化反応及び栄養状態との関連性

阿部憲章¹⁾、佐藤千尋¹⁾、木戸口勝彰¹⁾、菊 佳男^{2)*}、高橋秀之³⁾

- 1) 岩手県中央家畜保健衛生所 (〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字砂込 390-5)
2) (独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒062-0045 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘 4)
3) (独)農業・食品産業技術総合研究機構生物系特定産業技術研究支援センター
(〒331-8537 埼玉県さいたま市北区日進町 1-40-2)

*連絡責任者：菊 佳男

(独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所
(〒062-0045 北海道札幌市豊平区羊ヶ丘 4)
TEL : 011-851-2175 FAX : 011-853-0767
E-mail : yokiku@affrc.go.jp

[要 約]

分娩後の乳房炎発症と細胞性免疫及び栄養状態との関連性について検討した。周産期のホルスタイン種乳用牛 14 頭から血液及び乳汁を採取し、負のエネルギーバランス、リンパ球幼若化反応及び初乳中の単核球構成について調査した。分娩後 1 週間以内に 5 頭が臨床症状を伴う環境性乳房炎に罹患し (乳房炎群)、9 頭は罹患しなかった (対照群)。乳房炎群は対照群に比べ、初乳中の CD14+細胞率及び分娩後 1 週間のリンパ球幼若化反応が低値であり、分娩直後の遊離脂肪酸 ($1,006 \pm 146$, $682 \pm 95 \mu\text{Eq/l}$) 並びに分娩後 1 週間の β ヒドロキシ酪酸 (824 ± 26 , $621 \pm 66 \mu\text{mol/l}$) が高値であった。一方、分娩前後 4 週間のリンパ球幼若化反応と遊離脂肪酸濃度は負の関連を示し、分娩後 1 週間のリンパ球幼若化反応は体細胞数と負の関連、初乳中の CD14+細胞率とは正の関連を示した。以上のことから、負のエネルギーバランスが分娩後の免疫能低下に関連し、乳房炎の発症を誘導した可能性が示された。

キーワード：CD14+細胞、エネルギーバランス、リンパ球幼若化反応、乳房炎、周産期

[緒 論]

分娩直後の乳房炎の発生は、生乳出荷期間の短縮並びに年間乳量の減少に直結するため、経済的被害が大きい。周産期は、分娩によるストレスあるいは分娩後の乳汁合成のため栄養要求量増大に対する乾物摂取量不足に陥りやすい。そのため負のエネルギーバランスの増大等によって、代謝・内分泌機能及び免疫機能の低下

を引き起こし、乳房炎を始めとする周産期疾病に罹患するリスクを増大させる [4, 7, 9]。

乳汁に含まれる好中球、リンパ球、単球/マクロファージ等の免疫細胞は乳腺局所の細胞性免疫機能に重要な役割を果たしており、これら免疫細胞の構成変動及び機能低下は乳房炎への感受性を増大させることが示唆されている [1, 8, 15-18]。一方、負のエネルギーバランスは血液の細胞性免疫能を低下させることが報告されており、周産期疾病の発生原因の 1 つとして考えられる [10, 19]。しかしながら、乳腺局所における細胞性免疫機能と負のエネルギーバ

受付：2013 年 8 月 30 日

受理：2013 年 10 月 3 日

ランスの関連性は十分に検討されていない。

本研究では、乳用牛の分娩後の乳房炎発生と周産期における初乳及び血液中の免疫学的及び生化学的因子との関連性について検討した。

[材料と方法]

供試動物及び材料の採取：2010年5～10月に、搾乳牛60頭を飼養する1酪農場のホルスタイン種搾乳牛14頭(初～4産)を供試した。供試牛の乾乳期間は 74 ± 15 日(平均値 \pm 標準誤差)で、分娩予定日から換算し初産牛は4週間、経産牛は3週間前まで農場内で放牧された。その後、繋ぎ畜舎で分娩後1週間まで飼養(乾草及びTMR飼料を給与)された後、フリーストールに移動された。分娩直後から分娩後1週までにCMT変法(PLテスター、日本全薬工業(株)、福島)で陰性もしくは疑陽性であった牛を対照群($n=9$ 、平均産次 1.7 ± 0.3 、乳房炎既往歴2頭)とし、陽性であった牛を乳房炎群($n=5$ 、 2.8 ± 0.5 、3頭)とした。乳房炎群は、分娩後0日に2頭、1、5、6日に各1頭がCMT変法陽性と判定された。材料採取は、分娩予定日から換算し分娩前3及び2週間、また分娩直後及び分娩後1週間の午前9:00～10:00(採食後1.5時間)に実施し、その後臨床検査に供した。頸静脈より採取した血液は、37℃で20分間静置後、血清を分離した。乳汁は分娩直後及び分娩後1週間に後搾り乳を各乳房から採取し、等量を混合して4乳房の合乳とした。試験期間中に、乳房炎群は3頭が食欲不振を呈し、うち2頭はブドウ糖により加療され、残る2頭も乳汁性状の異常がみられ、臨床型乳房炎の病態を呈していた。

臨床検査：ボディーコンディションスコア(BCS)をFerguson法[12]により測定した。

血液検査：血清を用い、遊離脂肪酸(NEFA)及び β ヒドロキシ酪酸(BHB)の各濃度を酵素法(NEFA-Cテストワコー、和光純薬工業(株)、大阪)及び比色法(ケトメーターN、アークレイファクトリー(株)、滋賀)によりそれぞれ測定した。また、Ohtsukaらの報告[14]に従って、ヘパリンにより抗凝固処理した血液から単核球を分離し、PHA(Phytohaemagglutinin; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, U.S.A.)刺激によるリンパ球幼若化反応をMTT(3-[4,5-dimethyl-

thiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Sigma-Aldrich Co.)法により測定した。評価は、刺激指数(SI値:PHA添加ウェルの吸光度/対照ウェルの吸光度)によって算出した。

乳汁検査：分娩直後及び分娩後1週間に採取した乳汁をCMT変法により検査し、また同乳汁 $100 \mu\text{l}$ を10%羊血液寒天培地で37℃24時間培養後、分離菌を定法に従い同定した。また、既報[8, 14, 17, 20, 22]に従い、比重液(比重1.077、リンホセパールI、(株)免疫生物研究所、群馬)を用いて初乳中の単核球を分離し、マウス抗ウシCD3(clone:MM1A, VMRD, WA, U.S.A.)及びCD14(clone:CAM36A, VMRD)、FITC標識マウス抗ウシCD21(clone:CC1, Serotec, Oxford, U.K.)及びWC1(clone:CC15, Serotec)を付与した。特異抗原CD3及びCD14については、FITC標識ヤギF(ab')₂抗マウスIgG1抗体(ベックマン・コールター(株)、東京)を二次抗体として使用した。単核球構成比の解析は、フローサイトメーター(EPICS XL、ベックマン・コールター(株))を用いて、単核球集団を抽出後、それら細胞中の特異抗原保有率の計測によって行った。さらに分娩後1週間の乳汁の体細胞数を体細胞数測定装置(Fossomatic FC、フォス・ジャパン(株)、東京)により測定した。

体細胞数と乳汁及び血液検査成績の関連：血液リンパ球幼若化反応及び初乳中単核球の免疫細胞(CD3+、CD14+、CD21+、WC1+細胞)構成比の分娩後1週間の体細胞数との関連性、また、試験期間を通じた(分娩前3及び2週間、また分娩直後及び分娩後1週間)血液生化学検査成績とリンパ球幼若化反応との関連性をピアソン回帰分析により解析した。

統計処理：両群の各採材時結果の値は平均値 \pm 標準誤差で示し、Studentの*t*検定で比較した。5%以下の危険率を統計学的有意差、10%以下のそれを傾向とした。

[結果]

乳汁検査成績：分娩後1週間における乳房炎群の体細胞数は $809 \pm 199 \times 10^3/\text{ml}$ であり、対照群の $156 \pm 10 \times 10^3/\text{ml}$ より有意に高値を示した($p < 0.05$)。乳房炎群の5頭から環境性乳房炎菌であるCNS(表皮ブドウ球菌)及びOS(環

境性連鎖球菌) が分離された。Table 1 に乳房炎群と対照群との初乳中単核球の各種免疫細胞構成率の比較を示した。CD14+細胞率は乳房炎群が $20.0 \pm 2.3\%$ であり、対照群の $30.8 \pm 2.5\%$ に比較し有意に低かった ($p < 0.05$)。CD3+細胞率は乳房炎群が $10.0 \pm 2.9\%$ 、対照群が $16.6 \pm 3.1\%$ であり、WC1+細胞率は乳房炎群が $9.3 \pm 2.9\%$ 、対照群が $18.8 \pm 3.0\%$ と、両細胞群共に乳房炎群が低い傾向を示した ($p < 0.1$)。CD21+細胞率には両群間に有意な差は認められなかった。

血液及び臨床検査成績：分娩前後の両群の

Table 1 Percentages of marker positive cells in colostrum mononuclear cells of control and mastitic cows

Surface antigen	Mastitic cows	Control cows
CD3 (%)	10.0 ± 2.9	$16.6 \pm 3.1^\dagger$
CD14 (%)	20.0 ± 2.3	$30.8 \pm 2.5^*$
CD21 (%)	6.1 ± 1.6	11.5 ± 1.6
WC1 (%)	9.3 ± 2.9	$18.8 \pm 3.0^\dagger$

Value was expressed as the mean \pm S.E.M.

Dagger indicates marginally significant differences as determined by Student's t-test. ($p < 0.1$)

Asterisk indicates significant differences as determined by Student's t-test. ($p < 0.05$)

BCS を Table 2 に示した。分娩前3週間では乳房炎群が 3.35 ± 0.17 、対照群が 3.36 ± 0.11 と同水準で、その後分娩後1週間にかけて両群ともに低下したが、分娩後1週間の乳房炎群 (2.80 ± 0.15) 及び対照群 (3.08 ± 0.09) のスコアに両群間の差はなかった。また、分娩前3週間から分娩後1週間におけるBCSスコアの減少は、乳房炎群は 0.55 ± 0.05 、対照群は 0.28 ± 0.05 であり、両群間に有意な差を認めた ($p < 0.05$)。

NEFA、BHB及びリンパ球幼若化反応の推移を Table 3 に示した。NEFA及びBHB濃度は、両群ともそれぞれ分娩前に比較して分娩後に増加し、分娩直後におけるNEFA濃度は、乳房炎群 ($1,006 \pm 145 \mu\text{Eq/l}$) は対照群 ($682 \pm 95 \mu\text{Eq/l}$) と比較して有意に高値を示し ($p < 0.05$)、BHB濃度は、分娩1週間後に乳房炎群 ($824 \pm 26 \mu\text{mol/l}$) は対照群 ($621 \pm 66 \mu\text{mol/l}$) と比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。リンパ球幼若化反応のSI値は、分娩前3週間では両群共に同水準であったが、分娩後1週間に乳房炎群 (1.75 ± 0.26) は対照群 (2.80 ± 0.15) と比較して有意に低値となった ($p < 0.01$)。

Table 2 Change of body condition scores (BCS) of control and mastitic cows during the peripartum period and difference in BCS between the three weeks before calving and each study day

Time relative to calving (calv)	BCS		Difference in BCS between the three weeks before calving and each study day	
	Mastitic cows	Control cows	Mastitic cows	Control cows
-3 wk calv	3.35 ± 0.17	3.36 ± 0.11	—	—
-2 wk calv	3.30 ± 0.22	3.36 ± 0.11	-0.05 ± 0.02	0.00 ± 0.04
0 d calv	3.05 ± 0.24	3.22 ± 0.13	-0.30 ± 0.07	-0.14 ± 0.04
1 wk calv	2.80 ± 0.15	3.08 ± 0.09	-0.55 ± 0.05	$-0.28 \pm 0.05^*$

Value was expressed as the mean \pm S.E.M.

Asterisk indicates significant differences as determined by Student's t-test. ($p < 0.05$)

Table 3 Changes of NEFA and BHB concentrations and lymphocyte proliferation responses in blood of control and mastitic cows

Time relative to calving (calv)	NEFA ($\mu\text{Eq/l}$)		BHB ($\mu\text{mol/l}$)		Lymphocyte proliferation (stimulation index)	
	Mastitic cows	Control cows	Mastitic cows	Control cows	Mastitic cows	Control cows
-3 wk calv	488 ± 156	340 ± 91	348 ± 41	451 ± 44	4.06 ± 1.03	3.49 ± 0.44
-2 wk calv	436 ± 78	343 ± 77	539 ± 67	426 ± 52	2.74 ± 0.37	$3.68 \pm 0.16^\dagger$
0 d calv	$1,006 \pm 145$	$682 \pm 95^*$	502 ± 46	434 ± 31	2.18 ± 0.37	2.62 ± 0.21
1 wk calv	924 ± 51	725 ± 108	824 ± 26	$621 \pm 66^*$	1.75 ± 0.26	$2.80 \pm 0.15^{**}$

Value was expressed as the mean \pm S.E.M.

Dagger indicates marginally significant differences as determined by Student's t-test. ($p < 0.1$)

Asterisk indicates significant differences as determined by Student's t-test. ($p < 0.05$)

Double asterisks indicates significant differences as determined by Student's t-test. ($p < 0.01$)

stimulation index: Absorbance of wells contained PHA / absorbance of control wells

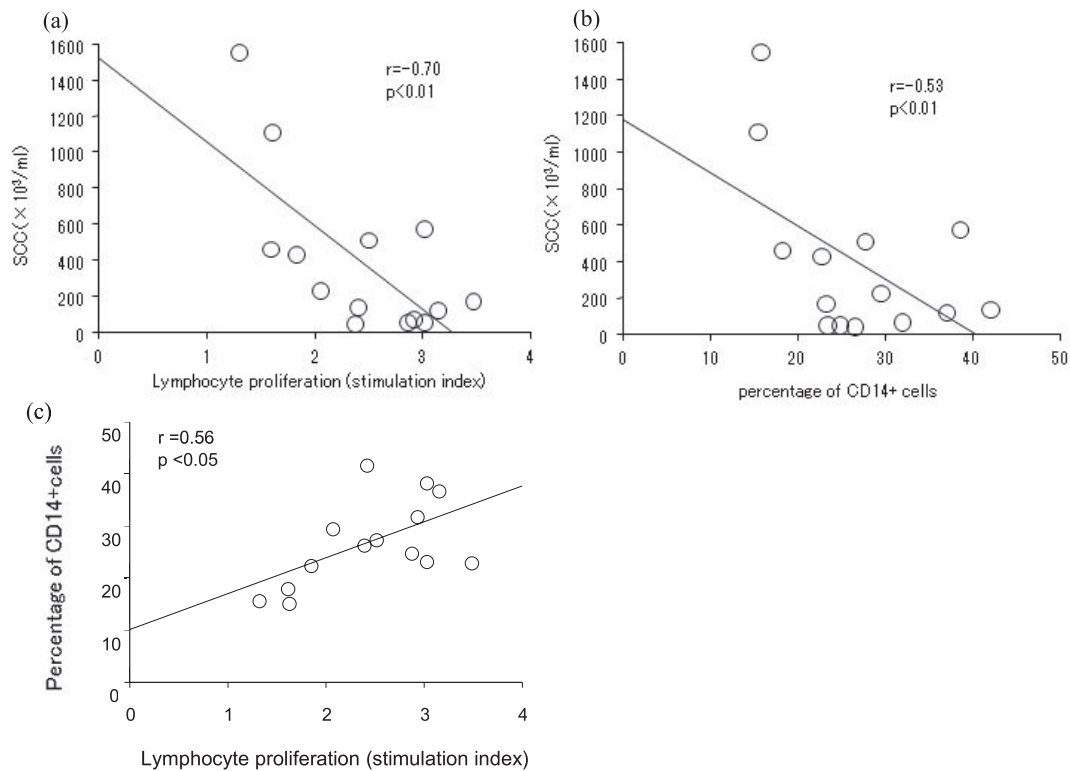


Figure 1 Relationship of somatic cell counts and immune examinations in milk and blood

(a) somatic cell counts and lymphocyte proliferation response at 1 week after calving, (b) somatic cell counts at 1 week after calving and percentage of CD14+ cells in colostrum, (c) percentage of CD14+ cells in colostrum and lymphocyte proliferation response at 1 week after calving

体細胞数と乳汁及び血液免疫機能検査成績の関連：分娩後1週間の体細胞数は、同時点のリンパ球幼若化反応 ($r = -0.70$, $p < 0.01$, figure 1a) 及び初乳中 CD14+ 細胞率 ($r = -0.53$, $p < 0.05$, figure 1b) と有意な負の関連を示した。また分娩後1週間のリンパ球幼若化反応は初乳中 CD14+ 細胞率 ($r = 0.56$, $p < 0.05$, figure 1c) と有意な正の関連を示した。また、他の特異抗原を発現する免疫細胞と体細胞数あるいはリンパ球幼若化反応との関連性は見られなかった (結果は示さない)。

一方、試験期間を通じて、リンパ球幼若化反応は NEFA 濃度 ($r = -0.49$, $p < 0.01$, figure 2) と有意な負の関連を示したが、BHB との関連はみられなかった (結果は示さない)。

[考察]

本試験では分娩後1週間以内に14頭中5頭が乳房炎に罹患し、周産期における乳房炎対策の重要性が再確認された。乳房炎群並びに対照群の間で免疫学的及び血液生化学的因子の特性に違いがみられた。

乳房炎群の初乳単核球中の CD3+、CD14+、

CD21+ 及び WC1+ 細胞率はいずれも低値で、本試験で用いた特異抗原を認識しない細胞が高率に含まれた。既報 [8] では、分娩後1週間以内に乳房炎と判定された8頭の試験牛のうち、初乳採取時に乳房炎と判定された牛は無く、分娩後1日で1頭 (12.5%) が乳房炎と判定された。それに対して、本試験では乳房炎群5頭のうち3頭 (60%) が分娩後0~1日に乳房炎と判定されたため、既報 [8] に比べ初乳採取時の乳性状が悪化していたことが考えられた。単核球を構成するマクロファージあるいはT細胞は、ブドウ球菌の感染によりアポトーシスあるいは空胞変性を起こすことが知られている [12, 20]。本試験においても、初乳採取時に単核球が既に侵入した病原微生物に対する役割を終え、アポトーシスを起こしていたことが推察された。そのため、特異抗原を認識できなかった単核球が存在した可能性が考えられた。

その中でも、乳房炎群の初乳中 CD14+ 細胞率は、対照群のそれと比較し有意に低値であった。初乳に豊富に含まれる CD14+ 細胞 (単球/マクロファージ) は、細菌などの異物を貪食し、ヘルパー T 細胞に抗原提示を行うことによっ

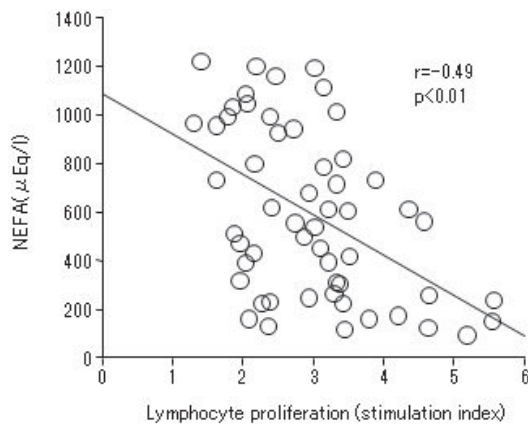


Figure 2 Relationship of NEFA concentration and lymphocyte proliferation response during the peripartum

て、特異的な免疫反応を誘発させると共に、サイトカイン (TNF- α 、IL-8 及び TGF- α 等) の放出により、炎症部位に食細胞 (好中球) を動員させる機能を有する [5, 7]。著者らは既に初乳中の CD14+ 細胞率が低値である場合、分娩直後には乳房炎が確認されなくとも分娩後 1 週間以内に乳房炎に罹患しやすいことを見出し [8]、CD14+ 細胞が乳房内における感染防除に重要であることを示唆した。本試験における乳房炎群の CD14+ 細胞率が低値であったことは、環境性乳房炎起因菌感染初期に重要な役割を果たす単球/マクロファージが、既に役割を終え、その構成比が低下していたことが示唆された。

乳房炎群の CD3+ (T 細胞) 及び WC1+ (γ δ 型 T 細胞) 細胞率は低下傾向を示した。T 細胞は α β 型 (ヘルパー T 細胞 (CD4+) 及びキラー T 細胞 (CD8+))、 γ δ 型のサブクラスに大別され [7, 15]、Yang らは周産期の乳汁中の T 細胞の減少が、乳腺の免疫低下の一要因となることを指摘していることから [22]、乳房内からの乳房炎起因菌の排除能力の低下を示す可能性が考えられた。

乳房炎群の分娩後のリンパ球幼若化反応は低下し、同指標は初乳中 CD14+ 細胞発現率と分娩後 1 週間の体細胞数とそれぞれ正、負の関連を示した。乳房炎牛の末梢血単核球のリンパ球幼若化反応の低下は佐藤らの報告 [19] と同様であり、初乳の免疫指標である CD14+ 及び体細胞数との関連は、末梢血液と乳汁の免疫機能の関連を示すことが推察された。

分娩後の体重あるいは BCS の減少の著しい牛では、分娩後の乳房炎罹患率が高いことが報告されている [2, 13]。本試験においても、乳房炎群の 60% (3/5 頭) では分娩後に食欲低下がみられ、BCS は分娩前 2 週から分娩後 1 週間にかけて減少し、分娩後 1 週間において対照群と比較して、その減少程度が有意に大きかった。分娩後の乳房炎群の NEFA 及び BHB は対照群より有意に高く、リンパ球幼若化反応は NEFA と負の関連を示した。乳房炎群は NEFA 及び BHB の増加が示すように負のエネルギーバランスの増大等がみられ [6]、この状態がリンパ球幼若化反応の抑制に関与していることから [10, 19]、負のエネルギーバランスによる細胞性免疫機能の抑制が乳房炎の誘因となったことが示唆された。

本試験では、周産期に環境性乳房炎に罹患した牛に末梢血及び乳汁における細胞性免疫指標の低下が認められ、要因解析から、重度の負のエネルギーバランスに伴う代謝異常が関与している可能性が示された。環境性乳房炎の低減には、細胞性免疫機能の低下要因となり得る周産期における BCS の減少を緩和する飼養管理が必要と考えられた。

[謝 辞]

稿を終えるにあたり、採材に終始ご協力を頂いた岩手県農業研究センター畜産研究所の諸先生方に深謝する。

[引用文献]

1. Asai, K., Kai, K., Rikiishi, H., Sugawara, S., Maruyama, Y., Yamaguchi, T., Ohta, M., Kumagai, K. 1998. Variation in CD4+ T and CD8+ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and non-lactating periods. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 65: 51-61. Amsterdam.
2. Berry, D. P., Lee, J. M., Macdonald, K. A., Stafford, K., Matthews, L., Roche, J. R. 2007. Associations among body condition score, body weight, somatic cell count, and clinical mastitis in seasonally calving dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 90: 637-648. Columbus.
3. Ferguson, J. D., Galligan, D. T., Thomsen, N. 1994. Principal Descriptors of Body Condition Score in Holstein Cow. *J. Dairy Sci.* 77: 2695-

2703. Columbus.
4. Goff, J. P., Horst, R. L. 1997. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80:, 1260-1268. Columbus.
 5. Holtenius, K., Persson, W. K., Essen, G. B., Holtenius, P., Hallen S. C. 2004. Metabolic parameters and blood leukocyte profiles in cows from herds with high or low mastitis incidence. *Vet. J.* 168:, 65-73. London.
 6. Jack, C. B. 1991. 脂質の代謝とこれに関連する疾患：獣医臨床生化学第4版（Jiro, J. K. 編, 久保周一郎他監訳）. 近代出版, 東京, pp108-142.
 7. Jeanne, L. B., Ronald, J. E. 2004. 免疫と乳房炎, 古い疾病の新しい考え：ウシの乳房炎（田口清訳, Philip MS 他編）. 獣医輸液研究会・大動物臨床研究会, 北海道, 1-41.
 8. Kiku, Y., Ozawa, T., Kushibiki, S., Sudo, M., Kitazaki, K., Abe, N., Takahashi, H., Hayashi, T. 2010. Decrease in bovine CD14 positive cells in colostrum is associated with the incidence of mastitis after calving. *Vet. Res. Commun.* 34:, 197-203. Netherlands.
 9. Mulligan, F. J., Doherty, M. L. 2008. Production diseases of the transition cow. *Vet. J.* 176:, 3-9. Amsterdam.
 10. Ohtsuka, H., Kase, H., Ando, T., Kohiruimaki, M., Masui, M., Watanabe, D., Hayashi, T., Kawamura, S. 2008. Changes in peripheral blood mononuclear cells after calving in lactating cows with serious decrease of body weight before and after calving. *J. Vet. Med. Sci.* 70:, 153-158. 東京.
 11. Ohtsuka, H., Kitagawa, M., Kohiruimaki, M., Tanami, E., Masui, M., Hayashi, T., Ando, T., Watanabe, D., Koiwa, M., Sato, S., Kawamura, S. 2006. Comparison of the insulin reaction of peripheral blood T cells between healthy Holstein dairy cows and JB during the periparturient period. *J. Vet. Med. Sci.* 68:, 1211-1214. 東京.
 12. Park, Y. H., Lee, S. U., Ferens, W. A., Samuels, S., Davis, W. C., Fox, L. K., Ahn, J. S., Seo, K. S., Chang, B. S., Hwang, S. Y., Bohach, G. A. 2006. Unique features of bovine lymphocytes exposed to a staphylococcal enterotoxin. *J. Vet. Sci.* 7:, 233-239. Seoul.
 13. Rezamand, P., Hoagland, T. A., Moyes, K. M., Silbart, L. K., Andrew, S. M. Energy status, lipid-soluble vitamins, and acute phase proteins in periparturient Holstein and Jersey dairy cows with or without subclinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 90:, 5097-5107. Columbus.
 14. Riollet, C., Rainard, P., Poutrel, B. 2001. Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy. Sci.* 84:, 1077-1084. Columbus.
 15. Rivas, A. L., Quimby, F. W., Coksaygan, O., Alba, A., Arina, A., Arrobas, M. J., Gonzalez, R. N., Mohammed, H. O., Lein, D. H. 2001. Expression of CD3 and CD11b antigens on blood and mammary gland leukocytes and bacterial survival in milk of cows with experimentally induced *Staphylococcus aureus* mastitis. *Am. J. Vet. Res.* 62:, 1840-1851, Chicago.
 16. Rivas, A. L., Schwager, S. J., Gonzalez, R. N., Quimby, F. W., Anderson, K. L. 2007. Multifactorial relationships between intramammary invasion by *Staphylococcus aureus* and bovine leukocyte markers. *Can. J. Vet. Res.* 71:, 135-144. Ottawa.
 17. Rivas, A. L., Tadevosyan, R., Gorewit, R. C., Anderson, K. L., Lyman, R., Gonzalez, R. N. 2006. Relationships between the phagocytic ability of milk macrophages and polymorphonuclear cells and somatic cell counts in uninfected cows. *Can. J. Vet. Res.* 70:, 68-74. Ottawa.
 18. Rivas, A. L., Tadevosyan, R., Quimby, F. W., Coksaygan, T., Lein, D. H. 2002. Identification of subpopulations of bovine mammary-gland phagocytes and evaluation of sensitivity and specificity of morphologic and functional indicators of bovine mastitis. *Can. J. Vet. Res.* 66:, 165-172. Ottawa.
 19. Sato, S., Suzuki, T., Okada, K. 1995. Suppression of mitogenic response of bovine peripheral blood lymphocytes by ketone bodies. *J. Vet. Med. Sci.* 57:, 183-185. 東京.
 20. Sladek, Z., Rysanek, D. 2006. The role of CD14 during resolution of experimentally induced *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus uberis* mastitis. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29:, 243-262. New York.
 21. Van, K. C., Mallard, B. A., Wilkie, B. N. 1999. Adhesion molecules and lymphocyte subsets in milk and blood of periparturient Holstein cows. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 69:, 23-32. Amsterdam.
 22. Yang, T. J., Ayoub, I. A., Rewinski, M. J. 1997. Lactation stage-dependent changes of lymphocyte subpopulations in mammary secre-

tions: inversion of CD4+/CD8+ T cell ratios
at parturition. Am. J. Reprod. Immunol. 37,;

378-383. New York.

Association of the onset of mastitis after calving with leukocyte populations, lymphocyte proliferation and nutritional conditions

Noriaki Abe¹⁾, Chihiro Sato¹⁾, Katsuaki Kidoguchi¹⁾, Yoshio Kiku^{2)*}, Hideyuki Takahashi³⁾

1) Iwate Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center, 390-5 Sunagome, Takizawa-mura, Iwate-gun, Iwate, 020-0173, Japan

2) National Institute of Animal Health, NARO, 4 Hitsujigaoka, Toyohira-ku, Sapporo-city, Hokkaido 062-0045, Japan

3) Bio-oriented Technology Research Advancement Institution, NARO, 1-40-2 Nisshin, Kita-ku, Saitama-city, Saitama 331-8537, Japan

* Corresponding author: Yoshio Kiku

National Institute of Animal Health, NARO, 4 Hitsujigaoka, Toyohira-ku, Sapporo-city, Hokkaido 062-0045, Japan

(TEL: 011-851-2175, FAX: 011-853-0767, E-mail: yokiku@affrc.go.jp)

[Abstract]

The aim of this study was to clarify the relationship between cellular immune status and nutritive condition, and relate these parameters to the onset of mastitis after calving. We investigated the negative energy balance and lymphocyte proliferation in blood, and the populations of the colostrum mononuclear cells obtained from 14 Holstein cows during the periparturient period. Five cows developed clinical mastitis within a week after calving and the other 9 remained healthy (control group). The percentage of CD14+ cells in colostrum and the value of blood lymphocyte proliferation on the first week after calving were significantly lower in mastitic cows than in healthy cows. Non-esterified fatty acid (NEFA) levels just after calving and β -hydroxybutyric acid (BHB) levels on the first week after calving were higher in mastitic cows than the others (NEFA; $1,006 \pm 146$, $682 \pm 95 \mu\text{Eq/l}$, BHB; 824 ± 26 , $621 \pm 66 \mu\text{mol/l}$). A correlation ($r = -0.49$, $p < 0.01$) was found between the value of lymphocyte proliferation and NEFA during the periparturient period. The value of lymphocyte proliferation on the first week after calving showed negative correlation with somatic cell count ($r = -0.70$, $p < 0.01$) and positive correlation with CD14+ cells ($r = 0.56$, $p < 0.05$). These results demonstrate that the onset of mastitis after calving may be associated with the immune suppression induced by negative energy balance.

Key words: CD14+ cells, energy balance, lymphocyte proliferation, mastitis, parturient period