

原著論文

分娩日に加療を要した乳牛における周産期の免疫状態の変化

蟹川奈穂子 大塚浩通* 今瀬留似 晴山寛子 川村清市

北里大学獣医学部 大動物内科学研究室
(〒034-8628 青森県十和田市東23番町35-1)

*連絡担当者：大塚浩通

TEL：0176-23-4371

FAX：0176-23-8703

e-mail：otsuka@towada.vmas.kitasato-u.ac.jp

【要約】

周産期における乳牛の健康と免疫状態との関係を知るため、分娩日に食欲不振を呈し治療を要した乳牛の分娩前後における末梢血白血球の機能検査を実施した。対象牛は分娩時に元気沈衰、食欲不振、皮温低下などの所見がみられ、カルシウム (Ca) 製剤の点滴治療を行った乳牛 (治療群; n=5) と、異常のみられなかった対照群 (n=13) である。観察期間中、治療群の血中 Ca 濃度は対照群に比べ低く推移し、分娩前1週と分娩後3日において有意な差を認めた。分娩3日後における治療群の CD3⁺および CD4⁺T 細胞数は対照群に比べ有意に低く、その後も低値で推移する傾向にあった。疾病群の CD21⁺B 細胞数は観察期間を通して対照群に比べ低く、分娩3日、2週および4週後において有意な低値を認めた。また分娩後4週における治療群の血清 IgG 値は対照群に比べ有意に高い値を示した。以上の結果より、分娩時に治療を要する乳牛では、分娩前後に免疫機能の異常があるものと示唆された。

【キーワード：乳牛、免疫機能、食欲不振、周産期】

【はじめに】

乳牛の周産期に発生する様々な生理的代謝の変化は、疾病の発症に大きく関与している。乳牛は分娩後の泌乳開始によってエネルギー要求量が高くなることに加え、様々なストレスのため採食量が減少し負のエネルギーバランスを誘発することで周産期疾病発症のリスクを高め、ついには免疫機能の低下を招くとされている [3]。

健康な乳牛では好中球機能の低下や T 細胞数の減少などがみられ、このような免疫機能の低下が分娩後の感染症発生に影響していると考えられ [7, 8, 11]、粘膜感染症のリスクも高まる [2]。実際に、炎症性疾患を発症した乳牛では健康な個体に比べて、分娩時の末梢血 T 細胞

数が低く推移するとされている [15]。さらに周産期に乳熱やケトosisといった代謝疾病を発症した乳牛では、感染症を発症するリスクが高くなるとされており [6, 17]、周産期における代謝性疾患と炎症性疾患とは密接な関係のあることが示唆される。しかし、分娩日に加療が必要な乳牛における分娩前後の免疫状態についてはあまり明確にされていない。本研究では周産期において臨床症状が悪化し治療を要した乳牛における、乾乳期から分娩後にかけての免疫機能を解析した。

【材料および方法】

本研究では3戸の牧場で繋養されていた18頭のホルスタイン種乳用経産牛を用いた。供試牛

のうち分娩時に元気沈衰、食欲不振、皮温低下などの症状がみられ、カルシウム (Ca) 剤を中心とした輸液剤の投与が実施された乳牛 (平均治療回数 2.0 ± 0.4) を治療群 ($n=5$ 、平均産次数 3.1 ± 0.3) とし、治療を必要としなかった乳牛を対照群 ($n=13$ 、平均産次数 3.2 ± 0.6) とした。なお、治療群の牛は治療後に回復し、廃用となる症例は認められなかった。全ての供試牛はチモシー乾草と濃厚飼料を用いた分離給与によって飼育されており、特定の牧場に発生が集中することはなかった。供試牛から分娩前6週、1週および分娩後3日、2週ならびに4週において、午前10時から12時までの時間に採血した。なお、今回対象とした個体の分娩予定日と実際の分娩日には3日以上の違いはみられなかった。

血液はヘパリン、EDTA-2Na、プレーン採血管に保存し、各検査に供した。血液生化学検査では総コレステロール (TC; 酵素法)、遊離脂肪酸 (NEFA; ACS-ACOD 法)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST; NADH-UV 法)、Ca (比色法)、イムノグロブリン (Ig)G (比濁法) を測定した。白血球数 (WBC) は自動血球計算装置 (CELLTAC α , NIHON KOHDEN, CO.) により測定し、顆粒球数および単核球数は白血球百分比から算出した。

白血球の表面抗原の解析は間接蛍光抗体法で

染色した。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、1500rpm で3分間遠心し、沈渣に1/15M リン酸緩衝液 (PBS) を加えて数回洗浄した後、PBS で適宜希釈し、白血球浮遊液を作製した。 1×10^4 倍の一次抗体をマイクロチューブに $10 \mu\text{L}$ ずつ加え、希釈血液浮遊液を分注し、 4°C で1時間反応させた (Table1)。その後 PBS で洗浄し、 1×10^4 倍の二次抗体 (fluorescein isothiocyanate 標識抗マウス IgM 抗体または phycoerythrin 標識抗マウス IgG 抗体) を加え、 4°C で30分間反応させた。反応後 PBS で洗浄し、フローサイトメーター (FACScan, Becton Dickinson 社, U.S.A.) により解析した。測定データは Cell Quest を用いて解析を行った。

リンパ球幼若化反応は以下の通りに実施した。まず、ヘパリン加真空採血管で採取した血液からリンホセパールを用いて単核球を分離した。分離した細胞は2回 PBS で洗浄し、 1×10^6 個/mL となるように RPMI Medium 1640 で調整した。細胞は $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Phytohemagglutinin (PHA) を加えて、 37°C 、72時間培養した。培養後は、MTT ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$) で細胞を染色し、その2時間後に Sodium Dodecyl Sulfate により細胞を破壊して、24時間後に吸光度計 (Model 3550 MACROPLATE READER, BIO-RAD Laboratories, inc.) により波長590

Table1. Antibodies used in the immunostaining of peripheral blood mononuclear leukocytes.

Antigen	MAb clone	Isotype	Specificity	Source ^{1,2}
CD3	MM1A	IgG1	Pan T cell	VMRD
CD4	CACT138A	IgG1	Helper/inducer	VMRD
CD8	CACT80C	IgG1	Cytotoxic	VMRD
CD14	MY4	IgG2b	Monocyte	Coulter
CD21	GB25A	IgM	B cell	VMRD

¹ VMRD=VMRD, Inc. (pullman, WA, U.S.A.)

² Coulter=Becton Coulter (Tokyo, Japan)

The original concentration of the MAb solution was $1 \mu\text{g}/\text{mL}$.

nm で測定した。

各群の解析項目は同時期の成績を平均±標準誤差により表示し、2群間の有意差については Student の t-test により検定し、 $P < 0.05$ を有意な差とした。

【結果】

2群の血清 Ca 濃度は分娩前6週以降から徐々に低下し、分娩後3日において最低値を示して、その後回復傾向を示した。観察期間中、治療群の血清 Ca 濃度は対照群に比べ低く推移し、分娩前1週と分娩後3日において有意な差を認めた。2群の血清 TC 濃度は分娩前6週から分娩後3日にかけてゆっくりと低下し、その後急激に上昇した。分娩前1週以降の治療群の血清 TC 濃度は対照群に比べ低く推移し、分娩前1週、分娩後2週および4週において2群間に有意な差を認めた。血清 AST 活性は2群とも分娩後3日に一過性に上昇し、特に治療群で顕著であったが、2群間に有意な差は認められなかった (Fig. 1)。血清 NEFA 値は分娩前1週から分娩後2週にかけて治療群で対照群に比べて高い傾向にあったものの有意差は認められなかった。

顆粒球数には分娩前後を通して顕著な変化や差は認められなかった。治療群の WBC は分娩後1週に一過性に低下したが、分娩後4週には回復した。対照群の WBC は観察期間中安定して推移し、2群間には有意な差を認めなかった。

治療群の CD3⁺、CD4⁺および CD8⁺T 細胞数は分娩前6週以降に低下傾向を示し、分娩後3日には最低値となり、その後徐々に回復した。また分娩後3日における治療群の CD3⁺ および CD4⁺T 細胞数は対照群に比べ有意な低値であった。PHA 刺激リンパ球幼若化反応においては、2群間に有意な差を認めなかった (Fig. 2, 3)。CD14⁺細胞には有意性のある2

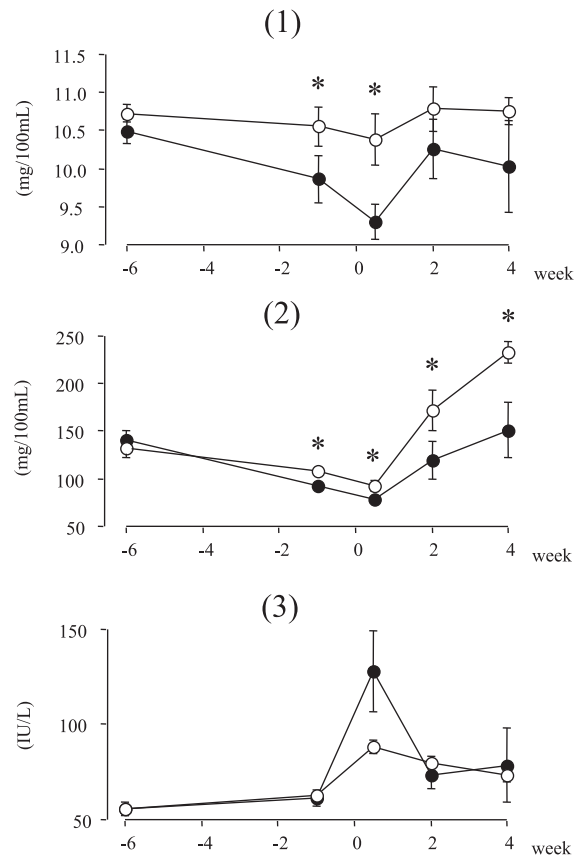


Fig. 1. Changes in the Ca (1), TC (2) and AST (3) levels in treated group (●), and control group (○). Values are expressed as the mean ± S.E. Asterisks indicate significant differences between the two groups ($P < 0.05$).

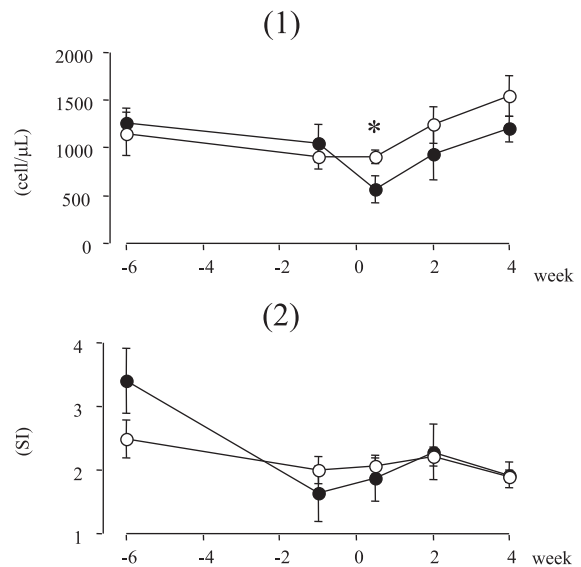


Fig. 2. Changes in the numbers of CD3⁺ T cells (1) and lymphocyte proliferate reaction (2) in treated group (●), and control group (○). Values are expressed as the mean ± S.E. Asterisks indicate significant differences between the two groups ($P < 0.05$).

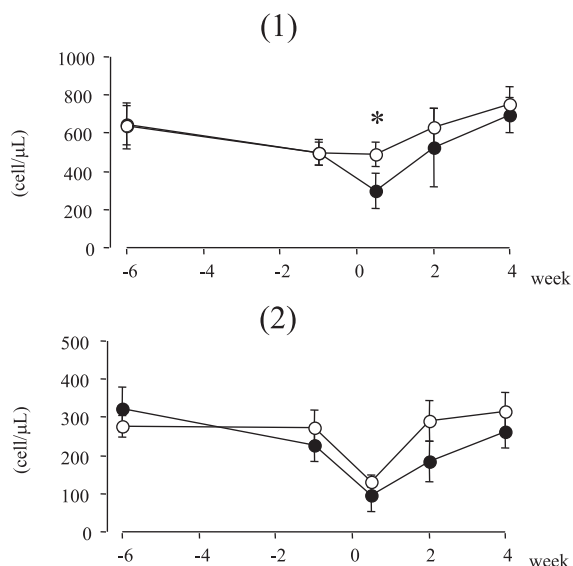


Fig. 3. Changes in the numbers of CD4⁺ (1) and CD8⁺ T cells (2) in treated group (●), and control group (○). Values are expressed as the mean ± S.E. Asterisks indicate significant differences between the two groups ($P<0.05$).

群間の差や各群の変化は認められなかった。

2群の CD21⁺B 細胞数は分娩前4週から徐々に低下し、分娩後3日に最低値となって、その後回復する傾向を示した。治療群の CD21⁺B 細胞数は対照群に比べ観察期間中に有意な低値で推移した。治療群の血清 IgG 濃度は分娩前1週以降徐々に上昇する傾向を示し、分娩後4週において最高値に至ったが、対照群では観察期間中安定して推移した。分娩後4週における治療群の血清 IgG 濃度は対照群に比べ有意に高い値を示した (Fig. 4)。

【考察】

本研究では、分娩後に食欲不振を発症し、加療を要した乳牛の周産期における免疫状態について経過を追って観察した。本研究の治療群の血中 Ca 濃度は乾乳期から有意な低下が持続して見られたことから、治療群の体調不良に血中 Ca 濃度の低下が影響していたものと推察される。また治療群の血清 TC 濃度は分娩前から持続的な低値で推移したが、TC の低下は乾物摂取量の減少を示唆することから [6]、乾物摂取

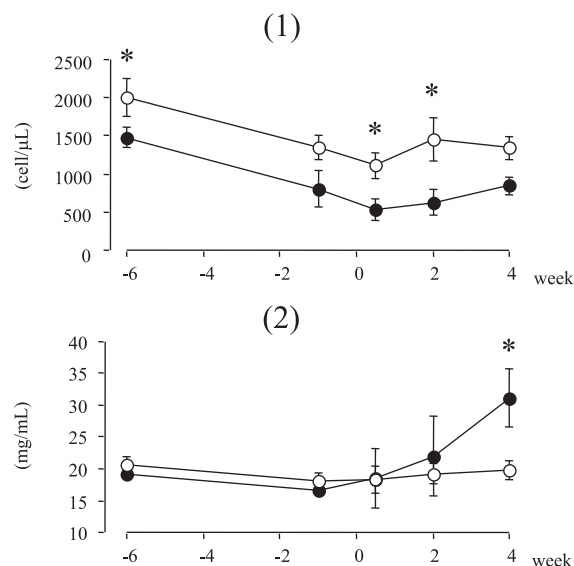


Fig. 4. Changes in the numbers of CD21⁺ B cell (1) and serum IgG concentration (2) in treated group (●), and control group (○). Values are expressed as the mean ± S.E. Asterisks indicate significant differences between the two groups ($P<0.05$).

量の減少があったものと考えられる。治療群では分娩3日後から低 T 細胞数が観察されたが、乳熱を発症した症例では免疫機能を抑制するコルチゾルの血中濃度が上昇するとされており [4]、加療を要するような分娩前後の体調不良が低 T 細胞を誘発した原因である可能性は高い。同様に、周産期疾病を発症した乳牛では末梢血 T 細胞が減少することも報告されている [17]。

Kimura ら [10] は、周産期の乳牛では低 Ca にともなって単核細胞の細胞内への蓄積 Ca 量が減少することを明らかにしている。細胞内 Ca は細胞内シグナリングに必要であるため、血中 Ca の低下にともなった単核球内蓄積 Ca の減少は、免疫機能の低下を誘導するものと考えられている。このことは、分娩前から血中 Ca 濃度が低下した治療群において、免疫細胞内のカルシウム蓄積が減少し、免疫機能低下が起きた可能性がある。

活性型ビタミン D3 は Ca の恒常性を保つために重要な役割を担っている。主なカルシウム

動員ホルモンである上皮小体ホルモンとカルシトールによって、ビタミンD₃が代謝され活性型ビタミンD₃となる。活性型ビタミンD₃はT細胞のIFN- γ やインターロイキン(IL)-2産生、単球のIL-12産生促進などT細胞の分化増殖や細胞性免疫機能の活性効果を有する[12,13]。また、活性型ビタミンDの代謝物である1,25-ジヒドロキシビタミンD₃はT細胞によるIL-4やIL-5, IL-10など液性免疫に関わるサイトカインの産生を増加させることが明らかとなっている[1]。乳熱では活性型ビタミンD濃度が低下しやすいことが発症原因の一つに挙げられることから[5]、低Caを示した治療群でも同様に活性型ビタミンD濃度が低下していた可能性があり、Ca代謝異常は治療群で観察されたT細胞の減少が細胞性免疫機能の低下に影響した要因の一つと示唆された。

観察期間を通して、治療群のCD21⁺B細胞数が対照群に比べて低く推移した。乳熱などの周産期疾病の多発する牛群では、乾乳期から泌乳初期にかけてB細胞が低値であることが明らかにされており[18]、本研究における治療群で観察された結果と類似する。このことから周産期疾病を発症する乳牛では、分娩前後に末梢血B細胞数が低値で推移することが考えられる。また治療群では分娩4週後に血清IgG濃度が対照群に比べて有意に上昇した。B細胞は液性免疫応答の促進により抗体産生細胞となり、血清IgG濃度が上昇する。炎症性疾患では乳牛では末梢血B細胞数と血清・グロブリン濃度に、また末梢血B細胞数とPokeweed mitogen 刺激幼若化反応とに負の相関性があることも明らかにされていることから[14]、疾病群では分娩4週後には液性免疫応答が強く誘導されていたことが示唆される。Shafer-Weaverら[16]は、分娩後3日以内の乳牛では細胞性免疫応答が低下し液性免疫応答が優

位に働くとしており、分娩前後に加療を必要とした乳牛では対照群に比べて分娩後の液性免疫応答の優位が顕著であった可能性が示された。

本研究では分娩前後に持続的な低Caの状態にあり加療を要した乳牛では、周産期に低T細胞やB細胞といった免疫機能異常が観察されたことから、分娩後の感染症の発症リスクが高まることが示唆された。分娩時の低カルシウム血症は平滑筋の収縮力を低下させ、乳頭口の緊張を緩慢にしたり子宮の収縮が遅延したりして細菌の感染を容易にして、乳房炎や子宮炎などの感染症を発症しやすくなるため、分娩前後に加療を要する乳牛の感染症予防には十分な配慮が必要であると考えられた。

【引用文献】

1. Ametaj, B. N., Beitz, D. C., Reinhardt, T. A. and Nonnecke, B. J. 1996. 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ inhibits secretion of interferon- γ by mitogen- and antigen-stimulated bovine mononuclear leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 52 : 77-90.
2. Daynes, R. A., Enioutina, E. Y., Butler, S., Mu, H. H. McGee, Z. A. and Araneo, B. A. 1996. Induction of common mucosal immunity by hormonally immunomodulated peripheral immunization. *Infect. Immunol.* 64 : 1100-1109.
3. Goff, J. P. 2006. Major Advances in Our Understanding of Nutritional Influences on Bovine Health *J. Dairy Sci.* 89 : 1292-1301.
4. Goff, J. P., Kimura, K. and Horst, R. L. 2002. Effect of mastectomy on milk fever, energy, and vitamins A, E, and beta-carotene status at parturition. *J. Dairy Sci.* 85 : 1427-1436.
5. Horst, R. L., Goff, J. P. and Reinhardt, T.

- A. 1994. Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 77 : 1936-1951. Review.
6. Kehrl, M. E. Jr. and Goff, J. P. 1989. Periparturient hypocalcemia in cows: Effects on peripheral neutrophil and lymphocyte function. *J. Dairy Sci.* 72 : 1188-119.
7. Kehrl, M. E. Jr., Nonnecke, B. J. and Roth, J. A. 1989. Alterations in bovine neutrophil function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 50 : 207-214.
8. Kehrl, M. E. Jr., Nonnecke, B. J. and Roth, J. A. 1989. Alterations in bovine lymphocyte function during the periparturient period. *Am. J. Vet. Res.* 50 : 215-220.
9. Kida, K. 2003. Relationships of metabolic profiles to milk production and feeding in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 65 : 671-617.
10. Kimura, K., Reinhardt, T. A. and Goff, J. P. 2006. Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 89 : 2588-2595.
11. Kimura, K., Goff, J. P., Kehrl, M. E. Jr. and Harp, J. A. 1999. Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cells in periparturient cows. *J. Dairy Sci.* 82 : 315-319.
12. Lemire, J. M. 1992. Immunomodulatory role of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Cell. Biochem.* 49 : 26-31.
13. Lemire, J. M. 1995. Immunomodulatory actions of 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53 : 599-602.
14. 大塚浩通, 晴山寛子, 小比類巻正幸, 今瀬留似, 増井真知子, 川村清市. 2006. 炎症性疾患に罹患した乳牛における末梢血白血球ポピュレーションとリンパ球幼若化反応. *日家臨会誌* 29 : 47-52.
15. Ohtsuka, H., Koiwa, M., Fukuda, S., Satoh, Y., 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.
16. Shafer-Weaver, K. A., Corl, C. M. and Sordillo, L. M. 1999. Shifts in bovine CD4 + subpopulations increase T-helper-2 compared with T-helper-1 effector cells during the postpartum period. *J. Dairy Sci.* 82 : 1696-1706.
17. Van Kampen, C. and Mallard, B. A. 1997. Effects of peripartum stress and health on circulating bovine lymphocyte subsets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 59 : 79-91.
18. 渡辺知香, 大塚浩通, 小比類巻正幸, 鴫田真弓, 寺澤早紀子, 安藤貴朗, 渡辺大作, 佐藤 繁. 2007. 分娩前後における乳用牛群に対する免疫プロファイルテストの有用性 *日獣会誌* 60 : 709-714.

Changes of Immune Condition in Dairy Cows Needed the Treatment at Calving during the Periparturient Period

Naoko Kanikawa, Hiromichi Ohtsuka, Rui Imase, Hiroko Hareyama and Seiichi Kawamura
School of Veterinary Medicine, Kitasato University
(35-1, Higashi23bancho, Towada, Aomori, 034-8628, Japan)

ABSTRACT

To recognize the relationship between health and immune condition on dairy cows during periparturient period, we analyzed peripheral leukocyte function in the cows with no appetite and needed treatment at calving around calving. The cows observed depression, anorexia and cold skin and treated by calcium (Ca) fluid administration (treated group; n=5) and no treatment healthy cows (control group; n=13) were used to analyze. Lower blood Ca concentration in treated group lasted compared with control group during this experiment, and significant differences were observed at week 1 before calving and day 3 after calving. After calving day 3, the number of peripheral CD3⁺ and CD4⁺ T cell in treated group were significantly lower than those in control group, and lower cell numbers were observed after that. Number of CD21⁺ B cell in treated group was lower during this observation, and significant lower was observed at day 3, week 2 and week 4 compared with control group after calving. In addition, serum IgG concentration was significantly higher in treated group than that in control group at week 4 after calving. These result suggested that abnormal immune condition in dairy cows needed treatment at calving was observed around calving.

【Key Word : dairy cow, immune function, no appetite, periparturient】