

## 群編成による子牛の免疫機能の変化

阿部憲章 木戸口勝彰 菊池文也

牛群編成は、発育を斉一化するために月齢や体重に基づいて行われる飼養管理法であり [1-4], EUの動物飼養管理基準では8週齢以上の個体に制限されている。群編成ではしばしば順位付け行動や闘争が起こり、これらが牛にストレスを与えることが一般に知られている [3] が、免疫機能に及ぼす影響を詳細に検討した報告は少ない。今回、群編成時の飼養管理に関する留意点を検討する目的で、子牛の免疫機能を評価した。

### 材料および方法

試験1 群編成によるストレス反応および細胞性免疫機能：2007年3月から9月に、1農場の乳用子牛を各2～3頭の対照群（計8頭、 $6.1 \pm 2.3$ カ月齢）と移動群（計8頭、 $6.4 \pm 0.9$ カ月齢）に分けた。群編成は対照と移動の両群を3週間以上同居させた後、移動群を高月齢の他群（3頭、 $7.6 \pm 2.4$ カ月齢）へ移動させ、両群を14日後まで継続的に追跡した。同試験を子牛を替えて3回実施した。行動観察に加え、ストレス反応の指標として、血漿コルチゾール濃度を市販キット（血液検査用コルチゾールキット、(株)ARKLAY, 東京）を用いて酵素免疫測定法により、血清遊離脂肪酸（NEFA）濃度を市販キット（NEFAC-テストワコー、和光純薬工業

(株、大阪)により測定した。白血球数を動物用血球計算器（MEK-5254, 日本光電(株), 東京）により、ヘモグラムをメイギムザ染色を施した血液塗抹標本上で計測した。リンパ球幼若化能をPHA, ConAおよびLPS刺激を用いたMTT（3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide）法により測定し、対照群に対する移動群の刺激指数（SI値）の割合で表した。

試験2 群編成による液性免疫機能：2007年7月から11月に、試験1と同じ農場の乳用子牛を対照群（計5頭、 $7.2 \pm 0.7$ カ月齢）と移動群（計4頭、 $8.8 \pm 0.8$ カ月齢）に分けた。両群に牛呼吸器病混合生ワクチン（牛伝染性鼻気管炎；IBR, 牛ウイルス性下痢症；BVD, パラインフルエンザ3型；PI-3及びアデノ7型；Ad-7の各ウイルス, 京都微研）を接種した当日に、試験1と同様に移動群を高月齢の他群（4頭、 $11.5 \pm 0.7$ カ月齢）に移動させ、21日後まで継続的に追跡し、同試験を2回実施した。移動後0日、14日及び21日時に得た血清を用いて、前述の4種のウイルス中和抗体価を求めた。リンパ球サブセットをフローサイトメトリー法で解析した。特異抗原としてCD4（ヘルパーT細胞）、CD8（キラー・サプレッサーT細胞）、CD21（B細胞）及びWC1（ $\gamma \delta$ 型T細胞）を用いた。

統計処理：両群の各採材時の値をstudentの *t* 検定で比較し、*p* = 0.05を統計学的有意点とした。抗体価の比較は、抗体価に1を加えた値の常用対数を二元配置分散分析法で行った。

## 成 績

試験1：移動直後から移動群と高月齢群の間で頭突き、押し合いおよび追い出しなどの順位決め行動が起こり、移動群は低い序列となり、起立時間が長く、採食や飲水時には劣勢になる傾向を示した。これらの行動は移動7日後まで持続した。図1に示すように、対照群では、いずれの検査項目も検査期間中ほぼ同水準で推移した。移動群の血漿コルチゾル濃度は移動2時間後に著しく上昇した後、徐々に低下した。対照群との比較では、移動1日後に有意差が得られた（対照群 $1.1 \pm 0.3$ , 移動群 $7.0 \pm 4.0$  ng/ml）。移動群のNEFA濃度も移動1日後に著しく増加した後、移動7日後まで徐々に低下した。対照群との比較では、移動1日後（ $316 \pm 184$ ,  $113 \pm 81$   $\mu$ Eq/l）、3日後（ $175 \pm 138$ ,  $51 \pm 10$   $\mu$ Eq/l）および7日後（ $93 \pm 24$ ,  $56 \pm 18$   $\mu$ Eq/l）に有意に増加した。移動群のリンパ球数は移動3日後に一過性に有意に低下した（ $7,200 \pm 994$ ,  $8,790 \pm 997$  / $\mu$ l）。移動群の好中球数とリンパ球数の比（N/L比）は移動3日後まで増加した

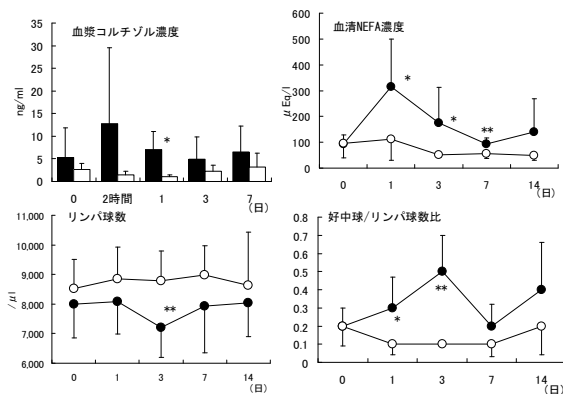


図1 群編成後の移動群(●)および対照群(○)の各成分の推移  
 平均値±標準偏差。  
 2群間の有意差 (\* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01)。

後、7日後に低下した。対照群との比較では、移動1日後（ $0.3 \pm 0.2$ ,  $0.1 \pm 0.1$ ）および3日後（ $0.5 \pm 0.2$ ,  $0.1 \pm 0.0$ ）に有意差が得られた。

図2に示すように移動群のPHA, ConAおよびLPS刺激による各リンパ球幼若化能は移動1日後に有意に低下した（PHA： $0.76 \pm 0.18$ ,  $1.00 \pm 0.19$ ；ConA： $0.67 \pm 0.29$ ,  $1.00 \pm 0.24$ ；LPS： $0.79 \pm 0.14$ ,  $1.00 \pm 0.21$ ）。その後上昇し、7日後までに対照群のそれと同水準まで回復した。

試験2：図3に示すようにワクチン接種前の両群の子牛血清中に各ウイルス抗体は認められなかった。移動時のワクチン接種により、両群の移動14日および21日後の各ウイルス抗体価の上昇の程度は同様であり、両群間で有意差はみられなかった。

図4に示すように、移動群のCD4陽性細胞数は対照群のそれより低値に推移し、移動7日後に両群間で有意差が得られた（ $1,187 \pm 129$ ,  $884 \pm 157$  / $\mu$ l）。移動群のCD21陽性細胞数も移動後低値に推移し、対照群のそれと比べて移動1日後（ $1,546 \pm 854$ ,  $2,997 \pm 1,158$ ）、3日後（ $1,364 \pm 996$ ,  $3,386 \pm 1,282$ ）、7日後（ $1,486 \pm 884$ ,  $2,193 \pm 1,187$ ）および21日後（ $539 \pm 827$ ,  $2,740 \pm 1,228$ ）に有意な低値を示した。両群のCD8およびWC1陽性細胞数は、対照群のそれらとほぼ同水準で推移した。

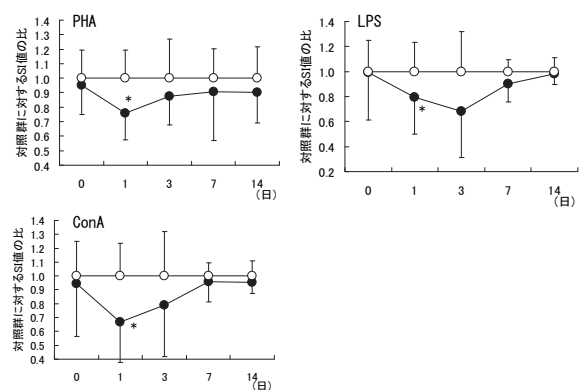


図2 群編成後の移動群(●)および対照群(○)のリンパ球幼若化能の推移  
 平均値±標準偏差。  
 2群間の有意差 (\* *p* < 0.05)。

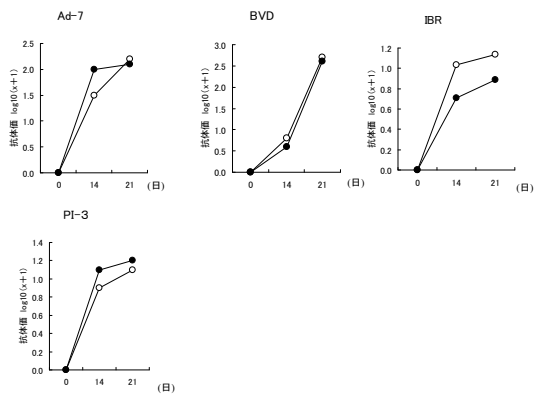


図3 群編成後の移動群(●)および対照群(○)の各ウイルス血清抗体価の推移

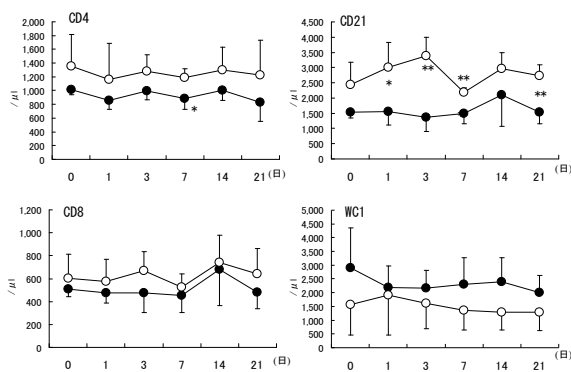


図4 群編成後の移動群(●)および対照群(○)のリンパ球サブセットの陽性細胞数の推移  
 平均値±標準偏差。  
 2群間の有意差(\* p<0.05, \*\* p<0.01).

### 考 察

群編成のため他群へ移動した群は低い序列を示し、血漿コルチゾル濃度は移動1日後に、N/L比は移動1日から3日後まで対照群と比較し上昇した。今回の試験対象牛の月齢は、序列形成が認められる3カ月齢以上であり[1, 3, 4]、移動群が受入群に比べ低月齢であったことから、体格的に劣ったことも序列を低位にする要因であったと推察された[3]。血漿コルチゾル濃度の増加は移動によるストレス負荷に伴い視床下部-下垂体-副腎軸(HPA軸)が刺激された結果[5]と思われた。移動3日後まで観察されたリンパ球数の減少と好中球数の増加によるN/L比の上昇は、ストレス状態が移動3日後まで継続したことを示唆している。

NEFAは脂肪組織からの血中への脂質動員を反映し、低栄養時に増加する[6]。移動7日後まで続いたNEFA濃度の増加は、ストレスや低い序列により飼料の摂取量が不足し[1]、体脂肪が動員されたことによると思われた。

T細胞を活性化するPHAおよびConAならびにB細胞を活性化するLPSの各刺激によるリンパ球幼若化能は、いずれも移動1日後に一過性に低下し、その後上昇した。移動群のCD4およびCD21陽性細胞数も影響され、前者は移動7日後に、後者は移動7日から21日後まで低下した。得られた成績は移動直後に細胞性および液性免疫機能の低下を招いたことを示唆している。

ワクチン接種直後に移動させた群の抗体価は移動させなかった対照群のそれと同様であった。この事実は、過密飼養に伴うストレスにより、ワクチン接種後の抗体上昇が抑制されたという既報[7]の結果と相違した。この正確な理由は不明であるが、移動群に負荷されたストレスの程度が既報[7]のそれと比べて軽度であり、液性免疫の低下が軽度に留まった結果であろうと推察された。今後、より強いストレスを負荷した際の影響を調査する必要がある。

群編成により細胞性および液性免疫機能が抑制されたが、その程度や抑制期間はPHA刺激によるリンパ球幼若化能、CD21陽性細胞数などの検査指標により移動1日後から21日後までさまざまであった。得られた成績から、移動後の飼養管理として1週間程度は注意深い観察や感染症を防ぐ衛生管理が求められ、ワクチン接種は基本的に移動前に行うべきであるが、移動後に接種する際は移動1週間後以降の接種により、より高い効果が期待できるように思われた。

稿を終えるにあたり、試験牛の提供を得た岩手県農業研究センター畜産研究所の諸先生方、また、リンパ球サブセット解析のご指導を賜った独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 生産病研究チーム高橋

秀之チーム長，菊佳男研究員に深謝する。

### 引用文献

- [ 1 ] Gupta S, Earley B, Ting ST, et al : Effect of repeated regrouping and relocation on the physiological, immunological, and hematological variables and performance of steers, *J Anim Sci*, 83, 1948-1958 (2005)
- [ 2 ] Sevi A, Taibi L, Albenzio M, et al : Behavioral, adrenal, immune, and productive responses of lactating ewes to regrouping and relocation, *J Anim Sci*, 79 : 1457-1465 (2001)
- [ 3 ] 鈴木省三：家畜の社会環境，畜産大辞典，田崎威和夫編，第2版，736-741，養賢堂，東京（1979）
- [ 4 ] Veissier I, Boissy A, dePassille AM, et al : Calves' responses to repeated social regrouping and relocation, *J Anim Sci*, 79, 2580-2593 (2001)
- [ 5 ] Minton JE : Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous system in models of acute stress in domestic farm animals, *J Anim Sci*, 72, 1891-1898 (1994)
- [ 6 ] Jack C. Bartley : 脂質の代謝とこれに関連する疾患，獣医臨床生化学，久保周一郎，友田勇監訳，第4版，108-164，近代出版，東京（1991）
- [ 7 ] Grasso F, Napolitano F, De Rosa G, et al : Effect of pen size on behavioral, endocrine, and immune responses of water buffalo (*Bubalus bubalis*) calves, *J Anim Sci*, 77, 2039-2046 (1999)

## 文 献 抄 録

### H5N1高病原性鳥インフルエンザウイルスに自然感染した白鳥の病理

Teifke JP, Klopfleisch R, Globic A, Starick E, Hoffmann B, Wolf PU, Beer M, Mettenleiter TC, Harder (ドイツ国立家畜衛生研究所, *Vet Pathol*, 44, 137-143, 2007)

高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) ウイルス感染による水禽類の死亡はまれであるが，近年，白鳥が同ウイルスに高い感受性を示すことが指摘されている．H5N1 HPAIウイルスに自然感染した白鳥を病理学的に検索した．剖検により，臍臓に多発巣状の出血性壊死，肺にうっ血・水腫，心外膜に出血がみ

られた．主要な組織学的病変は臍臓および肝臓の多発巣状壊死，神経細胞の壊死を伴う非化膿性脳炎であり，副腎実質の散発性巣状壊死，脾臓およびパイエル板におけるリンパ球の軽度な壊死を伴っていた．これらの病巣内にはHPAIウイルス抗原が存在した．同抗原はプルキンエ細胞を含む多数の神経細胞とグリア細胞に認められ，同ウイルスの神経親和性が示唆された．同抗原は肺の上皮細胞にはみられなかった．観察された循環障害，肺水腫および急性死の機序についてさらに検討を要する．

(岩手県中央家畜保健衛生所病性鑑定課)