

ウシ好中球の走化能の測定

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	永幡, 肇 山中, 旭 野田, 寛
巻/号	40巻12号
掲載ページ	p. 838-841
発行年月	1987年12月

ウシ好中球の走化能の測定

永幡 肇* 山中 旭* 野田 寛*

(昭和 62 年 10 月 16 日受理)

Chemotactic Response of Bovine Neutrophils Evaluated by Chemotaxis under Agarose
HAJIME NAGAHATA, AKIRA YAMANAKA and HIROSHI NODA (School of Veterinary
Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069)

SUMMARY

Zymosan-activated serum showed a significant chemotactic activity, whereas formyl peptide (f-MLP) failed to attract bovine neutrophils. An optimal number of neutrophils and incubation period in the agarose method were 1×10^6 neutrophils and 2 hours, respectively.

A significantly reduced chemotactic response of neutrophils in cows was found immediately after the parturient period, as compared with that in any other period. This reduction seemed to be related to the elevated cortisol concentration in blood during the parturient period.

要 約

アガロース法を用いたウシ好中球の走化能を評価するため、走化因子、アガロースウエル内の好中球数および培養時間について検討し、さらに、周産期乳牛 10 頭の出産前後における走化能および血漿コルチゾール濃度を測定した。ウシ好中球はチモーザン処理血清に対し良好な走化性を示した。ウエル内の好中球数は 1×10^6 個、培養時間は 2 時間が走化性、走化指数および走化性—ランダム運動の差の評価のうえで適当と考えられた。分娩時のウシ好中球の走化能は、分娩前後 3 週値のそれと比較して有意に低下しており、この一因として血漿コルチゾール濃度の上昇が関連しているものと考えられた。

ヒト好中球においては、走化性因子欠損による障害や遊走障害など数多くの食細胞の遊走障害が知られており¹⁰⁾、これに起因した症例が多数報告されている¹⁰⁾。しかし動物に関しての研究は不十分で、ウシ好中球の走化能については報告も少ない²⁻³⁾。感染防御の上で好中球の各種の機能検索は重要な項目と考えられるが、臨床例についてはほとんど検討されていない。

好中球の走化能の測定は、フィルター法¹⁾とアガロース法²⁾に大別される。アガロース法を用いたウシ好中球の走化能の測定は、ヒト好中球の走化能の評価法である NELSON ら³⁾の方法にしたがって行っているが、その測定法に関する検討は十分ではない。そこで、アガロース法によるウシ好中球の走化能の評価を行うため、走化能に影響をおよぼす走化因子、ウエル内の好中球数および培養時間について検討した。また、ホルスタイン種乳牛 10 頭につき、好中球の走化能と血漿コルチゾール濃度との関連を調べる目的で走化能およびコルチゾール濃度を測定した。

1. 材 料 と 方 法

1) 走化因子の調製

チモーザン (Zymosan A: *S. cerevisiae* yeast, Sigma, USA) を滅菌生理食塩液で 1 回洗浄し、ウシ新鮮プール血清 (5 頭) に 10 mg/ml 濃度で懸濁後、試験管ミキサーにて十分混和した。つぎに、ロートラック (Taiyo) を使い、37°C で 1 時間転倒混和した。反応終了後、700 g, 20 分間遠心し、上清を回収し、チモーザン処理血清とし小量ずつ分注後、-20°C 下で保存し使用時に融解して用いた。

合成ペプチド：フォルミル—メチオニル—ロイシル—フェニルアラニン (f-MLP) はジメチルスルフォキシドに溶解し、ハンクス液で最終濃度 10^{-8} ~ 10^{-6} M に希釈して使用した。

2) 供試動物

酪農学園付属農場に飼養されている臨床的健康な 1.6~6.5 才のホルスタイン種乳牛 5 頭を好中球の走化能の基礎的検討に用い、また周産期の好中球の走化能を測定するために、2.3~10.0 才の乳牛 10 頭から分娩予定日前約 4 週から、分娩時および分娩後 4 週にわたり週 1 回

* 酪農学園大学酪農学部 (北海道江別市文京台緑町 582)

採血した。末梢血液は尾静脈よりヘパリン加真空採血管に採血し、総白血球数および白血球百分比を常法に従い算定し、また好中球機能を測定した。

3) 好中球浮遊液の調製

血液からの好中球の分離は、フィコールーコンレイ法を用いて行った⁷⁾。まず血液 10 ml をリン酸緩衝生理食塩液 (PBS; pH 7.2) 20 ml で希釈した。つぎに、遠心管 (50 ml) にフィコールーコンレイ液 10 ml を入れ、その上層に希釈血 30 ml を静かに重層し、500 g, 30 分間遠心した。遠心後、血漿および単核球層を除去し、血球層に 0.2% 食塩液 10 ml を加え 20 秒間パスツールピペットで懸濁攪拌し、ただちに 1.6% 食塩液 10 ml を加えて浸透圧を等張にした。赤血球の溶血操作により得た好中球沈渣をメディウム 199 に 1×10^7 個/ml に調製した。回収した好中球浮遊液の純度は 80~90% であった。

4) 走化能測定

アガロース法による好中球の走化能の測定は、NELSON⁸⁾の方法にしたがって行った。アガロース (Type 1, Sigma, USA) を蒸留水で 1 回洗浄 (1700 g, 15 分間) 後、2.4% アガロースを作製し 30 分間沸騰水中で煮沸した。煮沸後 48°C に保持し、あらかじめ調製したメディウム [メディウム 199 (10 倍濃度) 20 ml, 7.5% 炭酸水素ナトリウム 2 ml, 非働化ウシブール血清 2.0 ml, 滅菌蒸留水 58 ml を混和し 48°C に保持] を等量加え混和後、60×15 mm の組織培養シャーレ (Falcon 3002) に 10 ml 分注した。室温下でアガロースゲルを硬化させた後、4°C で 30 分間放置した。アガロースゲルに直径 2.5 mm の小穴 (ウエル) 3 個を直線上に 2.5 mm 間隔で開けたものを一組として 3~4 組を用意した。3 個のウエルの中央に好中球浮遊液 10 μ l (0.25, 0.5, 1, 2, および 4×10^6 個) を入れ、外側のウエルには走化因子を 10 μ l, 内側のウエルには対照メディウム 10 μ l を入れた。5% CO₂ 下 37°C で 2 時間培養した。培養時間の検討時には、30分, 1, 2 および 3 時間で行った。培養終了後、メタノール 5 ml を加え 30 分間保持し、さらに 10% ホルマリン-PBS を 5 ml 加え 30 分間保持した。アガロースを除き風乾後、Wright 染色を行った。走化因子側への移動距離を走化性 (C) 対照メディウム側への移動距離をランダム運動 (R) としてマイクロ

メータ装着顕微鏡下で測定した (mm)。結果は C, R, 走化指数 (C/R) および CR 間の差 (C-R) で表した。

5) 血漿コルチゾール濃度の測定

コルチゾールの測定は酵素免疫測定法 (ENDAB コルチゾール測定キット, Immunotech, Corp.) で測定した。

6) 統計処理

平均値の差の検定は Student の t-test で行い、危険率 5% 以下を有意性のある差とした。

2. 成 績

ウシ好中球の走化因子に対する反応性を調べるために、走化因子にチモゼン処理血清および合成ペプチドの f-MLP を用いて走化性を検索した結果、チモゼン処理血清には走化性を示したが、f-MLP に対しては認められなかった。

アガロースウエル内の好中球数について、最終好中球数 0.25×10^6 , 0.5×10^6 , 1×10^6 , 2×10^6 および 4×10^6 個につき好中球の走化性におよぼす影響を検討しその成績は表 1 に示した。走化性およびランダム運動ともに好中球数の増加 ($0.25 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 個) に伴い促進する傾向が認められ、走化性は 1×10^6 個/ウエルが最も高く、 0.25×10^6 個/ウエルおよび 0.5×10^6 個/ウエルの成績に比較してその差は有意 ($P < 0.01$, $P < 0.05$) であった。ランダム運動は 2×10^6 個/ウエルが高く、 0.25×10^6 個/ウエルと 1×10^6 個および 2×10^6 個/ウエル間に有意差

表 1 走化能に及ぼす好中球数の影響

細胞数	走化性 (C)	ランダム運動 (R)	走化指数	C-R
0.25×10^6	1.51 ± 0.44	0.74 ± 0.23	2.09 ± 0.27	0.77 ± 0.24
0.5×10^6	1.73 ± 0.30 ^{**}	0.86 ± 0.21 [*]	2.05 ± 0.33	0.89 ± 0.20 ^{**}
1×10^6	2.06 ± 0.40 [*]	0.94 ± 0.18 [*]	2.19 ± 0.16	1.12 ± 0.24 [*]
2×10^6	1.97 ± 0.40	1.03 ± 0.17	1.92 ± 0.23	0.95 ± 0.27
4×10^6	1.77 ± 0.50	0.98 ± 0.07	1.79 ± 0.39	0.79 ± 0.44

注) 平均±標準偏差 (n=5), 単位は mm. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$

表 2 走化能に及ぼす培養時間の影響

時間	走化性 (C)	ランダム運動 (R)	走化指数	C-R
0.5	0.28 ± 0.07 [*]	0.21 ± 0.04 [*]	1.34 ± 0.22	0.08 ± 0.05 ^{**}
1	0.60 ± 0.21 ^{**}	0.42 ± 0.19 ^{**}	1.35 ± 0.28 ^{**}	0.17 ± 0.04 ^{**}
2	1.44 ± 0.39 ^{**}	0.81 ± 0.20 ^{**}	1.78 ± 0.21 ^{**}	0.63 ± 0.22 ^{**}
3	2.13 ± 0.43 ^{**}	1.30 ± 0.40 ^{**}	1.70 ± 0.34	0.83 ± 0.17

注) 平均±標準偏差 (n=5), 単位は mm. * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$

表 3 分娩前後におけるウシ好中球の走化能成績

期 間	走化性 (C)	ランダム運動 (R)	走化指数	C-R
分娩前 3 週	1.35 ± 0.40 [*]	1.08 ± 0.26	1.24 ± 0.11 [*]	0.29 ± 0.17 ^{**}
分娩時	0.94 ± 0.27 ^{**}	0.85 ± 0.28	1.12 ± 0.08 [*]	0.09 ± 0.06 ^{**}
分娩後 3 週	1.29 ± 0.16 ^{**}	1.09 ± 0.13	1.19 ± 0.14	0.20 ± 0.14 ^{**}

注) 平均±標準偏差 (n=10) * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$

ウシ好中球の走化能の測定

表4 周産期乳牛10頭の血漿コルチゾール濃度の測定成績

分娩前 (週)				分娩後 (週)			
-4	-3	-2	-1	1	2	3	4
11.25±1.75	12.25±6.26	15.15±6.32	14.90±5.59	42.00±30.38 ^{a)}	16.75±5.09	12.60±3.78	13.61±4.31

注) 平均±標準偏差, 単位 ng/ml. a): 分娩当日の値 (n=6) *: P<0.05

を認めた(P<0.05). 走化指数は 1×10^6 個/ウエルでやや高い傾向にあったが各好中球数の走化指数には有意差を認めなかった. 走化性とランダム運動の差は 1×10^6 個/ウエルで高く, 1×10^6 個/ウエルおよび 0.5×10^6 個/ウエル間に有意差を認めた(P<0.01, P<0.05).

走化能におよぼす培養時間の影響を培養時間 30 分から3時間で検討し, その成績は表2に示した. 培養時間30分で走化性およびランダム運動ともに認め, 30分値と1時間値, 1時間値と2時間値また2時間値と3時間値の差は有意であった. 培養時間の経過に伴い走化性およびランダム運動は増加し, 2時間値で走化性は 1.44 ± 0.39 mm, ランダム運動は 0.81 ± 0.20 mm であり, 走化指数は 1.78 ± 0.21 と最も高く, 1時間値に比較して有意差(P<0.01)を認めた. C-R 間は2時間値で高く, 30分値および1時間値に比較して有意差(P<0.01)を認めた.

周産期における好中球の走化能の結果は表3に示した. 好中球の走化性は分娩時に低く, 分娩前後3週値に比較して有意差(P<0.01, P<0.05)を認めた. 分娩時のランダム運動は分娩前および分娩後のそれに比較して低下していたが, 有意差は認められなかった. 走化指数は分娩時に低く, 分娩前3週値に比較して有意差(P<0.05)を認めた. 走化性とランダム運動の差(C-R)は, 分娩時に低く, 分娩前後に比較して有意差(P<0.01)を認めた.

周産期牛 10 頭の血漿コルチゾール濃度を測定し, その結果は表4に示した. 分娩前2週値(15.15 ± 6.32 ng/ml)より増加がみられ, 分娩日(42.30 ± 30.38 ng/ml (n=6); 範囲 $11.5 \sim 92.0$ ng/ml)に著明に増加し, 分娩～分娩後1週値のコルチゾール濃度と分娩後3週値の間に有意差(P<0.05)を認めた.

3. 考 察

好中球の運動は, 走化因子の濃度勾配に逆らって方向性をもって移動する走化性と, 方向性がなく自由に運動する随意運動(ランダム運動)に大別されるが, 好中球の走化因子に対する質的な反応性は種によって異なることが報告されている³⁻⁵⁾. ウシ好中球の走化能に関して GRAY⁵⁾や CARROLL³⁾は, チモーザン処理血清に対しては走化活性を示すが, ヒト好中球の走化因子である合成ペプチド f-MLP や細菌培養濾液に対しては見ら

れないことから, ウシ好中球の走化因子に対する反応性は多種と異なっていることを報告している. CRAVEN⁴⁾はウシ好中球に対する走化因子の影響を調べ, チモーザン処理血清, ロイコトリエン B4に走化活性を示すが, 種々の細菌産物, 合成ペプチド, カゼイン, 血漿板凝集因子には走化性を示さないとしている. 本実験において, チモーザン処理血清に対しては走化活性が認められ, 合成ペプチド(f-MLP)に対する非反応性は GRAY⁵⁾, CARROLL³⁾および CRAVEN⁴⁾の結果と同様であった. 他の好中球の走化活性因子について, CRAVEN⁴⁾はウシ乳腺マクロファージの *in vitro* 培養において, 死菌ブドウ球菌および大腸菌, チモーザン, 大腸菌培養濾液およびエンドトキシンなどでマクロファージを刺激した場合, ウシ好中球に対する走化活性の存在が見られ, 非刺激マクロファージでは有意な活性はみられないとしている.

アガロース法を用いたウシ好中球の走化能測定に関して, NELSON⁶⁾の方法に準じて行っているが, 測定条件の検討は見られない. 走化能の測定は変動の大きい測定法の一つであり, 技術の習熟も必要であるが走化活性におよぼす要因, すなわち, 走化因子, アガロース組成, アガロースプレート作製法, 細胞調製とアガロースウエル内の細胞数, 培養時間などを検討することが重要と考えられる. 走化能におよぼす好中球数の影響を $0.25 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 個の範囲で検討したところ, $0.25 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 個と細胞数を増すことにより, 走化活性は有意に増加することを認めた. 走化性, 走化指数および C-R の差は, 1×10^6 個/ウエルで最も高いことが認められたことからウエル内の好中球数は 1×10^6 個が適当と考えられた. NELSON⁶⁾はヒト好中球数をウエルあたり, $0.25 \times 10^6 \sim 1 \times 10^6$ 個と好中球を増加することにより, 走化性(C)およびランダム運動(R)ともに増加するが, C-R の差は影響を受けず, 走化指数は逆に減少すると報告している. 本実験においてもほぼ同様の傾向が認められた. 培養時間については時間の経過に伴い走化性, ランダム運動ともに増加するが, 走化指数は3時間で減少した. この理由としてランダム運動の増加により走化指数が減少してくるものと考えられる. 以上のことから培養時間は2時間が適当であることを確認した.

成乳牛 10 頭について, 分娩前3週, 分娩時および分娩後3週の走化能を調べた結果, 分娩時の走化能は分娩

前後のそれに比較して有意に低下していることが認められた。このことは宿主の感染防御において宿主抵抗性を減弱させている一因になっているものと推察された。周産期の血漿コルチゾール濃度の検討から、分娩時のコルチゾール濃度の上昇は、ROTHら⁹⁾も報告しているように、コルチゾールによる好中球機能の抑制と関連しているものと考えられる。

稿を終るにあたり、コルチゾール測定にご協力をいただいた仲沢聡志および高橋 博の両氏、また採材にご協力をいただいた酪農学園付属農場の各位に感謝します。

引用文献

- 1) BOYDEN, S. V.: *J. Exp. Med.*, 115, 453~466 (1962).
- 2) BRUECKER, K. A. and SCHWARTZ, L. W.: *Am. J.*

Vet. Res., 43, 1879~1881 (1982).

- 3) CARROLL, E. J., MUELLER, R. and PANICO, L.: *Am. J. Vet. Res.*, 43, 1661~1664 (1982).
- 4) CRAVEN, N.: *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.*, 9, 29~36 (1986).
- 5) GRAY, G. D., KINGHT, K. A., NELSON, R. D., et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 43, 757~759 (1982).
- 6) JAYAPPA, H. G. and LOKEN, K. I.: *Am. J. Vet. Res.*, 44, 2155~2159 (1983).
- 7) NAGAHATA, H., YATSU, A. and NODA, H.: *Br. Vet. J.*, 142, 578~584 (1986).
- 8) NELSON, R. D., QUIE, P. G. and SIMMONS, R. L.: *J. Immunol.*, 115, 1650~1656 (1975).
- 9) ROTH, J. A. and KAEBERLE, M. L.: *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 180, 894~901 (1982).
- 10) 白井朋包: 白血球と食作用, 水上茂樹, 柿沼カ子編, 150~174, 講談社, 東京 (1979).



KITASATO

北里の 鶏・豚用製剤

TO-31
1986.3

<p>■鶏用各種ワクチン</p> <ul style="list-style-type: none"> ●ニューカッスル病TCND乾燥予防液 ●ニューカッスル病不活化予防液 ●ニューカッスル病生ウイルス予防液(B1株) ●ND-IC混合不活化ワクチン ●鶏伝染性コリーザ2価ワクチン「北研」 ●コリーザワクチン「北研」 ●コリーザワクチン「北研」C型 ○穿刺用液状鶏痘予防液 ○穿刺用鶏痘乾燥予防液 <p>■鶏診断用製剤</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集素「北研」 ○M.S急速凝集反応用菌液 	<p>■豚用各種ワクチン</p> <ul style="list-style-type: none"> ●TGE生ワクチン豚用「北研」 ●ARワクチン(豚ホルデテラ感染症予防液) ●豚丹毒生ワクチン「北研」 ●豚コレラ生ウイルス乾燥予防液 ●日本脳炎生ウイルスワクチン(1m⁴用) <p>■豚診断用製剤</p> <ul style="list-style-type: none"> ○AR抗原「北研」 ○AR抗原参考抗血清「北研」 ○Bb. I相菌免疫家兔血清
--	---

●印は要指示医薬品



製造 北里研究所(社団法人)

販売 北里薬品産業株式会社

本社 千108東京都港区白金5丁目9-1 ☎03(444)6161(代)

大阪支店 ☎06(202)7658(代) 東北出張所 ☎0236(45)0111(代)

南九州連絡所 ☎0992(94)8070 北関東連絡所 ☎0272(32)0381

動物用消毒剤 動物用医薬品

「北研」セツコンク 


動物用医薬品

肝疾患・皮膚疾患治療剤

パンカル[®]G(顆粒)

○パンカルG(顆粒)は
急性・慢性肝炎, 脂肪肝, ケトージス, 肝硬変, 黄疸症の治療剤です。

○パンカルG(顆粒)は
皮膚炎, 湿疹, 蕁麻疹, 飼料疹, アレルギー性皮膚疾患の治療剤です。



第一製薬株式会社 東京都中央区日本橋三丁目14番10号