

乳牛の炎症性疾患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

| | |
|-------|--|
| 誌名 | 日本家畜臨床学会誌 = Japanese journal of large animal clinics |
| ISSN | 13468464 |
| 著者 | 大塚, 浩道 晴山, 寛子 小比類巻, 正幸 ほか6名, |
| 巻/号 | 29巻2号 |
| 掲載ページ | p. 47-52 |
| 発行年月 | 2006年10月 |

乳牛の炎症性疾患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

大塚浩通¹⁾ 晴山寛子¹⁾ 小比類巻正幸²⁾ 今瀬留以¹⁾ 増井真知子¹⁾
安藤貴朗¹⁾ 渡辺大作¹⁾ 川村清市¹⁾ 佐藤 繁³⁾

¹⁾北里大学獣医畜産学部, ²⁾小比類巻家畜診療サービス, ³⁾宮城NOSAI

Peripheral Leukocyte Population and Lymphocyte Proliferation in Cows with Inflammatory Disease

H. Ohtsuka¹⁾, H. Hareyama¹⁾, M. Kohiruimaki²⁾, R. Imase¹⁾, M. Masui²⁾,
T. Ando¹⁾, D. Watanabe¹⁾, S. Kawamura¹⁾, S. Sato³⁾

¹⁾Veterinary Internal Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University, ²⁾Kohiruimaki Animal Medical Service, ³⁾Miyagi Agricultural Mutual Relief Association

要 約 炎症性疾患に罹患した乳牛における細胞性免疫状態を明らかにするために、末梢血白血球ポピュレーションおよびリンパ球幼若化反応を解析した。供試牛として飛節周囲炎、蹄底潰瘍、乳房炎に罹患した臨床例68頭と、臨床的に健康な対照群12頭を用いた。各炎症群のCD4⁺細胞およびMHC⁺CD14⁻細胞数が対照群に比べて低値を示し、MHC⁻CD14⁺細胞数が高値を示した。各炎症群におけるPHA刺激幼若化反応は対照群に比べ低値を示し、PWM刺激幼若化反応は高値を示した。また全ての臨床例における項目の相関においては、CD14⁺細胞中MHC陽性率とCD4⁺細胞数の間に正の相関が、CD21⁺IgG⁺細胞数とPWM刺激幼若化反応およびγ-グロブリン量との間には負の相関が認められた。これらのことから、炎症群ではT細胞機能の低下、またB細胞機能の亢進と数の減少があることが明らかとなった。乳牛の炎症性疾患では細胞性免疫機能低下と液性免疫機能亢進の状態にある可能性が示唆された。

——キーワード：炎症性疾患、乳牛、末梢血白血球ポピュレーション、リンパ球幼若化反応

.....家畜臨床誌 29(2):47-52, 2006

ABSTRACT To clarify the cellular immunity condition in cows with inflammatory disease, peripheral leukocyte population and lymphocyte proliferation were analyzed. Sixty eight of clinical cases of dairy cows with periartthritis of hock joints, sole ulcer, mastitis, and twelve clinical healthy cows were used (control group). The numbers of CD4⁺ and MHC⁺ CD14⁻ cells in each inflammatory group were lower, and MHC⁻CD14⁺ cells were higher compared with the healthy group. The proliferation of PHA in each inflammatory group was lower and the proliferation of PWM was higher compared with the healthy group. There was a positive relation between the

Received 23 May 2006/Accepted 24 July 2006

*Correspondence to: H. Ohtsuka, Laboratory of Veterinary Internal Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Kitasato University, Towada, Aomori 034-0021, Japan. (〒034-8628 青森県十和田市東23番町35-1)

MHC positive rate in CD14⁺ cells and CD 4⁺ cell number, and CD21⁺ IgG⁺ cell number and proliferation of PWM or γ -globulin concentration in each inflammatory group. These results clarified that depression of the T cell function and enhancement of the B cell function was observed in the cows affected by inflammatory disease. It is possible that dairy cows with inflammatory diseases suppress cellular immunity function and activate humoral immunity function.

— Key words : inflammatory disease, dairy cows, peripheral leukocyte population, lymphocyte proliferation

.....Jpn. J. Vet. Clinics 29(2):47-52, 2006

緒言

乳牛の乳房炎や関節炎などの炎症性疾患は発生頻度が高く、生産性を著しく減退させる。なかでも慢性経過をたどる症例では難治性であり、ついには廃用となることもある。

炎症反応は、侵入してきた抗原を直接排除しようとする細胞性免疫と、間接的に排除しようとする液性免疫の二つの免疫反応によって引き起こされる。細胞性免疫において主要な白血球となるのが貪食能を持つ好中球と単球であり、液性免疫において主要な白血球となるのが抗体産生細胞に成熟するB細胞である。そして生体内では、これら細胞性免疫と液性免疫がバランスを維持しながら免疫機能の恒常性を維持しており、細胞性免疫応答または液性免疫応答のどちらが優位かによって、免疫細胞の数や機能は変化する。

白血球表面抗原の解析により得られる末梢白血球ポピュレーションは、免疫反応により多様に変化する各白血球のバランスを評価するもので、免疫反応を評価するために有用である。乳牛の炎症性疾患における細胞性免疫に関する報告では、*Staphylococcus Aureus* (S.A) による実験的乳房炎モデルにおいて、乳房内の菌の増加にともなって末梢血中の細菌数とCD 4⁺T細胞が増加している [8]。また、大腸菌性乳房炎の症例では急性炎症反応が認められる時期に、T細胞の減少が認められている [6] ことから、CD 4⁺T細胞数やCD 4⁺/CD 8⁺比率などが炎症性疾患における細胞性免疫応答の指標になると考えられる。

炎症性疾患に罹患した乳牛では何らかの免疫反応があるものと予測されるが、その詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、臨床的に炎症性疾患であると判断され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を解析し、免疫状態について検討した。

材料および方法

供試牛

供試牛は青森県の12戸の牧場で飼育されていたホルスタイン種、年齢約2歳から約10歳までの雌牛を用いた。臨床症状として発熱、食欲廃絶などの全身性炎症反応を認めない炎症性疾患の症例を対象（炎症群）とし、飛節周囲炎群（n=42、平均年齢5.7±0.7歳、平均分娩後日数187±29日）、蹄底潰瘍（n=16、平均年齢6.1±0.4歳、平均分娩後日数188±26日）、乳房炎（n=10、平均年齢4.3±0.6歳、平均分娩後日数179±43日）の3群、計68頭の泌乳牛の血液を解析した。また臨床的に健康であった12頭（平均年齢4.6±0.9歳、平均分娩後日数239±40日）の泌乳牛を対照群として用いた。

血液検査

赤血球数（RBC）、ヘマトクリット（Ht）、白血球数（WBC）について自動血球計算装置（CELLTAC α , NIHON KOHDEN,）により測定した。血清蛋白質の分画はセルロース・アセテート膜電気泳動法により分析した。

末梢血白血球のフローサイトメトリー法

白血球の表面抗原の解析は間接蛍光抗体法で染色し、フローサイトメーター（FACScan、Becton Dickinson社、U.S.A.）で測定した。その概要は次の通りであった。EDTA-2 Na添加血液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。白血球浮遊液に一次抗体を加えて4℃で、1時間反応させた。本研究に用いた抗体はVMRD社（Pullman, U.S.A.）のCACT83B（抗CD 4抗体；ヘルパーT細胞）、9 ACT80C（抗CD 8抗体；プレッサー・キラーT細胞、TH14B（抗MHC

class II 抗体；単球、B細胞）、GB25A（抗CD21抗体；B細胞）、MY 4（抗単球抗体；単球、Coulter Immunology, Florida, U.S.A.）であった。その後PBSで洗浄し、 1×10^4 倍の二次抗体（FITC標識抗マウスIgM抗体およびPE標識抗マウスIgG 1抗体）を加え、4℃で30分間反応させた。またB細胞の成熟度の評価する目的で、白血球浮遊液にGB25A抗体とともにKirkegaard & Perry社（Guildford, U.K.）のウシIgM（成熟前B細胞）またはIgG（成熟B細胞）FITC標識抗体を反応させた。反応後PBSで洗浄し、PBSで適宜希釈し測定した。測定データはCell Questを用いて解析を行った。

また、これまでの報告 [3] に従って、単球を示すCD14⁺細胞中の Major Histocompatibility Complex (MHC) class II を持つCD14⁺細胞の割合をMHC class II 陽性率によって示した。

リンパ球幼若化試験

ヘパリン加真空採血管で採取した血液 3 ml を同量のPBSで希釈し、3 ml のリンホセパール I に重層した。重層後、1500rpmで40分間遠心し、白血球を分離した。分離した細胞は数回PBSで洗浄し、 10^6 細胞/mlとなるようにRPMI Medium 1640 (RPMI) で調整した。細胞にはそれぞれ、Phytohemagglutinin (PHA；SIGMA, PO. U.S.A.) と recombinant-hu-interleukin (IL-2；DAKO Japan, Kyoto, Japan) 添加PHA、Pokeweed mitogen (PWM；SIGMA) で刺激し、10%牛胎子血清添加RPMIにて72時間培養した。幼若化反応に用いた濃度はそれぞれPHA (5 μ g/ml)、IL-2 (20ng/ml)、PWM (1 mg/ml) であった。培養後は、3-4、5-

Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT；5 mg/ml) で細胞を染色し、その2時間後にSodium Dodecyl Sulfate (SDS) で細胞を破壊して、24時間後に吸光度計 (Model 3550 MACROPLATE READER, BIO-RAD Laboratories) により波長590nmで測定した。

成績は各疾患群と健康群の差を配置分散分布後にScheffeの方法にて比較を行い解析した。また炎症群における各解析項目間の相関をFisherのz変換を用いて解析し、いずれも5%の危険率で有意な差とした。成績は平均±標準誤差により表示した。

結果

血液検査所見

炎症群の各3群の血清総蛋白質 (TP) は対照群に比べ有意な高値を示した。そのうち血清アルブミン量は対照群に比べ低く、血清 γ -グロブリン量およびA/G比は対照群に比べ有意な高値を示した。しかしHt、RBC、WBC、血清 α -グロブリン量には炎症群の各3群と対照群の間に有意差を認めず (表1)、炎症群の3群間にも有意な差を認めなかった。

末梢血白血球ポピュレーションとリンパ球幼若化反応

炎症群の各3群のCD4⁺およびCD8⁺細胞数は、対照群に比べ低い傾向にあった。炎症群のMHC⁺CD14⁺細胞は、それぞれ対照群に比べ低い傾向を示した。CD14⁺細胞中のMHC class II 比は炎症群の各3群が、対照群に比べ有意な低値を示した。一方、MHC⁺CD14⁻細胞およびCD21⁺IgG⁺細胞は、対照群に比べ有意な低値を示し

表1 各群の血液所見

| | | 飛節周囲炎群 (n=42) | 蹄底潰瘍群 (n=16) | 乳房炎群 (n=10) | 対照群 (n=12) |
|--------------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Ht | (%) | 29.9±0.5 | 31.0±1.1 | 29.7±1.2 | 30.4±1.6 |
| RBC | ($\times 10^4 / \mu$ l) | 586±14 | 613±14 | 568±24 | 634±24 |
| WBC | ($\times 10^2 / \mu$ l) | 76.9±4.4 | 81.1±7.5 | 84.3±9.4 | 82.8±4.7 |
| 血清総蛋白質 | (g/dl) | 7.81±0.1 ^a | 7.56±0.2 ^a | 7.73±0.3 ^a | 6.80±0.1 ^b |
| 血清アルブミン | (g/dl) | 2.82±0.1 ^a | 3.02±0.1 | 2.76±0.3 ^a | 3.14±0.1 ^b |
| 血清 α -グロブリン | (g/dl) | 1.06±0.0 | 0.95±0.0 ^a | 1.17±0.1 ^b | 1.01±0.0 ^a |
| 血清 β -グロブリン | (g/dl) | 0.70±0.0 | 0.75±0.0 ^a | 0.74±0.0 | 0.66±0.0 |
| 血清 γ -グロブリン | (g/dl) | 3.23±0.1 ^a | 2.85±0.2 ^a | 3.06±0.4 ^a | 1.92±0.1 ^b |
| A/G比 | | 0.59±0.0 ^a | 0.70±0.1 ^a | 0.60±0.1 ^a | 0.88±0.0 ^b |

a,b異符号間に有意差あり
平均±標準誤差

表2 各群の末梢血白血球ポピュレーションとリンパ球幼若化反応

| | | 飛節周囲炎群 (n=42) | 蹄底潰瘍群 (n=16) | 乳房炎群 (n=10) | 対照群 (n=12) |
|---|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| CD4 ⁺ | ($\times 10^2/\mu\text{l}$) | 10.4 \pm 1.3 | 10.6 \pm 1.3 | 8.4 \pm 2.0 ^a | 12.8 \pm 1.1 ^b |
| CD8 ⁺ | ($\times 10^2/\mu\text{l}$) | 2.2 \pm 0.9 | 3.4 \pm 0.9 | 2.3 \pm 0.9 ^a | 9.7 \pm 1.1 ^b |
| CD4 ⁺ /CD8 ⁺ | | 2.1 \pm 0.3 | 2.0 \pm 0.3 | 1.9 \pm 0.3 | 1.4 \pm 0.1 |
| CD14 ⁺ | ($\times 10^2/\mu\text{l}$) | 8.1 \pm 1.2 | 8.2 \pm 1.2 | 8.8 \pm 1.2 | 8.3 \pm 1.5 |
| MHC class-II ⁺ CD14 ⁻ | ($\times 10^2/\mu\text{l}$) | 8.7 \pm 1.2 ^a | 8.6 \pm 0.7 ^a | 6.3 \pm 1.2 ^a | 13.3 \pm 1.9 ^b |
| MHC class-II ⁺ CD14 ⁺ | ($\times 10^2/\mu\text{l}$) | 3.0 \pm 0.7 ^a | 3.5 \pm 0.7 | 3.3 \pm 0.7 | 4.6 \pm 0.8 ^b |
| MHC class-II ⁻ CD14 ⁺ | ($\times 10^2/\mu\text{l}$) | 5.1 \pm 0.6 | 4.7 \pm 0.6 | 5.5 \pm 0.6 | 3.7 \pm 0.9 |
| MHC class II 陽性率 | (%) | 38.0 \pm 2.8 ^a | 40.4 \pm 5.0 ^a | 37.4 \pm 5.9 ^a | 58.7 \pm 4.6 ^b |
| CD21 ⁺ IgM ⁺ | ($\times 10^2/\mu\text{l}$) | 11.5 \pm 1.4 | 9.9 \pm 1.4 | 8.2 \pm 1.5 ^a | 11.6 \pm 1.8 ^b |
| CD21 ⁺ IgG ⁺ | ($\times 10^2/\mu\text{l}$) | 6.9 \pm 1.5 ^a | 7.0 \pm 1.5 ^a | 4.9 \pm 1.5 ^a | 11.1 \pm 1.0 ^b |
| PHA刺激幼若化反応 | (SI) | 1.8 \pm 0.2 ^a | 2.0 \pm 0.2 | 1.8 \pm 0.1 ^a | 4.2 \pm 0.7 ^b |
| IL2添加PHA刺激幼若化反応 | (SI) | 3.0 \pm 0.2 | 3.0 \pm 0.2 | 3.2 \pm 0.2 | 2.4 \pm 0.2 |
| PWM刺激幼若化反応 | (SI) | 3.8 \pm 0.3 | 3.2 \pm 0.3 | 4.1 \pm 0.3 | 3.1 \pm 0.4 |

a,b異符号間に有意差あり
平均 \pm 標準誤差

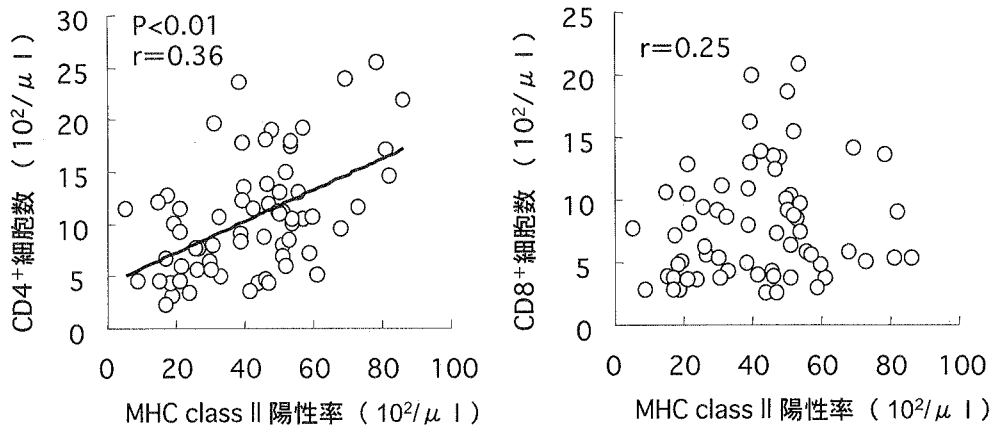


図1 炎症性疾患群におけるT細胞数とCD14⁺細胞中のMHC class II 比の関係

たが、CD21⁺IgM⁺細胞に有意な差を認めなかった。

リンパ球幼若化反応においては、炎症群の各3群のPHA刺激による幼若化能が対照群より有意な低値を示し、IL-2添加PHA刺激においても、低い傾向にあった。PWMの刺激において、炎症群の幼若化能がそれぞれ対照群より高い値を示した(表2)。

炎症群における各項目の相関

CD4⁺細胞数とMHC class II比には有意な正の相関を認めたが(P<0.01、r=0.36)、CD8⁺細胞数とMHC class II比には有意な相関がなかった(図1)。γ-グロブリン量はCD21⁺IgG⁺細胞数との間に有意な負の相関を

認めたが、CD21⁺IgM⁺細胞数との間には相関を認めなかった。またPWM刺激での幼若化能はCD21⁺IgG⁺細胞数との負の相関を認めたものの、CD21⁺IgM⁺細胞数との相関を認めなかった(図2)。

考察

本研究では炎症群のCD4⁺細胞が対照群に比べ減少傾向を、またPHA刺激によるリンパ球幼若化能の明らかな低下を示した。PHAはT細胞を特異的に刺激し、特にCD4⁺細胞から産生されたインターロイキン-2(IL-2)によって、リンパ球を幼若化させるマイトジェンである。PHA刺激はT細胞のIL-2産生能を、またIL-2添

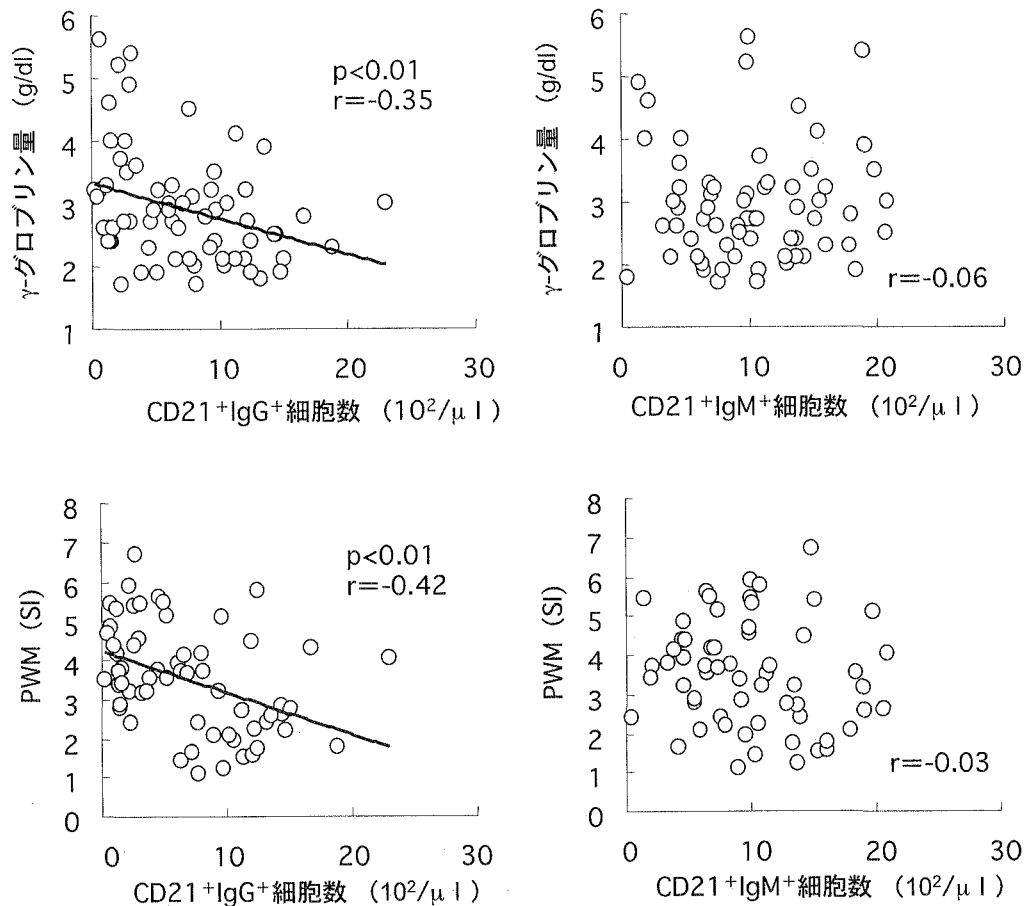


図2 炎症性疾患群におけるB細胞数と幼若化能およびγ-グロブリン量との相関

加PHA刺激はT細胞のIL-2感受性を評価するために用いられる [9]。したがって本研究における3つの炎症群ではそれぞれ、抗原刺激によるT細胞のIL-2産生の低下と、IL-2感受性の低下が示唆された。ヒトでは打撲や重度の火傷などともなう炎症において、リンパ球幼若化能が低下し、単核球のIL-2レセプター (IL-2R) が減少する [12]。またホルスタイン子牛に対して実験的にデキサメサゾンを投与し、T細胞をマイトジェンにて刺激培養すると、幼若化反応が低下し、T細胞のIL-2Rが減少する [5]。これまでの知見に基づいて考察すると、本研究においてみられた幼若化反応の低下には、コルチゾル増加に伴うリンパ球のIL-2RやT細胞のIL-2産生能の低下が関与したことが推察される。

本研究の各炎症群のMHC⁺CD14⁻細胞数は、対照群よりも有意な低値を示した。慢性乳房炎において末梢血B細胞数が減少することから [12]、本成績はこれまでの報告と類似している。また炎症群のCD21⁺IgG⁺細胞数とPWM刺激による幼若化能、またCD21⁺IgG⁺細胞数とγ-グロブリン量とに負の相関が認められた。これは、B細胞数が減少するほど、B細胞が活性化していることを

示している。B細胞の活性は、B細胞の数よりもB細胞表面に存在するB細胞レセプター (BCR) と抗原との親和性の強さに依存する [4]。また、炎症初期はBCR親和性の弱いB細胞が末梢血中に多いが、やがてリンパ節で抗原に高い親和性を示すB細胞だけが選別され、クローニングされる。したがって、炎症後期になるほど抗原親和性の高い抗体を分泌できるB細胞が増加する [10]。成熟したB細胞は細胞表面抗原にIgMを持つが、さらに活性化してメモリー型になるとIgGを持ち、やがてプラズマ細胞となって組織に遊走し抗体分泌を行うと考えられている [1]。炎症群では対照群よりMHC⁺CD14⁻細胞と成熟B細胞を示すCD21⁺IgG⁺細胞が有意に減少したが、血清蛋白質中のγ-グロブリン量は有意に高値を示しており、炎症群ではB細胞の数は減少しても活発に抗体産生が行われていると考えられた。

炎症群と対照群ではCD14⁺細胞の数に有意差は認められなかったが、MHC class II比は炎症群が対照群に比べ有意に低下した。潜在性乳房炎牛ではCD14⁺細胞中MHC class II陽性率が低値であることが報告されており [3]、本研究の炎症群と類似した結果であった。

MHC class II は単球表面に発現し、抗原ペプチドと結合してCD4⁺細胞に抗原を提示する。単球のMHC class II の発現は、炎症反応において誘導されて、単球あるいはCD4⁺細胞に抗原提示して細胞性免疫機能を促進する。しかし、炎症反応が過剰になると単球のMHC class II 発現が減退して、単球の活性化が抑制され、その結果、炎症反応としては液性免疫機能が細胞性免疫機能と対比して優位になると考えられている [2, 7]。本研究においてCD4⁺T細胞数がCD14⁺細胞中MHC class II 陽性率と相関したことは、炎症性疾患においてCD4⁺T細胞とCD14⁺細胞が連関しながら炎症反応が起こることを示唆するものであった。

以上のことから、本研究で用いた炎症性疾患の症例の免疫バランスにおいて液性免疫機能が細胞性免疫機能よりも優位な状態になっている可能性が示された。また血液所見と末梢血白血球ポピュレーションとの相関性から、末梢血白血球の細胞性免疫機能の低下は炎症部位や疾病の種類ではなく、炎症反応の過程や炎症刺激の程度が影響するものと考えられた。

文 献

1. Feldman, M. and Marini, J.C. (2001) Cell cooperation in the antibody response. *Immunology*. pp131-146 Mosby. St.Luis.
2. Hart, H.P., Bonder, S.C., Jones, A.C. and Finlay-Jones, J.J. (1996). Control of histocompatibility complex class II expression on human monocyte by interleukin-4: regulatory effect of lipopolysaccharide. *Immunology*. 89 : 599-605.
3. 小比類巻正幸, 大塚浩通, 西川聡子, 増井真知子, 林 智人, 川村清市 (2005). 栄養不足をともなった乳房炎における飼養管理改善後の白血球ポピュレーション. *家畜診療* 503 : 283-289.
4. Kouskoff, V. and Famiglietti, S. (1998). Antigens varying in affinity for the B cell receptor induce differential B lymphocyte responses. *J. Exp. Med.* 188 : 1453-1464.
5. Lan, H.C., Reddy, P.G., Chambers, M.A., Walker, G., Srivastava, K.K. and Ferguson, J.A. (1995). Effect of stress on interleukin-2 receptor expression by bovine mononuclear leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 49 : 241-249.
6. 大塚浩通, 高橋英彰, 工藤美穂, 初谷敦, 太田浩運, 永井文紀, 伊藤登, 吉野知男, 高橋敦吉, 小岩政照 (2000). 大腸菌性乳房炎を発症した重症および軽症例における単核球サブセットと血清IL-1 活性の変化. *日獣会誌* 53 : 810-814.
7. Payen, D., Faivre, V., Lukaszewicz, A.C. and Losser, M.R. (2000) . Assessment of immunological status in the critically ill. *Minerva.Anesthesiol.* 66 : 757-63.
8. Rioulet, C., Rainard, P. and Poutrel, B. (2001). Cell subpopulations and cytokine expression in cow milk in response to chronic *Staphylococcus aureus* infection. *J. Dairy. Sci.* 84 : 1077-1084.
9. Sabahi, F., Rola-Pleszczynski, M., O'Connell, S. and Frenkel, L. D. (1995). Qualitative and quantitative analysis of T lymphocytes during normal human pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.* 33 : 381-392.
10. Shin, Y.T., Meffre, E., Roederer, M. and Nussenzweig, C.M. (2002). Role of BCR affinity in T cell-dependent antibody response in vivo. *Nature. Immunol.* 3 : 570-575.
11. Teodorczyk-Injeyan, J.A., McRitchie, D.I., Peters, W.J., Lalani, S. and Girotti, M.J. (1990). Expression and secretion of IL-2 receptor in trauma patients. *Ann. Surg.* 212 : 202-208.
12. Thomas, J.Y. and Patricia, A. (1980). Depression of B-lymphocyte levels in the peripheral blood of cow with mastitis. *Infect. Immun.* 27 : 90-93.