

乳牛における周産期病コントロールのための「免疫プロファイル・テスト」の導入に関する基礎的検討

誌名	日本家畜臨床学会誌 = Japanese journal of large animal clinics
ISSN	13468464
著者名	小比類巻,正幸
発行元	日本家畜臨床学会
巻/号	31巻2号
掲載ページ	p. 58-71
発行年月	2008年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



乳牛における周産期病コントロールのための 「免疫プロファイル・テスト」の導入に関する基礎的検討

小比類巻 正幸

(小比類巻家畜診療サービス・青森県)

安定した酪農経営を実践していく上では、牛群での疾病の発生状況や発生要因を把握し、その問題点を修正していく管理技術が必要である。近年の高泌乳牛への品種改良の成果は目覚しく乳用牛の能力検定成績による1頭当りの平均乳量は、平成4年度に7994kgであったが、平成14年度には9014kgと約10年間で1000kg余り増加している。

しかし、実際の臨床現場においては、分娩後の摂取栄養が泌乳量に必要な栄養要求量に追いつかず、負のエネルギーバランス (NEB) の状態がしばしば観察され、栄養摂取の不足に起因する分娩前後の生産病や消化器や運動器疾患の多発をはじめとする諸問題が発生している[18]。平成15年度の乳牛の家畜共済統計では、農業共済加入乳牛の約62%が何らかの病傷に陥り、その内の68%が周産期に罹患し、また乳房の疾患は約32%、繁殖障害は約26%にも達している[10]。分娩後の疾病発生は乾乳期の飼養管理と密接に関わっており[12,14,19]、また、周産期の乳牛では生理的に免疫機能が低下し感染症へのリスクが増加すると報告されている[15]。一方、乳牛におけるエネルギーの充足不足が免疫系に影響することが近年研究されており栄養充足率が低く乳房炎を発症した乳牛に対し栄養改善を行ったところ、末梢血液中のCD3陽性T細胞数、B細胞数、CD14陽性細胞中のMHCclass II陽性率が有意に増加するとともに、体細胞数 (SCC) が低下することが明らかにされている[7]。本研究は、乳牛の周産期における疾病の多発が、この時期の負のNEBおよび、それに誘発される代謝の障害や免疫能の低下に深く関わっていること、またこの時期の体重変動率が

NEBの評価に有用であることなどを明らかにした研究データを基に、周産期における末梢血白血球サブポピュレーション (SPPL) の変化を解析して免疫能の変化を評価する「乳牛の免疫プロファイル・テスト (IPT)」の臨床応用の概念およびそのスクリーニングについて基礎的に検討したものである。

1. 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とその意義

周産期疾病の発症要因としては、分娩前後における栄養代謝の障害や内分泌機能の変化に端を発して、免疫にも機能低下のあることが報告されている[4,5]。また、周産期の乳牛では、特にその分娩時に好中球やリンパ球機能が生理的にも低下する[16]ことが知られており、分娩前後にはそれらが相乗して日和見感染症に陥りやすくなるものと考えられる。

本章では飼料の給与設計が異なる3つの周産期の牛群における血液の生化学成分とSPPLの検査により、周産期の栄養状態と免疫状態の推移および両者の関連性を検索した。

(1) 供試牛群における周産期疾病発生率の比較

各供試牛群における分娩後の周産期疾病の発生率はA群で最も高く、次いでB群であり、C群における周産期疾病の発生率は他の2群に比べて低い値であった (Table 1)。

(2) 牛群間の栄養給与量の比較

NRC飼養標準を用いた各牛群間の給与飼料の栄養充足率および含有率の成績から、全ての群の-2から-1ヶ月と分娩後のDMIとTDNの設計

Table 1. Occurrence rates of periparturient disease incidence in calving cows for in each herds.

Disease	Group A	Group B	Group C
Ketosis (%)	10.3	3.0	3.8
Milk fever (%)	15.4	9.1	1.3
Displaced abomasum (%)	10.3	9.1	2.6
Retained plascenta (%)	9.0	15.2	1.3

Date are the mean occurrence rates of periparturient disease in calving cows that required veterinary treatment during periparturient periods.

The average number of treatment times per cow was 3.4 in group A, 2.8 in group B, 3.2 in group C.

Table 2. Rates of filled vacancy of nutritions and feed contents of each group

Milking Stage		Group A	Group B	Group C
-2month ~ -1month	DMI (%) 1)	100.0	91.2	94.6
	CP (%) 1)	90.6	94.6	84.6
	TDN (%) 1)	113.1	112.6	114.2
	NDF (%) 2)	63.8	51.4	61.6
	ADF (%) 2)	37.5	27.7	35.7
	NFC (%) 2)	13.6	27.3	20.9
-1month ~ 0	DMI (%) 1)	106.5	104.9	100.0
	CP (%) 1)	100.6	107.5	99.3
	TDN (%) 1)	108.3	113.4	105.7
	NDF (%) 2)	54.7	44.6	45.2
	ADF (%) 2)	31.8	24.2	26.3
	NFC (%) 2)	21.3	32.3	32.3
2month ~ 4month	DMI (%) 1)	110.5	108.0	109.4
	CP (%) 1)	97.3	90.2	90.1
	TDN (%) 1)	100.2	100.3	98.9
	NDF (%) 2)	36.0	37.5	38.8
	ADF (%) 2)	19.2	20.8	23.5
	NFC (%) 2)	35.3	36.5	36.3

Dry means 1 month before calving to calving day (-30~-1day)

Peak means after calving periods (61~120day)

Data means percentage according with NRC standard.

1) Rate of filled vacancy of nutrition

2) Feed conains

は充足されており、各群間に差はなかった。

しかし、A群ではC群に比べ分娩前1ヶ月のNDFとADF含有率が高くNFC含有率が低かった。一方、B群ではC群に比べ-2から-1ヶ月におけるNDF含有量およびADF含有量が低く、NFC含有量が高かった(Table 2)。

(3) 血液生化学成分の変化

血清NEFA濃度は、相対的には血清BHB値と類似の変化を示し、群間では、-1から0ヶ月においてA群が他の2群に比べ有意な高値であったが、0から1ヶ月においてはB群がA群に比べ有意な高値を示した(Fig. 1)。

(4) 白血球サブポピュレーションの解析結果

CD 3⁺T細胞数は相対的には、周産期の中に特定の変化は認められなかったが、AおよびB群のCD 3⁺T細胞数はC群に比べ1から4ヶ月にかけて低い傾向にあり、3から4ヶ月においてA群ではC群に比べ有意に低い値を示した(Fig. 2)。AおよびB群のCD 4⁺T細胞数はC群に比べ1から4ヶ月にかけて低い傾向にあったものの、CD 8⁺T細胞数には特出した差を認めなかった。CD 4/CD 8比では、相対的には、0から1ヶ月の間に軽度の低下傾向が認められたが、2から3ヶ月までやや高い値を示した。

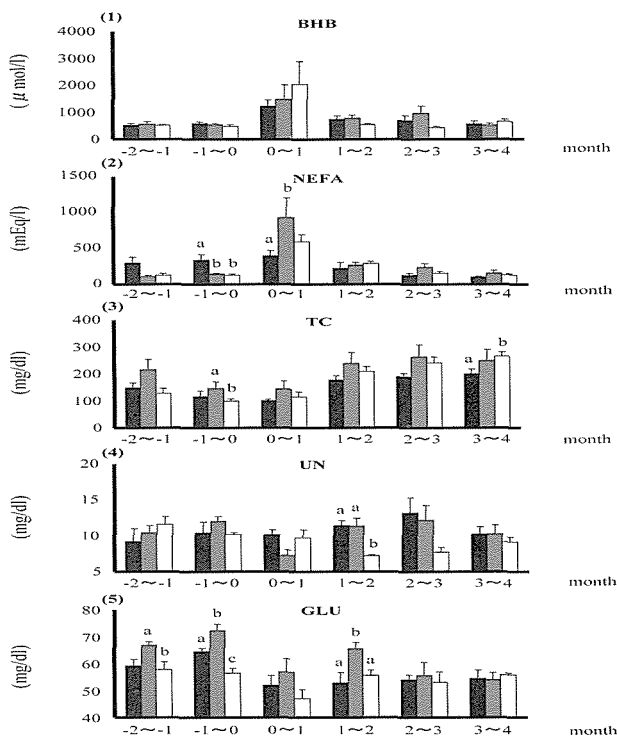


Fig. 1. Biochemical data in each group
*It indicates that significant difference a and b ($P < 0.05$).
A group (■) B group (▒) and C group (□)

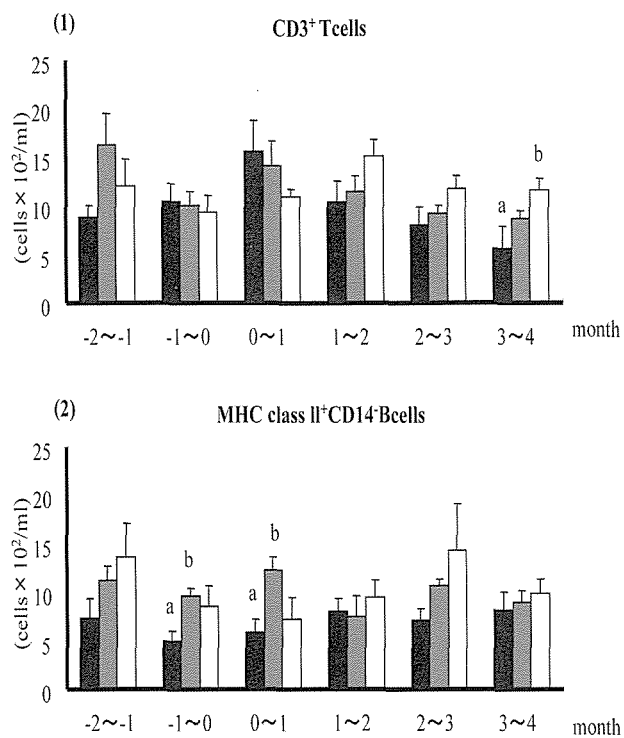


Fig. 2. CD3⁺ T cells, MHC class II⁺CD14⁺ B cells each group
*It indicates that significant difference a and b ($P < 0.05$).
A group (■) B group (▒) and C group (□)

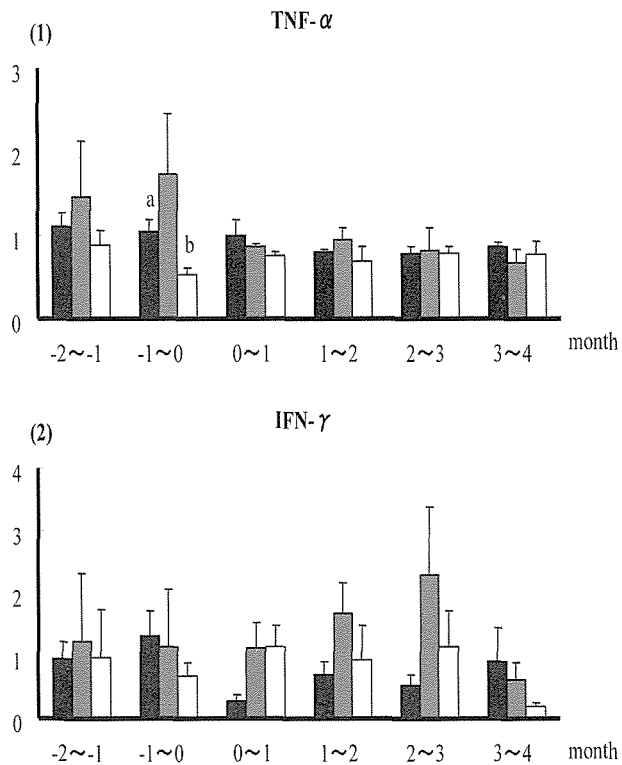


Fig. 3. TNF- α and IFN- γ each group
*It indicates that significant difference a and b ($P < 0.05$).
A group (■) B group (▒) and C group (□)

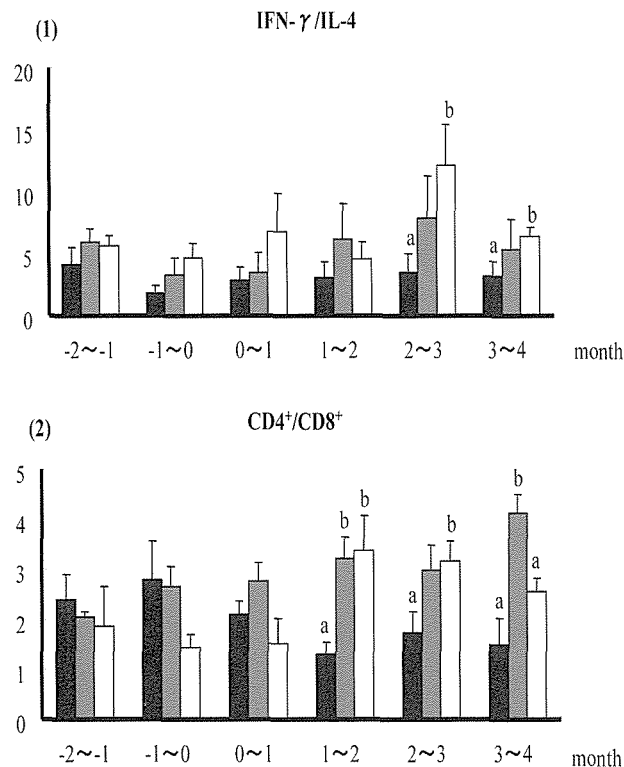


Fig. 4. IFN- γ /IL-4 and CD4⁺/CD8⁺ each group
*It indicates that significant difference a and b ($P < 0.05$).
A group (■) B group (▒) and C group (□)

(5) サイトカイン遺伝子の発現量の変化

TNF- α 遺伝子発現量は、相対的には、分娩前では分娩後よりもやや高い傾向が見られた。牛群間では、分娩前のA群およびB群のTNF- α 遺伝子発現量はC群に比べ高い傾向にあり、A群ではC群と比較して-1から0ヶ月に有意な高値を示した(Fig.3)。IFN- γ /IL-4比では分娩前後で低下傾向が見られ、その後徐々に上昇する傾向が見られた。群間の比較では、各期間を通してA群が他の2群に比べ低い傾向にあり、2から4ヶ月においてC群と比較して有意な低値を認めた(Fig.4)。

3牛群のDMIやTDNは飼料設計上充足されていたにもかかわらず、周産期疾病の発症率が最も高いA群では、乾乳期に血清非エステル型脂肪酸(NEFA)濃度が、周産期疾病の発生率が低いB・C群に比べ高値であり、妊娠末期にはMHCclass II⁺CD14⁻B細胞数が低値で、TNF- α 遺伝子発現量は疾病発生率が最も低いC群よりも高く、また分娩後1~4ヶ月の間ではCD4⁺/CD8⁺比、CD3⁺細胞数およびIFN- γ /IL-4比が低値を示し、またCD4⁺細胞数は分娩後に低い傾向を持続した。A群ではB・C群と比較してTDN充足率では差がないものの、分娩前後にNFC含有量(%)が低く、第一胃の機能低下に基づく低栄養状態が持続し、分娩後に細胞性免疫を主とした機能低下をきたし、易感染性の状態に陥ったことが唆された。

2. 乳牛における分娩前後の体重の減少と分娩後の末梢血単核球の変化

乳牛では、分娩の前後が最も感染へのリスクが高まるとされており、分娩前後の体重減少は、乳房炎や胎盤停滞を含む周産期疾病の発生と深い関係性がある[6]。Ohtsukaら[11]は、乳房炎や胎盤停滞を発症する乳牛では分娩前に免疫機能が抑制されていると報告している。搾乳牛の体重は、成長因子のスコアと正の相関があることが報告されており[2]、乾乳期間中に乾物摂取量が十分でなかった個体では、分娩後に免疫機能の抑

制されていることが報告されている。それらのことから、分娩前後に深刻な体重減少に陥った乳牛では、免疫機能の低下や内分泌異常が起こる可能性が高いものと考えられる。本章では、青森県内の一酪農家で飼養されていた臨床的に健康な乳牛を供試し、分娩前と分娩後で10%以上の体重が減少した体重減少群(Decreased Group;n=5)と、体重の減少が5%以内であった対照群(Control Group;n=5)の2群で、周産期における免疫機能と内分泌機能の動態を観察した。

(1) BCS及び体重の推移

BCSは2つの群とも分娩後に減少する傾向が見られたが、有意差はなかった。体重の減少は、体重減少群の分娩1ヵ月後で急激な減少が観察されたが、後の1ヵ月で回復基調となった(Fig.5)。

(2) 血液生化学検査の結果

体重減少群の血清TC濃度は、分娩後1ヶ月と分娩後2ヶ月で対照群と比較して有意な高値を示した。体重減少群の血清UN濃度は、分娩後1ヶ月と分娩4ヶ月で有意な低値を示した。血清NEFA濃度では、分娩直後から4ヶ月後まで直線的な低下が見られ、また2群間に差は見られなかった(Fig.6)。

(3) 白血球サブポピュレーションおよびサイトカイン遺伝子発現量比の推移

CD4⁺CD45 R⁺T cell数は、対照群では分娩から5ヶ月後まで漸次低下の傾向をしたが、体重減少群では3ヶ月までは対照群よりも低値の傾向で下降し、その後回復傾向を示した。CD4⁺CD45 R⁻T cell数は、対照群では、分娩後2ヶ月までは体重減少群よりも高値を示した。また体重減少群では、4ヶ月以降、対照群と近時の推移を示した。CD8⁺CD45 R⁺T cell数とCD8⁺CD45 R⁻T cell数は、何れの群でも特徴的な推移は見られなかったが、体重減少群では対照群に比べて何れも低い傾向で推移した(Fig.7)。CD4⁺/CD8⁺

比は、両牛群においてほぼ一定の値で推移したが、対照群の分娩後1ヵ月後の値が高値を示した。

対照群のIFN- γ /IL-4比は、分娩後4ヶ月

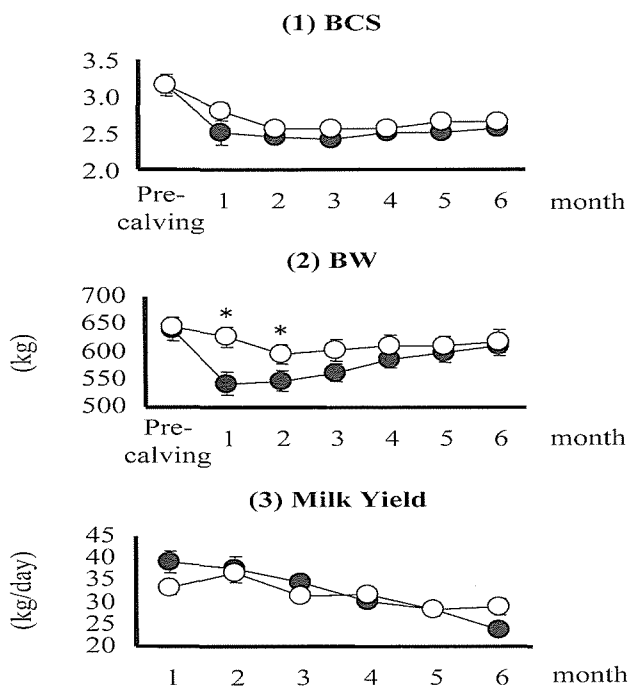


Fig. 5. Changes of BCS(1),BW(2)and milk yield(3) in Decreased Group (●) and Control Group (○). Values were expressed as the mean \pm S.E. *It is indicate that significant difference between the two groups ($P < 0.05$).

に軽度低下の傾向を示し、6ヶ月目に高い傾向を示したほかはほぼ一定の値で推移した。また体重減少群では、対照群よりも常に低い傾向の値で推移した (Fig. 8)。

(4) 血中ホルモン濃度の動向

分娩後1ヶ月から6ヶ月までの血漿GH濃度は両牛群において一様に低下の傾向を示したが、相対的には対照群がやや高い傾向で推移した。分娩後1ヶ月から6ヶ月までの血漿インスリン濃度は両牛群において一様に軽度の上昇傾向を示したが、相対的には体重減少群がやや高い傾向で推移し、3ヶ月目には一時的に対照群よりも高値を示した (Fig. 9)。体重低下群の末梢血単核球のGH-R遺伝子発現量は、対照群よりも泌乳最盛期に低値を、血漿GH濃度も低い傾向を示し、インスリン-R遺伝子発現量は泌乳後期に低値を示した (Fig. 10)。

同一飼養環境下で、分娩後に著しい体重減少を呈した牛群のSPPLおよび代謝性ホルモン濃度の変化を検索した。分娩時から1ヶ月間に体重変動率 (weight change rate, WCR) が10%以上低

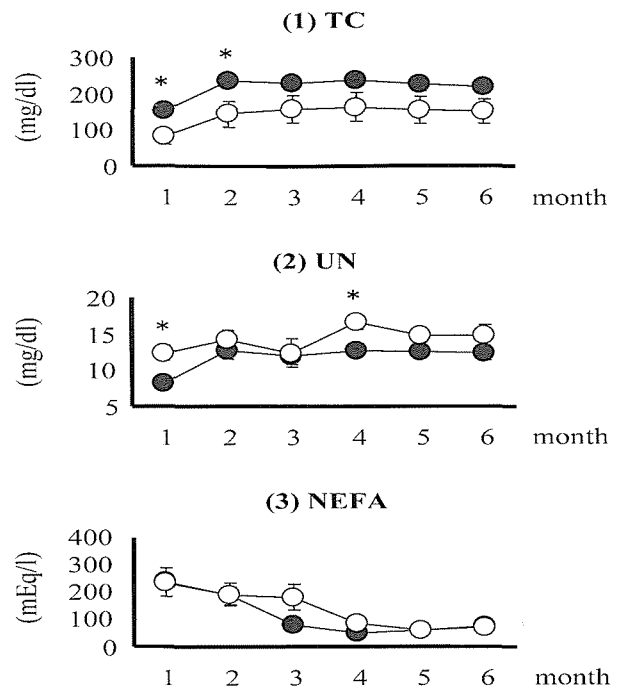


Fig. 6. Changes of TC (1), UN (2) and NEFA (3) in Decreased Group (●) and Control Group (○). Values were expressed as the mean \pm S.E. *It is indicate that significant difference between the two groups ($P < 0.05$).

下した牛群 (体重減少群、 $n = 5$) では、対照群 (RCW 5%未満、 $n = 5$) に比べて血清総コレステロール (TC) 値が高く、尿素窒素 (UN) 濃度が低値を示すとともに泌乳初期の泌乳量が多い傾向を示したが、BCSには両群間に有意差が認められなかった。SPPLでは、体重低下群の泌乳初期の $CD4^+CD45R^-T$ 細胞数や $CD4^+/CD8^+$ 比が低値を示し、また $CD4^+CD45R^+T$ 細胞数、 $CD8^+CD45R^+T$ 細胞数、 $CD8^+CD45R^-T$ 細胞数および $IFN-\gamma/IL-4$ 比は低い傾向を持続した。体重減少群の単核球のGH-R遺伝子発現量は、対照群よりも泌乳最盛期に低値を、GH濃度も低い傾向を示し、インスリン-R遺伝子発現量は泌乳後期に低値を示した。以上の所見から、分娩後に著しいWCR値の低下を示す乳牛では、単核球のホルモンレセプター発現量の減少を伴った細胞性免疫能の低下があることが示唆された。

3. 周産期の乳牛に対する活性卵白製剤と宮入菌製剤混合添加物が免疫機能に及ぼす影響
近年、免疫機能の維持、向上の目的で各種添加

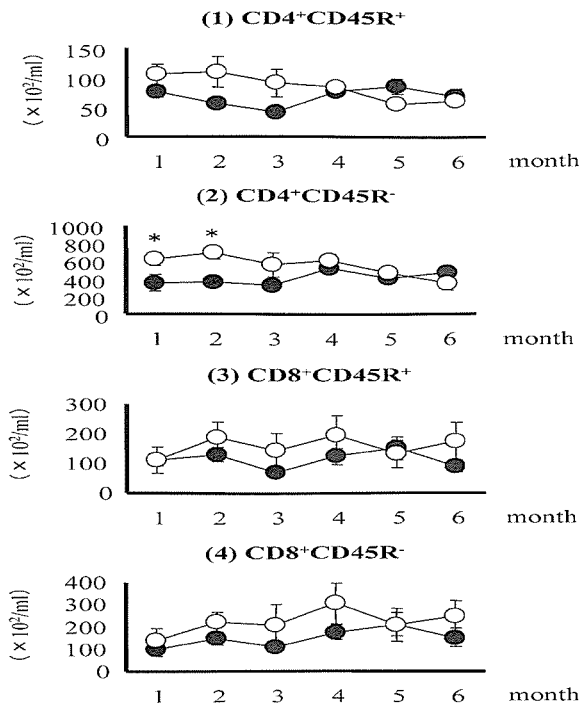


Fig. 7. Changes of CD 4 +CD45R+(1)CD 4 +CD45R-(2)CD 8 +CD45R+(3) and CD 8 +CD45R- (4) in Decreased Group (●) and Control Group (○). Values were expressed as the mean ± S.E. *It is indicate that significant difference between the two groups (P<0.05).

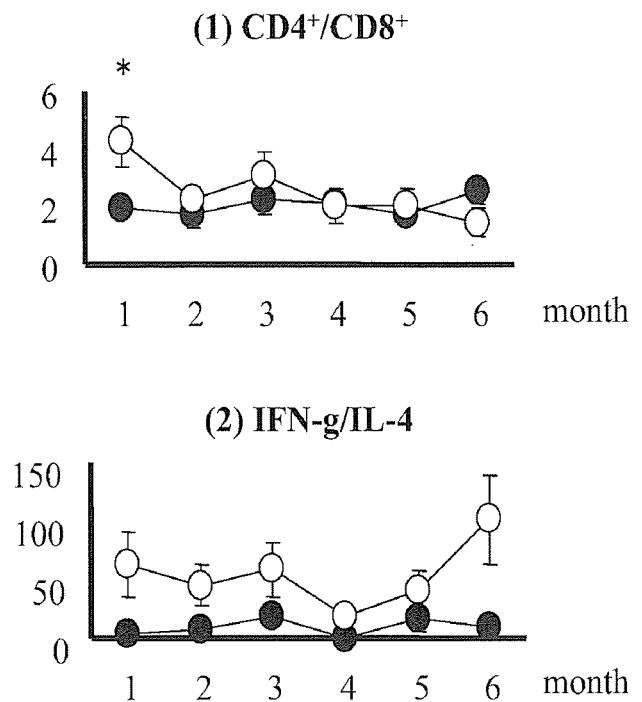


Fig. 8. Changes of CD 4 +/CD 8 + rate (1) and IFN - γ /IL-4 rate (2) in Decreased Group (●) and Control Group (○) Values were expressed as the mean ± S.E. *It is indicate that significant difference between the two groups (P<0.05).

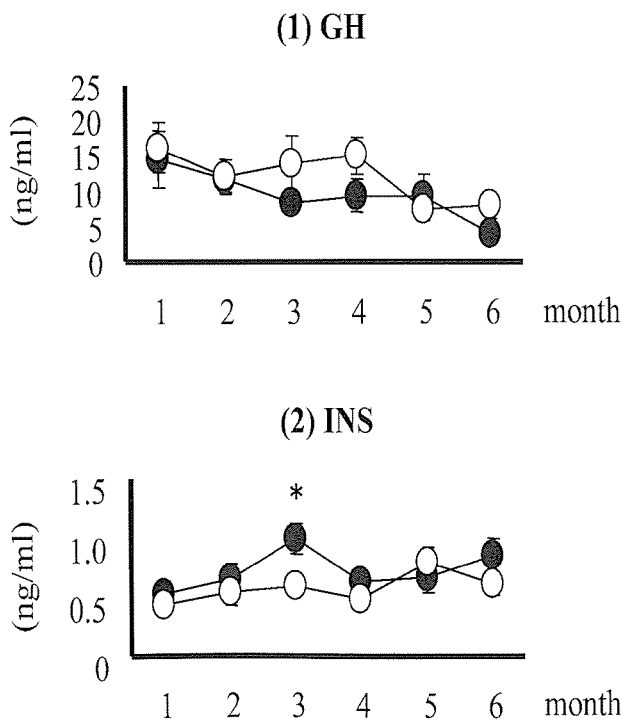


Fig. 9. Changes of serum GH concentration (1) and serum INS concentration (2) in Decreased Group (●) and Control Group (○). Values were expressed as the mean ± S.E. *It is indicate that significant difference between the two groups (P<0.05).

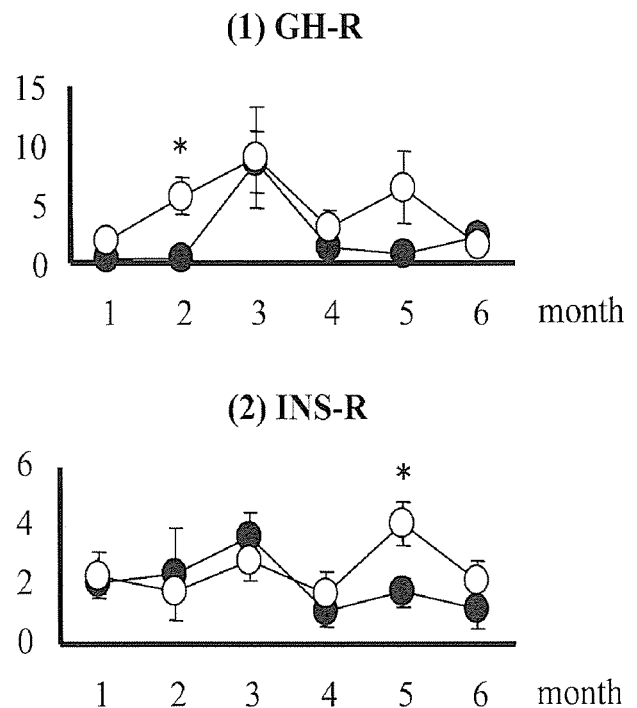


Fig. 10. Changes of GH-R (1) and INS-R (2) in Decreased Group (●) and Control Group (○) Values were expressed as the mean ± S.E. *It is indicate that significant difference between the two groups (P<0.05).

剤の投与が試みられているものの、その効果や免疫機能の動態に関しては不明な点が多い。その中で、AEWPは、マウスにおける経口投与試験においてマクロファージ機能の向上が認められており [1]、同じく子牛への経口投与で好中球機能の活性化を促すことが報告されている [9]。また、宮入菌 (*Clostridium butyricum* Miyairi 588) は、マウスにおける感染実験において腸管出血性大腸菌 (*Escherichia coli*) O157:H7 に対して増殖抑制や *stx*-like toxin の産生を抑制させること [17]、経口投与によって腸管粘膜における免疫活性効果のあることが報告されている [8]。これらの知見から、免疫機能の低下しやすい周産期の乳牛に対し、活性卵白製剤と宮入菌製剤の混合製剤の投与は免疫機能の低下を防ぐ効果が期待出来るものと推察される。そこで本章では、分娩1ヶ月前から分娩1ヶ月後の周産期の乳牛に対して、活性卵白製剤 (AEWP) と宮入菌製剤 (*Clostridium butyricum* Miyairi) を飼料添加したA群 (n=23)、宮入菌製剤のみの牛群 (B群)、非添加の対照群 (C群、n=22) の3群を供試し、周産期病の発生抑制効果を観察するとともにSPPLおよびMPTの推移を検索した。

(1) 周産期疾病の発生状況

代謝性疾患の発生状況は、A群で21.7%、B群で30.4%、C群で31.8%であった。炎症性疾患発生状況は、A群で0.0%、B群で13.0%、C群で4.5%であった。また、治癒までに要した治療回数は、A群で2.4回、B群で3.2回、C群で3.0回であった

(Table 3)。

(2) 末梢血白血球サブポピュレーション及びリンパ球幼若化試験

SPPLの検査成績において、CD4⁺T細胞数を分娩1ヶ月前、分娩1週間後および同1ヶ月後について比較したところ、C群では、分娩1ヶ月前値に比べて分娩1週間後に71.1%に低下し(最低値)、同1ヶ月後には90.0%にやや回復傾向を示したが、B群の分娩1週間後は分娩1ヶ月前の75.5%であり、A群の分娩1週間後値は他の2群の値よりも有意な高値で92.5%(最高値)であった (Table 4)。リンパ球のPHA刺激に対する幼弱化反応の群間の比較では、CD4⁺T細胞数と近時の推移を示した。C群では、分娩1週間後にSI値が低くなる傾向が見られ、その後回復の変化を示した。

(3) 血液生化学検査

分娩1ヶ月後のA・B群の血清UN濃度ではC群の値よりも低値であり、また分娩1ヶ月後のA・B群の血漿Glu濃度ではC群の値よりも高値であった。血清AST活性値では、分娩1ヶ月前が最も低い値を示し、分娩1週間後に高値となり、また分娩1ヶ月後にはやや低下する傾向が見られたものの3牛群間では、特異な差異は認められなかった (Table 5)。

免疫賦活作用を有する製剤を分娩1ヶ月前から分娩後1ヶ月までの間投与し、周産期病の発生抑制効果が認められた牛群におけるSPPLおよび代謝MPTの推移を検索した。供試泌乳牛68頭のう

Table 3. Incidence rates of metabolic disease or inflammatory disease incidence in periparturient cows for each group

	A group (n=23)	B group (n=23)	C group (n=22)
Metabolic disease (%)	21.7	30.4	31.8
Inflammatory disease (%)	0.0	13.0	4.5
Treatment (time)	2.4	3.2	3.0

Date are the mean incidence rates of periparturient disease in cows that required clinical treatment during periparturient periods.

Table 4. Leukocyte populations and PHA lymphocyte blastogenesis in each group

		Group A (n=23)	Group B (n=23)	Group C (n=22)
CD4 ⁺ T cells (cell/ μ l)	-1 month	731.5 \pm 385.3	834.3 \pm 691.5	747.2 \pm 568.1
	1 week	676.3 \pm 328.5*	629.7 \pm 363.4	531.0 \pm 207.3
	1 month	617.6 \pm 286.1	697.0 \pm 304.6	672.5 \pm 332.4
CD8 ⁺ T cells (cell/ μ l)	-1 month	337.1 \pm 127.6	307.1 \pm 118.6	412.9 \pm 225.3
	1 week	306.8 \pm 176.9	276.3 \pm 137.1	385.9 \pm 376.1
	1 month	271.1 \pm 144.6	300.3 \pm 123.5	338.3 \pm 133.9
MHCclassII ⁺ CD14 ⁺ cells (cell/ μ l)	-1 month	1331 \pm 645.8	1291 \pm 758.3	1258 \pm 597.4
	1 week	959 \pm 402.0	1089 \pm 770.9	1043 \pm 505.2
	1 month	1075 \pm 715.0	1061 \pm 502.1	1148 \pm 827.7
MHCclassII ⁺ CD14 ⁺ cells (cell/ μ l)	-1 month	480 \pm 226.1	531 \pm 486.1	592 \pm 254.8
	1 week	740 \pm 536.0	787 \pm 446.7	888 \pm 641.1
	1 month	613 \pm 327.4	602 \pm 196.6	642 \pm 240.4
PHA lymphocyte blastogenesis (SI)	-1 month	328 \pm 114.7	306 \pm 160.3	351 \pm 154.3
	1 week	344 \pm 169.9	301 \pm 155.6	289 \pm 139.0
	1 month	316 \pm 93.5	410 \pm 160.9	359 \pm 136.9

Values are expressed as mean \pm SD

* : Significantly different from the Group C, P<0.05.

Table 5. Biochemical data in each group

		Group A (n=23)	Group B (n=23)	Cont (n=22)
GGT (U/L)	-1 month	21.2 \pm 1.6	23.8 \pm 1.8	24.5 \pm 2.9
	1 week	28.4 \pm 2.1	26.3 \pm 2.0	23.5 \pm 2.3
	1 month	32.2 \pm 3.5	34.6 \pm 3.7	30.1 \pm 3.5
Ca (U/L)	-1 month	8.9 \pm 0.1	9.1 \pm 0.1	8.6 \pm 0.4
	1 week	8.1 \pm 0.2	7.8 \pm 0.2	8.7 \pm 0.4
	1 month	9.4 \pm 0.8	8.5 \pm 0.2	8.5 \pm 0.4
UN (mg/dl)	-1 month	12.2 \pm 0.6	10.9 \pm 0.5	11.2 \pm 0.7
	1 week	9.0 \pm 0.6	9.3 \pm 0.6	10.6 \pm 0.8
	1 month	10.7 \pm 0.4 *	10.6 \pm 0.4 *	13.7 \pm 0.9
TC (mg/dl)	-1 month	97.7 \pm 6.6	123.6 \pm 8.7	133.4 \pm 10.2
	1 week	123.4 \pm 9.7	106.3 \pm 6.0	111.9 \pm 6.5
	1 month	234.9 \pm 10.6	232.4 \pm 13.5	256.6 \pm 21.2
AST (mg/dl)	-1 month	59.0 \pm 1.9	69.6 \pm 3.6	69.8 \pm 5.6
	1 week	94.3 \pm 8.1	101.3 \pm 10.5	97.9 \pm 6.8
	1 month	82.0 \pm 6.3	80.1 \pm 9.9	93.7 \pm 9.2
iP (mg/dl)	-1 month	6.3 \pm 0.2	6.3 \pm 0.1	6.6 \pm 0.4
	1 week	6.2 \pm 0.3	5.7 \pm 0.2	6.2 \pm 0.4
	1 month	6.5 \pm 0.2	6.3 \pm 0.3	6.4 \pm 0.4
Glu (mg/dL)	-1 month	66.3 \pm 2.0	64.0 \pm 1.2	66.3 \pm 3.4
	1 week	57.0 \pm 2.7	59.2 \pm 2.4	55.5 \pm 4.2
	1 month	65.4 \pm 2.9 *	65.3 \pm 2.2 *	58.4 \pm 2.9

Values are expressed as mean \pm SE.

*Significantly different from the Group C, P<0.05.

ち、活性卵白製剤 (AEWP) と宮入菌製剤 (Clostridium butyricum Miyairi) を飼料添加したA群 (n=23) の感染症や代謝性疾患の発生率や治療に要した回数は、宮入菌製剤のみの牛群 (B群) や非添加の対照群 (C群、n=22) よりも低値を示した。SPPLの推移では、A群のCD4⁺T細胞数が分娩1週間後にC群よりも高値を示し、MHCclassII⁺CD14⁺細胞数やPHA刺激幼弱化率

の変動比率では高い傾向が認められ、CD8⁺T細胞数やMHCclassII⁺CD14⁺細胞数では低下の傾向が見られた。B群でも類似の傾向が認められたが、その程度はA群よりも軽度であった。また、MP Tでは各群間に有意な変化は認められなかった。

分娩前後における免疫賦活製剤の投与が周産期病の発生を軽度ながらも抑制したことは、周産期における生理的な免疫機能の低下をこれらプロバ

イオテックス製剤の投与により抑制できた可能性が示唆された。また、周産期における免疫学的な変化を今回適用した各パラメーターが感知できたことは、これらが乳牛の免疫能の臨床的な評価に比較的感度の高い方法であることを示唆したものと考えられた。

4. 体重変動率 (WCR) による乳用牛群コンディションの評価

乳牛の飼養管理では、各泌乳ステージによって栄養要求量が増えるため、充足率を満たした適切な飼料給与が必要であり、酪農経営で高い収益性を実現させる上で重要なポイントとなる。特に移行期においては、胎子の急速な成長や泌乳準備のための乳房の急激な発達などにより、生理的な変化が大きい。ボディコンディションスコア (BCS) は、乳牛におけるエネルギーバランスの指標や、牛群における栄養充足度、健康状態の指標として広く用いられている [13]。またBuckleyら [3] は、BCSと体重の変動は繁殖成績の悪い個体を見つけるための重要なツールであると述べている。しかし、BCSは骨格の違いを考慮できないことと、主観的な測定となるため、多くの問題点もあるのが事実である。本研究では、青森県内の5農場 (A, B, C, D, E群) で飼養されているホルスタイン種搾乳牛を供試し、毎月体重推定尺で体重を測定するとともに、前月との変動割合である体重変動率Weight Change Rate (WCR(%)) = (今月の体重 - 先月の体重) / 先月の体重 × 100 を算出した。また、WCRと疾病の発生状況や繁殖成績を観察するとともに、各泌乳ステージにおいてこれまでの体型評価方法として一般的であったBCSと比較検討し、乳牛の周産期における負の栄養バランスの状態をWCRの推移から推察し、これを乳牛の免疫プロファイル・テストの補助ツールとして利用できる可能性について検討した。

(1) 栄養充足率の評価

各群における飼料給与状況は、それぞれの群で、分娩前60日から分娩前30日まで (-60日 ~ -30日)、分娩前30日から分娩前1日まで (-30日 ~ -1日)、

分娩後30日から分娩後120日まで (30日 ~ 120日) の3期、すなわち、乾乳前期、乾乳後期、泌乳最盛期における栄養充足率をNational Research Council (NRC) 飼養標準を基に算出した (Table. 6)。

(2) 周産期疾病の発生状況及び繁殖成績

周産期疾病の発生は、A群が最も高く、以下、B, C, D, E群の順に低い値を示した (Table. 7)。繁殖成績では、検索した全ての項目においてA群が最も悪い成績を示し、次いでB群が続く、C・D・E群では同程度の成績であった (Table. 8)。

(3) 各群における体重変動率の推移

妊娠から分娩までの間のWCR値は、すべての牛群において正の閾値であったが、分娩から分娩後120日までは負の閾値で推移した。種々の周産期疾病が多発した分娩後0 ~ 30日の区間ではWCRの低下が最も著しい低値を示した。牛群別の比較では、周産期疾病の発生が最も多かったA群のWCR値の低下が最も強く、次に発生率が多いB群ではA群に次いだ低下であった。A群のWCR値は全ての泌乳ステージにおいて他の群と比較して低い傾向であった。乾乳後期と、泌乳初期のステージにおいてA群とD, E群との間に有意差が認められた (Fig.11)。

(4) 各群におけるBCSの推移

疾病発生率と各牛群のBCSとの関連性についても明確性が得られなかった。乾乳後期のBCSにも5群間に有意な差は認められなかった。A群の泌乳初期におけるBCSは、E群に比べて有意の低値であった。E群の61 ~ 90日のBCS値は、A・C・D群と比べて有意な高値を示したが、その他の分娩後のステージのBCSは、各牛群間に有意差が認められなかった (Fig.12)。

(5) 各群における血液生化学検査の動向

血清BHB濃度は、A群では分娩後にC・D・E群と比較して高い傾向がみられ、B群では泌乳中期にC, D, E群と比べて高い傾向を示した。乾乳後期におけるA群の血清NEFA濃度は、他の牛群と比較して有意に高い値を示した (Table. 9)。

Table 6. Rates of filled vacancy of nutrition and feeding contents in each herds

Milking Stage			Herd A	Herd B	Herd C	Herd D	Herd E
Day -60 to -31	DMI (%) 1)		100.0	91.2	95.5	98.0	94.6
	CP (%) 1)		90.6	94.6	83.0	92.0	84.6
	DIP (%) 1)		108.8	108.8	117.8	128.0	92.2
	SIP (%) 1)		104.7	100.0	98.3	75.0	87.8
	NE (%) 1)		114.4	114.8	105.9	114.3	116.3
	TDN (%) 1)		113.1	112.6	104.8	112.7	114.2
	NDF (%) 2)		63.8	51.4	55.7	62.8	61.6
	ADF (%) 2)		37.5	27.7	31.5	37.0	35.7
	NFC (%) 2)		13.6	27.3	23.8	18.5	20.9
Day -30 to -1	DMI (%) 1)		106.5	104.9	100.6	101.2	100.0
	CP (%) 1)		100.6	107.5	92.5	102.0	99.3
	DIP (%) 1)		118.6	112.2	125.6	118.0	111.2
	SIP (%) 1)		106.5	98.0	108.6	77.8	96.3
	NE (%) 1)		108.4	114.1	92.9	106.9	106.2
	TDN (%) 1)		108.3	113.4	93.5	106.5	105.7
	NDF (%) 2)		54.7	44.6	47.1	44.6	45.2
	ADF (%) 2)		31.8	24.2	26.7	26.1	26.3
	NFC (%) 2)		21.3	32.3	29.3	33.0	32.3
Day 31 to 60	DMI (%) 1)		110.5	108.0	101.9	106.4	109.4
	CP (%) 1)		97.3	90.2	87.6	94.9	90.1
	DIP (%) 1)		107.6	96.2	96.8	103.8	90.8
	SIP (%) 1)		89.0	86.5	82.9	86.0	81.0
	NE (%) 1)		99.5	99.8	97.1	95.3	98.2
	TDN (%) 1)		100.2	100.3	97.4	96.0	98.9
	NDF (%) 2)		36.0	37.5	33.2	33.6	38.8
	ADF (%) 2)		19.2	20.8	20.7	21.4	23.5
	NFC (%) 2)		35.3	36.5	35.0	38.7	36.3

1) Rate of filled vacancy

2) Feed contents

Data means percentage according with NRC standard.

The rate of feeding sufficiency was set up 650kg of body weight (BW) in all Herd. In all Herds, target milk yield was 40kg per day at peak period.

Table 7. Occurrence rates of periparturient disease incidence in calving cows for in each herds

Diseases	Herd A	Herd B	Herd C	Herd D	Herd E
Ketosis (%)	10.3	3.0	3.8	5.0	3.8
Milk fever(%)	15.4	9.1	5.7	0.0	1.3
Displaced abomasum(%)	10.3	9.1	5.7	6.7	2.6
Retained placenta(%)	9.0	15.2	9.4	3.3	1.3

Date are the mean occurrence rates of periparturient disease in calving cows that required veterinary treatment during periparturient periods. The average number of treatment times per cow was 3.4 in herd A, 2.8 in herd B, 3.2 in herd C, 2.4 in herd D and 2.4 in herd E.

Table 8. Reproductive performance of each herd

	Herd A	Herd B	Herd C	Herd D	Herd E
Average of first AI days (days)	100.3	84.0	78.5	85.9	92.8
Pregnant rate at first time of AI (%)	17.2	22.9	39.0	40.0	45.7
Non-pregnant rate after 121 days (%)	50.6	48.0	24.7	36.8	35.4
Interval day of calving to calving (days)	457.1	425.7	415.5	412.0	429.5

Data means average of each parameter in each herds.

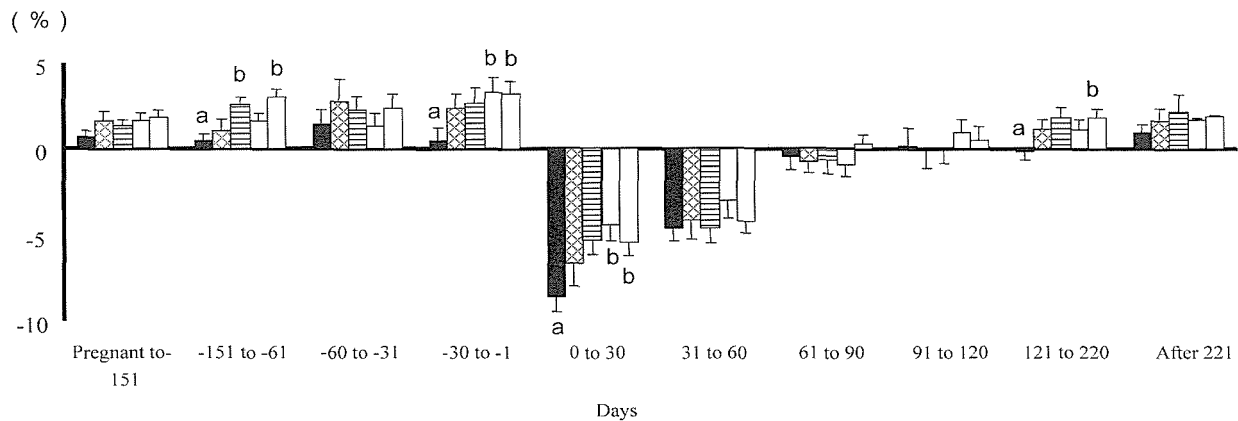


Fig 11. Weight Change Rate in herd A (black bars), herd B (double hatched bars), herd C (hatched bars), herd D (gray bars), and herd E (white bars). Values were expressed as the mean \pm S.E. Different letters indicate significant differences among the three groups ($P < 0.05$).

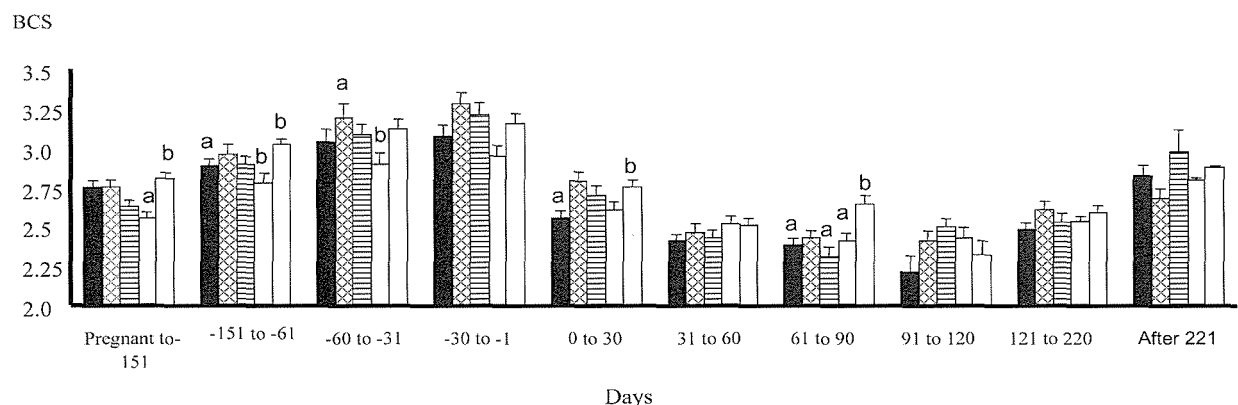


Fig 12. BCS in herd A (black bars), herd B (double hatched bars), herd C (hatched bars), herd D (gray bars), and herd E (white bars). Values were expressed as the mean \pm S.E. Different letters indicate significant differences among the three groups ($P < 0.05$).

A, B, C群はD, E群に比べ周産期疾病の発生が多く、かつA群における発生率は最も高かった。A, B群の繁殖成績はC, DとE群に比べ悪かった。A群のWCR値は分娩前30日から分娩後30日までの期間においてD及びE群に比べ有意に低かった。MPTの成績では、A群の分娩前30日から1日(-30~-1)までの期間における非エステル型脂肪酸 (NEFA) の高値と分娩後30日(0~30)までの低血糖および β ヒドロキシ酪酸 (BHB) の高値が認められた。WCR値は、本来、体重が増加しなければならない妊娠後期に低下し、周産期疾病が多発する泌乳初期には最も著しい低下を示し、かつ疾病が多発する牛群ほど著しい低下を示した。これらの結果からWCR値による各泌乳ステージにおける栄養状態の把握は、BCS値の測定よりも

客観性に優れると考えられるとともに、乳牛の周産期におけるWCRの検査は、牛群の総合的な栄養状態の把握に有効なパラメーターとなり、免疫プロファイル・テストの補助手段として有用であることが示唆された。

本研究は、乳牛の疾病が周産期に多発する背景に、分娩前後の負の栄養バランスおよびそれに誘発される免疫能の低下が深く関わっていることが考えられることから、周産期におけるSPPLおよびサイトカインの推移を解析して免疫能の変化を評価する「乳牛の免疫プロファイル・テスト」の臨床応用の概念について検討するとともに、この時期の体重変動率が牛群の総合的な栄養状態の把握に有効なパラメーターとなり、「免疫プロファイル・テスト」の補助手段として活用できる可能

Table 9. Biochemical datas in each herds.

	day	Herd A	Herd B	Herd C	Herd D	Herd E
BHB ($\mu\text{mol/l}$)						
	60~31	813.0 \pm 72.0 ^a	561.6 \pm 85.7	623.3 \pm 66.3	398.0 \pm 42.3 ^b	526.6 \pm 15.0 ^b
	30~1	717.8 \pm 42.3	528.3 \pm 46.8	652.6 \pm 40.3	634.8 \pm 59.3	468.4 \pm 77.5
	0~30	2343.0 \pm 888.0	1476.2 \pm 536.8	796.8 \pm 187.4	509.8 \pm 61.6	1170.2 \pm 490.3
	31~60	1037.8 \pm 197.0	776.5 \pm 118.2	620.3 \pm 42.6	595.8 \pm 100.4	529.8 \pm 55.5
	61~90	890.7 \pm 151.2 ^a	956.0 \pm 268.9	647.6 \pm 130.0	612.3 \pm 61.1	429.5 \pm 37.7 ^b
	91~120	706.5 \pm 132.1	524.0 \pm 63.5	564.4 \pm 54.2	669.4 \pm 39.6	530.2 \pm 43.9
NEFA (mEq/l)						
	60~31	105.7 \pm 28.5	112.0 \pm 13.9	112.7 \pm 22.3	171.5 \pm 24.9	131.8 \pm 29.1
	30~1	268.5 \pm 110.1 ^a	141.7 \pm 10.4 ^b	141.4 \pm 45.4 ^b	128.8 \pm 14.6 ^b	125.8 \pm 18.3 ^b
	0~30	564.0 \pm 130.3	923.3 \pm 271.3	561.7 \pm 131.8	293.7 \pm 61.9	594.0 \pm 108.1
	31~60	117.5 \pm 11.5	263.3 \pm 43.3	183.3 \pm 47.2	243.8 \pm 67.1	287.8 \pm 36.7
	61~90	112.3 \pm 14.6	232.0 \pm 54.1	158.2 \pm 40.9	120.7 \pm 22.4	148.8 \pm 27.7
	91~120	92.5 \pm 10.0	150.0 \pm 40.0	80.4 \pm 14.0	77.6 \pm 5.0	114.3 \pm 19.5
TC (mg/dl)						
	60~31	171.7 \pm 15.5	216.2 \pm 37.4	112.0 \pm 16.9	129.5 \pm 17.2	131.8 \pm 17.9
	30~1	136.5 \pm 16.3 ^a	145.2 \pm 26.1 ^a	74.9 \pm 6.4 ^b	91.3 \pm 9.9	97.8 \pm 12.4
	0~30	93.3 \pm 9.2	144.0 \pm 29.2	88.0 \pm 12.4	105.0 \pm 12.3	115.4 \pm 18.3
	31~60	189.3 \pm 11.2	239.3 \pm 40.0	155.5 \pm 12.6	182.2 \pm 15.7	208.2 \pm 19.7
	61~90	186.0 \pm 15.7	261.8 \pm 46.7	197.4 \pm 28.8	225.0 \pm 21.1	240.2 \pm 25.5
	91~120	212.7 \pm 18.1	250.5 \pm 38.5	216.4 \pm 23.73	215.8 \pm 12.3	252.8 \pm 21.1
UN (mg/dl)						
	60~31	11.5 \pm 0.9	10.4 \pm 1.0	9.6 \pm 1.3	9.9 \pm 1.2	12.6 \pm 1.3
	30~1	11.2 \pm 1.5	12.0 \pm 0.7	10.7 \pm 0.7	10.0 \pm 1.0	10.1 \pm 0.4
	0~30	10.7 \pm 0.6	7.3 \pm 0.7	7.5 \pm 0.8	9.9 \pm 2.1	9.7 \pm 1.3
	31~60	12.9 \pm 0.8	11.3 \pm 1.1	9.0 \pm 0.9	10.6 \pm 1.9	7.2 \pm 0.3
	61~90	14.3 \pm 2.0	12.2 \pm 2.0	11.5 \pm 0.6	11.3 \pm 1.4	7.7 \pm 0.8
	91~120	14.7 \pm 1.0 ^a	10.2 \pm 1.3 ^b	10.9 \pm 1.0	11.6 \pm 1.1	7.9 \pm 0.8 ^b
Glu (mg/dl)						
	60~31	60.8 \pm 2.4	66.8 \pm 1.3	60.3 \pm 3.2	56.5 \pm 1.7	61.5 \pm 1.2
	30~1	63.3 \pm 0.8	72.2 \pm 2.4	63.3 \pm 1.8	47.9 \pm 1.6	58.3 \pm 1.5
	0~30	44.4 \pm 4.8	56.8 \pm 5.1	54.7 \pm 2.7	58.9 \pm 5.1	54.7 \pm 3.0
	31~60	57.0 \pm 4.2	65.5 \pm 2.3	58.8 \pm 3.1	49.6 \pm 3.2	55.5 \pm 2.3
	61~90	52.4 \pm 2.0	55.5 \pm 4.9	56.8 \pm 1.1	53.3 \pm 3.0	53.0 \pm 4.3
	91~120	56.0 \pm 2.2	54.0 \pm 2.6	51.8 \pm 2.4	50.9 \pm 2.9	54.3 \pm 2.0

Values were expressed as the mean \pm S.E.

The different signs were indicated significant differences among the three groups ($P < 0.05$).

The periods 60~31 and 30~1 means day before calving and other periods means day after calving.

The day 0 means calving day.

について検索したものである。

本研究における成績から、乳牛の周産期における免疫能を評価するためのプロファイルのパラメーターとしては、CD 3⁺T細胞またはCD 4⁺T細胞およびIFN- γ /IL-4比の2項目がベストと考えられ、事情が許せば、さらにCD 4/CD 8比、MHC class II⁺CD14⁻細胞、リンパ球のPHA刺激幼弱化率およびTNF- α から1または2種を追加することが良いと考えられた。

また周産期疾病を発症する乳牛では、妊娠末期の栄養バランスが負の状態に陥ることが大きな要

因であり、それに伴ってWCR値に変化が起こり、体内の種々の代謝に乱れが生じ、ついには免疫機能にも一定の変化が惹起されることが示された。また、分娩前後のWCR値の有意な変動は、栄養・代謝障害や日和見感染症のリスクファクターとしても重要であることが示唆された。

これらの知見は、今後の産業動物医療に貢献できるばかりでなく、化学療法剤使用量の低減化、耐性菌発現の防止、並びに安心・安全な乳製品の生産にも貢献できるものと考えられる。

引用文献

1. Araki S, Suzuki M, Fujimoto M (1992) Enhanced resistance to bacterial in mice by oral administration of an active egg white product. *J Vet Med Sci*, 54 : 1055–1056
2. Berry DP, Lee JM, Macdonald KA, Stafford K, Matthews L, Roche JR (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
3. Buckley F, O'Sullivan K, Mee JF, Evans RD, Dillon P (2003) Relationships among milk yield, body condition, cow weight, and reproduction in spring-calved Holstein-Friesians. *J Dairy Sci*, 86 : 2308–2319
4. Goff JP, Horst RL (1997) Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J Dairy Sci*, 80 : 1260–1268
5. Kaneene JB, Miller R, Herdt TH, Gardiner JC (1997) The association of serum nonesterified fatty acids and cholesterol, management and feeding practices with peripartum disease in dairy cows. *Prev Vet Med*, 31 : 59–72
6. Kohiruimaki M, Ohtsuka H, Hayashi T, Kimura K, Masui M, Ando T, Watanabe D, Kawamura S (2006) Evaluation by weight change rate of dairy herd condition. *J Vet Med Sci*, 68 : 935–940
7. 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牛における飼養管理改善後のリンパ球サブセット. *家畜診療*, 52 : 283–289
8. Murayama T, Mita N, Tanaka M, Kitajo T, Asano T, Mizuochi K, Kaneko K (1995) Effects of orally administered *Clostridium Miyairi* 588 on mucosal immunity in mice. *Vet Immunol Immunopathol*, 48 : 333–342
9. Nakagawa J, Osamu S, Ichijo S, Araki S, Kimura M (1993) Effects of active egg white product on neutrophil function in calves. *J Vet Med Sci*, 55 : 259–263
10. 農林水産省 家畜共済統計表 (2005) 農業災害補償制度家畜共済統計平成15年度版.
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
12. Ostergaard S, Sorensen J (1998) A review of the feeding-health-production complex in a dairy herd. *Prev Vet Med*, 36 : 109–129
13. Roche JF, Mackey D, Diskin MD (2000) Reproductive management of postpartum cows. *Anim Reprod Sci*, 60–61 : 703–712
14. Rukkwamsuk T, Kruip T, Wensing A (1999) Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet Q*, 21 : 71–77
15. Saad AM, Concha C, Astrom G (1989) Alterations in neutrophil phagocytosis and lymphocyte blastogenesis in dairy cows around parturition. *Zentralbl Veterinarmed B*, 36 : 337–345
16. 佐藤繁, 岡田啓司, 鈴木利行 (2006) 乳牛の末梢血液中の好中球およびリンパ球機能に及ぼす活性卵白粉末の影響. *日獣会誌*, 59 : 464–466
17. Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A, Kamiya S (2004) The

effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H 7 infection in mice. FEMS Immunol Med Microbiol, 41 : 219–226

18. Van Saun RJ (1991) Dry cow nutrition. The key to improving fresh cow performance. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 7 : 599–620

19. Van der Meide PH, Schellekens H (1996) Cytokines and the immune response. Biotherapy, 8 : 243–249