黒毛和種とホルスタイン種の子牛における 末梢血白血球の比較

大塚浩通^{1)†} 小松勝一²⁾ 今内 覚³⁾ 福田茂夫⁴⁾ 菊 佳男⁴⁾
吉野知男⁴⁾ 小岩政照⁴⁾ 川村清市¹⁾

- 1) 北里大学獣医畜産学部 (〒034-8628 十和田市東二十三番町 35-1)
2) 北海道いぶり農業共済組合 (〒059-1433 勇払群早来町字遠浅 423-133)
3) 北海道大学大学院獣医学研究科 (〒060-0818 札幌市北区北 18 西 9)
4) 酪農学園大学獣医学部 (〒069-8501 江別市文京台緑町 582)

(2001 年 8 月 28 日受付・2002 年 8 月 12 日受理)

要 約

黒毛和種 (JB) 子牛の細胞性免疫を評価する目的で、出生後の JB 子牛 (JB 群; $n = 10$) とホルスタイン種 (Hol) 子牛 (Hol 群; $n = 10$) の末梢血白血球の変化を比較した。各群の子牛の出生後 3 日以内 (0 週齢) および 3, 6, 9, 12 週齢の末梢血白血球はフローサイトメトリー (FCM) を用いて解析した。末梢血白血球は FCM の側方散乱光 [side light scatter (SSC)] と前方散乱光 [forward light scatter (FSC)] によって得られた 3 つの大きさ、すなわち小型、中型および大型に分類して単球・リンパ球 (ML) とした。各群の中型 (M)-ML 数は 0 週齢が最低値で、その後増加した。しかし JB 群の M-ML 数は 6 から 9 週齢に減少し、6 週には Hol 群に比べ有意な低値が認められた。JB 群の小型 (S)-ML 数は 3 週齢に最高値となり、0, 3, 9, 12 週には Hol 群に比べ有意な高値が認められた。JB 群の $CD3^+$ 細胞数は Hol 群に比べ 3 週齢に有意な高値を示した。また S, M-ML 中の WC^+ 細胞比率は、観察期間中 JB 群が Hol 群に比べ低値を推移する傾向が認められた。これらのことから JB 子牛の細胞性免疫応答は T リンパ球を中心に Hol 子牛とは異なることが明かとなった。

——キーワード：子牛，フローサイトメトリー，ホルスタイン種，黒毛和種，末梢血白血球。

----- 日獣会誌 55, 789～795 (2002)

子牛の免疫機能は成牛に比べ未熟なため、下痢症や肺炎などの感染症を発症しやすい [8]。わが国における子牛の感染に関する報告は、黒毛和種 (JB) の下痢症に関する知見が多い [9, 11, 12, 19]。感染症の発症原因の一つに免疫機能の低下が挙げられるが、幼齢期の JB 子牛の免疫機能ではリンパ球幼若化反応が他品種に比べて低い [10]。また、人の幼齢期では黒色人種が白色人種に比べ好中球数が低値であるため、人種間で免疫機能に違いのあることが指摘されている [2]。これらのことから JB 子牛の免疫機能には他の品種の子牛と違いのあることが予測される。

リンパ球サブセットに代表される白血球表面抗原の解析は、細胞性免疫応答を評価する上で有用な情報が得られることから、人では感染症などの疾病の細胞性免疫応答を解明する目的で広く臨床応用されている [7, 25]。幼齢期の健康な人でのリンパ球サブセットに関しては、

末梢血 T リンパ球が多いことが知られている [21]。牛では幼齢期のホルスタイン (Hol) 種で人と類似した成績があるが [16]、JB における出生後の末梢血白血球の表面抗原を解析した報告はない。

一方、人の末梢血リンパ球の表面抗原をフローサイトメトリー (FCM) 解析した成績では、大きさに違いのあるリンパ球が存在し、おのおののリンパ球集団に独自のサブセットが存在することが確認されている [6, 20]。Walker ら [23] は、猫のウイルス感染症において大きさの異ったリンパ球中の T リンパ球比率が低下することから、リンパ球の大きさとそのサブセットを区分して解析することの必要性を述べている。しかし、牛での大きさの異なるリンパ球の区分と、おのおののリンパ球集団のサブセットは不明である。

本研究は幼齢期における JB の細胞性免疫を評価する目的で、JB 子牛と Hol 子牛の末梢血白血球の表面抗原

† 連絡責任者：大塚浩通 (北里大学獣医畜産学部獣医学科獣医内科学教室)

〒034-8628 十和田市東二十三番町 35-1 ☎0176-23-4371 FAX 0176-23-8703

図1 FCM解析による牛の末梢白血球のサイトグラム。
S-ML (S), M-ML (M) およびL-ML (L)

を解析・比較した。また、同時に単球とリンパ球の大きさに注目して、FCMによりおのおの大きさの異なった細胞集団に区分して表面抗原を解析し、それらの末梢白血球の2種類の違いについて検討した。

材料および方法

供試牛ならびに血液検査：臨床的に健康なJB子牛、雄5頭と雌5頭 (JB群; $n = 10$) ならびにHol子牛、雄6頭と雌4頭 (Hol群; $n = 10$) を供試した。

血液は出生後3日以内を0週齢とし、その後3, 6, 9, 12週齢に頸静脈から採取し、EDTA-2K添加試験管に分注した。血液は白血球数 (自動血球計数機)、好中球数 (ギムザ染色を用い白血球数と百分比から算出) の測定と白血球表面抗原の解析に用いた。

FCM：採取した血液1mlと0.83%塩化アンモニウム溶液2mlを混和して赤血球を溶血させ、リン酸緩衝液により洗浄して白血球を分離し、FCM解析に用いた。白血球表面抗原の解析はWyattらの方法 [26] に準じて実施した。牛白血球表面抗原の解析には抗ウシCD3抗体 (総Tリンパ球)^{a)}、抗ウシCD4抗体 (ヘルパーTリンパ球)^{b)}、抗ウシCD8抗体 (サプレッサー/キラーTリンパ球)^{c)}、抗ヒトCD14抗体 (単球)^{d)}、抗ウシWC1抗体 ($\gamma\delta$ T型細胞)^{e)}、抗ウシMHC class-II抗体 (単球・Bリンパ球)^{f)}を用いた。抗マウスFITC標識抗体^{g)}を反応させて標識した各表面抗原陽性細胞はフローサイトメーター^{h)}により解析した。

サイトグラムの結果から側方散乱光 (side light scatter; SSC) が低い単球・リンパ球 (Monocyte and Lymphocyte; ML) とそれ以外の白血球に分類でき、さらに単球・リンパ球は前方散乱光 (forward light scatter; FSC) が異なる3つのMLに分類できたため、

FSCが最も低かったMLをsmall size (小型, S-ML)、最も高かったMLをlarge size (大型, L-ML) とし、FSCがS-MLとL-MLの中間に位置したMLをmedium size (中型, M-ML) とした (図1)。

MHC class-II 陽性⁽⁺⁾細胞にはこれまでの報告 [5] と同様に蛍光強度の異なる2種類の陽性細胞群が得られたため、MHC class-II^{low} (蛍光強度弱陽性; 単球) と MHC class-II^{high} (蛍光強度強陽性; Bリンパ球) とに分別して評価した。

各表面抗原陽性細胞は各表面抗原の陽性率と、白血球数とを用いて算出した実数 ($\times 10^2/\mu l$) で、またS, MおよびL-ML数はサイトグラムから得られた各自白血球集団の陽性率と白血球の実数値を用い算出した。S, MならびにL-ML中のおおのこのML集団での表面抗原陽性細胞についてはS, MならびにLの各ML中の陽性率 (%) で示した。

各群の検査成績は各群の出生後3日以内 (0週齢) とその後の数値との比較、および同週齢のJB群とHol群との比較をStudentの t -検定により行った。各群の数値の変化はFriedman検定による多重比較も実施した。危険率5%未満を有意な差とした。

成績

白血球数 (図2A)：JB群の白血球数は0週齢から3週齢まで一定数で持続したが、その後減少し始め、9週齢には0週齢に比べ有意な低値を示した。JB群の数は12週齢にはふたたび増加傾向を示した。Hol群の数は0週齢から12週齢まで徐々に減少し、3, 6, 9, 12週齢の数は0週齢に比べ有意な低値を示した。12週齢におけるJB群の数 ($111.2 \pm 3.9 \times 10^2/\mu l$) はHol群 ($80.1 \pm 4.0 \times 10^2/\mu l$) に比べ有意な高値を示した。

好中球数 (図2B)：Hol群ならびにJB群の好中球数は0週齢において最高値を示し、その後減少した。JB群の数は6週齢に最低値になり、その後増加傾向を示した。JB群における6, 9, 12週齢の数は0週齢に比べ有意な低値を示した。Hol群の数は3週後に急激に減少し、その後12週齢まで徐々に減少した。Hol群における3, 6, 9, 12週齢の数は0週齢に比べ有意な低値を示した。12週齢におけるJB群の数 ($42.4 \pm 6.0 \times 10^2/\mu l$) はHol群 ($24.2 \pm 2.6 \times 10^2/\mu l$) に比べ有意な高値を示した。

a) MM1A; VMRD, Pullman, U.S.A.

b) CACT83B; VMRD, Pullman, U.S.A.

c) CACT80C; VMRD, Pullman, U.S.A.

d) MY4; Coulter Immunology Hailed, Florida, U.S.A.

e) WC-N1; VMRD, Pullman, U.S.A.

f) TH14B; VMRD, Pullman, U.S.A.

g) Cappel, Durham, NC, U.S.A.

h) Flow Cytometer; EPICS ELITE ESP, Coulter Corp., Miami, U.S.A.

図2 JB群とHol群子牛における白血球数 (A), 好中球数 (B), S-M-L数 (C) およびM-M-L数 (D) の推移.

JB群 (●; n = 10), Hol群 (○; n = 10)

平均±標準誤差

*; JB群とHol群との有意差

†; JB群における0週と出生後の各週の有意差

‡; Hol群における0週と出生後の各週の有意差

すべて $P < 0.05$ を有意として表示

した.

S-M-L数 (図2C): JB群のS-M-L数は3週齢に増加して最高値 ($46.2 \pm 5.6 \times 10^2/\mu l$) を示し, 6週齢以降は0週齢と同等の値に減少した. Hol群では3, 6週齢において0週齢と比べ有意に増加したが, 6週齢以降に0週齢と同等の値に減少した. JB群の数は観察期間中, Hol群に比べ高値を示す傾向にあり, 0, 3, 9, 12週齢には有意な差が認められた.

M-M-L数 (図2D): JB群のM-M-L数は0週齢に最低値を示し, 3週齢では0週齢に比べ有意に増加したも

表1 JB群とHol群子牛の末梢血単核球における各表面抗原陽性細胞数

週	JB群 (n = 10)	Hol群 (n = 10)	群間の差
CD3 ⁺ ($\times 10^2/\mu l$)			
0	34.14 ± 5.37	24.61 ± 2.15	*
3	55.76 ± 5.65 [‡]	39.03 ± 4.30	*
6	42.23 ± 3.61	36.26 ± 3.48	
9	28.05 ± 1.95	27.80 ± 2.33	
12	27.74 ± 2.75	23.17 ± 3.05	
WC1 ⁺ ($\times 10^2/\mu l$)			
0	11.91 ± 2.22	13.33 ± 1.51	
3	16.85 ± 3.41	21.97 ± 3.22 [†]	
6	14.47 ± 4.64	13.79 ± 1.31	
9	7.01 ± 1.14 [‡]	9.16 ± 0.97 [†]	
12	7.22 ± 1.25 [‡]	7.22 ± 1.39 [†]	
CD4 ⁺ ($\times 10^2/\mu l$)			
0	10.50 ± 1.79	7.58 ± 1.32	
3	20.52 ± 2.48 [‡]	10.39 ± 1.71	*
6	14.43 ± 2.40	10.75 ± 0.99	
9	10.26 ± 1.44	11.50 ± 1.66	
12	11.54 ± 1.30	9.66 ± 1.23	
CD8 ⁺ ($\times 10^2/\mu l$)			
0	5.06 ± 0.84	2.56 ± 0.47	
3	10.24 ± 1.10 [‡]	5.59 ± 0.85 [†]	*
6	7.58 ± 1.05 [‡]	6.01 ± 1.26 [†]	*
9	4.37 ± 0.35	5.65 ± 0.81	
12	5.12 ± 0.50	3.86 ± 0.41	
CD14 ⁺ ($\times 10^2/\mu l$)			
0	14.72 ± 2.72	11.35 ± 1.26	
3	19.59 ± 5.38	11.92 ± 1.52	
6	14.27 ± 2.99	13.32 ± 2.60	
9	11.99 ± 1.54	8.27 ± 1.40	
12	12.50 ± 1.59	7.88 ± 1.18	*
MHC class-II ^{low} ($\times 10^2/\mu l$)			
0	12.33 ± 2.78	8.90 ± 1.20	
3	19.43 ± 5.04	13.03 ± 1.93	
6	13.84 ± 2.35	16.74 ± 2.99	
9	13.46 ± 1.87	9.81 ± 1.21	
12	12.47 ± 1.40	9.57 ± 1.64	
MHC class-II ^{high} ($\times 10^2/\mu l$)			
0	3.65 ± 0.73	4.11 ± 0.63	
3	12.20 ± 0.99	10.13 ± 1.59	
6	11.50 ± 1.02 [‡]	14.94 ± 1.71 [†]	
9	14.58 ± 2.18 [‡]	13.24 ± 1.17 [†]	
12	22.12 ± 1.70 [‡]	16.63 ± 1.82 [†]	*

平均±標準誤差

*; JB群とHol群との有意差

‡; JB群における0週と出生後の各週の有意差

†; Hol群における0週と出生後の各週の有意差

すべて $P < 0.05$ を有意として表示

の6週齢にはふたたび減少した. 一方, Hol群では0週齢に低値を示したが, 3週齢以降は0週齢に比べ高値を示し, 6週齢に最高値となった. JB群の数は6週齢において ($18.5 \pm 1.9 \times 10^2/\mu l$), Hol群 ($33.5 \pm 2.3 \times 10^2/\mu l$) に比べ有意な低値を示した.

JB群とHol群のL-M-L数は観察期間中徐々に減少す

表2 JB 群とHol 群子牛の S-ML における各表面抗原の陽性率

週	JB 群 (n=10)	Hol 群 (n=10)	群間の差
CD3 ⁺ (%)			
0	83.56 ± 1.72	83.74 ± 2.36	
3	88.32 ± 0.98 [‡]	77.54 ± 1.75 [†]	*
6	86.39 ± 1.66	80.40 ± 1.81	*
9	76.53 ± 3.73	85.49 ± 2.86	*
12	73.60 ± 3.53 [‡]	73.83 ± 2.08 [†]	
WC1 ⁺ (%)			
0	23.38 ± 3.72	27.13 ± 4.43	
3	18.79 ± 3.92	31.83 ± 3.71	*
6	21.96 ± 5.11	21.68 ± 3.51	
9	15.79 ± 2.44	20.00 ± 4.08 [†]	
12	18.35 ± 3.14	22.65 ± 4.05	
CD4 ⁺ (%)			
0	36.63 ± 3.79	36.87 ± 6.52	
3	35.59 ± 5.02	26.88 ± 2.16	
6	32.64 ± 4.50	38.70 ± 5.17	
9	32.70 ± 3.91	43.07 ± 5.51	
12	30.91 ± 2.30	31.63 ± 2.46	
CD8 ⁺ (%)			
0	15.21 ± 1.94	9.93 ± 2.22	*
3	17.34 ± 2.07	13.02 ± 1.10	
6	15.71 ± 1.07	11.53 ± 1.71	*
9	12.16 ± 0.69 [‡]	17.55 ± 3.57	*
12	11.77 ± 1.23	15.42 ± 2.54	
MHC class-II ^{high} (%)			
0	3.38 ± 0.49	4.85 ± 1.13	
3	5.01 ± 0.83 [‡]	11.54 ± 1.35 [†]	*
6	6.42 ± 1.10 [‡]	15.75 ± 2.90 [†]	*
9	14.27 ± 2.55 [‡]	9.10 ± 1.47 [†]	*
12	15.73 ± 2.35 [‡]	17.17 ± 1.64 [†]	

平均 ± 標準誤差

*: JB 群と Hol 群との有意差

‡: JB 群における 0 週と出生後の各週の有意差

†: Hol 群における 0 週と出生後の各週の有意差

すべて $P < 0.05$ を有意として表示

る傾向を示した。JB 群の L-ML 数は Hol 群に比べ 3 から 12 週齢まで高値を示す傾向にあった。

末梢血単核球における各表面抗原陽性細胞数の変化 (表1): JB 群と Hol 群の CD3⁺細胞数は 3 週齢に最高値となり、その後徐々に減少する傾向が認められた。JB 群では 0 週齢、3 週齢に Hol 群と比べて有意な高値を示した。JB 群と Hol 群の WC1⁺細胞数は 3 週齢に 0 週齢と比べ増加する傾向を示したが 3 週齢以降減少し、9 週齢以降は 0 週齢に比べ有意な低値を示した。JB 群の WC1⁺細胞数は 3 週齢において Hol 群に比べ低値を示す傾向があった。JB 群の CD4⁺細胞数は 3 週齢に最高値となり、その後 0 週齢と同様の値に復した。Hol 群では観察期間中に明らかな変化が認められなかった。JB 群では 3 週齢に Hol 群に比べ有意な高値を示した。JB 群と Hol 群の CD8⁺細胞数は 3 週齢、6 週齢に 0 週齢と比べて高値を示し、その後 0 週齢と同様の値に復した。JB 群では 3、

6 週齢に Hol 群に比べ有意な高値を示した。各群の CD14⁺細胞数には観察期間中、明らかな変化が認められなかった。JB 群の数は Hol 群に比べ観察期間中、高値を示す傾向にあり、12 週齢に有意な差が認められた。各群の MHC class-II^{low}細胞数には明らかな変化が認められず、各群間に有意な差はなかった。JB 群と Hol 群の MHC class-II^{high}細胞数は 0 週齢において最低値を示し、観察期間中持続的に増加し、12 週齢には JB 群が Hol 群に比べ有意な高値が認められた。

S-ML の表面抗原の解析 (表2): JB 群の CD3⁺細胞比率は 3 週齢に最高値となり、その後徐々に低下し、12 週齢には 0 週齢に比べ明らかな低値を示した。Hol 群では 3 週齢において有意に低下したが、6 週齢には 0 週齢と近似した値に復した。Hol 群の数は 12 週齢にはふたたび低下して最低値になった。JB 群では Hol 群に比べ 3、6 週齢に有意な高値を示し、また、9 週齢では有意に低下した。JB 群の WC1⁺細胞比率は観察期間中有意的な変化は認められなかった。Hol 群では 0 週後徐々に低下する傾向にあり、9 週齢では 0 週齢に比べ有意な低値が認められた。JB 群では Hol 群に比べ観察期間中低値を示す傾向にあり、特に 3 週齢に有意な差が認められた。各群の CD4⁺細胞比率には明らかな変化ならびに差が認められなかった。JB 群の CD8⁺細胞比率は 3 週齢に最高値となり、9 週齢に有意に低下した。Hol 群では 0 週齢に最低値を示し、その後徐々に上昇して 9 週齢に最高値に至った。JB 群と Hol 群との間には 0 週齢、6、9 週齢において有意な差が認められた。各群の MHC class-II^{high}細胞比率は 0 週齢に最低値を示し、その後両群ともに徐々に上昇して 0 週齢に比べ有意な高値を示した。JB 群では 0、3、6、12 週齢において Hol 群に比べ低値を示し、3、6、9 週齢に Hol 群との間に有意な差が認められた。S-ML 中には CD14⁺細胞と MHC class-II^{low}細胞は認められなかった。

M-ML の表面抗原の解析 (表3): 各群の CD3⁺細胞比率は 0 週齢において最高値を示し、その後徐々に低下して 0 週齢に比べ有意な低値が認められた。JB 群では Hol 群に比べ 9、12 週齢に有意な低値が認められた。各群の WC1⁺細胞比率は 0 週齢において最高値を示し、その後徐々に低下して 0 週齢に比べ有意な低値が認められた。JB 群では Hol 群に比べ 9、12 週に有意な低値が認められた。JB 群ならびに Hol 群の CD4⁺細胞比率と CD8⁺細胞比率には有意な変化が認められなかった。また、CD4⁺細胞比率では JB 群と Hol 群の間に有意な差は認められなかった。JB 群の CD8⁺細胞比率は Hol 群に比べ 9、12 週齢に有意な低値が認められた。各群の MHC class-II^{high}細胞比率は 0 週齢に最低値を示し、その後徐々に上昇して 0 週齢に比べ有意な高値を示した。JB 群では Hol 群に比べ 6 週齢において有意な低値を、また

表3 JB 群と Hol 群子牛の M-ML における各表面抗原の陽性率

週	JB 群 (n=10)	Hol 群 (n=10)	群間の差
CD3 ⁺ (%)			
0	78.16 ± 2.27	76.14 ± 2.09	
3	66.10 ± 4.68 [‡]	67.13 ± 3.31 [†]	
6	66.50 ± 3.33 [‡]	60.02 ± 3.85 [†]	
9	47.89 ± 3.73 [‡]	62.43 ± 2.46 [†]	*
12	37.50 ± 4.04 [‡]	51.80 ± 2.77 [†]	*
WC1 ⁺ (%)			
0	47.66 ± 4.10	47.83 ± 4.77	
3	32.97 ± 6.14 [‡]	38.47 ± 3.96 [†]	
6	34.35 ± 4.88 [‡]	32.30 ± 2.26 [†]	
9	15.30 ± 2.41 [‡]	31.85 ± 2.22 [†]	*
12	14.47 ± 3.14 [‡]	29.69 ± 4.27 [†]	*
CD4 ⁺ (%)			
0	6.49 ± 0.58	7.45 ± 2.84	
3	10.92 ± 2.66	6.55 ± 1.60	
6	11.02 ± 2.15	8.68 ± 1.10	
9	10.02 ± 1.47	10.72 ± 1.44	
12	8.97 ± 1.16	11.47 ± 3.14	
CD8 ⁺ (%)			
0	6.59 ± 1.28	4.98 ± 0.93	
3	9.69 ± 2.05	5.05 ± 0.99	
6	9.22 ± 1.89	7.25 ± 2.48	
9	6.61 ± 0.91	9.82 ± 0.68	*
12	5.50 ± 0.64	6.00 ± 1.06	*
MHC class-II ^{high} (%)			
0	12.07 ± 3.16	12.55 ± 2.00	
3	24.56 ± 3.81 [‡]	24.52 ± 4.19 [†]	
6	20.07 ± 2.29 [‡]	33.45 ± 4.80 [†]	*
9	35.52 ± 3.31 [‡]	28.23 ± 3.07 [†]	
12	44.55 ± 2.90 [‡]	29.25 ± 1.78 [†]	*

平均 ± 標準誤差

*: JB 群と Hol 群との有意差

‡: JB 群における 0 週と出生後の各週の有意差

†: Hol 群における 0 週と出生後の各週の有意差

すべて $P < 0.05$ を有意として表示

12 週齢には有意な高値を示した。M-ML 中には CD14⁺ 細胞と MHC class-II^{low} 細胞は認められなかった。

L-ML の表面抗原の解析 (表 4) : 各群の CD3⁺ 細胞比率と CD4⁺ 細胞比率には明らかな変化ならびに差が認められなかった。各群の CD8⁺ 細胞比率は 3, 6, 9, 12 週齢において 0 週齢に比べ高値を示したが、各群間に有意な差は認められなかった。各群の CD14⁺ 細胞比率は 0 週齢において最高値を示し、その後徐々に低下した。JB 群では 0 週齢に比べ 3, 6, 9, 12 週齢に有意な差を示した。Hol 群では 6, 9, 12 週齢に有意な差を示した。JB 群の CD14⁺ 細胞比率は Hol 群に比べ 6, 9 週齢に有意な高値を示した。JB 群の MHC class-II^{low} 細胞比率は 3 週齢に最高値となり、その後徐々に低下した。JB 群の数は 0 週齢に比べ 3 ならびに 12 週齢に有意な差を示した。Hol 群では 0 週齢に最高値を示し、その後徐々に低下して、0 週齢に比べ 3, 9, 12 週齢に有意な差を示し

表4 JB 群と Hol 群子牛の L-ML における各表面抗原の陽性率

週	JB 群 (n=10)	Hol 群 (n=10)	群間の差
CD3 ⁺ (%)			
0	8.25 ± 1.59	8.90 ± 3.12	
3	8.40 ± 1.40	10.44 ± 2.03	
6	10.33 ± 0.93	11.60 ± 1.24	
9	11.71 ± 1.74	13.64 ± 2.97	
12	10.21 ± 1.08	13.90 ± 4.45	
CD4 ⁺ (%)			
0	5.52 ± 1.17	3.63 ± 1.36	
3	4.63 ± 0.82	5.56 ± 0.80	
6	7.33 ± 0.82	5.24 ± 0.87	
9	4.40 ± 0.52	5.92 ± 1.03	
12	4.73 ± 0.78	6.50 ± 1.67	
CD8 ⁺ (%)			
0	2.03 ± 0.59	2.18 ± 0.45	
3	3.45 ± 0.80 [‡]	5.50 ± 0.88 [†]	
6	3.91 ± 0.86 [‡]	4.26 ± 0.88 [†]	
9	3.46 ± 0.77 [‡]	5.72 ± 0.73 [†]	
12	3.83 ± 0.73 [‡]	4.74 ± 1.06 [†]	
CD14 ⁺ (%)			
0	82.23 ± 3.22	83.22 ± 1.37	
3	77.08 ± 4.15 [‡]	70.80 ± 5.27	
6	69.94 ± 2.84 [‡]	57.50 ± 6.53 [†]	*
9	60.41 ± 4.81 [‡]	50.02 ± 3.51 [†]	*
12	48.89 ± 4.16 [‡]	51.12 ± 2.74 [†]	
MHC class-II ^{low} (%)			
0	68.89 ± 8.30	74.46 ± 2.29	
3	75.00 ± 2.84 [‡]	64.28 ± 5.19 [†]	*
6	69.31 ± 3.62	64.42 ± 7.25	
9	68.24 ± 4.12	55.82 ± 3.76 [†]	*
12	58.95 ± 4.40 [‡]	51.96 ± 3.95 [†]	
MHC class-II ^{high} (%)			
0	10.55 ± 3.00	7.82 ± 1.07	
3	13.60 ± 2.27 [‡]	19.10 ± 6.01	
6	19.12 ± 3.47 [‡]	22.94 ± 4.46 [†]	
9	22.46 ± 2.52 [‡]	28.18 ± 2.23 [†]	
12	32.38 ± 3.80 [‡]	29.96 ± 3.52 [†]	

平均 ± 標準誤差

*: JB 群と Hol 群との有意差

‡: JB 群における 0 週と出生後の各週の有意差

†: Hol 群における 0 週と出生後の各週の有意差

すべて $P < 0.05$ を有意として表示

た。JB 群は Hol 群に比べ 3, 9 週齢に有意な高値が認められた。各群の MHC class-II^{high} 細胞比率は 0 週齢において最低値を示し、その後徐々に上昇した。JB 群では 0 週齢に比べ 3, 6, 9, 12 週齢に有意な差を示した。Hol 群では 0 週齢に比べ 6, 9, 12 週齢に有意な低値を示した。MHC class-II^{high} 細胞比率は観察期間中、各群間に有意な差は認められなかった。L-ML 中には WC1⁺ 細胞は認められなかった。

考 察

幼齢期の動物の末梢白血球数は成長の過程で著しく

変化する。人では新生児期に好中球増加に起因した白血球増多がみられるが、幼児期になると好中球数は減少して総リンパ球数は成人の2倍以上に増加する [13]。牛ではHolでの報告があり、人と同様に出生時に好中球数が高値を示すが1週間後には減少し、総リンパ球数は2週齢頃から増加し始める [15]。これらの成績は本研究のJB子牛で観察された好中球ならびに総リンパ球数の変化と類似した。さらにJB子牛のBリンパ球数の変化もHol子牛の報告 [18]と同様に、出生後に徐々に増加した。しかしTリンパ球であるCD3⁺、CD4⁺、CD8⁺ならびにWC1⁺細胞の変化はJB子牛がHolと明らかに異なっていたことから、JB子牛の細胞性免疫応答はTリンパ球を中心にHolと違いのあることが考えられた。

人では幼齢期に末梢血Tリンパ球数が増加するものの、CD4⁺細胞などの $\alpha\beta$ 型Tリンパ球のインターフェロンやインターロイキン-4の産生能が低い [3, 14, 22]。JB群のCD3⁺、CD4⁺ならびにCD8⁺細胞数は出生後にHol群に比べ高値だったが、これらTリンパ球の機能は低かった可能性がある。また牛の $\gamma\delta$ 型Tリンパ球であるWC1⁺細胞数は、JB群でHol群に比べ3週後に低値を示す傾向にあり、小型ならびに中型リンパ球中の比率においては有意な低値が認められた。 $\gamma\delta$ 型Tリンパ球は皮膚や粘膜組織など抗原との接触が豊富な器官に多く存在し [27]、幼齢期では細胞性免疫反応において重要な働きをもつと考えられている [1, 17]。このことからJBはHolに比べ、出生時から $\gamma\delta$ 型Tリンパ球が司る細胞性免疫反応が劣っている可能性がある。

本研究では牛のリンパ球の大きさの違いによっておのおの独立したサブセットが存在した。すなわちS-ML中には2種の子牛ともTリンパ球比率が高く、Bリンパ球比率は低かった。M-ML中にはS-MLに比較してTリンパ球比率が低く、またBリンパ球比率が高いことが明らかだった。L-MLには単球が最も多く存在し、Bリンパ球も存在するが、小数のTリンパ球も存在した。Mengeら [16]は、Hol子牛の末梢血リンパ球ポピュレーションにおいてCD4⁺細胞比率が出生直後に19.4 ± 6.4%，3から9週で20.2 ± 4.0%としているが、これは本研究で示したHol子牛の比率と異なる。比率に差があった要因の一つに、Mengeらの成績にはL-ML中のCD4⁺細胞が含まれていなかったことが考えられる。本研究ではL-MLの集団にもTリンパ球が分布していたことから、正確な末梢血サブセットを表現するためには、MLの位置での表面抗原の陽性率を解析する必要がある。

FCMによる解析の結果、JB群ではHol群に比べ幼齢期に中型リンパ球数が低値を示したのに対し小型リンパ球数は高値だった。人のリンパ球の大きさに関する報告では細胞質が大きな中型リンパ球が小型リンパ球に比べ

機能的であること [24]、スーパー抗原により刺激されたTリンパ球が大型化すること [4] から、出生後の中型リンパ球数が低値だったJBはHolに比べ免疫機能が低下している可能性がある。

本研究では子牛の独立したML集団のサブセットは品種間に差のあることが明かとなったが、リンパ球の大きさと機能の関連については検討しておらず、今後の課題である。出生後のJBとHolのTリンパ球数の変化には種差が存在したため、JBのTリンパ球の動態や機能に関する研究を行うことは、JBの幼齢期における感染防御システムを解明するために重要だと考えられた。

引用文献

- [1] Bluestone JA, Khattri R, Sciammas R, Sperling AI : Annu Rev Cell Dev Biol, 11, 307-353 (1995)
- [2] Caramihai E, Karayalcin G, Aballi AJ, Lanzkowsky P : J Pediatr, 86, 252-254 (1975)
- [3] Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Deguchi T, Sugiyama K, Azuma E, Sakurai M : Cell Immunol, 183, 149-156 (1998)
- [4] Dannecker G, Mahlknecht U, Schultz H, Hoffmann MK, Niethammer D : Immunobiology, 190, 116-126 (1994)
- [5] Davis WC, Marusic S, Lewin HA, Splitter GA, Perryman LE, McGuire TC, Gorham JR : Vet Immunol Immunopathol, 15, 337-376 (1987)
- [6] Douglas SD : Morphology of lymphocytes and plasma Cells : WJ Williams E, et al eds, Haematology, NewYork, 883-902 (1983)
- [7] Feeney C, Bryzman S, Kong L, Brazil H, Deutsch R, Fritz LC : Crit Care Med, 23, 1680-1685 (1995)
- [8] 福永成巳, 原 英文, 大場光洋, 村田友明, 初谷 敦, 大塚浩通, 小岩政昭 : 家畜診療, 48, 216-219 (2001)
- [9] 早坂次雄, 安藤順康, 山本克俊 : 家畜診療, 267, 26-27 (1985)
- [10] Inokuma H, Yoshida T, Onishi T : J Vet Med Sci, 57, 971-972 (1995)
- [11] 石川正光, 高橋清治, 高橋一郎, 勝又秀悦 : 家畜診療, 387, 19-22 (1995)
- [12] 岩松 茂, 向原要一, 高木一義, 清松邦章 : 日獣会誌, 44, 1000-1004 (1991)
- [13] Lee BW, Yap HK, Chew FT, Quah TC, Prabhakaran K, Chan GS, Wong SC, Seah CC : Cytometry, 15, 8-15 (1996)
- [14] Lewis DB, Yu CC, Meyer J, English BK, Kahn SJ, Wilson CB : J Clin Invest, 87, 194-202 (1991)
- [15] Mao XZ, Li SZ, Zhu ZK, Qin WL : Zentralbl Veterinarmed A, 41, 405-412 (1994)
- [16] Menge C, Neufeld B, Hirt W, Bauerfeind R, Baljer G, Wieler LH : Zentralbl Veterinarmed B, 46, 559-565 (1999)
- [17] Morita CT, Parker CM, Brenner MB, Band H : J Immunol, 153, 3979-3988 (1994)
- [18] Murata H, Takahashi H, Matsumoto H : Br Vet J, 143, 166-174 (1987)

- [19] 大林博和, 田原口貞生, 山田信実, 飛渡啓二: 家畜診療, 351, 5-8 (1992)
- [20] Rabinowitz R, Granot E, Deckelbaum R, Schlesinger M: Int Arch Allergy Immunol, 97, 200-204 (1992)
- [21] Tollerud DJ, Ildstad ST, Brown LM, Clark JW, Blattner WA, Mann DL, Neuland CY, Pankiw-Trost L, Hoover RN: Clin Immunol Immunopathol, 56, 88-96 (1990)
- [22] Trivedi HN, HayGlass KT, Gangur V, Allardice JG, Embree JE, Plummer FA: Hum Immunol, 57, 69-79 (1997)
- [23] Walker C, Bao S, Canfield PJ: Vet Immunol Immunopathol, 48, 11-25 (1995)
- [24] Weiss A: T lymphocyte activation, WE Paul ed, Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 467-504 (1993)
- [25] Weiss L, Okada N, Haeffner-Cavaillon N, Hattori T, Faucher C, Kazatchkine MD, Okada H: AIDS, 6, 379-385 (1992)
- [26] Wyatt CR, Madruga C, Cluff C, Parish S, Hamilton MJ, Goff W, Davis WC: Vet Immunol Immunopathol, 40, 187-199 (1994)
- [27] Wyatt CR, Brackett EJ, Perryman LE, Davis WC: Vet Immunol Immunopathol, 52, 91-103 (1996)

Comparison of Peripheral Leukocytes in Japanese Black and Holstein Calves

Hiromichi OHTSUKA^{*†}, Shoh-ichi KOMATSU, Satoru KON-NAI, Shigeo FUKUDA, Yoshio KIKU, Tomo-o YOSHINO, Masateru KOIWA and Sei-ichi KAWAMURA

** Department of Veterinary Internal Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University, 23-35-1 Higashi, Towada 034-8628, Japan*

SUMMARY

To evaluate cellular immunity in Japanese Black (JB) calves, changes in peripheral leucocytes were compared in two groups of calves—JB calves (JB group; n = 10) and Holstein calves (Hol group; n = 10). In both groups flow cytometric analysis (FCM) was used within 3 days (0 week) and 3, 6, 9, and 12 weeks after birth. Forward (FSC) and side-scatter (SSC) dot-plots were examined and used to construct monocyte-lymphocytes gates of 3 sizes (small, medium, and large). In both groups, numbers of medium (M)-ML were low in 0 week but increased after birth. In the JB group, however, numbers of M-ML decreased at from 6 to 9 weeks and were significantly lower than those in the Hol group from 6 weeks after birth. Numbers of small (S)-ML in the JB group peaked at 3 weeks and were significantly higher than in the Hol group at 0, 3, 9, and 12 weeks. FCM analysis showed that numbers of CD3⁺ cells in the JB group were significantly higher than those in the Hol group at 3 weeks after birth. These results indicate that cellular immunity in JB calves differs from that in Hol calves because of changes depending on the role of the T cell.

—Key words: calves, flow cytometry, Holstein, Japanese Black, peripheral leukocyte.

† Correspondence to: Hiromichi OHTSUKA (Department of Veterinary Internal Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Sciences, Kitasato University)
23-35-1 Higashi, Towada 034-8628, Japan TEL 0176-23-4371 FAX 0176-23-8703

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 55, 789 ~ 795 (2002)

日本産業動物獣医学会誌編集委員会委員

【編集委員】

◎澤田 勉 (大阪府立大学大学院農学生命科学研究科)
○小川 博之 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
金田 義宏 (元・東京農工大学農学部)
佐藤 繁 (宮城県農業共済組合連合会家畜診療所)
八木 行雄 (動物衛生研究所北海道支所)
明石 博臣 (東京大学大学院農学生命科学研究科)
今井 壯一 (日本獣医畜産大学獣医畜産学部)

梅村 孝司 (北海道大学大学院獣医学研究科)
月瀬 東 (日本大学生物資源科学部)
中澤 宗生 (動物衛生研究所安全性研究部)
(◎委員長, ○副委員長)

編集人 日本産業動物獣医学会
会長 酒井 健夫

『* 投稿を希望される方は、学会誌投稿規程 (本誌822頁に掲載) をご参照ください』