

令和元年6月18日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08052

研究課題名(和文) 家畜胸腺機能の定量方法の確立と臨床応用への基盤研究

研究課題名(英文) Studies on the evaluation of thymic function in domestic animals and translational research to veterinary clinic

研究代表者

保田 昌宏 (Yasuda, Masahiro)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：10336290

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、家畜の胸腺機能の評価方法を開発し、臨床応用のための基盤研究を行う事である。以下の項目について、重点的に研究と解析を行った。1) 抹消血中のsjTREC量を定量することによって、胸腺機能の評価方法を確立した。2) 季節性、月齢差、性差および系統間における値の推移を比較検証した。3) 既知の方法(リンパ球幼若化試験、末梢血単核球のサブセット解析など)と本法の関連性を検討した。4) 虚弱あるいは免疫が低下した動物に栄養補助製剤(アミノ酸製剤、ビタミン、亜鉛、生薬など)の投与や飼養改善を実施することで胸腺機能が強化でき、疾病予防の評価方法として本法が使用できるかを検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内外でも、ワクチネーションプログラム、家畜の栄養管理や飼育環境管理などこれまでに確立されてきた種々の方法によって、家畜の疾病罹患率はある程度はコントロールされている。しかしながら依然として、相当数の家畜が下痢や肺炎等に罹患し、一過性の治療効果は見られるものの損耗性疾患によって死廃となっている。そこで本研究では、家畜の胸腺機能の新規評価法を確立し、臨床症例を用いて解析と評価を実施する。本研究の結果、家畜の免疫能の評価方法が確立し、臨床応用を行い、策定した安全・安価な免疫増強プログラムによって、疾病の慢性化した死廃家畜の減少に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：Measurements of sjTREC values have been used to evaluate thymic function. I established a quantitative PCR (QPCR) assay of bovine sjTREC. In the study, I used this QPCR assay to measure the sjTREC value in bovine peripheral blood mononuclear cells and evaluated the relationships between sjTREC values and peripheral blood T-cell number, growth stage, gender, and meteorological season. The sjTREC value was highest at the neonatal stage, and its value subsequently decreased with age. The sjTREC value in calves up to 50-days old was significantly higher for males than for females, suggesting that thymic function might differ by gender. In addition, the sjTREC value and the peripheral T-cell number were significantly higher in calves in the summer season than in calves in the winter season. These data suggest that bovine thymic function is highly variable and varies according to the growth stage, gender, and environmental factors such as air temperature or the UV index.

研究分野：獣医学

キーワード：胸腺機能 sjTREC 疾病予防 易感染 慢性疾患

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

家畜の疾病予防戦略のために、ワクチネーションプログラムや栄養管理など多方面から研究され、飼育管理方法はある程度確立されている(農林水産省 家畜生産段階における飼養衛生管理の向上について等)。特に栄養管理に関しては、多様なプログラムが作成され臨床応用されている。さらに近年、大規模・集約型の牛の飼育管理を行う農場が増加しており、飼育規模の拡大によって、様々な疾病の発生が危惧されている。そのうえ持続的な家畜の導入によって、病原体の感染環を絶つことが困難となり、疾病の蔓延化や、罹患頻度が高くなる事も懸念されている。また家畜を取り巻く様々な環境因子が、ストレス要因となり免疫が低下する。例えば輸送、季節の変わり目、離乳や去勢などといった飼育環境の変化などによって、呼吸器病や消化器病が好発することが知られている。さらにワクチネーションプログラムを実施し同じ飼育環境であっても、個々の免疫抵抗性の差によって、易感染性となり発症した家畜から、疾病が潜在的に農場中へ蔓延する恐れもある。つまり適切な個体管理が、農場全体の疾病予防戦略として重要である。これまで研究代表者らは、県内外の農業共済獣医師と連携し、年間約 100 頭の死廃牛の病性鑑定や免疫能の検査を実施してきた。その結果、子牛では下痢や肺炎が多く認められ、胸腺が萎縮した個体が非常に多く、中には胸腺がほとんど観察されない個体もあった。つまり免疫系が虚弱的な個体は易感染性となり、治療には一時的に反応するが、結局は慢性化し死廃牛となるのである。従って、個々の家畜の免疫能を客観的に数値として把握し、虚弱家畜の早期発見に努め飼育管理を改善することが、疾病予防への道程となる。これまでに免疫機能を検査する方法には、胸腺スコア測定、末梢血単核球サブセット解析、リンパ球幼若化試験、血清中の特異抗体価測定、サイトカイン濃度の測定などが実施されてきている。胸腺で産生される T 細胞は T 細胞と T 細胞の 2 種類が知られており、特に T 細胞は細胞性免疫に重要な細胞分画であり、疾病と密接に関連している。DNA 上では鎖と鎖が遺伝子クラスターを作っており、鎖が組換えられるとき領域が取り除かれる。この取り除かれる領域は環状 DNA を作り、T 細胞内に存在し細胞分裂に伴って増えないため、末梢血で環状 DNA を定量することによって、胸腺から末梢へ移行する T 細胞の量を把握でき、これが胸腺機能 (T 細胞の産生能)の指標となる。我々はウシで、この取り除かれる領域ジャンクション部分(sjTREC)のクローニングに成功した。さらにウシで、末梢血を用いて胸腺機能を定量化ができることも確認した。

2. 研究の目的

家畜の免疫系は、個々の栄養状態、発育状態、飼育環境などのストレス要因で個体差が生じやすく、肺炎や下痢などが発症し、慢性化する前に免疫状態の低下を発見することは容易でない。その結果、かなりの頭数が**慢性的な損耗性疾患で死廃**となっている。本研究では、1) 末梢血を用いて家畜の胸腺機能を直接定量化して、細胞性免疫能の新しい評価方法を確立する。2) 本研究で確立した胸腺機能評価方法をリンパ球幼若化試験や末梢血単核球サブセット解析など既存の方法と相関性を検証する。3) 牧場や農業共済獣医師などの協力によって、多数のサンプルを解析し、胸腺機能の低下した易感染家畜の評価および摘発の可能性を検証する。4) これまで実施されてきた治療方法や飼育管理方法に関して、本法を用いて胸腺機能の増強効果に及ぼす影響を検討し、疾病予防効果を評価する。

3. 研究の方法

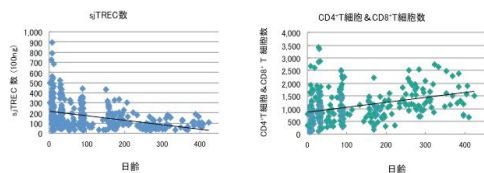
本研究は以下に列記した方法によって、家畜の胸腺機能の評価方法を開発し、臨床応用のための基盤研究を行うことにある。1) 末梢血中の sjTREC 量を定量することによって、胸腺機

能の評価方法を確立する。2) 季節性、月齢差、性差および系統間における値の推移を比較検証する。3) 既知の方法(リンパ球幼若化試験、末梢血単核球のサブセット解析など)と本法の相関性を検討する。4) 病性鑑定依頼を受けた家畜の胸腺の大きさ、胸腺内 sjTREC の値と末梢血で検出された sjTREC の値との相関を検討する。5) 農業共済獣医師などと連携して血液を入手し、胸腺機能を評価する。本法が易感染性家畜の早期発見に使えるかどうかの評価を行う。6) 虚弱あるいは免疫が低下した動物に栄養補助製剤(アミノ酸製剤、ビタミン、亜鉛、生薬など)の投与や飼養改善を実施することで胸腺機能が強化でき、疾病予防の評価方法として本法が使用できるかを検討する。

4. 研究成果

本研究では子ウシをモデル動物として sjTREC 数と胸腺機能野評価に関わる基礎的な研究を行った。まず、子ウシの日齢と末梢血 sjTREC 数と T 細胞数の関係について結果 1 に示した。sjTREC 数は加齢に伴って減少することが明らかになった。いっぽうで、末梢血 T 細胞数(CD4 陽性細胞数と CD8 陽性細胞数の和)は増加することが明らかになった。これは末梢リンパ組織などで分裂増殖を示唆するものである。次に、sjTREC 数と性差の関係を結果 2 に示した。雄と雌の抹消血中の sjTREC 数を比較すると優位に雄が高かった。この結果から、雄の方が雌よりも胸腺から末梢に播種する T 細胞数が多いことが明らかになった。これは、胎生期の雄の体格の差と関係があると思われた。つまり、雌よりも雄の方が体格の発育が良いので胸腺も発達が良いと考えられた。

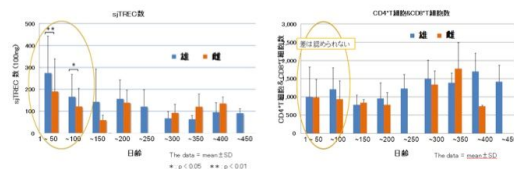
1. 結果 (日齢とsjTREC数とT細胞数の関係)



sjTREC数は加齢に伴い減少し、
CD4⁺T細胞数 及び CD8⁺T細胞数は増加した。

加齢に伴う胸腺機能の低下 及び 末梢における
T細胞の分裂・増殖が示唆された。

2. 結果 (sjTREC数とT細胞数の性差)

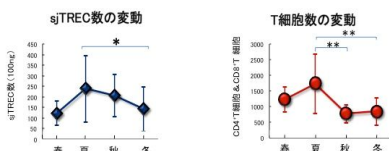


オスのsjTREC数 > メスのsjTREC数
オスのT細胞数とメスのT細胞数に差はない

生後100日間においては、
胸腺機能は、オスの方がメスよりも活発である。

次に、胸腺の機能の季節性的変化について検討した。抹消血中の sjTREC 数および T 細胞数とともに、夏季に高く冬季に有意に低いことが明らかになった。この結果から、子ウシでは冬季の肺炎や下痢などの疾患が起こりやすいことに関係すると思われた。

3. 結果 (sjTREC数とT細胞数の季節間の変動)

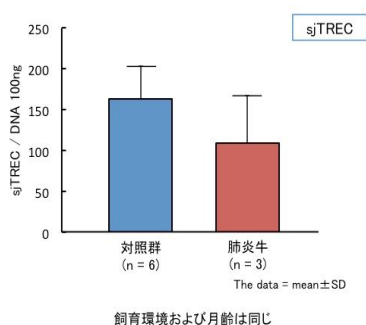


sjTREC数は夏に多く、冬に少ない
T細胞数は夏に多く、秋・冬に少ない

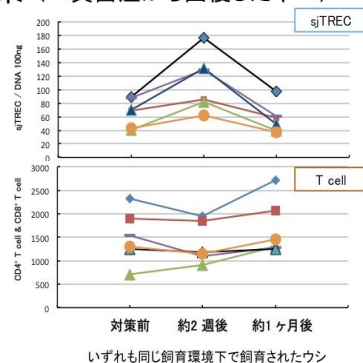
胸腺機能及び末梢でのT細胞の分裂・増殖は、
夏に活発になり、冬には抑制される。

次に、疾病と胸腺機能を解析した。同じ農家の飼育環境下で、肺炎に罹患している子ウシと臨床上症状を呈していない子ウシの末梢血 sjTREC 数を比較すると（結果 4）、肺炎の子ウシでは低いことが明らかになった。この結果から、やはり胸腺機能が低い個体は易感染性傾向があり肺炎や下痢などを発症しやすくなり、疾病と胸腺機能は関連があると考えられた。さらに、真菌症に罹患している子ウシの治療前、治療中、治療後の末梢血 sjTREC 数と末梢血 T 細胞数の推移を比較すると（結果 5）、治療中症状の改善に伴い、治療開始 2 週間後には sjTREC 数の増加が見られ、治療開始後 1 カ月で sjTREC 数は治療前の値とほぼ同数に戻った。いっぽう T 細胞数は治療開始後 2 週間では変化がないものの、治療開始後 1 ヶ月で一番高い値を示した。このように胸腺内で産生される T 細胞数は一定ではなく、体調の変化などでかなり動的なものであることが明らかになった。

4. 結果（一肺炎牛と対照群の比較）

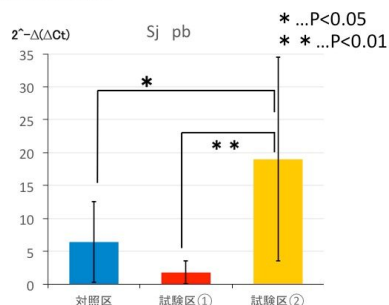


5. 結果（一真菌症から回復した牛）



次に、子ウシの定量プライマーを参考にして、子豚に使用出来るプライマーを作製した。そのプライマーを用いて、子豚の飼料添加剤として用いられているパントエアや乳酸菌を飼料添加した子豚の末梢血中 sjTREC 数を比較した（結果 6）。その結果、飼料添加によって胸腺機能増強が期待できる飼料添加剤が認められた。

6. 結果（パントエア及び乳酸菌製剤投与子豚の sjTREC 量の比較）



以上の結果より、家畜胸腺の機能評価に末梢血 sjTREC 定量が有用であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件) 代表者に下線

- 1) Ahmad Farid Nikmal AZIZI, Ryoko MIYAZAKI, Takeru YUMITO, Yuki OHASHI, Susumu UNO, Umi MIYAJIMA, Mayu KUMAMOTO, Shinji UCHIYAMA and Masahiro YASUDA. Effect of maternal supplementation with seaweed powder on immune status of liver and lymphoid organs of piglets. J.Vet.Med.Sci.80: 8-12, 2018, 10.1292/jvms.17-0537. 査読有り

- 2) Masahiro Yasuda, Jyunya Kawabata, Sayaka Akieda-Asai, Tetsuo Nasu, Yukari Date. Guanylyl cyclase C and guanylin reduce fat droplet accumulation in cattle mesenteric adipose tissue, J. Vet. Sci. 18: 341-348, 2017, 10.4142/jvs.2017.18.3.341. 査読有り

〔学会発表〕(計14件)

- 1) 伊佐敷祐実、保田昌宏、木田哲夫、柳田天靖、大橋勇希、上村涼子. 慢性疾患による廃用子牛の胸腺機能と末梢血 CD4 陽性細胞のサイトカイン発現の特徴. 第 67 回九州地区獣医師大会、2018 年 .
- 2) 阿部信介、山元のり子、日高亮介、保田昌宏 . 牛白血病の末梢血鏡検における異型・異常リンパ球区別の検討 . 第 67 回九州地区獣医師大会、2018 年 .
- 3) 浦川真李夢、保田昌宏、出口祐一郎、上松瑞穂、中間由規、今別府和成、野村祐資 . 初乳接種が子牛の免疫能にもたらす効果の検証 . 第 67 回九州地区獣医師大会、2018 年 .
- 4) 保田昌宏 . 子牛の慢性呼吸器病と免疫 . 第 40 回宮崎・鹿児島しゃくなげ会 合同技術研修会 (招待講演)、2018 年 .
- 5) 浦川真李夢、保田昌宏、弓戸猛、大橋勇希、Mahmoud Baakhtari、脇谷晶一、志賀明、野津手麻貴子、坂上健人 . パントエアおよび乳酸菌の経口投与による子豚への免疫部賦活作用 . 第 161 回日本獣医学会学術集会、2018 年 .
- 6) Mahmoud Baakhtari, 保田昌宏、浦川真李夢、弓戸猛、竹部直矢、都築直、岩本洋平、脇谷晶一、頃末憲治 . Effect of Branched chain amino acid on immune status of young racing horses during training . 第 161 回日本獣医学会学術集会、2018 年 .
- 7) 児嶋秀典、友川浩一郎、伊賀崎大、国澤明日香、谷千賀子、弓戸猛、片本宏、保田昌宏 . 黒毛和種繁殖牛における腹腔内死亡壊死症の一例 . 第 66 回九州地区獣医師大会、2017 年 .
- 8) 弓戸猛、保田昌宏、Ahmad Farid Nikmal Azizi、大橋勇希、中原圭子、宮崎涼子、内山伸二 . 母豚への海藻粉末給与による子豚の免疫増強効果の検証 . 第 66 回九州地区獣医師大会、2017 年 .
- 9) 弓戸猛、保田昌宏、志賀明、Ahmad Farid Nikmal Azizi、大橋勇希、岡田徹 . アルギニン添加飼料と供与した子ブタの末梢血および末梢器官における免疫増強作用 . 第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年 .
- 10) Nikmal Azizi, Masahiro Yasuda et.al. RYoko Miyazaki, Takeru Yumito, Yuuki Ohashi, Baakhtari Mahmoud, Shoichi Wakitani, Shinji Uchiyama. Seasonal differences of maternal supplemented seaweed extract effects on immune status of piglets . 第 160 回日本獣医学会学術集会、2017 年 .
- 11) 保田昌宏 . 子ウシの慢性呼吸器病と免疫 . みやざきしゃくなげ会 (招待講演)、2017 年 .
- 12) 弓戸猛、由地裕之、田崎大二郎、上原理、保田昌宏 . 活性卵白製剤の飼料添加による黒毛和種牛の末梢血免疫担当細胞に及ぼす影響 . 第 6 回家畜感染症学会、2016 年 .
- 13) 宮崎涼子、内山伸二、保田昌宏、Ahmad Farid Nikmal Azizi、弓戸猛 . 母豚への海藻給与が繁殖成績や子豚免疫能に与える影響 . 第105回日本養豚学会、2016年 .
- 14) Farid Azizi、宮崎涼子、弓戸猛、宇野進、宮嶋海、隈元麻由、大橋勇希、内山伸二、保田昌宏 . Immunostimulatory effects in maternal supplemented seaweed extract to the liver and lymphoid organs in piglets. 第159回日本獣医学会、2016年 .

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

https://srhumdb.miyazaki-u.ac.jp/html/596_ja.html

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。