

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580448

研究課題名(和文) ケトン体がウシの受胎期における末梢血 T細胞の機能に及ぼす影響の解明

研究課題名(英文) Effect of ketone body to peripheral gd T cell function in dairy cows during the breeding periods

研究代表者

大塚 浩通 (Hiromichi, Ohtsuka)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号：40327458

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：泌乳初期の乳牛は体調不良に至るリスクが高い。この時期に摂取量減少と泌乳量上昇がある乳牛ではケトン体が増加する。高ケトン体の牛では免疫機能や繁殖成績が劣るため、ケトン体が乳牛のT細胞に及ぼす影響を調査した。高ケトン体の牛では末梢単核球のmRNA発現量において炎症誘導性サイトカインであるIL-17が高く、妊娠期において上昇するIL-4が低かった。さらに、T細胞の中でIL-17を多く産生するのは T細胞であり、IL-4はCD4+T細胞であることが示されたことから、ケトン体は T細胞を活性化し、CD4+T細胞を抑制することにより受胎に不適切な免疫状態を誘導する可能性があった。

研究成果の概要(英文)：Dairy cows are at an increased risk for disorders during early lactation. At this time, there is increasing milk production, but a lag in feed intake, and this condition results in the production of the ketone body in the cows with negative energy balance. Although hyperketonemia should be minimized to prevent undesirable effects on immune function and reproduction, effect of ketone body to T cell function was investigated in this study. Increased IL-17 as a family functions as a proinflammatory cytokine that responds to the invasion of the immune system and decreased IL-4 as an anti-inflammatory cytokine that responds to the gestation were observed in the cows with hyperketonemia. In the comparison of T cell, gd T cell express strongly IL-17 mRNA and CD4+ T cell express strongly IL-4 mRNA in cows, therefore it was possible that ketone bodies induce an inappropriate immune condition for conception by activative effect to gd T cells and suppressive effect to CD4+ T cells.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：動物生命学・獣医学

キーワード：乳牛 ケトン体 繁殖適期 T細胞

1. 研究開始当初の背景

改良により泌乳能力が飛躍的に向上した乳牛は、分娩後、泌乳開始によって莫大なエネルギーを消費するため、脂肪代謝の異常を来してケトン体が生じやすく、高ケトン血症による病的な状態に至る。

高泌乳牛の生産性を最大限に引き出すために、分娩間隔の延長防止が求められている。高ケトン血症を呈する乳牛では分娩後の卵巣や子宮の回復が遅延するため、繁殖成績が悪化する。これらに対し獣医診療では、卵巣機能の回復を中心とした性ホルモン剤の投与が主流であるが、十分な繁殖成績の改善成果は得られていない。

ヒトやマウスでは妊娠の成立に際し性ホルモンの支配により免疫機能がダイナミックに変化し、受胎から出産までを維持していることが知られている。妊娠の成立には主に T 細胞から分泌される progesterone-induced blocking factor (PIBF) の作用により液性免疫応答が優位のサイトカインネットワークとなり、母体にとって異物となる胎児への母体側の免疫応答を抑制する機構が明らかとされている。

2. 研究の目的

ケトン体がウシの妊娠免疫をどのように変化させるかを解明するため、先ず未だウシでは確立されていない T 細胞レパートリー評価のための解析系を確立し、ケトン体の影響を防御する新たな予防方法や妊娠免疫を正常に機能させる新たな免疫療法の開発のための基礎となる研究を行う。

3. 研究の方法

(1) T 細胞の鎖および鎖レパートリーの解析系の確立

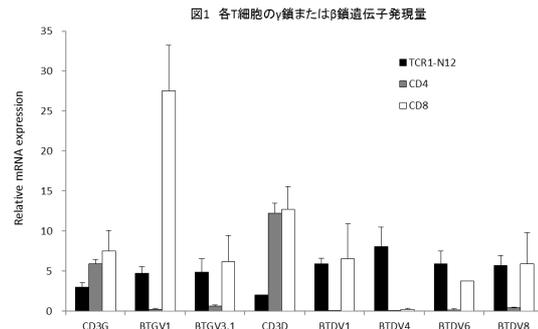
(2) ケトン体がウシの T 細胞への P<sub>4</sub> 刺激-PIBF 産生-サイトカイン産生系に対する効果の解析

(3) 高ケトン血症を呈した乳牛におけるおよび鎖レパートリー解析系と P<sub>4</sub> 刺激-PIBF 産生-サイトカイン産生系の解明

4. 研究成果

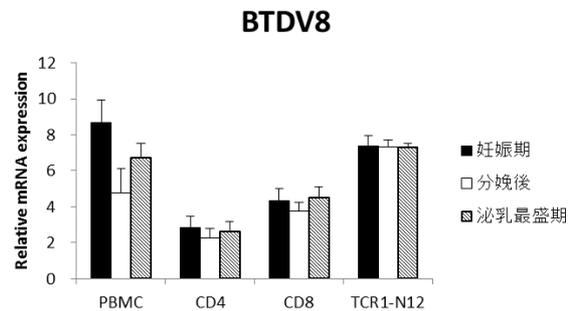
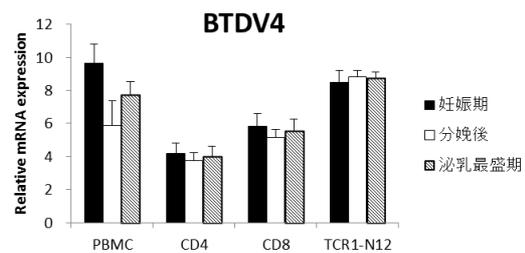
(1) ウシの末梢血 T 細胞の鎖および鎖レパートリー遺伝子の PCR による解析系の確立と健康な乳牛のレパートリーのタイピングから着手し、鎖 1、3 および鎖 1、4、6、8 の解析系を確立した。これを用い、T 細胞である TcR1-N12<sup>+</sup> 細胞、CD4<sup>+</sup> および CD8<sup>+</sup> を単離し、タイピングした各プライマーによってレパートリー遺伝子の保有状況を確認した。その結果、TcR1-N12<sup>+</sup> 細胞は全てのレパートリー遺伝子を強く保有していることが確認された。比較対照として T 細胞である CD4<sup>+</sup> および CD8<sup>+</sup> T 細胞も単離して解析し、CD4<sup>+</sup> 細胞では鎖およ

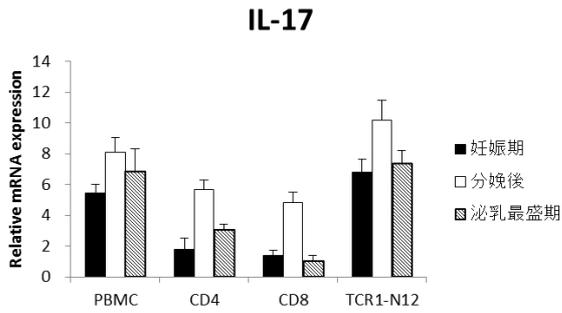
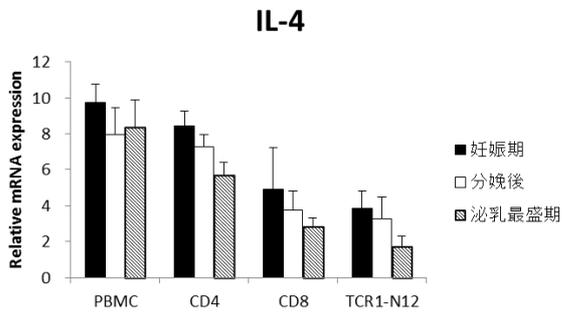
び鎖 mRNA は保有していないものの、CD8<sup>+</sup> T 細胞では 1、1 および 6 mRNA 発現が TcR1-N12<sup>+</sup> 細胞と同等程度に、また 3 および 8 は弱く発現しており、4 のみ遺伝子発現がないことが確認された。解析したレパートリー mRNA 発現の一部を図 1 に示す。



(2) 次に、T 細胞である TcR1-N12<sup>+</sup> T 細胞において発現量の多かったレパートリーである BTDV4 (4) と BTDV8 (8) について各泌乳期における mRNA 発現の比較と T 細胞系サイトカイン mRNA 遺伝子発現を解析した。その結果、T 細胞の BTDV4 と BTDV8 は泌乳期に影響を受けず安定して発現することが示された。さらに妊娠免疫において優位になる Th2 系サイトカインである IL-4 mRNA 発現量は、他の T 細胞に比べて TcR1-N12<sup>+</sup> T 細胞において低く、一方、炎症に関わる Th17 系サイトカインである IL-17 mRNA 発現は TcR1-N12<sup>+</sup> T 細胞において高く見られた。各非乳期間での比較においては、3 種類の T 細胞で IL-4 mRNA 発現量は泌乳最盛期において低下する傾向にあり、IL-17 は全ての T 細胞において分娩後に上昇する傾向にあった (図 2)。

図2 各泌乳期における鎖レパートリーとサイトカイン mRNA 発現量

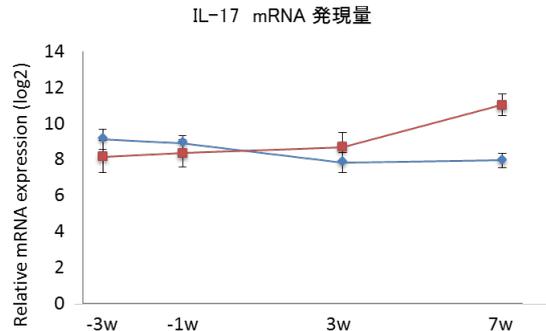
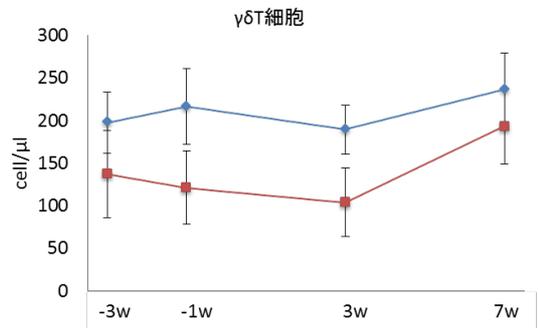




(3) 乳牛の末梢単核球に対する PIBF ならびに  $P_4$  刺激によるサイトカイン mRNA 発現量においては、IFN- mRNA 発現が促進された。しかし単核球の  $P_4$  刺激によって Th2 系サイトカインである IL-4 ならびに IL-10 mRNA 発現が促進されたにも関わらず PIBF 刺激ではこれらのサイトカインは促進されなかった。また妊娠牛における CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup> ならびに T 細胞の各々の T 細胞の PIBF mRNA 発現量は T 細胞において最も発現が高く、T 細胞が PIBF を産生して Th1 系細胞の機能を抑制して、受胎に適した免疫状態に誘導する可能性があった。

(4) 高ケトン血症牛の妊娠免疫の解析を目的に、同一牧場にて飼育された分娩 3 週後において血中 BHB 濃度が 1200  $\mu\text{mol/l}$  以上で臨床症状を示さなかった牛である subclinical ketosis (SK) 群 (N=7) と 1200  $\mu\text{mol/l}$  未満である対照群 (N=27) を供試した。血液の採材は、分娩前後の計 4 回実施した。SK 群の T 細胞は観察期間中、対照群に比べて低値で推移し、1W 前と 3W 後において有意差を認めた。SK 群では繁殖適期となる 7W 後において IL-17 遺伝子発現量が上昇した。7W 後の SK 群の IL-4、IL-17 ならびに TNF- 遺伝子発現量が対照群に比べ高かった。しかし、T 細胞数と各サイトカイン遺伝子発現量とは統計的に有意な相関性は得られなかった (図 4)。

図4 分娩前後における各項目の推移



ケトosis群 (□) ならびに対照群 (◇)  
-3週 (W) および -1W は分娩前、3W および 7W は分娩後を示す

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

Ohtsuka, H., Fujiwara, H., Nishio, A., Sakai, Y., Matsuda, K., Muramatsu, Y., Hara, H., Nakagawa-Yagi, Y., Hara, T. Effect of oral supplementation of bamboo grass leaves extracts supplement on cellular immune function in dairy cows. Acta Veterinaria Brno. 2014, in press.

Ohtsuka, H., Kanikawa, N., Kudo, K., Kyutoku, F., Kakinuma, S., Kohno, M., Maeda, Y. and Tanabe, T. Effect of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* on the in vitro response of peripheral blood mononuclear cells isolated from Holstein dairy cows had ketosis or milk fever of field cases. Int. J. Anim. Vet. Adv. 2014, in press.

Ohtsuka, H., Fukuda, S., Kudo, K., Tomioka, M., Koiwa, K. and Kimura, K. Changes in Leukocyte Populations of the Cows with Milk Fever or Displaced Abomasum after Calving. Can. J. Vet. Res. 77, 2013, 226-230.

Maeda, M., Yamamoto, K., Ohtsuka, H., Ando, T., Tomioka, M., Oikawa, M. Gene expression in T lymphocytes of

gravid cows during preimplantation. Acta Veterinaria Brno. 82, 2013, 131-134.

Maeda, Y., Ohtsuka, H., Tomioka, M. and Oikawa, M. Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and Regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows. Vet. Res. Commun. 74, 2012, 629-632.

Maeda, Y., Ohtsuka, H., Tomioka, M., Tanabe, T., Nanbo, Y., Uematsu, H. and Oikawa, M. Effect of Progesterone on the In Vitro Response of Peripheral Blood Mononuclear Cells Stimulated by *Escherichia coli* in Mares. J. Vet. Med. Sci. 74, 2012, 629-632.

〔学会発表〕(計 9 件)

前田洋佑, 大塚浩通 - ヒドロキシ酪酸が乳牛の末梢血免疫機能に及ぼす影響. 家畜感染症学会, 2013年12月6日 札幌市(北海道)

高貫秀幸, 大塚浩通, 前田洋佑, 小比類巻正幸, 山部周平. 飼養管理の異なる牛群における発情期の乳牛の血中ビタミン A 濃度と末梢血単核球の比較. 日本獣医学会学術集会. 平成 25 年 9 月 21 日 岐阜市(岐阜県)

前田洋佑, 大塚浩通, 及川正明 プロゲステロンが乳牛末梢血リンパ球の T 細胞関連遺伝子に及ぼす効果 第 154 回 日本獣医学会学術集会 平成 24 年 9 月 15 日 盛岡市(岩手県)

熊谷江里子, 前田洋佑, 大塚浩通, 大澤健司, 田邊太志, 及川正明 乳牛における分娩後の高遊離脂肪酸血症と *Escherichia coli* および *Arcanobacterium pyogenes* に対する末梢血単核球の反応性 第 154 回 日本獣医学会学術集会 平成 24 年 9 月 15 日 盛岡市(岩手県)

前田洋佑, 大塚浩通, 及川正明 飼養管理の異なる牛群間における泌乳最盛期乳牛の末梢血免疫細胞と大腸菌刺激に対する繁殖関連遺伝子発現の比較 平成 23 年度日本獣医師会年次大会 平成 24 年 2 月 4 日 札幌市(北海道)

前田洋佑, 大塚浩通, 石川真悟, 大澤健司, 及川正明 レチノイン酸が乳牛リンパ球のプロゲステロン反応性に及ぼす効果 第 62 回北海道獣医師大会 平成 23 年 9 月 8 日 札幌市(北海道)

津曲圭太, 大塚浩通, 前田洋佑, 大澤健司, 及川正明 乳牛の末梢白血球への P4 および PIBF 刺激によるサイトカイン産生能と産次数の関係 第 62 回北海道獣医師大会 平成 23 年 9

月 8 日 札幌市(北海道)

藤原秀美, 大塚浩通, 工藤克典, 藪崎尚弘, 及川正明 飼養管理の異なる牛群の大腸菌刺激による末梢血リンパ球のサイトカイン刺激反応性の比較 第 62 回北海道獣医師大会 平成 23 年 9 月 8 日 札幌市(北海道)

石川真悟, 大塚浩通, 前田洋佑, 及川正明 P4 による乳牛の末梢血リンパ球機能の活性-抑制効果に及ぼすアミノ酸の影響 第 62 回北海道獣医師大会 平成 23 年 9 月 8 日 札幌市(北海道)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 浩通 (OHTSUKA, Hiromichi)

北里大学・獣医学部・講師

研究者番号: 4 0 3 2 7 4 5 8

(2) 連携研究者

大澤 健司 (OSAWA, Takeshi)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号: 9 0 3 0 2 0 5 9