

牛新生子血清サイトカイン濃度と生後4ヶ月間の 疾病発生状況との関連

平 子 毅・久 枝 啓 一・泉 賢 一・黒 澤 隆
萩 原 克 郎・桐 沢 力 雄・岩 井 滋

Serum cytokine levels evaluated in neonatal calves in relation
to disease incidence up to 4 months after colostrum ingestion

Tsuyoshi HIRAKO, Keiichi HISAEDA, Kenichi IZUMI, Takashi KUROSAWA,
Katsuro HAGIWARA, Rikio KIRISAWA and Hiroshi IWAI

酪農学園大学紀要 別刷 第29巻 第2号

Reprinted from

”Journal of Rakuno Gakuen University” Vol.29, No.2 (2005)

牛新生子血清サイトカイン濃度と生後4ヶ月間の 疾病発生状況との関連

平 子 毅¹⁾・久 枝 啓 一²⁾・泉 賢 一³⁾・黒 澤 隆⁴⁾
萩 原 克 郎¹⁾・桐 沢 力 雄¹⁾・岩 井 宏¹⁾

Serum cytokine levels evaluated in neonatal calves in relation
to disease incidence up to 4 months after colostrum ingestion

Tsuyoshi HIRAKO¹⁾, Keiichi HISAEDA²⁾, Kenichi IZUMI³⁾, Takashi KUROSAWA⁴⁾,
Katsuro HAGIWARA¹⁾, Rikio KIRISAWA¹⁾ and Hiroshi IWAI¹⁾
(November 2004)

緒 言

牛に限らず新生子は一般に様々な感染症に対する感受性が高い。その理由は免疫機能の未熟さである。初乳は様々な栄養因子とともに免疫グロブリンを豊富に含んでおり、新生子はこれを摂取することにより感染症に対する抵抗性を獲得する。しかし、この抵抗性は初乳由来の免疫グロブリンが体内に存在している間だけで一過性であり、免疫グロブリンの抗原特異性により対象となる病原体は限定される。初乳にはサイトカインと総称される様々な免疫調節因子が含まれており^[1]、この多くは新生子の免疫機能の活性化に貢献している^[2,10]。すなわち、免疫グロブリンの限定的な抵抗性付与とは対照的に、サイトカインは様々な感染症に対する包括的、普遍的、持続的な免疫機能の活性化を通して新生子に抵抗性を付与するといえる。

牛新生子のサイトカインプロファイルを調べたこれまでの成績から、インターロイキン(IL)-1 β 、IL-1受容体拮抗因子(ra)、IL-6、インターフェロン(IFN)- γ 、腫瘍壊死因子(TNF)- α の血中サイトカイン濃度は初乳摂取後12~24時間でピークに達し、およそ4週後にはほとんど検出できなくなり、この間にリンパ球機能は成牛レベルに近づくことが判明

している^[9]。また、牛新生子にサイトカインを投与した実験や、初乳摂取前新生子末梢血から分離したリンパ球を初乳乳清やサイトカインで刺激する実験から、初乳に含まれるサイトカインが新生子の自然免疫、適応免疫の両機能を活性化することが示されている^[2,10]。

しかし、個々の新生子の摂取した初乳量やその中のサイトカイン濃度にばらつきがあり、それが新生子の血中サイトカイン濃度に反映されており、新生子の免疫機能の活性化の程度にもばらつきがあることが推測される。すなわち、新生子の初乳摂取後の血中サイトカインレベルはその後の感染症に対する抵抗性に影響を与えている可能性がある。

一方、動物は、経口的に摂取した様々な抗原に対しては免疫応答を起こさない仕組みを備えている。これを経口寛容というが、その中心的な役割を演ずるのがトランスフォーミング成長因子(TGF)- β と呼ばれるサイトカインである^[4,6]。TGF- β はヒトやウシの初乳に含まれており^[3,5,7,8]、ヒトでは牛乳蛋白にIgE型のアレルギーをもつ乳児の母親の初乳中TGF- β 濃度が健康児や他の疾患を持った乳児の母親のそれに比べ有意に低かったことが報告されており^[3]、新生児の経口寛容成立に初乳中のTGF- β の重要性が示唆されている。

¹⁾ 獣医学部獣医微生物学教室

Department of Veterinary Microbiology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

²⁾ NOSAI えひめ土居家畜診療所

Doi Veterinary Clinic Center, Ehime Prefectural Federation of Agricultural Mutual Aid Association, Doi, Ehime 799-0700, Japan

³⁾ 酪農学園大学附属農場

Research Farm, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

⁴⁾ 酪農学園大学獣医学部生産動物医療学教室

Department of Large Animal Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

このような背景の下に、新生子の血中サイトカインレベルがその後の発育にどのような影響を与えるのかを知るために初乳摂取後の牛新生子血中サイトカイン濃度とその後の疾病罹患ならびに発育状況との関連を調べた。

材料および方法

1. 牛

本学附属農場で出生したホルスタイン種メス新生子と愛媛県土居地区で出生したホルスタイン種、黒毛和種およびそれらのF1を対象とした。

2. 血液

初乳摂取後12~24時間に真空採血管を用いて頸静脈より採取し、血清分離後-30℃に保存した。

3. サイトカインの測定

サンドイッチELISAで6種類のサイトカイン、IL-1 β 、IL-1ra、IL-6、IFN- γ 、TNF- α およびTGF- β 1を測定した。IL-1 β 、IL-1raおよびTNF- α については一次抗体として、我々の研究室で作成した、アフィニティークロマトグラフィー精製ニワトリIgYを、二次抗体としてそのビオチン標識IgYを用いた。IL-6とIFN- γ については、一次抗体として自家製のアフィニティークロマトグラフィー精製ウサギIgGを、二次抗体としてそのビオチン標識物を用いた。ビオチン標識抗体の検出には市販のアビジン結合ホースラディッシュスーパーオキシダーゼ(Amersham Pharmacia)を使用した。TGF- β 1については市販の多動物種用キット(BioSource International, Inc.)を使用した。これらのELISAの検出限界はIL-1 β は2 ng/ml、IL-1raは2 ng/ml、IL-6は70 pg/ml、IFN- γ は200 pg/ml、TNF- α は340 pg/mlそしてTGF- β 1は16 pg/mlであった。

4. 疾病罹患状況および発育状況

日常行われる獣医師による牛群観察記録により疾病の発生をチェックした。発育は本学農場牛についてのみ検討し、毎月測定される体重によった。

5. 統計処理

平均値の差の検定にはStudentのtテスト、サイトカイン陽性率や発病率の差の検定には χ^2 テストを用いた。

成績と考察

酪農学園大学附属農場と愛媛県土居地区のホルスタイン新生子のサイトカイン検出率および平均サイトカイン濃度は、両地区間で有意な差を認めなかった。そのため、ホルスタインの成績は、特にことわりがない限り、両地区のものをあわせて取りあつかった。

初乳摂取後12~24時間の新生子血清中の平均サイトカイン濃度と検出率を表1に示した。TGF- β 1は全例から検出されたが、他の検出率はサイトカインの種類、品種により異なった。その中でIL-6の検出率は黒毛和種とF1でホルスタイン種より有意に高かった(それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$)。その平均濃度に有意差は認められなかったが、黒毛和種で高い傾向を示した。その他のサイトカインの検出率、平均濃度に品種間の差は認められなかった。

黒毛和種でIL-6の検出率が他の品種より高かった理由は不明であるが、黒毛和種では子を親につけ授乳させていたが、ホルスタイン種では凍結保存初乳を給与しており、このような違いが反映されているのかもしれない。

次に、品種毎に生後4ヶ月間病気に罹らなかった健康群と罹った罹患群に分け、それぞれの罹患率、各サイトカインの検出率と平均濃度を表2に示した。罹患率は黒毛和種で高い傾向を示したが、品種間での差は認められなかった。ホルスタイン種では

表1 品種別新生子血清サイトカインレベルの比較

サイトカイン	ホルスタイン	F1	黒毛和種
IL-1 β	90.45 \pm 13.82 (74/96)	122.26 \pm 28.27 (34/41)	124.58 \pm 42.57 (17/18)
IL-1ra	58.01 \pm 9.33 (82/96)	88.30 \pm 16.39 (39/41)	78.23 \pm 21.08 (17/18)
IL-6	0.24 \pm 0.04 (29/96)	0.25 \pm 0.06(21/41**)	0.89 \pm 0.39(10/18*)
TNF- α	8.32 \pm 1.25 (81/96)	9.66 \pm 2.06 (39/41)	8.11 \pm 1.71 (17/18)
IFN- γ	0.29 \pm 0.04 (8/96)	0.22 \pm 0.02 (1/41)	0.27 \pm 0.05 (2/18)
TGF- β 1	9.58 \pm 0.48 (96/96)	9.47 \pm 0.73 (41/41)	10.03 \pm 1.06 (18/18)

数字は平均値(ng/ml) \pm 標準誤差を、括弧内の数字は陽性数/検査数を示す。

**, * 検出率がホルスタイン種に対しそれぞれ $p < 0.01$, $p < 0.05$ で有意。

表2 生後4ヶ月間の健康群と罹患群の新生子期血清サイトカインレベルの比較

品種 (発病率)	サイトカイン	健康群	罹患群
ホルスタイン (15/96 16%)	IL-1 β	100.48 \pm 15.99 (64/81)	36.28 \pm 12.34** (10/15)
	IL-1ra	64.64 \pm 10.84 (68/81)	22.22 \pm 6.55** (14/15)
	IL-6	0.21 \pm 0.05 (22/81)	0.36 \pm 0.12 (7/15)
	INF- γ	0.31 \pm 0.05 (7/81)	0.22 \pm 0.01 (1/15)
	TGF- β 1	9.58 \pm 0.51 (81/81)	9.58 \pm 1.43 (15/15)
	TNF- α	9.10 \pm 1.46 (69/81)	4.14 \pm 1.09** (12/15)
F1 (5/41 12%)	IL-1 β	103.827 \pm 28.04 (29/36)	254.99 \pm 104.76 (5/5)
	IL-1ra	76.761 \pm 15.90 (34/36)	171.38 \pm 64.26 (5/5)
	IL-6	0.217 \pm 0.04 (20/36)	0.51 \pm 0.44 (1/5)
	INF- γ	0.224 \pm 0.02 (1/36)	0.21 \pm 0.00 (0/5)
	TGF- β 1	9.302 \pm 0.68 (36/36)	10.64 \pm 3.78 (5/5)
	TNF- α	9.031 \pm 2.27 (34/36)	14.22 \pm 4.11 (5/5)
黒毛和種 (5/18 28%)	IL-1 β	132.005 \pm 56.24 (12/13)	105.29 \pm 54.13 (5/5)
	IL-1ra	84.215 \pm 28.61 (12/13)	62.67 \pm 18.18 (5/5)
	IL-6	0.939 \pm 0.51 (7/13)	0.75 \pm 0.52 (3/5)
	INF- γ	0.253 \pm 0.05 (1/13)	0.33 \pm 0.12 (1/5)
	TGF- β 1	10.948 \pm 1.19 (13/13)	7.66 \pm 2.04 (5/5)
	TNF- α	8.988 \pm 2.16 (12/13)	5.82 \pm 2.62 (5/5)

数字は平均値(ng/ml) \pm 標準誤差を、括弧内の数字は陽性数/検査数を示す。

** 健康群との間に $p < 0.01$ で有意差あり。

IL-1 β , IL-1ra および TNF- α の平均濃度がいずれも健康群で有意に ($p < 0.01$) 高かった。罹患群の疾病は、呼吸器疾患 8 例、消化管疾患 7 例でいずれも感染症と考えられるものであった。罹患牛は全例回復している。

この成績は IL-1 β や TNF- α 濃度が低かった新生子で呼吸器や消化管感染症に罹りやすいことを示すものである。IL-1 β はウシ新生子のリンパ球や好中球を活性化することが *in vivo*, *in vitro* で^[2,10] 示されており、TNF- α もウシ新生子のリンパ球の活性化に貢献することが *in vivo* で報告されている^[10]。したがって、これらの初乳を介して得たサイトカインが低濃度である場合は、リンパ球や好中球の活性化が十分になされず、感染症に対する抵抗性が十分に誘導されなかったと考えることができる。IL-1ra は IL-1 の拮抗因子であるが罹患群で、高いのではなく、低かったことは、初乳中に IL-1ra は IL-1 濃度に比例して共存しており^[11]、その反映と思われる。また、初乳に存在する IL-1 β と IL-1ra 濃度比では IL-1ra による IL-1 β 作用の阻害は認められないことが報告されている^[11]。

このような傾向は黒毛和種でも認められたが、いずれのサイトカインも統計的な有意差はなかった。F1 ではこのような傾向は認められなかった。両品種の観察数はホルスタイン種に比べ非常に少なく、もっと多数の罹患例について観察する必要があると思われる。

酪農学園大学農場の新生子について血清サイトカイン濃度と体重増加率との関連を調べたが相関は認められなかった。この点は、IL-1 β や TNF- α 濃度がウシの体重増を規定している訳ではないし、罹患した呼吸器や消化管の疾患は体重に変化を与えるほどのものではなかったとも考えられる。

以上の成績は IL-1 β や TNF- α を子牛の疾病対策上の指標となりうることを示唆するが、もっと様々な農場について、もっと多くの罹患例について検討する必要があると思われる。また、今回は検討されなかった初乳を介して得た抗体についても調べる必要がある。

要 約

初乳は新生子の免疫機能を活性化するサイトカインや経口寛容成立に重要と考えられるサイトカインを含んでいるため、新生子の感染症感受性を大きく支配する要因であると考えられる。そこで、初乳摂取 12~24 時間の新生子血清中の IL-1 β , IL-1ra, IL-6, INF- γ , TGF- β 1 および TNF- α を ELISA で測定し、生後 4 ヶ月間の疾病発生状況との関連を調べた。ホルスタイン種では IL-1 β , IL-1ra, TNF- α 濃度が健康群より罹患群で有意に低いことが観察された。黒毛和種では同様の傾向を認めたが有意差はなかった。この成績は初乳摂取後の新生子血清サイトカインレベルは疾病対策上有効な指標となりうることを示唆するものであると考えられた。

謝 辞

本研究は 2003 年度酪農学園大学・同短期大学部共同研究の助成ならびに 2003 年度酪農学園大学ハイテクリサーチセンター事業の助成を受けて実施された。

参 考 文 献

- [1] Hagiwara, K., Kataoka, S., Yamanaka, H., Krisawa, R. and Iwai, H. 2000. Detection of cytokines in bovine colostrum. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 76: 183-190.
- [2] Hagiwara, K., Yamanaka, H., Higuchi, H., Nagahata, H., Kirisawa, R. and Iwai, H. 2001. Oral administration of IL-1 β enhanced the proliferation of lymphocytes and the O₂⁻ production of neutrophil in newborn calf. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 81: 59-69.
- [3] Kalliomaki, M., Ouwehand, A., Arvilommi, H., Kero, P. and Isolauri, E. 1999. Transforming growth factor-beta in breast milk: a potential regulator of atopic disease at an early age. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 104: 1251-1257.
- [4] Letterio, J.J., Geiser, A.G., Kulkarni, A.B., Dang, H., Kong, L., Nakabayashi, T., Mackall, C.L., Gress, R.E. and Roberts, A.B. 1996. Autoimmunity associated with TGF-beta1-deficiency in mice is dependent on MHC class II antigen expression. *J. Clin. Invest.*, 98: 2109-2119.
- [5] Pakkanen R. 1998. Determination of transforming growth factor-beta 2 (TGF-beta 2) in bovine colostrum samples. *J. Immunoassay*, 19: 23-37.
- [6] Perez-Machado, M. A., Ahwood, P., Thomson, M. A., Latcham, F., Sim, R., Walker-Smith, J. A. and Murch, S.H. 2003. Reduced transforming growth factor-beta1-producing T cells in the duodenal mucosa of children with food allergy. *Eur. J. Immunol.*, 33: 2307-2315.
- [7] Saito, S., Yoshida, M., Ichijo, M., Ishizaka, S. and Tsujii T. 1993. Transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human milk. *Clin Exp Immunol.*, 94: 220-224.
- [8] Tokuyama, H. and Tokuyama, Y. 1989. Bovine colostric transforming growth factor-beta-like peptide that induces growth inhibition and changes in morphology of human osteogenic sarcoma cells (MG-63). *Cell Biol Int Rep.*, 13: 251-258.
- [9] Yamanaka, H., Hagiwara, K., Kirisawa, R. and Iwai, H. 2003. Transient detection of proinflammatory cytokines in sera of colostrum-fed newborn calves. *J. Vet. Med. Sci.*, 65: 813-816.
- [10] Yamanaka, H., Hagiwara, K., Kirisawa, R. and Iwai, H. 2003. Proinflammatory cytokines in bovine colostrum potentiate the mitogenic response of peripheral blood mononuclear cells from newborn calves through IL-2 and CD25 expression. *Microbiol. Immunol.*, 47: 461-468.
- [11] Yamanaka, H., Katagiri, Y., Domi, M., Hagiwara, K., Kirisawa, R. and Iwai, H. 2001. Effect of interleukin-1 receptor antagonist on concanavalin A response of peripheral blood mononuclear cells from newborn calves. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 933-935.

Summary

Colostrum contains a variety of factors that contribute, in a multi-faceted manner, to the growth of newborns. In the newborn calf, pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6, INF- γ and TNF- α in colostrum activate both innate and adaptive immunity. In addition, TGF- β 1, also present in colostrum, is considered to play an important role in establishing oral tolerance against orally administered antigens. We hypothesized that the incidence of disease during the first few months of the calf's life may be related to the levels of the various cytokines in the animal soon after being fed colostrum as a neonate. The objectives of this study were (a) to analyze the sera of neonatal calves for cytokine levels after the calves were fed colostrum and (b) to evaluate the incidence of disease in the animals during their first four months of life. Serum was sampled from each newborn calf 12 to 24 hours after ingestion of colostrum and

analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for concentrations for cytokines IL-1 β , IL-1 receptor antagonist, IL-6, INF- γ , TGF- β 1 and TNF- α . In Holstein calves, neonatal levels of IL-1 β , IL-1 receptor antagonist and TNF- α were significantly lower in the diseased than in the healthy animals during their first four months of life. This tendency was also observed in the Japanese black calves, though not statistically significant. Results of the study bear out that in calves up to four months of age the incidence of disease is related to the serum cytokine levels in the neonate 12 to 24 hours after intake of colostrum. In conclusion, the serum levels of the various cytokines in newborn calves may serve as useful indices for disease control.