



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Studies on Flow Cytometric Assessment of Phagocytic Ability of Polymorphonuclear Leukocytes in Bovine Blood and Milk and Its Clinical Applications(内容の要旨)
Author(s)	Ducusin, Rio John Toledo
Report No.(Doctoral Degree)	博士(獣医学) 甲第137号
Issue Date	2003-03-13
Type	博士論文
Version	
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2191

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名(本籍)	Ducusin, Rio John Toledo (フィリピン共和国)		
学位の種類	博士(獣医)		
学位記番号	獣医博甲第137号		
学位授与年月日	平成15年3月13日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学		
学位論文題目	Studies on Flow Cytometric Assessment of Phagocytic Ability of Polymorphonuclear Leukocytes in Bovine Blood and Milk and Its Clinical Applications (フローサイトメトリーを用いたウシの血液および乳汁の多形核白血球の貪食能の評価ならびに臨床的応用に関する研究)		
審査委員	主査	帯広畜産大学	教授 更科孝夫
	副査	帯広畜産大学	教授 西村昌数
	副査	岩手大学	教授 内藤善久
	副査	東京農工大学	教授 山根義久
	副査	岐阜大学	教授 北川均

論文の内容の要旨

病原微生物に対する動物の重要な防御機構の1つは、多形核白血球(PMN)の貪食能である。従って、in vitroにおけるPMNの貪食能の測定は、動物の免疫状態および感染に対する反応を反映する。貪食能を評価する初期の分析方法は長時間を要し、主観的な解釈を要し、さらにしばしば再現性に欠ける。従って、本研究の基本的な目的は、ウシのPMN貪食能を測定するために、迅速、簡易かつ正確な方法を開発し、その方法を健康乳牛、急性乳房炎罹患牛および乳熱罹患牛の免疫状態を評価してモニターするために利用することである。

最初の段階では、蛍光ビーズを用いたフローサイトメトリー法を開発した。この分析法において、貪食能の主な指標は、蛍光PMN率および平均蛍光強度である。蛍光PMN率は、蛍光ビーズを貪食したPMN率を示し、平均蛍光強度は、蛍光ビーズを貪食したPMNの蛍光強度を示す。まず健康乳牛の血液を用いて、実験的条件(ビーズ数とPMN数の割合、反応時間および反応温度)の違いによる影響を検討した。結果に基づいて、最適なビーズ数とPMN数の割合、反応時間および反応温度はそれぞれ20:1、30分および38.5°Cであった。本法の再現性および信頼性を評価するために、いくつかの貪食の刺激剤、すなわち、lipopolysaccharide(LPS)、phorbol myristate acetate(PMA)、cytochalasin Bおよびformyl-met-leu-phe(fMLP)の健康乳牛血液のPMN貪食能に対する影響を検討した。LPSは低用量で貪食能を有意に増加させた。PMAは低用量で貪食

能を有意に増加させた。Cytochalasin Bは貪食能を低用量で有意に増加させ、高用量で有意に低下させた。fMLPは貪食能に対し有意な影響を及ぼさなかった。この結果は、異なる貪食能分析方法による以前の研究結果に一致したことから、今回のフローサイトメトリー法は確実な方法であると考えられる。抗凝固剤としてethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)とacid citrate dextrose (ACD)の影響を健康乳牛のヘパリン処理血のPMNを用いて比較した。EDTAとACDは貪食能を有意に減少させた。ヘパリンがPMN貪食能を減少させることを証明した報告があるが、使用された3種の抗凝固剤のうちヘパリンだけはPMN貪食能の研究にとって標準的な抗凝固剤として残っている。

前記の本法を乳汁中のPMNに対して改良した。非乳房炎乳汁(正常乳と初乳)と急性乳房炎乳汁(初期の乳汁、抗生物質治療中の乳汁および抗生物質治療後の乳汁)の貪食能を比較した。急性乳房炎初期の乳汁のPMNは血液のPMNと同様に最も高い貪食能を示す一方、正常乳のPMNは最も低い貪食能を示した。

オゾンガス療法は、ヒトの様々な疾病に効果的であると主張された有望で優れた療法である。しかしながら、治療の機構がまだ不明瞭である。本研究では、in vitroにおいて血液と乳汁にオゾンガスを添加し、ウシのPMN貪食能に対するオゾンガスの影響を検討した。オゾンガスをin vitroで健康乳牛、急性乳房炎罹患牛および乳熱罹患牛の血液と乳汁に添加した。健康乳牛の血液において、オゾンガスは白血球生存率には影響を与えなかったが、PMN貪食能を有意に低下させた。In vitroにおけるオゾンガスの添加は急性乳房炎罹患牛と乳熱罹患牛血液のPMN貪食能と急性乳房炎罹患牛の乳汁のPMN貪食能を有意に増加させた。この結果からin vitroにおけるオゾンガスの影響はウシの健康状態によって異なる効果を示すことが示唆された。

In vivoにおけるオゾンガスの影響を前記と同様の過程で検討した。急性乳房炎罹患牛に対する乳房内へのオゾンガス注入治療と抗生物質注入治療における臨床病理学的変化を比較した。オゾンガス療法は細菌が検出されない乳房炎罹患牛にのみ有効であった。乳汁のPMN貪食能はオゾンガス治療症例で高い傾向を示したが、治癒率(2/5)は比較的lowく、本実験において貪食能の増加の臨床的な有意性はまだ明らかではない。

最後に、生体の防御機構に重要な細胞活性であるPMN貪食能と細胞内カルシウムイオン濃度($[Ca^{2+}]_i$)の変化を分娩後の健康乳牛と乳熱罹患牛を用いて検討した。蛍光PMN率(PMAによる刺激とcytochalasin Bによる抑制の有無の条件下)とresting $[Ca^{2+}]_i$ は乳熱罹患牛(低カルシウム血症性産褥麻痺罹患牛)が軽度乳熱罹患牛および正常牛に比べて有意に低い値を示した。これらのウシの細胞外メジウム内のカルシウムイオンが十分な条件下において貪食能とresting $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。正常牛では細胞外メジウム内のカルシウムイオン濃度($[Ca^{2+}]_e$)の低い条件下において貪食能とresting $[Ca^{2+}]_i$ が減少した。これらの結果により、in vivoにおける乳熱罹患牛の低カルシウム状態がPMN貪食能とresting $[Ca^{2+}]_i$ の低下を起し、このことが感染症に対する大きな感受性に部分的に関与すると考えられた。

以上、牛の免疫状態や感染症に対する生体反応を知る血液および乳汁の多形核白血球(PMN)の貪食能の測定のために迅速、客観的かつ再現性のあるフローサイトメトリー分析法を開発した。この方法を用いることによって、急性乳房炎と乳熱のオゾンガス療法によってPMN貪食能が増加することを明らかにした。さらに乳熱のPMN貪食能と細胞内外のカルシウムイオンとの関係が密接に存在することを明らかにした。このことは、牛の生産性向上にとって大きな障害となっている周産期の代謝障害や感染症の原因究明や、診断・治療・予防法を検討するために非常に価値ある成績と考える。

審 査 結 果 の 要 旨

本研究はウシの多形核白血球 (PMN) の食食能の測定に迅速、簡易かつ正確なフローサイトメトリー分析法を開発し、急性乳房炎罹患牛および乳熱罹患牛の免疫状態を評価することを目的とした。

最適なビーズ数と PMN 数の割合、反応時間および反応温度はそれぞれ 20:1, 30 分および 38.5℃であった。食食刺激因子として lipopolysaccharide は低用量で食食能を有意に増加させた。phorbol myristate acetate は低用量で食食能を有意に増加させた。cytochalasin B は食食能を低用量で有意に増加させ、高用量で有意に低下させた。formyl-met-leu-phe は食食能に影響しなかった。また抗凝固剤として、ethylene diamine tetraacetic acid と acid citrate dextrose はヘパリンに比べ食食能を有意に減少させた。

急性乳房炎初期の乳汁 PMN は血液 PMN と同様に最も高い食食能を示す一方、正常乳汁の PMN は最も低い食食能を示した。さらにオゾンガスは健康牛の白血球生存率に影響しなかったが、PMN 食食能を有意に低下させた。In vitro におけるオゾンガス添加は急性乳房炎罹患牛と乳熱罹患牛の血液の PMN 食食能と急性乳房炎罹患牛の乳汁の PMN 食食能を有意に増加させた。またオゾンガス療法は細菌が検出されない乳房炎罹患牛にのみに有効であった。乳汁の PMN 食食能はオゾンガス治療症例で高い傾向を示したが、治癒率 (2/5) は比較的低かった。

乳熱罹患牛の蛍光 PMN 率と細胞内の resting $[Ca^{2+}]_i$ は正常牛に比べて有意に低い値を示した。ウシの細胞外メジウム内のカルシウムイオンが十分な条件下においては、食食能と resting $[Ca^{2+}]_i$ が増加した。正常牛では細胞外メジウム内のカルシウムイオン濃度 ($[Ca^{2+}]_e$) の低い条件下において、食食能と resting $[Ca^{2+}]_i$ が減少した。従って in vivo における乳熱罹患牛の低カルシウム状態が PMN 食食能と resting $[Ca^{2+}]_i$ の低下を起し、感染症に対して大きな感受性に関与すると考えられた。

以上の結果から、今回開発したフローサイトメトリー分析法は、他の臨床病理学的方法と連係して、乳牛の免疫状態を正確に測定し、モニターする有効な方法であると考えられる。

審査委員 5 名は全員一致で本論文が岐阜大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 Phagocytic response of bovine polymorphonuclear leukocytes to different incubation conditions and following exposure to some effectors of phagocytosis and different anticoagulants *in vitro*
- 著 者 名 DUCUSIN, Rio John T. SARASHINA, Takao UZUKA, Yuji TANABE, Shigeyuki and OHTANI, Masayuki
- 学術雑誌名 The Canadian Journal of Veterinary Research
- 券・号・頁・発行年: 65 (1): 38-44, 2001

- 2) 題 目 Phagocytosis of bovine blood and milk polymorphonuclear leukocytes after ozone gas administration *in vitro*
 著 者 名 DUCUSIN, Rio John T. NISHIMURA, Masakazu SARASHINA, Takao UZUKA, Yuji TANABE, Shigeyuki and OTANI, Masayuki
 学術雑誌名 The Journal of Veterinary Medical Science (発表予定)
 券・号・頁・発行年: 65 (4): ~ , 2003
- 3) 題 目 Phagocytosis and intracellular free Ca^{2+} level in blood polymorphonuclear leukocytes of postpartum dairy cows
 著 者 名 DUCUSIN, Rio John T. UZUKA, Yuji SATOH, Eiki OTANI, Masayuki NISHIMURA, Masakazu TANABE, Shigeyuki and SARASHINA, Takao
 学術雑誌名 Research in Veterinary Science (発表予定)
 券・号・頁・発行年: 74 (): ~ , 2003

既発表学術論文

- 1) 題 目 Relationship between the incidence of displaced abomasum and feeding of cows in Tokachi district, Hokkaido, Northern Japan
 著 者 名 MORI, Fujiki SAWADA, Kazuhito WATANABE, Noboru DUCUSIN, Rio John T. TANABE, Shigeyuki UZUKA, Yuji TAKAHASHI, Junichi and SARASHINA, Takao
 学術雑誌名 Asian-Australasian Journal of Animal Sciences
 券・号・頁・発行年: 14 (1): 88~91, 2001
- 2) 題 目 Changes in serum thyroid hormone levels in newborn calves as a diagnostic index of endemic goiter
 著 者 名 TAKAHASHI, Kenichi TAKAHASHI, Eiji DUCUSIN, Rio John T. TANABE, Shigeyuki UZUKA, Yuji and SARASHINA, Takao
 学術雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science
 券・号・頁・発行年: 63 (2): 175~178, 2001
- 3) 題 目 Expression of the mRNA of the chemokine receptor CXCR4 in feline mammary adenocarcinoma
 著 者 名 TANABE, Shigeyuki NAKADAI, Tomomi FURUOKA, Hidefumi OOMACHI, Tetsuo KOBAYASHI, Yoshiyasu OMATA, Yoshitaka KOYAMA, Tsuya HONDO, Eiichi UZUKA, Yuji SARASHINA, Takao DUCUSIN, Rio John T. SHIDA, Takuo and DORF, Martin E.
 学術雑誌名 The Veterinary Record
 券・号・頁・発行年: 151 (12): 729~733, 2002
- 4) 題 目 *Cryptosporidium* infection of cattle in the Tokachi District, Hokkaido
 著 者 名 SAKAI, Hiroaki TSUSHIMA, Yoshinori NAGASAWA, Hideyuki DUCUSIN, Rio John T. TANABE, Shigeyuki UZUKA, Yuji and SARASHINA, Takao
 学術雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science
 券・号・頁・発行年: 65 (1): 125~128, 2003