

乳牛の初乳中アデノシンデアミナーゼ活性の臨床的意義の検討

佐藤雅彦^{1,2)} 今西晶子¹⁾ 岡田啓司¹⁾† 安田 準¹⁾

1) 岩手大学農学部 獣医学課程 (〒020-8550 盛岡市上田3丁目18-8)

2) 現 東京大学大学院農学生命科学研究科

(2010年11月30日受付・2010年12月20日受理)

要 約 乳汁中のアデノシンデアミナーゼ (ADA) 活性の臨床的意義を検討した。まず臨床的に健康な搾乳中のホルスタイン種成乳牛35頭の乳汁を初乳と常乳 (泌乳初期, 泌乳最盛期, 泌乳中期, 泌乳後期) に区分し, 乳清中のADA活性値を測定した。常乳の乳清ADAは 0.03 ± 0.01 IU/ℓと著しく低値だったが, 初乳は 11.9 ± 2.9 IU/ℓ (平均±標準誤差, 以下同) と, 常乳に比べて高値を示した。次に, ホルスタイン種成乳牛11頭について, 分娩前後の血清ADA活性値と末梢血リンパ球幼若化能を調べた。また初乳および分娩1週間後の乳清ADA活性値と初乳中リンパ球幼若化能を測定した。これらの結果は, 乳汁CMT変法検査が陰性牛の非乳房炎牛 (6頭) と陽性牛の潜在性乳房炎牛 (5頭) に分けて検討した。分娩前後の血清ADA活性値は, 潜在性乳房炎牛が非乳房炎牛に対して高値を示す傾向が認められ, 初乳の乳清ADAでも非乳房炎牛が 13.5 ± 1.7 IU/ℓ, 潜在性乳房炎牛が 23.0 ± 5.1 IU/ℓで, 潜在性乳房炎牛が非乳房炎牛に対して有意 ($p < 0.05$) な高値を示した。分娩前後の末梢血リンパ球幼若化能は, 非乳房炎牛では分娩時に低下する傾向がみられたが, 潜在性乳房炎牛ではそのような傾向は認められず, 分娩時にも高い反応性を示した。初乳中リンパ球幼若化能は, いずれのマイトージェンで刺激した場合も, 潜在性乳房炎牛が非乳房炎牛に対して著しい高値を示した。PHAによる刺激指数がきわめて高値を示した個体では初乳中ADA活性も高値を示した。以上のことから, 潜在性乳房炎を伴う初乳中のADA活性は炎症反応により活性値が上昇するため, 乳房炎診断を同時に行う必要性が考えられた。リンパ球幼若化能とADA活性値の明らかな相関は見出せなかったが, 初乳中のADA活性値は乳汁中のリンパ球, とくにCD4⁺T細胞機能を反映することが推測され, 簡便なリンパ球系細胞の免疫能評価に応用できる可能性が示唆された。

——キーワード: アデノシンデアミナーゼ (ADA), 初乳, ホルスタイン牛, リンパ球幼若化能試験, 乳房炎

.....産業動物臨床医誌 1(4): 197-202, 2010

1. はじめに

乳牛の初乳中IgG量は母牛の年齢や健康状態, 給与飼料によって異なる [1] ことから, 初乳中の細胞成分やサイトカインについても母牛の免疫能を反映して変動することが推測される。周産期における全身性および乳腺局所の免疫機構の解明は, 初乳に含まれる免疫細胞が新生子に移行し感染防御に役立っている可能性があり, 子牛の感染症に関わる重要な課題である。しかしながら, 初乳を含め乳汁中の細胞性免疫能の検査方法は煩雑であるため, スクリーニング検査として簡便な免疫能評価法

の開発が必要である。

アデノシンデアミナーゼ (Adenosine deaminase : ADA) は, アデノシンを加水分解し, イノシンとアンモニアを生成する反応を触媒するプリン代謝系の酵素で [2], リンパ球の増殖や分化に必要である [3]。ヒトの上皮細胞やリンパ系細胞などでは, ADAがT細胞活性化抗原であるCD26と結合して細胞表面にも存在することが明らかにされており [4], 免疫系においてT細胞機能の調節に関わる重要な酵素であることが証明されている。一方, 動物の血清ADAに関する酵素診断学的な報

† 連絡責任者: 岡田啓司 (岩手大学農学部 獣医学課程)

〒020-8550 盛岡市上田3丁目18-8 ☎ 019-621-6237 FAX 019-621-6237

E-mail : keiji@iwate-u.ac.jp

告は数少なく、犬の実験的中毒性肝障害 [5]、猫伝染性腹膜炎 [6] や猫免疫不全ウイルス感染症 [7]、牛では牛白血病 [8] や肝臓病変 [9] などの報告があるにすぎない。

本研究では、乳汁中ADA活性の臨床的意義を検討するため、乳期別の乳汁中ADA活性および分娩前後の乳汁と血清中のADA活性値およびリンパ球幼若化能を測定し、乳汁中ADA活性と全身性および乳汁中のリンパ球細胞性免疫との関連性を検討した。

2. 材料および方法

乳期別乳汁のADA活性の測定には臨床的に健康な搾乳中のホルスタイン種成乳牛35頭を用いた。泌乳牛を初乳期（分娩～1時間、3頭）、泌乳初期（7日～49日、4頭）、泌乳最盛期（50日～109日、10頭）、泌乳中期（110日～219日、6頭）および泌乳後期（220日～乾乳、12頭）の泌乳期別に区分して、牛群検定時にミルクメーターより乳汁をプラスチック遠沈管に採取した。初乳は胎子娩出後1時間に手搾りで採取した。

分娩前後の乳牛血清および初乳中のADA活性およびリンパ球幼若化能の測定には、乳期別測定とは異なる、分娩直後の臨床的に健康なホルスタイン種成乳牛11頭を供試した。分娩直後に初乳と全血を採取した。初乳は50mlプラスチック遠沈管2本に無菌的に採取するとともに、California Mastitis Test変法（PLテスター：日本全業工業、郡山）で陽性の牛5頭を乳房炎牛、陰性の牛6頭を非乳房炎牛とした。乳房炎牛は全頭とも、全身症状や乳房の状態に変化を認めない潜在性乳房炎であった。潜在性乳房炎牛の乳汁は、細菌検査を実施した。乳汁採取は分娩後1週間（11頭）にも行った。血液は分娩2週間前、1週間前、分娩時、分娩後1週間に頸静脈より採取して血清を分離した。

乳汁は4℃、3000rpm、15分間遠心し、上層の脂肪層を除去して脱脂乳とした。レンニン（SIGMA, USA）10mgに対して蒸留水1mlを加えて溶解したものをレンニン溶液とし、その25μlを脱脂乳3mlに混合した。37℃で10分間静置し、脱脂乳を凝固させた後、4℃、3000rpm、15分間遠心分離して乳清を得た。乳清および血清ADA活性は、酵素法による血清ADA測定用キット（セロテックAD-L：セロテック、札幌）を用い、臨床生化学自動分析装置（7060型自動分析装置：日立製作所、東京）で測定した。

末梢血リンパ球分離は、Ficoll-Conray液を用いた比重遠心法 [10] で行った。Ficoll-Conray液は、Ficoll（SIGMA, USA）とConray 400（第一製薬、東京）を比重1.077に調整して用いた。得られたリンパ球塊を10%牛胎子血清（fetal calf serum（FCS）：GIBCO,

USA）加RPMI1640培地（GIBCO, USA）に浮遊させ、生存リンパ球数が $5 \times 10^6/\text{ml}$ となるよう濃度を調整した。マイトージェンとして、フィトヘマグルチニン（PHA：DIFCO, USA）、ポークウィードマイトージェン（PWM：GIBCO, USA）およびコンカナバリン-A（Con-A：Amersham Pharmacia Biotech, USA）を用いた。マイトージェンの濃度はそれぞれのリンパ球幼若化能の反応が最も良い濃度に希釈した。PHAは $31.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、Con-Aは $3.9 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、PWMは $6.24 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。リンパ球浮遊液を96穴マイクロプレート（COSTAR, USA）に90μlづつ分注し、そこにマイトージェンを10μl添加した。38℃、5% CO₂および95% O₂の環境下で4日間培養後、MTT（3-[4,5-Dimethylthylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide：SIGMA, USA）法 [11] により吸光度（主波長570nm、副波長650nm）を測定した。この吸光度を用いて、以下の式により刺激指数（SI）を求めた。

$$\text{SI} = \frac{\text{マイトージェン添加サンプル吸光度}}{\text{コントロール吸光度}} \times 100$$

初乳からのリンパ球の分離は末梢血同様に比重遠心法 [10]の変法で行った。初乳25mlと同量の滅菌0.01MPBSをプラスチック遠沈管内で混合し、550G、20分間遠心分離した。滅菌スポイトで沈渣を別の50mlプラスチック遠沈管に移し、滅菌PBSで3回洗浄（550G、10分間）した後、沈渣を滅菌PBS10mlに浮遊させた。その下層に比重1.084に調整したFicoll-Conray液を静かに注入した。700G、15分間遠心分離した後、リンパ球層を回収し、滅菌PBSで2回洗浄（550G、10分間）した。生存リンパ球数が $1.25 \times 10^6/\text{ml}$ となるよう末梢血中リンパ球分離と同様の10% FCS加RPMI1640培地に浮遊させ、マイトージェンとして、PHA、Con-A、PWMを用い、4日間培養後MTT法 [11] によりSI値を求めた。非乳房炎牛および潜在性乳房炎牛について、それぞれ初乳中ADA活性値と各マイトージェンで刺激した場合のSIとの相関を求めた。

以上の検査より得られた測定値の統計処理はStudentのt検定およびPearsonの相関係数を用いて行った。

3. 結果

泌乳期別の乳汁中ADA活性値を図1に示した。常乳中ADA活性値は $0.03 \pm 0.01 \text{ IU}/\ell$ （平均±標準誤差、以下同）と著しい低値を示したが、初乳は $11.9 \pm 2.9 \text{ IU}/\ell$ と、常乳に比べて著しい高値を示した。

分娩直後の初乳において、CMT変法陽性が5頭、陰性が6頭であった。陽性の5頭の乳房乳に関して細菌検査を実施したところ、4頭からブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌、ストレプトコッカス属、コアグラゼ陰性ブドウ

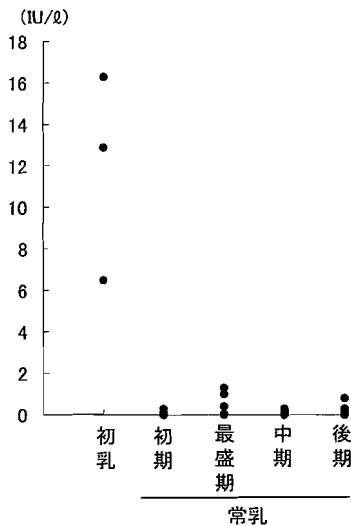


図1. 泌乳期別乳汁ADA活性値

ウ球菌, コリネバクテリウム, クレブシエラがいずれも少数分離され, 1頭からは菌が分離されなかった. 非乳房炎牛および潜在性乳房炎牛の分娩前後における血清ADA活性の推移を図2に示した. 非乳房炎牛では, 分娩前2週間 5.9 ± 0.6 IU/l, 分娩前1週間 6.7 ± 0.6 IU/l, 分娩 8.4 ± 1.2 IU/l, 分娩後1週間 5.6 ± 0.6 IU/lであり, 分娩時に高値を示す傾向がみられた. 潜在性乳房炎牛では, 分娩2週間前 7.6 ± 0.4 IU/l, 1週間前 8.4 ± 0.2 IU/l, 分娩 11.8 ± 0.7 IU/l, 分娩後1週間 8.2 ± 0.3 IU/lで分娩時に高値を示し, 非乳房炎牛に比べて分娩前1週間と分娩時は $p < 0.05$ で, 分娩後1週間は $p < 0.01$ で有意な高値を示した.

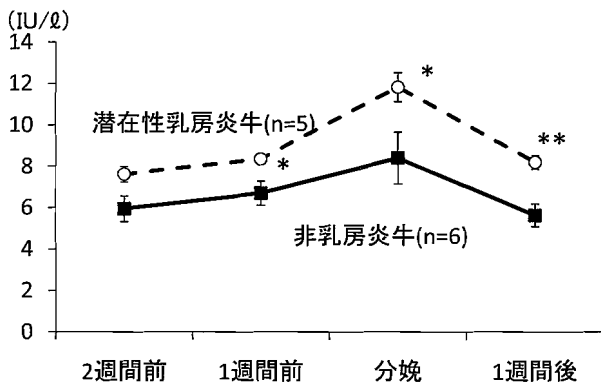


図2. 分娩前後における血清ADA活性の変動

平均±標準誤差

同時期の非乳房炎牛に対する有意差 *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$

表1. 初乳中および分娩後1週の乳清ADA活性値

	頭数	初乳	分娩後1週
非乳房炎牛	5	13.5 ± 1.7	1.3 ± 0.4
乳房炎牛	6	$23 \pm 5.1^*$	1.7 ± 0.3

平均±標準誤差

単位: IU/l

*: 同一時期の非乳房炎に対する有意差 $p < 0.05$

非乳房炎牛および潜在性乳房炎牛の初乳および分娩1週間後の乳清ADA活性平均値および標準誤差を表1に示した. 潜在性乳房炎牛の初乳は非乳房炎牛に対して $p < 0.05$ で有意な高値を示した.

非乳房炎牛および潜在性乳房炎牛の各個体の末梢血リンパ球幼若化能の変動を図3に示した. PHAで刺激培養した場合は非乳房炎牛では分娩前2週間から分娩時まではSIが低下傾向を示した. 潜在性乳房炎牛では, 分娩前1週間から分娩後1週間に掛けて増加傾向を示した. PWMで刺激した場合もPHA刺激の場合に類似した変化を示した. ConAで刺激した場合は非乳房炎牛, 潜在性乳房炎牛ともに, 分娩前には低下し, 分娩前1週間または分娩時に最低値をとった後, 上昇する傾向がみられた.

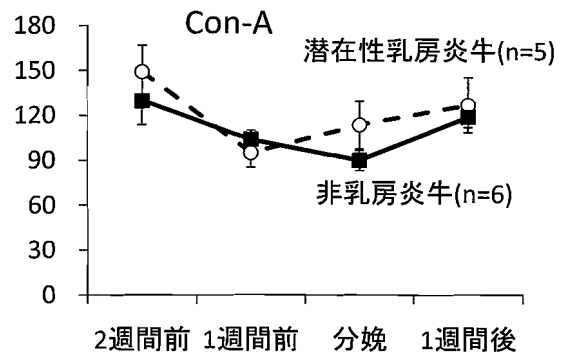
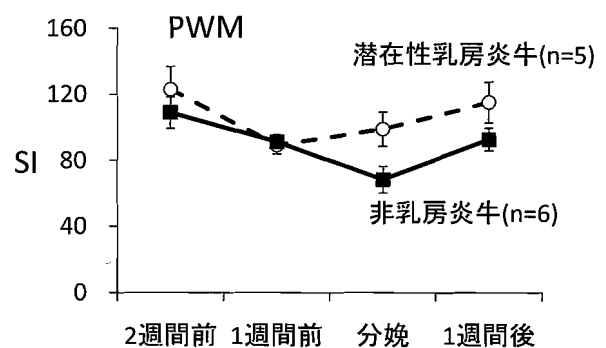
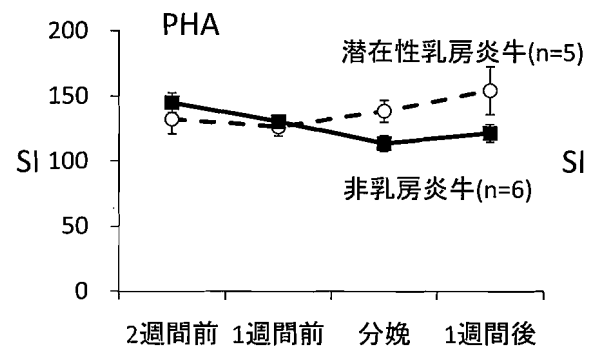


図3. 分娩前後における末梢血中リンパ球幼若化能の変動
平均±標準誤差

表2. 初乳中リンパ球幼若化能刺激指数

マイトージェン	PHA	PWM	Con-A
非乳房炎牛	109 ± 5	76 ± 10	92 ± 6
潜在性乳房炎牛	150 ± 18*	139 ± 18**	118 ± 18
潜在性乳房炎牛(n=5)	非乳房炎牛(n=6)	平均 ± 標準誤差	
非乳房炎牛に対する有意差 * : p<0.05 ** : p<0.01			

非乳房炎牛および潜在性乳房炎牛の初乳中リンパ球幼若化能刺激指数の平均値および標準誤差を表2に示した。全測定を通してのリンパ球の生存率は92.0±9.3%であった。PHAおよびPWMで刺激した場合、潜在性乳房炎牛は非乳房炎牛に対して有意な高値を示した。初乳中のADA活性値とPHA刺激によるSIには $R^2=0.300$ で相関があるとは言い難かったが、PHA刺激によるSIがきわめて高値を示した個体では初乳中ADA活性も15 IU/ℓ以上の高値を示した。初乳中ADA活性値とPWMおよびConAによるSIとの相関係数はそれぞれ $R^2=0.265$, $R^2=0.073$ で相関は認められなかった(図4)。

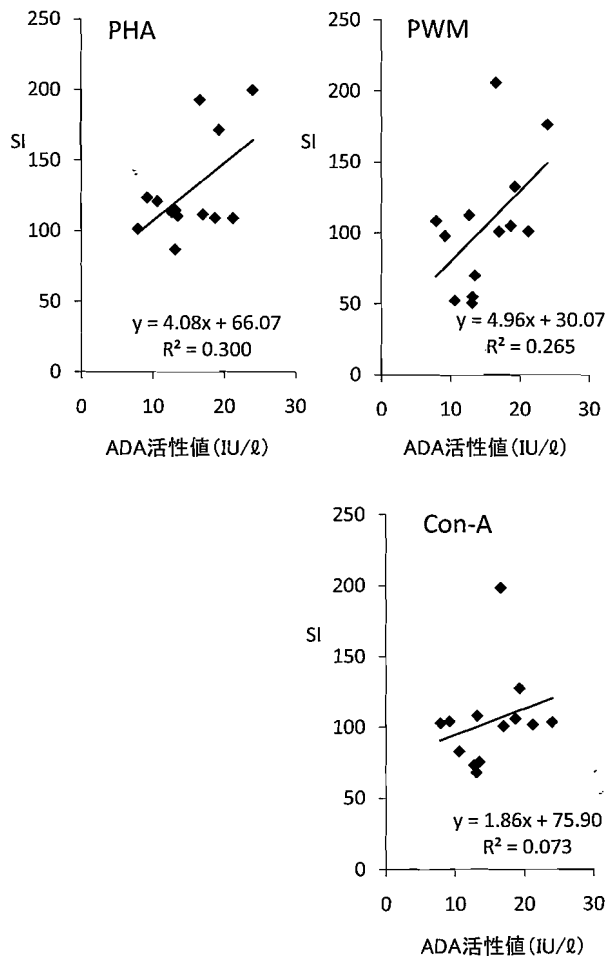


図4. 初乳中ADA活性値と各マイトージェン刺激によるSIの相関

4. 考察

血清ADA活性値は医学領域において、悪性腫瘍、感染症、肝疾患、神経筋疾患などの診断に利用されている[2]が、獣医臨床分野における牛血清ADA活性値と疾患に関しての報告は数少なく[8,9,12]、臨床現場では一般的に用いられている診断酵素ではない。一方、獣医臨床では非侵襲的に採材可能な乳汁中のN-acetyl-D-glucosaminidase (NAGase) や乳酸脱水素酵素 (LDH) が乳房炎の診断に用いられており[13,14]、血液以外の体液による酵素診断の有用性が示されている。本研究では乳汁中のADA活性についての臨床的意義を検討した。

乳汁中のADA活性は、常乳ではきわめて低値を示したが、初乳では常乳に比べて高値を示した。主に各種白血球で構成される乳汁中体細胞は泌乳期によって数的にも質的にも変動し、常乳中体細胞数は泌乳期では 5.2×10^4 個/ml程度であるが、初乳では 9.6×10^5 個/ml程度と増加する[15]。ADAは多くの臓器に分布する[16]が、とくにリンパ系組織には多く含まれる[4]。初乳中のリンパ球は、新生子に摂取された後消化管で36時間まで生存し、その一部は消化管壁を通過し乳糜管や腸間膜リンパ節にまで移動することが報告されており、初乳に含まれる免疫細胞が新生子に移行し感染防御に役立っている可能性が指摘されている[17,18]。ADAは主に細胞内に存在する酵素であるが、ヒトのリンパ系細胞などでは、ADAがT細胞活性化抗原であるCD26と結合して細胞表面にも存在することが示されている[4]。この細胞表面に存在するADAは細胞外のアデノシンレベルの調節の他にCD26との相互作用によって活性化T細胞の共刺激分子としての役割をもつことが示唆されている[15,19]。初乳中のADA活性が常乳に比して高値となるのは、乳汁に含まれるリンパ系細胞の数の増加だけではなく、リンパ球系細胞による機能亢進を反映している可能性が考えられた。しかしながら、初乳中のADA活性は非乳房炎牛よりも潜在性乳房炎牛で有意な高値を示した。このことは分娩前後の血清ADA活性の変動にも影響を及ぼし、非乳房炎牛に比べて潜在性乳房炎牛は分娩前1週間、分娩時、分娩後1週間では有意な高値を示した。牛でのADAアイソザイムの報告はないが、ヒトの伝染性単核球症や結核などの感染症では、ADAアイソザイム分析から血清中に活性化リンパ球由来ADAの増加することが報告されている[20]。このような血清ADA活性値の上昇機構が牛でも働いていると推察された。また、潜在性乳房炎牛の乳汁においても、乳腺組織の炎症反応の進行に伴い、乳腺組織および乳汁中の活性化リンパ球に由来するADA活性の上昇が生じた可能性が考えられた。したがって乳房炎存在下では炎症反応が初乳ADA活性値に影響を及ぼす可能性があるため、初

乳によるリンパ球系細胞の免疫能評価には乳房炎診断を同時に行い、炎症反応の影響がないことを確認しておく必要があると考えられた。

初乳中のリンパ球幼若化能において、非乳房炎牛に比べて潜在性乳房炎牛がPHAおよびPWM刺激で有意な高値を示したことから、潜在性乳房炎牛では、乳腺内の感染細菌による刺激によって初乳中のリンパ球機能が亢進していたと考えられた。PHAはCD4⁺T細胞をより強く刺激する [21] ので、初乳中のT細胞はCD4⁺T細胞が主体である [22] ため高値となったと考えられた。一方、主にCD8⁺T細胞を刺激するConAで刺激した場合のSIとADA活性値との相関はほとんど認められなかった。今回の結果からは、リンパ球幼若化能とADA活性値の明らかな相関は見出せなかったが、初乳中のADA活性値は乳汁中のリンパ球、とくにCD4⁺T細胞機能を反映することが推測され、今後例数を増やして検討することで、簡便なリンパ球系細胞の免疫能評価に応用できる可能性が示唆された。

5. 引用文献

1. 小峰優美子, 他: 乾乳期乳房炎罹患母牛の初乳形成不全に基づく子牛の感染性下痢症の発症, 日畜会報, 71, J279-285 (2000)
2. 佐倉伸夫: アデノシンデアミナーゼ (ADA) 日本臨床, 57 (増), 384-387 (1999)
3. Shore A, et al.: Role of adenosine deaminase in the early stages of precursor T cell maturation, Clin Exp Immunol, 44, 152-155 (1981)
4. Gines S, et al.: Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction, Biochem J, 15, 203-209 (2002)
5. Altug N, Agaoglu ZT: Serum adenosine deaminase activity in dogs: Its importance in experimental liver intoxication, Isr. J. Vet. Med., 55, 129-134 (2000)
6. Hirschberger J, Koch S: Validation of the determination of the activity of adenosine deaminase in the body effusions of cats, Res Vet Sci, 59, 226-229 (1995)
7. Hankanga C, et al.: Adenosine deaminase activity in cats infected with feline immunodeficiency virus, J Vet Med Sci, 69, 881-885 (2007)
8. Yasuda J, et al.: Adenosine deaminase (ADA) activity in tissues and sera from normal and leukaemic cattle, Br Vet J, 152, 485-487 (1996)
9. 安田 準, 他: ウシ血清アデノシンデアミナーゼ活性値と肝臓組織所見との関連性について, 獣医生化学, 38, 33-37 (2001)
10. 村上正人, 沢田海彦: リンパ球分離法, 細胞性免疫機能検査のすべて, 月刊Medical Technology編, 72-76, 医歯薬出版, 東京 (1985)
11. 小林豊一, 他: MTT法によるリンパ球幼若化反応の検討, 炎症, 13, 383-386 (1993)
12. Hunt S, McCosker PJ: Observations on serum adenosine deaminase activity in experimentally produced liver diseases of cattle and sheep: Yellowwood, lantana, carbon tetrachloride and chronic copper poisoning, Br Vet J, 126, 74-81 (1970)
13. 野附 巖, 青木康浩: 試料採取時期による乳房炎診断指標の変動-乳汁中NAGaseの診断上の意義-, 家畜診療, (341) 19-25 (1991)
14. Zank W, Schlatterer B: Assessment of subacute mammary inflammation by soluble biomarkers in comparison to somatic cell counts in quarter milk samples from dairy cows, J Vet Med A, 45, 41-51 (1998)
15. 小峰健一, 他: 乳牛乳汁中の各種生体防御因子の性状とその周産期に伴う変動, 日畜会報, 70, J169-J176 (1999)
16. Brady T G, O'donovan CI: A study of the tissue distribution of adenosine deaminase in six mammal species, Comp Biochem Physiol, 14, 101-120 (1965)
17. Sheldrake RF, Husband AJ: Intestinal uptake of intact maternal lymphocytes by neonatal rats and lambs, Res Vet Sci 39, 10-15 (1985)
18. Williams PP: Immunomodulating effect of intestinal absorbed maternal colostrum leukocytes by neonatal pigs, Can J Vet Res, 57, 1-8 (1993)
19. Martin M, et al.: Surface adenosine deaminase: A novel B-cell marker in chronic lymphocytic leukemia, Human Immunol, 42, 265-273 (1995)
20. Baganh MF, et al.: Serum and pleural adenosine deaminase: Correlation with lymphocytic populations, Chest, 97, 605-610 (1990)
21. 佐藤 繁: 乳牛の分娩前後における免疫能の変化および免疫賦活物質の影響, 東北家畜臨床研誌, 21, 61-70 (1998)
22. Asai K, et al.: Variation in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte subpopulations in bovine mammary gland secretions during lactating and nonlactating periods, Vet Immunol Immunopathol, 65, 51-61 (1998)

Clinical evaluation of bovine adenosine deaminase activities in the colostrums

M. Sato^{1,2)}, A. Imanishi¹⁾, K. Okada¹⁾ †, J. Yasuda¹⁾

1) *Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture,
Iwate University, 3-18-8, Ueda, Morioka 020-8550, Japan*

2) *Graduate school of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo*

ABSTRACT To determine the significance of adenosine deaminase (ADA) in the bovine colostrum, first, colostrum and ordinary milk samples were collected from 35 healthy adult Holstein cows and analyzed for ADA activity. The mean ADA activity was 11.9 ± 2.9 IU/ ℓ in the colostrum, which was significantly higher than 0.03 ± 0.01 IU/ ℓ in the ordinary milk. In the second experiment, 11 healthy adult Holstein cows were examined for serum ADA activity and by peripheral lymphocyte transformation (LT) test during the peripartum period. Whey ADA and LT were also examined for the colostrum. The results were compared between mastitis (M) and non-mastitis (NM) groups diagnosed by the modified California mastitis test. Serum ADA activities in the M group tended to be higher than those in the NM group. The whey ADA activity in the colostrums was 23.0 ± 5.1 IU/ ℓ in the M group and 13.5 ± 1.7 IU/ ℓ in the NM group with a significant difference between these groups. LT in the peripheral blood in the NM group tended to be lower at parturition, whereas that in the M group remained high even at parturition. LT in the colostrum in the M group was significantly higher than that in the NM group. Cows with high LT also had high whey ADA activities in the colostrums. These results suggest a possibility that ADA activity might be correlated with the number of CD4⁺ T cells in the colostrums. Because measurement of the whey ADA activity is very simple and rapid, colostrum ADA activity seems to be a potential indicator of immune status in the colostrums.

—Key Words : Adenosine Deanimase (ADA), Colostrums, Holstein Cow, Lymphocyte Transformation Test (LTT), Mastitis

† *Correspondence to : Keiji Okada (Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University)
3-18-8, Ueda, Morioka 020-8550, Japan
TEL 019-621-6237 FAX 019-621-6237 E-mail : keiji@iwate-u.ac.jp*

.....Jpn. J. Large Anim. Clin. 1(4): 197-202, 2010