

大腸菌ワクチン投与後のホルスタイン牛初乳中免疫成分とADA活性

岡田啓司^{1,2)†} 佐藤雅彦¹⁾ 青木美樹子^{1,2)}
 中村富子³⁾ 佐藤 繁^{1,2)} 安田 準^{1,2)}

1) 岩手大学農学部獣医学課程 生産獣医療研究室 (〒020-8550 盛岡市上田3-18-8)

2) 岐阜大学大学院連合獣医学研究科

3) 独立行政法人家畜改良センター岩手牧場

(2011年4月8日受付・2011年5月11日受理)

要 約 乾乳期の乳牛に大腸菌ワクチン製剤を投与し、初乳中リンパ球数、リンパ球サブセット、免疫グロブリン濃度およびアデノシンデアミナーゼ (ADA) 活性を調べた。試験には、臨床的に健康で乳房炎や血乳のなかったホルスタイン種経産牛を、投与群 (V群) 5頭とコントロール群 (C群) 5頭の2群に分けて供試した。

V群の初乳中白血球はC群と比べて、リンパ球数、CD4陽性T細胞数、CD8陽性T細胞数、 $\gamma\delta$ T細胞数、IgM陽性細胞数は差がなかった。V群のADA活性値は 17.5 ± 1.9 IU/ ℓ で、C群の 12.2 ± 2.9 IU/ ℓ に比べて有意な高値を示した。CD4陽性T細胞数とADA活性値の間に相関性が認められた。V群の初乳中免疫グロブリン濃度はC群と比べて、IgG1濃度とIgA濃度において有意な高値を示し、IgG1濃度とADA活性値の間に相関性が認められた。

以上のことから、大腸菌ワクチン投与は初乳において液性免疫増強作用のあること、また、初乳中ADA活性は初乳の液性免疫状態を知る指標になり得ることが示唆された。

—キーワード: アデノシンデアミナーゼ, 初乳, 大腸菌ワクチン, リンパ球サブセット

産業動物臨床医誌 2(1): 1-6, 2011

1. はじめに

牛は母親と胎子の血管が直結していないため、母牛の持つ感染防御因子は初乳のみによって新生子に与えられる [1]。初乳により子牛に供給される感染防御因子のうち、初乳中体細胞は新生子の腸管粘膜を通過でき [2]、初乳中に多く含まれるサイトカインは初乳中の細胞が産生している [3] など、初乳中のサイトカインや細胞成分の働きが注目されている。

腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *E. coli*: ETEC) が子牛に経口感染すると、線毛抗原により小腸粘膜に付着・定着・増殖し、腸管毒素を産生して下痢を惹起する。牛用大腸菌ワクチン (ゼンノウ: ローヌ・メリュエ社, フランス) は妊娠母牛に注射すると線毛抗原抗体が初乳を介して牛新生子に付与され、この抗体が子牛の小腸粘膜を被覆することによりETECの付着・増殖を阻止し下

痢発症を防ぐ [4]。臨床現場では、母牛に大腸菌ワクチン製剤を接種することにより、その特異的線毛抗原の検出されない地域でも牛新生子の感染症が減少する事例があり、大腸菌ワクチン製剤は非特異的免疫調節作用を有している可能性が示唆されている。

そこで本研究では、初乳形成において重要な乾乳期の母牛に大腸菌ワクチン製剤を投与し、初乳中リンパ球数、リンパ球サブセットおよび免疫グロブリン濃度を調査して、大腸菌ワクチンの初乳中免疫グロブリン濃度に及ぼす効果を検討した。あわせてリンパ球の増殖や分化に必要なプリン代謝系の酵素であり、ヒトの免疫系においてT細胞機能の調節にかかわる重要な酵素であることが証明されている [5, 6] アデノシンデアミナーゼ (ADA) 活性とリンパ球サブセットおよび免疫グロブリン濃度との関連を調べ、初乳中リンパ球による免疫レ

† 連絡責任者: 岡田啓司 (岩手大学農学部獣医学課程 生産獣医療研究室)
 〒020-8550 盛岡市上田3-18-8 ☎ 019-621-6237 FAX 019-621-6237
 E-mail: keiji@iwate-u.ac.jp

ベルの指標としての有用性を検討した。

2. 材料および方法

独立行政法人家畜改良センター岩手牧場において飼養されている、臨床的に健康かつ栄養状態良好で、初乳の California Mastitis Test (CMT) 変法検査 (PLテスター：日本全薬工業，郡山) が陰性で、肉眼的に血乳でなかったホルスタイン種成乳牛10頭 (産歴2～4産) の初乳を供試した。供試牛を5頭ずつ2群に分け、大腸菌ワクチン投与群 (V群：2.4±0.5産 (平均±標準偏差))，コントロール群 (C群：3.0±1.0産) とした。大腸菌ワクチン (牛用大腸菌ワクチン「ゼンノウ」：ローヌ・メリュエ社，フランス) は分娩予定日の1カ月前に5mlを皮下注射した。

分娩後、初搾乳時の乳汁を初乳として採取した。ミルカーで搾乳バケツに搾乳された乳汁を、消毒済みの金属杓子を用い、50mlプラスチック遠沈管4本に無菌的に採取した。

(1) 初乳中ADA活性および免疫グロブリン濃度

初乳乳汁を4℃、3000rpm、15分間遠心し、上層の脂肪層を除去して脱脂乳を得た。微生物由来レンニン (RENNET TYPE II from *Mucor miehei*：Sigma Chemical, USA) 20mgを蒸留水1mlで溶解したものをレンニン溶液とし、攪拌した脱脂乳10mlにつき400 μ lの割合で混合した。37℃で10分間静置して脱脂乳を凝固させた後、4℃、3000rpm、15分間遠心分離し、乳清を得た。

乳清中のIgG1, IgG2, IgM, IgA濃度は一元放射免疫拡散 (Single Radial Immunodiffusion：SRID) 法 (エコスチェック：メタボリックエコシステム研究所，宮城) を用いた。

乳清ADA活性測定は、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) で行った。

(2) 初乳中リンパ球数およびリンパ球サブセット

初乳からのリンパ球分離は前報 [7] に準じて行った。分離したリンパ球塊を2mlのPBSに浮遊し、その一部を用いて全自動血球計数器 (MEK-6258：日本光電工業，東京) によりリンパ球数を測定した。残りの浮

遊液を、リンパ球数が1×10⁶/mlとなるようPBSに浮遊させた。その細胞浮遊液を100 μ lずつ1.5mlマイクロチューブに分注し、Fluorescein isothiocyanate (FITC) 標識マウス抗ウシCD4抗体 (MCA1653F：CD4陽性T細胞)，CD8抗体 (MCA837F：CD8陽性T細胞)，WC1抗体 (MCA838F： γ δ T細胞)，IgM抗体 (AAI19F：IgM陽性細胞) (いずれもSerotec, U.K) の各モノクローナル抗体およびコントロールとしてのPBSを10 μ lずつ加え、4℃で30分間反応させた。

FACS Flow (日本ベクトン・ディッキンソン，東京) で3回洗浄 (550G, 3分間) した後、FACS Flow 300 μ lに細胞塊を浮遊させ、フローサイトメーター (FACScan：Becton Dickinson, USA) で測定した。測定データはCell Questを用いて解析を行った。初乳中リンパ球各サブセットの細胞数は、サイトグラムから得られた各表面抗原陽性率と初乳中リンパ球数とを用いて算出した。

(3) 統計処理

統計処理は、各群間の平均値の差の検定にはStudentのt検定、各検査項目とADA活性値との相関関係の検定にはPearsonの相関係数を用いて行い、危険率5%未満を有意差ありとした。以上の検査より得られた測定値は平均値±標準偏差にて示した。

3. 結果

(1) 初乳乳清成分

V群およびC群のIgG1, IgG2, IgM, IgA濃度の平均値を表1に示した。IgG1濃度はV群113.8±12.9mg/ml，C群81.5±11.1mg/mlで、V群はC群に対して有意な高値 ($p<0.01$) を示した。IgG2濃度はV群5.5±0.6mg/ml，C群5.4±0.5mg/ml，IgM濃度はV群1.7±0.3mg/ml，C群1.6±0.3mg/mlで各群間の間で差はみられなかった。IgA濃度はV群1.7±0.2mg/ml，C群1.1±0.3mg/mlで、V群はC群に対して有意な高値 ($p<0.01$) を示した。

V群およびC群の初乳中ADA活性値は、V群17.5±1.9IU/l，C群12.2±2.9IU/lで、V群はC群に対して有意な高値 ($p<0.05$) を示した。

(2) 初乳中リンパ球数およびリンパ球サブセット

V群およびC群の初乳中リンパ球数およびCD4陽性T細胞，CD8陽性T細胞， γ δ T細胞，IgM陽性細胞数の平均値を表2に示した。リンパ球数はV群5.06±1.40×10⁵

表1. 初乳乳清中免疫グロブリン濃度

	IgG1 (mg/ml)	IgG2 (mg/ml)	IgM (mg/ml)	IgA (mg/ml)
C (コントロール) 群	81.5 ± 11.1	5.4 ± 0.5	1.6 ± 0.3	1.1 ± 0.3
V (ワクチン投与) 群	113.8 ± 12.9 **	5.5 ± 0.6	1.7 ± 0.3	1.7 ± 0.2 **

**：コントロール群に対する有意差 $p<0.01$

表2. 初乳中リンパ球数およびリンパ球サブセット

	リンパ球 ($\times 10^5$ 個)	CD4陽性T細胞 ($\times 10^4$ 個)	CD8陽性T細胞 ($\times 10^4$ 個)	$\gamma\delta$ T細胞 ($\times 10^4$ 個)	IgM陽性細胞 ($\times 10^4$ 個)
C (コントロール) 群	3.92 \pm 1.43	8.35 \pm 1.99	8.12 \pm 2.24	8.23 \pm 4.68	18.28 \pm 8.11
V (ワクチン投与) 群	5.06 \pm 1.40	10.09 \pm 1.26	9.65 \pm 1.55	9.97 \pm 4.95	20.88 \pm 8.13

個/ml, C群 $3.92 \pm 1.43 \times 10^5$ 個/mlであり, 有意差は認められなかった.

リンパ球サブセットにおいて, CD4陽性T細胞数はV群 $10.09 \pm 1.26 \times 10^4$ 個/ml, C群 $8.35 \pm 1.99 \times 10^4$ 個/ml, CD8陽性T細胞数はV群 $9.65 \pm 1.55 \times 10^4$ 個/ml, C群 $8.12 \pm 2.24 \times 10^4$ 個/ml, $\gamma\delta$ T細胞数はV群 $9.97 \pm 4.95 \times 10^4$ 個/ml, C群 $8.23 \pm 4.68 \times 10^4$ 個/ml, IgM陽性細胞数はV群 $20.88 \pm 8.13 \times 10^4$ 個/ml, C群 $18.28 \pm 8.11 \times 10^4$ 個/mlであった. 各サブセットとも有意差は認められなかった.

(3) 各検査項目とADAとの相関

初乳中免疫グロブリン濃度と初乳中ADA活性の関連性(図1)は, IgG1濃度には $r=0.698$, $p<0.05$ で有意な相関が認められた. IgG2, IgM, IgA濃度との相関係数はそれぞれ $r=0.158$, $r=0.387$, $r=0.480$ で有意な相関は認められなかった.

初乳中リンパ球数および各リンパ球サブセットと初乳中ADA活性の関連性(図2)は, CD4陽性T細胞数とは $r=0.721$, $p<0.05$ で有意な相関が認められた. リンパ球数, CD8陽性T細胞, $\gamma\delta$ T細胞, IgM陽性細胞数との相関係数はそれぞれ $r=0.305$, $r=0.379$, $r=0.190$,

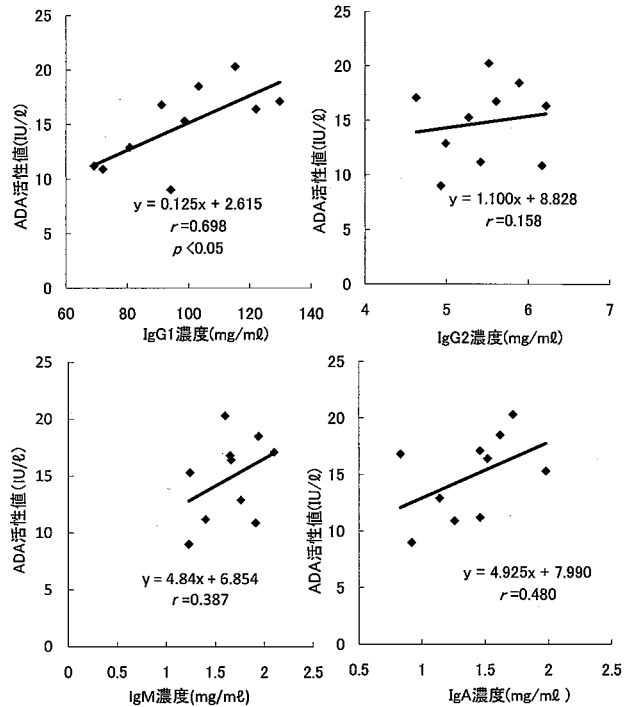


図1. 初乳中免疫グロブリン濃度と初乳中ADA活性の関連

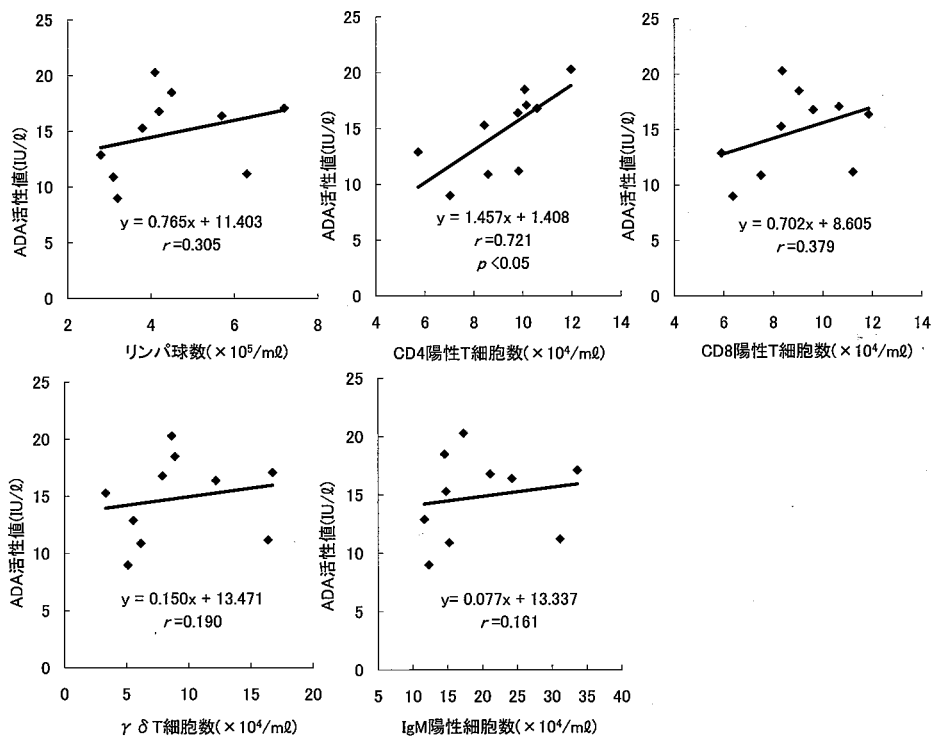


図2. 初乳中リンパ球数および各リンパ球サブセットと初乳中ADA活性の関連

$r=0.161$ で相関は認められなかった。

4. 考 察

牛新生子の免疫機能は、成牛と比べて未熟と考えられているが、十分には解明されていない。ヒト新生児ではT細胞のサイトカイン産生機能は低く [8]、B細胞でも抗体のクラススイッチ機能が成人と比べて低い [9] ことが知られている。牛においても新生子のリンパ球には活性化したメモリー細胞が殆んど存在しないことがわかっている [10]。

初乳中には免疫グロブリンの他に、リゾチームやラクトフェリンなどの抗菌作用を持つ物質、サイトカインおよびビタミンが多量に含まれている。近年、初乳中に含まれる細胞と新生子免疫との関連性が注目されている [11]。初乳中リンパ球は新生子豚に摂取された後に、消化管で36時間まで生存し、その一部の細胞は消化管壁を通過し乳び管や腸間膜リンパ節にまで移動し、これが感染防御に役立っている可能性が指摘されている [11]。さらに、細胞成分を含んだ初乳を飲ませた新生子牛では細胞成分を含まない初乳を飲ませた個体に比べ、毒素原大腸菌に対する抵抗性が高く、初乳に含まれる細胞成分は新生子にとって重要な免疫学的役割を担っている [12]。

大腸菌ワクチンを接種したところ、V群の初乳中免疫グロブリン濃度はIgG1とIgAにおいてC群より有意な高値を示した。初乳中の免疫グロブリンはヒトではIgAが主であるのに対して、牛ではIgGが主体である [1]。これは、ヒトにおいてIgG抗体は胎盤を通過して胎児に、IgAは母乳を介して新生児へと伝播されるのに対して、牛では、免疫グロブリンが胎盤を通じて胎子移行しない [1] ためと考えられる。初乳中の免疫グロブリンは、牛新生子血清に移行して血清免疫グロブリンとして感染を防御する以外に、血清中の免疫グロブリンが分泌液中に移行して局所の感染を防御する場合がある [13]。牛の初乳中に含まれるIgAはヒトと異なり、粘膜防御の主体となる分泌型IgA (secretion IgA : sIgA) は少なく、非分泌型IgAが主体である [13]。しかし牛では、母牛由来の免疫グロブリンを腸管から選択することなく吸収するため、他の哺乳類と異なりIgAおよびsIgAは牛新生子血清中に一時的に出現する [13]。牛で血中に移行したIgAおよびsIgAは25日の半減期で急速に消失するまでの間に、腸管粘膜の分泌液中に移行し、局所の感染防御に役立っている [13]。さらに、初乳を摂取した牛新生子の血清IgMとIgA濃度は下痢発症と深く関係する報告があり [14]、牛の初乳中IgAはヒトと同様に粘膜免疫に有効に作用していると考えられている。

免疫グロブリンの働きの中で、毒物やウイルスに結合

してそれを無害化することや、白血球の食殺菌作用を助けることは非常に重要なものであるが、そのような働きを示す中和抗体やオプソニン抗体のほとんどはIgGに属している。牛の初乳中免疫グロブリン組成では、IgG1が80%以上を占め、それは血清中濃度の6倍に達する [15]。これは牛において、IgG1産生形質細胞が、分娩時まで乳腺上皮下に集積し、また、レセプターを介して血中から選択的にIgG1を取り込んで、乳中に蓄積しているためである [16]。V群において初乳中Ig量、特にIgG1とIgAの濃度が有意に高かったことは牛新生子の感染症予防において有意義であることが示唆された。

本試験において、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、IgM陽性細胞数全てにおいてV群とC群の間には有意差が認められなかった。乾乳期の乳中Tリンパ球組成はCD 8陽性T細胞が主体である泌乳期のものとは異なり、CD4陽性T細胞主体へと変動する [17]。CD4陽性T細胞は細胞性免疫を担う1型ヘルパー T細胞 (Th1細胞) と液性免疫を担う2型ヘルパー T細胞 (Th2細胞) に大きく分類され、Th1細胞はインターロイキン2 (IL-2) やインターフェロン γ (IFN- γ) を産生し、マクロファージや細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラー細胞 (NK細胞) を活性化し細胞性免疫を増強する [18]。Th2細胞はIL-4, IL-5, IL-6, IL-10を産生し、B細胞を活性化し、免疫グロブリンの産生を促進させ、液性免疫を増強する [19]。本試験では初乳中のIgG1とIgAの濃度に群間の差が認められたにもかかわらず、V群のCD4陽性T細胞がC群に比べて若干高い平均値を示したものの有意差はなかった。初乳における液性免疫と細胞性免疫の関係については、さらに例数を増やして検討する必要がある。

CD4陽性T細胞数と初乳中ADA活性値に有意な相関が見られ、初乳中ADA活性はCD4陽性T細胞由来が主である可能性が示唆された。これは、初乳中ADA活性値は常乳中のそれよりも高く [7]、乳牛の乳腺上皮内および乳汁中のT細胞の構成内容は、泌乳期に主体をなすCD8陽性T細胞から乾乳期ではCD4陽性T細胞に劇的に変動する [17] ことによるものと考えられた。

初乳中ADA活性値は初乳中IgG1濃度とも有意な相関がみられた。本研究のV群において、初乳中ADA活性値が有意に高かったことや、IgG1の濃度が高かったこと、大腸菌ワクチン製剤にアジュバントとして含まれるサポニンが液性免疫を強く誘導すること [20] より、初乳中ADA活性値の高値はCD4陽性T細胞の中でも液性免疫の主体となるTh2細胞由来である可能性が示唆された。

以上より、大腸菌ワクチン投与は初乳においてワクチン固有の特異的線毛抗原抗体を増強するばかりではな

く、サポニンによる非特異的液性免疫増強作用があること、また、初乳中ADA活性値は初乳の液性免疫状態を知る指標になり得ることが示唆された。

5. 謝 辞

薬剤および資料をご提供いただいた日本全薬工業株式会社およびメリアルジャパン株式会社に深謝します。

6. 引用文献

1. Wallach D : Placental structure and transmission of maternal immunity, *Vet Rec*, 95, 573-574 (1974)
2. Kanamaru Y, et al. : The differential enzyme susceptibility of bovine IgG1 and IgG2, *Agric Biol Chem*, 41, 1203-1210 (1977)
3. Jan CL : Cellular components of mammary secretions and neonatal immunity, *Vet Res*, 27, 403-417 (1996)
4. Baelington N : Vaccination of cows with a K 99 extract to protect newborn calves against experimental enterotoxigenic colibacillosis. *Infect Immun*, 27, 21-24 (1980)
5. Gines S, et al. : Regulation of epithelial and lymphocyte cell adhesion by adenosine deaminase-CD26 interaction. *Biochem J*, 15, 203-209 (2002)
6. Shore A, et al. : Role of adenosine deaminase in the early stages of precursor T cell maturation. *Clin Exp Immunol*, 44, 152-155 (1981)
7. 佐藤雅彦, 他 : 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. *産業動物臨床医誌*, 1, 197-202 (2011)
8. Pillay V, et al. : Circulating cytokine concentrations and cytokine production by monocytes from newborn babies and adults, *Pflugers Arch*, 428, 197-201 (1994)
9. Splawski JB, et al. : Delineation of the functional capacity of human neonatal lymphocytes, *J Clin Invest*, 87, 545-553 (1991)
10. Wilson RA, et al. : T-cell subsets in blood and lymphoid tissues obtained from fetal calves, maturing calves and adult bovine, *Vet Immunol Immunopathol*, 53, 49-60 (1996)
11. Williams PP : Immunomodulating effect of intestinal absorbed maternal colostrum leukocytes by neonatal pigs, *Can J Vet Res*, 57, 1-8 (1993)
12. Riedel-Caspari G : The influence of colostrum leukocytes on the course of an experimental *Escherichia coli* infection and serum antibodies in neonatal calves, *Vet Immunol Immunopathol*, 35, 275-288 (1993)
13. Porter P : Structural and functional characteristics of immunoglobulins of the common domestic species, *Adv Vet Sci Comp Med*, 23, 1-21 (1979)
14. 畠山勝広 : 初乳給与後における子牛血清各種免疫グロブリン量の測定, *日獣会誌*, 30, 31-35 (1986)
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. Barrington GM, et al. : Expression of immunoglobulin G1 receptor by bovine mammary epithelial cells and mammary leukocytes, *J Dairy Sci*, 80, 86-93 (1997)
17. Yang TJ, et al. : Lactation stage-dependent change of lymphocyte subpopulation in mammary secretions : Inversion of CD4⁺/CD8⁺T cell ratios at parturition, *Am J Reprod Immunol*, 37, 378-383 (1997)
18. Covert J, Splitter G : Detection of cytokine transcriptional profiles from bovine peripheral blood mononuclear cells and CD4⁺ lymphocytes by reverse transcriptase polymerase chain reaction, *Vet Immunol Immunopathol*, 49, 39-50 (1995)
19. Romagnani S : Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease, *Int J Clin Lab Res*, 21, 152-158 (1991)
20. Oda K, et al. : Relationship between adjuvant activity and amphipathic structure of soysaponins, *Vaccine*, 21, 2145-2151 (2003)

Immune substances and ADA activity in colostrum after administration of *E. coli* vaccine in Holstein cows

K. Okada^{1,2)†}, M. Sato¹⁾, M. Aoki^{1,2)}, T. Nakamura³⁾, S. Sato^{1,2)} and J. Yasuda^{1,2)}

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

2) *Department of Clinical Veterinary Science, The United Graduate School of Veterinary Medicine, Gifu University, Gifu*

3) *National Livestock Breeding Center IWATE Station, Morioka*

ABSTRACT We examined the number of lymphocytes, lymphocyte subsets, the concentration of immunoglobulins and adenosine deaminase (ADA) activity in colostrum after administration of *E. coli* vaccine to dairy cows during the dry period. Healthy postparturient Holstein cows, which were negative for both mastitis and bloody milk, were divided into two groups; five were vaccinated (V group) and the other five were untreated as controls (C group).

The number of lymphocytes, CD4-positive T cells, CD8-positive T cells, $\gamma\delta$ T cells and IgM-positive cells was not significantly different between the V and C groups. The mean ADA activity was 17.5 ± 1.9 IU/ ℓ in the V group and 12.2 ± 2.9 IU/ ℓ in the C group, significantly higher in the V group. A significant correlation was observed between the number of CD4-positive T cells and the ADA activity. IgG1 and IgA concentrations were significantly higher in the V group than in the C group. A significant correlation was observed between the concentration of IgG1 and the ADA activity.

These results suggest that *E. coli* vaccine results in reinforcement of humoral immunity in colostrum. In addition, it was suggested that ADA activities in colostrum might be a good indicator of the status of humoral immunity in colostrum.

—Key Words : adenosine deaminase (ADA), colostrums, *E. coli* vaccine, lymphocyte subsets

† 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. 2(1): 1-6, 2011