

博士論文

飼養環境が育成牛の
生体機能に及ぼす影響に関する研究

吉田 茉純

目次

第1章 序論.....	1
1-1 牛の飼養の歴史.....	2
1-2 飼養環境と生体機能.....	3
1-3 心拍変動解析による自律神経系機能.....	4
1-4 Oxytocin, Vasopressin の鼻腔内投与について.....	6
1-5 本研究の目的.....	7
第2章 疾病に罹患した成牛における自律神経系機能の変化.....	8
2-1 緒言.....	9
2-2 材料および方法.....	9
2-3 結果.....	11
2-4 考察.....	11
第3章 育成牛において実験的に初期感染状態を誘発した際の生体機能変化.....	19
3-1 緒言.....	20
3-2 材料および方法.....	20
3-3 結果.....	24
3-4 考察.....	26
第4章 群飼育への移行が育成牛の生体機能に及ぼす影響.....	48
4-1 緒言.....	49
4-2 材料および方法.....	49
4-3 結果.....	53
4-4 考察.....	54
第5章 Oxytocin, Vasopressin の鼻腔内投与が育成牛の生体機能に及ぼす影響.....	80
5-1 緒言.....	81
5-2 材料および方法.....	81
5-3 結果.....	87
5-4 考察.....	88
第6章 総合考察および総括.....	104

6-1 総合考察	105
6-2 総括	107
謝辞	111
文献	112

第 1 章

序論

1-1 牛の飼養の歴史

牛 (*Bos taurus*) は、肉、乳製品、皮革および肥料となる糞などを得ることができることから、世界的にも重要な家畜として人類の生活に大きく関わってきた¹。紀元前3000年代にはメソポタミアやエジプトで牛乳が飲まれていたことが知られており、家畜の乳の中でも最も古くから利用されていたと考えられている²。牛乳を飲む習慣は、アリア人と共に中東からインドへ向かうルートと、ゲルマン人と共に中東から中央ヨーロッパを通過して北ヨーロッパに広がる2種類のルートで伝わったと考えられており³、中世における乳牛と食用牛の育種改良や飼料の栽培を通して近代的な畜産の発展に繋がってきた。

わが国においては、天智天皇の時代には官営牧場が全国に設けられ搾乳目的の畜産がすでに行われており、牛乳や乳製品は非常に貴重な滋養として尊ばれたようである。当時は「蘇」という乳製品が作られ孝徳天皇にも献上されたという記録も残されている。しかしながら、本格的な酪農への関心は長い間注がれることはなかった。江戸時代になってオランダ人から牛乳や乳製品の栄養的価値が伝わるとともに蘭学者や蘭医の間で知られるようになり、酪農製品に対する関心が再び高まるようになった。享保12年(1727)年には、インド産の白牛を3頭移入し、これを房総の嶺岡牧場で飼養繁殖して搾乳が行われるようになった。嶺岡牧場は幕末まで幕府の直営であり白牛は4~500頭に達したといわれているが、明治維新とともに明治政府に移管された。明治6年(1874年)には地方にも屠殺場が開設され、明治17年(1885年)になると兵庫、滋賀、三重や愛知で牛の肥育が始まった。明治19年(1887年)には軍の食料として牛肉が用いられるようになり、明治10年(1878年)には34,000頭だった屠殺頭数は明治33年(1900年)にはおよそ20万頭に達した。安政年間以来、西洋諸国と通商を行うことになってからは、外国人居留地における乳製品の需要が高まった。在留外国人を通じて日本人にも乳製品の効用が知られるようになり、牛乳を飲み、あるいは搾乳を行って商売を行うような者も現れはじめた。明治18年(1886年)には、「東京府下牛乳搾取販売営業組合」が結成され、これがわが国における最初の酪農組合であ

ると考えられている。また同組合ははじめて乳牛共進会を開催するとともに、生乳や乳製品の品質や衛生を保つための法律や制度の確立にも貢献した²。

戦後、昭和 22 年（1947 年）の農地解放により農家の生産意欲が高まり、昭和 29 年（1954 年）にはアメリカからの輸入穀物が飼料として用いられはじめ、昭和 30 年代には食の洋風化が進み牛肉やバターやチーズの消費が大きく増加した。このような状況において飼養規模は、戦後においても稲作や畑作の傍らで 2~3 頭の牛を飼う農家がほとんどであり、昭和 40 年代においても 1 戸あたりの平均飼養頭数は 3.4 頭であった。その後、経済成長に伴い合理化、集約化および大型化が進んだ結果、酪農家戸数は昭和 38 年（1963 年）をピークに、昭和 60 年には約 8.2 万戸、平成 26 年（2014 年）には約 1.9 万戸と減少し、その反面、1 戸あたりの平均飼養頭数は増加を続けている³。そのため、より省力化や効率化が求められるためロボット哺乳などが普及する一方で、集約型の飼養環境に潜むストレスに起因する日和見感染症や牛呼吸器症候群などの複合感染症が、予防・治療困難な疾病として問題となってきた^{4,5}。

1-2 飼育環境と生体機能

牛は生まれてから約 2~3 カ月の間は黒毛和種であれば母牛の元で、乳用種であれば個別哺育施設で哺乳される。離乳をした育成牛の飼養形態は生産農家によって異なるが、たいていは群で飼育をする。群飼育を行う理由として、ウシが社会性のある動物であるため、仲間と触れ合える環境で生活することが性質上適している^{6,7}ことや、スターター（濃厚飼料）の食い込みが向上する⁸、新規環境やハンドリングに対する恐怖が軽減する⁷といった利点があげられる。EU では 8 週齢を過ぎた子牛は社会的行動のとれる群管理施設で飼養することを義務づけている⁹。アメリカ合衆国のいくつかの州では、肥育用育成牛に対し個別飼育を禁じることを法で定めている¹⁰。しかし、牛は体格で序列が決まるため、新しく群に導入した牛は弱い立場におかれる場合が多く、餌場や水場が十分な大きさではない場合や飼養密度が高い環境では、序列の高い個体の攻撃を受けやすく精神的なストレスも大きい¹¹。特に、呼吸器病の拡大が問題とな

る群編成における生体機能の変化に注目したい。Abdelfattah ら (2013) は、飼育密度が高い群では低い群と比べると咳の回数が増えることを報告している¹²。また、群編成を繰り返すことによりストレスの指標として扱われる血中 Cortisol や、エネルギーバランスが負へ傾くことを示唆する遊離脂肪酸や β ヒドロキシ酪酸が高く推移することが知られている¹³。飼養環境のストレスが生体機能変化を起こすメカニズムとして、HPA 軸の活性化により Cortisol が増加すると、免疫機能が抑制されるため白血球の細胞表面抗原の発現量や貪食能の低下などをもたらす¹⁴。病原体や異物の侵入に対して血管壁への遊走や接着に重要な CD62L や CD11b という細胞表面抗原を白血球は発現するが、ストレス状態ではこれらのダウンレギュレーションが起こるため接着能が低下すると考えられている。さらに、初期防衛に関わる好中球や単球などの貪食能も低下し、病原体や異物への攻撃力が弱まるために易感染状態が招来される。したがって、ストレスに起因する免疫機能低下によって起こる易感染状態を予防することは重要な課題である。

1-3 心拍変動解析による自律神経系機能評価

家畜の健康状態を把握することは、飼養管理の上で生産性の向上や経済的な損失を防ぐ意味においても非常に重要なことである。生体機能の調節機構として自律神経系機能が、生体の恒常性を維持するために働いている。自律神経系の活動は年齢や疾患などを含め様々な要因によって変化するが、ヒトの心臓疾患、感染症や代謝性疾患など多くの病態において副交感神経系活動の低下や自律神経系機能の乱れが報告されている¹⁵⁻¹⁷。このように健康状態と密接に関わる自律神経系機能を評価する方法として、ヒト医療においては心電図記録を用いた心拍変動解析が広く利用されている。心拍変動とは個々の心拍のゆらぎのことを指しており、通常心電図の RR 間隔の変動として理解されている。心臓の拍動は交感神経系と副交感神経系によって拮抗的に支配されており、両神経の活動バランスが心拍数や心拍変動として反映されている。Eppiger and Hess (1915) は心拍変動が疾病における自律神経系の異常を示す可能性を 100 年前

にすでに投げかけている。心拍変動の存在と発生への自律神経系機能の関与が認識されるようになり、1960年代に入ると心拍変動を解析することによる自律神経系機能評価の試みが始まった。Hon and Lee (1965)は、胎児のストレスは心拍数に明らかな変化が認められる前に心拍変動の減少によって進行する¹⁸と報告している。そして、Sayers (1973) は心拍変動の周波数解析法とその臨床的意義について明らかにした¹⁹。1970年代に入ると、心拍変動が糖尿病の神経障害²⁰、心筋梗塞の予後²¹に深く関わりがあることが明らかになった。

心拍変動解析は、RR 間隔の時系列データを使用し、この時系列データの変動量、周期性やパターンを分析することにより自律神経系機能の評価するものである。解析方法としては大きく分けて、時間領域 (Time domain) および周波数領域 (Frequency domain) 分析法が知られている。時間領域分析法は、データの順序に依存しない変動の量を測定するものであり、一定の時間における変動の大きさを N-N 間隔 (連続する2つの洞調律 QRS 波からなる R-R 間隔) の平均値や標準偏差といった統計量を求めて自律神経系機能の評価するものである。一方、周波数領域分析法では、RR 間隔の変動をタコグラムと呼ばれる複数の周波数の波動として表し自律神経系機能に由来する周波数帯域の波を分離評価する方法である。周波数帯域としては、超低周波数領域 (Very Low Frequency; VLF)、低周波数領域 (Low Frequency; LF) と高周波数領域 (High Frequency; HF) に分類され、それぞれの領域のパワー値 (msec²) を算出することにより自律神経系機能の評価を行うことができる。心拍変動の高周波成分は呼吸運動に伴う迷走神経緊張に由来している。一方、低周波成分は、Mayer 波とよばれる約 10 秒周期に生じる収縮期血圧の変動²²に由来し、迷走神経および交感神経炎進路の活動に反映される。そのため、HF パワーは副交感神経活動の定量的な指標として扱われ、LF パワーには交感神経系と副交感神経系が関与しているため、LF/HF 比が自律神経系バランスの指標として使用されている。

1-4 Oxytocin, Vasopressin の鼻腔内投与について

Oxytocin, や Vasopressin が神経伝達物質として社会認知、親和性、情動といった大脳辺縁系により制御される機能や視床下部における生理的反応を調節している。Oxytocin と Vasopressin をリガンドとする受容体としては、Oxytocin 受容体および V1a、V1b、V2 受容体が知られており親和性は異なるもののそれぞれの物質が互いの受容体に作動することが可能である。鼻腔内投与法は、鼻粘膜の嗅神経系や三叉神経系を介して血液脳関門の通過が難しい物質を中枢神経系に伝達する方法である²³ ことから、Oxytocin や Vasopressin の中枢作用を臨床的に応用することを目的としても研究が進められている。特に、Oxytocin の鼻腔内投与は扁桃体活動の抑制作用があることから、不安感情やストレス反応の抑制効果として²⁴⁻²⁷、精神疾患の治療への応用も期待されており、様々な動物種における研究も実施されている^{28,29}。一方、Vasopressin の鼻腔内投与は認知機能を高めるという報告³⁰はあるものの、扁桃体の活動を上げることにより不安感情を高めるなど生体にとって利益とならない作用があるため、Oxytocin ほど研究が行われていない。しかし、シリアンハムスターでは嗅覚系による社会行動の一種である flank marking 行動の発現が Oxytocin と Vasopressin のどちらも V1a 受容体に作動することにより促される³¹ ことから、動物種によっては Vasopressin も Oxytocin と同様な作用をもたらす可能性も否定できない。また、ラットでは幼少期に母親からのグルーミングを多く経験するほど不安行動は抑制されるが、グルーミング経験はメスのラットでは中枢神経系における Oxytocin 受容体のリガンドとの結合能を上昇させる一方で、オスでは V1a 受容体のリガンド結合能を上昇させる³² という報告もあり、中枢における不安行動の抑制に関する受容体には性差があることを示唆している。そして、これらの作用の発現機構として嗅神経を介した物質の直接的な輸送によるという説が主流であるが、Veening & Oliver らは嗅神経に発現する V1aAVP 受容体の刺激による電気信号が中枢神経系に到達するという仮説も述べている²⁹。Oxytocin と Vasopressin は構造が類似しており V1aAVP 受容体に対して同等以上の親和性を示す³³ ことから、Oxytocin 以上の効果をもたらす可能性も考えられる。

1-5 本研究の目的

わが国においては、畜産が主要な第一次産業としてその役割を果たしてきたのは第二次世界大戦以降である。畜産食品の消費量増加とともに、家畜の飼養戸数や飼養頭数は増加し畜産物を大量にそして継続的に生産することにより、近代的な畜産経営として発展してきた。しかし、近年では飼養戸数の減少とともに、1戸あたりの飼養頭数は増加し飼養規模は大型化している。家畜飼養の専門化や大型化に伴い、家畜を個体としてではなく群れや集団としてとらえて対応する手法が重要になるとともに、飼養環境の不備や不適切な管理に基づく疾病が増加し、家畜の生産性や収益性に支障をきたすようになってきている。したがって、家畜をより健康的に飼育して安全な畜産物を安定的に生産するために、予防衛生的な視点からの飼養環境や管理衛生が重要となってきている。育成牛においても集約型の飼養環境に潜むストレスに起因すると考えられる日和見感染症や牛呼吸器病などが制御困難な疾病として問題となっており、飼養環境が生体機能に及ぼす影響を解明し健康を維持できる飼養形態を確立することが喫緊の課題として求められている。自律神経系、免疫系、内分泌系は生体内でネットワークを形成することで恒常性を維持している。そのなかでも、自律神経系機能は心電図記録から評価が可能であることから、飼養環境において刻々と変化する生体機能を捉えるのに有用であると推測される。そこで、本研究では飼養環境が生体機能に及ぼす影響を自律神経系機能の変化を中心に内分泌系や免疫系との関連も含めて明らかにするとともに、予防管理的な視点から病態発症を緩和する可能性が期待されている Oxytocin や Vasopressin の効果に関しても明らかにすることを目的とした。

第2章

疾病に罹患した成牛における 自律神経系機能の変化

2-1 緒言

家畜の健康状態を把握することは、飼養管理の上で生産性の向上や経済的な損失を防ぐ意味においても非常に重要なことである。ヒト医療においては、心電図記録を用いた心拍変動解析が心臓疾患、感染症や代謝性疾患など多くの病態における自律神経系機能の変化や病勢あるいは予後を知る上で広く利用されている。ウシにおいても搾乳システムの違いや去勢、除角などによる影響について本法を利用して検討した研究が報告されている³⁴⁻³⁷ものの、病勢や病態を把握するための研究や臨床には応用されていない。自律神経系の活動は年齢や疾患などを含め様々な要因によって変化することから、ウシにおいてもこれらの変化を心拍変動解析によって検出することが可能であると考えられる。そこで、本章では非侵襲的な自律神経系機能の評価法として利用されている心拍変動解析を用いて、乳用牛における病態の把握に対する有効性について明らかにすることを目的とした。

2-2 材料および方法

供試動物

ホルスタイン雌成牛 9 頭を供試した。5 頭は臨床的に健康な動物 (CH: n = 5) で、4 頭は麻布大学大附属大動物病院の入院患畜 (HP: n = 4) である。動物の診断名等の情報は Table 2-1 に記載した。CH 群と HP 群はそれぞれ別の施設で飼養されていたものの、柵に囲われ、床材としておがくずの敷かれたスペースで自由に身動きがとれる環境で管理された。どちらの施設においても照明時間の正確な管理はされていなかったが、朝は早くて 7:00 に点灯、夕方は遅くて 19:00 には消灯されていたため、明期 (Light) を 7:00 – 19:00、暗期 (Dark) を 19:00 – 7:00 と定義した。施設の清掃と給餌および HP 群の搾乳や医療的処置は 7:00 – 9:00 と 16:00 – 18:00 の間に行われたが、試験期間においては治療に伴うストレスを最小限にするために HP 群への処置は生菌製剤 (Bovactin®) の経口投与に限られていた。

採血

ホルター心電図記録を行う日の2日前後以内に血液検査のための採血を頸静脈よりプレーン採血管を用いて行った。血液は凝固させた後、遠心分離し血清を分離し生化学項目の測定を実施した。

ホルター心電図記録および心拍変動解析

ホルター心電計 (SM-50; Fukuda Denshi Co., Ltd, Tokyo, Japan) を使用し、心電図記録は A-B 誘導で行った。ホルター心電計は手製の腹帯を作成しその中に固定した。

記録した心電図は ECG processor analyzing system (SRV-2W, Softron Co., Ltd, Tokyo, Japan) によって解析した。はじめに R 波を検出し、RR 間隔のタコグラムを算出した後、200 msec で再サンプリングした 512 ポイントのデータセットからハニングウィンドウ処理をした後に高速フーリエ変換法を用いてパワースペクトラムを得た (Figure 2-1)。1-3 で述べたように、心拍変動の高周波成分は呼吸による迷走神経緊張に由来するため、高周波数帯域は、ウシの呼吸の周波数が含まれるように設定した。従って、周波数帯域は、低周波数領域 (Low Frequency; LF) は 0.04–0.1Hz、高周波数領域 (High Frequency; HF) は 0.1 – 1.0 Hz に設定した。解析指標として、心拍数(HR)、LF 値、HF 値および LF/HF 比を求め、自律神経機能の指標とした。

統計解析

群間の差の検定には Mann-Whitney's U test を用い、群内における昼間と夜間の差の検定には Student's *t* test を用いた。変数の比較において、*p* 値が 0.05 未満を有意と定義した。

2-3 結果

Table 2-2 に血液検査の結果を示した。赤血球数およびヘマトクリット値は HP 群で有意に低く、好中球 / リンパ球比および肝機能障害指標の 1 つである AST は HP 群で有意に高かった。しかし、AST は 45 – 110 の正常範囲を超えた動物は無かった。

いずれの動物の心電図にも不整脈は認められなかった。HP 群における HR の 1 日における平均値 (93.0 ± 5.5 bpm) は CH 群のそれ (71.4 ± 8.5 bpm) に比べ有意に高かった。CH 群においては明期 (Light) における HR が暗期 (Dark) よりも高いという日内変動パターンが認められ (Figure 2-2)、心拍変動指標にも同様な日内変動がみられた。しかし HP 群ではこれらの指標に明瞭な日内変動は認められなかった。CH 群、HP 群 HR の平均値は昼間が夜間よりも有意に高かった (Figure 2-3)。また、CH 群では、HF 値は夜間に高く、LF/HF 比は昼間に高い傾向であったが、HP 群はどちらも昼間と夜間で差は認められなかった。CH 群と HP 群を比較すると、昼間、夜間ともに LF 値および HF 値は CH 群で高く、LF/HF 比は夜間で HP 群が有意に高かった。

2-4 考察

一般的に HF 値は副交感神経活動を反映し、LF 値は交感神経系と副交感神経系のどちらの影響も受けているため、LF/HF が自律神経のバランスを表す指標として使用されている。これらの指標の日内変動は、すでに健康なウマやミニブタで報告がある^{38,39}が、健康な乳牛においても同様な特徴のあることが明らかとなり、昼間には交感神経系が、夜間においては副交感神経系が優位になることが示唆された。

一方で、疾病に罹患した乳牛では顕著に自律神経系のバランスが交感神経系優位な状態になるためにこの自律神経系機能の日内変動が不明瞭になっていた。この結果は、サラブレッド馬の輸送ストレスの影響に関する研究結果とも一致している⁴⁰。一般的には輸送時の自律神経機能の変化はストレスやそれに付随する免疫機能の抑制と関連していると考えられている。その他の動物種においても、菌血症や敗血症⁴¹、慢性肝障害⁴²、呼吸器疾患⁴³などの研究においても心拍変動の減少がみられることが報告

されている。これらの報告は、心拍変動解析が乳牛においても病態を把握する上で有用であることを推奨すると共に、昼間において心拍数は群間に有意な差はないにもかかわらず HF は減少していたことから、心拍数では評価しえない自律神経系機能の変化も検出可能であることを示唆していると考えられた。

試験に供した動物の疾患は、感染性・非感染性のどちらの疾患も含まれていたが、肝細胞の逸脱酵素である AST が有意に高かったため、健康な動物と比べると多少は肝細胞の傷害が起きていたことも否定はできない。しかしながら、すべての動物が正常範囲の数値を示していたことから、肝機能には大きな問題は無く心拍変動解析にも影響を及ぼしてはいないと考えられた。一方、疾患群のヘマトクリット値は標準範囲を下回っていたことからこれらの牛は貧血状態にあった可能性が高い。本研究では赤血球容積や赤血球色素について測定は行っていないため貧血の病型分類は不可能であったが、慢性炎症では鉄利用やエリスロポエチンによる造血の阻害が生じる⁴⁴ため、低色素性の赤血球や赤血球数そのものの減少が想定され慢性炎症の病態であったと推測された。1週間以上にわたって炎症反応が続いた状態は慢性炎症と定義されるが、慢性の経過をたどる炎症性疾患においては交感神経系が優位な状態が病態に関与する⁴⁵という報告もある。心臓疾患がなく臨床的には健康と判断される場合でも、炎症マーカーの1つである C 反応性蛋白の高値で認められ、潜在的な炎症状態を呈した患者において心拍変動の減少も報告されている⁴⁶。これらの結果は本研究で乳牛において認められた疾患群における自律神経系機能変化をサポートするものと考えられた。

小括

本章では、非侵襲的な自律神経系機能の評価法として利用されている心拍変動解析が、乳用牛における病態の把握に有効かどうかを明らかにするために、ホルスタイン種の臨床的に健康な雌成牛と疾患が認められた雌成牛からホルター心電図を記録し心拍変動解析を行った。疾患動物の診断名は乳房炎、肝機能障害、第四胃変位であったが、血液検査で正常範囲を大きく逸脱した項目は見られなかった。一方、心拍変動

解析の結果から疾患動物では心拍数の有意な増加や副交感神経活動の指標である HF 値の有意な低下、自律神経系バランスの指標である LF/HF 比の有意な増加が認められた。また、健康動物で認められたこれらの指標における日内変動が疾患動物では消失していた。これらの結果から、疾患動物では副交感神経系機能の減弱により自律神経系機能のバランスとしては交感神経系が優位な状態にあることが明らかになった。そして、心拍変動解析による自律神経系機能の評価が乳用牛の病態を把握する上で有効な手法であることが明らかになった。

Table 2-1 Information for the cows used in this experiment

	Cow	Age (years old)	Lactation	Diagnosis
CH	1	5	Non-lactating and nonpregnant	—
	2	12	Non-lactating and nonpregnant	—
	3	9	Non-lactating and nonpregnant	—
	4	6	Non-lactating and nonpregnant	—
	5	6	Non-lactating and nonpregnant	—
HP	6	8	8 months pregnant	Right abomasal displacement
	7	5	Lactating	Hepatic dysfunction
	8	3	Lactating	Chronic mastitis
	9	6	Non-lactating and nonpregnant	Chronic pyogenic mastitis

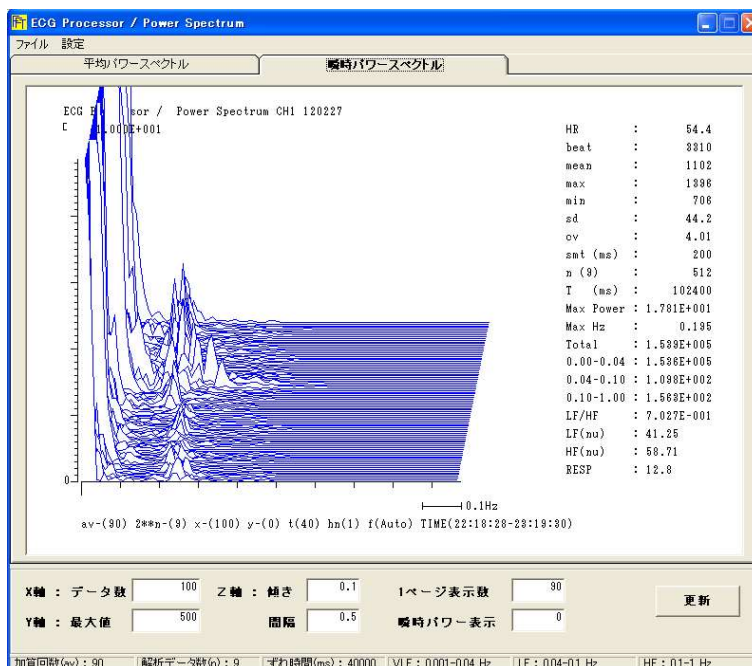
CH, Clinically healthy cows; HP, Hospitalizing cows.

Table 2-2 Complete blood cell count and serum chemistry of the cows

Group	ID	RBC ($10^4/\mu\text{L}$)		WBC ($10^3/\mu\text{L}$)		Lym (%)		Neut (%)		N:L		Ht (%)		AST (U/L)		ALP (U/L)		GGT (U/L)		T-Cho (mg/dL)		TG (mg/dL)		T-Bil (mg/dL)		K (mM/L)		Cl (mM/L)	
		500-800	5000-12000	5000-12000	5000-12000	45-75	15-45	0.3-0.6	34-40	45-110	15-150	6.1-17.4	100-180	30-70	0.1-0.8	3.9-5.3	96-110												
CH	1	548	62	67.3	27	0.4	38	41	54.3	26	53	18	0.09	4.6	105.7														
	2	681	58	55.4	40.1	0.7	42	34	50.5	25	61	37	0.1	3.47	102.4														
	3	747	60	68.6	22.1	0.3	42	36	227	16	108	30	0.08	3.79	102.6														
	4	599	62	70.8	27.4	0.4	32	44	53.6	27	75	8	0.05	4.07	98.2														
	5	846	70	69.7	22.6	0.3	39	46	60.9	8	48	15	0.04	4.23	100.5														
HP	6	575	61	55.5	43.5	0.8	32	96	49.1	26	93	9	0.4	4.5	106.4														
	7	475	47	59.6	25.9	0.4	26	58	54.7	43	130	6	0.23	4.09	98.5														
	8	517	107	51.5	41.4	0.8	28	43	94	23	82	12	0.04	4.29	98.2														
	9	565	89	32.7	63.2	1.9	26	71	78	17	17	17	0.21	3.73	96.2														
CH	mean \pm SE	684.2 \pm 52.9 ^a	62.4 \pm 2.0	66.4 \pm 2.8	27.8 \pm 3.25	0.43 \pm 0.07	38.6 \pm 1.8 ^a	40.2 \pm 2.3 ^a	89.3 \pm 34.5	20.4 \pm 5.6	69.0 \pm 10.8	21.6 \pm 5.2	0.1 \pm 0.0	4.0 \pm 0.2	101.9 \pm 1.2														
HP	mean \pm SE	535.0 \pm 23.1 ^b	76.0 \pm 13.5	49.8 \pm 5.9	43.5 \pm 7.65	0.99 \pm 0.33	28.0 \pm 1.4 ^b	67.0 \pm 11.2 ^b	69.0 \pm 10.4	27.3 \pm 0.4	23.5 \pm 0.7	11.0 \pm 2.4	0.2 \pm 0.1	4.2 \pm 0.2	99.8 \pm 0.5														

CH, Clinically healthy cows; HP, Hospitalizing cows; RBC, red blood cell; WBC, white blood cell; Lym; lymphocyte; Neut, neutrophil; Ht, hematocrit; AST, aspartate aminotransferase; GGT, gamma-glutamyl transpeptidase; T-Cho, total cholesterol; TG, triglyceride; K, potassium; Cl chloride. Different letters in superscript indicate significant differences between the groups.

A



B

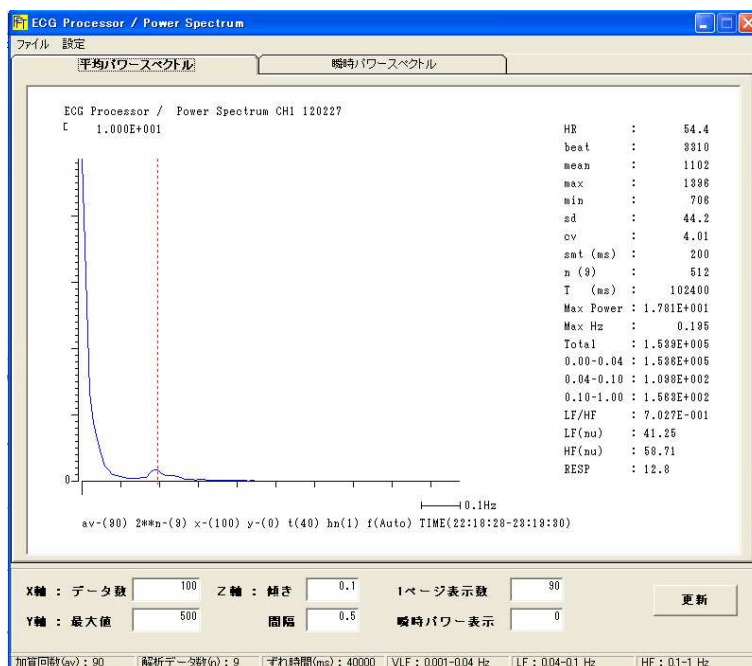


Figure 2-1 Power spectrums of heart rate variability. Low and high frequency are correspondent to 0.04 – 0.1 Hz and 0.1 – 1.0 Hz, respectively. A) Instantaneous power spectrum. Each power spectrum is depicted every 102400 msec. B) Mean power spectrum. LF (low frequency power) and HF (high frequency power) are calculated from area under the blue line corresponding to each frequency band. The red dotted line corresponds to the respiratory frequency.

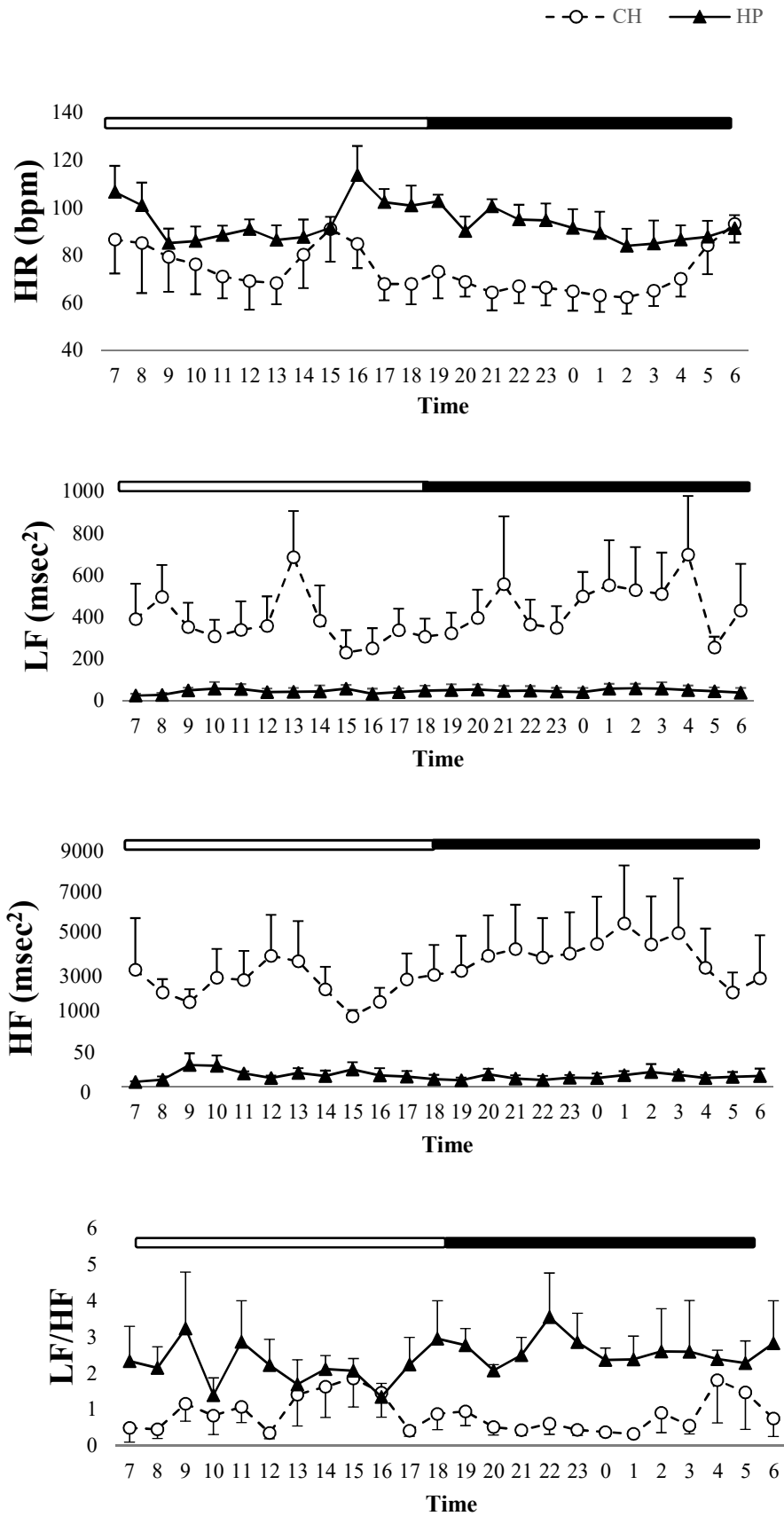


Figure 2-2 Changes in 24-hr plots of heart rate and heart rate variability indices. CH, Clinical healthy cows; HP, Hospitalizing cows; HR, heart rate; LF, low frequency power; HF, high frequency power; LF/HF, LF to HF ratio. Each plot represents mean and SE.

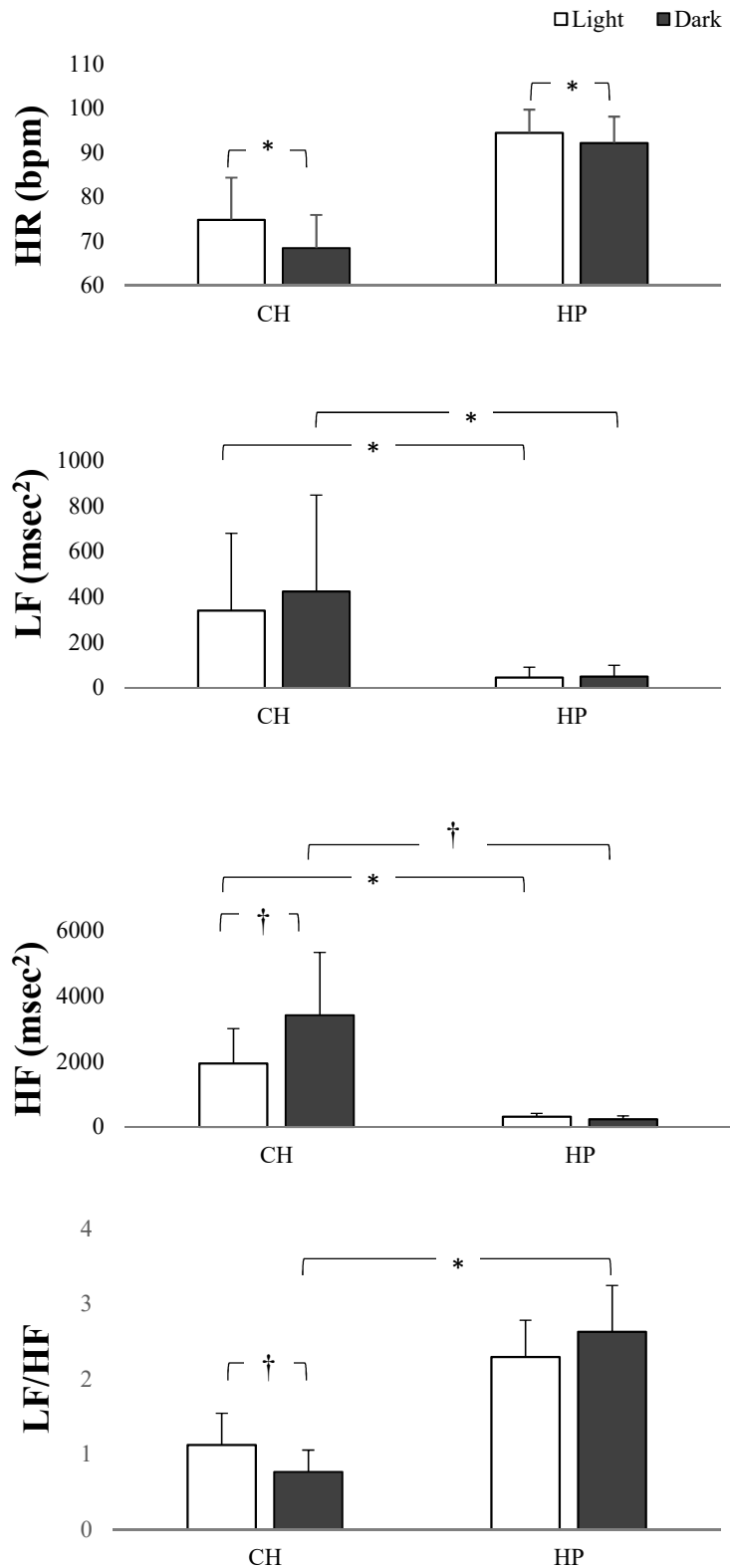


Figure 2-3 Light- and dark-phase heart rate and heart rate variability. Twelve hourly values for each cow in each period were taken and averaged to get the average per cow and then are summarized for each group to get the mean + SE for each of the periods. CH, Clinically healthy cows; HP, Hospitalizing cows; HR, heart rate; LF, low frequency power; HF, high frequency power; LF/HF, LF to HF ratio. Difference between the groups: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

第3章

育成牛において実験的に 初期感染状態を誘発した際の 生体機能変化

3-1 緒言

育成期の子牛にとって感染症はその個体の生産性を低下させるだけでなく、発症個体からの群内への波及が大きな問題となる。発咳や下痢など他への感染源となるような徴候を示す前に感染状態を検知して対処を行うことができれば、発症個体を隔離することにより疾病の蔓延を未然に防ぐことができると考えられる。感染時の病態生理について調べるために、牛においても大腸菌毒素である Lipopolysaccharide (LPS) 感染による実験的感染症モデルを用いた研究が行われてきており⁴⁷⁻⁵²、LPS の投与により濃度依存的に心拍数が上がるといわれている⁵²。一方、LPS は炎症性サイトカインやメディエーターを介して発熱を含めた病態の発症にも関与している。そこで本章では、育成牛を用いて低用量の LPS を投与することにより実験的な感染の初期状態を作出し、生体機能の変化を明らかにすることを目的とした。初期の感染状態を評価するために、Cortisol と TNF- α の血中濃度を測定すると共に血球の細胞分画を測定した。また、生体機能として直腸温度と呼吸数および自律神経系機能を血液検査による免疫機能との関連性から評価した。

3-2 材料および方法

本研究は（独）農業生物資源研究所（現：国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門）の動物実験規定に基づき計画し、実験動物倫理委員会の承認を得た上で行った。

供試動物

実験開始2か月前には去勢を済ませたホルスタイン育成牛6頭(6-8カ月齢, 196.5-294kg)を使用した。実験動物は実験施設においてスタンションで個別飼育をされていた。ゴムマットの床にスタンションで個別に繫留された状態で1回の実験に3頭ずつ実施したため、動物同士の視覚的および嗅覚的な隔たりはなく隣接する動物同士の接触もグルーミング程度なら可能な状態だった。実験施設および採血や心電計装着など

必要な実験手技への馴致を十分に行った後に実験に供した。給餌と施設の清掃は 9-10 時と 16-17 時に実施した。

実験手順

動物実験は（独）畜産草地研究所（現：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門）の動物実験施設にて実施された。

午前 8:00 を 0h とし、0h の採血直後に、5mL の生理食塩水（SAL）もしくは 5ng/kg の LPS(*Escherichia coli* O55:B5, L6529; Sigma, St. Louis, MO) (LPS) を同カテーテルより 1 分間かけて静脈内投与した。牛を対象に LPS 投与により実験的に感染症を再現した研究においては、10ng/kg が最小用量である。この用量では、直腸温度や呼吸数、心拍数が有意に上昇していた。従って、感染状態でありながら臨床徴候が明らかでない状態を再現するためにより低用量の 5ng/kg を投与することにした。生理食塩水、LPS の投与処置は 1 週間をあげ、クロスオーバーデザインで試験を行った。

採血

採血は、0（溶剤投与前）、0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12h に頸静脈に留置したカテーテルから採血を行った。血液はプレーン管、EDTA 添加試験管、ヘパリン添加試験管に入れ、プレーン管血液は凝固させたのち遠心分離機によって血清を分離した。血清サンプルは RIA、EDTA 添加血液サンプルは全血球計算、ヘパリン添加血液サンプルはフローサイトメトリーにそれぞれ供した。

臨床徴候の評価

直腸温度（Rectal temperature）および 1 分間の呼吸数（Respiratory rate）の測定は採血時に行い、臨床徴候の指標とした。

ホルター心電図記録および心拍変動解析

ホルター心電計 (QR2500; Fukuda M-E Kogyo Co., Ltd, Tokyo, Japan) を使用し、心電図記録は A-B 誘導法で行った。実験前日の夕方までに陽極および陰極 (Blue Sensor L-00-S; METS Inc., Tokyo, Japan) をそれぞれ右側肩甲骨および左側胸部にボン드로貼りつけ、ホルター心電計を手製のジャケットに固定した (Figure 3-1)。

心電図記録を用いて 2-2 に記載した手順で心拍変動解析を行い、HR, LF 値, HF 値, LF/HF 比を算出した。

血清 Cortisol 濃度測定

Cortisol は競合的 ELISA 法で測定した。マウス抗コルチゾールモノクローナル抗体 (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) を一次抗体、ヤギ抗マウス IgG-FC 抗体 (Bethyl Laboratories, Inc.) を二次抗体として使用し、Cortisol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) および HRP 標識 cortisol (Cosmo Bio Co. Ltd., Tokyo, Japan) を、それぞれスタンダード、競合用に使用した。当 ELISA 法のアッセイ内、アッセイ間変動係数はそれぞれ約 4.9% と 6.5% である。

炎症性サイトカイン測定

TNF- α は専用キット (Bovine TNF-alpha DuoSet ELISA #DY2279, R&D Systems, Inc., MN, USA) を使用し、付属説明書に従い測定した。

細胞分画の測定

末梢血における細胞分画については EDTA 管に入れた血液から多項目自動血球分析装置 (XT-1800i, Sysmex Corp., Kobe, Japan) により白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、リンパ球数 (Lymphocyte)、好中球数 (Neutrophil)、単球数 (Monocyte)、好中球 / リンパ球比 (N:L) を求めた。

白血球表面抗原解析

フローサイトメトリー法により白血球細胞表面抗原の分析を行った。100 μL の全血サンプルを同量の一次抗体懸濁液 (Table 3-1) に混合し冷暗条件にて 30 分間反応した。F-PBS (1%FCS 含リン酸緩衝溶液) により細胞を洗浄した後、二次抗体として蛍光標識 F(ab')₂ ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体を冷暗条件にて 30 分間反応させた。反応後、再度細胞を洗浄したのち、溶血・固定試薬 (Immunoprep; Beckman Coulter K.K., Tokyo, Japan) を加え、赤血球を溶解し白血球を固定した。各細胞集団 (リンパ球、顆粒球、単球) は前方散乱光 (forward light scatter; FSC) / 側方散乱光 (side light scatter; SSC) にてゲーティングし、表面抗原 CD14 については陽性細胞の割合 (%) を、表面抗原 CD62L は平均蛍光濃度 (MFI) を測定した。

統計解析

統計解析は統計ソフト R (ver. 3.2.4) を使用した。変数の比較において、p 値が 0.05 未満を有意と定義した。

臨床徴候 (Rectal Temperature, Respiratory rate)、細胞分画 (RBC, WBC, Lymphocyte, Neutrophil, Monocyte, N:L)、細胞表面抗原発現量 (CD62L Lym, CD62L Gra, CD62L Mono, CD14+Mono)、血清 Cortisol, TNF- α 濃度 および心拍変動指標 (HR, LF 値, HF 値, LF/HF 比) は一般化線形混合モデルを用いて二元配置分散分析を行い、処置 (SAL, LPS)・時間 (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6h) および処置と時間の交互作用効果を求めた。有意な交互作用効果が認められた場合は Tukey 法による多重比較検定を行い、どの時間帯において群間の差があるか調べた。

臨床徴候、全血球計算、細胞表面抗原発現および心拍変動解析指標は、投与後の反応のピーク値 (最大値もしくは最小値) を投与後の値の代表値とした。SAL・LPS 両群において投与前 (0h) (Pre) の値と反応が最大となった時間 (Max) の値を変数とし、時間 (Pre, Max) と処置 (SAL, LPS) の交互作用効果を二元配置分散分析により調べた。有意な交互作用効果が認められた場合は、Holm test により下位検定を行った。

さらに、すべての項目について 0h から 6h 以内におけるピーク値の 0h からの上昇率 (%) を求めた。各項目の上昇率を用いて反応の個体差を調べた。HF 値、LF/HF 比の反応性により個体を分類するために、クラスター解析 (Ward 法) を行い、HF 値の下降率および LF/HF 比の上昇率により個体を群分けした。LF/HF 比上昇率が最も低いと判断された個体群を LOW (n=3)、その他の個体群を HIGH (n=3) とし、臨床徴候、全血球計算、細胞表面抗原発現量・Cortisol・TNF- α について群間の比較を Student's *t* test で行った。

3-3 結果

Figure 3-1 に示した臨床徴候を見ると直腸温度 (Rectal temperature) は LPS 投与 2 時間後までに緩やかに上昇し、呼吸数 (Respiratory rate) は 1 時間後に一過性に増加した。Figure 3-2 に血清 Cortisol にも投与 1-2 時間での軽度の増加が認められたが、これらの指標と TNF- α 濃度もふくめて時間と処置の間に交互作用効果は認められず SAL と LPS で有意に推移が異なるとはいえなかった。

心拍変動解析指標は LPS 投与による顕著な変化は認められず給餌による影響の方が大きかった。これらの指標におけるいずれの時間帯にも SAL と LPS で有意な差は認められなかった (Figure 3-3)。

Figure 3-4 に全血球計算の結果を示した。赤血球数 (RBC)・リンパ球数 (Lymphocyte)・好中球 / リンパ球比 (N:L) おいて、処置と時間の交互作用効果が認められたが、下位検定ではいずれの時間においても処置間の差は見られなかった。一方で、Figure 3-5 に示した CD62L Mono は LPS 投与後 1h から SAL よりも高くなる傾向が認められ、2 時間でピーク (6.98 ± 0.3) となり SAL (3.6 ± 0.3) よりも有意に高値であった。この CD62L Mono の反応が見られた時間帯に着目して、その他の測定項目についても検討を加えた。

投与前 (0h) の値と反応のピーク値 (Max) をすべての測定項目について比較をした。反応のピーク値は、LPS 投与で起こりうる変化を考慮し項目によって投与後の最

大値か最小値のどちらを取るか判断した。呼吸数は LPS 投与後に有意に上昇し、投与前からの上昇率も SAL に比べて有意に高かった。一方、直腸温度の上昇に有意な差は認められなかった (Table 3-2)。血清 Cortisol 濃度、TNF- α 濃度も投与前後において変化は認められなかった (Table 3-3)。細胞分画 (Table 3-4) では、単球数 (Monocyte) には減少傾向が、白血球数 (WBC) には有意な減少が認められた。細胞表面抗原 (Table 3-5) は単球における CD62L 発現 (CD62L Mono) が有意に上昇し、最大反応値も上昇率も有意に高かった。Figure 3-6A,B に、反応が最も大きかった個体における CD62L 発現陽性細胞の側方散乱光を X 軸、前方散乱光を Y 軸にした散布図および蛍光強度を指標としたヒストグラムを示したが、LPS 投与後 2 時間後に最も発現が大きくなっていた。CD14 陽性単球 (CD14+Mono) は最大反応値に差はないものの、LPS では下降率が有意に高かった。Table 3-6 に心拍変動解析指標の反応を示した。心拍数は SAL、LPS 両処置において投与前から有意に上昇したが、心拍変動解析指標は LPS 投与後のみ LF 値と HF 値は有意に低下し、LF/HF には上昇傾向が認められた。

Table 3-2 から 3-6 に示すように LPS 投与に対する反応には大きな個体差が存在し、特に心拍変動解析指標で顕著に認められたことから、HF 値および LF/HF 比の変化量 (上昇率・下降率) の違いにより動物 (A, B, C, D, E, F) の群分けを行いさらに解析した。Figure 3-7 に各個体における投与前からの変化量 (%) とクラスター解析の結果を示した。数値の大小で分けると、A, C, D が小さく (すなわち下降率が大きい)、B, E, F が大きいと群分けされた。HF 値の小さい群と大きい群で臨床徴候・細胞分画・細胞表面抗原発現・血清 Cortisol および TNF- α 濃度を比較したところ、差が見られたのは血清 Cortisol 濃度のみで、HF の小さい群で有意に高かった。一方、LF/HF の変化量 (%) で群分けをした場合には (Figure 3-8)、C, E, F が LF/HF 比の小さい (すなわち上昇率が小さい) 群と抽出された。D のみ他の個体と比べると著しく大きかったが、A, B と合わせ大きい (上昇率が大きい) 群と判断した。LF/HF 比の上昇率が小さい個体群を LOW (n=3)、大きい群を HIGH (n=3) として、臨床徴候・全血球計算・細胞表面抗原を比較すると、直腸温度および赤血球数の上昇は HIGH 群で有意に高かった (Figure 3-

9, 3-11)。白血球数も HIGH でより減少している一方で、白血球分画は好中球数 (Neutrophil) が多くなっている傾向がみられ、N:L 比は HIGH で有意に高かった。細胞表面抗原発現は分析を行った個体数が 4 頭と少なかったため統計解析を行うことができなかったが、単球の CD62L 発現が LOW (153.0 ± 24.9) と比べ HIGH (233.0 ± 24.0) で高かった (Figure 3-11)。

3-4 考察

動物が病原体に曝露されてから徴候発現にいたるまでの微弱な感染状態における生体機能の動的変化を明らかにするために、実験的に低用量の LPS を投与することにより感染初期の作出を試みた。生体機能指標としての臨床徴候、血液性状、HPA 軸活性の指標として Cortisol、自律神経系機能の変化とこれらの関連について調べた結果、実験的に感染初期状態を作出できたものと考えられた。感染初期状態において、自律神経系バランスの変化が免疫反応や臨床徴候を予知する上で有用となる可能性が示唆された。

LPS 投与後における各血液検査項目で時系列変化を調べたところ、各時間帯において SAL との有意差が認められた項目は単球上に発現している CD62L だけだった。CD62L は炎症の初期反応において白血球が感染巣に遊走するために、血管壁をローリングする際に働く接着因子であり鋭敏な炎症マーカーの 1 つである⁵³。単球上において発現の上昇が認められたのは、単球が先天性免疫を担当する細胞として LPS に対する初期応答に関わっているためであると考えられる。外傷による炎症反応に際して CD62L の発現上昇は好中球、リンパ球、単球のいずれの細胞にも起こるが、単球の CD62L 発現上昇はその他の細胞に比較して早く生じることが報告されている^{54,55}。一般的な血液検査項目では投与後のどの時間帯においても正常範囲内の変化しか認められなかったが、単球における CD62L の増加は免疫応答が確かに生じていることを示していると考えられた。一方臨床徴候や自律神経系機能には処置間で有意差が見られる

時間帯は観察されなかった。従って、生体機能の推移を総合的に考慮すると疾病状態に至る前の感染初期状態を実験的に作出できたものと考えられた。

各時間帯で SAL と比べてあまり差が認められなかったのは、投与後における免疫系が反応し始める時間帯や持続時間などには個体差が影響していたと考えられたため、投与前と反応が最も大きくなった時間帯の値を使用して比較した。その結果、初期の炎症反応を反映した変化が観測された投与後に総白血球、総単球数と CD14 陽性単球数の減少といった免疫応答の存在と同時に交感神経系の緊張や呼吸数の増加が観測された。これらの結果は、白血球による LPS の認識と、それに続く自律神経系を介した炎症反応の開始を反映しているものと考えられた。

白血球の中でも単球だけが有意な減少を示したのは、単球が LPS を認識しその後の炎症反応を起こす細胞であるためだと考えられた。LPS 投与後における総白血球の減少は辺縁趨向が主な原因であるとされているが⁵⁶、CD14 陽性単球の減少と接着因子である CD62L の発現上昇が同時に起こっていることがこの現象の存在を示唆している。CD14 は Toll 様受容体 4 (TLR4) と共役して LPS を認識するため^{57,58}、CD14 陽性単球数の投与後における減少は LPS を抗原として認識できる単球の血管辺縁へ移動を示唆している。辺縁への移動には細胞表面に発現する CD62L と血管内皮細胞の接着因子の結合が必要であり、外傷や多臓器不全などで生じる全身炎症における単球上での発現が報告されている^{54,55}。

直腸温度は全体の平均値で 39.5°C を超え発熱傾向にあるものの、個体差が大きく統計的に有意な差は認められなかった。一方、呼吸数の増加が認められたことから、呼吸の促進による熱の放散によって発熱が抑えられたとも考えられた。

自律神経系機能を評価するために測定した心拍変動解析指標にも HF 値の低下や LF/HF 比の上昇が認められ、LPS 投与後に副交感神経系が抑制され交感神経系が優位になったことが示された。抗原を認識した白血球によって産生されたサイトカインの血液循環から血液脳関門を欠く視床下部への到達や求心性迷走神経の興奮は、視床下部や延髄を介して交感神経系を緊張させ、抗炎症作用や免疫増強作用を促すことがわ

かっている⁵⁹⁻⁶¹。炎症性サイトカインである TNF- α に有意な上昇は見られなかったが、このようなメカニズムが自律神経系機能の変化をもたらしたと考えられた。以上により、LPS 投与後の生体の応答には、交感神経系の緊張や白血球の活性化、そして呼吸数の増加や体温の上昇といった生理的反応が密接に関連していることが明らかとなった。

LPS 投与により副交感神経系の抑制に伴う交感神経系優位な状態が観測されたものの、反応が最大となった時点においても、群として比較すると明確な差がみられたわけではなく、反応の程度には個体差の影響が大きかった。そこで、交感神経系の緊張が大きかった個体群とそうでない個体群の臨床徴候や免疫応答について調べると、その反応性に差異のあることが明らかとなり、直腸温度は交感神経系緊張の高い群において上昇が大きく血液性状から示される免疫応答も交感神経系の緊張に伴い大きくなることが示唆された。

ウシにおいて直腸温度は LPS の濃度が高濃度であれば減少する場合があるが、ある程度までなら用量依存的に上昇する⁵²。感染時には炎症性サイトカインが体温セットポイントを上昇させる。交感神経系緊張の高い群における直腸温度の上昇は血管収縮や褐色脂肪組織の分解による熱産生を促す⁶²ためであると考えられた。赤血球の増加は、白血球の減少による二次的な増加に加え、炎症反応が引き起こす血管透過性の上昇が関与すると考えられた。血管透過性の亢進は Histamine、Thrombin、Bradykinin、IL-1 β 、TNF- α など炎症性メディエーターやサイトカインだけでなく、血管内皮細胞に発現する TLR4 を介して LPS 自身によっても媒介される⁶³。一方、単球の CD62L は β 受容体刺激により発現が上昇することが明らかにされている⁶⁴。好中球の増加や N:L 比の上昇も、好中球上のカテコラミン受容体刺激を介した交感神経系の緊張が促す反応である⁶⁵。交感神経系の緊張は、神経終末から分泌されるカテコラミンを介し白血球の遊走や炎症性メディエーターの産生を媒介する^{60,66-69}が、心拍変動解析によっても自律神経系機能によって間接的に炎症の病態や重症度との関連性を評価ができることが示唆されている^{17,70,71}ことから、本研究で明らかとなった自律

神経系バランスの変化と臨床徴候や免疫応答の関連性は、自律神経系と免疫系のクロストークを反映したものであると考えられた。

小活

本章では、育成牛を用いて低用量の大腸菌毒素（LPS）を投与することにより実験的な感染の初期状態を作出し、生体機能の変化を明らかにすることを目的とした。LPS 投与により軽度の体温上昇や呼吸数の増加は見られたものの臨床症状としては顕著な変化は認められなかった。心拍変動解析の結果、LPS 投与により HF 値は有意に減少し LF/HF 比は有意に増加した。さらに、LF/HF 比の変化には個体差が認められたことから、LPS に対する反応性により高感受性群と低感受性群に分類したところ、高感受性群では LPS に対する血液性状や臨床徴候の変化が低感受性群よりも大きいことが明らかとなった。これらの結果から、低濃度の LPS 投与により感染の初期状態を作出可能なことが明らかになるとともに、LPS に対する生体機能の変化が大きい個体は自律神経系バランスが交感神経系優位な状態になることが示唆された。

Table 3-1 Antibodies used for the immunostaining of peripheral blood leukocytes

Antigen	mAb Clone	Isotype	Cellular expression	Source
CD14	CAM66A	IgM	monocyte, macrophage, LPS receptor	WSU ¹⁾
CD62L	DU1-29	IgG1	L-selectin	WSU

1) Monoclonal Antibody Center, Washington State University.

Table 3-2 Maximum reaction of rectal temperature and respiratory rate

Treatment	ID	Rectal temperature (°C)			Respiratory rate (/min)		
		Pre	Max	Reaction (°C)	Pre	Max	Reaction (rates)
SAL	A	38.8	39.0	0.2	28.0	52.0	24.0
	B	39.1	39.4	0.4	40.0	40.0	0.0
	C	38.5	38.9	0.4	28.0	28.0	0.0
	D	39.2	39.3	0.1	20.0	32.0	12.0
	E	38.8	39.4	0.6	48.0	68.0	20.0
	F	39.1	39.8	0.7	52.0	56.0	4.0
LPS	A	38.8	39.9	1.1	28.0	80.0	52.0
	B	38.7	39.7	1.0	24.0	64.0	40.0
	C	38.6	39.2	0.6	40.0	56.0	16.0
	D	38.8	40.1	1.3	20.0	36.0	16.0
	E	38.8	39.4	0.6	32.0	76.0	44.0
	F	38.8	39.0	0.2	40.0	68.0	28.0
SAL	mean±SE	38.9±0.1	39.3±0.1	0.4±0.1	36.0±5.2	46.0±6.3	10.0±4.2 ^a
LPS	mean±SE	38.8±0.0	39.6±0.2	0.8±0.2	30.7±3.4	63.3±6.5**	32.7±6.1 ^b

The values before injection (Pre) and maximum reaction time (Max) are compared. SAL, 5mL saline; LPS, 5ng/kg LPS; Pre, 0h of the study; Max, time when the reaction reached the peak. Different letters indicate significant differences between the treatments. Difference from values before injection (Pre) : ** $P < 0.01$.

Table 3-3 Maximum reactions of plasma cortisol and TNF- α concentration

Treatment	ID	Cortisol (ng/mL)			TNF- α (ng/mL)		
		Pre	Max	Reaction (%)	Pre	Max	Reaction (%)
SAL	A	7.8	10.2	130.6	117.3	200.4	170.8
	B	6.9	8.2	118.3	306.8	596.4	194.4
	C	2.5	3.0	120.8	2628.6	2664.1	101.4
	D	0.1	1.4	1075.4	878.8	1050.3	119.5
	E	6.4	5.5	87.0	1.4	788.0	56939.6
	F	15.6	17.8	113.5	1.4	1.4	100.0
LPS	A	15.2	43.5	285.9	188.8	668.1	353.9
	B	9.8	13.1	133.0	217.5	513.9	236.3
	C	0.3	1.4	486.2	1321.2	1294.2	98.0
	D	0.9	2.8	314.0	735.3	903.8	122.9
	E	5.2	2.2	43.0	2.0	758.0	37027.5
	F	7.7	9.7	126.0	2.0	2.0	100.0
SAL	mean \pm SE	6.6 \pm 2.2	7.7 \pm 2.4	274.3 \pm 160.3	655.7 \pm 416.7	883.4 \pm 388.8	9604.3 \pm 9604.3
LPS	mean \pm SE	6.5 \pm 2.3	12.1 \pm 6.6	231.3 \pm 66.1	411.1 \pm 212.5	690.0 \pm 175.1	6323.1 \pm 6141.0

The values before injection (Pre) and maximum reaction time (Max) are compared. SAL, 5mL saline; LPS, 5ng/kg LPS. Pre, 0h of the study; Max, time when the reaction reached the peak.

Table 3-4 Maximum reaction of complete blood cell count and neutrophil to lymphocyte ratio

Treatment	ID	RBC (10 ¹² /μL)			WBC (10 ³ /μL)			Neutrophil (10 ³ /μL)			Lymphocyte (10 ³ /μL)			Monocyte (10 ³ /μL)			N:L		
		Pre	Max	Reaction (%)	Pre	Max	Reaction (%)	Pre	Max	Reaction (%)	Pre	Max	Reaction (%)	Pre	Max	Reaction (%)	Pre	Max	Reaction (%)
SAL	A	739	781	105.7	111.1	106.8	96.1	44.4	35.8	80.6	55.8	61.4	110.0	4.1	4.2	102.4	1.3	1.5	115.8
	B	831	872	104.9	93	74.6	80.2	35.1	23.1	65.8	47.8	62.1	129.9	4.3	1.6	37.2	1.4	2.0	150.2
	C	735	762	103.7	96.7	86.8	89.8	40.4	33.1	81.9	48	56.1	116.9	4.5	3.8	84.4	1.2	1.5	129.0
	D	739	815	110.3	73.4	68.1	92.8	30.6	24.4	79.7	37.2	43.4	116.7	4.1	3.5	85.4	1.2	1.8	146.3
	E	826	855	103.5	84.9	83.7	98.6	28.4	27.1	95.4	51.5	87.6	170.1	3.5	3.3	94.3	1.8	2.3	128.5
	F	642	667	103.9	120.1	114.1	95.0	46.3	45.6	98.5	51.2	60.4	118.0	8.9	7.2	80.9	1.1	1.3	116.2
LPS	A	768	894	116.4	136.4	88.6	65.0	46.7	23.4	50.1	75.2	106.4	141.5	5.1	1.2	23.5	1.6	4.4	274.4
	B	833	965	115.8	117.1	63.4	54.1	49.8	22.8	45.8	53.7	65.7	122.3	8.5	3.3	38.8	1.1	2.8	262.6
	C	754	795	105.4	92.8	77.5	83.5	33.5	24.9	74.3	52.3	61.6	117.8	3.5	1.5	42.9	1.6	2.2	143.8
	D	723	778	107.6	67.2	55.4	82.4	25.1	21.1	84.1	27.4	39.4	143.8	4.8	2	41.7	1.1	1.8	165.8
	E	856	884	103.3	105.5	94.4	89.5	40.2	34.7	86.3	60.3	70.5	116.9	4.2	1.5	35.7	1.5	1.7	116.6
	F	642	663	103.3	151.3	131	86.6	47.7	42.7	89.5	83.5	80.5	96.4	5.7	5.6	98.2	1.8	2.3	128.5
SAL	mean±SE	752.0±28.5	792.0±43.6	105.3±1.0	96.5±7.0	89.0±7.4	92.1±2.7 ^a	37.5±3.0	31.5±3.5	83.7±4.8	48.6±2.6	61.8±5.9	126.9±9.0	4.9±0.8	3.9±0.7	80.8±9.3	1.3±0.1	1.7±0.2	131.0±6.0
LPS	mean±SE	762.7±31.6	829.8±43.6	108.6±2.5	111.7±12.4	85.1±11.0	76.9±5.7 ^b	40.5±3.9	28.3±3.5	71.7±7.8	58.7±8.0	70.7±9.1	123.1±7.2	5.3±0.7	2.5±0.7 [†]	46.8±10.7	1.4±0.1	2.6±0.4	182.0±28.2

The values before injection (Pre) and maximum reaction time (Max) are compared. SAL, 5mL saline; LPS, 5ng/kg LPS; RBC, count of red blood cells, WBC, count of white blood cells; N:L, neutrophil to lymphocyte ratio. Pre, 0h of the study; Max, time when the reaction reached the peak. Difference between from values before injection (Pre): †P < 0.1. Different letters indicate significant differences between the treatments.

Table 3-5 Maximum reactions of expression of CD62L on lymphocytes, granulocytes and monocytes and CD14 positive monocytes

Treatment	ID	CD62L Lym (MFI)			CD62L Gra (MFI)			CD62L Mono (MFI)			CD14+ Mono (%)		
		Pre	Max	Reaction (%)	Pre	Max	Reaction (%)	Pre	Max	Reaction (%)	Pre	Max	Reaction (%)
SAL	A	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	
	B	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	
	C	9.1	8.6	94.5	4.7	5.4	116.1	4.7	4.8	100.8	60.2	56.1	93.1
	D	4.2	5.2	123.8	2.2	2.5	116.7	2.5	3.2	128.7	1.8	1.3	69.8
	E	4.8	5.4	113.1	5.3	5.4	101.7	4.3	4.0	93.0	28.4	21.2	74.7
	F	3.7	4.8	129.6	1.7	2.3	135.1	3.8	3.9	104.2	3.3	3.5	104.8
LPS	A	8.2	9.8	120.0	3.3	5.0	148.9	4.3	8.4	195.6	49.8	20.8	41.7
	B	8.0	10.7	134.5	3.7	4.3	117.8	3.4	9.5	277.8	62.0	17.4	28.1
	C	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=
	D	5.8	8.9	152.3	3.9	4.9	123.4	3.6	8.1	225.7	5.0	1.5	30.4
	E	2.8	4.6	167.5	2.1	2.9	134.6	3.9	6.9	177.8	17.4	5.9	34.0
	F	7.1	4.7	66.1	2.8	2.2	77.8	4.7	6.0	128.1	3.2	1.4	44.4
SAL	mean±SE	5.4±1.0	6.0±0.7	115.2±6.3	3.4±0.7	3.9±0.7	117.4±5.6	3.8±0.4	4.0±0.3 ^a	106.7±6.3 ^a	23.4±11.2	20.5±10.4	85.6±6.6 ^a
LPS	mean±SE	6.4±0.9	7.7±1.2	128.1±15.9	3.2±0.3	3.8±0.5	120.5±10.9	4.0±0.2	7.8±0.6b***	201.0±22.7 ^b	27.5±11.0	9.4±3.7	35.7±2.9 ^b

The values before injection (Pre) and maximum reaction time (Max) are compared. SAL, 5mL saline; LPS, 5ng/kg LPS; CD62L Lym, CD62L on lymphocytes; CD62L Gra, CD62L on granulocytes, CD62L Mono, CD62L on monocytes; CD14+ Mono, CD14 positive monocytes. Pre, 0h of the study; Max, time when the reaction reached the peak. Difference from values before injection (Pre) : *** $P < 0.001$. Different letters indicate significant differences between the treatments.

Table 3-6 Maximum reaction of heart rate and heart rate variability indices

Treatment	ID	HR (bpm)			LF (msec ²)			HF (msec ²)			LF/HF		
		Pre	Max	Reaction (%)	Pre	Max	Reaction (%)	Pre	Max	Reaction (%)	Pre	Max	Reaction (%)
SAL	A	79.4	103.9	130.8	46.2	21.7	47.0	27.0	7.5	27.8	1.5	4.2	277.6
	B	83.0	110.4	132.9	35.3	16.1	45.6	51.8	3.6	6.9	1.6	5.9	364.4
	C	69.1	100.7	145.9	70.3	10.1	14.3	57.5	3.2	5.6	1.3	4.8	352.7
	D	87.9	124.8	142.1	22.9	11.5	50.4	15.0	5.2	34.5	2.0	6.4	320.3
	E	86.6	106.0	122.5	24.5	17.5	71.7	42.3	7.9	18.7	1.7	3.1	182.7
	F	100.0	129.5	129.5	15.6	3.3	21.5	12.5	0.9	6.9	2.1	5.3	249.0
LPS	A	70.8	129.2	182.4	45.3	12.0	26.6	38.0	2.5	6.5	1.1	6.1	542.1
	B	63.1	100.4	159.2	82.4	24.2	29.3	111.9	15.4	13.8	1.0	4.3	450.6
	C	87.4	111.8	128.0	48.3	6.1	12.7	32.8	2.3	7.0	3.8	4.4	116.5
	D	84.0	151.8	180.7	64.4	15.5	24.1	85.0	1.9	2.2	1.2	17.5	1476.9
	E	90.7	109.2	120.4	29.9	22.5	75.2	19.0	12.3	65.1	3.6	4.4	119.5
	F	98.9	121.4	122.7	17.6	6.7	38.3	11.7	1.3	11.4	3.6	4.4	119.5
SAL	mean±SE	84.2±4.2	112.6±4.8**	133.9±3.5	35.8±8.2	13.4±2.6	41.8±8.5	34.4±7.8	4.7±1.1	16.8±5.0	1.7±0.1	4.9±0.5	291.1±28.1
LPS	mean±SE	82.5±5.4	120.6±7.4***	148.9±11.8	48.0±9.5	14.5±3.1**	34.4±8.8	49.8±16.3	6.0±2.5*	17.7±9.6	2.4±0.6	6.9±2.2†	470.9±215.3

The values before injection (Pre) and maximum reaction time (Max) are compared. SAL, 5mL saline; LPS, 5ng/kg LPS; Max, time when the reaction rate; LF, low frequency power; HF, high frequency power; LF/HF, LF to HF. Pre, 0h of the study; Max, time when the reaction reached the peak. Difference from values before injection (Pre) : † $P < 0.1$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$. Different letters indicate significant differences between the treatments.

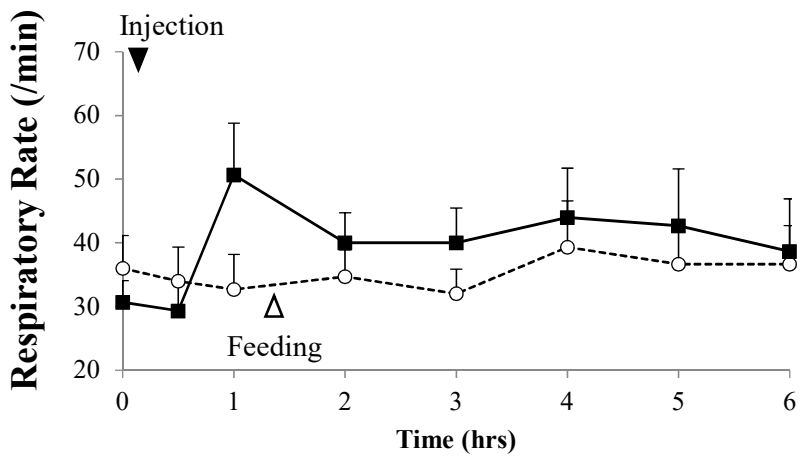
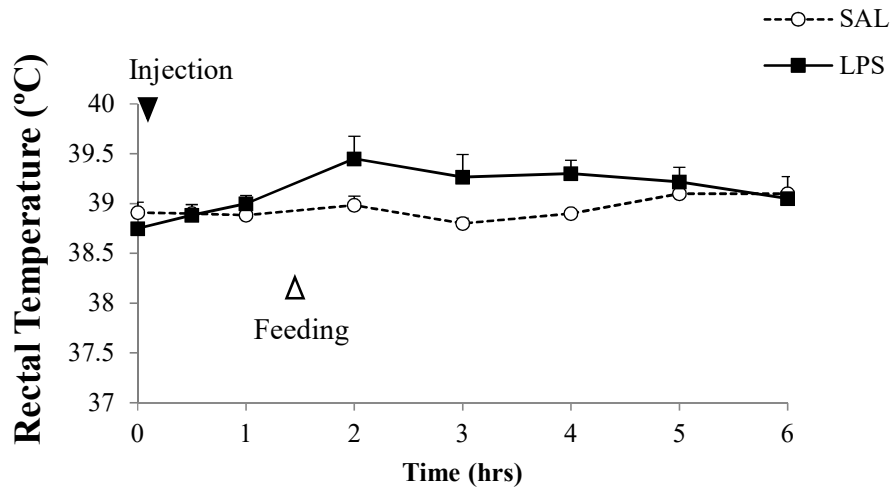


Figure 3-1 Time series change in rectal temperature and respiratory rate after intravenous injection of saline (SAL) or 5 ng/kg LPS (LPS). Each plot represents mean and SE.

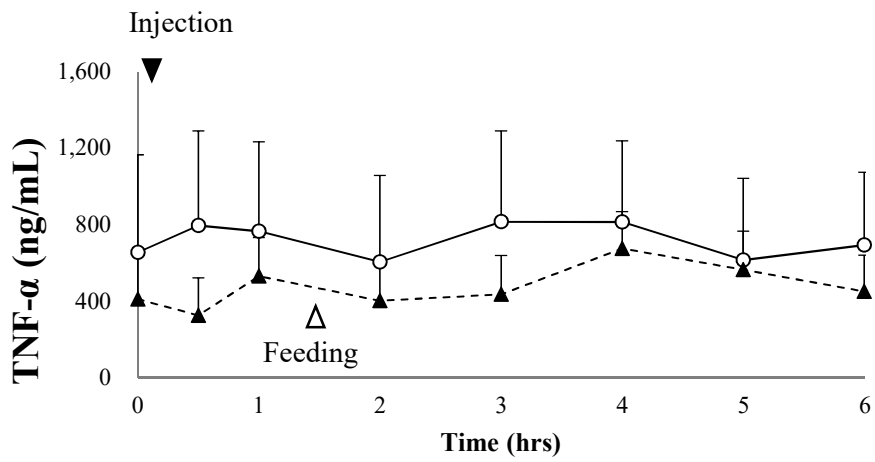
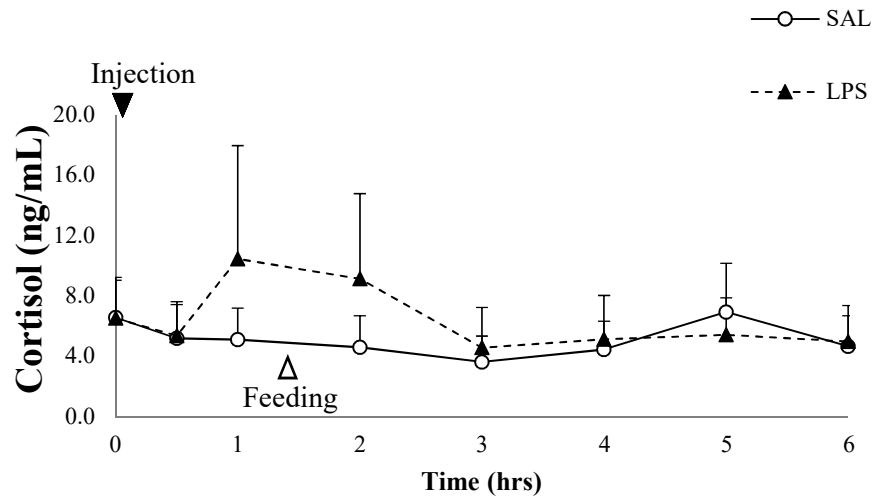


Figure 3-2 Time series change in serum cortisol and TNF- α concentrations after intravenous injection of saline (SAL) or 5 ng/kg LPS (LPS). Each plot represents mean and SE.

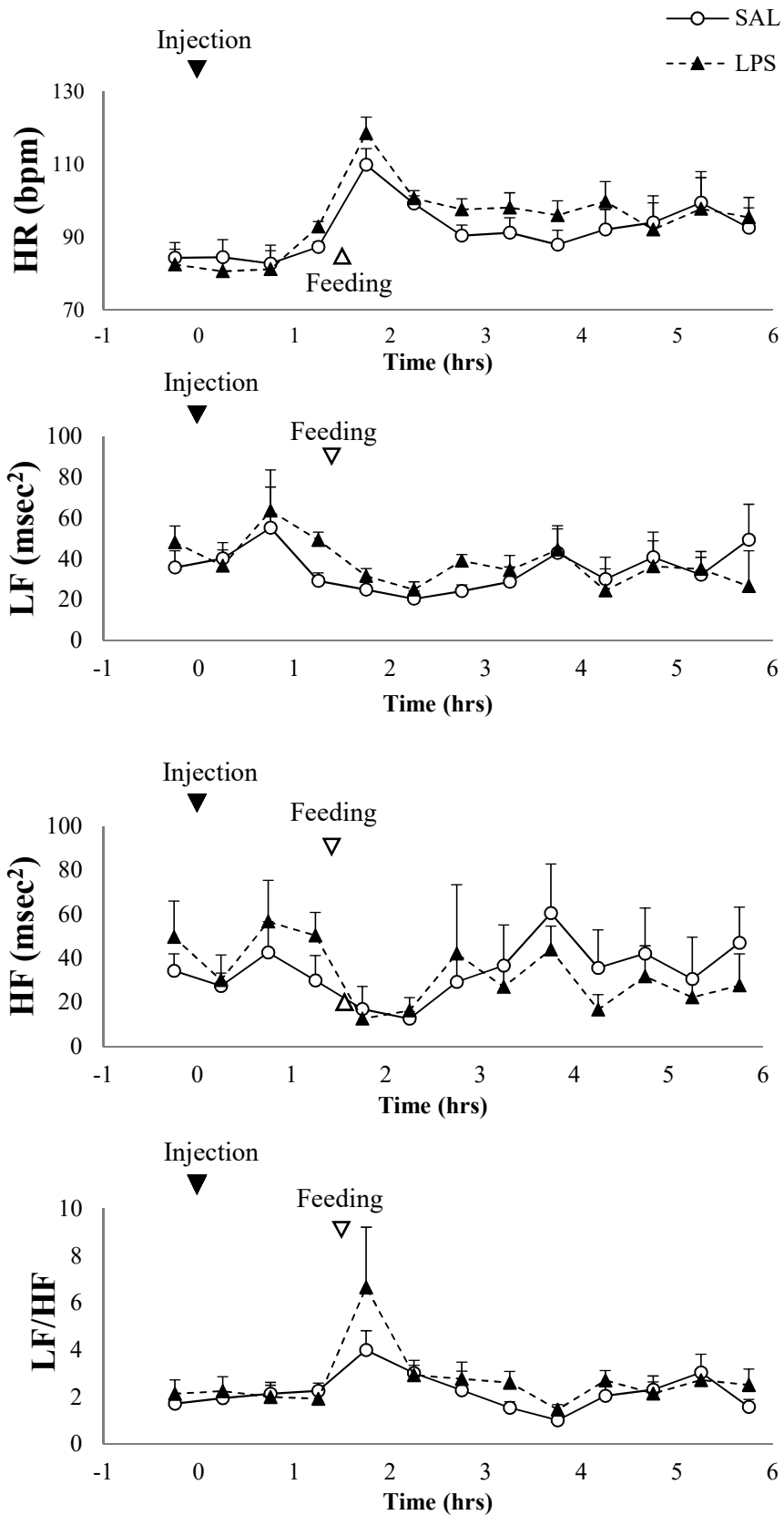


Figure 3-3 Time series change in heart rate and heart rate variability after 5mL intravenous injection of saline (SAL) or 5 ng/kg LPS (LPS). HR, heart rate; LF, low frequency power; HF, high frequency power; LF/HF, LF to HF ratio. Each plot represents mean and SE .

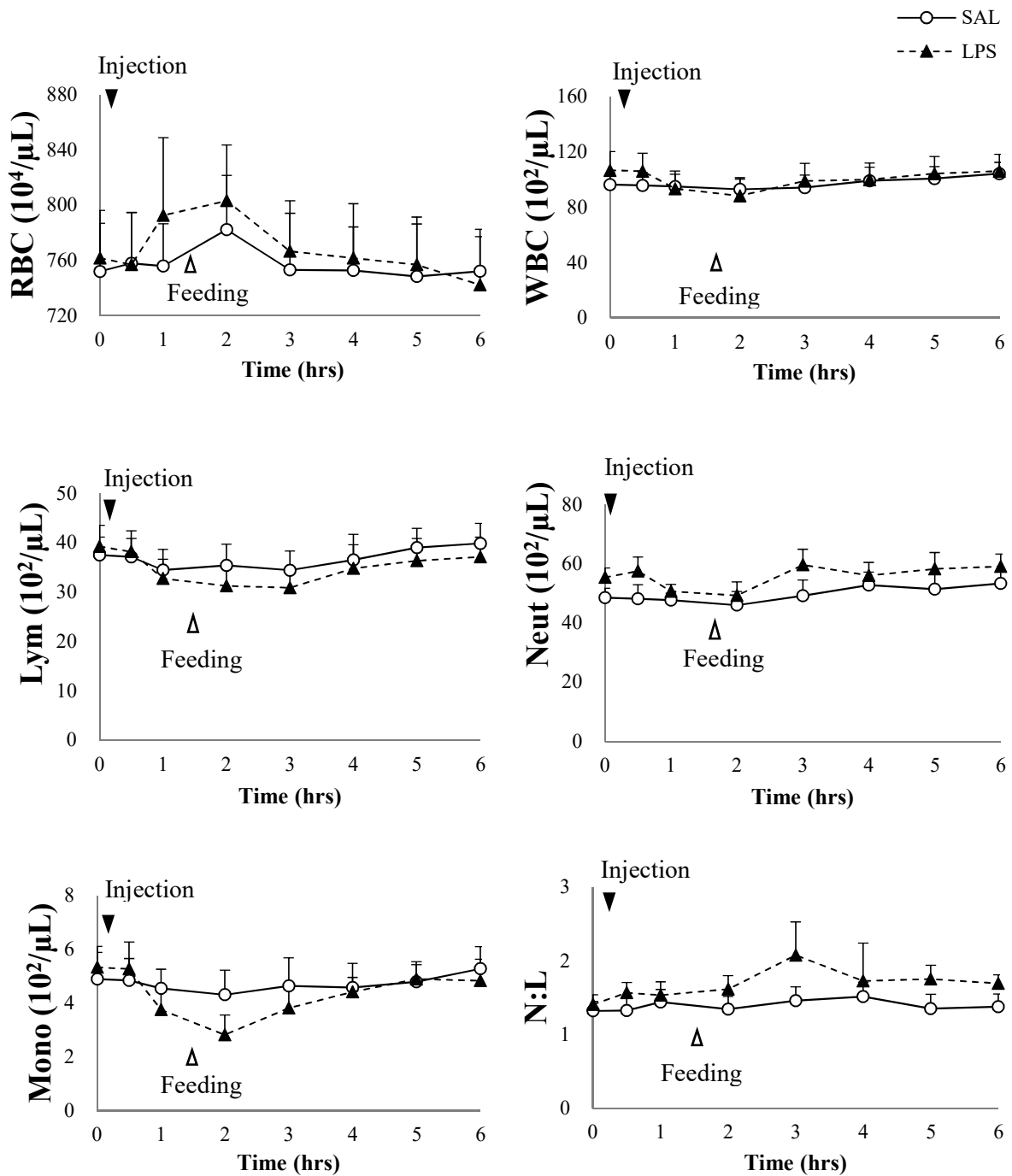


Figure 3-4 Time series change in blood cell count and neutrophil to lymphocyte ratio after intravenous injection of saline (SAL) or 5 ng/kg LPS (LPS). RBC, red blood cell; WBC, white blood cell; Lym, lymphocyte; Neut, neutrophil; Mono, monocyte; N:L, neutrophil to lymphocyte ratio. Each plot represents mean and SE.

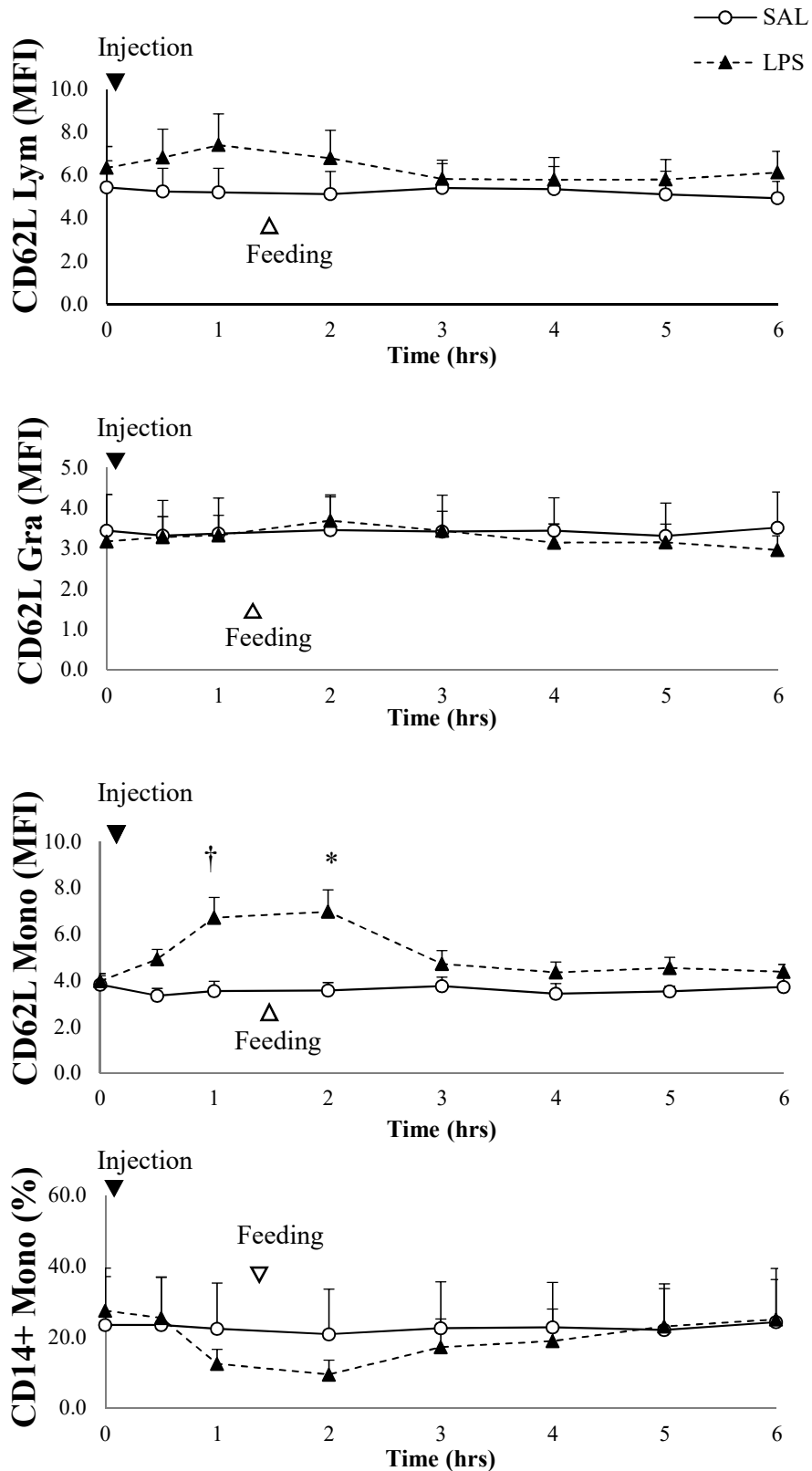


Figure 3-5 Time series change in expression of CD62L on blood cells after intravenous injection of saline (SAL) or 5 ng/kg LPS (LPS). CD62L Lym, CD62L on lymphocytes; CD62L Gra, CD62L on granulocytes; CD62L Mono, CD62L on monocytes; CD14+ Mono, CD14 positive monocytes. Each plot represents mean + SE. Difference between the groups: † $P < 0.1$, * $P < 0.05$.

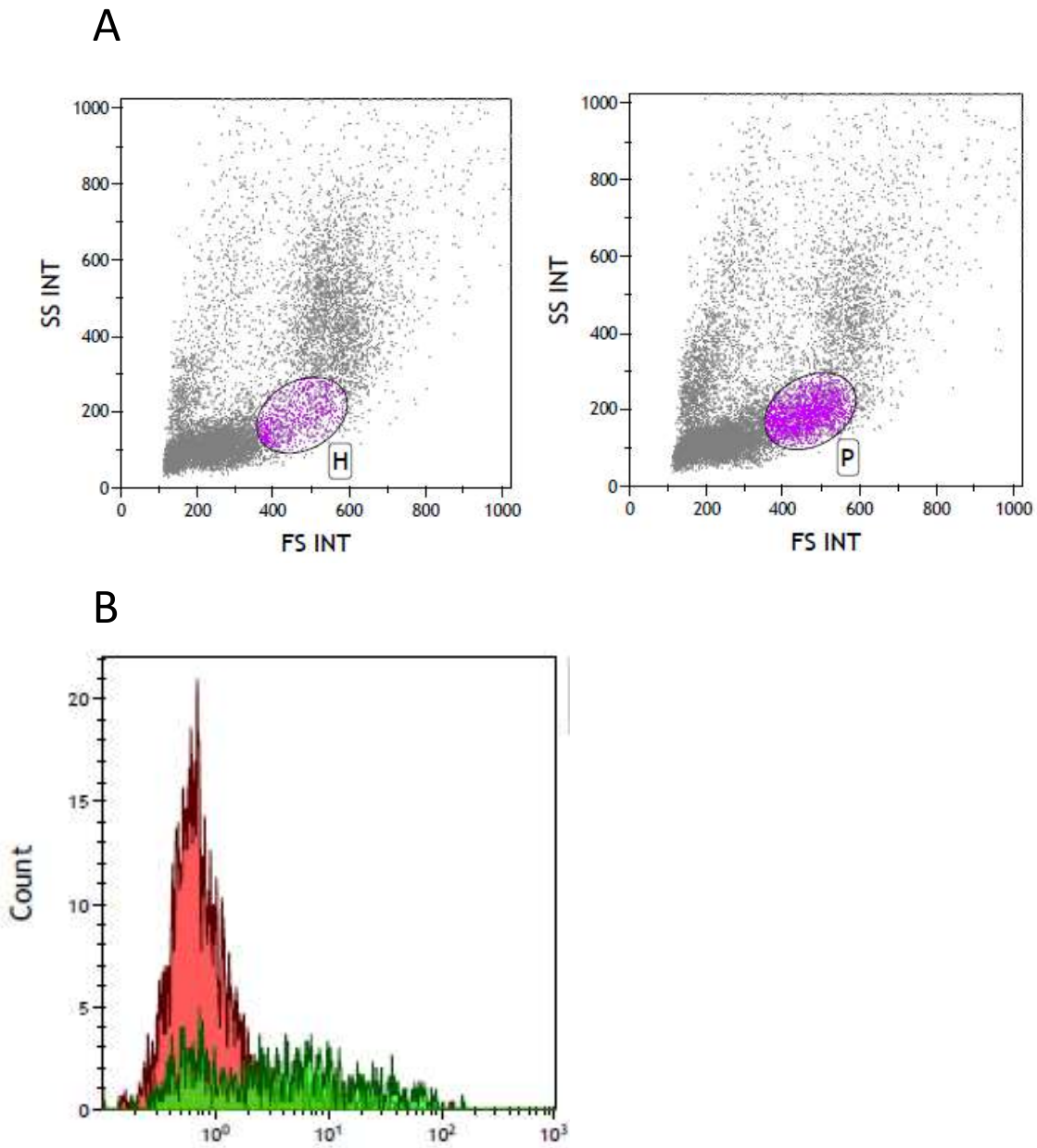


Figure 3-6 CD62L expression on monocytes after intravenous injection of saline (SAL) or 5 ng/kg LPS (LPS). Data shows the population of monocytes express CD62L in one of the animals susceptible for LPS treatment. The expressions at 2h are compared between SAL and LPS. A) SSC vs FSC contour plot of CD62L. Colored area coincides with the population of monocytes. B) The histogram displays a single measurement parameter (fluorescence intensity) on the x-axis and the cell count on the y-axis. Green and red histogram coincide with the population in SAL and LPS, respectively. SSC, side scatter; FSC, forward scatter.

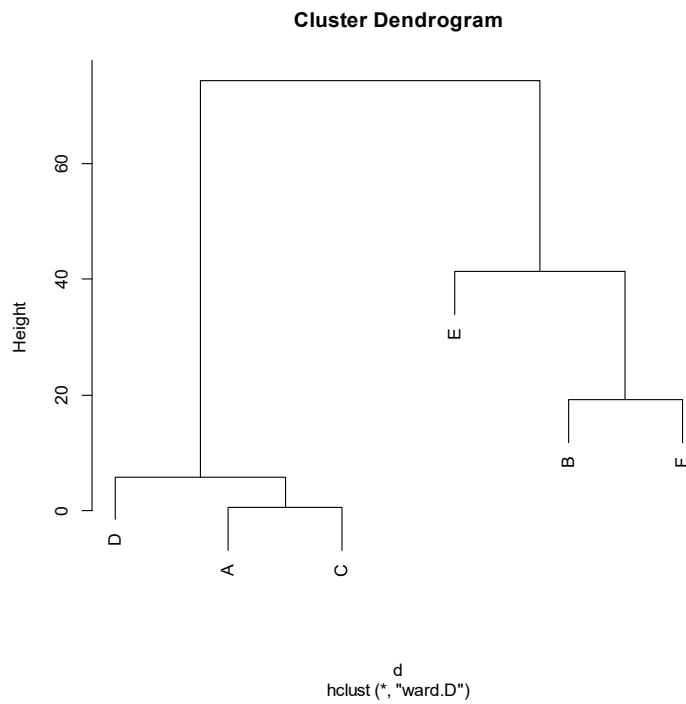
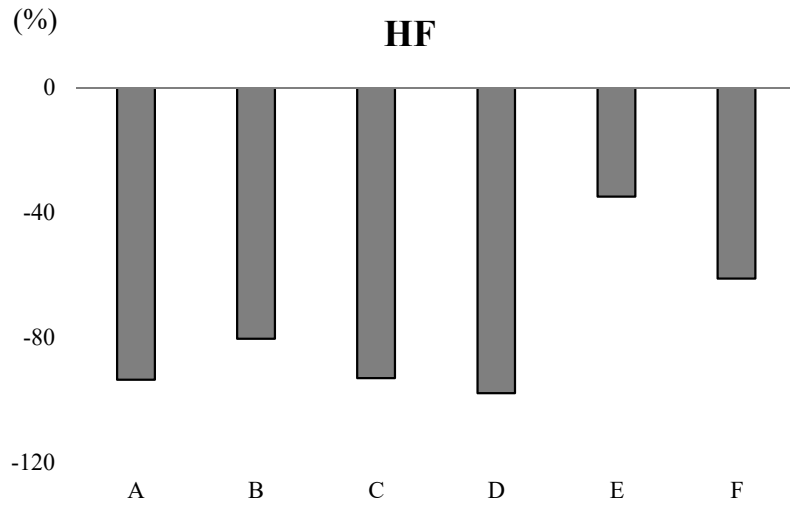


Figure 3-7 A) The maximum decrease percentage of HF after 5mL intravenous injection of 5 ng/kg LPS (LPS). A to F indicate the individual animals in the study. B) Cluster dendrogram of percent change of HF. HF, high frequency power.

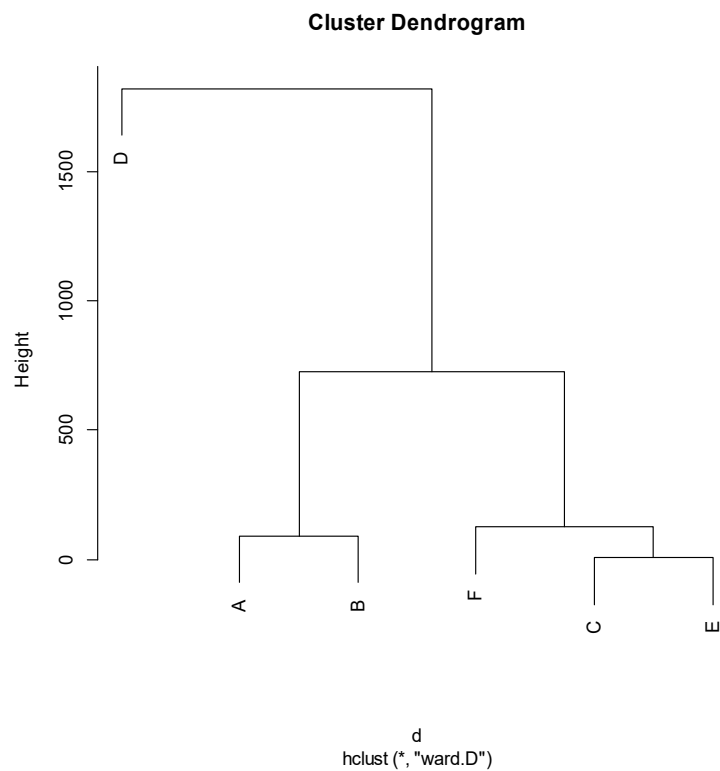
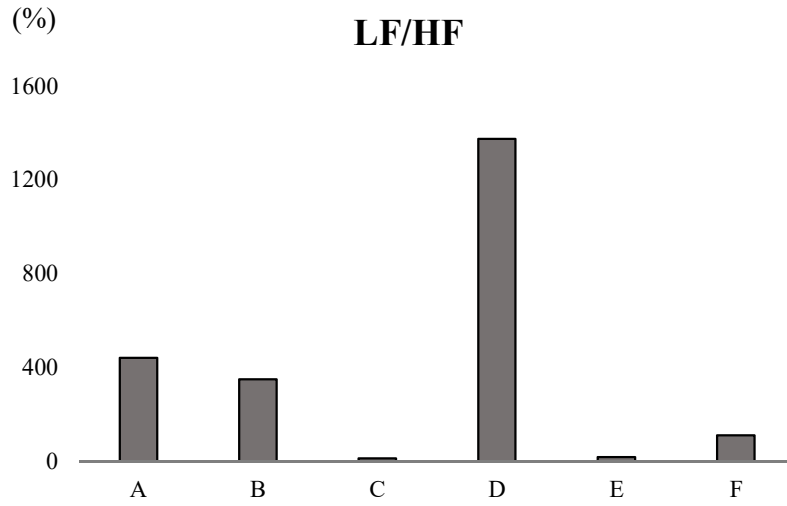


Figure 3-8 A) The maximum increase percentage of LF/HF after 5mL intravenous injection of 5 ng/kg LPS (LPS). A to F indicate the individual animals in the study. B) Cluster dendrogram of percent change of LF/HF. LF, low frequency power; HF, high frequency power; LF/HF, LF to HF ratio.

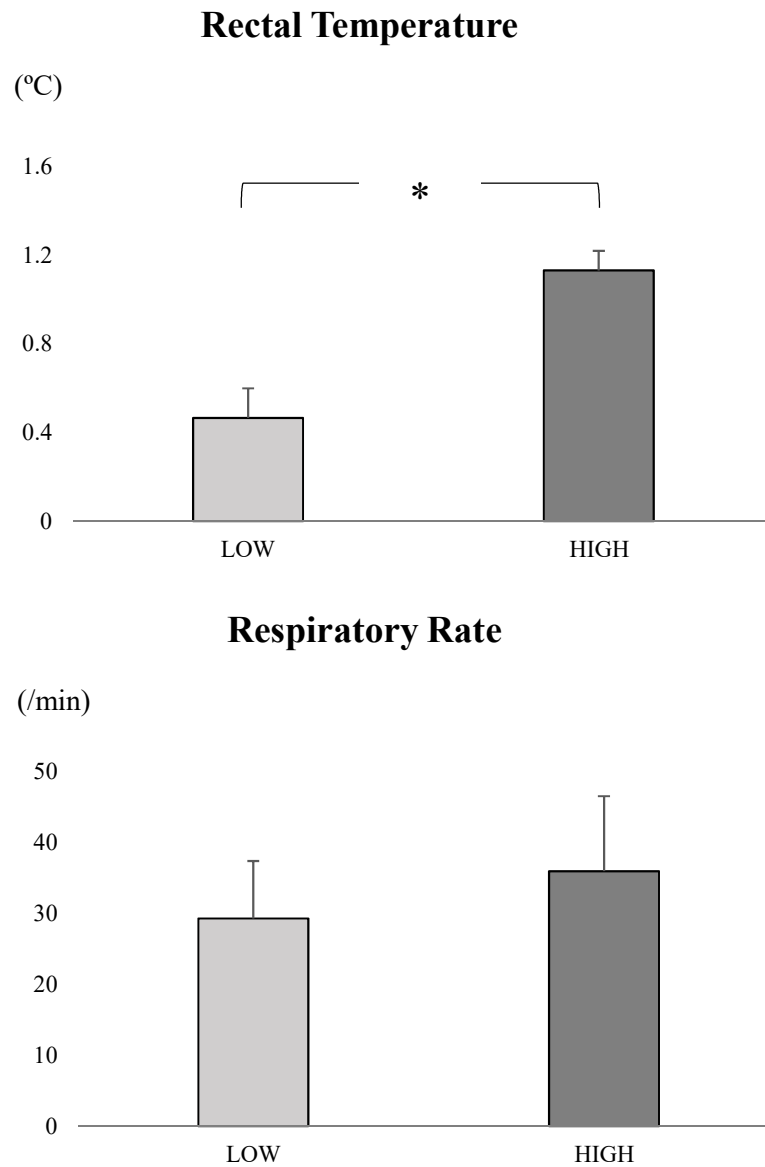
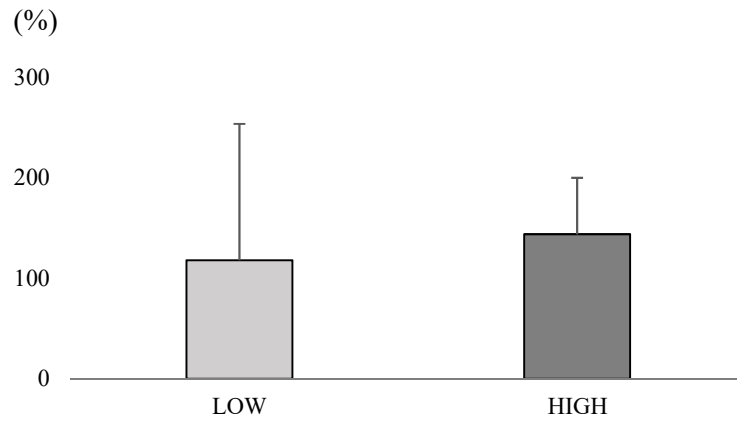


Figure 3-9 Increment of rectal temperature and respiratory rate are compared between animals showing different LF/HF increase after 5mL intravenous injection of 5 ng/kg LPS (LPS). LOW, animals showed higher percent change of LF/HF after LPS injection; HIGH, animals showed lower percent change of LF/HF after LPS injection. Each error bar represents SE. Difference between the groups: * $P < 0.05$.

Cortisol



TNF- α

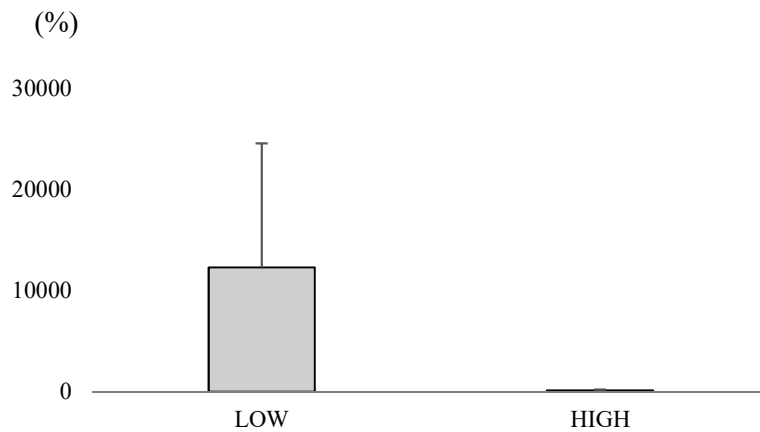


Figure 3-10 Percent change in serum cortisol and TNF- α concentrations are compared between animals showing different LF/HF increase after 5mL intravenous injection of 5 ng/kg LPS (LPS). LOW, animals showed higher percent change of LF/HF after LPS injection; HIGH, animals showed lower percent change of LF/HF after LPS injection Cortisol, serum cortisol concentration; TNF- α , serum TNF- α concentration. Each bar represents mean and SE.

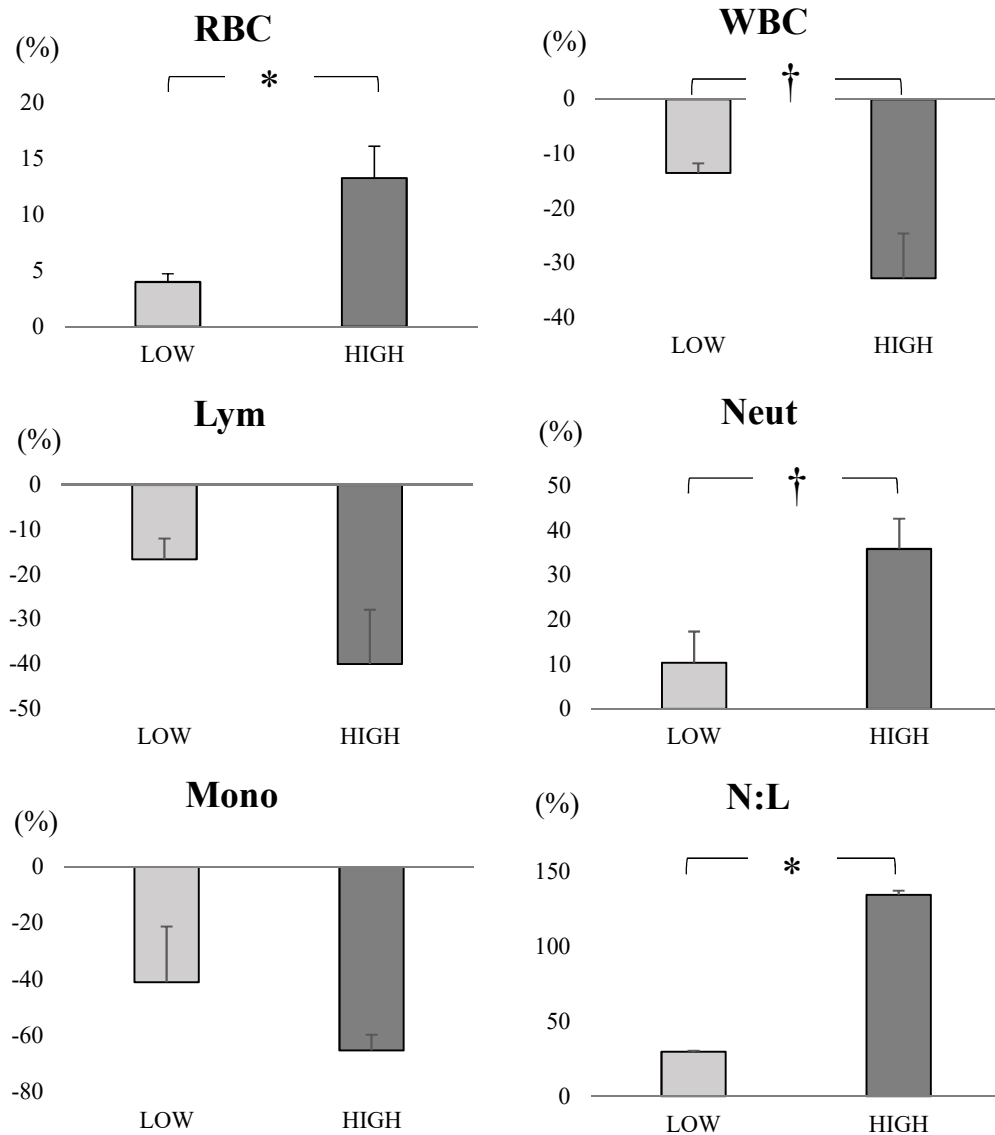


Figure 3-11 Percent change of blood cell count are compared between animals showing different LF/HF increase after 5mL intravenous injection of 5 ng/kg LPS (LPS). LOW, animals showed higher percent change of LF/HF after LPS injection; HIGH, animals showed lower percent change of LF/HF after LPS injection; RBC, red blood cells; WBC, white blood cells; Lym, lymphocyte; Neut, neutrophil; Mono, Monocyte; N:L, neutrophil to lymphocyte ratio. Each bar represents mean and SE. Difference between the groups: † $P < 0.1$, * $P < 0.05$.

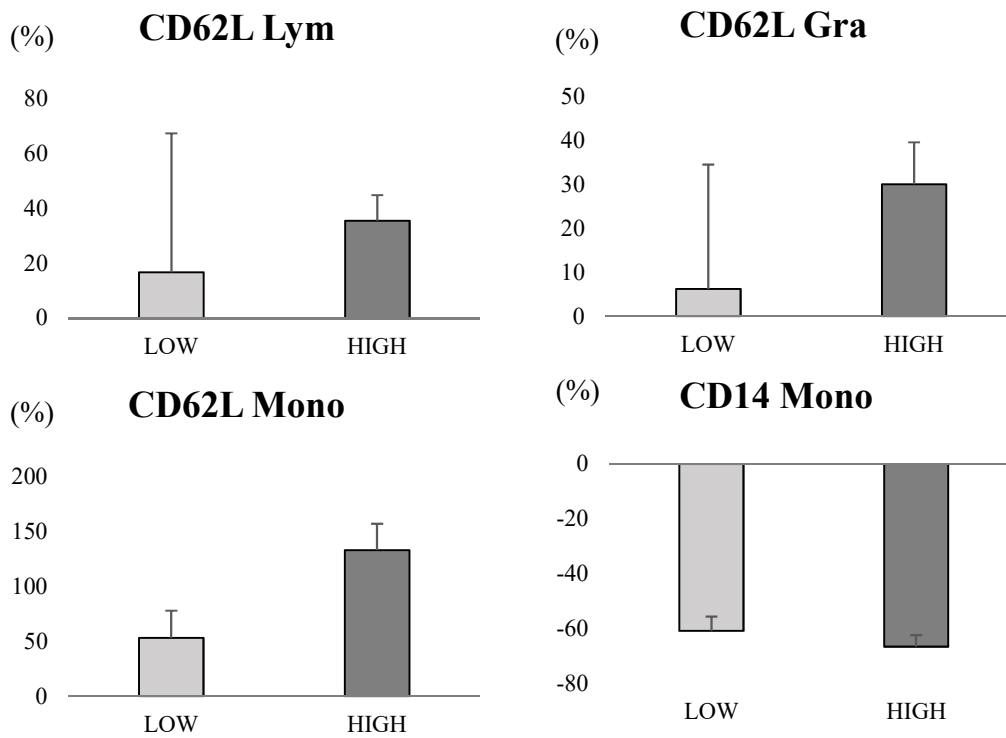


Figure 3-12 Percent change in surface antigen are compared between animals showing different LF/HF increase after 5mL intravenous injection of 5 ng/kg LPS (LPS). LOW, animals showed higher percent change of LF/HF after LPS injection; HIGH, animals showed lower percent change of LF/HF after LPS injection; CD62L Lym, CD62L on lymphocytes; CD62L Gra, CD62L on granulocytes, CD62L Mono, CD62L on monocytes; CD14 Mono, CD14 positive monocytes. Each bar represents mean and SE.

第4章

群飼育への移行が育成牛の 生体機能に及ぼす影響

4-1 緒言

これまでの章では、乳用牛の病態に自律神経系機能の変化が関与することを明らかにし、育成牛において低濃度の LPS 投与により感染の初期状態を作出可能なことが明らかになるとともに、LPS に対する生体機能の変化が大きい個体は自律神経系バランスが交感神経系優位な状態になることを明らかにしてきた。そこで、本章では実際に育成牛で実施されている飼養環境における生体機能の変化について明らかにすることを目的として、育成牛の管理上で特に問題となるのが群編成後における疾病の発生であることから、個別飼育から群飼育へ移行する移行群と個別飼育を継続する対照群で自律神経系機能を含めた生体機能の変化に関して比較検討した。

4-2 材料および方法

本研究は（独）畜産草地研究所（現：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門）の動物実験規定に基づき計画し、実験動物倫理委員会の承認を得た上で行った。

供試動物および実験手順

育成牛 11 頭（3 ヶ月齢）を使用し、7 頭を個別飼育から群飼育へ移行させた（GROUP: n = 7）。残りの 4 頭（CONT: n = 4）については個別飼育を継続した。観察期間は個別飼育 1 日と群飼育移行後 2 日とし、群飼育への移行は午前 9:00 – 9:30 の間に行い、その間ホルター心電図記録と経時的に採血を行った。個別飼育には幅 110 cm × 奥行 355 cm の柵で囲われたスペースを利用し、群飼育は柵で囲われた幅 760 cm × 奥行 710cm のスペースに幅 305 cm × 奥行 60 cm の飼槽および幅 350cm × 奥行 350 cm の屋根付きのスーパーカーフハッチを設置した場所で行い（Figure 4-1）、給餌は 9:00 と 16:00 頃に行った。群飼育施設では供試動物より月齢の 1 ヶ月程度大きな育成牛 2 頭が飼養されており、一回の試験につき 2–3 頭の動物が個別飼育から群飼育へ移行した。

採血

採血は0（移行直前）、1, 2, 3, 6, 12h に頸静脈に留置したカテーテルより行った。血液はプレーン採血管、ヘパリン入り採血管およびEDTA入り採血管に採取した。プレーン採血管で採取した血液は遠心分離機にかけ、血清サンプルを取得した。直腸温度（Rectal temperature）および呼吸数（Respiratory rate）の測定は、採血前後の立位時に行った。

ホルター心電図記録および心拍変動解析

ホルター心電計（QR2500; Fukuda M-E Kogyo Co., Ltd, Tokyo, Japan）を使用し、心電図記録はA-B誘導法で行った。陽極および陰極（Blue Sensor L-00-S; METS Inc., Tokyo, Japan）をそれぞれ右側肩甲骨および左側胸部にボンドで貼りつけ、ホルター心電計を手製のジャケットに固定し胸部に巻きつけ、リードを電極につないだ。これらの装着は実験日（移行処置を行った日）の2日前に行い、実験前日には十分に装着になれた状態にした。

記録した心電図は2-2で記載した手順で心拍変動解析をし、HR, LF値, HF値, LF/HF比を算出した。

血清 Cortisol 濃度測定

3-2に記載した方法で測定した。

白血球分画の測定

EDTA入り採血管に入れた血液から多項目自動血球分析装置（XT-1800i, Sysmex Corp., Kobe, Japan）により総白血球数（WBC）、リンパ球数（Lymphocyte）、好中球数（Neutrophil）、単球数（Monocyte）、好中球/リンパ球比（N:L）を求めた。

白血球機能解析

EDTA 入り採血管の血液から白血球細胞表面抗原 (CD62L, CD11b) を、ヘパリン入り採血管の血液から貪食 (Phagocytosis) およびアポトーシス (Apoptosis) 陽性細胞割合の分析をフローサイトメトリー法により行った。

細胞表面抗原解析：100 μ L の全血サンプルを同量の一次抗体懸濁液 (Table 4-1) に混合し冷暗条件にて 30 分間反応した。F-PBS (1%FCS 含リン酸緩衝溶液) により細胞を洗浄した後、二次抗体として蛍光標識 F(ab')₂ ヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体を冷暗条件にて 30 分間反応させた。反応後、再度細胞を洗浄したのち、溶血・固定試薬 (Immunoprep; Beckman Coulter K.K., Tokyo, Japan) を加え、赤血球を溶解し白血球を固定した。各細胞集団 (リンパ球、顆粒球、単球) は前方散乱光 (forward light scatter; FSC) / 側方散乱光 (side light scatter; SSC) にてゲーティングし、表面抗原 CD11b については陽性細胞の割合 (%) を、表面抗原 CD62L は平均蛍光濃度 (MFI) を測定した。

貪食陽性細胞解析：貪食陽性細胞の測定は専用キット (pHrodo E.coli BioParticles Conjugate for Phagocytosis Kit for Flow Cytometry, Life Technologies Japan Ltd., Tokyo, Japan) を使用した。ヘパリン添加血液 (各試験 50 μ L) を氷上で 10 分静置した後に、pHrodo Red Eshcherichia coli BioParticles (各試験 10 μ L) を加えて混和した。対照サンプルは氷上に静置し、被験サンプルは 37.0 $^{\circ}$ C の微温湯で 10 分間インキュベートした。インキュベート終了後、サンプルを微温湯から外し氷上に戻し貪食反応を停止した。サンプル中の赤血球は付属の緩衝液によって溶解し、遠心分離、洗浄を行ったのち、最終的な白血球を含有する沈殿物は洗浄液に懸濁した。貪食陽性細胞の測定はインキュベーションから 60 分以内に行った。

アポトーシス誘導反応およびアポトーシス陽性細胞解析：ヘパリン添加血液 100 μ L を 40 $^{\circ}$ C で 4 時間インキュベートしてアポトーシスを誘導した。対照を室温 (20 – 24 $^{\circ}$ C)

として測定した。アポトーシスの検出は Annexin-V-FLUOS 染色キット (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) により annexin-V と propidium iodide (PI) で二重染色した。なお、染色時間や洗浄は同キットの方法に準じて行い、前述した溶血・固定液を用いて細胞を処理した。FSC/SSC にて各細胞集団 (リンパ球、顆粒球、単球) にゲーティングし、FITC 標識した annexin-V に染まり、PI に染まらなかった細胞をアポトーシス陽性と判定した。

統計解析

統計解析は統計ソフト R (ver. 3.2.4) を使用した。変数の比較において、p 値が 0.05 未満を有意と定義した。

群飼育に移行した日の前日を Pre、当日を Exp とした。心拍変動指標は、一般化線形混合モデルにより二元配置分散分析を行い、実験前日 (Pre)・実験日 (Exp) それぞれの日において群 (CONT, GROUP) と時間 (0-6h) の効果および群と時間の交互作用効果を調べた。さらに、CONT と GROUP それぞれの群に対し、日 (Pre, Exp) と時間 (0 - 6h) の効果および日と時間の交互作用効果を調べた。有意な交互作用効果が認められた場合は、Tukey test により多重比較検定を行い、Exp において Pre と比較した場合に有意に異なる時間帯を検出した。

直腸温度 (Rectal temperature)、呼吸数 (Respiratory rate)、白血球分画 (WBC, Lymphocyte, Neutrophil, Monocyte, N:L)、白血球機能 (CD62L Lym, CD62L Gra, CD62L Mono, CD11b Gra, CD11b Mono, Phagocytosis Gra, Phagocytosis Mono, Apoptosis Lym, Apoptosis Gra, Apoptosis Mono) および Cortisol は、一般化線形混合モデルにより二元配置分散分析を行い、群 (CONT, GROUP) と時間 (0 - 12h) の効果および群 (CONT, GROUP) と時間 (0 - 12h) の交互作用効果を調べた。有意な交互作用効果が認められた場合は、Tukey test により多重比較検定を行い、群間で有意に異なる時間帯を検出した。さらに、各血液性状項目について、0h の値に対する 12h の値の変化率 (%) を求めた。

また、GROUP 群の自律神経機能の反応の個体差の検討をするために、Exp における 0–6h の心拍変動指標の平均値の、Pre の同時間帯 0–6h における平均値に対する割合 (%) を求め、上昇率とした。LF/HF 比の上昇率はクラスター解析 (Ward 法) によって 2 群に分類されたため、LF/HF 比の低い群を G-LOW、高い群を G-HIGH とした。

自律神経系機能と臨床徴候や免疫系機能の関連性は、CONT と G-LOW、G-HIGH それぞれの間における各項目の 0h の値に対する 12h の値の変化率 (%) の差を Student's *t* test により検定した。

4-3 結果

Pre、Exp いずれの日においても、0-12h における自律神経系機能の変化に CONT および GROUP 間の差は認められなかった (Figure 4-2, 4-3)。CONT においては 1 日の自律神経系機能の推移を Pre と Exp で比較した場合に、いずれの指標にも差は認められなかった (Figure 4-4)。一方で、GROUP では実験日において、移行直後に実験前日と比べて移行直後に HR の有意な上昇および HF 値の有意な低下が認められ、LF/HF 比は上昇向であった (Figure 4-5)。

直腸温度、呼吸数、血清 Cortisol 濃度、血液性状 (細胞分画、白血球機能) の推移を群間で比較したところ、直腸温度や呼吸数は群間で差のある時間帯は観察されなかった (Figure 4-6)。血清 Cortisol 濃度は GROUP が高く推移したものの、有意な交互作用効果は認められなかった (Figure 4-7)。総白血球数 (WBC) や細胞分画および好中球 / リンパ球比 (N:L) は両群で同様な推移をし、いずれの時間帯においても有意な差はなかった (Figure 4-8)。CD62L の発現は、好中球およびリンパ球においては移行処置の前にすでに GROUP で高く、12 時間後も CONT と比べ高かった。GROUP では単球上の CD62L 発現は移行から 3 時間後に上昇し、12 時間後まで高く推移した (Figure 4-9)。CD11b 陽性細胞 (Figure 4-10)、貪食 (Phagocytosis) 陽性細胞 (Figure 4-11) およびアポトーシス (Apoptosis) 陽性細胞 (Figure 4-12) は両群とも同様に推移し、有意差が認められる時間帯はなかった。

移行後（0–6h）の LF/HF 比の各個体における変化率から G1, 6, 7 が他の個体と比較して反応性の異なる群として抽出された（Figure 4-13）。これらの個体を G-HIGH とし、その他の個体を G-LOW とし、それに CONT を加えた 3 群間におけるその他の生体機能指標の変化について比較検討した。直腸温度、呼吸数は、G-HIGH が CONT よりも低い傾向であった（Figure 4-14）。血清 Cortisol 濃度は G-LOW が最も上昇が大きかったが、有意な差は認められなかった（Figure 4-15）。総白血球数（WBC）、好中球数（Neutrophil）および N:L 比は CONT よりも G-HIGH の方が有意に多かったが、単球やリンパ球には有意な差は認められなかった（Figure 4-16）。細胞表面抗原の発現に関しては、単球上の CD62L 発現（CD62L Mono）は G-LOW で上昇し CONT と比べて有意に高かった（Figure 4-17）。好中球における CD11b 陽性細胞について、CONT、G-HIGH それぞれにおける 1 頭の側方散乱光を X 軸、前方散乱光を Y 軸にした散布図（Figure 4-18A）および蛍光強度を指標としたヒストグラム（Figure 4-18B）を示した。CONT は 0h と 12h では蛍光強度の差は小さいのに対し、G-HIGH では 12h で蛍光強度の減少がみられた。CD11b 陽性好中球の割合は、G-HIGH で減少が認められ、CONT と比べて有意に低かった（Figure 4-19）。貪食陽性細胞率（Phagocytosis）およびアポトーシス陽性細胞率（Apoptosis）に関しては群間に差はみとめられなかった（Figure 4-20, 4-21）。

4-4 考察

個別飼育から群飼育へ育成牛を移行することにより、移行直後において LF/HF 比が増加する傾向が見られ、前章での LPS の反応と同様に個体差も認められた。移行群の中でも LF/HF 比の増加が大きい個体を高感受性群として解析を加えた。血液性状の変化は 12 時間後に顕著に現れていたため、移行前に対する行後 12 時間の変化率を移行処置に対する反応性とみなし、群間で比較を行った。高感受性群では好中球数が有意に増加し、接着因子の 1 つである CD11b の好中球における発現が有意に低下していた。

交感神経系の緊張による末梢血中における好中球の増加や機能低下が疾病罹患リスクの上昇を引き起こすといわれていることから、飼養環境の変化により交感神経系緊張が持続する場合には免疫機能の低下が起こり疾患の発症に関与しているものと考えられた。飼養環境が生体に及ぼす影響の評価を行った多くの研究では、Cortisol を指標として行われており、飼養環境の変化が HPA 軸を活性化することによる免疫機能の抑制が疾病発生の原因であると考えられてきた¹⁴。本研究では、移行群の方が対照群よりも移行 2 時間後から高い傾向は示したものの有意な変化ではなかった。一般的には視床下部で産生される CRH は交感神経系と HPA 軸どちらも活性化するといわれていることから、LF/HF 比に反映される自律神経バランスを基準に動物を分類したところ、交感神経系優位な個体群では血清 Cortisol 濃度の上昇は起こらず、むしろ自律神経バランスの変化が少ない群において高くなっていた Koolhaas ら (2010) は、ラットでは外部刺激に対し攻撃的な行動をとる時間とノルアドレナリンに正の相関がある一方で、Corticosteron には関連性が見られなかったことを報告している⁷²。つまり、同一刺激に対する HPA 軸や自律神経系の応答は個体によってどちらかが優位に働くかに差異があるといえる。群飼育や離乳などの飼養環境の変化がウシの免疫機能に悪影響をもたらす報告は数多くある^{13,73-78}。Hickey ら (2003) は子牛の離乳による血中ノルアドレナリン濃度の著しい上昇が免疫機能を抑制することを報告している⁷⁶。その免疫系指標の移行後 12 時間における変化率にも自律神経機能変化の違いによる差異が明らかとなった。白血球はカテコラミン受容体の α 、 β どちらも発現しているため、交感神経系の緊張によってどちらの受容体が刺激されるかによって、もたらされる免疫機能への影響が抗炎症作用や炎症増強作用と相反することもあり単純ではないと考えられている⁶⁸。そして、交感神経終末から分泌されるカテコラミンは、カテコラミン受容体を介して接着因子のダウンレギュレーションや貪食能の低下などを引き起こすことも知られている⁷⁹。交感神経系の緊張が大きかった群では血管壁への接着因子の 1 つである CD11b を発現する好中球の減少および好中球数や好中球・リンパ球比の増加が見られた。交感神経緊張は CD11b のダウンレギュレーション⁸⁰をもたらすことから、好中

球の辺縁プールから循環プールへの移動が生じたために増加につながったと考えられる。一方、交感神経系の緊張が小さい個体群では、リンパ球や単球 CD62L 発現上昇が観測された。この個体群では Cortisol や直腸温度の上昇が大きかった。Cortisol は好中球の接着因子の発現低下をもたらすことが報告されており⁸¹、これらの変化の詳細な機序は不明である。急性ストレス（数分～数時間）ではむしろ炎症時における白血球の遊走能を促すなど、免疫保護作用を持つことが報告されている^{82,83}。子牛の離乳により CD62L の発現が減少したという報告⁷⁷と、上昇したという報告もある⁸⁴。これらのことから、刺激の強度や持続期間によっても顕在化する現象が異なるものと考えられた。第 3 章において低用量 LPS 投与で作出した初期感染状態でも単球 CD62L 発現上昇が観察され、同時に直腸温度の上昇も観察されたが、本研究における直腸温度の上昇は日内変動によるものと考えられる。移行 12 時間後は日没から 2-3 時間後に一致するが、子牛ではこの時間帯に最も直腸温度が高くなることが報告されている⁸⁵。したがって、G-HIGH で観察された直腸温度の上昇は正常な日内変動を示している。また、総単球数には変化が認められなかったことから、少なくとも自然免疫系応答に伴う単球の血管壁への遊走を反映しているとは考えにくい。

育成牛において、白血球のアポトーシスに関連する遺伝子発現の変化が輸送⁸⁶や離乳⁸⁴で示されており、陽性を示す細胞の増加は拘束下に置かれたマウスでも報告されている⁸⁷。一方で、貪食陽性細胞は離乳ストレスで減少が報告されている^{77,88}。群飼育への移行に伴う単球 CD62L の発現量変化の生理学的意義は今後明らかにする必要はあるが、少なくとも貪食能やアポトーシスに影響がなかったことから、細胞機能抑制をもたらすほどの変化ではなかったといえる。

小括

本章では、実際に育成牛で実施されている飼養環境における生体機能の変化について明らかにすることを目的とした。育成牛で特に問題となるのが、群編成後における疾病の発生であることから、個別飼育から群飼育へ移行する移行群と個別飼育を継

続する対照群で自律神経系機能を含めた生体機能の変化を比較した。対照群では移行群の群飼育への移行を行う前日と当日でいずれの指標にも変化は見られなかったが、移行群では移行直後において LF/HF 比に増加する傾向が見られ、前章での LPS の反応と同様に個体差も認められた。そこで、移行群の中でも LF/HF 比の増加が大きい個体を高感受性群として解析を加えたところ、高感受性群では好中球数が有意に増加し、接着因子の 1 つである CD11b の好中球における発現が有意に低下していた。交感神経系の緊張による末梢血中における好中球の増加や機能低下が疾病罹患リスクの上昇を引き起こすといわれていることから、飼育環境の変化により交感神経系緊張が持続する場合には免疫機能の低下が起こり疾患の発症に関与しているものと考えられた。

Table 4-1 Antibodies used for the immunostaining of peripheral blood leukocytes.

Antigen	mAb Clone	Isotype	Cellular expression	Source
CD62L	DU1-29	IgG1	L-selectin	WSU ¹⁾
CD11b	MM12A	IgG1	Mac-1 α	WSU

1) Monoclonal Antibody Center, Washington State University.

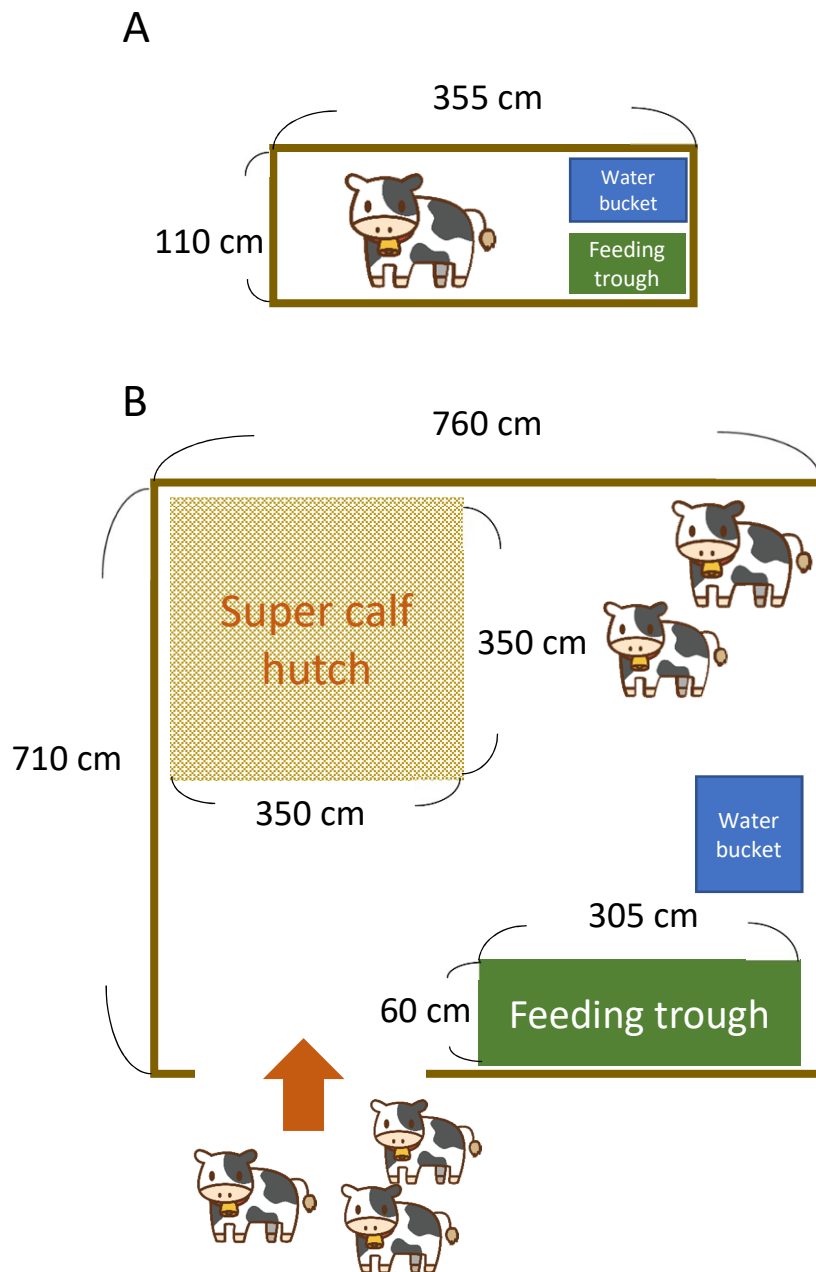


Figure 4-1 Environment supplied for calves under the experiment. A) Individual pen with a feeding trough and a water bucket are provided as shown above. B) Open yard housing with super calf hutch, a feeding trough and a water bucket are provided as shown above.

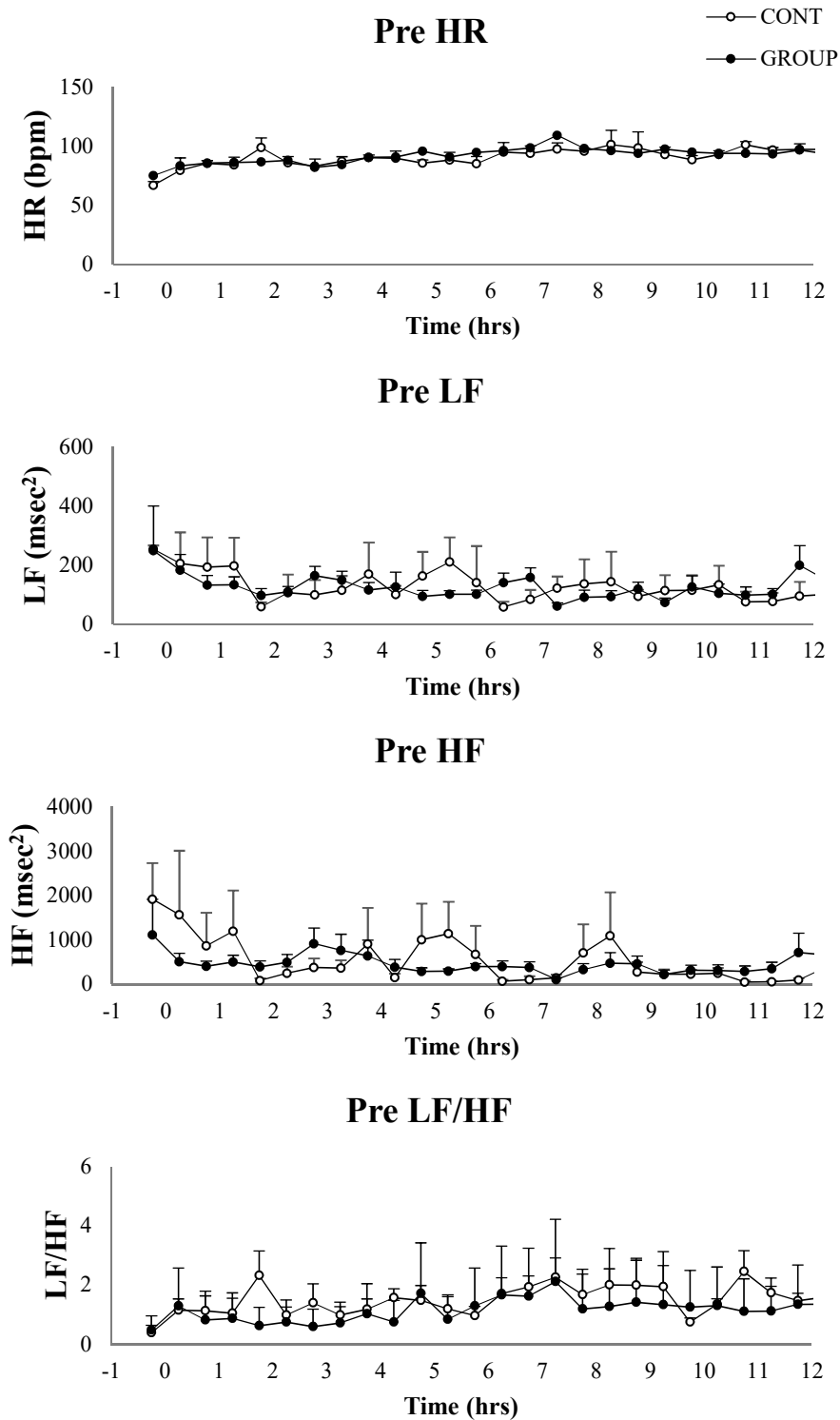


Figure 4-2 Time series change in heart rate and heart rate variability on pre-experimental day. CONT, control group; GROUP, grouping group; Pre, pre-experimental day; HR, heart rate; LF, low frequency power; HF, high frequency power; LF/HF, LF to HF ratio. Each plot represents mean and SE.

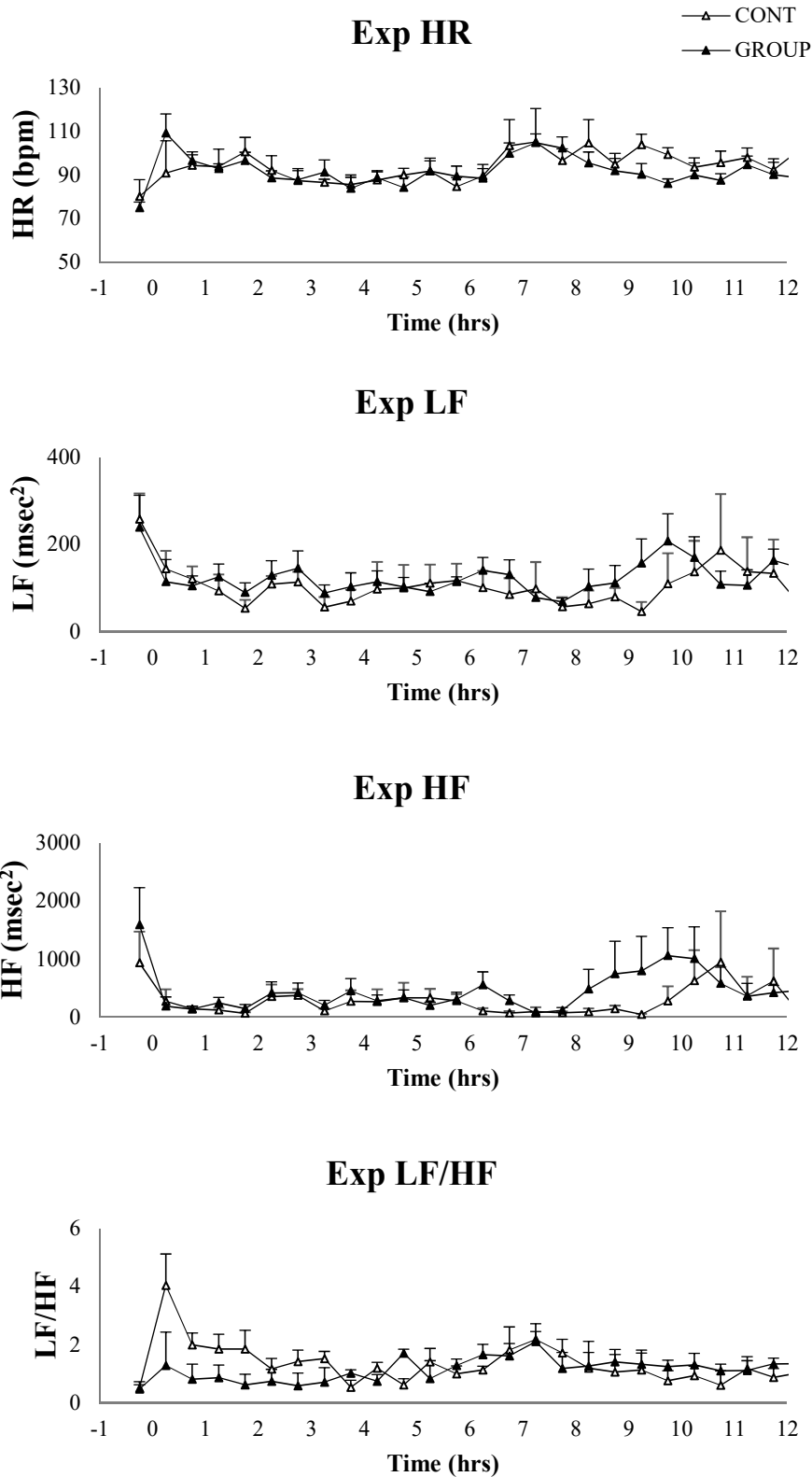


Figure 4-3 Time series change in heart rate and heart rate variability on experimental day. CONT, control group; GROUP, grouping group; Exp, experimental day; HR, heart rate; LF, low frequency power; HF, high frequency power; LF/HF, LF to HF ratio. Each plot represents mean and SE.

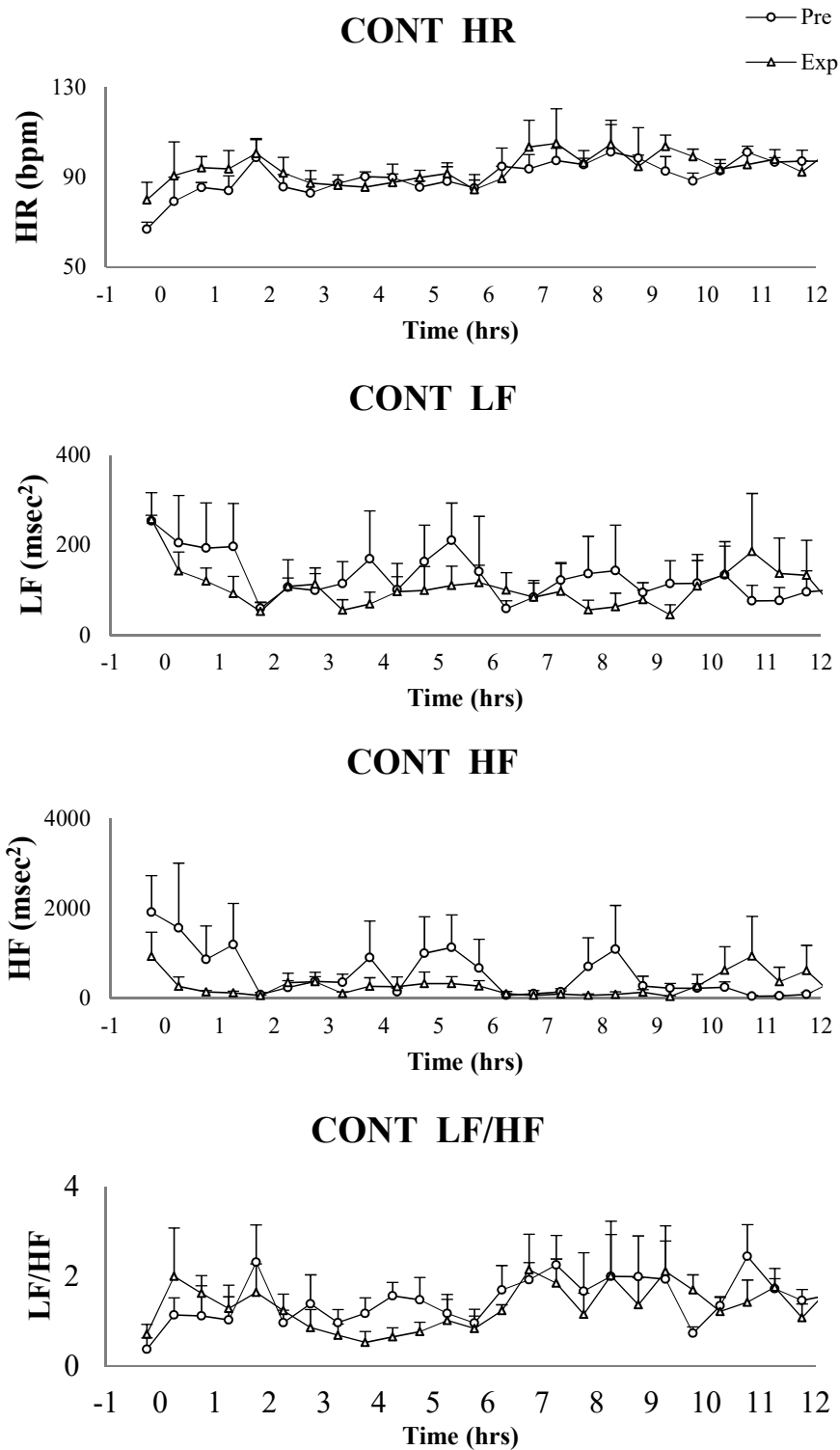


Figure 4-4 Time series change in heart rate and heart rate variability on pre-experimental and experimental day in control group. CONT, control group; Pre, pre-experimental day; Exp, experimental day; HR, heart rate; LF, low frequency power; HF, high frequency power; LF/HF, LF to HF ratio. Each plot represents mean and SE.

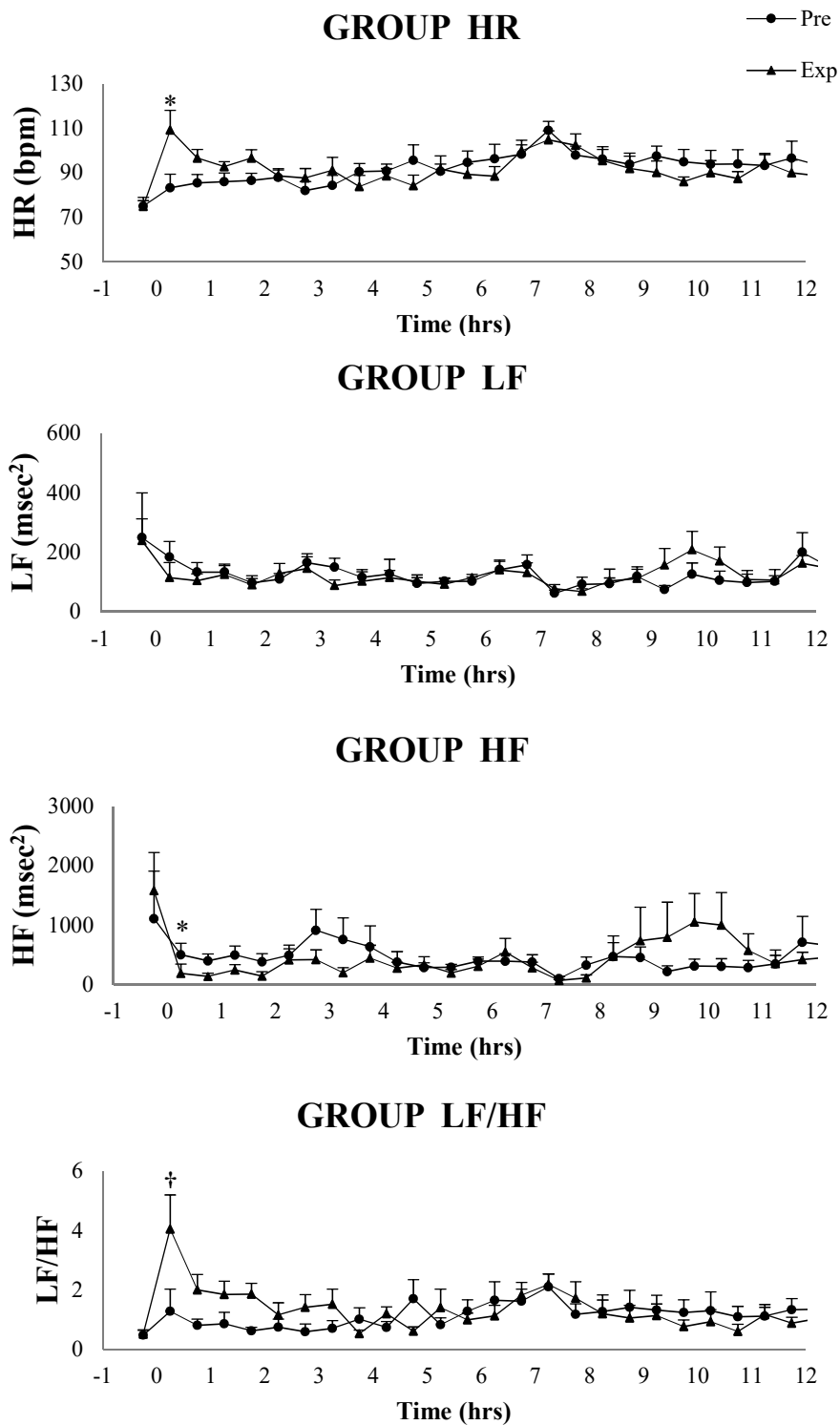


Figure 4-5 Time series change in heart rate and heart rate variability on pre-experimental and experimental day in grouping group. GROUP, grouping group; Pre, pre-experimental day; Exp, experimental day; HR, heart rate; LF, low frequency power; HF, high frequency power; LF/HF, LF to HF ratio. Each error bar represents SE. Difference between the days: † $P < 0.1$, * $P < 0.05$.

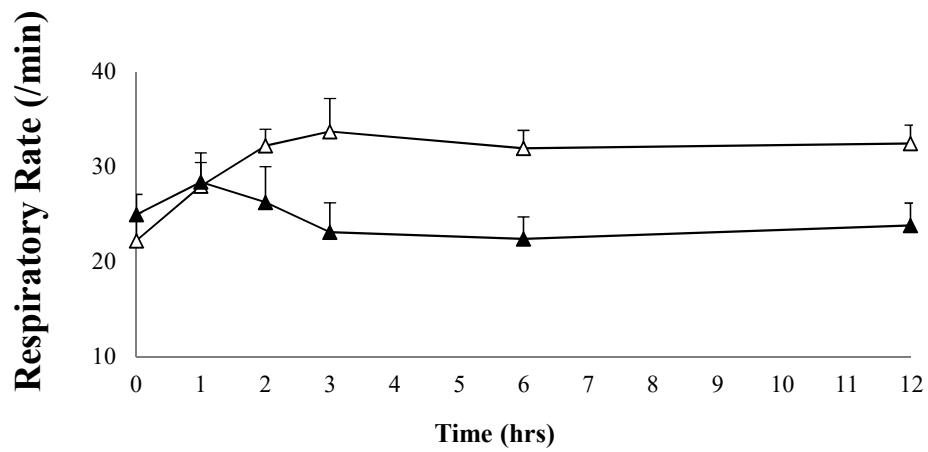
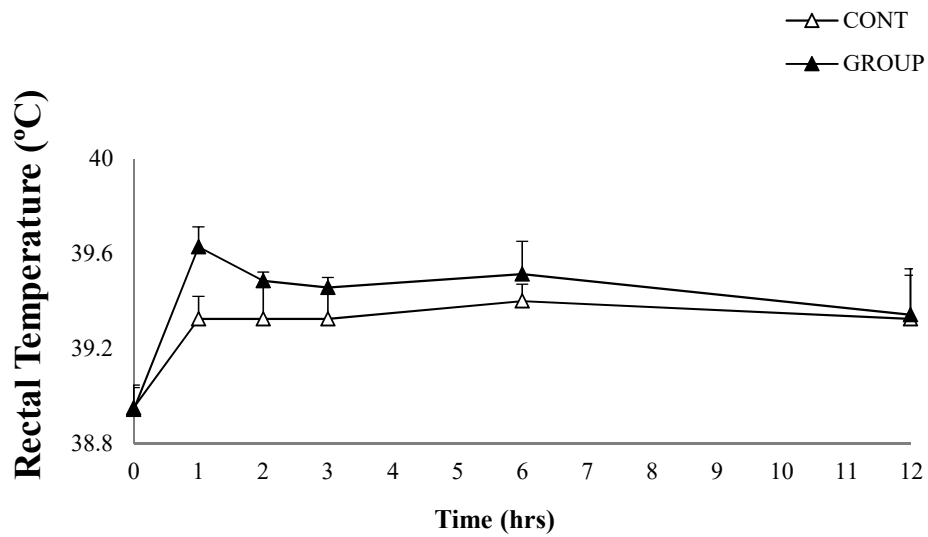


Figure 4-6 Time series change in rectal temperature and respiratory rate on experimental day. CONT, control group; GROUP, grouping group. Each plot represents mean and SE.

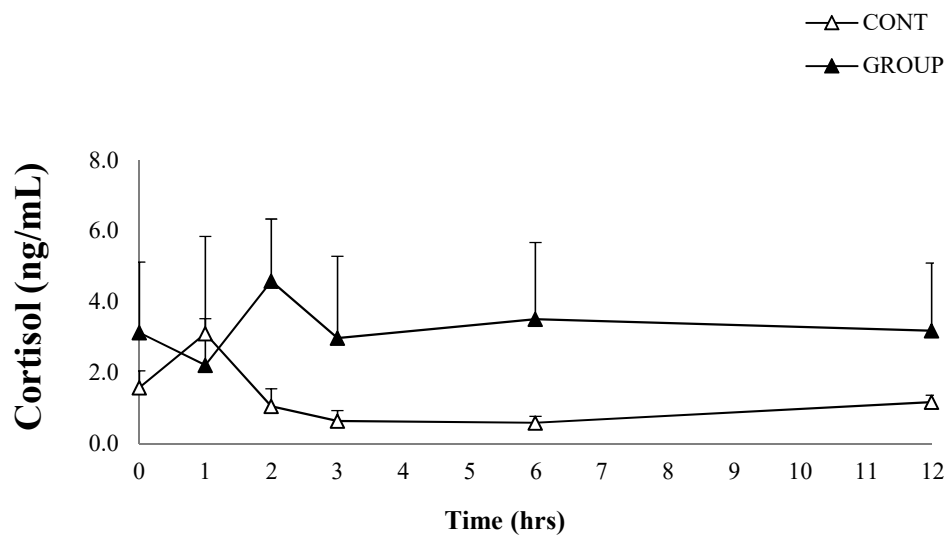


Figure 4-7 Time series change in serum cortisol concentration on experimental day. CONT, control group; GROUP, grouping group. Each plot represents mean and SE.

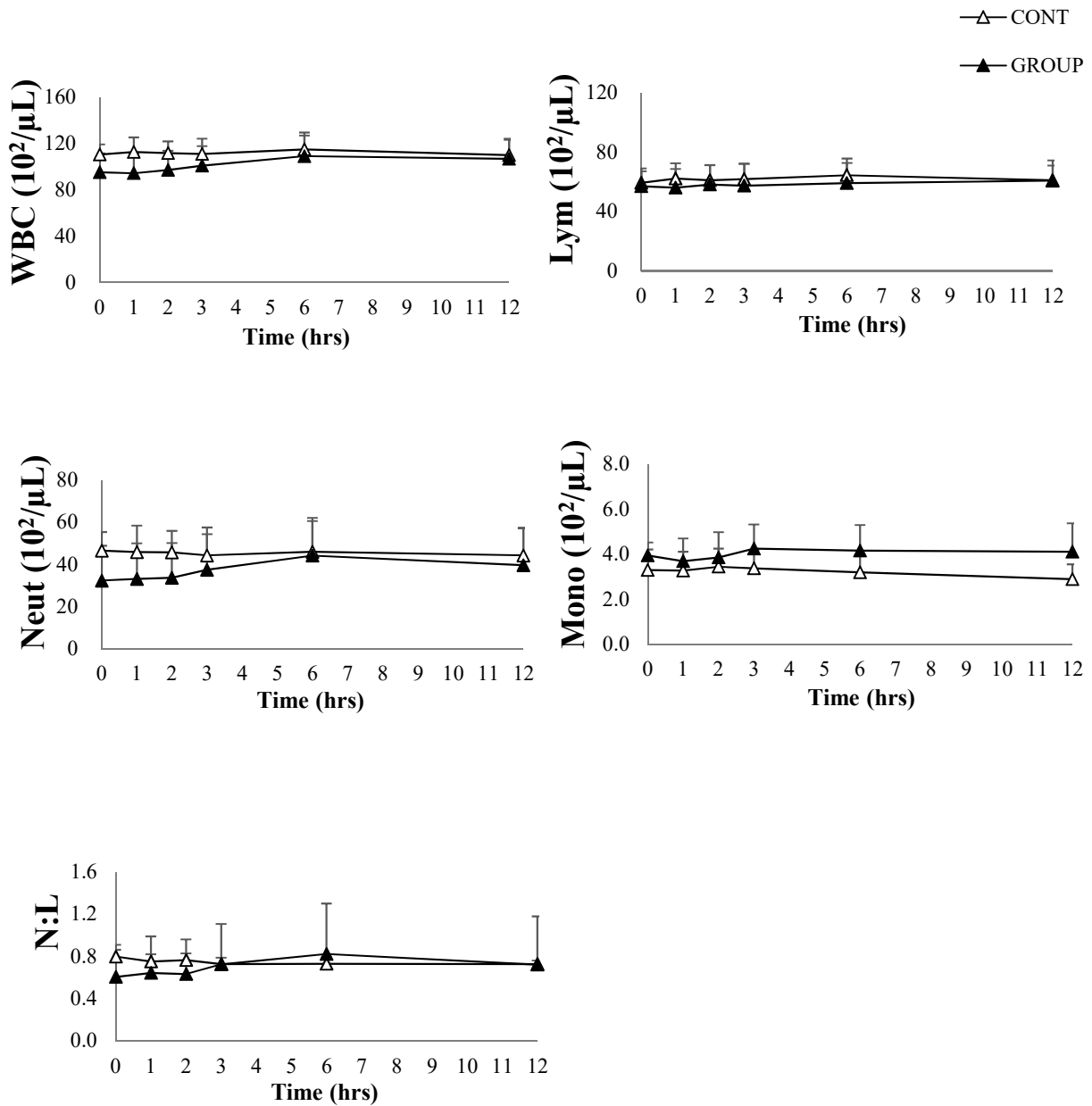


Figure 4-8 Time series change in blood cell counts and neutrophil to lymphocyte ratio on experimental day. CONT, control group; GROUP, grouping group; WBC, white blood cell; Lym, lymphocyte; Neut, neutrophil; Mono, Monocyte; N:L, neutrophil to lymphocyte ratio. Each plot represents mean and SE.

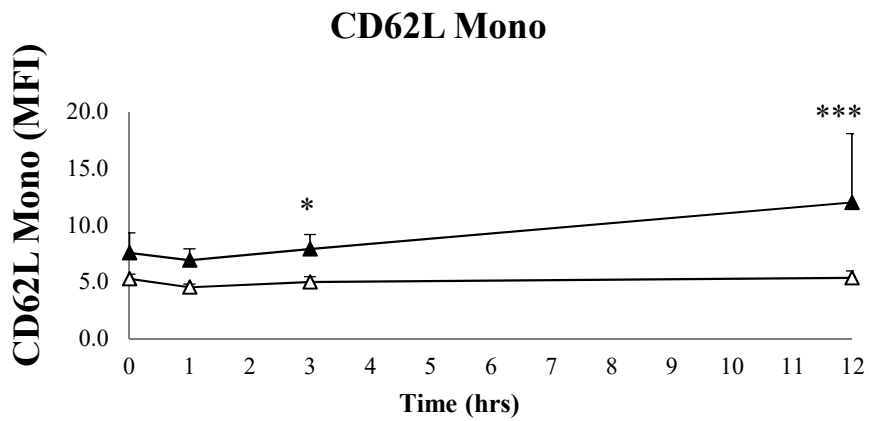
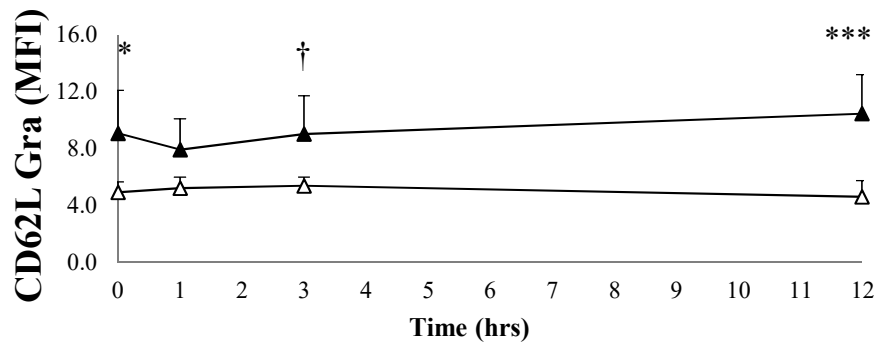
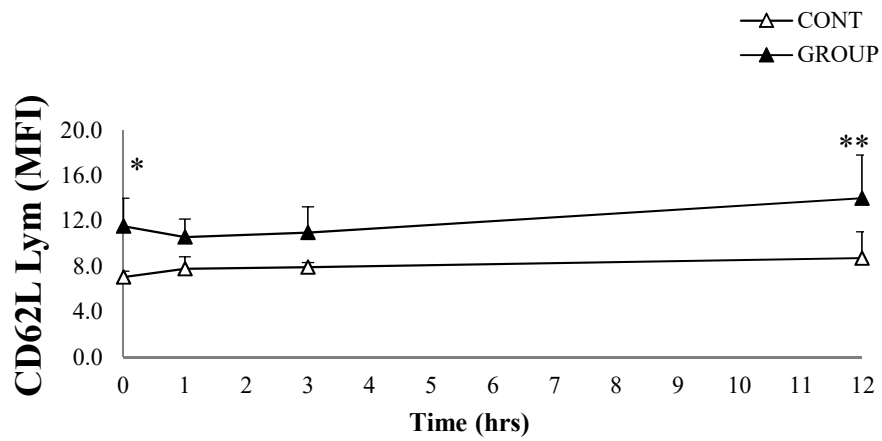


Figure 4-9 Time series change in CD62L expression on blood cells on experimental day. MFI, mean fluorescence intensity; CONT, control group; GROUP, grouping group; CD62L on lymphocytes; CD62L Gra, CD62L on granulocytes; CD62L Mono, CD62L on monocytes. Each plot represents mean and SE. Difference between the groups: † $P < 0.1$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

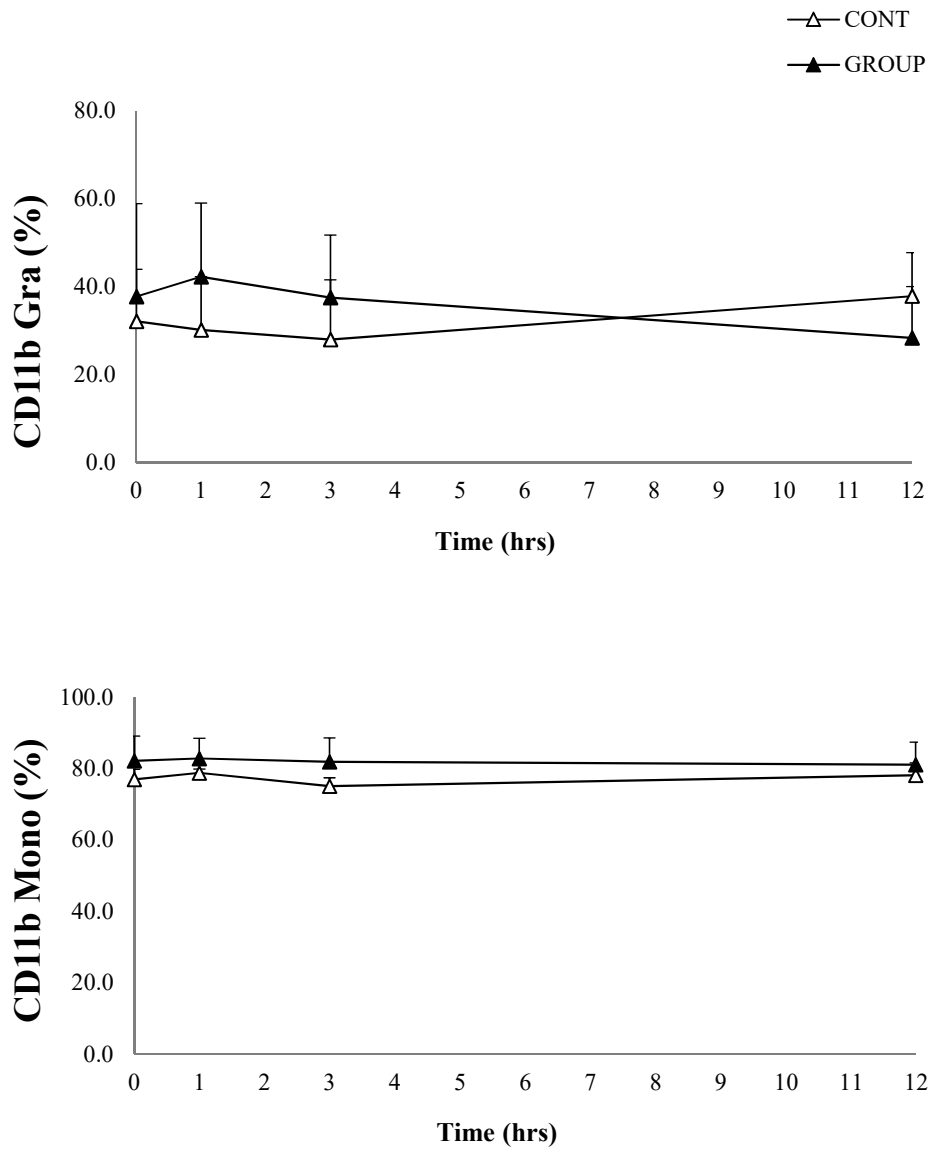


Figure 4-10 Time series change in CD11b positive blood cells (%) on experimental day. CONT, control group; GROUP, grouping group; CD11b Gra, CD11b positive granulocytes; CD11b Mono, CD11b positive monocytes. Each plot represents mean and SE.

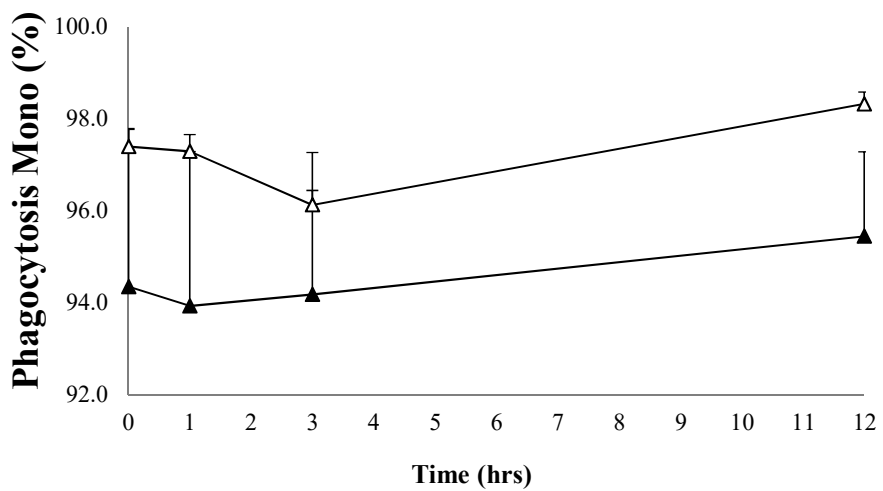
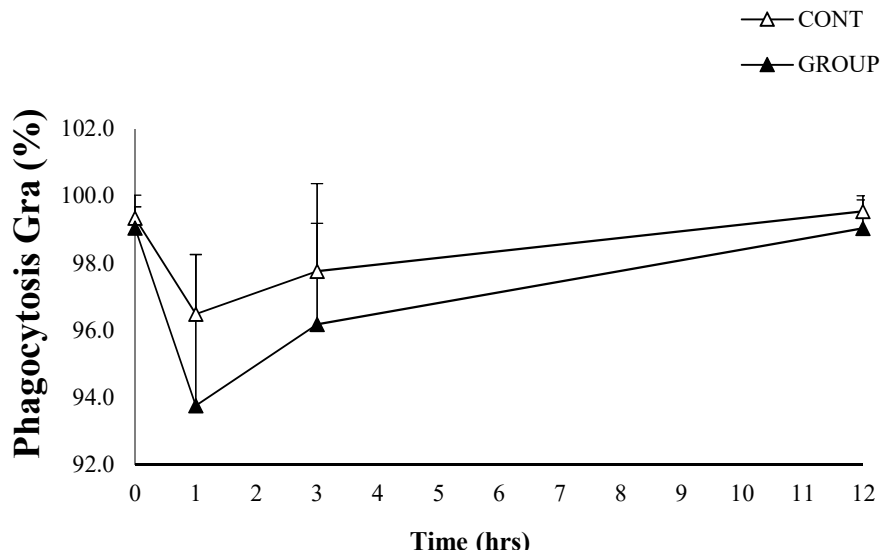


Figure 4-11 Time series change in phagocytosis positive blood cells (%) on experimental day. CONT, control group; GROUP, grouping group; Phagocytosis Gra, phagocytosis positive granulocytes; Phagocytosis Mono; phagocytosis positive monocytes. Each plot represents mean and SE.

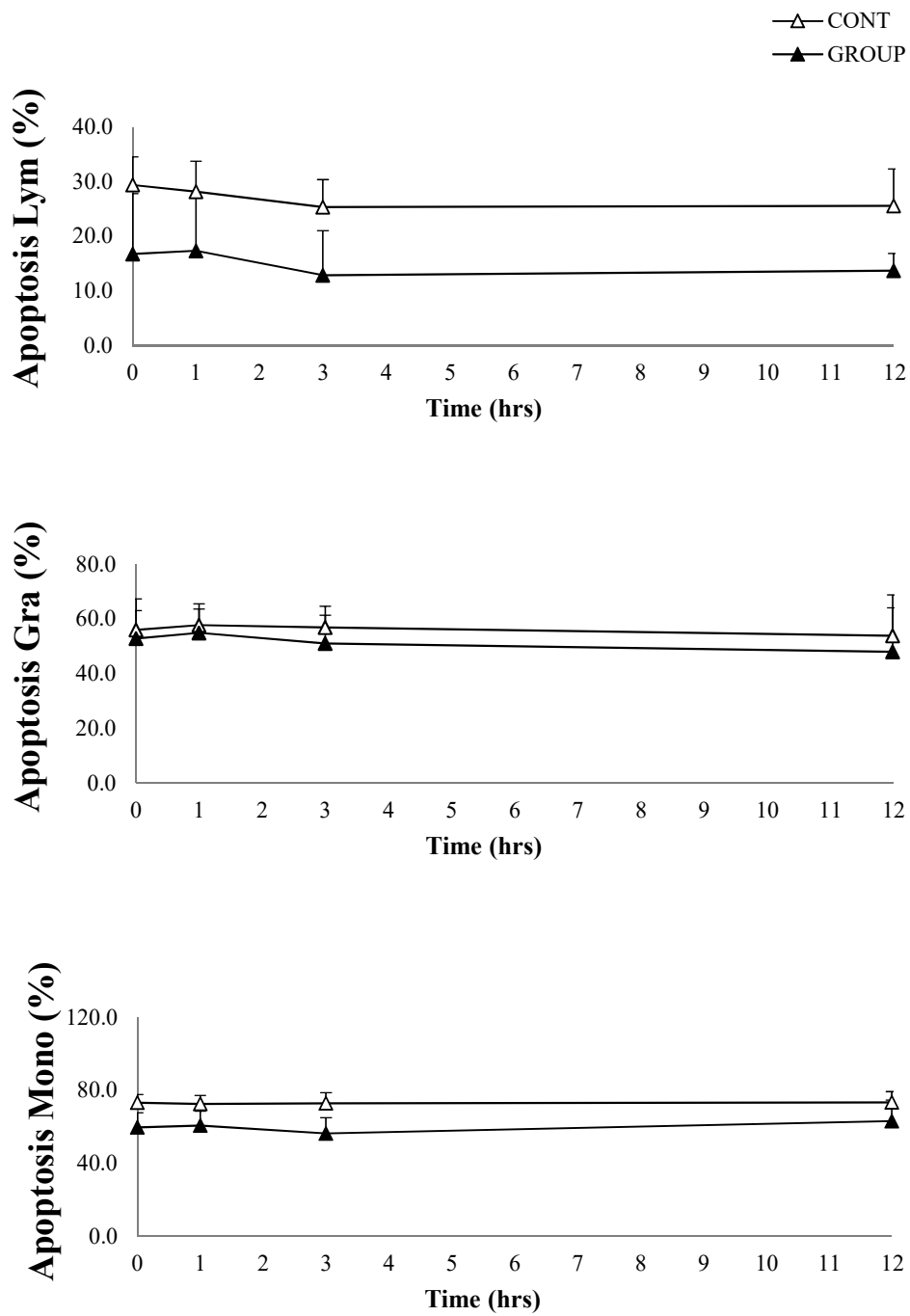
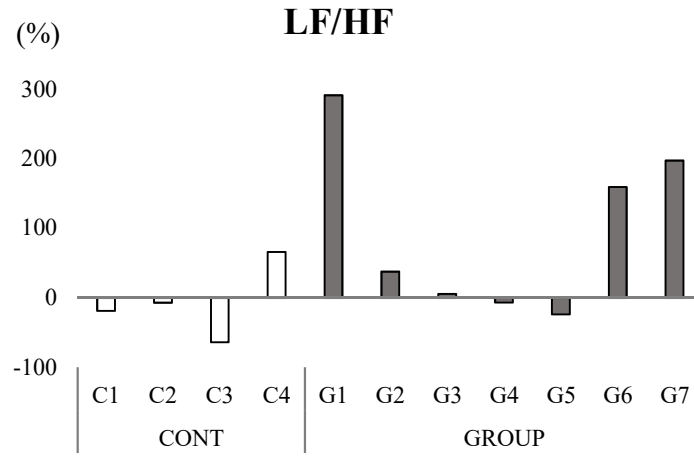


Figure 4-12 Time series change in apoptosis positive blood cells (%) on experimental day. CONT, control group; GROUP, grouping group; Apoptosis Gra, apoptosis positive granulocytes; Apoptosis Lym, apoptosis positive lymphocytes; Apoptosis Mono; apoptosis positive monocytes. Each plot represents mean and SE.

A



B

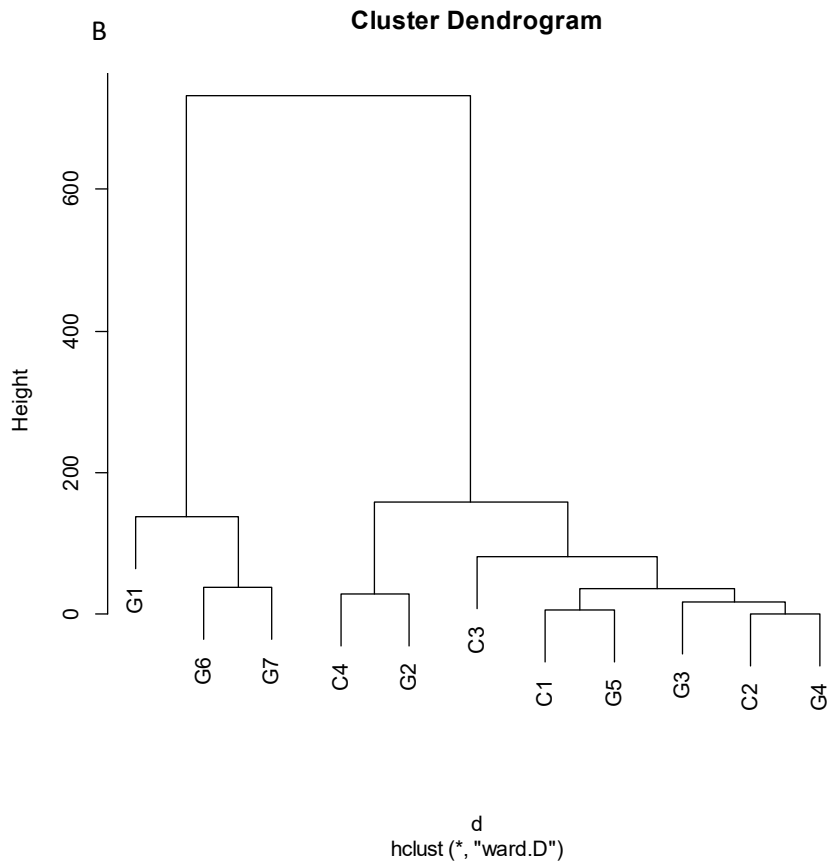


Figure 4-13 A) Percent change of LF/HF during 0 - 6h on experimental day from the corresponding time in pre-experimental day. B) Cluster dendrogram of the percent change of LF/HF for each animal. C1 – C4, animals in control group; G1 – G7, animals in grouping group; LF, low frequency power; HF, high frequency power; LF/HF, LF to HF ratio.

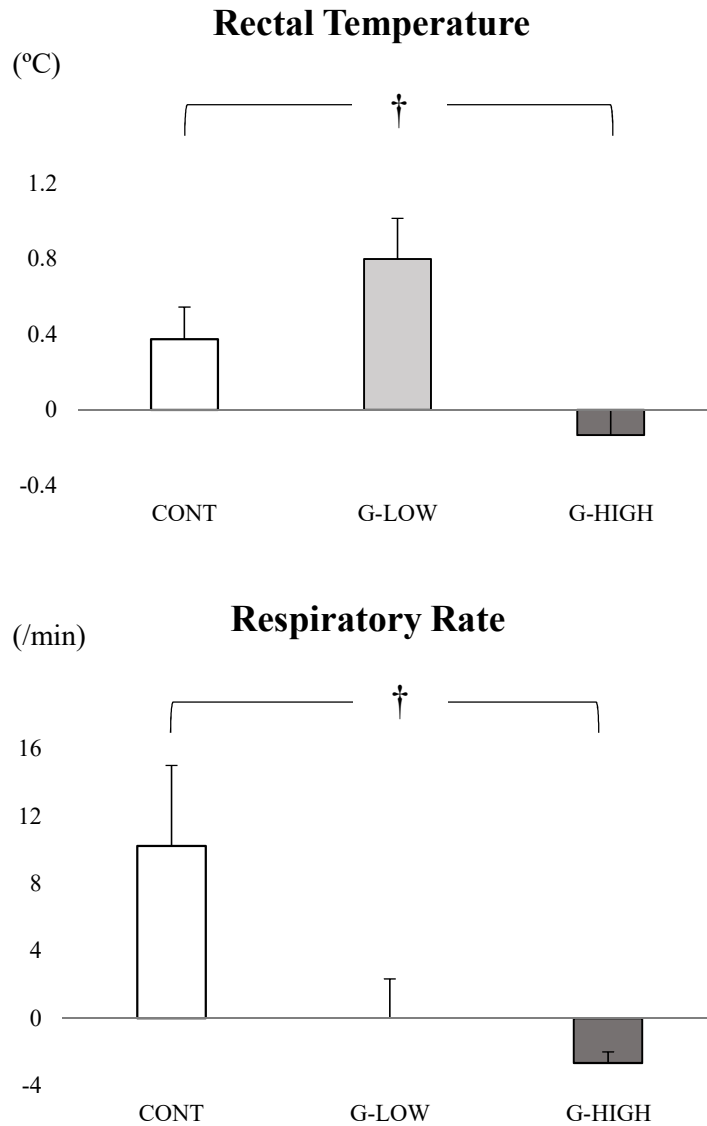


Figure 4-14 Percent change of rectal temperature and respiratory rate during 0 -12h on experimental day. CONT, control group; G-LOW, animals showed lower LF/HF change from pre-experimental day; G-HIGH, animals showed higher LF/HF change from pre-experimental day. Each bar represents mean and SE. Difference between the groups: † $P < 0.1$.

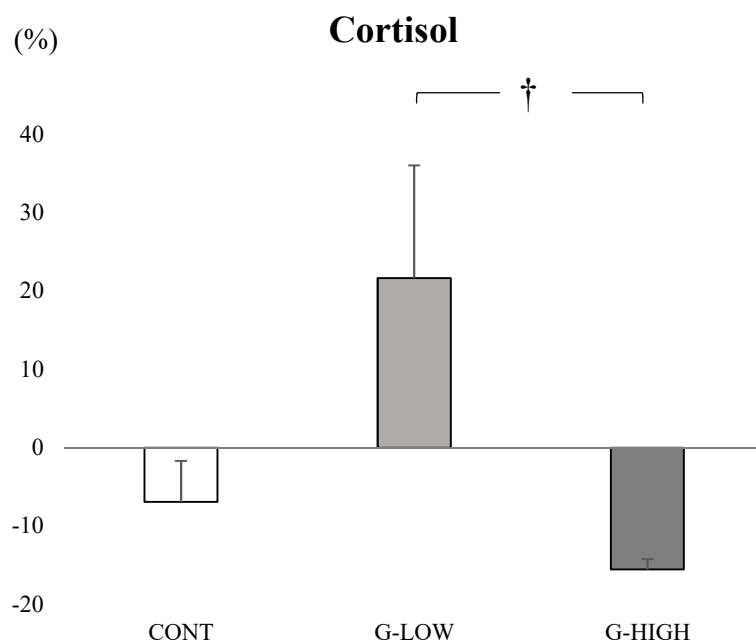


Figure 4-15 Percent change of serum cortisol concentration during 0 -12h on experimental day. CONT, control group; G-LOW, animals showed lower LF/HF change from pre-experimental day; G-HIGH, animals showed higher LF/HF change from pre-experimental day. Each bar represents mean and SE. Difference between the groups: † $P < 0.001$.

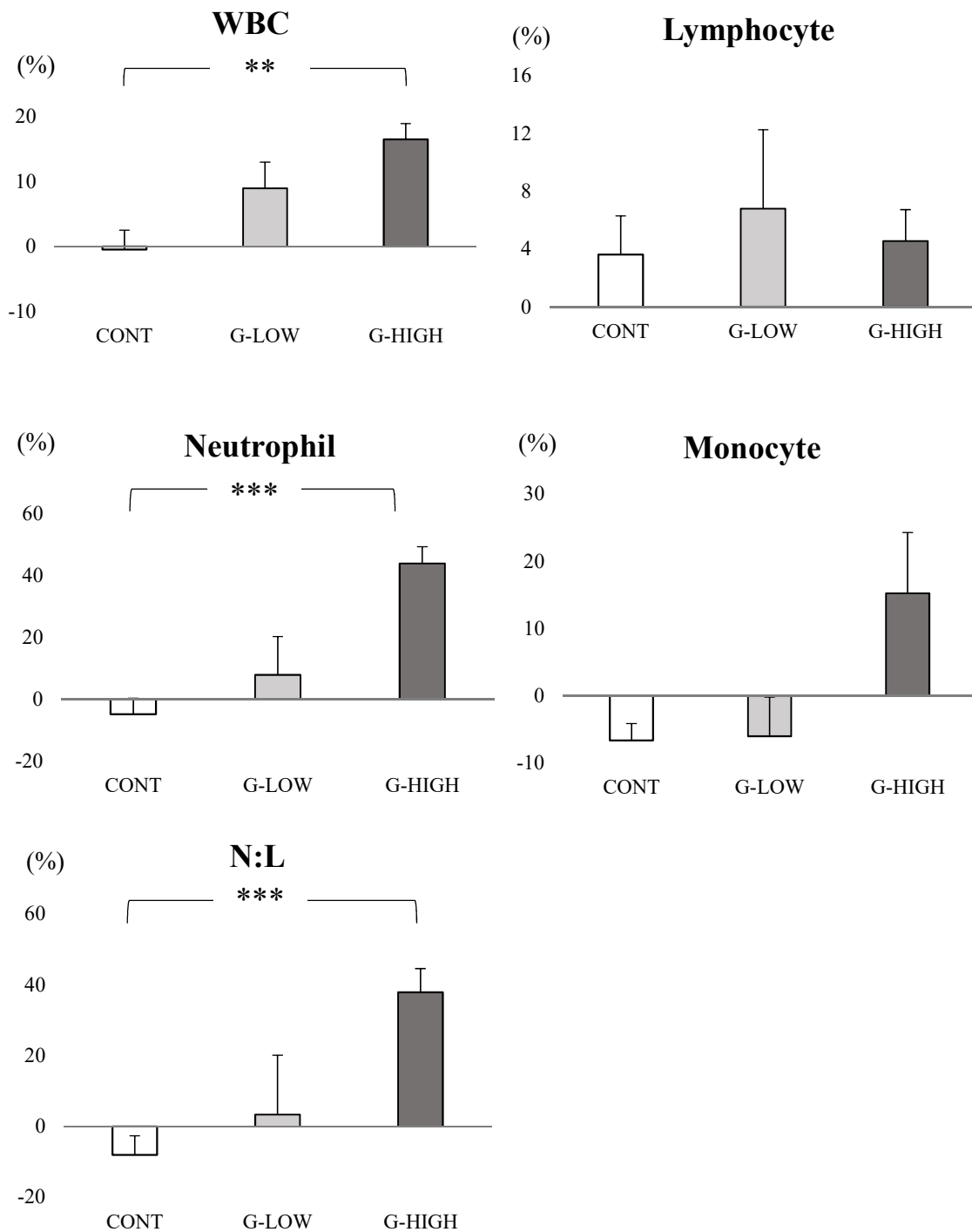


Figure 4-16 Percent change of blood cell count and neutrophil to lymphocyte ratio during 0 -12h on experimental day. CONT, control group; G-LOW, animals showed lower LF/HF change from pre-experimental day; G-HIGH, animals showed higher LF/HF change from pre-experimental day; WBC, white blood cell; N:L, neutrophil to lymphocyte ratio. Each bar represents mean and SE. Difference between the groups: $**P < 0.01$, $***P < 0.001$.

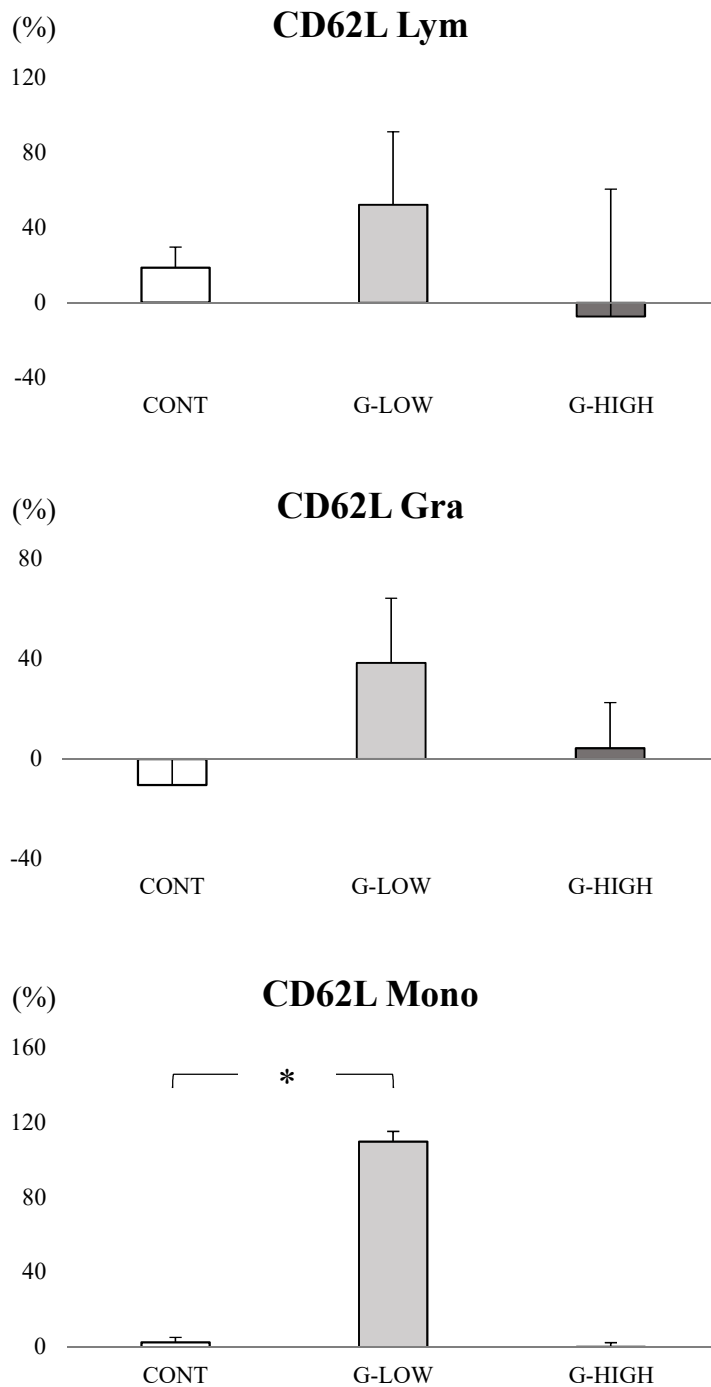


Figure 4-17 Percent change of expression of CD62L on blood cells (lymphocytes, granulocytes, and monocytes) during 0 -12h on experimental day. MFI, mean fluorescence intensity; CONT, control group; G-LOW, animals showed lower LF/HF change from pre-experimental day; G-HIGH, animals showed higher LF/HF change from pre-experimental day. MFI, mean fluorescence intensity; CD62L Lym, CD62L on lymphocytes; CD62L Gra, CD62L on granulocytes; CD62L Mono, CD62L on monocytes. Each bar represents mean and SE. Difference between the groups: $*P < 0.05$.

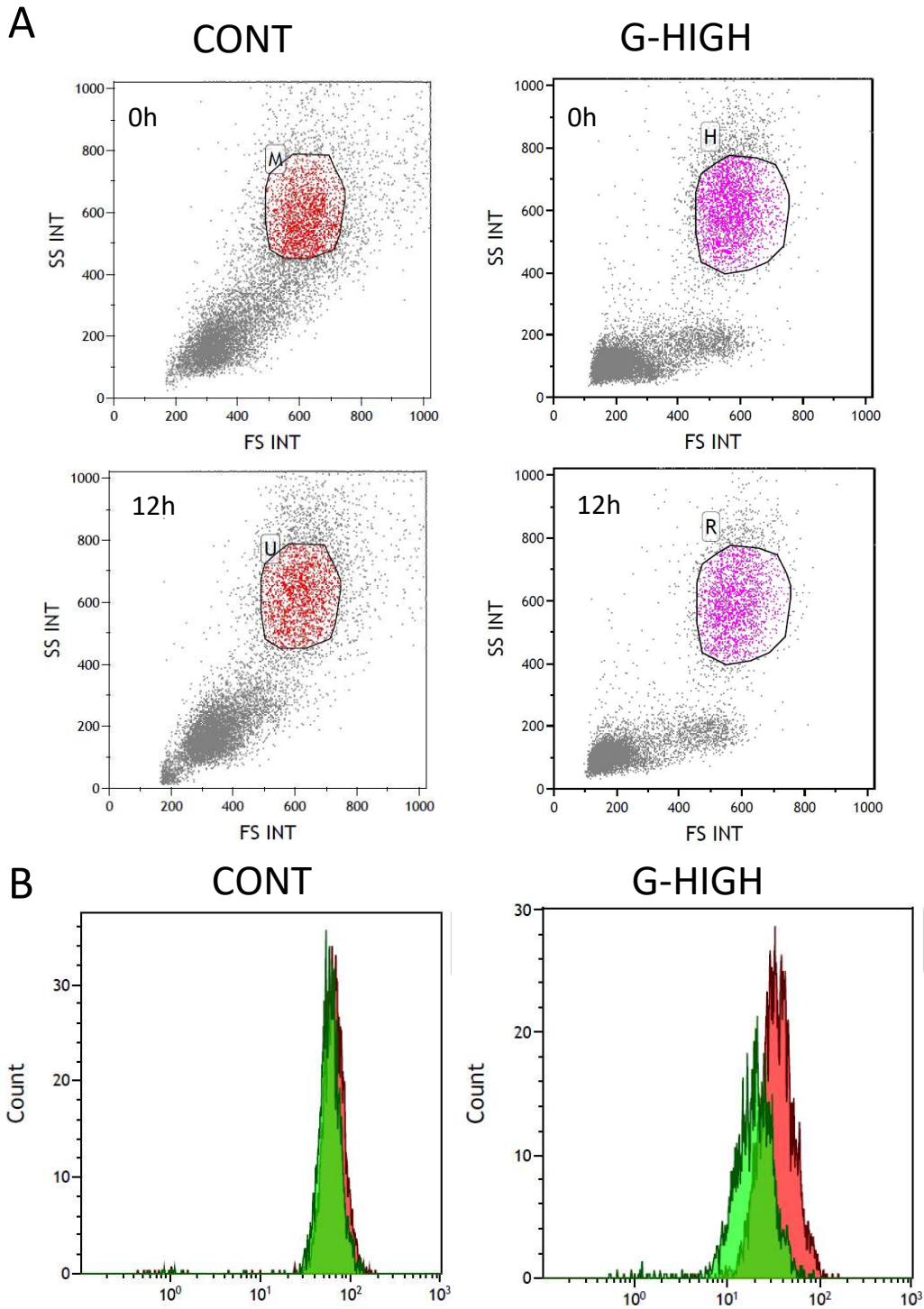


Figure 4-18 CD11b expression on granulocytes at 0h and 12h on experimental day. A) SSC vs FSC contour plot of CD11b. Colored area coincides with the population of granulocytes. B) Histograms display a single measurement parameter (fluorescence intensity) on the x-axis and the cell count on the y-axis. Red and green histogram coincide with the population at 0h and 12h, respectively. CONT, control group; G-HIGH, animals showed higher LF/HF change from pre-experimental day. SSC, side scatter; FSC, forward scatter.

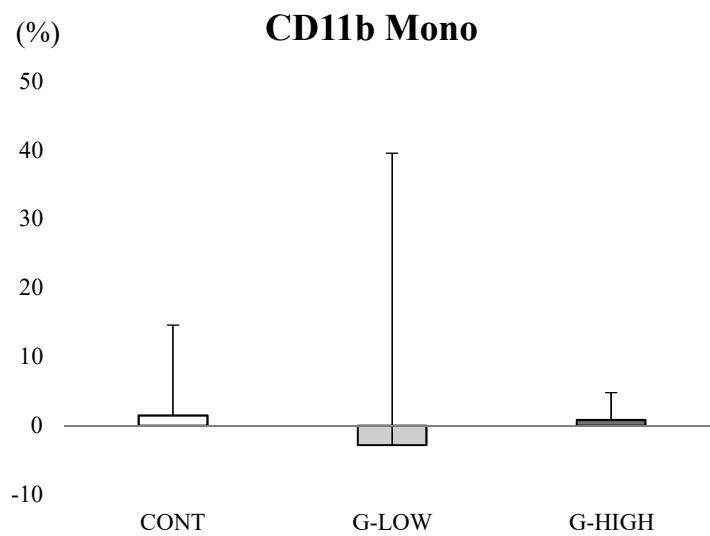
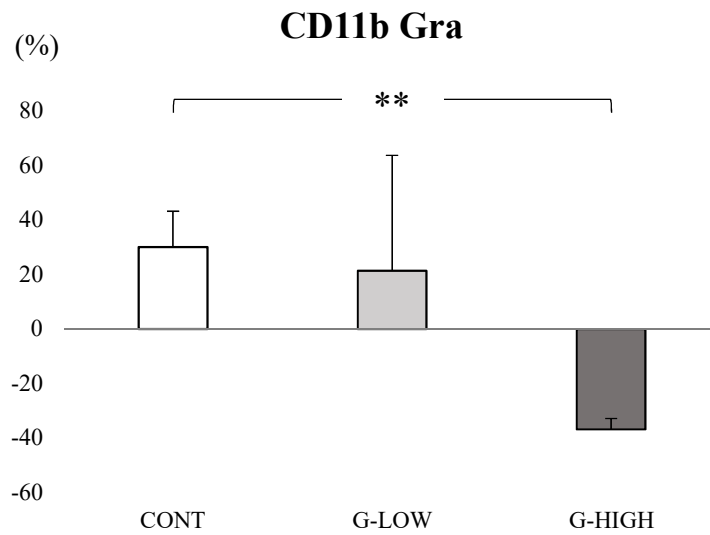


Figure 4-19 Percent change of CD11b positive cells (granulocytes and monocytes) during 0 -12h on experimental day. CONT, control group; G-LOW, animals showed lower LF/HF change from pre-experimental day; G-HIGH, animals showed higher LF/HF change from pre-experimental day; CD11b Gra, CD11b positive granulocytes; CD11b Mono, CD11b positive monocytes. Each bar represents mean and SE. Difference between the groups: $**P < 0.01$.

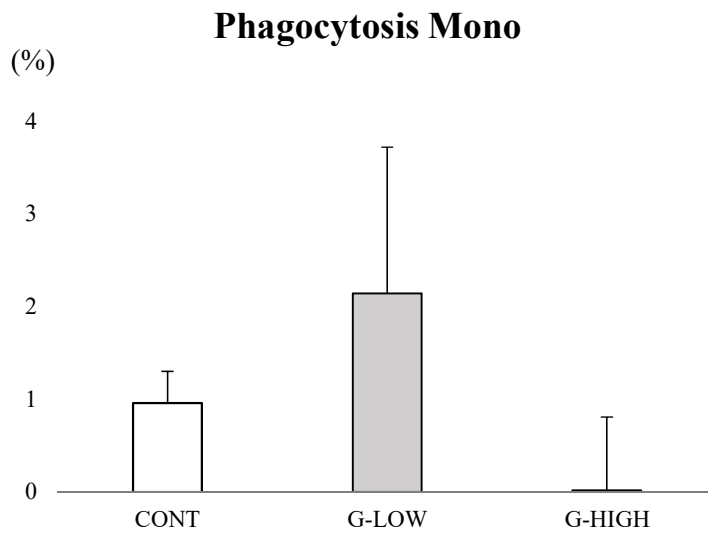
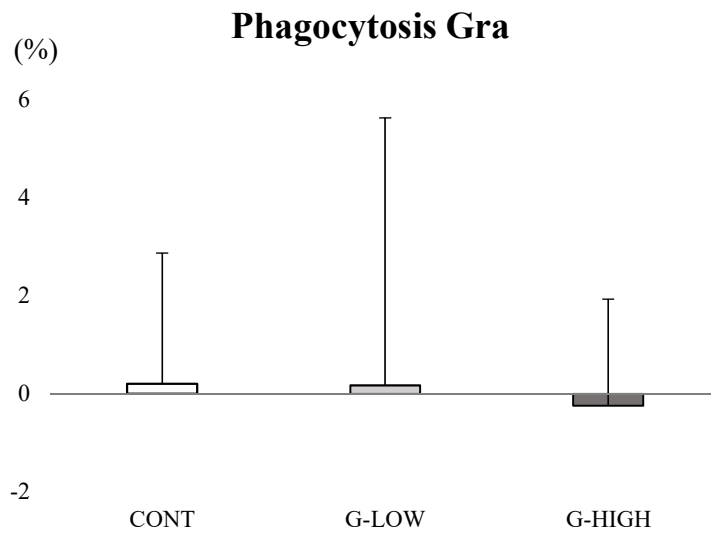


Figure 4-20 Percent change of apoptosis positive cells (lymphocytes, granulocytes, and monocytes) during 0 -12h on experimental day. CONT, control group; G-LOW; animals showed lower LF/HF change from pre-experimental day; G-HIGH, animals showed higher LF/HF change from pre-experimental day. Apoptosis Lym, apoptosis positive lymphocytes; Apoptosis Gra, apoptosis positive granulocytes, Apoptosis Mono, apoptosis positive monocytes. Each bar represents mean and SE.

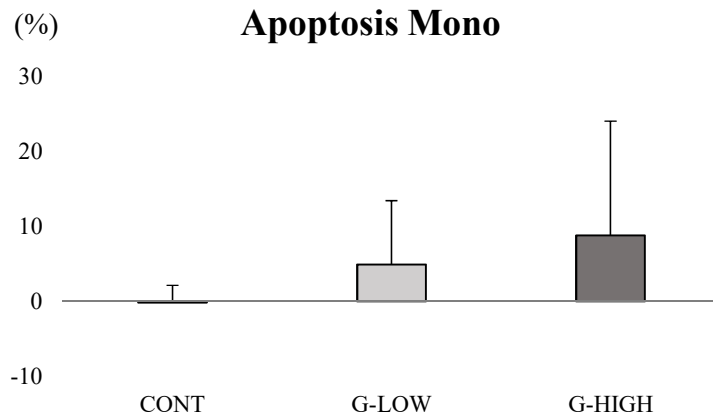
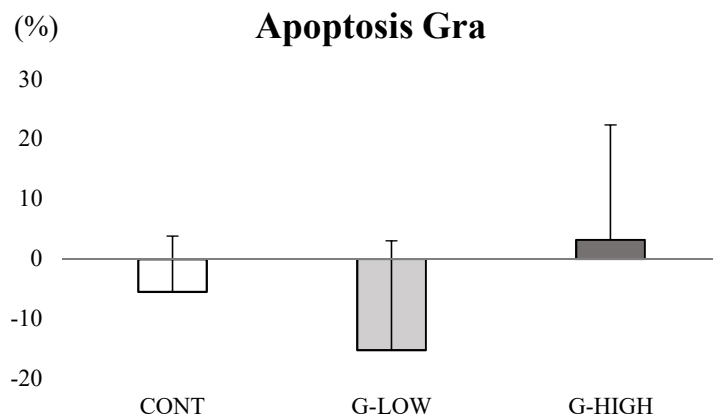
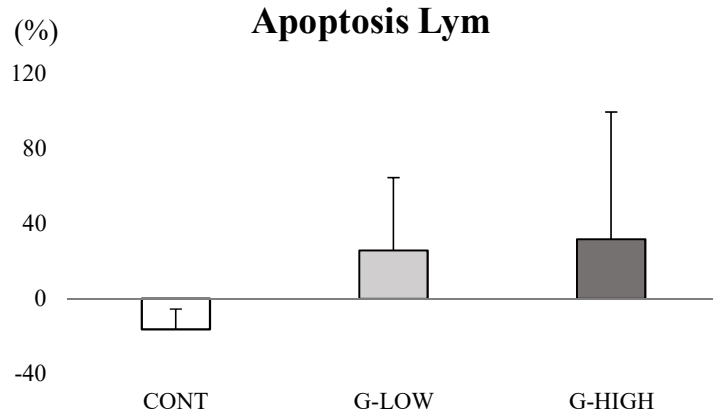


Figure 4-21 Percent change of apoptosis positive cells (lymphocytes, granulocytes, and monocytes) during 0 -12h on experimental day. CONT, control group; G-LOW; animals showed lower LF/HF change from pre-experimental day; G-HIGH, animals showed higher LF/HF change from pre-experimental day. Apoptosis Lym, apoptosis positive lymphocytes; Apoptosis Gra, apoptosis positive granulocytes, Apoptosis Mono, apoptosis positive monocytes. Each bar represents mean and SE.

第5章

Oxytocin, Vasopressin の 鼻腔内投与が育成牛の 生体機能に及ぼす影響

5-1 緒言

これまでの章において、自律神経系バランスの変化が疾病の発症や罹患リスクと関連性のあることが明らかとなった。近年、Oxytocin の鼻腔内投与による作用機序には諸説あるものの^{28,89}、副交感神経活動が高まるという報告^{90,91}や、不安行動やHPA軸の抑制を介した抗不安・抗ストレス効果に注目が寄せられている。一方、Vasopressin の中枢作用に関してはどちらかという不安行動を増強させる、攻撃性を高める、HPA軸を活性化させるなど、Oxytocin とは反対に作用する物質として取り上げられることが多い。しかしながら、Vasopressin の鼻腔内投与においても高齢者の睡眠中におけるHPA軸の活性化を抑制するという報告⁹²もあることから、V1aAVP受容体を介してOxytocinと同様の効果を示す可能性も否定はできない。そこで、疾病への罹患リスクを軽減する飼養管理法を検討する目的で、生体機能の反応を緩和させる効果が期待されているOxytocinやVasopressinの鼻腔内投与の有効性について追求した。

5-2 材料および方法

本研究は（独）農業生物資源研究所（現：国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門）の動物実験規定に基づき計画し、実験動物倫理委員会の承認を得た上で行った。

(1) Oxytocin 鼻腔内投与の生体機能への影響

供試動物

実験開始2か月前には去勢を済ませたホルスタイン育成牛6頭(7-10カ月齢, 207.4-330.1kg)を使用した。ゴムマットの床にスタンションで個別に繋留された状態で1回の実験に3頭ずつ実施したため、動物同士の視覚的および嗅覚的な隔たりはなく隣接する動物同士の接触もグルーミング程度なら可能な状態だった。実験施設および採血や心電計装着など必要な実験手技への馴致を十分に行った後に実験に供した。給餌と施設の清掃は9-10時と16-17時に実施した。

試薬の調整

Oxytocin (Peptide Institute, INC., Osaka, Japan) の濃度が 100 と 200 μ g/mL になるように生理食塩水に溶解し-20 度の冷凍庫に使用するまで保存した。

実験手順

それぞれの動物に生理食塩水 (SAL)、100 μ g/mL (OXT100) および 200 μ g/mL の Oxytocin (OXT200) をランダムな順序で投与した。Oxytocin の血中や脳脊髄液中における半減期を考慮し各処置の間隔は少なくとも 2 日とした。餌は実験開始の 30 分前には取り除き 13:30 (0h) に動物の鼻口部を上向きにした状態で、スタンションの壁にロープで固定してスプレーのノズルを付けた 2.5mL シリンジにより背鼻腔を目がけて鼻腔内投与を行った。片側 0.5mL ずつ両方の鼻腔に試薬を噴霧した後、30 秒ほど試薬が鼻粘膜に浸透するのを待ってから保定を外した。

各動物がすべての処置を施されたが、1 頭の動物が怪我により OXT200 の処置が出来なかったため、サンプルサイズは OXT200 のみ 5 頭となった。

行動記録および行動解析

各動物の行動は、投与後 90 分間ネットワークカメラ (Panasonic BB-HCM735; Panasonic INC., Osaka, Japan) によって記録した。

行動解析は、一人の観察者がネットワークカメラで記録したビデオ動画から連続的サンプリングによって行った。動物の姿勢を、反芻を伴わない起立 (Standing without ruminating; S)、反芻を伴う起立 (Standing with ruminating; SR)、反芻を伴わない伏臥 (Lying without ruminating; L) および反芻を伴う伏臥 (Lying with ruminating; LR) に分類し、90 分間の観察期間におけるそれぞれの姿勢持続時間割合(%)を求めた。更に、観察期間における維持行動や異常行動の発現回数も計測した。観察項目は、維持行動である身繕い (Self-grooming) および給水行動 (Water access) と、異常行動である擦りつ

け (Rubbing)、異物 (自分の身体以外の箇所) 舐めや異物齧り (Abnormal licking and biting)、舌遊び (Tongue playing) および首振り行動 (Head shaking) を選んだ。

心電図記録および心拍変動解析

心電図記録は A-B 誘導法により行った。実験開始 30 分前までには、陽極および陰極の電極 (Blue Sensor L-00-S; METS Inc., Tokyo, Japan) をそれぞれ右側肩甲骨および左側胸部にボンドで貼りつけ、テレメーター送信機 (RF-ECG transmitter; GMS Co., Ltd., Tokyo, Japan) を伸縮性のゴムバンドに固定し胸部に装着した。

心電図記録からは、MemCalc/Win (GMS Co., Ltd) を使用し心拍変動解析を行った。このソフトウェアでは最大エントロピー法を用い RR 間隔から低周波領域パワー (LF; 0.04 – 0.1Hz) と高周波領域パワー値 (HF; 0.1 – 0.8 Hz) を 30 秒間の心電図記録から解析し、2 秒間隔で心拍変動解析指標 (HR, LF 値, HF 値, LF/HF 比) が算出される。これまでの章では異なる周波数帯域を設定していたが、同実験施設において本研究と月齢の近い去勢育成牛の自律神経系機能測定の際に、同じテレメーターを使用した先行研究⁹³を参考にした。

統計解析

統計解析はエクセル統計 2010 Windows version 1.13 (Social Survey Research Institution Co. Ltd, Tokyo, Japan) を使用した。変数の比較において、p 値が 0.05 未満を有意と定義した。

行動データは、まず観察期間を 0 – 30, 30 – 60, 60 – 90 分の 3 つの時間帯に分け、各時間帯における行動変化を調べた。時間と処置の効果および時間と処置の交互作用を繰り返しのある二元配置分散分析によって解析した。交互作用がない場合は、効果のあった因子について一元配置分散分析につづき下位検定として Bonferroni 検定を行い、どの時間帯もしくは処置間で有意な持続時間割合の差があるかを、各姿勢 (S, SR, L, LR) につき調べた。更に、90 分間の観察期間における各姿勢持続時間割合 (%) と

維持・異常行動発現回数ともに Kruskal-Wallis 検定によって群間の差を調べた。p 値が 0.1 未満の場合は Steel 法による多重比較を行った。

心拍変動解析指標は 90 分を 10 分毎に 9 時間帯:10 (0 – 10 分), 20 (10 – 20 分、以下同様), 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 分に区切り、それぞれの時間帯における平均値を算出してから統計解析に供した。それぞれの指標に対して、時間と処置の効果および時間と処置の交互作用の効果を繰り返しのある二元配置分散分析によって解析した。

(2) Vasopressin 鼻腔内投与の行動および生理機能に及ぼす影響

供試動物

実験開始 2 か月前には去勢を済ませたホルスタイン育成牛 5 頭(7–9 カ月齢, 218.1 – 299.7 kg) を使用した。飼育施設・方法は (1) で述べたものと同様で、すべての動物を実験手技に馴致させた。

手術

実験の約 1 ヶ月前に脳脊髄液 (CSF) の経時的サンプリングのために 18 ゲージのステンレス製カニューレ (Elcom, Kyoto, Japan) を第三脳室に留置する手術を粕谷らの論文に記載された手順に従い行われた⁹⁴。イソフルラン吸入麻酔下で脳定位固定装置を用い、前頭部の皮膚を切開し頭蓋にドリルで小さな穴を開けマイクロマニピュレーターに取り付けた 18 ケージ針を穴に刺入し先端が側脳室に到達するまで引き下げた。側脳室を経由して 1mL の造影剤 (Iopaminron200, Nihon-Shering, Osaka, Japan) を第三脳室まで流し込み、X 線画像を撮影することにより第三脳室の位置を確認した。微小操作装置の針をカニューレに付け替え先端が正中線を通り第三脳室に留置されるように刺入し、CSF がカニューレから流出するのを確認した後デンタル用セメントを用いて頭蓋に固定した。カニューレ装着の様子を Figure 5-1 に示した。

実験手順

それぞれの動物に生理食塩水(SAL)、100nmol /mL (AVP100) および 200nmol/mL arginine-vasopressin (AVP200) をランダムな順序で投与した。(1) と同様の手順で鼻腔内投与を行った。

行動記録および行動解析

(1) と同じ方法で行った。

心電図記録および心拍変動解析

(1)と同じ方法で行った。

血液および脳脊髄液サンプリング

血漿 Cortisol 濃度測定のための血液サンプリングは、少なくとも実験の 2 日前に留置した頸静脈カテーテルから 0, 10, 20, 30, 60, 90 分に行った。脳脊髄液 (CSF) 中 Oxytocin 濃度測定のための CSF サンプリングも血液サンプリングと同時に行った。しかし、留置したカニューレは頭部の成長により先端の位置ずれが生じたために、本実験では 1 頭の動物からしかサンプリングを行えなかった。

血液サンプルは予め氷で冷やした EDTA 試験管に入れ、CSF サンプルと共に実験終了まで氷の中に静置した。血漿および CSF サンプルは測定まで-30 度の冷凍庫に保存した。

血漿 Cortisol 濃度測定

血漿 Cortisol 濃度は、市販のキット (Cortisol ELISA kit, Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY) を使って ELISA 法により測定した。

CSF Oxytocin 濃度測定

CSF 中 OXT 濃度は、Sep-Pak C18 cartridges (Waters Corporation, Milford, MA, USA) によりサンプル抽出を行ってから市販のキット (Oxytocin ELISA kit, Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY) を使って ELISA 法により測定した。抽出は、まず 400- μ L の CSF に 0.1 規定 HCl を混ぜ、混合物をメタノールと蒸留水で予め湿潤させたカートリッジに通した。その後 10mL の 4%酢酸によって夾雑物を取り除き、メタノールに抽出物を溶かした。溶媒は窒素ガスによって蒸発させ、残差は 267 μ L の ELISA キット専用 Assay Buffer に溶かして測定に供した。

統計解析

統計解析はエクセル統計 2010 Windows version 1.13 (Social Survey Research Institution Co. Ltd, Tokyo, Japan) を使用した。変数の比較において、p 値が 0.05 未満を有意と定義した。

行動データは、各姿勢持続時間割合 (%) と維持・異常行動発現回数ともに Freedman 検定によって群間の差を調べ、p 値が 0.1 未満の場合は Sheffe 法による多重比較を行った。心拍変動指標は 90 分を 10 分毎に 9 時間帯:10 (0–10 分), 20 (10–20 分、以下同様), 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 分に区切り、それぞれ時間帯における平均値を算出してから統計解析に供した。それぞれの指標に対し、時間、処置の効果および時間と処置の交互作用の効果を繰り返しのある二元配置分散分析によって解析した。交互作用の効果が有意 ($p < 0.05$) もしくは有意傾向 ($p < 0.1$) であれば、Fisher's least significant difference (LSD) 法により下位検定を行った。血漿 Cortisol 濃度も心拍変動指標と同様な手順で解析を行った。ただし、交互作用効果が有意ではないものの時間か処置の効果が有意であれば、時間もしくは処置をプールし、一元配置分散分析によって群間の差があるかどうかを調べたのち、Bonferroni 法によりデータに影響している因子を特定した。CSF 中 OXT 濃度は、Smirnov-grubbs の外れ値検定により異常値を取り除いた。

5-3 結果

(1) Oxytocin 鼻腔内投与の生体機能への影響

各処置 (SAL, OXT100, OXT200) 間における S, SR, L, LR の 30 分間における時間割合推移を Table 5-1 に示した。いずれの項目においても有意な交互作用効果は認められなかった。しかし、S, L, LR の時間割合は、処置に関わらず時間による影響を受けた。S, L, LR の時間割合は、それぞれ 30 - 60 分間、0 - 30 分間、60 - 90 分間において最も低かった; S の 30 - 60 分間における割合は、0 - 30 分間、60 - 90 分間と比べ低く、L の 0 - 30 分間における割合は、30 - 60 分間と比べて低く、LR の 60 - 90 分間における割合は 0 - 30 分間、30 - 60 分間と比べて低かった。

L, LR については時間帯に関係なく有意な処置の効果が認められた (Table 5-1)。LR の時間割合は OXT200 において SAL、OXT100 と比べ高く、一方で L は OXT200 において OXT100 よりも低かった (Table 5-2)。

異常行動 (self-grooming と water access) や維持行動 (rubbing, abnormal licking, tongue playing, head shaking) の 90 分間における発現回数は処置間の差は見られなかった (Table 5-3)。

心拍変動解析指標の 90 分間における変化を Figure 5-2 に示した。HR, LF 値, HF 値, LF/HF 比いずれも時間と処置の交互作用効果は有意ではなかった。時間の効果は HR, LF 値 と LF/HF 値で有意であったが、下位検定ではいずれの時間帯でも有意な差は見られなかった。

(2) Vasopressin 鼻腔内投与の行動および生理機能に及ぼす影響

各姿勢時間割合 (%) の変化を Table 5-4 に示した。L の時間割合は群間で有意に差があり、SAL と比較して AVP100 で有意に減少し、AVP200 で増加傾向がみられた。LR の時間割合にも処置間に有意な差が認められ、AVP200 で SAL と比べて有意に増加した。一方で、総起立時間割合 (S + SR) や総伏臥時間割合 (L + LR) には処置間の差が認められなかった。しかし、総反芻時間割合 (SR + LR) には処置によって有意に異

なる傾向があり、下位検定では AVP200 で増加傾向と認められた。Table 5-5 に維持・異常行動の発現回数の結果を示したが、Head shaking 回数が処置間で有意に異なり、AVP200 で SAL と比べ有意に減少した。

心拍変動解析指標の 90 分間における変化を Figure 5-3 に示した。HF 値において有意な交互作用効果が認められ、AVP200 の処置後 70, 80 分で SAL と比べ有意に高くなった。

Figure 5-4 に血漿 Cortisol 濃度の変化を示した。時間と処置の交互作用効果はなかったが、有意な時間の効果が認められた。全処置を組み合わせた場合、時間によって血漿 Cortisol 濃度は有意に異なり、濃度は投与後 10 分で 0 分に比べ有意に上昇した。

Figure 5-5 にサンプリング可能だった 1 頭の CSF Oxytocin 濃度の変化を示した。AVP100 における 0 min のデータは外れ値検定により除外されたが、AVP100 および AVP200 共に投与後に多少増加する傾向は確認された。

5-4 考察

本章では、生体機能の反応を緩和させる効果が期待されている Oxytocin (OXT) や Vasopressin (AVP) の鼻腔内投与の有効性について調べた。維持行動や異常行動には OXT と AVP とともに顕著な変化は認められなかったが、唯一首振り (Head Shaking) の回数は Vasopressin により減少した。また、姿勢変化と反芻の割合に関してみると伏臥位での反芻が OXT と AVP とともに有意に増加した。OXT と AVP の投与後に心拍数は減少する傾向がみられたが有意な変化ではなかったものの、AVP 投与後には副交感神経系活動の指標である HF 値が有意に増加した。そのため、AVP の鼻腔内投与は去勢済育成牛において Oxytocin よりも顕著な中枢作用を引き起こす可能性があると考えられた。

本研究は、Oxytocin や Vasopressin の鼻腔内投与による抗ストレス効果に類する中枢作用をウシで初めて明らかにしたものであり、飼養管理においての有用性が期待される。

Oxytocin 鼻腔内投与の行動および生理機能に及ぼす影響

ウシにおいて伏臥姿勢および反芻行動は快適さの指標として扱われていることから^{95,96}、OXT の鼻腔内投与による姿勢や反芻への効果が期待されたが、伏臥姿勢や反芻について時間と処置の間に交互作用は認められなかった。一方、OXT 鼻腔内投与後、CSF や血漿中の OXT 濃度は、ヒトやげっ歯類では 10 分以内に上昇をはじめ、30 分ほどでピークに達するという結果がある^{97,98}。そして、上昇を初めてから濃度が最大になる時間帯において男性の性行動の調節に関連する生理指標に顕著な変化が表れている⁹⁹。したがって、本研究では OXT 投与後に中枢の OXT 濃度が最高になると想定される投与後 30–60 分の時間帯で L や LR が増えると期待したものの、時間帯による行動割合の変化はなかった。そして、OXT 投与の有無に関わらずこの時間帯で L と LR どちらも増加がみられた。反芻時間は給餌の約 4 時間後に最も大きくなるという報告¹⁰⁰がある。本実験では給餌時間が 9:00–10:00 であり、OXT 投与後 30–60 分の時間帯が 4 時間後に相当するため、OXT 投与の有無に関わらず最も反芻時間が大きくなったものと考えられた。そして、反芻を伴わない起立時間 (S) は、Oxytocin 投与の有無に関わらず 0–30 分で最も大きく 30–60 分で最も小さかったことから、投与後に動物が興奮状態から落ちつく過程が姿勢に反映されたものと考えられた。これらの要因が、姿勢の変化に対して処置の効果がないことに影響していると考えられた。

隔離、拘束などを負荷した場合は反芻行動が抑制され¹⁰¹、隔離による影響を軽減する処置を施すと反芻時間が増加する¹⁰²という報告があり、本研究と同様な飼養環境である繋留した状態はウシにとって拘束負荷になる報告^{103,104}もある。このような飼養形態においては、OXT そのものに反芻行動を促す作用があったというよりは、抑制されていた反芻行動が、OXT の抗ストレス作用により促進されたと推測された。OXT 鼻腔内投与はヒトにおいて幼児の鳴き声に反応し興奮する扁桃体の神経活性を抑制し²⁴、ラットでは恐怖を感じた時の神経の興奮を抑える¹⁰⁵という報告がある。OXT によって不安関連行動やそれに伴うストレス反応が抑制されるのは、扁桃体の働きにより調

節されていることから^{89,106}、行動変化が中枢における抗ストレス作用の結果だとすれば、大脳辺縁系に属する扁桃体が効果をもたらした可能性が高いものと考えられた。

Vasopressin 鼻腔内投与の行動および生理機能に及ぼす影響

AVP200 では SAL に比べて有意に LR が増えた一方で、AVP100 は LR には影響せず L が他の処置に比べて減った。しかし、合計伏臥時間 (L+LR) ではなく合計反芻時間 (SR+LR) が処置間で差が見られたことから、AVP100 で L が減ったのはやや LR が増えたためと考えられた。従って、LR が AVP の効果と捉えるならば、反芻行動の促進は Oxytocin の場合と同様に飼養形態による潜在的なストレスが緩和された可能性であると思われた。

一方で、高用量の AVP 投与後は、OXT 投与後ではみられなかった副交感神経系の指標である HF 値の上昇が観測された。ラットでは AVP を吸入投与することによって体温や心拍数が低下するため¹⁰⁷、自律神経系が副交感神経優位に傾いたことを示唆している。一方、AVP は末梢投与経路でも心拍数低下や体温低下を示していることから、AVP による血圧上昇作用によって圧受容器反射が起こり副交感神経系を緊張させた可能性が高い。AVP の吸入投与では血漿中 AVP の上昇が観測されているため末梢投与経路と同じようなメカニズムで心拍数や体温低下が生じた可能性も否定できない。実際に、ヒトでは Vasopressin の誘導體である Desmopressin (DDAVP) の点鼻薬は、主に中枢性尿崩症の治療薬として使用されているが、これは尿細管の Vasopressin 受容体への作用を介した効果を期待するものである^{108,109}。本研究において血漿中 AVP 濃度は測定していないため詳細は不明であるが、AVP が直接中枢神経系へ作用し生理機能調節に影響する経路に加え、末梢循環を介した経路による自律神経系機能の変化の可能性も考慮する必要があるものと考えられた。今回観測された生体機能の変化は、測定した血中 Cortisol 濃度を考えると中枢神経系における AVP 濃度の上昇が関与した可能性は低い。Cortisol は処置間での変化はなく、すべての処置において 10 分で上昇しすぐに基準値まで戻るといった変化がみられた。Cortisol はストレスを感じて 10 分で上昇す

るといわれているため¹¹⁰、わずかな上昇は鼻腔内投与の操作由来のストレスによるものと考えられる。AVP は一般的に中枢において HPA 軸を活性化させるなどストレス反応を強めることが分かっている¹¹¹。AVP は中枢で CRH と協調して ACTH の分泌を促すことが知られており、実際に育成牛における脳室内投与では HPA 軸の活性化がみられている¹¹²。AVP 投与による Cortisol の反応がなかったことは、おそらく中枢における AVP の増加をもたらすような現象、例えば中枢における AVP 産生神経の刺激による CSF 中の AVP 濃度の増加やそれに伴う AVP 受容体の刺激（中枢 AVP 系の活性化と呼ぶ）などが起こらなかったことを示唆している。さらに観察した異常行動の 1 つである head shaking が減ったという結果も、観測された行動・生理変化に中枢 AVP 系の活性化が関与することを否定している。同じ実験施設を使った矢用らの研究において、AVP の脳室内投与では head shaking の回数増加が見られ、かつ CRH 投与では回数変化がみられなかった¹¹² ことから、この行動は中枢における AVP 濃度の上昇に特異的な現象であることが推察される。従って、少なくとも今回の実験では鼻腔内投与後には中枢 AVP 系の活性化は起こらなかったと考えられた。

Oxytocin, Vasopressin 鼻腔内投与の中枢作用発現機序について

OXT と AVP の投与後どちらにおいても反芻時間の延長が観測された一方で、自律神経系の変化は OXT では見られず、AVP 投与後には副交感神経系活動が上昇するという結果となった。反芻行動の意義を解釈すると、副交感神経系の緊張をもたらすようである。しかし、行動上は抗不安作用を示している場合でも循環器系の反応は見られなかったという先行研究¹¹³があり、必ずしも行動変化と自律神経系機能の変化は同時には現れないと考えられる。また、鼻腔内投与された物質が中枢に作用するメカニズムは、嗅神経や三叉神経および毛細血管を介した物質の中枢神経系への運搬が通説である²³が、物質の伝搬ではなく嗅神経の興奮が中枢作用の発揮に関与している仮説が存在する²⁹。この仮説が OXT と AVP の効果の違いを説明するのに適当である。Quintana らは、OXT がもたらす循環器系への影響は三叉神経を介した延髄の自律神経核への投

射がもたらすと推測している¹¹⁴が、AVP 投与後の副交感神経系の緊張はこの経路を介したものと考えるべく、むしろ延髄に直接作用し副交感神経系の活動抑制する可能性が報告されている¹¹⁵。OXT ではなく AVP が副交感神経系活動の上昇をもたらした原因として考えられるものは何だろうか。嗅神経には V1aAVP 受容体が存在するが¹¹⁶、Veening & Oliver (2013)らは、鼻腔内投与された OXT はこの部位への結合が嗅神経を興奮させ嗅球の活性化をもたらし、その結果、嗅球の視床下部の OXT 神経への投射¹¹⁷により OXT 産生が促されることで中枢作用が得られるという経路を可能性の1つとして挙げている²⁹。この経路説を支持するとすれば、投与した AVP は V1a 受容体を刺激することで、OXT と同様な行動変化をもたらしたと考えることができる。前述した通り、AVP による副交感神経系活動の上昇は血行性に圧受容器反射を促した結果である可能性が十分に考えられるが、AVP がこの受容体に対しより高い親和性を持つ故に自律神経系機能の変化をもたらしたと解釈することもできる。

本研究において作用発現機序に関しては投与薬物の血中濃度や CSF 中濃度の変化が明らかでないため仮説にすぎないが、両薬剤の投与で観測された反芻行動の促進は OXT による中枢神経系への作用を介するものと考えられる。OXT と反芻行動の関連性について、ヤギでは胃の運動性に関係なく搾乳の数秒後に誘発されることから、中枢の OXT によって搾乳・反芻反射が引き起こされると考えられている¹¹⁸。そして、搾乳の前もしくは後に給餌をされた牛群に比べて、搾乳中に給餌された牛群では搾乳後 1.5 時間以内の反芻時間が長く血漿中の OXT 濃度が最も高かった^{119,120}。これらの結果から、反芻時間の増加はおそらく搾乳由来の中枢を介した OXT 濃度の上昇に起因することが示唆されている。実際に、AVP 投与後に AVP 系の活性化を示す生体機能の変化が観測されず、1 例しか測定できなかったが、高用量の AVP 投与後に持続的な CSF 中 OXT 濃度の上昇が認められた。そのため、OXT および AVP 鼻腔内投与における反芻行動の促進に OXT 系の活性化が関与しているのではないかと考えられた。

小括

本章では、疾病への罹患リスクを軽減する飼養管理法を検討する目的で、生体機能の反応を緩和させる効果が期待されている Oxytocin や Vasopressin の鼻腔内投与の有効性について調べた。維持・異常行動には Oxytocin と Vasopressin とともに顕著な変化は認められなかったが、唯一首振り行動 (Head Shaking) の回数は Vasopressin により減少した。また、姿勢変化と反芻の割合に関してみると伏臥位での反芻が Oxytocin と Vasopressin とともに有意に増加した。Oxytocin と Vasopressin の投与後に心拍数は減少する傾向がみられたが有意な変化ではなかったものの、Vasopressin 投与後には HF 値が有意に増加した。一般的に、Oxytocin には親和性の向上や抗不安作用があると考えられている一方で、Vasopressin には攻撃性の亢進や不安増強作用があるとも言われている。そして、これらの物質は末梢作用だけでなく中枢作用もあると考えられており、中枢神経系における神経伝達物質として行動や生理機能の調節にも関与していると考えられている。Vasopressin の鼻腔内投与が Oxytocin と類似した副交感神経系活動を増加させ抗不安作用的な行動変化を誘発したことからより高い中枢神経系への作用を持つ可能性が考えられるが、メカニズムについて今後明らかにしていく必要がある。

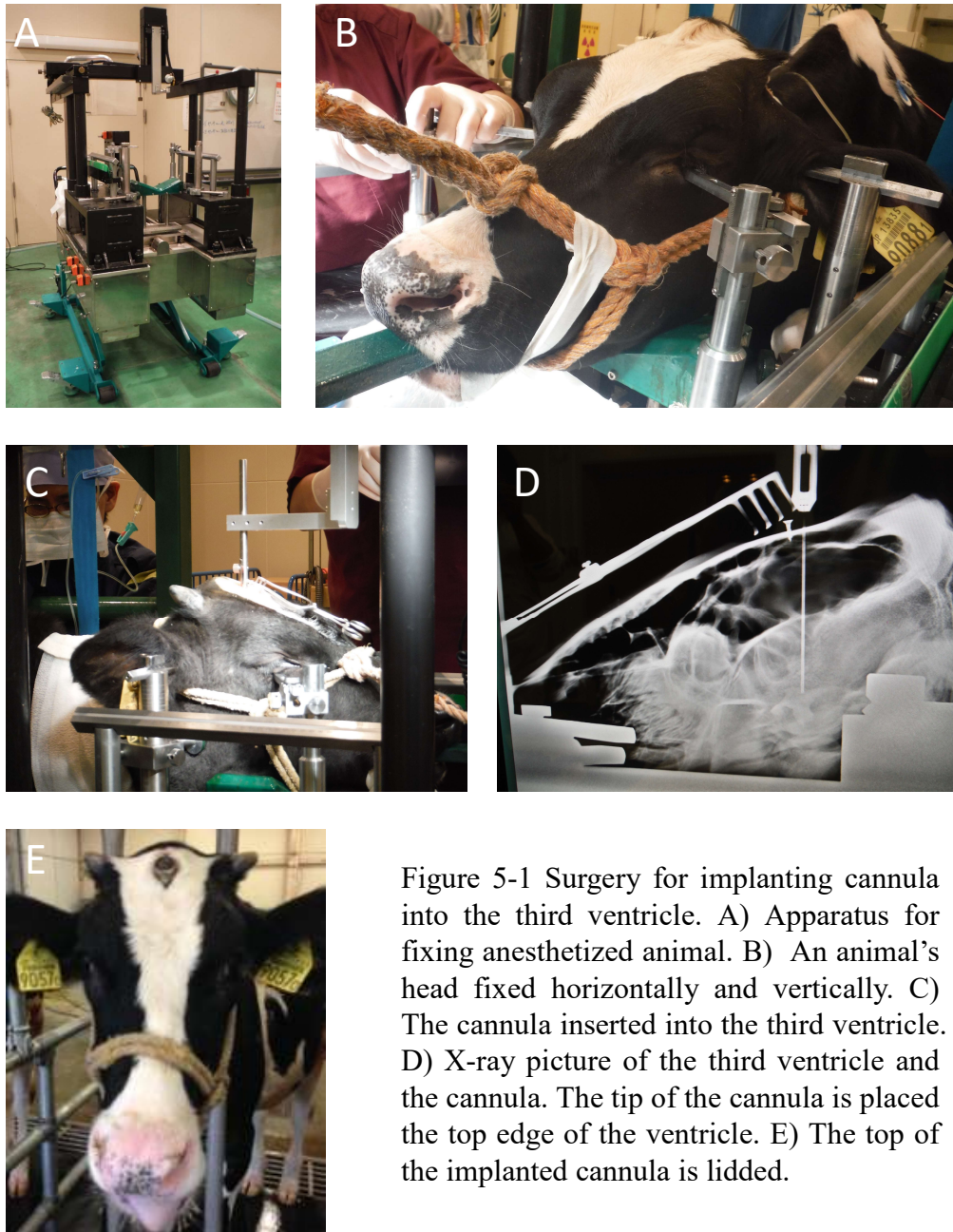


Table 5-1 Time series change in body posture and rumination after intranasal oxytocin

Behavior	Treatment	0-30		30-60		60-90		time		treatment		time×treatment	
		Mean±SE	Mean±SE	Mean±SE	Mean±SE	Mean±SE	Mean±SE	F	P	F	P	F	P
S (%)	SAL	54.2±13.7	27.1±13.2	33.4±14.2									
	OXT100	45.9±10	0.4±0.3	32.7±12.4	10.588	0.000	0.811	0.464	0.489	0.744			
	OXT200	47.9±14.7	5.7±2.6	27.1±7.3									
SR (%)	SAL	2.9±2.9	0±0	0±0									
	OXT100	2.2±2.2	0.2±0.2	9.3±7	0.839	0.443	1.739	0.212	1.194	0.335			
	OXT200	0±0	0±0	0±0									
L (%)	SAL	14.5±5.6	40±10.8	63.1±13									
	OXT100	26.8±14.4	70±12.8	44.2±15	7.499	0.002	4.775	0.026	1.751	0.167			
	OXT200	6.5±3	20.6±8.9	58.8±5.6									
LR (%)	SAL	28.4±8.3	32.9±15.6	3.5±3									
	OXT100	25±11.2	29.4±13	13.8±8.4	7.489	0.002	4.913	0.024	1.018	0.415			
	OXT200	45.6±14.6	73.7±7.6	14.1±7.7									

S, standing without ruminating; SR, standing with ruminating; L, lying without ruminating; LR, lying with ruminating; SAL, intranasal administration saline; OXT100, intranasal administration of 100 µg oxytocin; OXT200, intranasal administration of 200 µg oxytocin.

Table 5-2 Effects of intranasal oxytocin on body posture and rumination

Body posture and Rumination	SAL	OXT100	OXT200	<i>F</i>	<i>p</i>
S (%)	38.2±8.6	26.3±6.8	26.9±6.9	0.811	0.464
SR (%)	1±1	3.9±2.3	0±0	1.739	0.212
L (%)	39.2±4.9 ^{a,b}	47±4.2 ^a	28.6±2.2 ^b	4.775	0.026
LR (%)	21.6±5.8 ^a	22.7±5.2 ^{a,b}	44.5±5.8 ^b	4.913	0.024

S, standing without ruminating; SR, standing with ruminating; L, lying without ruminating; LR, lying with ruminating; SAL, intranasal administration saline; OXT100, intranasal administration of 100 µg oxytocin; OXT200, intranasal administration of 200 µg oxytocin. The values are expressed as mean ± SE. Different letters in superscript indicate significant differences between the treatments.

Table 5-3 The occurrence of maintenance and abnormal behaviors after intranasal oxytocin

Behavior	SAL	OXT100	OXT200	x^2	p
Self-grooming (No.)	mean \pm SE Number of animals exhibiting the behavior 10.5 \pm 5.3 (6/6)	10.7 \pm 5.5 (6/6)	12.4 \pm 2.3 (5/5)	1.24	0.538
Water access (No.)	mean \pm SE Number of animals exhibiting the behavior 6 \pm 2.2 (5/6)	7.3 \pm 4.7 (5/6)	4.4 \pm 0.8 (5/5)	0.27	0.874
Rubbing (No.)	mean \pm SE Number of animals exhibiting the behavior 2.5 \pm 1.2 (5/6)	3.2 \pm 1.6 (5/6)	5 \pm 2.0 (5/5)	2.23	0.328
Abnormal licking and biting (No.)	mean \pm SE Number of animals exhibiting the behavior 5.5 \pm 1.2 (5/6)	8.8 \pm 6.8 (5/6)	6.8 \pm 1.2 (5/5)	1.38	0.501
Tongue playing (No.)	mean \pm SE Number of animals exhibiting the behavior 0.2 \pm 0.2 (1/6)	0.8 \pm 0.7 (2/6)	0.4 \pm 0.4 (1/5)	0.83	0.661
Head shaking (No.)	mean \pm SE Number of animals exhibiting the behavior 8.3 \pm 9.0 (4/6)	1.8 \pm 1.6 (3/6)	1.6 \pm 1.0 (3/5)	0.33	0.849

SAL, intranasal administration saline; OXT100, intranasal administration of 100 μ g oxytocin; OXT200, intranasal administration of 200 μ g oxytocin.

Table 5-4 Effects of intranasal AVP on body posture and rumination

Body posture and Rumination	SAL	AVP100	AVP200	χ^2	p
S (%)	26.0±9.7	26.9±14.7	19±7.4	1.6	0.449
SR (%)	5.3±7.3	2.3±3.3	0.0±0.0	1.3	0.522
L (%)	45.3±7.8 ^a	34.8±9.0 ^b	34.3±11.9 ^{a,b}	7.6	0.022
LR (%)	23.4±9.2 ^a	36.0±16.4 ^{a,b}	46.8±9.3 ^b	6.4	0.041

The values are expressed as mean \pm SE. Different letters indicate significant differences between treatments. S, standing without ruminating; SR, standing with ruminating; L, lying without ruminating; LR, lying with ruminating; SAL, intranasal administration saline; AVP100, intranasal administration of 100 nmol AVP; AVP200, intranasal administration of 200 nmol AVP.

Table 5-5 Effects of intranasal AVP on abnormal and maintenance behaviors

Behavior		SAL	AVP100	AVP200	χ^2	p
Self-grooming (No.)	Mean±SE	13.8±3.9	10±2.5	7.6±2.3	0.90	0.638
	Number of animals exhibiting the behavior	(5/5)	(5/5)	(5/5)		
Water Access (No.)	Mean±SE	3.4±1.0	4±1.2	3.4±1.2	0.40	0.819
	Number of animals exhibiting the behavior	(4/5)	(5/5)	(5/5)		
Rubbing (No.)	Mean±SE	6.4±1.5	6.8±2.3	6±2.4	0.10	0.951
	Number of animals exhibiting the behavior	(5/5)	(5/5)	(5/5)		
Abnormal Licking and Biting (No.)	Mean±SE	5±2.3	3±1.6	4±1.9	2.10	0.350
	Number of animals exhibiting the behavior	(4/5)	(4/5)	(4/5)		
Tongue Playing (No.)	Mean±SE	0±0	0±0	0±0	0.00	1.000
	Number of animals exhibiting the behavior	(0/5)	(0/5)	(0/5)		
Head Shaking (No.)	Mean±SE	4.4±1.4 ^a	2±0.8 ^a	1.0±0.8 ^b	6.70	0.035
	Number of animals exhibiting the behavior	(5/5)	(5/5)	(2/5)		

Different letters indicate significant differences between treatments. S, standing without ruminating; SR, standing with ruminating; L, lying without ruminating; LR, lying with ruminating; SAL, intranasal administration saline; AVP100, intranasal administration of 100 nmol AVP; AVP200, intranasal administration of 200 nmol AVP.

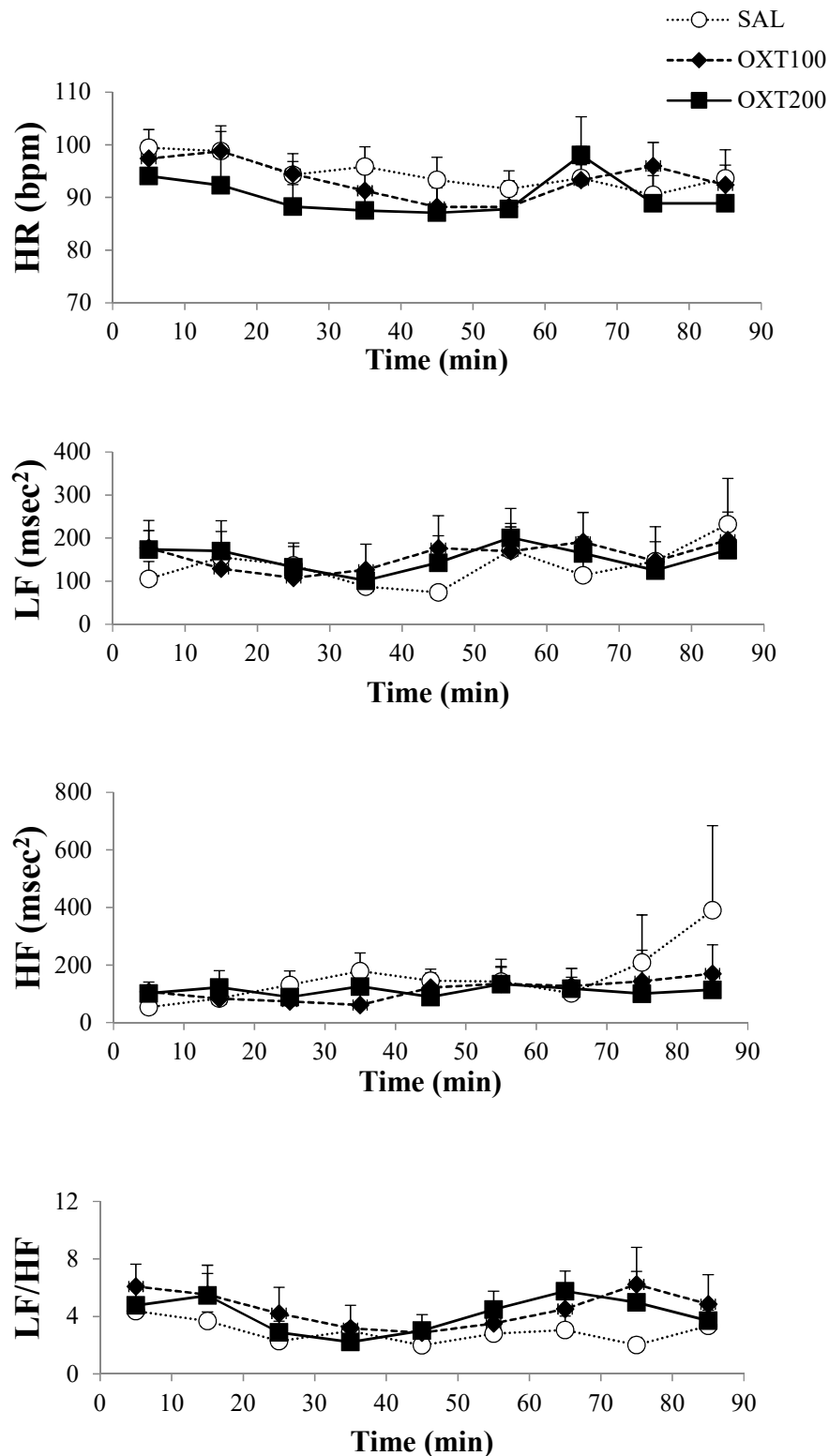


Figure 5-2 Time series change in heart rate and heart rate variability following intranasal administration of saline (SAL), or 100 or 200 μg oxytocin (OXT100 and OXT200, respectively). Each plot represents the mean value and SE for each 10-min period. HR, heart rate; LF, low frequency power; HF, high frequency power; LF/HF, LF to HF ratio.

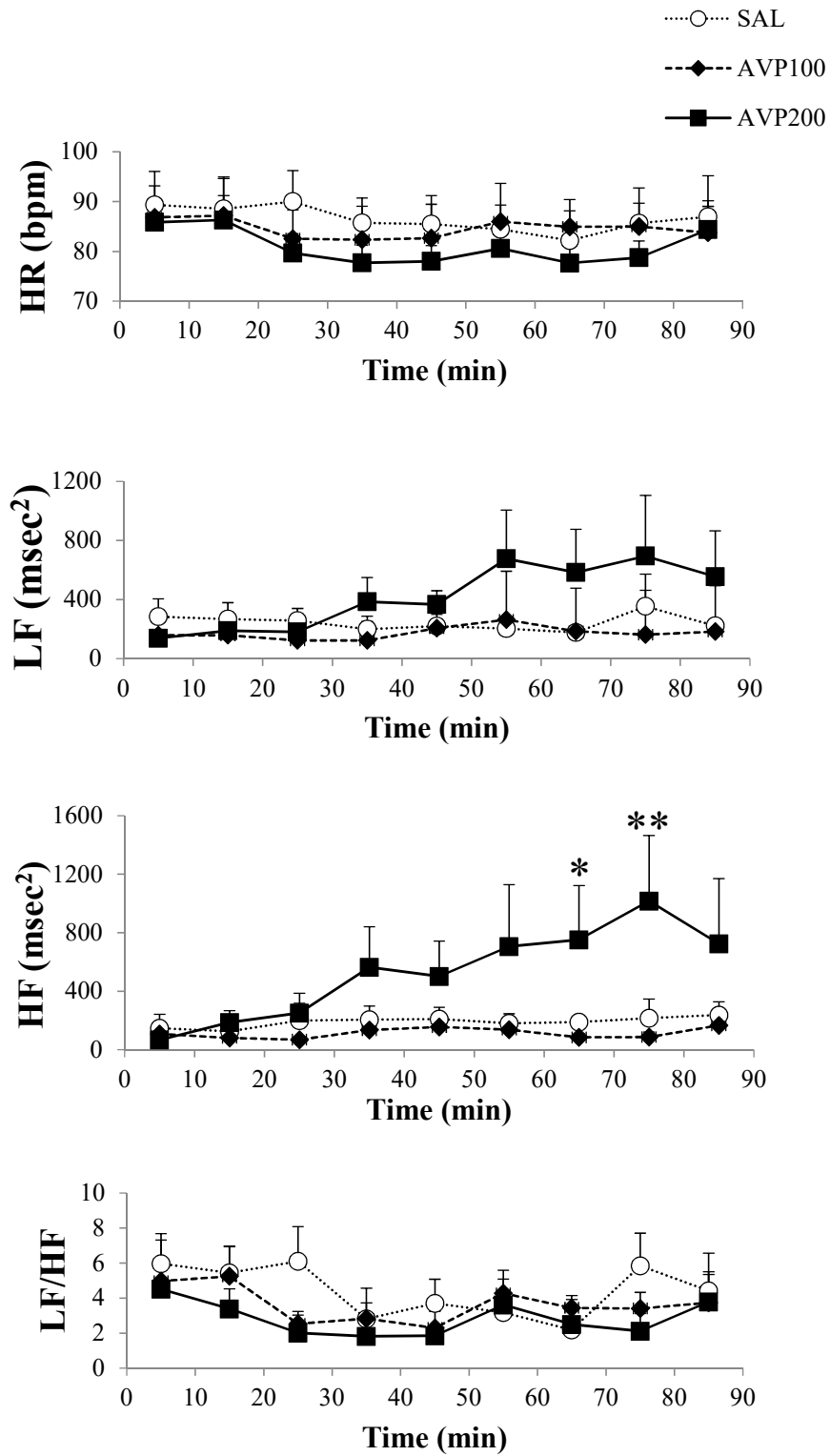


Figure 5-3 Time series change in heart rate and heart rate variability following intranasal administration of saline (SAL), 100 or 200 μ g arginine-vasopressin (AVP100 and AVP200 respectively). Each plot indicates the mean value and SE for each 10- min period. HR, heart rate; LF, low frequency power; HF, high frequency power; LF/HF, LF to HF ratio. Difference between the treatments: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

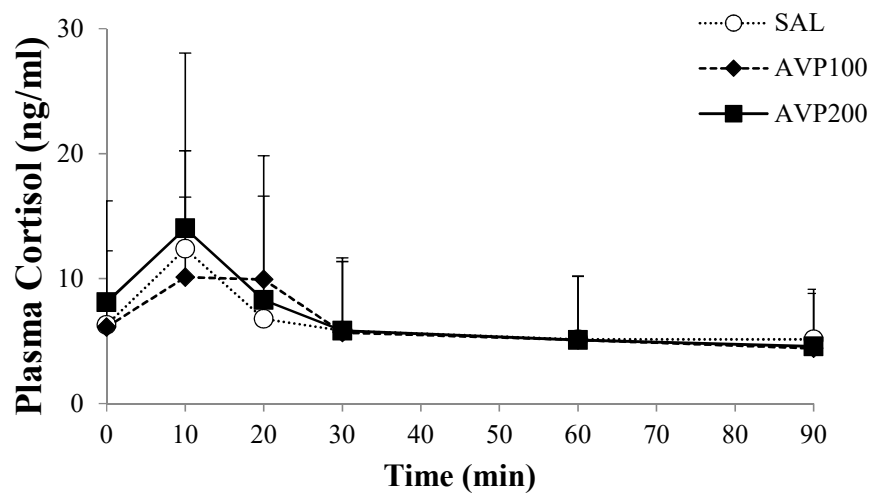


Figure 5-4 Time series change in plasma cortisol levels after intranasal administration of saline (SAL), 100 and 200 µg arginine-vasopressin (AVP100 and AVP200 respectively). Each plot indicates the mean value and SE .

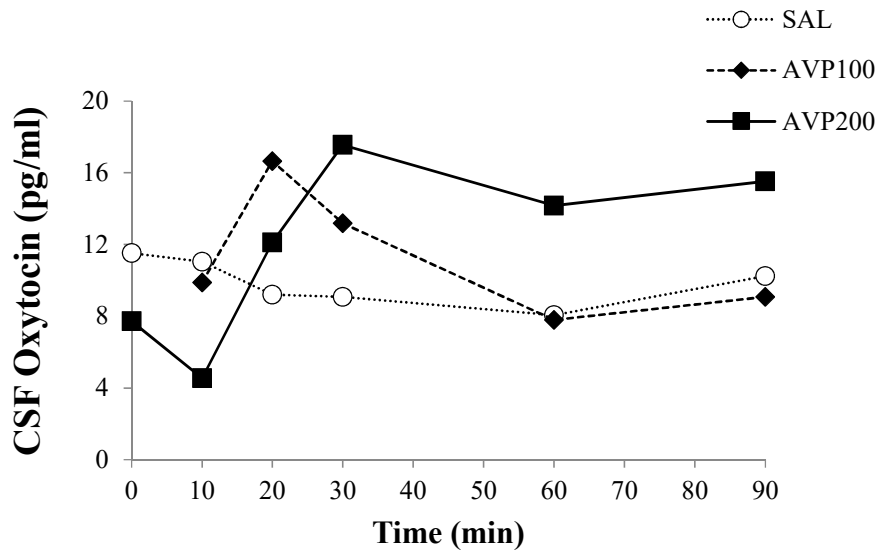


Figure 5-5 Time series change in CSF oxytocin concentration after intranasal administration of saline (SAL), 100 and 200 µg arginine-vasopressin (AVP100 and AVP200 respectively) in one of the animals.

第6章

総合考察および総括

6-1 総合考察

本研究の目的は、育成牛が飼養環境上経験する生体負荷を実験的に再現し、飼養環境がもたらす生体機能の影響を明らかにし、Oxytocin や Vasopressin の中枢作用が生体機能の変化を緩和もしくは改善する手段として利用できる可能性を示すことであった。本研究で得られた重要な知見は2つある。自律神経バランスの変化や副交感神経活動の大きさが、明らかな臨床症状のない潜在的な病態を表す生体機能指標となる可能性があることがあげられること、Oxytocin や Vasopressin の鼻腔内投与はウシに中枢作用を持つ可能性があり、後者は特に、副交感神経活動の上昇もみられたことから、飼育環境上生じる生体機能への負の影響を緩和させる可能性があることである。

比較的弱い刺激に対して生体機能指標の変化は、個体によって反応するまでの時間や大きさが異なっており個体差が生じることを実験的に証明できた。そして、反応性は個体により異なるものの自律神経系機能の変化には共通して交感神経系が優位な状態が観測された。交感神経系が優位に傾いた個体では、感染状態においては免疫反応や臨床徴候が大きく、非感染状態では免疫機能に抑制される傾向が認められた。このような個体は、飼養環境において疾病罹患リスクが高く脆弱個体として保護する必要があるものと考えられ、そのような個体に共通の自律神経系機能の変化の特徴が見られたことは、病態評価への利用性が高いことを示唆している。

生体機能の変化を細かく追跡することにより反応の差異を明確にできたものの、環境因子に対する反応性の高い個体、すなわち発症や罹患リスクの高い個体が元来どのような生体機能の特徴を持つのか明らかにできなかった。Oxytocin や Vasopressin の受容体の分布や産生は、新規環境に対する不安や恐怖や他個体との親和性に関与しているといわれている。Oxytocin は子牛では群における親

和行動の発現と関与があることが分かっている¹²¹ため、おそらく Oxytocin の産生が環境変化への順応に関与すると考えている。育成牛において Vasopressin は Oxytocin と同様な行動変化を起こし、加えて自律神経系機能も変化させたことから、鼻腔内投与方法では Oxytocin 以上にストレス緩和作用があるのかもしれない。中枢の Oxytocin 系の活性化が示唆されたものの、メカニズムについては今後明らかにしていく必要がある。

Oxytocin は LPS 投与によって引き起こした炎症反応を緩和するという報告¹²²や、副交感神経系は免疫系に対して抗炎症作用をもたらすことが明らかになっている¹²³。ヒトでは、副交感神経系の抗炎症作用を応用した敗血症の治療に関する研究や¹²⁴、迷走神経そのものの活動を促すことで、心疾患の治療を試み病態に関わる炎症性サイトカインの産生を抑制した報告¹²⁵もある。そのため、育成牛で Vasopressin の鼻腔内投与がもたらす副交感神経活動の上昇が免疫機能へ及ぼす影響を明らかにしていくことが今後の課題であると考えられた。

まだ多くの検討課題があるが、本研究によって飼養環境における脆弱個体の検出と生体機能変化の緩和が生産現場で利用できれば、感染症の発生減少や、それによって畜産物の安全性への問題に貢献できるはずである。家畜への抗生物質の使用は薬剤耐性菌の出現の原因となり、耐性菌の増加は動物の生命を脅かすばかりではなく、食品を介した人々への感染も懸念される。そのため、世界的に抗生物質の使用をできる限り減らす取り組みがすすんでいる¹²⁶。我が国では、獣医師の薬物慎重使用のためのガイドラインを設ける、ワクチンの開発や普及の促進といった対策をとっている¹²⁷。しかし、動物の健康維持のために最も重要なことは、生体の疾病罹患リスクそのものを減らすことである。免疫機能が正常に保たれなければワクチン効果も減弱する。感染症を防ぐうえで最も重要なのは衛生環境や飼育環境を見直すことで、病原体の蔓延や家畜のストレスを

最小限に保つことが重要である。ところが現実的にはこれらを見直すには人材や設備への投資も不可欠であり飼養環境においては 1 頭の発症さえ疾病の拡大を招くため、個体の生体機能に着目した戦略は有効であると考えられる。

さらに、本研究で示した自律神経系機能による病態評価や鼻腔内投与による行動・生理機能の調節は、どちらも非侵襲的な手段であることが大きな利点である。これまで当たり前のように行われてきた施術もアニマルウェルフェアの観点から苦痛のない代替法への切り替えがすすんでいくことから、本研究で明らかとなった評価方法は飼養衛生や食の安全性のみならずアニマルウェルフェアに配慮した飼養環境の実現にも大きく貢献することが期待される。

6-2 総括

育成牛においても集約型の飼養環境に潜むストレスに起因すると考えられる日和見感染症や牛呼吸器病などが制御困難な疾病として問題となっており、飼養環境が生体機能に及ぼす影響を解明し健康を維持できる飼養形態を確立することが喫緊の課題として求められている。そこで、本研究では飼養環境が生体機能に及ぼす影響を自律神経系機能の変化を中心に内分泌系や免疫系との関連も含めて明らかにするとともに、予防管理的な視点から病態発症を緩和する可能性が期待されている *Oxytocin* や *Vasopressin* の効果についても明らかにすることを目的とした。その結果、心拍変動解析によって得られる自律神経系機能の評価は、飼養環境において発症リスクや罹患リスクの高い脆弱個体を検出する上で有効であり、そのような個体の予防的な措置として *Oxytocin* や *Vasopressin* の鼻腔内投与は有効な手段として活用できる可能性のあることが明らかとなった。

第 2 章では、非侵襲的な自律神経系機能の評価法として利用されている心拍変動解析が、乳用牛における病態の把握に有効かどうかを明らかにするため

に、ホルスタイン種の臨床的に健康な雌成牛と疾患が認められた雌成牛からホルター心電図を記録し心拍変動解析を行った。疾患動物の診断名は乳房炎、肝機能障害、第四胃変位であったが、血液検査で正常範囲を逸脱した項目は見られなかった。一方、心拍変動解析の結果から疾患動物では心拍数の有意な増加や副交感神経活動の指標である HF 値の有意な低下、自律神経系バランスの指標である LF/HF 比の有意な増加が認められた。また、健康動物で認められたこれらの指標における日内変動が疾患動物では消失していた。これらの結果から、疾患動物では副交感神経系機能の減弱により自律神経系機能のバランスとしては交感神経系が優位な状態にあることが明らかになった。そして、心拍変動解析による自律神経系機能の評価が乳用牛の病態を把握する上で有効な手法であることが明らかになった。

群で管理される育成牛において脆弱個体における疾病の発症が、他個体への伝播に影響を及ぼし飼育群全体への疾病の蔓延に波及することが問題であると考えられることから、疾病の拡大を防ぐためにはより早く疾病の徴候を検出する必要がある。第3章では、育成牛を用いて低用量の大腸菌毒素（LPS）を投与することにより実験的な感染の初期状態を作出し、生体機能の変化を明らかにすることを目的とした。LPS 投与により軽度の体温上昇や呼吸数の増加は見られたものの臨床症状としては顕著な変化は認められなかった。心拍変動解析の結果、LPS 投与により HF 値は有意に減少し LF/HF 比は有意に増加した。さらに、LF/HF 値の変化には個体差が認められたことから、LPS に対する反応性により高感受性群と低感受性群に分類したところ、高感受性群では LPS に対する血液性状や臨床徴候の変化が低感受性群よりも大きいことが明らかとなった。これらの結果から、低濃度の LPS 投与により感染の初期状態を作出可能なこと

が明らかになるとともに、LPS に対する生体機能の変化が大きい個体は自律神経系バランスが交感神経系優位な状態になることが示唆された。

第 4 章では、実際に育成牛で実施されている飼養環境における生体機能の変化について明らかにすることを目的とした。育成牛の疾病で特に問題となるのが、群編成後における疾病の発生であることから、個別飼育から群飼育へ移行する移行群と個別飼育を継続する対照群で自律神経系機能を含めた生体機能の変化を比較した。対照群では移行群の群飼育への移行を行う前日と当日でいずれの指標にも変化は見られなかったが、移行群では移行直後において LF/HF 比に増加する傾向が見られ、前章での LPS の反応と同様に個体差も認められた。そこで、移行群の中でも LF/HF 比の増加が大きい個体を高感受性群として解析を加えたところ、高感受性群では好中球数が有意に増加し、接着因子の 1 つである CD11b の好中球における発現が有意に低下していた。交感神経系の緊張による末梢血中における好中球の増加や機能低下が疾病罹患リスクの上昇を引き起こすといわれていることから、飼養環境の変化により交感神経系緊張が持続する場合には免疫機能の低下が起これ疾患の発症に関与しているものと考えられた。

これまでの章において、自律神経系バランスの変化が疾病の発症や罹患リスクと関連性のあることが明らかとなった。そこで、第 5 章では、疾病への罹患リスクを軽減する飼養管理法を検討する目的で、生体機能の反応を緩和させる効果が期待されている Oxytocin や Vasopressin の鼻腔内投与の有効性について調べた。行動学的指標には Oxytocin、Vasopressin とともに顕著な変化は認められなかったが、唯一 Head Shaking の回数は Vasopressin により減少した。また、姿勢変化と反芻の割合に関してみると伏臥位での反芻が Oxytocin と Vasopressin とともに有意に増加した。Oxytocin と Vasopressin の投与後に心拍数は減少する傾向がみ

られたが有意な変化ではなかったものの、Vasopressin 投与後には HF 値が有意に増加した。一般的に、Oxytocin には親和性の向上や抗不安作用があると考えられている一方で、Vasopressin には攻撃性の亢進や不安増強作用があるとも言われている。そして、これらの物質は末梢作用だけでなく中枢作用もあると考えられており、中枢神経系における神経伝達物質として行動や生理機能の調節にも関与していると考えられている。Vasopressin の鼻腔内投与が Oxytocin と類似した副交感神経系活動を増加させ抗不安作用的な行動変化を誘発したことから、より高い中枢神経系への作用をもたらしたともいえるが、詳細なメカニズムについては投与物質の体液中濃度の変化などから明らかにしていく必要がある。

以上の成績を要約すると、心拍変動解析によって得られる自律神経系機能の評価は、飼養環境において発症リスクや罹患リスクの高い脆弱個体を検出する上で有効であり、そのような個体の予防的な措置として Oxytocin や Vasopressin の鼻腔内投与は有効な手段として活用できる可能性のあることが明らかとなった。本研究で得られた知見は、飼養環境における生体機能の変化がもたらす疾病の予防に重要である。

謝辞

本論文を作成するにあたり懇篤なる御指導御鞭撻を賜りました東京大学農学部獣医衛生学教室教授桑原正貴博士、同准教授 関澤 信一 博士に心より感謝申し上げます。

本研究の遂行および投稿論文作成に際し、終始御指導賜りました国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門 矢用 健一博士に心より感謝申し上げるとともに、実験に御指導および御協力いただいた以下の方々に御礼申し上げます。

麻布大学獣医学部内科学第三研究室元教授 和田恭則 博士、同准教授 恩田 賢 博士、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門 石崎 宏 博士、同部門 粕谷 悦子 博士、同部門 須藤 まどか 博士、動物衛生研究部門 宗田 吉広 博士、茨城大学大学院 粂田 康介氏に深謝致します。

本研究を実施した国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構における関係者の方々に感謝申し上げます。また、本研究を遂行するにあたって多大なるご支援、御助言を賜りました獣医衛生学教室の各位の皆様および獣医師 佐藤 隆裕氏に厚く御礼申し上げます。

いつも筆者の志を応援してくれ、生活面において支え続けてくれた両親および祖父母に深く感謝します。

最後に、筆者が課す厳しい実験に耐えながらも癒しを与えてくれ、尊い生命を捧げてくれた愛すべき牛達に心より感謝しますとともに、安らかなるご冥福をお祈り申し上げます。

文献

1. ブライアン・フェイガン著「人類と家畜の世界史」河出書房新社; 2016.
2. 加茂儀一「日本畜産史」法政大学出版局; 1976.
3. 中央酪農会議「日本の酪農」 <http://www.dairy.co.jp/>.
4. 石崎宏「育成期の子牛の免疫抵抗性を低下させる要因」日本家畜臨床感染症研究会誌 2010;5(2):47-54.
5. 農林水産省「酪農及び肉用牛生産の近代化を図るための基本方針」. 2015.
http://www.maff.go.jp/j/press/seisan/c_suisin/150331_1.html.
6. Bøe KE, Færevik G. Grouping and social preferences in calves, heifers and cows. *Appl Anim Behav Sci.* 2003;80(3):175-190. doi:10.1016/S0168-1591(02)00217-4.
7. Færevik G, Andersen IL, Jensen MB, Bøe KE. Increased group size reduces conflicts and strengthens the preference for familiar group mates after regrouping of weaned dairy calves (*Bos taurus*). *Appl Anim Behav Sci.* 2007;108(3):215-228. doi:10.1016/j.applanim.2007.01.010.
8. Warnick VD, Arave CW, Mickelsen CH. Effects of Group, Individual, and Isolated Rearing of Calves on Weight Gain and Behavior. *J Dairy Sci.* 1977;60(6):947-953. doi:10.3168/jds.S0022-0302(77)83968-4.
9. EUR-Lex. Council Directive 97/2/EC. 1997. <http://eur-lex.europa.eu/eli/dir/1997/2/oj>.
10. Association AVM. AVMA Issues Statement on California Proposition 2.
<https://www.avma.org/News/JAVMANews/Pages/081001a.aspx>.
11. 日本家畜臨床感染症研究会編「子牛の科学-胎子期から出生・育成期まで」チクサン出版社; 2009.
12. Abdelfattah EM, Schutz MM, Lay DC, Marchant-Forde JN, Eicher SD. Effect of group size on behavior, health, production, and welfare of veal calves. *J Anim Sci.* 2013;91(11):5455-5465. doi:10.2527/jas.2013-6308.
13. Gupta S, Earley B, Ting STL, Crowe MA. Effect of repeated regrouping and relocation on the physiological, immunological, and hematological variables and performance of steers. *J Anim Sci.* 2005;83(8):1948-1958. doi:/2005.8381948x.
14. Hulbert LE, Moisés SJ. Stress, immunity, and the management of calves. *J Dairy Sci.* 2016. doi:10.3168/jds.2015-10198.
15. Stys A, Stys T. Current clinical applications of heart rate variability. *Clin Cardiol.* 1998;21(10):719-724. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9789691>. Accessed January 12, 2017.

16. Rajendra Acharya U, Paul Joseph K, Kannathal N, Lim CM, Suri JS. Heart rate variability: a review. *Med Biol Eng Comput.* 2006;44(12):1031-1051. doi:10.1007/s11517-006-0119-0.
17. Huston JM, Tracey KJ. The pulse of inflammation: heart rate variability, the cholinergic anti-inflammatory pathway and implications for therapy. *J Intern Med.* 2011;269(1):45-53. doi:10.1111/j.1365-2796.2010.02321.x.
18. Eppinger H, Hess L. *Vagotonia; a Clinical Study in Vegetative Neurology.* New York: The Nervous and Mental Disease Publishing Company; 1915.
19. Sayers BM. Analysis of Heart Rate Variability. *Ergonomics.* 1973;16(1):17-32. doi:10.1080/00140137308924479.
20. Hon EH, Lee ST. Electronic evaluation of the fetal heart rate. VIII. Patterns preceding fetal death, further observations. *Am J Obstet Gynecol.* 1963;87:814-826. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14085784>. Accessed January 4, 2017.
21. Wolf A, Swift JB, Swinney HL, Vastano JA. Determining Lyapunov exponents from a time series. *Phys D Nonlinear Phenom.* 1985;16(3):285-317. doi:10.1016/0167-2789(85)90011-9.
22. Polinsky RJ, Kopin IJ, Elbert MH, Weise V. Pharmacologic distinction of different orthostatic hypotension syndromes. *Neurology.* 1981;31(1):1-6.
23. Dhuria S V., Hanson LR, Frey WH. Intranasal delivery to the central nervous system: Mechanisms and experimental considerations. *J Pharm Sci.* 2009;99(4):n/a-n/a. doi:10.1002/jps.21924.
24. Riem MME, Bakermans-Kranenburg MJ, Pieper S, et al. Oxytocin modulates amygdala, insula, and inferior frontal gyrus responses to infant crying: a randomized controlled trial. *Biol Psychiatry.* 2011;70(3):291-297. doi:10.1016/j.biopsych.2011.02.006.
25. Parker KJ, Buckmaster CL, Schatzberg AF, Lyons DM. Intranasal oxytocin administration attenuates the ACTH stress response in monkeys. *Psychoneuroendocrinology.* 2005;30(9):924-929. doi:10.1016/j.psyneuen.2005.04.002.
26. Quirin M, Kuhl J, Düsing Rainer R. Oxytocin buffers cortisol responses to stress in individuals with impaired emotion regulation abilities. *Psychoneuroendocrinology.* 2011;36(6):898-904. doi:10.1016/j.psyneuen.2010.12.005.
27. Cardoso C, Ellenbogen MA, Orlando MA, Bacon SL, Joobor R. Intranasal oxytocin attenuates the cortisol response to physical stress: a dose-response study. *Psychoneuroendocrinology.* 2013;38(3):399-407. doi:10.1016/j.psyneuen.2012.07.013.
28. Benarroch EE. Oxytocin and vasopressin: social neuropeptides with complex neuromodulatory

- functions. *Neurology*. 2013;80(16):1521-1528. doi:10.1212/WNL.0b013e31828cfb15.
29. Veening JG, Olivier B. Intranasal administration of oxytocin: Behavioral and clinical effects, a review. *Neurosci Biobehav Rev*. 2013;37(8):1445-1465. doi:10.1016/j.neubiorev.2013.04.012.
 30. Brunnie C, Münze TF, Tempelmann C, Heldmann M. Vasopressin modulates neural responses related to emotional stimuli in the right amygdala. *Brain Res*. 2013;1499:29-42. doi:10.1016/j.brainres.2013.01.009.
 31. Song Z, McCann KE, McNeill JK, Larkin TE, Huhman KL, Albers HE. Oxytocin induces social communication by activating arginine-vasopressin V1a receptors and not oxytocin receptors. *Psychoneuroendocrinology*. 2014;50:14-19. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.08.005.
 32. Francis DD, Young LJ, Meaney MJ, Insel TR. Naturally Occurring Differences in Maternal Care are Associated with the Expression of Oxytocin and Vasopressin (V1a) Receptors: Gender Differences. *J Neuroendocrinol*. 2002;14(5):349-353. doi:10.1046/j.0007-1331.2002.00776.x.
 33. Manning M, Misicka A, Olma A, et al. Oxytocin and vasopressin agonists and antagonists as research tools and potential therapeutics. *J Neuroendocrinol*. 2012;24(4):609-628. doi:10.1111/j.1365-2826.2012.02303.x.
 34. Hagen K, Langbein J, Schmied C, Lexer D, Waiblinger S. Heart rate variability in dairy cows: influences of breed and milking system. *Physiol Behav*. 2005;85(2):195-204. doi:10.1016/j.physbeh.2005.03.019.
 35. Stewart M, Verkerk GA, Stafford KJ, Schaefer AL, Webster JR. Noninvasive assessment of autonomic activity for evaluation of pain in calves, using surgical castration as a model. *J Dairy Sci*. 2010;93(8):3602-3609. doi:10.3168/jds.2010-3114.
 36. Stewart M, Stafford KJ, Dowling SK, Schaefer AL, Webster JR. Eye temperature and heart rate variability of calves disbudded with or without local anaesthetic. *Physiol Behav*. 2008;93(4-5):789-797. doi:10.1016/j.physbeh.2007.11.044.
 37. Stewart M, Shepherd HM, Webster JR, Waas JR, McLeay LM, Schütz KE. Effect of previous handling experiences on responses of dairy calves to routine husbandry procedures. *Animal*. 2013;7(5):828-833. doi:10.1017/S175173111200225X.
 38. Kuwahara M, Hiraga A, Kai M, Tsubone H, Sugano S. Influence of training on autonomic nervous function in horses: evaluation by power spectral analysis of heart rate variability. *Equine Vet J Suppl*. 1999;(30):178-180. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10659247>. Accessed December 14, 2016.
 39. Kuwahara M, Suzuki A, Tsutsumi H, Tanigawa M, Tsubone H, Sugano S. Power spectral analysis of heart rate variability for assessment of diurnal variation of autonomic nervous

activity in miniature swine. *Lab Anim Sci.* 1999;49(2):202-208.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10331551>. Accessed December 14, 2016.

40. Ohmura H, Hiraga A, Aida H, Kuwahara M, Tsubone H, Jones JH. Changes in heart rate and heart rate variability in Thoroughbreds during prolonged road transportation. *Am J Vet Res.* 2006;67(3):455-462. doi:10.2460/ajvr.67.3.455.
41. Goldstein B, Kempinski MH, Stair D, et al. Autonomic modulation of heart rate variability during endotoxin shock in rabbits. *Crit Care Med.* 1995;23(10):1694-1702.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7587235>. Accessed December 14, 2016.
42. Dillon JF, Plevris JN, Nolan J, et al. Autonomic function in cirrhosis assessed by cardiovascular reflex tests and 24-hour heart rate variability. *Am J Gastroenterol.* 1994;89(9):1544-1547.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8079935>. Accessed December 14, 2016.
43. Watson JP, Nolan J, Elliott MW. Autonomic dysfunction in patients with nocturnal hypoventilation in extrapulmonary restrictive disease. *Eur Respir J.* 1999;13(5):1097-1102.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10414410>. Accessed December 14, 2016.
44. Nemeth E, Ganz T. Anemia of inflammation. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2014;28(4):671-81, vi. doi:10.1016/j.hoc.2014.04.005.
45. Jänig W. Sympathetic nervous system and inflammation: A conceptual view. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2014;182:4-14. doi:10.1016/j.autneu.2014.01.004.
46. Sajadieh A, Nielsen OW, Rasmussen V, Hein HO, Abedini S, Hansen JF. Increased heart rate and reduced heart-rate variability are associated with subclinical inflammation in middle-aged and elderly subjects with no apparent heart disease. *Eur Heart J.* 2004;25(5):363-370. doi:10.1016/j.ehj.2003.12.003.
47. Carroll JA, Burdick NC, Reuter RR, et al. Differential acute phase immune responses by Angus and Romosinuano steers following an endotoxin challenge. *Domest Anim Endocrinol.* 2011;41(4):163-173. doi:10.1016/j.domaniend.2011.06.002.
48. Bieniek K, Szuster-Ciesielska A, Kamińska T, Kondracki M, Witek M, Kandefer-Szerszeń M. Tumor necrosis factor and interferon activity in the circulation of calves after repeated injection of low doses of lipopolysaccharide. *Vet Immunol Immunopathol.* 1998;62(4):297-307. doi:10.1016/S0165-2427(98)00102-0.
49. Prin-Mathieu C, Le Roux Y, Faure GC, Laurent F, Bene MC, Moussaoui F. Enzymatic Activities of Bovine Peripheral Blood Leukocytes and Milk Polymorphonuclear Neutrophils during Intramammary Inflammation Caused by Lipopolysaccharide. *Clin Vaccine Immunol.* 2002;9(4):812-817. doi:10.1128/CDLI.9.4.812-817.2002.

50. Borderas TF, de Passillé AM, Rushen J. Behavior of dairy calves after a low dose of bacterial endotoxin. *J Anim Sci.* 2008;86(11):2920-2927. doi:10.2527/jas.2008-0926.
51. Carroll JA, Burdick Sanchez NC, Hulbert LE, et al. Sexually dimorphic innate immunological responses of pre-pubertal Brahman cattle following an intravenous lipopolysaccharide challenge. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;166(3):108-115. doi:10.1016/j.vetimm.2015.06.009.
52. Jacobsen S, Toelboell T, Andersen PH. Dose dependency and individual variability in selected clinical, haematological and blood biochemical responses after systemic lipopolysaccharide challenge in cattle. *Vet Res.* 36(2):167-178. doi:10.1051/vetres:2004062.
53. Malhotra R, Bird MI. L-Selectin--a signalling receptor for lipopolysaccharide. *Chem Biol.* 1997;4(8):543-547. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9281523>. Accessed January 4, 2017.
54. Cocks RA, Chan TY, Rainer TH. Leukocyte L-selectin is up-regulated after mechanical trauma in adults. *J Trauma.* 1998;45(1):1-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9680003>. Accessed December 22, 2016.
55. Maekawa K, Futami S, Nishida M, et al. Effects of trauma and sepsis on soluble L-selectin and cell surface expression of L-selectin and CD11b. *J Trauma.* 1998;44(3):460-468. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9529172>. Accessed December 7, 2016.
56. Andersen PH. Bovine endotoxemia--some aspects of relevance to production diseases. A review. *Acta Vet Scand Suppl.* 2003;98:141-155. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15259787>. Accessed January 4, 2017.
57. Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, et al. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell.* 2011;147(4):868-880. doi:10.1016/j.cell.2011.09.051.
58. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol.* 2004;4(7):499-511. doi:10.1038/nri1391.
59. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature.* 2002;420(6917):853-859. doi:10.1038/nature01321.
60. Kenney MJ, Ganta CK, Kenney MJ, Ganta CK. Autonomic Nervous System and Immune System Interactions. In: *Comprehensive Physiology.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2014:1177-1200. doi:10.1002/cphy.c130051.
61. Pavlov VA, Wang H, Czura CJ, Friedman SG, Tracey KJ. The cholinergic anti-inflammatory pathway: a missing link in neuroimmunomodulation. *Mol Med.* 2003;9(5-8):125-134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14571320>. Accessed March 1, 2017.
62. Tupone D, Madden CJ, Morrison SF. Autonomic regulation of brown adipose tissue thermogenesis in health and disease: potential clinical applications for altering BAT

- thermogenesis. *Front Neurosci.* 2014;8:14. doi:10.3389/fnins.2014.00014.
63. Goddard LM, Iruela-Arispe ML. Cellular and molecular regulation of vascular permeability. *Thromb Haemost.* 2013;109(3):407-415. doi:10.1160/TH12-09-0678.
64. Rainer TH, Lam N, Cocks RA. Adrenaline upregulates monocyte L-selectin in vitro. *Resuscitation.* 1999;43(1):47-55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10636317>. Accessed January 4, 2017.
65. Altenburg SP, Martins MA, Silva AR, Cordeiro RS, Castro-Faria-Neto HC. LPS-induced blood neutrophilia is inhibited by alpha 1-adrenoceptor antagonists: a role for catecholamines. *J Leukoc Biol.* 1997;61(6):689-694. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9201259>. Accessed December 19, 2016.
66. Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9(1):46-56. doi:10.1038/nrn2297.
67. Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev.* 2000;52(4):595-638. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11121511>. Accessed December 17, 2016.
68. Pongratz G, Straub RH. The sympathetic nervous response in inflammation. *Arthritis Res Ther.* 2014;16(6):504. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25789375>. Accessed November 18, 2016.
69. Wrona D. Neural-immune interactions: An integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. *J Neuroimmunol.* 2006;172(1):38-58. doi:10.1016/j.jneuroim.2005.10.017.
70. Papaioannou V, Pneumatikos I, Maglaveras N. Association of heart rate variability and inflammatory response in patients with cardiovascular diseases: current strengths and limitations. *Front Physiol.* 2013;4:174. doi:10.3389/fphys.2013.00174.
71. Lampert R, Bremner JD, Su S, et al. Decreased heart rate variability is associated with higher levels of inflammation in middle-aged men. *Am Heart J.* 2008;156(4):759.e1-7. doi:10.1016/j.ahj.2008.07.009.
72. Koolhaas JM, de Boer SF, Coppens CM, Buwalda B. Neuroendocrinology of coping styles: towards understanding the biology of individual variation. *Front Neuroendocrinol.* 2010;31(3):307-321. doi:10.1016/j.yfrne.2010.04.001.
73. Hulbert LE, Ballou MA. Innate immune responses and health of individually reared Holstein calves after placement into transition-pens 23 d after weaning. *J Dairy Res.* 2012;79(3):333-340. doi:10.1017/S0022029912000271.

74. Gupta S, Earley B, Crowe MA. Effect of 12-hour road transportation on physiological, immunological and haematological parameters in bulls housed at different space allowances. *Vet J.* 2007;173(3):605-616. doi:10.1016/j.tvjl.2006.03.002.
75. Gupta S, Earley B, Crowe MA. Pituitary, adrenal, immune and performance responses of mature Holstein x Friesian bulls housed on slatted floors at various space allowances. *Vet J.* 2007;173(3):594-604. doi:10.1016/j.tvjl.2006.02.011.
76. Hickey MC, Drennan M, Earley B. The effect of abrupt weaning of suckler calves on the plasma concentrations of cortisol, catecholamines, leukocytes, acute-phase proteins and in vitro interferon-gamma production. *J Anim Sci.* 2003;81(11):2847-2855. doi:/2003.81112847x.
77. Lynch EM, Earley B, McGee M, Doyle S. Effect of abrupt weaning at housing on leukocyte distribution, functional activity of neutrophils, and acute phase protein response of beef calves. *BMC Vet Res.* 2010;6(1):39. doi:10.1186/1746-6148-6-39.
78. Weber PSD. Mechanisms of glucocorticoid-induced down-regulation of neutrophil L-selectin in cattle: evidence for effects at the gene-expression level and primarily on blood neutrophils. *J Leukoc Biol.* 2003;75(5):815-827. doi:10.1189/jlb.1003505.
79. Scanzano A, Cosentino M. Adrenergic regulation of innate immunity: a review. *Front Pharmacol.* 2015;6:171. doi:10.3389/fphar.2015.00171.
80. Scanzano A, Schembri L, Rasini E, et al. Adrenergic modulation of migration, CD11b and CD18 expression, ROS and interleukin-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Inflamm Res.* 2015;64(2):127-135. doi:10.1007/s00011-014-0791-8.
81. Burton JL, Kehrli ME, Kapil S, Horst RL. Regulation of L-selectin and CD18 on bovine neutrophils by glucocorticoids: effects of cortisol and dexamethasone. *J Leukoc Biol.* 1995;57(2):317-325. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531748>. Accessed March 2, 2016.
82. Dhabhar FS. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation.* 2009;16(5):300-317. doi:10.1159/000216188.
83. Viswanathan K, Dhabhar FS. Stress-induced enhancement of leukocyte trafficking into sites of surgery or immune activation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(16):5808-5813. doi:10.1073/pnas.0501650102.
84. O'Loughlin A, McGee M, Waters SM, Doyle S, Earley B. Examination of the bovine leukocyte environment using immunogenetic biomarkers to assess immunocompetence following exposure to weaning stress. *BMC Vet Res.* 2011;7:45. doi:10.1186/1746-6148-7-45.
85. Piccione G, Caola G, Refinetti R. Daily and estrous rhythmicity of body temperature in

domestic cattle. *BMC Physiol.* 2003;3(1):7. doi:10.1186/1472-6793-3-7.

86. Buckham Sporer KR, Burton JL, Earley B, Crowe MA. Transportation stress in young bulls alters expression of neutrophil genes important for the regulation of apoptosis, tissue remodeling, margination, and anti-bacterial function. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;118(1-2):19-29. doi:10.1016/j.vetimm.2007.04.002.
87. Yin D, Tuthill D, Mufson RA, Shi Y. Chronic restraint stress promotes lymphocyte apoptosis by modulating CD95 expression. *J Exp Med.* 2000;191(8):1423-1428.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10770807>. Accessed January 12, 2017.
88. Hulbert LE, Cobb CJ, Carroll JA, Ballou MA. The effects of early weaning on innate immune responses of Holstein calves. *J Dairy Sci.* 2011;94(5):2545-2556. doi:10.3168/jds.2010-3983.
89. Meyer-Lindenberg A, Domes G, Kirsch P, Heinrichs M. Oxytocin and vasopressin in the human brain: social neuropeptides for translational medicine. *Nat Rev Neurosci.* 2011;12(9):524-538. doi:10.1038/nrn3044.
90. Kemp AH, Quintana DS, Kuhnert R-L, Griffiths K, Hickie IB, Guastella AJ. Oxytocin increases heart rate variability in humans at rest: implications for social approach-related motivation and capacity for social engagement. *PLoS One.* 2012;7(8):e44014. doi:10.1371/journal.pone.0044014.
91. Gamer M, Büchel C. Oxytocin specifically enhances valence-dependent parasympathetic responses. *Psychoneuroendocrinology.* 2012;37(1):87-93. doi:10.1016/j.psyneuen.2011.05.007.
92. Perras B, Wagner U, Born J, Fehm HL. Improvement of sleep and pituitary-adrenal inhibition after subchronic intranasal vasopressin treatment in elderly humans. *J Clin Psychopharmacol.* 2003;23(1):35-44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12544374>. Accessed October 17, 2016.
93. Watanabe K, Ishida M, Ito S, Kasuya E, Sutoh M, Yayou K. The relationship between awake-sleep states and autonomic nervous balance in cattle. *Anim Behav Manag.* 2014;50(3):119-126. <http://ci.nii.ac.jp/naid/110009863072/en/>. Accessed April 29, 2015.
94. Yayou K, Ito S, Kasuya E, Sutoh M, Yamamoto N. Effects of Intracerebroventricularly Administered Carbetocin on Social Behavior in Holstein Steers. *J Vet Med Sci.* 2013;75(9):1147-1152. doi:10.1292/jvms.12-0560.
95. Charlton GL, Haley DB, Rushen J, de Passillé AM. Stocking density, milking duration, and lying times of lactating cows on Canadian freestall dairy farms. *J Dairy Sci.* 2014;97(5):2694-2700. doi:10.3168/jds.2013-6923.
96. Vanhoudt A, van Winden S, Fishwick JC, Bell NJ. Monitoring cow comfort and rumen health indices in a cubicle-housed herd with an automatic milking system: a repeated measures

- approach. *Ir Vet J*. 2015;68(1):12. doi:10.1186/s13620-015-0040-7.
97. Gossen A, Hahn A, Westphal L, et al. Oxytocin plasma concentrations after single intranasal oxytocin administration - A study in healthy men. *Neuropeptides*. 2012;46(5):211-215. doi:10.1016/j.npep.2012.07.001.
98. Neumann ID, Maloumy R, Beiderbeck DI, Lukas M, Landgraf R. Increased brain and plasma oxytocin after nasal and peripheral administration in rats and mice. *Psychoneuroendocrinology*. 2013;38(10):1985-1993. doi:10.1016/j.psyneuen.2013.03.003.
99. Burri A, Heinrichs M, Schedlowski M, Kruger THC. The acute effects of intranasal oxytocin administration on endocrine and sexual function in males. *Psychoneuroendocrinology*. 2008;33(5):591-600. doi:10.1016/j.psyneuen.2008.01.014.
100. Schirmann K, Chapinal N, Weary DM, Heuwieser W, von Keyserlingk MAG. Rumination and its relationship to feeding and lying behavior in Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*. 2012;95(6):3212-3217. doi:10.3168/jds.2011-4741.
101. Herskin MS, Munksgaard L, Ladewig J. Effects of acute stressors on nociception, adrenocortical responses and behavior of dairy cows. *Physiol Behav*. 2004;83(3):411-420. doi:10.1016/j.physbeh.2004.08.027.
102. Sutoh M, Ito S, Kasuya E, Yayou K-I. Effects of exposure to plant-derived odorants on behavior and the concentration of stress-related hormones in steers isolated under a novel environment. *Anim Sci J*. 2013;84(2):159-164. doi:10.1111/j.1740-0929.2012.01047.x.
103. Müller C, Ladewig J, Thielscher HH, Smidt D. Behavior and heart rate of heifers housed in tether stanchions without straw. *Physiol Behav*. 1989;46(4):751-754. doi:10.1016/0031-9384(89)90362-4.
104. Redbo I. Relations between oral stereotypies, open-field behavior, and pituitary-adrenal system in growing dairy cattle. *Physiol Behav*. 1998;64(3):273-278. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9748093>. Accessed February 3, 2016.
105. Viviani D, Charlet A, van den Burg E, et al. Oxytocin selectively gates fear responses through distinct outputs from the central amygdala. *Science*. 2011;333(6038):104-107. doi:10.1126/science.1201043.
106. Neumann ID. Brain oxytocin: a key regulator of emotional and social behaviours in both females and males. *J Neuroendocrinol*. 2008;20(6):858-865. doi:10.1111/j.1365-2826.2008.01726.x.
107. Hicks C, Ramos L, Reekie T, et al. Body temperature and cardiac changes induced by peripherally administered oxytocin, vasopressin and the non-peptide oxytocin receptor agonist

- WAY 267,464: a biotelemetry study in rats. *Br J Pharmacol*. 2014;171(11):2868-2887. doi:10.1111/bph.12613.
108. Vande Walle J, Stockner M, Raes A, Nørgaard JP. Desmopressin 30 years in clinical use: a safety review. *Curr Drug Saf*. 2007;2(3):232-238. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18690973>. Accessed March 7, 2017.
109. Chanson P, Salenave S. Treatment of neurogenic diabetes insipidus. *Ann Endocrinol (Paris)*. 2011;72(6):496-499. doi:10.1016/j.ando.2011.09.001.
110. Hernandez CE, Thierfelder T, Svennersten-Sjaunja K, Berg C, Orihuela A, Lidfors L. Time lag between peak concentrations of plasma and salivary cortisol following a stressful procedure in dairy cattle. *Acta Vet Scand*. 2014;56:61. doi:10.1186/s13028-014-0061-3.
111. Familiarì M, Smith AI, Smith R, Funder JW. Arginine vasopressin is a much more potent stimulus to ACTH release from ovine anterior pituitary cells than ovine corticotropin-releasing factor. 1. In vitro studies. *Neuroendocrinology*. 1989;50(2):152-157. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2550836>. Accessed March 23, 2016.
112. Yayou K, Sato Y, Ito S, Nakamura M. Comparison between the central effects of CRH and AVP in steers. *Physiol Behav*. 2008;93(3):537-545. doi:10.1016/j.physbeh.2007.10.014.
113. Calcagnoli F, Kreutzmann JC, de Boer SF, Althaus M, Koolhaas JM. Acute and repeated intranasal oxytocin administration exerts anti-aggressive and pro-affiliative effects in male rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2015;51:112-121. doi:10.1016/j.psyneuen.2014.09.019.
114. Quintana DS, Kemp AH, Alvares G a., Guastella AJ. A role for autonomic cardiac control in the effects of oxytocin on social behavior and psychiatric illness. *Front Neurosci*. 2013;7(7 APR):1-9. doi:10.3389/fnins.2013.00048.
115. Zhu J, Chang L, Xie J, Ai H. Arginine Vasopressin Injected into the Dorsal Motor Nucleus of the Vagus Inhibits Gastric Motility in Rats. *Gastroenterol Res Pract*. 2016;2016:4618672. doi:10.1155/2016/4618672.
116. Levasseur G, Baly C, Grébert D, Durieux D, Salesse R, Caillol M. Anatomical and functional evidence for a role of arginine-vasopressin (AVP) in rat olfactory epithelium cells. *Eur J Neurosci*. 2004;20(3):658-670. doi:10.1111/j.1460-9568.2004.03516.x.
117. Meddle SL, Leng G, Selvarajah JR, Bicknell RJ, Russell J a. Direct pathways to the supraoptic nucleus from the brainstem and the main olfactory bulb are activated at parturition in the rat. *Neuroscience*. 2000;101(4):1013-1021. doi:10.1016/S0306-4522(00)00300-6.
118. Andersson B, Kitchell R, Persson N. A study of rumination induced by milking in the goat. *Acta Physiol Scand*. 1958;44(1):92-102. doi:10.1111/j.1748-1716.1958.tb01611.x.

119. Johansson B, Redbo I, Svennersten-Sjaunja K. Effect of feeding before, during and after milking on dairy cow behaviour and the hormone cortisol. *Anim Sci.* 1999;68:597-604. http://www.researchgate.net/publication/259662022_Effect_of_feeding_before_during_and_after_milking_on_dairy_cow_behaviour_and_the_hormone_cortisol. Accessed April 17, 2015.
120. Johansson B, Uvnäs-Moberg K, Knight CH, Svennersten-Sjaunja K. Effect of feeding before, during and after milking on milk production and the hormones oxytocin, prolactin, gastrin and somatostatin. *J Dairy Res.* 1999;66(2):151-163. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10376238>. Accessed February 3, 2016.
121. Yayou K, Ito S, Yamamoto N. Relationships between postnatal plasma oxytocin concentrations and social behaviors in cattle. *Anim Sci J = Nihon chikusan Gakkaiho.* 2015;86(8):806-813. doi:10.1111/asj.12363.
122. Yuan L, Liu S, Bai X, et al. Oxytocin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammation in microglial cells and attenuates microglial activation in lipopolysaccharide-treated mice. *J Neuroinflammation.* 2016;13(1):77. doi:10.1186/s12974-016-0541-7.
123. Pereira MR, Leite PEC. The Involvement of Parasympathetic and Sympathetic Nerve in the Inflammatory Reflex. *J Cell Physiol.* 2016;231(9):1862-1869. doi:10.1002/jcp.25307.
124. Kakinuma Y, Akiyama T, Okazaki K, Arikawa M, Noguchi T, Sato T. A non-neuronal cardiac cholinergic system plays a protective role in myocardium salvage during ischemic insults. *Ma X-L, ed. PLoS One.* 2012;7(11):e50761. doi:10.1371/journal.pone.0050761.
125. Schwartz PJ, De Ferrari GM, Sanzo A, et al. Long term vagal stimulation in patients with advanced heart failure First experience in man. *Eur J Heart Fail.* 2008;10(9):884-891. doi:10.1016/j.ejheart.2008.07.016.
126. World Health Organization. Global action plan on antimicrobial resistance. http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/en/.
127. 農林水産省「家畜に使用する抗菌性物質について」
<http://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/yakuzi/koukinzai.html>.