

## 5 子牛の群導入時の ICT を活用したストレス評価と免疫機能変動との関連性

県央家畜保健衛生所

安西真奈美、大竹祥紘、赤間俊輔、米山州二、手塚典子

### はじめに

子牛の群導入は、移動や環境の変化により大きなストレスとなることから下痢や呼吸器病の発生を誘発する原因となり生産性を低下させることが知られている<sup>1)</sup>。これらの被害を低減するためには適切な治療や対策が必要であり、健康状態を的確に把握し疾病兆候を早期に検知する手法が求められている。一方、農家の高齢化・跡継ぎ問題等から人手不足が大きな問題となっており、飼養管理を効率化・省力化する機器への要望が高まっている。そうした中、より精密な健康管理や省力化した飼養管理を可能にする方法として ICT を活用したスマート農業が注目され、ICT の開発が進められているところである。

今回、生産農場における初めての実証試験として ICT を採用した心拍計、心電計及び体表温センサを群導入する子牛に装着し、群導入前後の子牛のストレス状態の評価や発熱状態の検知を試みるとともに群導入ストレスと免疫機能変動の関連性を調査したので、その概要を報告する。

### 材料と方法

試験期間は平成 28 年 8 月の 22 日間とし、6~7 か月齢のホルスタイン種の雌子牛 4 頭を供した。群導入前日に心拍計、心電計、及び体表温センサを装着後に試験を開始した。翌日に約 1 時間かけて県内預託牧場に輸送し、同月齢の 12 頭とともにフリーバーン牛舎で群飼養を行った。

### 1 心拍計、ホルター心電計を用いた自律神経の解析

本試験では市販されているヒト用の心拍計とホルター心電計を子牛の左胸部に装着しデータを採取した。得られた心電図の R-R 間隔のスペクトル解析を行い、自律神経機能の変動について調査した<sup>2)</sup>。心拍計は、ホルター心電計の捉えた心拍数との照合に用いた。データの採取は群導入前日、0、1、2、3、7 日目の計 6 回実施した。得られたデータのうち解析を実施する時間区分は昼間(13時から19時)と夜間(22時から翌6時)とし、解析項目は交感神経と副交感神経の活動を反映する心拍数と心拍数の低周波数(以下、LF)成分、副交感神経の活動を反映する心拍数の高周波数(以下、HF)成分、交感神経の活動を反映する LF/HF について実施した。

### 2 体表温センサ解析

群導入前日に動物衛生研究部門で開発中の体表温センサを尾根部腹側にベルトで固定した(図 1)。体表温センサは群導入前日~15 日目まで装着し、体表温データを 2 分間隔で連続採取した。得られた体表温データから推定直腸温を算出し、実測した直腸温との関連性の検証を行った。なお、この体表温データはパソコン上だけでなくクラウド上でリアルタイムに確認可能である。また、群導入前日、0、1、2、3、7、14、21 日目の午前 10 時に直腸温を測定した。



図1 体表温センサの装着状況

### 3 血液学的検査

群導入前日、0、1、2、3、7、14、21日目で採血した。ストレスの指標としてはEIA法を用い血清中コルチゾールを測定した<sup>3)</sup>。免疫状態の評価については、自動血球計算機を用いて総白血球数を測定し、白血球分画についてはギムザ染色をした塗抹標本を作製しリンパ球数と好中球数をカウントした<sup>4)</sup>。また、好中球の貪食能の指標である血液化学発光能(以下血液CL能)を測定した<sup>5)</sup>。リンパ球サブセット解析については、CD3(T細胞)、CD21(B細胞)、CD4(ヘルパーT細胞)、CD8(細胞傷害性T細胞)を特異抗原として用いフローサ

イトメトリー解析を実施した。また呼吸器病発症のバイオマーカーとして、ハプトグロビン(細菌性炎症の指標)についてはヘモグロビンバインディングアッセイにより測定した<sup>6)</sup>。Mxタンパク(ウイルス感染の指標)については、分離した末梢血単核球(以下PBMC)から総RNAを抽出後、逆転写反応により合成されたcDNAを用いてリアルタイムPCRを行った。解析はβアクチンをインターナルコントロールとし発現比(比較Ct法)で解析した。肺サーファクタントプロテインA(以下SP-A、肺特異的炎症の指標)については、ELISA法にて測定した<sup>7)</sup>。

### 4 統計解析

自律神経系機能指標と血液学的検査結果については一元配置分散分析を行い、群導入前日と各採材日との多重比較には、Bonferroni法を用いた。各測定値は平均±標準誤差で表示した。

## 結果

### 1 自律神経の解析(図2)

交感神経の指標である心拍数は、群導入前

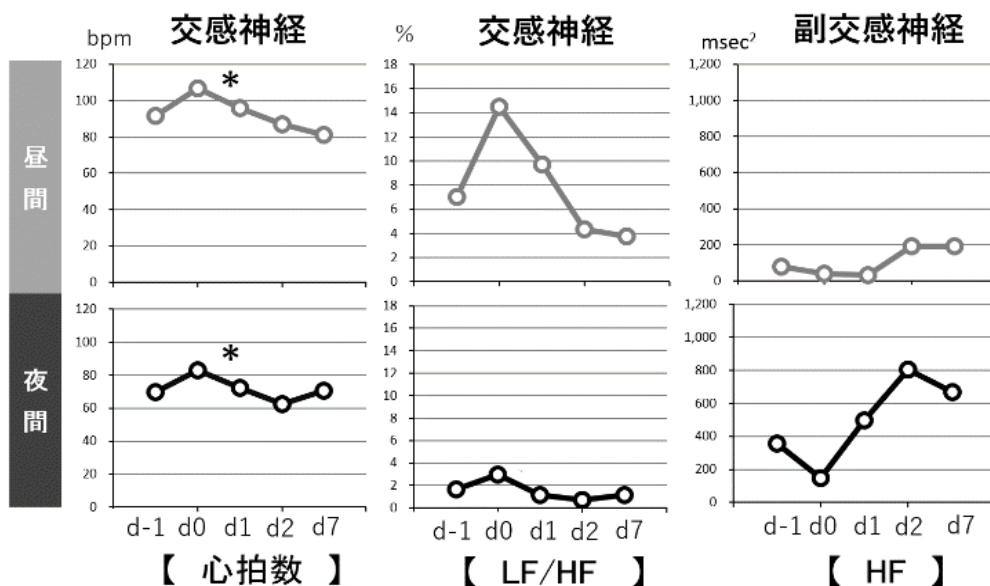


図2 自律神経の解析

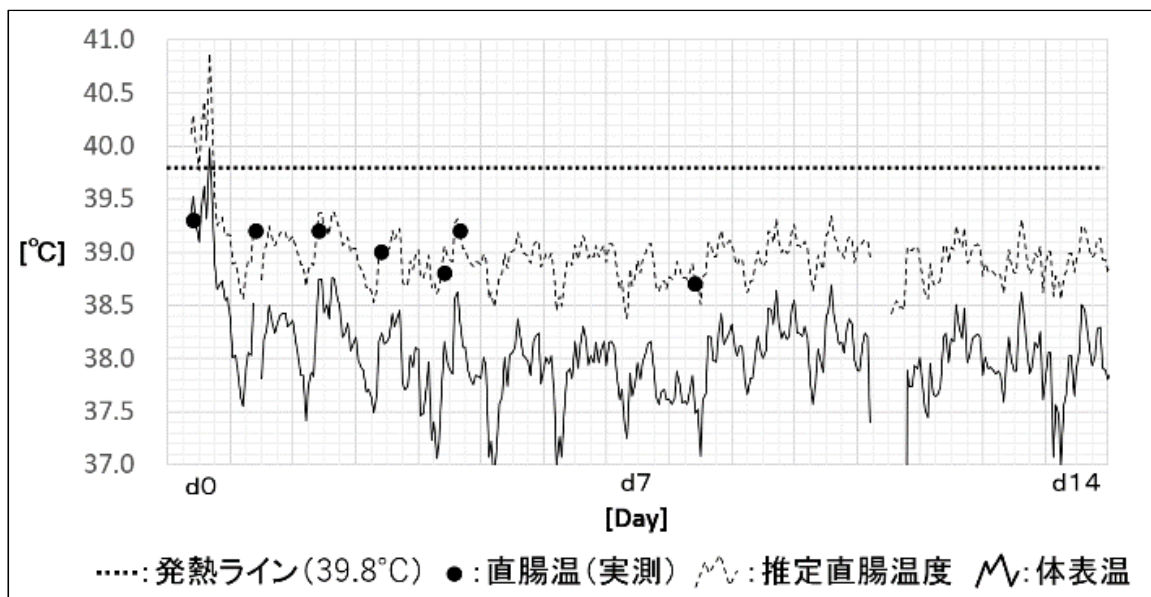


図3 体表温センサ解析

日の昼(91.7±2.5bpm)、夜(69.7±4.5bpm)と比較して群導入直後の昼(106.6±3.1bpm)、夜(83.1±1.3bpm)ともに有意な上昇を認めた(P<0.05)。また、交感神経の指標であるLF/HFについても昼間に群導入前日(7.0±3.1%)と比較して有意差は認められなかったものの群導入日(14.5±3.2%)に顕著な上昇が認められた。一方、副交感神経の緊張を示すHFは、群導入日には昼夜ともにやや低下傾向であったが、群導入1日後の夜間から上昇傾向となり、2日後の夜間(805.5±328.6msec)に群導入日の夜間(355.3±208.0msec)と比較して顕著な上昇を認めた。

## 2 体表温センサ解析(図3)

体表温センサのデータから算出した午前10時の推定直腸温は、実測した直腸温とほぼ同じ値を示した。また、群導入日以降、推定直腸温は規則的な日内変動を示し、病的な発熱は検出されなかった。ただし、群導入前日に検出された発熱兆候は、センサ類の装着作業や外気温が30.5°Cであったことによる暑熱の影響であると考えられた。なお、試験中に下痢や呼吸器病等の異状を示す個体は認め

られなかった。

## 3 血液学的検査(表1)

ストレスの指標であるコルチゾールは群導入日に顕著な上昇を認めた。また、総リンパ球数は群導入前日と比較して群導入日に有意な低下を認めた。リンパ球分画については群導入前日と比較してTリンパ球(CD3陽性)の有意な低下を認めたが、Bリンパ球(CD21陽性)に大きな変動は認められなかった。Tリンパ球分画のうち、ヘルパーT細胞(CD4陽性)と細胞傷害性T細胞(CD8陽性)の有意な低下を認めた。また、群導入0~2日目にかけて好中球数、血液CL能の低下傾向を認めた。

炎症性タンパクの解析では、ハプトグロビン、Mxタンパク、SP-Aの3種ともに変動は認められなかった。

## 考察

本試験の結果、ホルター心電計により群導入した子牛の自律神経の変動を捉えることが可能であり、群導入0日目に群導入ストレスによると考えられる交感神経の緊張が検出された。同じく群導入0日目にコルチゾールの

表 1 血液学的検査結果

項目	単位	群導入後日数								
		-1	0	1	2	3	7	14	21	
コルチゾール	ng/ml	12.9±21.3	<b>44.8±50.1</b>	6.5±11.5	8.8±14.8	6.6±9.8	8.4±12.6	5.7±11.3	5.7±11.2	
総白血球数	×10 <sup>2</sup> /μl	104.2±16.5	79.1±13.5	96.4±20.0	93.4±12.5	93.4±12.5	126.9±27.4	113.5±22.4	147.5±28.6	
リンパ球	×10 <sup>2</sup> /μl	59.3±6.5 <sup>a</sup>	44.1±7.4 <sup>b</sup>	60.3±11.3	60.0±8.7	64.5±8.3	64.6±13.6	67.7±13.6	83.6±16.9	
好中球	×10 <sup>2</sup> /μl	37.1±15.6	27.3±10.1	27.2±9.7	24.3±8.9	32.8±9.2	51.1±13.4	33.9±11.6	48.0±10.9	
血液CL能	群導入前日を基準とした比	100±0.0	54.5±28.6	57.6±39.7	45.2±32.3	113.8±81.5	132.0±78.6	112.0±123.	135.5±193.!	
CD3	×10 <sup>2</sup> /μl	39.8±3.6 <sup>a</sup>	27.2±1.6 <sup>b</sup>	40.0±5.5	41.3±11.1	43.9±3.4	38.9±6.3	42.5±5.1	45.4±7.6	
CD21	×10 <sup>2</sup> /μl	13.7±5.4	11.0±4.2	13.4±5.8	12.6±3.8	14.4±5.4	16.7±6.5	17.0±7.5	23.1±9.6	
CD4	×10 <sup>2</sup> /μl	17.1±4.4 <sup>a</sup>	8.6±1.3 <sup>b</sup>	16.3±3.7	16.2±4.0	17.3±2.5	15.8±3.7	12.6±1.0	12.9±1.7	
CD8	×10 <sup>2</sup> /μl	6.1±1.6 <sup>a</sup>	4.2±0.4 <sup>b</sup>	6.3±1.1	6.6±1.8	7.2±1.0	7.8±1.8	6.4±0.7	8.3±0.8	
ハプトグロビン	μg/ml	56.9±19.2	85.8±70.9	67.5±7.4	56.4±7.2	55.5±3.5	63.1±5.4	67.4±9.3	63.1±5.8	
Mxタンパク	発現比	1.0±0.0	4.7±7.1	1.1±0.7	0.9±0.7	0.7±0.5	1.2±0.9	7.9±7.4	2.1±1.6	
S P-A	ng/ml	0.2±0.0	0.2±0.0	2.0±1.6	1.1±1.2	2.0±1.1	1.6±1.7	0.7±0.6	1.5±1.1	

数値は平均±標準誤差  
異符号間に有意差あり (P<0.05)

上昇を認めたことから、子牛は交感神経優位のストレス状態にあると考えられた。この交感神経優位なストレス状態は群導入2日目の夜間には副交感神経が優位となり安息状態へ移行したと考えられた。

体表温センサにより得られた体表温データから算出した推定直腸温は、実際に測定した直腸温の値とほぼ同じであったことから、体表温センサにより直腸温の推定が可能であると考えられた。本試験期間中、呼吸器症状などの臨床症状を呈した子牛は認められず、炎症性タンパク解析でも変動は認められなかったことから、感染症の発生はなかったと考えられた。したがって、本試験における体表温センサで捉えた規則的日内変動は正常な生理的日内変動を示していると考えられた。今回の試験では発熱性疾患は確認されず発熱の検知には至らなかった。規則的な日内変動からの逸脱を検出することで病的発熱の検知が可能であり、これまで人手を要した直腸温の測定に代わる手段として有用であると考えられた。この体表温センサを用いることで畜主が現場で長時間観察することなく疾病発生の兆熱性疾患の早期発見・早期治療による損耗防

止が期待される。

免疫指標解析では、群導入0日目に総リンパ球数の低下、特にヘルパーT細胞・細胞傷害性T細胞が低下しており、細胞性免疫が低下していると考えられた。さらに群導入から2日目にかけては好中球数の低下と血液CL能の低下といった好中球機能が低下しており、自然免疫が低下しているものと考えられた。

これらのことから、子牛は群導入後に交感神経優位のストレス状態となり、細胞性免疫や自然免疫が低下するものと考えられた。したがって、群導入直後から2日間程度は免疫が低下し感染症に罹患するリスクが上がるため、飼養管理に細心の注意を払う必要があると考えられた。

これまでも牛における暑熱・寒冷、狭飼養環境及び拘束・隔離等によるストレス応答による免疫の低下が報告されている<sup>1)</sup>が、これらのストレスをリアルタイムに客観的な評価をすることは困難であった。ホルター心電計を用いた自律神経解析により、これまでは現場で把握しきれなかったストレス状態を客観的に評価することが可能であり、経験に頼ってきた健康状態の把握やその手間の省力化

に期待を持たせる結果であった。なお、現在、農研機構畜産研究部門にて牛用のセンサを開発中である。

今回の実証試験で用いた心拍計、ホルター心電計、体表温センサは、これまで現場では把握できなかったストレス状態の指標となるデータや人手を要して測定していた直腸温をパソコンやクラウド上で確認可能であった。これらを用いることで飼養管理や健康管理の一端を代替することが可能であると考えられた。さらにストレスと免疫状態は密接に関連することからストレス状態を評価することや、疾病兆候の早期発見のために体温の変動をモニタリングすることは個体毎の精密個体管理にも有用であると考えられた。これらセンサはスマート農業の実現に向けて有効なツールであると考えられた。

最後に、本研究は、内閣府 SIP「生体センシング技術を活用した次世代精密家畜個体管理システムの開発」により実施しました。御協力いただいた農研機構動物衛生研究部門、農研機構畜産研究部門、東京大学農学部の諸先生方及び東海大学農学部の学生諸君に深謝致します。

#### 参考文献

- 1) 石崎宏:ウシの飼養環境ストレス応答と免疫状態, 家畜感染症学会誌, 1 巻 2 号, 63-70(2012)
- 2) 渡辺香穂里ら:ウシにおける覚醒・睡眠レベルと自律神経緊張度との関連, Animal Behaviour and Management, 50(3), 119-126(2014)
- 3) Muneta Y et al: Interleukin-18 expression in pig salivary glands and salivary content changes during acute immobilization stress, Stress, 14, 549-556(2011)
- 4) Ishizaki H. et al: Road transportation stress promptly increases bovine peripheral blood absolute NK cell counts and cortisol levels, J Vet Med Sci, 72, 747-753(2010)
- 5) 高橋秀之:健康牛及び乳房炎牛における血液及び乳汁化学発光能, 家畜衛生研究成果情報, 10, 3-4(1997)
- 6) 中村正明ら:ヘモグロビン結合アッセイの改良及び乳牛の分娩後における牛ハプトグロビン濃度推移, 日本獣医師会雑誌, 65, 682-688(2012)
- 7) 宮本亨:肺におけるサーファクタントプロテインの動態, 動衛研研究報告, 第 118 号, 23-26(2011)