

乾乳牛の定期的な歩行運動が心拍数、末梢血T細胞サブセット および貪食細胞機能等に及ぼす影響

石黒裕敏^{1,a,*}・沼辺 孝^{1,b}・田中沙智^{2,c}・渡邊康一²・山口高弘²・麻生 久²

¹宮城県畜産試験場, 宮城県玉造郡大崎市岩出山南沢字樋渡 1 989-6445

²東北大学大学院農学研究科 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 468-1 980-8572

現所属:^a大河原家畜保健衛生所, 宮城県柴田郡大河原町字南 129-1 989-1243

^b公益社団法人みやぎ農業振興公社, 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 4-17 981-0914

^c信州大学農学部 長野県上伊那郡南箕輪村 8304 399-4598

2019年3月11日受付, 2019年7月4日受理

要約

歩行運動が末梢血のT細胞サブセットおよび貪食細胞など免疫機能に及ぼす影響を調査するため、繋養したホルスタイン種乾乳牛6頭を用いて実験を行った。実験は歩行区ではラウンダーを用いて、速度31.5m/分で1日当たり32分の歩行運動を1週間に5日の頻度で7週間継続して行い、また歩行を行わない対照区を設けた。そして歩行開始日(0週)、歩行開始1週後(1週)、4週後(4週)および7週後(7週;分娩予定1週前)の各期間において、それぞれの運動時心拍数と運動前(Pre)および運動終了2時間後(Post)の末梢血中のT細胞サブセットほか免疫機能等の動態を調査した。

歩行運動時の心拍数は、0週に比べ4週で有意($P < 0.05$)に減少した。末梢血の白血球数は7週で対照区に比べ歩行区の方が多い傾向($P < 0.1$)にあったが、その他の赤血球(RBC)数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット(Ht)値、白血球化学発光能(CL値)、血漿免疫グロブリン(Ig)G, IgA, IgM、コルチゾール濃度およびT細胞サブセットの各細胞数は、0週から7週の各期間において、対照区と歩行区の間には有意な差はなかった。ただし、末梢血 $CD4^+$ T細胞数は、歩行区において0週に比べ7週で有意($P < 0.05$)に多かった。

歩行運動開始前後の比較では、RBC数は1週において、Preに比べPostで減少傾向($P < 0.1$)を示し、Ht値は同様に有意($P < 0.05$)に低下した。末梢血CL値は、7週ではPreに比べPostで上昇傾向($P < 0.1$)を示した。白血球に占めるT細胞の割合は、1週においてPreに比べPostで有意($P < 0.05$)に増加し、また4週においては同様に増加傾向($P < 0.1$)を示した。一方で白血球に占めるB細胞の割合は、4週において逆に減少傾向($P < 0.1$)を示した。そして、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $\gamma\delta$ および $WC1^+\gamma\delta$ T細胞の各細胞数は、0週から7週の各期間において、Preに比べPostでそれぞれ有意($P < 0.05$)に増加、もしくは有意ではない場合も多かった。

これらの結果から、乾乳牛の歩行運動は、その運動継続期間が長くなると運動時の心拍数の上昇は抑制されること、また白血球中のT細胞割合や多くのT細胞サブセット細胞数は、歩行運動前に比べ歩行運動終了後で一時的に増加することが明らかとなった。

キーワード：運動、乾乳牛、T細胞サブセット、化学発光能、貪食細胞機能

東北畜産学会報 69(3): 18 ~ 32 2020

* 連絡者：石黒 裕敏 (いしぐろ ひろとし)
Fax : 0224-52-1392
E-mail : ishiguro-hi656@pref.miyagi.lg.jp

緒言

歩行運動と免疫に関する研究は、ヒトにおいて運動によるインターフェロン- γ (IFN- γ) などサイトカインの亢進、ナチュラルキラー (NK) 細胞の活性化、リンパ球幼若化反応の亢進などが示され、運動と免疫機能の関係が解明されてきている (Simpson ら, 2015; Sinkai ら, 1998)。また運動と疫学に関する研究では、中程度の強度のトレーニングは上気道炎の発生を減少させる (山崎, 1998)、12 ヶ月間の中程度の強度のウエイトトレーニングやエアロビクス運動などは、高齢者の唾液分泌型免疫グロブリン A の分泌量を増加させる (Akimoto ら, 2003)、また 10 週間にわたる中程度の強度の歩行運動などは潰瘍性大腸炎患者の炎症に改善がみられる (Elsenbruch ら, 2005) といった健康面や医療分野で良い報告もある。しかし、ウシの運動においては、インスリン抵抗性 (Aoki ら, 2007)、乳酸 (Davidson と Beede, 2003; 石黒と木船, 2006) およびホルモン濃度 (Arave ら, 1987) など血液性状に関する報告はあるものの、免疫に関する報告は少なく、歩行運動は末梢血貪食細胞の活性酸素産生能を亢進させる (石黒と沼辺, 2010)。また登坂歩行を取り入れた負荷の強い歩行運動では、逆に末梢血貪食細胞機能や単核球のサイトカイン産生能を抑制する (石崎, 2010) といった報告もあり、運動と免疫機能の関係についてはさらなる研究が望まれる。そこで本研究では、疾病予防に対する運動取り入れ技術の確立に向けて基礎的知見を得るため、有酸素的なエネルギー供給が主体である歩行速度 (石黒と木船, 2006) において、継続した定期的なウシの歩行運動が末梢血 T 細胞サブセットほか免疫機能等に及ぼす影響について検討した。

材料および方法

本研究における動物実験は、宮城県畜産試験場の試験研究設計会議の承認を得て飼養管理規程に従い実施した。供試牛は、宮城県畜産試験場で繋養管理されているホルスタイン種のいずれも分娩予定日の 60 日前に乾乳した妊娠乾乳牛 6 頭を用い、歩行区および対照区に各 3 頭ずつ配置した。実験開始時の供試牛の年齢、産次数、ボディコンディションスコア (BCS) および体重の平均 \pm 標準偏差は、歩行区が 3.5 ± 0.5 歳、 1.3 ± 0.6 産、 3.5 ± 0.0 および 680 ± 16 kg、対照区が 4.1 ± 0.9 歳、 1.3 ± 0.6 産、 3.75 ± 0.25 および 718 ± 16 kg であった。また、歩行時の気温は同様に $13.2 \pm 3.2^\circ\text{C}$ であった。なお、BCS 調査

は Furguson ら (1994) の方法を用いた。

飼料は 1 日 1 頭当たり、配合飼料、圧ペントウモロコシ、アルファルファハイキューブおよびオーチャードグラスのラップサイレージを乾物重量割合で順に 5%、10%、2% および 83% を、また分娩予定日の 3 週間からは同様の飼料を順に 13%、8.5%、4.5% および 68.3% と、これらに加えトウモロコシサイレージを 5.7% 給与した。そして、これらの給与飼料は日本飼養標準 (農林水産省農林水産技術会議事務局, 2006) により、可消化エネルギー総量 (TDN) を 100% に充足させた。

歩行運動は石黒と木船 (2006) の方法に準じて行った。すなわち、供試牛に心拍計を朝の給餌前に装着し、その後繋ぎで 20 分以上安静にさせた後、インバーターを取り付けたラウンダーを用い、周波数で回転速度を 31.5 m/分の歩行速度に設定し、32 分間 / 日の歩行運動を 1 週間に 5 日の頻度で、乾乳開始後から分娩予定日の 1 週間まで行った。心拍数の測定および採血は気象の影響をできる限り少なくするため、雨天や強風時を避け、気温は 15°C 前後で行った。

馴致と調教は、石黒と木船 (2006) の方法で行い、十分な予備試験を行った後、本試験へ移行し、必要以上の負荷をかけないように動物倫理に配慮した。心拍数は、心尖部-左肩甲骨後縁上部の電極装着部位による誘導法により、石黒と木船 (2006) の方法で測定した。すなわち、歩行運動中の心拍数を 10 秒単位で測定し、測定値は連続する 6 回の心拍数を合計して 1 分単位で解析した。

採血は、歩行区では歩行運動開始日 (0 週)、歩行運動開始から 1 週後 (1 週)、4 週後 (4 週) および 7 週後 (7 週; 分娩予定 1 週前) において、歩行運動前の繋ぎ安静時 (Pre) および歩行運動終了 2 時間後 (Post) の各期間にそれぞれ 1 回、採血管で頸静脈より行い、採血量は 1 回あたり 32 mL とした。また歩行運動を行わない対照区では、歩行区と同じ週頻度で 1 日の同時刻の繋ぎ安静時に行った。これらの血液サンプルにおいて、ヘマトクリット (Ht) 値は直ちに Ht 毛細管 (テルモ株式会社, 東京) で、赤血球 (RBC) 数、白血球 (WBC) 数およびヘモグロビン (HGB) 濃度はセルタック血球計数器 (日本光電工業株式会社, 東京) で測定した。コルチゾール (Cort) 濃度は凍結融解後の血漿を EIA キット (Oxford Biomedical Research, Oxford, MI, USA) を用いてエライザ法で、免疫グロブリン (Ig)G、IgA および IgM 濃度はエコスチェック (株式会社メタボリックエコシステム, 宮城) を用いて免疫拡散法で、末梢血の白血球化学発光能 (Chemiluminescence; CL 値) は、微弱発光測定装置テトラライト (株式会社トッケン, 千葉) を用いて、白血球貪食細胞によるザイモザン貪食時の単位時

間あたりの化学発光量を高橋 (1997) の方法で測定した。

白血球および末梢血リンパ球の分離は, Tanaka ら (2008a) の方法を用いた。フローサイトメトリーは, 表 1 に示した T 細胞表面抗原の CD3, CD4, CD8, TCR1-N24 および WC1-N1 に対するモノクローナル抗体である一次抗体, そしてこれらの免疫グロブリンアイソタイプと特異的反応を示す二次抗体を用いた。またフローサイトメトリーのための免疫染色および解析は, Tanaka ら (2008a) の方法で行い, 白血球に占める顆粒球, 単球, B 細胞および T 細胞の割合, T 細胞 (CD3⁺ 細胞) に占める CD4⁺, CD8⁺, $\gamma\delta$, CD8⁺ $\gamma\delta$ および WC1⁺ $\gamma\delta$ の T 細胞サブセットの割合を決定した。そして, T 細胞サブセットの細胞数は, 血球計数器で測定した白血球数に T 細胞割合を乗じて得た T 細胞数に対し, さらにそれぞれの T 細胞サブセット割合を乗じて算出した。ただし, ここでの対照区における 7 週の一部データについては, フローサイトメトリー機器の故障により測定不能となり欠損したため, 0 週, 1 週および 4 週のみとした。

統計処理は SAS (1988) を利用し, 心拍数は一元配置分散分析を, 各血球数および血液成分値において, データに欠損のない場合は二元配置の分散分析を, ある場合は一元配置の分散分析を行い, 有意であったものについて歩行区と対照区の差は, 対応のない Student の T 検定を, 0 週, 1 週, 4 週および 7 週の期間の差は Scheffé 検定を行った。また歩行区の各週それぞれの Pre と Post の差は, 対応のある Student の T 検定を行った。

結果

1. 歩行運動における心拍数の推移

図 1 には 0 週から 7 週の各歩行運動期間における歩行運動前の安静時と歩行運動時の心拍数の平均値および標準偏差を示した。心拍数は, 0 週, 1 週, 4 週および 7 週の各期間では, 歩行運動前が順に 69, 65, 66 および 74 拍/分, 歩行運動時が順に 110, 96, 83 および 95 拍

Table 1. Primary antibodies used for immunostaining of bovine blood cells

Specificity	mAb/clone	Isotype	Cell types
Granulocytes	MM20A	IgG1	Granulocytes
CD3	MM1A	IgG1	Pan T cells
MHC class II	TH14B	IgG2a	Monocytes, B cells
CD14	CAM36	IgG1	Monocytes
CD4	ILA11A	IgG2a	T cells helper
CD8	BAQ111A	IgM	T cells cytotoxic
TCR1-N24	GB21A	IgG2b	$\gamma\delta$ T cells
WC1-N1	B7A1	IgM	WC1 ⁺ T cells

mAb: monoclonal antibody, MHC: major histocompatibility complex.

/分となり, 歩行運動前に比べ歩行運動時でいずれも有意 ($P < 0.05$) に高かった。また各期間における歩行運動時の心拍数は, 0 週に比べ 4 週では有意 ($P < 0.05$) に低くなり, 7 週ではこの 4 週に比べて逆にやや高くなった。なお, 対照区における安静時の心拍数の平均値は 79 拍/分であった。

2. 歩行運動期間における末梢血中の白血球数, 赤血球数, ヘモグロビン濃度, ヘマトクリット値, CL 値, 免疫グロブリン濃度およびコルチゾール濃度の推移

表 2 には 0 週から 7 週の各歩行運動期間において, 対照区および歩行区の末梢血中の WBC 数, RBC 数, HGB 濃度, Ht 値, CL 値, IgG, IgA, IgM および Cort 濃度の平均値と標準偏差を示し, 歩行運動期間と処理区の要因で二元配置の分散分析結果を示した。WBC 数は対照区と歩行区の処理区間に有意性 ($P < 0.05$) を示し, 7 週では対照区に比べて歩行区の方が多い傾向 ($P < 0.1$) を示した。しかし, その他の歩行運動期間や処理区には有意性がなく, これらの交互作用もなかった。また, RBC 数, HGB 濃度, Ht 値, CL 値, IgG, IgA, IgM および Cort 濃度については, すべて有意性がなかった。

3. 歩行運動期間における末梢血中の各白血球細胞の推移

表 3 には 0 週から 7 週の各歩行運動期間における対照

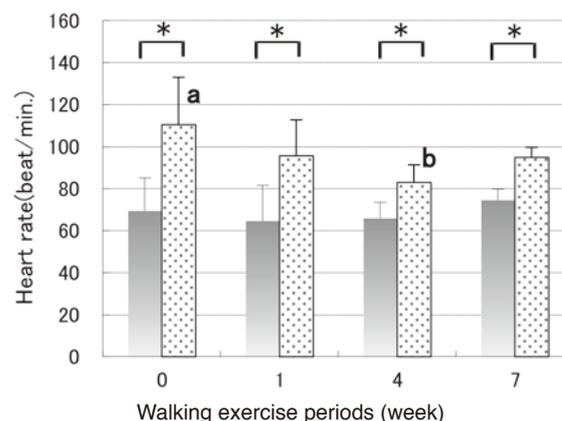


Figure 1. Heart rates during walking exercise

Values represent means \pm standard deviation, and bars with a and b are significantly ($P < 0.05$) different within the during walking exercise group.

* : Means for Pre and the during walking exercise within each walking exercise periods are significantly different ($P < 0.05$).

Walking exercise periods : Walking exercise of 32 minutes at 31.5 m/min with a rounder during 0 (started day of the walking exercise) - 7 weeks period.

■ Pre : The pre-exercise period just before the walking exercise.
 ▨ The during walking exercise of 32 minutes at 31.5 m/min.

Table 2. Changes of blood characteristic at control and exercise on the walking exercise periods

Item	Treatments	Walking exercise periods, week				Significance		
		0	1	4	7	T	W	T×W
White blood cell, ×10 ² /μL	Control	89±21	87±21	84±18	90±17	*	n.s.	n.s.
	Exercise	89±27	100±28	97±35	104±13 ⁺			
Red blood cell, ×10 ² /μL	Control	624±59	642±48	622±31	643±48	n.s.	n.s.	n.s.
	Exercise	654±109	635±41	661±55	621±42			
Hemoglobin, g/dL	Control	11.1±1.1	11.5±0.7	11.2±0.6	11.4±0.6	n.s.	n.s.	n.s.
	Exercise	11.0±0.9	11.3±0.4	11.6±0.7	11.2±0.3			
Hematocrit, %	Control	32.5±3.0	33.2±1.6	32.5±3.1	33.5±3.3	n.s.	n.s.	n.s.
	Exercise	32.3±3.8	33.5±1.5	34.0±1.7	32.2±1.9			
Blood CL	Control	8.13±5.29	15.40±5.78	10.80±4.39	11.10±2.04	n.s.	n.s.	n.s.
	Exercise	16.25±15.90	24.24±17.00	9.96±7.74	6.21±5.35			
IgA, mg/ml	Control	0.42±0.14	0.41±0.17	0.38±0.09	0.31±0.23	n.s.	n.s.	n.s.
	Exercise	0.31±0.13	0.40±0.12	0.32±0.08	0.27±0.10			
IgM, mg/ml	Control	1.60±1.39	2.15±1.25	2.52±2.50	1.45±1.21	n.s.	n.s.	n.s.
	Exercise	1.90±1.03	2.50±0.88	2.57±1.19	1.83±0.91			
IgG, mg/ml	Control	21.0±6.9	21.4±5.4	22.0±9.5	22.5±6.2	n.s.	n.s.	n.s.
	Exercise	19.3±7.4	23.5±5.3	18.6±7.0	19.3±8.9			
Cortisol, mmol/L	Control	3.71±2.88	5.55±3.65	4.73±3.79	1.32±0.58	n.s.	n.s.	n.s.
	Exercise	1.74±1.39	4.41±3.30	4.63±4.16	3.25±4.42			

Values represent means ± standard deviation.

* : Significance (P < 0.05). n.s. : Not significant.

⁺ : Means with plus are tendency different (P < 0.1) between control group and exercise group within each walking exercise periods.

T : Treatments of control group and exercise group.

W : Walking exercise periods (0, 1, 4 and 7 week) .

Walking exercise periods : Walking exercise of 32 minutes at 31.5 m/min with a rounder during 0 (started day of the walking exercise) - 7 week periods.

Control : The non-exercise group, Exercise : The walking exercise group (the pre-exercise period just before the walking exercise).

Blood CL : Blood chemiluminescence activity (CL ; total photon counts / 20 min).

Table 3. Changes in the percentages of granulocytes, monocytes, T cells and B cells in white blood cell at control and exercise on walking exercise periods

Cell	Treatments	Walking exercise periods, week			
		0	1	4	7
Granulocytes, %	Control	24.6±1.7a	37.2±12.3ab	39.5±10.4b*	—
	Exercise	24.5±3.8	25.1±9.2	22.9±2.9	26.7±10.3
Monocytes, %	Control	4.4±1.2	7.4±4.6	6.5±2.9	—
	Exercise	5.3±3.7	4.6±1.7	6.2±4.2	9.1±8.1
T cell, %	Control	15.9±9.7	15.1±6.2	17.0±10.6	—
	Exercise	13.3±5.5	12.0±4.8	15.0±5.4	10.3±4.2
B cell, %	Control	55.2±12.3	40.3±21.3	37.0±23.1	—
	Exercise	56.9±12.5	58.4±15.6	55.9±11.0	54.0±20.4

Values represent means ± standard deviation.

a, b : Means with different letters are significantly (P < 0.05) different within each group.

* : Means with asterisk are significantly (P < 0.05) different between control group and exercise group within each walking exercise periods.

Walking exercise periods : Walking exercise of 32 minutes at 31.5 m/min with a rounder during 0 (started day of the walking exercise) - 7 weeks period.

Control : The non-exercise group, Exercise : The walking exercise group (the pre-exercise period just before the walking exercise).

区と歩行区の末梢血中の各白血球細胞割合の平均値と標準偏差を示した。CD14⁺細胞（単球）、CD3⁺細胞およびB細胞（MHC class II⁺細胞とCD14⁺細胞の差）の割合は、各区それぞれの0週から7週の間に有意な変化はなく、対照区と歩行区の間にも有意差はなかった。一方、Granulocytes⁺細胞（顆粒球）割合は、歩行区では0週から7週の各期間に有意な変化はなかったが、対照区では0週、1週および4週が順に24.6%、37.2%および39.5%となり、0週に比べ4週では有意（P < 0.05）に増加した。またこの4週は、歩行区に比べ対照区で有意（P < 0.05）に高かった。

4. 歩行運動期間における末梢血T細胞サブセットの推移

表4には0週から7週の各歩行運動期間における対照区と歩行区の末梢血T細胞サブセットの平均値と標準偏差を示した。CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、CD8⁺ $\gamma\delta$ T細胞、WC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞の各細胞数およびCD4⁺/CD8⁺T細胞比は、対照区と歩行区の間にも有意差はなかった。CD4⁺T細胞数は、歩行区において0週に比べ7週で有意（P < 0.05）に高かった。CD4⁺/CD8⁺T細胞比は、対照区では0週、1週および4週において一定の変化はみられなかったが、歩行区では0週、1週、4週および7週が順に1.11、1.34、1.56および1.75となり、0週に比べ7週で有意（P < 0.05）に高く、歩行運動期間が長くなるにつれて徐々に高くなった。

5. 歩行運動前後における末梢血中の白血球数、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、CL値、免疫グロブリン濃度およびコルチゾール濃度の推移

図2には、PreとPostの歩行運動前後における末梢血中のWBC数、RBC数、HGB濃度、Ht値、CL値、IgG、IgM、IgA濃度およびCort濃度の平均値と標準偏差を示した。またPreとPostの歩行運動前後と歩行運動期間の要因による二元配置の分散分析を行った。この二元配置の分散分析結果は、歩行運動前後でRBC数、Ht値およびCL値に有意性（P < 0.05）がみられたが、歩行運動期間に有意性はなく、これらの交互作用もなかった。WBC数は、0週から7週のそれぞれPreとPostの間に有意な変化はみられなかった。RBC数およびHGB濃度は、0週から7週の各期間にそれぞれ有意な変化はなかったが、RBC数は、1週でPreが635×10⁴個/μL、Postが587×10⁴個/μLとなり、Preに比べPostで減少傾向（P < 0.1）を示した。Ht値は0週および1週ではPreが32%および34%、Postが両者で31%となり、Preに比べPostが前者で低下傾向（P < 0.1）を、後者で有意（P < 0.05）に低下した。末梢血CL値は、0週、1週および4週では有意な変化はなかったが、7週ではPreが6.21×10⁶CPM、Postが12.5×10⁶CPMとなりPreに比べPostで上昇する傾向（P < 0.1）を示した。血漿IgA、IgM、IgG濃度および血漿Cort濃度は、0週から7週の各期間で、それぞれPreとPostの間に有意な変化はなかった。

Table 4. Changes of T cell subsets number in peripheral blood at control and exercise on the walking exercise periods

Cell	Treatments	Walking exercise periods, week			
		0	1	4	7
CD4, ×10 ³ /μL	Control	10.70±5.61	8.3±5.80	11.55±6.98	—
	Exercise	5.77±3.01a	6.63±2.16ab	9.50±1.57ab	10.07±6.61b
CD8, ×10 ³ /μL	Control	10.42±10.62	12.52±16.01	10.09±10.95	—
	Exercise	4.94±1.40	5.02±1.11	6.26±2.03	5.37±2.70
$\gamma\delta$, ×10 ³ /μL	Control	3.71±1.75	2.73±1.68	3.56±2.97	—
	Exercise	3.23±2.28	3.49±1.95	3.84±1.72	4.38±3.77
CD8+ $\gamma\delta$, ×10 ³ /μL	Control	0.95±0.57	0.91±0.75	0.81±0.54	—
	Exercise	1.16±0.85	1.27±1.22	1.28±0.57	1.20±1.26
WC1+ $\gamma\delta$, ×10 ³ /μL	Control	1.95±0.83	1.11±0.64	1.84±1.60	—
	Exercise	1.32±0.57	1.40±0.45	1.28±0.66	1.73±1.39
CD4/CD8, Rate	Control	1.83±1.86	1.20±1.04	1.89±1.38	—
	Exercise	1.11±0.36a	1.34±0.47ab	1.56±0.22ab	1.75±0.37b

Values represent means ± standard deviation.

a, b : Means with different letters are significantly (P<0.05) different within each group.

Walking exercise periods : Walking exercise of 32 minutes at 31.5 m/min with a rounder during 0 (started day of the walking exercise) - 7 weeks period.

Control : The non-exercise group, Exercise : The walking exercise group (the pre-exercise period just before the walking exercise).

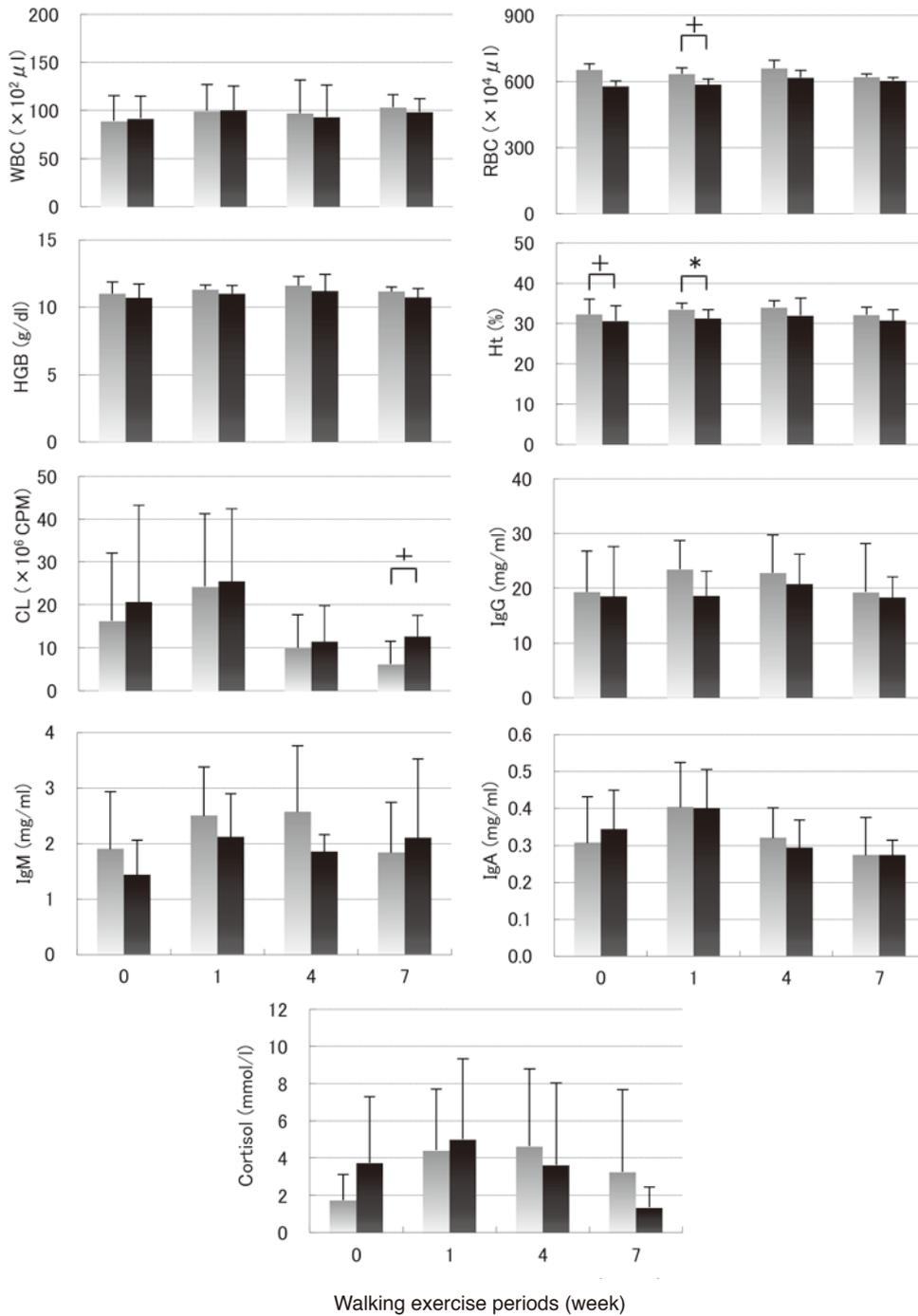


Figure 2. Changes in the number of white and red blood cells, hemoglobin concentrations, hematocrit values, blood chemiluminescence activity, plasma immunoglobulin G, A, and M levels and plasma cortisol levels at Pre and Post on each walking exercise periods

Values represent means \pm standard deviation. n.s. : Not significant.

* : Means for Pre and Post within each walking exercise periods are significantly different ($P < 0.05$).

+ : Means for Pre and Post within each walking exercise periods are tendency different ($P < 0.1$).

Walking exercise periods : Walking exercise of 32 minutes at 31.5 m/min with a rounder during 0 (started day of the walking exercise) - 7 weeks period.

■ Pre : The pre-exercise period just before the walking exercise.

■ Post : The period 2 h after walking exercise of 32 minutes at 31.5 m/min.

CL : Blood chemiluminescence activity (CL ; total photon counts / 20 min).

6. 歩行運動前後における末梢血中の各白血球細胞の推移

図3にはPreとPostの歩行運動前後における末梢血中の各白血球細胞割合の平均値と標準偏差を示した。顆粒球および単球の割合はPreとPostの間に有意な変化はなかった。T細胞割合は、1週ではPreが12.0%、Postが14.1%となり、Preに比べPostで有意($P < 0.05$)に増加し、4週ではPreが15.0%、Postが17.6%となり、Preに比べPostで増加傾向($P < 0.1$)を示した。B細胞割合は、4週ではPreが55.9%、Postが52.6%となり、Preに比べPostで減少傾向($P < 0.1$)を示した。

7. 歩行運動前後における末梢血T細胞サブセットの推移

図4にはPreとPostの歩行運動前後における末梢血T細胞サブセット、すなわち $CD4^+$ T細胞、 $CD8^+$ T細胞、 $\gamma\delta^+$ T細胞、 $CD8^+\gamma\delta^+$ T細胞、 $WC1^+\gamma\delta^+$ T細胞の各細胞数および $CD4^+/CD8^+$ T細胞比の平均値と標準偏差を示した。また、図5にはフローサイトメトリー分析において、白血球中の $CD3^+$ 細胞のヒストグラムを示し、リンパ球ゲート内の $CD3^+$ 細胞と $CD4^+$ T細胞の関係を散布図で示した。 $CD4^+$ T細胞数は、0週、1週および7週でそれぞれPreに比べPostで増加傾向($P < 0.1$)を

示し、4週ではPreが 9.50×10^2 個/ μL 、Postが 11.1×10^2 個/ μL となり、Preに比べPostで有意($P < 0.01$)に増加した。またPreおよびPostにおいて、両者とも0週に比べ4週で有意($P < 0.05$)に増加した。 $CD8^+$ T細胞数は、0週および7週ではPreに比べPostでそれぞれ増加傾向($P < 0.1$)を示した。 $\gamma\delta^+$ T細胞数は、0週ではPreが 3.23×10^2 個/ μL 、Postが 4.77×10^2 個/ μL 、4週ではPreが 3.84×10^2 個/ μL 、Postが 5.19×10^2 個/ μL となり、いずれもPreに比べPostで有意($P < 0.05$)に増加し、また1週ではPreに比べPostで増加傾向($P < 0.1$)を示した。 $CD8^+\gamma\delta^+$ T細胞数は、PreとPostの間に有意な変化はなかった。 $WC1^+\gamma\delta^+$ T細胞数は、0週ではPreが 1.32×10^2 個/ μL 、Postが 2.05×10^2 個/ μL 、4週ではPreが 1.28×10^2 個/ μL 、Postが 2.43×10^2 個/ μL となり、いずれもPreに比べPostで有意($P < 0.05$)に増加した。 $CD4^+/CD8^+$ T細胞比は、0週、1週、4週および7週でそれぞれPreとPost間に有意差はなかった。またPreにおいては0週に比べ7週で、Postにおいては0週に比べ1週でそれぞれ有意($P < 0.05$)に高かった。

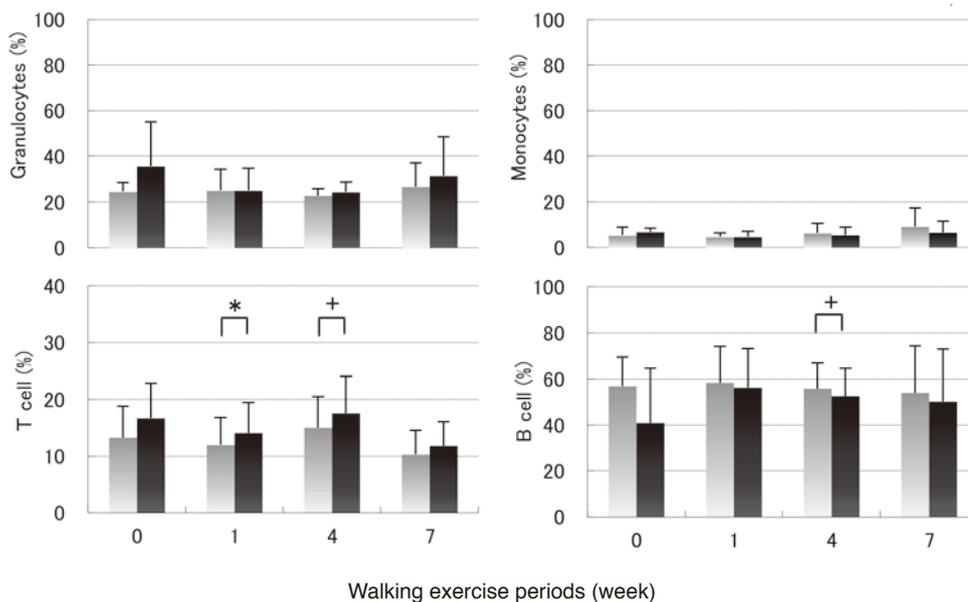


Figure 3. Changes in the percentages of granulocytes, monocytes, T cells and B cells in white blood cell at Pre and Post on each walking exercise periods

Values represent means \pm standard deviation.

*: Means for Pre and Post within each walking exercise periods are significantly different ($P < 0.05$).

+: Means for Pre and Post within each walking exercise periods are tendency different ($P < 0.1$).

Walking exercise periods: Walking exercise of 32 minutes at 31.5 m/min with a rounder during 0 (started day of the walking exercise) - 7 weeks period.

□ Pre: The pre-exercise period just before the walking exercise.

■ Post: The period 2 h after walking exercise of 32 minutes at 31.5 m/min.

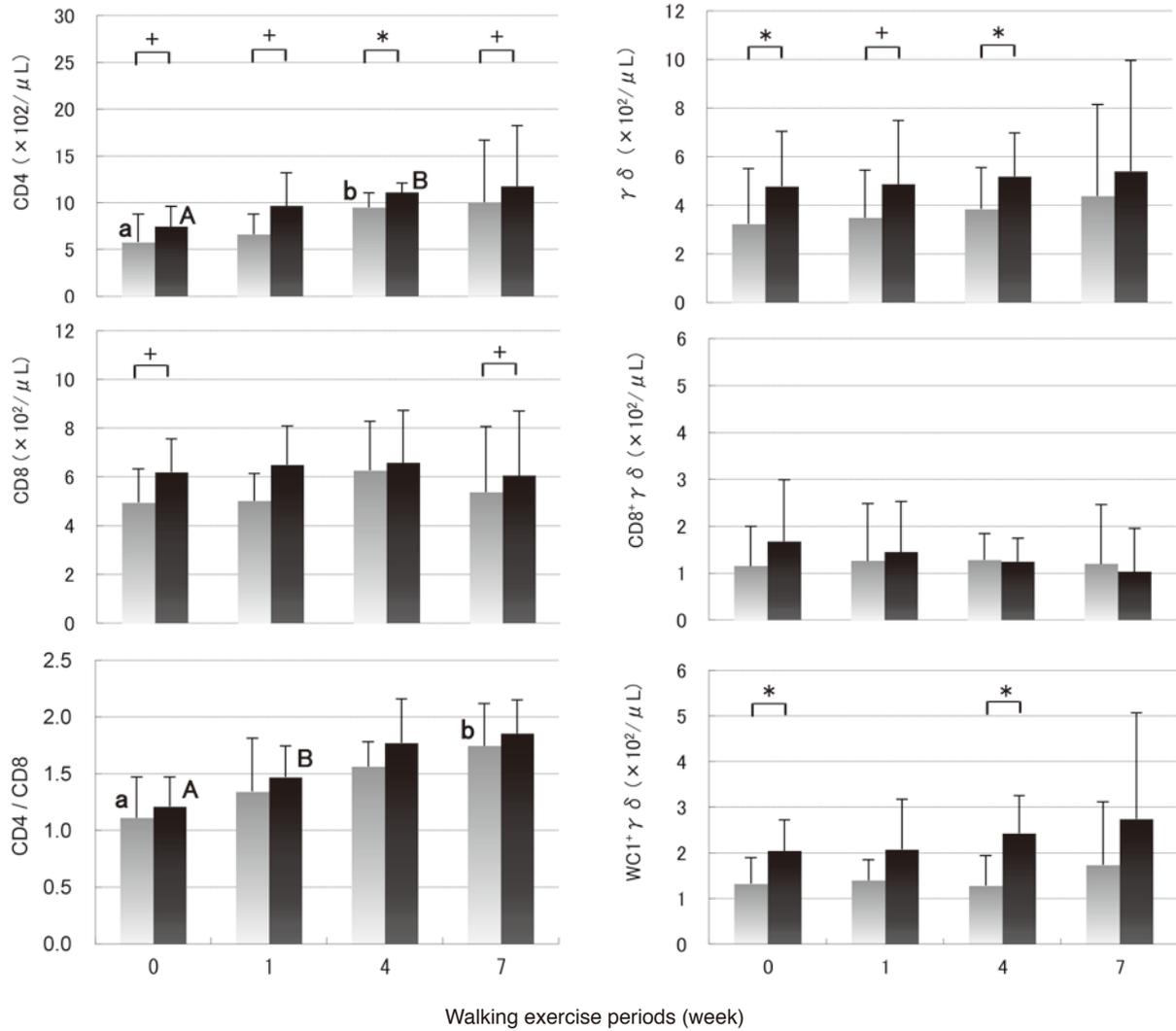


Figure 4. Changes of T cell subsets number in peripheral blood at Pre and Post on each walking exercise periods

Values represent means \pm standard deviation and bars with a, b or A, B are significantly ($P < 0.05$) different within the each groups of Pre or Post.

* : Means for Pre and Post within each walking exercise periods are significantly different ($P < 0.05$).

+ : Means for Pre and Post within each walking exercise periods are tendency different ($P < 0.1$).

Walking exercise periods : Walking exercise of 32 minutes at 31.5 m/min with a rounder during 0 (started day of the walking exercise) - 7 weeks period.

■ Pre : The pre-exercise period just before the walking exercise.

■ Post : The period 2h after walking exercise of 32 minutes at 31.5 m/min.

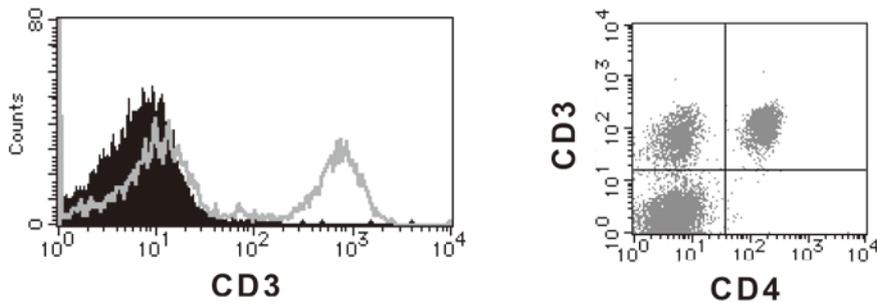


Figure 5. Flow cytometric analysis for the proportions of CD3⁺ cell in leukocytes and CD4⁺ T cell in T cell subsets. The solid line represents the leukocyte stained with anti-CD3 antibody (CD3⁺ cells or T cells). The histogram shaded black is negative control which is stained with only secondary antibodies. Dual-color flow cytometry for T cell subsets stained with anti-CD3 (CD3⁺ cell) and anti-CD4 (CD4⁺ T cell) antibodies.

考 察

ウシの歩行・走行速度と血中乳酸濃度の関係について、我々は「乳酸性閾値」Lactate Threshold (LT 値) および「乳酸蓄積開始点」Onset of blood lactate accumulation (OBLA 値) はそれぞれ 49.8 m/分および 139.5 m/分の速度であると報告した (石黒と木船, 2006)。今回の実験はこの結果をもとに、乳酸蓄積がみられない LT 値以下の歩行速度 31.5 m/分において、継続した定期的な歩行運動が T 細胞サブセットなど免疫機能に及ぼす影響について検討したものである。

歩行運動と心拍数の関係において、ウシのトレッドミルによる歩行運動は、その継続期間が長くなるにつれて歩行時の心拍数は低く抑えられることが報告されている (Davidson と Beede, 2003)。また久保 (1990) は、競走馬における 2 ヶ月間の走行トレーニングにおいて、このトレーニング期間が長くなると、走行時の心拍数は低くなることを報告している。本実験の歩行運動時の心拍数においても、0 週に比べ 4 週で有意に低下しており、同様な結果と考えられる。しかし、7 週では逆に 4 週に比べて増加した。このことは、7 週が分娩予定日の 1 週間前であったため、実験開始時に比べて体重および BCS が平均でそれぞれ 55 kg および 0.17 増加したこと、また妊娠末期による乳房や腹部の張りも同時にみられたことから、歩行運動に対するこれらの負荷が歩行運動時の心拍数を増加させた可能性が考えられる。

血中のリンパ球数は、ヒトにおいてジムフィットネス、短距離走、マラソンおよびアメリカンフットボールなどの強度の高い運動中に増加するが、運動終了後には逆に減少することが報告されている (Pedersen と Hoffman, 2000)。本実験のリンパ球 T 細胞数と B 細胞数の合計は、歩行運動前後で 0 週, 1 週, 4 週, 7 週の Pre が順に 91, 82, 105, $69 \times 10^2 / \mu\text{L}$, Post が順に 99, 88, 112, $75 \times 10^2 / \mu\text{L}$ と、後者でいずれも増加し逆の結果となった。このことは我々の同様の歩行運動実験と一致した結果であり (石黒と沼辺, 2010)、本実験の歩行運動が高い強度ではなかったことが要因として考えられる。また、本実験の顆粒球割合は、0 週から 7 週において Pre と Post の間に有意差はなかった。一般に、血中の好中球割合はヒトにおいて運動時に増加し、運動終了後も増加し続けることが報告されている (Mccarthy と Dale, 1998)。また我々はウシにおいて、末梢血好中球数は歩行・走行運動の終了直後およびその終了 2 時間後に増加することを報告している (石黒と沼辺, 2010) が、本実験では有意な差はみられなかった。このことは、0 週では個

体差の影響が大きかったこと、また、1 週および 4 週では歩行運動時の心拍数の上昇が低く抑えられていたことから、心肺機能の向上や歩行運動に対する慣れが交感神経系の刺激を減少させ、細胞受容体への影響を少なくした可能性が要因の一つとして考えられるが、これらのことはさらに実験頭数を増やして証明する必要がある。

各リンパ球細胞の血中濃度は、ヒトにおいて運動時に体内の各組織から血中へ動員されることにより、それぞれ増加することが知られている (山崎, 1998)。本実験の末梢血 T 細胞割合は、0 週から 7 週において Pre に比べ Post でいずれも増加がみられ、1 週では有意 ($P < 0.05$) に増加しており、同様な結果と考えられる。一方で B 細胞割合は、4 週で逆に Pre に比べ Post で減少する傾向がみられた。ヒトにおいて Eliakim ら (1997) は、20 分間の高強度のトレッドミル走行は、この運動後の血中 B 細胞数を変化させないことを報告しているが、一方で山崎 (1998) は、エルゴメーター運動は運動時の血中 B 細胞割合を低下させることを報告している。さらに Elphick ら (2003) は、ラットにおいて 6 ~ 7 週間の自発走トレーニングは腹腔 B-1 細胞を選択的に増加させることを報告している。本実験の末梢血 B 細胞の割合は、白血球中に占める顆粒球細胞や T 細胞の割合が増える一方で、逆にその割合を減少させたものと考えられるが、この B 細胞には樹状細胞も含まれるため、この B 細胞の応答についてはさらなる検討が必要である。なお、本実験の B 細胞の割合が歩行区で高い値であったことは、WBC 数が 100×10^2 個/ μL を超え、B 細胞割合も著しく高く推移した個体が 1 頭いたため、牛白血病感染の有無は明らかではないが、この個体の影響が考えられる。

T 細胞サブセットでは、山崎 (1998) は、ヒトにおいて運動は $\text{CD}16^+$ T 細胞, $\text{CD}3^+$ T 細胞, $\text{CD}4^+$ T 細胞および $\text{CD}8^+$ T 細胞の各細胞数を増加させることを報告している。本実験のウシにおいても、 $\text{CD}4^+$ T 細胞, $\text{CD}8^+$ T 細胞, $\gamma \delta$ T 細胞および $\text{WC}1^+ \gamma \delta$ T 細胞は、順に 0 週から 7 週, 0 週と 7 週, 0 週から 4 週および 0 週と 4 週において、Pre に比べ Post で有意に増加または増加傾向を示しており、同様な結果と考えられる。 $\gamma \delta$ T 細胞はおもに胸腺でつくられ皮膚や腸管内粘膜に多く存在すること、そして $\text{WC}1^+ \gamma \delta$ T 細胞は炎症性疾患に関与し増加することが知られている (矢田, 2001)。また Wyatt ら (1994) は、ウシにおいて $\text{WC}1^+ \gamma \delta$ T 細胞は加齢とともに減少することを報告している。今回の実験では、ウシにおいて末梢血の $\gamma \delta$ T 細胞および $\text{WC}1^+ \gamma \delta$ T 細胞は、一時的に歩行運動によって増加することが明らかとなった。本実験の $\text{CD}4^+/\text{CD}8^+$ T 細胞比は、0

週から7週までPreとPostの間に有意差はなかった。ヒトにおいて運動はリンパ球の中でNK細胞を著しく増加させ、次いでキラーT細胞、ヘルパーT細胞の順に増加割合が高いこと(山崎, 1998)が知られているため、今回の結果についてはNK細胞の動態などを含め、さらに検討が必要である。

次に歩行運動の継続期間における歩行区と対照区の比較において、WBC数は対照区でほとんど変化がなかったのに対し、歩行区では0週に比べて1週から7週で、有意ではないが約9%~17%増加している。WBCに占める顆粒球、単球、リンパ球T細胞およびB細胞の割合は、歩行区で0週から7週においていずれもほとんど変化がなかったことから、各白血球数はそれぞれ同じ割合で末梢血中に増えたものと考えられる。一方、歩行運動をしていない対照区では、顆粒球割合が0週に比べ4週で有意に増加している。一般に末梢血顆粒球はストレスが加わると増加することが知られており、大塚ら(2004)は、好中球数は健康牛に比べ周産期疾病牛で増加することを報告している。本実験で用いた乾乳牛においても、泌乳期から乾乳期への飼養管理の移行によって何らかのストレスが加わり、顆粒球割合を増加させた可能性が考えられる。また歩行区ではこの顆粒球割合の増加がみられなかったことから、歩行運動がストレス低減に寄与している可能性も考えられる。T細胞サブセットでは、CD4⁺T細胞、CD8⁺T細胞、 $\gamma\delta$ T細胞、CD8⁺ $\gamma\delta$ T細胞およびWC1⁺ $\gamma\delta$ T細胞の各細胞数において、歩行区と対照区の間有意差はなかった。また両区では、それぞれ乾乳期の歩行運動期間が0週から7週へ長くなるにつれて、CD4⁺/CD8⁺T細胞比が徐々に上昇した。Parkら(1992)はウシにおいて、乾乳期のはじめより後期の方が、末梢血中のCD4⁺T細胞割合が高くなることを報告しており、本実験の結果と一致している。

血中CL値と歩行運動の関係では、我々はウシにおいて歩行・走行運動の終了直後および終了2時間後の末梢血CL値は、その運動開始前に比べてそれぞれ上昇し、運動が貪食白血球の活性酸素産生能を亢進させることを報告している(石黒と沼辺, 2010)。本実験においても、CL値は7週でPreに比べPostで上昇傾向(P < 0.1)を示しており、石黒と沼辺(2010)の報告と同様な結果と考えられる。しかし、本実験の1週および4週では、PreとPostの間にほとんど差はなく、このことは前述した顆粒球数に変化がみられなかった考察と同じように運動に対する慣れの影響が考えられる。本実験ではアドレナリン濃度は測定していないが、ヒトにおいて、アドレナリン受容体密度と運動に対する応答性には相関関係が見られ、その受容体発現量はNK細胞や好中球が高く、

次いでB細胞、CD8⁺T細胞、CD4⁺T細胞の順に高いことが示されている(野村と井澤, 2009)。そして、好中球の動員・活性化には、サイトカインの関与が示されており(Suzukiら, 2003)、Ostrowskiら(1998)はヒトにおいてマラソン後の血中TNFやIL1細胞が2倍程度に、IL6細胞が50倍以上に増加したことを報告している。また、好中球の殺菌作用には、熱ショック蛋白質(heat shock protein: HSP)72の関与も報告されている(野村と井澤, 2009)。これらのことは、ウシにおいて明らかにされていないため、細胞受容体、サイトカインおよびHSPの変化についてもさらに検討する必要がある。

免疫グロブリン濃度は、ヒトにおいて2時間の自転車エルゴメーター運動後(Mackinnonら, 1987)やウルトラマラソン終了後(Niemanら, 2006)には、唾液中のIgA濃度が低下することが報告されている。本実験のウシにおいては、IgA濃度はPreとPostの間に有意差がなかった。このことは、本実験の歩行運動は負荷強度が高くなく、液性免疫に影響しなかったと考えられた。

運動とCortの関係では、ホルスタイン種の雄子牛において、時速8.0kmの歩行運動は、歩行前に比べて血中Cort濃度を6倍以上に上昇させることが報告されている(Appleら, 2006)。しかし、馬では、副腎皮質刺激ホルモンの分泌は運動強度の増加に伴い顕著に増加するが、それに比べてCort濃度の上昇は僅かであったと報告(Nagataら, 1999)され、さらにヒトでは、血漿Cort濃度は長時間運動したときのみ上昇し、1時間の急激な運動では僅かな変化であったと報告されている(Galbo, 1983)。また我々は、ウシにおける40分間の歩行運動は、末梢血のCort濃度を上昇させないことを報告しており(石黒と沼辺, 2010)、本実験でもCort濃度は歩行運動前とその運動終了2時間後では有意な変化がなかったことから、同様な結果と考えられ、副腎皮質系のストレスがほとんどなかったものと推察される。

RBC数、HGB濃度およびHt値では、我々はウシにおいて歩行運動前に比べ、歩行運動終了直後およびその終了2時間後に減少することを報告している(石黒と沼辺, 2010)。またDavidsonとBeede(2003)はウシにおいて、トレッドミルの傾斜を1.6%~9.6%に上げ速度5km/時間で歩行させた実験で、Ht値およびHGB濃度は最大傾斜まで上昇し続け、歩行終了後には逆に低下することを報告している。本実験においても、RBC数およびHt値は、前者が1週、後者が0週と1週においてPreに比べPostで、いずれも有意に低下または低下傾向を示しており、一致した結果である。また0週から7週の歩行運動期間には、これらの有意な変化はみられなかったことから、Preに比べPostで低下したことは一

時的なものと考えられる。一般にこれらの現象は循環血液量の増加による血液希釈，足底部の反復衝撃による赤血球の破壊，血中 pH の低下および高体温による赤血球の脆弱化などが要因として考えられるが，原因は明らかではない。田中と堀（1989）はヒトにおいて，RBC 数や HGB 濃度は一過性の運動をした直後に溶血が原因で減少することを報告しており，ウシにおいて同様なことも考えられるため証明が必要である。

運動と免疫の関係は，ヒトにおいて液性免疫，マクロファージ機能，NK 細胞活性，T 細胞サブセットの体内分布および白血球表面レセプターなどの研究が報告されている（秋本ら，1998； Akimoto ら，2003； 山崎，1998）。また近年では，ウマにおいても同様の研究が行われている（Perkins と Wagner，2015）。今回の研究で得られたウシにおける末梢血の各白血球細胞，リンパ球 T 細胞サブセットおよび化学発光能の変化は，継続的な歩行運動と免疫との関係を知る上で，貴重な基礎資料となるものと思われる。これまで我々は，搾乳牛の乾乳期間におけるパドック運動は血中 CL 値を高めること（石黒と木船，2004），また別の乾乳牛を用いた研究では，分娩時の血中 CL 値の上昇割合から，分娩後の乳房炎や胎盤停滞などの周産期疾病の発生を予測できる可能性がある（未発表データ）ことなどの結果を得ており，今後は歩行運動との関連性を含めて検討したい。さらに，ヒトではマラソンランナーにおいて 3 時間のトレッドミル運動後の筋組織は，好中球および単球の浸潤とサイトカイン腫瘍壊死因子 (TNF- α)，インターロイキン (IL) -1, IL-6 および IL-8 の産生が報告されているため (Nieman ら，2003)，ウシの筋組織におけるこれらの調査も必要である。ウシにおける T 細胞サブセットの研究は，これまでサイトカインの産性 (Tanaka ら，2008b) のほか，デキサメタゾン (Menge と Dean，2008) やグルタミン酸 (Doepel ら，2006) 投与の影響，またマイコバクテリウム感染 (Albarrak ら，2018) などについても報告されている。また近年，ヒトにおいて，妊娠中に高脂肪食を摂取した母親から生まれた子供の出生直後の骨格筋では，代謝機能制御に重要な転写補助因子である PGC-1 α プロモーターはメチル化するが，母親が妊娠中に運動した子供ではメチル化が抑制される傾向，そして生後 1 年後ではこの PGC-1 α の mRNA の発現が有意に高かったことが報告されており (奥津，2014)，このことは運動の有効性において搾乳牛や繁殖雌牛での応用が期待できる。今後はウシにおいて，免疫機能に対する栄養面を含めた運動の影響と，周産期など疾病防除に対する運動の影響について，検討を進める必要がある。

謝 辞

本研究で供試した実験動物の飼養管理ならびに実験装置の設置にご協力をいただいた本試験場の門脇裕司技師，笠原義和技師ほか職員の方々に深謝いたします。

文 献

- 秋本崇之，赤間高雄，杉浦弘一，龍野美恵子，香田泰子，和久貴洋，河野一郎. 持久性ランニングによる口腔局所免疫能の変化. 体力科学，47：53-62. 1998.
- Akimoto T, Kumai Y, Akane T, Hayashi E, Murakami H, Soma R, Kuno S, Kono I. Effect of 12 months of exercise training on salivary secretory IgA levels in elderly subjects. *Br. J. Sports Med.*, 37：76-79. 2003.
- Albarrak SM, Waters WR, Stabel JR, Hostetter JM. Evaluating the cytokine profile of the WC1+ $\gamma\delta$ T cell subset in the ileum of cattle with the subclinical and clinical forms of MAP infection. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 201：26-31. 2018.
- Aoki Y, Yamada T, Nakanishi N. Effect of regular walking exercise on glucose tolerance and insulin response to i.v. glucose infusion in growing beef steers. *Anim. Sci. J.*, 78：173-179. 2007.
- Apple JK, Kegley EB, Galloway DL, Wistuba TJ, Rakes LK, Yancey JWS. Treadmill exercise in not an effective methodology for producing the dark-cutting condition in young cattle. *J. Anim. Sci.*, 84：3079-3088. 2006.
- Arave CW, Lamb RC, Walters JL. Physiological and glucocorticoid response to treadmill exercise of Holstein heifers. *J. Dairy Sci.*, 70：1289-1293. 1987.
- Davidson JA, Beede DK. A system to assess fitness of dairy cows responding to exercise training. *J. Dairy Sci.*, 86：2839-2851. 2003.
- Doepel L, Lessard M, Gagnon M, Lobley GE, Bernier JF, Dubreuil P, Lapierre H. Effect of postprandial glutamine supplementation on immune response and milk production in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 89：3107-3121. 2006.
- Eliakim A, Wolach B, Kodesh E, Gavrieli R, Radnay J, Ben-Tovim T, Yarom Y, Falk B. Cellular and humoral immune response to exercise among gymnasts and untrained girls. *Int. J. Sports Med.*, 18：208-212. 1997.
- Elphick GF, Wieseler-Frank J, Greenwood BN, Campisi J, Fleshner M. B-1 cell (CD5+/CD11b+) numbers and nlgM levels are elevated in physically active vs. sedentary rats. *J.*

- Appl. Physiol., 95 : 199-206. 2003.
- Elsenbruch S, Langhorst J, Popkirowa K, Muller T, Luedtke R, Franken U, Paul A, Spahn G, Michalsen A, Janssen OE, Schedlowski M, Dobos DJ. Effects of mind-body therapy on quality of life and neuroendocrine and cellular immune functions in patients with ulcerative colitis. *Psychother. Psychosom.*, 74 : 277-287. 2005.
- Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N. Principal descriptors of body condition score in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 77 : 2695-2703. 1994.
- Galbo H. *Hormonal and Metabolic Adaption to Exercise*. 1-117. Thieme Verlag, New York. 1983.
- 石黒裕敏, 木船厚恭. 乾乳牛のパドック管理が維持行動, 運動量, 負荷運動時の心拍数および免疫活性に及ぼす影響. *日本家畜管理学会誌*, 44 (1) : 48 - 49. 2004.
- 石黒裕敏, 木船厚恭. 乾乳牛における歩行・走行運動負荷時の心拍数および血中乳酸値. *日畜会報*, 77 : 425 - 431. 2006.
- 石黒裕敏, 沼辺孝. 乾乳牛における歩行・走行運動がストレスホルモンほか血液成分, 血球数および貪食細胞機能に及ぼす影響. *日畜会報*, 81 : 363 - 372. 2010.
- 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*, 5(2) : 47-53. 2010.
- 久保勝義. 走路における運動負荷試験. *馬の科学*, 27 : 459-470. 1990.
- Mackinnon LT, Chick TW, van As A, Tomasi TB. The effect of exercise on secretory and natural immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 216A : 869-876. 1987.
- Mccarthy DA, Dale MM. The leukocytosis of exercise. A review and model. *Sports Med.*, 6 : 333-363. 1988.
- Menge C, Dean-Nystrom EA. Dexamethasone depletes gammadelta T cells and alters the activation state and responsiveness of bovine peripheral blood lymphocyte subpopulations. *J. Dairy Sci.*, 91 : 2284-2298. 2008.
- Nagata S, Takeda F, Kurosawa M, Mima K, Hiraga A, Kai M, Taya K. Plasma adrenocorticotropin and cortisol, catecholamines response to various exercises. *Equine Vet. J. Suppl.*, 30 : 570-574. 1999.
- Nieman DC, Davis JM, Henson DA, Walberg-Rankin J, Shute M, Dumke CL, Utter AC, Vinci DM, Carson JA, Brown A, Lee WJ, McAnulty SR, McAnulty LS. Carbohydrate ingestion influences skeletal cytokine mRNA and plasma cytokine levels after 3-h run. *J. Appl. Physiol.*, 94 : 1917-1925. 2003.
- Nieman DC, Henson DA, Dumke CL, Lind RH, Shooter LR, Gross SJ. Relationship between salivary IgA secretion and upper respiratory tract infection following a 160-km race. *J. Sports Med. Phys. Fitness*, 46 : 158-162. 2006.
- 野村幸子, 井澤鉄也. 運動と内分泌系と免疫. 運動と免疫 (大野秀樹, 木崎節子編). 第1版. 129-147. (有) ナップ. 東京. 2009.
- 農林水産省農林水産技術会議事務局. 日本飼養標準・乳用牛 (2001年版). 中央畜産会. 東京. 2001.
- 大塚浩通, 小松勝一, 小岩政照, 福田茂夫, 初谷敦, 岡田啓司, 吉野知男, 川村清市. 周産期疾病発生牛群に対する免疫プロファイルテストの有用性. *日畜会報*, 75 : 37 - 44. 2004.
- 奥津光晴. 骨格筋の発育発達に対する運動の役割. *体力化学*, 63(1) : 26. 2014.
- Ostrowski K, Rohde T, Zacho M, Asp S, Pedersen BK. Evidence that interleukin-6 is produced in human skeletal muscle during prolonged running. *J. Physiol.*, 508 : 949-953. 1998.
- Park YH, Fox LK, Hamilton MJ, Davis WC. Bovine mononuclear leukocyte subpopulations in peripheral blood and mammary gland secretions during lactation. *J. Dairy Sci.*, 75 : 998-1006. 1992.
- Pedersen BK, Hoffman-Goetz L. Exercise and Immune System : Regulation, Integration, and Adaptation. *Physiol. Rev.*, 80 : 1055-1081. 2000.
- Perkins GA, Wagner B. The development of equine immunity: Current knowledge on immunology in the young horse. *Equine Vet. J.*, 47 (3) : 267-74. 2015.
- SAS. User's guide: Statistics, Version 5 edn. SAS Institute, Inc. Cary, NC. 1988.
- Simpson RJ, Kunz H, Agha N, Graff R. Exercise and the Regulation of Immune Functions. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.*, 135 : 355-380. 2015.
- Shinkai S, Watanabe S, Asai H, Shek PN. Cortisol response to exercise and post-exercise suppressin of blood lymphocyte subset counts. *Int. J. Sports Med.*, 17 : 597-603. 1996.
- Suzuki K, Nakaji S, Yamada M, Liu Q, Kurakake S, Okamura N, Kukae T, Umeda T, Sugawara K. Impact of competitive marathon race on systemic cytokine and neutrophil responses. *Med. Sci. Sports Exerc.*, 35 : 348-355. 2003.
- 高橋秀之. 免疫機能に及ぼす環境ストレスの影響と評価法. 環境ストレス低減化による高品質乳生産マニュアル (農林水産省北海道農業試験場編). 33-42. 農林水産省北海道農業試験場, 札幌. 1997.
- 田中信雄, 堀清紀. 運動による貧血に関する研究とその動向. *臨床スポーツ医学*, 6 : 473-482. 1989.
- Tanaka S, Miyazawa K, Kuwano A, Watanabe K, Ohwada

- S, Aso H, Nishida S, Yamaguchi T. Age-related changes in leukocytes and T cell subsets in peripheral blood of Japanese Black cattle. *Anim. Sci. J.*, 79 : 368-374. 2008 a.
- Tanaka S, Nagai Y, Noguchi Y, Miyake M, Watanabe K, Aso H, Yamaguchi T. Differential cytokine expression in T cell subsets from bovine peripheral blood. *Anim. Sci. J.*, 79 : 597-604. 2008 b.
- Wyatt CR, Madruga C, Cluff C, Parish S, Hamilton MJ, Goff W, Davis WC. Differential distribution of gamma delta T-cell receptor lymphocyte subpopulations in blood and spleen of young and adult cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 40 : 187-199. 1994.
- 矢田純一. T細胞の分化と機能発現. *医系免疫学*, 7 : 154-190. 2001.
- 山崎元. *運動と免疫*. 第1版. 3-28. (有)ナッパ. 東京. 1998.

The influence of regular walking exercise of dry cows on heart rate, T cell subsets in peripheral blood, phagocytic cell function and other immune functions

Hirotoishi ISHIGURO^{1,a,*}, Takashi NUMABE^{1,b}, Sachi TANAKA^{2,c}, Kouichi WATANABE²,
Takahiro YAMAGUCHI² and Hisashi ASO²

¹Miyagi Prefecture Livestock Experiment Station, Osaki, Miyagi 989-6445, Japan

²Graduate School of Agriculture, Tohoku University, Sendai, Miyagi 980-8572, Japan

Present Address: ^aOgawara Livestock Hygiene Center, Ogawara, Miyagi 989-1243, Japan

^bMiyagi Agricultural Development Corporation of General Incorporated Association, Sendai, Miyagi 981-0914, Japan

^cFaculty of Agriculture, Shinsyu University, Minamiminowa, Nagano 399-4598, Japan

*Corresponding: Hirotoishi ISHIGURO

(Fax : +81 (0) 229-72-2326, E-mail : ishiguro-hi656@pref.miyagi.lg.jp)

The purpose of this study was to investigate the effects of walking exercise on T cell subsets in peripheral blood, phagocytic cell and other immune functions. Experiments were performed with six Holstein dry cows housed in a tie stall barn. In the walking exercise group, the cows were subjected to walking exercise of 32 minutes at 31.5 m/min with a rounder on 5 days/week during 7 weeks period. The control group was to non-exercise. Heart rate, T cell subsets in peripheral blood and immune functions were measured at the pre-exercise period just before walking exercise (Pre) and the period 2 h after walking exercise (Post) during 0 week (0W ; started day of the exercise), 1 week (1W), 4 weeks (4W) and 7 weeks (7W ; 1 week before expected calving day).

Heart rate during the walking exercise decreased significantly ($P < 0.05$) at 4W than 0W. The numbers of white blood cell (WBC) showed a tendency to increase ($P < 0.1$) at the walking exercise group than the control group in 7W, but, the number of red blood cell (RBC), concentrations of hemoglobin, hematocrit (Ht), Luminol-dependent chemiluminescence activity (CL) of peripheral blood, the concentrations of plasma immune globulin (Ig) G, IgA, IgM, cortisol and the each numbers of T cell subsets were not significantly different between the walking exercise group and the control group in the each periods of 0W – 7W. However, the CD4⁺T cell number of peripheral blood elevated significantly ($P < 0.05$) at 7W than 0W in the walking exercise group.

In a comparison between Pre and Post, the number of RBC showed a tendency to decrease ($P < 0.1$) at Post than Pre, and Ht was significantly lower ($P < 0.05$) at the Post. The CL of peripheral blood in 7W showed a tendency to elevate ($P < 0.1$) at the Post than Pre. The proportion of T cell in WBC in 1W was significantly elevated ($P < 0.05$) at Post than Pre, and that in 4W showed similarly a tendency to elevate

($P < 0.1$). The other hand, the proportion of B cell in WBC in 4W showed a tendency to reduce ($P < 0.1$). The numbers of $CD4^+$, $CD8^+$, $\gamma\delta$ and $WC1^+\gamma\delta$ T cell were significantly increased ($P < 0.05$) at Post than Pre in the each periods of 0W – 7W, or those were similarly increased in case there were not the significant differences.

These results indicates that the increase of heart rates during the walking exercise of dry cow is suppressed by the long period of the regular walking exercise, and that the regular walking exercise increase the T cell proportion and the most of T cell subsets numbers temporarily at the period 2 h after walking exercise.

Key words : exercise, dry cow, T cell subset, chemiluminescence activity, phagocytic cell function