

称号及び氏名 博士(獣医学) 野田 桂

学位授与の日付 平成19年2月20日

論文名 「**Studies on polymorphonuclear cell functions of bottlenose dolphin during transportation** (輸送時におけるバンドウイルカの末梢血多形核白血球機能に関する研究)」

論文審査委員 主査 大橋 文人
副査 久保 喜平
副査 児玉 洋

論文要旨

緒言

以前からイルカは展示動物として飼育されているが、近年、その見学や触れ合いをつうじての精神的な癒し効果、あるいは動物介在療法効果が大きく注目され、今後社会におけるイルカの必要性はさらに増すと考えられる。

このようにイルカの必要性が増すにつれて、その必要個体数も当然増加する。イルカを飼育している各関連施設において、飼養環境改善・健康管理ならびに適性繁殖に努力しているが、現時点ではその繁殖効率は極めて悪く、必要個体数の確保が困難であり捕鯨による確保が必要となる。そのため、各関連施設がイルカを新規に導入する場合には捕鯨地から輸送・搬入する事が多い。

陸棲動物では、輸送は強いストレスであり、動物を疲労させ、呼吸器感染、活動低下および腸炎などの疾患リスクを増加させることが知られている。ストレスは代謝機能に変化を与える一方、免疫能にも関与しており、このような変化により感染症罹患率が増加すると考えられている。特に家畜では輸送時に *first host diffence* を担っている好中球を中心とした多形核白血球 (Polymorphonuclear cell; PMNs) の機能抑制が認められており、このような状況下では感染症の罹患率が増加する可能性が非常に高い。陸棲動物と同様に、イルカにとって輸送による極度のストレスは、免疫能の低下を誘導し、様々な感染症や、ショックの原因となり、輸送後の適切な飼育に悪影響を及ぼすと考えられる。しかし、現在、イルカにおいて輸送とそれによるストレス反応、さらにそれに関連した免疫能の変化については明らかとなっていない。

本研究では、イルカにおける輸送と免疫能との関連性について検討することを目的として、日本で広く飼育されているバンドウイルカ (*Bottlenose dolphin, Tursiops truncatus*) を対象に、輸送によるストレス反応の評価、および PMN 機能評価法の確立と輸送時における

PMN機能の変動について検討した。

第1章 バンドウイルカにおける輸送時の白血球分画、血漿コルチゾールとクロモグラニンA濃度の評価

現在、イルカにおいてストレス反応の評価法は確立されておらず、特に輸送ストレス時の変化についての報告はほとんどない。そのため、第1章では他の動物種でストレスマーカーとして用いられている、コルチゾール（視床下部-下垂体-副腎皮質（HPA）軸のマーカー）およびクロモグラニンA（CgA）（交感神経-副腎髄質（SAM）軸のマーカー）を用いてイルカにおける輸送時ストレス反応を評価した。また同時に、鯨類のストレスの指標として報告のある白血球数並びに白血球分画も測定した。すなわち、飼育下バンドウイルカ6頭を約6時間トラックで輸送し、安静時（トレーニングにより自主的に尾鰭を水面上に出した時）、輸送直前（強制的にプールから取り上げた時）、輸送直後（目的地到着時）に尾鰭より採血を行い、血漿コルチゾールおよびCgAの測定を行った。その結果、輸送前後は安静時と比較してコルチゾール、CgAともに有意に上昇した。また、白血球数および好酸球数は輸送前後において安静時の値と比較して有意に低下した。このことから、輸送はイルカのHPA軸およびSAM軸の両者を活性化すると共に、白血球数および好酸球数を減少させることが示され、陸棲哺乳類と同様に輸送がストレス反応を引き起こすことが示唆された。

第2章 バンドウイルカにおけるPMN分離方法と活性酸素産生能および貪食能測定方法の確立

生体において、感染に対する初期の防御策は自然免疫応答であり、これを担当しているPMN機能を強化または調整することで、感染症に対する抵抗力を増強することができるものと考えられる。その主な機能は活性酸素産生による殺菌能および病原体の貪食である。陸棲哺乳類ではその機能の評価法は確立されているが、鯨類における好中球機能を中心とした細胞性免疫能に関する報告はごく限られており、輸送ストレスと細胞性免疫能に関する検討はなされていない。そのため、第2章ではバンドウイルカのPMN分離方法および機能測定方法を確立するため、様々な比重の分離液を作成し末梢血液からのPMN分離と、Nitroblue tetrazolium (NBT)還元能を用いた活性酸素産生能およびラテックスビーズを用いた貪食能の測定を様々な反応時間で実施した。健康なバンドウイルカ4頭の尾鰭よりヘパリン加シリンジにて採血した後、血液を直ちに4℃以内で保存し、採血後6時間以内に実験に供した。比重1.077から1.200の分離液に重層し遠心したところ、比重1.077の分離液を用いてバフィーコート以下の上清と沈渣を溶血処理することで良好な回収率にてPMNsが得られることが判明した。また、同時にバフィーコート上の上清には末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell; PBMCs)が豊富に含まれていることが判明した。分離したPMNsの浮遊液を作成した後、PMN機能として活性酸素産生能と貪食能を測定するため、各測定方法の条件設定を行った。NBT還元能の反応時間を10から120分、貪食能の反応時間を1から18時間の範囲で検討したところ、最適反応時間はそれぞれNBT還元能試験で30分、貪食能で

12時間であった。

これらの結果より、バンドウイルカのPMNsの分離法、活性酸素産生能および貪食能の測定法を確立出来た。

第3章 バンドウイルカのPMNsに対する輸送の影響

第1章において輸送はバンドウイルカにおいてストレス反応を惹起することが示唆された。しかし、バンドウイルカでは陸棲哺乳類で報告されているような輸送と関連したPMN機能の変化は報告されていない。そこで、第3章では輸送と免疫能、特にPMN機能に及ぼす影響について検討するため、輸送時におけるPMN機能の変化を第2章で確立した方法により測定した。

飼育下バンドウイルカ6頭を6時間トラックにて輸送し、第1章と同様に安静時と輸送直前、輸送直後において尾鰭より採血を行い、第2章にて確立した方法を用いて各ステージのPMN機能として活性酸素産生能と貪食能を測定し、さらに血漿コルチゾールおよびCgAとの相関性についても検討した。その結果、NBT還元能は安静時 (0.078 ± 0.013) と比較して、輸送直前直後共に低下傾向を示した (0.047 ± 0.025 および 0.050 ± 0.016)。また、貪食能は安静時 ($58.5 \pm 6.1\%$) と比較して、輸送直前直後共に有意に低下した ($39.3 \pm 4.9\%$ および $36.8 \pm 3.2\%$, $p < 0.05$)。またこれらPMN機能の変化は、血漿コルチゾールおよびCgAと相関を示した。

このことから、輸送によるストレスはPMNsの活性酸素産生能と貪食能を共に抑制することが示唆された。

第4章 輸送時におけるバンドウイルカのPBMCsおよびPMNsのサイトカインmRNA発現量の変化

PMN機能の機能制御にはさまざまな因子が関連しており、このような因子の1つとしてサイトカインが上げられる。PMN機能に直接もしくはサイトカインネットワークを介して間接的に作用するサイトカインとして、granulocyte colony stimulating factor (G-CSF)、granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)、interleukin (IL)-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10、tumor necrosis factor α (TNF- α)、interferon- γ (IFN- γ) などが報告されている。これらのサイトカインは単球、マクロファージなどの末梢血単核球の他、内皮細胞や線維芽細胞などの間葉系細胞および好中球などによって産生されオートクリンやパラクリンによりPMNに対して作用する。その作用として、PMN接着能や走化性の増強、またPMNの活性酸素産生をプライミングもしくはトリガリングし、貪食能を活性化させることが知られている。そこで、第3章において示唆された輸送によるPMN機能抑制とサイトカインの関連について検討するため、バンドウイルカの末梢血からPMNsおよびPBMCsを分離し、これらよりtotal RNAを分離した。半定量的RT-PCR法を用いてPBMCsとPMNsそれぞれについて、輸送直前、直後におけるIL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、IFN- γ のmRNA発現量を測定した。

PMNsにおいて、IL-6とIL-8 mRNA発現量は輸送直前と比較して、有意に低下し、IFN- γ は低下する傾向を示した。輸送前後においてIL-1 β とTNF- α mRNAは変化が認められなかった。

また、PBMCsにおいてIL-1 β mRNA発現量は輸送直前と比較して有意に低下し、IL-6、IFN- γ mRNA発現量は輸送直前と比較して輸送直後に低下する傾向を示した。輸送前後においてIL-8とTNF- α 発現量は変化が認められなかった。

これらのことから、輸送時におけるPMN機能の抑制にはPBMCsから産生されるIL-1 β 、IL-6、IFN- γ およびPMNsから産生されるIL-6、IL-8、IFN- γ が関与している可能性が示唆された。

総括

1. 輸送はイルカにおいてストレス反応をもたらすことが明らかとなった。さらに、イルカにおいても他の動物と同様にストレス反応の指標として血漿 CgA が利用可能であることが示唆された。
2. 比重 1.077 の分離液を用いることでバンドウイルカの PMNs を効率良く分離することが可能であった。また、PMN 機能として、NBT 還元能による活性酸素産生能測定およびラテックスビーズを用いた貪食能測定が可能であり、活性酸素産生能および貪食能の反応至適時間はそれぞれ 30 分と 12 時間であった。以上のことから、陸棲哺乳類と同様に好中球機能の検討がバンドウイルカで可能であることが明らかとなった。
3. バンドウイルカの PMNs による活性酸素産生能と貪食能は安静時と比較して、輸送前後において抑制された。このことから、バンドウイルカの PMN 機能は輸送ストレスにより低下することが示された。
4. 輸送後のバンドウイルカ PBMCs および PMNs におけるサイトカイン mRNA 発現量は輸送直前と比較して有意に低下するものが認められた。これらのことから、輸送ストレスによるバンドウイルカの PMN 機能抑制の機序には IL-1 β 、IL-6、IL-8、IFN- γ といったサイトカインの関連性が示された。

審査結果の要旨

以前からイルカは展示動物として飼育されているが、近年、その見学や触れ合いをつうじての精神的な癒し効果、あるいは動物介在療法効果が大きく注目され、イルカの必要個体数が増加し、捕鯨地からの輸送・搬入も頻繁となってきている。陸棲動物では、輸送は強いストレスであり、動物を疲労させ、呼吸器感染、活動低下および腸炎などの疾患リスクを増加させることが知られている。陸棲動物と同様に、イルカにとって輸送による極度のストレスは、免疫能の低下を誘導し、様々な感染症や、ショックの原因となり、輸送後の適切な飼育に悪影響を及ぼすと考えられる。しかし、現在、イルカにおいて輸送とそれによるストレス反応、さらにそれに関連した免疫能の変化については明らかとなっていない。本研究では、イルカにおける輸送と免疫能との関連性について検討することを目的と

して、日本で広く飼育されているバンドウイルカ (*Bottlenose dolphin, Tursiops truncatus*) を対象に、輸送によるストレス反応を評価し、新たにイルカにおける PMN 機能の評価法を確立するとともに輸送時における PMN 機能の変動について明らかかにするを目的として研究を行い、以下の成績を得た。

1. 飼育下バンドウイルカ 6 頭における約 6 時間のトラック輸送に際して、安静時 (トレーニングにより自主的に尾鰭を水面上に出した時)、輸送直前 (強制的にプールから取り上げた時)、輸送直後 (目的地到着時) に尾鰭より採血を行い、血漿コルチゾール、CgA、白血球数並びに白血球分画の測定を行った。その結果、輸送前後は安静時と比較してコルチゾール、CgA とともに有意に上昇し、白血球数および好酸球数は輸送前後において安静時の値と比較して有意に低下した。このことから、輸送はイルカの視床下部-下垂体-副腎皮質軸および交感神経-副腎髄質軸の両者を活性化すると共に、白血球数および好酸球数を減少させることが示され、陸棲哺乳類と同様に輸送がストレス反応を引き起こすことを明らかにした。
2. バンドウイルカの多形核白血球 (Polymorphonuclear cell; PMNs) 分離方法および機能測定方法を確立するため、比重 1.077 から 1.200 の様々な比重の分離液を作成し末梢血液からの PMN 分離を行うとともに、活性酸素産生能の指標である Nitroblue tetrazolium (NBT) 還元能およびラテックスビーズを用いた貪食能の測定を様々な反応時間で測定して検討した。その結果、比重 1.077 の分離液で最も良好に PMN の回収が得られ、また NBT 還元能および貪食能の最適反応時間はそれぞれ 30 分および 12 時間であることを明らかにし、バンドウイルカの PMNs の分離法、活性酸素産生能および貪食能の測定法を確立した。
3. 飼育下バンドウイルカ 6 頭における 6 時間のトラック輸送に際して、安静時、輸送直前、輸送直後において尾鰭より採血を行い、新たに確立した方法により PMN 機能として NBT 還元能と貪食能の測定を行うとともに、血漿コルチゾールおよび CgA の測定を行い、それらとの相関性についても検討した。その結果、安静時と比較して NBT 還元能は輸送直前直後共に低下傾向を示し、貪食能は輸送直前直後共に有意に低下した。またこれら PMN 機能の変化は、血漿コルチゾールおよび CgA と相関を示した。これらのことから、輸送によるストレスは PMNs の活性酸素産生能と貪食能を共に抑制することを明らかにした。
4. 輸送時におけるバンドウイルカの末梢血単核球(peripheral blood mononuclear cell; PBMCs)および PMNs のサイトカイン mRNA 発現量の変動を評価するために、バンドウイルカの末梢血から PMNs および PBMCs を分離し、半定量的 RT-PCR 法により、輸送直前、直後におけるそれぞれの IL-1 β 、IL-6、IL-8、TNF- α 、IFN- γ の mRNA 発現量を測定した。その結果、PMNs において、IL-6 と IL-8 mRNA 発現量は輸送直前と比較して、有意に低下し、IFN- γ は低下する傾向を示した。また、PBMCs において IL-1 β mRNA 発現量は輸送直前と比較して有意に低下し、IL-6、IFN- γ mRNA 発現量は輸送直前と比較して輸送直後に低下する傾向を示した。これらのことから、輸送時における PMN 機能の抑制には PBMCs から産生される IL-1 β 、IL-6、IFN- γ および PMNs から産生される IL-6、IL-8、IFN- γ が関与している可能性を明らかにした。

以上のように本研究では、バンドウイルカにおける輸送時のストレスの発現状況、特に好中球機能を中心とした細胞性免疫能の変動およびその発生機序の一部を解明した。これらの研究成果は、イルカにおけるストレス反応を把握する上で有用な情報を提示するとともに、今後のより安全な輸送方法を開発していく上でも重要と考えられ、獣医学、水棲哺乳動物学の発展に大きく貢献するものである。本論文の審査ならびに学力確認の結果と併せて、申請者に対し、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。