

氏名（本（国）籍）	Abdul Qadir Qadis（アフガニスタン・イスラム共和国）
推薦教員氏名	岩手大学 教授 佐藤 繁
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博甲第430号
学位授与年月日	平成26年9月24日
学位授与の要件	学位規則第3条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学位論文題目	Studies on the effects of a bacterial probiotic on ruminal components and cellular immune function in holstein calves (ホルスタイン種子牛の第一胃性状と細胞性免疫機能に対する生菌製剤の影響に関する研究)
審査委員	主査 岩手大学 教授 山岸 則夫 副査 帯広畜産大学 教授 猪熊 壽 副査 岩手大学 教授 佐藤 繁 副査 東京農工大学 教授 竹原 一明 副査 岐阜大学 教授 大場 恵典

#### 学位論文の内容の要旨

反芻動物に対する生菌プロバイオティックス（生菌製剤；BPs）の投与は、消化管微生物叢を改善して第一胃機能および健康増進に有益な効果がある。BPs 投与は、子牛の局所および全身性免疫機構の発達に有効であると報告されているが、子牛の第一胃性状に及ぼす BPs の影響および BPs と免疫機構との相互作用については、未だ不明な点が多い。本研究は、ホルスタイン種子牛における第一胃性状と細胞性免疫機構に対する BPs の効果を明らかにする目的で行われた。

はじめに、第1章では、第一胃の成分と微生物叢に及ぼすBP投与の影響を確認するため、子牛の第一胃液性状を検討した。12頭のホルスタイン種子牛（平均12週齢）に濃厚飼料を多く含む飼料を馴致させた後、*Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium* および *Clostridium butyricum* の3菌種からなるBPを体重100kgあたり1.5gあるいは3.0gを1日1回5日間経口投与した。BPを投与しない子牛を対照群とした。第一胃液pHは15日間の実験期間中、10分間隔で連続測定した。第一胃液は性状と微生物叢を評価するため投与前、投与後7日および14日の一定時刻に第一胃フィステルから採取した。その結果、いずれのBP投与群においても飼料給与による第一胃液pH（24時間平均値）の低下が改善された。また、BP投与群では第一胃液pH（1時間平均値）の日内変動が同様傾向を示し、第一胃液の乳酸濃度は対照群に比べて有意な低値を示した。第一胃液においてBPを構成する細菌は検出されなかったが、他の第一胃優勢細菌が多数検出された。これらの結果から、BP投与子牛では第一胃の優勢細菌と乳酸消費の増加によって、第一胃液pHが安定したもの

と考えられた。

次に、第 2 章では、子牛の細胞性免疫機能に及ぼす BP 投与の影響を明らかにするため、末梢白血球のサブポピュレーションおよびサイトカイン mRNA 発現を評価した。健康なホルスタイン種子牛 8 頭（平均 10 週齢）に対して体重 100kg あたり 3.0 g の前記 BP を 1 日 1 回 5 日間経口投与し、BP を投与しない子牛を対照群とした。その結果、BP 投与群では投与後 7 日に投与前および対照群に比べて  $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$  および  $WC1^+ \gamma \delta T$  細胞数と  $TLR2^+$  単球数の増加が認められた。また、投与後 7 日および 14 日に末梢白血球の IL-6、 $TNF-\alpha$  および  $INF-\gamma$  発現レベルの上昇が認められた。これらの結果から、健康子牛の末梢白血球免疫マーカーは、BP 投与によって安定化した第一胃微生物叢と、それに伴って増加した消化管微生物叢によって刺激されることが示唆された。

さらに、第 3 章では、BP の免疫刺激および下痢治療効果について、離乳前の子牛を用いて検討した。供試動物として野外のホルスタイン種子牛 42 頭（平均 10 日齢）を用い、下痢および健康子牛とも BP 投与群と対照群に区分した。さらに、下痢子牛は病原体の有無によって病原体陽性と病原体陰性に区分した。BP 投与群には下痢発症日から体重 100kg あたり 3.0 g の前記 BP を 1 日 1 回 5 日間経口投与した。採血は下痢発症日（0 日）と 7 日後に実施した。その結果、下痢子牛では発症日に末梢白血球の免疫マーカー数の減少およびサイトカイン mRNA 発現の低下が観察された。また、下痢および健康子牛の BP 投与群では、7 日後に  $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$  および  $WC1^+ \gamma \delta T$  細胞数と、 $CD14^+$ 、 $CD21^+$  および  $TLR2^+$  細胞数が有意な高値を示した。同様に、BP 投与群では末梢白血球の IL-6、 $TNF-\alpha$  および  $INF-\gamma$  mRNA 発現の上昇も認められた。なお、BP 投与群の下痢子牛は 7 日後までに全て下痢が回復した。これらの結果から、下痢子牛で観察された末梢白血球の免疫マーカー数の減少とサイトカイン mRNA 発現の低下は、下痢発症に起因したものであり、離乳前子牛に対する BP の反復投与は、細胞性免疫を刺激し、下痢の回復を促進するものと考えられた。

以上のように、本研究により BP 投与子牛では第一胃の優勢細菌と乳酸消費の増加によって第一胃液 pH が安定し、第一胃微生物叢の安定化とそれに伴って増加した消化管微生物叢によって末梢白血球免疫マーカーが刺激されること、また、離乳前子牛に対する BP の反復投与は、細胞性免疫を刺激し、下痢の回復を促進するものと考えられた。これらのことから、BP の 5 日間経口投与は、子牛の末梢白血球免疫マーカーの増加および下痢治療に貢献することが示唆された。

## 審査結果の要旨

本研究は、ホルスタイン種子牛における第一胃性状と細胞性免疫機構に対する生菌プロバイオティックス（生菌製剤；BPs）の効果を明らかにする目的で行われた。

第 1 章では、第一胃の性状と微生物叢に及ぼす BP 投与の影響を調べるため、濃厚飼料を給与した子牛（12 頭、平均 12 週齢）に *Lactobacillus plantarum*、*Enterococcus faecium* および *Clostridium butyricum* の 3 菌種からなる BP（体重 100kg あたり 1.5 g あるいは 3.0 g を 1 日 1 回 5 日間）を経口投与した結果、第一胃液の pH 低下が改善され、乳酸濃度が対照群に比べて有意な低値を示し、優勢細菌が多数検出された。このことから、子牛におけ

る BP 投与は、第一胃の優勢細菌と乳酸消費の増加によって、第一胃液 pH を安定させることが明らかにされた。

第 2 章では、子牛の細胞性免疫機能に及ぼす BP 投与の影響を調べるため、健康子牛（8 頭、平均 10 週齢）に体重 100kg あたり 3.0 g の BP を 1 日 1 回 5 日間経口投与した結果、BP 投与群では投与前や対照群に比べて末梢白血球の CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> および WC1<sup>+</sup> γ δ T 細胞数と TLR2<sup>+</sup> 単球数の増加、IL-6, TNF-α および INF-γ 発現レベルの上昇が認められた。このことから、健康子牛の末梢白血球免疫マーカーは、BP 投与によって安定化した第一胃微生物叢とそれに伴い増加した消化管微生物叢によって刺激されることが示唆された。

第 3 章では、離乳前の下痢および健康子牛（42 頭、平均 10 日齢）を用いて、BP の免疫刺激および下痢治療効果が検討された。健康および下痢子牛とも BP 投与群と対照群に区分し、BP 投与群には下痢発症日から体重 100kg あたり 3.0 g の BP を 1 日 1 回 5 日間経口投与した。その結果、BP 投与群では、下痢および健康子牛のいずれも末梢血中の CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> および WC1<sup>+</sup> γ δ T 細胞数と CD14<sup>+</sup>, CD21<sup>+</sup> および TLR2<sup>+</sup> 細胞数が有意な高値を示し、IL-6, TNF-α および INF-γ mRNA 発現も上昇した。このことから、離乳前子牛に対する BP 投与は、細胞性免疫を刺激することで下痢の回復を促進することが示唆された。

以上、本研究によって、BP の 5 日間経口投与が子牛の末梢白血球免疫マーカーの増加および下痢治療に貢献することが明らかになり、ホルスタイン種子牛の第一胃性状や細胞性免疫機能に対する複合 BPs の効果に関する新しい知見が提示された。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

## 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Effects of a bacteria-based probiotic on subpopulations of peripheral leukocytes and their cytokine mRNA expression in calves  
著 者 名 : Qadis, A. Q., Goya, S., Yatsu, M., Yoshida, Y., Ichijo, T. and Sato, S.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 76 (2) : 189-195, 2014
- 2) 題 目 : Immune-stimulatory effects of a bacteria-based probiotic on peripheral leukocyte subpopulations and cytokine mRNA expression levels in scouring Holstein calves  
著 者 名 : Qadis, A. Q., Goya, S., Yatsu, M., Kimura, A., Ichijo, T. and Sato, S.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
巻・号・頁・発行年 : 76 (5) : 677-684, 2014
- 3) 題 目 : Effects of a bacteria-based probiotic on ruminal pH, volatile fatty acids and bacterial flora of Holstein calves  
著 者 名 : Qadis, A. Q., Goya, S., Ikuta, K., Yatsu, M., Kimura, A., Nakanishi, S. and Sato, S.

學術雜誌名：The Journal of Veterinary Medical Science  
卷・号・頁・発行年：76 (6) : 877-885, 2014