

黒毛和種子牛の呼吸器疾病における

涙液成分の有用性に関する研究

(Study of the usefulness of tear components in respiratory disease  
of Japanese Black Calves)

巢山由乃

黒毛和種子牛の呼吸器疾病における

涙液成分の有用性に関する研究

(Study of the usefulness of tear components in respiratory disease  
of Japanese Black Calves)

巢山 由乃

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科

獣医学専攻博士課程平成 29 年入学

(指導教授：小山 秀一)

令和 3 年 3 月

## 目次

<b>第 1 章</b>	緒言	1-3
<b>第 2 章</b>	黒毛和種子牛の涙液性状ならびに涙液量変動要因の検討	
1.	緒言	5
2.	材料及び方法	5-9
3.	結果	9-10
4.	考察	10-12
5.	小括	12
6.	図表	13-20
<b>第 3 章</b>	呼吸器疾病の急性炎症期である黒毛和種子牛の涙液性状	
1.	緒言	22
<b>第 1 節</b>	呼吸器疾病の急性炎症期である黒毛和種子牛の STTI 値、ならびに涙液中の総蛋白濃度	
1-1.	材料及び方法	23-26
1-2.	結果	26
<b>第 2 節</b>	呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の涙液中蛋白成分	
2-1.	材料及び方法	27-29
2-2.	結果	29-30
<b>第 3 節</b>	呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の涙液中免疫グロブリン濃度	
3-1.	材料及び方法	31-34
3-2.	結果	34-35

第4節	呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の涙液性状の変化	
4-1.	材料及び方法	36-38
4-2.	結果	38-39
2.	考察	39-43
3.	小括	43-44
4.	図表	45-77
<b>第4章</b>	<b>総括</b>	<b>78-81</b>
	謝辞	82
	引用文献	83-87

## 第1章 緒言

子牛は繁殖和牛農家にとって重要な存在であるが、近年、黒毛和種子牛市場の取引価格高騰により、その度合いは高まっている。繁殖和牛農家は繁殖用素牛に人工授精、または本交尾をさせ、約10ヶ月間の妊娠期間を経て出産、出生後は約10ヶ月の飼養期間を経て子牛市場に上場する。畜産経営を安定化するための重要な課題として、出生子牛をいかに健康に飼養するかということが挙げられる。しかしながら、子牛は成牛と比較して免疫システムが未成熟であり、様々な感染症に罹患しやすい[2, 22]。家畜共済統計によると、最も多い病傷事故発生件数は消化器疾病であり、呼吸器疾病が続いている。消化器疾病の症状として、便性状の変化や尾根部への下痢便の付着等が挙げられるが、これらは畜主が目視で症状を把握しやすいため、往診依頼を行いやすい。しかしながら、呼吸器疾病の症状である発咳、鼻水等は必発ではなく、症状が明らかになった時点で重症化していることも多い。その要因の一つに畜主が目視で把握しやすい初期症状の指標がないことが挙げられる。近年、和牛農家は群飼養をすることが多いが、過密な飼育環境によるストレスの増大は呼吸器疾病を誘引する[27, 41]。群飼養されている牛のうち一頭が呼吸器疾病に罹患すると、感染は牛群全体へ拡大する危険が高く、和牛農家に経済的損失をもたらす。治療にかかる日数が長くなれば、その後の成長にも影響を及ぼし、経済動物としての価値が低下する。

近年、涙液中の蛋白質成分が様々な疾病のバイオマーカーになりうるとして、人医療だけでなく、小動物獣医療においても注目されている[10, 12]。ドライアイでは、涙液中の蛋白質成分であるリゾチームやラクトフェリンの減少が報告されており[18]、早期の乳がん患者では涙液中のLacryglobinの増加が報告されている[12, 23]。また、悪性腫瘍を発症した犬の涙液には特異的な蛋白の発現が確認されている[8]。眼表面の恒常性を維持するために重要な涙液は、角膜表面に膜状になって存在することで、涙液膜 (tear film) を形成している[42, 45]。この涙液膜は、油層、水層、ムチン層の三層から構成されており、油層はマイボーム腺より分泌される脂質から構成される。中間層を構成する

水層は涙液膜の 98%を占めており、主涙腺や副涙腺から分泌される細胞外液によって形成されている[42, 45]。最深層のムチン層は、結膜杯細胞から分泌される粘液によって形成されている[42]。涙液量は、シルマー試験紙を用いた測定方法が一般的であり[3, 19, 37]、Schirmer Tear Test (STT) で表わされる涙液量は、涙液の水層を反映している[36]。STT には第 I 法と第 II 法があり、第 I 法では基礎性分泌と反射性分泌の合計量を表わす[20]。一方で、第 II 法は、測定時に鼻粘膜を刺激することで反射性分泌の最大量を測定する方法である[31]。基礎性分泌は、主にまばたき、パラクリンやオートクリンといった神経支配を受けない分泌であるのに対して、反射性分泌は副交感神経に支配された水層の主涙腺のみからの分泌であり、角結膜表面や鼻粘膜の刺激時や情動に伴って分泌され、弱い刺激では片眼性の分泌であるが、強い刺激の際には両眼から分泌する[44]。

涙液中の成分は、電解質、水、蛋白質から構成されており、蛋白質は Regulated protein と Constitutive protein の 2 種類に分類される[45]。Regulated protein (調節蛋白質) の代表であるリゾチームやラクトフェリンは、合成後に貯蔵され、刺激が加わると放出される[44]。Constitutive protein (恒常性蛋白質) である IgA は、細胞内での蛋白質の産生量に依存して合成され、貯蔵されることなく、分泌される[45]。牛の涙液に関する報告は少なく、子牛の涙液に関しては、健全なホルスタイン種子牛の STT I 値と眼圧を測定した報告のみであり[34]、黒毛和種子牛の涙液や涙液中の蛋白質成分に関する報告はない。

呼吸器疾病に罹患した黒毛和種子牛では、初診時に、「流涙」が観察される個体が多い。実際に流涙が見られる子牛の体温や呼吸を観察すると、39.5℃以上の発熱や呼吸様式の異常が認められた。しかし、流涙がみられる子牛の多くは発咳や鼻水等の症状は乏しいため、治療対象になることは少ない。このように明らかな呼吸器疾病の症状を示さない子牛を早期に発見することは牛群全体への呼吸器疾病の蔓延や、症状の重篤化の回避につながると考えられる。そこで、呼吸器疾病に罹患した子牛の急性炎症期において、流涙が診断の指標となりうるかを検討した。

本研究では、初めに、臨床的に健全な黒毛和種子牛の STT I 値、ならびに涙液中の総

蛋白濃度を測定し、STT I 値が変動する要因について検討した（第 2 章）。続いて、呼吸器疾病の急性炎症期における黒毛和種子牛の STT I 値、涙液中の総蛋白濃度を測定し、臨床的に健常な子牛と比較検討を行った。さらに、涙液中の蛋白質について、二次元電気泳動、Liquid Chromatography-Mass spectrometry（LC-MS/MS）による定性解析、ELISA による IgA および IgG の測定を実施し、呼吸器疾病の急性炎症期の子牛にみられる流涙の有用性を検討した。





## 第2章 黒毛和種子牛の涙液性状ならびに涙液量変動要因の検討

### 1. 緒言

黒毛和種子牛は呼吸器疾病に罹患しやすく、その経済的損害は甚大である。呼吸器疾病の症状には、発咳、呼吸様式の異常、鼻汁等の症状が挙げられるが、どの症状も必発ではないため、畜主は子牛の発症に気づき難い。しかし、実際の臨床現場では初診時に流涙を呈する子牛が多数認められる(図1)。子牛の涙液に関しては、Tofflemireらによるホルスタイン種子牛の正常なSTT I値と眼圧についての報告のみであり[34]、健全な黒毛和種子牛に関する報告はない。そこで、本章では、臨床的に健全な黒毛和種子牛の涙液量、涙液中の総蛋白濃度、および涙液量に影響を与える要因について検討した。

### 2. 材料及び方法

#### 供試動物

宮城県内で飼養されている生後3~90日齢(出生日を0日齢)の黒毛和種子牛137頭(雄:70頭、雌:67頭)を用いた。全ての子牛は、結膜の発赤や腫脹、目視可能な外傷がないことを確認している。またすべての供試牛はWIBRD Clinical Scoring System[24]を用いて評価した(表1)。WIBRD Clinical Scoring Systemとは、5つの臨床徴候、眼漏、鼻汁、直腸温、誘発性または自然発生的な発咳、および斜頸や耳の下垂による呼吸器疾患の診断法である。各項目のスコアリングの合計が5未満を臨床的に健全な子牛、5以上を呼吸器疾病に罹患していると判定する。本研究では、体温39.5℃未満、正常な呼吸様式を呈し、WIBRD Clinical Scoring Systemの合計スコアが5未満(表2)の臨床的に健全な子牛を用いた。本研究の実験手順および実験動物の管理扱いについては、宮城県農業共済組合アニマルウェルフェア推進委員会の実験ガイドラインに従い、委員会および動物実験に係わる審査委員会の承認を得た(nm0008)。

## 血液検査

21G 採血針と真空採血管（ベノジェクト II 真空採血管, TERUMO, 東京, 日本）を用いて、右側頸静脈より採血を行った。採血後は直ちに氷冷し、30 分以内に遠心分離（3000 ×g、15 分）を行うことで、血清を分離し、血清分画測定まで -30°C で凍結保存した。凍結保存した血清を測定直前に室温で解凍し、血清蛋白分画をアガロースゲル電気泳動 (AGE) で測定した。AGE は、QuickGel SP アガロースゲルキット (Helena Laboratories Japan、埼玉、日本) を使用して、manufacture's instruction に基づいて以下の方法で行った。血清を 30μl ずつサンプルプレートウェルのウェルにアプライした。サンプルは、アプリケーション (J653、Helena Laboratories Japan、埼玉、日本) を使用して QuickGel SP に塗布され、ゲルは、QuickGel Chamber P (J678、Helena Laboratories Japan、埼玉、日本) を使用し、20°C、240V で 8 分間、泳動を行った。次に、ポンソー S (J845、Helena Laboratories Japan、埼玉、日本) で 5 分間染色した。5% 酢酸溶液で脱染し、完全に乾燥させた後、QuickScan 濃度計 (J121、Helena Laboratories Japan、埼玉、日本) でゲルのスキャンを行った。QuickScan コンピュータソフトウェアを使用して、レーンを識別し、バックグラウンドを抽出し、各サンプルの濃度測定トレース (電気泳動図) を取得し、各電気泳動図を調べ、ソフトウェアを使用してラベルを付けた。各分画内の相対蛋白質濃度は、吸光度のパーセンテージとして決定され、絶対濃度は、総血清蛋白質濃度を使用して計算を行った。各分画の絶対濃度を表 3 に示した。この測定により、 $\alpha_1$  分画、 $\alpha_2$  分画が上昇しているものを急性炎症期であると判断している (図 2)。供試牛は  $\alpha_1$  分画、 $\alpha_2$  分画が上昇していないことを確認している。

また、血液生化学検査として血清総蛋白濃度、血清アルブミン濃度、血清尿素窒素濃度、血清アミノトランスフェラーゼ濃度、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度、血清総トリグリセリド濃度、血清ナトリウム濃度、血清カリウム濃度、血清クロール濃度を測定して異常が認められないことを確認した (表 3)。完全血球検査 (Celltac $\alpha$ , MEK-6558, 日本光電, 東京, 日本) として、赤血球数、総白血球数、ヘマトクリット値、ヘモ

グロビン濃度、平均赤血球ヘモグロビン濃度、平均赤血球ヘモグロビン量を測定し、異常が認められないことを確認した（表3）。

#### 涙液量の測定

涙液量測定には、涙液量検査試験紙（Schirmer tear test, MERCK Animal Health, NJ, U.S.A）を用いた。測定は、基礎分泌と反射性分泌の両方の分泌による涙液量である Schirmer のテスト第I法に準じて行った。試験紙の切れ込み部位を山折りにし、下眼瞼を露出させ、下眼瞼の外側 3 分の 1 の部位に 1 分間静置し、測定を行った。

#### 涙液量変動要因

涙液量変動要因として、左右眼、雌雄、生後日齢、母子分離、牛舎内のアンモニア濃度、気温、湿度、照度を検討項目とした。母子分離については、母牛と同居し母乳にて飼養されている子牛と、生後まもなく母子分離をし、人工哺乳で哺育されている子牛とに分けた。牛舎内のアンモニア濃度については、検知管式気体測定器（GV-100S, 株式会社 GASTEC, 神奈川, 日本）を用いて測定を行った。測定は子牛の伏臥状態での眼の位置に検知管式気体採取器を 1 分間静置して行った。気温・湿度・照度に関しては、マルチ環境測定器（LM-8000, 株式会社マザーツール, 長野, 日本）を用いて、子牛が伏臥姿勢でいる状態で鼻鏡の高さに検知器を静置、吸引し、1 分間計測を行った。涙液の採取は 10 : 00 ~ 19 : 00 の間に行った。

#### 涙液の採取

涙液の採取は Capillary Micropipettes 10  $\mu$ l（Microcaps, DRUMMOND Scientific company, PA, U.S.A）を用いて行った。Capillary Micropipettes 10  $\mu$ l を 1  $\times$  1  $\times$  3 cm に切り出した発泡スチロールに埋め込み、その発泡スチロールを保持した状態で、眼瞼の涙液メニスカスに接触させて毛細管現象にて採取した。採取した涙液は、付属のピペットにて押し出

しを行い、スクリータイプのエッペンチューブに保存した。エッペンチューブは、液体窒素素内に入れ、測定まで液体窒素素内で保存した。

#### 涙液中の蛋白質濃度の測定

凍結保存されていた涙液を測定直前に氷冷下にて融解し、Bradford 法により涙液中蛋白質濃度を測定した。測定には、Pierce 660nm Protein Assay Kit (Thermo fisher scientific, MA, U.S.A) を使用し、manufacture's instruction に従って以下の方法で行った。

96 穴マイクロプレートの各ウェルに牛血清アルブミン (BSA) 標準液 (125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{g/ml}$ ) 及び融解した涙液を 10  $\mu\text{l}$  ずつ分注した。その後、Protein Assay Reagent を 150  $\mu\text{l}$  ずつアプライし、室温で 1 分間震盪した。その後、室温で 5 分間静置し、マイクロプレートリーダー (BioRad Laboratories, Inc. CA, U.S.A) を用いて、各ウェルの 660 nm の吸光度を測定した。

#### Palperal Fissure Length 測定

成牛等の瞼裂との比較を行うために、PFL (Palperal Fissure Length) と呼ばれる瞼裂の長さ (目頭から目尻まで) をデジタルノギス (19990, シンク測定株式会社, 新潟, 日本) を用いて測定を行った。生後 15~90 日齢までの子牛 39 頭 (雄 : 22 頭、雌 : 17 頭) を供試した。

#### 統計処理

結果はすべて平均値  $\pm$  標準偏差で示した。正規性は、Kolmogorov-Smirnov 検定を行った。左眼と右眼の STTI 値の平均値の 2 群間の差の検定を行うために、student の t 検定を行った。涙液量変動要因の検討を行うために、生後日齢に関して、生まれた日を 0 とし、15 日ごとに群分けを行い、一元配置分散分析を用いて有意性を調べた。有意であった場合、有意差検定は Tukey-kramer 法の多重比較法を用いた。母子同居、母子分離

の飼養環境における STT I 値の平均値を 2 群間の差の検定を行うために Student の t 検定を行った。雌雄での STT I 値の平均値の 2 群間の差の検定を行うために student の t 検定を行った。牛舎内のアンモニア濃度について 2ppm 以上の環境と 2ppm 以下の環境での STT I 値の平均値の 2 群間の差の検定を行うために student の t 検定を行った。STT I 値と牛舎内のアンモニア濃度の相関、ならびに STT I 値と涙液の採取時間の相関を評価するために、ピアソンの相関係数を用いて算出した。STT I 値とそれぞれ気温、湿度、照度の相関については、スピアマンの順位相関係数を算出し評価した。統計処理はすべて危険率 5%未満 ( $P < 0.05$ ) で有意差ありと判定した。

### 3. 結果

#### STT I 値

臨床的に健常な黒毛和種子牛の STT I 値は  $18.9 \pm 2.9$  mm/min ( $n=263$ ) であった。左眼の STT I 値は  $18.7 \pm 3.2$  mm/min ( $n=130$ )、右眼の STT I 値は  $19.0 \pm 3.0$  mm/min ( $n=133$ ) であり、左右の STT I 値に有意な差はみられなかった ( $P=0.34$ )。また、雄の STT I 値は  $18.6 \pm 2.6$  mm/min ( $n=70$ )、雌の STT I 値は  $19.1 \pm 3.1$  mm/min ( $n=67$ ) であり、性別の違いによる有意な差はみられなかった ( $P=0.33$ )。

生後日齢に関しては、生後 15 日齢までの STT I 値は  $20.6 \pm 3.8$  mm/min ( $n=33$ )、生後 16~30 日齢での STT I 値は  $18.2 \pm 1.9$  mm/min ( $n=12$ )、生後 31~45 日齢での STT I 値は  $18.8 \pm 2.5$  mm/min ( $n=23$ )、生後 46~60 日齢での STT I 値は  $18.9 \pm 2.5$  mm/min ( $n=14$ )、生後 61~75 日齢での STT I 値は  $17.8 \pm 2.0$  mm/min ( $n=27$ )、生後 76 日~90 日齢での STT I 値は  $17.9 \pm 1.9$  mm/min ( $n=18$ ) であった。生後 15 日齢までの STT I 値 ( $20.6 \pm 3.8$  mm/min) は生後 61~75 日齢の  $17.8 \pm 2.0$  mm/min、及び生後 76~90 日齢の  $17.9 \pm 1.9$  mm/min と比較し、有意な高値が認められた ( $P < 0.01$ , 表 3)。

#### 涙液量変動要因と STT I 値

以降の涙液量変動要因は、生後 15 日齢以降の子牛を対象に検証した。

母子同居の子牛の STTI 値は  $18.0 \pm 2.2$  mm/min (n=74)、生後間もなく母子分離した子牛の STTI 値は  $19.4 \pm 1.9$  mm/min (n=49) であり、有意な差はみられなかった ( $P=0.4$ )。

本研究での牛舎内の環境は温度  $6.5 \sim 35.5^\circ\text{C}$ 、湿度  $40 \sim 77.4\%$ 、照度  $9 \sim 8350$  Lux であり、それぞれ STTI 値との相関性は認められなかった (表 4)。また、涙液採取時間と STTI 値との間に相関性は認められなかった。牛舎内のアンモニア濃度については、環境省が制定している悪臭防止法に従い、2ppm 以上を高アンモニア濃度とした。アンモニア濃度が 2ppm 未満の環境における STTI 値は  $17.8 \pm 1.8$  mm/min (n=64)、2ppm 以上では、 $20.3 \pm 2.8$  mm/min (n=41) であり、2ppm 以上の STTI 値は有意な高値が認められた ( $P < 0.05$ )。牛舎内のアンモニア濃度と STTI 値の間には正の相関が認められた ( $P < 0.01$ , 表 5)。

#### 涙液中の総蛋白濃度

生後 15 日齢以降の涙液中の総蛋白濃度は、 $1.18 \pm 0.30$  mg/ml (n=38) であり、左右眼に有意な差はみられなかった (左眼： $1.14 \pm 0.35$  mg/ml, n=35、右眼： $1.13 \pm 0.29$  mg/ml, n=38)。また、生後 15 日齢未満では  $0.95 \pm 0.36$  mg/ml (n=9) で、左眼は  $0.96 \pm 0.28$  mg/ml (n=9)、右眼は  $0.96 \pm 0.27$  mg/ml (n=9) であり、生後 15 日齢以降の総蛋白濃度と有意な差はみられなかった。

#### Palpebral Fissure Length

PFL は  $30.7 \pm 2.4$  mm (n=39) であった。

## 4. 考察

本章では、臨床的に健常な黒毛和種子牛における STTI 値、涙液中の総蛋白濃度、さらに涙液量の変動要因を評価した。

本研究の調査から、臨床的に健常な黒毛和種子牛の STTI 値は  $18.9 \pm 2.9$  mm/min (n=263) であるとの結果が得られた。Tofflemire らは、9.3～13.3 週齢のホルスタイン種子牛の STTI 値は  $20.4 \pm 5.0$  mm/min [34]と報告しており、本研究の臨床的に健常な黒毛和種子牛の

STTI 値と同様な結果であった。正常な羊や山羊の STTI 値は、羊においては  $18.5 \pm 2.5$  mm/min (13.5–22 mm/min)、山羊においては  $15.8 \pm 5.7$  mm/min (10–30 mm/min) と報告されており [5, 14, 39]、本研究での黒毛和種子牛の STTI 値と同様な結果であった。一方で、成牛の STTI 値は  $34.15 \pm 20.47$  mm/min [39] および  $24.18 \pm 6.5$  mm/min [38] と黒毛和種子牛よりも高い結果が報告されている。このような違いは体格、ならびに黒毛和種子牛の PFL (Palpebral Fissure Length) と呼ばれる瞼裂の長さが小さいことが要因として考えられる。山羊や羊の PFL は  $26.8 \pm 2.17$  mm、 $29.5 \pm 1.8$  mm [39] と子牛と同等な長さであるのに対して、成牛では  $47.7 \pm 2.06$  mm [39] と明らかに長い。これらの結果から、子牛の眼周囲の長さは山羊や羊と同程度であるのに対して成牛に比較すると小さいため、STTI 値に違いが生じたと考えられる。

STTI 値の変動要因に関する検討の結果、生後日齢と牛舎内のアンモニア濃度が STTI 値に影響することが明らかとなった。犬の STTI 値は、月齢、性差、体重の影響を受けることが報告されており、生後 63~70 日齢までに成犬と同程度となり、以降は加齢に伴って STTI 値は低下する [20]。また、健康犬の STTI 値は、生後 14 日齢までの子犬では成犬と比較して高値を示すことが報告されている [5, 35]。本研究では、生後 15 日齢までの STTI 値は、生後 61~90 日齢の STTI 値と比較して、有意な高値が認められ、犬での報告と同様な変化がみられた。出生直後の毛和種子牛の免疫機能は未熟であり、抹消血の T 細胞、B 細胞のいずれのリンパ球数は少なく、徐々に増加していくが、生後 15 日齢前後で大きく増加すると報告されている [47]。生後 15 日齢までの子牛では、生後 61 日齢以降の子牛と比較して、免疫機能が未熟であるために、結膜や角膜といった眼粘膜への刺激に鋭敏である可能性が考えられ、そのため流涙が起き、STTI 値は高値を示していたと推測された。

母乳で飼養されている母牛同居の子牛と、人工哺乳で飼養している母子分離の子牛では、飼養環境が大きく異なるが、STTI 値に有意な差がみられなかったことから、飼養環境は涙液量に影響しないと考えられた。一方で、牛舎内の環境では、アンモニア濃度

が STTI 値の変動要因であった。結膜や角膜への刺激によって流涙は生じるため、牛舎内の高いアンモニア濃度は持続的な眼粘膜の刺激となり、STTI 値が上昇したと考えられる。

本研究においては、牛舎内の温度、湿度、および照度はいずれも涙液量を変動させる要因とはならなかった。そのため、一般的な飼養環境では涙液量に影響を与えないと考えられた。本研究における STTI 値の測定は 10 : 00 から 19 : 00 の間に行っており、同一個体による継時的な STTI 値を測定していないため日内変動が起きているかは不明である。しかしながら、測定時刻と STTI 値に相関性は認められなかったことから、少なくとも 10 : 00 ~ 19 : 00 の間であれば日内の変動はないことが明らかとなった。

本研究において、臨床的に健常な黒毛和種子牛の正常な涙液中の総蛋白濃度は  $1.18 \pm 0.30$  mg/ml (n=38) であった。ホルスタイン種の成牛の涙液中の総タンパク濃度は  $5.8 \pm 2.2$  mg/ml [7] および  $4.4 \pm 1.9$  mg/ml [15] であり、黒毛和種子牛よりも高い結果が報告されている。黒毛和種子牛の PFL ( $30.7 \pm 2.4$  mm) は、成牛 ( $47.7 \pm 2.06$  mm) と比較して明らかに短く、また、眼球も構造的に小さいため、分泌される蛋白量も少ない可能性が考えられた。

## 5. 小括

本章では、臨床的に健常な黒毛和種子牛の STTI 値、涙液中の総蛋白濃度を評価した。その結果、臨床的に健常な黒毛和種子牛の STTI 値は  $18.9 \pm 2.9$  mm/min (n=263) であることが明らかとなった。生後 15 日齢までの STTI 値 ( $20.6 \pm 3.8$  mm/min, n=33) は生後 61 ~ 75 日齢の STTI 値 ( $17.8 \pm 2.0$  mm/min, n=27)、及び生後 76 ~ 90 日齢の STTI 値 ( $17.9 \pm 1.9$  mm/min, n=18) と比較し、有意な高値が認められた。涙液中の総蛋白濃度については生後 15 日齢から 90 日齢までの臨床的に健常な黒毛和種子牛では、 $1.18 \pm 0.30$  mg/ml (n=38) であった。また、STTI 値が変動する要因は、生後日齢と牛舎内のアンモニア濃度であることが明らかとなった。



## 6. 図表

表 1. WI BRD Clinical Scoring System

	0	1	2	3
眼漏	正常	片側少量	両側少量	両側多量
鼻汁	正常	片側少量の 白濁鼻汁	両側の白濁、 または 粘液性鼻汁	両側多量な 粘液濃性鼻汁
直腸温 (°C)	<38.2	38.3~38.8	38.9~39.4	> 39.5
誘発性または 自然発生的な発咳	正常	一回のみ誘発	何回も誘発	自然に何度も
斜頸や耳の下垂	正常	耳や頭を振る	わずかに片側 耳下垂	両側耳下垂 もしくは斜頸

WI BRD Clinical Scoring System のスコア表。それぞれのスコアの合計が 5 未満を臨床的に健常な子牛、合計スコアが 5 以上を呼吸器疾病と判定する。

表 2. 臨床的に健常な黒毛和種子牛の WI BRD Clinical Scoring System

	0	1	2	3
眼漏	137	0	0	0
鼻汁	137	0	0	0
直腸温	0	98	39	0
発咳	125	12	0	0
耳・頭下垂	137	0	0	0

Total Score	0	1	2	3	4	5	6
	0	96	31	10	0	0	0

臨床的に健常な黒毛和種子牛のそれぞれのスコアと合計スコアを示した。合計スコアは 5 未満であり、臨床的に健常な子牛であると判定した。

表 3. 血球検査、血液生化学検査、血清蛋白分画

	健常	標準範囲 <sup>[33, 45]</sup>
WBC ( $\times 10^3/l$ )	7.54 $\pm$ 1.67	8.65 $\pm$ 1.69
RBC ( $\times 10^4/l$ )	1003 $\pm$ 109	886 $\pm$ 68
Hb (g/dl)	10.1 $\pm$ 1.3	11.32 $\pm$ 1.02
Ht (%)	33.5 $\pm$ 3.6	35 $\pm$ 3
MCV (fl)	30.0 $\pm$ 1.3	39.1 $\pm$ 1.9
MCHC (g/dl)	32.8 $\pm$ 1.3	32.8 $\pm$ 1.6
TP (g/dl)	5.6 $\pm$ 0.6	5.3~6.7
Alb (g/dl)	3.1 $\pm$ 0.3	2.4~3.6
BUN (mg/dl)	10.3 $\pm$ 2.3	7.0~17.9
AST (IU/l)	54.9 $\pm$ 11.1	35.5~81.3
GGT (IU/l)	30.5 $\pm$ 14.2	12.0~42.7
TG (mg/dl)	20.0 $\pm$ 9.1	12.5~41.4
Na (mmol/l)	139.2 $\pm$ 1.9	135.0~143.2
K (mmol/l)	4.6 $\pm$ 0.4	5.5~6.6
Cl (mmol/l)	100.9 $\pm$ 2.5	95.3~101.2
Alb (g/dl)	2.81 $\pm$ 0.21	
$\alpha_1$ (g/dl)	0.42 $\pm$ 0.07	
$\alpha_2$ (g/dl)	0.49 $\pm$ 0.07	
$\alpha_1+\alpha_2$ (g/dl)	0.91 $\pm$ 0.09	
$\beta_1$ (g/dl)	0.69 $\pm$ 0.11	
$\beta_2$ (g/dl)	0.36 $\pm$ 0.13	
$\gamma$ (g/dl)	0.69 $\pm$ 0.46	

いずれの項目も異常は認められなかった。



図 1. 臨床的に健常な子牛と流涙している子牛の眼周囲。(a) 臨床的に健常な子牛の眼周囲、STTI 値は 17 mm/min。(b) 流涙している子牛の眼周囲、STTI 値は 24 mm/min。

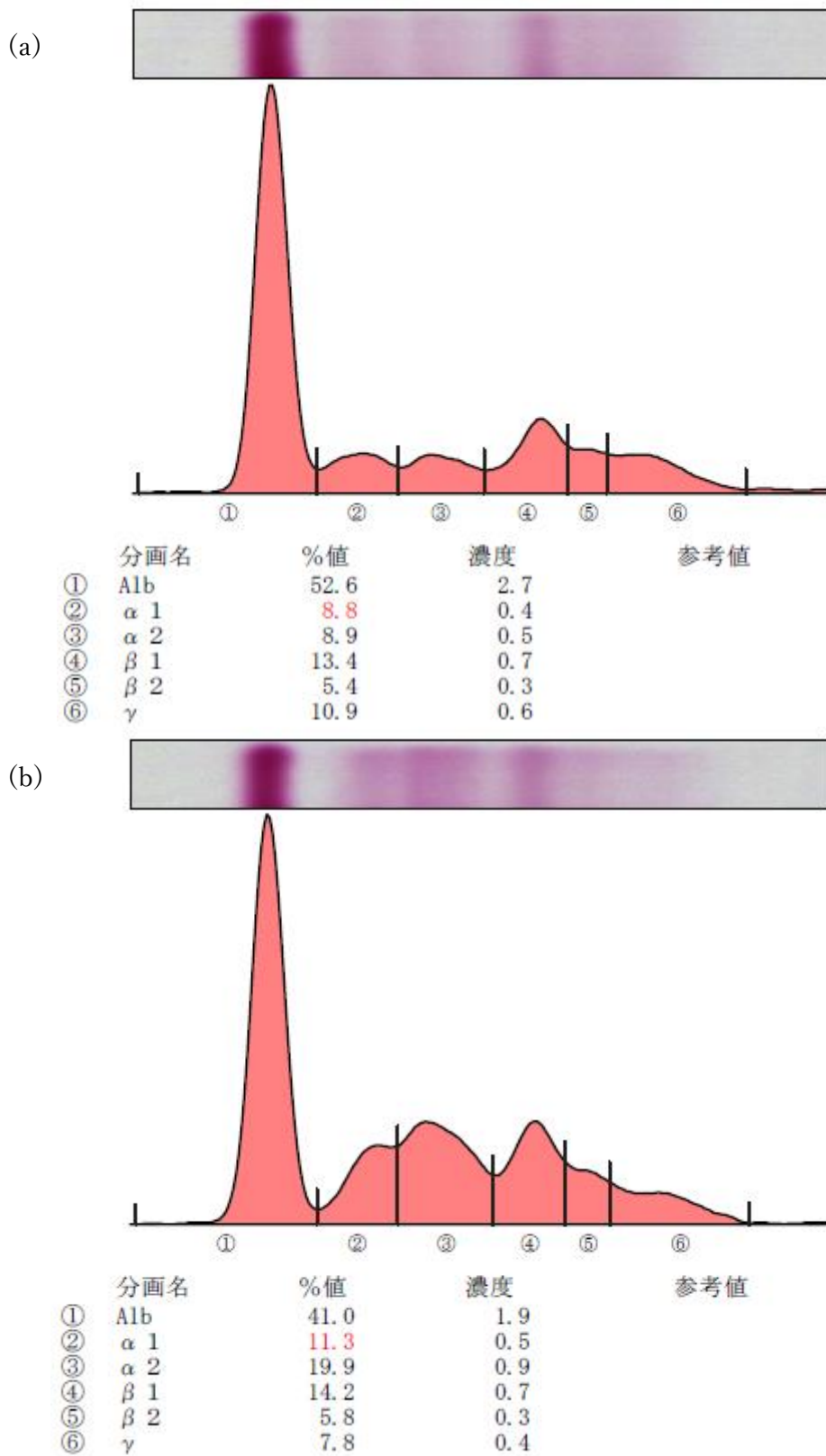


図2. 血清蛋白分画。(a) : 健全子牛、(b) : 急性炎症期である子牛

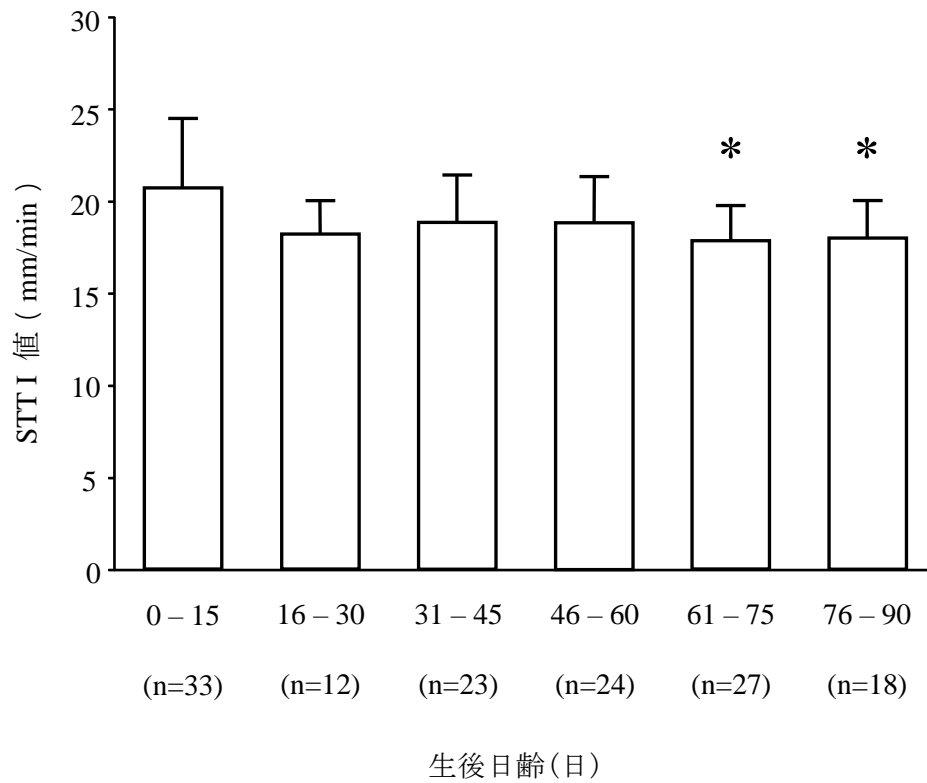


図 3. 生後日齢における STT I 値の比較

生後 15 日齢未満の子牛の STT I 値は生後 61 日齢以降の STT I 値と比較して有意な高値が認められた。

\*生後 15 日齢未満と生後 61 日齢以降について  $P < 0.05$

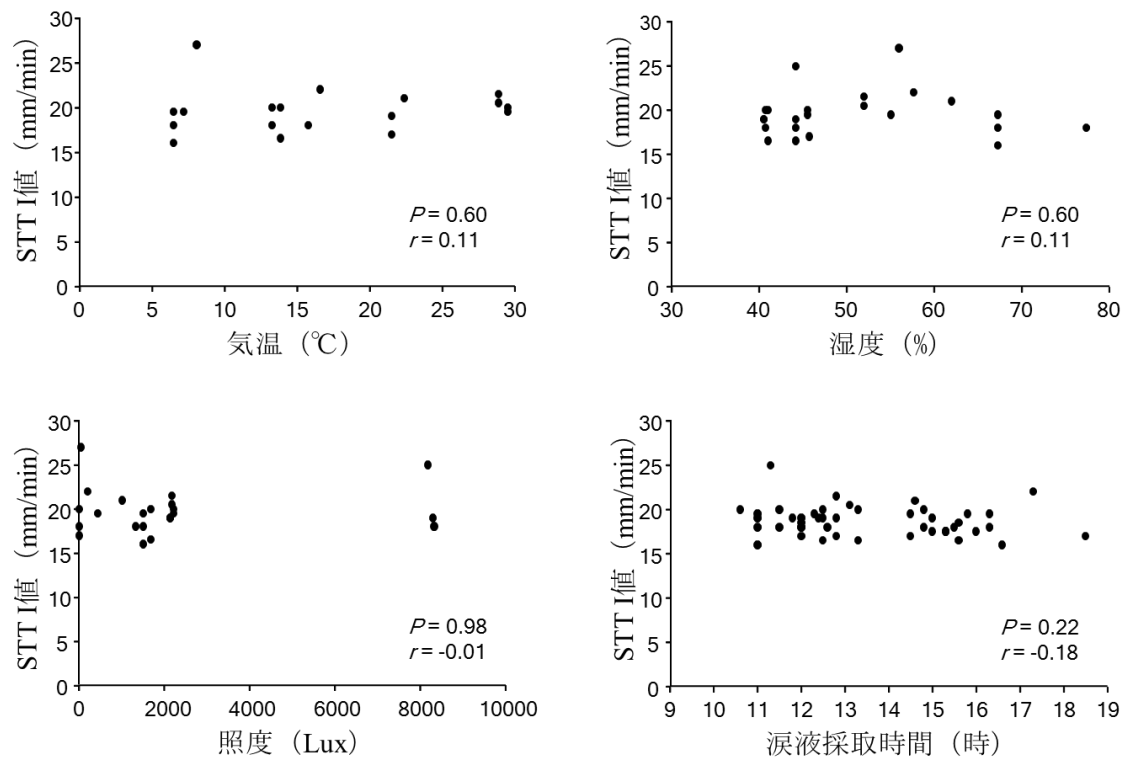


図 4. STT I 値と気温、湿度、照度、涙液測定時間との相関性

STT I 値とそれぞれ気温、湿度、照度、涙液測定時間との間に相関性は認められなかった。

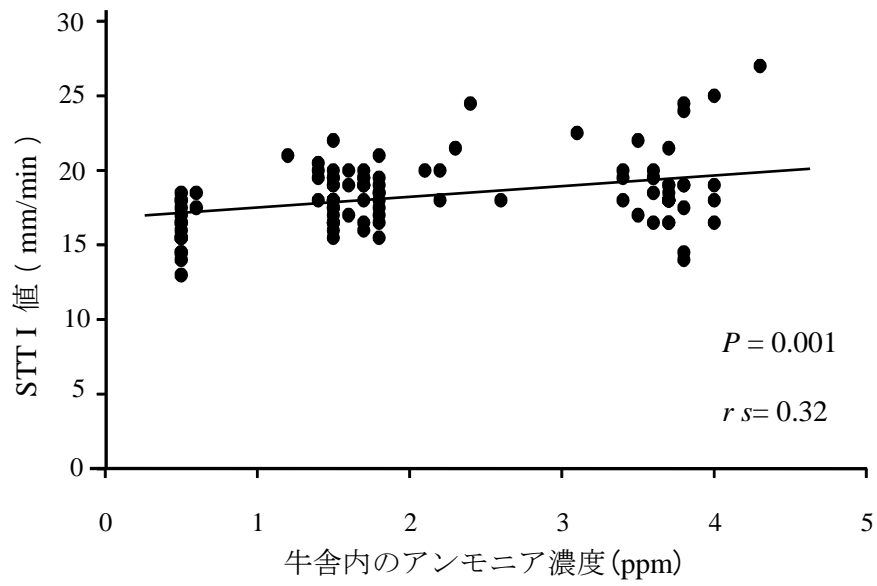


表 5. STTI 値と牛舎内のアンモニア濃度の相関性

STTI 値と牛舎内のアンモニア濃度には正の相関が認められた。 ( $P = 0.001$ ,  $r_s = 0.32$ ).





### 第3章 呼吸器疾病の急性炎症期である黒毛和種子牛の涙液性状

#### 1. 緒言

黒毛和種子牛の呼吸器疾病は、ウイルス感染が先行し、鼻腔内に存在する常在菌等が上気道や肺に侵入することで発症する[47]。近年はワクチン接種や初乳製剤の投与など、感染予防対策を講じているが、依然として呼吸器疾病は消化器疾病に次いで2番目に多い疾病である。呼吸器疾病に罹患した子牛では、発咳、呼吸様式の異常、鼻汁等の症状がみられるものの、畜主の飼養管理時にこれらの症状がみられるとは限らないため、発見が困難となり、往診依頼が遅れることも多い。呼吸器疾病に罹患した黒毛和種子牛の初診時に流涙がみられる子牛（図1）が多いことから呼吸器疾病と涙液量に関連があるのではと考えた。近年、非侵襲的に採取可能な涙液は疾病のバイオマーカーとして、人医療のみならず小動物獣医療においても盛んに研究がされており[8, 23]、腫瘍性疾患や糖尿病などでは涙液中の蛋白成分に変化がみられることが報告されている[8, 12, 21]。眼粘膜は鼻粘膜と同様に外環境に常に曝露しているため、粘膜免疫が深くかかわっている。IgAは粘膜分泌液中に最も多く含まれている免疫グロブリンであり、粘膜表面からの微生物の侵入を阻止する役割を担っている[13, 26]。涙液中では、IgA、ラクトフェリン、リゾチームといった蛋白質が免疫を司っている。本章では、呼吸器疾病に罹患した子牛の急性炎症期を検出する指標として、涙液性状の変化が有用であるのかを検討した。初めに本章の第1節において、呼吸器疾病の子牛のSTTI値と涙液中の蛋白濃度の検討を行い、続く第2節では涙液中の蛋白成分の比較同定解析を行った。また、第3節では涙液中の免疫グロブリン濃度について、子牛に代表的な消化器疾病を含めて評価することで、呼吸器疾病における涙液性状の有用性を検討した。さらに第4節では涙液中の免疫グロブリン濃度の継時的測定を行い、呼吸器疾病の急性炎症期における涙液性状の変化を検討した。

## 第1節 呼吸器疾病の急性炎症期における黒毛和種子牛の STT I 値、ならびに涙液中の総蛋白濃度

呼吸器疾病の急性炎症期と診断した子牛の STT I 値と涙液中の総蛋白濃度を測定し、臨床的に健常な子牛と比較検討した。

### 1-1. 材料及び方法

#### 供試動物

宮城県内で飼養されている生後 15～90 日齢（出生日を 0 日齢）の黒毛和種子牛 125 頭（雄：63 頭、雌：62 頭）を供試した。全ての子牛は、結膜の発赤や腫脹、目視可能な外傷がないこと、牛舎内のアンモニア濃度が 2ppm 以下であることを確認している。また、全ての供試牛は WI BRD Clinical Scoring System [24]を用いて評価した。WI BRD Clinical Scoring System とは、5 つの臨床徴候、眼漏、鼻汁、直腸温、誘発性または自然発生的な発咳、および斜頸や耳の下垂による呼吸器疾病の診断法である。各項目のスコアリングの合計が 5 未満を臨床的に健常な子牛、5 以上を呼吸器疾病に罹患していると判定する。

本研究では、体温 39.5℃以上、頻呼吸等の呼吸様式の異常を認めたもの、ならびに WI BRD Clinical Scoring System にて合計スコアが 5 以上の子牛を呼吸器疾病罹患子牛とした。さらに血清を用いて血清蛋白分画を測定し、 $\alpha_1$ 分画、 $\alpha_2$ 分画が上昇している子牛を呼吸器疾病罹患の急性炎症期とした（表 1）。往診時に臨床症状、ならびに WI BRD Clinical Scoring System にて呼吸器疾病と診断したが、血清蛋白分画において  $\alpha_1$ 分画、 $\alpha_2$ 分画が上昇を認めない、 $\gamma$ 分画の上昇が認められた子牛については除外した。また、対照として体温 39.5℃未満、正常な呼吸様式を呈し、WI BRD Clinical Scoring System の合計スコアが 5 未満の臨床的に健常な子牛を供試した（表 1）。子牛はそれぞれ呼吸器疾病の急性炎症期として 63 頭（雄：33 頭、雌：30 頭）、臨床的に健常な子牛として 62 頭

(雄：30頭、雌：32頭)であった。本研究の実験手順および実験動物の管理扱いについては、宮城県農業共済組合アニマルウェルフェア推進委員会の実験ガイドラインに従い、委員会および動物実験に係わる審査委員会の承認を得た (nm0008)。

## 血液検査

21G 採血針と真空採血管 (ベノジェクト II 真空採血管, TERUMO, 東京, 日本) を用いて、右側頸静脈より採血を行った。採血後は直ちに氷冷し、30 分以内に遠心分離 (3000 ×g、15 分) を行うことで、血清を分離し、血清分画測定まで -30°C で凍結保存した。凍結保存した血清を測定直前に室温で解凍し、血清蛋白分画をアガロースゲル電気泳動 (AGE) で測定した。AGE は、QuickGel SP アガロースゲルキット (Helena Laboratories Japan、埼玉、日本) を使用して、manufacture's instruction に従って以下の方法で行った。血清を 30μl ずつサンプルプレートのウェルにアプライした。サンプルは、アプリーケーター (J653、Helena Laboratories Japan、埼玉、日本) を使用して QuickGel SP に塗布され、ゲルは、QuickGel Chamber P (J678、Helena Laboratories Japan、埼玉、日本) を使用し、20°C、240V で 8 分間、泳動を行った。次に、ポンソー S (J845、Helena Laboratories Japan、埼玉、日本) で 5 分間染色した。5% 酢酸溶液で脱染し、完全に乾燥させた後、QuickScan 濃度計 (J121、Helena Laboratories Japan、埼玉、日本) でゲルのスキャンを行った。QuickScan コンピュータソフトウェアを使用して、レーンを識別し、バックグラウンドを抽出し、各サンプルの濃度測定トレース (電気泳動図) を取得し、各電気泳動図を調べ、ソフトウェアを使用してラベルを付けた。各画分内の相対蛋白質濃度は、吸光度のパーセンテージとして決定され、絶対濃度は、総血清蛋白質濃度を使用して計算を行った。各分画の絶対濃度を表 2 に示した。

この測定により、 $\alpha_1$  分画、 $\alpha_2$  分画について基準比率 ( $\alpha_1$  分画：4.5~9.5%、 $\alpha_2$  分画：8.0~13.5%以上[40]) と比較して有意に上昇しているものを急性炎症期であると判断している。

また、血液生化学検査として血清総蛋白濃度、血清アルブミン濃度、血清アミノトランスフェラーゼ濃度、血清アラニンアミノトランスフェラーゼ濃度、血清総トリグリセリド濃度、血清ナトリウム濃度、血清カリウム濃度、血清クロール濃度を測定して異常が認められないことを確認した（表 2）。完全血球検査（Celltac  $\alpha$ , MEK-6558, 日本光電, 東京, 日本）として、赤血球数、総白血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、平均赤血球ヘモグロビン濃度、平均赤血球ヘモグロビン量を測定し、異常が認められないことを確認した（表 2）。

#### 涙液量の測定

涙液量測定には、涙液量検査試験紙（Schirmer tear test, MERCK Animal Health, NJ, U.S.A）を用いた。測定は、基礎分泌と反射性分泌の両方の分泌による涙液量である Schirmer のテスト第 I 法に準じて行った。試験紙の切れ込み部位を山折りにし、下眼瞼を露出させ、下眼瞼の外側 3 分の 1 の部位に 1 分間静置し、測定を行った。

#### 涙液の採取

涙液の採取は Capillary Micropipettes 10  $\mu$ l（Microcaps, DRUMMOND Scientific company, PA, U.S.A）を用いて行った。Capillary Micropipettes 10  $\mu$ l を 1×1×3 cm に切り出した発泡スチロールに埋め込み、その発泡スチロールを保持した状態で、眼瞼の涙液メニスカスに接触させて毛細管現象にて採取した。採取した涙液は、付属のピペットにて押し出しを行い、スクリータイプのエッペンチューブに保存した。エッペンチューブは、液体窒素素内に入れ、測定まで液体窒素素内で保存した。

#### 涙液中の蛋白質濃度の測定

凍結保存されていた涙液を測定直前に氷冷下にて融解し、Bradford 法により涙液中蛋白質濃度を測定した。測定には、Pierce 660nm Protein Assay Kit（Thermo fisher scientific,

MA, U.S.A) を使用し、manufacture's instruction に従って以下の方法で行った。

96 穴マイクロプレートの各ウェルに牛血清アルブミン (BSA) 標準液 (125, 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000  $\mu\text{g/ml}$ ) 及び融解した涙液を 10  $\mu\text{l}$  ずつ分注した。その後、Protein Assay Reagent を 150  $\mu\text{l}$  ずつアプライし、室温で 1 分間震盪した。その後、室温で 5 分間静置し、マイクロプレートリーダー (BioRad Laboratories, Inc. CA, U.S.A) を用いて、各ウェルの 660 nm の吸光度を測定した。

### 統計処理

結果はすべて平均値  $\pm$  標準偏差で示した。正規性は、Kolmogorov-Smirnov 検定を行った。呼吸器疾病罹患の急性炎症期の子牛と臨床的に健常な子牛の二群間の STTI 値の平均値、ならびに涙液中の総蛋白濃度の平均値を比較するためにウエルチの t 検定を行った。統計処理はすべて危険率 5%未満 ( $P < 0.05$ ) で有意差ありと判定した。

## **1-2. 結果**

### 呼吸器疾病の急性炎症期における子牛の STTI 値

呼吸器疾病罹患子牛の STTI 値は  $22.2 \pm 3.0$  mm/min ( $n=63$ ) であった。臨床的に健常な子牛の STTI 値 ( $18.5 \pm 1.6$  mm/min,  $n=62$ ) と比較して、呼吸器疾病罹患の急性炎症期の子牛では有意な高値が認められた ( $P < 0.001$ , 図 2)。

### 呼吸器疾病の急性炎症期である子牛における涙液中の総蛋白濃度

涙液中の総蛋白濃度について、呼吸器疾病罹患子牛では  $1.85 \pm 0.47$  mg/ml ( $n=63$ )、臨床的に健常な子牛では  $1.15 \pm 0.31$  mg/ml ( $n=62$ ) であった。呼吸器疾病罹患の急性炎症期の子牛では、臨床的に健常な子牛よりも有意な高値が認められた ( $P < 0.001$ , 図 3)。

## 第2節 呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の涙液中蛋白成分

臨床的に健常な子牛と呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した子牛における涙液中蛋白成分の比較検討を行うため、二次元電気泳動を行った。二次元電気泳動の結果から、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の涙液で増加が認められたスポットについて LC-MS/MS による同定解析を行った。

### 2-2. 材料及び方法

#### 供試動物

宮城県内で飼養されている生後 15～90 日齢（出生日を 0 日齢）の黒毛和種子牛 6 頭（雄：3 頭、雌：3 頭）を供試した。呼吸器疾病罹患の急性炎症期として 3 頭（雄：2 頭、雌：1 頭）、臨床的に健常な子牛として 3 頭（雄：1 頭、雌：2 頭）を供試した。全ての子牛は、結膜の発赤や腫脹、目視可能な外傷がないこと、牛舎内のアンモニア濃度が 2ppm 以下であることを確認している。それぞれの WI BRD Clinical Scoring System によるスコアを表 3、血液検査結果ならびに血清蛋白分画は表 4 に記載した。呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の STT I 値は  $24.5 \pm 3.0$  mm/min (n=3)、臨床的に健常な子牛の STT I 値は  $17.3 \pm 1.3$  mm/min (n=3) であった。二次元電気泳動に用いたプール涙液の総蛋白濃度は、呼吸器疾病の子牛で 1.92 mg/ml、臨床的に健常な子牛で 1.38 mg/ml であった。本研究の実験手順および実験動物の管理扱いについては、宮城県農業共済組合アニマルウェルフェア推進委員会の実験ガイドラインに従い、委員会および動物実験に係わる審査委員会の承認を得た (nm0008)。

#### 二次元電気泳動

質量分析、およびスポットの同定はアナテック株式会社（東京、日本）に依頼した。健常子牛 (n=3) と呼吸器疾病罹患の急性炎症期の子牛 (n=3) の涙液をプール涙液とし

て用いた。涙液は-70℃にて凍結保存しておき、測定直前に室温にて融解し、攪拌した後、蛋白量を 90 $\mu$ g になるようにサンプルを調整した。サンプルの調整後、サンプルの液量の 10 倍量の氷冷アセトンを追加・攪拌し、冷蔵庫内で 60 分間静置した。15,000rpm、4℃、20 分にて遠心した後、アセトンを除去し、風乾し 50 $\mu$ l の抽出液を追加・可溶化した後、回収した全量(50 $\mu$ l)をその後の測定に用いた。抽出液として、尿素 7M, 2.1g、チオ尿素 2M, 0.76g、CHAPS32.5mM, 0.1g、DTT0.1M, 0.077 g、ファルマライト 2.5%, 125 $\mu$ l を混合したものを使用した。

まず、一次元電気泳動として、イモビラインドライストリップ (18cm タイプ、pH3-10NL、GE Healthcare, Chalfont St. Giles, Buckinghamshire, UK) を用いて、膨張液にて 8 時間静置膨潤した。膨潤液は尿素 7M, 4.2g、チオ尿素 2M, 1.52 g、20% Triton を 2%, 1.0ml、DTT0.1M, 0.154g、ファルマライト 2.5%, 250 $\mu$ l、0.1M 酢酸を 25mM, 250 $\mu$ l、0.1%BPB を 200 $\mu$ l を混合したものである。サンプルを試料塗布濾紙に 50 $\mu$ l アプライし、イモビラインドライストリップ上の塩基側にセットした。等電点電気泳動として、500V にて 2 時間、500~3500V まで 3 時間、3500V で 10 時間の通電を行った。等電点電気泳動後に、SDS 処理液を用いて 30 分間振盪した。12.5%ポリアクリルアミドゲルに、イモビラインドライストリップゲルをセットし、SDS-PAGE 電気泳動を 3 時間の泳動時間で行った。泳動後のゲルは、40%メタノールと 10%酢酸溶液の固定液にて 30 分間固定し、SYPRO Ruby 染色液にて 90 分間、その後、10%メタノールと 70%酢酸溶液の脱色液にて 30 分間振盪を行った。振盪後に、フルオロホレスター3000 (アナテック株式会社, 東京, 日本) にて撮影を行った。画像解析には二次元電気泳動専用解析ソフトウェア (SameSpots) を用いて行った。呼吸器疾病罹患の急性炎症期の涙液画像を基準画像として、通常撮影時間 5 秒の画像データを使用した。画像解析ソフトウェアにて自動機能によるスポットマッチング操作を行い、25kDa 付近は手動にてスポットマッチング操作を行った。



## 質量分析

検出したスポットから臨床的に健常な子牛と比較して呼吸器疾病の急性炎症期である子牛において有意に上昇しているスポットについて、フルオロホレスター3000（アナテック株式会社）を用いて、1.8Φmmのゲルピッカーを使用して切り出しを行った。二次元電気泳動ゲルを、ゲルサポートプレートにセットし、切り出しを行い、切り出したゲルはそれぞれ1.5ml エッペンチューブに100μlの蒸留水とともに入れ、リライオン社に同定解析を依頼した。スポットの解析はLC-MS/MSにより解析をおこなった。ProGest（DigiLab、IL、U.S.A）を使用し、切り出したゲルスポットを25mMの重炭酸アンモニウム、続いてアセトニトリルで洗浄し、60°Cで10mMのジチオトレイトールで還元した後、RTで50mMのヨードアセトアミドでアルカリ化した。ゲルを37°C、4時間トリプシンで消化し、ギ酸でクエンチした後、分析を行った。スポットに由来するトリプシンペプチドで記録されたすべてのLC-MS/MSスペクトルを、MASCOT検索プログラムを使用してNCBI Inrデータベースからシーケンスされたタンパク質に対して検索した。ゲル消化物は、ThermoFisher Q Exactiveに接続されたウォーターズのNaniAcquity HPLCシステムを使用したナノLC-MS/MSにより分析を行った。

## **2-2. 結果**

### 二次元電気泳動

二次元電気泳動により、臨床的に健常な子牛において蛋白質のスポットは自動スポット検出にて2,270個のスポットが検出され、スポットの大きさが200以下のものを削除、残りのスポット1,474個を手動によるスポットの確認を行ったところ、最終的に1,329個のスポットを検出した（図4、図5）。呼吸器疾病の急性炎症期の子牛において臨床的に健常な子牛と比較して蛋白質のスポットが二倍以上に増加しているものは49個であった（表5）。また、25kDa付近が最も変動しているスポット数が多かった。

### 質量分析

呼吸器疾病の急性炎症期である子牛で有意に増加していた 25kDa 付近の蛋白質のスポットのうち、図 6、図 7 に示した Spot\_1257、Spot\_2402、Spot\_2405 のスポットを切り出し、同定解析を行った。それぞれのスポットの同定解析の結果は表 6 に示した。分子量は、Spot\_1257 では 31kDa、Spot\_2402 では 24kDa、Spot\_2405 では 28kDa であった。LC-MS/MS により、それぞれのスポットについてトリプシン消化を行い、得られたペプチド断片を SpC(スペクトルカウント)と表わした。Spot\_1257 は、SpC が 3 の Uncharacterized protein(分子量：21kDa)、SpC が 2 の Clusterin (分子量：51kDa) が検出されたが、SpC が低く、また coverage も低かった (図 8)。Spot\_2402 については、分子量 27kDa の Uncharacterized protein と 26kDa の Uncharacterized protein が検出され、いずれも SpC は 8 であった。また、それぞれの coverage は 29%と 31%との結果が得られた。アミノ酸配列より、免疫グロブリン L 鎖の可能性が示唆された (図 9)。Spot\_2405 は、予想される分子量は 28kDa であったが、Desmoplakin (分子量：332kDa) が検出され、SpC は 23、coverage は 6%であった。

### 第3節 呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の涙液中免疫グロブリン濃度

呼吸器疾病の急性炎症期である子牛、臨床的に健常な子牛、ならびに子牛に代表的な疾病である消化器疾病の子牛における涙液中の免疫グロブリン濃度を ELISA にて測定し、呼吸器疾病における涙液中の免疫グロブリンの変化を検討した。

#### 3-1. 材料及び方法

##### 供試動物

宮城県内で飼養されている生後 15～90 日齢（出生日を 0 日齢）の黒毛和種子牛 73 頭（雄：38 頭、雌：35 頭）を供試した。呼吸器疾病罹患の急性炎症期として 32 頭（雄：16 頭、雌：16 頭）、臨床的に健常な子牛として 35 頭（雄：20 頭、雌：15 頭）供試した。また、頻呼吸等の呼吸様式の異常を認めず、WI BRD Clinical Scoring System の合計スコアが 5 未満で呼吸器疾病に罹患していないと判断でき、茶褐色～赤褐色の下痢便を排出し、消化器疾病に罹患している子牛を 6 頭（雄：2 頭、雌：4 頭）用いた。消化器疾病については、糞便検査を行い、コクシジウムのオーシストを顕微鏡にて確認をしている。全ての子牛は、結膜の発赤や腫脹、目視可能な外傷がないこと、牛舎内のアンモニア濃度が 2ppm 以下であることを確認している。それぞれの WI BRD Clinical Scoring System によるスコアは表 7、血液検査結果、ならびに血清蛋白分画は表 8 に記載した。本研究の実験手順および実験動物の管理扱いについては、宮城県農業共済組合アニマルウェルフェア推進委員会の実験ガイドラインに従い、委員会および動物実験に係わる審査委員会の承認を得た（nm0008）。

##### IgA 濃度の測定

涙液中、血清中の IgA 濃度の測定には、サンドイッチ ELISA 法にて Bovine IgA ELISA Kit（Bethyl Laboratories, AL, U.S.A）を使用し、manufacture's instruction に従って以下の

方法で行った。凍結しておいた涙液、ならびに血清は、測定直前に氷冷下にて融解した。融解した涙液は 50000 倍希釈、血清は 500 倍希釈し、測定に使用した。96 穴マイクロプレートの各ウェルに IgA 標準液 (0, 1.37, 4.1, 12.3, 37, 111.1, 333.3 ng/ml) 、及び 50000 倍希釈した涙液、500 倍希釈した血清をそれぞれ 100  $\mu$ l ずつ分注した。プレートをシールし、室温で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、洗浄液で 4 回洗浄した。その後、各ウェルに anti-IgA Detection Antibody を 100  $\mu$ l ずつ分注した。プレートをシールし、室温にて 1 時間インキュベートし、インキュベート後に 4 回洗浄液で洗浄し、各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ HRP を分注した。プレートをシールし、室温で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、洗浄液で 4 回洗浄し、各ウェルに TMB Substrate Solution を 100  $\mu$ L ずつ分注した。室温暗所で 30 分間、インキュベートした。インキュベート後、各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ Stop Solution を分注した。マイクロプレート分光光度計 (モレキュラーデバイスジャパン株式会社, 東京, 日本) を用いて、各ウェルの 450 nm の吸光度を測定した。

#### Haptoglobin 濃度の測定

血清中の Haptoglobin 濃度の測定には、サンドイッチ ELISA 法にて Bovine Haptoglobin ELISA Kit (Life Diagnostics, Inc., PA,U.S.A) を使用し、manufacture's instruction に従って以下の方法で行った。凍結しておいた血清は、測定直前に融解した。融解した血清は、2000 倍希釈し、測定に用いた。96 穴マイクロプレートの各ウェルに Haptoglobin 標準液 (0, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125, 250 ng/ml) 、2000 倍希釈した血清を 100  $\mu$ l ずつアプライした。マイクロプレートシェーカーを用いて、室温にて 45 分間インキュベートした。インキュベート後、一つのウェルについて 400  $\mu$ l ずつ Wash Solution を使用して 5 回洗浄した。その後、enzyme conjugate reagent をそれぞれのウェルに 100  $\mu$ l ずつアプライし、室温で 45 分間、マイクロプレートシェーカーにてインキュベートした。インキュベート後は、6 回洗浄を行った。TMB Reagent を 100  $\mu$ l ずつそれぞれのウェルにアプライし、

20 分間室温でマイクロプレートシェーカーにてインキュベートした。Stop Solution を 100  $\mu$ l ずつウェルにアプライし、マイクロプレートリーダー（モレキュラーデバイスジャパン株式会社, 東京, 日本）を用いて、各ウェルの 450 nm の吸光度を測定した。

### IgG 濃度の測定

涙液中の IgG 濃度の測定には、サンドイッチ ELISA 法にて Bovine IgG ELISA Kit (Abnova, Taipei, Taiwan) を使用し、manufacture's instruction に従って以下の方法で行った。Kit は使用前までに室温に戻しておいた。凍結しておいた涙液は、測定直前に氷冷下にて融解した。融解した涙液は 5000 倍希釈にし、測定に使用した。96 穴マイクロプレートの各ウェルに IgG 標準液 (0, 3.13, 6.25, 12.50, 25, 50, 100 ng/ml) 5000 倍希釈した涙液を 100  $\mu$ l ずつアプライした。プレートをカバーにて覆い、室温で 30 分間、インキュベートを行った。インキュベート後に各ウェルの分注したものを吸引し、Wash Solution を用いて、4 回洗浄した。Enzyme-Antibody Conjugate をそれぞれのウェルに 100  $\mu$ l ずつアプライし、室温暗所にて 10 分間、インキュベートした。その後、Wash Solution を用いて、4 回洗浄し、TMB Substrate Solution を 100  $\mu$ l ずつアプライし、再度、室温暗所にて 10 分間、インキュベートを行った。10 分後、Stop Solution を各ウェルに 100  $\mu$ l ずつアプライし、マイクロプレートリーダー（モレキュラーデバイスジャパン株式会社, 東京, 日本）を用いて、各ウェルの 450 nm の吸光度を測定した。

### 統計処理

結果はすべて平均値  $\pm$  標準偏差で示した。正規性は、Kolmogorov-Smirnov 検定を行った。健常子牛、呼吸器疾病の急性炎症期の子牛、消化器疾病の子牛の三群間の涙液中の IgA 濃度の平均値の比較、血清中の IgA 濃度の平均値の比較、ならびに血清中の Haptoglobin 濃度の平均値の比較をするために、一元配置分散分析を用いて有意性を調べた。有意であった場合、有意差検定は Tukey-kramer 法の多重比較法を用いた。涙液

中の IgG 濃度について、健常子牛と呼吸器疾病の急性炎症期の子牛、消化器疾病の子牛の三群間での比較を行うため、クラスカル・ワーリスの順位を用いた。また、涙液中に含まれる IgA 濃度と IgG 濃度の相関性、涙液中の IgA 濃度と血清中の IgA 濃度の相関性を評価するためにピアソンの相関係数を用いて算出した。

統計処理はすべて危険率 5%未満 ( $P < 0.05$ ) で有意差ありと判定した。

### 3-2. 結果

#### STTI 値

本研究に供試した子牛の STTI 値の結果を図 10 に示した。臨床的に健常な子牛の STTI 値は  $18.6 \pm 4.0$  mm/min ( $n=35$ ) であった。呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の STTI 値は  $23.2 \pm 3.0$  mm/min ( $n=32$ ) で、臨床的に健常な子牛の STTI 値と比較して有意な高値が認められた ( $P < 0.001$ )。消化器疾病の STTI 値は  $19.8 \pm 1.7$  mm/min ( $n=6$ ) で、臨床的に健常な子牛の STTI 値と有意な差はみられなかった ( $P=0.45$ )。

#### 涙液中の IgA 濃度

涙液中の IgA 濃度の結果を図 11 に示した。臨床的に健常な子牛の涙液中の IgA 濃度は  $0.31 \pm 0.27$  mg/ml ( $n=21$ ) であった。呼吸器疾病の急性炎症期の子牛では  $0.98 \pm 0.32$  mg/ml ( $n=32$ ) であり、健常子牛と比較して、有意な高値が認められた ( $P < 0.001$ )。また、消化器疾患の子牛については  $0.07 \pm 0.04$  mg/ml ( $n=6$ ) であり、健常子牛と比較して有意な低値が認められた ( $P=0.04$ )。

#### 血清中の IgA 濃度

血清中の IgA 濃度の結果を図 12 に示した。呼吸器疾病の急性炎症期の子牛では  $0.14 \pm 0.08$  mg/ml ( $n=21$ ) であり、健常子牛で  $0.13 \pm 0.1$  mg/ml ( $n=28$ )、消化器疾患の子牛では  $0.13 \pm 0.07$  mg/ml ( $n=6$ ) であり、3 群間に有意な差はみられなかった ( $P=0.08$ )。

#### 涙液中の IgG 濃度

涙液中の IgG 濃度の結果を図 13 に示した。呼吸器疾病の急性炎症期の子牛において

78.7±42.9 ng/ml (n=14)、健常子牛において、80.1±39.4 ng/ml (n=19) であり、消化器疾病の子牛では 91.0±38.8 ng/ml (n=6) であり、三群間に有意な差はみられなかった ( $P=0.71$ )。

#### 血清中の Haptoglobin 濃度

血清中の Haptoglobin 濃度は、健常子牛では 0.67±0.66 µg/ml (n=21)、呼吸器疾病の急性炎症期の子牛で 165.7±138.5 µg/ml (n=28) であった (図 14)。消化器疾病の子牛における血清中の Haptoglobin 濃度は 66.1±46.1 µg/ml (n=6) であった。呼吸器疾病の急性炎症期である子牛、ならびに消化器疾病の子牛では健常子牛と比較して有意な高値が認められた ( $P=0.003$ )。

#### 涙液中の IgA 濃度と血清中の IgA 濃度、および涙液中の IgA 濃度と IgG 濃度の相関性

図 15 に結果を示した。血清中の IgA 濃度、涙液中の IgG 濃度は、それぞれ涙液中の IgA 濃度との相関性はみられなかった。

## 第4節 呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の涙液性状の変化

涙液採取時には臨床的に健常な子牛であると評価した子牛と、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断するまで継時的に涙液採取を行った子牛の涙液中の免疫グロブリン濃度の測定を行った。

### 4-1. 材料及び方法

#### 供試動物

宮城県内で飼養されている生後 15～90 日齢（出生日を 0 日齢）の涙液採取時には体温 39.5℃未満、頻呼吸等の呼吸様式の異常を認めず、血清蛋白分画や血清中の Haptoglobin 濃度から臨床的に健常な黒毛和種子牛と評価した 9 頭（雄：6 頭、雌：3 頭）を供試した。供試した子牛のうち 2 頭は、継時的な涙液採取を毎日行い、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断されるまで行った。4 日間涙液採取を行った子牛を子牛 A、3 日間採取を行った子牛を子牛 B とした。血液検査結果は図 16 に示した。体温 39.5℃以上、頻呼吸等の呼吸様式の異常、WI BRD Clinical Scoring System で合計スコアが 5 以上、血清蛋白分画の  $\alpha_1$  分画、 $\alpha_2$  分画が上昇している子牛を呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した。全ての子牛は、結膜の発赤や腫脹、目視可能な外傷がないこと、牛舎内のアンモニア濃度が 2ppm 以下であることを確認している。本研究の実験手順および実験動物の管理扱いについては、宮城県農業共済組合アニマルウェルフェア推進委員会の実験ガイドラインに従い、委員会および動物実験に係わる審査委員会の承認を得た（nm0008）。

#### IgA 濃度の測定

涙液中、血清中の IgA 濃度の測定には、サンドイッチ ELISA 法にて Bovine IgA ELISA Kit（Bethyl Laboratories, AL, U.S.A）を使用し、manufacture’s instruction に従って以下の方法で行った。凍結しておいた涙液、ならびに血清は、測定直前に氷冷下にて融解した。



融解した涙液は 50000 倍希釈、血清は 500 倍希釈し、測定に使用した。96 穴マイクロプレートの各ウェルに IgA 標準液 (0, 1.37, 4.1, 12.3, 37, 111.1, 333.3 ng/ml) 、及び 50000 倍希釈した涙液、500 倍希釈した血清をそれぞれ 100  $\mu$ l アプライした。プレートをシールし、室温で 1 時間インキュベートした。インキュベート後、洗浄液で 4 回洗浄した。その後、各ウェルに anti-IgA Detection Antibody を 100  $\mu$ l ずつ分注した。プレートをシールし、室温にて 1 時間インキュベートし、インキュベート後に 4 回洗浄液で洗浄し、各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ HRP を分注した。プレートをシールし、室温で 30 分間インキュベートした。インキュベート後、洗浄液で 4 回洗浄し、各ウェルに TMB Substrate Solution を 100  $\mu$ L ずつ分注した。室温暗所で 30 分間、インキュベートした。インキュベート後、各ウェルに 100  $\mu$ l ずつ Stop Solution を分注した。マイクロプレートリーダー (モレキュラーデバイスジャパン株式会社, 東京, 日本) を用いて、各ウェルの 450 nm の吸光度を測定した。

#### 血清中の Haptoglobin 濃度の測定

血清中の Haptoglobin 濃度の測定には、サンドイッチ ELISA 法にて Bovine Haptoglobin ELISA Kit (Life Diagnostics, Inc., PA,U.S.A) を使用し、manufacture's instruction に従って以下の方法で行った。凍結しておいた血清は、測定直前に融解した。融解した血清は、2000 倍希釈し、測定に用いた。96 穴マイクロプレートの各ウェルに Haptoglobin 標準液 (0, 7.8, 15.6, 31.25, 62.5, 125, 250 ng/ml) 、2000 倍希釈した血清を 100  $\mu$ l アプライした。マイクロプレートシェーカーを用いて、室温にて 45 分間インキュベートした。インキュベート後、一つのウェルについて 400  $\mu$ l ずつ Wash Solution を使用して 5 回洗浄した。その後、enzyme conjugate reagent をそれぞれのウェルに 100  $\mu$ l ずつアプライし、室温で 45 分間、マイクロプレートシェーカーにてインキュベートした。インキュベート後は、6 回洗浄を行った。TMB Reagent を 100  $\mu$ l ずつそれぞれのウェルにアプライし、20 分間室温でマイクロプレートシェーカーにてインキュベートした。Stop Solution を 100  $\mu$ l ず

つウェルにアプライし、マイクロプレートリーダー（モレキュラーデバイスジャパン株式会社，東京，日本）を用いて、各ウェルの 450 nm の吸光度を測定した。

#### 統計処理

結果はすべて平均値 ± 標準偏差で示した。正規性は、Kolmogorov-Smirnov 検定を行った。本節で用いた臨床的に健常な子牛の STTI 値と 2 章での臨床的に健常な子牛の STTI 値の平均値の 2 群間の差の検定を行うために、student の t 検定を行った。本節で用いた臨床的に健常な子牛と 3-3 での臨床的に健常な子牛の涙液中の IgA 濃度の平均値の 2 群間の差の検定を行うために、student の t 検定を行った。

統計処理はすべて危険率 5%未満 ( $P < 0.05$ ) で有意差ありと判定した。

#### **4-2. 結果**

供試した 7 頭の子牛は涙液採取後、数日以内に発熱や頻呼吸等の呼吸様式の異常、WIRB Clinical Scoring system における合計スコアが 5 以上であることが認められた（表 9）。

#### STTI 値

STTI 値は  $20.9 \pm 4.6$  mm/min ( $n=7$ ) と第 2 章の臨床的に健常な子牛の STTI 値 ( $18.9 \pm 2.9$  mm/min) と比較して高値を示した（図 17）。

継時的に測定した STTI 値の結果を図 18 に示した。4 日間 STTI 値を測定した子牛を子牛 A、3 日間 STTI 値を測定した子牛を子牛 B とした。子牛 A は、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断する 3 日前に STTI 値が 21 mm/min を示し、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した際に再度 STTI 値は 28 mm/min と高値であった。子牛 B は、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断する 2 日前に STTI 値が 20 mm/min で、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した際に 24 mm/min であった。

#### 涙液中の IgA 濃度

臨床的に健常な子牛の涙液中の IgA 濃度は  $0.99 \pm 0.08$  mg/ml (n=7) で第 3 節の臨床的に健常な子牛の涙液中の IgA 濃度 ( $0.31 \pm 0.27$  mg/ml) と比較して高値を示した(図 19)。継時的の涙液採取を行った子牛 A、子牛 B の涙液中の IgA 濃度の結果を図 20 に示した。子牛 A では、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断する 3 日前に涙液中の IgA 濃度は 1.92 mg/ml で、急性炎症期であると診断した際に 1.76 mg/ml であった。子牛 B では、涙液中 IgA 濃度は、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断する 2 日前に 1.94 mg/ml で、急性炎症期であると診断した際に 1.79 mg/ml と再び高値であった。

#### 血清中の Haptoglobin 濃度

臨床的に健常な子牛の血清中の Haptoglobin 濃度は低値 ( $1.83 \pm 0.98$   $\mu$ g/ml, n=7) であった(図 21)。継時的に測定を行った 2 頭の子牛の血清中の Haptoglobin 濃度はいずれも低値で推移し、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した際に高値を示した(図 22)。

## 2. 考察

呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の STT I 値は  $22.2 \pm 3.0$  mm/min (n=63) であり、臨床的に健常な子牛の STT I 値と比較し、有意な高値であった。涙液は主涙腺や副涙腺から分泌される細胞外液により形成される水層、マイボーム腺から分泌される脂質から構成される油層、結膜杯細胞から分泌される粘液により構成されるムチン層の 3 層で構成されている。また、分泌した涙液は、上下の涙点を通り涙小管、涙囊、鼻涙管と辿り、鼻腔へと排出されるため[45]、流涙症は涙液の産生増加、もしくは鼻涙管からの排出低下によって引き起こされる[42,43]。涙液産生増加の原因として、上気道感染症、アレルギー性鼻炎、アレルギー性結膜炎、ドライアイ、睫毛乱生が挙げられる。また、結膜や角膜への刺激を引き起こす疾病(角膜上皮剥離やびらん、異物、感染性結膜炎、刺激性化学物質等)は、涙液産生を増加させる可能性がある[42]。上気道感染症では、持続的に鼻粘膜への刺激、および炎症が生じることにより涙液産生が増加する[42]。本研究に

供試した呼吸器疾病の急性炎症期である子牛では、健常子牛と比較して STTI 値の有意な高値が認められたが、これは上気道感染が原因であると考えられた。

一方で、鼻涙管からの排出の低下は、炎症産物による鼻涙管の閉塞によって起こる[43]。鼻涙管の閉塞に起因した流涙症は犬や馬に多発するが、牛の鼻涙管開口部は外鼻孔に存在し、鼻涙管と骨性の鼻涙管腔が大きいいため、成牛では鼻涙管閉塞による流涙症は起こらない[43]。これは成牛に関する報告であり、子牛の鼻涙管閉塞を原因とする流涙症については報告がなく、本研究においてもフルオレセイン染色を用いた涙液排出速度は測定していないことから、呼吸器疾病の子牛の STTI 値に鼻涙管の閉塞が影響していたかは不明である。

呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の涙液中の総蛋白濃度 ( $1.85 \pm 0.47$  mg/ml, n=63) においては、臨床的に健常な子牛 ( $1.15 \pm 0.31$  mg/ml, n=62) と比較して有意な高値が認められた。涙液中の蛋白質には **Regulated protein** と **Constitutive protein** が含まれる[45]。**Regulated protein** であるリゾチームやラクトフェリンは、合成後に貯蔵され、刺激を受けると放出される[45]。**Regulated protein** は細胞外から神経刺激を受けると、細胞内のセカンドメッセンジャーレベルが上昇し、分泌顆粒が細胞膜と融合して蛋白の分泌が起こる[44]。刺激の強さに従って、セカンドメッセンジャーレベル、ならびに蛋白分泌量が決定する。つまり、刺激が強いほど、**Regulated protein** の分泌量は増加する。一方、**Constitutive protein** に含まれる IgA は、細胞内における蛋白質の産生量に依存して合成され、貯蔵されることなく、分泌される。呼吸器疾病の急性炎症期である子牛は、鼻粘膜への刺激や炎症により涙液産生が増加し、**Regulated protein** の分泌量は増加すると考えられる。**Regulated protein** の分泌量が増加すると細胞内の蛋白産生量が増加するため、**Constitutive protein** の合成が亢進し、その結果、呼吸器疾病の急性炎症期の子牛では涙液中の総蛋白濃度が上昇したと考えられた。

臨床的に健常な黒毛和種子牛の涙液には 1,329 個の蛋白質成分が検出された (図 5)。人の涙液中に含まれる蛋白成分を二次元電気泳動によって解析した研究では、1,175 個

の蛋白成分が検出されており [9, 17]、黒毛和種子牛の涙液中の蛋白成分は人と同程度に多様であった。臨床的に健常な子牛と呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の涙液の二次元電気泳動像を比較検討したところ、急性炎症期の子牛において 49 個の蛋白質のスポットが有意に増加していることが明らかになった (表 5)。それらのスポットのうち、Spot\_1257、Spot\_2402、Spot\_2405 を LC-MS/MS によって同定解析を行った (表 6, 表 7)。その結果、予想される分子量はそれぞれ Spot\_1257 では 31kDa、Spot\_2402 では 24kDa、Spot\_2405 では 28kDa であった。Spot\_1257 は、SpC (スペクトルカウント) が 3 の Uncharacterized protein (分子量: 21kDa)、SpC が 2 の Clusterin (分子量: 51kDa) が検出された。牛の蛋白アミノ酸配列のデータベースと照合した結果、予想される分子量とは異なるが、Lipocalin の一部である可能性が示唆された。予想される分子量は 31kDa であるため、Clusterin とは異なる蛋白質と考えられた (図 8)。Spot\_2402 では分子量 27kDa の Uncharacterized protein と 26kDa の Uncharacterized protein について SpC が 8 であり、牛の蛋白アミノ酸配列のデータベースと照合した結果、免疫グロブリンの L 鎖である可能性が示唆された (図 9)。Spot\_2405 については予想される分子量 25kDa とは大きく異なる分子量 332kDa の Desmoplakin が同定されたが、分子量が 332kDa と明らかに異なるため、Desmoplakin に含まれるアミノ酸配列をもった他の蛋白質と考えられた。

血中に最も多く含まれている免疫グロブリンは IgG であるのに対して、粘膜免疫を主とする鼻粘膜や眼粘膜では IgA が、主に機能する。涙液中の含まれている IgA は主な Constitutive Protein であるため、本研究で同定を試みた。Spot\_2402 は IgA の L 鎖の一部である可能性が示唆された。

呼吸器疾病の急性炎症期である子牛において、涙液中の免疫グロブリンが変化していると推察されたことから、涙液中の IgA と IgG 濃度を評価した。免疫グロブリンには、他にも IgM や IgD が含まれるが、涙液中の IgM や IgD はごく微量、もしくは存在しないとの報告があることから [1, 32]、本研究では検討を行わなかった。また、IgA 以外に

眼粘膜の免疫を司っている蛋白成分にはリゾチームやラクトフェリンが存在する。しかし、リゾチームは成牛の眼粘膜には含まれておらず[28]、二次元電気泳動の結果から 25kDa 付近の蛋白に顕著な変動がみられたため、78kDa のラクトフェリンの評価は行われなかった。本研究において、涙液中の IgG 濃度は呼吸器疾病の急性炎症期の子牛において  $78.7 \pm 42.9$  ng/ml (n=14) であり、臨床的に健常な子牛 ( $80.1 \pm 39.4$  ng/ml, n=19)、ならびに消化器疾病の子牛 ( $91.0 \pm 38.8$  ng/ml, n=6) と比較して、有意な差はみられなかった。細菌やウイルスの感染が起こると、体内では、抗原認識を経て抗体、感作リンパ球が産生されることで獲得免疫が起こる[46]。外界と接している粘膜は、感染が起きる際に最初に免疫応答が起きる組織である。これらの粘膜組織では、粘膜免疫による免疫応答を行っており、IgA が重要な役割を担っているため、IgG 濃度には変化がみられず、IgA のみが上昇したと推察された。

急性炎症期の蛋白質として、CRP、血清アミロイド A、Haptoglobin 等が存在するが、その中でも Haptoglobin は、呼吸器病や消化器疾病等の炎症に有用なマーカーと報告されている[6, 25, 29]。成牛の血清中の Haptoglobin 濃度の基準範囲は 47  $\mu$ g/ml 以下であり[16, 30]、本研究に供試した呼吸器疾病の急性炎症期である子牛 ( $165.7 \pm 138.5$   $\mu$ g/ml, n=28) と消化器疾病に罹患している子牛 ( $66.1 \pm 46.1$   $\mu$ g/ml, n=6) の Haptoglobin 濃度には明らかな高値が認められ、急性炎症期であることが確認された (図 14)。また血清蛋白分画の結果からも急性炎症期であることが確認された (表 8)。

涙液中の IgG 濃度は健常子牛、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛、ならびに消化器疾病の子牛の三群間に有意な差は認められなかったことから、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の涙液において示唆された免疫グロブリン量の増加は IgA が主体であると考えられた。

涙液採取時は、体温は 39.5°C 未満、頻呼吸等の呼吸様式に異常は認めず、血清蛋白分画や血清中の Haptoglobin 濃度から臨床的に健常な子牛であると評価したにも関わらず、涙液中の IgA 濃度に明らかな上昇が認められた個体について、追跡調査を行った。その

結果、涙液採取後の数日以内に発熱や頻呼吸等の呼吸様式の異常、WI BRD Clinical Scoring system における合計スコアが 5 以上への上昇といった呼吸器疾病の急性炎症期を示唆する状態への変化が認められた（表 9）。これらの子牛では、涙液採取時に上気道や結膜・角膜の眼粘膜への刺激により涙液中の IgA 濃度は上昇していた可能性が考えられた。そのため、臨床的に健常である子牛（子牛 A, 子牛 B）において、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断されるまでそれぞれ経時的に涙液の採取を行った。STT I 値は第 2 章における STT I 値と同様な値で推移していた。しかし、子牛 A では、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断する 3 日前に STT I 値は 21 mm/min、涙液中の IgA 濃度は 1.92 mg/ml といずれも高値であった。そして、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した際の STT I 値は 28 mm/min、涙液中 IgA 濃度は 1.76 mg/ml であった（図 17、図 18）。子牛 B は、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断する 2 日前の STT I 値は 20 mm/min、涙液中の IgA 濃度は 1.94 mg/ml と高値であった（図 17、図 18）。そして、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した際の STT I 値は 24 mm/min、涙液中 IgA 濃度は 1.79 mg/ml であった（図 17）。本研究での継時的採取はそれぞれ 3 日と 4 日と短期間であったため、いつ感染が起きたかは不明であるが、呼吸様式の異常や、発熱、発咳等の症状を呈する前に、上気道や結膜・角膜の眼粘膜への刺激により、局所的に IgA の産生が亢進していたと推測された。また、本研究での継時的な涙液採取は 3 日、4 日と短期間であり、2 頭のみのも供試であったため、今後は長期間で測定を行い、供試する子牛の数を増やして検討する必要がある。

### 3. 小括

本章では呼吸器疾病の急性炎症期であると診断された黒毛和種子牛の STT I 値と涙液中の総蛋白濃度を評価した。その結果、呼吸器疾病の急性炎症期と診断された黒毛和種子牛の STT I 値は  $22.2 \pm 3.0$  mm/min (n=63)、涙液中の総蛋白濃度は  $1.85 \pm 0.47$  mg/ml (n=63) であり、臨床的に健常な子牛と比較して有意な高値を示していた。また、涙液

中の蛋白成分を解析した結果、呼吸器疾病の急性炎症期では健常子牛と比較して、有意に増加している蛋白質成分のスポットが 49 個あることが確認された。

さらに、それらの3つのスポットについて LC-MS/MS を用いて同定解析を行ったところ、同定には至らなかったが、ひとつのスポットについて免疫グロブリンの L 鎖である可能性が示唆された。そこで、涙液中の IgA 濃度、ならびに IgG 濃度を測定し、変動する蛋白質成分に免疫グロブリンが含まれるのか検討した。また、血清中の IgA 濃度についても測定を行い、涙液中の IgA との相関性を評価した。さらに、健常子牛の涙液中 IgA 濃度に特異的な変化があるのかを明らかにするために子牛での発症が多い消化器疾病と比較した。その結果、健常子牛の涙液中 IgA 濃度は  $0.31 \pm 0.27$  mg/ml (n=21) であったのに対して、呼吸器疾病の急性炎症期の子牛では  $0.98 \pm 0.32$  mg/ml (n=30) であり、健常子牛と比較して、有意な高値が認められた。また、消化器疾患の子牛については  $0.07 \pm 0.04$  mg/ml (n=6) であった。涙液中の IgG 濃度については、健常子牛で  $80.1 \pm 39.4$  ng/ml (n=19)、呼吸器疾病の急性炎症期の子牛では  $78.7 \pm 42.9$  ng/ml (n=14)、消化器疾病の子牛では  $91.0 \pm 38.8$  ng/ml (n=6) であり、IgG は眼粘膜において関与していない可能性が示唆された。さらに、涙液採取時には臨床的に健常な子牛と評価したにも関わらず、涙液中 IgA 濃度が高値 ( $0.99 \pm 0.08$  mg/ml, n=7) であった子牛の追跡調査をしたところ、数日以内に発熱、頻呼吸等の呼吸様式の異常といった呼吸器疾病の急性炎症期を示唆する状態への変化が認められた。そのため、臨床的に健常な子牛であると評価を行った2頭について涙液採取を継時的に行ったところ、呼吸器疾病の外部症状が発現する前に涙液中 IgA 濃度の高値が認められ、呼吸器疾病の急性炎症期を検出する指標として、涙液性状の変化が有用である可能性が示唆された。



#### 4. 図表

表 1. WI BRD Clinical Scoring System

		0	1	2	3				
眼漏	健全	63	0	0	0				
	呼吸器疾病	0	59	3	0				
鼻汁	健全	63	0	0	0				
	呼吸器疾病	58	4	0	0				
直腸温	健全	0	25	38	0				
	呼吸器疾病	0	0	0	62				
発咳	健全	60	3	0	0				
	呼吸器疾病	0	33	29	0				
耳・頭下垂	健全	63	0	0	0				
	呼吸器疾病	62	0	0	0				
Total score		0	1	2	3	4	5	6	7
健全		0	23	39	1	0	0	0	0
呼吸器疾病		0	0	0	0	0	35	28	2

1 節の WI BRD Clinical Scoring System のスコア表。合計スコアが 5 未満を臨床的に健全な子牛、5 以上を呼吸器疾病と判定している。

表 2. 血球検査、血液生化学検査、血清蛋白分画

	健常	呼吸器疾病
WBC ( $\times 10^3/l$ )	8.06 $\pm$ 1.18	7.08 $\pm$ 1.97
RBC ( $\times 10^4/l$ )	1005 $\pm$ 281	1007 $\pm$ 169
Hb (g/dl)	10.1 $\pm$ 1.2	10.3 $\pm$ 1.8
Ht (%)	33.9 $\pm$ 3.1	32.9 $\pm$ 5.9
MCV (fl)	33.9 $\pm$ 1.9	32.7 $\pm$ 2.6
MCHC (g/dl)	31.2 $\pm$ 1.0	31.2 $\pm$ 0.9
TP (g/dl)	5.2 $\pm$ 0.4	5.1 $\pm$ 0.4
Alb (g/dl)	3.1 $\pm$ 0.2	2.9 $\pm$ 0.2
BUN (mg/dl)	9.5 $\pm$ 1.8	9.8 $\pm$ 2.7
AST (IU/l)	51.4 $\pm$ 6.3	48.0 $\pm$ 4.6
GGT (IU/l)	35.1 $\pm$ 11.5	29.3 $\pm$ 9.3
TG (mg/dl)	11.6 $\pm$ 9.9	9.3 $\pm$ 6.9
Na (mmol/l)	138.7 $\pm$ 2.2	136.7 $\pm$ 1.9
K (mmol/l)	4.8 $\pm$ 0.4	4.6 $\pm$ 0.4
Cl (mmol/l)	103.2 $\pm$ 1.9	101.6 $\pm$ 2.8
Alb (g/dl)	2.75 $\pm$ 0.23	2.53 $\pm$ 0.28
$\alpha_1$ (g/dl)	0.44 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.03
$\alpha_2$ (g/dl)	0.46 $\pm$ 0.05	0.66 $\pm$ 0.15
$\alpha_1+\alpha_2$ (g/dl)	0.90 $\pm$ 0.07	1.16 $\pm$ 0.17
$\beta_1$ (g/dl)	0.68 $\pm$ 0.14	0.73 $\pm$ 0.17
$\beta_2$ (g/dl)	0.35 $\pm$ 0.14	0.43 $\pm$ 0.24
$\gamma$ (g/dl)	0.71 $\pm$ 0.65	0.69 $\pm$ 0.34

臨床的に健常な子牛と呼吸器疾病の子牛の血球検査、血液生化学検査、ならびに血清蛋白分画結果。いずれの項目も異常は認められなかった。

表 3. WI BRD Clinical Scoring System

		0	1	2	3				
眼漏	健全	3	0	0	0				
	呼吸器疾病	0	3	0	0				
鼻汁	健全	3	0	0	0				
	呼吸器疾病	3	0	0	0				
直腸温	健全	0	1	2	0				
	呼吸器疾病	0	0	0	3				
発咳	健全	3	0	0	0				
	呼吸器疾病	0	0	3	0				
耳・頭下垂	健全	3	0	0	0				
	呼吸器疾病	3	0	0	0				
Total score		0	1	2	3	4	5	6	7
健全		0	1	2	0	0	0	0	0
呼吸器疾病		0	0	0	0	0	0	3	0

2 節の WI BRD Clinical Scoring System のスコア表。合計スコアが 5 未満を臨床的に健全な子牛、5 以上を呼吸器疾病と判定している。

表 4. 血球検査、血液生化学検査、血清蛋白分画

	健常	呼吸器疾病
WBC ( $\times 10^3/l$ )	7.77 $\pm$ 1.34	8.55 $\pm$ 0.78
RBC ( $\times 10^4/l$ )	989 $\pm$ 210	1142 $\pm$ 33
Hb (g/dl)	9.7 $\pm$ 1.2	10.5 $\pm$ 0.5
Ht (%)	33.5 $\pm$ 3.9	36.6 $\pm$ 1.3
MCV (fl)	34.3 $\pm$ 3.7	32.1 $\pm$ 2.1
MCHC (g/dl)	28.7 $\pm$ 0.4	28.8 $\pm$ 0.3
TP (g/dl)	5.4 $\pm$ 0.7	5.9 $\pm$ 0.7
Alb (g/dl)	3.5 $\pm$ 0.2	3.3 $\pm$ 0.1
BUN (mg/dl)	7.9 $\pm$ 1.8	7.1 $\pm$ 1.1
AST (IU/l)	58.3 $\pm$ 9.7	51.5 $\pm$ 7.7
GGT (IU/l)	19.7 $\pm$ 6.0	22.0 $\pm$ 2.8
TG (mg/dl)	18.8 $\pm$ 12.3	18.1 $\pm$ 15.7
Na (mmol/l)	139.1 $\pm$ 1.2	138.2 $\pm$ 0.3
K (mmol/l)	4.7 $\pm$ 0.1	4.7 $\pm$ 0.1
Cl (mmol/l)	100.1 $\pm$ 1.2	100.8 $\pm$ 0.6
Alb (g/dl)	2.97 $\pm$ 0.18	2.71 $\pm$ 0.43
$\alpha_1$ (g/dl)	0.45 $\pm$ 0.02	0.50 $\pm$ 0.06
$\alpha_2$ (g/dl)	0.48 $\pm$ 0.002	0.72 $\pm$ 0.02
$\alpha_1+\alpha_2$ (g/dl)	0.93 $\pm$ 0.03	1.22 $\pm$ 0.08
$\beta_1$ (g/dl)	0.68 $\pm$ 0.08	0.78 $\pm$ 0.03
$\beta_2$ (g/dl)	0.29 $\pm$ 0.17	0.37 $\pm$ 0.08
$\gamma$ (g/dl)	0.52 $\pm$ 0.25	0.63 $\pm$ 0.03

臨床的に健常な子牛と呼吸器疾病の子牛の血球検査、血液生化学検査、ならびに血清蛋白分画結果。いずれの項目も異常は認められなかった。

表 5. 呼吸器疾病において上昇が認められたスポット

#	Anova(P)	Fold	Average Normalised Volmes	
			normal	respiratory
452	7.278e-005	6.8	5.360e+005	7.856e+004
903	5.185e-004	9.6	7.945e+006	8.297e+005
459	0.001	3.1	4.796e+005	1.529e+005
95	0.001	5.5	1.154e+005	2.093e+004
854	0.002	1.9	1.233e+005	2.308e+005
640	0.003	1.9	6.361e+005	1.211e+006
196	0.005	2.6	2.724e+006	7.031e+006
416	0.005	1.7	4.127e+006	8.631e+006
1121	0.006	2.7	1.247e+007	4.603e+006
750	0.006	6.2	9683.0.13	5.961e+004
685	0.007	6.1	1.436e+005	2.340e+004
202	0.007	2.3	8.440e+005	1.951e+006
417	0.007	1.5	5.066e+006	7.461e+006
437	0.008	6.4	1.402e+006	2.185e+005
216	0.008	1.7	2.625e+006	4.429e+006
1083	0.008	6.2	2.389e+005	3.856e+004
804	0.009	2.5	4.392e+004	1.098e+005
647	0.009	2.6	7.670e+005	2.247e+006
669	0.010	2.6	1.995e+006	7.708e+005
720	0.011	2.7	5.738e+004	1.563e+005
197	0.012	6.8	3.009e+004	2.043e+005

239	0.012	2.4	5.582e+004	1.326e+005
150	0.012	4.8	6.616e+004	1.388e+004
766	0.012	2.3	1.440e+005	3.267e+005
652	0.012	2.1	8.612e+005	1.849e+006
224	0.014	3.6	1.355e+006	4.943e+006
699	0.014	1.7	7.907e+006	1.307e+007
316	0.015	3.2	8.490e+005	2.622e+006
325	0.018	7.2	1.958e+005	2.705e+004
205	0.019	2.3	8.202e+005	1.882e+006
1060	0.020	3.3	2.876e+006	8.791e+005
287	0.020	3.5	1.535e+005	5.427e+005
653	0.020	1.4	4.924e+006	6.865e+006
763	0.021	2.2	1.620e+005	3.501e+005
376	0.021	4.5	7.432e+004	1.652e+004
418	0.021	1.3	4.383e+006	5.566e+006
410	0.021	2.7	1.769e+007	6.609e+006
695	0.022	2.1	4.360e+006	2.121e+006
221	0.022	3.6	3.042e+005	1.089e+006
1036	0.023	3.6	1.157e+006	3.231e+005
365	0.023	3	2.095e+006	6.888e+005
518	0.024	1.3	2.227e+007	2.910e+007
168	0.027	5.3	1.814e+005	3.397e+004
568	0.027	1.2	2.059e+007	1.777e+007
140	0.027	4.1	1.128e+006	2.721e+005

896	0.029	3.8	6.260e+005	2.384e+006
324	0.03.	3.4	7.803e+005	2.304e+006
466	0.032	2.9	6.338e+005	2.213e+005
174	0.032	3.4	4.539e+005	1.338e+005
1118	0.032	2.2	1.881e+006	4.057e+006
141	0.033	7.6	3.293e+004	4310.187
220	0.033	2.6	3.362e+006	8650e+006
72	0.033	2.5	1.333e+006	3.372e+006
213	0.034	2.4	3.646e+005	8.917e+005
629	0.034	1.9	7.622e+007	3.981e+007
259	0.035	2.0	4.464e+005	2.211e+005
526	0.036	3.3	5.939e+006	1.826e+006
492	0.037	1.6	4.078e+006	2.524e+006
48	0.037	1.9	7.410e+006	1.435e+007
817	0.039	2.8	6.954e+007	1.964e+008
39	0.039	2.8	2.302e+006	6.455e+006
240	0.040	2.8	7.633e+004	2.141e+005
201	0.040	4.1	1.608e+005	6.569e+005
443	0.040	9.5	9.674e+005	1.018e+005
783	0.040	3.3	4.447e+004	1.471e+005
456	0.044	4.1	4.309e+005	1.061e+005
921	0.044	1.6	2.915e+007	4.731e+007
236	0.044	1.9	4.026e+005	7.698e+005
840	0.044	4.4	1.786e+006	6.524e+006

115	0.044	4.8	4.580e+005	9.547e+004
592	0.044	1.8	1.654e+006	9.031e+005
315	0.045	2.8	9.988e+005	2.801e+006
408	0.045	1.7	2.049e+006	3.391e+006
20	0.045	4.8	1.812e+005	8.766e+005
646	0.045	1.4	8.780e+007	1.194e+008
718	0.045	4.2	1.416e+006	5.997e+006
342	0.045	5.1	7.911e+005	1.540e+005
406	0.045	1.6	2.115e+006	3.399e+006
976	0.047	2.2	1.324e+007	2.852e+007
912	0.047	4.3	1.446e+005	6.156e+005
679	0.047	2.7	8.584e+005	3.234e+005
352	0.047	1.5	2.447e+006	3.680e+006
317	0.048	2.4	2.058e+006	4.958e+006
262	0.048	3.3	3.615e+004	1.211e+005
918	0.050	6.2	1.284e+004	7.907e+004

呼吸器疾病の急性炎症期である子牛において、健常子牛と比較して上昇していたスポット。



表 6. 呼吸器疾病の急性炎症期の子牛において有意な上昇を示したスポットの同定結果

Spot Number	MW (kDa)	PI	Score*	Accession No.
1257	31	5.81	6.8	E1BJP1
2402	24	6.44	50	F1MH40
2405	28	5.71	36.7	E1BKT9

\*Score は  $-10 \cdot \log(P)$  と表わした。MASCOT 検索プログラムを使用して NCBI nr データベースからシーケンスされたタンパク質に対して検索した。

表 7. WI BRD Clinical Scoring System

		0	1	2	3				
	健全	33	2	0	0				
眼漏	呼吸器疾病	0	32	0	0				
	消化器疾病	6	0	0	0				
	健全	35	0	0	0				
鼻汁	呼吸器疾病	12	16	4	0				
	消化器疾病	6	0	0	0				
	健全	0	12	23	0				
直腸温	呼吸器疾病	0	0	0	32				
	消化器疾病	0	0	4	2				
	健全	28	7	0	0				
発咳	呼吸器疾病	0	18	12	2				
	消化器疾病	6	0	0	0				
	健全	35	0	0	0				
耳・頭下垂	呼吸器疾病	32	0	0	0				
	消化器疾病	6	0	0	0				
Total score		0	1	2	3	4	5	6	7
健全		0	8	23	3	1	0	0	0
呼吸器疾病		0	0	0	0	0	18	12	2
消化器疾病		0	0	4	2	0	0	0	0

3 節の WI BRD Clinical Scoring System のスコア表。消化器症状を呈し、合計スコアが 5 未満の子牛を消化器疾病罹患子牛とした。

表 8. 血球検査、血液生化学検査、血清蛋白分画

	健常	呼吸器疾病	消化器疾病
WBC ( $\times 10^3/l$ )	7.00 $\pm$ 2.05	8.83 $\pm$ 1.26	8.93 $\pm$ 1.70
RBC ( $\times 10^4/l$ )	1006 $\pm$ 113	1082 $\pm$ 112	1205 $\pm$ 141
Hb (g/dl)	9.7 $\pm$ 1.2	10.4 $\pm$ 0.9	10.4 $\pm$ 0.3
Ht (%)	33.1 $\pm$ 4.2	35.5 $\pm$ 3.4	39.8 $\pm$ 4.4
MCV (fl)	32.9 $\pm$ 1.5	32.9 $\pm$ 2.4	33.1 $\pm$ 1.3
MCHC (g/dl)	29.3 $\pm$ 0.5	29.3 $\pm$ 0.6	29.6 $\pm$ 0.9
TP (g/dl)	5.7 $\pm$ 0.5	5.7 $\pm$ 0.5	5.5 $\pm$ 0.60.2
Alb (g/dl)	3.4 $\pm$ 0.2	3.4 $\pm$ 0.2	3.5 $\pm$ 0.1
BUN (mg/dl)	11.6 $\pm$ 2.0	14.7 $\pm$ 3.4	12.3 $\pm$ 4.3
AST (IU/l)	50.7 $\pm$ 12.4	48.0 $\pm$ 18.6	45.0 $\pm$ 4.5
GGT (IU/l)	29.6 $\pm$ 16.3	31.8 $\pm$ 17.6	25.3 $\pm$ 10.0
TG (mg/dl)	19.4 $\pm$ 15.6	17.7 $\pm$ 15.9	14.8 $\pm$ 9.5
Na (mmol/l)	139.6 $\pm$ 1.9	138.2 $\pm$ 2.3	137.5 $\pm$ 1.1
K (mmol/l)	4.5 $\pm$ 0.4	4.9 $\pm$ 0.6	4.9 $\pm$ 0.1
Cl (mmol/l)	99.3 $\pm$ 1.6	98.9 $\pm$ 1.6	99.2 $\pm$ 1.6
Alb (g/dl)	2.85 $\pm$ 0.17	2.79 $\pm$ 0.20	3.12 $\pm$ 0.17
$\alpha_1$ (g/dl)	0.39 $\pm$ 0.06	0.43 $\pm$ 0.06	0.29 $\pm$ 0.06
$\alpha_2$ (g/dl)	0.52 $\pm$ 0.06	0.56 $\pm$ 0.07	0.45 $\pm$ 0.04
$\alpha_1+\alpha_2$ (g/dl)	0.82 $\pm$ 0.08	1.14 $\pm$ 0.11	0.74 $\pm$ 0.06
$\beta_1$ (g/dl)	0.59 $\pm$ 0.11	0.78 $\pm$ 0.04	0.78 $\pm$ 0.13
$\beta_2$ (g/dl)	0.41 $\pm$ 0.08	0.42 $\pm$ 0.08	0.47 $\pm$ 0.36
$\gamma$ (g/dl)	0.82 $\pm$ 0.26	0.85 $\pm$ 0.17	0.80 $\pm$ 0.17

臨床的に健常な子牛、呼吸器疾病の子牛、ならびに消化器疾病の子牛の血球検査、血液生化学検査、ならびに血清蛋白分画結果。いずれの項目も異常は認められなかった。

表 9. 涙液採取後に呼吸器疾病の急性炎症期であると示唆された子牛の WI BRD Clinical Scoring System のスコア

	症状発現 (日後)	症状発現時の WI BRD Clinical Scoring System のスコア				
		眼漏	鼻汁	直腸温	発咳	耳・頭下垂
子牛 a	5	1	1	3	1	0
子牛 b	4	1	1	3	2	0
子牛 c	4	1	0	3	2	0
子牛 d	3	1	0	3	2	0
子牛 e	5	1	1	3	1	0
子牛 f	3	1	0	3	2	0
子牛 g	6	1	1	3	1	0

症状発現は涙液採取後からの日数を表わしている。

(a)



(b)





図 1. 臨床的に健常な子牛、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛、消化器疾病に罹患した子牛の眼周囲。(a)は臨床的に健常な子牛でSTTI値は16 mm/min。(b)は呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した子牛で、流涙しているのを矢印で示した。STTI値は28 mm/min。(c)消化器疾病に罹患した子牛で流涙は認められず、STTI値は18 mm/min。

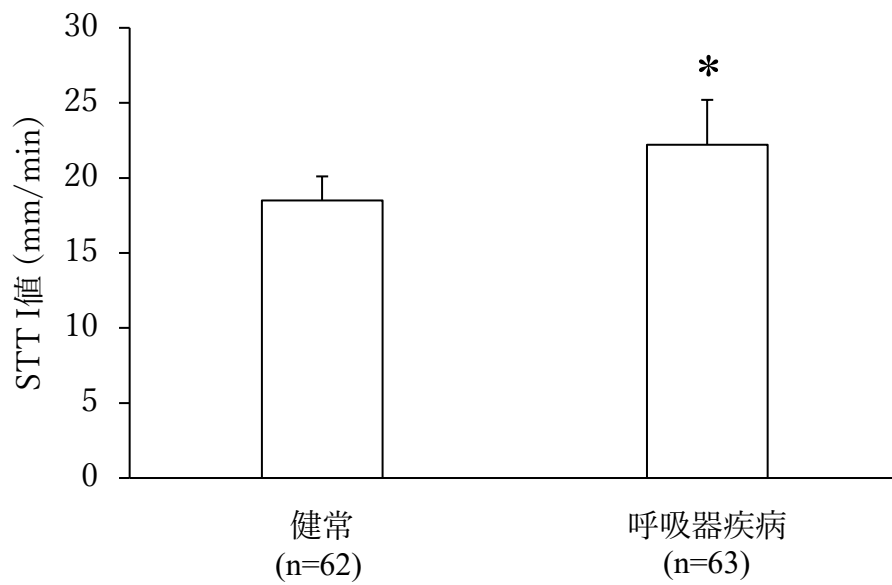


図 2. 臨床的に健常な子牛と呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の STT I 値の比較。呼吸器疾病の子牛の STT I 値は  $22.2 \pm 3.0$  mm/min で、健常子牛の STT I 値 ( $18.5 \pm 1.6$  mm/min) と比較して、有意な高値が認められた ( $P < 0.05$ )。

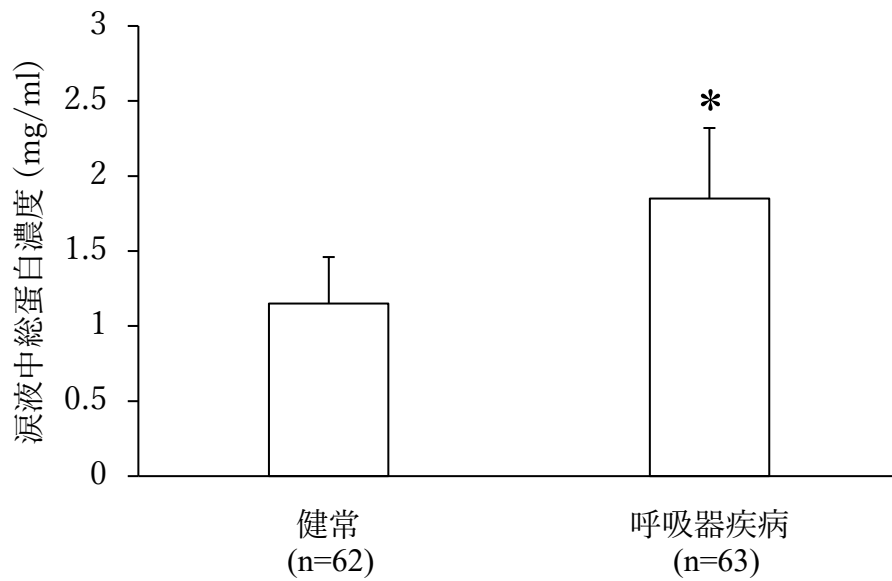


図 3. 臨床的に健常な子牛と呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の涙液中総蛋白濃度の比較。呼吸器疾病の子牛の涙液中総蛋白濃度は  $1.85 \pm 0.47$  mg/ml で、健常子牛の涙液中総蛋白濃度 ( $1.15 \pm 0.31$  mg/ml) と比較して有意な高値が認められた ( $P < 0.05$ )。



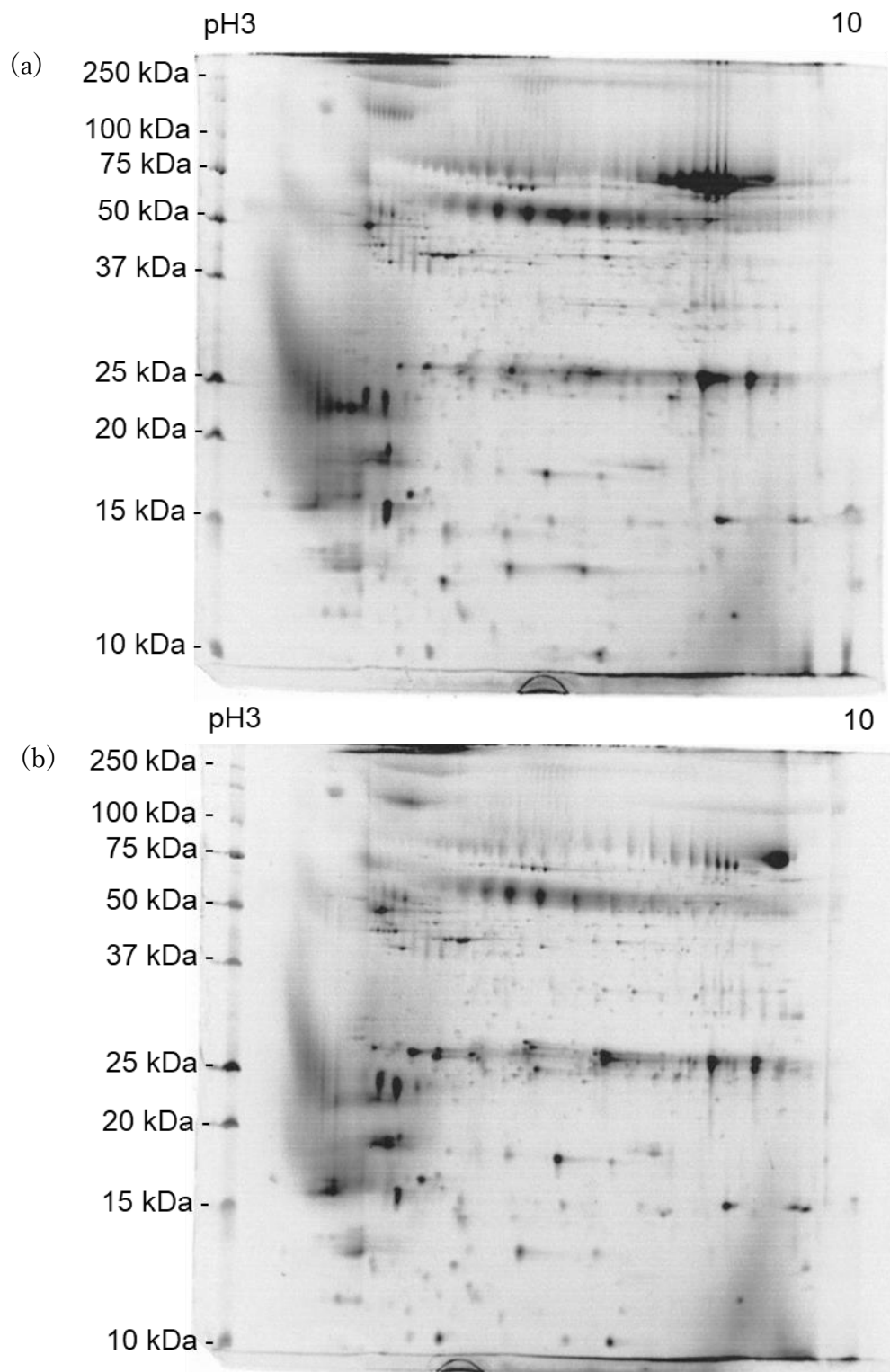


図 4. 二次元電気泳動画像。(a) : 臨床的に健常な子牛、(b) 呼吸器疾病の急性炎症期である子牛。

pH 3

10

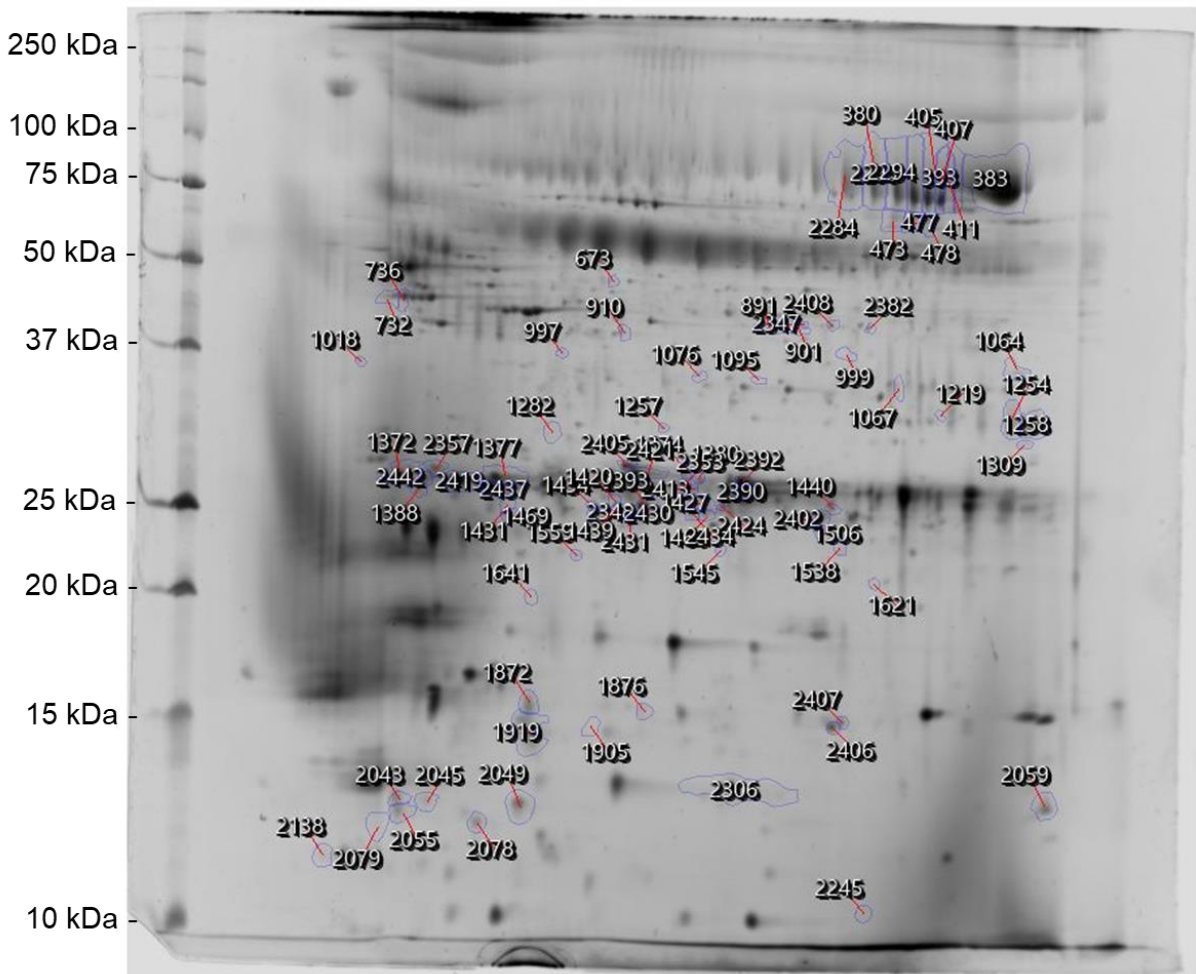


図 5. 健常子牛のスポット分割画像。1,329 個のスポットが得られた。

pH 3

pH 10

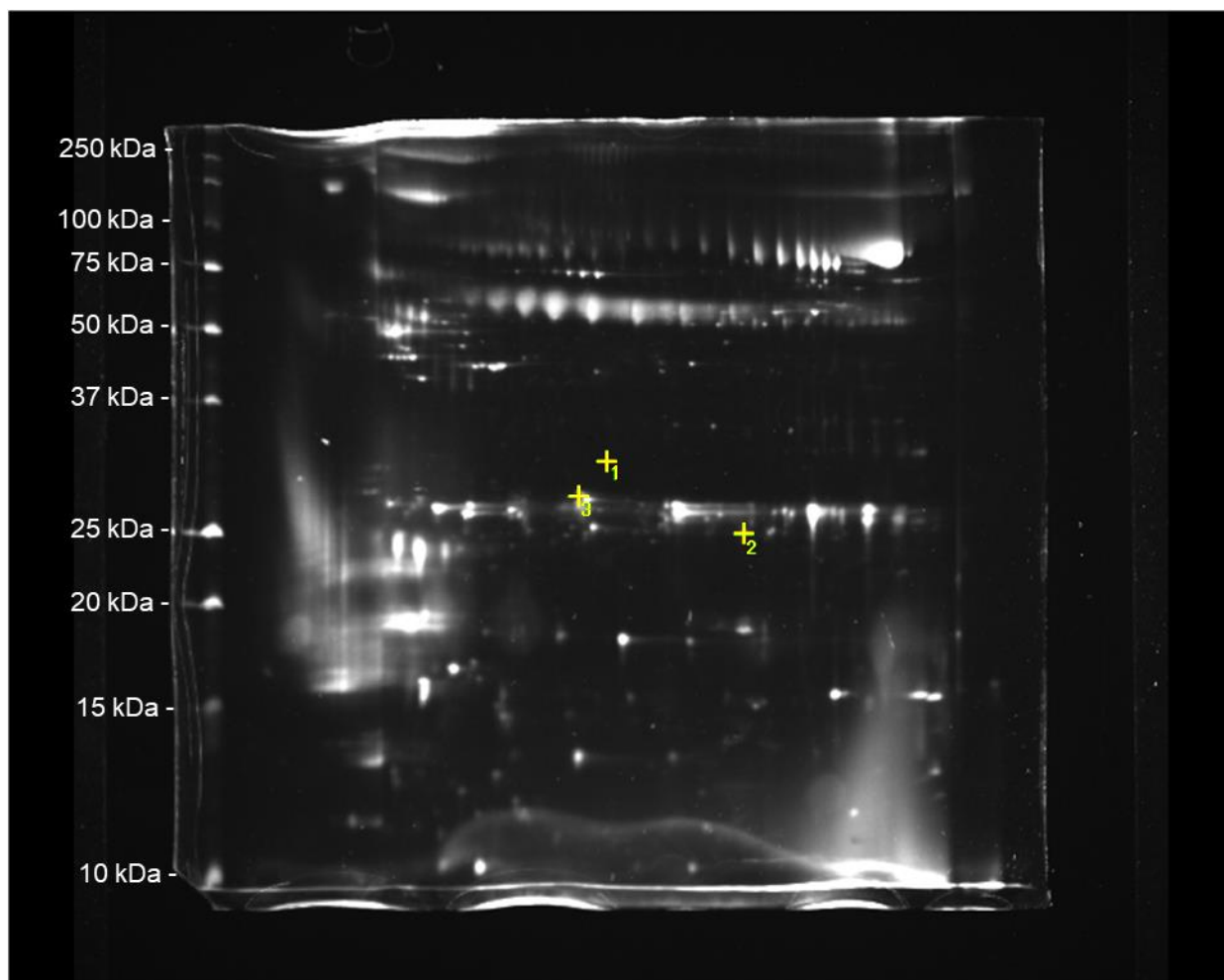
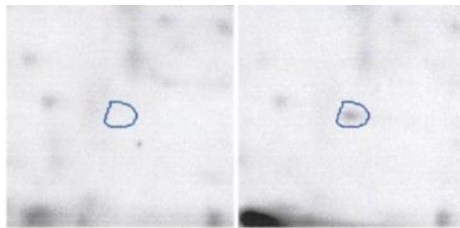
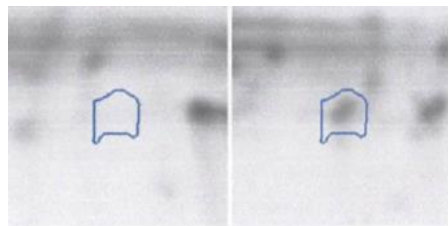


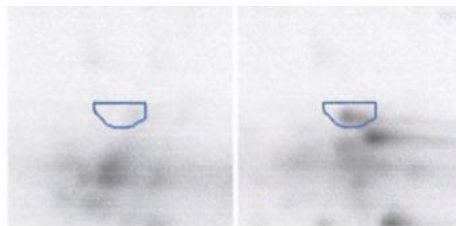
図 6. 呼吸器疾病の急性炎症期である子牛において有意な上昇が認められ同定解析を行った3スポット。1 : Spot\_1257、2 : Spot\_2402、3 : Spot\_2405。



Spot\_1257



Spot\_2402



Spot\_2405

図 7. 呼吸器疾病の急性炎症期である子牛において有意な上昇が認められ同定解析を行った 3 スポット (Spot\_1257、Spot\_2402、Spot\_2405) の臨床的に健常な子牛との比較。左：臨床的に健常な子牛、右：呼吸器疾病の急性炎症期である子牛。

(a) MKLLLLCLGLTLVCAQEGNSDVVRSNFDIPEIAGEWYSILLASDNREKIEENGSMRVFVE 60  
 (b) MKLLLLCLGLTLVCAQEGNSDVVRSNFDIPEIAGEWYSILLASDNREKIEENGSMRVFVE 60

(a) YIDVLENSLLFKFHTKVNGVCTELSLVSDSTGEDGVFTISYDGENKFRI LQVNYSQHI I 120  
 (b) YIDVLENSLLFKFHTKVNGVCTELSLVSDSTGEDGVFTISYDGENKFRI LQVNYSQHI I 120

(a) FYLENFSDSFK LLELYAREPDTSPELKSEFVEI CQKYGVVK ENVIDLTK VDRCLQERGNG 180  
 (b) FYLENFSNSFK LLELYAREPDTSPELKSEFVEI CQKYGVVK ENVIDLTK VDRCLQERGNG 180

(a) VA 182  
 (b) VA 182

図 8. Spot\_1257 において検出された SpC3 の (a) : Uncharacterized protein と (b) : Lipoin\_cytosolic\_FA-bd\_dom domain-containing protein の相同性の比較。青色は LC-MS/MS により検出されたペプチド領域を示している。

(a) 1 MRFPAQLLGLLLLWVPGSSGDVVL TQTPLSLSVI PGETV T I SCKSTQSLKYSDGK T Y L Q W 60  
(c) 1 MRFPAQLLGLLLLWVPGSSGDVVL TQTPLSLSVI PGETV S I SCKSTQSLKY SNG R T Y F F W 60

(a) 61 F QHKPGQSP R LLIYQISNRYTGVPDR FTGSGSETDFTLTI SSVQAEDAGVYYC L Q R S Y D P 120  
(c) 61 L QHKPGQSP Q S LIYEVS K R N T G V P S R F T G S G S E T D F T L T I S S V Q A E D A G V Y Y C S Q G S S A P 120

(a) 121 YTFGQGT KVEI KRSDAEP SVFLFKPSDEQLK TGTVSVVCLV NDFY PKDI NVKWK V D G V T Q 180  
(c) 121 YTFGQGT KVEI KRSDAEP SVFLFKPSDEQLK TGTVSVVCLV NDFY PKDI NVKWK V D G V T Q 180

(a) 181 SSSNFQNSFTDQDSK KSTYSLSSI LTLPSSEYQSHDAYTCEVSHK S L T T T L V K S F S K N E C 240  
(c) 181 SSSNFQNSFTDQDSK KSTYSLSSI LTLPSSEYQSHDAYTCEVSHK S L T T T L V K S F S K N E C 240

(b) 1 MRF SAQLLGLLLLWVPGSSGDVVL TQTPLSLSI I PGE MA S I SCKSSQSLVHSDGK T Y L N W 60  
(c) 1 MRF PAQLLGLLLLWVPGSSGDVVL TQTPLSLSVI PGETV S I SCKST QSLKY S N G R T Y F F W 60

(b) 61 I QYKPGQSPQG LIYQVSN RYS GVS DR FTGSGSGTDFTLTI SR VQAEDAGVYYC Y QGTEDP 120  
(c) 61 L QHKPGQSPQS LIYEVS K R N T G V P S R F T G S G S E T D F T L T I S S V Q A E D A G V Y Y C S Q G S S A P 120

(b) 121 PTF S QGT K L E V KRSDAEP SVFLFKPSDEQLK TGTVSVVCLV NDFY PKDI NVKWK V D G V T Q 180  
(c) 121 YTF G QGT K V E I KRSDAEP SVFLFKPSDEQLK TGTVSVVCLV NDFY PKDI NVKWK V D G V T Q 180

(b) 181 SSSNFQNSFTDQDSK KSTYSLSSI LTLPSSEYQSHDAYTCEVSHK S L T T T L V K S F S K N E C 240  
(c) 181 SSSNFQNSFTDQDSK KSTYSLSSI LTLPSSEYQSHDAYTCEVSHK S L T T T L V K S F S K N E C 240

表 9. Spot\_2402 の SpC8 であった Uncharacterized protein (a : 27kDa、b : 26kDa) のアミノ酸配列と (c) IGK protein のアミノ酸配列の相同性の比較を示した。青色は LC-MS/MS で検出されたペプチド領域を表している。

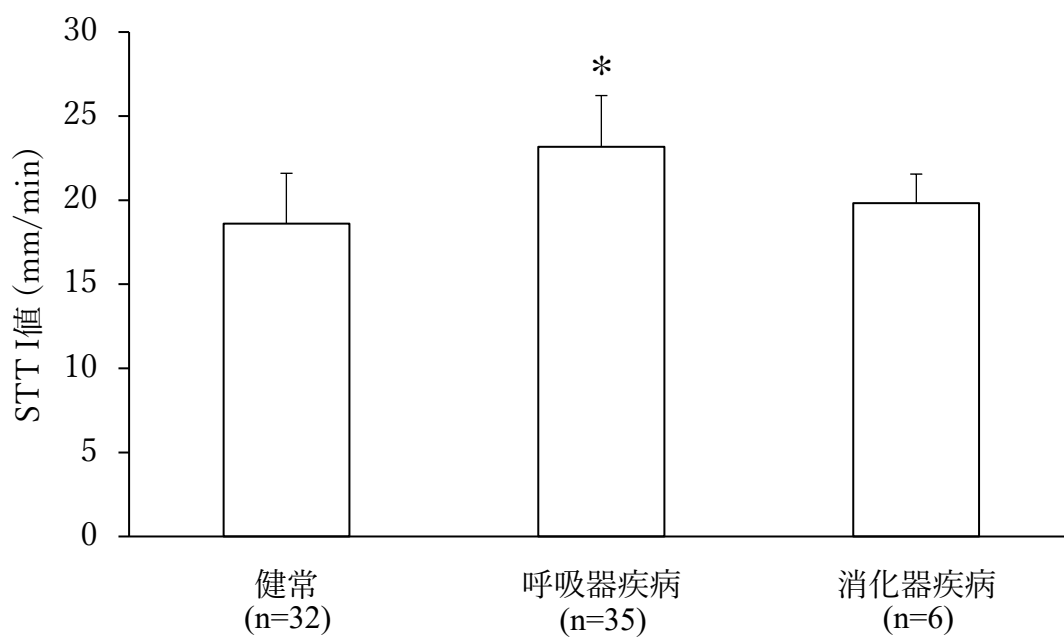


表 10. 臨床的に健常な子牛、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛、消化器疾病の子牛の STTI 値の比較。臨床的に健常な子牛の STTI 値は  $18.6 \pm 4.0$  mm/min であった。呼吸器疾病の子牛の STTI 値は  $23.2 \pm 3.0$  mm/min であり、健常子牛と比較して有意な高値が認められた ( $P < 0.001$ )。消化器疾病の子牛の STTI 値は  $19.8 \pm 1.7$  mm/min で健常子牛と有意差はみられなかった。

\* 健常子牛と呼吸器疾病の子牛の間で  $P < 0.05$

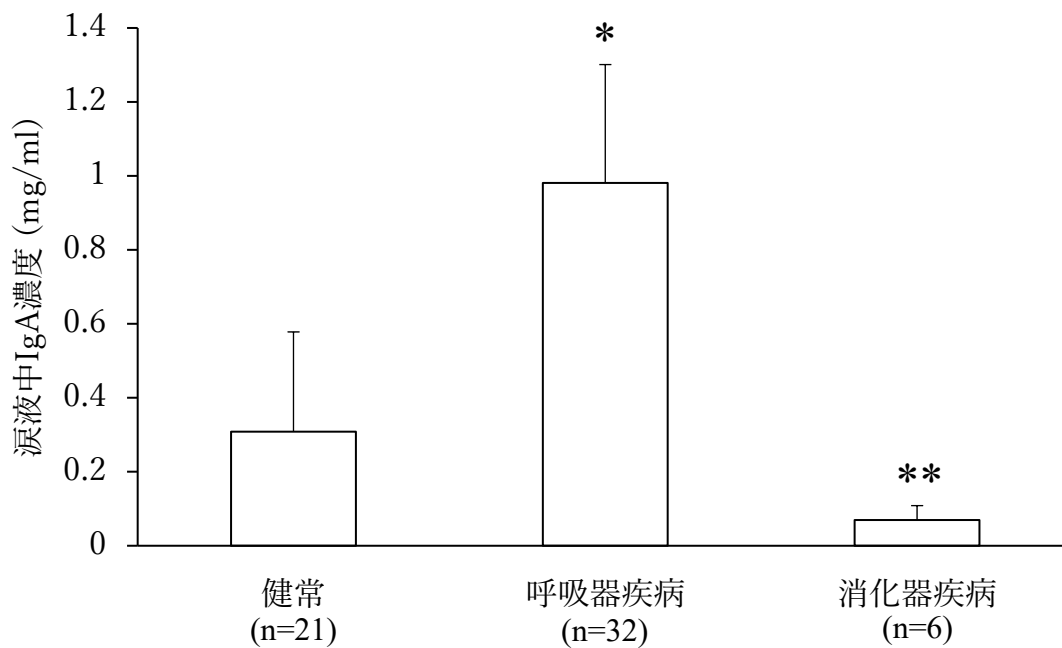


表 11. 臨床的に健常な子牛、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛、消化器疾病の子牛の涙液中 IgA 濃度の比較。呼吸器疾病の子牛の涙液中 IgA 濃度は  $0.98 \pm 0.32$  mg/ml で、臨床的に健常な子牛 ( $0.31 \pm 0.27$  mg/ml) と比較して有意な高値が認められた ( $P < 0.001$ )。消化器疾病の子牛では  $0.07 \pm 0.04$  mg/ml で、臨床的に健常な子牛と比較して有意な低値が認められた ( $P = 0.004$ )。

\* 健常子牛と呼吸器疾病の子牛の間で  $P < 0.05$

\*\* 健常子牛と消化器疾病子牛の間で  $P < 0.05$



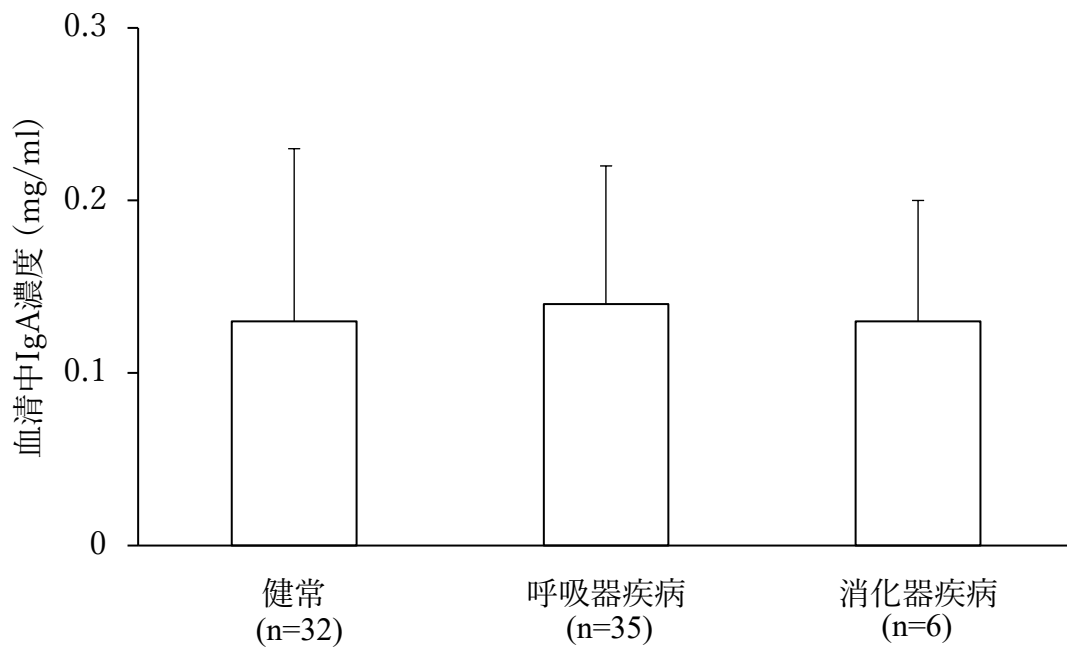


表 12. 臨床的に健常な子牛、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛、消化器疾病の子牛の血清中 IgA 濃度の比較。臨床的に健常な子牛の血清中 IgA 濃度は  $0.13 \pm 0.10$  mg/ml、呼吸器疾病の子牛は  $0.14 \pm 0.08$  mg/ml、消化器疾病の子牛では  $0.13 \pm 0.07$  mg/ml であった。3 群間に有意な差はみられなかった ( $P=0.08$ )。

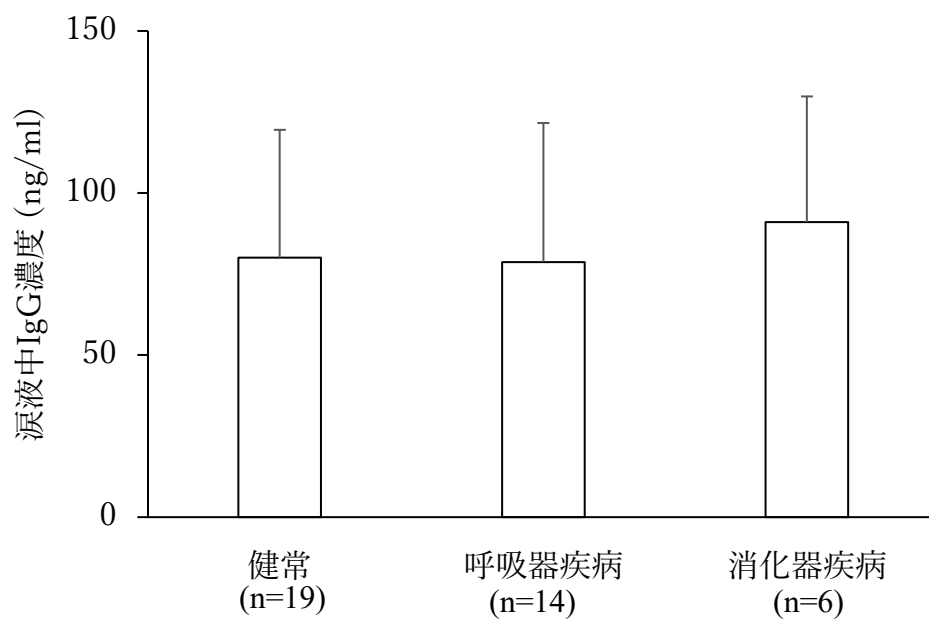


表 13. 臨床的に健常な子牛、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛、消化器疾病の子牛の涙液中 IgG 濃度の比較。臨床的に健常な子牛の涙液中 IgG 濃度は  $80.1 \pm 39.4$  ng/ml、呼吸器疾病の子牛は  $78.7 \pm 42.9$  ng/ml、消化器疾病の子牛では  $91.0 \pm 38.8$  ng/ml であった。3 群間に有意な差はみられなかった ( $P=0.71$ )。

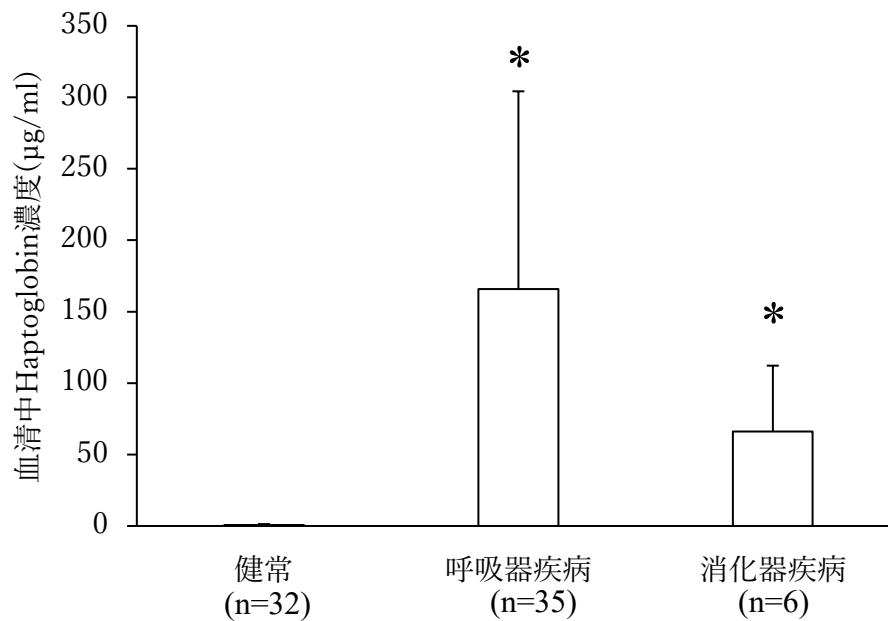


表 14. 臨床的に健常な子牛、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛、消化器疾病の子牛の血清中 Haptoglobin 濃度の比較。臨床的に健常な子牛の血清中 Haptoglobin 濃度は  $0.67 \pm 0.66 \mu\text{g/ml}$  であった。呼吸器疾病の子牛の血清中 Haptoglobin 濃度は  $165.7 \pm 138.5 \mu\text{g/ml}$ 、消化器疾病の子牛では  $66.1 \pm 46.1 \mu\text{g/ml}$  であり、健常子牛と比較して有意な高値が認められた ( $P=0.003$ )。

\* 健常子牛と呼吸器疾病の子牛の間で  $P<0.05$

\* 健常子牛と消化器疾病の子牛の間で  $P<0.05$

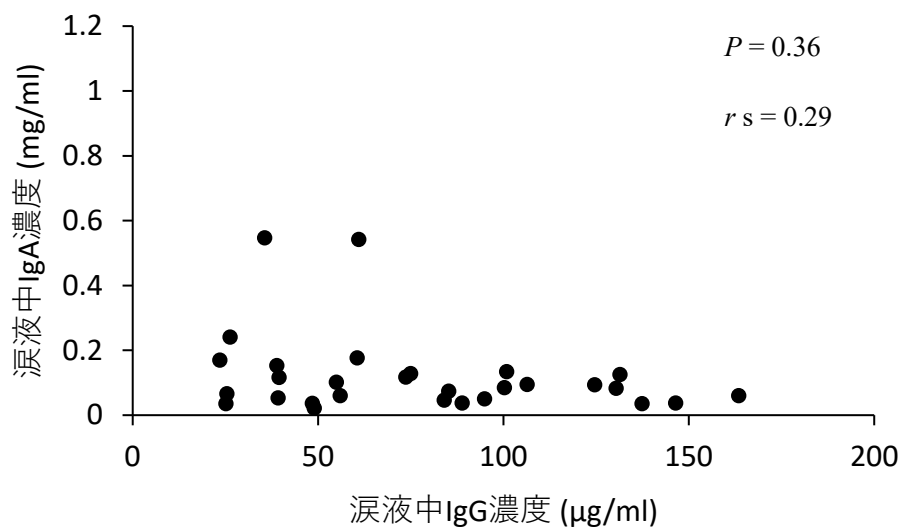
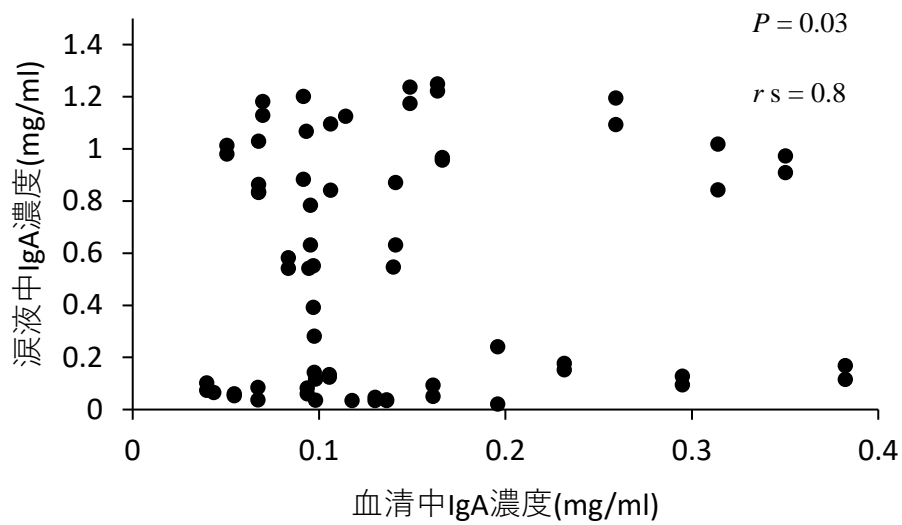
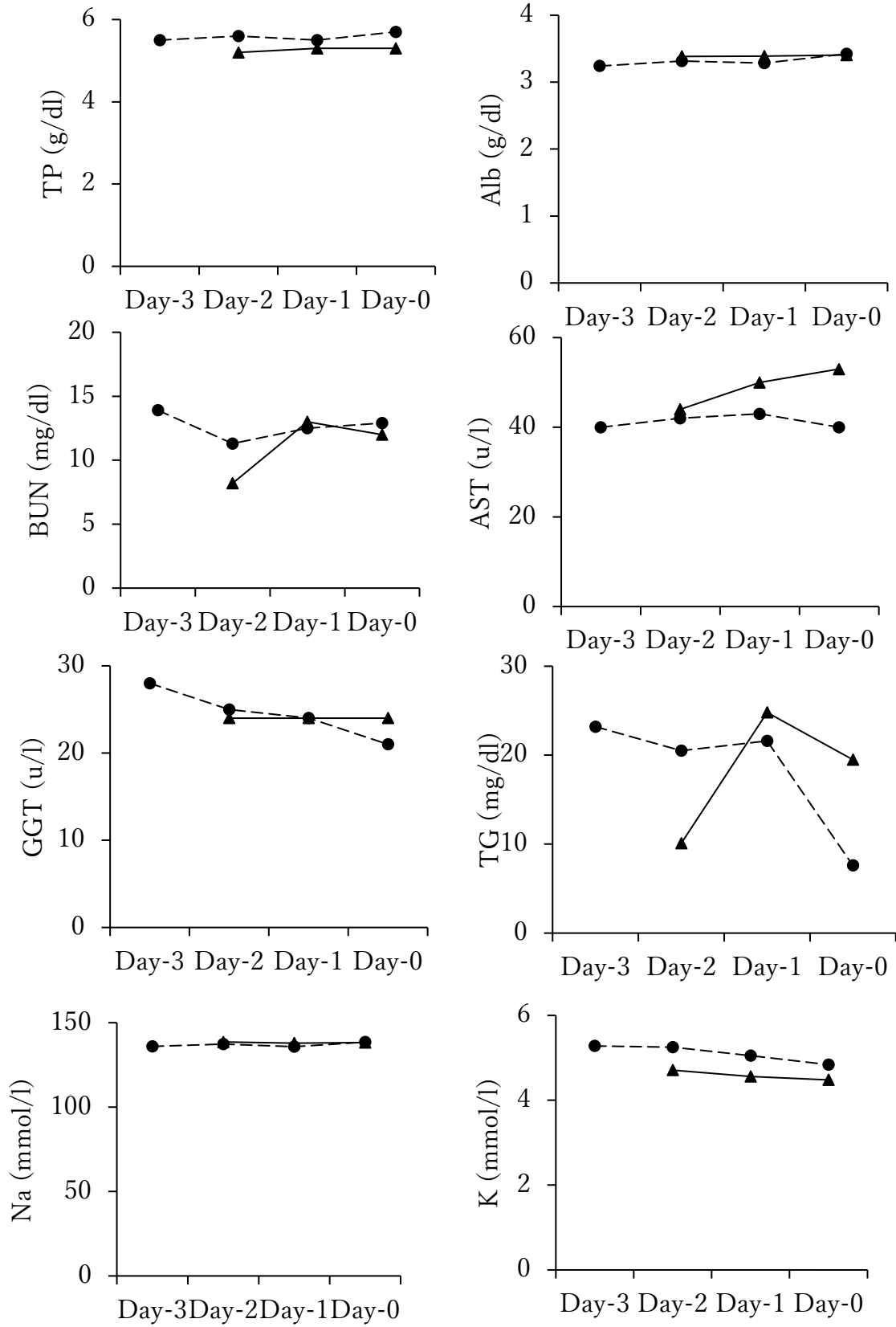


表 15. 涙液中 IgA 濃度と血清中 IgA 濃度との相関性、涙液中 IgA 濃度と涙液中 IgG 濃度との相関性のグラフ。涙液中 IgA 濃度と血清中 IgA 濃度との間に相関性は認められなかった ( $P=0.03, r_s=0.80$ )。涙液中 IgA 濃度と涙液中 IgG 濃度との間に相関性は認められなかった ( $P=0.36, r_s=0.29$ )。



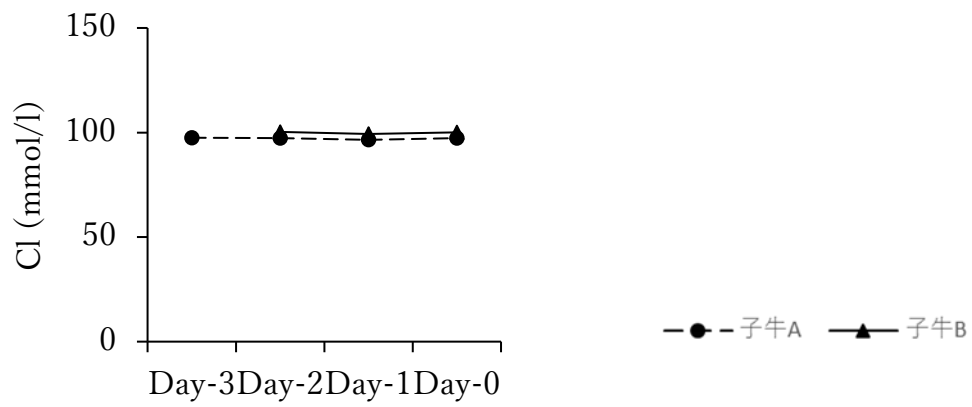


表 16. 継時的に涙液採取を行った子牛の血液生化学検査結果。子牛 A、子牛 B ともに、異常は認められなかった。

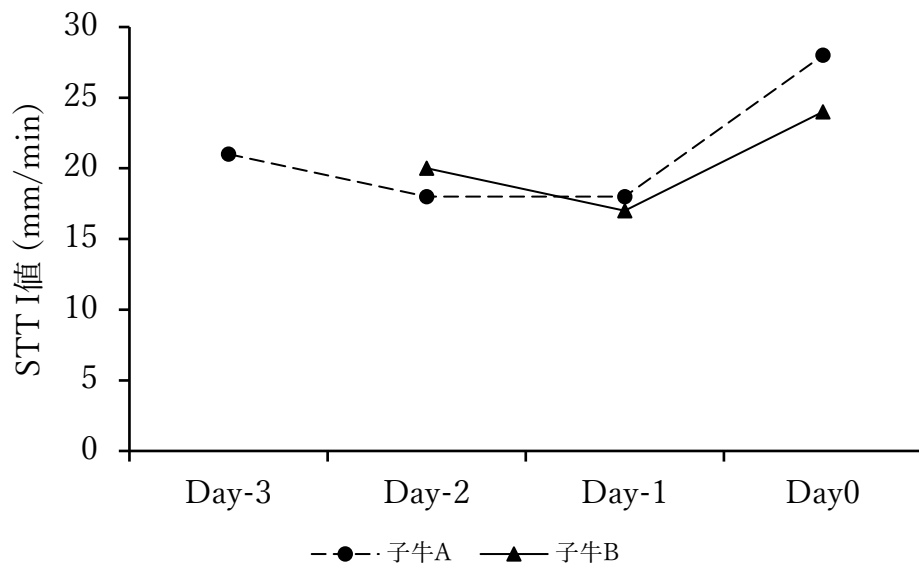


表 17. 継時的に測定した STTI 値の推移。呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した日を Day0 とした。子牛 A では、Day-3 に STTI 値が 21 mm/min と高値を示し、Day0 において再度 STTI 値は 28 mm/min と高値を示した。子牛 B では、Day-2 において STTI 値は 20 mm/min、Day0 では 24 mm/min といずれも高値を示した。

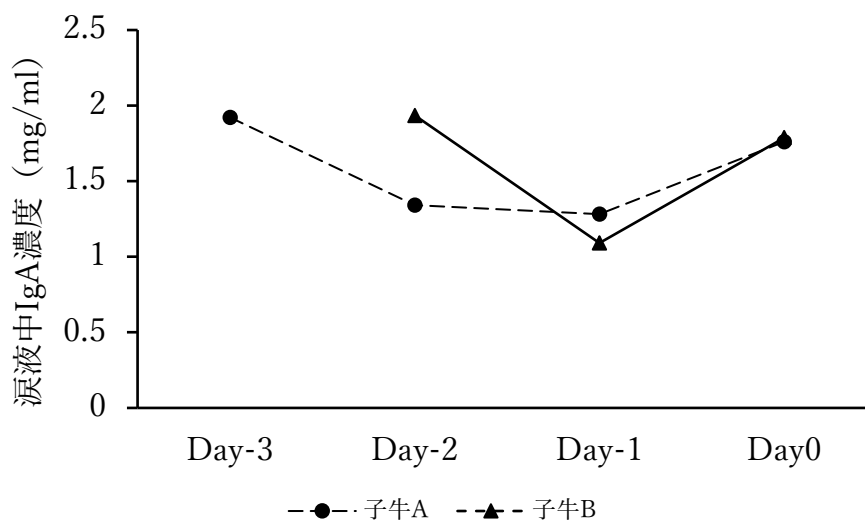


表 18. 継時的に測定した涙液中 IgA 濃度の推移。呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した日を Day0 とした。子牛 A では、Day-3 において 1.92 mg/ml と高値を示し、その後 Day-2、Day-1 と低値を示したが、Day0 に再度涙液中 IgA 濃度は、1.76 mg/ml と高値を示した。子牛 B では、Day-2 において高値 (1.94 mg/ml) を示し、Day-1 は低値であったが、Day0 で再度 1.79 mg/ml と高値を示した。



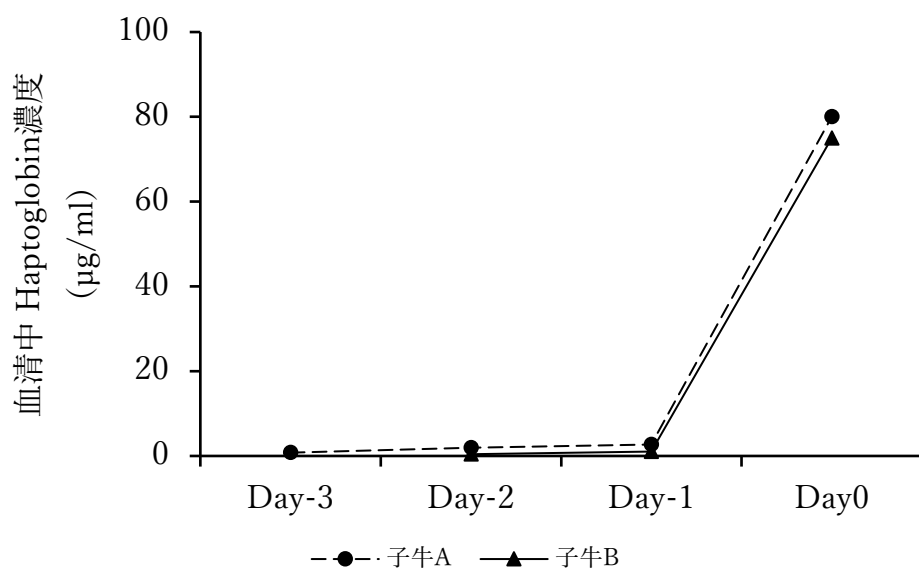


表 19. 継時的に測定した血清中 Haptoglobin 濃度の推移。呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した日を Day0 とした。子牛 A、子牛 B いずれも低値で推移していたが、Day0 において子牛 A は 80 µg/ml、子牛 B は 75 µg/ml と高値を示した。

## 第4章 総括

黒毛和種子牛では、消化器疾病に次いで、呼吸器疾病は多く発生し、その経済的損害は甚大である。消化器疾病と異なり、呼吸器疾病では発咳、呼吸様式の異常、鼻汁等の症状はあるものの、どれも必発ではなく、症状が明らかになった時点ではすでに重症化していることも多い。その要因の一つに、目視で把握しやすい初期症状の指標がないことが挙げられる。近年、人医療のみならず小動物獣医療においても、涙液が疾病のバイオマーカーになり得るとして、多くの研究が報告されている。黒毛和種子牛において呼吸器疾病の往診時、「流涙」が認められることに着目した。まず、臨床的に健常な黒毛和種子牛を供試して、STTI 値、ならびに涙液中の総蛋白濃度の測定を行い、涙液量に変動を及ぼす要因について検討した。呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した子牛の STTI 値、ならびに涙液中の総蛋白濃度の測定を行い、臨床的に健常な子牛と比較検討した。さらに、涙液中の蛋白成分について二次元電気泳動を行い、同定解析を行った。スポットの同定までには至らなかったが、免疫グロブリン L 鎖である可能性が示唆されたため、涙液中の IgA 濃度、IgG 濃度の測定を行った。呼吸器疾病の急性炎症期である子牛では、上気道や結膜・角膜の眼粘膜への刺激によって、STTI 値の増加、ならびに涙液中 IgA 濃度が上昇していた可能性が考えられた。

### 1. 黒毛和種子牛の涙液性状ならびに涙液量変動要因の検討（第2章）

臨床的に健常な黒毛和種子牛の STTI 値は  $18.9 \pm 2.9$  mm/min (n=263) で、涙液中の総蛋白濃度は  $1.18 \pm 0.30$  mg/ml (n=38) であることが明らかとなった。涙液量の変動要因として、左右眼、雌雄、生後日齢、母子分離、牛舎内のアンモニア濃度、気温、湿度、照度を検討した。生後日齢においては 15 日ごとに分け検討を行い、生後 15 日齢までの STTI 値 ( $20.6 \pm 3.8$  mm/min, n=33) は生後 61~75 日齢 ( $17.8 \pm 2.0$  mm/min, n=27)、生後 76~90 日齢 ( $17.9 \pm 1.9$  mm/min, n=18) の STTI 値と比較して有意な高値が認められた。牛舎内のアンモニア濃度は、2ppm 未満 ( $17.8 \pm 1.8$  mm/min, n=64) と比較して 2ppm

以上の環境では  $20.3 \pm 1.8$  mm/min (n=41) であり、STTI 値の有意な高値が認められた。以上から、生後日齢と牛舎内のアンモニア濃度が涙液量変動要因であることが明らかとなった。

## 2. 呼吸器疾病罹患子牛の涙液性状について (第3章1節)

呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した子牛 (n=63) と臨床的に健常な子牛 (n=62) とで STTI 値と涙液中の総蛋白濃度の比較検討を行った。呼吸器疾病罹患子牛の STTI 値は、 $22.2 \pm 3.0$  mm/min (n=63) で、涙液中の総蛋白濃度は  $1.85 \pm 0.47$  mg/ml (n=63) であった。一方で、臨床的に健常な子牛の STTI 値は  $18.5 \pm 1.6$  mm/min (n=62) で、涙液中の総蛋白濃度は  $1.15 \pm 0.31$  mg/ml (n=62) であった。呼吸器疾病の急性炎症期である子牛では、STTI 値、ならびに涙液中の総蛋白濃度の有意な高値が認められた。

## 3. 呼吸器疾病罹患子牛における涙液中蛋白質成分について (第3章2節)

呼吸器疾病の急性炎症期である子牛では、涙液中の総蛋白濃度が高値であることが明らかとなり、臨床的に健常な子牛と呼吸器疾病の急性炎症期である子牛において、二次元電気泳動を行い、有意なスポットについて LC-MS/MS を用いて同定解析を行った。臨床的に健常な子牛では、涙液中に 1,329 個のタンパクスポットが認められた。呼吸器疾病の子牛の涙液において、明らかに増加が認められた 3 つのスポットについて、LC-MS/MS を用いて同定解析を行ったが、いずれのスポットも同定までには至らなかった。しかし、そのうちの一つのスポットは、アミノ酸配列の相同性から免疫グロブリン L 鎖である可能性が示唆された。

## 4. 呼吸器疾病罹患子牛における涙液中の免疫グロブリン濃度について (第3章3節)

第3章2節の LC-MS/MS の同定解析により、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛において変動している涙液中の蛋白成分の一つとして、免疫グロブリンの可能性が示唆さ

れたため、涙液中の IgA 濃度、ならびに涙液中 IgG 濃度の測定を行った。涙液中の IgA 濃度は臨床的に健常な子牛において  $0.31 \pm 0.27$  mg/ml (n=20) であった。呼吸器疾病の急性炎症期の子牛の涙液中 IgA 濃度は  $0.98 \pm 0.32$  mg/ml (n=32) で、臨床的に健常な子牛と比較して呼吸器疾病の急性炎症期である子牛では、有意な高値が認められた。涙液中の IgG 濃度は、健常子牛で  $80.1 \pm 39.4$  ng/ml (n=19)、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛では、 $78.7 \pm 42.9$  ng/ml (n=14) であり、有意な差はみられなかった。血清中の IgA 濃度と涙液中の IgA 濃度に相関性はみられず、また涙液中の IgA 濃度と IgG 濃度についても相関性はみられなかった。人の眼粘膜の炎症性疾患において、局所的に涙液中の IgA の産生が亢進するため、涙液中の IgA 濃度は上昇するものの、IgG 濃度は変化しないと報告されている。本研究において、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛では、呼吸器疾病に起因した上気道や眼粘膜である結膜・角膜への刺激により涙液量の増加、ならびに涙液中の IgA 濃度の増加が起こったと考えられた。

さらに、黒毛和種子牛の代表的な疾病である消化器疾病に罹患した子牛の涙液中の IgA 濃度 ( $0.07 \pm 0.04$  mg/ml, n=6)、ならびに IgG 濃度 ( $91.0 \pm 38.8$  ng/ml, n=6) を測定したが、有意な差はみられなかった。また、涙液採取時には臨床的に健常な子牛と評価したにもかかわらず、涙液中 IgA 濃度が高値 ( $0.99 \pm 0.08$  mg/ml, n=7) を示している子牛が認められた。これらの子牛の追跡調査を行ったところ、涙液採取後の数日以内に発熱、呼吸様式の異常等を認め、呼吸器疾病の急性炎症期を示唆する状態への変化が認められた。そのため、臨床的に健常な子牛 (n=2) の継時的な涙液採取を、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断するまで行ったところ、1 頭は急性炎症期であると診断する 3 日前に涙液中 IgA 濃度は  $1.92$  mg/ml、急性炎症期であると診断した際に  $1.76$  mg/ml と高値であった。また、もう 1 頭については急性炎症期であると診断する 2 日前に  $1.94$  mg/ml、呼吸器疾病の急性炎症期であると診断した際に  $1.79$  mg/ml と高値であった。発熱、呼吸様式の異常等の症状を呈する前に、上気道や結膜・角膜の眼粘膜への刺激により、局所的に IgA の産生が亢進していたと推測された。

以上の結果から、本研究では黒毛和種子牛の呼吸器疾病の急性炎症期を検出するひとつの指標として、涙液の有用性が示された。これまで、呼吸器疾病では、畜主が目視で把握しやすい初期症状の明確な指標がなかったが、眼周囲を観察し涙液量が増加しているかを目視で確認することは指標のひとつとして有用である可能性が示唆された。このことは、全ての繁殖和牛農家にとって、眼周囲を観察することの重要性を示していると考えられる。冬季では、一頭が呼吸器疾病に罹患することで、牛群全体への拡大が懸念されている。飼養管理をする中で、眼周囲を観察し、呼吸器疾病の初期において治療を開始することが可能となれば、加療日数の低減、感染拡大の予防、家畜共済の病傷事故件数の低減につながり、ひいてはより良い子牛の育成、生産性の向上および農家の経営安定化に寄与できるものと考えられる。

## 謝辞

本研究を終えるに臨み、多大なる御指導と御助言を賜りました、日本獣医生命科学大学獣医内科学教室・小山秀一教授に心から感謝いたします。

本研究に対し、多大なる御指導と御助言を賜りました、日本獣医生命科学大学獣医内科学教室・松本浩毅准教授、手嶋隆洋准教授、鈴木亮平助教に心から感謝いたします。

本研究を始める契機を作って頂き、多大なる御指導と御助言を賜りました宮城県農業共済組合 家畜診療研修所・村山勇雄所長代行、松田敬一課長に心から感謝いたします。

本研究に理解を示し、貴重な黒毛和種子牛を快く提供していただいた宮城県内の繁殖和牛農家の方々に心から感謝いたします。

また、忙しい日々の業務の中、本研究を行うにあたり、多大な支援とご協力をいただきました宮城県農業共済組合の皆様、中央家畜診療センターの皆様、家畜診療研修所の皆様に心から感謝いたします。

そして、日本獣医生命科学大学獣医内科学教室の大学院生、室員各位に心から感謝いたします。

## 引用文献

1. Aiuti F, Turbessi G, and Ugolini A. Synthesis in vitro of immunoglobulins produced by different human mucous membranes. *Experientia (Basel)* 1969;25:1089
2. Ayoub IA and Yang TJ. Age-dependent changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in cattle: a longitudinal study. *Dev Comp Immunol* 1996;20:353-363.
3. Barnett KC and Joseph EC. Keratoconjunctivitis sicca in the dog following 5-aminosalicylic acid administration. *Hum Toxicol* 1987;6:377-383
4. Bluestone R, Easty DL, Goldberg LS, Jones BR and Petit TH. Lacrimal immunoglobulins and complement quantified by counter-immunoelectrophoresis. *Br J Ophthalmol* 1975; 59:279-281.
5. Broadwater JJ, Schorling JJ, Herring IP and Pickett JP. Ophthalmic examination findings in adult pygmy goats (*Capra hircus*). *Vet. Ophthalmol* 2007;10:269–273.
6. Burfeind O, Sannmann I, Voigtsberger R and Heuwieser W. Receiver operating characteristic curve analysis to determine the diagnostic performance of serum haptoglobin concentration for the diagnosis of acute puerperal metritis in dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2014;149:145-151.
7. Davidson HJ, Blanchard GL and Montgomery PC. Comparisons of tear proteins in the cow, horse, dog and rabbit. *Adv Exp Med Biol* 1994;350:331–334.
8. de Freitas Campos C, Cole N, Van Dyk D, Walsh BJ, Diakos P, Almeida D, Torrecilhas A, Laus JL, and Willcox MD. Proteomic analysis of dog tears for potential cancer markers. *Res Vet Sci* 2008;85:349-352.
9. de Souza GA, Godoy LM and Mann M. Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors. *Genome Biol* 2006;7:R72.
10. Di Zazzo A, Micera A, De Piano M, Cortes M and Bonini S. Tears and ocular surface

- disorders: Usefulness of biomarkers. *J Cell Physiol* 2019;234:9982-9993.
11. Dubreuil P and Lapierre H. reference values for Quebec lactating dairy cows, nursing sows, growing pigs and calves. *Can J Vet Res* 1997;61(3):235-9.
  12. Evans V, Vockler C, Friedlander M, Walsh B and Willcox MD. Lacryglobin in human tears, a potential marker for cancer. *Clin Exp Ophthalmol* 2001;29:161-163.
  13. Fagarasan S and Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defenses. *Nat Rev Immunol* 2003;3:63-72.
  14. Ghaffari MS, Shojaei M, Sabzavari A and Golezardy H. Reference values for intraocular pressure and Schirmer tear test in clinically normal Sanjabi sheep. *Small Rumin Res* 2011;97:101–103.
  15. Gionfriddo JR, Melgarejo T, Morrison EA, Alinovi CA, Asem EK and Krohne SG. Comparison of tear proteins of llamas and cattle. *Am J Vet Res* 2000;61:1289–1293.
  16. Godson DL, Campos M, Attah-Poku SK, Redmond MJ, Cordeiro DM, Sethi MS, Harland RJ and Babiuk LA. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;51:277-92.
  17. Green-Church KB, Nichols KK, Kleinholz NM, Zhang L and Nichols JJ. Investigation of the human tear film proteome using multiple proteomic approaches. *Mol Vis* 2008;14:456-470.
  18. Ham BM, Jacob JT, and Cole RB. Single eye analysis and contralateral eye comparison of tear proteins in normal and dry eye model rabbits by MALDI-ToF mass spectrometry using wax-coated target plates. *Anal Bioanal Chem* 2007 ;387:889-900.
  19. Harker DB. A modified Schirmer tear test technique. Its uses in aiding the diagnosis of chronic keratoconjunctivitis sicca (filamentary keratitis) in dogs. *Vet Rec* 1970;86:196-199.
  20. Hartley C, Williams DL and Adams VJ. Effect of age, gender, weight, and time of day on tear production in normal dogs. *Vet Ophthalmol* 2006;9:53–57.
  21. Herber S, Grus FH, Sabuncuo P and Augustin AJ. Two-dimensional analysis of tear protein



- patterns of diabetic patients. *Electrophoresis*. 2001;22:1838-1844.
22. Kampen AH, Olsen I, Tollersrud T, Storset AK and Lund A. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;113:53-63.
  23. Lebrecht A, Boehm D, Schmidt M, Koelbl H, Schwirz RL and Grus FH. Diagnosis of breast cancer by tear proteomic pattern. *Cancer Genomics Proteomics*. 2009;6:177-182.
  24. Love WJ, Lahenbauer TW, KAass PH, Van Eenennaam AL and Aly SS. Development of a novel clinical scoring system for on-farm diagnosis of bovine respiratory disease in pre-weaned dairy calves. *PeerJ* 2014;2:238.
  25. Makimura S and Suzuki N. Quantitative determination of bovine serum Haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. *Nihon Juigaku Zasshi* 1982;44:15-21.
  26. Mora JR and von Andrian UH. Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells. *Seminar Immunology* 2009;21:28-35.
  27. Panciera RJ and Confer AW. Pathogenesis and pathology of bovine pneumonia. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 2010;26:191-214
  28. Pinard CL, Weiss ML, Brightman AH, Fenwick BW and Davidson HJ. Evaluation of lysozyme and lactoferrin in lacrimal and other ocular glands of bison and cattle and in tears of bison. *Am J Vet Res* 2003;64:104-108.
  29. Prohl A, Schroedl W, Rhode H and Reinhold P. Acute phase proteins as local biomarkers of respiratory infections in calves. *BMC Vet Res* 2015;11:167.
  30. Salonen M, Hirvonen J, Pyörälä S, Sankari S and Sandholm M. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin in experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Res Vet Sci* 1996;60:88-91.
  31. Schirmer O: *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1903;56:197-291.

32. Sen DK and Sarin GS. Immunoglobulin concentrations in human tears in ocular diseases. *Br J Ophthalmol* 1979;63:297-300.
33. Smith BP. *Large Animal Internal Medicine* 4<sup>th</sup> Ed. 2009, Mosby
34. Tofflemire KL, Whitley EM, Gould SA, Dewell RD, Allbaugh RA, Ben-Shlomo G, O'Connor AM and David Whitley R. Schirmer tear test I and rebound tonometry findings in healthy calves. *Vet Ophthalmol* 2015;18:147–151.
35. Verboven CA, Djajadiningrat-Laanen SC, Teske E and Boevé MH. Development of tear production and intraocular pressure in healthy canine neonates. *Vet Ophthalmol* 2014;17:426-31.
36. Vogels Z, Chuck GM, zmorton JM. Failure of transfer of passive immunity and agammaglobulinaemia in calves in south -west Victorian dairy herds: prevalence and risk factors. *Aust Vet J* 2013;91:150-158.
37. Webber WR, Jones DP and Wright P. Fluorophotometric measurements of tear turnover rate in normal healthy persons: evidence for a circadian rhythm. *Eye* 1987;1:615-620.
38. Whitley RD and Moore CP. Ocular diagnostic and therapeutic techniques in food animals. *Vet Clin North Am Large Anim Pract* 1984;6:553–575.
39. Wieser B, Tichy A and Nell B. Correlation between corneal sensitivity and quantity of reflex tearing in cows, horses, goats, sheep, dogs, cats, rabbits, and guinea pigs. *Vet Ophthalmol* 2013;16:251–262.
40. 猪熊壽 北川均 内藤善久 獣医内科学 第2版 大動物編, 2005, 文永堂
41. 加藤敏英、他：子牛の呼吸器病疾患を考える, 臨床獣医, 32, 11-40 2014
42. 栗橋克昭和, DACRYOLOGY, 1998, メディカル葵出版
43. 小谷忠夫, 工藤荘六, セベリンの獣医眼科学 第3版, 2003, 株式会社メディカルサイエンス社
44. 丸尾敏夫 本田孔士 白井正彦 田野保雄 眼科診療プラクティス 17. 眼科診療

に必要な生理学, 1995, 文永堂

45. 丸尾敏夫 本田孔士 臼井正彦 田野保雄 眼科診療プラクティス 22.やさしい眼  
の細胞・分子生物学, 1996, 文永堂
46. 森田猛 子牛の医学, 2014, 株式会社 緑書房
47. 森田猛 子牛の科学, 2009, 株式会社 緑書房