

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)

学位論文の内容の要約

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

巢山 由乃

(指導教授：小山秀一)

要約

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。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。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、次いで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。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。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に罹患する子牛は多く、和牛農家の経済的損失は大きい。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されている。本研究は、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するために行った。

第2章では、臨床的に健常であると診断した子牛の涙液量の測定、涙液中の総蛋白濃度の測定を行い、涙液量に影響を与える要因について検討を行った。涙液量は Schirmer Tear Test (STT) の第I法に準じて行い、STT I 値と表記した。臨床的に健常な黒毛和種子牛の STT I 値は 18.9 ± 2.9 mm/min (n=263) であった。生後15日齢までの STT I 値 (20.6 ± 3.8 mm/min, n=33) は生後61

～75 日齢の 17.8 ± 2.0 mm/min (n=27)、及び生後 76～90 日齢の 17.9 ± 1.9 mm/min (n=18) と比較し、有意な高値が認められた。アンモニア濃度が 2ppm 以上の環境における STTI 値 (20.3 ± 2.8 mm/min, n=41) は、2ppm 未満の環境における STTI 値 (17.8 ± 1.8 mm/min, n=64) と比較して、有意な高値が認められた。涙液中の総蛋白濃度は、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 ± 0.30 mg/ml (n=38) であった。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。

第 3 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、涙液性状の有用性を検討した。第 1 節において呼吸器疾病の子牛の STTI 値と涙液中の総蛋白濃度の検討を行った。呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の STTI 値 (22.2 ± 3.0 mm/min, n=63) は、臨床的に健常な子牛の STTI 値 (18.5 ± 1.6 mm/min, n=62) と比較して、有意な高値が認められた。上気道感染は鼻粘膜への刺激や炎症が起ることにより涙液産生が増加するとされており、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛では上気道感染が涙液産生の要因であると考えられた。また、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 ± 0.47 mg/ml, n=63) は、臨床的に健常な子牛 (1.15 ± 0.31 mg/ml, n=62) と比較して、有意な高値が認められた。

続く第 2 節では涙液中の蛋白成分の比較同定解析を二次元電気泳動、Liquid Chromatography-Mass spectrometry (LC-MS/MS) を用いて行った。二次元電気泳動の結果より、1,329 個のスポットが臨床的に健常な子牛で検出された。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 個であり、25kDa 付近が最も変動しているスポット数が多かった。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、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。呼吸器疾病の急性炎症期の子牛 (0.98 ± 0.32 mg/ml, n=30) では、健全子牛 (0.31 ± 0.27 mg/ml, n=21)、ならびに消化器疾病罹患子牛 (0.07 ± 0.04 mg/ml, n=6) と比較して、涙液中の IgA 濃度に顕著な高値が認められたことから、涙液中の総蛋白濃度にみられた増加の主な要因であると考えられた。また、涙液中の IgG 濃度については、健全子牛で 80.1 ± 39.4 ng/ml (n=19)、呼吸器疾病の急性炎症期の子牛では 78.7 ± 42.9 ng/ml (n=14)、消化器疾病の子牛では 91.0 ± 38.8 ng/ml (n=6) であった。急性細菌性結膜炎や眼瞼結膜炎、急性角結膜炎といった眼粘膜の炎症性疾患では、局所的に 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子牛にみられた涙液、および涙液中 IgA の増加は、呼吸器疾病に起因した上気道や眼粘膜である結膜や角膜への刺激によって引き起こされたと考えられた。

第 4 節では、呼吸器疾病の急性炎症期における涙液性状の変化について検討を行った。涙液採取時には臨床的に健全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 ± 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、呼吸速迫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、臨床的に健全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、呼吸器疾病の臨床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。

以上の結果から、本研究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可能性が示唆された。これまで、呼吸器疾病の急性炎症期における明確な指標はなく曖昧であったが、涙液量の増加を観察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、近年、一戸あたりの飼養頭数が増加傾向にある畜産農家のみならず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、牛群全体への感染拡大が懸念されている。毎日の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。