

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 巢山由乃

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、ウイルスや細菌などの感染により発症することが知られている。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。申請者は、呼吸器疾病に罹患した黒毛和種子牛の初診時に流涙が多くみられることから、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、涙液量と性状の変化が有用であるのかを検討している。

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 の第I法(STT I値)に準

じて行った。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。特に、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、有意に高値であることが認められた。

また、牛舎内アンモニア濃度が 2ppm 以上での STT I 値 (20.3 ± 2.8 mm/min, $n=41$) は、2ppm 未満の環境における STT I 値 (17.8 ± 1.8 mm/min, $n=64$) 比較して有意に高値であった。さらに、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 ± 0.30 mg/ml ($n = 38$) であった。以上のことから、健常子牛では STT I 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を明らかとした。

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、涙液量と性状の変化が有用であるのかの検討を行っている。なお、第 3 章での検討は、全て牛舎内アンモニア濃度が 2ppm 以下の環境であることを確認した農家の子牛を用いている。第 1 節において呼吸器疾病の子牛の STT I 値と涙液中の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 STT I 値 (22.2 ± 3.0 mm/min, $n=63$) は、臨床的に健常な子牛の STT I 値 (18.5 ± 1.6 mm/min, $n=62$) と比較して有意に高値であった。上気道感染は鼻粘膜への刺激や炎症が起こ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, $n=62$) と比較して有意に高値であることが確認された。

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) を用いて行っている。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、25 kDa付近が最も変動しているスポット数が多かった。そこで、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、アミノ酸配列の相同性から免疫グロブリンのL鎖である可能性が示唆された。

第3節では2節の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 ± 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 ± 0.32 mg/ml (n=32)で、臨床的に健常な子牛と比較して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 ± 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 ± 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 ± 0.04 mg/ml, n=6)、ならびにIgG濃度 (91.0 ± 38.8 ng/ml, n=6)を測定したが有意な差はみられなかった。

第4節では、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 ± 0.08 mg/ml, n=7)を示している子牛の追跡調査を行った。その結果、涙液採取後の数日以内に発熱、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。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、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。

以上のように、本論文は黒毛和種子牛の呼吸器疾病の急性炎症期を検出する一つの指標として、涙液量と涙液中 IgA が増加することを明らかにした。これまで呼吸器疾病の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の増加を目視で確認することは畜主にとっても容易であり、呼吸器疾病の早期発見に寄与するものと考えられる。さらにこのことは早期治療、加療日数の低減、感染拡大の予防等、子牛の飼育管理の向上につながり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。

よって審査委員一同は、本論文が博士（獣医学）の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判定した。