

## 研 究

## 黒毛和種子牛の涙液量と涙液量変動に及ぼす要因

巢山 由乃<sup>1)</sup>、内海 博文<sup>1)</sup>、村山 勇雄<sup>2)</sup>

1) 宮城県農業共済組合連合会 中央家畜診療センター

2) 宮城県農業共済組合連合会 家畜診療研修所

## I. はじめに

涙液は、眼表面の恒常性を維持する働きを有しており、油層、水層、およびムチン層の3層から構成され、水層には多種多様なタンパク質が存在している<sup>1)</sup>。水層に存在する主涙腺からの分泌が涙液量を決めていると言われている。涙液の分泌様式は、神経支配を伴わない基礎性分泌、および副交感神経による反射性分泌の2種類あり、反射性分泌は水層の主涙腺のみで行われている<sup>1)</sup>。基礎性分泌は主にまばたき、パラクリンやオートクリンにより起こる。反射性分泌は、角結膜表面や鼻粘膜の刺激時などに伴って分泌が起こり、弱い刺激は片眼性、強い刺激が加わると両眼から流涙する<sup>1)</sup>。

涙液は電解質、水、およびタンパク質の3種類で構成されている。タンパク質には、合成し貯蔵され、細胞外からの神経刺激により細胞内のセカンドメッセンジャーレベルが上昇すると放出される調節タンパク質（リゾチームおよびラクトフェリンなど）と、細胞内のタンパク量に依存して作られ、貯蔵されることなくすぐ分泌される恒常性タンパク質（IgA）が存在している<sup>2)</sup>。

ヒトの涙液中では491種類のタンパク質が含まれていると報告されており<sup>3)</sup>、ヒトの医療や小動物獣医療においては、涙液中に含まれているタンパク質が疾患のバイオマーカーになると多くの研究が行われている。ドライアイの患者では、涙液中に含まれるタンパク質であるラクトフェリンの増加、および

リゾチームの減少が確認されている<sup>4)</sup>。また、ヒトの乳癌患者の涙液においてタンパク質の増減することが報告され<sup>5)</sup>、悪性腫瘍を持つ犬において、涙液の二次元電気泳動を行った結果、正常犬では検出されなかったスポットが出現したとの報告もある<sup>6)</sup>。

我々は、黒毛和種子牛において、発熱を伴う呼吸器感染症を発症すると、涙液量が多くなり漿液性眼脂を付着している子牛が多いことに着目した。このように特定の疾病で涙液量が増加するのであれば、牛においても涙液をバイオマーカーとして活用することが出来る可能性がある。しかし、牛における涙液に関する研究はほとんど無く、子牛の涙液量に関する報告は無い。そこで、今回我々は子牛における正常な涙液量、および涙液量が増加する要因を把握することを目的として調査した結果、若干の知見を得たので報告する。

## II. 材料および方法

調査期間：2015年5月～2016年2月の10ヶ月間とした。

調査対象牛：宮城県内の和牛繁殖農家6軒において飼養されていた、3ヶ月齢以下の黒毛和種子牛77頭（雄40頭、雌37頭）を調査対象とした。供試牛は、被毛粗剛がなく、削瘦、下痢、および呼吸器症状を示していない子牛を対象とした。

調査方法：調査子牛については、体温、心拍数、および呼吸数を計測し、被毛状態、栄養状態などの

一般状態および疾病発生状況を確認した後、涙液量の測定を行った。その際、体温が39.5度未満を平熱子牛群 (n = 59)、39.5度以上を発熱子牛群 (n = 18) と群分けをした。また、飼育環境の客観的な評価のために、子牛が飼育されている場所の空气中アンモニア濃度を測定した。

涙液量の測定は、図1に示した涙液量検査試験紙 (Schirmer tear test, MERCK Animal Health, USA) を用いて、基礎性分泌と反射性分泌の両方の分泌による涙液量を測定するSchirmerのテスト第一法に準じて行った。試験紙の切れ込み部位を山折りにし、下眼瞼を露出させ、外側3分の1のところ一分間静置した後に青色に染まった長さを計測した。測定は、必ず左眼、右眼の順に計測し、左眼を計測する際は子牛の右側に立って行った。左眼、および右眼それぞれの涙液量を測定した結果、左右に有意差を認めないことから、左右の平均値をその子牛の涙液量とした。

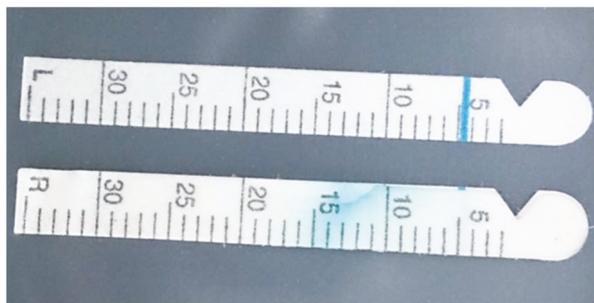


図1 Schirmer tear test  
上：使用前、下：使用后 (15mm)

涙液量の変動要因については、検討項目を、体温、性別、生後日数、牛床環境、および季節とした。体温は39.5度で群分けをし、生後日数に関しては生後0日から90日まで15日ごとに群分けを行った。牛床環境は、敷き藁が豊富で乾燥している乾燥環境、および堆肥や糞尿で湿潤している湿潤環境を比較した。季節は、同一農場において夏 (平均気温25.7℃)、および冬 (平均気温4.8℃) での比較を行った。

空气中アンモニア濃度の測定には、図2で示した検知管式気体測定器 (GV-100S, 株式会社ガステック、神奈川) を用いた。測定方法は、子牛が座っている状態で鼻鏡の高さに検知器を静置、吸引し、1分間計測した (図3)。得られた数値は悪臭防止法<sup>7)</sup>に従って分類し、2 ppm以上を高アンモニア濃

度とした。

統計方法：統計解析にはSPSS13.0 (エス・ピー・エス・エス株式会社、東京) を用いた。得られた結果は平均値±標準偏差で示した。各検査項目における2群間の比較は、F検定を用いて分散性を確認したうえで、等分散の項目にはstudentのt検定、非等分散の項目にはwelchのt検定を行った。生後日数についての多重比較には一元配置分散分析法を用いた。各検定共に危険率5%未満を有意差ありとした。



図2 検知管式気体測定器 (GV-100S)



図3 空气中アンモニア濃度の測定

### Ⅲ. 結果

涙液量は、平熱子牛群は $17.8 \pm 2.5$ mm、および発熱子牛群は $18.4 \pm 2.7$ mmで両群間に有意な差は認められなかった (図4)。そのため、涙液量の変動要因についての検討は平熱子牛群で行った。性別では、涙液量が雄 $18.1 \pm 3.0$ mm、および雌 $17.7 \pm 1.8$ mmであり、雌雄で有意な差は認められなかった (図5)。15日間隔で群分けした生後日数では、涙液量に各群間での有意な差は認められなかった (図6)。牛床環境では、敷料が豊富で乾燥した環境下の子牛の涙液量 (n=31,  $17.0 \pm 2.2$  mm) と比較し

て、牛床に排泄物が蓄積し湿潤環境下の子牛の涙液量 (n=28, 18.8±2.5mm) は有意な高値を示した (図7)。季節では、夏の涙液量 (n=14, 18.4±1.6mm)、および冬の涙液量 (n=10, 17.9±1.2mm) に有意な差は認められなかった (図8)。

空气中アンモニア濃度は、乾燥環境 (n=3, 1.3±0.7ppm) と比較して、湿潤環境 (n=2, 3.7±0.1ppm) は有意な高値を示した (図9)。

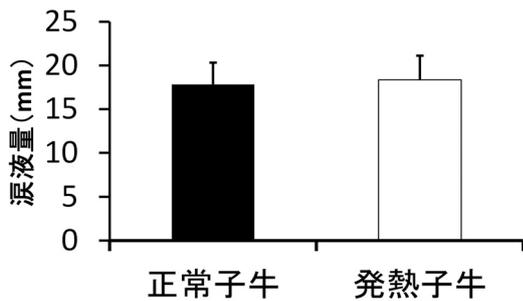


図4 平熱子牛群と発熱子牛群における涙液量の比較  
■: 平熱子牛群 (n=59)、□: 発熱子牛群 (n=18)  
mean±SD

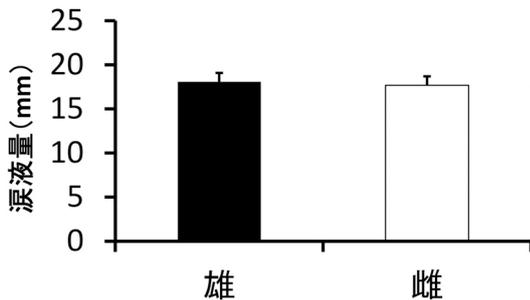


図5 雄子牛群と雌子牛群における涙液量の比較  
■: 雄子牛群 (n=30)、□: 雌子牛群 (n=29)  
mean±SD

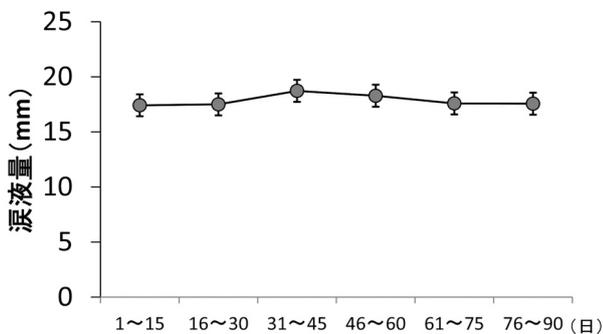


図6 生後日数における涙液量の比較  
n=59、mean±SD

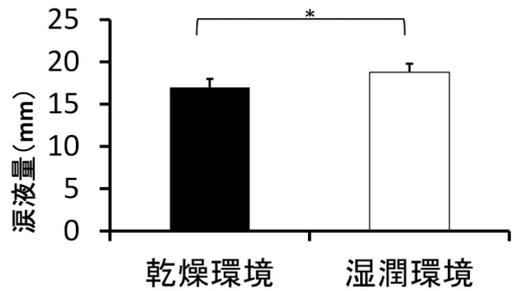


図7 牛床環境における涙液量の比較  
■: 乾燥環境群 (n=30)、□: 湿潤環境群 (n=29)  
mean±SD、\*: p<0.05

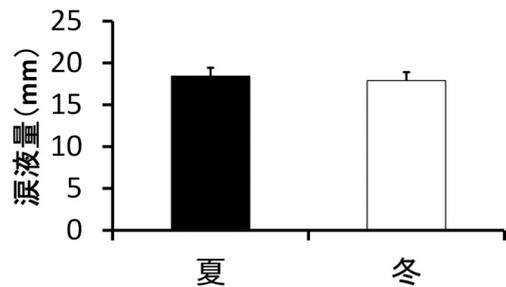


図8 季節による涙液量の比較  
■: 夏群 (n=14)、□: 冬群 (n=10)  
mean±SD

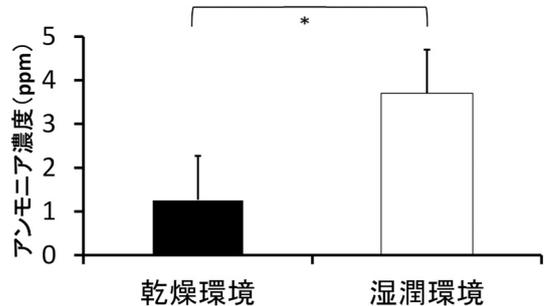


図9 牛床環境における空气中アンモニア濃度の比較  
■: 乾燥環境群 (n=3)、□: 湿潤環境群 (n=2)  
mean±SD、\*: p<0.05

#### IV. 考 察

今回の調査において黒毛和種子牛では性別、生後日数、体温、および季節は涙液量に影響を与えないことが示され、涙液量の正常値は18mm前後であると考えられた。また、湿潤環境で飼養されている子牛では乾燥環境で飼育されている子牛に比べて涙液量が有意な高値を示したことから、涙液量の変動には空气中のアンモ

ニア濃度が影響していると考えられた。牛舎内の環境負荷ガスとしての報告はアンモニアに限定され、メタンや亜酸化窒素に関する報告は稀である<sup>8)</sup>。亜酸化窒素の発生は糞尿中の窒素に由来していると言われているが、窒素の酸化還元反応が起こりにくい牛舎においてはその発生量は少ないと考えられている。そのため、環境中で子牛の粘膜を刺激するの物質はアンモニアであると考えられる<sup>9)</sup>。

今回の調査を行った湿潤環境の農場では子牛の呼吸器疾患が多いことから、高アンモニア濃度下での飼養により、鼻粘膜が持続的に刺激され、ウイルスや細菌が侵入しやすい環境を創り出し、そのことが子牛の呼吸器疾患の多発に繋がっている可能性も示唆された。このような農場では、牛床環境を見直し、換気方法を改善することがウイルス、細菌に曝露されにくい環境を創り出し、子牛の呼吸器疾患低減に繋がっていくと考えられた。また同時に涙液量を測定した際、農場全体で涙液量の高値が示される場合はアンモニア濃度が高い可能性があり、子牛の呼吸器疾患にさらなる注意を払う必要があると考える。

犬での正常涙液量はビーグルにおいて $18.89 \pm 2.62$  mm<sup>10)</sup>、ラブラドルレトリバーでは $22.9 \pm 4.1$  mm、シェットランドシープドッグでは $15.8 \pm 1.8$  mmとの報告<sup>11)</sup>があり、犬種によって涙液量に違いがある。今回調査した子牛の涙液量は、報告されている犬の涙液量よりも少なく、涙液量には動物差や品種差があるものと考えられ、動物において涙液量を観察する場合には、目的とする動物や品種の正常な涙液量を把握する必要がある。

今回の調査では、黒毛和種子牛についてのものがあつたため、今後ホルスタイン種や交雑種における

涙液量についても検討を行う必要がある。さらに、涙液中に含まれているタンパク質の成分について調査し、涙液をバイオマーカーとしての活用について検討を行っていきたいと考えている。

## 参考文献

- 1) 本田孔士、他編集：眼科診療プラクティス17眼科診療に必要な生理学、文光堂、14-16 (1944)
- 2) 本田孔士、他編集：眼科診療プラクティス17眼科診療に必要な生理学、文光堂、16-17 (1944)
- 3) Gustavo, A, et al. : Identification of 491 proteins in the tear fluid proteome reveals a large number of proteases and protease inhibitors, *Genome Biology*, Volume 7, Issue 8, Article R72 (2006)
- 4) Ham, BM, et al. : 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.* 387(3) : 889-900, February, (2007)
- 5) Lebrecht, A, et al. : Diagnosis of Breast Cancer by Tear Proteomic Pattern, *CANCER GENOMICS&PROTEOMICS* 6 : 177-182, (2009)
- 6) Carla, C, et al. : Proteomic analysis of dog tears for potential cancer markers, *Veterinary Science*85, 349-352, (2008)
- 7) 環境省環境管理局大気生活環境室：臭気対策行政ガイドブック、(2002)
- 8) 長田隆ら：畜舎内のアンモニア、メタン、および亜酸化窒素の濃度, *J. Japan] Asspciation on Odor Enviroment* Vol.35 No.1 (2004)
- 9) 白石誠ら：岡山県内の酪農場から発生する環境負荷ガス実態調査、岡山県総合畜産センター研究報告 第14号
- 10) Akihiko Saito, et al. : Estimation of lacrimal level and testing methods on normal beagles, *Veterinary Ophthalmology* 4, 7-11, (2001)
- 11) Hamor, RE, et al. : Evaluation of results for Schirmer tear tests conducted with and without application of a topical anesthetic in clinically normal dogs of 5 breeds, *AJVR*, vol61, No.11, November, (2000)