

研 究

黒毛和種子牛の呼吸器疾病における涙液成分の有用性

後上由乃¹⁾ 手嶋隆洋²⁾ 鈴木亮平²⁾松本浩毅²⁾ 小山秀一²⁾

1) 宮城県農業共済組合 中央家畜診療センター

2) 日本獣医生命科学大学 獣医内科学教室

要 約

臨床的に健常な子牛について、Schirmer Tear Test I 法による涙液量 (STT I 値)、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。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った。次に、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛のSTT I 値と涙液中の総蛋白濃度を測定したが、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。涙液中の免疫グロブリン濃度を測定したところ、呼吸器疾病の急性炎症期の子牛では、健常子牛と比較して、涙液中のIgA濃度は顕著な高値が認められた。涙液中IgA量の増加は、呼吸器疾病に起因した上気道や結膜、ならびに角膜への刺激によって引き起こされたと考えられた。さらに臨床的に健常であると評価を行った2頭について涙液採取を継続的に行ったところ、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た。

キーワード：黒毛和種子牛，呼吸器疾病，免疫グロブリン，涙液，IgA濃度

緒 言

子牛は繁殖と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^{2,9)}。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²⁰⁾。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」が観察される子牛が多い。実際に流涙を認められた子牛の体温や呼吸を観察すると、39.5度以上の発熱や呼吸様式の異常が認められた。しかし、流涙が認められる子牛の多くは発咳や鼻水等の臨床症状は乏しく、治療対象になることは少ない。このような明らかな呼吸器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繋がると考えた。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^{4,5,6,10)}。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を行った。

材料および方法

宮城県内に飼養されている生後90日齢までの子牛について、WI BRD Clinical Scoring System¹¹⁾を用いて評価し、体温が39.5度未満、正常な呼吸様式を呈している子牛を、臨床的に健常であると診断し、137頭（雄：70頭、雌：67頭）を供試した。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。涙液中の総蛋白濃度はBradford法を用いた。涙液量に与える要因については、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。左眼と右眼の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。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、雌雄でのSTT I値の平均値の2群間の差の検定、ならびに牛舎内のアンモニア濃度について2 ppm以上の環境と2 ppm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。

成績

臨床的に健常な黒毛和種子牛のSTT I値は $18.9 \pm 2.9 \text{ mm/min}$ ($n=263$) であった。生後15日齢

までのSTT I値 ($20.6 \pm 3.8 \text{ mm/min}$, $n=33$) は生後61～75日齢のSTT I値 ($17.8 \pm 2.0 \text{ mm/min}$, $n=27$)、及び生後76～90日齢のSTT I値 ($17.9 \pm 1.9 \text{ mm/min}$, $n=18$) と比較し、有意な高値 ($P < 0.05$) が認められた (図1)。アンモニア濃度が2 ppm以上の環境におけるSTT I値 ($20.3 \pm 2.8 \text{ mm/min}$, $n=41$) は、2 ppm未満の環境におけるSTT I値 ($17.8 \pm 1.8 \text{ mm/min}$, $n=64$) と比較して、有意な高値 ($P < 0.05$) が認められた。また、STT I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 (図2)。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、 $1.18 \pm 0.30 \text{ mg/ml}$ ($n=38$) であった。

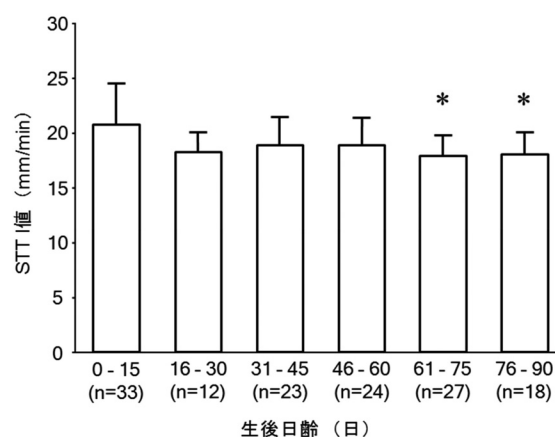


図1 生後日齢におけるSTT I値の比較

*生後15日齢未満と生後61日齢以降について $P < 0.05$

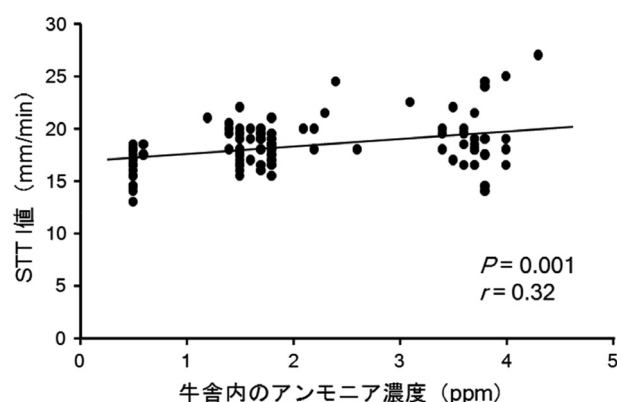


図2 STT I値と牛舎内のアンモニア濃度の相関性

STT I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。 ($P=0.001$, $r_s=0.32$)。

考 察

本研究におけるSTT I値とこれまでに報告のあった9.3～13.3週齢のホルスタイン種子牛のSTT I値($20.4 \pm 5.0 \text{ mm/min}$)¹⁴⁾は同様な結果であった。また小型反芻動物である羊のSTT I値($18.5 \pm 2.5 \text{ mm/min}$)、山羊のSTT I値($15.8 \pm 5.7 \text{ mm/min}$)^{3,8,15)}とも同様な結果であったが、成牛のSTT I値($34.15 \pm 20.47 \text{ mm/min}$)¹⁵⁾よりも低値であった。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た。

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が明らかとなった。本研究では、生後15日齢までのSTT I値は生後61～90日齢のSTT I値と比較して、有意な高値が認められた。出生直後の黒毛和種子牛の免疫機能は未熟であり、末梢血のT細胞、B細胞のいずれのリンパ球も少なく、生後徐々に増加していき、生後15日齢前後で大きく増加すると報告されている¹⁹⁾。また、結膜や角膜への刺激というのは、「流涙」の要因になるとされている¹⁶⁾。生後15日齢未満の子牛では、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、STT I値は高値を示していたと推測された。さらに、牛舎内の高いアンモニア濃度は持続的な眼粘膜への刺激となるため、STT I値は高値を示したと考えられた。

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。

材料および方法

宮城県内に飼養されている生後15～90日齢の黒毛和種子牛125頭を供試した。WI BRD Clinical Scoring Systemを用いて、合計スコアが5以上で、体温39.5度以上、頻呼吸等の呼吸様式の異常を認め、血清蛋白分画において $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 分画が上昇している子牛63頭を呼吸器疾病の急性炎症期であると診断し、供試した。また、臨床的に健常な子牛として62頭供試

した。それぞれ、STT I値、涙液中の総蛋白濃度を測定、比較した。

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STT I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。

成 績

呼吸器疾病の急性炎症期である子牛のSTT I値($22.2 \pm 3.0 \text{ mm/min}$, $n=63$)は、臨床的に健常な子牛のSTT I値($18.5 \pm 1.6 \text{ mm/min}$, $n=62$)と比較して、有意な高値($P<0.05$)が認められた(図3)。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($1.85 \pm 0.47 \text{ mg/ml}$, $n=63$)は、臨床的に健常な子牛($1.15 \pm 0.31 \text{ mg/ml}$, $n=62$)と比較して、有意な高値($P<0.05$)が認められた。

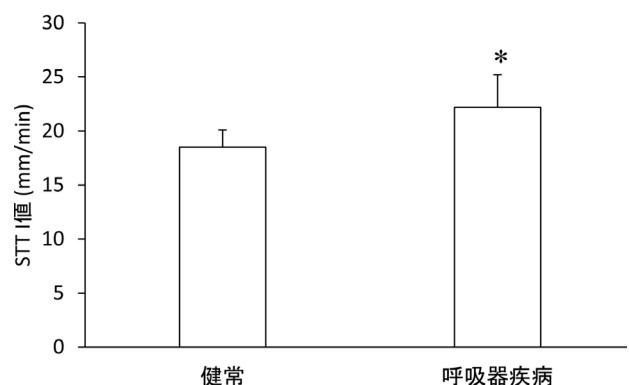


図3 臨床的に健常な子牛と呼吸器疾病の急性炎症期である子牛のSTT I値の比較。(* $P<0.05$)

考 察

呼吸器疾病の急性炎症期である子牛は、健常な子牛と比較してSTT I値は有意な高値であった。流涙症というのは、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^{16,17)}。涙液の産生増加の原因として、上気道感染症やアレルギー性鼻炎症、ドライアイなどが挙げられる。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¹⁶⁾。上気

道感染症は、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¹⁶⁾。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、上気道感染症により持続的に鼻粘膜への刺激が起こり、涙液産生が増加したと考えられた。

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は臨床的に健常な子牛と比較して、有意な高値であった。涙液中には、Regulated proteinとConstitutive proteinの2種類の蛋白質が存在する¹⁸⁾。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¹⁸⁾。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おこる¹⁸⁾。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ため、刺激が強いほど、分泌量は増加する。一方で、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、分泌が行われる¹⁸⁾。呼吸器疾病の急性炎症期である子牛では、鼻粘膜への刺激や炎症により涙液産生の増加が起こり、Regulated proteinの分泌量が増加すると考えられる。Regulated proteinの分泌が増加することで、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である子牛において、涙液中の総蛋白濃度は上昇したと考えられた。

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、粘膜免疫が深く関わっている。IgAは粘膜分泌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^{7,12)}。呼吸器疾病の急性炎症期である子牛は、免疫を司っている蛋白質成分に変動が起きているのではないかと推測された。

次に、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。

材料および方法

宮城県内に飼養されている生後15～90日齢の黒毛和種子牛を供試した。臨床的に健常な子牛として35頭、呼吸器疾病の急性炎症期である子牛として32頭、消化器疾病の子牛として6頭供試した。消化器疾病に罹患している子牛については、糞便検査を行い、コクシジウムのオーストを顕微鏡にて確認しており、またWI BRD Clinical Scoring Systemを用いて合計スコアが5未満、頻呼吸等の呼吸器症状を呈していないことを確認している。

涙液中、血清中のIgA濃度の測定にはBovine IgA ELISA Kit (Bethyl Laboratories, AL, U.S.A.) を使用し、manufacture's instructionに従って測定を行った。涙液中のIgG濃度の測定にはBovine IgG ELISA Kit (Abnova, Taipei, Taiwan) を使用し、manufacture's instructionに従って測定を行った。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。

さらに、臨床的に健常な子牛であると評価を行った2頭について呼吸器疾病の急性炎症期であると診断するまでそれぞれ4日間と3日間、涙液採取を継続的に行い、涙液中、ならびに血清中のIgA濃度の測定を行った。4日間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。

成績

呼吸器疾病の急性炎症期である子牛の涙液中IgA濃度 ($0.98 \pm 0.32 \text{ mg/ml}$, $n=30$) は、健常子牛のIgA濃度 ($0.31 \pm 0.27 \text{ mg/ml}$, $n=21$)、ならびに消化器疾病罹患子牛のIgA濃度 ($0.07 \pm 0.04 \text{ mg/ml}$, $n=$

6)と比較して、顕著な高値(それぞれ $P<0.001$, $P<0.005$)が認められた(図4)。また、涙液中のIgG濃度については、健常子牛で $80.1\pm39.4\text{ng/ml}$ ($n=19$), 呼吸器疾病の急性炎症期の子牛では $78.7\pm42.9\text{ng/ml}$ ($n=14$), 消化器疾病の子牛では $91.0\pm38.8\text{ng/ml}$ ($n=6$)であった。

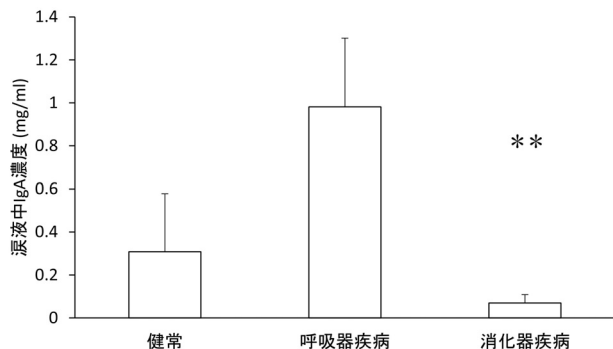


図4 臨床的に健常な子牛, 呼吸器疾病の急性炎症期である子牛, 消化器疾病の子牛の涙液中IgA濃度の比較。

* 健常子牛と呼吸器疾病の子牛の間で $P<0.001$

** 健常子牛と消化器疾病子牛の間で $P<0.005$

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 21mm/min , 涙液中のIgA濃度は 1.92mg/ml といずれも高値を示した(図5, 図6)。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 28mm/min , 涙液中のIgA濃度は 1.76mg/ml であった(図5, 図6)。子牛Bでは、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 20mm/min , 涙液中のIgA濃度は 1.94mg/ml と高値であった(図5, 図6)。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 24mm/min , 涙液中のIgA濃度は 1.79mg/ml であった(図5, 図6)。

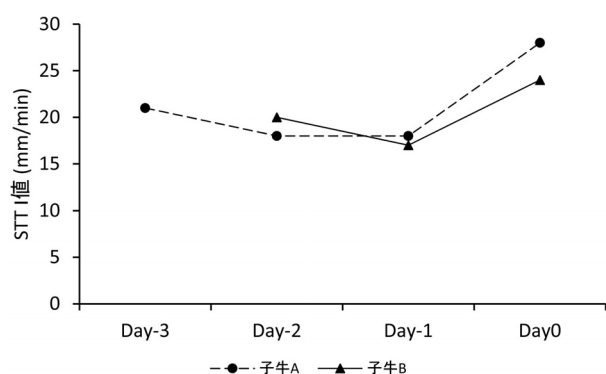


図5 継時的に測定したSTT I値の推移。

mlであった(図5, 図6)。

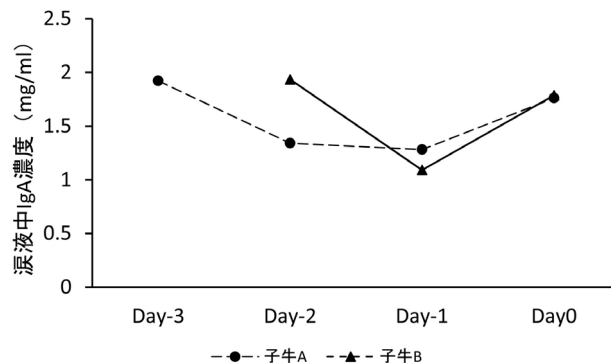


図6 継時的に測定した涙液中IgA濃度の推移。

考 察

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。本研究では、涙液中のIgA濃度、IgG濃度の評価を行った。免疫グロブリンには、IgMやIgDも含まれているが、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、本研究では検討を行わなかった。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 $78.7\pm42.9\text{ng/ml}$ ($n=14$)であり、臨床的に健常な子牛、ならびに消化器疾病罹患子牛の涙液中IgG濃度と比較して、有意な差は認められなかった。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¹⁹⁾。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。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。

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た。本研究では、継時的採取がそれぞれ

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。しかし、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のではないかと推測された。本研究では短期間、さらには2頭のみ供試であったため、今後は長期間での測定を行い、供試する子牛の数を増やして検討する必要性がある。

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。

引用文献

- 1) Aiuti F, Turbessi G, Ugolini A: Synthesis in vitro of immunoglobulins produced by different human mucous membranes, *Experientia (Basel)*, 25, 1089 (1969)
- 2) Ayoub IA, Yang TJ: Age-dependent changes in peripheral blood lymphocyte subpopulations in cattle: a longitudinal study, *Dev Comp Immunol*, 20, 353-363 (1996)
- 3) Broadwater JJ, Schorling JJ, Herring IP, Pickett JP: Ophthalmic examination findings in adult pygmy goats (*Capra hircus*), *Vet Ophthalmol*, 10, 269-273 (2007)
- 4) de Freitas Campos C, Cole N, Van Dyk D, Walsh BJ, Diakos P, Almeida D, Torrecilhas A, Laus JL, Willcox MD: Proteomic analysis of dog tears for potential cancer markers, *Res Vet Sci*, 85, 349-352 (2008)
- 5) Di Zazzo A, Micera A, De Piano M, Cortes M, Bonini S: Tears and ocular surface disorders: Usefulness of biomarkers, *J Cell Physiol*, 234, 9982-9993 (2019)
- 6) Evans V, Vockler C, Friedlander M, Walsh B, Willcox MD: Lacryglobin in human tears, a potential marker for cancer, *Clin Exp Ophthalmol*, 29, 161-163 (2001)
- 7) Fagarasan S, Honjo T: Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defenses, *Nat Rev Immunol*, 3, 63-72 (2003)
- 8) Ghaffari MS, Shojaei M, Sabzavari A, Golezard H: Reference values for intraocular pressure and Schirmer tear test in clinically normal Sanjabi sheep, *Small Rumin Res*, 97, 101-103 (2011)
- 9) Kampen AH, Olsen I, Tollersrud T, Storset AK, Lund A: Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life, *Vet Immunol Immunopathol* 113, 53-63 (2006)
- 10) Lebrecht A, Boehm D, Schmidt M, Koelbl H, Schwirz RL, Grus FH: Diagnosis of breast cancer by tear proteomic pattern, *Cancer Genomics Proteomics*, 6, 177-182 (2009)
- 11) Love WJ, Lahenbauer TW, Kass PH, Van Eenennaam AL, Aly SS: Development of a novel clinical scoring system for on-farm diagnosis of bovine respiratory disease in pre-weaned dairy calves, *PeerJ*, 2, 238 (2014)
- 12) Mora JR, von Andrian UH: Role of retinoic acid in the imprinting of gut-homing IgA-secreting cells, *Semin Immunology*, 21, 28-35 (2009)
- 13) Sen DK, Sarin GS: Immunoglobulin concentrations in human tears in ocular diseases, *Br J Ophthalmol*, 63, 297-300 (1979)
- 14) Tofflemire KL, Whitley EM, Gould SA, Dewell RD, Allbaugh RA, Ben-Shlomo G, O' Connor AM, David Whitley R: Schirmer tear test I and rebound tonometry findings in healthy calves, *Vet Ophthalmol*, 18, 147-151 (2015)
- 15) Wieser B, Tichy A, Nell B: Correlation between corneal sensitivity and quantity of reflex tearing in cows, horses, goats, sheep, dogs, cats, rabbits, and guinea pigs, *Vet Ophthalmol*, 16, 251-262 (2013)
- 16) 栗橋克昭: DACRYOLOGY, 95-96, メディカル葵出版 (1998)
- 17) 小谷忠夫, 工藤荘六: セベリンの獣医眼科学 第3版, 206-213, 株式会社メディカルサイエンス社 (2003)
- 18) 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, 16-17, 文永堂 (1995)
- 19) 森田猛: 子牛の科学, 140-142, 株式会社 緑書房 (2014)
- 20) 森田猛: 子牛の科学, 156, 株式会社 緑書房 (2009)