

酪農学研究科 博士論文

牛血液中ハプトグロビン濃度簡易測定法の開発とその臨床応用に関する研究

Development of hemoglobin binding assay for measuring bovine haptoglobin in serum and its application to clinical pathological examination

中村 正明

Nakamura Masaaki

目次

凡例	
緒言	1
第I章 血清中ハプトグロビン値の簡易測定法の開発	
1.序文	6
2.材料および方法	7
3.結果	13
4.考察	25
5.小括	26
第II章 健常牛の血清中ハプトグロビン値の簡易測定	
1.序文	28
2.材料および方法	29
3.結果	30
4.考察	33
5.小括	34
第III章 罹患牛の血清中ハプトグロビン値簡易測定法の臨床応用	
1.第1節 胎盤停滞牛の血清中ハプトグロビン値とその後の繁殖成績	
(1)序文	36
(2)材料および方法	37
(3)結果	42
(4)考察	49
(5)小括	51

2. 第2節 難治性乳房炎牛の血清中ハプトグロビン値と病原菌の消長	
(1)序 文	52
(2)材料および方法	52
(3)結 果	54
(4)考 察	60
(5)小 括	62
3. 第3節 呼吸器疾患子牛の血清中ハプトグロビン値と治療成績	
(1)序 文	63
(2)材料および方法	64
(3)結 果	65
(4)考 察	70
(5)小 括	71
総 括	72
英文要約(Summary)	76
謝 辞	79
引用文献	81

凡 例

AGP	α 1-acid glycoprotein	α -1 酸性糖タンパク
APPs	Acute phase proteins	急性相タンパク
CRP	C-Reactive Protein	C 反応性タンパク
Hp	Haptoglobin	ハプトグロビン
HBA	Hemoglobin Binding Assay	ヘモグロビン結合測定
SAA	Serum amyloid A	血清アミロイド A

緒言

多くの哺乳類では、感染、免疫応答、悪性腫瘍、外傷などの組織傷害があると、体内において急性相反応が直ちに、非特異的かつ複合的に発生する。この反応は生体の恒常的な修復や障害の原因除去のためによるものと考えられている[17,72]。急性相反応では発熱、血液中の白血球数増加、コルチゾール増加、チロキシン減少、また脂質や糖などに関する代謝性変化、鉄や亜鉛の減少なども出現するとされている[20,42]。急性相の反応で増加する物質は C 反応性タンパク(CRP)、血清アミロイド A(SAA)、ハプトグロビン(Hp)、 α -1酸性糖タンパク(AGP)、セルロプラスミンをはじめとした正の急性相タンパク(APPs)に分類され、また減少するものはアルブミン、トランスフェリンなど負の APPs に分類される[10]。さまざまな動物において共通する APPs を有するが、動物種により増減の大きさが異なり、また各種物質における機能、役割については解明されていないものが多い。

人医療では、すでに APPs のうち CRP や SAA を測定するための機器や試薬が開発され、普及している。CRP や SAA は医科診療報酬点数表に記載されており[53]、炎症マーカーとして確立した血液検査項目となっている。また、獣医界では犬の CRP、猫の SAA の測定機器や測定試薬が販売され、これら動物の異常発見や治療反応性の評価などに用いられている。

牛においては、主要な APPs の一つは Hp である。Hp は、20kDa のペプチド(α 鎖)と 35kDa のペプチド(β 鎖)がジスルフィド結合した構造を有する物質である[9]。Hp は精製された状態では活性を示さないが、ヘモグロビン(Hb)に結合すると、Hb の酸化還元反応を誘導する特定の酵素活性を維持する。この酵素活性は著者の知る限り、他の APPs に関する報告がみられない。また、他にも血液中の好中球や単球などに作用する機能も知られている[2,9]。Hp が上昇する疾病の種類については、牛では子宮炎、

乳房炎、呼吸器病、RS ウイルス感染、マンハイミア感染、第四胃変位、脂肪肝などの疾病が知られており、分娩に伴って上昇することも研究報告されている[1,26,39,50,51,54,68]。一方で、わが国では生産現場における牛の APPs 検査体制は確立されていない。牛の主要な APPs である Hp は炎症刺激等により血液中で 10 倍以上に上昇するとされ[50]、他の APPs と比べて軽度な炎症でも検出されることが Hp の有用性の一つである。また、Hp の検査を行うために必要な血清量は 20~200 μ l[11,47]で、他の検査に用いた血清の残りでも十分に測定が可能である。したがって、ルーチンで Hp を炎症マーカーの検査項目に入れることやその動態を遡って調査するために保存血清を用いて Hp 検査することは容易に実施できると考えられる。さらに、Hp は上述の酵素活性を有することから、それを利用して、測定に必要な 2 次抗体を必要としない測定系の作成が可能であり、試薬作成コストを低く抑えることが可能である。動態についての既報では、牛の Hp の反応時間に関しては去勢術後 7 時間から上昇し、1~3 日後に顕著なピークがみられ[58,67]、さらに分娩牛の半数以上(74%(31/42 頭))で 0~1 日後に上昇している[68]。また、ワクチン接種後 3 日[9,33]、テレピン油皮下注射による炎症試験では投与後 2 日から血清中 Hp が検出されている[13]。これらの報告から、牛の診療と予後判定のために行う Hp 検査を、急性炎症発現から 2、3 日経過して行ったとしても、その測定結果をもとに炎症の有無を判断することには影響しないと考えられる。

著者は、動物病院に来院した様々な疾患犬の血液中 CRP が上昇していたことを明らかにした[52]。現在では犬、猫などの診療分野における CRP、SAA 測定の有用性は広く浸透し、小動物臨床の血液検査項目の一つとして認知されている。しかし、産業動物では施設、測定機器、検査試薬などが整備されること、そしてその測定結果の解釈に習熟することが必要である。日本における人の医療を支える臨床検査は病院の検査部や外部の民間検査センターで行われ、検査試薬を開発・供給する企業が多くある。小動物において多くは院内の測定器材で、獣医師や愛玩動物看護師が検査を担い、日常的

に測定しない項目については民間検査センターに依頼することが一般的である。産業動物の血液検査については、診療獣医師が自ら検査室で行うか、管轄の家畜保健衛生所（家保）に依頼、または民間の臨床検査センターに外注する。動物の検査試薬を開発する企業は存在するが、人の医療と比べると多いとは言えない。牛の新規血液検査項目の開発やその活用を図るためには、診療所や家保で行うことができる検査体系の開発が重要である。

もう一つの牛の主要な APPs である SAA の検査では、研究用の酵素免疫測定 (ELISA) キットがある。また、牛の SAA にも反応する抗体を使用した試薬で、ウェット式生化学自動分析器を用いた測定が報告されている[55]。しかし、ELISA は一般的に測定キットが高価であるため、診療所の検査室でそれを日常的に使用する場合、必要経費を確保しなければならない。また、ウェット式生化学自動分析機による牛の SAA 測定用の試薬や装置がある診療所も少ないことから、いまだ広範な普及には至っていない。現在、マイクロプレートリーダー(プレートリーダー)は、生化学自動分析装置より安い価格で販売されており、全国の家保において家畜伝染病の診断業務に使用されている。プレートリーダーはマイクロプレートウェル内反応液の吸光度を測定する機器であることから、試薬の条件をマイクロプレートで適正に反応するように設定することで検査が可能になる。プレートリーダーを用いて牛の臨床において APPs の測定を行うこともできると考えられるが、家保などでは活用されてはいない。

これらの背景から、著者は牛の血液中 Hp 濃度について Makimura と Suzuki[47] が報告した Hp とヘモグロビン結合によるペルオキシダーゼ様活性を利用する測定法に注目し、プレートリーダーでも測定が可能ではないだろうかと考えた。この方法は試薬の原料として、牛の血液中ヘモグロビンをゲルろ過クロマトグラフィーで精製処理したメトヘモグロビンを用いて試験管内で反応させ[47]、分光光度計で測定する。この測定方法は特異的抗体を利用する測定系と比較して、少ない費用で試薬の入手が可能である。そこで、著者は自家製のメトヘモグロビン試薬を作製し、Makimura と Suzuki[47]の

報告で用いている試験管と分光光度計の代わりに、マイクロプレートとプレートリーダーを用いた Hp 測定系を改良し、活用することが合理的で、日本国内の家畜診療所検査室、家保、公設農業試験場においても、短時間で簡易な検査が可能になると考えた。

Hp の測定値の解釈について、健常牛の血液では検出されないという報告がある[49]。日本の成書には、牛の Hp の基準値は掲載されていないが、海外の一部成書には 0.0~0.05 mg/dlと掲載されている[64]。しかし、牛の飼養方法は国や地域によって異なるため、血清中 Hp 濃度(Hp 値)の解釈には考慮すべき要因がある。特に、雌牛は性成熟後、妊娠と分娩を繰り返すことから、生産に伴う疾病発症の可能性がある。すなわち、少なくとも日本における健常牛の成長や生産ステージにおける Hp 値の基準が示されなければならない。Hpの基準値が広く知られ、また活用方法が理解されれば、診療現場における測定や、生産管理に用いられている代謝プロファイルテストにおいても、新たな検査項目として利用が可能である。したがって、測定法の開発ならびに健常牛の Hp 基準値範囲を明らかにする必要がある。

一般に、疾病動物の血液中の炎症マーカーの多くは上昇し、加療に反応して炎症が収束すると低下する。また、加療に反応しなかった場合には高値で推移すると考えられる。しかし、病勢の強弱や回復能力には差があるため、炎症マーカーとしての Hp 測定を生産現場で活用、あるいは臨床応用するための前段階として、臨床所見の確認と Hp 測定を含む血液検査が必要である。また、疾病経過中の Hp 値の変動を測定しながら、加療による変化も明らかにする必要がある。そのためには、生産現場において疾病牛を確保し、連続的な血液検査を行い、Hp 値について詳細な調査が必要である。

検査施設において、新しい血液検査項目は、企業から妥当な価格の測定試薬や測定機器の供給がされない限り、採用することは難しい。しかし、今後、メトヘモグロビンのような自家製試薬を用い、既存の器材を活用した Hp の新たな測定系が確立できれば、持続的に生産現場での測定活用が可能となる。

このようなことから、本研究では牛の臨床現場で使用可能なプレートリーダーを用

いた血液中 Hp 濃度の簡易測定の開発、急性炎症疾患の病勢判定に活用できる基準値の確立を目的として、以下の研究を実施した。

第 I 章では、プレートリーダーを用いた牛の Hp 値の簡易測定法の開発および測定値の信頼性について検討した。次いで第 II 章では、第 I 章の測定法を用いて、健常牛の成長や各生産ステージにおける Hp の基準値について検討した。さらに第 III 章では、生産性の低下をもたらす胎盤停滯、難治性乳房炎および子牛呼吸器疾患症候群の Hp 値を明らかにするとともに疾病の病態把握、予後判定が可能かどうか検討した。

第 I 章 牛血清中ハプトグロビン値の簡易測定法の開発

1. 序 文

ハプトグロビン(Hp)は急性相タンパク(APPs)の一つであり、微生物の感染やストレスなどの刺激により、肝臓で産生され、血液中に放出される。Hp は炎症により生じた遊離ヘモグロビン(Hb)と結合し、体内から鉄の損失を防ぐ働きがある[50]。牛では、子宮炎[33]、乳房炎[59]、蹄病[63]および呼吸器病[3]の発症に伴って、血清中 Hp 濃度(Hp 値)が上昇することが報告され、炎症性疾患の診断や治療方針の決定などを行う上で、有用な指標の一つと考えられている。牛の Hp 値の測定法には酵素免疫測定法(ELISA)および一元放射免疫拡散法(SRID)などがあり、これらの測定キットが市販されている。ELISA は最も高感度な方法とされているが、高価で測定に数時間を要する。また、SRID は簡便な操作であるが、測定に数日を要する。生産現場における血液検査は簡易でかつ短時間に測定できることが重要である。

ヘモグロビン結合測定(HBA)法は、Hp を含む血清に Hb 試薬を混合し、酸性条件下で Hp-Hb 複合体のペルオキシダーゼ様活性を測定して Hp 値を求める方法である。これは Hb の持つペルオキシダーゼ様活性を酸性条件下で失活させ、Hp と複合体を形成すると活性が維持されることに基づいている[47]。Makimura と Suzuki[47] は、1M リン酸緩衝液(pH4.1)、発色剤にオルトジアニシジンを用いた牛の HBA 法を開発した。この方法は安価であるが、試薬の調製に時間を要し、反応判定も試験管で行わなければならない。Chan ら[11]は酢酸緩衝液(pH3.6)、発色剤にテトラメチルベンジジン(TMB)を用い、マイクロプレート上で測定が行えるように簡易化を図った。しかし、この測定では未結合の Hb が持つ酵素活性の不活化時間が必要であり、測定に 1 時間以上を要するため、臨床現場での使用に適さない。

そこで本章では、従来の HBA 法の問題点を改善するため、酸性緩衝液の種類と pH 値が遊離 Hb 活性の不活化に及ぼす影響について検討した。また、測定時間を短縮した

改良型ヘモグロビン結合測定(改良 HBA)法の開発とその測定精度についても検討した。

2. 材料および方法

1) 供試牛

本研究は地方独立行政法人北海道立総合研究機構動物実験指針に基づいて適正に実施し、同法人の酪農試験場で飼養されていたホルスタイン種雌乳牛 55 頭および育成牛 41 頭を供試した。当該試験場は搾乳牛および乾乳牛を専用のフリーストールで飼養している。分娩予定牛は5日前から観察用タイストールに移動し、分娩後5～10 日まで管理した。その間、分娩予定前日から分娩日までは分娩房に移動して個体管理した。また、採食量、疾病罹患歴、乳汁体細胞数・細菌検査成績および削蹄履歴に関する記録から、異常がみられないものを健常牛、何らかの異常があるものを疾病罹患牛に区分した。胎盤停滞を発症した牛は、無症状を示していても健常牛に含めなかった。

2) 血液採取

供試牛の採血は正中尾静脈からを行い、1 時間以内に遠心分離した後に得られた血清は測定まで -20°C で凍結保存した。なお、採血管は後述する血液抗凝固剤による影響を検討する試験のため、ベノジェクトII 真空採血管(テルモ、東京)の血清分離管(VP-AS109K)、ヘパリン Na(VP-H100K)、EDTA-2Na(VP-NA052K)および血糖用採血管[フッ化 Na(NaF) + ヘパリン Na + EDTA-2Na](VP-FH072K)の4種類を用いた。

3) 測定試薬の作製

Hb 試薬は、健康な乳牛の血液を用いて Makimura と Suzuki[45]の方法で作製した。シアンメトヘモグロビン法[65]でメトヘモグロビン(MtHb)値を測定したのち、生理食塩液で 30mg/ml に調製し、マイクロチューブに小分けして -20°C で凍結保存した。凍結 Hb 試薬は測定直前に融解したのち、生理食塩液で 100 倍に希釈

(0.3mg/ml)して使用した。発色試薬は、ジメチルスルホキシドに溶解した濃度 22.5mg/ml の TMB 溶液 110 μ l に後述する 10,890 μ l の酸性緩衝液を加え、0.44M 過酸化水素水 11 μ l を添加して作製した。この試薬は、96 穴プレート発色反応の直前段階で調整した。

Hp の標準血清は子宮炎罹患牛から得た血清を用い、あらかじめ一元放射免疫拡散法(SRID)で Hp 濃度を測定しておき、小分けして凍結保存した。標準血清は測定前に融解し、生理食塩液で希釈して用いた。

4)ヘモグロビン結合測定法(HBA)の測定操作

すべての測定は1試料につき同時2ウェルで行った。測定操作は以下のとおりとした。最初に被検血清および標準血清(0、82、163、325、650 および 1300 μ g/ml)を 96 穴マイクロプレートにそれぞれ5 μ l ずつ添加し、さらに 0.3mg/ml Hb 溶液 20 μ l を加えて混和したのち、室温で静置した。続いて、酸性緩衝液 100 μ l を加えて混和後、37 $^{\circ}$ Cで静置し、遊離 Hb を不活性化処理した。発色反応直前段階で調製した発色試薬 100 μ l を各ウェルに添加し、室温で5~10 分静置した。最後に1N 塩酸 50 μ l を添加して反応停止を行い、マイクロプレートリーダー(Wallac 1420 ARVOsx、Perkin Elmer、米国)を用いて 450nm の吸光度を測定した。標準血清の吸光度から検量線(図1)を作製し、被験試料の Hp 値を算出した。標準血清よりも高い濃度の検体については希釈して再度測定した。

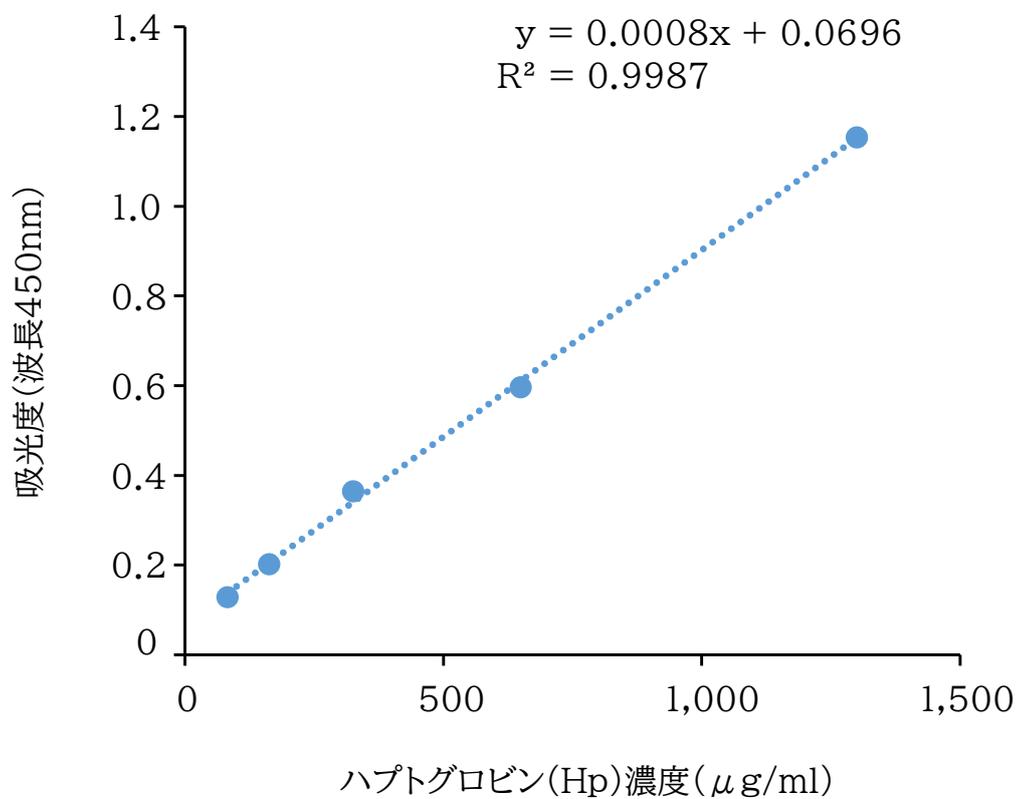


図1 ヘモグロビン結合測定法の代表的な検量線の例

5)測定条件の検討

(1)メトヘモグロビン添加後の静置時間

改良 HBA 法の操作では、血清試料にメトヘモグロビン(MtHb)を添加後の適正な静置時間について検討した。Hp 陽性血清(1,000 および 3,000 $\mu\text{g/ml}$ をそれぞれ5ウェル)と陰性対照(蒸留水5ウェル)を用いた。これらに MtHb 添加後 0、5、10、20 および 30 分間それぞれ静置したのちに発色試薬を反応させて吸光度を測定し、MtHb 添加後の静置時間の違いが吸光度に与える影響を検討した。

(2)酸性緩衝液添加後の静置時間および酸性緩衝液の条件

改良 HBA 法の操作における酸性緩衝液添加後の静置時間を 0、5、10、15 および 20 分間とした場合の吸光度に及ぼす影響を検討した。また、遊離 Hb のペルオキシダーゼ様活性の不活化における酸性緩衝液の条件を検討するため、0.1M 酢酸緩衝液(pH3.6)および 0.05M クエン酸緩衝液を pH3.2、3.4、3.6、3.8 および 4.0 で比較した。なお、Hp 陽性血清(3,000 $\mu\text{g/ml}$)と陰性対照(蒸留水)を比較血清として用い、吸光度を測定した。

6)改良 HBA 法による Hp 測定の信頼性の検討

(1)再現性試験

Hp 濃度が異なる4種類の血清を用いて 10 回同時測定して、測定内変動(同時再現性)を調べた。また、測定間変動(プレート間再現性)は繰り返し 12 回測定を行って調べた。

(2)添加回収試験

Hp 濃度が異なる3種類の血清(66、302 および 1,044 $\mu\text{g/ml}$)10 容積に、それぞれ3種類の既知量の牛 Hp 溶液(5,000、10,000 および 20,000 $\mu\text{g/ml}$)1容積を添加し、本法で3回反復測定を行って、添加回収量を算出した。なお、牛 Hp 溶液調整に使用した精製牛 Hp は株式会社メタボリックエコシステム研究所(宮城県)から提供された。

(3)希釈直線性試験

Hp 濃度が異なる 2 種類の血清(1,000 および 2,500 $\mu\text{g/ml}$)を蒸留水で2、4、8 および 16 倍に希釈し、Hp 濃度を測定した。

(4)改良 HBA 法と一元放射免疫拡散法の測定値比較

供試牛 99 頭の血清中 Hp 値を改良 HBA 法と一元放射免疫拡散(SRID)法で測定し、両者の測定値に差異があるかを検討した。両者の比較には二軸の散布図と、Bland-Altman プロットを用いた。SRID 法には市販の Hp 測定キット(ウシ・ハプトグロビン定量用キット、ウシ Hp プレートーエコスチェック、株式会社メタボリックエコシステム研究所、宮崎)を使用した(図2)。



SRIDプレート(市販品)

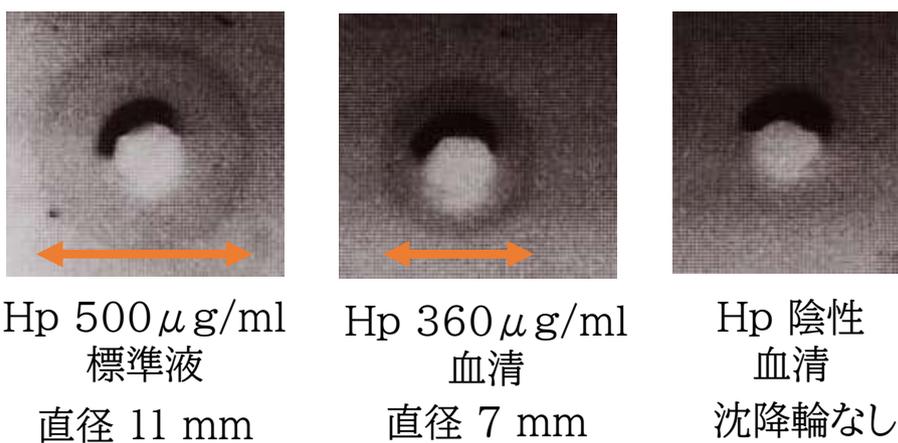


図2 一元放射免疫拡散(SRID)法によるHp測定例

(5) Hp 陰性血清の測定下限値の検討

SRID 法により血清中 Hp 濃度が $0 \mu\text{g/ml}$ であった 63 検体の血清を改良 HBA 法で測定し、測定下限値について検討した。

(6) 血液抗凝固剤による影響の検討

供試牛 53 頭の血液を前述した4種類の採血管を用いて採取し、それぞれの Hp 濃度測定を検討した。

6) 統計解析

統計解析には表計算ソフト((Excel 2003、Microsoft Corp、U.S.A.)および(エクセル統計 2008、(株)社会情報サービス、東京))を用いた。測定サンプルの Hp 値の正規性の検定には Kolmogorov-Smirnov 検定を用いた。改良 HBA 法と SRID 法の測定値の検討には Pearson の積率相関係数および Bland ら[6]の方法に基づいた Bland-Altman 解析を用いた。許容範囲は平均値 \pm 1.96 標準偏差(SD)とした。

なお、血清試料に MtHb を添加後の静置時間および血液抗凝固剤による影響の検討には Friedman 検定を行い、次に Scheffe 法を用いて各群の関係を検討した。

3. 結果

1) 測定条件の検討

(1) メトヘモグロビン添加後の静置時間の影響

静置時間を 0、5、10、20 および 30 分間で比較した結果、陽性血清 1,000 および 3,000 μ g/ml 試料と陰性対照(蒸留水)の吸光度は静置時間の違いによる影響がみられず(図3)、Friedman 検定では 3,000 μ g/ml および 1,000 μ g/ml 間に有意差がみられなかった($P=0.52$ および 0.33)。陰性対照では、Friedman 検定で有意差がみられ($P<0.001$)、また Scheffe 法では 0 分間と 10 分間($P=0.006$)および 10 分間と 30 分間($P=0.037$)に有意差を認めしたが、吸光度平均値の差の絶対値は 0.008 と 0.007 であった。

(2) 酸性緩衝液添加後の静置時間および酸性緩衝液条件による吸光度への影響

0.1M 酢酸緩衝液(pH3.6)および 0.05M クエン酸緩衝液(pH3.2~4.0)における Hp 陽性血清と陰性対照の吸光度の変化を図4および図5に示した。陰性対照では

0.05M クエン酸緩衝液 pH3.2~3.6 を用いた場合、5分以内の吸光度が0付近で可視可能な変動はみられず、安定と判断された。しかし、0.05M クエン酸緩衝液 pH3.8-4.0 および 0.1M 酢酸緩衝液では安定するまで 10 分以上を要した。Hp 陽性血清では 0.05M クエン酸緩衝液 pH3.2-3.8 を用いた場合、5 分以内で吸光度は安定したが、0.05M クエン酸緩衝液 pH4.0 および 0.1M 酢酸緩衝液では安定するまで 10 分以上を要した。

以上の結果から、牛の血清中 Hp 値を測定する Makimura と Suzuki[47] や Chan ら[11]の方法と比べて、改良 HBA 法では遊離 Hb 不活性化に pH3.2~3.6 の 0.05M クエン酸緩衝液を使用したところ、反応時間を 15 分に短縮することができた。また、Hp と Hb の結合のための反応時間は操作時間を考えて2~3分と設定し、測定に要する時間は合計 22 分程度であった。

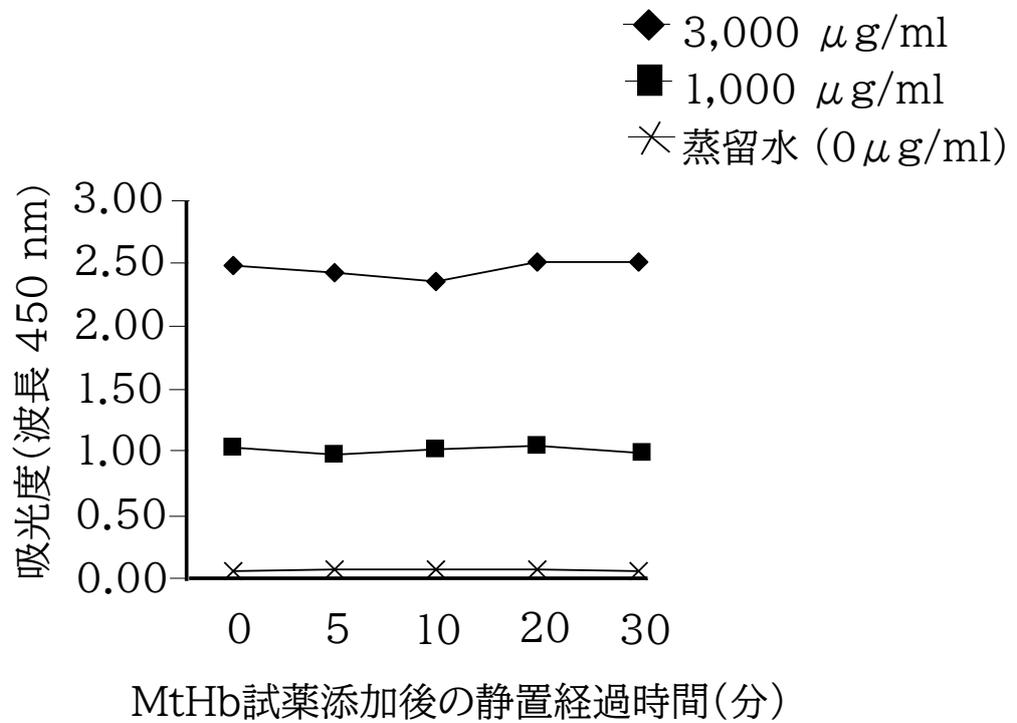


図3 改良HBA法における牛血清中メトヘモグロビン (MtHb) 試薬添加が吸光度および静置時間に及ぼす影響

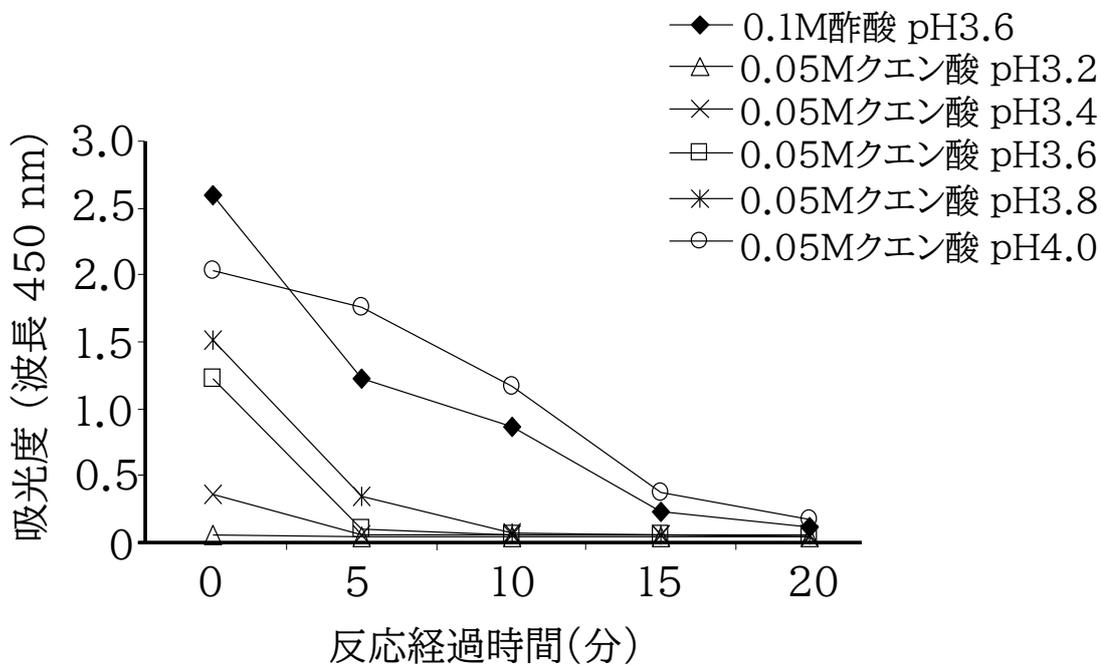


図4 酸性緩衝液条件が改良HBA法における遊離Hb不活性化に及ぼす影響

注1:Hp陰性(0 μ g/ml)のサンプルを用いて試験を行った

注2: MtHb試薬+Hp陰性サンプルに酸性緩衝液を添加して反応時間ごとの吸光度を測定した

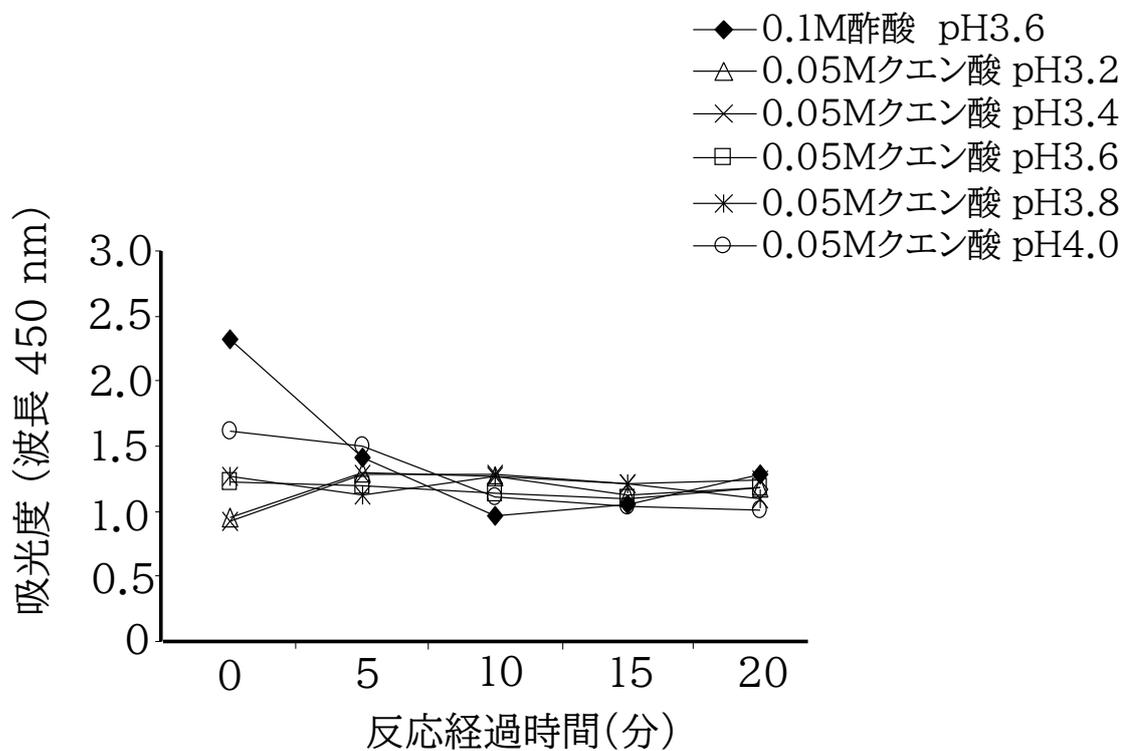


図5 改良HBA法の遊離Hb不活性化に及ぼす酸性緩衝液条件

注1:Hp濃度3,000 μ g/mlサンプルを用いて試験した

注2:MtHb試薬+Hp陽性サンプルに酸性緩衝液を添加して反応時間ごとの吸光度を測定した

2)改良 HBA 法による血清中 Hp 値測定の信頼性

(1)再現性試験

本法による血清中 Hp 値の測定内変動係数は 2.2~6.1%、また測定間変動係数は 3.4~10.8%であった(表 1)。

表1 改良ヘモグロビン結合測定法の再現性試験成績

再現性試験の項目	Hp(μ g/ml)			
	血清	平均値	標準偏差	変動係数(%)
測定内変動 (同時再現性)	血清1	75	4.6	6.1
	血清2	152	5.7	3.8
	血清3	565	18.3	3.2
	血清4	1,075	23.3	2.2
測定間変動 (プレート間再現性)	血清1	75	8.1	10.8
	血清2	153	5.2	3.4
	血清3	545	33.0	6.1
	血清4	1,022	36.8	3.6

注1: 測定内変動試験は同一標本を同時10回測定した

注2: 測定間再現性試験は同一標本を12回測定した

(2) 添加回収試験

Hp 値が異なる3種類の血清 10 容積に3種類の既知 Hp 血清1容積を添加して、改良 HBA 法で測定した場合、これらの回収率は 93.0~106.4%であった(表2)。

表2 添加回収試験成績

	Hp添加量 (μg)	測定値		期待される値 ($\mu\text{g/ml}$)	回収率 (%)
		平均	標準偏差		
血清1	2,000	2,144	58	2,066	103.8
66 $\mu\text{g/ml}$	1,000	1,134	26	1,066	106.4
	500	537	12	566	94.9
血清2	2,000	2,311	43	2,302	100.4
302 $\mu\text{g/ml}$	1,000	1,210	41	1,302	93.0
	500	772	13	802	96.2
血清3	2,000	2,906	57	3,044	95.5
1,044 $\mu\text{g/ml}$	1,000	2,026	17	2,044	99.1
	500	1,576	36	1,544	102.1

注1:本研究では、「検体に目的成分の標品を一定量加え、添加した量が正確に定量されるかどうかを検査する試験」を添加回収試験とした

注2:本研究ではHp添加後の回収測定は3回行った

(3) 希釈直線性試験

Hp 濃度が異なる 2 種類の血清を蒸留水で2~16 倍に希釈した結果、いずれも直線的な測定値が得られた(図 6)。

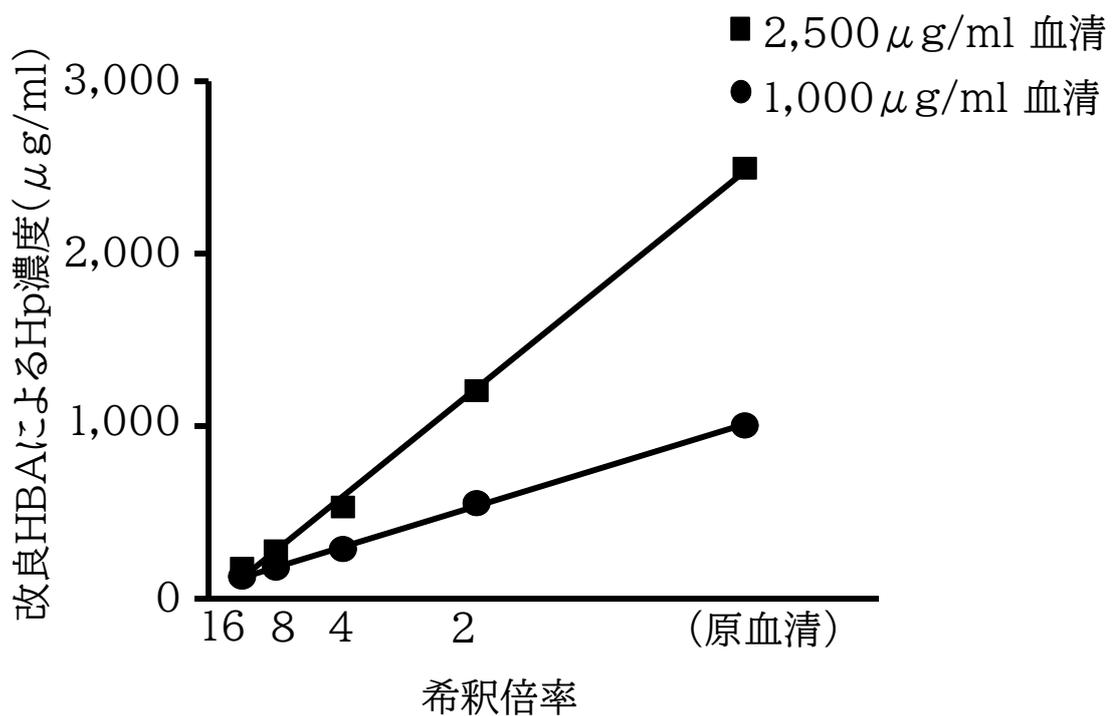


図6 改良HBAにおける希釈直線性試験成績

4) 改良 HBA 法と一元放射免疫拡散 (SRID) 法による Hp 濃度の相関

改良 HBA 法と SRID 法による血清中 Hp 値の相関 (n=99) を図7に示した。両者の間には高い相関関係 (R=0.98、P<0.001) が認められた。また、Bland-Altman 解析において、2種類の測定値の差の平均値は 106 μg/ml であり、データプロットは平均値±1.96SD (-153~364 μg/ml) の範囲に 97% (96/99) が含まれた (図8)。

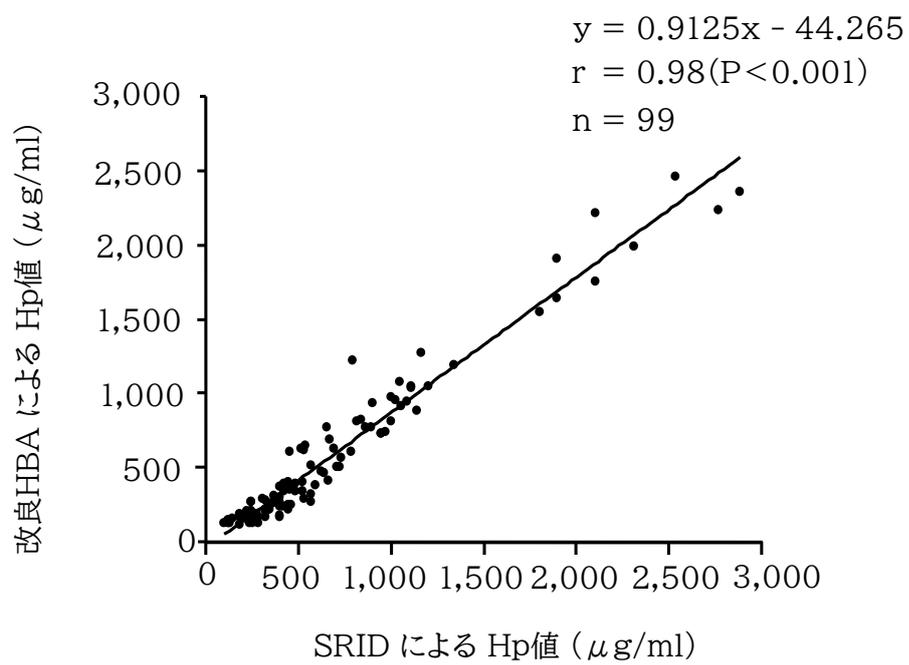


図7 SRIDおよび改良HBAによる血液中Hp濃度の比較

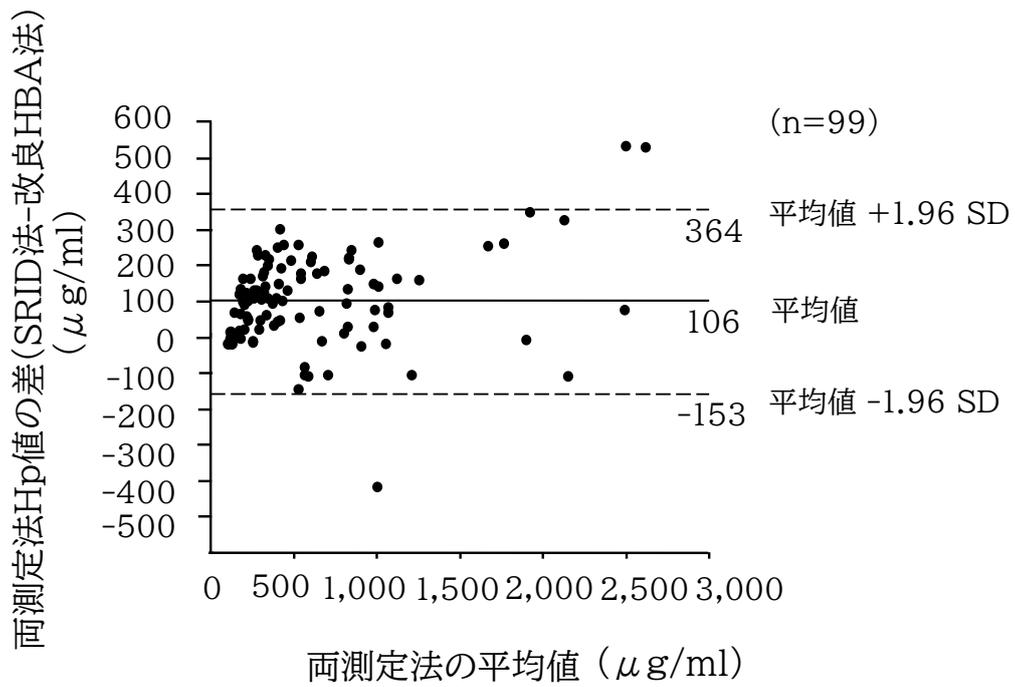


図8 SRIDと改良HBAの測定値によるBland-Altman plot

5) Hp 陰性血清の測定による下限値の検討

SRID 法による Hp 陰性血清(n=63)のヘモグロビン結合法による測定値は平均値 77 $\mu\text{g/ml}$ で、標準偏差 29、中央値 65 $\mu\text{g/ml}$ 、95%タイル値 133 $\mu\text{g/ml}$ であった。最小検出量(平均値+2SD)は 135 $\mu\text{g/ml}$ であった。

6) 血液抗凝固剤による影響の検討

血液抗凝固剤が Hp 測定値に及ぼす影響について、血清とそれ以外の血漿の Hp 値の関係を図9に示した(n=53)。血糖用採血管血漿(NaF+ヘパリン Na+EDTA-2Na)の Hp 測定値(365 \pm 411 $\mu\text{g/ml}$)は血清(791 \pm 905 $\mu\text{g/ml}$)、ヘパリン Na 血漿(796 \pm 913 $\mu\text{g/ml}$)および EDTA-2Na 血漿(776 \pm 874 $\mu\text{g/ml}$)の Hp 測定値との間に有意差が認められた(Friedman 検定(P<0.001)。また、Scheffe 法では血糖用採血管血漿とそれ以外の間に有意差がみられた(P<0.001)。

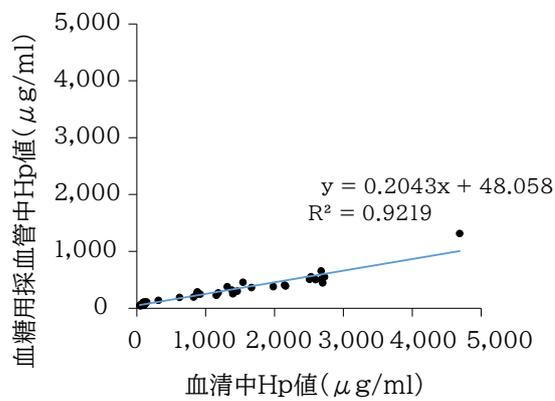
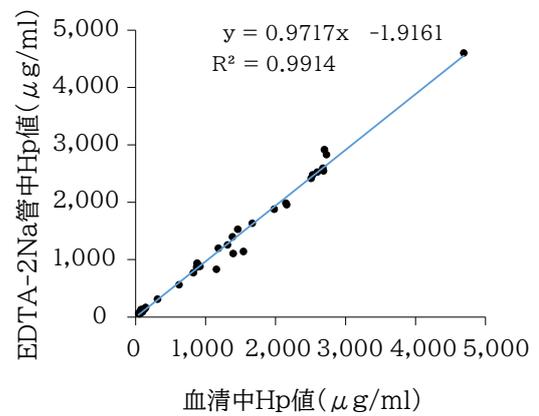
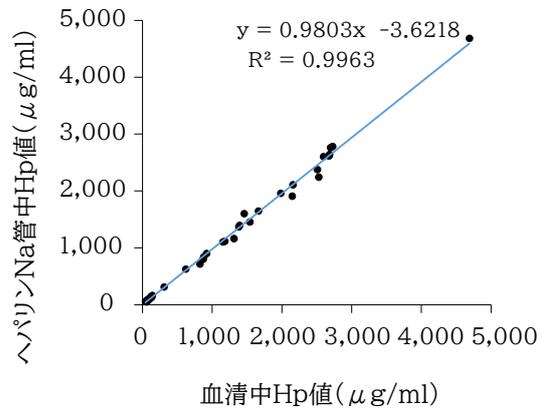


図9 抗血液凝固剤が改良HBA法で測定したHp値に及ぼす影響

注1:濃度散布図には53サンプルを用いた

注2:採血には血清分離管、ヘパリンNa血漿管、EDTA-2Na管および血糖用採血管を用いた

4. 考 察

本章では、既存のヘモグロビン結合測定(HBA)の問題点を改善するため、酸性緩衝液の種類と pH 値が遊離 Hb 活性の不活化に及ぼす影響を検討し、測定時間が短縮可能な改良型ヘモグロビン結合測定(改良 HBA)法の開発を試みた。その結果、改良 HBA 法の開発に成功し、その測定精度は十分に信頼性が得られることが判明した。

Makimura と Suzuki[47] が報告した Hp とヘモグロビン結合によるペルオキシダーゼ様活性を利用する牛の血液中 Hp 濃度の測定法は試薬の調製に時間を要し、反応判定も試験管で行わなければならなかった。この方法では、検量線の作成、また多くの検体処理では多数の試験管に試薬を添加しなければならず、その処理も煩雑であった。また、Chan ら[11]は多検体を一度に処理することが可能なマイクロプレート上で、酢酸緩衝液(pH3.6)、発色剤にテトラメチルベンジジン(TMB)を添加する HBA 法を報告した。Chan ら[11]の方法はマイクロプレート上で測定できるよう簡易化された。しかし、測定に 1 時間以上を要するため、操作時間の短縮が課題として残っている。

HBA 法は、Hp と結合しなかった遊離 Hb の酵素活性の不活化処理に最も時間を要する。この処理に Makimura と Suzuki[47]は 1M リン酸緩衝液(pH4.1)で約 45 分、Chan ら[11]は 0.1M 酢酸緩衝液(pH3.6)で約 1 時間要することを報告している。本章の改良 HBA 法では pH3.2~3.6 の 0.05M クエン酸緩衝液を用いると 10 分以内に不活化処理されることが可能になり、測定に要した時間も約 22 分で Chan ら[11]の報告(75 分)よりも大幅に短縮できることが可能になった。

改良 HBA 法による血清中 Hp 値測定の信頼性は再現性試験、添加回収試験および希釈直線性試験のいずれにおいても高く、改良 HBA 法が実用的な測定法であることが示された。

本章の改良 HBA 法と一元放射免疫拡散(SRID)法による Hp 値の相関係数(r)は 0.98 と高く、Bland-Altman 解析では平均値 $\pm 1.96SD$ の範囲にデータプロットの

97%が含まれ、改良 HBA 法は SRID 法と同等の測定精度があることが示された。測定下限値については、SRID 法で陰性を確認した血清の中央値は 65、また 95%タイル値が $133 \mu\text{g/ml}$ であった。また、Hp 陰性血清の 95%タイル値以下の測定値には、非特異反応が混在する可能性が示唆された。今回は、ELISA など第3の測定法でサンプルを検討していないため、SRID 法の測定下限についても検討する必要があった。しかし、HBA 法の Hp 測定下限域が急性炎症における測定対象域になるかどうかは、詳細な調査を必要とするが、Hp を含む主要な急性相タンパク (APPs) は、刺激反応により 10~100 倍増加する報告がある [50]。この報告から、もし牛に何らかの炎症があれば、その Hp 値は陰性血清 95%タイル値を容易に超えると推察される。したがって、簡便迅速で測定精度が高い改良 HBA 法は牛の Hp 測定に使用できることが示された。

血液抗凝固剤であるヘパリン Na や EDTA-2Na でコーティングされた採血管で得られた血液から分離した血漿と血清の測定値間に有意差は認められず、いずれの採血管を使用しても測定値に及ぼす影響はないと考えられた。しかし、NaF を含む血糖用採血管で得られた血液の血漿では、測定値が著しく低下したことから、本法に使用する血液採取には使用できないことが明らかになった。この測定値の低下は NaF による酵素活性阻害が原因であると推測される。

本法では 0.05M クエン酸緩衝液 (pH3.2~3.6) を用いることにより、約 22 分で牛の血液中 Hp 値の測定が可能になった。さらに、本法はマイクロプレートリーダーで測定が可能であり、SRID 法とほぼ同等の測定範囲において測定が可能で、広く利用できると思われる。乳牛の炎症性疾患などの診断の一助として改良 HBA は有用な Hp 測定方法であることが明らかになった。

5. 小括

本章では、従来の HBA 法が測定に 1 時間以上を要することから、測定時間の短縮を目的として、緩衝液の種類と pH の検討を行った。改良 HBA 法では pH3.2~3.6 の

0.05M クエン酸緩衝液を用いることにより、測定時間を約 22 分に短縮することが可能となった。また、測定信頼性については再現性試験、添加回収試験、希釈直線性試験のいずれにおいても良好であることを確認した。

改良 HBA 法の測定値は SRID 法と比較し、許容できる値であることが確認できた。また、牛からの採血に用いる EDTA-2Na、ヘパリンがコーティングされている試験管の使用は問題ないが、NaF が含まれる血糖用採血管は HBA の測定値に影響があることが判明した。HBA 法の測定下限値については、SRID 法で確認した Hp 陰性血清の 95%タイル値が 133 であったが、この値については HBA と SRID 以外の測定方法で確認する必要がある、また臨床的な調査が必要である。しかしながら、血液中 Hp が炎症刺激により 10 から 100 倍以上に増加すると報告があることから、本章で開発した改良 HBA 法は SRID 法と同等範囲の血清中 Hp 値を迅速かつ多検体でも可能な測定法であることが示された。

第Ⅱ章 健常牛の血清中ハプトグロビン値の簡易測定

1. 序 文

人医界の臨床検査法に関する成書[31]では、血液測定値は「健常人がとり得る臨床検査値であり、検査成績を臨床的に解釈するときの基本的な尺度として用いられる」と記載されている。また「一般的な基準値の概念は、疾病の対比においてではなく、健常人集団を対象として設定し、被験者の検査値が健常人のとり得る値のどの付近に位置するかを判断するために用いられる」とも記載されている[31]。人医療分野の血液検査基準値の範囲設定には、厳密な条件と多くの労力や資金が必要とされている。また、施設や検査機関ごとの測定体系に適合した基準範囲設定は数少ない[40]。人の血液検査測定系についてはすでに資料等、あるいは膨大な臨床に連結した検査結果の蓄積があり、また多くの患者が検査を受けるため、測定データの標本数は生産動物と比べてはるかに多く、信頼性が高い。牛も同様に健常な集団から測定値が収集できるならば理想的である。しかし、牛の血液検査については、おそらく限られた標本数であり、また、いまだ成牛あるいは育成牛などの区分でしか示されておらず、種、用途、成長過程、生産ステージ別の基準値はほとんど見当たらない。牛の主要な急性相タンパクであるハプトグロビン(Hp)に関しても、獣医診療や生産管理に応用できるような基準値はみられない。

このようなことから、改良ヘモグロビン結合測定(HBA)法による健常牛の血液中 Hp 濃度(Hp 値)の基準範囲値の作成が必要であると考えられる。牛の血液中 Hp の基準値を作成するためには、疾病などの詳細な記録があり、同一条件で飼養管理された十分な頭数を有する牛群から採血して測定データを蓄積する必要がある。

Morimatsu ら[49]は 1992 年に健常牛から Hp が検出されなかったことを報告している[47]。近年、生産現場にける牛群の飼養管理方法や衛生管理レベルに違いがあるため、その差が血液中 Hp 値に何らかの影響を与えているかどうか確認するため、詳細な調査が必要である。また、牛群の健康状態を代謝プロファイルテストで評価する際

に Hp を項目として活用することも想定されるため、発育ステージや泌乳ステージを考慮した調査が必要である。牛では、これまでに血清中 Hp 値は子宮炎[33]、乳房炎[59]、蹄病[63]および呼吸器病[3]などを発症すると上昇することが報告されていることから、炎症性疾患の診断や治療方針の決定を行う上で有用な指標の一つと考えられる。

本章では、第 I 章で開発した改良 HBA 法による血清中 Hp の基準値を明らかにするため、健常な乳用成牛と育成牛の Hp を測定した。また、生産現場で多発している胎盤停滞、乳房炎、乳熱などの疾病牛の血清中 Hp 値を健常牛と比較した。

2. 材料および方法

1) 供試牛

第 I 章と同じ試験場で飼養されているホルスタイン種牛を用い、同施設の動物実験指針に従って行った。乳熱罹患牛は北海道内の酪農家で飼養されている同種牛を供試した。健常牛の血清中 Hp 基準値を検討するため、分娩後異常を認めなかった泌乳牛 51 頭および発育過程で異常を認めなかった 6～16 ヶ月齢の育成牛 41 頭を供試した。また、周産期疾患と血清中 Hp 値の関係を検討するため、急性乳房炎罹患牛 10 頭(分娩直後～2日目)、胎盤停滞罹患牛 7 頭および乳熱罹患牛 11 頭(分娩直後～2日目)を供試した。急性乳房炎および胎盤停滞の診断はそれぞれ成書[28,60]に基づいて行った。乳熱は血清イオン化 Ca 濃度が 0.7mmol 以下で起立不能を示したが、他の臨床的な疾病は認められず Ca 製剤の輸液で回復した泌乳牛である。

2) 血液採取

健常牛は分娩後 1、3、7、10 日および 2 週以降 16 週目まで 1 週間に 1～2 回正中尾静脈から血液を採取した。育成牛は月齢 6～16 ヶ月の頸静脈から採取した。得られた血液は直ちに遠心分離を行って、血清を測定まで -20 °C 凍結保存した。また、上述の成牛 51 頭から得た分娩後 6～16 週の血清 754 検体を健常牛母集団として Hp 値分

布を調べた。

3)血清中 Hp 値測定

第 I 章で確立した改良 HBA 法で血清中 Hp 値を測定した。なお、供試血清中遊離 Hb の不活性化を促すために pH3.6 の 0.05M クエン酸緩衝液を使用した。

4)統計解析

健常牛の分娩後 1 日とそれ以降、および育成牛の血清中 Hp 値の有意差検定には Steel 検定を用いた。また、分娩後の健常牛と疾病罹患牛の比較には Mann-Whitney 検定を用いた。

3. 結果

1)健常牛の血清中 Hp 値の推移

健常牛の泌乳期における血清中 Hp 値の推移を表 3 に示した。Hp の平均値および中央値は、分娩日(0 日)が 199 および 133 $\mu\text{g/ml}$ であり、また分娩後 3 日はそれぞれ 376 および 269 $\mu\text{g/ml}$ を示し、分娩後 7 日以後は下降した。生後 6~16 ヶ月齢の育成牛の Hp の平均値と中央値はそれぞれ 91 および 88 $\mu\text{g/ml}$ であった(表 3)。分娩翌日と分娩後 5 週、6 週、8 週、10 週、11 週、12 週および育成牛の Hp 値の間には有意差が認められた($P < 0.05$)。分娩後 6~16 週の健常牛($n=754$)の Hp の平均値および中央値はそれぞれ 110 および 98 $\mu\text{g/ml}$ で、95 パーセンタイル値は 170 $\mu\text{g/ml}$ であった(図 10)。

表3 健常牛のHp濃度の推移

健常牛	血液採取 時期	頭 数	Hp ($\mu\text{g/ml}$)							P値	
			平均 値	標準 偏差	25% タイル	中央 値	75% タイル	最小 値	最大 値		
	採血 日	1	28	197	216	102	133	172	66	1,081	—
		3	26	376	330	138	269	446	85	1,167	0.05
		7	28	147	122	95	110	121	60	623	0.91
		10	18	133	63	103	107	141	82	331	1.00
分娩牛	採血 週	2	24	100	38	78	101	107	42	212	0.06
		3	51	122	78	90	102	118	38	509	0.15
		4	49	137	143	87	101	118	26	960	0.16
		5	38	104	27	89	99	111	55	184	0.04
		6	51	105	47	85	98	115	24	365	0.02
		7	36	107	36	88	99	112	65	234	0.06
		8	48	104	40	86	95	109	60	324	0.01
		9	41	121	58	94	101	124	57	291	0.31
		10	42	101	34	86	96	111	64	287	0.01
		11	34	103	25	91	100	109	69	199	0.03
		12	44	99	21	90	99	113	53	164	0.02
		13	34	103	20	91	99	110	69	169	0.07
14	33	122	87	88	101	120	69	565	0.21		
15	25	125	101	93	99	112	77	575	0.18		
16	28	106	34	87	99	114	45	216	0.12		
育成牛		41	91	24	74	88	103	63	160	<0.01	

注1:健常牛として、分娩牛と育成牛を供試した

注2:分娩後1日の分娩牛のHpと、それ以外の日および育成牛(生後6週~16週)のHpについてそれぞれ有意差検定を行い、P値を表に示した

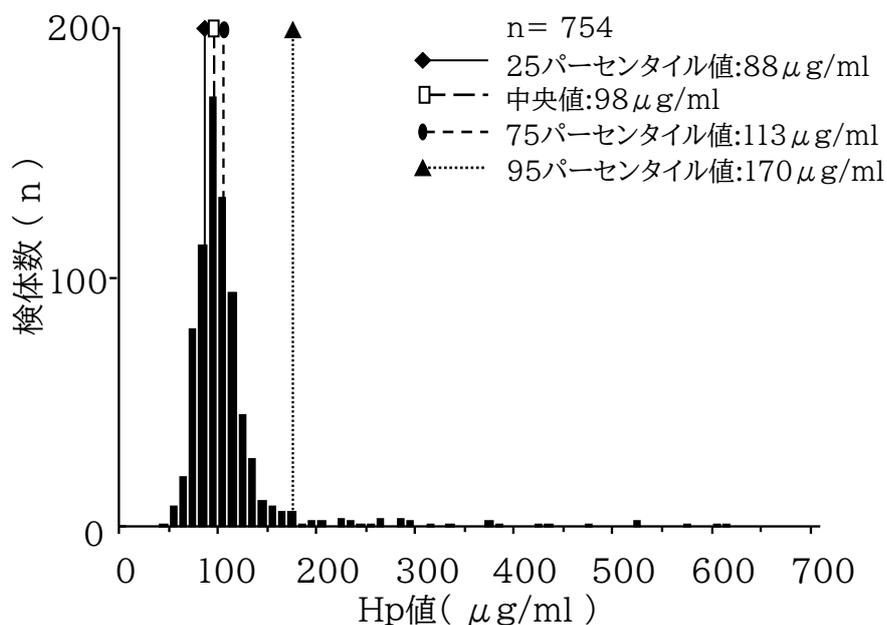


図10 分娩後6-16週における健常乳牛のHp値ヒストグラム

2) 疾病罹患牛の血清中 Hp 値

急性乳房炎、胎盤停滞および乳熱牛の分娩直後から3日目まで測定した血清中 Hp 値を表 4 に示した。急性乳房炎牛の平均 Hp 値は 1,259 μ g/ml と高く、健常牛の分娩翌日と比較して有意に高かった($P < 0.01$)。分娩後3日の胎盤停滞牛の平均 Hp 値は 2,010 μ g/ml であり、同日の健常牛と比べて有意に高かった($P < 0.01$)。乳熱牛の平均 Hp 値は 301 μ g/ml であり、分娩翌日の健常牛との間に有意差は認められなかった。

表4 急性乳房炎、胎盤停滯および乳熱に罹患した乳牛の血清中Hp値

乳牛	分娩後 採血時期	供試 頭数	Hp ($\mu\text{g/ml}$)							P 値
			平均 値	標準 偏差	25% タイル値	中央 値	75% タイル値	最小 値	最大 値	
急性 乳房炎	分娩直後 ～2日	10	1,259	1,114	612	963	1,454	346	4,142	<0.01 ^a
胎盤 停滯	3日	7	2,010	736	1,600	2,149	2,475	793	2,980	<0.01 ^b
乳熱	分娩直後 ～2日	11	301	319	129	147	334	89	1,152	0.19 ^a

注1: aは分娩後1日の健常乳牛のHpとの有意差検定におけるP値を示す

注2: bは分娩後3日の健常乳牛のHpとの有意差検定におけるP値を示す

4. 考 察

乳牛は乾乳、分娩、そして分娩後の体調回復時期まで代謝による血液成分の変化がみられる。また、分娩はストレスであり、分娩後に多くの疾病発生がみられることから、各乳期の血液中 Hp 濃度 (Hp 値) の測定が必要である。そこで、健常牛における乳期の経過に伴う血清中 Hp 値の推移を調査して、疾病発症診断の参考となる健常牛基準値を検討した。本章では、Huzzey ら[33]の報告を参考にして、分娩の影響がないと考えられる、分娩後6～16 週の 754 検体を一つの健常な成牛の母集団とした。これら標本の95%タイル値は $170 \mu\text{g/ml}$ であった。また、6～16 ヶ月齢の健常な育成牛の血清中 Hp は平均値 $91 \mu\text{g/ml}$ 、中央値 $88 \mu\text{g/ml}$ であり、すべて $170 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。この結果から、 $170 \mu\text{g/ml}$ を改良 HBA 法による分娩後6～16 週の健常牛の血清中 Hp 基準値とした。分娩翌日と分娩後3日～4週までの血清中 Hp 値に有意差は認められなかったが、Hp の平均値と中央値は分娩翌日および3日後に上昇し、7日目以降は $170 \mu\text{g/ml}$ 以下で推移した。分娩翌日および3日後の上昇は胎子娩出に伴って、必然的に生じる軽度な産道損傷が起因していると考えられた。HBA 法を用いた場合の育成牛の基準値について Chan ら[11]は $83.6 \mu\text{g/ml}$ 、Eckersall ら[18]は $0-100 \mu\text{g/ml}$ であったと報告しており、今回の結果とほぼ同じであった。本章の調査によると育成牛の Hp 基準値は中央値が $88 \mu\text{g/ml}$ 、最大値が $160 \mu\text{g/ml}$ であることか

ら、健常成牛と同じ値と推察される。

乳房炎牛の乳汁中 Hp 値はカリフォルニアマスタイトテスト(CMT)色調や体細胞数よりも感度が高かったと報告されている[59]。本章では、分娩直後～2日目に発症した急性乳房炎牛の血清中 Hp 値は同時期の健常牛と比較して有意に高かった。このことは、乳房炎罹患牛の Hp 測定は乳房炎の診断や経過観察の有効な指標になると考えられる。

子宮炎や子宮内膜炎発生の危険性があるとされる胎盤停滞牛[44]についても、本章の Hp 値は開口期から後産期まで異常なく経過した健常牛と比べて胎盤停滞牛では分娩日、分娩後3日は有意に高かった($P < 0.05$)。今回供試した胎盤停滞牛でも分娩後 5.7 ± 2.0 (平均 \pm SD)日で発熱や食欲不振などの症状を示したことから治療を必要とした。このことから、同症罹患牛の血清中 Hp 値の増加は、自然剥離しなかった胎盤に起因すると考えられ、Hp 測定は産褥期における子宮の炎症診断に有用であると考えられる。

乳熱罹患牛の血清中 Hp 値は分娩日、分娩後3日の健常牛との間に有意差はなかった。Skinner ら[62]も乳熱やケトosisなどの代謝性疾患では Hp 値が上昇しないと報告している。本章の結果からも分娩後の胎盤停滞や乳房炎から波及する Hp 値上昇とは異なり、代謝性疾患の乳熱に Hp は直接関与しないと考えられた。

5. 小 括

本章では、第1章で開発した改良 HBA 法を用いて健常牛の血清中 Hp 濃度(Hp 値)を調査し、生産現場で参考となる基準値を算出した。改良 HBA 法では健常牛 754 頭の分娩後6～16 週の Hp95%タイル値は $170 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。分娩後3日の血清中 Hp は平均値および中央値はともに $170 \mu\text{g/ml}$ を超えたが、分娩後7日以降の平均値および中央値は $170 \mu\text{g/ml}$ を下回った。胎盤停滞や分娩直後に発症する急性乳房炎では、同時期の健常牛より有意に高い値($P < 0.01$)を示したが、代謝性疾患の

乳熱では上昇しなかった。

以上の結果から、血清中 Hp 値は健常牛では $170\mu\text{g/ml}$ 以下であり、また Hp は乳牛の胎盤停滞や急性乳房炎の診断に有用であることが示唆された。

第Ⅲ章 罹患牛の血清中ハプトグロビン値簡易測定法の臨床応用

第1節 胎盤停滞牛の血清中ハプトグロビン値とその後の繁殖成績

1. 序 文

牛の胎盤停滞発生率は報告により 2～55%と幅があり、平均発生率は 7.5%である [21]。牛胎盤停滞発症後の代謝性疾患、乳房炎、子宮炎などの発生率は高く [24]、また流産を含むその後の受胎成績の低下が知られている [25,43]。胎盤停滞や産褥性子宮炎は、乳量の短期的な低下を引き起こし、胎盤自然排出牛よりも受胎率が 14%低かったという報告もある [25]。

牛の胎盤は分娩後6～8時間までに排出され、12 時間を経過しても自然に排出されなければ、胎盤停滞と診断される。そして牛の産褥性子宮炎は分娩後1～10 日の間に発症し、発熱、心悸亢進、食欲廃絶、泌乳量減少、第一胃運動停止、元氣消沈、脱水、下痢などの症状を示す重篤な疾病である。また、敗血症性子宮炎に陥ると診断後1～7日で斃死する [22]。

Christensen ら [12] は胎盤停滞牛で、発熱および食欲不振が認められたら、直ちに抗生物質治療を行うと急性子宮炎の発生率が低下し、その後の受胎成績に悪影響しないと報告している [12]。多くの胎盤停滞牛では敗血症を起こすような子宮炎、あるいは慢性子宮内膜炎を継発する病状はみられないが、その後の重症化が予測できないため、治療を必要とする場合があると述べている [23]。また、Fourichon ら [22] は胎盤停滞牛の慢性子宮内膜炎発症率が高く、初回発情までの間隔、初回人工授精受胎率、受胎までの日数と、人工授精回数などの繁殖成績に悪影響を与えると報告している。

このように、牛の胎盤停滞はその後の子宮炎症を惹起する可能性があるにも関わらず、その病態の観察を目的としたパラメーターに乏しい。したがって、まずは胎盤停滞に起因して発生していると思われる子宮の炎症の評価指標ならびにそれに基づく治療の研究が求められる。そのような中で、牛の産褥性子宮炎のハプトグロビン(Hp)は病勢

を反映することが報告されている[15,33]。

本節では、胎盤停滞牛の血清中 Hp 値の変動が分娩翌日からの体温、分娩 2 週間からの腔内粘液スコアの変化との関連を明らかにし、また分娩後1ヵ月以内の Hp 値の推移からその後の繁殖成績が予測できるかを調査した。

2. 材料および方法

1) 供試牛

本節の研究は第 I 章および第 II 章と同じ試験場で飼養されているホルスタイン種牛 27 頭を用い、同施設の動物実験指針に従って行った。これらは胎盤停滞の有無および現症所見から供試牛を以下の3群に区分した。

(1) 分娩後、胎盤が自然排出された群 8 頭

(2) 胎盤停滞を発症したが体温上昇、元気食欲低下などの症状が認められなかった群 7 頭(随伴症状なし群)

(3) 胎盤停滞を発症し、かつ体温上昇、元気食欲低下などの症状が認められた群 12 頭(随伴症状あり群)

2) 胎盤停滞の判定基準

分娩後 12 時間を経過しても胎盤が自然排出されず、外陰部から垂下している胎膜を牽引しても離脱排出しない場合を胎盤停滞と判定した(図 11)。



図11 分娩後に胎盤停滞を発症した供試牛

注：黄色矢印は胎子胎盤を示す

3) 臨床症状の観察

臨床症状の観察は分娩翌日から13日目まで行った。元気・活力低下の判断は、搾乳および飼料給与時の体動が悪い場合とした。食欲は個別の給餌槽に入れられた完全混合飼料(TMR)の残量を連日午前9時ごろの測定から判断した。TMRを前日から20kg以上摂食した場合を食欲あり、摂食20kg未満を食欲なしと区分した。

4) 抗生物質製剤による治療

胎盤停滞発症後、元気・活力低下および体温 39.5°C 以上の発熱がみられた牛群12頭は治療が必要と診断され、アンピシリンナトリウム3gの筋肉内注射を1日1回、3~4日間(3.8 ± 1.3 日)行った。本節では、食欲低下が認められた牛でも消化管作動薬は投与しなかった。また、発熱が認められても、食欲がある場合は抗生物質製剤を投与しなかった。

5) 血液採取

供試牛の血液は正中尾静脈から分娩日(分娩後0日)、分娩後1、2、3、7、10、14、17、21、24および28日に採取した。

採血管は市販品を利用した(ベノジェクトII真空採血管、テルモ、東京:血清分離管(VP-AS109K)、ヘパリンNa(VP-H100K)。採血後、血清分離管は血液が十分に凝固するまで室温で静置し、3,000rpm 15分間の遠心分離を行い、分離血清は測定まで -20°C 冷凍保存した。ヘパリン加血漿は採血後(直後~1時間以内)に3,000rpm 15分間遠心分離し、同様に保存した。

6) 血清中Hp値測定

第I章の改良ヘモグロビン結合測定(改良HBA)法を用いて測定した。

7) 体温測定

供試牛の直腸温度は分娩翌日~13日まで午前7~8時に、デジタル体温計(Thermo VISION, Measure Technology Co Ltd, Taiwan)を用いて測定した。

8) 臍内貯留物のスコア判定

腔内粘液は分娩後2～8週間、1週間に1回または2回、腔鏡または消毒した手袋で採取して視診を行い、Williamsら[69]の腔粘液スコア(VDS)を参考にして、以下の4スコアに区分した(図12)。

- (1)スコア0:腔粘液なし、あるいは粘液透明
- (2)スコア1:腔粘液に白または斑点状膿混入
- (3)スコア2:腔粘液に50%未満の膿様物混入
- (4)スコア3:50%以上の膿様物混入、時々血液混入

9)繁殖成績調査

供試牛の自発的待機期間は50日とし、胎盤停滞の有無およびその後の臨床所見から3群に区分して、分娩後初回発情までの日数、初回人工授精までの日数、受胎までの日数、受胎までの人工授精回数を比較した。なお、初回排卵日は卵巢の超音波検査所見による黄体形成と血清中 progesterone (P_4)濃度の変化から判定した(分娩直後から週1～2回の卵巢観察による黄体確認と、週2回の採血により $P_4 \geq 1\text{ng/ml}$ であった日の2日前を初回排卵日とした)。発情行動は分娩後150日まで1日3回観察し、人工授精は分娩後150日までとした。妊娠診断は人工授精後1～2ヵ月の間に超音波検査で行った。 P_4 値は分娩後から150日まで週2回採血し、酵素免疫測定法により確認した。

10)統計処理

表計算ソフト Microsoft windows Excel 2003 (microsoft, U.S.A)およびエクセル統計 2012(社会情報サービス、東京)を使用した。独立2群の有意差検定にはマンホイットニーのU検定を使用した。分娩後0日を対照群とし、それ以外の採材日(分娩後1～28日)における血清中 Hp 値の比較には Steel 検定を使用した。独立3群の検定には Steel-Dwass 検定を使用した(各群のサンプル数が6以上の場合にのみ検定を実行)。スピアマンの順位相関係数(R_s)は、Hp 値と日数との間の相関を評価するために検定で用いた。分娩後150日まで妊娠しなかった牛については、151日に置き換

えて計算した。

VDS

0



透明粘液



黄体期帯白色粘液

1



斑点状含有帯白あるいは
灰白色膿

2



50%未満含有帯白あるいは
灰白色膿

3



白色懸濁粘液



血液混入粘液

図12 William's (2005年)判定に基づく膣粘液スコア(VDS)

3. 結果

1) 臨床症状

供試牛でみられた臨床症状を表 5 に示した。胎盤停滞後に異常な所見を示した群の 12 頭では分娩後 1~13 日に元気食欲低下、39.5℃以上の発熱が観察され、その症状出現日は 2.2±1.3 日(平均±SD)であった。胎盤自然排出群、胎盤停滞の随伴症状なし群、および胎盤停滞の随伴症状あり群では、発熱の発現日がそれぞれ分娩後6日(1頭)、4.7±2.1 日(3 頭)、および 2.3±1.7 日(12 頭)であった。なお、随伴症状あり群と随伴症状なし群の発熱日に統計的有意差はなく(P>0.05)、また両群の発熱持続日数にも有意差はなかった(P>0.05)。

表5 胎盤停滞牛と胎盤自然排泄牛でみられた臨床症状の比較

臨床症状	供試牛(n=27)		
	胎盤停滞牛		胎盤自然排出牛(n=8)
	随伴症状あり群(n=12)	随伴症状なし群(n=7)	
元気活力低下、食欲低下	12/12 (100%)	0/7 (0%)	0/8 (0%)
直腸温度39.5℃以上	12/12 (100%)	3/7 (43%)	1/8 (13%)

注1:観察期間は分娩翌日から13日後までとした

注2:胎盤が分娩後12時間までに自然排出されない牛を胎盤停滞と診断した

2) 膣内貯留粘液スコア(VDS)

胎盤停滞後に随伴症状あり群、症状なし群および胎盤自然排出群の膣粘液スコアが1以上であると子宮内膜に炎症があると判断した。その結果、スコア3が自然排出群で分娩2週後に 100%、また4週に 17%で認められた(図 13)。随伴症状なし群でもスコア3が2週に 83%、7週でも 25%にみられた。そして随伴症状あり群は2週で 86%、8週でも 11%に認められた。自然排出群では分娩3週後にスコア3が減少し、スコア 1 あるいは2が 50%、また8週に 34%を占めた。随伴症状なし群の 50%は8週にスコア0

となった。しかし、随伴症状あり群では8週経過してもスコア2および3を示し、清浄化粘液がみられなかった。

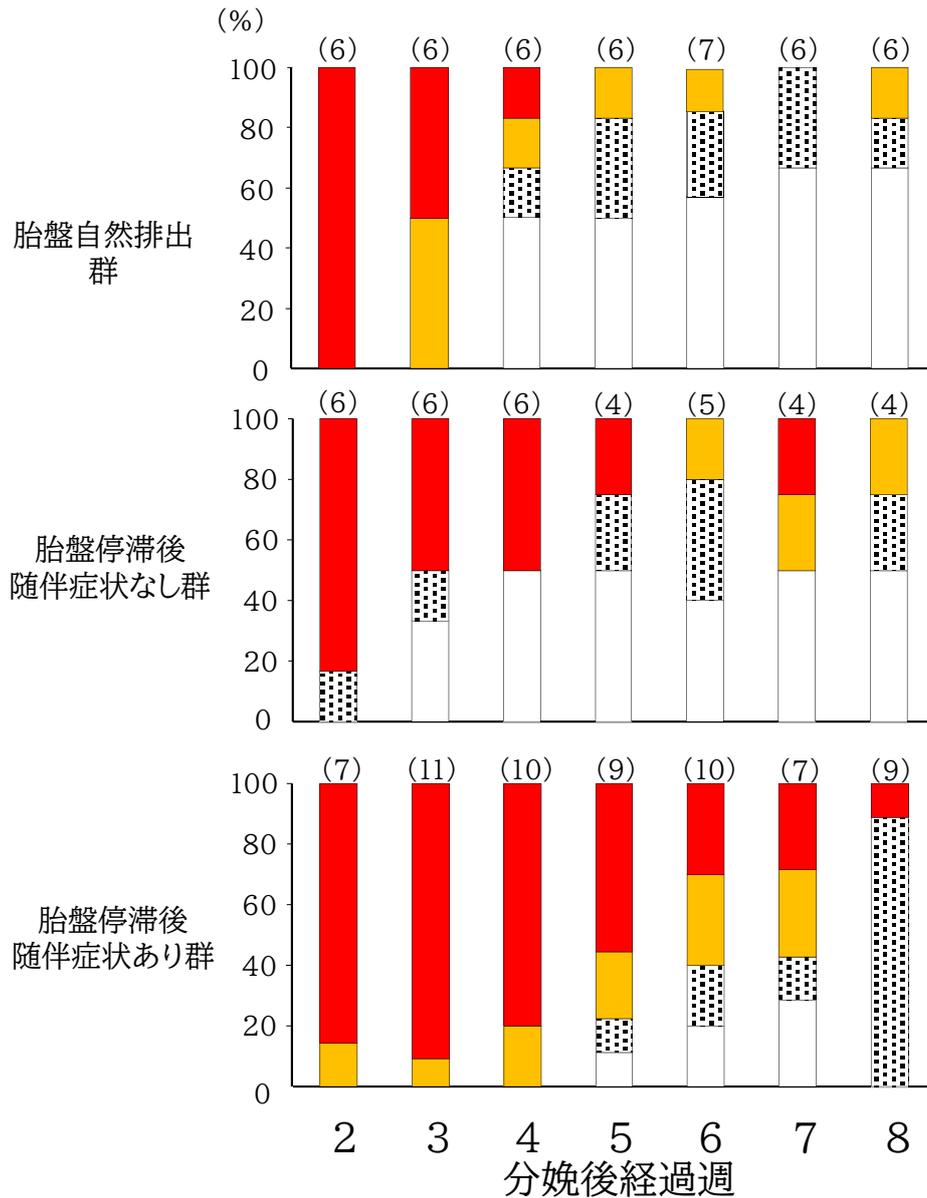


図13 胎盤停滞牛と自然排泄牛の分娩後経過週ごとの腔粘液スコア(VDS)

注1:()は頭数を示す

注2:□はVDS 0、▣はVDS 1、■はVDS 2、■はVDS 3を示す

3) 血清中 Hp 値の変動

分娩日とその後1~28日までの血清中 Hp 値を測定し、3群それぞれで有意差検定を行った。その結果、胎盤停滞後随伴症状あり群のみが分娩後1、2、3、7および10日に有意な Hp 値の上昇が認められた($P < 0.01$)。胎盤自然排出群と随伴症状なし群では血清中 Hp 値の有意な上昇はみられなかったが、随伴症状なし群は分娩後3日、また自然排出群は2日にわずかな上昇を示した。さらに、自然排出群と随伴症状あり群では分娩後2~10日の Hp 値に有意差がみられた(図14)。

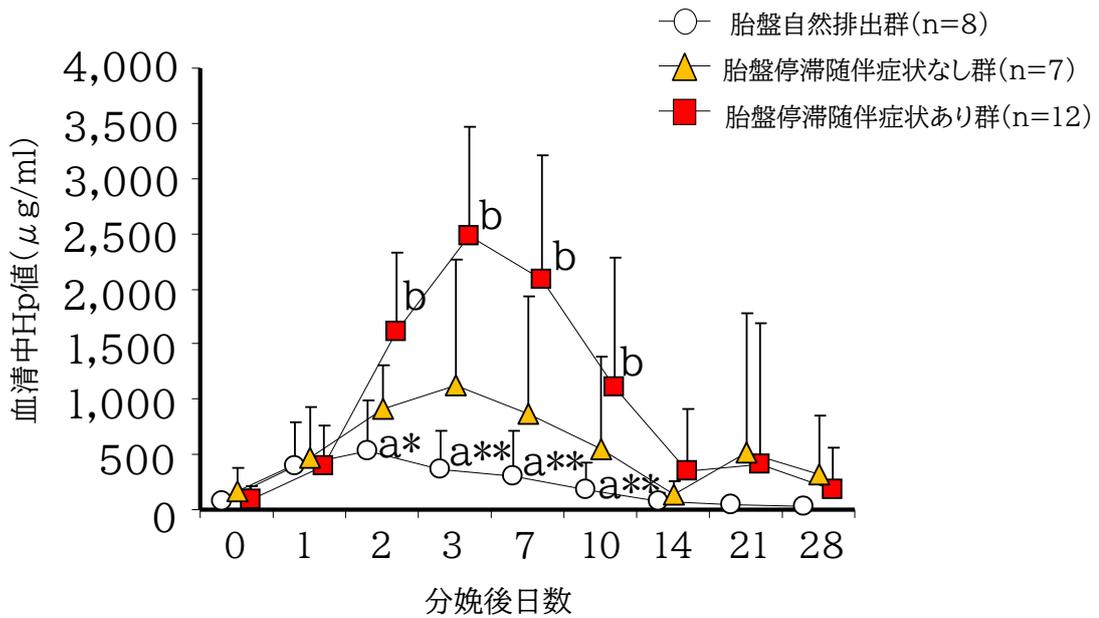


図14 胎盤停滞および胎盤自然排泄牛の血清中Hp値の推移

注1:各シンボルは平均値、上のバーは標準偏差を示した

注2:a, b間は有意差があることを示した

注3:* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$

4)繁殖成績

供試牛の繁殖成績を表6に示した。胎盤自然排出群と随伴臨床症状あり群および随伴症状なし群の分娩後150日以内の初回排卵日数、初回発情日数および初回人工授精日数に有意差は認められなかった。また、随伴臨床症状あり群と随伴症状なし群の合計と自然排出群を比較すると、初回排卵日は 35 ± 17 ($P=0.24$)、初回発情日 69 ± 30 ($P=0.37$)および初回人工授精日が 86 ± 30 ($P=0.44$)で、いずれにも有意差を認めなかった。随伴臨床症状あり群と随伴症状なし群の間には初回排卵日数、初回発情日数、初回人工授精日数に有意差はなかった($P > 0.05$)。

表7 分娩後胎盤停滞牛と自然排泄牛における繁殖成績の比較

項目	供試牛			有意差検定によるP値
	胎盤停滞牛(n=19)		胎盤 自然排出牛 (n=8)	
	随伴症状 あり群(n=12)	随伴症状 なし群(n=7)		
初回排卵日数	39 ± 18	29 ± 15	29 ± 18	すべて $P > 0.05$ (3群間)
初回発情日数	78 ± 33	51 ± 8	54 ± 12	すべて $P > 0.05$ (3群間)
初回授精日数	98 ± 43	61 ± 8	68 ± 16	すべて $P > 0.05$ (3群間)
初回授精受胎率	2/12 (17%)	1/5 (20%)	5/8 (63%)	検定せず
分娩後150日までの 総受胎率	7/12 (64%)	4/5 (80%)	8/8 (100%)	検定せず
空胎日数	131 ± 32	94 ± 37	82 ± 26	$P < 0.01$ (注3)

注1:分娩後200日までの調査期間とした

注2:空胎日数は150日以降に受胎した牛は151日と代入して計算した

注3:標本数の理由により胎盤自然排出牛と胎盤停滞の牛(随伴症状あり群+随伴症状なし群)でマンホイットニーU検定を適用し検定した

注4:胎盤停滞随伴症状なし群の2頭は調査期間中に骨折により除籍した

5) 膣内粘液スコアと血清中 Hp 値との関係

分娩後3～5週の膣内粘液スコアと分娩後3日における血清中 Hp 値とのスピアマンの相関係数を算出した(3週:図15)。その結果、分娩後3週の粘液スコアと分娩後3日のHp値は中程度の正の相関($R_s=0.51$, $P<0.05$)があり、4週目のスコアはさらに強い相関を示した($R_s=0.65$, $P<0.01$)。また、5週目では有意な相関関係を認めなかった($R_s=0.31$, $P=0.19$)。

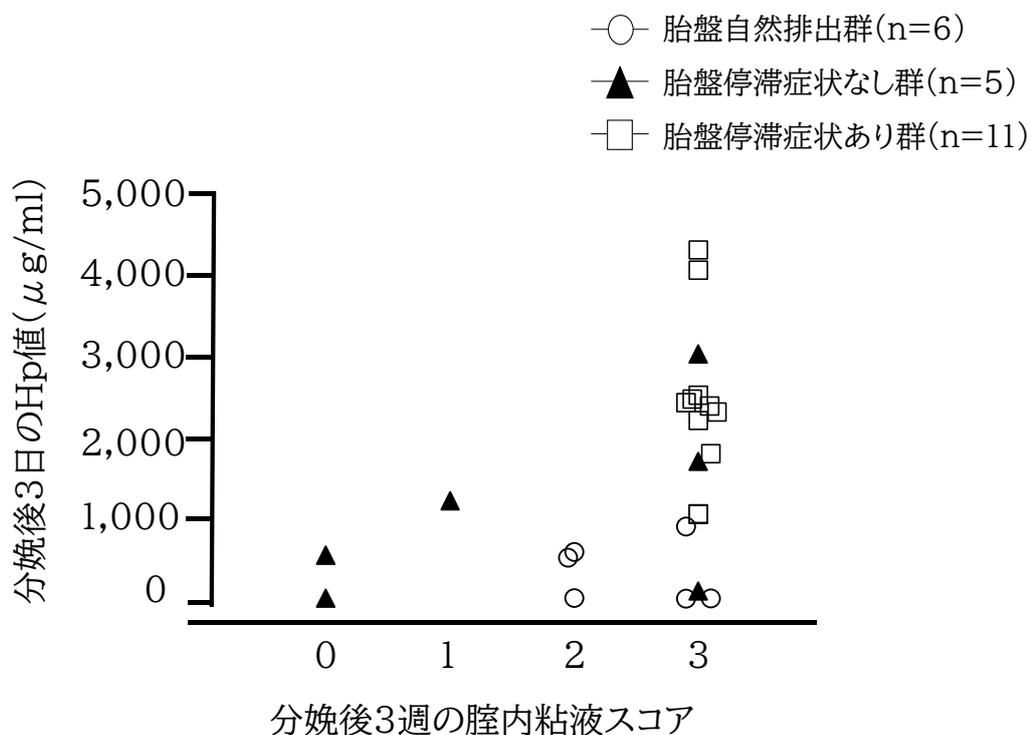


図15 分娩後3日の血清中Hp値と3週後膣内粘液スコアとの関係

6) 空胎日数と血清中 Hp 値との関係

供試牛 27 頭の空胎日数と分娩後 0～28 日までの血清中 Hp 値の変動との関係を、スピアマンの順位相関係数を用いて表 7 に示した。分娩後 3、7 および 10 日の Hp 値は分娩後 150 日まで不受胎日数と有意な正の相関を示すことが明らかになった(表 7)。また、分娩後 150 日以内に受胎した牛の分娩後 3 日の Hp 値との関係を図 16 に示した。胎盤停滞牛の Hp 値は分娩後 3 日の Hp 値が高く、妊娠しなかった 6 頭すべてが 1,500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上であった。150 日以内に妊娠した 19 頭中 10 頭(53%)の Hp 値は 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を超えていた。

表7. 分娩牛の血清中Hp値の変動が空胎日数に及ぼす影響

項目	分娩後の日数								
	0	1	2	3	7	10	14	21	28
Rs	-0.61	-0.20	0.34	0.47	0.47	0.47	0.35	-0.18	-0.28
P	<0.01	0.39	0.15	<0.05	<0.05	<0.05	0.09	0.38	0.20

注1:血清中Hp値は分娩後から分娩後28日まで測定した

注2:Rsはスピアマンの順位相関係数である

注3:Pは危険率である

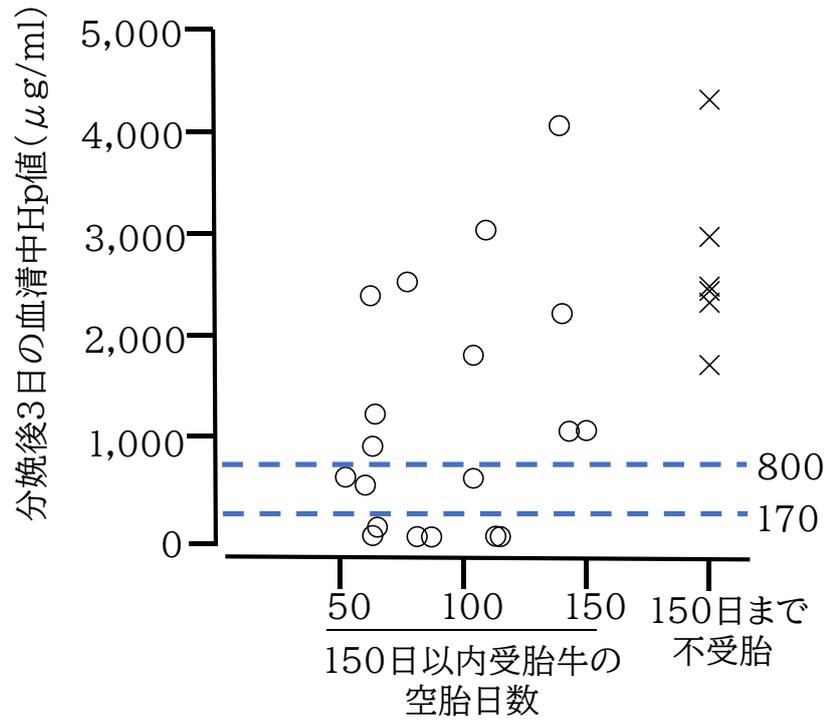


図16 分娩後150日以内受胎牛と150日まで不受胎牛の、分娩後3日の血清中Hp値が空胎日数に及ぼす影響

注1: ○ 分娩後150日以内受胎牛、× 分娩後150日まで不受胎牛を示す

注2: 800 $\mu\text{g/ml}$ はDubucが報告した子宮炎の危険因子のひとつとして述べたHp値である。170 $\mu\text{g/ml}$ はII章の健常牛血清中Hp値である

4. 考 察

牛の胎盤停滯は無症状で経過、あるいはその直後から子宮の炎症を発症し、重症や生命を脅かす可能性があるものまで、さまざまな病態を示す疾病である。本節では、Hpを含む臨床検査によって胎盤停滯牛の病態を評価した。子宮の炎症の診断には継続的なバイオプシーによる病理学的あるいは細胞学的検査を行わなければならないが、本節では胎盤停滯後の発熱、元気食欲低下など所見をもとに産褥性子宮炎や子宮内膜炎の反応があると判断した。

腔鏡による貯留物の視診は牛の子宮内膜炎の診断に有用な手法の一つと考えられているが[39,73]、本節の胎盤停滯牛では、腔内粘液スコアと子宮内膜炎との明確な関連を見出すことは困難であった。たとえば、自然排出群では分娩後3週に50%、4週で17%にスコア3が検出され、8週目では34%がスコア1または2であったからである。すべての自然排出群は分娩後150日以内に受胎が確認されており、このことからスコア1と2による子宮の炎症があることの評価については、今後の課題であると思われた。本節の調査から、胎盤停滯牛の分娩後8週以降でもスコア3が検出されたことは、子宮内膜炎に関連している可能性があるかと類推される。

Dubucら[16]は牛の子宮炎の危険因子として、分娩前における血中遊離脂肪酸上昇、難産、胎盤停滯および分娩後1週間の血清中Hp値上昇($\geq 0.8\text{g/L}$)があることを報告している。Huzzeyら[31]の報告では分娩後、順調に回復した牛の分娩後12~15日の血清中Hp値は $0\mu\text{g/ml}$ 近くまで低下したが、産褥性子宮炎継発例の分娩後12日のHp値は順調に回復したものと比べて有意に高かったと述べている。また、Chanら[11]は分娩後3週の血清中Hp値は $86\pm 73\mu\text{g/ml}$ で、6ヵ月間高値を持続したと報告している。

本節でも、胎盤停滯後に随伴症状を示した群(随伴症状あり群)の分娩後1~10日間の血清中Hp値に顕著な変動が認められ、特に7~10日は $1,000\mu\text{g/ml}$ 以上であ

り、第Ⅱ章で得られた分娩後6～16週間の健常牛754頭の95%タイル値である170 $\mu\text{g/ml}$ をはるかに超えていた。また、随伴症状あり群の分娩後3、7および10日の中央値はそれぞれ2,424、2,293、941 $\mu\text{g/ml}$ 、3～10日の平均Hp値は2,000 $\mu\text{g/ml}$ を超えていたことから、強度な炎症が起こっていたと考えられる。随伴症状なし群にも少なからず変動がみられたことから、病勢モニタリングにおいてはこの間のHp値推移が子宮の炎症を反映しているかを調べる必要がある。

供試牛を3群に分けた場合、胎盤停滞後に発熱、元気食欲低下などの症状を示し分娩後150日まで受胎しなかった牛の空胎日数を151日と仮定して計算すると、胎盤自然排出群との間には有意差が認められた($P < 0.01$)。両群の初回排卵日数、初回発情日数および初回人工授精日数に有意差がみられないことから、その後の卵巣および子宮の回復に胎盤停滞は影響していないとも考えられた。一方で、すべてに発症後3日の血清中Hpを代表値にした場合、分娩後100日以内の受胎牛は150日までに不受胎であったものと比べて低く、胎盤停滞発症後の子宮炎あるいは子宮内膜炎に関連する子宮回復遅延の指標になる可能性が示唆された。

本節では、胎盤停滞後に発熱、元気食欲低下などの随伴症状を示した群の受胎率が自然排出群よりも低い傾向を示し、腔内粘液スコア3が継続する傾向がみられ、分娩後2～10日で血清中Hp値が1,000 $\mu\text{g/ml}$ より高くなり、胎盤停滞に起因する炎症が重度で、分娩後のHpが高いことは臨床で注意すべき事項の一つと考えた。Hp値は分娩後3日がピークであったことから、胎盤停滞後の無症状牛、元気食欲低下牛、発熱牛などの検査結果を収集して治療研究に結びつけ、生産現場での健康管理の効率化を目指す必要があると考えられる。

以上より、本節において分娩後血清中Hp値は牛の胎盤停滞後に継発する産褥性子宮炎の病態の程度と、繁殖成績を推量する指標の一つとして活用できることが示された。

5. 小 括

牛の胎盤停滯に継発する産褥性子宮炎あるいは子宮内膜炎との関連が考えられる血清中ハプトグロビン(Hp)値の変動を評価するため、分娩後の胎盤が正常に排出された群8頭、胎盤停滯を発症したが発熱、元気食欲低下などの症状を認めなかった(随伴症状なし)群7頭および胎盤停滯を発症し、かつ随伴症状がみられた群(随伴症状あり群)12頭に区分して比較検討した。その結果、自然排出群と随伴症状なし群のHp中央値は分娩後1日から上昇し、2日目に最大の525~994 μ g/mlを示した。随伴症状あり群の中央値も1日目から上昇し、3日目に最大2,424 μ g/mlとなった。3群は7日目まで高値を持続し、特に随伴症状あり群は2~10日目まで1,000 μ g/ml以上で推移し、自然排出群とは有意な差を認めた($P<0.05$)。このことから、随伴症状あり牛は症状なし牛や自然排出牛よりも大きい炎症があったと考えられ、Hp値は胎盤停滯に起因する炎症に反応して顕著な上昇を示し、病態把握に必要な血液炎症指標のひとつとして有効であることが示された。

本節の調査では、胎盤停滯後に発熱、元気食欲低下などの臨床症状を示した群の血清中Hp値が分娩後~10日に大きく変動した。さらに、分娩後5~8週以降に腔内粘液スコア3がみられる胎盤停滯牛は子宮内膜回復遅延を示す所見であると考えられる。したがって、血清中Hp値は胎盤停滯に関連する炎症の指標として有効であることが示された。

第2節 難治性乳房炎牛の血清中ハプトグロビン値と病原菌の消長

1. 序 文

牛の乳房炎は生産現場で最も多い疾病の一つで、抗生物質製剤が普遍的に使用され、その効果に生産者と獣医師は大きな関心を示す。効果的な抗生物質製剤が投与されない場合、乳房炎の治療期間が延び、乳生産の損失要因になるため、病態把握ができる検査項目の実用化は急務である。細菌感染症の治療効果をモニタリングするには、臨床症状の他に、病原菌の存在を証明する必要がある。牛の子宮炎や呼吸器病の細菌採取は、手間がかかるため臨床では頻繁に行われていない。これに対して、乳房炎は乳汁中に病原菌が排出されることから、投与薬剤の効果を容易に評価できる。

本節では、分娩後の乳房炎発症牛の血清中 Hp 値の推移から、牛の主要な急性相タンパクのひとつである Hp が病態を反映して、抗生物質製剤投与の有効性が予知できるかを検討した。

2 材料および方法

1) 供試牛

本節の研究は第 I 章で記述した試験場で動物実験指針に基づいて適正に実施され、急性乳房炎罹患牛 26 頭を供試した。なお、胎盤停滞、産褥性子宮炎、胃腸障害など疾病が診断された個体は除外した。

2) 検査方法および供試牛の区分

全牛の乳汁は毎搾乳時にストリップカップ法による検査を行い、分娩翌日あるいは7～8 日後に乳汁細菌培養検査と体細胞数検査を行った。また、明らかな乳房の腫れ、凝固物などの症状が認められた個体は乳汁を細菌培養した。罹患乳房から乳汁 50 μ l を採取してコーンラージ棒を用いて血液寒天培地に塗抹、培養した。発育培地に

250CFU/ml以上の発育コロニーを認めると異常所見と診断されているので[4, 38, 48]、この基準を採用して陽性と陰性に区分した。体細胞数は診断日と治療終了後8日の乳汁を Fossomatic90(A/S Foss electric Hillerød, Denmark)で測定した。急性乳房炎牛 26 頭の第1～8病日までの血清中 Hp 値および診断日と第8病日の乳汁中平均体細胞数(SCC)を測定した(表 8)。

(1)治療後の乳汁中細菌培養結果による区分

治療後の乳汁細菌培養結果により供試牛を2群に区分した。すなわち、治療後に乳汁中細菌培養陽性となった(陽性)群、治療に反応して陰性であった(陰性)群である。

また、複数分房感染による血清中 Hp 値上昇の影響を除外する目的で、単分房だけの急性乳房炎症例の乳汁細菌培養も行った。

(2)乳房炎発症時期による区分

次に、急性乳房炎の発症時期に注目して、分娩直後～2日目に発症した群と分娩後3週以降に発症した群に供試牛を2区分した。

表8 乳房炎牛26頭の発症時期と治療後乳汁細菌培養結果による区分

		乳房炎発症時期	
		分娩直後～2日目 (n=13)	分娩後3週以降 (n=13)
治療後乳汁細菌 培養結果	陰性 (n=14)	8	6
	陽性 (n=12)	5	7

注：治療後の乳汁細菌培養は第8病日に行った

3)血液検査

供試牛の血液は分娩翌日から 8 日間採取し、3,000rpm 15 分間遠心分離後の血清を-20℃で凍結保存した。Hp 値は第 I 章の方法で測定した。なお、分娩後6～16 週の健常牛の Hp 値は第 II 章の評価に準じて 170 μg/ml とした。

4)急性乳房炎の治療

すべての乳房炎牛の罹患乳房に軟膏抗生物質製剤を1日1回、3～4日間注入した。なお、*Staphylococcus Aureus*(SA)陽性6頭には抗生物質製剤の筋肉内注射を併用した。

5)統計解析

独立2群間における分娩翌日から8日間の血清中 Hp 値および乳汁中体細胞数の比較には、マンホイットニーの U 検定を用いた。治療終了日の細菌培養で陽性を示した群と陰性であった群の8日間の Hp 変動については、治療翌日とそれ以降の8日までの変動が有意であるかを検討するために Steel 検定を用いた。なお、危険率(有意水準)は5%とした。

3. 結果

1)治療後の乳汁中細菌陽性群と陰性群の血清中 Hp 値の変動

急性乳房炎牛 26 頭に抗生物質製剤を3～4日間投与し、治療開始日と治療終了後4日あるいは5日の乳汁を培養したところ、陽性を示した群の12頭は炎症反応を反映して血清中 Hp 値の明らかな上昇傾向がみられた(図17)。細菌培養陰性群14頭の8日間の血清中 Hp 中央値は治療後2日にピークを示した。その後は漸減し、治療開始から6～8日後は治療開始日と比べて有意な低下を示した($P=0.02$ 、 <0.01 および <0.01)。特に、治療終了後4日あるいは5日の12頭(85%)の血清中 Hp 中央値は健康牛レベル以下($<170\mu\text{g/ml}$)に低下した。一方、治療効果がなかった細菌培養陽性群12頭の Hp 中央値は治療翌日から5日まで $1,000\mu\text{g/ml}$ 以上あり、その後8日目まで $500\mu\text{g/ml}$ 以上を維持した。そして steel 検定において治療翌日とその後の8日目までの有意差はみられなかった。また、4頭(33%)の8日目の血清 Hp 中央値は健康牛レベル以下であった($\text{Hp}<170\mu\text{g/ml}$)。治療開始後8日の血清中 Hp 値は、細菌培養陰性群(四分位値:25パーセンタイル値(Q1),50パーセンタイル値(Q2),75パ

一センタイル値(Q3)= 58,94,110)と、陽性群(同:89,577,2563)の間に有意差があった(P=0.03)。すなわち、治療に無反応であった細菌培養陽性群では血清中 Hp 値は高く維持され、治療に反応した陰性群では治療開始後6~8日の Hp 値が治療開始翌日より有意に低下した。

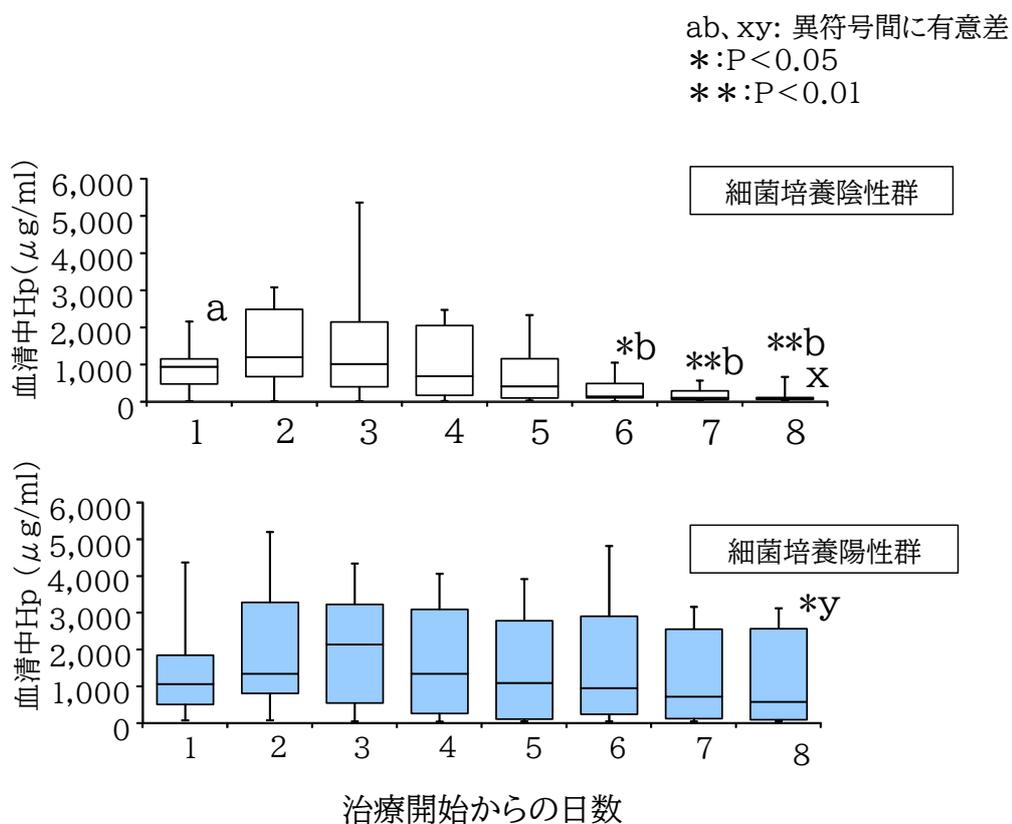


図17 乳房炎牛の血清中Hp値の推移

注1:第8病日細菌培養検査陰性 14頭

第8病日細菌培養検査陽性 12頭

注2:複数分房と単数分房発症例に区分せず

注3:各病日の血清中Hp濃度は上から最大値、75%値、中央値、25%値および最小値を示した

複数分房感染が血清中 Hp 値の変動に及ぼす影響を除外する目的で、単分房感染牛の 16 頭についても分析した。その結果、治療開始後 8 日の細菌培養陽性群 6 頭では、治療開始日から 8 日目までの Hp 値は複数分房感染牛と同様に上昇傾向を示した (図 18)。陽性群 10 頭の血清中 Hp 中央値は、2 日目がピークで、その後徐々に減少し、6~8 日目は、治療開始日との間に有意差がみられた ($P = 0.049, 0.02$, および <0.01)。細菌培養陰性群 10 頭中の 9 頭は 8 日目に $170 \mu\text{g/ml}$ を下回った。一方、陽性群の血清中 Hp 中央値は治療開始日~8 日目まで $500 \mu\text{g/ml}$ 以上を示し、陰性群と比較して有意に高かった (それぞれ $P < 0.01, < 0.01$)。陽性群の Hp 値については、Steel 検定で治療開始日と 8 日目に有意差がみられなかった。そのうち、陽性群 2 頭牛の 7~8 日目の血清中 Hp 値は、 $170 \mu\text{g/ml}$ を下回り、複数分房の結果と同様の傾向であった。

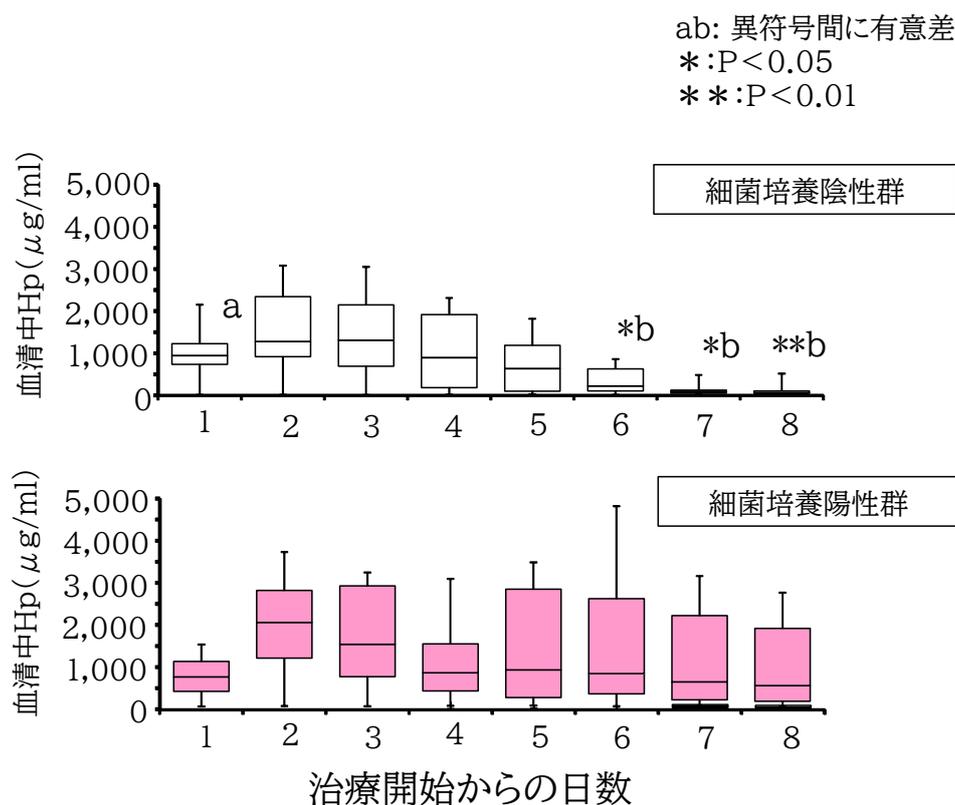


図18 単数分房の乳房炎発症牛の血清中Hp値の推移

注1:第8病日細菌培養検査陰性 10頭

第8病日細菌培養検査陽性 6頭

注2:各病日の血清中Hp濃度は上から最大値、75%値、中央値、25%値および最小値を示した

2)乳房炎発症時期による血清中 Hp 値の変動

乳房炎を分娩直後～2日目に発症した群 13 頭と分娩後3週後以降に臨床的乳房炎症状を示した群 13 頭に区分して血清中 Hp 値を比較した(図 19)。その結果、分娩直後から発症した群の翌日の四分位値はそれぞれ 772 $\mu\text{g/ml}$ 、1,129 $\mu\text{g/ml}$ 、および 1,736 $\mu\text{g/ml}$ を示した。分娩後3週以降に治療された群の四分位値はそれぞれ 119 $\mu\text{g/ml}$ 、731 $\mu\text{g/ml}$ 、および 1,158 $\mu\text{g/ml}$ であった。分娩直後から乳房炎を発症した群の治療開始後 8 日の四分位値はそれぞれ 97 $\mu\text{g/ml}$ 、158 $\mu\text{g/ml}$ 、および 668 $\mu\text{g/ml}$ 、分娩 3 週以降に発症した群の四分位値はそれぞれ 56 $\mu\text{g/ml}$ 、62 $\mu\text{g/ml}$ 、

および219 $\mu\text{g/ml}$)で、両群の血清中Hp値に有意な差がみられなかった($P>0.05$)。

また、各群における変動も治療開始日と開始後2～8日に有意差はなかった($P>0.05$)。

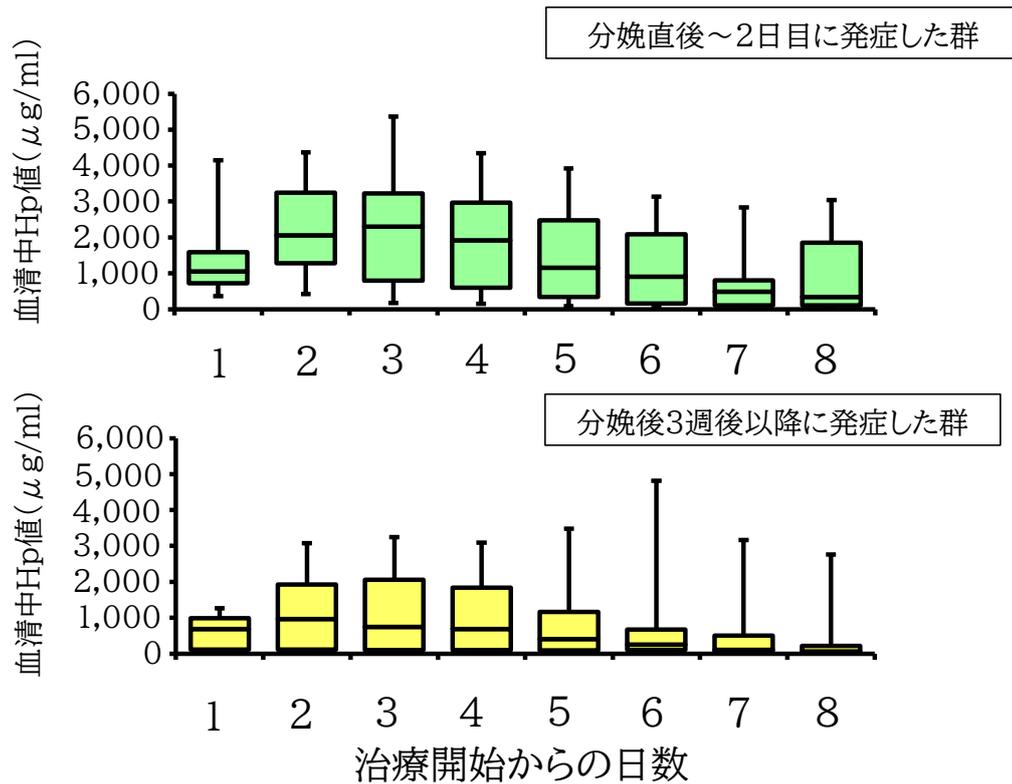


図19 牛乳房炎の発症時期による血清中Hp値の推移

注1:分娩直後～2日に発症した群13頭

分娩後3週後以降に発症した群13頭

注2:各病日の血清中Hp濃度は上から最大値、75%値、中央値
25%値および最小値を示した

3) 治療後の乳汁中細菌陽性群と陰性群で区分した乳汁中体細胞数

治療開始日の乳汁中体細胞数は表9に示したとおり、細菌培養陰性群の治療開始後1日と、陽性群の治療開始後1日との間に有意差がなく(P=0.57)、また治療開始後8日の両者間に有意差はなかった(P=0.86)。

表9 牛乳房炎治療後の乳汁細菌培養結果の体細胞数に及ぼす影響

治療開始後 日数	乳房炎牛の体細胞数						P値
	細菌培養陰性群(n=14)			細菌培養陽性群(n=12)			
	25% タイル値	中央値	75% タイル値	25% タイル値	中央値	75% タイル値	
1	751	2,492	5,575	1,916	2,406	8,167	0.57
8	48	122	430	47	169	321	0.86

注1:体細胞数の測定単位は、数値×1,000個/mlである

注2:乳汁細菌培養は治療開始後8日目(第8病日)に実施した

4) 乳房炎発症時期で区分した乳汁中体細胞数

表10のとおり、分娩直後の乳房炎発症群の治療開始日と分娩後3週以降の発症群の治療開始日の乳汁中体細胞数に有意差がみられた(P=0.02)。なお、8日目の両群に有意差はなかった(P=0.87)。

表10 牛乳房炎発症時期が体細胞数に及ぼす影響

治療開始後 日数	乳房炎牛の体細胞数						P値
	分娩直後～2日目発症群(n=13)			分娩後3週以降発症群(n=13)			
	25% タイル値	中央値	75% タイル値	25% タイル値	中央値	75% タイル値	
1	2,113	5,017	10,346	318	1,966	3,883	0.02
8	48	122	430	48	169	270	0.87

5) 乳汁細菌分離培養成績

供試牛 26 頭の罹患分房から治療開始日にレンサ球菌、ブドウ球菌および大腸菌群がそれぞれ 10 頭、6 頭および 5 頭で分離された。また、コリネバクテリウムとパスツレラが各 1 頭、ブドウ球菌とレンサ球菌の複合分離および大腸菌群とレンサ球菌の複合分離がそれぞれ 2 頭、1 頭で得られた。8 日目の細菌培養で陽性を示した供試牛 3 頭の乳汁からブドウ球菌、レンサ球菌および大腸菌群がそれぞれ 4、3 および 3 分房で分離された。また、陽性牛 1 頭ずつの乳汁からコリネバクテリウムとパスツレラが分離された。供試牛の罹患分房数は 16 頭が 1 分房、6 頭が 2 分房で、3 分房と 4 分房はそれぞれ 2 頭であった。

4. 考 察

本節では、治療開始後 8 日の乳汁細菌培養陽性牛の血清中 Hp 値は高く推移し、その治療抵抗性が反映された。乳汁中体細胞数(体細胞数)は分娩後の発症牛で高値を示したが、細菌培養の成績との連動性はなかった。したがって、治療期間中の血清中 Hp 値は病態を反映し、抗生物質製剤投与の有効性を予知する指標である可能性が高いと考えられた。しかし、本来 Hp は非特異的な炎症を検出する一つの指標であり、乳房炎診断については従来から用いられている体細胞数、NAGase、PL テスターなどの評価との関連を今後調査する必要がある。罹患分房が複数、単数のいずれでも、治療開始後 8 日の細菌培養陰性群では感染由来の炎症が抗生物質製剤投与によって抑えられ、血清中 Hp 値が低下した。それに対して、陽性群では病原菌が抗生物質に抵抗し、感染による炎症が維持され血清中 Hp 値は高く推移したと考える。また、分娩による影響は血清中 Hp 値に影響しないと思われた。しかし、急性相タンパクは非特異的な炎症に反応することから、乳房炎牛に他の炎症がある場合には、血清中 Hp 値は治療効果に関わらず低下しない可能性がある。

著者が知る限りにおいては、産褥期を比較的健常に経過する泌乳牛の血液中 Hp 値に関する研究報告は見当たらない。そこで、臨床現場で判断する血清中 Hp 値として、今回は第 2 章で示した分娩後 6～16 週の健常牛から得た $170\mu\text{g/ml}$ (95%値) を採用した。治療開始後 8 日の乳汁中細菌検査で陰性を示した群の血清中 Hp 値は 85% が $170\mu\text{g/ml}$ を下回ったことから、臨床現場で治療効果を判断するため、すでに普及している白血球数や血清中アルブミン・グロブリン比測定などに加えて、本研究の改良型 HBA 測定法による Hp 値の測定は病態評価の一つとして妥当であると考えられる。

Morimatsu ら[49] は一元免疫拡散法を用いて健常牛の Hp 値の測定を試みたが、検出できなかったと報告している。また、Safi ら[59] は潜在性乳房炎牛の診断日における血清 Hp の感度は 90% で、特異度が 64.4% であり、体細胞数 (感度 89.6、特異度 98.3) と感度は同等であるが特異度はやや劣る報告をしている。本節の研究では、8 日目の治療に反応した細菌陰性群と薬効がなかった陽性群の乳汁中体細胞数において有意な差がみられなかった。また、分娩直後罹患群の治療開始日と分娩後 3 週以降罹患群では治療開始日の Hp に有意差が認められたが、症例数が少ないため、Hp を治療抵抗性の指標とするにはさらに症例数を重ねる必要がある。Hagnestam-Nielsen ら[27] は、臨床型乳房炎のない経産牛では泌乳開始 1～2 週の体細胞数は $133,000$ 個/ml (中央値)、また 3～8 週後に $46,000$ 個/ml (中央値) まで低下したと報告している。したがって、今回の分娩直後と泌乳期間に発症した乳房炎の炎症反応が同程度であれば、前者が後者よりも乳汁中体細胞数が高いことは矛盾しないであろう。

以上から、分娩直後および分娩後 3 週以降に発症する乳房炎牛の抗生物質製剤による治療効果のモニタリングが可能なバイオマーカーとして、Hp は有用であり、また本研究の改良 HBA 法による血清中 Hp 値の測定は病態評価法の一つであることが判明した。

5 小 括

本節の研究では、乳房炎牛 26 頭の診断・治療開始日から8日間の改良ヘモグロビン結合アッセイ(改良 HBA)法による血清中 Hp 値を測定して、抗生剤治療成績の反映を検討した。

その結果、3～4日間抗生物質製剤が投与され、薬効がなく治療開始から 8 日目の細菌培養検査で陽性判定群 12 頭中8頭(67%)の Hp 中央値は、健常牛濃度レベルより高く推移した(分娩後6～16 週の 95%タイル値:170 μ g/ml)。一方、薬効があり、8 日目に細菌陰性群 14 頭中 12 頭(85%)の血清中 Hp 値は健常牛レベル以下であった。また、陽性群の血清中 Hp 値は6日、7 日および 8 日が陰性牛と比べて有意な高さで推移していることから($P<0.01$ 、 $P<0.05$ 、および $P<0.05$)、Hp が治療抵抗性を反映していることが示された。分娩後の乳房炎発症牛では抗生物質製剤投与後の血清中 Hp 値のモニタリングが薬効の有効性を予知できる可能性があり、有用な検査項目のひとつになりうると考えられた。

第3節 呼吸器疾患子牛の血清中ハプトグロビン値と治療成績

1 序文

子牛の呼吸器病症候群(BRDC)は、消化器病とともに生産現場が困窮する一大疾病である。本症の治療には抗生物質製剤等を用いているが、投与後の効果判定を客観的に評価する指標の開発は未だ進展していない。通常、血液中炎症マーカーは第1病日の病勢、また治療経過中の投与薬剤反応性を評価するために利用されている。人医学領域の炎症マーカーと同様に、獣医学領域でも犬の肺炎や気管支炎の診断に急性相タンパク(APPs)の一種であるC反応性タンパク(CRP)検査が用いられ[70、74]、細菌性肺炎の治療効果判定の指標として活用できることが示唆されている[69]。今日まで、牛のAPPsのうちハプトグロビン(Hp)、血清アミロイドA(SAA)、フィブリノーゲンなどは呼吸器病診断に有用であることが報告されている[1]。また、肥育場で飼育されている子牛の呼吸器病のHp、SAA、フィブリン、 α -1酸性糖タンパク(AGP)などと病状との関係を検討し[8]、治療効果と血清中Hp値との関連性がみられることから、疾病評価や治療効果のモニタリングとしての上記マーカーの活用が提案されている。

しかし、これまでの報告では第1病日の測定から次の測定日まで少なくとも1週以上の間隔があり[8,32]、臨床現場ではもっと早期の病状判定が求められる。したがって、治療効果の判定に用いるなら、これまでの報告よりも短い間隔で血清中Hp値などを測定する必要がある。また、臨床でルーチン化されている白血球数や、測定が確立しているAGPの有用性も検討しなければならない。

本節では、公設酪農試験場でBRDCに罹患した子牛の血清中Hp値と白血球数変動パターンは同一であるか、また北海道網走地域の酪農家から診療依頼された同病子牛の血清中Hp値とAGP値が診断日ならびに治療中の病勢の判定に用いられるかを明らかにするために実施した。

2 材料および方法

1) 供試牛

(1) 本節の研究には第 I 章および第 II 章と同じ公設酪農試験場で飼養され、呼吸器疾患症候群 (BRDC) に罹患した 2~3 ヶ月齢のホルスタイン種子牛 8 頭を同施設の動物実験指針に従って供試した (試験 1)。これらは 1 群が 8~16 頭程度で管理され、呼吸器病ワクチン接種は行われていない。供試子牛の呼吸器症状は同時期にみられ発熱 (39.5℃ 以上)、発咳、鼻汁などを示した。これらの子牛は β -ラクタム系抗生物質 (水性アンピシリン注「KS」: 共立製薬、東京) を体重 10kg あたり 100 mg、1 回/日、5 日間連続筋肉内注射した。

(2) 北海道網走地域の酪農家で飼養され、BRDC に罹患した 2~3 ヶ月齢のホルスタイン種子牛 13 頭を用いた (試験 2)。これらにも抗生物質製剤 (バイトリル®10% 注射液 (エランコジャパン株式会社、東京) 5 mg/kg、オキシテトラサイクリン注 NZ (日本全薬工業、福島) 10 mg/kg、セファゾリン注「KS」(共立製薬、東京) 5 mg/kg のいずれかを 1 回/日、3 日間連続筋肉内注射した。

2) 血液採取

公設酪農試験場で飼育されている呼吸器疾患症候群子牛からの血液は第 1~5 病日、第 8 病日に頸静脈から注射器で採取し、血清分離管および EDTA-2K 入り分離管に分注して、それぞれ Hp、白血球数測定に用いた。供試牛の白血球は採取後ただちに計測した。網走地域の酪農家で飼育されている同病罹患子牛からの頸静脈採血は第 1 病日 (n=13) および第 2 もしくは第 3 病日 (n=9) に行って、Hp および α -1 酸性糖タンパク (AGP) 測定に用いた。血清分離、凍結保存および融解方法は第 I 章および第 II 章と同じである。本節では、子牛血清中 AGP 値の基準値を伊藤の報告に準じた [34]。第 II 章と同じ公設酪農試験場で飼育されている 6~16 ヶ月齢の育成牛 41 頭の血清中 Hp 値と比較した。

3)血液検査

Hp 測定は第 I 章のヘモグロビン結合測定法(HBA)で行い、または白血球数計測は自動血球計算機(セルタック α MEK-6358、日本光電、東京)で行った。AGP は一元放射免疫拡散法(SRID 法、エコスチェック:メタボリックエコシステム研究所、宮城)を用いて測定した。

4)統計解析

試験1では Friedman の検定を用い、採血日の違いによる Hp と白血球数に有意差があるかどうかを調べた。また、試験2では第1病日および第2もしくは第3病日にも採血を行った9頭の Hp および AGP 値を Wilcoxon の符号付順位法で検定した。なお、有意水準は5%とした。

3 結果

1)公設酪農試験場の BRDC 罹患子牛の血清中 Hp 値と白血球数の比較(試験1)

供試牛8頭の第 1 病日の体温は 39.5℃以上であったが、5日間の治療で 39.5℃未満に低下した。発咳は3頭で消失し、残りの5頭でも著減が認められた。血清中 Hp 値は全頭の第 1 病日の中央値が 695 μ g/ml で、その後は漸減し第8病日の中央値が 78 μ g/ml で有意($P < 0.05$)に低下した(図 20)。白血球数は第1病日の中央値が 11,400 個/ μ l、第8病日は 13,000 個/ μ l で両日に有意差が認められなかった(図 21)。

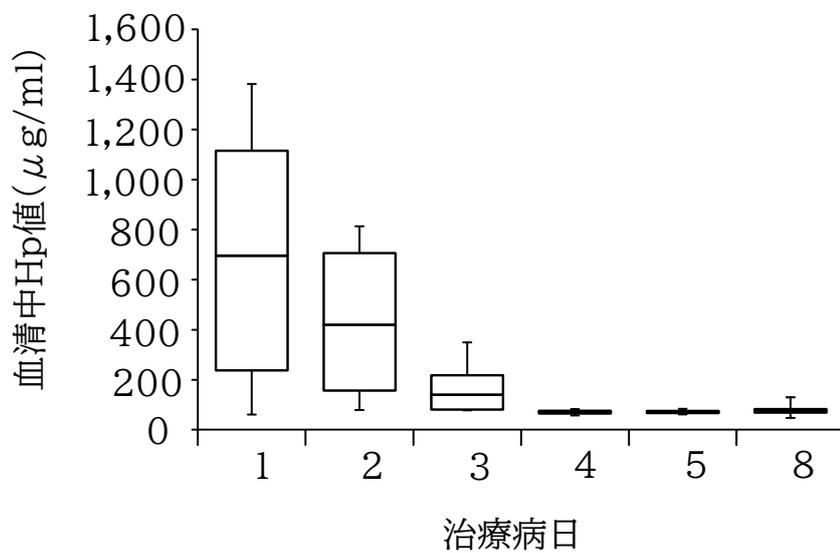


図20 公設酪農試験場で育成されている子牛の呼吸器病症候群8頭の血清中Hp値の推移

注1: 各病日の血清中Hp値は上から最大値、75%値、中央値、25%値、最小値を示した

注2: 第1病日と第8病日の中央値に有意差があった($P < 0.05$)

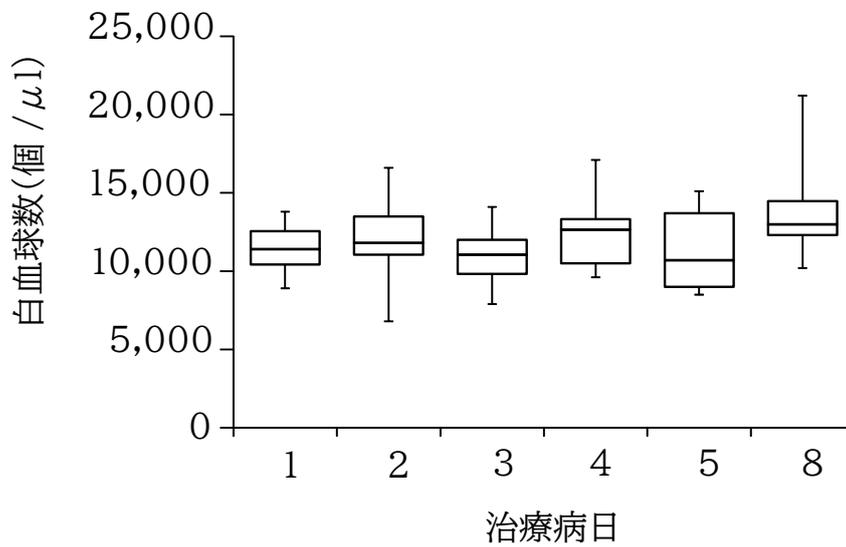


図21 公設酪農試験場で育成されている子牛の呼吸器
病症候群8頭の白血球数の推移

注1: 各病日の血清中Hp値は上から最大値、75%値、中央値、25%
値、最小値を示した

注2: 第1病日と第8病日の中央値に有意差はみられなかった (P=0.09)

2)道北地域酪農家のBRDC罹患子牛の血清中Hp値とAGPの比較(試験2)

供試子牛 13 頭は3日間治療され、いずれも発咳が消失し、体温は 39.5℃未満に低下、元気食欲が回復した。第 1 病日の血清中 Hp 中央値は 95 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、13 頭中5頭(38%)が第II章の健常育成牛の Hp 最大値(160 $\mu\text{g}/\text{ml}$)を上回った(図 22)。一方で、AGP の中央値は 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、13 頭中2/頭(15%)のみが伊藤の基準値(450 $\mu\text{g}/\text{ml}$)[34]を上回っていた。血清中 Hp 値が上昇していた5頭のうち、4頭は第2あるいは3病日まで低下した。また、第1病日の血清中 Hp 値および α -1 酸性糖タンパク(AGP)値は第2あるいは3病日との間に有意な差はみられなかった($P=0.14$ および 0.11)。

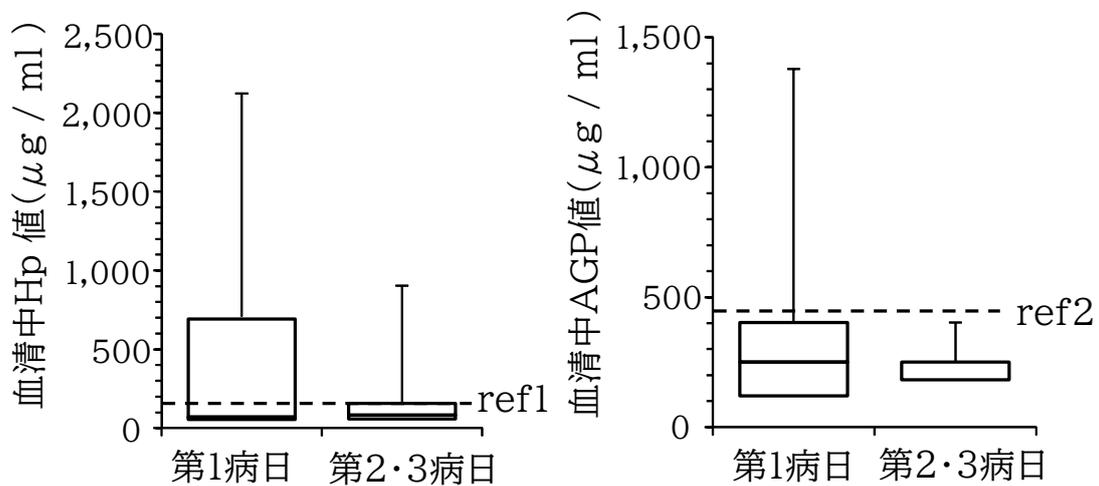


図22 一般酪農家で育成されている子牛の呼吸器病症候群13頭の血清中Hpおよび α -1酸性糖タンパク(AGP)値の推移

注1: 各病日の血清中Hp値は上から最大値、75%値、中央値、25%値、最小値を示す

注2: ref1は第Ⅱ章の育成牛41頭のHp値(最大値 $160\mu\text{g}/\text{ml}$)を示す

注3: ref2は伊藤(1996)の生後3週子牛のAGP値($450\mu\text{g}/\text{ml}$)を示す

4 考 察

本節では改良 HBA 法による呼吸器疾患症候群(BRDC)症例の Hp 測定の有用性について検討した。Humblet ら[32]および Idoate ら[35]は子牛の BRDC の診断に血清中 Hp 値測定を用いた。Hp、リポ多糖体(LPS)結合タンパク、トランスフェリンを測定し、Hp と LPS 結合タンパクが診断として有用であるとする報告もみられる[35]。また、Hp、血清アミロイド A(SAA)、各種の酸化ストレスマーカーを測定した結果、Hp がもっとも鋭敏なバイオマーカーであり、酸化ストレスマーカーとの組み合わせで診断精度が高まったことも報告されている[37]。

本節の試験1でも、BRDC 子牛 6 頭(75%)は第1病日の血清中 Hp 値が第Ⅱ章の健常子牛の最大値(160 $\mu\text{g}/\text{m}\ell$)以上の増加を示した。白血球数は第 1 病日の中央値が健常子牛の基準値(育成牛:9,900 \pm 2,290 [53]、成牛:4,900~12,000 [14])の範囲以内であった。これは炎症反応時期よりも遅く血液を採取したため、すでに白血球が病巣に遊走されていたと推察した。しかし、子牛 BRDC の血清中 Hp 値および白血球数計測値を比較するための統計学的な有意差検定には症例数、測定日数などが不足していたことから、今後、症例牛を増やし、病状の変化を示す有用な情報を得る必要がある。

試験2では、炎症マーカーである Hp と α -1 酸性糖タンパク(AGP)を比較したが、重度な BRDC の子牛は少なく、血清中 Hp 値と AGP 値の上昇を示す個体が少なかったと思われた。Lindholm-Perry ら[46]は呼吸器病罹患牛と無症候牛の白血球数に有意差はなく、好中球数のみ有意差があったと報告している。しかし、その成績では好中球数の平均値が成牛の基準範囲内であり、臨床現場で異常値と解釈する根拠になり得ないと思われる。また、血清中 AGP 値は牛の外傷性心外膜炎、関節炎、肺炎[66]および甚急性乳房炎[30]で上昇することが報告されている。本節の供試牛では、血清中 Hp 値と比べて AGP 値の上昇はわずか8%に過ぎなかったことから、AGP は子牛

BRDC の病態を明瞭に反映しないと考えられた。一部の BRDC 子牛においては治療前の血清中 Hp 値上昇を認めしたが、治療経過とともに低下傾向を示した。本節の調査では、血清中 Hp 値は白血球数や AGP と比べ、BRDC において上昇変動を示す個体が多く、Hp が第1病日において異常を検出する炎症指標である可能性が高いと言えた。そして、加療に反応して治療経過中に血清中 Hp 値が低下したことから、Hp は病状を的確に反映する主要な検査項目であることが示唆された。今後は症例を蓄積し、治療に反応しない BRDC において Hp が継続して高い値の推移をするかなどを詳細に調査する必要がある。

5 小 括

本節では、呼吸器疾患症候群(BRDC)に罹患した子牛の抗生物質製剤治療前後の血清中 Hp 値と他の炎症マーカー値を測定し、それらの推移が治療による改善を反映するかどうか検討した。まず、試験 1 では公設酪農試験場で BRDC ホルスタイン種子牛8頭の第1～8病日までの血清中 Hp 値の測定と白血球数を計測した。また、試験2では一般酪農家で飼養されているホルスタイン子牛 13 頭の第 1 病日と第2あるいは3病日の血清中 Hp と α -1 酸性糖タンパク(AGP)値を測定した。

その結果、試験 1 では、5 日間の加療により全頭で症状が改善し、第 1 病日の血清中 Hp の中央値は $695 \mu\text{g/ml}$ を示したが、第8病日には $78 \mu\text{g/ml}$ まで有意に低下した($P < 0.01$)。白血球数は第8病日まで大きな変化がみられなかった。また、試験2の血清中 Hp 値は第 1 病日で 13 頭中5頭(38%)のみがⅡ章の基準値($160 \mu\text{g/ml}$)を上回り、治癒した4頭の血清中 Hp 値が第2あるいは3病日までに低下した。一方、第1病日、2あるいは3病日に血清中 AGP 値が伊藤[34]の基準値より上昇していたのは2頭(15%)のみであった。したがって BRDC に罹患した子牛の血清中 Hp 値は白血球数や血清中 AGP 値より病状を的確に反映する炎症指標になり得ることが示された。

総 括

動物では感染、免疫応答、悪性腫瘍、外傷などによる組織傷害が発生すると、直ちに急性相反応が誘起される。急性相タンパク (APPs) は炎症刺激等に反応して肝臓で産生される物質の総称で、それぞれの機能や役割がさまざまである。人や犬猫では、急性炎症のバイオマーカーとして測定が実用化されている。牛の主要な APPs のひとつであるハプトグロビン (Hp) や血清アミロイド A (SAA) を生産現場、獣医診療で測定することは人や犬猫と同様に、病態把握や予後判定のために有用と思われる。そのためには、APPs 測定の検査が可能な施設、検査試薬、検査器材環境の整備を行い、そして測定値の解釈に習熟する必要がある。診療獣医師は診療の性質上、可及的速やかに APPs 測定の検査結果を得たいが、現状は管轄の家畜保健衛生所 (家保) に依頼、または臨床検査センターに外注する必要がある。また、診療 (臨床) に用いるための Hp と SAA 測定に使用する安価な試薬は市販されていない。一方、Hp 測定系には特異的抗体を用いず、ヘモグロビン結合アッセイ (HBA) 法が応用できる。HBA は牛血液のヘモグロビン (Hb) 由来の試薬による測定であり、特別な器材を必要とせず、全国の公設畜産試験場や家保で作製が可能である。

しかし、まだ牛 APPs を簡易迅速に測定できる専用の機器は開発されていない。人の SAA については生化学自動分析機があり、牛でもそれを用いて測定することは可能ではあるが、設置する場所と高価格がネックである。牛の Hp 測定は分光光度計を利用することが可能であり、またマイクロプレートリーダーを利用する測定法が報告されている。前者は試薬の調整に時間が必要であり、また試験管内で反応させること、後者は汎用の機器を利用して測定しているが、その測定時間が1時間以上必要であり、普及のためには簡易で迅速に測定できる方法が必要である。さらに、測定値の解釈については、牛の APPs 測定を臨床応用するために、参考となる基準値が必要であり、健常牛および確

定疾病・治療例のデータを蓄積して、臨床現場で採用できる参考値を作成しなければならない。また、疾病牛がどのような値を示し、加療によってどのような変化をするのかというデータの蓄積も必要であるが、詳細な研究報告はほとんど見当たらない。これらの課題を解決して、生産現場が直面しているさまざまな疾病の病勢および予後判定に採用するため、本研究は都道府県の試験場や家保などの公的施設に設置されているプレートリーダーを利用した測定法開発に注目し、急性相タンパクのひとつである Hp の改良測定法の確立を目的とした。

本研究では、第 I 章でヘモグロビン結合アッセイ(HBA)の簡易迅速な測定法の開発による牛の Hp 値測定、第 II 章で改良 HBA 法による牛の生産現場で採用可能な Hp 基準値の算出、そして第 III 章では牛の生産現場が直面している胎盤停滯、乳房炎、呼吸器疾患群の血清中 Hp 値測定を行った。

1. 第 I 章では、従来の HBA 法が Hp 測定に 1 時間以上を要することから、測定時間の短縮を目的として、緩衝液の種類と pH の検討を行った。開発に成功した改良 HBA 法では pH3.0~3.6 の 0.05M クエン酸緩衝液を用いることにより、血清中 Hp 測定時間を約 22 分に短縮することが可能となった。また、測定信頼性については再現性試験、添加回収試験、希釈直線性試験のいずれにおいても良好であることが確認され、一元放射免疫拡散法(SRID)と同等範囲の Hp 測定を迅速かつ多検体で行うことができる有用な測定法であることが示された。また、牛からの採血に用いる EDTA-2Na、ヘパリンがコーティングされている試験管の使用は問題ないが、NaF が含まれる血糖用採血管は HBA の測定値に影響があることが判明した。さらに、改良 HBA 法と SRID 法による血清中 Hp 値の相関係数(r)は 0.98 と高く、Bland-Altman 解析では平均値 \pm 1.96SD の範囲においてデータプロットの 97%が含まれ、改良 HBA 法は SRID 法と同等の測定値が得られた。再現性試験などの結果も良好であり、改良 HBA 法は牛の血清中 Hp 値測定に十分な精度と再現性を持つことを明らかにした。

2. 第 II 章では、第 I 章で開発した改良 HBA 法を用いて健常牛の血清中 Hp 値を調

査し、生産現場で参考となる基準値を算出した。その結果、健常牛 754 頭の分娩後6～16 週の Hp95%タイル値は $170\ \mu\text{g/ml}$ 以下であった。また、分娩後3日の Hp は平均値および中央値はともに $170\ \mu\text{g/ml}$ を超えたが、分娩後7日以降の平均値および中央値は $170\ \mu\text{g/ml}$ を下回った。この結果から、改良 HBA 法による分娩後6～16 週の健常牛の血清中 Hp 基準値は $170\ \mu\text{g/ml}$ であることが判明した。胎盤停滞や分娩直後に発症する急性乳房炎では、同時期の健常牛より有意に高い値 ($P<0.01$) を示し、これら病状の判定に利用できることが明らかにした。

3. 第三章では、牛の生産現場が直面している胎盤停滞、乳房炎、呼吸器疾患群 (BRDC) の血清中 Hp 値測定の有用性を検討した。

1) 牛の胎盤停滞と血清中 Hp 値の変動との関係を調べるため、分娩後の胎盤が正常に排出された(自然排出)群8頭、胎盤停滞発症後に発熱、元気食欲低下などの症状みられた(随伴症状あり)群 12 頭、随伴症状を認めなかった(随伴症状なし)群7頭の血清中 Hp 値を比較検討した。その結果、自然排出群と随伴症状なし群の Hp 中央値は分娩後1日から上昇し、2日目に最大の $525\sim 994\ \mu\text{g/ml}$ を示した。随伴症状あり群の中央値も1日目から上昇し、3日目に最大 $2,424\ \mu\text{g/ml}$ となった。3群はいずれも7日目まで高値を持続し、特に随伴症状あり群は2～10 日目まで $1,000\ \mu\text{g/ml}$ 以上で推移する個体もあり、自然排出群とは有意な差を認め ($P<0.05$)、胎盤停滞後に異常所見を示す牛は随伴症状なし牛や自然排出牛よりも大きい炎症があったと考えられる。血清中 Hp 値は胎盤停滞に起因する炎症に反応して顕著な上昇を示すことから、病態把握に必要な血液炎症指標のひとつとして有用であることが示された。

2) 乳房炎牛 26 頭の診断・治療開始日から8日間の血清中 Hp 値を測定して、治療効果の反映性を検討した。その結果、3～4日間抗生物質製剤が投与され、治療開始から8 日目の細菌培養検査で陽性判定の 12 頭中8頭(67%)の Hp 中央値は、健常牛濃度レベルより高く推移した(分娩後6～16 週の 95%タイル値: $170\ \mu\text{g/ml}$)。一方、薬効があり、8 日目に細菌陰性であった 14 頭中 12 頭(85%)の血中 Hp 濃度は健常牛

レベル以下であった。また、細菌陽性群の血清中 Hp 値は6日、7日および8日が陰性牛と比べて有意な高さで推移していることから ($P < 0.01$, $P < 0.05$, および $P < 0.05$)、治療抵抗性を反映していることが示された。分娩後の乳房炎発症牛では、抗生物質製剤投与後の血清中 Hp 値のモニタリングを行うことで薬効の有効性が予知できる可能性を示した。

3) 呼吸器疾患症候群 (BRDC) に罹患した子牛の抗生物質製剤治療前後の血清中 Hp 値と他の炎症マーカー値を測定し、それらの推移が治療による改善を反映するかどうかが検討した。その結果、5日間の加療で呼吸器症状が改善した子牛の第1病日の血清中 Hp の中央値は $695 \mu\text{g/ml}$ を示したが、第8病日には $78 \mu\text{g/ml}$ まで有意に低下した ($P < 0.01$)。白血球数は第8病日まで大きな変化がみられなかった。第1病日と第2あるいは3病日の血清中 α -1 酸性糖タンパク (AGP) 値の上昇は 15% のみであった。したがって、BRDC に罹患した子牛の血清中 Hp 値は白血球数や血清中 AGP 値より病状を的確に反映する炎症の指標であることを示した。

以上の結果から、Hp 値をプレートリーダーによって簡易迅速に測定する改良 HBA 法を確立できた。また、改良 HBA 法を用いて、分娩牛の週ごと、また育成牛の測定から、健常牛の Hp 基準値が作成された。これらの基準値は生産現場、獣医臨床において正常・異常の判断基準として利用できる。改良 HBA 法はプレートリーダーを有する施設において持続的に測定が可能になることから、全国の公設畜産試験場、家保、検査センター、家畜診療所などでの活用が可能になった。

英文要約(Summary)

One of the major acute phase proteins that are akin to C-reactive proteins and that can be measured in both animals and humans is blood haptoglobin (Hp). By adding a methemoglobin reagent, Hp as an inflammatory marker can be measured in veterinary laboratories using Hemoglobin Binding Assay (HBA). Moreover, its measurement is tedious and time-consuming as it requires several instruments and reagent solutions. Despite being regarded as one of the major acute phase proteins (Apps), Hp in bovine species has not yet been programmed to be utilized as one of the routine blood examination protocols in large animal veterinary practice. Hence, a study to develop a novel Hemoglobin Binding Assay was done and was accomplished in a simple and time-efficient manner. Subsequently, Hp changes as a prognosis marker of bovine diseases during treatment periods have been undertaken.

The accomplished results of this study are as follows:

1. HBA which is one of the methods for bovine Hp analysis using 0.5M citric acid buffer at pH3.0-3.6 was effectively developed with a shortened reaction time as compared to traditional HBA using conventional acetic acid buffers. Hp values determined by modified HBA showed highly significant correlations with those tests done by single radial immunodiffusion assay. The reproducibility (intra- and inter-assay) of the test was found to be

acceptable.

2. In healthy postpartum cows, the concentration of blood Hp was elevated until 3 days after parturition; eventually, it subsequently decreased. The mean and median values of 95% healthy cows (6-16 weeks after parturition, n = 754) were recorded at 110, 98, and 170 $\mu\text{g/ml}$ respectively. The median value in healthy heifers (n = 41) was 88 $\mu\text{g/ml}$ (mean 91 $\mu\text{g/ml}$). Therefore, the Hp values of healthy cows during each period of lactation including those of the heifers were revealed.
3. Hp levels of cows with retained fetal membrane and with morbid clinical signs were consistently elevated from 1-10 days (all $P < 0.01$) compared with the Hp levels of cows whose placenta were naturally expelled after calving. The Hp of test cattle for 3 days correlated with the 'days open' ($R_s = 0.47$). These findings have in effect validated the value of using Hp in assessing cows with retained fetal membranes.
4. The Hp of positive bacterial culture in milk on Day 8 after antibiotic treatment was significantly higher than the negative bacterial culture from Day 7 and 8 ($P < 0.01$ and < 0.01) in mastitis-infected cows. With this finding, it is suggested that bovine Hp measurements be considered as one of the alternative test items in detecting refractory mastitis that is showing resistance to antibiotic treatments.
5. The increase in measurement of blood Hp as observed in many calves with bovine respiratory disease complex may be considered

as a major test item that can accurately reflect its clinical condition. It might be regularly used as one of the inflammatory marker items that can be used to judge the pathophysiology of disease in calves. Conclusively, a novel HBA model has been established which can be assessed in microplates and that can measure the most suitable inflammatory markers for current production sites. The newly developed assay is simple as it can determine Hp concentration in 22 minutes without the use of sophisticated instruments. Blood Hp concentration by HBA is expected to be extensively used in determining the prognosis of infectious disease conditions, particularly in dairy cows.

謝 辞

先ず、本研究の遂行ならびに学位論文の作成にあたり、多くの皆様の支援ならびに指導いただき、心より感謝の意を表します。

研究の取りまとめに関し、主査として指導いただいた、酪農学園大学大学院酪農学研究科動物資源生産学地修教授、副査として本論文の構成および執筆に多大な指導をいただいた酪農学園大学 樋口豪紀教授、森好政晴准教授に感謝申し上げます。

本学位論文を構成する、急性相タンパク研究のスタートとなった犬CRP研究に関しては元東京大学獣医内科学研究室の辻本元先生、大野耕一先生、藤野泰人先生、瀬戸口明日香先生、中島亘先生および越野明子先生、鹿児島大学附属動物病院 高橋雅准教授、東京大学動物医療センターの皆様感謝いたします。本研究の測定系確立にご指導いただいた農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門宮本亨先生、元酪農学園大学横田博教授、ご協力いただいた地方独立行政法人北海道立総合研究機構農業研究本部畜産試験場小山毅様、同・酪農試験場松井義貴様、平井綱雄様(投稿時所属)および南橋昭様(同)、酪農学園大学 中田健教授、及川伸教授、遠藤大二教授、井上博紀特任准教授、杉浦智親講師に感謝いたします。また、供試材料にご協力いただいた酪農試験場職員の皆様、草刈直仁様、帯広畜産大学伊藤めぐみ助教、元(株)メタボリックエコシステム研究所鹿野信様、有限会社紋別家畜診療センター松崎勉先生および大分県波津久航先生に感謝いたします。

学術雑誌投稿にあたり、学術交流協定(2002年2月4日酪農学園大学獣医学部、2015年3月2日同全学)を契機に、小生の大学獣医学部卒業後にも関わらず終始懇切丁寧にご指導とご鞭撻をいただいた東フィリピン大学獣医学部 Gerry Amor

Camer 教授に感謝申し上げます。

本大学獣医学部卒業後、今日まで挫折を克服するためのご指導と激励、本論文執筆にご助力をいただいた元酪農学園大学澤向豊教授に心から感謝いたします。

最後に、終始研究生生活を支えていただいた愛妻中村洋子、実子豊乃と綾吾、そして両親に心より感謝申し上げます。

引用文献

1. Abdallah, A., Hewson, J., Francoz, D., Selim, H., Buczinski, S. 2016. Systematic review of the diagnostic accuracy of Haptoglobin, serum amyloid A, and fibrinogen versus clinical reference standards for the diagnosis of bovine respiratory disease. *J. Vet. Intern Med.* 30: 1356-1368.
2. Alayash, A. I. 2011. Haptoglobin: Old protein with new functions. *Clin. Chim. Acta.* 412: 493-498.
3. Angen, O., Thomsen, J., Larsen, L. E., Larsen, J., Kokotovic, B., Heegaard, P. M. H. and Enemark, J. M. D. 2009. Respiratory disease in calves: Microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Vet. Microbiol.* 137: 165-171.
4. Ariznabarreta, A., Gonzalo, C., Primitivo, F. S. 2002. Microbiological quality and somatic cell count of ewe milk with special reference to staphylococci. *J. Dairy Sci.* 85: 1370-1375.
5. Beagley, J. C., Whitman, K. J., Baptiste, K. E., Scherzer, J. 2010. Physiology and treatment of retained fetal membranes in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 24: 261-268.
6. Bland, J. M. and Altman, D. G. 1995. Comparing methods of measurement: why plotting difference against standard method is misleading, *Lancet.* 346: 1085-1087.
7. Burfeind, O., Sannmann, I., Voigtsberger, R. and Heuwieser, W. 2014. 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.* 149: 145-151.
8. Carter, J. N., Meredith, G. L., Montelongo, M., Gill, D. R., Krehbiel, C. R., Payton, M. E. and Confer, A. W. 2002. Relationship of vitamin E supplementation and antimicrobial treatment with acute-phase acquired respiratory tract disease. *Am. J. Vet. Res.* 63: 1111-1117.
 9. Cecilian, F., Ceron, J. J., Eckersall, P. D., Sauerwein, H. 2012. Acute phase proteins in ruminants. *J. Proteomics.* 75: 4207-4231.
 10. Ceron, J. J., Eckersall, P. D., Martinez-Subiela, S. 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: Current knowledge and future perspectives. *Vet. Clin. Path.* 34: 85-99.
 11. Chan, J. P.W., Chu, C. C., Fung, H. P., Chuang, S. Te, Lin, Y. C., Chu, R. M., Lee, S. L. 2004. Serum haptoglobin concentration in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 66: 43-46.
 12. Christensen, B. W., McNabb, B. R., Troedsson, M. H. T, and Woodward, E. M. 2015. Uterine abnormalities-retained fetal membranes. pp.1324-1326. *In: Large Animal Internal Medicine.* 5th ed. (Smith, B.P. ed.), Elsevier Mosby, Missouri.
 13. Conner, J. G., Eckersall, P. D., Wiseman, A., Aitchison, T. C., Douglas TA. 1988. Bovine acute phase response following turpentine injection. *Res. Vet. Sci.* 44: 82-88. PMID: 2453907.
 14. Divers, T. J. and Peek, S. F. 2018. The clinical examination. pp.2-16. *In: Rebhun's diseases of dairy cattle*, 3rd ed. (Peek, S. F. and Divers, T. J. eds.). Saunders, Missouri.

15. Drillich, M., Beetz, O., Pfützner, A., Sabin, M., Sabin, H. J., Kutzer, P., Nattermann, H., Heuwieser, W. 2001. Evaluation of a systemic antibiotic treatment of toxic puerperal metritis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 84: 2010-2017. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(01\)74644-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(01)74644-9)
16. Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., LeBlanc, S. J. 2010. Risk factors for postpartum uterine diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93: 5764-5771.
17. Ebersole, J. L. and Cappelli, D. 2000. Acute-phase reactants in infections and inflammatory diseases. *Periodontology* 23: 19-49.
18. Eckersall P. D. 1988. Acute phase reactants in diseases of dog and cattle, pp. 225-230. *In: Animal clinical biochemistry: the future* (Blackmore D. J, et al. eds), Cambridge University Press, Cambridge.
19. Eckersall, P. D. and Bell, R. 2010. Acute phase proteins: biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet. J.* 185: 23-27.
20. Eckersall, P. D. 1995. Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. *Comp. Haematol. Int.* 5: 93-97.
21. Eiler, H. and Fecteau, K. A., 2006. Chapter 45 Retained placenta. pp. 345-354. *In: Current Therapy in large animal theriogenology*, 2nd ed. (Youngquist, R. S. and Threlfall, W. R ed), Saunders Elsevier, Missouri.
22. Fourichon, C., Seegers, H., Malher, X. 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: A meta-analysis.

Theriogenology 53: 1729-1759.

23. Gilbert, R. O. 2018. Acute puerperal metritis. pp.477-480. *In*: Rebhun's diseases of dairy cattle, 3rd ed. (Peek, S. F. and Divers, T. J. eds.), Elsevier, Missouri.
24. Gilbert, R. O. 2018. Retained Fetal Membranes. pp.475-477. *In*: Rebhun's Diseases of Dairy Cattle, 3rd ed. (Peek, S. F. and Divers, T. J. eds.), Elsevier, Missouri.
25. Gröhn, Y. T. and Rajala-Schultz, P. J. 2000. Epidemiology of reproductive performance in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 60-61: 605-614. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(00\)00085-3](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(00)00085-3)
26. Guzelbektes, H., Sen, I., Ok, M., Constable, P. D., Boydak, M., Coskun, A. 2010. Serum amyloid a and haptoglobin concentrations and liver fat percentage in lactating dairy cows with abomasal displacement. *J. Vet. Intern. Med.* 24: 213-219.
27. Hagnestam-Nielsen, C., Emanuelson, U., Berglund, B., Strandberg, E. 2009. Relationship between somatic cell count and milk yield in different stages of lactation. *J. Dairy Sci.* 92: 3124-3133.
28. 浜名克己. 2001. 乳房炎., pp.408-419, 獣医繁殖学 第2版(森 純一, 金川弘司, 浜名克己 編), 文永堂出版, 東京.
29. Hirvonen, J., Eklund, K., Teppo, A.M., Huszenicza, G., Kulcsar, M., Saloniemi, H., Pyörälä, S. 1999. Acute phase response in dairy cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *Acta. Vet. Scand.* 40:35-46.
30. 久枝啓一, 今村智子, 園部隆久, 杉山美恵子, 井原晴喜, 那須正信, 永

- 幡 肇. 2011. 大腸菌群による甚急性乳房炎の診断に関する一考察. *日家畜臨
感染症研究会誌* 6:91-106.
31. 細萱茂実. 2005. 第1章基礎編、B 基準値・臨床判断値. pp.26-27. 臨床検
査法提要. 改正第32版 (金井正光監修). 金原出版株式会社, 東京.
32. Humblet, M. F., Coghe, J., Lekeux, P., Godeau, J. M. 2004. Acute
phase proteins assessment for an early selection of treatment in
growing calves suffering from bronchopneumonia under field
conditions. *Res. Vet. Sci.* 77: 41-47.
33. Huzzey, J. M., Duffield, T. F., LeBlanc, S. J., Veira, D. M., Weary,
D. M., Von Keyserlingk, M. A. G. 2009. Short communication:
Haptoglobin as an early indicator of metritis. *J. Dairy Sci.* 92:
621-625.
34. 伊藤 博 1996. ウシ血清 α -1 酸性糖蛋白の性状とその臨床測定意義, *東北
家畜臨研会誌*. 19:44-54.
35. Idoate, I., Vander, L. B., Schultz, L., Heller, M. 2015. Veterinary
immunology and immunopathology acute phase proteins in
naturally occurring respiratory disease of feedlot cattle. *Vet.
Immunol. Immunopathol.* 163: 221-226.
36. Jain, S., Gautam, V., Naseem, S. 2011. Acute-phase proteins: As
diagnostic tool. *J. Pharm. BioAllied Sci.* 3: 118-127.
37. Joshi, V., Gupta, V. K., Bhanuprakash, A. G., Mandal, R. S. K.,
Dimri, U., Ajith, Y. 2018. Haptoglobin and serum amyloid A as
putative biomarker candidates of naturally occurring bovine
respiratory disease in dairy calves. *Microb. Pathog.* 116: 33-37.
38. 金子一幸, 内田直也, 川上静夫. 2004. 乳牛における乳汁中アミロイド A タ

- ンパク による潜在性乳房炎の診断. *日獣会誌*. 57:515-518.
39. Katoh, N. and Nakagawa, H. 1999. Detection of haptoglobin in the high-density lipoprotein and the very high-density lipoprotein fractions from sera of calves with experimental pneumonia and cows with naturally occurring fatty liver. *J. Vet. Med. Sci.* 61: 119-124.
40. 河合 忠. 2001. 序論 検査値を正しく判断するために. pp.1-8. 異常値の出るメカニズム 第4版(河合忠, 尾形稔, 伊藤喜久 編), 医学書院, 東京.
41. 厚生労働省ホームページ内 医科診療報酬点数表(PDF148 ページ)
<https://www.mhlw.go.jp/file/05-Shingikai-12404000-Hokenkyoku-Iryouka/0000112223.pdf>[アクセス日:2021年12月26日]
42. Kushner, I and Mackiewicz, A. 1993. The acute phase response: an overview.pp.3-19 *In: Acute phase proteins: Molecular biology, biochemistry and clinical applications.* (Mackiewicz, A., Kushner, I and Baumann, H. eds.), CRC Press, London.
43. Laven, R. A. and Peters, A. R. 1996. Bovine retained placenta: Aetiology, pathogenesis and economic loss. *Vet. Rec.* 139: 465-471. <https://doi.org/10.1136/vr.139.19.465>
44. LeBlanc, S. J. 2008. Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance: A review. *Vet. J.* 176: 102-114.
45. LeBlanc, S. J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Bateman, K. G., Keefe, G. P., Walton, J. S., Johnson, W. H. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85: 2223-2236.

46. Lindholm-Perry, A. K., Kuehn, L. A., McDanel, T. G., Miles, J. R., Workman, A. M., Chitko-Mckown, C. G., Keele, J. W. 2018. Complete blood count data and leukocyte expression of cytokine genes and cytokine receptor genes associated with bovine respiratory disease in calves. *BMC Res Notes*. 11: 1-6.
47. Makimura, S. and Suzuki, N. 1982. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44: 15-21.
48. Miyazaki, T., Kaku, S., Kawai, K. and Okada, K. 2009. Effects of sample storage temperature and inversion-mixing of sample on colony counts of specific bacteria isolated in bovine mastitis and an examination of inoculation tools. *Jpn. J. Vet. Clin.* 32: 109-114
49. Morimatsu, M., Sarikaputi, M., Syuto, B., Saito, M., Yamamoto, S., Naiki, M. 1992. Bovine haptoglobin: Single radial immunodiffusion assay of its polymeric forms and dramatic rise in acute-phase sera. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 33: 365-372.
50. Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. *Vet. J.* 168: 28-40.
51. Nakagawa, H., Yamamoto, O., Oikawa, S., Higuchi, H., Watanabe, A., Kato, N. 1997. Detection of serum haptoglobin by enzyme-linked immunosorbent assay in cows with fatty liver. *Res. Vet. Sci.* 62: 137-141.
52. Nakamura, M., Takahashi, M., Ohno, K., Koshino, A., Nakashima, K., Setoguchi, A., Fujino, Y., Tsujimoto, H. 2008. C-reactive

- protein concentration in dogs with various diseases. *J. Vet. Med. Sci.* 70: 127-131.
53. 農林水産省経営局. 2005. 第1章 本編 表 1-2-6 血液検査の正常値. *16 経営第 8829 号 家畜共済における臨床病理検査要領*. p37. 農林水産省経営局, 東京.
54. Orro, T., Pohjanvirta, T., Rikula, U., Huovilainen, A., Alasuutari, S., Sihvonen, L., Pelkonen, S., Soveri, T. 2011. Acute phase protein changes in calves during an outbreak of respiratory disease caused by bovine respiratory syncytial virus. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34: 23-29.
55. Otsuka, M., Sugiyama, M., Ito, T., Tsukano, K., Oikawa, S., Suzuki, K. 2021. Diagnostic utility of measuring serum amyloid a with a latex agglutination turbidimetric immunoassay in bovine mastitis: Comparison with haptoglobin and alpha 1 acid glycoprotein. *J. Vet. Med. Sci.* 83: 329-332.
56. Paltrinieri, S. 2008. The feline acute phase reaction. *Vet. J.* 177: 26-35.
57. Petersen, H. H., Nielsen, J. P. and Heegaard, P. M. 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.* 35:163-187. doi: 10.1051/vetres:2004002.
58. Roberts, S.L, Hughes, H.D., Burdick-Sanchez, N.C., Carroll J.A., Powell J.G., Hubbell, D.S., Richeson, J.T. 2015. Effect of surgical castration with or without oral meloxicam on the acute inflammatory response in yearling beef bulls. *J. Anim. Sci.*

- 93:4123-4131. doi: 10.2527/jas.2015-9160. PMID: 26440192.
59. Safi, S., Khoshvaghti, A., Jafarzadeh, S. R., Bolourchi, M., Nowrouzian, I. 2009. Acute phase proteins in the diagnosis of bovine subclinical mastitis. *Vet. Clin. Path.* 38: 471-476.
60. 澤向 豊, 中尾敏彦. 2001 胎盤停滯. pp. 377-380. 獣医繁殖学 第 2 版 (森 純一, 金川弘司, 浜名克己 編). 文永堂出版, 東京.
61. 社団法人畜産技術協会. 1995. 農業研究・教育のための家畜の取り扱いと使用法に関する指針: Guide for the care and use of agricultural animals in agricultural research and teaching, 社団法人畜産技術協会, 東京.
62. Skinner, J. G., Brown, R. A., Roberts, L. 1991. Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions. *Vet Rec.* 128:147-149. doi: 10.1136/vr.128.7.147. PMID: 1903006.
63. Smith, B. I., Kauffold, J., Sherman, L. 2010. Serum haptoglobin concentrations in dairy cattle with lameness due to claw disorders. *Vet. J.* 186: 162-165.
64. Smith, B. P. 2014. Clinical chemistry: Normal range for large animals. p. BM7. *In: Large animal internal medicine 5th edition*, Elsevier Mosby, Missouri.
65. 竹内恵 2005. シアンメトヘモグロビン法. p.273. 臨床検査法提要, 改正第 32 版(金井正光監修), 金原出版株式会社, 東京.
66. Tamura, K., Yatsu, T., Itoh, H., Motoi, Y. 1989. Isolation, characterization, and quantitative measurement of serum alpha 1-acid glycoprotein in cattle. *Nihon Juigaku Zasshi.* 51: 987-994. doi: 10.1292/jvms1939.51.987.

67. Ting, S.T., Earley, B., Crowe, M.A. 2003. Effect of repeated ketoprofen administration during surgical castration of bulls on cortisol, immunological function, feed intake, growth, and behavior. *J Anim Sci.* 81:1253-1264. doi: 10.2527/2003.8151253x.
68. Uchida, E., Katoh, N., Takahashi, K. 1993. Appearance of haptoglobin in serum from cows at parturition. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 893-894.
69. Viitanen, S. J., Lappalainen, A. K., Christensen, M. B., Sankari, S. Rajamäki, M. M. 2017. The utility of acute-phase proteins in the assessment of treatment response in dogs with bacterial pneumonia. *J. Vet. Intern. Med.* 31: 124-133.
70. Viitanen, S. J., Laurila, H. P., Lilja-Maula, L. I., Melamies, M. A., Rantala, M., Rajamäki, M. M. 2014. Serum C-reactive protein as a diagnostic biomarker in dogs with bacterial respiratory diseases. *J. Vet. Intern. Med.* 28: 84-91.
71. Waks, M. and Alfsen, A. 1966. The hemoglobin binding and activation by haptoglobins: spectrophotometric and potentiometric measurements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23: 62-67. doi: 10.1016/0006-291x (66)90269-5.
72. Whicher, J. T. and Westacott, C. I. 1992. The acute phase response. pp.243-272. *In: Biochemistry of Inflammation.* (Whicher, J.T., Evans, S.W., eds.), Kluwer Academic, London.
73. Williams, E. J., Fischer, D. P., Pfeiffer, D. U., England, G. C. W., Noakes, D. E., Dobson, H., Sheldon, I. M. 2005. Clinical

evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* 63: 102-117.

74. Yamamoto, S., Shida, T., Okimura, T., Otabe, K., Honda, M., Ashida, Y., Furukawa, E., Sarikaputi, M., Naiki, M. 1994. Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slide reversed passive latex agglutination test. *Vet, Q.* 16: 74-77.