

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 中村 正明

学位の種類 博士（農学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第4項に該当

学位論文の題目 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

審査委員

主査 教授 堂地 修（動物資源生産学）

副査 教授 樋口 豪紀（獣医衛生学）

副査 准教授 森好 政晴（動物資源生産学）

副査 澤向 豊

論文要旨

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

中村 正明

人および家畜の血液検査項目には物理的・化学的刺激や病性微生物による急性炎症を反映する炎症マーカーとして、急性相タンパク (APPs) がある。そのうち、人や犬では変動幅が大きく、異常を検知しやすい C 反応性タンパク (CRP) が主要な APPs として、臨床分野で測定されている。一方で、牛の主要な APPs はいまだ臨床応用可能な測定法が確立されていない。牛の APPs の一つであるハプトグロビン (Hp) の特性として、ヘモグロビン (Hb) と結合することによって、酸性緩衝液条件下でペルオキシダーゼ様活性を維持する性質があると報告されている。この Hp-Hb 結合体の酵素活性を利用することによって、通常の測定系に必要な特異的抗体を用いなくとも、Hp の測定系を確立することが可能である。この酵素活性を利用した測定法はヘモグロビン結合アッセイ (HBA) として報告されている。HBA は様々な施設で、Hp 測定系として確立することが期待できる方法であるが、残念ながらいまだに生産現場では活用されていない。現今、牛の臨床現場では生産性に甚大な被害をもたらす感染による急性炎症の病勢を即座に判定する検査方法の開発が求められてい

る。本研究では、HBAを生産現場でより効率的に役立たせるため、プレートリーダーを利用した迅速なHBAを開発し、健常牛および疾病牛の血清中Hp濃度(Hp値)を調査した。

第I章では、HBAの簡易・迅速化改良のため、酸性緩衝液による遊離Hbの不活性化条件の検討を行った。その結果、0.05Mクエン酸緩衝液pH3.2~3.6の条件を設定することで短時間の処理に成功し、不活性化は約10分に短縮できた。そして、全体の操作時間はChanらの75分に対し、22分程度と大幅に短縮できた。また、改良HBAとSRIDの相関係数(r)は0.98と高く、Bland-Altman解析では平均値±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はSRIDと同等の測定値が得られることを証明した。再現性試験、添加回収試験、直線性試験の結果はいずれも良好であり、改良HBAは牛の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。

第II章では、健常牛のHp値を測定し、生産現場で採用可能な基準値を算出した。その結果、健常牛の分娩後6~16週のHp95%タイル値は $170\mu\text{g/ml}$ であった。分娩後3日のHp値は $170\mu\text{g/ml}$ を超えるが、分娩後7日以降の平均値および中央値は低下した。また、分娩直後に起こる胎盤停滞や急性乳房炎では、同時期の健常牛より有意な高値を示し、病勢判定に利用できる可能性が明らかになった。

第Ⅲ章では、乳牛の生産・育成に悪影響する3疾病のHp値測定の有用性について検討した。第1節では、分娩後に元気食欲が低下した胎盤停滞牛のHp値の推移を調査した。その結果、Hp値は分娩後10日までは高く推移した。臨床所見の一つである膣粘液は多くの症例で10日以降もスコア3（膿汁粘液排出）が持続していた。本来、Hpは牛の胎盤停滞後に継発する産褥性子宮炎の予知因子ではなく、その後に進行する病態を反映するマーカーのひとつである可能性が明らかになった。また、発症後の繁殖成績を推定するマーカーのひとつである可能性が明らかになった。第2節では、乳房炎牛の診断・治療開始日から8日間のHp値を測定して、その推移から治療効果の反映性を検討した。その結果、3～4日間の抗生物質製剤投与に効果なく、治療開始から8日目の乳汁中細菌培養検査で陽性と判定された罹患牛のHp中央値は、既報の健康牛濃度レベルより高く推移していた。一方、8日目の細菌検査で陰性を示し、投与製剤の効果が認められた症例のHp値は健康牛レベル以下であった。したがって、Hpの推移は抗生物質製剤投与による治療効果を把握する有用なマーカーの一つである可能性が明らかになった。第3節では、子牛の呼吸器病症候群（BRDC）の抗生物質製剤治療前後におけるHp値と白血球数（WBC）、 α -1酸性糖タンパク（AGP）値などの炎症マーカーとの推移を比較し、治療効果がこれらの測定値に反映されるかどうかを検討した。その結果、公設酪農試験場

で飼育されているホルスタイン種子牛 8 頭の第 1 ～ 8 病日までの Hp 値は WBC と比べて顕著に高く推移し、また一般酪農家のホルスタイン子牛の第 1 病日と第 2 ・ 3 病日の Hp 値も著しく高く、AGP 値よりも明瞭に病勢を反映し、罹患子牛の異常を検知する可能性が明らかになった。

本研究により、プレートリーダーを用いて改良 HBA による迅速・簡便な Hp 測定が臨床施設で可能となり、生産現場における病勢の判断精度の向上も期待される。

論文審査の要旨および結果

1. 論文評価点数

評価項目	主査 (堂地)	副査 (樋口)	副査 (森好)	副査 (澤向)
テーマのたて方	5	5	5	5
研究の背景	5	5	5	5
研究の方法	5	5	5	5
研究の結果	5	5	5	5
考察と結論	5	5	5	5
参考論文	5	5	5	5
合計	30	30	30	30

・各評価項目を5点、3点、1点で評価 ・全ての審査委員が20点以上(30点満点)をつけたことをもって、本審査終了

2. 論文審査の要旨および結果

論文審査は、論文評価点数項目にしたがって審査を実施し、すべての項目において高い評価を得た。論文の概要は以下のとおりである。

人および家畜の血液検査項目には、物理的・化学的刺激や病原微生物による急性疾患を反映する炎症マーカーとして、急性相タンパク (APPs) がある。そのうち、人や犬では変動幅が大きく、異常を検知しやすいC反応性タンパク (CRP) が主要な APPs として臨床分野で測定されている。一方で、牛の主要な APPs はいまだ臨床で応用可能な測定法が確立されていない。牛の APPs の一つであるハプトグロビン (Hp) の特性として、ヘモグロビン (Hb) と結合することによって、酸性緩衝液条件下でもペルオキシダーゼ様活性を維持する性質を有することが報告されている。この Hp-Hb 結合体の酵素活性を利用することによって、通常の測定系に必要な特異的抗体を用いなくても、Hp の測定系を確立することが可能である。この酵素活性を利用した測定法はヘモグロビン結合アッセイ (HBA) として報告されている。HBA は様々な施設で、いつでも Hp 測定系を確立できるもののいまだに生産現場では活用されていない。現在、牛の臨床現場では生産性に甚大な被害をもたらす感染による急性炎症の病勢を即座に判定する検査方法が求められている。本研究では、HBA を生産現場でより効率的に活用するため、プレートリーダーを利用した迅速な HBA 法を開発し、健常牛および疾病牛の血清中 Hp 濃度 (Hp 値) を調査した。

第 I 章では、HBA の簡易・迅速化改良のため、酸性緩衝液による遊離 Hb の不活性化条件の検討を行った。その結果、0.05M クエン酸緩衝液を pH3.2~3.6 にすることで短時間処理

が可能になった。さらに、全体の操作時間を既報の75分から約22分に大幅短縮を実現した。また、再現性試験、添加回収試験、直線性試験の結果はいずれも良好であり、改良HBAは牛の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。

第II章では、健常牛のHp値を改良HBA法で測定し、生産現場で応用可能な基準値を算出し、分娩直後に起こる胎盤停滞や急性乳房炎では、同時期の健常牛より有意な高値を示し、病勢判定に利用できる可能性が明らかにした。

第III章では、乳牛の生産・育成に悪影響を及ぼす3疾病のHp値測定の有用性について検討した。第1節では、分娩後に元気食欲が低下した胎盤停滞牛のHp値の推移を調査した。その結果、Hpは牛の胎盤停滞後に継発する産褥性子宮炎の予知因子ではなく、その後に進行する病態を反映するマーカーのひとつである可能性が明らかになった。また、発症後の繁殖成績を推定するマーカーのひとつである可能性が明らかになった。第2節では、乳房炎牛の診断・治療開始日から8日間のHp値を測定して、その推移から治療効果の反映性を検討した。その結果、Hpの推移は抗生物質製剤投与による治療効果を把握する有用なマーカーの一つである可能性が明らかになった。第3節では、子牛の呼吸器病症候群の抗生物質製剤治療前後におけるHp値と白血球数、 α -1酸性糖タンパク値などの炎症マーカーとの推移を比較し、治療効果がこれらの測定値に反映されるかどうかを検討した。その結果、罹患子牛の異常を検知する可能性が明らかになった。

本研究により、プレートリーダーを用いて改良HBAによる迅速・簡便なHp測定が臨床施設で可能となり、生産現場における病勢の判断精度の向上も期待される。

3. 本研究の評価

本研究において、プレートリーダーを利用した測定法の迅速化に成功した。また、信頼性の高い測定系を確立し、健常牛のHp基準値を明らかにした。さらに、胎盤停滞牛の分娩直後～10日目のHp値上昇が子宮の炎症程度を反映する一つのマーカーであること、急性乳房炎牛の抗生物質製剤治療における病勢判定の検査に有用であること、子牛の呼吸器病症候群のHp値の動態を明らかにした。この一連の研究は、牛の生産現場における疾病の診断を簡易・迅速化することに貢献し、生産性の向上並びに臨床獣医療の進展に貢献するとともに、畜産学および獣医学の発展に寄与する研究であると判断される。

4. 学位論文の一部を公表した論文

1) 第I章および第II章：原著（筆頭）

ヘモグロビン結合アッセイの改良及び乳牛の分娩後における牛ハプトグロビン濃度推移。

日獣会誌 65 : 682~688. 2012.

2) 第III章1節：原著（筆頭）

Postpartum clinicopathological and reproductive performance assessment and haptoglobin measurement of dairy cattle with retained fetal membrane. Philipp Agric Scientist 103(3):235-244. 2020.

3) 第Ⅲ章 2 節:単報 (筆頭)

Blood haptoglobin measurement by Hemoglobin Binding Assay in cows with refractory mastitis. 家畜衛生学雑誌 47(3):105-110. 2021.

4) 第Ⅲ章 3 節:単報 (筆頭)

呼吸器病症候群 (BRDC) の子牛における加療前後の血中ハプトグロビン濃度測定. 産業動物臨床医学雑誌 12(4):188-191. 2022.

5) その他 (学位論文の内容は含まれない)

参考論文 2 編

以上のことから、審査員一同は、中村正明氏が提出した本論文が博士 (農学) に値するものと判断した。

5. 最終試験の結果

審査委員 4 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2023 年 2 月 27 日

審査委員

主査	教授	堂地	修
副査	教授	樋口	豪紀
副査	准教授	森好	政晴
副査		澤向	豊