

病態生理学に基づいた下痢症子牛の
栄養輸液療法に関する研究

塚野 健志

病態生理学に基づいた下痢症子牛の
栄養輸液療法に関する研究

酪農学園大学大学院
獣医学研究科
獣医学専攻博士課程

塚野 健志

生産動物外科学

指導教員 教授 鈴木 一由

2018年度

目 次

第1章	緒言	・・・1
第2章	下痢症子牛の死亡率を高めるリスク因子の解析	・・・6
	2.1 材料および方法	
	2.2 統計解析	
	2.3 結果	
	2.4 考察	
	2.5 小括	
第3章	子牛の主要疾病と血液中遊離アミノ酸動態	・・・16
	3.1 下痢症子牛の血液中遊離アミノ酸動態	・・・18
	3.1.1 材料および方法	
	3.1.2 統計解析	
	3.1.3 結果	
	3.1.4 考察	
	3.2 <i>Mycoplasma</i> 性気管支肺炎子牛の血液中遊離アミノ酸動態	・・・23
	3.2.1 材料および方法	
	3.2.2 統計解析	
	3.2.3 結果	
	3.2.4 考察	

3.3 小括

第4章	病態生理学に基づいた下痢症子牛の栄養輸液療法	・・・35
4.1	軽度脱水子牛における経口補液剤の処方検討	・・・38
4.1.1	材料および方法	
4.1.2	統計解析	
4.1.3	結果	
4.1.4	考察	
4.2	重度脱水子牛における5%ブドウ糖加酢酸リンゲル液の異化予防効果	・・・43
4.2.1	材料および方法	
4.2.2	統計解析	
4.2.3	結果	
4.2.4	考察	
4.3	<i>Cryptosporidium</i> 下痢症子牛における末梢静脈内栄養輸液の有用性	・・・49
4.3.1	材料および方法	
4.3.2	統計解析	
4.3.3	結果	
4.3.4	考察	
4.4	小括	

第5章	総括	・・・68
	謝辞	・・・73
	利益相反	・・・75
	引用文献	・・・76
	語略一覧	・・・88
	成績の公表	・・・90
	英文要旨	・・・91

第 1 章

緒 言

新生子牛における下痢症は依然として死亡率が高く、酪農および畜産業に与える被害は甚大である[69]。下痢症では病原体や発生機序にかかわらず糞便中からの水分および電解質喪失量が増加する[72]。さらに下痢症は腸管において水分や電解質だけでなく、炭水化物、タンパク質、脂質の吸収不良を引き起こす[9]。その結果、下痢症子牛は脱水症、電解質異常、酸塩基平衡異常に加えて負のエネルギーバランス（NEB：Negative Energy Balance）に陥る。したがって、輸液療法は下痢症子牛の死亡率を低下させるための重要な支持療法と考えられている。

しかし、下痢症子牛に関する病態生理学[23]、脱水症の改善および酸塩基平衡異常の補正に関する輸液療法[9, 72]の進歩が認められているにも関わらず、この数十年にわたり下痢症子牛の死亡率は変わっていない[47, 57, 81]。このことは下痢症子牛の治療において今日一般的に行われている輸液療法、抗菌薬療法などの支持療法だけでなく次の手段を模索する必要性を示唆している。例えば、ヒトや伴侶動物医療において、経口および経静脈内輸液療法の目的は脱水症の改善、酸塩基平衡異常の補正はもちろんのことエネルギーの供給[9]も含まれる。しかし、生産動物医療では経静脈内輸液療法が脱水子牛に対して行われている一方で経静脈内栄養輸液療法については十分に普及しているとは言い難い。

経静脈内栄養輸液療法はヒト医療において1960年代以降広く普及し、消化器に重大な問題を抱える患者の治療に大きな進歩をもたらした[13]。一般的にヒト医療で用いられている経静脈内栄養輸液剤は10%以上のブドウ糖、各種アミノ酸および微量元素が処方されている。このうち、アミノ酸の経静脈内投与についてはヒトの周術期中における代謝性変化の抑制[27, 37]、ラット[32]およびウサギ[21]において腸粘膜の再生に有効であることが報告されている。ヒトおよび伴侶動物医療において輸液療法の目的は前述の通り、脱水症の改善、酸塩基平衡異常の補正に加えてエネルギーの供給であるが、牛医療においていわゆる「エネルギーの供給」はブドウ糖のみに頼っており[9]、ヒト医療における「経静脈内栄養輸液療法」というコンセプトは残念ながら普及していない。したがって、下痢症子牛の救命および治癒率をさらに向上させるためには、ヒトおよび伴侶動物医療で広く取り入れられている「経静脈内栄養輸液療法」

およびその前段階である「経口栄養補液療法」を臨床現場に導入することが求められる。

ヒト医療における経静脈内栄養輸液療法のコンセプトとして、中心静脈内輸液 (TPN: Total Parenteral Nutrition) と末梢静脈内輸液 (PPN: Peripheral Parenteral Nutrition) に大別される。TPN は「中心静脈」と呼称される心臓に近い大静脈にカテーテル先端を留置して高濃度の糖、アミノ酸、脂質、微量元素、電解質およびビタミン剤を 24 時間かけて投与することである。TPN を施術することはその患者の栄養を完全に補填することであり、高カロリー輸液 (IVH: Intravenous Hyperalimentation) ともいう。TPN は必要熱量が経口摂取できずにタンパク質異化が常在化している患者に対して、完全無菌状態でカテーテルを鎖骨下静脈から中心静脈に留置して 24 時間の完全看護下で実施する。したがって、TPN を生産動物医療の現場で応用することは経済的な理由だけでなく集中治療室 (ICU: Intensive Care Unit) を設けることのできない診療環境を考えれば限りなく難しい。一方、PPN は TPN ほどに特殊な操作を必要とせず末梢静脈から投与できる最大量のブドウ糖、アミノ酸、脂質を短期間で補給する方法である。PPN は経口摂取不十分な患者に対して行われる必要熱量の一部を静脈内輸液するものである。そのため、PPN は ICU のような厳密に管理された環境を必ずしも必要としない。子牛の経静脈内栄養輸液療法として、必要最低限の栄養素を子牛の頸静脈を介して補填する PPN は診療環境に制限を受ける牛医療でも可能であると思われる。よって本研究は、下痢により低栄養状態を呈している子牛に対して、これまで一般的に行われていた「体液および酸塩基異常の補正を目的とした経静脈内輸液療法」にブドウ糖だけでなくアミノ酸を加味した末梢静脈内栄養輸液療法を加えることで下痢症子牛の治癒率の向上に寄与するか否かを検討した。すなわち本研究は、(1) 下痢症子牛死亡率における血液検査所見に基づいたリスク因子の後向き調査、(2) 子牛の疾病と血液中遊離アミノ酸動態との関係、そして (3) 病態生理学に基づいた子牛の栄養輸液療法の有用性を検証した。詳述すると、第 2 章では下痢症子牛における栄養管理の必要性を確認する目的で、初診時に経静脈内輸液療法が実施されており、肺炎、気管支炎、臍帯炎など重度の合併症を伴

わない 221 頭の下痢症子牛の診療記録簿を用いて、血液検査所見により下痢症子牛の死亡率を高めるリスク因子を抽出するための後向き調査を行った。

第 3 章では末梢静脈内栄養輸液療法で必要となるアミノ酸について、子牛の二大疾病である下痢症と呼吸器疾患を対象に調査を行った。すなわち、第 3 章第 1 節では、下痢症子牛の病態で重要な酸血症（アシデミア）が血液中遊離アミノ酸動態に影響を及ぼすか否かを評価した。また、本研究では下痢症子牛の合併症として肺炎[81]が頻繁に認められたことを考慮して、肺炎子牛における呼吸器の異常が血液中遊離アミノ酸濃度に影響を及ぼすか否かについても調査を行った。すなわち、第 3 章第 2 節では呼吸器疾患子牛の病態として過呼吸と発熱に伴う代謝亢進状態と血液中遊離アミノ酸動態の関連性を調査した。

第 4 章では病態生理学に基づいた子牛の栄養輸液療法の有用性を検証するために、軽度から重度の下痢症子牛に分けてそれに応じた経口または経静脈内栄養輸液療法を提案することを目的として研究を遂行した。すなわち、第 1 節では酸塩基平衡異常および体液欠乏が深刻でなく、ある程度の必要熱量を経口摂取できている下痢症子牛を対象とした。これらの軽度の低栄養状態子牛に 4 種類の処方が異なる経口補液剤を投与して循環血液量の改善または脂質異化抑制効果に適した処方の検討と病態に基づいた経口補液剤の処方を検証した。第 2 節では脱水が顕著であり体液補充療法を必要とするが通常の間静脈内輸液療法では異化亢進が生じる可能性のある下痢症子牛を対象とした。これらの子牛に一般的な細胞外液補充剤である酢酸リンゲル液を対照として、酢酸リンゲル液に糖を添加する意義について評価した。第 3 節では *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) 感染で腸絨毛の損傷により重度の下痢を呈している子牛を用いて、アミノ酸およびブドウ糖またはブドウ糖単独による間静脈内栄養輸液療法の治療効果について血漿ジアミンオキシダーゼ (DAO: Diamine Oxidase) を指標に検討を行なった。

本研究は、消耗性疾患である下痢症子牛において (1) 栄養輸液療法が必要か否かの検証、(2) 栄養輸液療法にアミノ酸を加える必要性およびアミノ酸製剤の処方の検証、そして (3) 病態生理学に基づいた子牛の間静脈内栄養輸液療法の有用性につい

での検証を行った。末梢静脈内栄養輸液療法は臨床現場において実践可能であり、従来の体液および酸塩基平衡異常の補正のみを目的とした経静脈内輸液療法と比較して下痢症子牛の治癒率を向上させる可能性が高いと思われる。本研究は、下痢症子牛におけるブドウ糖に加えアミノ酸を添加した末梢静脈内栄養輸液療法の有用性を病態生理学および臨床薬理学的見地に基づき証明するものである。

第 2 章

下痢症子牛の死亡率を高めるリスク因子の解析

下痢症子牛の死亡率を高めるリスク因子として血中尿素態窒素および塩素濃度の増加[22]、ヘマトクリット値の上昇[22]、酸血症、低血糖症、高ナトリウム血症[81]が報告されている。Trefz et al. [80] はルートヴィヒ・マクシミリアン大学ミュンヘン附属病院に入院した 10,060 頭の子牛について後向き調査を実施したところ、重度の低血糖を示した子牛はわずかに 6.3%であった。しかし、この重度低血糖症子牛の死亡率は 79.4%と著しく高いことから低血糖は死亡率を高めるリスク因子と考えられる。このような重度の低血糖症子牛の死亡率は深刻な栄養失調を含む代謝障害が原因であると考えられている[80]。ヒト医療でも同様に、5 歳以下の小児において下痢症は世界的に主要な死亡原因となっている[66]。Talbert et al. [74] は下痢症小児の死亡原因として、低ナトリウム血症、低酸素血症、低血糖症に加えて栄養失調の関与を指摘しており、特に栄養失調を重要視する意見は多くの研究者によって支持されている [71, 79]。小児医療では、重度のタンパク質不足が下痢症小児の極めて重大な死亡リスク因子として認知されている[78]。この問題に対して世界保健機関（WHO : World Health Organization）は、1999 年に栄養失調の小児における栄養管理方法を示したガイドラインを作成し[88]、このガイドラインを採用した病院では下痢症小児の死亡率を低減させることに成功している[5, 18]。

下痢症子牛に関する病態生理学や[23]、脱水症の改善および酸塩基平衡異常の補正に関する輸液療法の進歩が認められているにも関わらず[9, 72]、この数十年において下痢症子牛の死亡率は改善されていない[47, 57, 81]。このことは下痢症子牛の治療において抗生物質および体液補充/酸塩基平衡異常の補正療法だけでなく次の手段を模索する必要性を示唆している。そのために、下痢症子牛の死亡リスクを改めて検証することで死亡率を低減させる新たな治療展開が可能になると思われる。しかし、そのリスク因子を特定するための情報は不足しているのが現状である。したがって、本章では北海道道南地域において、体液補充および酸塩基平衡異常の補正を目的に初診時に経静脈内輸液療法を実施した下痢症子牛の診療記録簿を用いて、下痢症子牛の死亡率を高めるリスク因子は何かを明らかにするため血液検査所見に基づいた疫学調査を行った。

2.1 材料および方法

本調査は National Research Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, 2011)に従って実施した。本後向き調査は 2015 年 1 月から 2017 年 9 月の期間、みなみ北海道農業共済組合が下痢症を主訴に診療依頼を受け、初診時より経静脈内輸液療法が行われた 221 頭の下痢症子牛（平均日齢：10.4±3.7 日）の診療記録簿を対象に実施した。調査対象として抽出した診療記録簿は、肺炎、気管支炎、臍帯炎など重度の合併症は認められなかったホルスタイン種 96 頭（43.4%）、ホルスタイン種と黒毛和種の交雑種 65 頭（29.4%）、黒毛和種 60 頭（27.1%）であった。

初診時において、全ての対象牛に対してポータブル血液ガス分析機（i-STAT 1；アボット社、プリンストン、イリノイ州、アメリカ合衆国）および i-STAT カートリッジ（i-STAT EC8+；アボット社）により血液ガスおよび付随した血液生化学検査が実施された。なお、血液サンプルは頸静脈より 1 mL のヘパリン加シリンジを用いて採血して検査に供した。これらの一連の作業は可能な限り嫌氣的に行った。ポータブル血液ガス分析器では血液 pH、二酸化炭素分圧（PCO₂：Partial CO₂ pressure）、重炭酸イオン（HCO₃⁻）濃度、過剰塩基（BE：Base Excess）濃度、アニオンギャップ（AG：Anion Gap）濃度、ナトリウム（Na）濃度、カリウム（K）濃度、塩素（Cl）濃度、尿素窒素（BUN：Blood Urea Nitrogen）濃度、血糖（Glu：Glucose）、ヘマトクリット（Ht：Hematocrit）値、ヘモグロビン（Hb：Hemoglobin）濃度の測定および演算を行った。

2.2 統計解析

全ての統計解析は市販の統計ソフト（エクセル統計 2010；SSRI、大阪、日本）を用いて行った。等分散の値は平均±標準偏差で、非等分散の値（Glu および血液 pH）は中央値で記し、最小値、最大値を補足した。

供試牛を生存期間に基づき初診日から 60 日以上生存した子牛を生存群、生存期間が初診時から 60 日未満であった子牛を死亡群に区分した。群間における初診時に得

られた値の比較は F 検定で分散を評価した後に、等分散であれば Student t 検定、非等分散であれば Mann-Whitney U 検定を用いて行った。また、下痢症子牛の死亡率を高めるリスク因子を明らかにする目的で、全ての血液検査項目に対して多重ロジスティック回帰分析を行った。上記の明らかにされたリスク因子を基に、下痢症子牛における生存曲線を Kaplan-Meier 法を用いて作成した。生存時間（期間）の比較は log-rank 検定後に Bonferroni 検定を用いて行った。危険率は 5%未満とした。

2.3 結果

2.3.1 供試牛情報

診療記録簿の身体一般所見より、眼球陥没および吸乳反射の減退、運動失調、昏睡などの中枢神経系の症状が多くの子牛で認められた。初診時での輸液療法に用いられた輸液剤は、生理食塩液、リンゲル液、酢酸リンゲル液、7%重炭酸ナトリウム液、ブドウ糖液など多岐にわたっていた。また、経静脈内輸液療法は、脱水症および代謝性アシドーシスの改善が認められるまで行われた。経静脈内輸液療法の他に、支持療法として抗生物質が投与されたものが 195 頭 (88.2%)、抗炎症薬が投与されたものが 83 頭 (37.6%) であった。治療は活力、食欲および糞便性状の改善が認められるまで継続された。

本調査における 221 頭の下痢症子牛の生存率（初診後 60 日以上生存）は 82.8% (183/221) であった。一方で 38 頭 (17.2%) の下痢症子牛が初診時から 35 日以内に死亡していた。従って、183 頭が生存群、38 頭を死亡群とした。死亡群の治療期間は、生存群の 5 日（最小-最大；1-22 日）に対して 7 日（最小-最大；2-34 日）であり有意に延長していた ($p=0.02$)。

2.3.2 生存および死亡群における各種パラメーターの比較

初診時の生存群および死亡群における総輸液量は $4,344.6 \pm 1,416.1$ および $5,186.8 \pm 1,581.9$ mL ($p=0.006$) であり、死亡群の総輸液量は生存群のそれよりも有意に多かった。生存群および死亡群における輸液剤の内訳を見ると、7%重炭酸ナト

リウム液量 (400.9±197.0 vs 437.6±187.7 mL, $p>0.05$)、ブドウ糖量 (81.8±61.8 vs 82.1±62.5 g, $p>0.05$)、ブドウ糖濃度 (2.0%±1.5% vs 1.6%±1.2%, $p>0.05$) であり、群間での差は認められなかった。輸液療法を実施した診療日数は死亡群で 5.0±1.0 日であり生存群の 2.4±2.0 日と比較して有意に延長していた ($p<0.001$)。

表 2. 1 に初診時の血液検査所見を示した。死亡群の血漿中 Na 濃度 ($p=0.04$)、Cl 濃度 ($p=0.04$)、PCO₂ ($p=0.001$) は生存群のそれらと比較して有意に高値を示した。一方で死亡群の血液 pH ($p=0.04$) と血漿中 Glu 濃度 (Glu: $p=0.02$) は生存群のそれらと比較して有意に低値を示した。そのほかの得られた値に群間差は認められなかった。群間で有意差が認められた項目を、文献データ [8, 10, 40, 68] に基づいてカテゴリー分類した後、多重ロジスティック回帰分析に供試した。なお、PCO₂ については基準値に基づき、<39.8 torr を呼吸性代償あり、>50.3 torr を呼吸性代償不全とした。

Na 濃度	:	基準値 138.8-144.0 mM	[40]
Cl 濃度	:	基準値 100.3-107.0 mM	[40]
Glu 濃度	:	基準値 68.0-90.0 mg/dL	[68]
血液 pH	:	重度アシデミアの閾値 7.20	[8]
PCO ₂	:	基準値 39.8-50.3 torr	[10]

多重ロジスティック回帰分析の結果、低血糖症 (オッズ比 3.09; 95% 信頼区間 1.22-7.87; $p=0.02$) および呼吸性代償不全 (オッズ比 2.63; 95% 信頼区間 1.05-6.62; $p=0.04$) が下痢症子牛において死亡率を高めるリスク因子として抽出された(表 2.2)。

図 2.1 に本調査における下痢症子牛の生存曲線を示した。初診時より 60 日の試験期間中において、リスク因子が認められない 111 頭のうち 8 頭 (7.2%) が死亡した。一方で、リスク因子である低血糖症を認めた 51 頭のうち 13 頭 (25.5%)、および呼吸性代償不全を認めた 48 頭のうち 12 頭 (25.0%) がそれぞれ死亡した。同様に、低血糖症かつ呼吸性代償不全を合併した 11 頭のうち 5 頭 (45.5%) が死亡した。した

がって、Kaplan-Meyer 解析結果より、リスク因子を認める下痢症子牛の生存期間はリスク因子を認めない下痢症子牛と比較して有意に短かった ($p<0.05$)。

2.4 考察

本後向き調査において、低血糖症および呼吸性代償不全が下痢症子牛において死亡率を高めるリスク因子として抽出された。また、Kaplan-Meyer 法による生存解析を実施したところ、低血糖症や呼吸性代償不全のリスク因子を認める下痢症子牛の生存日数は、リスク因子を認めない下痢症子牛よりも有意に短縮していたことから、低血糖症および呼吸性代償不全は下痢症子牛におけるリスク因子として極めて重要であることが明らかとなった。この結果は、Trefz et al.[80]による低血糖症は子牛において主要な死亡原因となるという報告を裏付けている。さらに Tennant et al.[77]は下痢症子牛における極度の低血糖症 (<40 mg/dL) は常に重度の脱水症を伴っていると報告している。今回の調査において Ht 値や Hb 濃度の観点から脱水を推定すると、死亡群の Ht 値 ($p=0.08$) と Hb 濃度 ($p=0.08$) は生存群と比較して統計学的に有意差は認められなかったものの高値を示す傾向にあった。脱水症は嫌気性代謝の原因となり、その結果として組織中酸素レベルの低下が生じてブドウ糖の酸化効率が低下する[46]。エネルギー補給を目的とした経静脈内輸液におけるブドウ糖の添加は世界的に行われているものの[9]、下痢症子牛においてはブドウ糖の利用効率を改善させるためにも脱水症の改善は重要である。

下痢症子牛において低血糖症は沈鬱や昏睡を伴うことが報告されているが[76]、その多くは末期の臨床所見である[40]。下痢症子牛では健常子牛と比較して糞便中に排泄される脂質が増加すること、哺乳から摂取できるエネルギーが約 31%減少することから、NEB に陥る[92]。低血糖症を伴う下痢症子牛では栄養失調が深刻な問題[80]となることから、下痢症子牛においてはエネルギー要求量が増加していることが容易に想像できる。栄養失調は顕著な生理学的、代謝的变化をもたらすことから、栄養失調に陥った動物の治療は奏功しないことが多い。下痢症子牛の病態を考慮すれば、エネルギー補給を目的とした経静脈内輸液においてブドウ糖を配合するだけでは不

十分と思われる。

一般的に代謝性アシドーシスを呈した動物において呼吸性代償反応は恒常性維持のために速やかに行われる。ヒト医療において、BE 濃度が >0 mM の患者では代償反応の結果として呼吸性アルカローシスが認められる[6]。代謝性アシドーシスに陥った子牛の呼吸性代償機能はヒトと同等であることが知られている[10]。しかし、本調査において呼吸性代償不全が低血糖症とともにリスク因子として抽出された。本調査では、呼吸性代償反応に影響を与える可能性がある重度の合併症を伴う個体は除外しているため、「代謝性アシドーシスに対する呼吸性代償が破綻」することが死亡のリスク因子であると推察できる。詳細は不明であるが呼吸性代償不全を引き起こす原因の1つとして重度の脱水症との関与が報告 [10] されていることから、今後は脱水の程度と呼吸性代償との関連性について調査する必要がある。

本調査では下痢症子牛の死亡率を高めるリスク因子として低血糖症および呼吸性代償不全が抽出され、下痢症子牛が換気能力の低下に陥ると予後不良となることが示唆された。これは Berchtold et al.[10]による呼吸性代償不全は下痢症子牛の死亡率を高めるという報告を裏付けている。低血糖症を伴う下痢症子牛においては、従来のブドウ糖のみによるエネルギー補給に代わる、ブドウ糖の利用効率をも考慮した新たな栄養管理法が必要であることが示唆された。

2.5 小括

本章では北海道道南地域における下痢症子牛の死亡率を高めるリスク因子を抽出するために検査所見に基づいた後向き調査を行い、その結果として呼吸性代償不全および低血糖症がリスク因子として抽出された。呼吸性代償不全は重度の脱水症が関与している可能性があり、換気不全に陥った個体では予後不良となることが示唆された。一方で低血糖症を伴う下痢症子牛では栄養失調および脱水症の関与が報告されていることから、従来のブドウ糖のみによるエネルギー補給に代わる、ブドウ糖の利用効率をも考慮した新たな栄養管理方法の必要性が確認された。

表 2.1 生存群および死亡群における初診時の血液検査所見

	生存群 (n=183)	死亡群 (n=38)	p 値
Na (mM)	132.1 ± 8.7	135.5 ± 10.4	0.04
K (mM)	5.6 ± 1.3	6.1 ± 1.6	NS
Cl (mM)	106.0 ± 10.0	109.8 ± 11.8	0.04
BUN (mg/dL)	48.9 ± 37.5	60.4 ± 38.4	NS
Glu (mg/dL)	82.5 (34-192)	70.5 (19-263)	0.02
Ht (%)	34.2 ± 8.7	37.1 ± 9.7	NS
Hb (g/dL)	11.6 ± 2.9	12.6 ± 3.3	NS
pH	7.11 (6.69-7.43)	7.05 (6.66-7.45)	0.04
PCO ₂ (torr)	42.6 ± 11.8	50.0 ± 12.6	0.001
HCO ₃ ⁻ (mM)	14.6 ± 7.0	14.8 ± 6.4	NS
BE (mM)	-14.9 ± 8.8	-15.7 ± 8.9	NS
AG (mM)	17.3 ± 4.5	16.8 ± 4.7	NS

平均値±標準偏差

mM : mmol/L

NS: Not Significant

表 2.2 下痢症子牛の死亡率を高めるリスク因子

供試数 (n = 221)	カテゴリー	オッズ比	95% 信頼区間	p 値
Na (mM)	138.8 - 144.0	1.00	-	-
	< 138.8	0.44	0.16, 1.25	NS
	> 144.0	0.43	0.09, 1.93	NS
Cl (mM)	100.3 - 107.0	1.00	-	-
	< 100.3	0.47	0.14, 1.55	NS
	> 107.0	0.95	0.34, 2.64	NS
Glu (mg/dL)	68.0 - 90.0	1.00	-	-
	< 68.0	3.09	1.22, 7.87	0.02
	> 90.0	1.12	0.41, 3.07	NS
pH	≥ 7.20	1.00	-	-
	< 7.20	1.64	0.58, 4.68	NS
PCO ₂ (torr)	39.8 - 50.3	1.00	-	-
	< 39.8	0.49	0.18, 1.32	NS
	> 50.3	2.63	1.05, 6.62	0.04

mM : mmol/L

NS: Not Significant

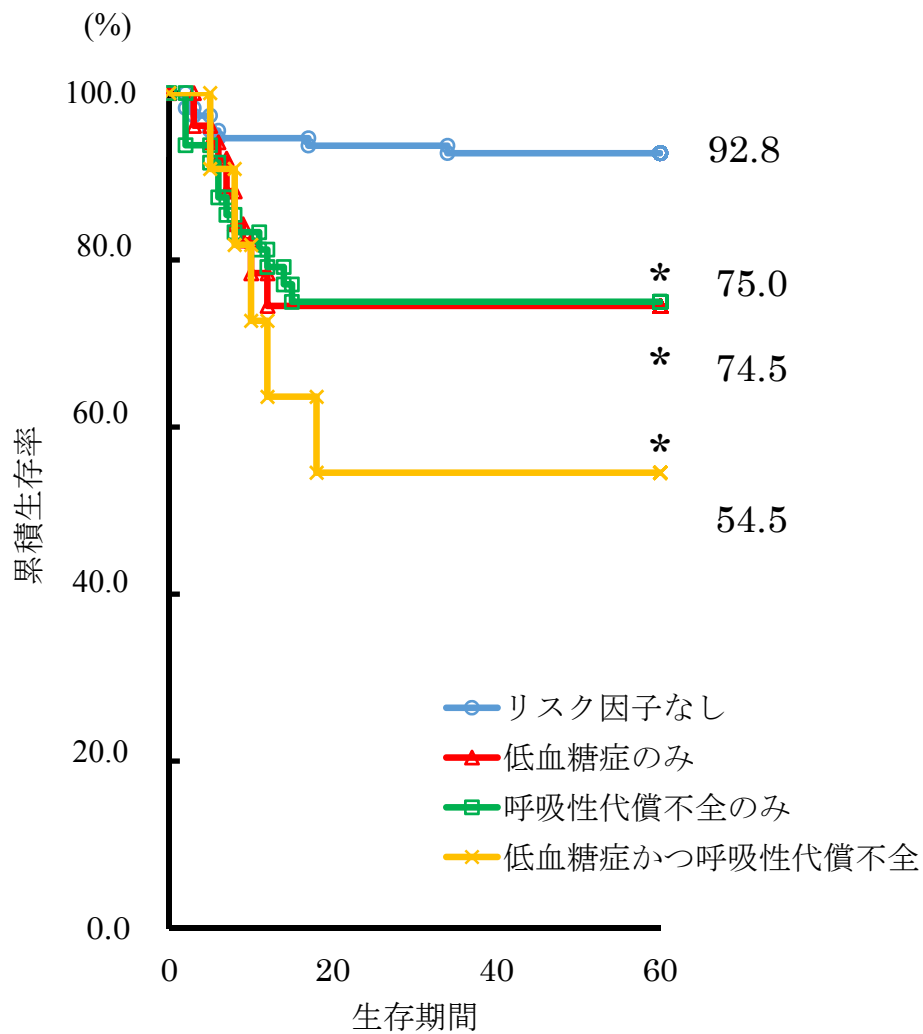


図 2.1 下痢症子牛の生存曲線

Kaplan-Meier 解析結果による、リスク因子を認めない下痢症子牛とリスク因子を認める下痢症子牛の生存期間の比較

*; $p < 0.05$

第 3 章

子牛の主要疾病と血液中遊離アミノ酸動態

代謝性アシドーシスは下痢症子牛において頻繁に遭遇する病態である[92]。ヒトにおいて代謝性アシドーシスはタンパク質異化および分岐鎖アミノ酸（BCAA：Branched Chain Amino Acids）の分解を亢進させることが知られている[42, 51]。例え軽度のアシデミアであったとしても、ヒトではタンパク質異化の亢進が認められる[67]。アシデミアを伴う下痢症子牛においてもヒトと同様のタンパク質異化によるアミノ酸動態を示すのであれば、下痢症子牛の栄養管理においてもアミノ酸の補給が必須となる。しかし下痢症子牛のアミノ酸動態に関する研究はほとんど行われておらず不明な点が多いのが現状である。また、下痢症子牛の合併症として肺炎[81]が頻繁に認められるため、肺炎子牛における呼吸器の異常が血液中遊離アミノ酸濃度に影響を及ぼすか否かについても調査が必要である。したがって、第3章第1節では、下痢症子牛の病態で重要なアシデミアにおける血液中遊離アミノ酸動態、第3章第2節では下痢症子牛の合併症として最も多い呼吸器疾患において過呼吸と発熱に伴う代謝亢進状態による血液中遊離アミノ酸動態の変化を調査した。

3.1 下痢症子牛の血液中遊離アミノ酸動態

ヒトにおいて代謝性アシドーシスはタンパク質異化および BCAA の分解を亢進させることが知られている[42, 51]。タンパク質分解を担う主な経路にアデノシン三リン酸 (ATP : Adenosine Triphosphate) 依存性ユビキチンプロテアソーム系 (UPS : Ubiquitin-Proteasome System) がある。BCAA はその分解系において分岐鎖ケト酸脱水素酵素 (BCKDH : Branched-Chain, Ketoacid Dehydrogenase) 複合体による反応を受ける[2, 33]。UPS および BCKDH 複合体は代謝性アシドーシスにより活性化されることが報告されている[1, 51]。このように、ヒトにおけるタンパク質異化および BCAA の分解は代謝性アシドーシスの影響を受けることが知られているが牛についての報告は極めて少ない。第 3 章第 1 節ではアシデミアを伴う下痢症子牛における血液中遊離アミノ酸動態の調査を行った。

3.1.1 材料および方法

本研究は National Research Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, 2011) に従って実施した。本研究では平均日齢 11.0±5.9 日のホルスタイン種子牛 34 頭を供試した。このうち 17 頭は下痢症を呈しており、クリプトスポリジウム検出用ストリップテスト (BOX-BIOK-155-10 テスト ; コスモバイオ株式会社、東京、日本) により全ての子牛の下痢便から *C. parvum* が検出された。身体一般と血液ガス分析検査により、下痢症子牛 17 頭のうち 10 頭 (重症群) で重度の脱水症およびアシデミアが認められた。これらの下痢症子牛では吸乳反射が認められず、臨床獣医師により経静脈内輸液療法を受けた。残りの下痢症子牛 7 頭 (軽症群) では軽度の脱水症とアシデミアが身体一般および血液ガス分析検査より確認された。これらの下痢症子牛では吸乳反射が認められたことから、臨床獣医師より経口補液剤による治療を受けていた。また、糞便性状に異常を認めず、活力および食欲が正常な 17 頭の子牛を対照群とした。これらの健常子牛の糞便から *C. parvum* は検出されなかった。

採血は 1 mL のヘパリン添加シリンジおよび 5 mL のヘパリン非添加シリンジを用いて頸静脈から嫌気的に行った。ヘパリン添加血液はポータブル血液ガス分析器 (i-STAT 1; アボット社、プリンストン、イリノイ州、アメリカ合衆国) および i-STAT カートリッジ (i-STAT EC8+; アボット社) を用いて血液 pH、過剰塩基 (BE) 濃度、ヘマトクリット (Ht) 値およびヘモグロビン (Hb) 濃度を、携帯型ケトン体測定器 (プレシジョンエクシード; アボットジャパン株式会社、千葉、日本) を用いて β -ヒドロキシ酪酸 (BHBA : Beta-Hydroxybutyrate) 濃度を測定した。ヘパリン非添加血液は EDTA-2K 真空採血管 (ベノジェクト® II 真空採血管; テルモ株式会社、東京、日本) に分注して室温で 3,000g、15 分間の遠心分離により血漿を得た。血漿中遊離アミノ酸濃度の測定はアミノ酸分析装置 (Prominence LC-20AD; 島津製作所、京都、日本) を用いて行った。得られた血漿を 5% トリクロル酢酸と 1 : 1 に希釈した後に 4°C で 3 分間遠心分離 (10,000g) を行った。上清を 0.2N クエン酸リチウム緩衝液 (pH=2.2) により 10 倍希釈した後に 0.45 μ m メンブランフィルター (GHP メンブレン・アクロディスク PSFGxF・シリンジフィルター 25 mm GxF; 株式会社島津ジーエルシー、東京、日本) を用いて濾過を行い、続いて濾液 20 μ L を HPLC カラム (Shim-pack Amino-Li; 株式会社島津ジーエルシー) に注入した。各遊離アミノ酸を市販キット [Amino acid mobile phase kit (Li type); 島津製作所] を用いて分離後、*o*-フタルアルデヒド試薬による蛍光誘導体化を市販キット (Amino acid reaction reagent kit; 島津製作所) を用いて行った[29]。各遊離アミノ酸は蛍光検出器 (励起波長=350 nm、蛍光波長=450 nm、RF-10Axs; 島津製作所) を用いて検出した。

3.1.2 統計解析

得られた各血漿中遊離アミノ酸濃度より、血漿中総遊離アミノ酸 (TAA : Total Amino acids; スレオニン+バリン+メチオニン+イソロイシン+ロイシン+フェニルアラニン+ヒスチジン+リジン+アルギニン+トリプトファン+セリン+グルタミン酸+グリシン+アラニン+チロシン+プロリン+アスパラギン酸+アスパラギン+グルタミン+シスチン) および BCAA (バリン+イソロイシン+ロイシン) 濃

度を算出した。

全ての統計解析は市販の統計ソフト（エクセル統計 2010；SSRI、大阪、日本）を用いて行った。等分散の値は平均±標準偏差で、非等分散の値（血液 pH および血液中 BHBA 濃度）は中央値で記し、最小値、最大値を補足した。3 群間の比較には Steel-Dwass 検定を用いた。また、血液 pH と血漿中 TAA、BCAA、および血液中 BHBA 濃度とのそれぞれの関係は Spearman の順位相関係数を用いて評価した。危険率は 5%未満とした。

3.1.3 結果

重症群、軽症群および対照群の血液 pH の中央値はそれぞれ 7.01 (6.98-7.19)、7.30 (7.21-7.34) および 7.41 (7.37-7.41) であった。同様に血液中 BE 濃度は重症群 (-17.4±4.5 mM)、軽症群 (0.0±5.2 mM) および対照群 (11.2±3.5 mM) であった。重症群の血液 pH および血液中 BE 濃度は軽症群および対照群と比較して有意に低値を示した ($p<0.001$)。同様に、軽症群の血液 pH および血液中 BE 濃度は対照群のそれと比較して有意に低値を示した ($p<0.001$)。重症群、軽症群および対照群の Ht 値はそれぞれ 36.8%±10.7%、22.6%±5.0%、および 35.2%±3.8%となり、重症群、対照群の Ht 値は軽症群のそれと比較して有意に高値を示した ($p<0.05$)。同様に、重症群、軽症群および対照群の Hb 濃度はそれぞれ 12.2±3.5、7.6±1.7 および 11.6±1.2 g/dL であり、重症群と対照群の Hb 濃度は軽症群のそれと比較して有意に高値を示した ($p<0.05$)。

表 3.1.1 に下痢症子牛における血漿中遊離アミノ酸分析結果を示した。重症群の血漿中 TAA 濃度は 3,110.9±451.0 μ M であった。重症群の TAA 濃度は軽症群 (2,498.1±419.3 μ M) および対照群 (2,612.2±380.9 μ M) のそれらと比較して、有意差は認められないものの高値を示す傾向にあった。そのため血液 pH と血漿中 TAA 濃度の間には有意な負の相関が認められた ($r = -0.40$ 、 $p<0.05$)。重症群、軽症群および対照群の血漿中バリン濃度はそれぞれ 277.9±67.2、211.9±41.4 および対照群 219.3±70.1 μ M であり、重症群は対照群のそれと比較して有意に高値を示した

($p < 0.05$)。血漿中ロイシン濃度は重症群で $184.3 \pm 36.1 \mu\text{M}$ となり、軽症群 ($136.4 \pm 31.4 \mu\text{M}$) および対照群 ($141.0 \pm 30.1 \mu\text{M}$) のそれらと比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。重症群の血漿中イソロイシン濃度は $129.4 \pm 33.5 \mu\text{M}$ であり、軽症群 ($85.7 \pm 21.3 \mu\text{M}$) よりも有意に高値を示した ($p < 0.05$)。なお、対照群の血漿中イソロイシン濃度は $98.9 \pm 17.9 \mu\text{M}$ であり、重症群との間で有意な差は認められなかった。バリン、ロイシン、イソロイシンで構成される BCAA は、重症群において $591.6 \pm 124.9 \mu\text{M}$ であり、軽症群 ($434.0 \pm 91.2 \mu\text{M}$) および対照群 ($459.2 \pm 108.6 \mu\text{M}$) のそれらよりも有意に高値を示した (図 3.1.1, $p < 0.05$)。また、血漿中 BCAA 濃度は血液 pH と有意な負の相関が認められた (図 3.1.2, $r = -0.41$, $p < 0.05$)。

重症群、軽症群および対照群の血液中 BHBA 濃度の中央値はそれぞれ $0.2 (0.1-0.3)$ 、 $0.1 (0.1-0.1)$ および $0.0 \text{ mM} (0.0-0.1 \text{ mM})$ であった。重症群の血液中 BHBA 濃度は軽症群 ($p < 0.05$) および対照群 ($p < 0.001$) のそれらと比較して有意に高値を示した。同様に軽症群の血液中 BHBA 濃度は対照群と比較して有意に高値を示した ($p < 0.001$)。したがって、血液 pH と血液中 BHBA 濃度の間には有意な負の相関が認められた ($r = -0.72$, $p < 0.001$)。

3.1.4 考察

生体内においてアミノ酸は血漿中遊離アミノ酸、組織中遊離アミノ酸、タンパク質を構成するアミノ酸のいずれかの形で存在する。これらのアミノ酸はアミノ酸プールと呼ばれており、タンパク質を構成するアミノ酸のプール比率が最も高い。確かに生体内ではタンパク質内のアミノ酸の占める割合が大きいが、生体内のアミノ酸プールは血漿中遊離アミノ酸濃度に反映するため、血漿中遊離アミノ酸濃度の測定を行うことで生体内全体のアミノ酸動態を把握することが可能である[11]。

本研究において下痢症子牛のアシデミアと血漿中 TAA および BCAA 濃度の方に負の相関が認められた。タンパク質分解を担う ATP 依存性 UPS は様々な要因により活性化されるが、代謝性アシドーシスもその要因の 1 つである [1]。加えて BCAA はその分解系において BCKDH 複合体による反応を受け[2, 33]、さらにこの反応は不可逆

的であるために BCAA 分解の律速段階に位置付けられている[33]。BCKDH 複合体もまた代謝性アシドーシスにより活性化されることが知られている[51]。したがって、重度のアシデミアを伴う下痢症子牛の血漿中 TAA および BCAA 濃度が増加したことは、タンパク質分解が亢進したことが原因であり、特にそれは骨格筋で顕著であることが推察できる。

本研究において下痢症子牛の酸塩基平衡異常と血液中 BHBA 濃度の間には負の相関が認められた。この結果は下痢症子牛においてエネルギーの消耗は血液 pH の影響を受けることを示唆している。下痢症子牛では例え NEB 状態であったとしても、重度アシデミアにより骨格筋におけるタンパク質異化が亢進していることが示唆された。つまり、アシデミアによる短期的なタンパク質代謝の変化は、長期的には骨格筋量の減少に繋がるため、下痢症子牛に対してはタンパク質分解を抑制する目的からもアシデミアの補正は重要であること、アシデミアを伴う下痢症子牛には BCAA を中心としたアミノ酸補給が必要であることが示唆された。

脱水症もまたタンパク質異化に影響を与えている可能性がある。McCue et al. [52] は飲水制限処置したマウスを用いて、脱水症がタンパク質分解に与える影響を検証している。この報告によればマウスにおいて脱水症はタンパク質分解に影響を与えていなかった。その理由として脱水マウスの生体における代謝能が低下することを挙げている。このことは初期の脱水症ではタンパク質分解に深刻な影響を与えないことを示唆している。しかし、McCue et al. [52] は軽度な脱水モデルを用いていることから、重度の脱水症においてタンパク質分解に与える影響がどのようなものなのかは明らかではなく、本研究においても明確な評価はできなかった。したがって、下痢症子牛において、重度の脱水症がタンパク質分解に関与するか否かについてさらなる検証が必要であると思われる。

3.2 *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛の血液中遊離アミノ酸動態

牛呼吸器病 (BRD) は世界的な広がりを見せており、今日では子牛の健康や経済に影響を与える重要な問題とされている[19, 61, 65]。肺炎や気管支炎は子牛下痢症の合併症としても認められ、Trefz et al. [81]の大規模な調査によると、9.5%の下痢生子牛に合併症として肺炎が認められた。これは腹部外科疾患 (12.7%)、敗血症 (9.5%) と並び下痢生子牛においては重要な合併症に位置付けられる。さらに下痢生子牛において肺炎との合併症は死亡率を高めるリスク因子であることが報告されている[81]。

Mycoplasma bovis (*M. bovis*) はしばしば肺炎子牛から分離される病原体であり、重度の感染で壊死性化膿性気管支肺炎や壊死性線維索性肺炎を、軽度の感染でカタル性間質性肺炎を引き起こす[4]。*Mycoplasma* 性気管支肺炎における炎症は内皮細胞、脈管や肺泡マクロファージ、肺泡上皮細胞に波及する。インターロイキン (IL : Interleukin) -1、IL-6、腫瘍壊死因子 (TNF : Tumor Necrosis Factor) のような炎症誘発性サイトカインは高体温症、食欲不振そしてタンパク質分解を引き起こす[31, 53]。ヒトにおける慢性閉塞性肺疾患 (COPD : Chronic Obstructive Pulmonary Disease) は肺の炎症や免疫反応に惹起される代謝性変化により、進行性の体重減少や骨格筋の消耗を伴い、多くの研究者により血漿および骨格筋アミノ酸動態に影響を与えることが報告されている[36, 91]。COPD 患者のアミノ酸動態は BCAA の減少に特徴づけられる[20, 36, 91]。肺炎子牛においても COPD 患者と同様に炎症に起因するタンパク質分解が亢進しているのであれば、栄養管理にはアミノ酸の補給が必要であると思われる。第 3 章第 2 節では子牛の下痢症の合併症として発症頻度の高い肺炎に着目し、特に重篤化しやすい *Mycoplasma* 性気管支肺炎の子牛を対象に血液中遊離アミノ酸動態の調査を行った。

3.2.1 材料および方法

本研究は National Research Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, 2011)に従って実施した。

本研究には平均日齢 70.1±37.5 日のホルスタイン種 34 頭を供試した。これらの子牛では身体一般、血液生化学、胸部超音波および胸部 X 線検査により健康状態の評価を行った。酪農学園大学附属動物医療センターの入院家畜である 18 頭 (肺炎群) は、発咳、鼻漏、発熱、胸部領域において副雑音が聴取され、胸部超音波および胸部 X 線検査からは肺炎像が確認された。16S-rRNA 遺伝子を標的とした Polymerase Chain Reaction (PCR) 法 [35] において 18 頭の肺炎子牛の肺胞洗浄液 (BALF : Bronchoalveolar Lavage Fluid) より *M. bovis* が検出された。健常牛として酪農学園大学で飼養管理されていた 16 頭 (対照群) を供試した。これらの子牛では臨床症状に異常を認めず、胸部超音波および胸部 X 線検査においても肺炎像は認められなかった。BALF を用いた PCR 法においても *M. bovis* は検出されなかった。全ての供試牛は試験期間中同一の人工乳 (カーフスターター ; サツラク農業協同組合、北海道、日本)、乾草、および飲料水を給与した。

採血は頸静脈より行い、血液は真空採血管 (ベノジェクト® II 真空採血管 ; テルモ株式会社、東京、日本) に分注し、室温で 30 分間静置させた後に 3,000 g で 10 分間の遠心分離により血清を分離した。血清中遊離アミノ酸濃度の測定はアミノ酸分析装置 (Prominence LC-20AD ; 島津製作所、京都、日本) を用いて行った。血清は 5% トリクロル酢酸と 1 : 1 に希釈した後 4°C で 3 分間遠心分離 (10,000g) を行った。上清を 0.2N クエン酸リチウム緩衝液 (pH=2.2) により 10 倍希釈した後に 0.45 μm メンブランフィルター (GHP メンブレン・アクロディスク PSFGxF・シリンジフィルター 25 mm GxF ; 株式会社島津ジーエルシー、東京、日本) を用いて濾過を行い、続いて濾液 20 μL を HPLC カラム (Shim-pack Amino-Li ; 株式会社島津ジーエルシー) に注入した。各遊離アミノ酸を市販キット (Amino acid mobile phase kit (Li type) ; 島津製作所) を用いて分離後、 σ -フタルアルデヒド試薬による蛍光誘導体化法を市販キット (Amino acid reaction reagent kit ; 島津製作所) で行った [29]。各遊

離アミノ酸は蛍光検出器（励起波長=350 nm、蛍光波長=450 nm、RF-10Axs；島津製作所）を用いて検出した。

3.2.2 統計解析

得られた各血清中遊離アミノ酸濃度より、必須アミノ酸（EAA：Essential Amino Acids；スレオニン+バリン+メチオニン+イソロイシン+ロイシン+フェニルアラニン+ヒスチジン+リジン）、非必須アミノ酸（NEAA：Non-Essential Amino Acids；セリン+グルタミン酸+グリシン+アラニン+シスチン+チロシン+アルギニン）、総アミノ酸（TAA：EAA+NEAA）およびBCAA（バリン+ロイシン+イソロイシン）をそれぞれ算出した。

統計解析は市販の統計ソフト（IBM SPSS Statistics Ver.21；International Business Machines Corporation、ニューヨーク、アメリカ合衆国）を用いて行った。得られた値は平均±標準偏差で示した。群間の比較はF検定により分散を評価した後、等分散ではStudent *t*検定、非等分散ではMann-Whitney *U*検定を用いて行った。危険率は5%未満とした。

3.2.3 結果

表 3.2.1 に *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛の各種血清中遊離アミノ酸濃度を要約した。肺炎群のセリン、アラニン、バリン、ロイシン、フェニルアラニンおよびオルニチンは対照群のそれらと比較して有意に低値を示した ($p<0.001$)。一方で肺炎群のホスホセリン ($p<0.001$)、 σ ホスホエタノールアミン ($p<0.01$)、シトルリン ($p<0.01$)、シスチン ($p<0.001$)、チロシン ($p<0.001$)、カルノシン ($p<0.01$) および OH-リジン ($p<0.01$) は対照群のそれらと比較して有意に高値を示した。その他の血清中遊離アミノ酸およびアンモニア濃度において両群間に有意な差を認めなかった。

肺炎群 (46.3±8.8 mM) の血清中 TAA 濃度は対照群 (67.1±25.0 mM) と比較して有意に低値を示した (図 3.2.1, $p<0.01$)。肺炎群の血清中 EAA 濃度は 15.4±12.0 mM であり、対照群 (28.3±12.0 mM) と比較して有意に低値を示したが (図 3.2.2, $p<0.001$)、

血清中 NEAA 濃度は両群間で有意な差を認めなかった。したがって、肺炎群の EAA/NEAA 比は 0.56 ± 0.23 であり、対照群の 0.80 ± 0.34 と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。肺炎群の血清中 BCAA 濃度は 6.7 ± 2.5 mM であり、対照群の 20.3 ± 12.9 mM と比較して有意に低値を示した (図 3.2.3、 $p < 0.001$)。

3.2.4 考察

Mycoplasma 性気管支肺炎子牛では健常子牛と比較して血清中 TAA、EAA および BCAA 濃度の低下が認められた。血清中遊離アミノ酸濃度は食餌をはじめとする外因性のアミノ酸と、生体内におけるタンパク質の合成または分解による内因性のアミノ酸のバランスを反映している。低体重の COPD 患者においては様々なアミノ酸動態の異常が認められている[91]。Engelen et al. [20] は重度の COPD 患者においてはタンパク質合成と分解が亢進しており、安静時においてもエネルギー消費量が増加していることを報告している。ATP 依存性 UPS は主要なタンパク質分解経路であるが、代謝性アシドーシス同様、炎症もまたこの UPS を活性化させる要因であることが知られている[1]。In vivo の実験において IL-1 や TNF α の刺激により筋肉組織中の BCKDH 複合体が活性化し、BCAA 分解が亢進することが証明されている[20]。BCAA の分解は主に骨格筋で行われることから[91]、血清中 BCAA 濃度の低下は骨格筋の減少を示唆している。代謝亢進時における血清中 BCAA 濃度の減少は肺機能の悪化および呼吸筋力の低下が関与している可能性もある[20, 91]。したがって、*Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛において認められた血清中 TAA、EAA および BCAA 濃度の低下は呼吸器官の炎症に伴うタンパク質代謝の亢進や食欲不振が原因であると考えられる。

本研究において *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛では血清中アラニン濃度の低下が認められた。アラニンは生体内で糖の利用が不足した際に脱アミノ化後、糖新生へと利用される糖源性アミノ酸であることは周知されている。*Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛における血清中アラニン濃度の減少は食欲不振や炎症により糖新生への利用が増加した結果と考えられる[63]。

Mycoplasma 性気管支肺炎子牛では血清中 TAA、EAA、BCAA およびアラニン濃

度の低下が認められた。血清中 BCAA の低下は *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛において骨格筋の消耗が亢進していることを示唆している。BCAA はタンパク質合成に必要な基質となるだけでなく、骨格筋合成の調節を担う重要なアミノ酸である[12]。気管支肺炎に伴う血清中アミノ酸の変化は食欲不振による外因性のアミノ酸摂取量の低下および炎症に起因する内因性のアミノ酸利用亢進が原因であると考えられ、加えて生体内における糖の利用低下が示唆された。さらに骨格筋における BCAA の消耗が亢進していることから *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛における栄養管理には BCAA を強化したアミノ酸の補給が望ましいと考えられた。

3.3 小括

第3章第1節ではアシデミアを伴う下痢症子牛における血漿中遊離アミノ酸動態の調査を行った。その結果、下痢症子牛において血液 pH と血漿中 TAA および BCAA 濃度の間には負の相関が認められた。血漿中 BCAA 濃度の増加は、下痢症子牛の骨格筋におけるタンパク質分解の亢進を示唆するものであった。したがって、下痢症子牛においてタンパク質分解を抑制する目的から、アシデミアの補正は重要であると思われる。加えてアシデミアを伴う下痢症子牛の栄養管理には BCAA を強化したアミノ酸の補給が必要であることが示唆された。

第3章第2節では子牛下痢症の合併症として頻繁に観察される肺炎子牛のアミノ酸動態の調査を行った。その結果 *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛では血清中 TAA、EAA、BCAA およびアラニン濃度の低下が認められた。これらの変化は食欲不振による外因性のアミノ酸摂取量の低下および炎症に起因する内因性のアミノ酸利用亢進が原因であると考えられた。骨格筋における BCAA の消耗が亢進していることから *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛における栄養管理においてもアシデミアと同様に BCAA を強化したアミノ酸の補給が必要であることが示唆された。

第3章の結果をまとめると下痢症子牛で見られるアシデミアや合併症として生じやすい呼吸器疾患ではいずれも BCAA が低下しているため、BCAA を強化した栄養輸液の必要性は明らかである。

表 3.1.1 下痢症子牛における血漿中アミノ酸濃度

	重症群 (n=10)	軽症群 (n=7)	対照群 (n=17)
総遊離アミノ酸	3,110.9 ± 451.0	2,498.1 ± 419.3	2612.2 ± 380.9
バリン	277.9 ± 67.2	a 211.9 ± 41.4	219.3 ± 70.1 b
ロイシン	184.3 ± 36.1	a 136.4 ± 31.4	b 141.0 ± 30.1 b
イソロイシン	129.4 ± 33.5	a 85.7 ± 21.3	b 98.9 ± 17.9

平均値±標準偏差

単位：μM

a·b：p<0.05

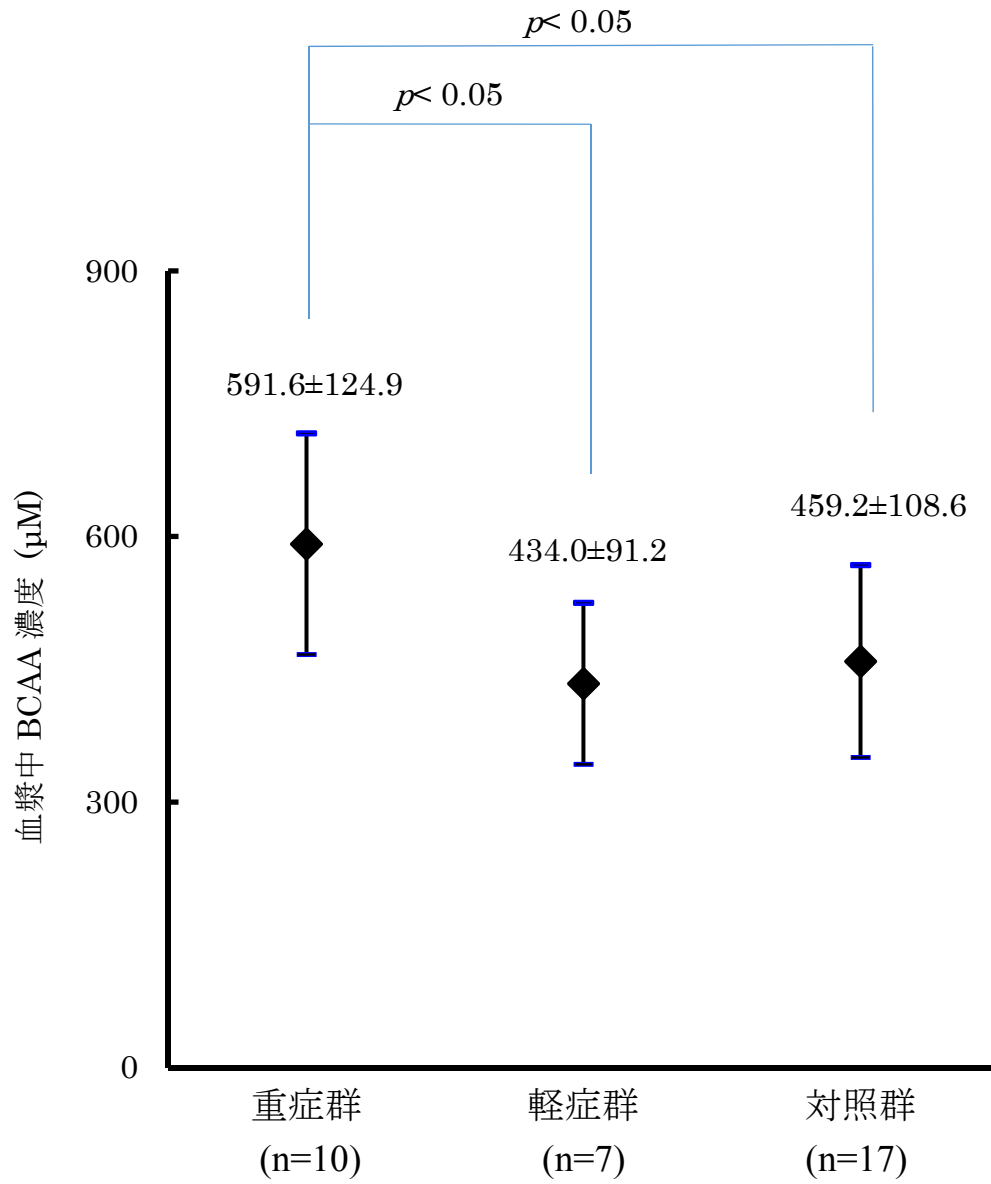


図 3.1.1 下痢症子牛における血漿中分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 濃度

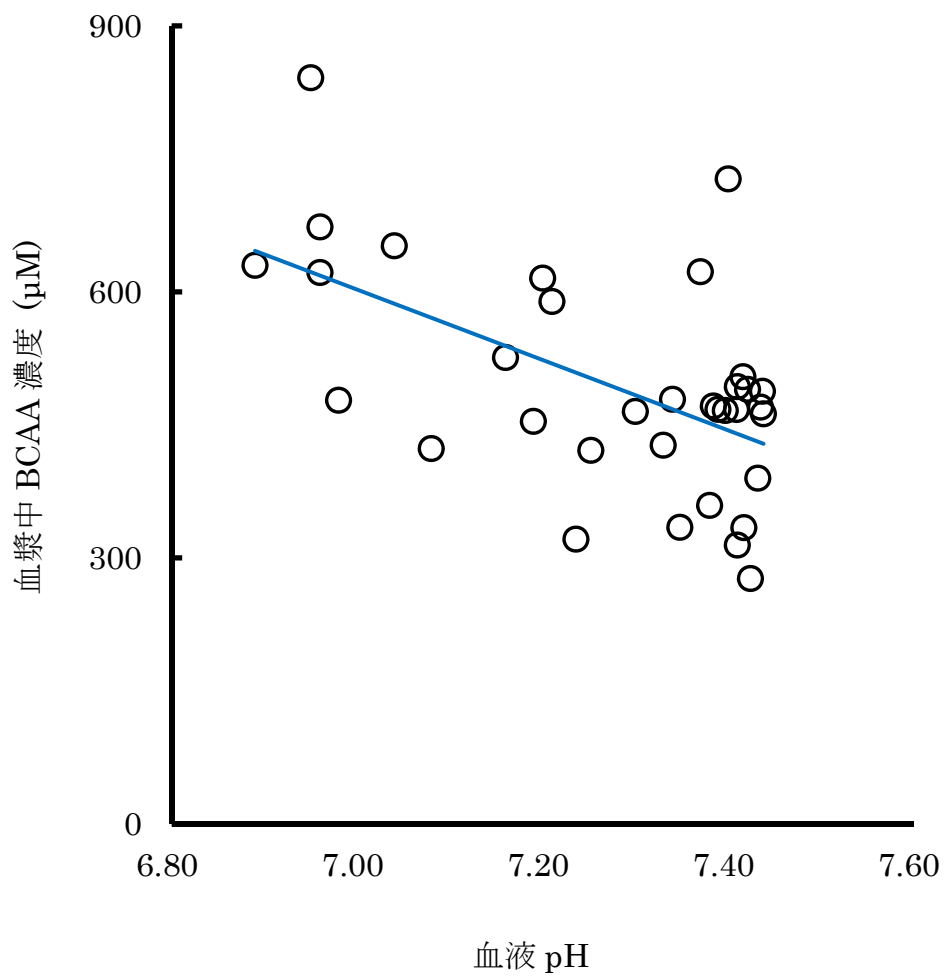


図 3.1.2 下痢症子牛における血漿中分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 濃度と血液 pH の関係
 $r = -0.41$ 、 $p < 0.05$

表 3.2.1 *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛の血清中アミノ酸濃度

アミノ酸	対照群 (n=16)	肺炎群 (n=18)	p 値
ホスホセリン	2.42 ± 0.92	6.25 ± 2.40	<i>p</i> <0.001
タウリン	7.86 ± 3.53	9.96 ± 4.73	NS
o-リン酸エタノールアミン	1.53 ± 2.00	3.40 ± 1.89	<i>p</i> <0.01
スレオニン	1.99 ± 0.94	1.79 ± 0.76	NS
セリン	6.60 ± 1.85	2.39 ± 2.88	<i>p</i> <0.001
L-グルタミン酸	4.32 ± 3.06	4.23 ± 2.62	NS
α-アミノアジピン酸	7.37 ± 9.22	12.83 ± 4.07	NS
グリシン	11.43 ± 7.81	7.50 ± 6.96	NS
アラニン	9.62 ± 7.97	1.36 ± 2.71	<i>p</i> <0.001
シトルリン	1.97 ± 2.21	5.55 ± 3.60	<i>p</i> <0.01
α-アミノ酪酸	0.23 ± 0.28	1.05 ± 1.31	NS
バリン	9.82 ± 9.20	0.05 ± 0.15	<i>p</i> <0.001
シスチン	1.07 ± 1.07	3.94 ± 2.68	<i>p</i> <0.001
メチオニン	1.23 ± 0.56	1.64 ± 0.47	NS
イソロイシン	3.49 ± 0.99	3.89 ± 1.20	NS
シスタチオン	0.01 ± 0.05	2.06 ± 2.94	NS
ロイシン	7.02 ± 3.89	3.16 ± 2.20	<i>p</i> <0.001
チロシン	1.98 ± 1.37	4.76 ± 2.70	<i>p</i> <0.001
フェニルアラニン	1.22 ± 0.71	0.37 ± 0.34	<i>p</i> <0.001
β-アラニン	0.04 ± 0.07	0.10 ± 0.19	NS
β-アミノイソ酪酸	0.01 ± 0.01	0.00 ± 0.00	NS
γ-アミノ酪酸	1.03 ± 1.35	1.33 ± 0.98	NS
ヒスチジン	2.15 ± 2.25	3.37 ± 1.37	NS
3-メチルヒスチジン	0.38 ± 0.64	0.57 ± 0.32	NS
カルノシン	0.14 ± 0.22	0.50 ± 0.27	<i>p</i> <0.01
OH-リジン	0.26 ± 0.08	0.51 ± 0.24	<i>p</i> <0.01
オルニチン	0.86 ± 0.55	0.48 ± 0.40	<i>p</i> <0.05
リジン	1.50 ± 0.72	1.65 ± 0.96	NS
アンモニア	0.30 ± 0.16	0.50 ± 0.42	NS
アルギニン	5.14 ± 3.14	7.19 ± 3.97	NS

平均値±標準偏差

単位：mM

NS: Not Significant

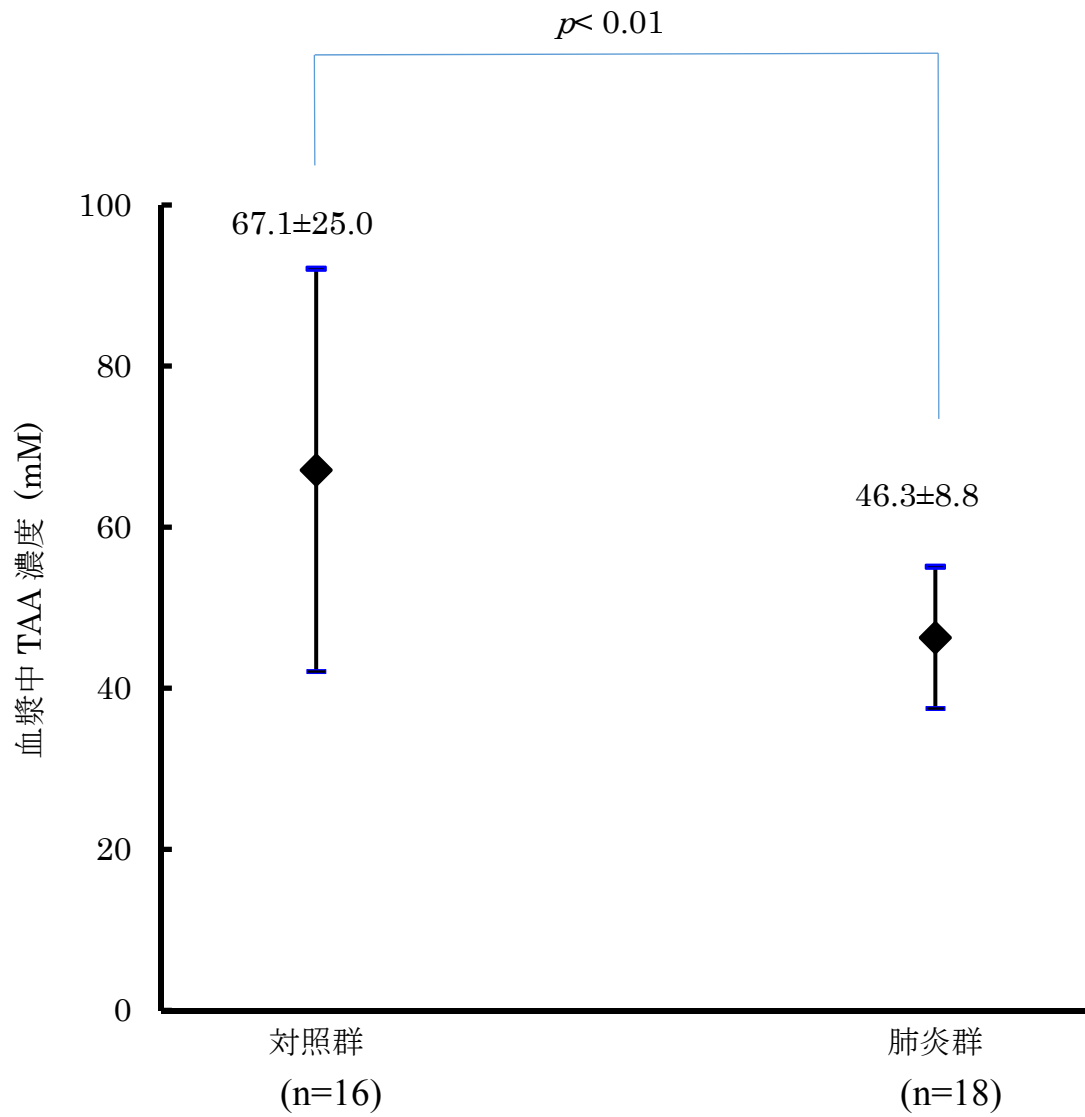


図 3.2.1 *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛における血清中総遊離アミノ酸 (TAA) 濃度の比較

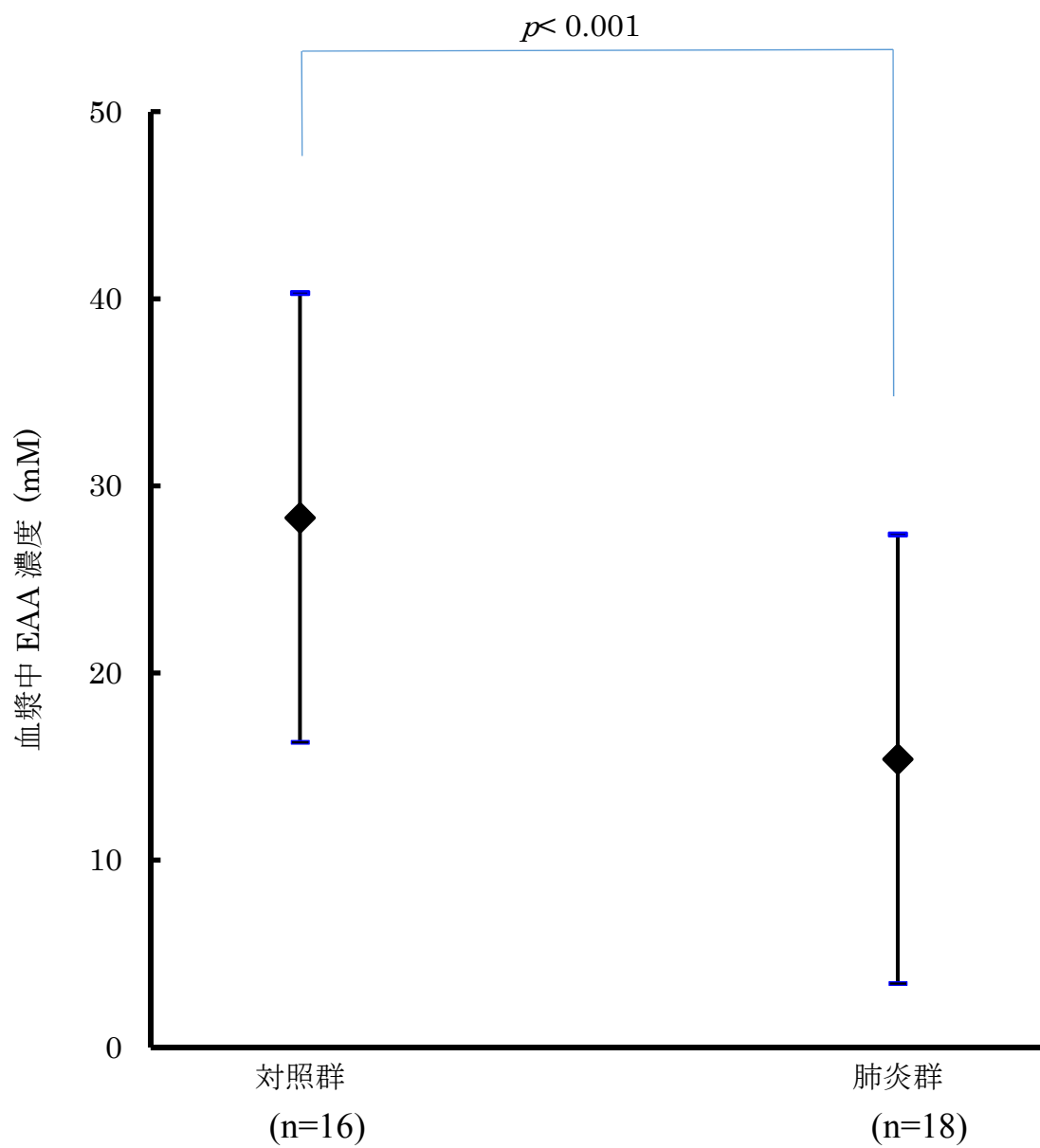


図 3.2.2 *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛における血清中必須アミノ酸 (EAA) 濃度の比較

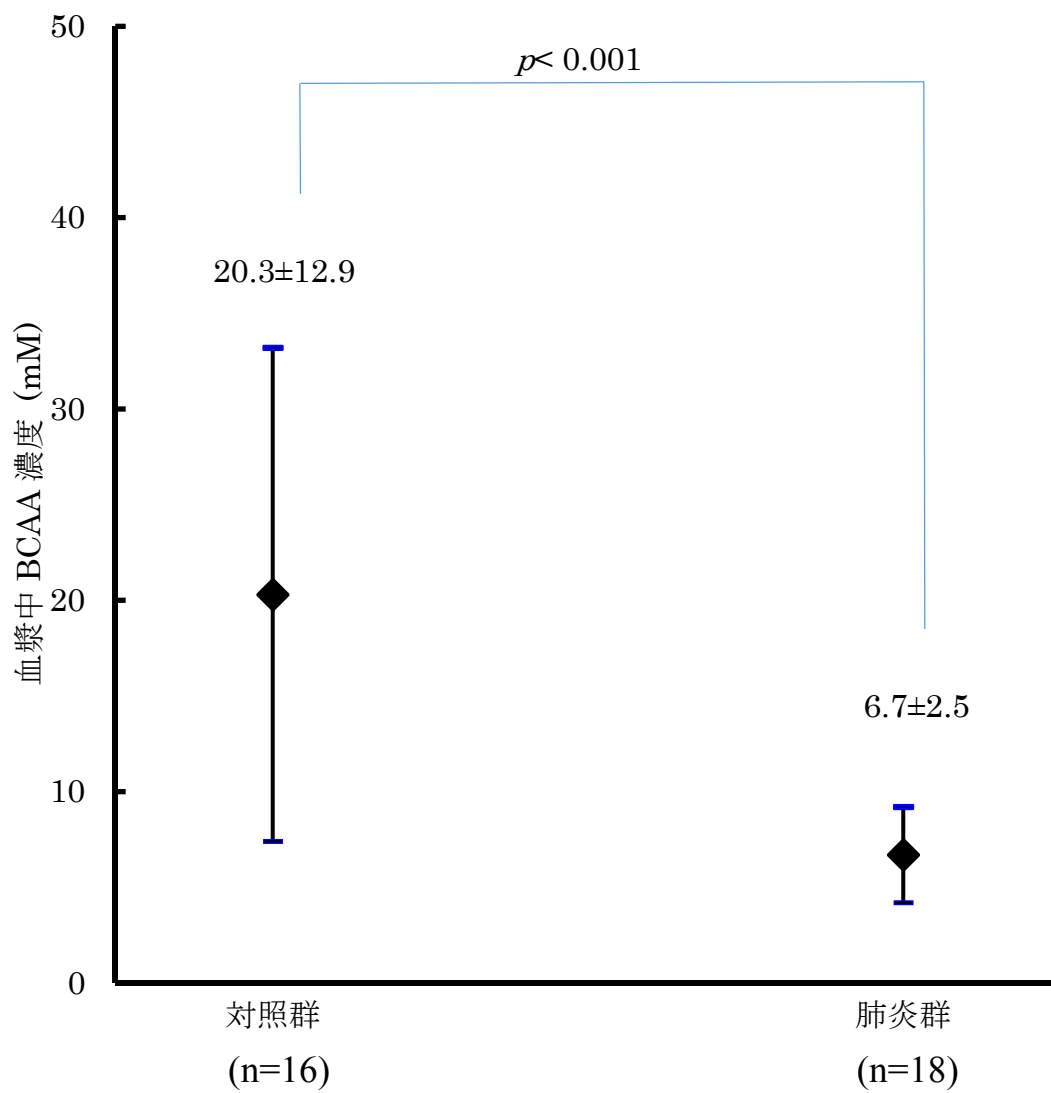


図 3.2.3 *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛における血清中分岐鎖アミノ酸 (BCAA) 濃度の比較

第 4 章

病態生理学に基づいた下痢症子牛の栄養輸液療法

子牛において下痢症は病原体やその機序に関係なく、下痢便からの水分および電解質喪失増加、哺乳量の減少を認める[72]。その結果、子牛は急性期において脱水症や代謝性アシドーシスを生じ、慢性化に伴い消耗が進行し NEB に陥る。したがって、長期間に及ぶ消耗を防ぐために循環血液量や代謝性アシドーシスの補正は重要となる。

新生子牛の下痢症は輸液療法適応症として広く周知されている。軽度の脱水症では経口補液剤は簡便かつ経済的であることから多くの農場で下痢の初期治療に行われている。一方、子牛は成牛と比較して体重における細胞外液量の比率が高いため[9]、下痢症などにより体液の喪失が続くと容易に重度の脱水症に陥る。体重の減少が 8% 以上認められる重度の脱水症においては、経口補液剤のみによる再水和は困難であり経静脈内輸液が推奨されている[9]。さらに下痢症子牛においては代謝性アシドーシスを伴うことが頻繁に認められる[77]。子牛の吸乳反射は代謝性アシドーシスの影響を受けるため[39]、吸乳反射の消失もまた静脈内輸液の必要性を示唆する臨床所見である[72]。

下痢症子牛はエネルギー摂取量の減少[24]に加えて糞便中への脂質の喪失が増加していることから NEB に陥る[92]。生体内において利用できるブドウ糖が不足すると糖新生が活性化してタンパク質や脂質の異化作用が亢進する。したがって、糖代謝を維持することがタンパク質、脂質異化を防止する上で極めて重要となる。確かに、ブドウ糖は脳や赤血球の直接エネルギー源となることから栄養輸液療法においてブドウ糖は必須であり、子牛へのエネルギー補給を目的とした経静脈内輸液療法ではブドウ糖の投与が一般的に行われている[9]。ブドウ糖の供給は糖代謝を維持し、脂質異化による BHBA の増加を防止する。しかし、Lund et al.[48, 49]はブドウ糖製剤のみでの経静脈内投与だけではヒトの腹部外科手術中のタンパク質異化を抑制できなかったことを報告している。さらにブドウ糖製剤のみでの経静脈内投与は、筋肉から血漿中へ種々のアミノ酸放出が増加することが確認されている[48]。このように、ブドウ糖製剤のみでの経静脈内投与は脂質異化の防止には有用であるが、生体内でのアミノ酸利用を亢進させることでさらなる消耗を促す。

経静脈内栄養輸液はヒト医療において 1960 年代より広く普及し、消化器に重大な問題を抱える患者の治療に大きな進歩をもたらした[13]。一般的に経静脈内栄養輸液製剤の処方にはブドウ糖の他にアミノ酸、脂質、微量元素およびビタミンが含まれている。ヒトにおける周術期中のアミノ酸投与は深部体温低下の抑制や[27]、手術後の早期回復に貢献し[37]、特にタンパク質異化の抑制に有用であることが報告されている[28, 62]。異化が亢進している患者への経静脈内栄養輸液療法においてタンパク質代謝は最も重要であり、とりわけ体重の維持には BCAA 等の栄養補助が重要となる[25]。このようにヒト医療ではアミノ酸を含む経静脈内栄養輸液療法は消耗が認められた患者に有用であるが生産動物医療において消耗性疾患である下痢症子牛においても有用であるか否かは不明である。したがって、本章では、下痢症子牛の病態生理学に基づいた子牛の経静脈内栄養輸液療法の有用性を評価する上で、第 4 章第 1 節では酸塩基平衡異常および体液欠乏が深刻でなく必要熱量をある程度経口摂取できている軽度脱水を呈した下痢症子牛を対象に、ナトリウム (Na)、ブドウ糖 (Glu) およびグリシン (Gly : Glycine) 比の異なる経口補液剤について薬効の違いを評価した。第 4 章第 2 節では重度脱水を呈した下痢症子牛を対象に一般的な細胞外液補充剤である酢酸リンゲル液に糖を添加する意義について評価した。さらに、第 4 章第 3 節では *C. parvum* 感染により重度の下痢を呈している子牛を用いて、アミノ酸およびブドウ糖またはブドウ糖製剤単独による経静脈内栄養輸液療法の治療効果について比較を行なった。

4.1 軽度脱水子牛における経口補液剤の処方検討

経口補液剤は投与が容易かつ安価であることから古くから脱水症の改善、電解質異常の補正、エネルギー補給を目的として利用されている[72]。経口補液剤は 1) 主剤として浸透圧を構成する Na および Glu、2) 腸管からの Na や水分吸収を促進する Glu、Gly、酢酸およびクエン酸イオン、3) 代謝性アシドーシスに対するアルカリ前駆物質として酢酸、クエン酸および重炭酸イオンが処方されており、これらの配合比率に基づいて分類される[72]。Na は細胞外液量を決定する主因子であることから経口補液剤には必須の電解質である。Glu は腸管からの Na 吸収促進およびエネルギー源として必要となるだけでなく、タンパク質や脂質の異化予防効果を有する。

経口補液剤の処方として Na に対する理想的な Glu の配合比は 1 : 1 から 1 : 3 であり[16]、経口補液剤によっては Glu に Gly を加えた総量で Na との配合比を決定しているものもある。国内で市販されている牛用経口補液剤も同様であり、Na : Glu+Gly の比率が 1 : 1 と 1 : 3 の 2 製剤に大別される。前者の Na 配合比が高い (Na : Glu+Gly=1 : 1) 牛用経口補液剤としてカーフライト S (CF ; 日本全薬工業株式会社、福島、日本)、後者の Na に対して Glu の配合比が高い (Na : Glu+Gly=1 : 3) 牛用経口補液剤としてサラロン (SL ; フジタ製薬株式会社、東京、日本) が販売されている。しかし、これらの処方の異なる経口補液剤の効果を比較した研究はほとんど行われていない。本研究では CF に含まれる Glu を SL まで増量させた CFG、同様に CF に含まれる Glu および Gly を SL まで増量させた CFGG を試作し、下痢症子牛における異なる配合比率の経口補液剤が循環血液量改善および脂質異化抑制に与える効果を比較した。

4.1.1 材料および方法

本研究は National Research Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, 2011)に従って実施した。

本研究には平均日齢 10.4±3.7 日のホルスタイン種 29 頭、ホルスタイン種と黒毛

和種の交雑種 3 頭を供試した。これら子牛の多くは泥状の下痢を呈し、身体一般および血液ガス分析検査により重度のアシドーシスを伴わない軽度の脱水症と診断された。クリプトスポリジウム検出用ストリップテスト (BOX-BIOK-155-10 テスト; コスモバイオ株式会社、東京、日本) により 17/32 頭の下痢便から *C. parvum* が検出された。

本研究は国内で市販されている CF (n=8、カーフライト S) および SL (n=8、サラロン) に加えて、CFG (n=8、カーフライト S に糖を増量) および CFGG (n=8、カーフライト S に糖と Gly を増量) を日本全薬工業株式会社において試作し、これらが無償で提供を受けた。なお、表 4.1.1 に本研究で用いた経口補液剤の組成および Na に対する Glu+Gly 比を示した。経口補液剤の投与方法は定法に従い、規定量を 2 L の温湯に溶解した後、哺乳瓶を用いて臨床獣医師が給与した。なお、抗生物質や抗炎症薬等の経口補液剤以外の投薬は行わなかった。

子牛は試験期間中、飲用水および乾草を自由採食とし、加えて朝と夕の 2 回、体重の 5% (2 L) 量に相当する生乳が給与された。臨床症状の観察と採血は経口補液剤投与前 (pre)、投与後 1 (1 hr)、2 (2 hr)、4 (4 hr) および 24 時間目 (24 hrs) に実施した。糞便性状の評価は Heath et al. [34] の方法 (0 : 正常、1 : 軟便、2 : 泥状便、3 : 水様便) に準拠した。血液サンプルは左頸静脈よりヘパリン添加 1 mL シリンジを用いて嫌氣的に採取し、ポータブル血液ガス分析器 (i-STAT 1 ; アボット社、プリンストン、イリノイ州、アメリカ合衆国) および i-STAT カートリッジ (i-STAT EC8+ ; アボット社) を用いて過剰塩基 (BE) 濃度、ヘマトクリット (Ht) 値およびヘモグロビン (Hb) 濃度を測定した。また、携帯型ケトン体測定器 (プレシジョンエクスィード ; アボットジャパン株式会社、千葉、日本) を用いて血液中 BHBA 濃度の測定を行った。

4.1.2 統計解析

得られた Ht 値、Hb 濃度より循環血漿量指数 (rPV : relative changes in Plasma Volume) を算出した[30]。さらに各採血時点の血液中 BE および BHBA 濃度から pre

値の BE および BHBA 濃度の差をそれぞれ BE 変化量 (rBE: relative changes in Base Excess [73]) および BHBA 変化量 (rBHBA: relative changes in Beta-Hydroxybutyrate) と定義した。

全ての統計解析は市販の統計ソフト (エクセル統計 2010; SSRI、大阪、日本) を用いて行った。得られた値は平均±標準偏差で示した。pre 値に対する平均値の群内変動は、一元配置分散分析により分散を評価した後、*post-hoc* 検定として Dunnett 検定を用いて実施した。各採血時点における群間の平均値の差は、一元配置分散分析により分散を評価した後、Tukey-HSD 検定を用いた。危険率は 5%未満とした。

4.1.3 結果

全ての子牛において下痢症に伴い軽度の眼球陥没や頸部皮膚テントテストの時間延長が認められたが、運動失調や昏睡などの中枢神経症状は確認されなかった。ポータブル血液ガス分析器による検査 (Ht: 28.0%±5.7%、Hb: 9.3±1.9 g/dL、pH: 7.37±0.05、BE: 6.3±4.5 mM) でも軽度の脱水症を認めるのみであった。*C. parvum* は CF、CFG、CFGG、SL 群においてそれぞれ 8 頭中 5 (62.5%)、5 (62.5%)、4 (50.0%) および 3 頭 (37.5%) で検出された。経口補液剤投与前 (=pre) の糞便スコアは CF、CFG、CFGG および SL 群でそれぞれ 2.1±0.4、2.3±0.2、2.3±0.3 および 2.0±0.4 であり、群間での差は認められなかった。経口補液剤投与後 4 時間目 (=4 hr) の糞便スコアは CF、CFG、CFGG および SL 群においてそれぞれ 2.2±0.3、2.3±0.3、2.4±0.4 および 2.2±0.5 となり群内変動および群間変動に差は認められなかった。

図 4.1.1 に異なる配合比率の経口補液剤を軽度下痢症に投与したときの rPV の経時的変化を示した。CF における rPV は pre 値と比較して 2 hr より有意な増加を認め ($p<0.01$)、その変化は 24 hrs まで継続した。同様に CFGG においても 4 hr の rPV は pre 値と比較して有意に高値を示した ($p<0.05$)。一方で CFG および SL の rPV は一時的に軽度の増加を認めるのみであり、有意な変化は確認されなかった。

CFG、CFGG および SL における rBE は 2 hr においてそれぞれ 1.2±1.3、2.3±2.5 および 2.2±1.7 mM となり増加傾向にあったが有意な変化は認めなかった。一方で

CF の 2 hr における rBE (3.5 ± 3.8 mM) は pre 値と比較して有意に高値を示した ($p < 0.01$)。

図 4.1.2 に異なる配合比率の経口補液剤を投与した下痢症子牛における rBHBA の経時的変化を示した。CF および CFG の rBHBA は 4 hr まで有意な変動を認めなかった。一方で CFGG および SL では 4 hr の rBHBA はそれぞれ -0.09 ± 0.06 および -0.06 ± 0.05 mM を示し、pre 値から有意に減少した ($p < 0.05$)。

4.1.4 考察

CF および SL 製剤の Na 濃度はそれぞれ 100.1 mM および 73.9 mM である。循環血液量改善を目的とした経口補液剤に含まれるべき Na 濃度は 90 から 130 mM とされている [72]。さらに Michell et al. [54] は Na 濃度が 73 mM の経口補液剤では脱水症が改善できなかったと報告している。したがって、循環血液量の改善には SL ではなく製剤 Na 濃度が 100.1 mM の CF を選択するべきであり、本研究結果は既報を支持した。しかし、CF に Glu のみを増量した CFG の rPV は試験期間中ほとんど変化が認められなかったことから、Glu を増量したことで高 Na 処方の有用性である循環血液量の改善効果が失われたことになる。これに対して CF に Glu だけでなく Gly も増量した CFGG では 4 hr において rPV が増加したため、腸管での水の吸収には Na と Glu の配合比率だけでなく、Gly の役割が重要であることが示唆された (表 4.1.1)。

Naylor et al. [61] は経口補液剤において酢酸イオンと重炭酸イオンのアルカリ化能の比較を行い、両者の効果が同等であったことを報告している。クエン酸イオンも同様にアルカリ前駆物質であるが、経静脈内投与でのクエン酸イオンはアルカリ前駆物質として有効性が認められず不適切であるとされている [58]。本研究において CFGG と SL のアルカリ化能に差が認めなかったことから、経口補液剤においては酢酸イオンおよびクエン酸イオンのアルカリ化能に差はないと考えられる。一方、CF においてのみ顕著なアルカリ化が認められた。著者が推察するにこれは循環血液量の改善によるものである。つまり、循環血液量の改善は生体内における好気性代謝を促

し、好気性代謝は生体内における L-乳酸を減少させ[14]、その結果としてアルカリ化が生じる。加えて CF に含まれる酢酸イオンのモル濃度が 40.2mM であったのに対して、SL に含まれるクエン酸イオンのモル濃度が 19.3mM と約半量であったことも要因の 1 つと推察できる。

CF に配合されている Glu 濃度は用法用量に従って溶解した場合、57.2 mM である。これに本研究では CF をベースに Glu を添加した CFG および CFGG は SL と同等の Glu を配合している (116.8 mM)。確かに、Glu は直接エネルギーとしてタンパク質や脂質の異化防止効果が期待できるが、経口摂取をした場合には CF に Glu のみを増量した CFG では脂質異化抑制が認められなかった。一方で、CF に対して Glu だけでなく Gly も増量することで SL と同等の脂質異化抑制が得られたことから、脂質異化抑制には Glu だけでなく Gly の必要性が示唆された。つまり、経口補液剤の脂質異化抑制は Glu 濃度が高いだけでなく、Glu と Gly の配合比率がおよそ 1.0 : 1.0 であることが重要である。

要約すると、CF は循環血液量の改善に効果的であるが、脂質異化の抑制は認められなかった。一方で SL は脂質異化抑制に優れているが、循環血液量の改善効果は十分ではなかった。したがって、軽度脱水を伴う下痢症子牛の治療では病態に応じて経口補液剤を使い分けるべきである。つまり脱水症に加え消耗が軽度である急性期には Na 配合比が高い CF を、消耗が進行している慢性期では Na に対して Glu 配合比が高い SL を選択するべきである。

4.2 重度脱水子牛における 5%ブドウ糖加酢酸リンゲル液の異化予防効果

Yamasaki et al. [89] は、人における周術期中のケトン体の増加をブドウ糖添加輸液剤の経静脈内輸液により抑制できたことを報告している。このようにブドウ糖を含む経静脈内輸液療法は、下痢症などの消耗性疾患動物に対し脂質異化を抑制することから有用であると思われる。

したがって、第 4 章第 2 節では酢酸リンゲル液 (AR) と 5%ブドウ糖加酢酸リンゲル液 (ARD) を用いて、下痢生子牛に対して細胞外液補充剤にブドウ糖を添加する優位性を実験的下痢モデルおよび臨床症例を用いて評価した。

4.2.1 材料および方法

本研究は National Research Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, 2011)に従って実施した。本研究では低栄養状態の下痢生子牛において糖配合細胞外液補充剤の異化抑制効果を検討するために、生理食塩液 (ISS : 動物用生食-V 注射液 ; 日本全薬工業株式会社、福島、日本)、酢酸リンゲル液 (AR : 酢酸リンゲル-V 注射液 ; 日本全薬工業株式会社、福島、日本)、5%ブドウ糖加酢酸リンゲル液 (ARD : 試作品 ; 日本全薬工業株式会社、福島、日本) を用いた。これらの被験薬の組成を表 4.2.1 に示した。なお、試験は実験的下痢モデルと臨床症例を用いて実施した。

4.2.1.1 実験的下痢モデルを用いた評価試験

平均日齢 12.0 ± 2.5 日、体重 34.5 ± 5.8 kg のホルスタイン種 2 頭、ジャージー種 4 頭を供試した。3/6 頭においては一週間以上の期間を空けて再度試験に供試した。試験期間中は飲用水および乾草は自由採食とし、1 日 2 回代用乳を給与した。試験開始前において、全ての供試牛で身体一般検査および血液ガス分析所見に異常は認めなかった。これらの子牛に以下の手法を用いて下痢症実験モデルを作出した。市販されている代用乳 (子牛用モー特ミルク 02S ; 化学飼料株式会社、東京、日本) 400g を 4°C

の冷水 3 L に溶解し、朝と夕方の 1 日 2 回給与を行った[56]。実験モデル作出前後で血液中 BHBA 濃度を携帯型ケトン体測定器（プレシジョンエクシード；アボットジャパン株式会社）、過剰塩基（BE）濃度、塩素（Cl）濃度、ヘマトクリット（Ht）値およびヘモグロビン（Hb）濃度をポータブル血液ガス分析器（i-STAT 1,；アボット社）および i-STAT カートリッジ（i-STAT EC8+；アボット社）を用いて測定した。

各被験静脈内輸液剤を投与する直前に 14 ゲージ留置針（サーフロー[®]留置針、テルモ株式会社、東京、日本）を右頸静脈に留置し持続点滴を行った。供試牛に投与量 80 mL/kg の ISS（ISS 群；n=3）、AR（AR 群；n=3）または ARD（ARD 群；n=3）のいずれかを、20 mL/kg/hr の投与速度で静脈内投与した。採血は輸液剤の投与直前（base）、投与後 30 分（0.5 hr）、1 時間（1 hr）、投与終了（post：投与開始後 4 時間目）そして投与開始後 24 時間目（24 hrs）に行った。血液サンプルは左頸静脈からヘパリン添加 1 mL シリンジを用いて嫌氣的に採取した。

4.2.1.2 野外臨床症例を用いた評価試験

野外での自然発症例を用いた臨床試験は 2015 から 2016 年に北海道道南地域で実施した。臨床症例は平均日齢 9.6±3.1 日、体重約 40 kg の 16 頭の下痢発症子牛であり、内訳はホルスタイン種 13 頭およびホルスタイン種と黒毛和種の交雑種 3 頭であった。全ての供試牛は身体一般検査および血液ガス分析所見により脱水および代謝性アシドーシスが確認され、臨床獣医師により経静脈内輸液療法が必要と診断された。これらの子牛は直腸内に泥状または水様下痢を認め、糞便検査においてクリプトスポリジウム検出用ストリップテスト（BOX-BIOK-155-10 テスト；コスモバイオ株式会社、東京、日本）により 13/16 頭（81.3%）で *C. parvum* が検出された。経静脈内輸液開始直前に 14 ゲージ留置針（サーフロー[®]留置針、テルモ株式会社、東京、日本）を右頸静脈に留置し、投与量 100 mL/kg の AR（AR 群；n=8）または ARD（ARD 群；n=8）のいずれかを、25 mL/kg/hr の投与速度で経静脈内輸液した。採血は被験輸液剤投与直前（base）、投与後 30 分（0.5 hr）、1 時間（1 hr）、2 時間（2 hr）、投与終了（post：投与開始後 4 時間目）そして輸液開始後 24 時間目（24 hrs）に行っ

た。血液サンプルは左頸静脈よりヘパリン添加 1 mL シリンジを用いて嫌氣的に採取した。採取した血液を用いて前述の実験的下痢モデル試験と同様に血液中 BHBA、BE 濃度、Ht 値および Hb 濃度を測定した。

4.2.2 統計解析

全ての統計解析は市販の統計ソフト（エクセル統計 2010；SSRI、大阪、日本）を用いて行った。得られた値は平均±標準偏差で示した。実験的下痢モデルおよび臨床症例においてそれぞれの base 値に対する各時点の測定値の群内変動は一元配置分散分析により分散を評価した後に *post-hoc* 検定として Dunnett 検定を行った。実験的下痢モデルの各採血時点における群間変動の評価は、一元配置分散分析により分散を評価した後、各群の平均値の差の検定を Tukey-HSD 検定を用いて行った。同様に臨床症例において、群間の平均値の差の検定は *F* 検定後、等分散であれば Student *t* 検定、非等分散であれば Mann-Whitney *U* 検定を用いて評価した。危険率は 5%未満とした。

4.2.3 結果

4.2.3.1 実験室内における下痢発症モデルを用いた評価試験

実験的下痢モデル作出前 (pre) の血液中 BE 濃度 (図 4.2.1) は 5.9 ± 1.5 mM であったが実験的下痢モデル作出後 (base) には -9.1 ± 3.8 mM と有意に低下し ($p < 0.001$)、アシドーシス状態を作出することができた。一方、pre の血液中 BHBA 濃度は 0.19 ± 0.12 mM であったのに対し、base では 0.32 ± 0.21 mM と増加傾向が認められた (図 4.2.2)。実際には、血液中 BHBA 濃度はモデル作出前後において有意な変化は認められなかったが、全ての実験的下痢モデルにおいて血液中 BHBA 濃度が 0.2 mM 以上を呈していた。したがって、本試験における実験的下痢モデルでは中程度のアシドーシスおよび軽度の異化亢進状態を作出した。

実験的下痢モデルに対して ISS、AR および ARD のそれぞれの経静脈内輸液により、投与開始直後から rPV は漸次増加して最終的には post においてそれぞれ

124.7%±14.2%、136.3%±18.2%および120.9%±8.0%までに有意に増加したが ($p<0.05$)、輸液剤の種類による rPV の増加量の有意な違いは認められなかった。各種輸液剤投与による血液中 BE 濃度の経時的変化において、ISS 群では ISS 投与による BE 濃度の減少傾向が、AR および ARD 群では投与開始から終了まで BE 濃度が増加する傾向が認められたが統計学的な差は認められなかった。

図 4.2.3 に実験的下痢モデルにおける ISS、AR または ARD 投与による血液中 BHBA 濃度の経時的変化を示した。投与終了(post)時における ISS および AR 群の血液中 BHBA 濃度はそれぞれ、 0.53 ± 0.21 および 0.37 ± 0.25 mM であり、base 値と比較して増加する傾向が認められたが統計学的な差は認められなかった。対照的に ARD 群の血液中 BHBA 濃度は、輸液剤投与開始直後である 0.5 hr には 0.03 ± 0.06 mM まで有意に減少し ($p<0.05$)、1 hr ($p<0.01$) 以降投与中は検出されなかった。

ISS 群の血液中 Cl 濃度は base 値 (102.4 ± 5.4 mM) に対して投与終了後 (post) には 107.5 ± 4.6 mM まで有意に増加したが ($p<0.05$)、AR および ARD 群では血清中 Cl 濃度の有意な変動は認められなかった。

4.2.3.2 野外臨床症例を用いた評価試験

臨床試験において AR または ARD の静脈内投与による rPV の経時的変化を図 4.2.4 に示した。AR および ARD 群において rPV は 1 hr より有意な増加を認め ($p<0.05$)、post ではそれぞれ $179.0\%\pm 58.6\%$ および $144.3\%\pm 22.9\%$ に達し ($p<0.01$)、これらの値は両群間で有意な差は認められなかった。Post における血液中 BE 濃度は AR および ARD 群の全ての子牛で増加傾向にあったが、base 値と比較して統計学的な有意差は認められなかった。

臨床症例における AR または ARD の静脈内投与による血液中 BHBA 濃度の経時的変化を図 4.2.5 に示した。AR 群において血液中 BHBA 濃度は base 値の 0.21 ± 0.08 に対して post では 0.38 ± 0.34 mM まで増加する傾向が認められた。一方、ARD 群における血液中 BHBA 濃度は base 値の 0.23 ± 0.07 に対して post では 0.06 ± 0.05 mM まで有意に減少した ($p<0.05$)。したがって、post における ARD 群の血液中 BHBA 濃

度は AR 群のそれと比較して有意に低値を示した ($p<0.05$)。

4.2.4 考察

本研究において AR および ARD の経静脈内輸液では循環血液量の改善、代謝性アシドーシスの補正が確認された。また、AR の経静脈内輸液では脂質異化を抑制することはできなかったが、ARD の経静脈内投与により有意に血液中 BHBA 濃度を低下させることを確認した。

実験的下痢モデルおよび臨床症例のいずれにおいても細胞外液補充剤である ISS、AR および ARD の経静脈内投与は同等の循環血液量の改善を認めた。このことは、細胞外液補充剤であれば輸液剤の種類や糖の配合の有無によって循環血液量の改善効果に差がないことを示している。

実験的下痢モデルにおいて ISS の経静脈内投与は更なる血液中 BE 濃度の低下を招いた。Barker [7]は 0.9%食塩液の静脈内投与は血清 Cl 濃度を増加させることで代謝性アシドーシス（高 Cl 性アシドーシス）を引き起こすと報告している。本研究でも ISS が血液中 BE 濃度を低下させた原因として血液中 Cl 濃度の増加が挙げられる。したがって、代謝性アシドーシスを伴う下痢症子牛においては、アルカリ前駆物質を含まない輸液製剤の使用を控えるべきであろう [38]。実験的下痢モデルおよび臨床症例において AR および ARD の静脈内投与では軽度の血液中 BE 濃度の増加が確認されたが、両群間で有意な差が認められなかった。よって、酢酸リンゲル液は糖を 5% 配合しても代謝性アシドーシス補正能に差は生じないことが示唆された。

実験的下痢モデルにおける ISS、AR および臨床症例における AR の静脈内投与は血液中 BHBA 濃度を増加させることから脂質異化を亢進させていると思われる。循環血液量が改善された後には細胞膜上の ATP 依存性 Na^+/K^+ 共輸送体やコリ回路が活性化するが、これらの反応はエネルギー (ATP) を必要とするために直接エネルギーであるブドウ糖を配合しない ISS および AR の経静脈内投与ではエネルギーの消費を増長するために異化が亢進する。一方で実験的下痢モデルおよび臨床症例において ARD を静脈内投与した子牛では血液中 BHBA 濃度の有意な低下および消失が認めら

れたことから直接エネルギーである糖を配合した **ARD** では脂質異化の抑制だけでなくケトン体の消失効果が確認された。この結果は、外因性のブドウ糖により糖代謝が維持されたことによるものと考えられた。ヒトの周術期におけるブドウ糖の投与は血糖を維持し糖新生を抑制する。その結果、骨格筋の分解やケトン体の上昇をコントロールすることが可能となる[44, 70, 89]。よって、下痢症子牛に対してブドウ糖を配合した細胞外液補充剤の経静脈内投与は血糖を維持し糖新生を抑制することで骨格筋の分解やケトン体の上昇をコントロールできるものと推察した。本研究において酢酸リンゲル液に糖を配合しても循環血液量改善およびアシドーシス補正効果を保持し、脂質異化抑制効果が付与されることが明らかとなった。したがって、**ARD** は、消耗性疾患である下痢症子牛体液補充療法において適切な輸液剤であると考えられる。

4.3 *Cryptosporidium* 下痢症子牛における末梢静脈内栄養輸液の有用性

C. parvum は子牛の下痢便から頻繁に検出される病原体であり、腸粘膜を障害し吸収不良性下痢を引き起こす[45, 55, 93]。DAO は小腸の絨毛上皮細胞において産生される酵素であり、小腸におけるヒスタミン分解に重要な役割を果たす[41, 75]。DAO は腸粘膜障害の血清バイオマーカーとして有用であることが報告されており[3]、腸粘膜障害の程度は血液中 DAO 活性値を測定することで知ることができる[3, 26]。吸収不良性下痢は腸管からの炭水化物、脂質、アミノ酸吸収を障害し[24]、食欲不振は NEB を助長させる[92]。したがって、1) NEB を防ぐこと、2) 障害された腸粘膜修復へのエネルギー供給は *C. parvum* 下痢症において重要な補助的治療となる[15]。牛においてはエネルギーを供給する方法としてブドウ糖製剤を用いた経静脈内栄養輸液療法が行われている[9]。したがって、第 4 章第 3 節では血漿中 DAO 濃度、治療日数を指標として、ブドウ糖およびアミノ酸を含む栄養輸液療法とブドウ糖のみによる栄養輸液療法について治療効果の比較を行った。

4.3.1 材料および方法

本研究は National Research Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals (National Academy Press, 2011) に従って実施した。本研究の供試牛は平均日齢 11.3 ± 4.4 日の下痢症子牛 16 頭であり、内訳はホルスタイン種 5 頭、ホルスタイン種と黒毛和種の交雑種 6 頭および黒毛和種 5 頭であった。クリプトスポリジウム検出用ストリップテスト (BOX-BIOK-155-10 テスト; コスモバイオ株式会社) により全ての子牛の下痢便から *C. parvum* が検出された。これらの子牛は重度 (泥状~水様) の下痢症を呈し、身体一般検査および血液ガス分析所見により軽度の脱水症および代謝性アシドーシスが確認された。

被験輸液剤はヒト用に市販されているブドウ糖およびアミノ酸を配合した静脈内総合栄養輸液製剤 (ユニカリック L; テルモ株式会社) および 15%ブドウ糖製剤であり、熱量はともに 600 kcal に調節した。これらの被験輸液製剤の組成を表 4.3.1 に要

約した。下痢症子牛への輸液計画は定法に従い初めに細胞外液の補充を行い、循環血漿量が確保された後に栄養輸液剤を経静脈内投与した。具体的には、第 I 相として全ての子牛に脱水症の改善を目的として細胞外液補充剤である酢酸リンゲル液（酢酸リンゲル液 V 注射液；日本全薬工業株式会社）を 20 mL/kg/hr の投与速度で 3,000 mL 輸液した。第 II 相では栄養輸液としてヒト用経静脈内総合栄養輸液剤であるユニカリック L（PPN 群， n=8）または 15%ブドウ糖液（Dex 群，n=8）をそれぞれ 2 時間かけて 1,000 mL 静脈内投与した。経静脈内栄養輸液は沈鬱、食欲不振の改善が認められるまで最大 2 日間行うものとし、活力、食欲の回復および糞便性状の改善が認められた時点で治療を終了した。本研究において計画した輸液療法の他に支持療法として初診時に、20 mg/kg のオキシテトラサイクリン（テラマイシン[®]・LA；ゾエティス・ジャパン株式会社、東京、日本）および非ステロイド系抗炎症剤であるメロキシカム（メタカム[®]2%注射液；共立製薬株式会社、東京、日本）の 0.5 mg/kg の皮下投与を全頭で実施した。1 ないし 2 日間の経静脈内栄養輸液を行った後、再び沈鬱、食欲不振に陥り経静脈内輸液療法が必要となった症例については、前述の栄養輸液療法は行わず脱水症および代謝性アシドーシスの改善を目的とした経静脈内輸液療法を行った。

経静脈内輸液療法は 14 ゲージ留置針（サーフロー[®]留置針；テルモ株式会社）を右頸静脈に留置して行った。血液サンプルは左頸静脈よりヘパリン添加 1 mL シリンジおよびヘパリン非添加 5 mL シリンジを用いて嫌氣的に採取した。サンプリングは輸液療法直前（pre）、輸液終了直後（post）および輸液療法開始後 24 時間目（24 hrs）に実施した。ヘパリン添加血液サンプルを用いて血液 pH および過剰塩基（BE）濃度をポータブル血液ガス分析器（i-STAT 1,；アボット社）および i-STAT カートリッジ（i-STAT EC8+；アボット社）、血液中 BHBA 濃度を携帯型ケトン体測定器（プレシジョンエクシード；アボットジャパン株式会社）を用いて測定を行った。ヘパリン非添加血液サンプルは EDTA-2K 真空採血管（ベノジェクト[®] II 真空採血管、テルモ株式会社）に分注し、室温において 3,000g、15 分間の遠心分離により血漿を得た。これらの血漿を用いて血漿中遊離アミノ酸濃度をアミノ酸分析キット（EZfaast、島

津ジーエルシー株式会社、京都、日本)、アミノ酸分析装置(Prominence、LCMS-2020、島津製作所、京都、日本)を用いて超高速液体クロマトグラフ法(HPLC: High Performance Liquid Chromatography 法)で測定した。血漿中遊離アミノ酸の詳細な測定法は第3章に記した。血漿中 DAO 活性の測定は市販の Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) キット (Bovine Diamine Oxidase ELISA kit、 My BioSource、サンディエゴ、アメリカ合衆国)を用いて行った。

4.3.2 統計解析

得られた各血漿中遊離アミノ酸濃度より、血漿中総遊離アミノ酸(TAA: スレオニン+バリン+メチオニン+イソロイシン+ロイシン+フェニルアラニン+ヒスチジン+リジン+アルギニン+トリプトファン+セリン+グルタミン酸+グリシン+アラニン+チロシン+プロリン+アスパラギン酸+アスパラギン+グルタミン+シスチン) および BCAA (バリン+イソロイシン+ロイシン) 濃度の算出を行った。

全ての統計解析は市販の統計ソフト(エクセル統計 2010; SSRI、大阪、日本)を用いて行った。得られた値は平均±標準偏差で示した。各サンプリングポイントにおける測定項目の pre 値に対する群内変動を一元配置の分散分析により分散を評価した後、*post-hoc* 検定として Dunnet 検定により評価した。各サンプリングポイントにおける群間の平均値の差の検定は *F* 検定により分散を評価した後、等分散であれば Student の *t* 検定、非等分散であれば Mann-Whitney *U* 検定を用いて評価した。加えて治療期間中に行われた経静脈内栄養輸液以外の追加輸液量および治療日数の調査を診療記録簿より抜粋し、群間の比較には Mann-Whitney *U* 検定を用いて評価した。危険率は 5%未満とした。

4.3.3 結果

供試牛 16 頭全てで軽度の脱水症および運動失調などの中枢神経症状が認められた。PPN 群および Dex 群の pre における血液 pH はそれぞれ 7.22 ± 0.08 および 7.25 ± 0.07 であり、いずれもアシデミアを呈していた。同様に pre における血液中 BE 濃度は

PPN 群で -6.6 ± 7.1 mM、Dex 群で -4.5 ± 4.7 mM であり軽度の代謝性アシドーシスが認められた。

初診時における栄養輸液療法の結果、翌日 (24 hrs) の血液ガス分析値は PPN 群 (血液 pH: 7.27 ± 0.05 、BE 濃度: -2.4 ± 3.2 mM) および Dex 群 (血液 pH: 7.29 ± 0.06 、BE 濃度: -0.7 ± 4.2 mM) であり、代謝性アシドーシスの改善傾向が認められた。しかし、24 hrs においても沈鬱および食欲不振を呈する症例が PPN 群および Dex 群でそれぞれ 2/8 頭 (25%) および 4/8 頭 (50%) 認められたため、これらの症例にはそれぞれの経静脈内栄養輸液を再度実施した。

治療成績の比較において、PPN 群では 8 頭全ての子牛が 10 日以内に治癒したが、Dex 群では 8 頭中 2 頭 (25%) の子牛が死亡した。PPN 群および Dex 群における追加静脈輸液量はそれぞれ 2.2 ± 4.5 および 13.0 ± 18.3 L であった。しかし追加の静脈輸液量において両群間で有意差を認めなかった。治療日数の比較では PPN 群および Dex 群の治療日数はそれぞれ 6.0 ± 3.2 および 11.7 ± 4.7 日であり、PPN 群で有意に診療日数の短縮が認められた ($p<0.001$)。

栄養輸液終了時点である post において、Dex 群の血漿中 TAA 濃度は $2,101.9\pm 388.6$ μ M であり、輸液開始直前 (pre) の $2,662.5\pm 548.8$ μ M と比較して有意に減少した ($p<0.001$)。しかし、アミノ酸を配合しているヒト用総合栄養輸液剤を投与した PPN 群の血漿中 TAA 濃度は、pre の $2,580.5\pm 420.4$ μ M に対して post では $3,135.6\pm 796.9$ μ M と有意な変動は認められなかった。その結果、Dex 群の post における血漿中 TAA 濃度は PPN 群のそれと比較して有意に低値を示した ($p<0.01$)。

Dex 群における post の血漿中 BCAA 濃度は 393.3 ± 126.8 μ M であり pre 値の 581.1 ± 92.9 μ M と比較して有意に低下した ($p<0.01$)。PPN 群における post の血漿中 BCAA 濃度は 808.2 ± 175.6 μ M であり pre 値の 576.9 ± 140.5 μ M と比較して有意に増加した ($p<0.05$)。その結果、Dex 群の post における血漿中 BCAA 濃度は PPN 群のそれと比較して有意に低値を示した ($p<0.001$)。しかし、24 hrs の血漿中 TAA および BCAA 濃度は両群共に pre 値に復していたため、両群間の差は認められなかった。

PPN 群の血液中 BHBA 濃度は pre の 0.14 ± 0.07 mM に対して post でも 0.11 ± 0.04 mM であり経静脈内栄養輸液前後で有意な変動を認めなかった。一方、Dex 群の血液中 BHBA 濃度は pre の 0.15 ± 0.08 mM に対して post では 0.06 ± 0.05 mM と有意に減少した ($p < 0.01$)。したがって、post 値における Dex 群の血液中 BHBA 濃度は PPN 群のそれより有意に低値を示した ($p < 0.05$)。

600kcal に相当する熱量の経静脈内栄養輸液を行った下痢症子牛における血漿中 DAO 活性値の経時的変化を図 4.3.1 に示した。PPN 群および Dex 群における pre の血漿中 DAO 活性はそれぞれ 81.5 ± 52.7 IU/mL および 83.4 ± 52.7 IU/mL であり、両群間に有意な差は認められなかった。グルコースのみで 600 kcal の熱量を付与した Dex 群では、栄養輸液剤投与後 (post) における血漿中 DAO 活性値は 100.2 ± 45.1 IU/mL であり、pre 値に対して有意な変化は認められなかった。一方、アミノ酸とグルコースで 600 kcal の熱量を付与した栄養輸液剤を投与した PPN 群では、投与終了時(post)における血漿中 DAO 活性値は 118.3 ± 42.3 IU/mL であり、pre 値のそれよりも有意に高値を示した ($p < 0.05$)。

4.3.4 考察

Dex 群の post における血漿中 TAA および BCAA 濃度は pre 値と比較して有意に減少した。絶食時肝臓で生産される糖は骨格筋においてピルビン酸へと変換される。その後、ピルビン酸は BCAA に由来する窒素を転移してアラニンを生成し、糖新生のため肝臓で再度糖へと変換される (グルコース-アラニン-BCAA 経路) [63]。本研究結果より、過剰なブドウ糖の供給はグルコース-アラニン-BCAA 経路を活性化して生体内の BCAA の利用を加速させている可能性が考えられる。つまり、Dex 群において 24 hrs の血漿中 TAA および BCAA 濃度が pre 値に復した理由として生体内遊離アミノ酸プールの恒常性維持と組織タンパク質の分解が亢進した結果であると思われた。一方、PPN 群における 24 hr の血漿中 BCAA 濃度の低下は、BCAA がタンパク質合成、タンパク質異化抑制および直接的または間接的に生体内で利用[17, 50]された可能性が考えられるが明らかではない。

Dex 群における血液中 BHBA 濃度の低下は、外因性のブドウ糖により糖代謝が維持された結果、脂質異化が抑制されたことによるものと考えられる。しかし、アミノ酸とブドウ糖を含む PPN 群では、血液中 BHBA 濃度に変化を認めなかった。その理由のひとつとして、血漿中遊離アミノ酸濃度の急激な増加はブドウ糖の生体内での利用を抑制することが挙げられる[43, 64]。つまり、PPN 群において血液中 BHBA 濃度の有意な減少が認められなかった理由として、BCAA やアラニンなどの糖源性アミノ酸の利用や代謝が亢進したことに起因するものと思われる。

Dex 群では、栄養輸液剤投与後 (post) における血漿中 DAO 活性値は、pre 値に対して有意な変化は認められなかった。一方、PPN 群では、投与終了時(post)における血漿中 DAO 活性値は、pre 値のそれよりも有意に高値を示した。これは、PPN 群では Dex 群と比較して腸絨毛の再生に必要なエネルギーだけでなく基質となるアミノ酸を補給したことによるものと推察できる。PPN 群が Dex 群と比較して血漿中 DAO 活性値が有意に増加していることは、PPN 群の治療日数が Dex 群のそれよりも有意に短いことを裏付ける大きな理由になり得る。つまり、PPN 群で治療日数が短縮した理由として血漿中 DAO 活性値の上昇に裏付けられた腸絨毛の修復が考えられる。ラット[32]やウサギ[21]においてグルタミンやアルギニンの投与が腸粘膜の再生に有効であるとの報告がある。さらにアミノ酸は生体反応に重要なシグナル伝達[50]や免疫反応[60]においても重要な役割を果たしていることから短期的または長期的なアミノ酸投与は栄養失調に陥った患者に有用であろう[37, 90]。

C. parvum 感染症による子牛の下痢症において有効な治療方法は確立されていないため、臨床獣医師は輸液療法などの支持療法にたよらざるをえない[23]。原因療法にはなり得ないが、本研究結果によりアミノ酸を含む栄養管理は *C. parvum* によって損傷した腸絨毛の修復が期待できるために、*C. parvum* 下痢症の支持療法として有効であることが示唆された。

4.4 小括

第4章では、下痢症子牛の病態生理学および重症度に基づいて経口または経静脈内輸液療法における糖およびアミノ酸の有用性について評価した。

第4章第1節では処方異なる4種類の経口補液剤を用いて、下痢症子牛における循環血液量の改善および脂質異化抑制効果に適した処方とはどのようなものかを検証した。その結果、経口補液剤に含まれるナトリウム (Na)、ブドウ糖 (Glu)、グリシン (Gly) の量に加えてその比率が重要であることが示唆された。例えば、Na (100.1 mM) が高濃度に配合され、Na : Glu : Gly が 1.0 : 0.6 : 0.6 で処方された経口補液剤では循環血液量の改善に優れていた。一方、脂質異化抑制に優れた経口補液剤は Glu (116.8 mM) が高濃度に配合され、Glu : Gly がおよそ 1.0 : 1.0 で処方されたものが有効であった。したがって、下痢症子牛の経口補液療法は脱水症に加え消耗が軽度である急性期には Na 強化型 (CF)、進行性の消耗を伴う慢性期の下痢症に対しては Glu 強化型 (SL) を処方することが望ましい。

第4章第2節では酢酸リンゲル液 (AR) と 5%ブドウ糖加酢酸リンゲル液 (ARD) を用いて、下痢症子牛における細胞外液補充剤に糖を添加する意義について実験的下痢モデルおよび臨床症例を用いて評価した。その結果、実験的下痢モデルおよび臨床症例における AR の静脈内投与では循環血液量の改善に伴い血液中 BHBA 濃度が増加する傾向が認められ、さらなる消耗を引き起こすことが示唆された。対照的に 5%ブドウ糖を配合した ARD の静脈内投与では実験的下痢モデルおよび臨床症例のいずれも血液中 BHBA 濃度の著減が確認された。この結果は、外因性のブドウ糖を付与することにより糖代謝が維持されるものと思われる。したがって、下痢症子牛においてブドウ糖を細胞外液補充剤に配合することは血液中 BHBA 濃度の低下によって裏付けられる脂質異化抑制に有効であることから、ARD は NEB の下痢症子牛に適切な静脈内輸液剤であることが示唆された。

第4章第3節では *C. parvum* 下痢症子牛を用いて、アミノ酸およびブドウ糖 (PPN 群) またはブドウ糖のみ (Dex 群) で熱量を付与する栄養輸液療法の治療効果を比較した。PPN 群では経静脈内栄養輸液終了時の血漿中 DAO 活性値が pre 値と比較して

有意に増加した。血漿中 DAO 活性値の増加は腸絨毛の再生を示唆するものであり、その結果、PPN 群の治療日数は Dex 群のそれと比較して有意に短縮した。したがって、ブドウ糖にアミノ酸を加えた経静脈内栄養輸液療法は、*C. parvum* など腸絨毛の損傷に起因する下痢症子牛において適切な静脈内輸液剤であることが確認された。

表 4.1.1.1 被験経口補液剤の組成

	Na (mM)	Glu (mM)	Gly (mM)	酢酸イオン (mM)	クエン酸イオン (mM)	浸透圧 (mOsmol/L)	Na:Glu+Gly比
CF	100.1	57.2	57.3	40.2	-	359.0	1.0 : 1.1
CFG	100.1	116.8	57.3	40.2	-	396.0	1.0 : 1.7
CFGG	100.1	116.8	110.1	40.2	-	454.0	1.0 : 2.3
SL	73.9	116.8	110.1	-	19.3	441.0	1.0 : 3.1

CF：カーフライトS (日本全薬工業株式会社)

CFG：カーフライトS+Glu (試作品)

CFGG：カーフライトS+Glu+Gly (試作品)

SL：サラローン (フジタ製薬株式会社)

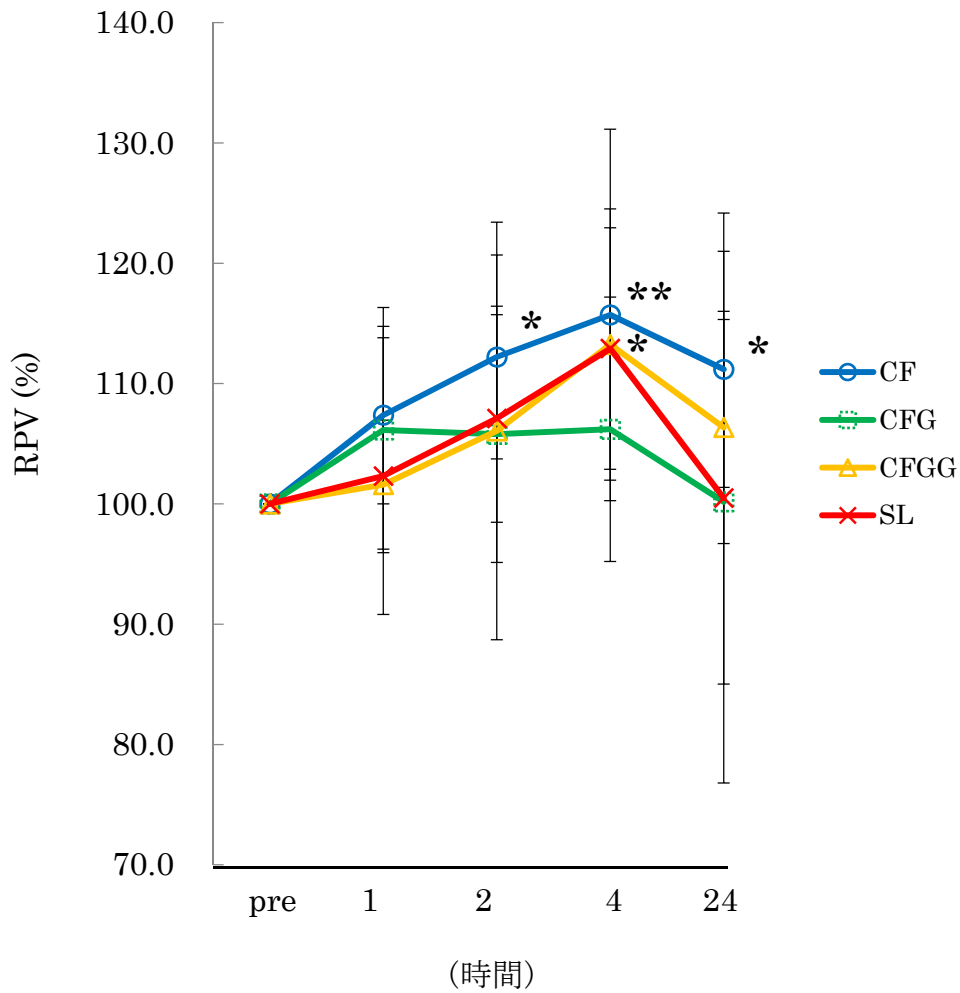


図 4.1.1 Na:Glu+Gly 比の異なる経口補液剤投与による循環血漿量指数 (rPV) の経時的変化

CF (n=8)、CFG (n=8)、CFGG (n=8)、SL (n=8)

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

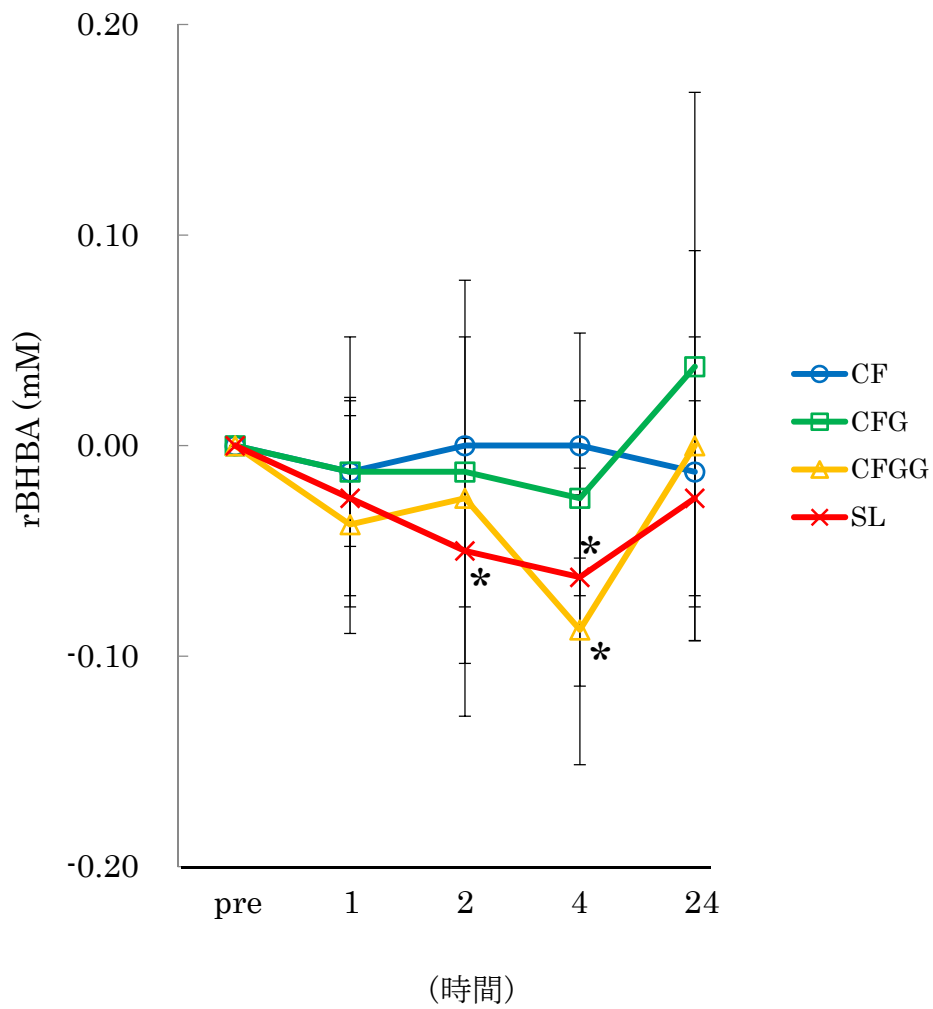


図 4.1.2 Na:Glu+Gly比の異なる経口補液剤投与による血液中BHBA濃度変化量 (rBHBA) の経時的変化

CF (n=8)、CFG (n=8)、CFGG (n=8)、SL (n=8)

* : $p < 0.05$

表 4.2.1 被験静脈輸液剤の組成

	Na ⁺ (mEq/L)	K ⁺ (mEq/L)	Ca ⁺⁺ (mEq/L)	Cl ⁻ (mEq/L)	酢酸イオン (mEq/L)	Glu (mg/dL)	浸透圧 (mOsmol/L)
ISS	154.0	-	-	154.0	-	-	285
AR	130.0	4.0	3.0	109.0	28.0	-	255
ARD	130.0	4.0	3.0	109.0	28.0	5.0	566

ISS：動物用生食-V注射液（日本全薬工業株式会社）

AR：酢酸リンゲル-V注射液（日本全薬工業株式会社）

ARD：5%ブドウ糖加酢酸リンゲル液（試作品）

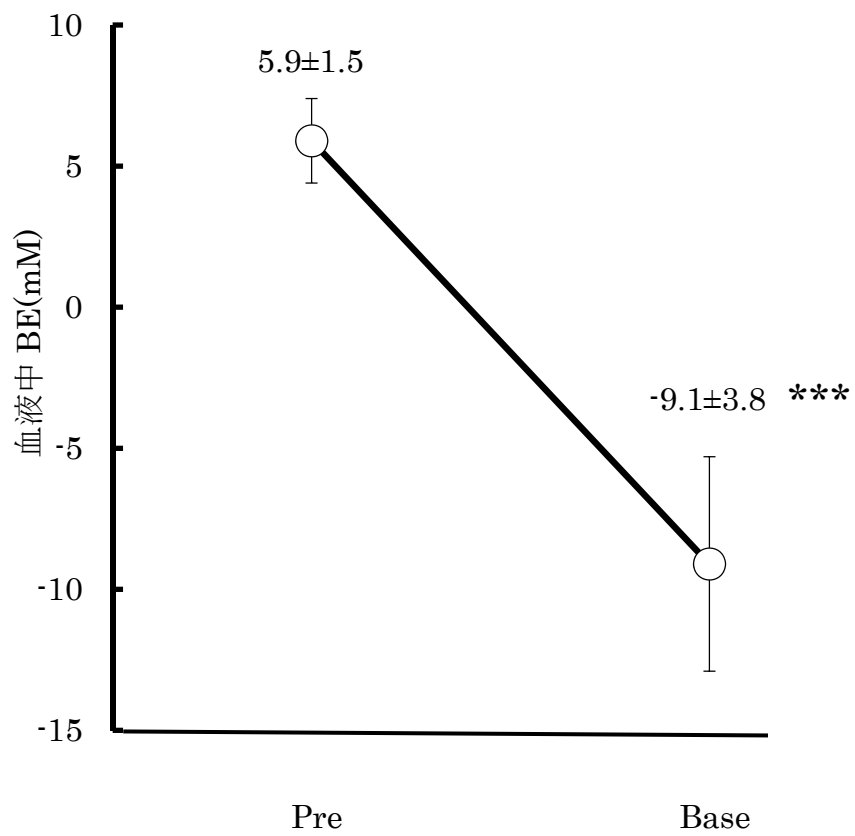


図 4.2.1 実験的下痢モデル作出前後の血液中 Base Excess (BE) 濃度の変化
n=9
***: $p < 0.001$

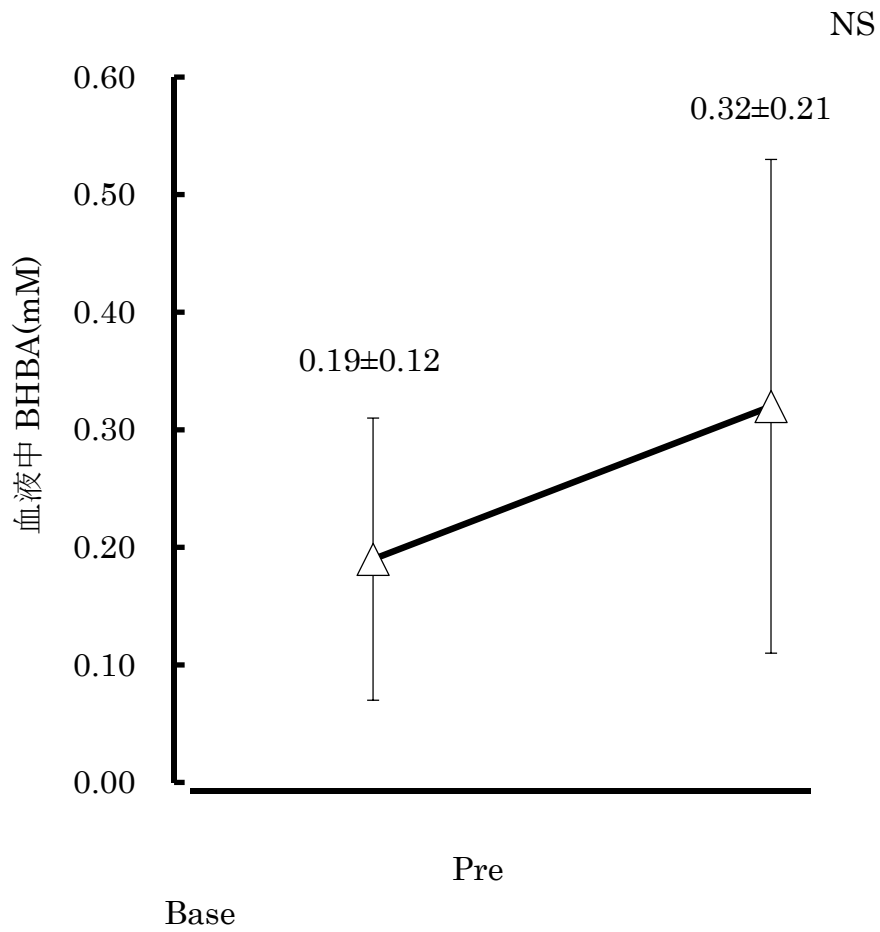


図 4.2.1 実験的下痢モデル作出前後の血液中 Base Excess (BE) 濃度の変化
 n=9
 ***: $p < 0.001$

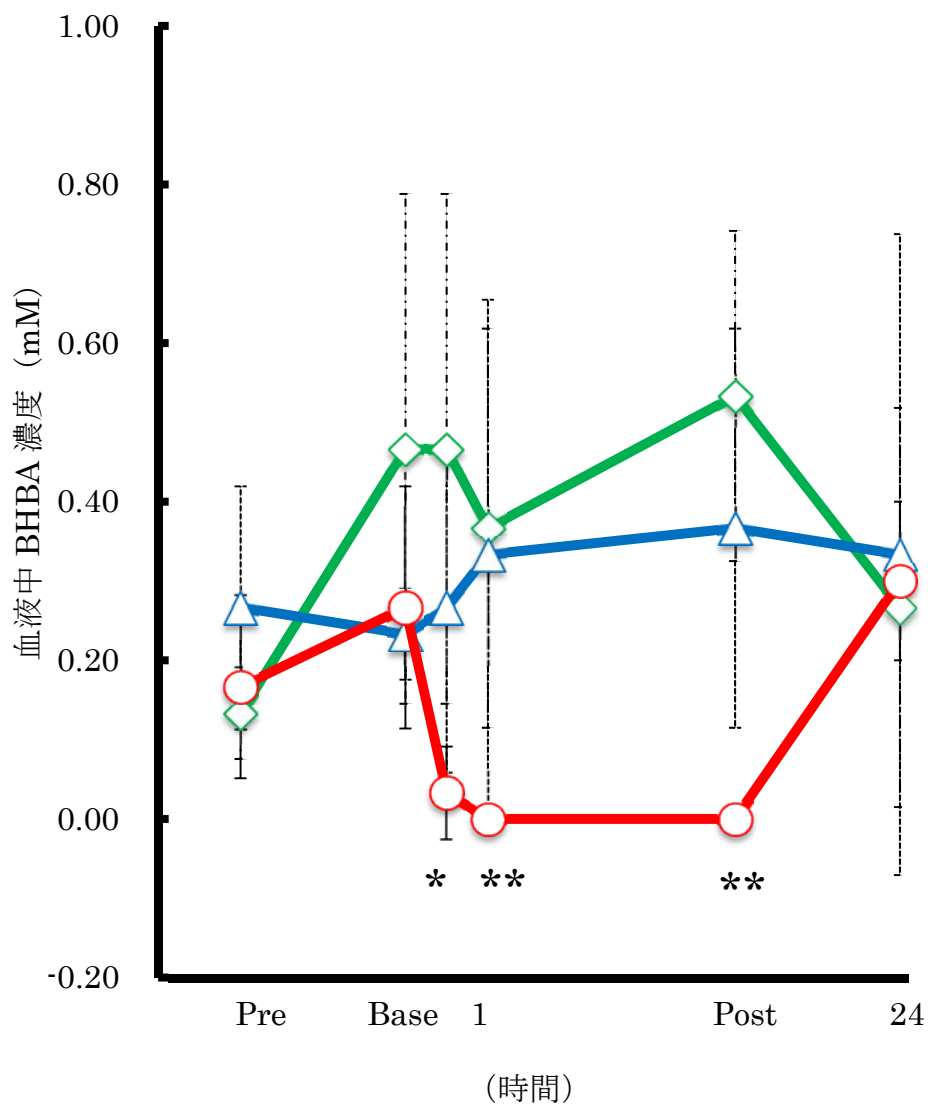


図 4.2.3 実験的下痢モデルにおける血液中 β -ヒドロキシ酪酸 (BHBA) 濃度の経時的変化

ISS (n=3)、AR (n=3)、ARD (n=3)

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

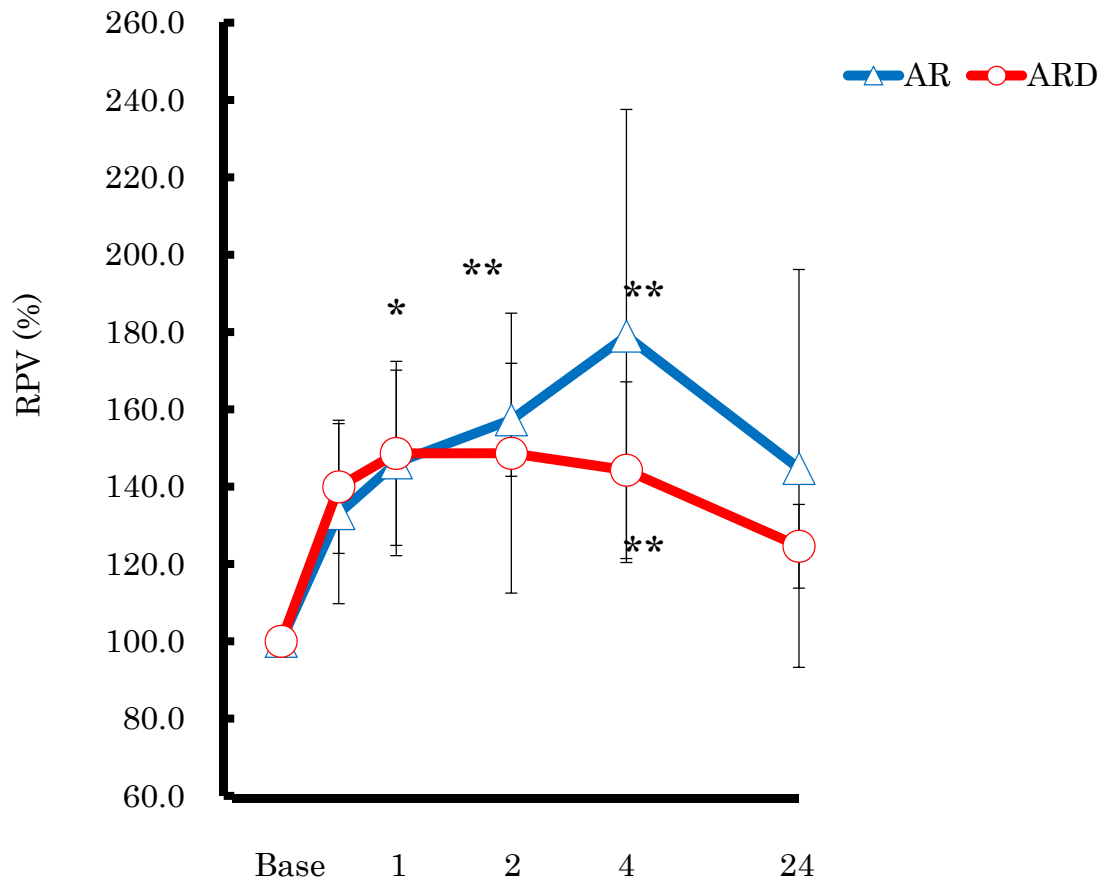


図 4.2.4 臨床症例における循環血漿量指数 (rPV) の経時的変化
AR (n=8)、ARD (n=8)

* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

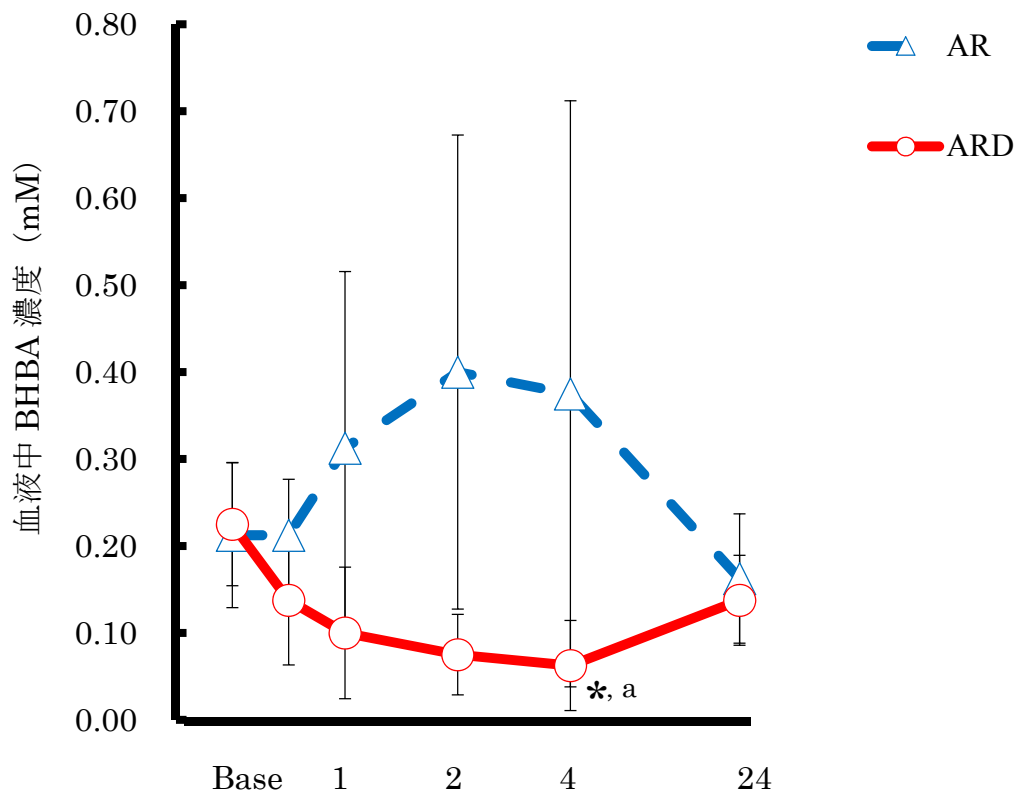


図 4.2.5 臨床症例における血液中 β -ヒドロキシ酪酸 (BHBA) 濃度の経時的変化
AR (n=8)、ARD (n=8)

* : $p < 0.05$ ^a : vs AR, $p < 0.05$

表 4.3.1 被験栄養輸液剤の組成

	総遊離アミノ酸 (g)	BCAA含有比 (%)	ブドウ糖 (g/dL)	非タンパク熱量 (kcal)	総熱量 (kcal)
PPN 群	25.03	31.00	12.5	500.0	600.0
Dex 群	-	-	15.0	600.0	600.0

PPN 群：ユニカリックL

Dex 群：15%ブドウ糖製剤

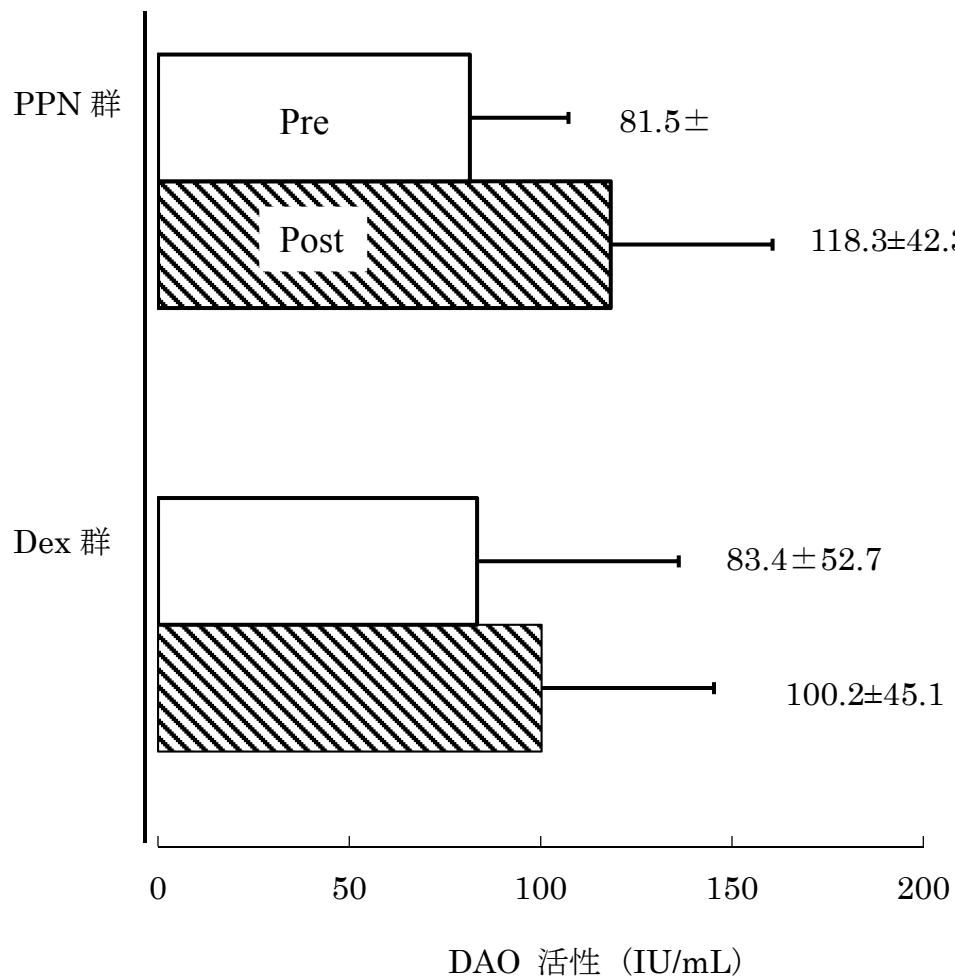


図 4.3.1 PPN 群および Dex 群における血漿中 Diamine Oxidase (DAO) 活性値の比較

PPN 群 (n=8)、Dex 群 (n=8)

* : $p < 0.05$

第 5 章

総 括

本研究は下痢症子牛における経口および経静脈内栄養輸液療法において適正な輸液剤とはどのような処方であるかを明らかにすることを目的とした。

第2章では下痢症子牛における栄養管理の必要性を確認する目的で、初診時より経静脈内輸液療法が実施され、肺炎、気管支炎、臍帯炎など重度の合併症を伴わない221頭の下痢症子牛の診療記録簿から、血液検査所見に基づいた下痢症子牛の死亡率を高めるリスク因子の抽出を試みた。その結果、呼吸性代償不全（オッズ比 2.63; 95% 信頼区間 1.05-6.62; $p=0.04$ ）および低血糖症（オッズ比 2.63; 95% 信頼区間 1.05-6.62; $p=0.04$ ）が下痢症子牛の死亡リスク因子として抽出された。本調査では呼吸性代償不全は重度の脱水症が関与している可能性があり[10]、換気不全に陥った個体においては予後不良となることが示唆された。一方、子牛の低血糖症は重度の脱水症[76]や栄養失調[80]との関連性が示唆されている。特に脱水症は嫌気性代謝の原因であり、組織中酸素レベルの低下はブドウ糖の酸化効率を悪化させる[46]。したがって、下痢症子牛のブドウ糖の利用効率を改善させるためにも脱水症の補正は重要である。加えて低血糖症における栄養失調[80]は従来のブドウ糖のみによるエネルギー補給に代わる新たな栄養供給方法の必要性を示唆するものである。

第3章第1節では、下痢症子牛の栄養管理におけるアミノ酸補給の必要性を確認する目的で、アシデミアを伴う下痢症子牛の血漿中遊離アミノ酸動態について調査を行った。その結果、下痢症子牛では血液 pH と血漿中 TAA および BCAA 濃度の間に負の相関が認められた。血液 pH の低下は血漿中 BCAA 濃度を増加させることから、アシデミアを呈した下痢症子牛では骨格筋の分解が亢進していることが示唆された。短期的なタンパク質代謝の変化でも、長期的には骨格筋の減少に繋がることから、タンパク質分解を抑制する目的でアシデミアを補正することは理にかなっている。

下痢症子牛では合併症として肺炎が頻繁に認められことから[81]、第3章第2節では肺炎子牛におけるアミノ酸動態の調査を行った。その結果 *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛では血清中 TAA、EAA、BCAA およびアラニン濃度の有意な低下が認められた。これらの変化は食欲不振による外因性アミノ酸摂取量の低下はもちろんのこと、炎症に起因する内因性アミノ酸の利用亢進も関与している[63]。炎症は筋肉組織中の

BCKDH 複合体を活性化し、BCAA 分解を亢進させる[20]。BCAA の分解は主に骨格筋で行われるため[91]、血清中 BCAA 濃度の低下は骨格筋量の減少を反映している。よって *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛においても下痢症子牛と同様に異化を防ぐためにもアミノ酸を中心とした栄養管理を行う必要がある。下痢症および肺炎子牛では血液中 TAA 濃度の低下が認められ、とりわけ BCAA 濃度の減少は顕著であった。したがって、下痢症および肺炎子牛における経静脈内栄養輸液では BCAA を強化した栄養輸液剤を選択するべきである。ただし、アシデミアを伴う下痢症子牛では既に高 BCAA 血症に陥っていることから、アミノ酸を配合した経静脈内栄養輸液はアシデミアを補正した後に行うべきである。

新生子牛において下痢症は輸液療法適応症として広く周知されている[9]。経口補液剤は投与が簡便かつ安価であることから古くから脱水症の改善、電解質異常の補正、エネルギー補給を目的に汎用されている。第 4 章 1 節では下痢症子牛における循環血液量の改善または脂質異化抑制効果に適した経口補液剤の処方を検討するために、処方異なる 4 種類の経口補液剤を用いて臨床試験を実施した。その結果、Na : Glu : Gly 比が 1.0 : 0.6 : 0.6 の Na 強化型経口補液剤では Na (100.1 mM) が高濃度に配合されているために循環血液量の改善に優れていた。一方、Glu : Gly 比が約 1.0 : 1.0 で Glu (116.8 mM) が高濃度に配合された Glu 強化型の経口補液剤は直接エネルギーである糖を付与することにより脂質異化抑制効果が認められた。これらの結果は、経口補液剤に含まれるナトリウム (Na)、ブドウ糖 (Glu)、グリシン (Gly) の量に加えてその比率が経口補液剤の効果と密接に関係があることを示している。すなわち、下痢症子牛に対して、脱水症に加え消耗が軽度である急性期では Na 強化型、消耗の進行を伴う慢性期とでは Glu 強化型を処方するなど下痢の病態やステージによって経口補液剤を使い分けることが下痢症治療を奏功させる上で重要である。

体重の減少が 8%以上認められる重度の脱水症においては、経口補液だけで再水和は困難であるため、経静脈内輸液が推奨される[9]。さらに、子牛の脱水に伴う吸乳反射の消失もまた経静脈内輸液の必要性を示唆するものである[72]。したがって、重度の脱水症および代謝性アシドーシスを伴う下痢症子牛においては細胞外液補充剤に

よる経静脈内輸液が必要となるが、糖を配合すべきか否かの判断は難しい。第4章第2節では酢酸リンゲル液（AR）に5%のブドウ糖を配合した5%ブドウ糖加酢酸リンゲル液（ARD）を試作し、下痢症子牛におけるブドウ糖補給効果についてARを対照に実験的下痢モデルおよび臨床症例を用いて検証を行った。その結果、実験的下痢モデルおよび臨床症例においてARの静脈内投与では循環血液量の改善は認められたものの、血液中BHBA濃度の増加、すなわち異化亢進が認められた。つまりARの単独投与は直接エネルギーを供給しないためにさらなる消耗を引き起こすことが明らかとなった。これとは対照的に糖を配合したARDの静脈内投与では実験的下痢モデルおよび臨床症例のいずれにおいても血液中BHBA濃度の有意な低下が確認された。この結果は外因性のブドウ糖により糖代謝が維持されたことによるものと考えられた。ARDはARと同等の循環血液量の改善効果に加えて、血液中BHBA濃度の低下で示された脂質異化抑制効果を有することから、消耗性疾患である下痢症子牛に適した輸液剤といえる。

第4章第3節では*C. parvum*下痢症子牛を用いて、腸絨毛の損傷を伴う下痢症に対してブドウ糖およびアミノ酸（PPN群）またはブドウ糖のみ（Dex群）で熱量を付与する経静脈内栄養輸液療法の治療効果を検証した。その結果、PPN群およびDex群において経静脈内栄養輸液開始後24時間目の血漿中遊離アミノ酸濃度に変化は認めなかったが、PPN群においてのみ、経静脈内栄養輸液終了時の血漿中DAO活性値が有意に増加した。血漿中DAO活性値の増加は腸絨毛の再生を示唆するものであり、その結果としてPPN群の治療日数はDex群のそれと比較して有意に短縮したと考えられる。この結果は、ブドウ糖にアミノ酸を加えた経静脈内栄養輸液療法はブドウ糖のみで熱量を付与するよりも*C. parvum*下痢症子牛の腸絨毛修復に有用であることが明らかとなった。したがって、*C. parvum*感染症だけでなく腸絨毛の損傷が疑われる栄養不良性下痢症に対しては、ブドウ糖単独でなくブドウ糖にアミノ酸を配合した経静脈内栄養輸液療法が望ましいことが明らかとなった。これらの結果をまとめると、以下のことが明らかとなった。

1. 低血糖症を伴う下痢症子牛では従来のブドウ糖のみによるエネルギー補給に代わる、ブドウ糖の利用効率をも考慮した新たな栄養管理方法が必要である[83]。
2. アンデミアを伴う下痢症子牛および *Mycoplasma* 性気管支肺炎子牛における栄養管理には BCAA を強化したアミノ酸の補給が望ましい[82, 87]。
3. 下痢症子牛の経口補液療法は脱水症に加え消耗が軽度である急性期には Na 強化型、進行性の消耗を伴う慢性期の下痢症に対しては Glu 強化型の経口補液剤を処方することが望ましい[84]。
4. 5%ブドウ糖加酢酸リンゲル液 (ARD) は酢酸リンゲル液 (AR) と同等の循環血液量の改善効果に加えて脂質異化抑制効果を有することから、消耗性疾患である下痢症子牛の経静脈内輸液療法に適した輸液剤といえる[85]。
5. 腸絨毛の損傷が疑われる栄養不良性下痢では、ブドウ糖単独でなくアミノ酸を配合した経静脈内栄養輸液療法が望ましい[86]。

本研究を総括すると、末梢静脈内栄養輸液療法 (PPN) がまだ一般的ではない生産動物医療において、経済的かつ効率的な下痢症子牛の PPN を科学的根拠に基づいて啓蒙普及するものであり、臨床現場ですぐにでも応用すべき内容である。しかし、ヒト医療および伴侶動物医療における栄養輸液療法はブドウ糖やアミノ酸だけでなく他の栄養素についても応用されている。今後は、本研究で触れることができなかった脂質、ビタミンおよび微量元素動態についても子牛下痢症の病態生理学的解明とこれらの栄養素を配合した栄養輸液剤の臨床薬理的検証に基づき、経済性に見合ったより効果的な「牛の栄養輸液療法」のあり方について継続的に検証する必要があるだろう。

謝 辭

稿を終わるに臨み、本研究に際して終始ご指導ご助言を賜りました酪農学園大学大学院獣医学研究科 鈴木一由 教授（主査）、ならびに研究の機会を提供していただきました北海道農業共済組合 更科進也 次長に心から感謝いたします。本研究の遂行において多大なご協力とご助言を賜りました酪農学園大学大学院獣医学研究科 山下和人 教授（副査）、樋口豪紀 教授（副査）および大塚浩通 准教授（副査）に深謝いたします。

また、本研究の遂行において欠かすことのできない試作品の設計から提供、輸液療法に関するご助言を賜りました日本全薬工業株式会社中央研究所臨床開発センター 味戸忠春 チーフリサーチャー、ならびにアミノ酸の測定や解析についてご指導とご助言を賜りました酪農学園大学 井上博紀 特任准教授に深甚な謝意を表します。本研究において採材、サンプル測定、論文製作、学会発表など終始にわたり御協力を頂いた酪農学園大学獣医学研究科 嶋守俊雄氏、西康暢氏、福田達也氏および大塚まりな氏に心から感謝いたします。そして、本研究を遂行する上で多大なご協力を賜りました北海道農業共済組合の同僚諸氏、酪農学園大学獣医学群獣医学類生産動物医療分野生産動物外科学ユニット所属学生諸氏、臨床症例を提供していただいた北海道農業共済組合管内の生産者諸氏に心から感謝いたします。

最後に、長期に渡り経済的ならびに精神的に支えてくれた妻 早紀子、娘 紗也、息子 春樹に親愛の念を込めて謝意を表します。

利益相反

本主論文で開示すべき利益相反（COI：Conflict of interest）において、以下の研究助成を受けたことを開示いたします。本主論文で扱われた調査・研究の一部は文部科学省科研費基盤研究 C（21580393, 26450431）、2016 年度秋山記念財団研究助成、2015 および 2017 年度公益法人伊藤記念財団研究調査助成、および 2015 年度財団法人旗影会研究助成でご支援頂いた内容のものが含まれています。

また、本研究遂行のために日本全薬工業株式会社に 5%ブドウ糖加酢酸リンゲル液 および経口補液剤 2 品目の試作を依頼し無償で提供を受けたことを開示いたします。

引 用 文 献

1. Abramowitz, M. K. 2014. Acid-base balance and physical function. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* **9**: 2030-2032.
2. Adibi, S. A. 1976. Metabolism of branched-chain amino acids in altered nutrition. *Metabolism* **25**: 1287-1302.
3. Akimoto, T., Takeda, M., Ichihara, T. and Kuroda, Y. 2006. Molecular analysis for differential diagnosis of small bowel obstruction: expression of proinflammatory cytokines and diamine oxidase activity. *Int. J. Biomed. Sci.* **2**: 160-165.
4. Arcangioli, M. A., Duet, A., Meyer, G., Dernburg, A., Bèzille, P., Poumarat, F. and Le Grand, D. 2008. The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. *Vet. J.* **177**: 89-93.
5. Ashworth, A., Chopra, M., McCoy, D., Sanders, D., Jackson, D., Karaolis, N., Sogaula, N. and Schofield, C. 2004. WHO guidelines for management of severe malnutrition in rural South African hospitals: effect on case fatality and the influence of operational factors. *Lancet* **363**: 1110-1115.
6. Baer, D. M. 1964. Acid base disorders. The clinical use of the Astrup method of determining pH pCO₂ and base excess. *Calif. Med.* **101**: 439-444.
7. Barker, M. E. 2015. 0.9% saline induced hyperchloremic acidosis. *J. Trauma Nurs.* **22**: 111-116.
8. Berchtold, J. 1999. Intravenous fluid therapy of calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **15**: 505-531.
9. Berchtold, J. 2009. Treatment of calf diarrhea: intravenous fluid therapy. *Vet. Clin. Food Anim.* **25**: 73-99.
10. Berchtold, J., Hartmann, H. and Hofmann, W. 2000. Significance of respiratory compensation in acidosis in calves. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **107**: 10-16. [Article in German]

11. Bergström, B., Fürst, P., Noree, L. O. and Vinnars, E. 1974. Intracellular free amino acid concentration in human muscle tissue. *J. Appl. Physiol.* **36**: 693-697.
12. Buse, M. G. and Reid, M. 1975. Leucine, A possible regulator of protein turnover in muscle. *J. Clin. Invest.* **56**: 1250-1251.
13. Chang, I. F., Sorof, T. A. and Nguyen, N. Y. T. 2006. Chapter 27 Pharmacy considerations in pediatric parenteral nutrition. pp 347-358. In: Pediatric nutrition support, (Baker, S. S. Baker, R. D. and Davis, A. M.), Jones & Bartlett Pub, Sudbury, MA, USA.
14. Chiang, B. B., Stevens, K., Etoch, S. W., Cerrito, P., Gray, L. A. Jr. and Dowling, R. D. 2001. Blood lactic acid levels after artificial heart implantation. *ASAIO. J.* **47**: 683-685.
15. Conatable, P. D. 2009. Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and ancillary treatment. *Vet. Clin. Food. Anim.* **25**: 101-120.
16. Constable, P. D., Thomas, E. and Boisrame, B. 2001. Comparison of two oral electrolyte solutions for the treatment of dehydrated calves with experimentally-induced diarrhea. *Vet. J.* **162**: 129-140.
17. Dam, G., Sorensen, M., Buhl, M., Sandahl, T. D., Moller, N., Ott, P. and Vilstrup, H. 2015. Muscle metabolism and whole blood amino acid profile in patients with liver disease. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **75**: 674-680.
18. Duke, T., Kelly, J., Weber, M., English, M. and Campbell, H. 2006. Hospital care for children in developing countries: clinical guidelines and the need for evidence. *J. Trop. Pediatr.* **52**: 1-2.
19. Ellis, J. A. 2001. The immunology of bovine respiratory disease complex. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **17**: 535-550.
20. Engelen, M. P., Deutz, N. E., Wouters, E. F. and Schols, A. M. 2000. Enhanced levels of whole-body protein turnover in patients with chronic obstructive

- pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**: 1488-1492.
21. Eyarefe, O. D., Emikpe, B. O. and Arowolo, O. A. 2008. Small bowel responses to enteral honey and glutamine administration following massive small bowel resection in rabbit. *Afr. J. Med. Sci.* **37**: 309-314.
 22. Fayet, J. C. and Overwater, J. 1978. Prognosis of diarrhea in the newborn calf: statistical analysis of blood biochemical data. *Ann. Rech. Vet.* **9**: 55-61.
 23. Foster, D. M. and Smith, G. W. 2009. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet. Clin. Food Anim.* **25**: 13-36.
 24. Foster, D. M. and Smith, G. W. 2009. Treatment of calf diarrhea: intravenous fluid therapy. *Vet. Clin. Food Anim.* **25**: 73-99.
 25. Freund, H., Dienstag, J., Lehrich, J., Yoshimura, N., Bradford, R. R., Rosen, H., Atamian, S., Slemmer, E., Holroyde, J. and Fischer, E. 1982. Infusion of branched-chain enriched amino acid solution in patients with hepatic encephalopathy. *Ann. Surg.* **196**: 209-220.
 26. Fu, X. B., Xing, F., Yang, Y. H., Sun, T. Z. and Guo, B. C. 2003. Activation of phosphorylating-p38 mitogen-activated protein kinase and its relationship with localization of intestinal stem cells in rats after ischemia-reperfusion injury. *World J. Gastroenterol.* **9**: 2036-2039.
 27. Fujita, K., Tokunaga, C., Yamaguchi, S., Nakamura, K., Horiguchi, Y., Kaneko, M. and Iwakura, T. 2014. Effect of intraoperative amino acids with or without glucose infusion on body temperature, insulin, and blood glucose levels in patients undergoing laparoscopic colectomy: A preliminary report. *Acta. Anaesthesiol. Taiwan* **52**: 101-06.
 28. Gelfand, R. A., Glickman, M. G., Castellino, P., Louard, R. J. and DeFronzo, R. A. 1988. Measurement of L-[1-14C] leucine kinetics in splanchnic and leg tissues in humans. Effect of amino acid infusion. *Diabetes* **37**: 1365-1372.
 29. Gnanou, J. V., Srinivas, S. K. and Kurpad, A. V. 2004. Automated

- derivatization with *o*-phthalaldehyde for estimation of amino acids in plasma using reversed-phase high performance liquid chromatography. *Indian J. Biochem. Biophys.* **41**: 322-325.
30. Greenleaf, J. E., Convertino, V. A. and Mangseth, G. R. 1979. Plasma volume during stress in man; osmolality and red cell volume. *J. Appl. Physiol. Respir. Environ. Exerc. Physiol.* **47**: 1031-1038.
 31. Grimble, R. F., Jackson, A. A., Persaud, C., Wride, M. J., Delers, F. and Engler, R. 1992. Cysteine and glycine supplementation modulate the metabolic response to tumor necrosis factor- α in rats fed a low protein diet. *J. Nutr.* **122**: 2066-2073.
 32. Gurbuz, A. T., Kunzelman, J. and Ratzler, E. E. 1998. Supplemental dietary arginine accelerates intestinal mucosal regeneration and enhances bacterial clearance following radiation enteritis in rats. *J. Surg. Res.* **74**: 149-154.
 33. Harper, A. E., Miller, R. H. and Block, K. P. 1984. Branched-chain amino acid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **4**: 409-454.
 34. Heath, S. E., Naylor, J. M., Guedo, B. L., Petrie, L., Rousseaux, C. G. and Radostits, O. M. 1989. The effects of feeding milk to diarrheic calves supplemented with oral electrolytes. *Can. J. Vet. Res.* **53**: 477-485.
 35. Higuchi, H., Iwano, H., Kawai, K., Ohta, T., Obayashi, T., Hirose, K., Ito, N., Yokota, H., Tamura, Y. and Nagahata, H. 2011. A simplified PCR assay for fast and easy mycoplasma mastitis screening in dairy cattle. *J. Vet. Sci.* **12**:191-193.
 36. Hofford, J. M., Milakofsky, L., Vogel, W. H., Sacher, R. S., Savage, G. J. and Pell, S. 1990. The nutritional status in advanced emphysema associated with chronic bronchitis. A study of amino acid and catecholamine levels. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**: 902-908.
 37. Ichikawa, K., Okabayashi, T., Maeda, H., Namikawa, T., Iiyama, T.,

- Sugimoto, T., Kobayashi, M., Mimura, T. and Hanazaki, K. 2013. Oral supplementation of branched-chain amino acids reduces early recurrence after hepatic resection in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective study. *Surg. Today* **43**: 720-726.
38. Kasri, T. R. and Naylor, J. M. 1984. Metabolic acidosis without clinical signs of dehydration in young calves. *Can. Vet. J.* **25**: 394-399.
39. Kasri, T. R. and Naylor, J. M. 1985. Clinical evaluation of sodium bicarbonate, sodium L-lactate, and sodium acetate for the treatment of acidosis in diarrheic calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **187**: 392-397.
40. Kasari, T. R. and Naylor, J. M. 1986. Further studies on the clinical features and clinicopathological findings of a syndrome of metabolic acidosis with minimal dehydration in neonatal calves. *Can. J. Vet. Res.* **50**: 502-508.
41. Kitanaka, J., Kitanaka, N., Tsujimura, T., Terada, N. and Takemura, M. 2002. Expression of diamine oxidase (histaminase) in guinea-pig tissues. *Eur. J. Pharmacol.* **437**: 179-185.
42. Kooman, J. P., Deutz, N. E., Zijlmans, P., van den Wall Bake, A., Gerlag, P. G., van Hooff, J. P. and Leunissen, K. M. 1997. The influence of bicarbonate supplementation on plasma levels of branched-chain amino acids in haemodialysis patients with metabolic acidosis. *Nephrol. Dial. Transplant.* **12**: 2397-2401.
43. Krebs, M., Krssak, M., Bernroider, E., Anderwald, C., Brehm, A., Meyerspeer, M., Nowotny, P., Roth, E., Waldhäusl, W. and Roden, M. 2002. Mechanism of amino acid-induced skeletal muscle insulin resistance in humans. *Diabetes* **51**: 599-605.
44. Lattermann, R., Carli, F., Wykes, L. and Schricker, T. 2003. Perioperative glucose infusion and the catabolic response to surgery: The effect of epidural block. *Anesth. Analg.* **96**: 555-562.

45. Laurent, F., McCole, D., Eckmann, L. and Kagnoff, M. F. 1999. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes. Infect.* **1**: 141-148.
46. Levenson, S. M., Einheber, A. and Malm, O. J. 1961. Nutritional and metabolic aspects of shock. *Fed. Proc.* **20**: 99-140.
47. Lorenz, I. 2004. Influence of D-lactate on metabolic acidosis and on prognosis in neonatal calves with diarrhea. *J. Vet. Med. A. Physiol. Pathol. Clin. Med.* **51**: 425-428.
48. Lund, J., Stjernström, H., Bergholm, U., Jorfeldt, L., Vinnars, E. and Wiklund, L. 1986. The exchange of blood-borne amino acids in the leg during abdominal surgical trauma: effects of glucose infusion. *Clin. Sci (Lond).* **71**: 487-496.
49. Lund, J., Stjernström, H., Vinnars, E., Jorfeldt, L., Bergholm, U. and Wiklund, L. 1986. The influence of abdominal surgery on the splanchnic exchange of amino acids. *Acta. Chir. Scand.* **152**: 191-197.
50. Lynch, C. J. and Adams, S. H. 2014. Branched-chain amino acids in metabolic signaling and insulin resistance. *Nat. Rev. Endocrinol.* **10**: 723-736.
51. May, R. C., Hara, Y., Kelly, R. A., Brock, K. P., Buse, M. G. and Mitch, W. E. 1987. Branched-chain amino acid metabolism in rat muscle: abnormal regulation in acidosis. *Am. J. Physiol.* **263**: 712-718.
52. McCue, M. D., Sandoval, J., Beltran, J. and Gerson, A. R. 2017. Dehydration causes increased reliance on protein oxidation in mice: a test of the protein-for-water hypothesis in mammal. *Physiol. Biochem. Zool.* **90**: 359-369.
53. Melchior, D., Sève, B. and Le Floc'h, N. 2004. Chronic lung inflammation affects plasma amino acid concentrations in pigs. *J. Anim. Sci.* **82**: 1091-1099.
54. Michell, A. R., Brooks, H. W., White, D. G. and Wagstaff, A. J. 1992. The comparative effectiveness of three commercial oral solutions in correcting

- fluid, electrolyte and acid-base disturbances caused by calf diarrhea. *Br. Vet. J.* **148**: 507-522.
55. Mosier, D. A. and Oberst, R. D. 2000. Cryptosporidiosis. A global challenge. *Ann. NY. Acad. Sci.* **916**: 102-111.
 56. Nakagawa, M., Suzuki, K., Takahashi, F., Kamikatano, K., Koiwa, M. and Taguchi, K. 2009. Comparison of the alkalizing effects of bicarbonate precursors in calves with experimentally induced metabolic acidosis. *J. Vet. Med. Sci.* **71**: 807-809.
 57. Naylor, J. M. 1989. A retrospective study of the relationship between clinical signs and severity of acidosis in diarrheic calves. *Can. Vet. J.* **30**: 577-580.
 58. Naylor, J. M. and Forsyth, G. W. 1986. The alkalizing effects of metabolizable bases in the healthy calf. *Can. J. Vet. Res.* **50**: 509-516.
 59. Naylor, J. M., Petrie, L., Rodriguez, M. I. and Skilnick, P. 1990. A comparison of three oral electrolyte solutions in the treatment of diarrheic calves. *Can. Vet. J.* **31**: 753-760.
 60. Neuvonen, P., Salo, M., Perttilä, J. and Havia, T. 1986. Lack of modulation of postoperative immunosuppression by isotonic amino acid infusion. *JPEN. J. Parenter. Enteral. Nutr.* **10**: 160-165.
 61. Nicholas, R. A. and Ayling, R. D. 2003. *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control. *Res. Vet. Sci.* **74**: 105-112.
 62. Nygren, J. and Nair, K. S. 2003. Differential regulation of protein dynamics in splanchnic and skeletal muscle beds by insulin and amino acids in healthy human subjects. *Diabetes* **52**: 1377-1385.
 63. Odessey, R., Khairallah, E. A. and Goldberg, A. L. 1974. Origin and possible significance of alanine production by skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* **249**: 7623-7629.
 64. Patti, M. E., Brambilla, E., Luzi, L., Landaker, E. J. and Kahn, C. R. 1998.

- Bidirectional modulation of insulin action by amino acids. *J. Clin. Invest.* **101**: 1519-1529.
65. Radaelli, E., Luini, M., Loria, G. R., Nicholas, R. A. and Scanziani, E. 2008. Bacteriological, serological, pathological and immunohistochemical studies of *Mycoplasma bovis* respiratory infection in veal calves and adult cattle at slaughter. *Res. Vet. Sci.* **85**: 282-290.
66. Randremanana, R. V., Razafindratsimandrey, R., Andriatahina, T., Randrimanantena, A., Ravelomanana, L., Randrianirina, F. and Richard, V. 2016. Etiologies, risk factors and impact of severe diarrhea in the under-fives in Moramanga and Antananarivo, Madagascar. *PLoS ONE*. **11**: e0158862.
67. Reaich, D., Channon, S. M., Scrimgeour, C.M. and Goodship, T. H. 1992. Ammonium chloride-induced acidosis increases protein breakdown and amino acid oxidation in human. *Am. J. Physiol.* **263**: 735-739.
68. Reece, W. O. 1980. Acid-base balance and selected hematologic, electrolyte, and blood chemical variables in calves: milk-fed vs conventionally fed. *Am. J. Vet. Res.* **41**: 109-113.
69. Sabine, J. R. and Johnson, B. C. 1964. Acetate metabolism in the ruminant. *J. Biol. Chem.* **239**: 89-93.
70. Schrickler, T., Latternmann, R. and Carli, F. 2005. Intraoperative protein sparing with glucose. *J. Appl. Physiol.* **99**: 898-901.
71. Schroeder, D. G. and Brown, K. H. 1994. Nutritional status as a predictor of child survival: summarizing the association and quantifying its global impact. *Bull. World Health Organ.* **72**: 569-579.
72. Smith, G. W. 2009. Treatment of calf diarrhea: oral fluid therapy. *Vet. Clin. Food Anim.* **25**:55-72.
73. Suzuki, K., Kato, T., Tsunoda, G., Iwabuchi, S., Asano, K. and Asano, R. 2002. Effect of intravenous infusion of isotonic sodium bicarbonate solution on

- academic calves with diarrhea. *J. Vet. Med. Sci.* **64**: 1173-1175.
74. Talbert, A., Thuo, N., Karisa, J., Chesaro, C., Ohuma, E., Ignas, J., Berkley, J. A., Toromo, C., Atkinson, S. and Maitland, K. 2012. Diarrhoea complicating severe acute malnutrition in Kenyan children: a prospective descriptive study of risk factors and outcome. *PLoS ONE*. **7**: e38321.
75. Tanaka, Y., Mizote, H., Asakawa, T., Kobayashi, H., Otani, M., Tanikawa, K., Nakamizo, H., Kawaguchi, C., Asagiri, K., Akiyoshi, K., Hikida, S. and Nakamura, T. 2003. Clinical significance of plasma diamine oxidase activity in pediatric patients: influence of nutritional therapy and chemotherapy. *Kurume Med. J.* **50**: 131-137.
76. Tennant, B., Harrold, D. and Reina-Guerra, M. 1968. Hypoglycemia in neonatal calves associated with acute diarrhea. *Cornell Vet.* **58**: 136-146.
77. Tennant, B., Harrold, D. and Reina-Guerra, M. 1972. Physiologic and metabolic factors in the pathogenesis of neonatal enteric infections in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **161**: 993-1007.
78. Tette, E. M., Neizer, M., Nyarko, M. Y., Sifah, E. K., Nartey, E. T. and Donkor, E. S. 2016. Changing patterns of disease and mortality at the Children's Hospital, Accra: areinfections rising? *PLoS ONE*. **11**: e0150387.
79. Tette, E. M. A., Nyarko, M. Y., Nartey, E. T., Neizer, M. L., Egbehome, A., Akosa, F. and Biritwum, R. B. 2016. Under-five mortality pattern and associated risk factors: a case-control study at the Princess Marie Louise Children's Hospital in Accra, Ghana. *PLoS ONE*. **16**: 148.
80. Trefz, F. M., Feist, M. and Lorenz, I. 2016. Hypoglycemia in hospitalized neonatal calves: prevalence, associated conditions and impact on prognosis. *Vet. J.* **217**: 103-108.
81. Trefz, F. M., Lorenz, I., Lorch, A. and Constable, P. D. 2017. Clinical signs, profound acidemia, hypoglycemia, and hypernatremia are predictive of

- mortality in 1400 critically ill neonatal calves with diarrhea. *PLoS ONE*. **12**: e0182938.
82. Tsukano, K., Inoue, H. and Suzuki, K. 2017. Increase in branched-chain amino acids due to acidemia in neonatal calves with diarrhea. *Vet. Rec. Open*. **4**: e000234.
83. Tsukano, K., Sarashina, S. and Szuki, K. 2018. Hypoglycemia and failure of respiratory compensation are risk factors for mortality in diarrheic calves in Hokkaido, northern Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **80**: 1159-1164.
84. Tsukano, K., Ajito, T., Abe, I., Sarashina, S. and Suzuki, K. 2017. Rehydration and catabolic preventive effects depend on the composition of oral electrolyte solutions for diarrheic calves. *J. Vet. Med. Sci.* **79**: 1776-1779.
85. Tsukano, K., Sarashina, S., Abe, I., Ajito, T., Ohtsuka, H. and Suzuki, K. 2017. Effect of acetate Ringer's solution with or without 5% dextrose administered intravenously to diarrheic calves. *J. Vet. Med. Sci.* **79**: 795-800.
86. Tsukano, K., Fukuda, T., Otsuka, M., Nishi, Y., Inoue, H., Sarashina, S. and Suzuki, K. 2018. Advantage of parenteral nutrition for diarrheic calves. *J. Vet. Med. Sci.* Oct 8. doi: 10.1292/jvms.18-0110. [Epub ahead of print]
87. Tsukano, K., Suzuki, K., Shimamori, T., Sato, A., Kudo, K., Asano, R., Ajito, T. and Lakritz, J. 2015. Profiles of serum amino acids to screen for catabolic and inflammation status in calves with *Mycoplasma bronchopneumonia*. *J. Vet. Med. Sci.* **77**: 67-73.
88. World Health Organization. 1999. Management of severe malnutrition: a manual for physicians and other senior health workers. Geneva: World Health Organization.
89. Yamasaki, K., Inagaki, Y., Mochida, S., Funaki, K., Takahashi, S. and Sakamoto, S. 2010. Effect of intraoperative acetated Ringer's solution with 1% glucose on glucose and protein metabolism. *J. Anesth.* **24**: 426-431.

90. Yi, D. Y. and Yang, H. R. 2015. Comparison of a three-in-one total nutrient mixture with conventional peripheral nutrition in children. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* **24**: 44-50.
91. Yoneda, T., Yoshikawa, M., Fu, A., Tsukaguchi, K., Okamoto, Y. and Takenaka, H. 2001. Plasma levels of amino acids and hypermetabolism in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Nutrition* **17**: 95-99.
92. Youanes, Y. D. and Herdt, T. H. 1987. Changes in small intestinal morphology and flora associated with decreased energy digestibility in calves with naturally occurring diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* **48**: 719-725.
93. Zu, S. X., Fang, G. D., Fayer, R. and Guerrant, R. L. 1992. Cryptosporidiosis: pathogenesis and immunology. *Parasitol. Today* **8**: 24-27.

語 略 一 覽

AG	:	Anion Gap
AR	:	酢酸リンゲル-V 注射液（日本全薬工業株式会社）
ARD	:	5%ブドウ糖加酢酸リンゲル液（試作品）
ATP	:	Adenosine Triphosphate
BALF	:	Bronchoalveolar Lavage Fluid
BCAA	:	Branched Chain Amino Acids
BCKDH	:	Branched-Chain Ketoacid Dehydrogenase
BE	:	Base Excess
BHBA	:	Beta-Hydroxybutyrate
BUN	:	Blood Urea Nitrogen
CF	:	カーフライト S（日本全薬工業株式会社）
CFG	:	カーフライト S に糖を増量（試作品）
CFGG	:	カーフライト S に糖と Gly を増量（試作品）
COPD	:	Chronic Obstructive Pulmonary Disease
DAO	:	Diamine Oxidase
EAA	:	Essential Amino Acids
ELISA	:	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
Glu	:	Glucose
Gly	:	Glycine
Hb	:	Hemoglobin
HPLC	:	High Performance Liquid Chromatography
Ht	:	Hematocrit
ICU	:	Intensive Care Unit
IL	:	Interleukin
ISS	:	動物用生食-V 注射液（日本全薬工業株式会社）
IVH	:	Intravenous Hyperalimentation
NEAA	:	Non-Essential Amino Acids
NEB	:	Negative Energy Balance
PCO ₂	:	Partial CO ₂ pressure
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
PPN	:	Peripheral Parenteral Nutrition
rBE	:	relative changes in Base Excess
rBHBA	:	relative changes in Beta-Hydroxybutyrate
rPV	:	relative changes in Plasma Volume
SL	:	サラロン（フジタ製薬株式会社）
TAA	:	Total Amino Acids
TNF	:	Tumor Necrosis Factor
TPN	:	Total Parenteral Nutrition
UPS	:	Ubiquitin-Proteasome System
WHO	:	World Health Organization

成績の公表

本主論文の成績は下記の通り誌上公表した。

第2章

Tsukano K, Sarashina S, Suzuki K. Hypoglycemia and failure of respiratory compensation are risk factors for mortality in diarrheic calves in Hokkaido, northern Japan. *J Vet Med Sci*. 2018 Jun 4. doi: 10.1292/jvms.18-0109.

第3章第1節

Tsukano K, Inoue H, Suzuki K. Increase in branched-chain amino acids due to acidemia in neonatal calves with diarrhoea. *Vet Rec Open*. 2017 Nov 14;4(1):e000234. doi: 10.1136/vetreco-2017-000234. eCollection 2017.

第3章第2節

Tsukano K, Suzuki K, Shimamori T, Sato A, Kudo K, Asano R, Ajito T, Lakritz J. Profiles of serum amino acids to screen for catabolic and inflammation status in calves with Mycoplasma bronchopneumonia. *J Vet Med Sci*. 2015 Jan;77(1):67-73. doi: 10.1292/jvms.14-0355.

第4章第1節

Tsukano K, Ajito T, Abe I, Sarashina S, Suzuki K. Rehydration and catabolic preventive effects depend on the composition of oral electrolyte solutions for diarrheic calves. *J Vet Med Sci*. 2017 Nov 10;79(11):1776-1779. doi: 10.1292/jvms.17-0398.

第4章第2節

Tsukano K, Sarashina S, Abe I, Ajito T, Ohtsuka H, Suzuki K. Effect of acetate Ringer's solution with or without 5% dextrose administered intravenously to diarrheic calves. *J Vet Med Sci*. 2017 Apr 20;79(4):795-800. doi: 10.1292/jvms.16-0297.

第4章第3節

Tsukano K, Fukuda T, Otsuka M, Nishi Y, Inoue H, Sarashina S, Suzuki K. Advantage of parenteral nutrition for diarrheic calves. *J Vet Med Sci*. 2018. Oct 8. doi: 10.1292/jvms.18-0110. [Epub ahead of print]

Study on nutritional infusion therapy in calves with diarrhea based on pathophysiology

Rakuno Gakuen University Graduate School

Doctoral Course in Veterinary Medicine, Large Animal Surgery

Tsukano Kenji

The aim of present study was to identify what kind of formulation is appropriate for oral and intravenous nutritional infusion therapy in calves with diarrhea.

In chapter 1 discussed the state of fluid therapy for calves with diarrhea in Japan, and noted the necessity of nutrient infusion.

In chapter 2, the aim of present survey was to identify risk factors of laboratory findings for mortality in calves with diarrhea. A retrospective analysis was conducted utilizing medical records of 221 diarrheic calves. As a result, hypoglycemia (OR 3.09; 95% CI 1.22-7.87; $p=0.02$) and failure of respiratory compensation (OR 2.63; 95% CI 1.05-6.62; $p=0.04$) were the major risk factors associated with a negative outcome in diarrheic calves. Indeed, the addition of glucose to IV fluid solutions is widely used to provide energy, but malnutrition is serious problem in diarrheic calves with hypoglycemia. These results suggest that to consider the next step for nutritional management in diarrheic calves is important.

In chapter 3 aimed to confirm necessity of amino acid supply in calves with diarrhea and respiratory diseases. As a result, the blood pH and plasma concentrations of total amino acids (TAA) and branched chain amino acids (BCAA) were significantly and negatively correlated in calves with diarrhea. In other words, acidemia activated the catabolism of protein. Similarly, the calves with *Mycoplasma* bronchopneumonia, a respiratory disease, were characterized by significantly lower in serum TAA and BCAA. These results indicated that supplying amino acids to diarrheic calves with acidemia and respiratory diseases with hyper inflammation state was important.

In chapter 4, oral or intravenous nutrient infusions for diarrheic calves with different pathophysiology features were examined. In section 1, four different compositions of oral electrolyte solutions (OES) were prepared to test how differences in the composition of OES affect dehydration and prevent catabolism. Results of present study demonstrated that OES with high sodium (Na) concentration (100.1 mM) and the ratio of glucose (Glu) and glycine (Gly) to Na was 0.6 : 0.6 : 1.0 has effect of increasing the blood volume. On the other hand, OES with high Glu concentration (116.8 mM) and the ratio of Glu to Gly was 1.0 : 1.0 has catabolism prevention effect. This suggests that it is necessary to use these OES properly. The OES with high Na concentration should be used in the early stages of diarrhea for calves with dehydration and metabolic acidosis, but not in the later stages of exhaustion. The OES with high Glu concentration may beneficial for wasting diarrheic calves with dehydration. In section 2 evaluated the effects of solutions with or without dextrose intravenously administered to diarrheic calves, with beta-hydroxybutyrate (BHBA) concentrations as an index. As a result, the addition of dextrose to intravenous fluid solutions did not affect the correcting dehydration. In addition, catabolism prevention was observed only intravenous infusion of solution with dextrose. These results suggest that a solution with dextrose could be beneficial for wasting diarrheic calves. In section 3 assessed the advantages of dextrose and amino acid mixture solution as parenteral nutrition (PN) therapy for calves with *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) diarrhea. Sixteen diarrheic calves were randomly assigned to receive PN (PPN group, n=8) or only dextrose solution (Dex group, n=8). Plasma diamine oxidase (DAO) activity in the PPN group at the end of infusion (118.3 ± 42.3 IU/mL) was significantly increased compared with that before fluid infusion (81.5 ± 25.8 IU/mL), but there were no significant differences in the Dex group. Increased plasma DAO activity indicated repair of the damaged intestine, as a result, the treatment period for the PPN group was significantly shorter than that for the Dex group. Our results suggested that not only dextrose but dextrose and amino acid mixture solution as PN therapy was recommended in calves with *C. parvum* diarrhea.

The PN therapy has been widely used for humans, but it is not yet standard in large animal medical treatment. The present study demonstrated that the PN therapy could be beneficial for clinical use in calves with diarrhea based on scientific basis. The PN therapy in this study was economical and executable in clinical site. Future studies to examine the prescription of PN infusion solution with an amino acid ratio, lipid, vitamin and trace elements suitable for calf diarrhea are needed.