

牛呼吸器疾患におけるエンドトキシンに起因した

全身性炎症性疾患の病態解明

西 康暢

牛呼吸器疾患におけるエンドトキシンに起因した  
全身性炎症性疾患の病態解明

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

西 康暢

生産動物外科学

指導教員 教授 鈴木 一由

2019 年度

## 目次

緒言	・・・	1
第1章 血液生化学性状を指標とした肺炎罹患子牛の予後評価	・・・	5
1.1 マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の血液生化学性状における予後に影響を及ぼす因子の検討	・・・	8
1.1.1 材料および方法		
1.1.2 統計解析		
1.1.3 結果		
1.1.4 考察		
1.2 子牛におけるヒト用携帯型血糖値測定器(PBGM)の応用	・・・	13
1.2.1 材料および方法		
1.2.2 統計解析		
1.2.3 結果		
1.2.4 考察		
1.3 小括	・・・	18
第2章 エンドトキシン活性値および炎症性サイトカイン mRNA 発現量を指標とした子牛のエンドトキシンに起因する全身性炎症の病態解析		

	・・・	28
2.1 マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛における血漿中エンドトキシン活性値を 指標とした予後評価	・・・	30
2.1.1 材料および方法		
2.1.2 統計解析		
2.1.3 結果		
2.1.4 考察		
2.2 エンドトキシンチャレンジモデルにおける炎症性サイトカイン mRNA 発現量の 経時的变化	・・・	36
2.2.1 材料および方法		
2.2.2 統計解析		
2.2.3 結果		
2.2.4 考察		
2.3 小括	・・・	42
第3章 エンドトキシン活性値および炎症性サイトカイン mRNA 発現量を指標とした エンドトキシンチャレンジモデルにおけるツラスロマイシンの抗炎症作用の評価	・・・	54
3.1 材料および方法		
3.2 統計解析		

3.3 結果

3.4 考察

3.5 小括

総括	・ ・ ・ 7 1
謝辞	・ ・ ・ 7 6
利益相反	・ ・ ・ 7 8
引用文献	・ ・ ・ 7 9
略語一覧	・ ・ ・ 9 1
成績の公表	・ ・ ・ 9 4
英文要旨	・ ・ ・ 9 5

## 緒言

子牛は容易に細菌感染に陥り、特に肺炎は罹患率および死亡率が高いことから畜産業において肺炎の制御は重要である[18, 29, 70, 77]。牛呼吸器病症候群 (BRDC: Bovine Respiratory Disease Complex) は、複数の微生物の相互作用によって引き起こされる複雑な感染症である。これらにはウシヘルペスウイルス 1、パラインフルエンザウイルス-3、RS ウイルスなどの呼吸器ウイルスや *Mycoplasma bovis* (*M. bovis*)、*Pasteurella multocida* (*P. multocida*) および *Mannheimia haemolytica* (*M. haemolytica*) などの病原体が含まれる。とりわけ *M. bovis* の感染は呼吸上皮細胞の機能を傷害することで初期のウイルス感染や免疫力の低下を引き起こし、その後の細菌定着を容易にする[1]。BRDC などの急性炎症性疾患は過剰な免疫反応に発展し、しばしば致命的である[9, 75, 82]。

肺炎罹患子牛においては血糖値[8]および血漿中アミノ酸濃度[91]の低下、血中免疫グロブリン G および血漿中遊離脂肪酸濃度[8]が増加する。さらに Tsukano ら[91]はマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛において血液中分岐鎖アミノ酸 (BCAA: Branched Chain Amino Acid) 濃度の低下を特徴とした血清中総アミノ酸濃度の低下を報告している。BCAA はグルコース-アラニン-BCAA 回路[74]において重要な窒素供給源となることから、血液中 BCAA 濃度の減少は糖新生を抑制するため血糖値の低下に関与すると思われる。すなわち肺炎罹患子牛では食欲不振による摂取エネルギー量の低下や、呼吸筋の仕事量の増加に伴うエネルギー要求量の増加に起因する負のエネルギーバランスが生じている。したがって、肺炎罹患子牛では飼料摂取量の減少および飼料効率の低下に伴う体重の減少が認められる[8]。

子牛の細菌性肺炎の主な原因であるグラム陰性菌は、リポポリサッカロイド (LPS: Lipopolysaccharide) で構成される細胞壁をもち、これがエンドトキシンに起因した全身性炎症に関与する。反芻動物ではエンドトキシンに対する病態生理学的影響は用量依存的であり、さまざまな代謝的および臨床的徴候を誘発する[57, 59]。さらにエンドトキシンによる刺激は、感染肺組織領域に蓄積した好中球および単球 (マクロファージ) から炎症性サイトカインを放出させる[10,



83]。インターロイキン（IL: Interleukin）-1、IL-6、腫瘍壊死因子（TNF: Tumor Necrosis factor）のような炎症性サイトカインは高体温症、食欲不振そしてタンパク分解を引き起こすため、循環血中エンドトキシン活性および炎症性サイトカイン発現量の増加は予後に影響を与えることが示唆されている[37]。

臨床現場において肺炎は抗生物質に加えてステロイド系および非ステロイド系抗炎症薬（NSAIDs: Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs）により治療されるのが一般的である[31, 60]。しかしながらすべての子牛が同様の治療によって治癒するとは限らず、肺炎治療が奏功するか否かは個体の栄養状態や炎症強度が影響している可能性も否定できない。しかしながら肺炎罹患子牛の栄養状態および炎症の病態を検証した報告は少なく、臨床現場で利用可能な情報は限られている。よって本研究は肺炎罹患子牛の栄養状態および炎症の病態解析に基づき、臨床現場で応用可能な新たな診断基準および治療戦略の構築を目的とした。すなわち本研究は（1）血液生化学性状を指標とした肺炎罹患子牛の予後評価、（2）エンドトキシン活性値および炎症性サイトカイン mRNA 発現量を指標とした子牛のエンドトキシンに起因する全身性炎症の病態解析、そして（3）マクロライド系抗生物質であるツラスロマイシンの抗炎症作用を検証した。詳述すると、第1章では臨床現場において一般的な測定項目である血液中パラメーターによる肺炎罹患子牛の予後評価を行った。すなわち、第1章第1節では血漿総蛋白（TP: Total protein）、アルブミン、グロブリン濃度および血糖値について連続変数である検査値と二分変数である予後の関係の強さを評価する統計法の一つである Receiver Operating Characteristic（ROC）解析を用いて予後診断のカットオフ値を求めた。ヒト医療では医師が即座に検査結果を判断し、迅速な処置を施すことができる利点から被験者の傍らで行う検査である Point of Care（POC）検査が広く行われている。もし、肺炎罹患子牛の予後評価に血糖値を利用することが可能であれば、ヒト医療において使用されている POC 機器を用いて On-farm で血糖値を測定することにより予後診断が可能となる。しかし、現在、牛医療において利用可能な携帯型血糖値測定器（PBGM: Portable Blood

Glucose Meter) の精度管理についての検証は行われていない。したがって、第 1 章第 2 節ではヒト用 PBGM が牛に応用可能か否かを検証する目的で 2 種類のヒト用 PBGM の精度および正確度について評価した。第 2 章ではエンドトキシン活性による肺炎罹患子牛の予後評価ならびにエンドトキシンにより誘導される白血球および肝臓中炎症性サイトカインの mRNA 発現量を測定することで全身性炎症の病態解析を試みた。すなわち、第 2 章第 1 節では肺炎罹患子牛の気管支肺胞洗浄液 (BALF: bronchoalveolar lavage fluid) および血漿エンドトキシン活性値について ROC 解析により予後診断のカットオフ値を求めた。また、Bieniek ら [7] は子牛の日齢はエンドトキシンへの感受性の違いに関与しており、とくに新生子牛でエンドトキシンへの感受性が高いことを報告していることから、第 2 章第 2 節ではエンドトキシンチャレンジ子牛を用いて、エンドトキシンにより誘導される白血球および肝臓中炎症性サイトカインの mRNA 発現量を測定し比較することで、日齢によるエンドトキシンに対する感受性を検証した。第 3 章ではマクロライド系抗生物質が抗炎症効果を示す機序の一部を明らかにする目的で、マクロライド系抗生物質であるツラスロマイシンが血漿中エンドトキシン活性値を抑制するか否かの検証を行った。

本研究は、肺炎の罹患率および肺炎による死亡率が高い子牛において (1) On-farm で栄養状態に基づいた予後評価が可能であるか否かの検証、(2) エンドトキシン活性による予後評価およびエンドトキシンにより誘導される炎症性サイトカイン発現量の検証、そして (3) エンドトキシンチャレンジモデルを用いたツラスロマイシンの抗炎症作用についての検証を行った。本研究は、肺炎罹患子牛の診療において臨床現場で応用可能な新たな診断基準および治療戦略の有用性を肺炎罹患子牛の栄養状態および炎症の病態解析に基づき証明するものである。

## 第 1 章

### 血液生化学性状を指標とした肺炎罹患子牛の予後評価

肺炎罹患子牛では飼料摂取量の減少、飼料効率の低下を特徴とする体重の減少が報告されている[8]。すなわち肺炎罹患子牛では食欲不振による摂取エネルギー量の低下や、呼吸筋の仕事量の増加に伴うエネルギー要求量の増加に起因する負のエネルギーバランスが生じている。事実、肺炎罹患子牛においては血糖値[8]および血漿中アミノ酸濃度[91]の低下、血中免疫グロブリン G および血漿中遊離脂肪酸濃度[8]が増加することが報告されている。Trefz ら[88]は子牛において低血糖症の発生率は低いが、死亡率は高いことを報告している。低血糖症は敗血症[27, 88]、低体温症[88]および栄養失調[88, 89]を伴う子牛の疾患でも認められるため、特異的なマーカーではないが、疾病の予後を評価することは可能である[90]。血漿総タンパク (TP) は炎症により増加することが知られている[8]。特に血液中 TP の増加にはグロブリンの上昇が関与しているが、高グロブリン血症の最も一般的な原因は炎症であり、急性相タンパク ( APPs: acute phase proteins ) を含む多くのグロブリン産生が増加する。慢性炎症では慢性的な抗原刺激に应答して形質細胞により抗体が産生され非特異的な  $\gamma$ -グロブリンが増加する[41]。しかしながら、肺炎罹患子牛においてこれらの血液中パラメータは予後評価に用いることが可能であるか否かについての検討は行われていない。

本章では肺炎罹患子牛において変動が確認されており、臨床現場において一般的な測定項目である血糖値、血漿中 TP およびグロブリンに加えて、血漿中アルブミンおよびグルタミン酸ピルビン酸転移酵素 ( GPT ) 濃度が肺炎罹患子牛の予後を予測するマーカーとなるか否かの検証を行った。すなわち第 1 章第 1 節では肺炎罹患子牛と健常子牛における上記の血液生化学性状について ROC 解析により予後診断のカットオフ値を求めた。もし、肺炎罹患子牛の予後評価に血糖値を利用することが可能であれば、ヒト医療において使用されている POC 機器を用いて On-farm で血糖値を測定することで予後診断が可能となる。しかし、現在、牛医療において利用可能な携帯型血糖測定器 ( PBGM ) の精度管理についての検証は行われていない。したがって、第 1 章第 2 節ではヒト用 PBGM

が牛に応用可能か否かを検証する目的で 2 種類のヒト用 PBGM の精度および正確度について評価した。

## 1.1 マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の血液生化学性状における予後に影響を及ぼす因子の検討

細菌感染は組織から炎症性サイトカインや炎症性タンパクの放出を誘導し、牛は沈鬱および食欲不振などの臨床症状を呈する[44, 64]。肺炎罹患子牛では BCAA 濃度の低下を特徴とした血清中総アミノ酸濃度が低下することが報告されている [91]。BCAA はグルコース-アラニン-BCAA 回路[74]において重要な窒素供給源となることから、血液中 BCAA 濃度の減少は糖新生を抑制するため血糖値の低下に関与すると思われる。低血糖は様々な子牛の疾病において確認されており[27, 88, 89]、肺炎罹患子牛においても同様に血糖値の低下が報告されている[8]。肺炎罹患子牛では食欲不振や肺の炎症に伴い、血漿中 TP、アルブミンおよびグロブリン濃度の変動が確認されている[8]。栄養状態や炎症の程度は疾病に特異的なマーカーではないが、これらのマーカーにより予後評価を行うことは可能である[90, 91]。第 1 章第 1 節ではマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛において、臨床現場で一般的に実施されている血液生化学検査項目である血糖値、血漿中 TP、グロブリン濃度に加えて血漿中アルブミンおよび GPT 濃度について ROC 解析により予後診断へのカットオフ値を求めた。

### 1.1.1 材料および方法

本試験は酪農学園大学動物実験委員会の承認 (Approval#: VH16C1) に基づいて実施した[69]。本研究では、日齢 13 日 ~ 148 日 ( $48.6 \pm 33.4$  日) のホルスタイン種雌子牛 10 頭および雄子牛 23 頭を供試した。全ての子牛の健康状態は身体一般検査、血液生化学検査および胸部レントゲン検査により評価した。16 頭の子牛は酪農学園大学附属動物病院に治療のために入院した子牛であり、発咳、鼻汁、発熱を呈し、肺の副雑音が聴取された。それら子牛の胸部レントゲン検査では肺野全体の 30% 以上に不透過性を認め、16 頭全ての子牛で重度の気管支肺炎と診断された。これらの重度気管支肺炎子牛は入院後 1 週間以内に死亡または予後不良と診断され安楽殺処置が施された (気管支肺炎群)。一方、酪農学

園大学で飼育管理されていた 17 頭の子牛を健常対照群とした。これらの健常子牛は活力および食欲に異常を認めず身体および胸部レントゲン検査においても異常を認めなかった。さらに後述する検査により得られた BALF から細菌および *M. bovis* の感染は否定された。

すべての供試牛の頸静脈より 10 ml 採血し、血液分離用真空採血管に分注した。分注した血液は 24 時間以内に  $1,400 \times g$  で 10 分間、室温で遠心分離し、得られた血漿は直ちにオートアナライザー（富士ドライケム 3000; 富士フイルム株式会社、東京、日本）を用いて血糖値、血漿中 TP、アルブミン、グロブリン、および GPT 濃度の測定に供試した。

また、すべての子牛から気管支肺胞洗浄液を採取し、細菌培養検査および 16 S rRNA に基づいた *M. bovis* の検出を行った[33]。非選択培地を用いた 35-37 °C の好気条件下での 17-20 時間培養による細菌培養検査も同時に実施した。*M. bovis* の検査は polymerase chain reaction (PCR) を用いて実施した。さらに *M. bovis* は PPLO 培地を用いて 37 °C、5% 濃度 CO<sub>2</sub> 条件下で 3 日間培養して分離した。*M. bovis* の簡易 PCR 検査は、以下の通り実施した。すなわち、全反応液が 20  $\mu$ l となるように、10  $\mu$ l AmpdirectPlus( 島津製作所、京都、日本 )、0.50 U の Nova taq™ Hot start DNA ポリメラーゼ( Merck KGaA、ダルムシュタット、ドイツ )、5 pmol のマイコプラズマユニバーサルプライマーセット ( MycoAce; 日本獣医特殊品、恵庭、日本 ) および各 5  $\mu$ l のサンプルを混合し調整した。PCR は iCycler PCR システム ( Bio-Rad Laboratories、ハーキュリーズ、カリフォルニア州、米国 ) を用いて、95°C で 10 分間の初期変性後、94°C で 30 秒の変性、60°C で 45 秒のアニーリング、72°C で 1 分の伸長の 35 サイクルの条件で行った。PCR 産物を 1.5% ( w / v ) アガロースゲルでの電気泳動により分離し、エチジウムブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーターで可視化した。*M. bovis* 株 ( ATCC 25523 ) を陽性標準として使用した。

### 1.1.2 統計解析

全ての統計解析は、市販のソフトウェア・パッケージ（IBM SPSS Statistics v.23；日本 IBM Co. 東京）を用いて行った。正規分布データは平均値±標準偏差（SD: standard deviation）、非正規分布データは中央値（最小値-最大値）で示した。健常子牛に対するマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の各測定項目における測定値の差の検定は、*F* 検定で分散を評価した後に、等分散であれば Student's *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、マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の予後診断能は ROC 解析により評価した。理想的カットオフ値、感度および特異度は *J* インデックスに基づいて算出した[3, 68]。*J* インデックスとは ROC 曲線と対角線の距離と定義され、 $J = \text{maximum} [\text{sensitivity} + \text{specificity} - 1]$ により計算される。*J* インデックスに対応する ROC 曲線のカットオフ点を理想的カットオフ値とした[3, 68]。すべての統計学的解析は有意水準 5%未満を有意とした ( $p < 0.05$ )。

### 1.1.3 結果

図 1.1.1 に健常子牛およびマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の血糖値の比較を示した。気管支肺炎罹患子牛の血糖値は  $58.5 \pm 22.4$  mg/dl であり、健常子牛の  $90.7 \pm 29.9$  mg/dl と比較して有意に低値を示した ( $p < 0.01$ )。マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の血漿中 TP およびグロブリン濃度はそれぞれ  $7.0 \pm 1.2$  および  $3.7$  (2.1-6.6) g/dl であり、健常子牛の  $5.9 \pm 0.6$  g/dl ( $p < 0.01$ ) および  $2.8$  (1.9-3.5) g/dl ( $p < 0.05$ ) と比較して有意に高値を示した(図 1.1.2 および図 1.1.3)。マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の血漿中アルブミンおよび GPT 濃度はそれぞれ  $3.2 \pm 0.4$  g/dl および  $15.0$  (6.0-65.0) IU/l であり、健常子牛の  $3.2 \pm 0.3$  g/dl および  $9.0$  (5.0-20.0) IU/l でと比較して差を認めなかった。したがって、血糖値、血漿中 TP およびグロブリン濃度について ROC 解析により予後診断のカットオフ値を求めた。血糖値の ROC 曲線下面積 (AUC: area under the curve) は 0.783 となり、マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の予後を診断するための血糖値におけるカットオフ値は  $< 83.0$  mg/dl であった (図 1.1.4)。マイコプラズマ性気管支



肺炎罹患子牛の予後不良を診断するための血糖値のカットオフ値における感度 (Se: sensitivity) および特異度 (Sp: specificity) はそれぞれ 92.3% および 57.1% であった。同様に血漿中 TP およびグロブリン濃度の AUC は 0.832 および 0.797 となり、マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の予後を診断するための血糖値におけるカットオフ値は  $>6.5$  および  $>3.3$  g/dl であった( 図 1.1.5 および 図 1.1.6 )。マイコプラズマ性気管支肺炎子牛の予後不良を診断するための血漿中 TP 濃度のカットオフ値における Se および Sp はそれぞれ 76.9% および 85.7% であった。また、マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の予後不良を診断するための血漿中グロブリン濃度のカットオフ値における Se および Sp はそれぞれ 69.2% および 92.9% であった。

#### 1.1.4 考察

本試験において予後不良となるマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛では健康子牛と比較して、血糖値の低下および血漿中 TP およびグロブリン濃度の上昇が特徴であった。本試験は慢性肺炎罹患子牛において血糖値の低下や血漿中 TP およびグロブリン濃度の上昇が認められたとする Blum ら[8]の報告を裏付ける結果であった。さらに本試験では肺炎罹患子牛の栄養および炎症状態に関連すると推察されるこれらの測定値を用いて ROC 解析による予後評価を試みた。その結果、血糖値、血漿中 TP およびグロブリン濃度がそれぞれ  $<83.0$  mg/dl、  $>6.5$  g/dl および  $>3.3$  g/dl であればマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の予後は不良で可能性が高いことを示すことができた。本研究結果より、マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の予後診断において血糖値、血漿中 TP およびグロブリン濃度は有用なツールとなり得ることが示唆された。とりわけ血糖値の測定はヒト用の携帯型血糖値測定器 ( PBGM ) を利用すれば On-farm での迅速な診断が可能となり、臨床現場において非常に有用な診断項目になると考えられる。しかし、現在、牛医療において利用可能な PBGM の精度管理についての検証は行われていない。したがって、血糖値によるマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛

の予後評価を臨床現場に導入するためにはヒト用 PBGM が牛に応用可能か否かを検証する必要がある。

## 1.2 子牛におけるヒト用携帯型血糖値測定器（PBGM）の応用

低血糖症は通常、下痢および肺炎罹患子牛において栄養失調を伴う末期の病態として認められる[48, 88]。栄養失調の動物は、著しい生理的および代謝的变化を呈するために治療に対する反応が悪い[90]。低血糖は、子牛の死亡リスクを高めるため、血糖値を直ちに評価することは重要である[46, 87, 90]。

ヒトおよび獣医療において血糖値測定に使用されているほとんどの生化学分析装置（ACA: automated chemistry analyzers）は、標準法としてヘキソキナーゼ法またはグルコースオキシダーゼ法を用いて血糖値を測定している。しかし、これらは測定時間がかかることに加えて、実験室内で実施する必要があるという欠点がある[43]。一方、ヒト医療において糖尿病患者が自ら血糖値を測定するための血糖測定計[52, 54, 94]および入院患者の集中的な治療に用いるヒト用POC機器は、操作が簡便で患者の傍らでの測定が可能である。市販されている各種PBGMの基本的な原理は同じであり、主に電気化学的または吸光度によって測定される[26, 43]。血糖値の測定はヒト用のPBGMを利用すればOn-farmでの迅速な診断が可能となり、臨床的意義が高まると考えられる。しかしヒト用PBGMが牛に応用可能か否かを検証した報告はほとんどない。

したがって第1章第2節ではヒト用PBGMが牛医療において応用可能か否かを評価するため、ブドウ糖含有輸液剤の静脈内投与により血糖値を変動させた子牛の血液サンプルを用いて、2種類のPBGMの精度および正確度を血糖値測定の標準法であるヘキソキナーゼ法と比較した。

### 1.2.1 材料および方法

本試験は酪農学園大学動物実験委員会の承認（Approval#: VC15H21）に基づいて実施した[69]。本試験では酪農学園大学獣医学部医療センターで飼育管理されている、日齢89～307日（ $128.4 \pm 67.6$ 日）のホルスタイン種雄子牛11頭を用いた。

本試験はまず供試牛のうち7頭の子牛(125.8±10.8 kg)を用いて i-STAT 1(アボット社、プリンストン、イリノイ州、米国)の精度管理を行った。7頭の子牛に対して無作為に 40 ml/kg の等張酢酸リンゲル液または 120 ml/kg の 5%ブドウ糖加酢酸リンゲル液を投与速度 20 ml/kg/hr の速度で静脈内投与した。血液サンプルは、投与前および投与開始 0.5、1、2、3、4、6 および 24 時間後で輸液用カテーテルの反対側に留置した頸静脈カテーテルを介して採取した。血糖値の測定は i-STAT 1 およびカートリッジ(i-STAT EC8+ Cartridge、アボット社)を用いて行った。次に残りの子牛4頭(101.2±61.3 kg)を用いて Precision Xceed(アボット社)の精度管理を行った。図 1.2.1 に本研究で用いた i-STAT 1 および Precision Xceed を示した。4頭の子牛に対して無作為に 20 ml/kg の 2.5%ブドウ糖加等張リンゲル液を投与速度 10 ml/kg/hr で経静脈内投与した。血液サンプルは投与前および投与開始 15、30、45、60、75、120、180 および 300 分後に反対側に留置した頸静脈カテーテルを介して採取した。全血を Precision Xceed 測定電極へ滴下して血糖値の測定を行った。i-STAT 1 または Precision Xceed を用いて血糖値を測定した直後に 5 ml の血液サンプルをフッ化ナトリウム添加真空採血管に分注し、十分に転倒混和を行った。血漿分離するまで冷蔵保存した。血漿分離は室温で 15 分間、1,400 × g で血漿を遠心分離により得た。ヘキソキナーゼ法による血糖値の測定は市販の試薬キット(AU 480; Beckman Coulter Inc.、ブレア、カリフォルニア州、米国)を用いて行った。

### 1.2.2 統計解析

統計解析は市販のソフトウェア(IBM SPSS Statistics v.23; 日本 IBM Co.)を用いて行なった。正規分布データは平均値±SD、非正規分布データは中央値(最小値-最大値)で示した。ヘキソキナーゼ法で測定された血糖値を i-STAT 1 または Precision Xceed の精度および正確度を評価するための基準値とした。i-STAT 1 または Precision Xceed により測定された血糖値とヘキソキナーゼ法による血糖値の相関関係を Pearson's rank test により評価した。さらにそれぞれの機器によ

り測定された血糖値とヘキソキナーゼ法による血糖値の残差を Durbin-Watson 分析および Bland-Altman Plot を用いて評価した。それぞれの機器により測定された血糖値の精度を評価するために Wilcoxon 検定を併せて行った。危険率は  $p < 0.05$  を有意とした。

### 1.2.3 結果

i-STAT 1 および Precision Xceed による血糖値の測定範囲はそれぞれ 20-700 mg/dl および 20-500 mg/dl であった。測定範囲外 ( $>700$  mg/dl) の血糖値が i-STAT1 で測定した 11 検体で確認された。したがって本試験では i-STAT 1 および Precision Xceed の精度と正確度を評価するために 85 検体および 44 検体を供試した。

標準法であるヘキソキナーゼ法による血糖値と i-STAT 1 および Precision Xceed による血糖値の相関関係を図 1.2.2 に示した。i-STAT 1 により測定された血糖値は標準法のそれと強い相関が認められた ( $r^2=0.99$ ,  $p < 0.0001$ )。線形回帰分析に基づく関係式は血糖値 (mg/dl, i-STAT 1) =  $1.02 \times$  血糖値 (mg/dl, ACA) + 2.31 であった。Durbin-Watson 検定を用いた i-STAT 1 および標準法による血糖値の残差において自己相関は認められなかった ( $p > 0.05$ )。さらに i-STAT 1 と標準法の結果の残差をそれらの平均値に対して比較したところ i-STAT 1 における測定値は平均で 6.17 mg/dl 高値を示した。全体として、観測値の 94% は Bland-Altman の 95% 信頼区間に含まれ、良好な一致を示した (図 1.2.3)。i-STAT 1 および標準法を用いた血糖値の中央値はそれぞれ 97 (58-689 mg/dl) および 94 (55-676 mg/dl) であった。Wilcoxon 検定による二つの測定間での有意差は認められなかった ( $p > 0.05$ )。

Precision Xceed を用いた血糖値もまた標準法のそれと強い相関が確認された ( $r^2=0.96$ ,  $p < 0.0001$ )。線形回帰分析に基づく関係式は血糖値 (mg/dl, Precision Xceed) =  $1.32 \times$  血糖値 (mg/dl, ACA) + 10.68 であった。Durbin-Watson 検定を用いた Precision Xceed および標準法による血糖値の残差において自己相関は認め

られなかった ( $p>0.05$ )。さらに Precision Xceed と標準法の結果の残差をそれらの平均値に対して比較したところ Precision Xceed における測定値は平均して 31.59 mg/dl 高値を示した。全体として、観測値の 93%は Bland-Altman の 95%信頼区間に含まれ、良好な一致を示した。Precision Xceed および標準法を用いた血糖値の中央値はそれぞれ 152 (40-339 mg/dl) および 126 (41-249 mg/dl) であった。Wilcoxon 検定による二つの測定間での有意差は認められなかった ( $p>0.05$ )。

#### 1.2.4 考察

現在ヒトにおいて使用されているほとんどの PBGM は、相対的な血漿量、動脈および静脈血酸素分圧、および血液中 pH の影響を受けやすい[26]。Suzuki ら[86] は 2.5%ブドウ糖液は投与中に相対血漿量を増加させたが、動脈血 pH と血清電解質は変化させなかったことを報告している。本試験では輸液剤の静脈内投与による血糖値への影響を最小限にする目的で 2.5%または 5.0%ブドウ糖加電解質液を使用した。

本試験では2つの異なる PBGM による血糖値測定の精度および正確度を評価した。その結果 i-STAT 1 および ACA によって測定した血糖値の間には強い相関関係が認められた。ACA による血糖値測定を標準法としたとき、i-STAT 1 は精度および正確度に標準法との間に差が認められなかったことから、i-STAT 1 は牛の POC に使用可能であることが示唆された。一方、Precision Xceed は標準法と強い相関関係を有するが、高血糖領域において過大評価していることが明らかとなった。Precision Xceed は内蔵の換算係数を使用して静脈血と等価の血糖値を算出する。イヌやアルパカにおいても一貫性のない過小および過大評価が報告されている[13, 26, 87]。本試験における Precision Xceed による高血糖範囲での過大評価は、機器独自の補正アルゴリズムにより生じた可能性がある。さらに本試験では、被毛を剃毛したのち皮膚を傷つけて出血させて得る末梢血よりも、牛の診療においては頸静脈、耳介、尾骨静脈および乳静脈などの静脈から

の採血が一般的であることから、静脈血を用いて Precision Xceed を使用した。このことも Precision Xceed による血糖値測定に影響した可能性があった。Gerber ら[26]は特定の範囲内の血糖値を一貫して過大評価する PBGM は、一貫性なく予測不能な誤差を示す PBGM よりも臨床応用し易いことを報告している。したがって、Precision Xceed は標準法と比較して高血糖域で過大評価することを理解して牛の POC に応用することが重要である。

### 1.3 小括

第1章第1節では肺炎罹患子牛と健常子牛の血糖値、血漿中 TP、アルブミン、グロブリン、および GPT 濃度について ROC 解析により予後診断へのカットオフ値を求めた。その結果、血糖値、血漿中 TP およびグロブリン濃度がそれぞれ  $<83.0 \text{ mg/dl}$ 、 $>6.5 \text{ g/dl}$  および  $>3.3 \text{ g/dl}$  であればマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の予後は不良である可能性が高いことを示すことができた。とりわけ血糖値の測定はヒト用の PBGM を利用すれば On-farm での迅速な診断が可能となり、臨床現場において非常に有用な診断項目になると考えられる。しかし、牛医療において利用可能な PBGM の精度管理についての検証は現在のところ行われていないことから第1章第2節ではヒト用 PBGM が牛に応用可能か否かを検証する目的で2種類のヒト用 PBGM の精度および正確度について評価した。その結果、i-STAT 1 および Precision Xceed は標準法と強い相関関係を示したことから牛の POC に使用可能であることが示唆された。一方で、子牛の細菌性肺炎の主な原因であるグラム陰性菌は、LPS で構成される細胞壁をもち、これがエンドトキシンに起因した全身性炎症に関与する。エンドトキシンは、マクロファージを刺激して TNF- $\alpha$ 、IL-1 および IL-6 などのサイトカインを放出させることが知られていることから[20, 95]、肺炎罹患子牛の病態を評価するうえでエンドトキシン活性や炎症性サイトカインの調査は必要となるであろう。



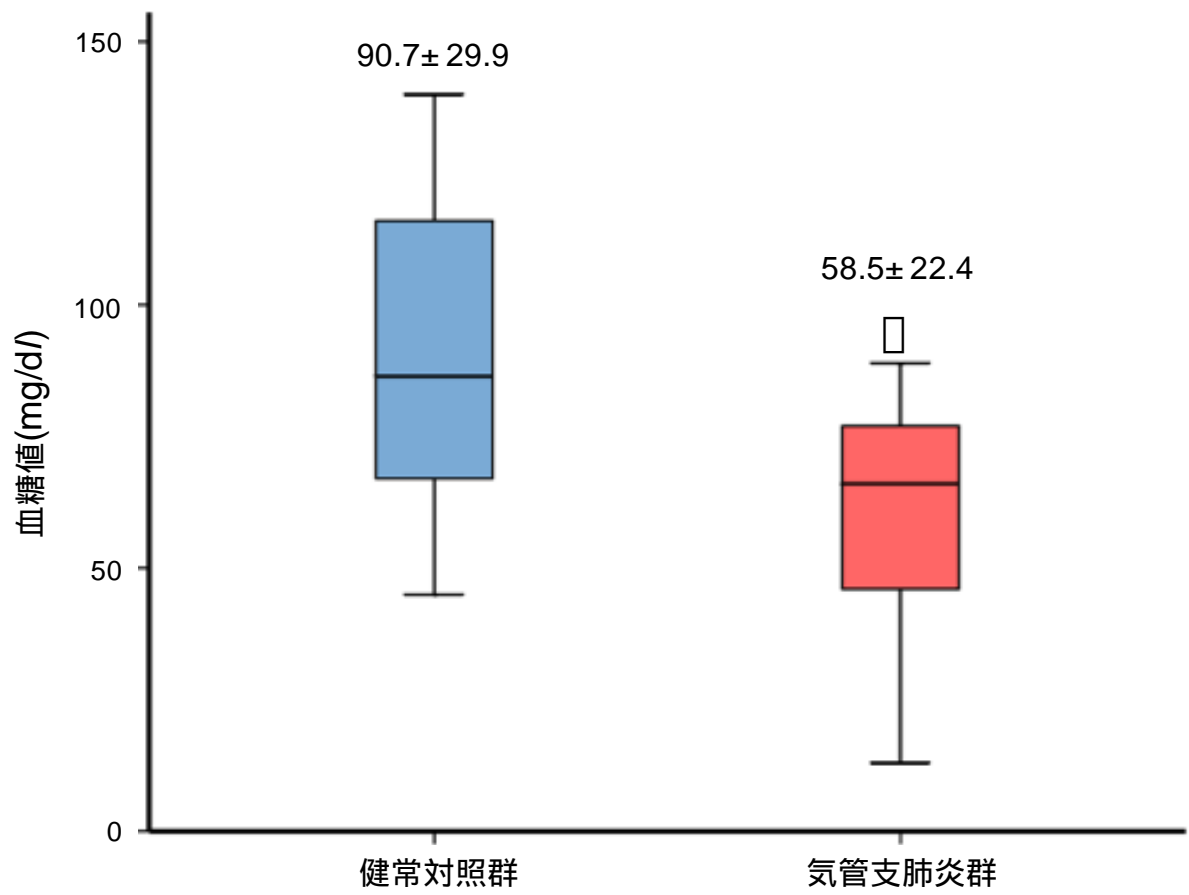


図 1.1.1 マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛における血糖値の比較

\*:  $p < 0.01$

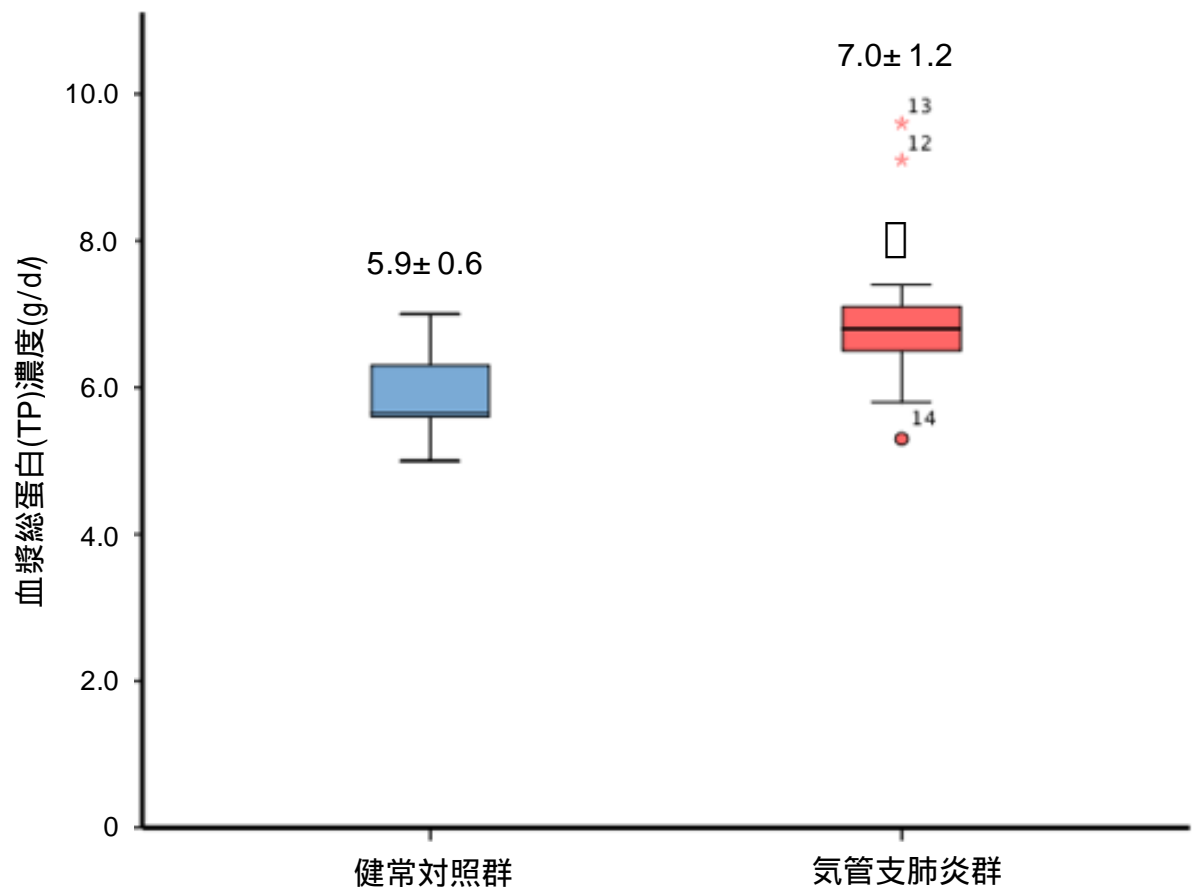


図 1.1.2 マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛における血漿中総蛋白(TP)濃度の比較

健康対照群(n=17)、気管支肺炎群(n=16)

箱は四分位範囲を示した(25-75%)。\*:  $p < 0.01$

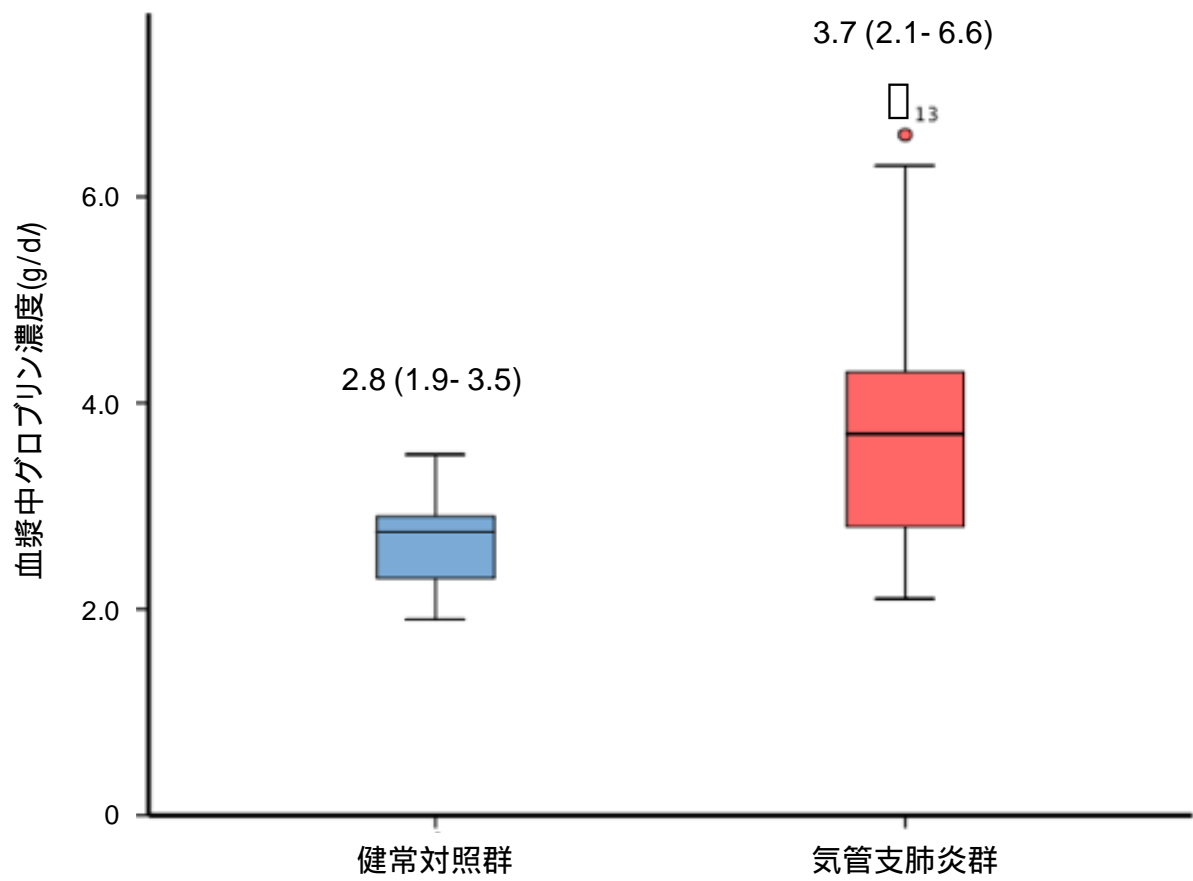


図 1.1.3 マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛における血漿中グロブリン濃度の比較

\*:  $p < 0.05$

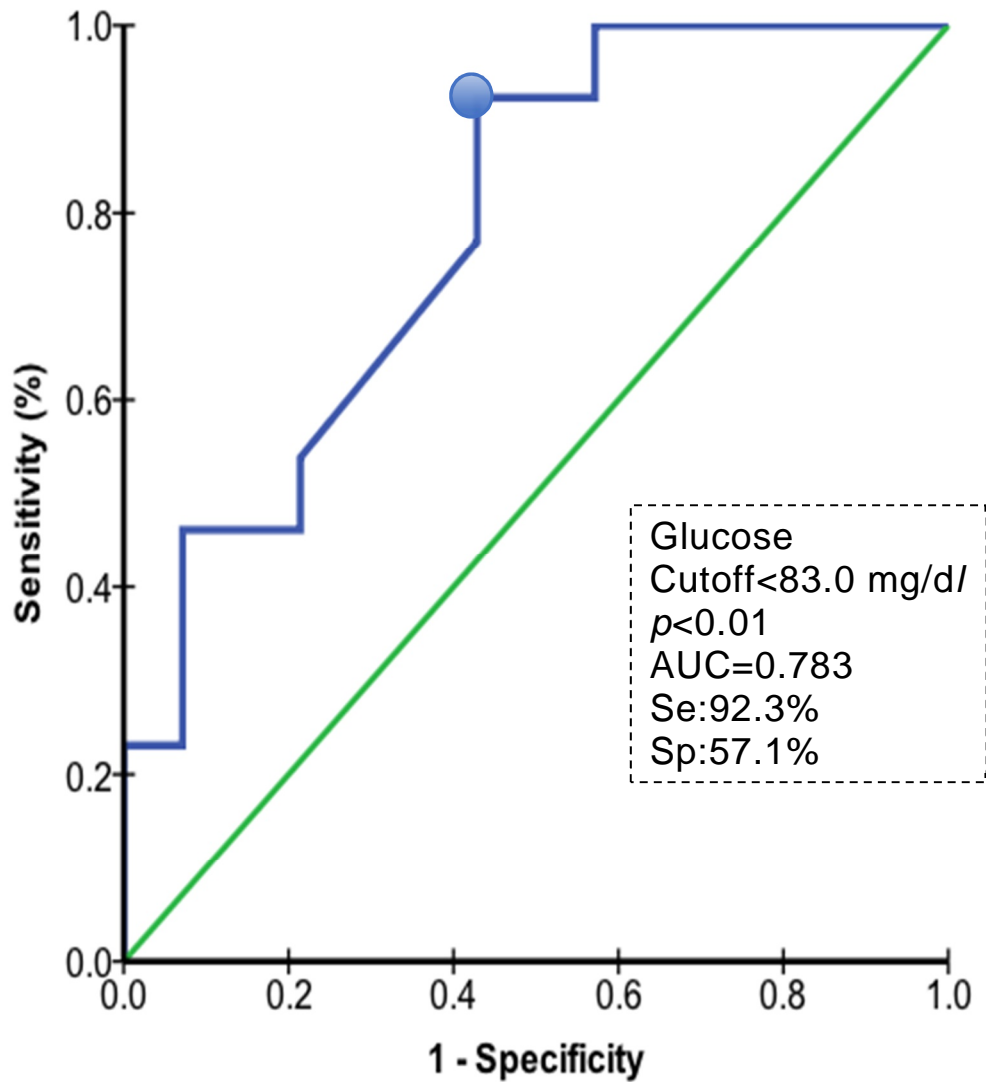


図 1.1.4 血糖値によるマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の予後診断能  
理想的カットオフ値はJインデックスにより算出した。

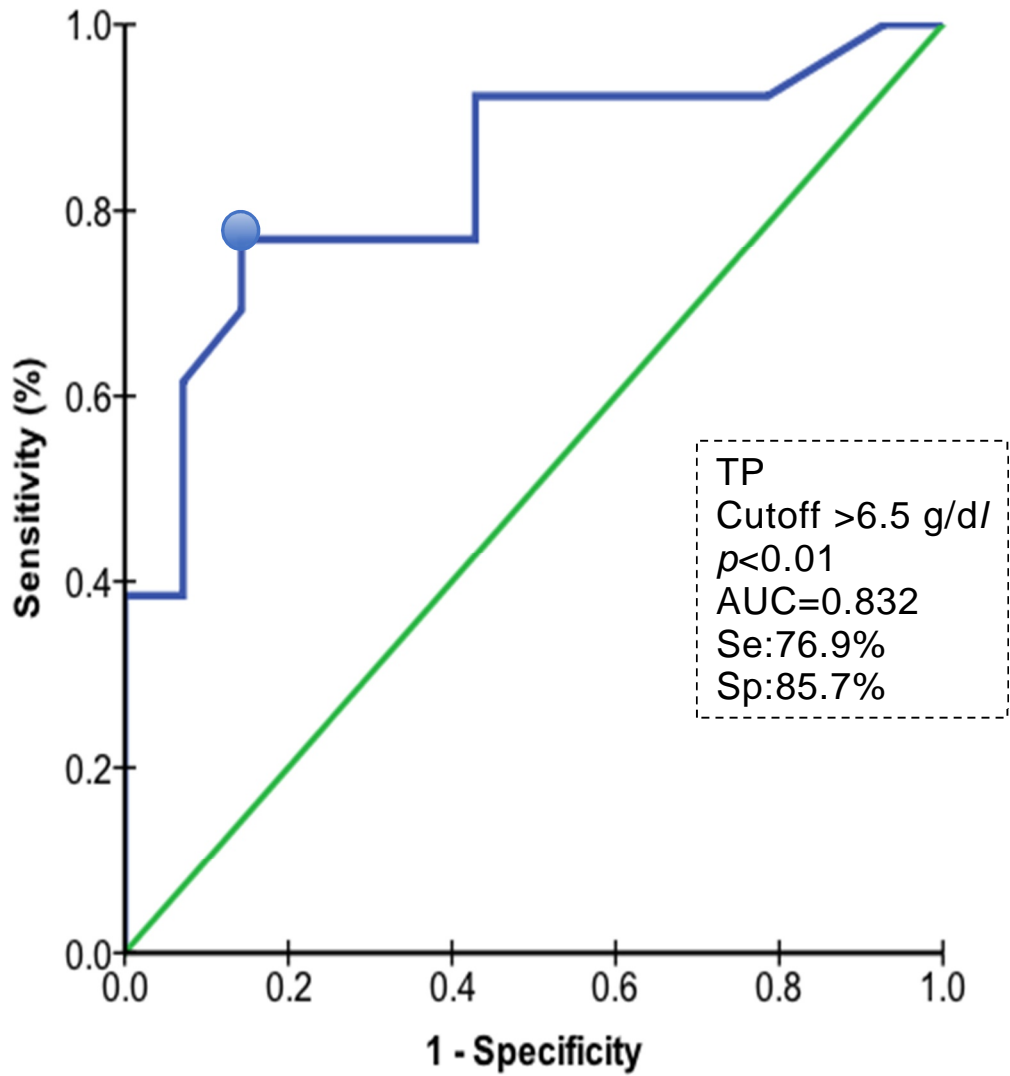


図 1.1.5 血漿中総蛋白(TP)濃度によるマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の予後診断能

理想的カットオフ値はJインデックスにより算出した。

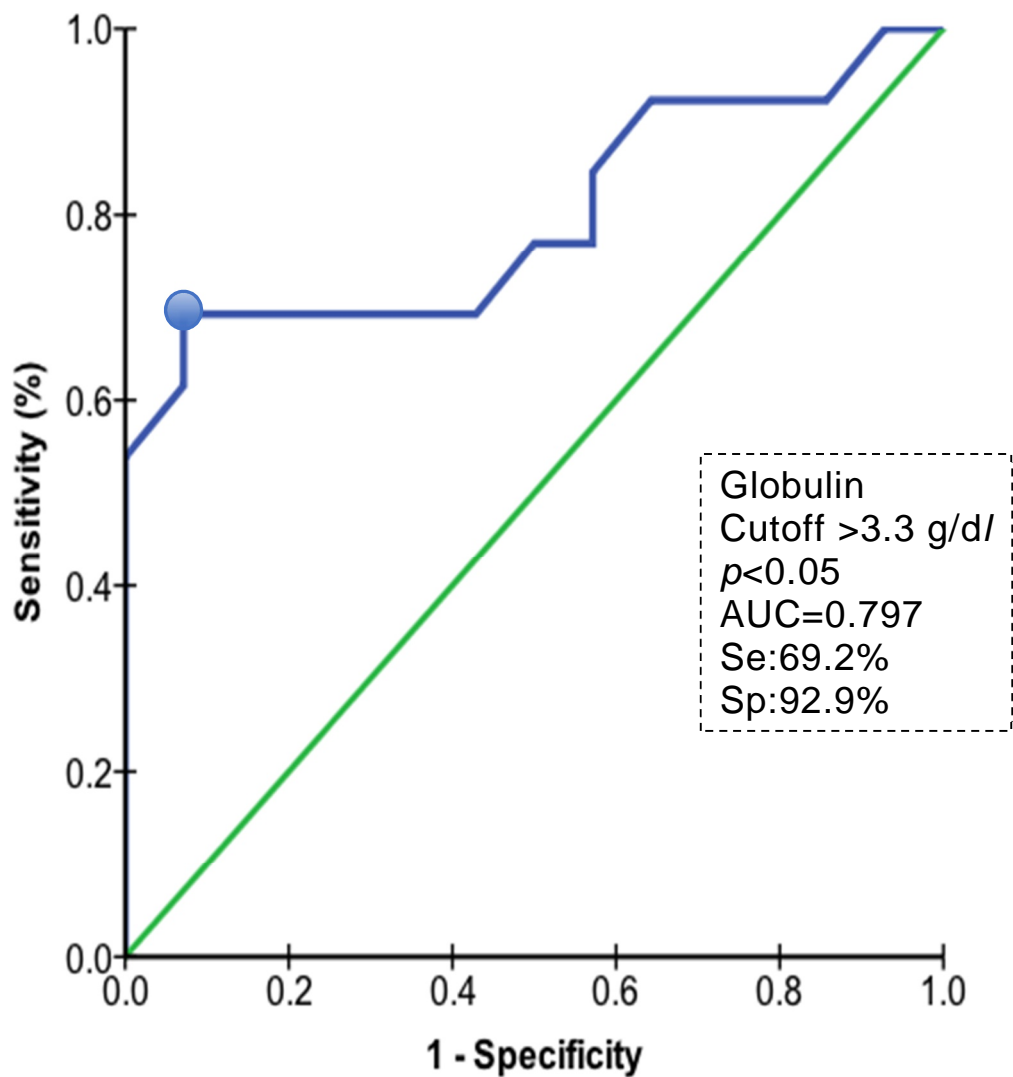
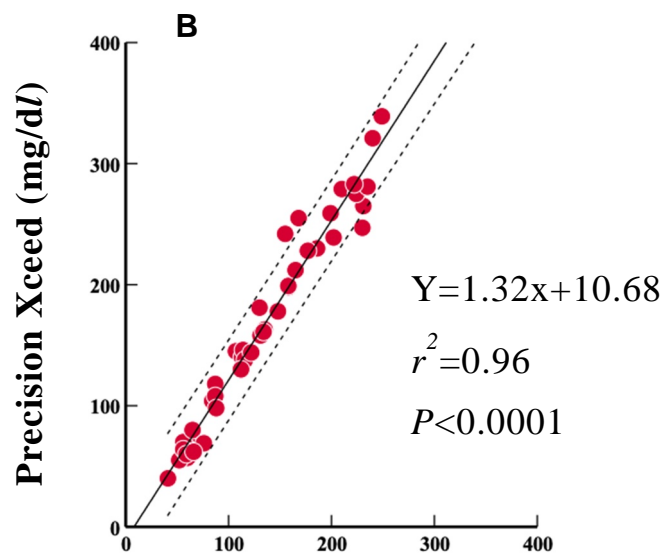
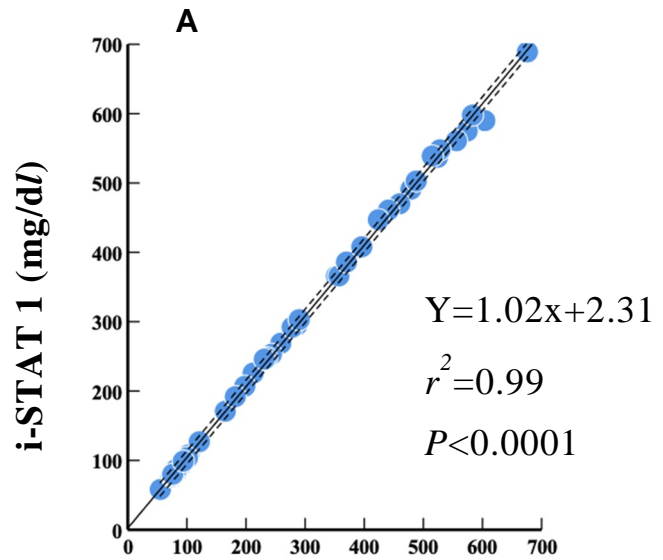


図 1.1.6 血漿中グロブリン濃度によるマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の予後診断能

理想的カットオフ値はJインデックスにより算出した。



図 1.2.1 本試験に用いた携帯型血糖値測定器：i-STAT 1（上）および Precision Xceed（下）



Gold standard (hexokinase method, mg/dl)

図 1.2.2 標準法であるヘキソキナーゼ法による血糖値と i-STAT 1 (A) および Precision Xceed (B) による血糖値の相関関係  
 プロットは血糖値、破線は 95% 信頼区間を示した。



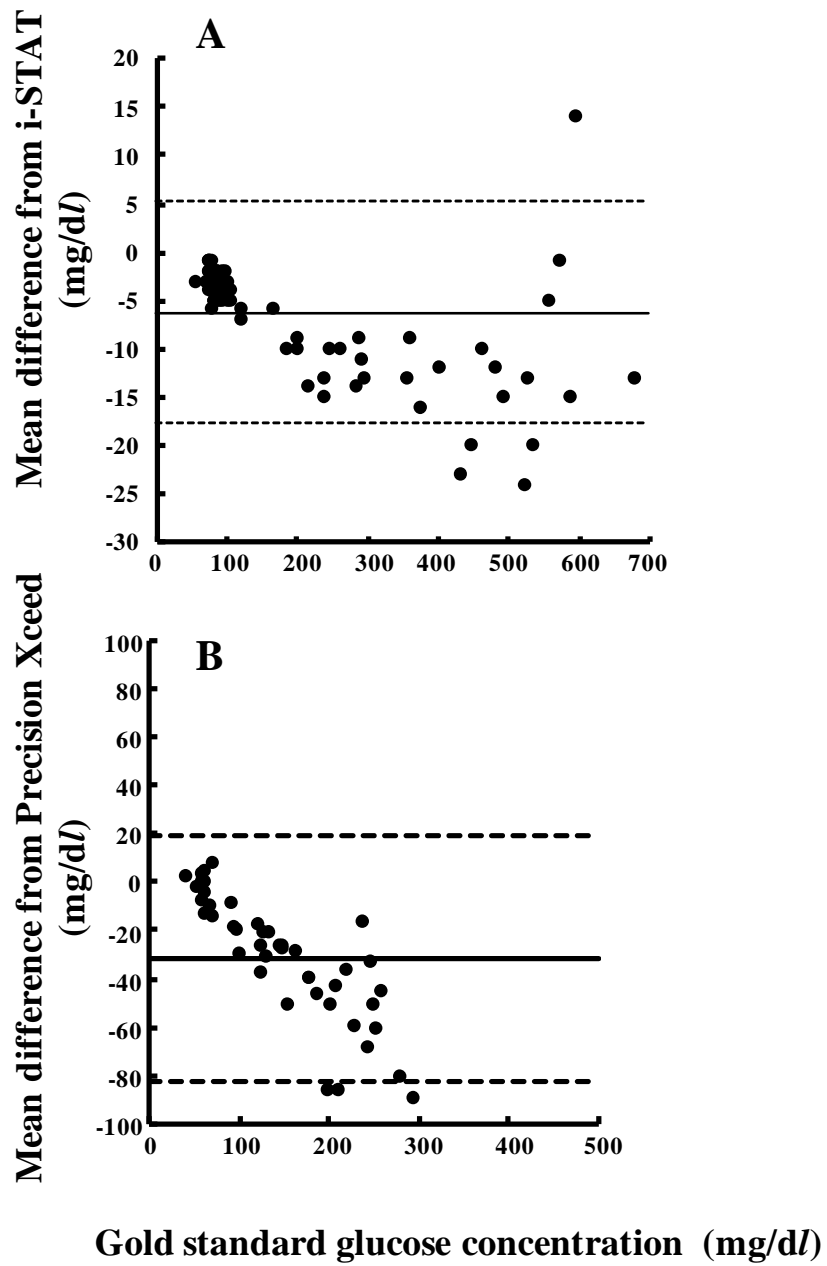


図 1.2.3 Bland-Altman plot による i-STAT 1 (A)および Precision Xceed (B)と標準法に対する血糖値の関係

## 第 2 章

エンドトキシン活性値および炎症性サイトカイン mRNA 発現量を指標とした  
子牛のエンドトキシンに起因する全身性炎症の病態解析

子牛の細菌性肺炎の主な原因であるグラム陰性菌は、LPS で構成される細胞壁をもち、エンドトキシンとして全身性炎症をもたらす。エンドトキシンはグラム陰性菌が死滅する際に放出される一次毒性物質である[34]。反芻動物ではエンドトキシンに対する病態生理学的影響は用量依存的であり、さまざまな代謝的および臨床的徴候を誘発する[57, 59]。さらにエンドトキシンによる刺激は、感染肺組織領域に蓄積した好中球および単球（マクロファージ）から炎症性サイトカインを放出させる[10, 83]。IL-1、IL-6 および TNF のような炎症性サイトカインは高体温症、食欲不振そしてタンパク分解を引き起こすため、循環血中エンドトキシン活性および炎症性サイトカイン発現量の増加は予後に影響を与えることが示唆されている[37]。肺炎罹患子牛において、もし血漿中エンドトキシン活性値の上昇と肺炎の重症度が相関するのであれば、血漿中エンドトキシン活性値を指標として予後の評価が可能となるかもしれない。一方で、Bieniek ら[7]は子牛は日齢によりエンドトキシン感受性が異なる、とくに新生子牛でエンドトキシンへの感受性が高いことを報告している。しかしながら、子牛の日齢とエンドトキシン感受性に関する検証は少なく、そのメカニズムについては不明な点が多いのが現状である。

したがって、第 2 章第 1 節では *M. bovis* に感染した重度気管支肺炎罹患子牛の血漿および気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中エンドトキシン活性値について ROC 解析により予後診断のカットオフ値を求めた。また第 2 章第 2 節では日齢の異なる子牛に LPS を投与し、LPS により誘導される白血球および肝臓中の炎症性サイトカインの mRNA 発現量を測定し比較することで、加齢により LPS に対する感受性が異なるか否かの検証を行った。

## 2.1 マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛における血漿中エンドトキシン活性値を指標とした予後評価

炎症は細胞や組織の損傷に対する複合的な反応であり、非特異的な全身での急性炎症による反応は急性期反応と呼ばれる。炎症に対する宿主の反応、つまり急性期反応は、血漿タンパク濃度の著しい変化を伴う一連の生理学的反応である[6]。炎症性サイトカインに対する全身反応には、肝臓からの急性相タンパク (APPs) 産生と分泌が含まれる[58]。APPs は炎症反応の初期に放出されるため、APPs を測定することにより炎症の早期発見が可能である。牛において測定可能な主な APPs はハプトグロビン (Hp)、血清アミロイド A (SAA)、LPS 結合タンパク、 $\alpha$ 1 酸性糖タンパク、トランスフェリンである[19、39、63、92]。肺炎罹患牛の炎症マーカーとして Hp [30、45] の有用性が報告されている一方で、その診断能が高くないことも確認されている[35、66]。子牛の細菌性肺炎の主な原因はグラム陰性菌であることから、BALF または血漿中エンドトキシン活性値を測定することで肺炎罹患子牛の重症度を評価することができるかもしれない。第 2 章第 1 節では肺炎罹患子牛の BALF および血漿中エンドトキシン活性値について ROC 解析により予後診断へのカットオフ値を求めた。また、BALF と血漿中のエンドトキシン活性値の関係を評価することで気管支肺炎局所の炎症が全身性炎症へ進行する機序について検証した。

### 2.1.1 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[69]。本試験では日齢 13 日 ~ 148 日 ( $48.6 \pm 33.4$  日) のホルスタイン種雄子牛 20 頭、雌子牛 10 頭およびジャージー種雄子牛 3 頭を供試した。全ての子牛の健康状態は身体一般検査、血液生化学検査および胸部レントゲン検査により評価を行った。16 頭の子牛は酪農学園大学附属動物医療センターに治療目的で入院した子牛であり、臨床症

状として発咳、鼻汁、および発熱および肺の副雑音が聴取された。これらの子牛は胸部レントゲン検査により肺野全体の 30% 以上に不透過性を認め重度の気管支肺炎と診断され、入院後 1 週間以内に死亡または予後不良と診断された(気管支肺炎群)。一方で、臨床症状がなく後述する検査により細菌および *M. bovis* の感染を認めなかった 17 頭の子牛を健常対照群とした。

BALF は、気管支鏡検査において定法により得た[4, 80]。すなわち気管支鏡検査は、キシラジン 0.05 mg/kg を用いた鎮静下で行い、気管支鏡の先端を気管の気管支に挿入留置し、50 ml シリンジを用いて 37 °C に加温した滅菌生理食塩水を 200 ml 注入したものを気管支鏡により吸引した。BALF 回収率は 60% 以上と設定した。気管支鏡内のエンドトキシンに対して検査直前に最低 5 回の洗浄を行った。すなわち洗浄は 2 l 水道水を吸引した後、1 l の消毒液で洗浄し、更に 0.5 l の滅菌生理食塩水による吸引を 1 回のプロトコルとした。消毒液として 5 ml のベンザルコニウム液を 1 l の生理食塩水を用いて 200 倍希釈した。3 回以上の吸引でエンドトキシン活性値が測定限界値以下になることを確認済みであった。BALF サンプルの一部は、細菌培養検査および PCR による 16 S rRNA に基づいた *M. bovis* 検出に供試した[33]。細菌培養検査は、非選択培地を用いて 35-37 °C の好気条件下で 17-20 時間培養して一般好気性細菌の検出を試みた。*M. bovis* 検出は PPLO 培地を用いて 37 °C、5% 濃度 CO<sub>2</sub> 条件下で 3 日間培養することで行った。簡易 PCR は、全反応液が 20 μl となるように、10 μl AmpdirectPlus (島津製作所) 0.50 U の Nova taq™ Hot start DNA ポリメラーゼ(Merck KGaA) 5 pmol のマイコプラズマユニバーサルプライマーセット(MycoAce; 日本獣医特殊品) および各 5 μl のサンプルを混合し調整した。PCR は iCycler PCR システム (Bio-Rad Laboratories) を用いて、95°C で 10 分間の初期変性後、94°C で 30 秒の変性、60°C で 45 秒のアニーリング、72°C で 1 分の伸長の 35 サイクルの条件で行った。PCR 産物を 1.5% (w/v) アガロースゲルでの電気泳動により分離し、エチジウムブロマイドで染色し、UV トランスイルミネーターで可視化した。*M. bovis* 株 (ATCC 25523) を陽性標準として使用した。

血漿および BALF 中のエンドトキシン活性値は、それぞれリムルス比濁時間法 (LAL-KTA: Limulus Amebocyte Lysate-Kinetic Turbidimetric assay) およびリムルス基質発色法 (LAL-KCA: Limulus Amebocyte Lysate-Kinetic Chromogenic assay) により測定した。測定直前に、血漿と BALF 検体は、エンドトキシンフリー蒸留水 (大塚蒸留水; 大塚製薬、東京、日本) を用いてそれぞれ 20 倍および 100 倍に希釈し、ボルテックスミキサーで 10 秒間混和した。その後、血漿は測定阻害物質を不活化するために 80 °C、10 分間加熱処理した。

全ての測定には、エンドトキシンフリー蒸留水を陰性対照、リファレンススタンダード (CSE、Control Std Endotoxin; Charles River、チャールストン、サウスカロライナ州、米国) を 10,000 (EU) /バイアルに調整したエンドトキシンを陽性対照として使用した。β-グルカンによる反応阻害をさけるため、カイネティック比濁時間用 LAL 試薬 (Endosafe® KTA2; Charles River) を Endotoxin-Specific Buffer Solution (Charles River) により再融解した。LAL-KTA 法は 96 穴マイクロプレート (Endosafe® 96-well、flat bottom microplate M9001; Charles River) を用い、マイクロプレートリーダー (Sunrise™; Tecan Group Ltd.、メンネドルフ、スイス) およびエンドトキシン測定ソフトウェア EndoScan-V™ (Charles River) により測定した。測定限界値は、血漿と BALF でそれぞれ 0.042 EU/ml および 0.140 EU/ml であった。添加回収率と変動係数 (CV: Coefficient of variation) の許容基準 (添加回収率: 50-200% および CV: 25% 未満) を満たしたものを有効とみなした [16、24、25、42]。

### 2.1.2 統計解析

統計解析は市販のソフトウェア (IBM SPSS Statistics v.21; IBM Co、サマーズ、ニューヨーク州、米国) を用いて行なった。正規分布データは平均値±SD、非正規分布データは中央値 (最小値-最大値) で示した。群間の比較は分散を評価したのち、非正規分布 (エンドトキシン活性値) データは Mann-Whitney *U* 検定を用いて行った。また、予後不良群の診断能を ROC 曲線解析により評価し、さ

らに感度と特異度を理想的カットオフ値により決定した。すなわち、理想的カットオフ値は  $J$  インデックスに基づいて算出した[3, 68]。  $J$  インデックスとは ROC 曲線と対角線の距離と定義され、  $J = \text{maximum} [\text{sensitivity} + \text{specificity} - 1]$  により計算した。  $J$  インデックスに対応する ROC 曲線のカットオフ点を理想的カットオフ値とした[3, 68]。さらに血漿と BALF 中のエンドトキシン活性値の相関関係を調べるために Pearson's rank test を用いた。すべての統計学的解析は有意水準 5% 未満を有意とした ( $p < 0.05$ )。

### 2.1.3 結果

細菌分離培養の結果、 *P. multocida* および *M. haemolytica* がそれぞれ気管支肺炎罹患子牛 1 頭および 6 頭から検出された。16S rRNA に基づく PCR および PPLO 培地による培養検査によって、 *M. bovis* は気管支肺炎群のすべての子牛の BALF から分離された。一方、健常対照群からは細菌および *M. bovis* は検出されなかった。

健常対照群における BALF 中エンドトキシン活性値の中央値は 2.43 EU/ml (0.10-36.33) であった。気管支肺炎群の BALF 中エンドトキシン活性値は、29.45 EU/ml (0.50 -156.46) であり、健常対照群のそれと比較して有意に高値を示した ( $p < 0.001$ 、図 2.1.1)。一方で健常対照群における血漿中エンドトキシン活性値は、17 頭中 14 匹 (82.4%) で検出限界値以下であり、中央値は 0.042 EU/ml (0.042-0.802) であった。気管支肺炎群の血漿中エンドトキシン活性値は 0.437 EU/ml (0.048-2.419) であり、健常対照群のそれと比較して有意に高値を示した ( $p < 0.001$ 、図 2.1.2)。

図 2.1.3 および図 2.1.4 に気管支肺炎罹患子牛の BALF 中および血漿中エンドトキシン活性値について ROC 解析による予後診断能を示した。BALF 中および血漿中エンドトキシン活性値について ROC 解析により予後診断のカットオフ値を求めたところ、BALF 中および血漿中エンドトキシン活性値の AUC はそれぞれ 0.875 および 0.914 であった。マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の予後

診断するための BALF 中および血漿中エンドトキシン活性値におけるカットオフ値はそれぞれ 4.39 および 0.104 EU/ml であった。また、BALF 中エンドトキシン活性値による重度気管支肺炎罹患子牛の予後評価のカットオフ値の Se および Sp はそれぞれ 81.3 % および 88.2% であり、血漿中エンドトキシン活性値による重度気管支肺炎罹患子牛の予後評価のカットオフ値の Se および Sp はそれぞれ 81.3 % および 82.4% であった。さらに、BALF 中エンドトキシン活性値および血漿中エンドトキシン活性値は、有意な正の相関を示した ( $r^2=0.900$ 、 $p<0.01$ 、図 2.1.5)。

#### 2.1.4 考察

Radaelli ら [77] は BRDC における *M. bovis* の重要性について指摘している。*M. bovis* は、好中球およびマクロファージを気管や細気管支に誘導し微小膿瘍を形成する。集積した好中球およびマクロファージは気管上皮細胞を損傷し [2] 気道環境を悪化させる。すなわち、*M. bovis* は *P. multocida* および *M. haemolytica* などの細菌性病原体の呼吸器官への侵入を容易にする役割を果たしている [70]。このことは *M. bovis* が化膿性肺炎、壊死性肺炎およびカタル性肺炎子牛において頻繁に分離されることから支持される [77]。以上のことから、本試験では *M. bovis* に関連した重度気管支肺炎罹患子牛においては BALF および血漿中エンドトキシン活性値が増加しているという仮説を立て実験を遂行した。その結果、*M. bovis* に関連した重度気管支肺炎罹患子牛における BALF および血漿中エンドトキシン活性値は、健常子牛のそれと比較して有意に高値を示した。さらに ROC 解析により BALF および血漿中エンドトキシン活性値がそれぞれ 4.39 および 0.104 EU/ml 以上であれば、予後不良と診断できることが示唆された。さらに、BALF および血漿中エンドトキシン活性値の間には正の相関が確認された。

Murphy ら [67] はウサギの気道内にエンドトキシンを投与した後に陽圧換気を行うと、伸展刺激により気管上皮に生じた損傷部から循環血中へエンドトキシンが移行することを実験的に明らかにした。本試験による BALF 中エンドトキシ



ン活性値は血漿中のそれと比較して著しく高値を示したこと、BALF および血漿中エンドトキシン活性値の間には正の相関が確認されたことから、本試験の結果は、気道から全身へエンドトキシンが移行している可能性を示唆している。

気管支肺炎罹患子牛における血漿中エンドトキシン活性値による予後診断能 (AUC:0.914) は Hp (AUC:0.68) [66]によるその比較からもその有用性が伺われた。本試験結果より、血漿中エンドトキシン活性を測定することで肺炎罹患子牛の重症度評価が可能であることが明らかとなった。

## 2.2 エンドトキシンチャレンジモデルにおける炎症性サイトカイン mRNA 発現量の経時的変化

肺炎や腸炎などエンドトキシンに関連した疾患に牛の臨床現場で遭遇することは珍しくない[14]。新生子牛はエンドトキシンに感受性が高く[7]、血液中のエンドトキシン活性の上昇により疾病は重症化する[15, 72]。エンドトキシンに関連した疾患の炎症反応は、エンドトキシンが Toll 様受容体 (TLR) に結合してその活性を示す[49]。その結果、核内因子 B (NF $\kappa$ B) を活性化し、TNF $\alpha$ 、IL-6、マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) 9 を誘導する[56]。また、別の調整因子としてシグナル伝達兼転写活性化因子 (STAT) 3 は、炎症により誘導される IL-6 の刺激により増加することが知られている[21]。牛のエンドトキシンに対する炎症反応を知ることは、炎症性疾患の新たな治療法および予後評価のために重要である。さらに Bieniek ら[7]が指摘する子牛の加齢とエンドトキシン感受性に関する検証は少なく、そのメカニズムについては不明な点が多いのが現状である。したがって、第 2 章第 2 節では日齢の異なる子牛にエンドトキシンを投与し、エンドトキシンにより誘導される白血球および肝臓中における炎症性サイトカイン mRNA 発現量を測定することで、加齢によるエンドトキシンに対する感受性が異なるか否かの検証を行った。

### 2.2.1 材料および方法

本試験は酪農学園大学動物実験委員会の承認 (Approval#: VH16C1) に基づいて実施した[69]。本試験では、身体一般検査、血液生化学検査、胸部超音波検査およびレントゲン検査により異常所見を認めない健常ホルスタイン種およびジャージー種の計 15 頭 (雄 9 頭および雌 6 頭) を供試した。

子牛は対照群 (n=5、191 $\pm$ 21 日、188.8 $\pm$ 42.35 kg)、LPS older 群 (n=5、162.4 $\pm$ 17.5 日、168.5 $\pm$ 21.11 kg) および LPS young 群 (n=5、22.4 $\pm$ 8.2 日、38.1 $\pm$ 9.26 kg) の 3 群に区分した。全ての子牛に頸静脈カテーテルを留置し、その直後に 2.5  $\mu$ g/kg

の O111:B4 LPS ( L4391、Sigma-Aldrich、セントルイス、ミズーリ州、米国 ) を自家血清 10 ml に混和してボラス投与した ( LPS older および LPS young 群 )。対照群には生理食塩液 ( 生理食塩水 ; 日本全薬工業、福島、日本 ) 10 ml をそれぞれ頸静脈より投与した。エンドトキシンまたは生理食塩液の投与前 ( pre )、投与 0.5、1、2、4、8、12 および 24 時間後において LPS を投与した反対側の頸静脈より 10 ml 採血を行った。採血した血液は直ちに全血用 EDTA 管、血清分離用およびヘパリン添加分離真空採血管に分注した。血清および血漿は 1,400 × g、15 分間の遠心分離により得た。全血は RBC lysis buffer ( Roche Diagnostic、バーゼル、スイス ) を用いて溶血し、遠心分離により白血球を得た。この処理で得られた白血球を High pure RNA Kit Lysis/binding buffer ( Roche Diagnostic ) 処置し、mRNA を抽出した。これらのサンプルは測定まで -80 °C で保存した。

第 10-11 肋間において 2.5 ml の 2 % リドカイン ( キシロカイン注 2% ; アストラゼネカ、大阪、日本 ) により局所の浸潤麻酔を施し、pre、LPS または生理食塩液投与 2、4 および 24 時間後において超音波ガイド下で肝生検を行なった。肝生検には 14G の生検針 ( クイックカット C2 ; 株式会社八光、東京、日本 ) を用いた。肝生検により得た組織を直ちに RNAlater RNA stabilization reagent ( Qiagen、ヒルデン、ドイツ ) に浸漬した。肝臓サンプルは採取後 24 時間以内に使い捨て型ホモジナイザー ( bio-masher II ; 和光純薬工業、東京、日本 ) を用いてホモジナイズすると同時に High pure RNA Tissue Kit ( Roche Diagnostic ) 処置により mRNA を抽出したのち測定まで -80 °C で保存した。

血漿中エンドトキシン活性値は LAL-KTA により測定した。測定の直前に血漿をエンドトキシンプリー蒸留水 ( 大塚蒸留水 ; 大塚製薬 ) を用いて 20 倍希釈し、ボルテックスミキサーで 10 秒間混和した。その後、阻害物質を不活化するため 80 °C で 10 分間加熱した。全ての測定には、エンドトキシンプリー蒸留水を陰性対照、リファレンススタンダード ( CSE、Control Std Endotoxin ; Charles River ) を 10,000 (EU)/バイアルに調整したエンドトキシンを陽性対照として使用した。 $\beta$ -グルカンによる反応阻害をさけるため、カイネティック比濁時間用 LAL 試薬

( Endosafe<sup>®</sup> KTA2 ; Charles River ) を Endotoxin-Specific Buffer Solution ( Charles River ) により再融解した。LAL-KTA 法は 96 穴マイクロプレート ( Endosafe<sup>®</sup> 96-well、flat bottom microplate M9001 ; Charles River ) を使い、マイクロプレートリーダー ( Sunrise<sup>™</sup> ; Tecan Group Ltd. ) およびエンドトキシン測定ソフトウェア EndoScan-V<sup>™</sup> ( Charles River ) により測定した。各測定では LAL 試薬の添付文書に従い、0.003 EU/ml から 3.0 EU/ml の範囲の検量線を作成した。

エンドトキシンチャレンジモデルより得た白血球および肝臓の TLR4、NFκB1、NFκB2、TNFα、IL-6 および STAT3 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法 ( Light-Cycler 480 system II ; Roche Diagnostics ) により測定した。逆転写およびリアルタイム PCR は市販のキット ( Light-Cycler<sup>®</sup> Multiplex RNA Virus Master version 3 ; Roche Diagnostics ) を用いたワンステップ法により行なった。リアルタイム PCR は 96 穴プレートで行ない、反応液の最終量は 20 μl とした。反応液は 5 μl のテンプレート RNA、各プライマー ( リバースおよびフォワードプライマー ) 1 μl ( 0.5 μM )、ユニバーサルプローブ 0.4 μl、RT-PCR reaction mix 4 μl、RT-Enzyme solution 0.1 μl および水 8.5 μl により調整した。牛 TLR4、NFκB1、NFκB2、TNFα、IL-6 および STAT3 に対するプライマーおよびユニバーサルプローブを表 2.2.1 に示した。添付文書に従い、増幅条件は 50°C で 10 分 ( 逆転写 )、95°C で 30 秒 ( プレインキュベート )、95°C で 5 秒および 60°C で 30 秒を計 55 サイクル ( 増幅 ) とした。結果は、リファレンス遺伝子である Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-mRNA に対する相対発現量として市販のソフトウェア ( E-method ; Roche Diagnostics ) を用いて算出した。

### 2.2.2 統計解析

統計解析は市販のソフトウェア ( IBM SPSS Statistics v.23 ; 日本 IBM Co. ) を用いて行なった。正規分布データは平均値±SD、非正規分布データは中央値 ( 最小値-最大値 ) で示した。得られたデータの統計学的評価はグループと時間を二つの要因として二元分散分析を用いて行い、その後、群間比較を Bonferroni 検定、

pre 値に対する経時的変化は Dunnett 検定を用いて行った。

### 2.2.3 結果

図 2.2.1 に血漿中エンドトキシン活性値の経時的変化を示した。対照群では一貫して血漿中エンドトキシン活性値に変動は認めなかった。一方、LPS older ( $p<0.05$ ) および LPS young ( $p<0.001$ ) 群の pre 値に対する 0.5 時間後の血漿中エンドトキシン活性値は有意な増加を示し、それぞれ 1.313 EU/ml (0.490-2.689) および 1.443 EU/ml (0.960-2.406) に達した。その後、LPS older 群における血漿中エンドトキシン活性値はすぐにベースラインへと復したが、LPS young 群では LPS 投与 2 時間後まで pre 値に対して有意な高値を維持した ( $p<0.05$ )。

白血球および肝臓における TLR4-mRNA 発現量の経時的変化を図 2.2.2 に示した。白血球中 TLR4-mRNA は、LPS older および LPS young 群において、pre 値と比較して LPS 投与 2 時間後にピークとなる有意な上昇を認めた ( $p<0.05$ )。肝臓における TLR4-mRNA 発現量は、LPS young 群において pre 値と比較して LPS 投与 2 および 4 時間後で有意に上昇した ( $p<0.05$ )。一方、LPS older 群の肝臓における TLR4-mRNA 発現量は、統計学的に有意な経時的変化を示さなかったが、LPS 投与 4 時間後をピークとする上昇を認めた。

図 2.2.3 に白血球および肝臓における NF $\kappa$ B2-mRNA 発現量の経時的変化を示した。白血球中 NF $\kappa$ B2-mRNA 発現量は LPS older および LPS young 群において、pre 値と比較して LPS 投与 2 時間後をピークとした有意な上昇を認めた ( $p<0.05$ )。肝臓における NF $\kappa$ B2-mRNA 発現量は、LPS young 群において pre 値と比較して LPS 投与 2 および 4 時間後で有意に上昇した ( $p<0.05$ )。一方、LPS older 群における肝臓中 NF $\kappa$ B2-mRNA 発現量は、統計学的に有意な経時的変化は示さなかったが、LPS 投与後 2 時間目をピークとする上昇を認めた。

白血球における STAT3-mRNA 発現量は LPS older 群において、pre 値と比較して LPS 投与 2 および 4 時間後に有意な上昇を認めた ( $p<0.05$ 、図 2.2.4)。さらに、LPS older 群の白血球中 STAT3-mRNA 発現量は対照群および LPS young 群と比

較して LPS 投与 1 から 4 時間後まで有意な高値を示した ( $p < 0.05$ )。一方、LPS young 群における白血球中 STAT3-mRNA 発現量は、経時的な変動は認められなかった。肝臓における STAT3-mRNA 発現量は、LPS young 群において pre 値と比較して LPS 投与 2 時間後に有意に上昇した ( $p < 0.05$ )。一方、LPS older 群における STAT3-mRNA 発現量は、統計学的に有意な経時変化は示さなかったが、LPS 投与後 2 時間目をピークとする上昇を認めた。

白血球中 NF $\kappa$ B1、IL-6、TNF- $\alpha$ -mRNA および肝臓中 NF $\kappa$ B1、TNF- $\alpha$ -mRNA 発現量は、群間および時間に関連した交互作用は検出されなかった。

#### 2.2.4 考察

本試験では日齢の異なる子牛にエンドトキシンを静脈内投与し、エンドトキシンにより誘導される炎症性サイトカインの mRNA 発現量を比較することで、日齢によるエンドトキシンに対する感受性に違いが認められるか否かを検証した。その結果、6 ヶ月齢子牛の血漿中エンドトキシン活性値は、エンドトキシン投与 0.5 時間後に一過性の上昇を認めた後、ただちに pre 値に復した。一方、1 ヶ月齢未満の子牛におけるエンドトキシン活性値は、pre 値と比較してエンドトキシン投与 0.5 時間後に有意な増加を認め、その増加はエンドトキシン投与 2 時間後まで持続した。つまりエンドトキシンを静脈内投与した際、1 ヶ月齢未満の子牛では 6 ヶ月齢以上の子牛よりも高いエンドトキシン活性値が長時間持続することが明らかとなった。循環血中のエンドトキシンは、肝臓や他の組織に分布し、肝臓マクロファージ (kupffer 細胞)、脾臓マクロファージ、白血球に取り込まれる [62]。詳細な機序は明らかでないが、循環血中のエンドトキシンの排除には、エンドトキシンと血漿成分の相互作用やエンドトキシンの凝集サイズが影響をしていると考えられている [62]。本試験で確認された日齢によるエンドトキシン活性値の経時変化の違いは、エンドトキシンを排除する機構が加齢により変化することを示唆するものである。

本試験において子牛へのエンドトキシン投与は、少なくとも白血球または肝臓

のいずれかにおいて TLR4、NFκB2 および STAT3-mRNA の発現量を増加させた。ヒトにおいて加齢による免疫機能を調査した研究では、新生児の TLR4 および NFκB は成人と同様に機能することが示されている[51]。一方で TLR 4 および NFκB2 とは別経路で炎症性サイトカインを調節する因子として STAT3 が知られている。STAT3 は抗炎症性サイトカインとして知られており、IL-10 によりリン酸化され、詳細な機序について不明な点はあるが pro-inflammatory サイトカインを抑制すると報告されている[12]。本試験で観察された加齢による白血球 STAT3-mRNA の発現の差は、1 ヶ月齢未満の子牛が 6 ヶ月齢以降の子牛に比べてエンドトキシンに起因した炎症が重篤化する根拠になりうるかもしれない。

## 2.3 小括

第2章第1節では肺炎罹患子牛のBALFおよび血漿エンドトキシン活性値についてROC解析により予後診断のカットオフ値を求めた。また、BALFと血漿中のエンドトキシン活性値の関係を評価することで気管支肺炎局所の炎症が全身性炎症へと進行する機序について検証した。その結果、ROC解析によりBALFおよび血漿中エンドトキシン活性値がそれぞれ4.39および0.104 EU/ml以上であれば、予後不良と診断できることが示唆された。さらに、BALFおよび血漿中エンドトキシン活性値の間には正の相関が確認されたことから、気管支肺炎罹患子牛においては気道から全身へエンドトキシンが移行している可能性が示唆された。

エンドトキシンに関連した疾患の炎症反応は、エンドトキシンがTLRに結合することでその活性を示し[49]、その結果NF $\kappa$ Bが活性化され、TNF $\alpha$ 、IL-6、MMP9を誘導することで炎症が進行する[56]。第2章第2節ではエンドトキシンにより誘導される炎症性サイトカインのmRNA発現量を日齢の異なる子牛で比較した。その結果、1ヶ月齢未満または6ヶ月齢以降の子牛へのエンドトキシン静脈内投与は、少なくとも白血球または肝臓のいずれかにおいてTLR4、NF $\kappa$ B2およびSTAT3-mRNAの発現量を増加させた。しかしながら、1ヶ月齢未満の子牛では白血球におけるSTAT3-mRNAの発現はほとんど認められなかった。STAT3は抗炎症性サイトカインとして知られており、pro-inflammatoryサイトカインを抑制すると報告されている[12]ことから本試験で観察された加齢による白血球におけるSTAT3-mRNAの発現の差は、1ヶ月齢未満の子牛が6ヶ月齢以降の子牛に比べてエンドトキシンに起因した炎症が重篤化する根拠になりうるかもしれない。

臨床現場における肺炎は一般的に抗生物質に加えてNSAIDsにより治療されるのが現状である[31, 60]。Crofford [17]は炎症性サイトカインによりシクロオキシゲナーゼ(COX)2の発現が劇的に増加することを報告している。もし肺炎罹患子牛において炎症をサイトカインレベルで抑制することが可能となれば、今ま



で行われてこなかったより効果的な治療戦略を臨床現場に取り入れることができる。

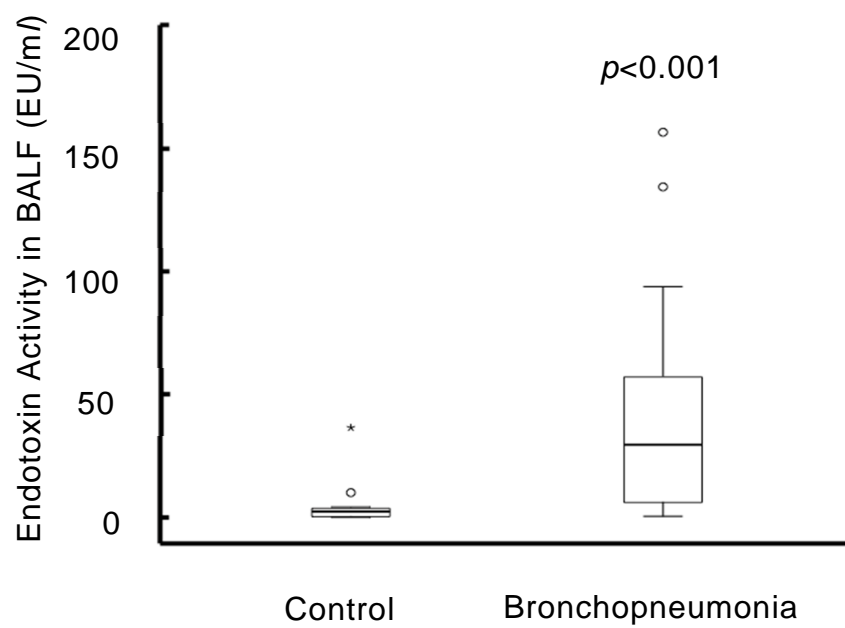


図 2.1.1 マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛における気管支肺胞洗浄液中エンドトキシン活性値

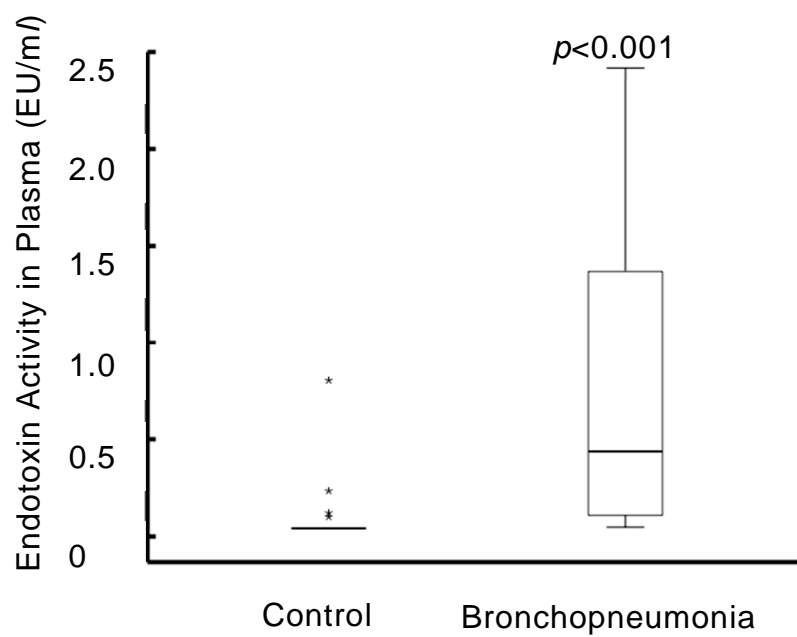


図 2.1.2 マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛における血漿中エンドトキシン活性値

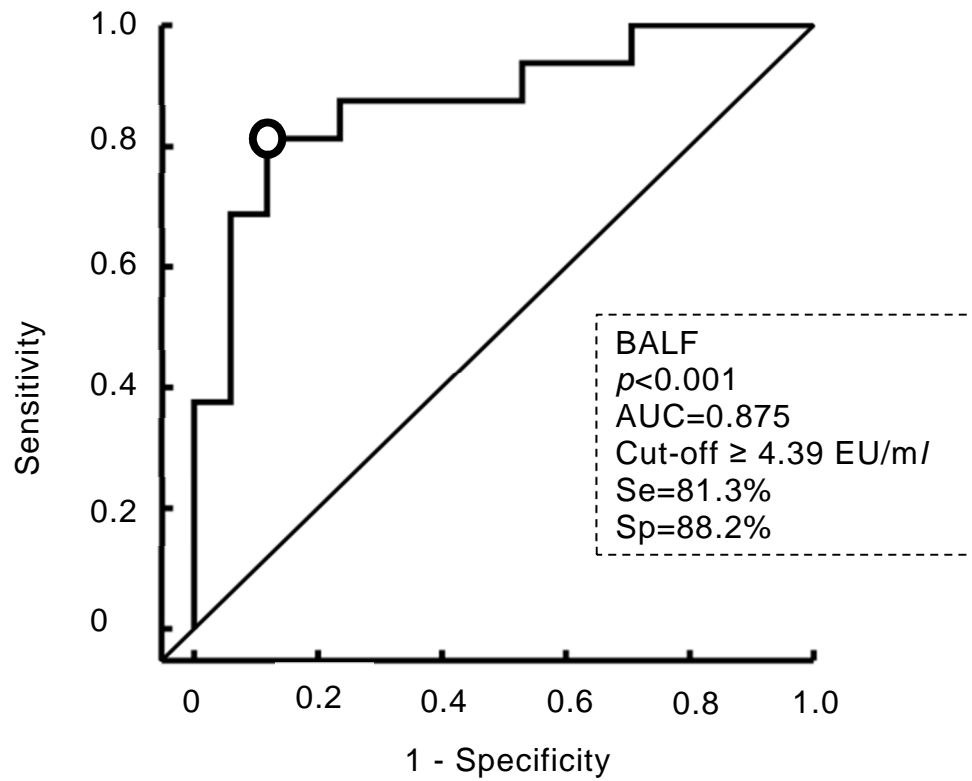


図 2.1.3 マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛における気管支肺胞洗浄液中エンドトキシン活性値を用いた Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線による予後診断能

理想的カットオフ値は J インデックスにより算出した。

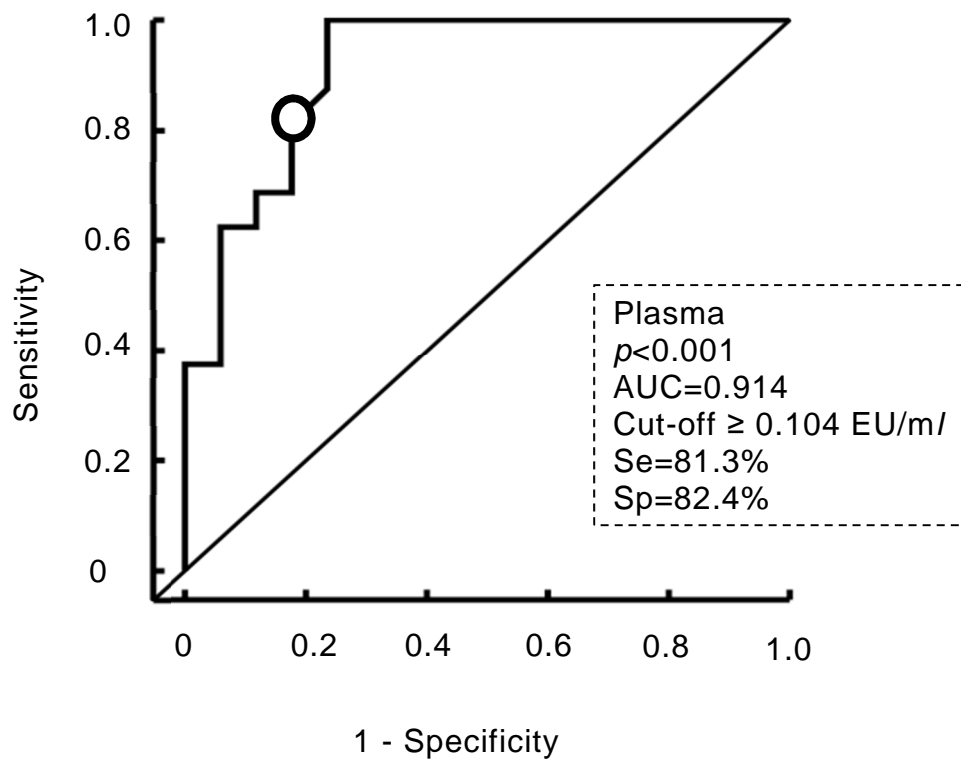


図 2.1.4 マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛における血漿中エンドトキシン活性値および Receiver Operating Characteristic (ROC) 曲線による予後診断能理想的カットオフ値は J インデックスにより算出した。

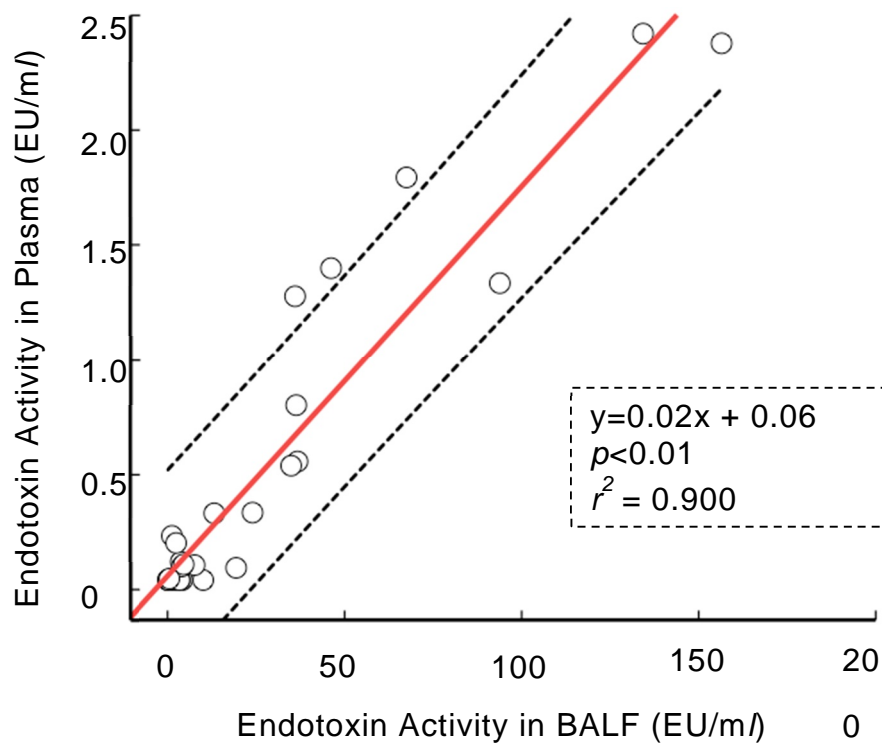


図 2.1.5 マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の血漿中および気管支肺胞洗淨液中エンドトキシン活性値の関係

表 2.2.1 ウシ GAPDH、TLR4、NF- $\kappa$ B1、NF- $\kappa$ B2、TNF- $\alpha$ 、IL-6 および STAT3 のプライマーおよびユニバーサルプローブのリスト

Primers		Length	Sequence	Universal probe
GAPDH	Left	20	ggcctccaaggagtaaggtc	#45
	Right	21	aggaactcttctctcgtgct	
TLR4	Left	20	acgacacatttcagggccta	#39
	Right	20	ggatagggtttcccgtcagt	
NF- $\kappa$ B1	Left	21	cctaccctcagggtcaaactcc	#29
	Right	18	ttcacgcctcccaaata	
NF- $\kappa$ B2	Left	19	ccttctctctgccctgaa	#23
	Right	20	gctccaggagacttgctgctc	
TNF- $\alpha$	Left	19	ccttctcatccccttctgg	#23
	Right	22	ttgtttaaagttggatgcttgg	
IL-6	Left	20	gcctgagagctattcggatg	#45
	Right	20	tgcccaggaactaccacaat	
STAT3	Left	20	ggaaacaaccagtcggtgac	#29
	Right	20	gggcagtaagcatctgttcg	

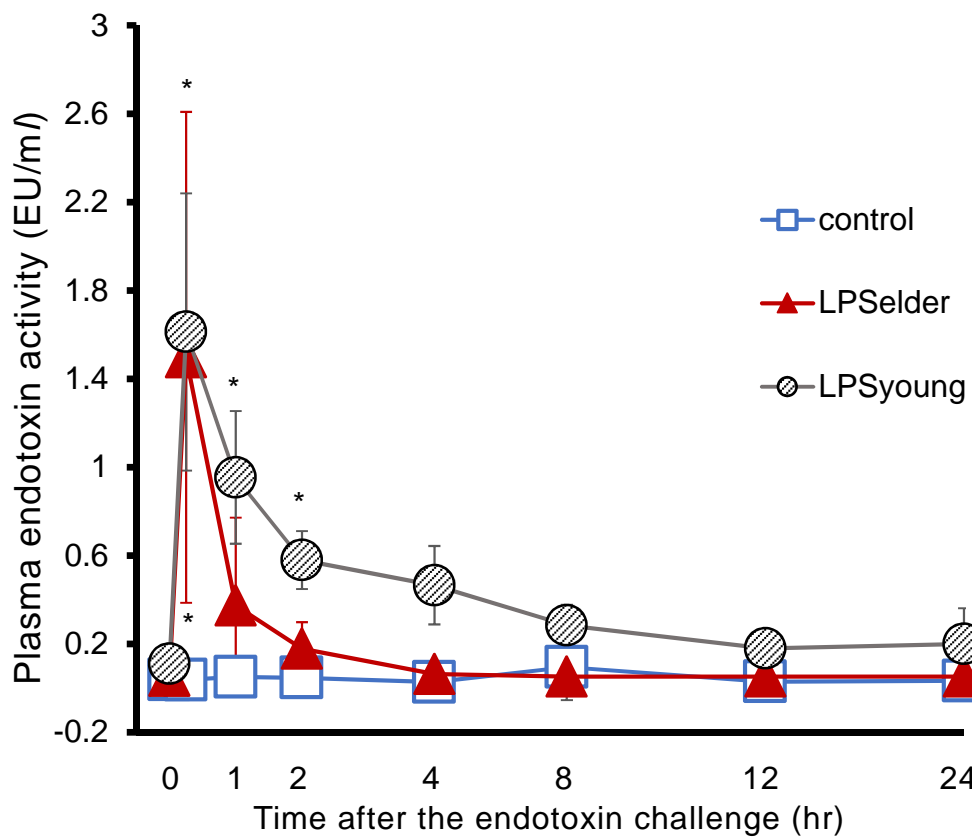


図 2.2.1 エンドトキシンチャレンジモデルにおける血漿中エンドトキシン活性値の経時的変化

\*: versus the pre value、 $p < 0.05$



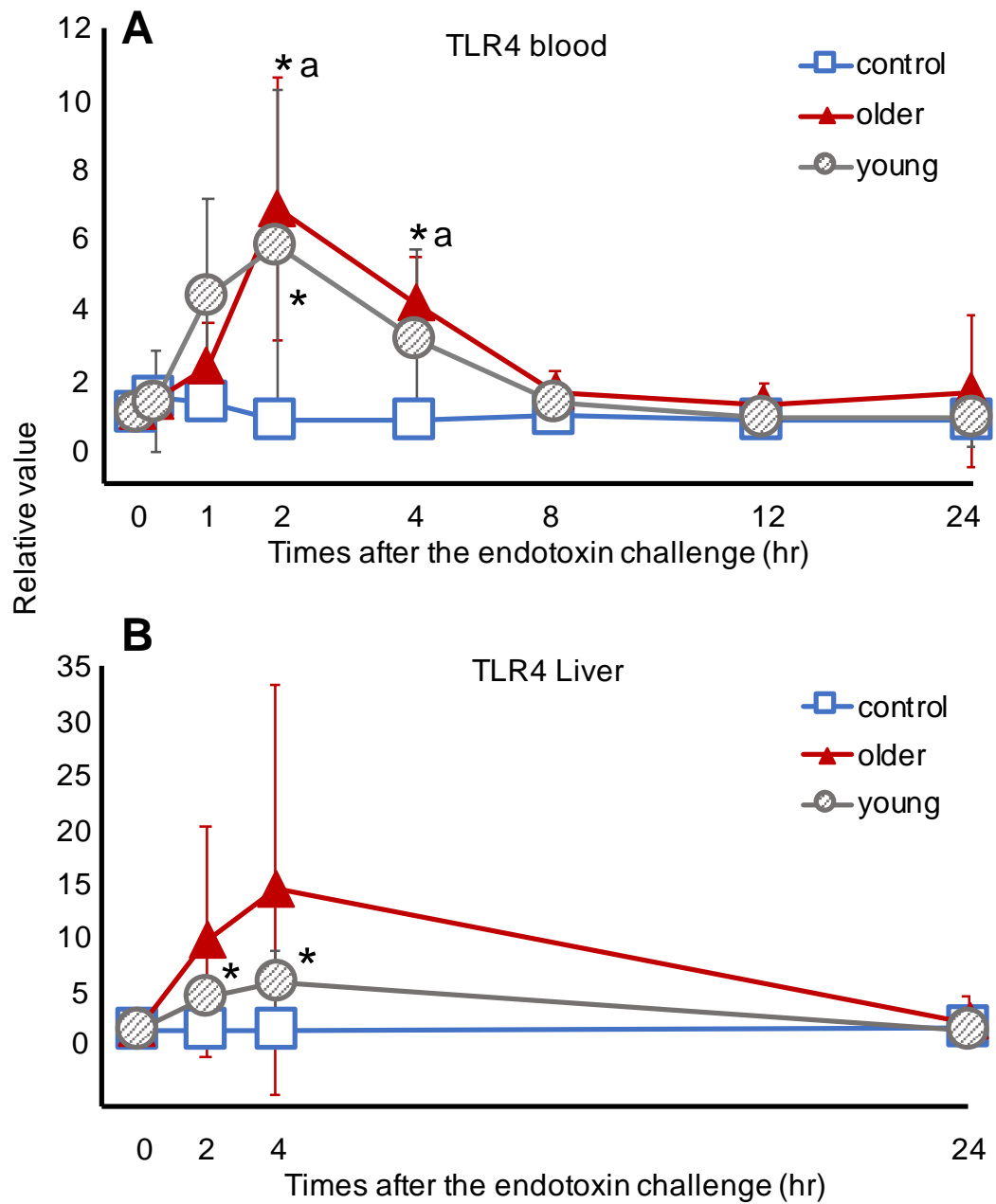


図 2.2.2 エンドトキシンチャレンジモデルにおける白血球 (A) および肝臓 (B) 中 TLR4-mRNA 相対的発現量の経時的变化

TLR4-mRNA の相対的発現量は投与前値を基準とし、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法を用いて算出した。

\*: versus the pre value、 $p < 0.05$ 、a: versus control、 $p < 0.05$

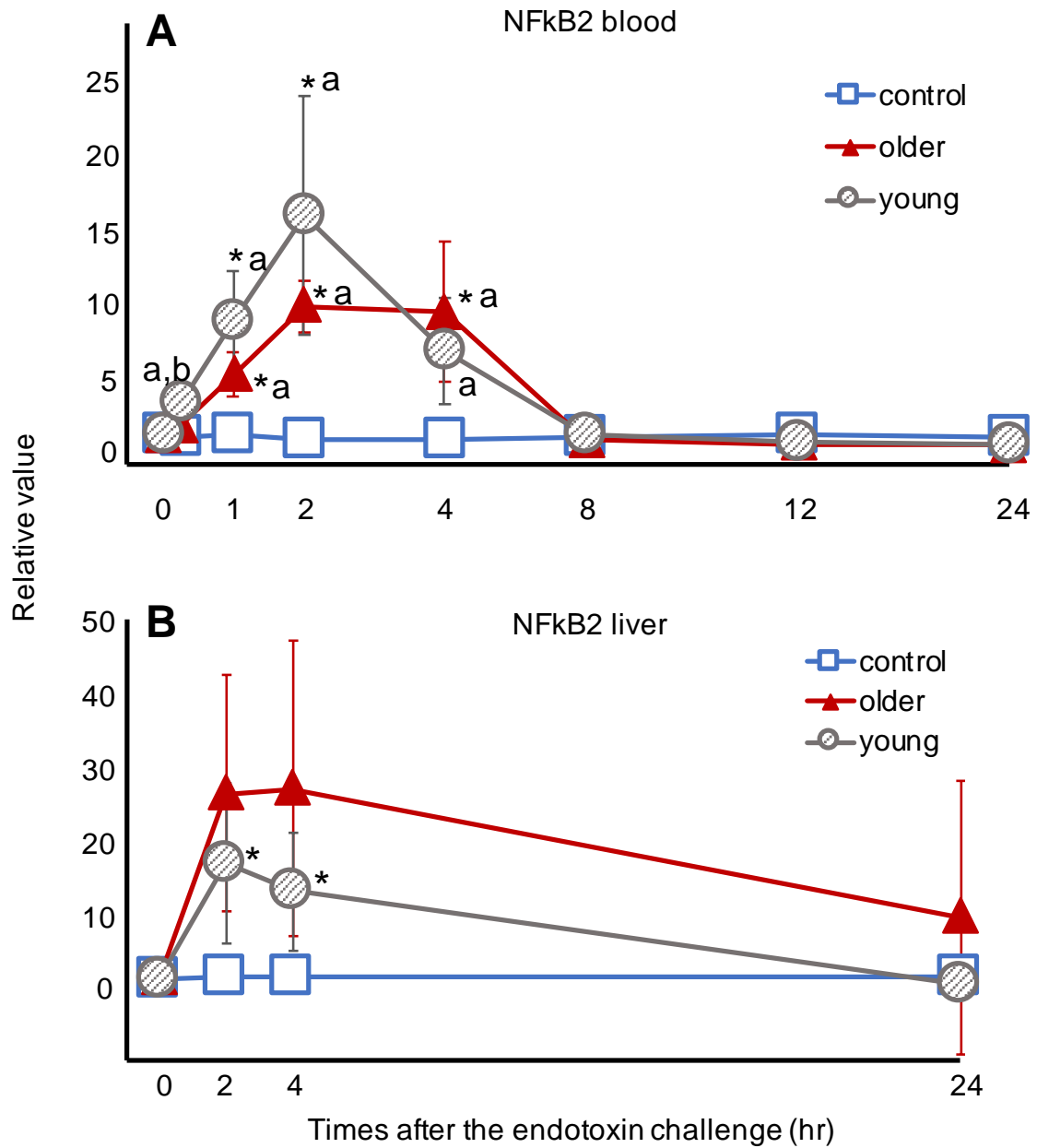


図 2.2.3 エンドトキシンチャレンジモデルにおける白血球 (A) および肝臓 (B) 中 NFκB2-mRNA 相対的発現量の経時的変化

NFκB2-mRNA の相対的発現量は投与前値を基準とし、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法を用いて算出した。

\*: versus the pre value、 $p < 0.05$ 、a: vs. control、 $p < 0.05$

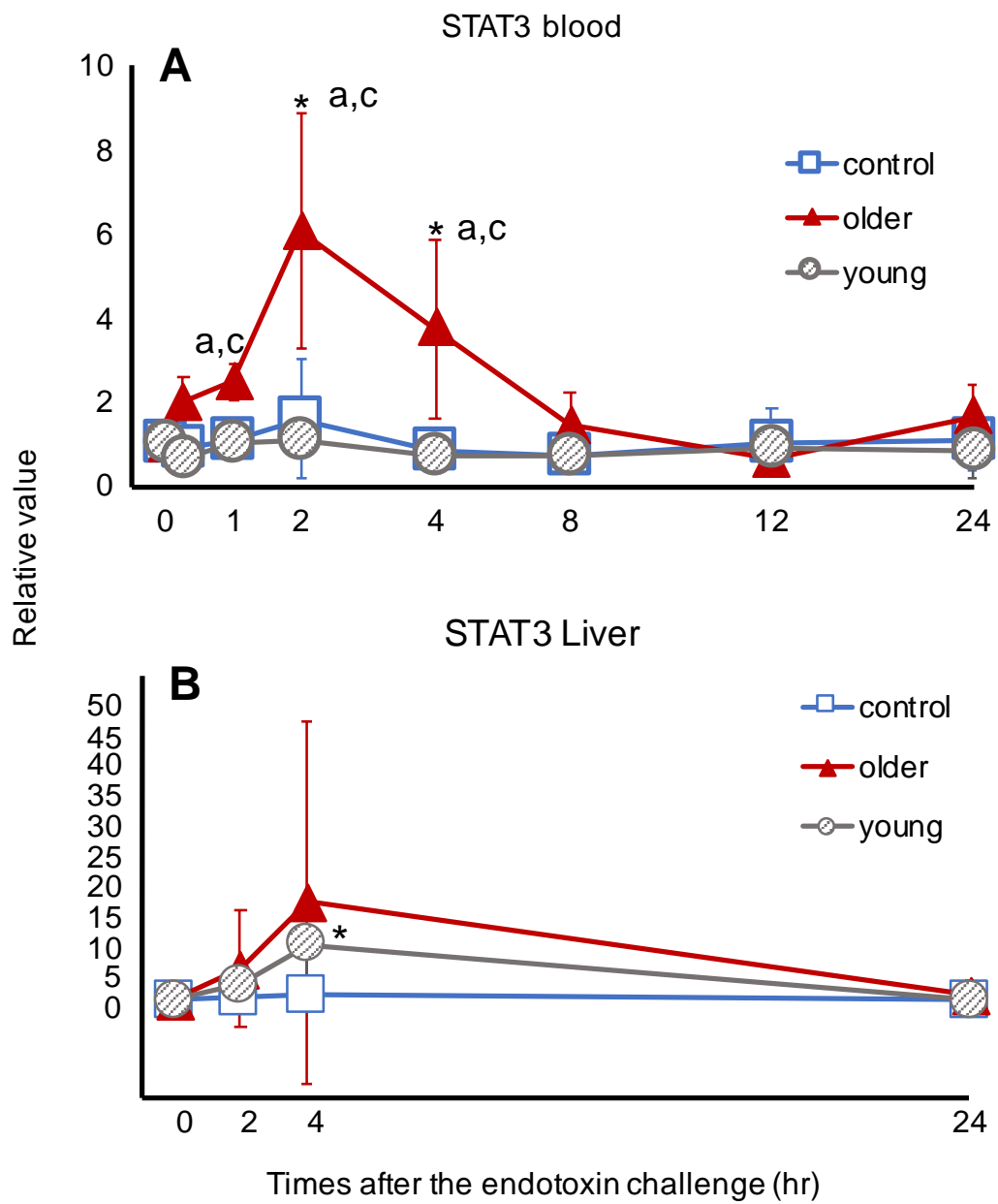


図 2.2.4 エンドトキシンチャレンジモデルにおける白血球 (A) および肝臓 (B) 中 STAT3-mRNA 相対的発現量の経時的变化

STAT3-mRNA の相対的発現量は投与前値を基準とし、 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法を用いて算出した。

\*: versus the pre value、 $p < 0.05$ 、a: versus control、 $p < 0.05$ 、c: versus young、 $p < 0.05$

### 第 3 章

エンドトキシン活性値および炎症性サイトカイン mRNA 発現量を指標とした  
エンドトキシンチャレンジモデルにおけるツラスロマイシンの抗炎症作用の評価

牛呼吸器病症候群( BRDC )などの急性炎症性疾患は過剰な免疫反応を誘発し、動物の生命を脅かす[9, 75, 82]。エンドトキセミアや敗血症の治療に対する治療法として、ステロイド系および非ステロイド系抗炎症薬が使用されることがあるが、ある研究ではコルチコステロイドは臨床症状および急性相タンパク( APPs )を抑制しても、炎症性サイトカインの産生を抑制しないことが報告されている[12]。一方で、一部の抗炎症および抗菌薬はエンドトキセミアに対して免疫調節の効果があることが明らかとなっている[11, 53]。

マクロライド系抗生物質は、炎症性サイトカインの放出の調整および好中球機能を変化することにより、抗菌作用とは無関係に免疫調節機能を持つことが報告されている[28, 47, 53]。ツラスロマイシンは BRDC の治療薬として用いられる 13 員環および 15 員環アザライドの異性体平衡混合物からなる半合成マクロライド抗菌剤である[73]。Patricia Fernandez-Robredo ら[22]は、マウスの結膜に LPS を投与した実験において、マクロライド系抗生物質が炎症性タンパクおよび炎症促進サイトカインを減少させることを報告した。マクロライド系抗生物質は、細菌感染による炎症を減衰させる効果だけでなく、マクロライド耐性病原体による炎症性毒素の産生を阻害することも報告されている[84]。しかしながら、マクロライド系抗生物質が抗炎症効果を示す機序は複雑であり未だ詳細は不明である。

したがって第 3 章では、マクロライド系抗生物質が抗炎症効果を示す機序の一部を明らかにする目的で、マクロライド系抗生物質であるツラスロマイシンが血漿中エンドトキシン活性値を抑制するか否かの検証を行った。本試験ではまず、ツラスロマイシンがエンドトキシン活性を抑制するか否かを調べるため子牛血漿を用いた *in vitro* 試験を行った。その後、*in vivo* 試験としてツラスロマイシンの定常状態モデルを作出し、エンドトキシンの静脈内投与を行った。また、エンドトキシン血症における炎症マーカーとして TLR4、NF $\kappa$ B2、IL-6 および STAT3-mRNA 発現量を測定して、マクロライド系抗生物質の抗炎症作用を評価した。

### 3.1 材料および方法

本試験は酪農学園大学動物実験委員会の承認（Approval#：VH16C1）に基づいて実施した[69]。本試験は、15員環マクロライドであるツラスロマイシンが牛に対してエンドトキシン活性抑制効果を示すか否かを明らかにすることを目的とし、*in vitro* と *in vivo* の試験で構成した。さらに *in vitro* 試験ではツラスロマイシン単独（study 1）、ツラスロマイシンが血漿成分と混在（study 2）、およびツラスロマイシン処置した牛の血漿（study 3）がエンドトキシン活性を抑制するのか否かを検証するために3つの試験で構成した。一方、*in vivo* 試験（study 4）は第3章第2節で実施したエンドトキシンチャレンジモデルを用いてツラスロマイシン処置した牛では血漿のエンドトキシン活性を抑制できるのか否かについて検討した。

#### Study 1：ツラスロマイシンのエンドトキシン活性抑制作用の検証

牛用抗生物質として市販されているツラスロマイシン製剤（Draxxin-C; Zoetis、Madison、ニュージャージー州、米国）を最終濃度が 1、0.1、0.01、0.001  $\mu\text{g}/\text{ml}$  になるようにエンドトキシンプリー蒸留水を用いて段階希釈したものを供試した。各濃度の被験試薬に対して最終濃度 0.03 EU/ml になるように O111:B4-LPS（L4391; Sigma-Aldrich）を添加し、その前後のエンドトキシン活性値を LAL-KTA 法により測定して回収率を求めた。全ての測定には、エンドトキシンプリー蒸留水を陰性対照、リファレンススタンダード（CSE、Control Std Endotoxin；Charles River）を 10,000（EU）/バイアルに調整したエンドトキシンを陽性対照として使用した。 $\beta$ -グルカンによる反応阻害をさけるため、カイネティック比濁時間用 LAL 試薬（Endosafe<sup>®</sup> KTA2；Charles River）を Endotoxin-Specific Buffer Solution（Charles River）により再融解した。LAL-KTA 法は 96 穴マイクロプレート（Endosafe<sup>®</sup> 96-well、flat bottom microplate M9001；Charles River）を用い、マイクロプレートリーダー（Sunrise<sup>™</sup>；Tecan Group Ltd.）

およびエンドトキシン測定ソフトウェア EndoScan-V™ ( Charles River ) により測定した。

Study 2: ツラスロマイシン添加血漿によるエンドトキシン活性抑制作用の検証  
ツラスロマイシン処置をしていない健常子牛 5 頭 ( 平均日齢  $137.8 \pm 121.2$  日、平均体重  $121.2 \pm 36.3$  kg ) より定法に従って頸静脈から採血を行い  $1,400 \times g$ 、15 分、室温環境下で遠心分離により血漿を得た。これらの血漿に対してそれぞれ牛用抗生物質として市販されているツラスロマイシン製剤を添加し、最終濃度が 1、0.1、0.01、0.001  $\mu g/ml$  になるように段階希釈した。ツラスロマイシン未添加血漿を陰性対照とした。各濃度のツラスロマイシン添加および未添加血漿 ( 各濃度 5 サンプル ) に対して最終濃度 0.03 EU/ml になるように O111:B4-LPS ( L4391; Sigma-Aldrich ) を添加し、その前後のエンドトキシン活性値を LAL-KTA 法により測定して回収率を求めた。

Study 3: ツラスロマイシン処置子牛血漿のエンドトキシン活性抑制作用の検証  
ツラスロマイシンの半減期は血中および肺組織中で約 3 日および 7 日であることがメーカーの用法用量で示されているため、健常子牛 6 頭 ( 平均日齢  $151.5 \pm 43.5$  日および平均体重  $125.2 \pm 30.91$  kg ) に対して 2.5 mg/kg のツラスロマイシンを 3 日間隔で 4 回皮下投与し血液中ツラスロマイシン濃度の定常状態を作出した。ツラスロマイシン処置開始直前を対照群とし、血液中ツラスロマイシン濃度の定常状態が得られたと考えられる処置開始後 11 日目 ( 最終処置翌日 ) に被験牛の頸静脈から採血を行った ( 処置群 )。血漿中ツラスロマイシン濃度の定常状態を作出する前 ( 対照群 ) および作出後 ( 処置群 ) の血漿を  $1,400 \times g$ 、15 分、室温環境下で遠心分離により得た。これらの血漿に対して最終濃度 0.03 EU/ml になるように O111:B4-LPS ( L4391; Sigma-Aldrich ) を添加し、添加前 10 分、添加後 0、5、10、20 および 30 分目の血漿エンドトキシン活性値を LAL-KTA 法により測定した。

#### Study 4: エンドトキシンチャレンジ子牛における血漿中エンドトキシン活性抑制および炎症性サイトカイン mRNA 調節作用の検証

本試験では、12頭のホルスタインおよびジャージー子牛（平均日齢  $32.8 \pm 2.69$  日、平均体重  $42.8 \pm 10.68$  kg）を供試した。すべての供試牛は研究目的で本学に導入、飼養管理され、食餌の摂取および飲水、排尿、排便、一般身体検査および血液学的検査に異常を認めなかった。供試牛のうち6頭に対して、ツラスロマイシンの定常状態を作出するためにツラスロマイシンを  $2.5$  mg/kg の用量で3日に1回の間隔で計4回投与した（ツラスロマイシン群）。残り6頭には、ツラスロマイシンと同じ間隔で生理食塩液（生理食塩水；日本全薬工業）を投与した（対照群）。 $2.5$   $\mu$ g/kg の O111:B4 LPS (L4391；Sigma-Aldrich) を自家血清  $10$  ml に混和調整し、ツラスロマイシンおよび対照群の子牛へ頸静脈に留置したカテーテルを介して投与した。エンドトキシンを投与した反対側頸静脈よりエンドトキシン投与前および投与  $0.5$ 、 $1$ 、 $2$ 、 $4$ 、 $8$ 、 $12$  および  $24$  時間後に各  $10$  ml ずつ採血し、EDTA およびヘパリン添加真空採血管へ分注した。EDTA 全血は RBC lysis buffer (Roche Diagnostics) を用いて溶血処理し、遠心分離により白血球を得た。白血球を High pure RNA Kit Lysis/binding buffer (Roche Diagnostic) 処理し、mRNA を抽出した。これらのサンプルは測定まで  $-80$  °C で保存した。

血漿中エンドトキシン活性値の測定のためにヘパリン添加血漿を  $1,400 \times g$ 、 $10$  分間遠心分離により得た。得られた血漿は測定まで  $-30$  °C で保存し、LAL-KTA 法により測定した。超音波ガイド下での肝生検は、 $14G \times 170$  mm 組織生検用針（クイックカット C2；株式会社八光）を用いて右側第  $10$ - $11$  肋間より LPS 投与前および投与後  $2$ 、 $4$  および  $24$  時間目に行った。得られた肝臓サンプルは直ちに RNAlater RNA stabilization reagent (Qiagen) に浸漬し、その後  $24$  時間以内にホモジナイザー（bio-masher II；和光純薬工業）を用いてホモジナイズした。Total RNA は High Pure RNA Tissue Kit (Roche Diagnostics) を用いて抽出し、測定まで  $-80$  °C で保存した。



エンドトキシンチャレンジモデルより得た白血球および肝臓の炎症性サイトカイン mRNA 発現量をリアルタイム PCR ( Light-Cycler 480 system II ; Roche Diagnostics ) により測定した。測定した炎症性サイトカイン mRNA は、TLR4、NFκB2、IL-6 および STAT3 であった。逆転写およびリアルタイム PCR は市販のキット ( Light-Cycler<sup>®</sup> Multiplex RNA Virus Master version 3 ; Roche Diagnostics ) を用いたワンステップ法により行なった。リアルタイム PCR は 96 穴プレートで行ない、反応液の最終量は 20 μl とした。反応液は 5 μl のテンプレート RNA、各プライマー ( リバースおよびフォワードプライマー ) 1 μl ( 0.5 μM )、ユニバーサルプローブ 0.4 μl、RT-PCR reaction mix 4 μl、RT-Enzyme solution 0.1 μl および水 8.5 μl を用いて調整した。測定した炎症性サイトカイン mRNA に対するプライマーおよびユニバーサルプローブを表 2.2.1 に示した。添付文書に従い、増幅条件は 50°C で 10 分 ( 逆転写 )、95°C で 30 秒 ( プレインキュベート )、95°C で 5 秒および 60°C で 30 秒を計 45 サイクル ( 増幅 ) とした。結果は、リファレンス遺伝子である GAPDH-mRNA に対する相対発現量として市販のソフトウェア ( E-method ; Roche Diagnostics ) を用いて算出した。

### 3.2 統計解析

統計解析は市販のソフトウェア ( IBM SPSS Statistics v.23 ; 日本 IBM Co. ) を用いて行なった。正規分布データは平均値±SD、非正規分布データは中央値 ( 最小値-最大値 ) で示した。

*in vitro* において各希釈濃度のツラスロマイシン添加液にエンドトキシンをチャレンジした後に測定したエンドトキシン活性値を Bonferroni 検定にて比較した。ツラスロマイシン投与前血漿およびツラスロマイシン投与後血漿へのエンドトキシンチャレンジにおける各時点のエンドトキシン活性値は Mann-Whitney *U* 検定により比較した。*in vivo* 試験で得られたデータの統計学的評価はグループと時間を二つの要因として二元配置分散分析を用いて行い、その後、群間比較を Bonferroni 検定、pre 値に対する経時的変化は Dunnett *t* 検定を用いて行っ

た。危険率は  $p < 0.05$  とした。

### 3.3 結果

Study1: ツラスロマイシンのエンドトキシン活性抑制作用の検証

ツラスロマイシン添加エンドトキシンフリー蒸留水においてエンドトキシン活性値は全ての希釈倍率において検出されなかった(表 3.1)。また、O111:B4-LPS による添加回収試験における添加回収率はアメリカ食品医薬品局 (FDA) の定める 50-200%の範囲であった(表 3.1)。

study 2: 血漿中ツラスロマイシンによるエンドトキシン活性抑制作用の検証

ツラスロマイシン添加子牛血漿におけるエンドトキシン活性値は全ての希釈倍率の被験試料間で有意差は認めなかった(表 3.2)。また、O111:B4-LPS による添加回収試験における添加回収率はアメリカ食品医薬品局 (FDA) の定める 50-200%の範囲であった(表 3.2)。

study 3: エンドトキシン処置子牛血漿のエンドトキシン活性抑制作用の検証

ツラスロマイシン処置前後の牛血漿サンプルに対する O111:B4-LPS を用いたエンドトキシンチャレンジにおいて、ツラスロマイシン処置子牛由来の血漿のエンドトキシン活性値 (305.38 EU/ml [272.5-375.96]) は無処置群 (960.35 EU/ml [607.6-1787.99]) のそれよりも有意に低値を推移した ( $p < 0.001$ )。なお、ツラスロマイシン処置した子牛由来血漿のエンドトキシン活性値の時間-曲線下面積 (ACU<sub>0-30min</sub>) は平均で  $10976.08 \pm 952.03$  EU/ml  $\times$  min であり、無処置群の  $42588.22 \pm 11192.49$  EU/ml  $\times$  min よりも有意に低値を示した ( $p < 0.05$  図 3.1)。

Study 4: エンドトキシンチャレンジ子牛におけるエンドトキシン活性抑制および炎症性サイトカイン mRNA 調節作用の検証

二元配置分散分析の結果から、ツラスロマイシン群と対照群の血漿中エンドト

キシン活性値および炎症性サイトカイン mRNA 発現量に交互作用は認められなかった。すなわち、血液中ツラスロマイシン濃度を定常状態にしても 2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の O111:B4 LPS を用いたエンドトキシンチャレンジモデルにおいてエンドトキシン活性値を対照群のそれと比較して有意に低下させなかった ( $p \geq 0.05$ )。一方、ツラスロマイシン処置の有無にかかわらずエンドトキシンチャレンジにより血漿中エンドトキシン活性値 (図 3.2)、白血球および肝臓中 TLR4 (図 3.3) および NF $\kappa$ B2 (図 3.4) および肝臓 STAT3-mRNA (図 3.5) は有意な経時的変化が認められた ( $p < 0.05$ )。

### 3.4 考察

*in vitro* 試験において、ツラスロマイシンが直接エンドトキシン活性値を抑制しないが、ツラスロマイシンを投与した子牛の血漿はエンドトキシン活性を抑制することが示唆された。一方、*in vivo* 試験では、たとえツラスロマイシンが定常状態であっても、2.5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の O111:B4 LPS を用いたエンドトキシンチャレンジ子牛における炎症性サイトカインの mRNA 発現量に対する抑制効果は認められなかった。

エンドトキシン活性は、エンドトキシンと血漿成分の相互作用やエンドトキシンの凝集サイズに影響され、血中モノクローナル抗体およびリポプロテインはエンドトキシン活性値を抑制すると考えられている[62]。マクロライド系抗生物質は、宿主の免疫調節機能および消化管収縮機能を有する[11,47,53]。*in vitro* 試験において、ツラスロマイシンは直接エンドトキシン活性値を抑制しないがツラスロマイシンを投与した子牛血漿がエンドトキシン活性値を抑制した。この結果によりツラスロマイシン投与は、子牛の血液性状に何らかの変化を及ぼしエンドトキシン活性を抑制したことが推察された。しかしながら、本試験ではツラスロマイシン投与前および投与後の子牛の血液性状の比較を行っていないため詳細な機序は明らかでない。したがって今後は、ツラスロマイシン投与および非投与子牛においてモノクローナル抗体およびリポプロテインを含む血液

生化学性状の検証を行う必要がある。

マクロライド系抗生物質は好中球動員[38, 55, 65]と組織毒性化合物の放出[38]を減少させることで炎症性サイトカインの蓄積を減らすことが知られている[65, 93]。さらにツラスロマイシンは好中球のアポトーシスを誘導し、炎症性メディエーターの産生を阻害する可能性が報告されている[23, 55, 93]。Plesseresら[76]も同様に 0.5 µg/kg のエンドトキシンをチャレンジした子牛モデルを用いて、15 員環マクロライド系抗生物質であるガミスロマイシンの炎症性サイトカイン発現についての評価を行っている。その結果、マクロライド系抗生物質であるガミスロマイシンは TNF、IL-1b および IL-6 を抑制しなかったことを示した[76]。エンドトキシンチャレンジ量は低用量時にはエンドトキシン投与量に依存した生体反応が認められる一方で、ある一定の投与量に達した後には生体反応に変化が認められなくなることが知られている[40]。本試験におけるエンドトキシンチャレンジ量が適切であったか否かの検討も含め、今後は 0.5 µg/kg 以下の低用量エンドトキシンチャレンジ試験により検証を行う必要がある。

### 3.5 小括

第3章では、マクロライド系抗生物質が抗炎症効果を示す機序の一部を明らかにする目的で、マクロライド系抗生物質であるツラスロマイシンが血漿中エンドトキシン活性値を抑制するか否かの検証を行った。その結果、ツラスロマイシンは直接エンドトキシン活性を抑制しないが、ツラスロマイシンを投与した子牛の血漿はエンドトキシン活性を抑制することを示した。一方でツラスロマイシンは炎症性サイトカインの mRNA 発現量に影響を与えないことが明らかとなった。マクロライド系抗生物質は好中球動員[38, 55, 65]と組織毒性化合物の放出[38]を減少させることで炎症性サイトカインの蓄積を減らすことが知られている[65, 93]。さらにツラスロマイシンは好中球のアポトーシスを誘導し、炎症性メディエーターの産生を阻害する可能性が報告されている[23, 55, 93]。本試験結果は、ツラスロマイシンの投与により白血球中の炎症性サイトカインの発現量が抑制される現象は確認できず、ツラスロマイシンが好中球のアポトーシスを促進し、炎症を抑制する既報を支持することもできなかった。しかしながら、本試験におけるツラスロマイシンが直接エンドトキシン活性を抑制しないが、ツラスロマイシンを投与した子牛の血漿ではエンドトキシン活性が低下するという結果は、ツラスロマイシンの臨床効果の一部を説明するものと思われる。

表3.1 ツラスロマイシン添加蒸留水の各希釈濃度におけるエンドトキシシン添加回収試験

	NC	0.001 $\mu$ g/m/	0.01 $\mu$ g/m/	0.1 $\mu$ g/m/	1 $\mu$ g/m/
ETX活性値(EU/m/)	ND	ND	ND	ND	ND
添加回収率 (%)	100	101.1	100.9	98.5	100.0

ETX: エンドトキシシン, NC: negative control, ND: not detected

アメリカ食品医薬品局 (FDA) の定める添加回収率の基準値: 50-200%

表3.2 ツラスロマイシン添加子牛血漿の各希釈濃度におけるエンドトキシンの添加回収試験

	NC	0.001 $\mu$ g/m/	0.01 $\mu$ g/m/	0.1 $\mu$ g/m/	1 $\mu$ g/m/
ETX活性値(EU/m/)	0.517 $\pm$ 0.416	0.494 $\pm$ 0.405	0.448 $\pm$ 0.346	0.456 $\pm$ 0.359	0.456 $\pm$ 0.373
添加回収率 (%)	62.3	65.7	62.9	63.2	62.3

ETX: エンドトキシン, NC: negative control, ND: not detected

アメリカ食品医薬品局 (FDA) の定める添加回収率の基準値: 50-200%

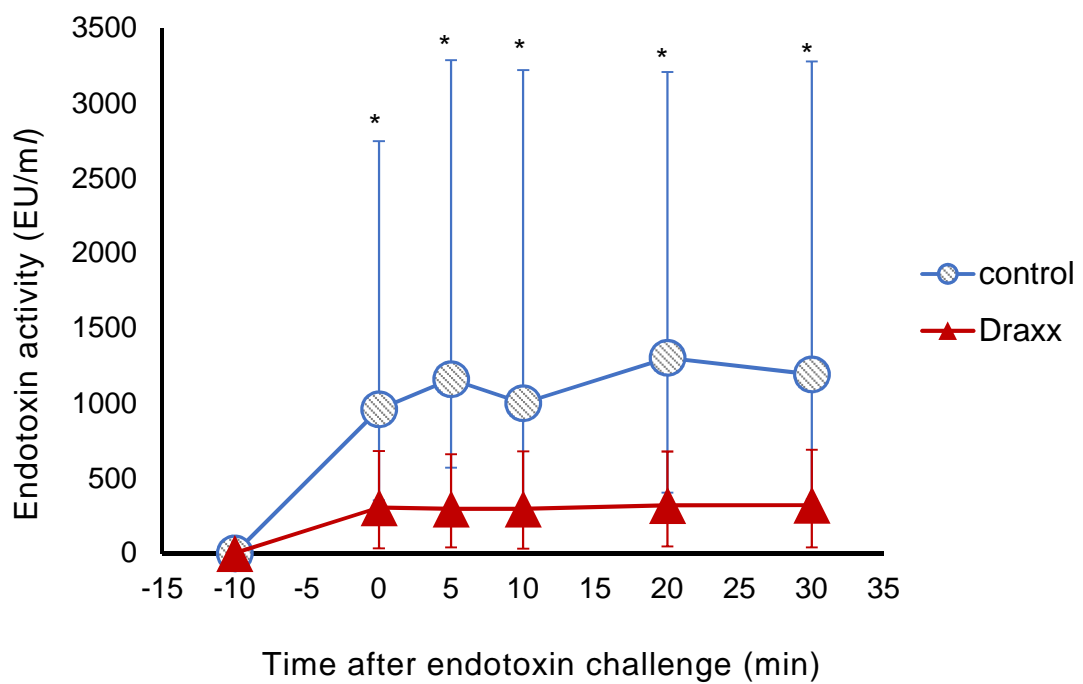


図 3.1 エンドトキシンチャレンジによるツラスロマイシン投与子牛血漿および非投与子牛血漿におけるエンドトキシン活性値の経時的変化

\*: versus the Draxxin group、 $p < 0.05$



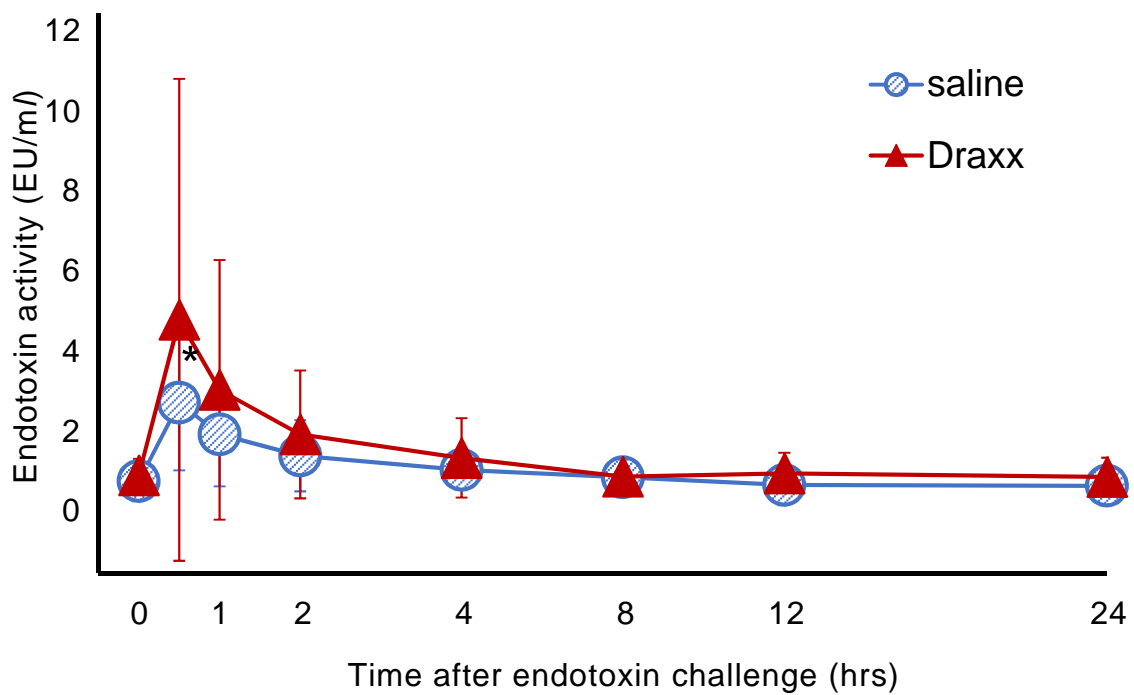


図 3.2 エンドトキシンチャレンジモデルにおける血漿中エンドトキシン活性値の経時的変化

\*: versus the pre value、 $p < 0.05$

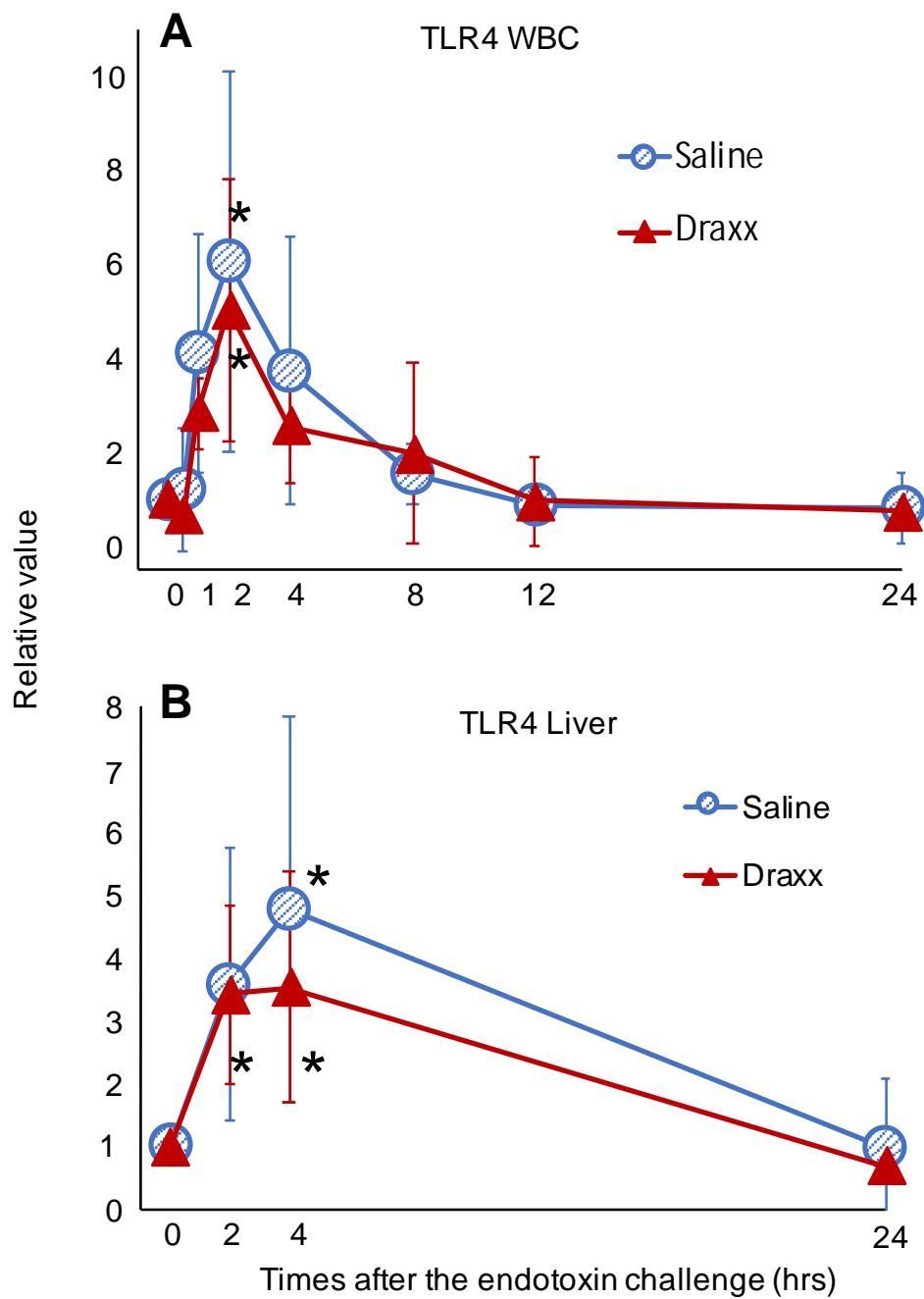


図 3.3 エンドトキシンチャレンジモデルにおける白血球 (A) および肝臓 (B) 中 TLR4-mRNA 発現量の経時的变化  
 TLR4-mRNA の相対的発現量は投与前値を基準とし、 $2^{-Ct}$  法を用いて算出した。  
 \*: versus the pre value、 $p < 0.05$

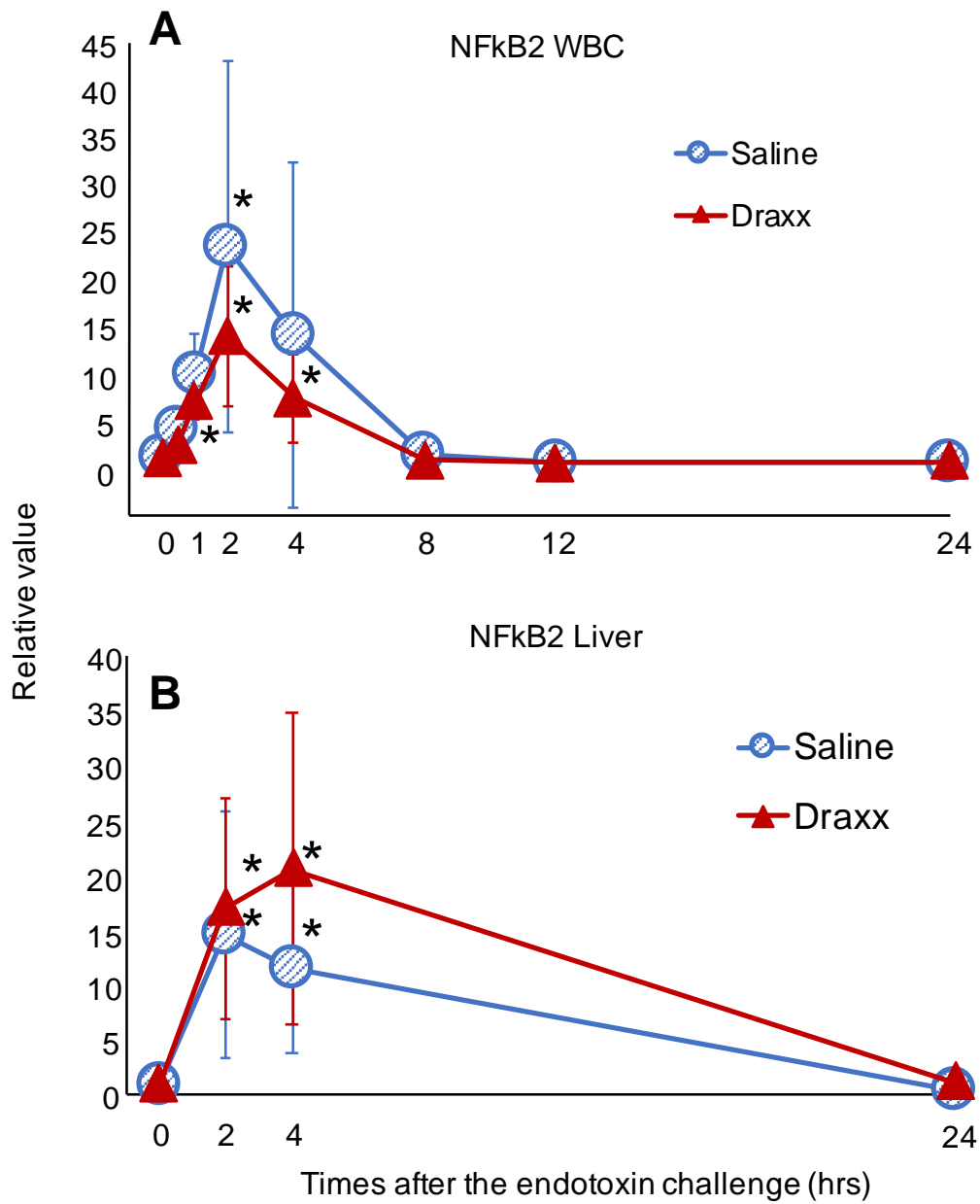


図 3.4 エンドトキシンチャレンジモデルにおける白血球 (A) および肝臓 (B) 中 NFκB2-mRNA 発現量の経時的変化

NFκB2-mRNA の相対的発現量は投与前値を基準とし、 $2^{-Ct}$  法を用いて算出した。\*: versus the pre value、 $p < 0.05$

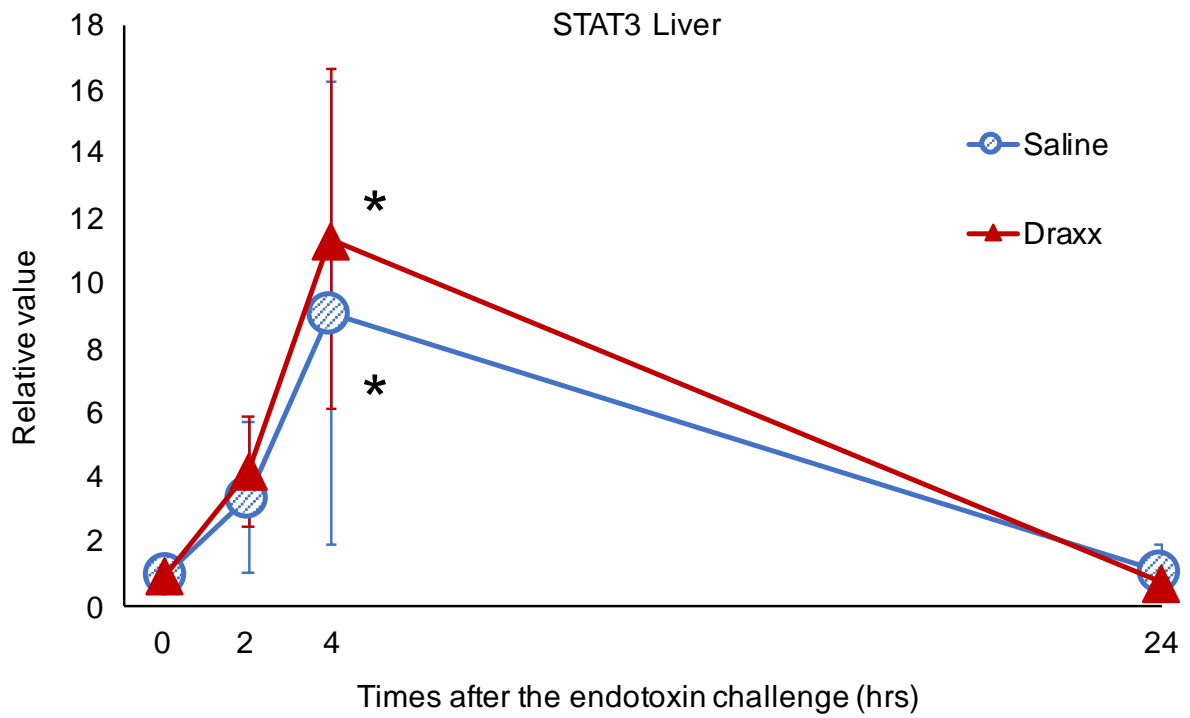


図 3.5 エンドトキシンチャレンジモデルにおける肝臓中 STAT3-mRNA 発現量の経時的変化

STAT3-mRNA の相対的発現量は投与前値を基準とし、 $2^{-Ct}$ 法を用いて算出した。\*: versus the pre value、 $p < 0.05$

## 総括

本研究は肺炎罹患子牛の栄養状態および炎症の病態解析に基づき、臨床現場で応用可能な新たな診断基準および治療戦略の構築を目的とした。

第1章第1節ではマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛において、臨床現場で一般的に実施されている血液生化学検査項目である血糖値および血漿中 TP、アルブミン、およびグロブリン濃度について ROC 解析により予後診断のカットオフ値を求めた。その結果、血糖値、血漿中 TP およびグロブリン濃度がそれぞれ  $<83.0 \text{ mg/dl}$ 、 $>6.5 \text{ g/dl}$  および  $>3.3 \text{ g/dl}$  であればマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の予後は不良であることを示すことができた。本調査は慢性肺炎の子牛において血糖値の低下や血漿中 TP およびグロブリン濃度の上昇が認められたとする Blum ら[8]の報告を裏付ける結果であった。とりわけ血糖値の測定はヒト用の PBGM を利用すれば On-farm での迅速な診断が可能となり、臨床現場において非常に有用な診断項目になると考えられる。しかし、現在、牛医療において利用可能な PBGM の精度管理についての検証は行われていないことから第1章第2節ではヒト用 PBGM が牛に応用可能か否かを検証する目的で2種類のヒト用 PBGM の精度および正確度について評価した。その結果、i-STAT 1 および Precision Xceed は標準法と強い相関関係を示したことから牛の POC に使用可能であることが示唆された。しかしながら Precision Xceed は標準法と強い相関関係を有するが、高血糖領域において過大評価していることが明らかとなった。Gerber ら[26]は特定の範囲内の血糖値を一貫して過大評価する PBGM は、一貫性なく予測不能な誤差を示す PBGM よりも臨床応用し易いことを報告している。したがって、Precision Xceed は標準法と比較して高血糖域で過大評価することを理解して牛の POC に応用することが重要である。

第2章第1節では BALF および血漿中エンドトキシン活性値の上昇と肺炎の重症度が相関するか否かを検証する目的で *M. bovis* に感染した重度の気管支肺炎罹患子牛の血漿および BALF 中エンドトキシン活性値について ROC 解析により予後診断のカットオフ値を求めた。その結果、*M. bovis* に関連した重度の気管支肺炎罹患子牛における BALF および血漿中エンドトキシン活性値は、健常子牛

のそれと比較して有意に高値を示した。さらに ROC 解析により BALF および血漿中エンドトキシン活性値がそれぞれ 4.39 および 0.104 EU/ml 以上であれば、予後不良と診断できることが示唆された。Bieniek ら[7]は子牛は日齢によりエンドトキシン感受性が異なり、とくに新生子牛でエンドトキシンへの感受性が高いことを報告している。しかしながら、子牛の日齢とエンドトキシン感受性に関する検証は少なく、そのメカニズムについては不明な点が多いのが現状である。したがって第 2 章第 2 節ではエンドトキシンにより誘導される炎症性サイトカインの mRNA 発現量を日齢の異なる子牛で比較した。その結果、1 ヶ月齢未満または 6 ヶ月齢以降の子牛へのエンドトキシン投与は、少なくとも白血球または肝臓のいずれかにおいて TLR4、NFκB2 および STAT3-mRNA の発現量を上昇させた。しかしながら、1 ヶ月齢未満子牛の白血球における STAT3-mRNA 発現はほとんど認められなかった。STAT3 は抗炎症性サイトカインとして知られており、pro-inflammatory サイトカインを抑制すると報告されている[12]ことから本試験で観察された加齢による白血球中 STAT3-mRNA の発現の差は、1 ヶ月齢未満の幼若な子牛が 6 ヶ月齢以降の子牛に比べてエンドトキシンへの感受性が高い根拠になりうる可能性がある。もし肺炎罹患子牛において炎症をサイトカインレベルで抑制することが可能となれば、ステロイド系および NSAIDs による治療だけでなく、炎症性サイトカインを標的とした特異的な治療を臨床現場に取り入れることができるかもしれない。第 3 章ではマクロライド系抗生物質が抗炎症効果を示す機序の一部を明らかにする目的で、マクロライド系抗生物質であるツラスロマイシンが血漿中エンドトキシン活性値を抑制するか否かの検証を行った。その結果、ツラスロマイシンは直接エンドトキシン活性を抑制しないが、ツラスロマイシンを投与した子牛の血漿はエンドトキシン活性を抑制することを示した。一方でツラスロマイシンは炎症性サイトカインの mRNA 発現量に影響を与えないことが明らかとなった。マクロライド系抗生物質は好中球動員[38, 55, 65]と組織毒性化合物の放出[38]を減少させることで炎症性サイトカインの蓄積を減らすことが知られている[65, 93]。さらにツラスロ

マイシンは好中球のアポトーシスを誘導し、炎症性メディエーターの産生を阻害する可能性が報告されている[23, 55, 93]。本試験結果は、ツラスロマイシンの投与により炎症性サイトカインの発現量が抑制する現象は確認できず、ツラスロマイシンが好中球のアポトーシスを促進し、炎症を抑制する効果を持つとする既報を支持することもできなかった。しかしながら、本試験におけるツラスロマイシンが直接エンドトキシン活性を抑制しないが、ツラスロマイシンを投与した子牛の血漿はエンドトキシン活性を抑制するという結果は、ツラスロマイシンの臨床効果の一部を説明するものと思われる。これらの結果をまとめると本研究により以下のことが明らかとなった。

1. マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛において血糖値、血漿中 TP およびグロブリン濃度がそれぞれ  $<83.0 \text{ mg/dl}$ 、 $>6.5 \text{ g/dl}$  および  $>3.3 \text{ g/dl}$  であれば予後不良と診断できる。
2. ヒト用携帯型血糖値測定器のうち i-STAT 1 および Precision Xceed は、牛診療においても応用可能である[71]。
3. マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛において、BALF および血漿中エンドトキシン活性値がそれぞれ 4.39 および 0.104 EU/ml 以上であれば、予後不良と診断できる[72]。
4. 1 ヶ月齢未満または 6 ヶ月齢以降の子牛へのエンドトキシン投与は、少なくとも白血球または肝臓のいずれかにおいて TLR4、NF $\kappa$ B2 および STAT3-mRNA の発現量を増加させたが、白血球の STAT3-mRNA 発現は 1 ヶ月齢未満子牛においてほとんど確認されなかった。
6. マクロライド系抗生物質であるツラスロマイシンは直接エンドトキシン活性を抑制しないが、ツラスロマイシンを投与した子牛の血漿はエンドトキシン活性を抑制する。

本研究を総括すると、一般的に抗生物質に加えて NSAIDs により行われている肺炎罹患子牛の診療に[31, 60]、栄養状態および炎症の病態解析に基づいた新



たな診断基準および治療戦略を臨床現場に提案するものであり、すぐにでも応用可能な内容である。ヒト医療では優れた肺炎診療ガイドラインがエビデンスに基づいて各国で作成されている[50, 61, 81]。子牛における肺炎治療の質を向上させるためには、肺炎罹患子牛の病態生理学的解明と抗生物質および NSAIDs 等の臨床薬理学的検証に基づいた治療戦略を継続的に検証すべきであろう。

## 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光犬猫病院 立花徹 院長、論文執筆において多大なご支援を賜りましたみなみ北海道農業共済組合 道南支所 塚野健志 係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 寺岡宏樹 教授（副査）、上野博史 教授（副査）および大塚浩通 准教授（副査）に深謝いたします。

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 大塚まりな氏に心から感謝いたします。そしてエンドトキシン活性値の測定や解析についてご指導とご助言を賜りました Microbial Solutions 土谷正和 氏 に深甚な謝意を表します。

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父 賢および母 えり子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）はありません。

## 引用文献

1. Ackermann, M. R., Derscheid, R. and Roth, J. A. 2010. Innate immunology of bovine respiratory disease. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **26**: 215-228.
2. Adegbeye, D. S., Halbur, P. G., Cavanaugh, D. L., Werdin, R. E., Chase, C. C., Miskimins, D. W. and Rosenbusch, R. F. 1995. Immunohistochemical and Pathological Study of Mycoplasma Bovis-Associated Lung Abscesses in Calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* **7**: 333-337.
3. Akobeng, A. K. 2007. Understanding diagnostic tests 3: receive operating characteristic curves. *Acta. Paediatr.* **96**: 644-647.
4. Bargagli, E., Monaci, F., Bianchi, N., Bucci, C. and Rottoli, P. 2008. Analysis of trace elements in bronchoalveolar lavage of patients with diffuse lung diseases. *Biol. Trace. Elem. Res.* **124**: 225-235.
5. Berchtold, J. 2009. Treatment of calf diarrhea: intravenous fluid therapy. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **25**: 73-99.
6. Bertsch, T., Triebel, J., Bollheimer, C., Christ, M., Sieber, C., Fassbender, K., Heppner, H. J. 2015. C-reactive protein and the acute phase reaction in geriatric patients. *Z. Gerontol. Geriatr.* **48**: 595-600.
7. Bieniek K, Szuster-Ciesielska A, Kamińska T, Kondracki M, Witek M, Kandefer-Szerszeń M. 1998. Tumor necrosis factor and interferon activity in the circulation of calves after repeated injection of low doses of lipopolysaccharide. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **62**: 297-307.
8. Blum, J. W., Bruckmaier, R. M. and Moser, M. 1996. Endocrine, metabolic and hematological changes associated with reduced growth performance during chronic pneumonia in calves: a case study. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.* **103**: 115-116.
9. Bradley, A. 2002. Bovine mastitis: an evolving disease. *Vet. J.* **164**: 116-128.
10. Burvenich, C., Bannerman, D. D., Lippolis, J. D., Peelman, L., Nonnecke, B. J., Kehrl, M. E. Jr. and Paape, M. J. 2007. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections

- during the transition period. *J. Dairy Sci.* **90 Suppl 1**: E39-54.
11. Christaki, E., Anyfanti, P. and Opal, S. M. 2011. Immunomodulatory therapy for sepsis: an update. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* **9**: 1013-1033.
  12. Chusid, L. A., Pereira-Argenziano, L., Miskolci, V., Vancurova, I. and Davidson, D. 2010. Transcriptional control of cytokine release from monocytes of the newborn: effects of endogenous and exogenous interleukin-10 versus dexamethasone. *Neonatology.* **97**: 108-116.
  13. Cohen, T. A., Nelson, R. W., Kass, P. H., Christopher, M. M. and Feldman, E. C. 2009. Evaluation of six portable blood glucose meters for measuring blood glucose concentration in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **235**: 276-280.
  14. Confer, A. W. 2009 Update on bacterial pathogenesis in BRD. *Anim. Health Res. Rev.* **10**: 145-148.
  15. Constable, P. D. 2004. Antimicrobial Use in the Treatment of Calf Diarrhea. *J. Vet. Intern. Med.* **18**: 8-17.
  16. Cooper, J. F., Latta, K. S. and Smith, D. 2010. Automated endotoxin testing program for high-risk-level compounded sterile preparations at an institutional compounding pharmacy. *Am. J. Health. Syst. Pharm.* **67**: 280-286.
  17. Crofford, L. J. 1999. COX-2 in synovial tissues. *Osteoarthritis. Cartilage.* **7**: 406-408.
  18. Dubrovsky, S. A., Van Eenennaam, A. L., Karle, B. M., Rossitto, P. V., Lehenbauer, T. W. and Aly, S. S. 2019. Bovine respiratory disease (BRD) cause-specific and overall mortality in preweaned calves on California dairies: The BRD 10K study. *J. Dairy Sci.* **102**: 7320-7328.
  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. Erskine, R. J., Tyler, J. W., Riddell, M. G. Jr. and Wilson, R. C. 1991. Theory, use, and realities of efficacy and food safety of antimicrobial treatment of acute coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **198**: 980-984.
21. Fan, Y., Mao, R. and Yang, J. 2013. NF- $\kappa$ B and STAT3 signaling pathways collaboratively link inflammation to cancer. *Protein Cell.* **4**: 176-185.
22. Fernandez-Robredo, P., Recalde, S., Moreno-Orduña, M., García-García, L., Zarranz-Ventura, J. and García-Layana, A. 2013. Azithromycin reduces inflammation in a rat model of acute conjunctivitis. *Mol. Vis.* **19**: 153-165.
23. Fischer, C.D., Beatty, J.K., Zvaigzne, C.G., Morck, D.W., Lucas, M.J. and Buret, A.G. 2011. Anti-inflammatory benefits of antibiotic-induced neutrophil apoptosis: tulathromycin induces caspase-3-dependent neutrophil programmed cell death and inhibits NF- $\kappa$ B signaling and CXCL8 transcription. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**: 338-348.
24. Fukumori, N. T., de Campos, D. G., Massicano, A. V., de Pereira, N. P., da Silva, C. P. and Matsuda, M. M. 2011. A portable test system for determination of bacterial endotoxins in <sup>18</sup>F-FDG, <sup>99m</sup>Tc, and lyophilized reagents for labeling with <sup>99m</sup>Tc. *J. Nucl. Med. Technol.* **39**: 121-124.
25. Gee, A. P., Sumstad, D., Stanson, J., Watson, P., Proctor, J., Kadidlo, D., Koch, E., Sprague, J., Wood, D., Styers, D., McKenna, D., Gallelli, J., Griffin, D., Read, E. J., Parish, B. and Lindblad, R. 2008. A multicenter comparison study between the Endosafe PTS rapid-release testing system and traditional methods for detecting endotoxin in cell-therapy products. *Cytotherapy.* **10**: 427-435.
26. Gerber, K. L. and Freeman, K. P. 2016. ASVCP guidelines: quality assurance for portable blood glucose meter (glucometer) use in veterinary medicine. *Vet. Clin. Pathol.* **45**: 10-27.



27. Gerros, T. C., Semrad, S. D. and Proctor, R. A. 1995. Alterations in clinical, hematological and metabolic variables in bovine neonatal endotoxemia. *Can. J. Vet. Res.* **59**: 34-39.
28. Giamarellos-Bourboulis, E. J. 2008. Macrolides beyond the conventional antimicrobials: a class of potent immunomodulators. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **31**: 12-20.
29. Gifford, C. A., Holland, B.P., Mills, R.L., Mazwell, C.L., Farney, J.K., Terrill, S.J., Step, D.L., Richards. C.J., Burciaga Robles, L.O. and Krehbiel, C.R. 2012. Growth and Development Symposium: Impacts of inflammation on cattle growth and carcass meri. *J. Anim. Sci.* **90**: 1238-51.
30. Godson, D. L., Campos, M., Attah-Poku, S. K., Redmond, M. J., Cordeiro, D. M., Sethi, M. S., Harland, R. J. and Babiuk, L. A. 1996. Serum haptoglobin as an indicator of the acute phase response in bovine respiratory disease. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **51**: 277-292.
31. Guzel, M., Karakurum, M. C., Durgut, R. and Mamak, N. 2010. Clinical efficacy of diclofenac sodium and flunixin meglumine as adjuncts to antibacterial treatment of respiratory disease of calves. *Aust. Vet. J.* **88**: 236-239.
32. Hagar, A. J., Edin, L. M., Lih, B. F., Thurlow, L., Koller, H. B., Cairns, A. B., Zeldin, C. D. and Miao, A. E. 2017. LPS potentiates insulin-driven hypoglycemic shock. *J. Immunol.* **199**: 3634-3643.
33. 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.
34. Hogan, J. and Larry Smith, K. 2003. Coliform mastitis. *Vet. Res.* **34**: 507-519.
35. Holland, B. P., Step, D. L., Burciaga-Robles, L. O., Fulton, R. W., Confer, A. W., Rose, T. K., Laidig, L. E., Richards, C. J. and Krehbiel, C. R. 2011. Effectiveness of sorting calves with high risk of developing bovine respiratory disease on the

- basis of serum haptoglobin concentration at the time of arrival at a feedlot. *Am. J. Vet. Res.* **72**: 1349-1360.
36. Holtenius, K., Strenbauer, K. and Holtenius, P. 2000. The effect of the plasma glucose level on the abomasal function in dairy cows. *J. Anim. Sci.* **78**: 1930-1935.
37. Hurley, J. C. 1995. Reappraisal with Meta-Analysis of Bacteremia, Endotoxemia, and Mortality in Gram-Negative Sepsis. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 1278-1282.
38. Ichikawa, Y., Ninomiya, H., Koga, H., Tanaka, M., Kinoshita, M., Tokunaga, N., Yano, T., Oizumi, K., 1992. Erythromycin reduces neutrophils and neutrophil-derived elastolytic-like activity in the lower respiratory tract of bronchiolitis patients. *Am. Rev. Res. Dis.* **146**: 196-203.
39. Idoate, I., Vander Ley, B., Schultz, L. and Heller, M. 2015. Acute phase proteins in naturally occurring respiratory disease of feedlot cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **163**: 221-226.
40. Jacobsen, S., Andersen, P. H., Toellboell, T. and Heegaard, P. M. 2004. Dose dependency and individual variability of the lipopolysaccharide-induced bovine acute phase protein response. *J. Dairy Sci.* **87**: 3330-3339.
41. Jennifer L. Johns. 2015. Chapter 26 Alterations in Blood Proteins. pp.386-392. *In: Large animal internal medicine. 5th ed.(Smith. B.P.), Elsevier, Amsterdam.*
42. Jimenez, L., Rana, N., Travers, K., Tolomanoska, V. and Walker, K. 2010 Evaluation of the Endosafe® Portable Testing System for the Rapid Analysis of Biopharmaceutical Samples. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* **64**: 211-221.
43. Johnson M. B., Fry, M. M., Flatland B. and Kirk, A. C. 2009. Comparison of a human portable blood glucose meter, veterinary portable blood glucose meter, and automated chemistry analyzer for measurement of blood glucose concentrations in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **235**: 1309-1313.
44. Johnson R.W. 2002. The concept of sickness behavior: a brief chronological account of four key discoveries. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **87**: 443-50.

45. Joshi, V., Gupta, V. K., Bhanuprakash, A. G., Mandal, R. S. K., Dimri, U. and 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.
46. Kallem, V. R., Pandita, A. and Gupta, G. 2017. Hypoglycemia: When to Treat? *Clin. Med. Insights. Pediatr.* **11**: 1-9.
47. Kanoh, S. and Rubin, B. K. 2010. Mechanisms of action and clinical application of macrolides as immunomodulatory medications. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**: 590-615.
48. 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.
49. Kawai, T. and Akira, S. 2007. Signaling to NF- $\kappa$ B by toll-like receptors. *Trends. Mol. Med.* **13**: 460-469.
50. Khono, S. 2015. Diagnosis and treatment of pneumonia -- progress of the guidelines for treatment of pneumonia in Japan. *Nihon Naika Gakkai Zasshi.* **100**: 3481-3483. [Article in Japanese]
51. Kollmann, T. R., Levy, O., Montgomery, R. R. and Goriely, S. 2012. Innate Immune Function by Toll-like Receptors: Distinct Responses in Newborns and the Elderly. *Immunity.* **37**: 771-783.
52. Kovatchev, B. and Cobelli, C. 2016. Glucose Variability: Timing, Risk Analysis, and Relationship to Hypoglycemia in Diabetes. *Diabetes Care.* **39**: 502-510.
53. Labro, M. T. 2000. Interference of antibacterial agents with phagocyte functions: immunomodulation or “immune-fairy tales”? *Clin. Microbiol. Rev.* **13**: 615-650.
54. Lachin, J.M., Genuth, S., Nathan D.M., Zinman, B. and Rutledge, B.N. 2008. Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the Diabetes Control and Complications Trial—revisited. *Diabetes.* **57**: 995-1001.
55. Lee, W. D., Flynn, A. N., LeBlanc, J. M., Merrill, J. K., Dick, P., Morck, D. W. and

- Buret, A. G. 2004. Tilmicosin-induced bovine neutrophil apoptosis is cell-specific and downregulates spontaneous LTB<sub>4</sub> synthesis without increasing Fas expression. *Vet. Res.* **35**: 213-224.
56. Liang, Y., Zhou, Y. and Shen, P. 2004. NFκB and its regulation on the immune system. *Cell Mol. immunol.* **1**: 343-350.
57. Lohuis, J. A., Schukken, Y. H., Henricks, P. A., Heyneman, R., Burvenich, C., Verheijden, J. H., Van Miert, A. S., Brand, A. 1990. Preinfection functions of blood polymorphonuclear leukocytes and the outcome of experimental *Escherichia coli* mastitis in the cow. *J. Dairy Sci.* **73**: 342-350.
58. Lohuis, J. A., Schukken, Y. H., Verheijden, J. H., Brand, A. Van Miert, A. S. 1990. Effect of severity of systemic signs during the acute phase of experimentally induced *Escherichia coli* mastitis on milk production losses. *J. Dairy Sci.* **73**: 333-341.
59. Lohuis, J. A., Verheijden, J. H., Burvenich, C., van Miert, A. S. 1988. Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants. 2. Metabolic aspects. *Vet. Q.* **10**: 117-125.
60. Mahendran, S. A., Booth, R., Bell, N. J., Burge, M. 2017. Randomised positive control trial of NSAID and antimicrobial treatment for calf fever caused by pneumonia. *Vet. Rec.* **181**: 45.
61. Martin-Loeches, I., Rodriguez, A. H. and Torres, A. 2018. New guidelines for hospital-acquired pneumonia/ventilator-associated pneumonia: USA vs. Europe. *Curr. Opin. Crit. Care.* **24**: 347-352.
62. Mathison, J. C. and Ulevitch, R. J. 1979. The clearance, tissue distribution, and cellular localization of intra venously injected lipopolysaccharide in rabbits. *J. Immunol.* **123**: 2133-2143.
63. Mavangira, V., Mangual, M. J., Gandy, J. C. and Sordillo, L. M. 2016. 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostane Concentrations and Oxidant Status in Lactating Dairy Cattle

- with Acute Coliform Mastitis. *J. Vet. Intern. Med.* **30**: 339-347.
64. Melchior, D., Se`ve, B. and Le Floc'h, N. 2004. Chronic lung inflammation affects plasma amino acid concentrations in pigs. *J. Anim. Sci.* **82**: 1091-1099.
65. Mikasa, K., Kita, E., Sawaki, M., Kunimatsu, M., Hamada, K., Konishi, M., Kashiba, S., Narita, N., 1992. The anti-inflammatory effect of erythromycin in zymosan- induced peritonitis of mice. *J. Antimicrob. Chemother.* **30**: 339-348.
66. Moisé, S. J., Aly, S. S., Lehenbauer, T. W., Love, W. J., Rossitto, P. V., Van Eenennaam, A. L., Trombetta, S. C., Bortoluzzi, E. M. and Hulbert, L. E. 2019. Association of plasma haptoglobin concentration and other biomarkers with bovine respiratory disease status in pre-weaned dairy calves. *J. Vet. Diagn. Invest.* **31**: 40-46.
67. Murphy, D. B., Cregg, N., Tremblay, L., Engelberts, D., Laffey, J. G., Slutsky, A.S., Romaschin, A. and Kavanagh, B. P. 2000. Adverse ventilatory strategy causes pulmonary-to-systemic translocation of endotoxin. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **162**: 27-33.
68. Nakas, C. T., Dalrymple-Alford, J. C., Anderson, T. J. and Alonzo, T. A. 2013. Generalization of Youden index for multipleclass classification problems applied to the assessment of externally validated cognition in Parkinson disease screening. *Stat. Med.* **32**: 995-1003.
69. National Research Council (US). 2011. Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 8th ed. pp. 1-124. National Academies press, Washington D.C.
70. Nicholas, R. A. and Ayling, R. D. 2003. Mycoplasma bovis: disease, diagnosis, and control. *Res. Vet. Sci.* **74**: 105-112.
71. Nishi, Y., Murakami, Y., Otsuka, M., Tsukano, K., Ajito, T. and Suzuki, K. 2019. Accuracy of the point-of-care glucose meter for use in calves. *J. Vet. Med. Sci.* **81**: 1301-1304.

72. Nishi, Y., Tsukano, K., Otsuka, M., Tsuchiya, M., Suzuki, K. 2019. Relationship between bronchoalveolar lavage fluid and plasma endotoxin activity in calves with bronchopneumonia. *J. Vet. Med. Sci.* **81**: 1043-1046.
73. Norcia, L. J., Silvia, A. M., Santoro, S. L., Retsema, J., Letavic, M. A., Bronk, B. S., Lundy, K. M., Yang, B., Evans, N. A. and Hayashi, S. F. 2004. In vitro microbiological characterization of a novel azalide, two triamilides and an azalide ketal against bovine and porcine respiratory pathogens. *J. Antibiot (Tokyo)*. **57**: 280-288.
74. 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.
75. Peri, F., Piazza, M., Calabrese, V., Damore, G. and Cighetti, R. 2010. Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules. *Biochem. Soc. Trans.* **38**: 1390-1395.
76. Plessers, E., Watteyn, A., Wyns, H., Pardon, B., De Backer, P. and Croubels, S. 2015. Study of the immunomodulatory properties of gamithromycin and dexamethasone in a lipopolysaccharide inflammation model in calves. *Res. Vet. Sci.* **103**: 218-223.
77. 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.
78. Raetzsch, C. F., Brooks, L.N., Alderman, J. M., Moore, Kelli S., Hosick, A. P., Klebanov, S., Shizuo, A., Bear, E. J., Baldwin, S. A., Mackman, N. and Combs, P. T. 2009. LPS inhibition of glucose production through the TLR4, MYD88, NFκB pathway. *Hepatology*. **50**: 592-600.
79. Roussel, A. J. 2014. Fluid therapy in mature cattle. *Vet. Clin. Food. Anim.*

**30**:429-439.

80. Schildge, J., Nagel, C. and Grun, C. 2007. Bronchoalveolar lavage in interstitial lung diseases: does the recovery rate affect the results? *Respiration*. **74**: 553-557.
81. Shi, Y., Huang, Y., Zhang, T. T., Cao, B., Wang, H., Zhuo, C., Ye, F., Su, X., Fan, H., Xu, J. F., Zhang, J., Lai, G. X., She, D. Y., Zhang, X. Y., He, B., He, L. X., Liu, Y. N. and Qu, J. M. 2019. Chinese guidelines for the diagnosis and treatment of hospital-acquired pneumonia and ventilator-associated pneumonia in adults (2018 Edition). *J. Thorac. Dis.* **11**: 2581-2616.
82. Snowder, G. D., Van Vleck, L. D., Cundiff, L.V., Bennett, G.L., Koohmaraie, M. and Dikeman, M. E. 2007. Bovine respiratory disease in feedlot cattle: Phenotypic, environmental, and genetic correlations with growth, carcass, and longissimus muscle palatability traits. *J. Anim. Sci.* **85**: 1885-1892.
83. Sotohira, Y., Suzuki, K., Sasaki, H., Sano, T., Tsuchiya, M., Suzuki, Y., Shimamori, T., Tsukano, K., Sato A., Yokota, H. and Asakawa, M. 2016. Plasma endotoxin activity in kangaroos with oral necrobacillosis (lumpy jaw disease) using an automated handheld testing system. *J. Vet. Med. Sci.* **78**: 971-976.
84. Steel, H. C., Theron, A. J., Cockeran. R., Anderson, R. and Feldman, C. 2012. Pathogen- and host-directed anti-inflammatory activities of macrolide antibiotics. *Mediators. Inflamm.* 2012: 584262.
85. Stämpfli, H. and Oliver-Espinosa, O. 2014. Clinical chemistry tests. pp.350-373. *In: Large Animal Internal Medicine*, 5th ed. (Smith, P.B. eds.), Elsevier, Amsterdam.
86. Suzuki, K., Ajito, T., Kadota, E. and Ohashi, S. 1997. Comparison of commercial isotonic fluids intravenously administered to rehydrate fasted bullocks. *J. Vet. Med. Sci.* **59**: 689-694.
87. Tennent-Brown, B. S., Koenig, A., Williamson, L. H. and Boston, R. C. 2011. Comparison of three point-of-care blood glucose meters for use in adult and

- juvenile alpacas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **239**: 380-386.
88. Trefz, F.M., Feist, M. and Lorenz, I. 2016. Hypoglycaemia in hospitalised neonatal calves: Prevalence, associated conditions and impact on prognosis. *Vet. J.* **217**: 103-108.
89. Tsukano, K. and Suzuki, K. 2019. Plasma amino acid abnormalities in calves with diarrhea. *J. Vet. Med. Sci.* **81**: 517-521.
90. Tsukano, K., Sarashina, S. and Suzuki, 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.
91. 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.
92. Vels, L., Røntved, C. M., Bjerring, M. and Ingvarsen, K. L. 2009. Cytokine and acute phase protein gene expression in repeated liver biopsies of dairy cows with a lipopolysaccharide-induced mastitis. *J. Dairy Sci.* **92**: 922-934.
93. Villarino, N., Brown, S. A. and Martin-Jiménez, T. 2013. The role of the macrolide tulathromycin in veterinary medicine. *Vet. J.* **198**: 352-357.
94. Workgroup on hypoglycemia. American diabetes association. 2005. Defining and reporting hypoglycemia in diabetes: a report from the American Diabetes Association Workgroup on Hypoglycemia. *Diabetes Care.* **28**: 1245-1249.
95. Ziv, G. 1992. Treatment of peracute and acute mastitis. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **8**: 1-15.



語 略 一 覽

ACA	:	生化学分析装置
APPs	:	急性相タンパク
AUC	:	Receiver Operating Characteristic 曲線下面積
BALF	:	気管支肺胞洗浄液
BCAA	:	分岐鎖アミノ酸
BRDC	:	牛呼吸器病症候群
COX	:	シクロオキシゲナーゼ
CV	:	変動係数
GAPDH	:	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GPT	:	グルタミン酸ピルビン酸転移酵素
Hp	:	ハプトグロビン
IL	:	インターロイキン
LAL-KCA	:	リムルス基質発色法
LAL-KTA	:	リムルス比濁時間法
LPS	:	リポポリサッカロイド
<i>M. haemolytica</i>	:	<i>Mannheimia haemolytica</i>
<i>M.bovis</i>	:	<i>Mycoplasma bovis</i>
MMP	:	マトリックスメタロプロテアーゼ
NFκB	:	核内因子 B
NSAIDs	:	非ステロイド系抗炎症薬
<i>P.multocida</i>	:	<i>Pasteurella multocida</i>
PBGM	:	携帯型血糖値測定器
PCR	:	Polymerase Chain Reaction
POC	:	Point of Care
ROC	:	Receiver Operating Characteristic

SAA	:	血清アミロイド A
SD	:	標準偏差
Se	:	感度
Sp	:	特異度
STAT	:	シグナル伝達兼転写活性化因子
TLR	:	Toll 様受容体
TNF	:	腫瘍壊死因子
TP	:	血清総タンパク

## 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 1 章第 2 節

**Nishi Y**, Murakami Y, Ostuka M, Tsukano K, Ajito T, Suzuki K. (2019) Accuracy of the point-of-care glucose meter for use in calves. *J. Vet. Med. Sci.* **81**:1301-1304.

### 第 2 章第 1 節

**Nishi Y**, Tsukano K, Otsuka M, Tsuchiya M, Suzuki K. (2019) Relationship between bronchoalveolar lavage fluid and plasma endotoxin activity in calves with bronchopneumonia. *J. Vet. Med. Sci.* **81**:1043-1046.

## **Pathophysiological study of endotoxin-derived systemic inflammation in bovine respiratory disease**

Rakuno Gakuen University Graduate School  
Veterinary Medicine, Large Animal Surgery  
Nishi Yasunobu

The objective of this study was to evaluate the inflammatory response induced by endotoxin using endotoxin activity and messenger RNA (mRNA) expression of pro-inflammatory cytokines as parameters. In addition, we examined whether the macrolide tulathromycin attenuates the acute-phase response in calves.

As shown in chapter 2 section 1, we measured the blood glucose, total protein (TP) and globulin concentrations in calves with bronchopneumonia, and constructed receiver operating characteristic (ROC) curves to assess the prognosis of calves with bronchopneumonia. As result, the blood glucose concentration in calves with bronchopneumonia was significantly lower than that in controls ( $p < 0.01$ ). On the other hand, the plasma concentrations of TP and globulin in calves with mycoplasmal bronchopneumonia were significantly higher than those in controls ( $p < 0.05$ ). In addition, the proposed diagnostic cut-offs for blood glucose, and plasma concentrations of TP and globulin for a poor mycoplasmal bronchopneumonia prognosis based on the receiver operating characteristic concentration were  $< 83.0$  mg/dl,  $> 6.5$  g/dl and  $> 3.3$  g/dl, respectively. These results suggested that the blood glucose, TP and globulin concentrations are promising prognostic tools to assess the outcome of calves with mycoplasmal bronchopneumonia. In particular, the blood glucose concentration is useful as it can be measured on farms using a portable blood glucose meter. In chapter 2 section 2, we describe the accuracy and precision of portable blood glucose meters, such as i-STAT 1 and Precision Xceed, in calves. Whole

blood and plasma samples were obtained from eleven calves that received 2.5 or 5.0% dextrose-containing polyelectrolyte isotonic solutions. Measurements using the i-STAT 1 ( $r^2=0.99$ ,  $P<0.0001$ ) and Precision Xceed ( $r^2=0.96$ ,  $P<0.0001$ ) correlated well with those by the hexokinase method, which is the gold standard. Although the accuracy of i-STAT 1 was equivalent to that of the hexokinase method, there was an autocorrelation in the residuals between the results from the Precision Xceed and the hexokinase method.

It is possible that severe bronchopneumonia in calves is associated with endotoxemia. However, few reports have investigated the relationship between plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) endotoxin activity. As described in chapter 3 section 1, we investigated the relationship between the endotoxin activity in plasma and that in BALF in bronchopneumonia. Thirty-three calves were included in this study (17 healthy calves and 16 calves with respiratory disease). In the calves with bronchopneumonia, the median endotoxin activity in plasma (0.437 EU/ml,  $P<0.001$ ) and BALF (29.45 EU/ml,  $P<0.001$ ) was significantly higher than that in the control calves. Plasma endotoxin activity was significantly and positively correlated with that in BALF ( $r^2=0.900$ ,  $P<0.001$ ). Based on the receiver operating characteristics curves, we propose a diagnostic cut-off for plasma endotoxin activity (0.104 EU/ml, AUC=0.914,  $P<0.001$ , Se 81.3% and Sp 82.4%) to identify calves with bronchopneumonia that may die within a week. In addition, our results suggested that lipopolysaccharide (LPS) translocated from the bronchus to the circulation in severe pneumonia because plasma endotoxin activity was correlated with that of BALF. It is well known that LPS or endotoxin induces pro-inflammatory cytokines. In chapter 3 section 2, we describe the sequential changes in the expression of toll-like receptor-4 (TLR4), nuclear factor kappa B (NF $\kappa$ B)-1, -2, and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) mRNA in calves that received endotoxin. In addition, we compared the expression level of mRNA in old and young calves. As a result,

leukocytic TLR4 and NFκB2 mRNA levels in old and young calves were significantly increased, peaking at 2 hours after LPS administration, compared with pre-values ( $p < 0.05$ ). Hepatic TLR4 and NFκB2 mRNA levels in young calves were increased, peaking at 4 and 2 hours after LPS administration, respectively. The leukocytic STAT3 mRNA level in old calves increased at 2-4 hours ( $p < 0.05$ ); however, that in young calves did not significantly change. Therefore, TLR4 and NFκB2 mRNA levels may be useful inflammatory markers for endotoxin-challenged calves. Moreover, we found that LPS induced leukocytic STAT3 mRNA expression in old calves but not in young calves.

Macrolide antibiotics have been demonstrated to inhibit cytokine release independently of their antimicrobial actions. As described in chapter 4, we investigated whether tulathromycin, a macrolide antibiotic, suppresses endotoxin activity. As a result, endotoxin activity in tulathromycin-containing plasma was significantly lower than that in plasma without tulathromycin. This suggests that it can inhibit endotoxin activity in calves. Thus, prophylactic administration of tulathromycin may reduce the severity of symptoms even if cattle develop endotoxin-associated inflammation.

The present study characterized marked changes in inflammatory mediators in systemic inflammation induced by endotoxin based on scientific analysis. It is important to continue to investigate inflammatory disease related to endotoxin in order to elucidate the pathophysiology of endotoxin-related diseases in calves and the effects of drugs.