

## 博士学位論文

### 学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 西 康暢

学位の種類 博士（獣医学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第3項に該当

学位論文の題目 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

### 審査委員

主査 教授 鈴木 一由（生産動物外科学）

副査 教授 寺岡 宏樹（獣医薬理学）

副査 教授 上野 博史（運動器・神経病治療学）

副査 准教授 大塚 浩通（生産動物内科学Ⅰ）

# 学位論文要旨

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

生産動物外科学 西 康暢

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て、肺炎罹患子牛およびエンドトキシンチャレンジモデルを用いて血液生化学検査、血中エンドトキシン活性値および炎症性サイトカインおよび核調節因子のメッセンジャーRNA(mRNA)発現を調査した。これに加えてマクロライド系抗生物質の副次効果である抗炎症機能を前述の指標を用いて評価できるか否かを検証した。すなわち本研究では、(1)血液生化学性状を指標としたマイコプラズマ性気管支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、血漿中総タンパク(TP)およびグロブリン濃度について、Receiver Operating Characteristic (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、マイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛における血糖値、TP およびグロブリン濃度のカットオフ値は、それぞれ $<83.0 \text{ mg/dl}$ 、 $>6.5 \text{ g/dl}$ および $>3.3 \text{ g/dl}$ であれば予後不良である可能性が高いことを示すことができた。第1章第2節では、前節で血糖値が有用な診断項目であったため、ヒト用携帯型血糖測定器(PBGM)であるi-STAT 1およびPrecision Xceedが牛医療において利用可能か否かを検証するためにヘキソキナーゼ法を標準法として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による測定値と標準法による測定値は有意に相関したが、Precision Xceedは自己相関を有した。したがって、これらの機器はその特徴を理解した上で臨床応用できることが示唆された。

第2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ける血中および気管支肺胞洗浄液(BALF)中エンドトキシン活性値の関係を調査し、これに加えてマイコプラズマ性気管支肺炎罹患子牛の予後判定がエンドトキシン活性値により診断可能か否かをROC解析を用いて検証した。その結果、肺炎罹患子牛における血中およびBALF中エンドトキシン活性値は健常子牛のそれよりも有意に高値を示した。さらに血中およびBALF中エンドトキシン活性値がそれぞれ0.104 EU/m/および4.39 EU/m/以上であれば、予後不良であると診断できることが示唆された。また、血中およびBALF中エンドトキシン活性値は有意に相関した。したがって、子牛の気管支肺炎ではエンドトキシンが肺から全身へ移行することが推察された。一方、新生子牛ではエンドトキシンへの感受性が高いことが報告されているが、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い。第2章第2節では、エンドトキシンチャレンジモデルを用いて白血球および肝臓中の炎症性サイトカイン mRNA 発現量の経時的变化を観察し、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、NFkB2 およびSTAT3-mRNA の発現量を増加させた。しかしながら、1ヶ月齢未満の白血球中のSTAT3-mRNA 発現はほとんど認められなかった。

第3章では、マクロライド系抗生物質である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検証するために、ツラスロマイシン投与群および非投与群から得た血漿にエンドトキシンを添加し、エンドトキシン活性値および回収率を測定した。その結果、ツラスロマイシン投与群の血漿は、非投与群の血漿と比較してエンドトキシン活性値を抑制した。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た。

本研究を総括すると、一般的に抗生物質に加えて非ステロイド性抗炎症薬により行われている肺炎罹患子牛の診療に、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る。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、抗生物質および非ステロイド等消炎剤の臨床薬理的検証に基づいた治療戦略を継続的に検証する必要があると思われる。

## 論文審査の要旨および結果

### 1 論文審査の要旨および結果

審査は、1) 体裁を整え、新規性があり、明確に十分な根拠があるか、2) 科学および獣医学の発展に寄与する内容であるかの2点を重点に行われた。

#### 論文の概要について

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て、肺炎罹患子牛およびエンドトキシンチャレンジモデルを用いて血液生化学検査、血中エンドトキシン活性値および炎症性サイトカインおよび核調節因子の mRNA を調査し、これに加えてマクロライド系抗生物質の副次効果である抗炎症機能を前述の指標を用いて評価できるか否かを検証したものである。第2章第1節では、血液生化学検査項目である血糖値を予後診断指標として有用であるか評価したところ <83.0 mg/dl であれば予後不良である可能性が高いことを示した。そして第2章第2節では、ヒト用携帯型血糖測定器 (PBGM) である i-STAT1 および Precision Xceed が牛医療において利用可能か否かを検証し、これらの機器はその特徴を理解した上で臨床応用できることを明らかにした。第3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ける血中および気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中エンドトキシン活性値が健常子牛のそれらよりも有意に高値であること、血中および BALF 中エンドトキシン活性値がそれぞれ 0.104 EU/ml および 4.39 EU/ml 以上であれば予後不良と診断できることを示唆した。また、血中および BALF 中エンドトキシン活性値は有意に相関したことから子牛の気管支肺炎ではエンドトキシンが肺から全身へ移行することを推察している。一方、新生子牛ではエンドトキシンへの感受性が高いことが報告されているが、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いため第3章第2節では、エンドトキシンチャレンジモデルを用いて白血球および肝臓中の炎症性サイトカイン mRNA 発現量の継時的変化を観察している。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 の発現量を増加させたが1ヶ月齢未満の白血球中の STAT3-mRNA 発現はほとんど認められず月齢によるエンドトキシンへの対応が異なる可能性を示唆している。第4章では、マクロライド系抗生物質である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検証したところツラスロマイシン投与群の血漿は、非投与群の血漿と比較してエンドトキシン活性値を抑制したことを明らかにした。本研究を総括すると、一般的に抗生物質に加えて非ステロイド性抗炎症薬により行われている肺炎罹患子牛の診療に、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る。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、抗生物質および非ステロイド等消炎剤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る必要があると思われる。

## 研究の背景と目的

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。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により治療されるのが一般的である。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。一方、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。

## 研究の成果

本研究成果をまとめると、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  $<83.0$  mg/dl、 $>6.5$  g/dl および  $>3.3$  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。
5. 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。

## 研究の評価

本研究は、一般的な血液生化学検査項目である血糖値、血漿中総タンパク(TP)およびグロブリン濃度を指標に全身性炎症を伴う気管支肺炎の予後評価について検証し、血糖値を評価指標と抽出した後にヒト用携帯型血糖測定器(PBGM)の牛臨床への応用のため精度管理を行ったことは実践的研究として評価に値する。第 3 章では牛呼吸器疾患の血漿および BALF 中エンドトキシン活性値を調査し、呼吸器疾患でも全身性炎症にエンドトキシンが関与していることを初めて明らかにした意義は高い。また、エンドトキシンに対する感応性は月齢によって異なることが指摘されているが明確な機序は不明であったが、その機序の一端についてエンドトキシンモデルを用いて証明している。最後に、牛用として市販されている動物用医薬品の中からエンドトキシン活性値を減少させる可能性のあるものとして 15 員環マクロライドであるツラスロマイシンを挙げ、エンドトキシン活性を抑制する機序の一端を明らかにしたことは臨床薬理的に極めて興味深い。以上のように牛の臨床現場でも応用可能な血糖値を用いた予後診断の解明からエンドトキシンモデルを用いた実験室レベルの研究まで多岐に渡り牛の呼吸器疾患の病態を解明していることは評価に値する。また、そのほとんどの章において論文公表を行っていることから、研究の妥当性も客観的に担保されている。

### 学位論文の一部を公表した論文

- 1) 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.
- 2) 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.

その他の論文 英語：主著 0、共著 6 ( J. Vet. Med. Sci. 計 6 編 )

以上のことから、西 康暢 氏は、博士(獣医学)の学位を授与されるに十分な資格を有すると審査員一同は認めた。

## 2 最終試験の結果

審査委員 4 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2020年 2月10日

### 審査委員

主査	教授	鈴木	一由
副査	教授	寺岡	宏樹
副査	教授	上野	博史
副査	准教授	大塚	浩通