

血液中ジアミノオキシダーゼ活性値を客観的指標として用いた

下痢症子ウシに対する抗菌薬代替療法の評価法の検討

福田 達也

血液中ジアミノオキシダーゼ活性値を客観的指標として用いた

下痢症子ウシに対する抗菌薬代替療法の評価法の検討

酪農学園大学大学院

獣医学研究科

獣医学専攻博士課程

福田 達也

生産動物外科学

指導教員 教授 鈴木 一由

2020 年度

目 次

緒言	・ ・ ・ 1
第1章 下痢症子ウシにおける血液中 DAO 活性値の低下と 重症度との関係性の調査	・ ・ ・ 7
1.1 黒毛和種子ウシにおける下痢と 血清 DAO 活性値の関係	・ ・ ・ 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 ホルスタイン下痢症子ウシにおける血漿 DAO 活性値と 腸粘膜障害の程度の検証	・ ・ ・ 12
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	・ ・ ・ 16
第2章 生後日齢および血液中 Cu 濃度が血液中 DAO 活性値に 与える影響	・ ・ ・ 26
2.1 黒毛和種健全子ウシにおける血清 DAO 活性値と 血漿 Cu 濃度の生後日齢による変化	・ ・ ・ 28
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	下痢症子ウシにおける血清 DAO 活性値に対する 血漿 Cu 濃度の影響	・・・ 31
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	・・・ 35
第3章	血清中 DAO 活性値を指標とした下痢症子牛に対する抗菌薬療法の 代替療法としてのプロバイオティクス療法の評価	・・・ 39
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	・・・ 47
総括		・・・ 54
謝辞		・・・ 61
利益相反		・・・ 63
引用文献		・・・ 64
略語一覧		・・・ 78

成績の公表	・ ・ ・ 80
和文要旨	・ ・ ・ 82
英文要旨	・ ・ ・ 84

緒言

子ウシの下痢症は、肉用および乳用子ウシにおいて最も一般的にみられる疾病であり、今日でも畜産業に与える経済的損失の主な原因である。例えば、米国の酪農場における調査では、子ウシの死亡原因の50%以上が下痢症によるものと報告されている[83]。また、ノルウェーでは下痢症に関連した子ウシの死亡に伴う経済的損失はおよそ1,000万ドルであることが報告されている[66]。我が国の実情に目を向けると、農林水産省による2017年度家畜共済統計表[61]では子ウシの死亡および廃用頭数は9,294頭、病傷事故は226,274件にも昇り、我が国においても諸外国と同様に子ウシの下痢症による経済的損失が高い。

子ウシの下痢症はその原因により、感染性または非感染性に分類されるが[6、37、64]、その治療においては非感染性であっても抗菌薬による治療が従前から行われている[18、19、71]。しかしながら、下痢症の原因が細菌ではない場合、抗菌薬は原因療法とはなり得ない。実際、子ウシの下痢症の原因を調査した研究ではその多くがウイルスや非感染性であり必ずしも抗菌薬の適用を裏付けるものではない[7、12、38、41、53、87]。Ortmanら[65]は、90日齢以下のすべての下痢症子ウシに対して原因や症状に関わらず抗菌薬を処方した群の方が、抗菌薬の処方を全身症状の有無で決定した群よりも死亡率が高かったことを報告した。Constableは彼が著したレビュー[19]の中でこのOrtmanら[65]の報告を引用し、食欲、活力および体温が正常で脱水が認められず、肺炎や臍静脈炎などの合併症がない下痢症子ウシに対して抗菌薬を処方することは推奨できないと明記している。また、子ウシの下痢症に対する抗菌薬の処方が死亡率の増加および治療期間の延長を招いたとする報告[9、15、65]や抗菌薬の処方の有無が治療期間に影響しなかったとする報告[53]もあり、子ウシの下痢症に対する抗菌薬の処方については議

論の余地がある。これらの議論とは別に、抗菌薬の使用において我々が最も注意すべきこととして、薬剤耐性（AMR）の問題が挙げられる。近年、抗菌薬の不適切な使用は AMR の出現に寄与することから重大な公衆衛生上の脅威となっている[81]。獣医療における抗菌薬の使用および AMR の発生が、ヒトの病原菌に対し影響を与えている十分な根拠は必ずしも示されていない。しかしながら、動物からヒトへの AMR の伝播は重要な懸念事項となっている[49、73、85]。国際獣疫事務局（OIE）により 2003 年に「獣医療における動物用抗菌薬の責任ある慎重使用」が定められた[63]。それを受けて我が国においても 2016 年に「薬剤耐性対策アクション・プラン（2016-2020）」が発出され[46]、獣医療における抗菌薬の減量および代替戦略が求められている[17、23、26、75、77]。

下痢症の治療における抗菌薬の代替療法としては、「宿主に有用な作用を発揮する生きた微生物」であるプロバイオティクス[31]、「大腸内の特定の細菌の増殖および活性を選択的に変化させることより宿主に有利な影響を与えて宿主の健康を改善する難消化性食品成分」であるプレバイオティクス[32]、その両者を併用するシンバイオティクス[32]、ハーブの混合物と抽出物を含む製剤[16、62]およびラクトフェリン[67]など、実に様々な物質および製剤が提案されている。しかしながら、各物質および製剤の処方が発症予防や治療効果を示唆する報告[16、19、62、67]はあっても、現状ではプロバイオティクス療法を推奨する明確な根拠はない[19]。また、他の抗菌薬代替候補物質についても効果的な治療プログラムを科学的に証明するものは未だ存在しない[77]。下痢症に対する抗菌薬の有効性について未だに議論の余地があり、かつ抗菌薬の使用を減らすための代替療法が国際レベルで求められているにも

関わらず生産動物の臨床現場において下痢症に対する抗菌薬治療の代替療法は浸透しているとは言い難い。その理由として、上述のように未だ有効な代替療法が科学的根拠、例えば治療や治療日数の短縮など主観的評価に加えバイオマーカーなど客観的指標に基づいた判断に至っていないことが原因と推察できる。すなわち、これまでに報告された下痢症子ウシの抗菌薬による治療法や代替療法に関する研究では、その治療効果を死亡率、治療期間および糞便スコアなどの主観的な指標を使用して評価されてきた[19、21、22、67]。しかしながら、子ウシの下痢症は感染性や非感染性を問わず腸粘膜に炎症[47、55]と重度の絨毛萎縮[34、60]が引き起こされることで発症する。また、抗菌薬の代替療法の一つとして提唱されているプロバイオティクス製剤は、腸粘膜に作用し腸管粘膜組織の発育促進、特に絨毛組織を充実させるものである[84、88]。しかしながら、それら腸粘膜の状態を反映する客観的な指標を用いた治療効果の評価は難しく現状では主観的な評価で行われているため、正当な評価がなされているとは言い難い。したがって、抗菌薬の代替療法の有効性を評価するためには腸粘膜の状態を反映する客観的な指標を用いる必要がある。しかしながら、ヒトではいくつかの指標が確立しているとしても、下痢による子ウシの腸粘膜障害を評価するための有用なバイオマーカーについては未だ確立されていない。

近年、ヒト医療において腸絨毛の状態を反映する客観的な指標としてジアミンオキシダーゼ(DAO)に着目した臨床研究が報告されている[36]。DAOは1930年にヒスタミン酸化還元酵素として最初に報告[10]された銅(Cu)含有細胞質酵素であり、小腸でのヒスタミンの分解に重要な役割を果たしている[44]。DAOは腸粘膜の主に上部絨毛領域に局在し、その活性は小腸で高く[11]、特に小腸の絨毛の粘膜上皮細胞に

において細胞増殖の制御に深く関与している[86]。血漿 DAO 活性値は、腸粘膜の成熟度および完全性と正の相関があり[86]、小腸の絨毛で生成された DAO は、血中に放出された直後に肝臓で代謝される。よって、血液中 DAO 活性値は小腸の絨毛の状態をリアルタイムに反映するバイオマーカーである[13]。Luk ら[51]は腸粘膜損傷の増加に伴い、腸粘膜の漸進的な減少が生じると血漿 DAO 活性値が低下することを明らかにした。このように血液中 DAO 活性値は、ヒトにおいて小腸粘膜の健全性と成熟度を反映することが報告されており、腸の萎縮、虚血および炎症などを伴うさまざまな腸疾患に対するバイオマーカーとして広く認知されている[3、54、58、80、82]。しかしながら、我々の知る限りウシの腸粘膜の状態と血液中 DAO 活性値との関係を明らかにした報告はないため、ウシにおいてもヒト[3、54、58、80、82]と同様に血液中 DAO 活性値が腸粘膜の状態を反映する客観的な指標として利用可能か否かは明らかとなっていない。

そこで、本研究の主たる目的は血液中 DAO 活性値を利用して抗菌薬の代替療法の客観的評価が可能であるか否かを明らかにすることとした。そのために、(1) 下痢症ウシにおける血液中 DAO 活性値の低下と重症度との関係を評価し、(2) 健常ウシの日齢が血液中 DAO 活性値に与える影響と、下痢症が血液中 DAO 活性値および血液中 Cu 濃度に与える影響を調査した。その結果、血液中 DAO 活性値がウシにおいても腸粘膜の状態を反映する客観的な指標として利用可能であることを明らかにした後に、(3) 血液中 DAO 活性値を客観的指標として加えることで抗菌薬代替療法の優位性を示せるか否か検証した。

詳述すると、第 1 章では自然発生の下痢症ウシを用い、下痢症と血液中 DAO 活性値との関係について調査した。すなわち、第 1 章第 1

節では黒毛和種下痢症および健常子ウシを用い、血液中 DAO 活性値が下痢症の影響を受けてヒト[3、54、58、80、82]と同様に低下するか否か調査した。また、血液中 DAO 活性値の低下が下痢症の重症度を反映するか否かは不明であるため、第 1 章第 2 節では下痢症子ウシの重症度を糞便性状および血液 pH を基に分類し、血液中 DAO 活性値の低下が下痢症の重症度を反映しているか否かを検討した。第 2 章では、日齢と血液中 Cu 濃度が血液中 DAO 活性値に影響を与える可能性があるため、その影響の程度を評価した。すなわち、第 2 章第 1 節では黒毛和種健常子ウシを用い、血液中 DAO 活性値および血液中 Cu 濃度の出生後の日齢変化を調査した。第 2 章第 2 節では、第 1 節において明らかとした日齢変化の影響が少ない日齢の黒毛和種下痢症子ウシを用いて、血液中 Cu 濃度が血液中 DAO 活性値に与える影響を評価した。第 3 章では、第 1 章および第 2 章の結果を受けて、下痢症治療における抗菌薬の代替療法としてのプロバイオティクス療法の有効性を従前の主観的指標（治療日数、治癒率および糞便スコアなど）に血液中 DAO 活性値を客観的指標として加えることでプロバイオティクス療法の優位性を示せるか否かを検証した。

本研究は、生産動物の臨床現場において重要な疾患の一つと位置付けられている子ウシ下痢症に対して抗菌薬の代替療法が求められている社会的情勢を鑑み、それを従前の主観的評価に加えて腸粘膜の状態を反映する血液中 DAO 活性値を客観的指標として加味することでこれまで曖昧であった代替候補物質の適正な評価方法を構築し、「食の安全・安心」および AMR 対策の両者に貢献するものである。

第 1 章

下痢症子ウシにおける血液中 DAO 活性値の低下と 重症度との関係性の調査

本章は、血液中 DAO 活性値がヒト[3、54、58、80、82]と同様にウシにおいても腸粘膜の状態を反映するバイオマーカーとなり得るか否かを明らかにすることを目的とした。第 1 節では、黒毛和種下痢症子ウシの血液中 DAO 活性値を健常子ウシのそれと比較し、下痢症によって血液中 DAO 活性値が低下するか否かを調査した。また第 2 節ではホルスタイン種子ウシを用い血液中 DAO 活性値が下痢症の重症度を反映しているか否かについての検証を行った。

1.1 黒毛和種子ウシにおける下痢と血清 DAO 活性値の関係

本節は、黒毛和種下痢症および健常子ウシを用い、血清 DAO 活性値が下痢症の影響を受けてヒト[3、54、58、80、82]と同様に低下するか否かを調査した。

1.1.1 材料および方法

本研究は、National Research Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals [59]に従って実施した。供試牛として宮城県内で飼育されている平均 10.9 ± 3.1 日齢の黒毛和種子ウシ 64 頭を用いた。このうち下痢を主訴に宮城県農業共済組合の家畜診療センターに診療依頼のあった 25 頭を下痢群とした。これらの子ウシは、発熱($>39.5^{\circ}\text{C}$)、吸乳反射の低下および眼球陥没などの所見は認められず、下痢を呈している以外に臨床上的異常は確認されなかった。下痢群と同一管内で飼育され臨床上的異常を認めない残りの 39 頭を対照群とした。すべての子ウシは、母牛と共に独房で飼育され自由に哺乳が可能であった。また、乾草と水は自由採食とした。

初診時の糞便性状を、Heath ら[34]のスコアリングシステム（0：正常便、1：軟便、2：泥状便、3：水様便）により評価した。また、糞便ストリップ試験（Tetrastrips、Bio-X Diagnostics S.A.、Rochefort、ベルギー）により 4 種の病原体（ロタウイルス、コロナウイルス、*Cryptosporidium parvum* および K99 *Escherichia coli*）による感染の有無を確認した。血液サンプルはディスポーザブル注射器を用いて頸静脈から採血し、10 ml の真空血清分離用採血管（Venoject II、TERUMO、東京）に保存した。採血後、室温において常法に従い $1,500\times g$ 、15 分間遠心分離して血清サンプルを得た。血清サンプルは測定に供するまで -20°C で保存した。血清 DAO 活性値は市販の Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（ELISA）キット（Bovine Diamine Oxidase ELISA kit、My BioSource、San Diego、カリフォルニア州、米国）を用いて測定した。血清総コレステロール（T-Cho）濃度、血液尿素窒素（BUN）濃度、血清アスパラギン酸トランスアミナーゼ（AST）値、血清 γ -グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）値および血清トリグリセリド（TG）濃度を生化学自動分析装置（Dade Behring Inc.、Deerfield、イリノイ州、米国）を用いて測定した。血清総タンパク質（TP）および血清アルブミン（Alb）濃度は、それぞれ Biuret 法および Bromocresol Green 法により測定した。

1.1.2 統計解析

得られたデータは、平均値±標準偏差（SD）または中央値（最小-最大）で示した。すべての統計解析は、市販の統計ソフト（SPSS Statistics23、IBM、Armonk、ニューヨーク州、米国）を用いて行った。群間における血清 DAO 活性値および血清生化学検査項目の平均値の差の比較は、 F

検定で分散を評価した後に等分散であれば Student'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、下痢症に関連する因子を明らかにする目的で群間差が認められた血液検査項目を説明変数、下痢の有無を目的変数とした二項ロジスティック回帰分析を行った。さらに二項ロジスティック回帰分析により抽出された測定値を用いて、下痢症の診断能を Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析により評価した。*J* インデックスに基づいて理想的カットオフ値およびそれに対応した感度および特異度をそれぞれ算出した [4、57]。*J* インデックスとは ROC 曲線と対角線の距離と定義され、 $J = \text{maximum} (\text{sensitivity} + \text{specificity} - 1)$ により算出される。*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 [4、57]。すべての統計学的解析は危険率 5% 未満を有意差ありとした ($p < 0.05$)。

1.1.3 結果

下痢群と対照群の糞便スコアの中央値はそれぞれ 2 (1-3) および 0 (0-0) であった。病原微生物の検出状況は下痢群の 24% (6/25 頭) からロタウイルスが検出されたが、その他の病原微生物は下痢群および対照群で検出されなかった。下痢群と対照群の血清 DAO 活性値および血清生化学検査値の結果を表 1.1.1 に要約した。下痢群の血清 DAO 活性値は 71.9 ± 16.0 IU/ml であり、対照群の 170.2 ± 78.8 IU/ml と比較して有意に低値を示した ($p < 0.01$)。同様に下痢群の T-cho 濃度 (96.4 ± 36.5 vs 125.3 ± 34.1 mg/dl、 $p < 0.01$)、AST 値 (46.88 ± 9.8 vs 55.0 ± 10.4 IU/l、 $p < 0.01$) および TG 濃度 (16.2 ± 13.9 vs 32.1 ± 18.6 mg/dl、 $p < 0.01$) は対照群のそれらと比較して有意に低値を示した。その他の測定項目について有意な差は認められなかった。

対照群に対して下痢群で有意に低値を示した血清 DAO 活性値、T-Chol 濃度、AST 値および TG 濃度を説明変数、下痢の有無を目的変数とした二項ロジスティック回帰分析の結果を表 1.1.2 に示した。その結果、下痢発症に関連する測定値として血清 DAO 活性値[オッズ比 0.94、95%信頼区間 0.908-0.976 ($p=0.001$)]のみが抽出された。さらに下痢症の診断能を ROC 解析により評価したところ血清 DAO 活性値の ROC 曲線下面積 (AUC) は 0.93 ($p<0.001$ 、図 1.1.1) であった。J インデックスに基づく血清 DAO 活性値の理想的カットオフ値は <107.23 IU/ml であり、このカットオフ値における感度および特異度はそれぞれ 84.6% および 100.0% であった。

1.1.4 考察

本研究では黒毛和種下痢症および健常子ウシを用い、血清 DAO 活性値が下痢症の影響を受けてヒト[3、54、58、80、82]と同様に低下するか否かを調査した。その結果、血清 DAO 活性値および血清生化学検査項目のうち T-cho 濃度、AST 値および TG 濃度が下痢症子ウシにおいて有意に低値を示した。群間差の認められたこれらの項目について、診断能を二項ロジスティック回帰分析および ROC 解析により評価した結果、血清 DAO 活性値が最も信頼できるパラメーターであった。

これらの結果から、血清 DAO 活性値は下痢症により低下すること、また、今回測定した項目の中で下痢の影響を最も受けて値が低下することを明らかにした。以上のことから、血清 DAO 活性値は下痢に対する診断能が高いことを確認した。したがって、血清 DAO 活性値はヒト[3、54、58、80、82]と同様に子ウシにおいても下痢により低下すること、下痢症の診断マーカーとして有用であることを明らかにした。

1.2 ホルスタイン種下痢症子ウシにおける血漿 DAO 活性値と腸粘膜障害の程度の検証

第 1 節において子ウシの血清 DAO 活性値はヒトのそれと同様[3、54、58、80、82]に子ウシでも有意に低下することを示すとともに、血液中 DAO 活性値が下痢に対する診断能を有することを明らかとした。したがって、血液中 DAO 活性値が下痢のバイオマーカーとして利用できる可能性が示唆された。しかしながら、血液中 DAO 活性値が下痢症の重症度、すなわち腸粘膜の状態を反映するか否かは不明である。したがって、第 2 節では下痢症子ウシの重症度を糞便性状および血液 pH を基に分類し、血漿 DAO 活性値の低下が腸粘膜の状態を反映しているか否かを検証した。

1.2.1 材料および方法

本研究は酪農学園大学動物実験委員会の承認（承認番号：VH18C9）を得て実施した。平均日齢 11.2 ± 5.4 日のホルスタイン種子ウシ 50 頭を供試した。すべての子ウシの糞便性状を Heine ら[35]の方法（0：正常便、1：軟便、2：泥状便、3：水様便）に基づきスコア化し、そして血液 pH[43]を加味して図 1.2.1 に示した手順で重症度分類した。すなわち、水様性下痢（スコア 3）および血液 pH が 7.25 未満の重度アシデミアのどちらか一方または両方が認められた 17 頭の子ウシを重症群に分類した。また、軟便または泥状便（スコア 1 または 2）を呈しており血液 pH が 7.25 以上の軽度のアシデミアが認められた 19 頭の子ウシを軽症群に分類した。すべての子ウシは *C. parvum* 迅速検査キット（BOX-BIOK-155-10TEST、COSMO BIO Co., Ltd.、東京）により *C. parvum* 感

染の有無を確認した。さらに、下痢症子ウシと同じ酪農場で飼育されていた下痢を含む臨床症状に異常を認めず *C. parvum* の感染が認められなかった 14 頭の子ウシを対照群とした。重症群、軽症群および対照群を問わずすべての子ウシは出生後十分に初乳が給与され、この研究が行われるまでの病歴はなかった。供試牛には、朝（午前 5 時～午前 8 時）と午後（午後 5 時～午後 8 時）の 1 日 2 回、体重あたり 5% 量に相当する代用乳が給与された。また、乾草と水は自由採食とした。試験期間中に濃厚飼料の給与は行われなかった。

血液サンプルは、ヘパリン添加 1ml ディスポーザブルシリンジおよびヘパリン非添加 10ml ディスポーザブルシリンジを用いて頸静脈から採血して得た。採血は、哺乳後少なくとも 2 時間以上経過した後に行った。ヘパリン添加血液サンプルは、ポータブル血液ガス分析装置 i-STAT 1 (Abbott Lab、Princeton、イリノイ州、米国) とその i-STAT EC8 +カートリッジ (Abbott Lab、Princeton、イリノイ州、米国) を用いて、血液 pH および血液中グルコース (Glu) 濃度を測定した。ヘパリン非添加血液サンプルは EDTA-2K 真空採血管および血清分離用真空採血管 (Venoject II、TERUMO、東京) に分注し、室温において常法に従い 1,500 ×g、15 分間遠心分離してそれぞれ血漿および血清を得た。得られた血漿は市販の ELISA キット (Bovine Diamine Oxidase ELISA kit、My BioSource、San Diego、カリフォルニア州、米国) を用いて血漿 DAO 活性値を測定した。血清サンプルは TP 濃度 (Biuret 法) および T-Cho 濃度 (酵素法) を測定した。

1.2.2 統計解析

正規分布データは平均値 ± 標準偏差 (SD) として示し、非正規分布

データ（糞便スコア、血液 pH および血漿 DAO 活性値）は中央値および範囲として示した。すべての統計解析は、R（The R Foundation for Statistical Computing、Vienna、オーストリア）のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR（自治医科大学附属さいたま医療センター、埼玉）を使用して行った[42]。群間の平均値の差の比較には Steel-Dwass 検定を用いた。血漿 DAO 活性値と糞便スコアとの相関を評価するために Spearman の順位相関係数を用いた。危険率 5% 未満を有意差ありとした ($p<0.05$)。

1.2.3 結果

各群における *C. parvum* の感染状況は、重症群で 76.4%（13/17 頭）および軽症群で 68.4%（13/19 頭）であった。表 1.2.1 に各群の糞便スコアと血液 pH を要約した。重症群、軽症群および対照群の糞便スコアは、それぞれ 3（1-3）、2（1-2）および 0（0-0）であった。糞便スコアは群設定因子であることから、重症および軽症群の方が対照群よりも有意に高く ($p<0.01$)、重症群の糞便スコアは軽症群よりも有意に高い ($p<0.05$) ことを確認した。同様に血液 pH も群設定因子であり、その基準値を 7.25 とした。実際に重症群、軽症群および対照群の血液 pH は、それぞれ 7.21（6.83-7.40）、7.38（7.27-7.45）および 7.42（7.38-7.44）であり、重症群の血液 pH は、軽症群 ($p<0.01$) および対照群 ($p<0.01$) のそれよりも有意に低く、軽症群の血液 pH は、対照群のそれよりも有意に低いことを確認した ($p<0.05$)。

各群の TP 濃度、T-Cho 濃度、血液中 Glu 濃度および血漿 DAO 活性値を表 1.2.2 に要約した。重症群、軽症群および対照群の TP 濃度はそれぞれ、 5.9 ± 1.3 、 5.7 ± 1.0 および 5.7 ± 0.5 g/dl であり、各群間に有意

差は認められなかった。重症群、軽症群および対照群の T-Cho 濃度は、それぞれ 41.7 ± 21.1 、 60.9 ± 22.6 および 66.3 ± 31.0 mg/dl であった。統計学的に有意でなかったものの、重症群の T-Cho 濃度は軽症群 ($p=0.09$) および対照群 ($p=0.07$) のそれよりも低値を示す傾向が認められた。重症群および軽症群の血液中 Glu 濃度は、それぞれ 84.6 ± 16.7 ($p<0.01$) および 90.0 ± 17.2 g/dl ($p<0.05$) であり、対照群の 104.4 ± 12.4 g/dl よりも有意に低値を示した。

図 1.2.1 に下痢症の重症度と血漿 DAO 活性値の関係を図示した。重症群、軽症群および対照群の血漿 DAO 活性値は、それぞれ 95.4 (23.5-196.0)、 146.7 (86.8-246.0) および 293.2 (130.7-444.9) IU/ml であった。血漿 DAO 活性値は重症群 ($p<0.01$) と軽症群 ($p<0.01$) で対照群のそれよりも有意に低値を示した。さらに、重症群の血漿 DAO 活性値は軽症群のそれと比較して有意に低値を示した ($p<0.05$)。血漿 DAO 活性値と糞便スコアの間を Spearman の順位相関係数によって調査したところ、血漿 DAO 活性値と糞便スコアとの間に弱いながら負の相関が認められた ($r=-0.55$ 、 $p<0.01$ 、図 1.2.2)。

1.2.4 考察

本研究において子ウシ下痢症の重症度を糞便性状[35]および血液 pH[43]に基づいて重症度を分類し、血漿 DAO 活性値が下痢の重症度を反映するか否かを検討した。下痢症は分泌性または吸収不良性下痢の分類[8]や病原体に関わらず、子ウシの電解質と水分の喪失を引き起こす。その結果、子ウシは脱水症、強イオン性アシドーシス、電解質異常および負のエネルギーバランス (NEB) に陥ることは周知のことである[76]。Lorenz[50]は、アシドーシスの子ウシでは D 型乳酸濃度が増加す

ることを報告している。D型乳酸の産生は絨毛の萎縮や、腸内細菌による炭水化物の吸収不良と異常発酵に起因する[8]。本研究ではD型乳酸濃度の測定を行ってはいないがこれらの既報を鑑み、重症群および軽症群の分類基準に糞便性状のみならず血液 pH を加味したことは適切であったと考えられる。

本研究では、血漿 DAO 活性値は重症度の違いによって有意な差が認められた。確かに血液中 DAO 活性値は腎障害の影響を受けるため[20]、子ウシ下痢症では重度の脱水症による腎機能障害が血液中 DAO 活性値に影響を与える可能性は否定できない。しかし本研究では TP 濃度を指標に脱水症の有無を評価したところ、脱水を疑わせる所見は得られていない。したがって、本研究で用いた供試牛において血漿 DAO 活性値の変化に腎機能が影響している可能性は考えにくい。また、下痢症子ウシの血漿 DAO 活性値と糞便スコアとの関係において有意な負の相関が認められた。つまり我々の結果は血漿 DAO 活性値が、子ウシにおいてもヒト[3、54、58、80、82]と同様に腸粘膜の状態を反映することを示唆している[54、80]。さらに本研究で確認された重症群の血液中 Glu 濃度および T-Cho 濃度の低下は、腸管からの栄養素の吸収不良を疑わせる所見であり、子ウシにおいて血漿 DAO 活性値の低下が腸粘膜の損傷を反映する結果を支持するものと考えられる。

1.3 小括

第1章では、血液中 DAO 活性値がヒト[3、54、58、80、82]と同様にウシにおいても腸粘膜の状態を反映するバイオマーカーとなり得るかを明らかにすることを目的とした。第1節では黒毛和種下痢症および健常子ウシを用い、血清 DAO 活性値が下痢症の影響を受けてヒト

[3、54、58、80、82]と同様に低下するか否かを調査した。その結果、血清 DAO 活性値は T-cho 濃度、AST 値および TG 濃度と共に下痢により影響を受ける。しかし、二項ロジスティック回帰分析および ROC 解析を用いて評価した結果、血清 DAO 活性値が最も信頼できるパラメーターであった。よって、血清 DAO 活性値は下痢症により低下することおよび下痢に対する診断能が高いことを確認した。したがって、血清 DAO 活性値はヒト [3、54、58、80、82]と同様に子ウシにおいても下痢により低下すること、下痢症の診断マーカーとして有用であることを明らかにした。

第1節の結果を受け、第2節では子ウシ下痢症の重症度を糞便性状および血液 pH に基づいて分類し、血漿 DAO 活性値の低下が下痢の重症度と関連しているか否かを調査した。その結果、血漿 DAO 活性値と下痢の重症度との間に相関が認められた。このことはウシにおいてもヒトと同様に下痢の重症度、おそらく腸粘膜の障害の程度を血漿 DAO 活性値が反映していることが明らかとなった。以上の結果から、第1章では血液中 DAO 活性値は下痢症子ウシの腸粘膜の状態および病態を反映するバイオマーカーとなり得ることを明らかにした。

しかしながら、ラットでは成長に伴って血液中 DAO 活性値が増加することが報告されており [51]、子ウシにおいても血液中 DAO 活性値が日齢により変化する可能性が否めない。また、DAO は Cu 含有酵素であることからウシの Cu 欠乏症で低値を示すことが報告されている [68]。したがって、子ウシでも血液中 Cu 濃度と血液中 DAO 活性値の関係を明らかにする必要がある。よって、第2章では日齢および血液中 Cu 濃度が下痢症子ウシの血液中 DAO 活性値に影響を与えるか否かについて検討する。

表 1.1.1 下痢群および対照群における血清 DAO 活性値および血液生化学検査結果

	下痢群 (n=25)	対照群 (n=39)
DAO (IU/dl)	71.9 ± 16.0**	170.20 ± 78.80
T-cho (mg/dl)	96.4 ± 36.5**	125.30 ± 34.10
BUN (mg/dl)	17.0 ± 6.70	13.30 ± 7.60
TP (g/dl)	6.3 ± 0.70	6.40 ± 0.90
Alb (g/dl)	3.1 ± 0.30	3.10 ± 0.30
AST (IU/l)	46.9 ± 9.8**	55.00 ± 10.40
GGT (IU/l)	130.9 ± 108.30	165.30 ± 151.90
TG (mg/dl)	16.2 ± 13.9**	32.10 ± 18.60

平均±標準偏差 (SD)

** $p < 0.01$ vs 対照群 (Student's t 検定)

表 1.1.2 ロジスティック回帰分析の要約

	オッズ比	95%信頼区間		<i>p</i> 値	
DAO	0.942	0.908	-	0.976	0.001
T-cho	0.985	0.959	-	1.010	0.249
AST	0.985	0.878	-	1.110	0.802
TG	0.972	0.917	-	1.030	0.339

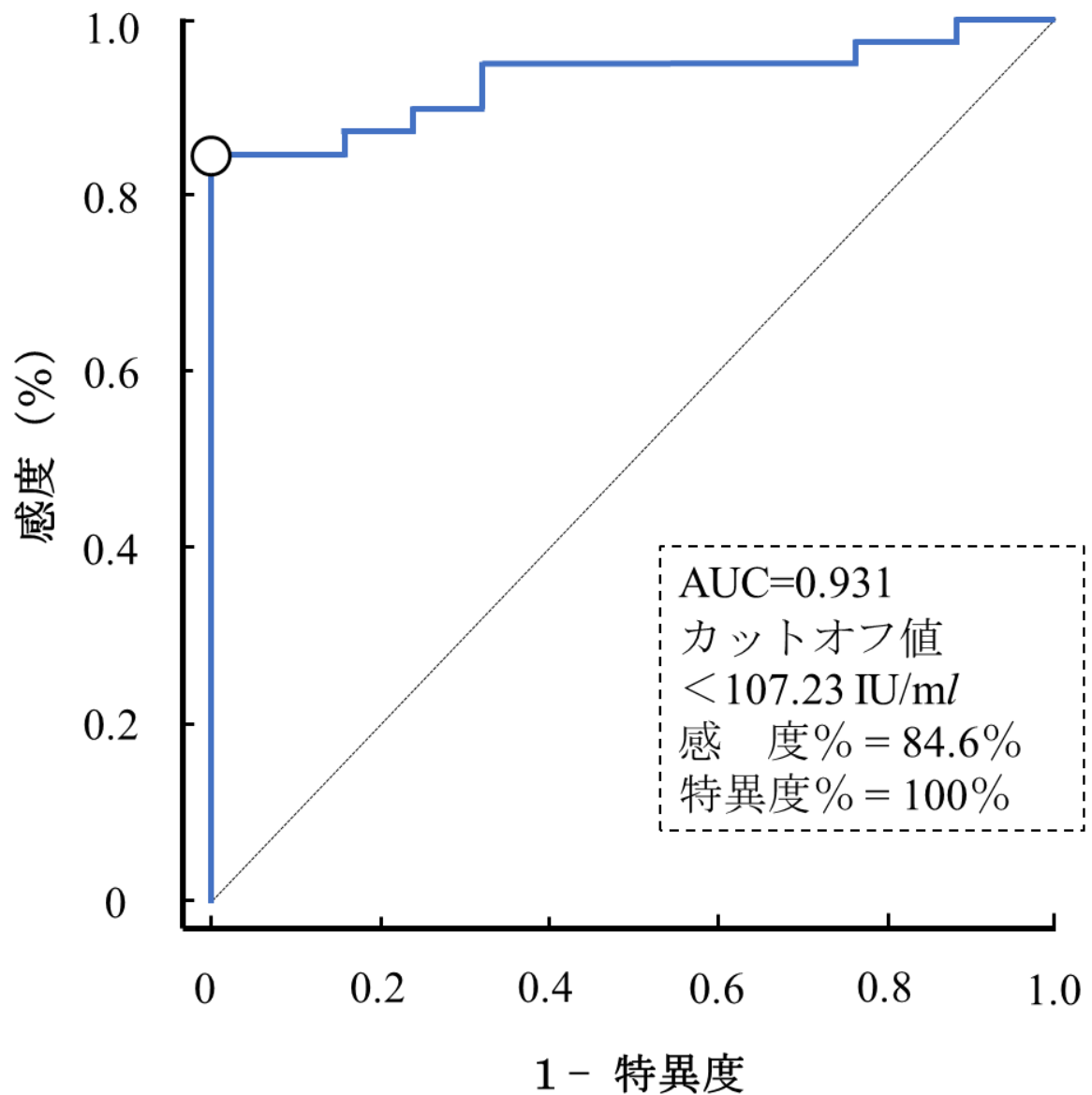


図 1.1.1 ROC 解析による血清 DAO 活性値の下痢症診断のカットオフ値

○ : 理想的カットオフ値 (J インデックス)

$p < 0.001$

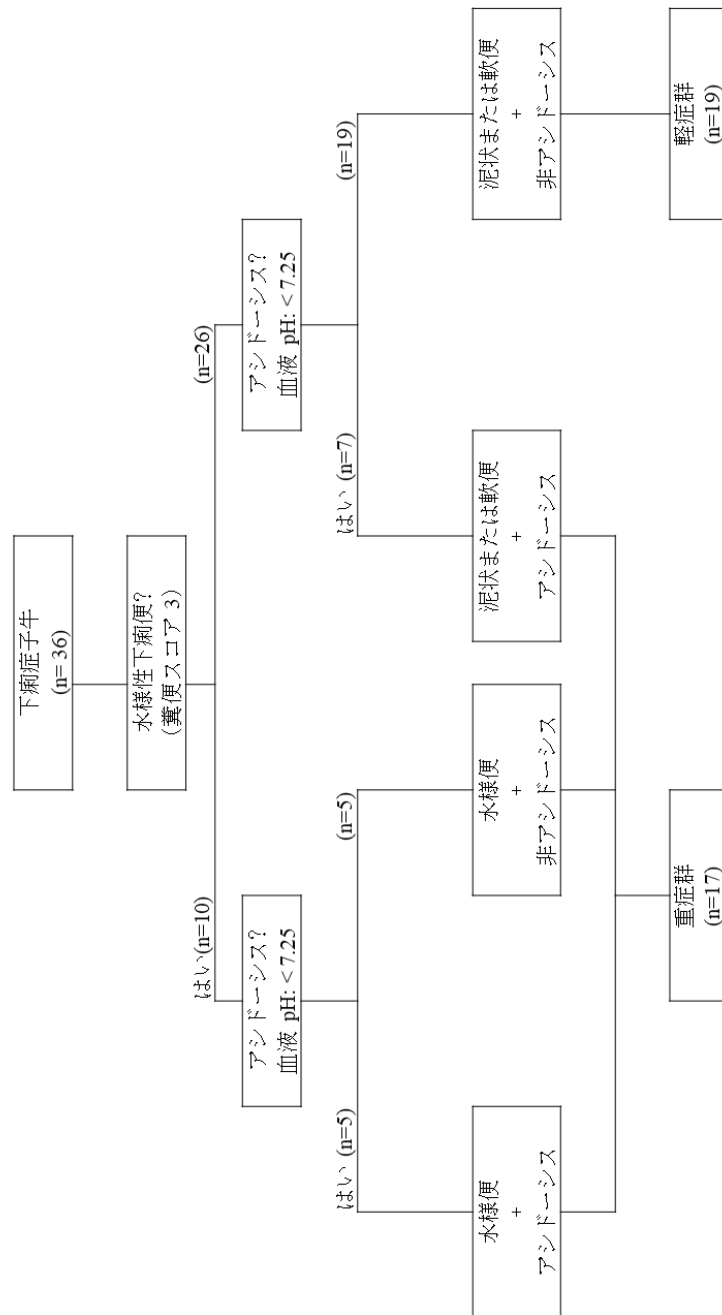


図 1.2.1 糞便性状および血液 pH による重症群および軽症群の分類

水様性下痢（スコア 3）を示した 10 頭および泥状または軟便（スコア 2）を示した 26 頭のうちのアシドーシスを伴う 7 頭が重症群に分類した。軟便（スコア 2）を示しアシドーシスを伴わない 19 頭の子牛は、軽症群に分類した。

表 1.2.1 重症度分類による各群の糞便スコアおよび血液 pH

	対照群 (n=14)	軽症群 (n=19)	重症群 (n=17)
糞便スコア	0 (0-0) ^A	2 (1-2) ^{C, D}	3 (1-3) ^{C, E}
血液 pH	7.42 (7.38-7.44) ^A	7.38 (7.27-7.45) ^{B, D}	7.21 (6.83-7.40) ^{C, F}

中央値 (最大-最小)

異符号間に有意差あり: $p < 0.05$, A-C, D-F: $p < 0.01$: Steel- Dwass 検定

表 1.2.2 重症度分類による各群の血液生化学検査および血漿 DAO 活性値の比較

	対照群 (n=14)	軽症群 (n=19)	重症群 (n=17)
TP (g/dl)	5.7 ± 0.5	5.7 ± 1.0	5.9 ± 1.3
T-cho (mg/dl)	66.3 ± 31.0	60.9 ± 22.6	41.7 ± 21.1
Glu (mg/dl)	104.4 ± 12.4 ^A	90.0 ± 17.2 ^B	84.6 ± 16.7 ^C
DAO (IU/ml)	293.2 (130.7-444.9) ^A	146.7 (86.8-246.0) ^{C, D}	95.4 (23.5-196.0) ^{C, E}

平均値 ± 標準偏差 または 中央値 (最小-最大)

異符号間に有意差あり A-B, D-E: $p < 0.05$, A-C, D-F: $p < 0.01$: Steel- Dwass検定

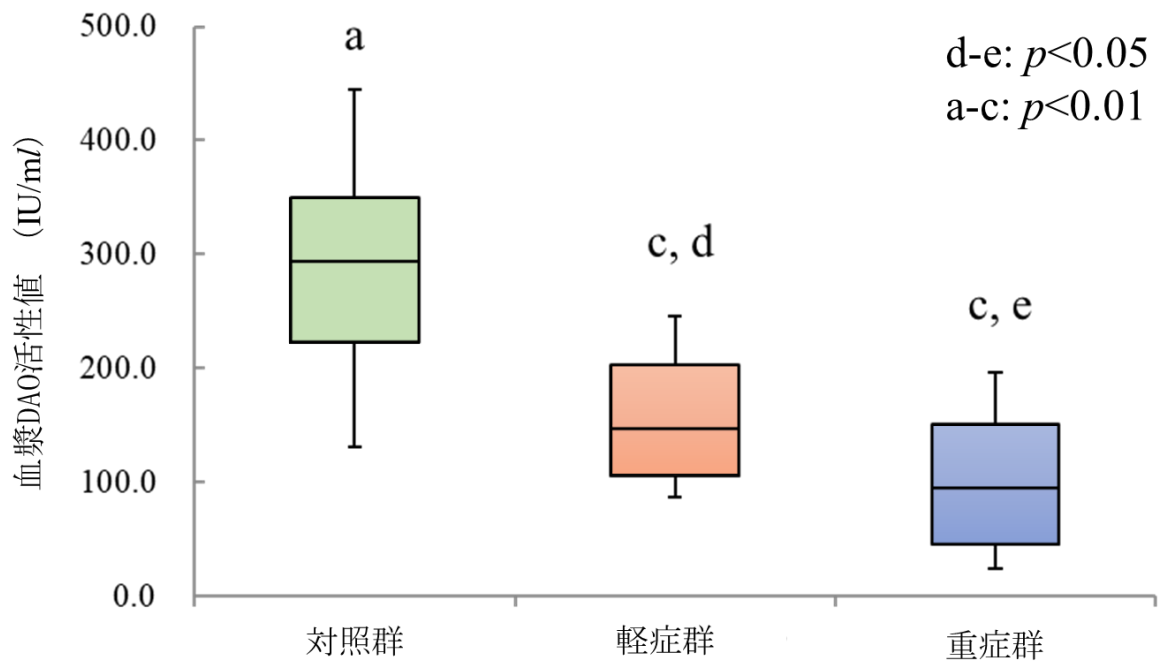


図 1.2.2 重症度分類における各群の血漿 DAO 活性値の比較

対照群 (n=14)、軽症群 (n=19)、重症群 (n=17)

Box は四分位範囲で中の太線は中央値を示す。

異符号間で有意差あり : a-c: $p<0.01$,d-e: $p<0.05$:steel-Dwass 検定

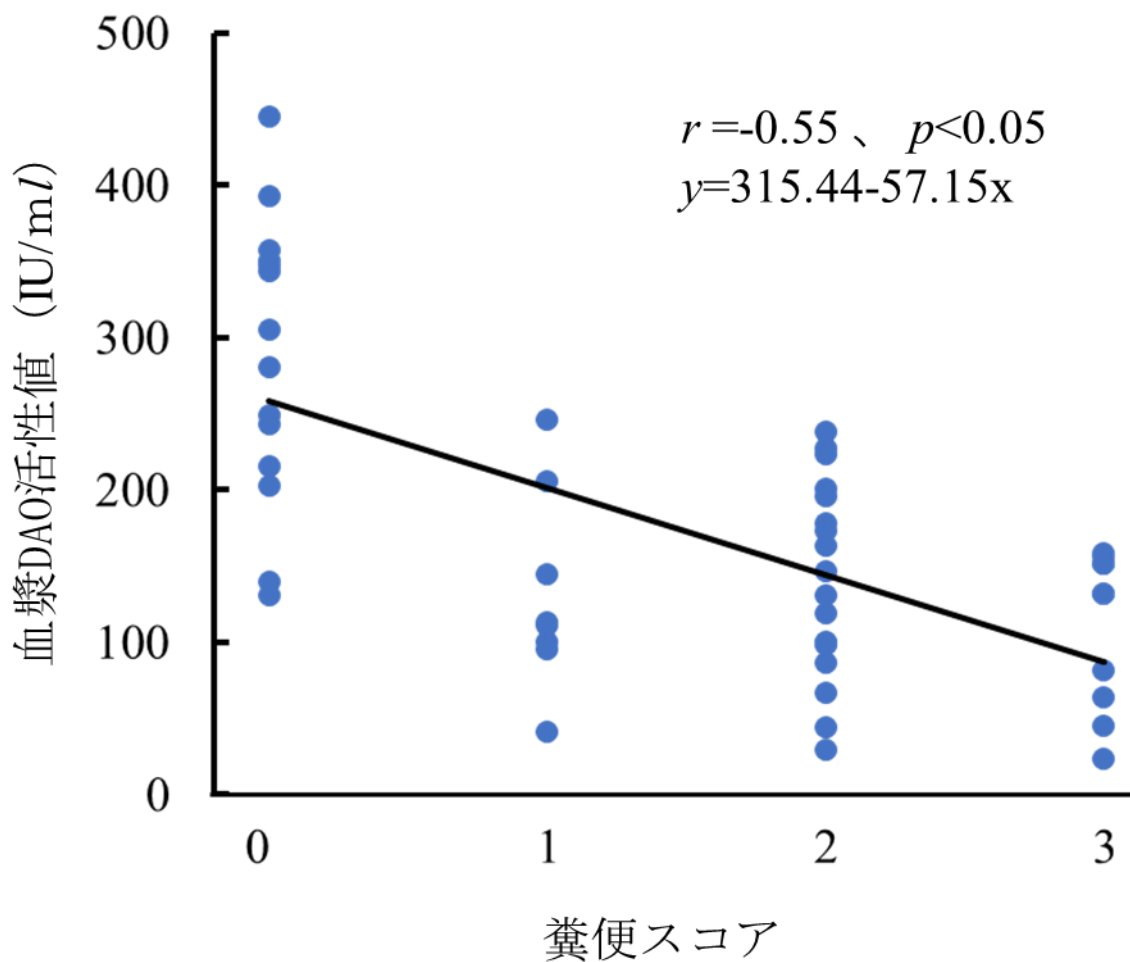


図 1.2.3 下痢症および健常子ウシにおける血漿 DAO 活性値と糞便スコアの関係

供試数 n=50

糞便スコア 0：正常便、1：軟便、2：泥状便、3：水様便

図中の直線は糞便スコアに対する血漿 DAO 活性値の相関直線

(Spearman の順位相関係数)

第 2 章

生後日齢および血液中 Cu 濃度が血液中 DAO 活性値に与える影響

第1章において、血液中 DAO 活性値は子ウシの下痢症における腸粘膜の状態を反映するバイオマーカーとして利用できることを明らかとした。しかしながら、ラットでは成長に伴って血液中 DAO 活性値が増加することが報告されており[51]、子ウシにおいても日齢により変化する可能性は否めない。また、DAO は Cu 含有酵素であるため、ヒトやウシにおける Cu 欠乏症のバイオマーカーとしても有用であることが報告されている[20、40、45、68]。例えばウシでは、実験的に作出した食餌性 Cu 欠乏症のウシにおいて血漿 DAO 活性値が Cu 欠乏の程度に応じて低下し、Cu 欠乏症のウシと基準値内のウシとを効率的に診断可能であったと報告されている[68]。それゆえに、子ウシの下痢症によって Cu 欠乏状態が生じているならば血液中 DAO 活性値の低下が下痢症によるものか Cu 欠乏によるものかが不明となる。下痢症子ウシの腸粘膜の状態を反映するバイオマーカーとして血液中 DAO 活性値を利用するためには、生後日齢による血液中 DAO 活性値および血液中 Cu 濃度の変化、下痢症によって子ウシに Cu 欠乏状態が生じているか否かおよび下痢症子ウシにおける血液中 Cu 濃度と血液中 DAO 活性値との関係について調査する必要がある。

そこで、第2章第1節では黒毛和種健常子ウシを用い、血清 DAO 活性値および血漿 Cu 濃度の出生後の日齢変化を調査した。第2節では、第1節において明らかとした日齢変化の影響の少ない日齢の黒毛和種下痢症子ウシを用いて下痢症によって子ウシに Cu 欠乏状態が生じているか否かを調査し、血漿 Cu 濃度が血清 DAO 活性値に与える影響を評価した。

2.1 黒毛和種健常子ウシにおける血清 DAO 活性値と血漿 Cu 濃度の生後日齢による変化

血液中 DAO 活性値はラットにおいて出生後から生後 21 日齢まで上昇し、その後安定して推移することが報告されている[51]。また、ウシでは血液中 DAO 活性値が Cu 欠乏症の指標として有用であることが報告されている[68]。しかしながら、ウシにおいて血液中 DAO 活性値が出生後に変化をするか否かについての報告は著者が知る限りない。そこで、本章では黒毛和種健常子ウシを用い、子ウシの血液中 DAO 活性値および血液中 Cu 濃度の日齢変化を調査し検討した。

2.1.1 材料および方法

本研究は、酪農学園大学動物実験委員会の承認（承認番号：VH18C9）を得て実施した。本研究の供試牛として、宮城県内で飼育されていた 2（n=8）、7（n=10）、10（n=12）、14（n=7）、21（n=10）および 180（n=11）日齢の健康な黒毛和種子ウシ計 58 頭を用いた。子ウシは 21 日齢まで母牛と共に独房で飼育されたため自由哺乳が可能であった。それ以降は母牛から分離され離乳されていた。また、乾草と水は自由採食とした。

血液サンプルは滅菌済みディスプレイ注射器を用いて頸静脈から 20 ml 採血し、直ちに 10 ml の血清分離用真空採血管とヘパリン処理された採血管（Venoject II、TERUMO、東京）にそれぞれ保存した。次に、採取した血液サンプルは室温において常法に従い 1,500×g で 15 分間遠心分離して血清または血漿を得た。血清または血漿サンプルは、測定に供されるまで -20℃ で保存した。血清 DAO 活性値は市販の ELISA

キット（Bovine DAO ELISA kit、My BioSource Inc.、San Diego、カリフォルニア州、米国）を用いて測定した。血漿 Cu 濃度は仁科記念サイクロトロンセンター（岩手県）において粒子励起 X 線分析（PIXE: Particle Induced X-ray Emission）法により測定した。PIXE 法による Cu 濃度の検出下限は血漿レベルで 10^{-5} $\mu\text{g/ml}$ であった[5、79]。

2.1.2 統計解析

得られたデータは平均±標準偏差（SD）で示した。すべての統計解析は、R（The R Foundation for Statistical Computing、Vienna、オーストリア）のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR（自治医科大学付属さいたま医療センター、埼玉）を用いて行った[42]。生後日齢の血清 DAO 活性値と血漿 Cu 濃度の変化は、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 Kruskal-Wallis 検定または Tukey の HSD 検定により平均値の差の比較を行った。出生後各日の血漿 Cu 濃度と血清 DAO 活性値との間の相関は、Pearson の相関係数を用いて評価した。危険率 5%未満を有意差ありとした ($p<0.05$)。

2.1.3 結果

出生後日齢による血清 DAO 活性値と血漿 Cu 濃度の経時的変化を図 2.1.1 に示した。血清 DAO 活性値は 2 日齢で最高値の 388.7 ± 75.1 IU/ml に達し、その後 7 日齢 (180.0 ± 70.6 IU/ml、 $p<0.01$ vs 2 日齢) から 180 日齢 (130.6 ± 71.9 IU/ml、 $p<0.01$ vs 2 日齢) まで安定して低値を推移した。

出生後の血漿 Cu 濃度の推移は血清 DAO 活性値とは異なり、2 日齢で最も低く (0.32 ± 0.03 $\mu\text{g/ml}$)、7 日齢 (0.54 ± 0.13 $\mu\text{g/ml}$ 、 $p<0.05$ vs 2

日齢) から 180 日齢 ($0.58 \pm 0.13 \mu\text{g/ml}$ 、 $p < 0.01$ vs 2 日齢) まで安定して高値を推移した。各生後日齢において、血清 DAO 活性値と血漿 Cu 濃度の間に有意な相関関係は認められなかった。

2.1.4 考察

本研究において、子ウシの血清 DAO 活性値は 7 日齢以降で安定することが明らかとなった。Luk ら [51] は、ラットの血液中 DAO 活性値は出生時に低く、日齢とともに徐々に増加し 21 日齢でピークに達した後は安定することを報告している。これは、生後最初の 3 週間で陰窩が伸長し、その後細胞増殖が増加、絨毛が長くなり、スクラーゼ、マルターゼおよび他の刷子縁酵素を持つ成熟粘膜細胞が現れるためである。一方、出生直後の子ウシの腸細胞は、免疫細胞を含む多数の高分子をピノサイトーシスによって非選択的に吸収する独自の能力を持っている [14]。この高分子吸収は、生後約 24~36 時間まで認められ、gut closure と呼ばれている [78]。本研究では、子ウシの血清 DAO 活性値の日齢変化がラットのそれと異なるか否かは明らかにならなかったが、上述の様なウシ特有の腸の変化を反映している可能性がある。今後、gut closure と血液中 DAO 活性値がどの様に関連しているのか研究が望まれる。一方、血漿 Cu 濃度は血清 DAO 活性値の日齢変化と異なった。しかしながら、各日齢において血清 DAO 活性値と血漿 Cu 濃度に有意な相関は認められなかった。本研究の結果より血漿 Cu 濃度の増加は成長に伴い腸管からの吸収量が増加したものと考えられた。日齢変化に伴う血漿 Cu 濃度と血清 DAO 活性値に関連性が認められなかったことから、子ウシにおける血液中 DAO 活性値は 7 日齢以降であれば、日齢を考慮する必要がないことが明らかとなった。

2.2 下痢症子ウシにおける血清 DAO 活性値に対する血漿 Cu 濃度の影響

第 1 節において、健常子ウシの血清 DAO 活性値は生後 7 日齢以降に安定したことから、7 日齢以降であれば日齢を考慮する必要がないことが明らかとなった。しかしながら、ウシでは血液中 DAO 活性値が Cu 欠乏症の指標として有用である [68] ことから、下痢症子ウシの血漿 Cu 濃度が低値となるならば血液中 DAO 活性値に影響が生じる可能性が否定できない。そこで、第 2 節では 7 日齢以降の子ウシを用い、下痢症子ウシにおける血清 DAO 活性値および血漿 Cu 濃度を測定し、血漿 Cu 濃度が血清 DAO 活性値に何らかの影響を及ぼすか否かについて検討した。

2.2.1 材料および方法

本研究は、酪農学園大学動物実験委員会の承認（承認番号：VH18C9）を得て実施した。本研究では、宮城県内で飼育され宮城県農業共済組合の家畜診療センターに下痢症を主訴として診療依頼のあった生後 10～15 日齢の黒毛和種子ウシ 14 頭（平均日齢 11.9 ± 1.4 日）を下痢群として供試した。これらの子ウシは下痢以外の臨床症状に異常を認めなかった。すなわち、 39.5°C 以上の発熱、吸乳反射の低下または眼球陥没などの臨床症状は認められなかった。一方、対照群として黒毛和種健常子ウシ 19 頭（平均日齢 12.6 ± 1.6 日）を供試した。子ウシは母牛と共に独房で飼育されたため自由哺乳が可能であり、乾草と水を自由採食できた。

本研究では供試牛の糞便性状を Heath ら [34] のスコアリングシステム（0：正常便、1：軟便、2 泥状便、3：水様便）を用いて記録した。

また、糞便ストリップ試験 (Tetrastrips、Bio-X Diagnostics S.A.、Rochefort、ベルギー) を用いて 4 種の病原体 (ロタウイルス、コロナウイルス、*C. parvum* および K99 *E. coli*) の感染の有無を確認した。

血液サンプルはディスプレイザブル注射器を用いて頸静脈から 20 ml 採血した。採血後、すぐに 10 ml の血清分離用真空採血管とヘパリン処理された真空採血管 (Venoject II、TERUMO、東京) にそれぞれ保存した。次に、採取した血液サンプルを室温において常法に従い $1,500 \times g$ で 15 分間遠心分離して、血清または血漿を得た。血清または血漿サンプルは、測定に供されるまで -20°C で保存した。血清 DAO 活性値は、市販の ELISA キット (Bovine DAO ELISA kit、My BioSource Inc.、San Diego、カリフォルニア州、米国) によって測定した。血漿 Cu 濃度は、仁科記念サイクロترونセンター (岩手県) において PIXE 法によって測定した。さらに、下痢群および対照群の AST 値および GGT 値は、自動生化学分析装置 (Dade Behring、Inc.、Deerfield、イリノイ州、米国) を用いて酵素法にて測定した。

2.2.1 統計解析

得られたデータは平均±標準偏差 (SD) または中央値 (最小-最大) で示した。すべての統計解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing、Vienna、オーストリア) のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター、埼玉) を用いて行った [42]。群間における血清 DAO 活性値、血漿 Cu 濃度および血液生化学検査値の平均値の比較は、分散を評価した後 Student's t 検定または Mann-Whitney U 検定によって評価した。危険率 5% 未満を有意差ありとした ($p < 0.05$)。

2.2.3 結果

下痢および対照群の糞便スコアの中央値は、それぞれ 2 (2-3) および 0 (0-0) であった。糞便ストリップ試験の結果、下痢群において 28.6% (4/14 頭) の子ウシよりロタウイルスが検出されたが 71.4% (10/14 頭) の子ウシの下痢便からは検査したいずれの病原体も検出されなかった。

下痢群および対照群の血清 DAO 活性値および血漿 Cu 濃度を図 2.2.1 に示した。下痢群の血清 DAO 活性値 [62.36 (50.27-107.23) IU/ml] は、対照群 [133.68 (58.11-361.16) IU/ml] のそれと比較して有意に低値を示した ($p < 0.01$)。一方、血漿 Cu 濃度は下痢および対照群で、それぞれ 0.53 (0.21-0.77) および 0.53 (0.31-0.96) $\mu\text{g/ml}$ であり、群間に有意な差を認めなかった ($p = 0.74$)。

下痢および対照群の AST 値は、それぞれ 46.3 ± 10.3 および 59.5 ± 9.5 IU/l であり両群間で有意差が認められた ($p < 0.01$)。しかしながら、これらの値は基準値内であったため [29]、疾病による影響とは言えない。下痢および対照群における GGT 値は、それぞれ 109.4 ± 44.0 および 167.8 ± 115.0 IU/l であり、両群間に有意な差は認められなかった ($p = 0.18$)。

2.2.4 考察

本研究において、下痢群の血清 DAO 活性値は対照群のそれよりも有意に低値を示した。一方、血漿 Cu 濃度は両群間で差を認めず、すべての子ウシで Legleiter [48] が示した基準値の下限である $< 0.50 \mu\text{g/ml}$ よりも低値を呈した個体は認められなかった。この結果は Javad ら [39] による、下痢症子ウシの臨床症例では血漿 Cu 濃度がほとんど変化しなかったという報告を裏付けている。

本研究では、ロタウイルス感染が4頭で認められたが残る10頭は本研究で用いた病原検索ではいずれも陰性であったため非感染性下痢症と診断した。ロタウイルス感染 ($n=4$) または非感染子ウシ ($n=10$) の血清 DAO 活性値はそれぞれ 66.15 ± 10.62 および 67.02 ± 16.14 IU/ml であり、有意な差は認められなかった ($p=0.923$)。ロタウイルスは、成熟した絨毛性腸細胞を優先的に標的とし、一般的に中程度の絨毛損傷を引き起こす[25]。しかしながら、血清 DAO 活性値において、ロタウイルス陽性および陰性子ウシの間で有意な差は観察されなかった ($p=0.923$)。Acres ら[2]は、ロタウイルスが健康な下痢の子ウシにおいても検出されたと報告している。本研究の下痢群には病原体が検出された個体はほとんどいなかったため、病原体の違いや浸透圧性または吸収不良性などの下痢症の種類によって血清 DAO 活性値が変化するか否かを明らかにすることはできなかった。しかしながら、本研究ではロタウイルス検出の有無により血清 DAO 活性値に差が認められなかったことから、病原体の検出が常に重症度と相関しているとは限らないものと推察できる。

肝機能は血液中 DAO 活性値の変化に影響を与える[13]ため、本研究では肝機能との関係についても調査を行った。下痢および対照群の AST 値は、両群間で有意な差が認められたが ($p<0.001$)、これらの値は基準値内であった[29]。また、GGT 値に群間差は確認されなかった ($p=0.18$)。したがって、本研究における血清 DAO 活性値に対する肝機能の影響は考慮しなくてよいと思われた。

以上のことから、急性下痢の存在は血漿 Cu 濃度に影響を与えず血清 DAO 活性値を低下させる。すなわち、野外条件下の自然発生下痢症子ウシにおいて血清 DAO 活性値は血漿 Cu 濃度を考慮せず、腸粘膜の状

態を反映するバイオマーカーとして利用可能であることが明らかとなった。

2.3 小括

第1節では、黒毛和種健常子ウシを用い、子ウシの血液中 DAO 活性値および血液中 Cu 濃度の日齢変化を調査し検討した。その結果、血清 DAO 活性値は7日齢以降で安定し、血漿 Cu 濃度による影響は認められなかった。したがって、子ウシにおける血液中 DAO 活性値は7日齢以降であれば、日齢を考慮する必要がないことが明らかとなった。

第2節では、7日齢以降の黒毛和種下痢症子ウシを用い、下痢症子ウシにおける血清 DAO 活性値および血漿 Cu 濃度を測定し、血漿 Cu 濃度が血清 DAO 活性値に何らかの影響を及ぼすか否かを検討した。その結果、血清 DAO 活性値は下痢群において有意な低下が認められたが、血漿 Cu 濃度は両群間に有意な差は認められなかった。本研究ではすべての子ウシが血漿 Cu 濃度の基準値を満たしており、Cu 欠乏は認められなかった。以上のことから、急性下痢における血清 DAO 活性値は血漿 Cu 濃度の影響を考慮することなく、腸粘膜の状態を評価するバイオマーカーとして利用可能であることが明らかとなった。

第1章および第2章において、ヒトで腸粘膜の損傷程度を反映するバイオマーカーとして利用されている血液中 DAO 活性値がウシにおいても利用可能であることが明らかとなった。このことは、これまで治療日数、治療率および糞便スコアなどの主観的指標でしか評価できなかった下痢症の治療効果を血液中 DAO 活性値により評価できる可能性を示した。しかしながら、実際に抗菌薬の代替療法の有効性試験において血液中 DAO 活性値を指標として利用することが適正であるか否かは検

証されていない。そこで、第 3 章では下痢症治療における抗菌薬の代替療法としてのプロバイオティクス療法の有効性を従前の主観的指標（治療日数、治癒率および糞便スコア）に血液中 DAO 活性値を客観的指標として加えることでプロバイオティクス療法の優位性を示せるか否か検証した。

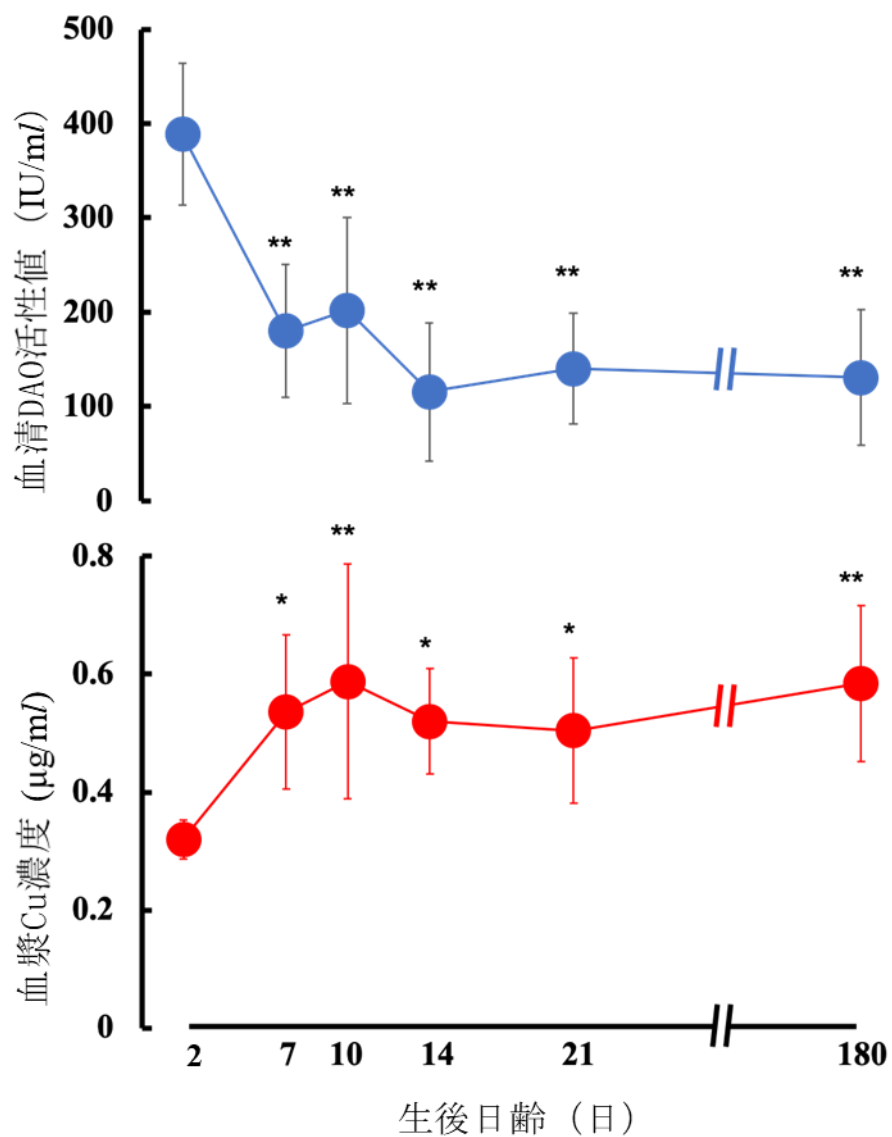


図 2.1.1 生後日齢に対する血清 DAO 活性値および血漿 Cu 濃度の推移
 平均値 ±SD、*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ vs 2 日齢: Tukey の HSD 検定

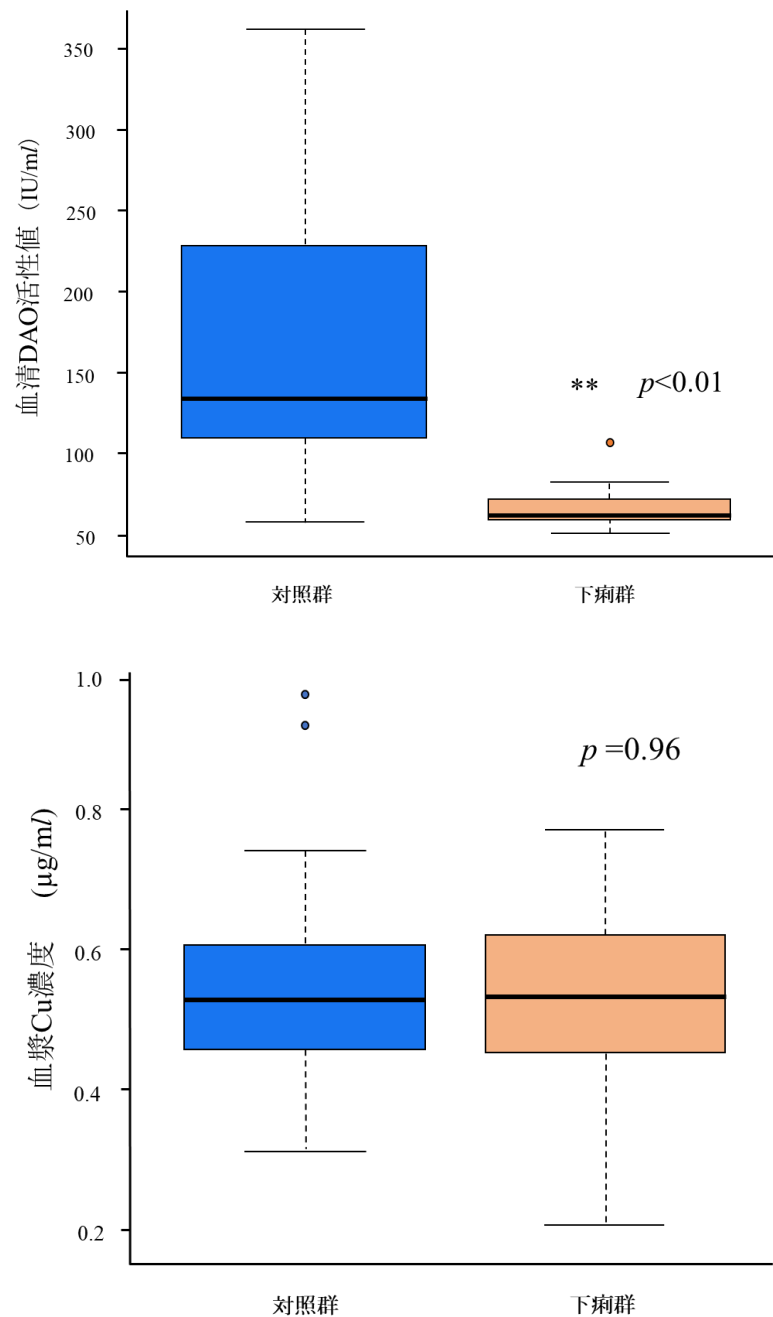


図 2.2.1 対照群および下痢群の血清 DAO 活性値および血漿 Cu 濃度の比較

対照群 n=19、下痢群 n=14

Box は四分位範囲で中の太線は中央値を示す

** : $p < 0.01$ vs 対照群 : Mann-Whitney U 検定

第 3 章

血清 DAO 活性値を指標とした下痢症子ウシに対する抗菌薬療法の
代替療法としてのプロバイオティクス療法の評価

第1章および第2章において血液中 DAO 活性値が下痢症子ウシの腸粘膜の状態を反映する客観的指標として有用であることを示した。したがって、本章では下痢症治療における抗菌薬の代替療法としてのプロバイオティクス療法の有効性を従前の主観的指標（治療日数、治癒率および糞便スコア）に血液中 DAO 活性値を客観的指標として加えることでプロバイオティクス療法の優位性を示せるか否か検証した。

抗菌薬療法の代替療法には現時点では種々の製剤が提唱されているが[77]、そのうちのひとつであるプロバイオティクスは「宿主に有用な作用を発揮する生きた微生物」と定義され[31]、家畜においては主に消化機能改善や成長促進を目的に処方されている[56、89]。我が国においては、下痢症に対する効能を取得した動物用医薬品としてプロバイオティクス製剤が市販されているので、本研究では抗菌薬療法の代替療法としてプロバイオティクスを選択した。Rolf[70]は、プロバイオティクスは比較的 low cost であり AMR の発生率を増加させる可能性が低く、かつ病原体を阻害する複数のメカニズムを持つことなど、従来の抗菌薬による治療に比べて多くの潜在的な利点があることを示した。実際、プロバイオティクスの有用性は多くの研究者[1、22、24、27、72、74]によって報告されている。たとえば Renaud ら[69]は、カナダで市販されている *Pediococcus acidilactici*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* を含む多種プロバイオティクス製品を下痢症子ウシに投与したところ下痢の発症期間が短縮したことを示した。このようにプロバイオティクス製剤の評価には主観的指標が使用され評価が行われている。Hayakawa ら[33]は日本で市販されている *Bacillus mesentericus* TO-A 株、*Clostridium butyricum* TO-A 株および *Enterococcus faecalis* T-110 株を含むプロバイ

オティクス製剤の給与が、離乳子ブタの小腸の絨毛を高くし、筋層の薄化を防ぐことを明らかにした。このように、病理学的知見を客観的指標として評価することができたとしても、一般の臨床現場で用いることが可能な客観的指標によって有効性を評価したものは極めて少ない。

そこで、第 3 章では下痢症治療における抗菌薬の代替療法としてのプロバイオティクス療法の有効性を従前の主観的指標（治療日数、治癒率および糞便スコア）に血液中 DAO 活性値を客観的指標として加えることでプロバイオティクス療法の優位性を示せるか否か検証した。

3.1 材料および方法

本研究は酪農学園大学動物実験委員会の承認（承認番号：VH15C21）を得て実施した。供試動物として、2015 年 6 月から 2017 年 11 月までの間に宮城県農業共済組合の家畜診療センター管内 15 農場から下痢を主訴に診療を依頼され、 39.5°C 以上の発熱がなく下痢以外の臨床症状に異常を認めなかった黒毛和種子ウシ 22 頭を供試した。供試牛の平均日齢は 10.2 ± 2.7 日で、体重推定尺（KM 式黒毛和種子牛体重推定尺、富士平工業株式会社、東京）を用いて測定した平均体重は 45.3 ± 10.6 kg であった。これらの子ウシは診療依頼のあった順に、抗菌薬を使用して治療を行う抗菌薬群（ $n=11$ ）と市販の 3 種混合生菌剤（動物用ビオスリー、東亜薬品工業、東京）を用いて治療を行うプロバイオティクス群（ $n=11$ ）の 2 群に交互に分類した。なお、各群ともに 8 農場からの子ウシで構成された。すべての子ウシは母牛と共に独房で飼育されたため自由哺乳が可能であり、乾草と水は自由採食とした。本研究では、対照群として下痢の症状がない健康な黒毛和種子ウシ 10 頭（平均日齢 11.5 ± 0.8 日）を供試した。対照群の子ウシは、身体一般検査で異常は

認められず臨床的に正常であり下痢症子ウシと同じ地域の農場で飼育されていた。

試験期間は第 1 病日（初診）から第 8 病日までの 8 日間とし、初診時に糞便ストリップ試験（Tetrastrips、Bio-X Diagnostics S.A.、Rochefort、ベルギー）を用いて 4 種の病原体（ロタウイルス、コロナウイルス、*C. parvum* および K99 *E. coli*）の感染の有無を確認した。糞便性状は、Heath[34]らのスコアリングシステム（0：正常便、1：軟便、2：泥状便、3：水様便）により評価した。抗菌薬群における治療は、10 mg/kg のアンピシリン（水性アンピシリン注 KS、共立製薬、東京）を初診時から第 5 病日まで筋肉内投与し、第 5 病日までに治癒しない場合は第 6 病日から 8 病日まで 10 mg/kg のカナマイシン（硫酸カナマイシン注射液 250 明治、Meiji Seika ファルマ株式会社、東京）を筋肉内投与した。プロバイオティクス群には、100 g の 3 種混合生菌剤を 500 ml の水または微温湯に溶解し、カテーテルを用いて経鼻または経口投与した。3 種混合生菌剤（動物用ビオスリー、東亜薬品工業、東京）の成分および分量については表 3.1 に示した。両群に対し、抗菌薬またはプロバイオティクスの投与に加えて、10 mg/kg のメンブトン（動物用エンドコール注、Boehringer Ingelheim Japan Inc.、東京）を筋肉内投与した。その他の治療は行わず、抗菌薬またはプロバイオティクスの投与を除いて治療についてはすべて同様に扱った。治癒の判定は糞便スコアが 0 になった時点とした。治癒した症例はその時点で治療を終了し、それ以降の治療は行われなかった。加えて、本研究は各群における治療期間と第 8 病日までの治癒率の調査を合わせて行った。すなわち、本研究の主観的評価項目は糞便スコア、治療期間および第 8 病日までの治癒率とした。これらの評価は臨床獣医師が行った。

血液サンプルは第 1、3 および 8 病日にディスポーザブルシリンジを用いて頸静脈から採血した後に 10 ml の血清分離用真空採血管 (Venoject II、TERUMO、東京) に保存した。得られた血液サンプルは室温において常法に従い $1,500 \times g$ で 15 分間遠心分離して血清を得た。血清は測定に供されるまで -20°C で保存した。得られた血清を用いた血清生化学分析では、T-Cho 濃度、BUN 濃度、AST 値、GGT 値および TG 濃度を生化学自動分析装置 (Dade Behring、Inc.、Deerfield、イリノイ州、米国) を用いて酵素法により測定した。TP 濃度と Alb 濃度は、それぞれ Biuret 法と Bromocresol Green 法を用いて測定した。血清 DAO 活性値は、市販の ELISA キット (Bovine DAO ELISA kit、My BioSource Inc.、San Diego、カリフォルニア州、米国) を用いて測定した。すなわち、客観的評価項目は上述の血液生化学検査項目および血清 DAO 活性値とした。

3.2 統計解析

すべての統計解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing、Vienna、オーストリア) のグラフィカルユーザーインターフェイスである EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター、埼玉) を用いて行った [42]。正規分布データは平均 \pm 標準偏差 (SD) で、非正規分布データは中央値 (最小-最大) で示した。群間、時間ごとの糞便スコアおよび血清 DAO 活性値、血液生化学項目の経時的変化および群間差の比較には繰り返しのある二元配置分散分析を用いた。交互作用が認められた際には、第 1 病日に対する各項目の群内変動を Dunnett 検定により評価した。各サンプリングポイントにおける測定値の群間および第 1 病日に対する平均値の差は Student's *t* 検定または Mann-Whitney U 検定を

用いて評価を行った。危険率 5%未満を有意差ありとした ($p<0.05$)。

3.3 結果

両群における、初診時の糞便スコア、病原体の検出状況および治療期間を表 3.2 に要約した。試験期間中に死亡または全身症状が増悪した個体はいなかった。本研究では、ロタウイルスが抗菌薬群で 4 頭、プロバイオティクス群で 1 頭検出された。また、*C.parvum* が抗菌薬群およびプロバイオティクス群でそれぞれ 1 頭ずつ検出された。2 種以上の病原体が検出された個体は無く、コロナウイルスおよび K99 *E.coli* はすべての個体で検出されなかった。プロバイオティクス群と抗菌薬群の治療日数はそれぞれ 4 (3-8) 日および 5 (2-8) 日で、両群間に有意な差は認められなかった。同様に、プロバイオティクス群と抗菌薬群の治癒率はそれぞれ 81.8% (9/11 頭) および 90.9% (10/11 頭) で、両群間に有意な差は認められなかった。

図 3.1 に本研究における糞便スコアの推移を示した。第 1 病日のプロバイオティクス群と抗菌薬群の糞便スコアはそれぞれ 2 (2-3) および 3 (2-3) で両群間に有意な差は認められなかった。また、試験期間中において糞便スコアはいずれも両群間に有意な差は認められなかった。最終日である第 8 病日のプロバイオティクス群と抗菌薬群の糞便スコアは、それぞれ 0 (0-1) および 0 (0-3) であり、両群の糞便スコアに、有意な差は認められなかった。主観的評価項目では下痢症の改善は認められたが、両群間に差は認められずプロバイオティクスの有意性は明らかにできなかった。

治療開始時の下痢症子ウシの血清 DAO 活性値は 64.7 ± 7.7 IU/ml ($n=22$) であり、対照群から得られた基準値 153.9 ± 72.0 IU/ml よりも

有意に低値を示した ($p<0.01$)。プロバイオティクス群および抗菌薬群の血清 DAO 活性値の推移を図 3.2 に示した。第 1 病日のプロバイオティクス群および抗菌薬群の血清 DAO 活性値は、それぞれ 64.4 ± 7.2 および 64.9 ± 5.4 IU/ml であり、両群間に有意な差は認められなかった。繰り返しのある二元配置分散分析により各群の血清 DAO 活性値の経時的变化を比較したところ交互作用が確認されたが ($p<0.01$)、抗菌薬群の血清 DAO 活性値に有意な経時的变化は観察されなかった (第 8 病日: 66.3 ± 4.9 IU/ml)。プロバイオティクス群の血清 DAO 活性値は、対照群から得られた基準値 (153.9 ± 72.0 IU/ml) まで復することはなかったものの、第 8 病日の血清 DAO 活性値は 76.3 ± 5.1 IU/ml と治療開始時のそれよりも有意に高値を示した ($p<0.01$)。さらに、第 8 病日のプロバイオティクス群の血清 DAO 活性値は、抗菌薬群よりも有意に高値を示した ($p<0.01$)。

血液生化学検査の結果を表 3.3 に要約した。繰り返しのある二元配置分散分析により T-Chol 濃度、TG 濃度、BUN 濃度、TP 濃度、Alb 濃度、AST 値および GGT 値において各群における経時的变化に交互作用は認められなかった。

3.4 考察

本研究では、抗菌薬の代替療法としてのプロバイオティクス療法を従前より行われてきた主観的指標 (治療期間、治癒率および糞便スコア) および一般的な血液生化学検査項目を指標として評価しても、抗菌薬療法との治療効果の比較において同等であることは証明できても有意性にまで言及することはできなかった。この結果は、抗菌薬の代替療法の評価において推奨する根拠が無いとする過去の報告者の研究結果

[19、77]を覆すものには至らない。しかしながら、本研究では、客観的指標としての血清 DAO 活性値を加えたことで、プロバイオティクス療法の抗菌薬代替療法の優位性を明確に示すことができた。

本研究の結果を詳述すると、第 1 病日のプロバイオティクス群および抗菌薬群の血清 DAO 活性値は、それぞれ 64.4 ± 7.2 および 64.9 ± 5.4 IU/ml であった。第 1 病日では両群間に有意な差は認められなかったが、プロバイオティクス群の第 8 病日における血清 DAO 活性値は 76.3 ± 5.1 IU/ml と抗菌薬群 (66.3 ± 4.9 IU/ml) と比較して有意に高かったことから、プロバイオティクス群では腸粘膜の状態が抗菌薬療法と比較し早期に回復した可能性が示唆された。今回、K99 *E.coli* による細菌性下痢は確認されなかったが、ロタウイルスおよび *C.parvum* 感染が確認された。ロタウイルスと *C.parvum* は小腸絨毛に損傷を与え、その結果、電解質と水分の吸収が低下する（吸収不良性下痢）[25]。腸粘膜への損傷は、分泌性下痢よりも吸収不良性下痢の方が深刻であると広く認められており、これらの病原菌は子ウシに長期の下痢を引き起こす可能性があったが、プロバイオティクス群では、ロタウイルス (n=1) と *C.parvum* (n=1) が検出された子ウシは、それぞれ 3 および 7 日間の治療で治癒した。同様に、抗菌薬群において、ロタウイルス (n=4) と *C.parvum* (n=1) が検出された子ウシはそれぞれ 5 (2-7) と 5 日間で治癒した。このことは、下痢症の治療において原因微生物を特定することは有益な情報であったとしても、軽度の下痢症では病原体の検出が腸粘膜の損傷状態や病態を直接表すわけではないことを第 2 章に引き続きあらためて確認した。

血液生化学検査の結果では群間差は認められなかった。一般に、T-Cho 濃度、TG 濃度、TP 濃度、および Alb 濃度の変動は、栄養状態の改

善によるものとされている。Maldonado ら[52]は、4 種類の乳酸菌を含むプロバイオティクスを 60 日間与えられた子ウシが、栄養指標および体重が改善したことを報告したが、両群間での差は認められなかった。おそらく、プロバイオティクス療法の効果は、細菌の種類と投与期間に影響を受ける可能性があり、本試験における最長 8 日間の投与では血液生化学検査の結果に影響を及ぼすまでには至らなかったものと推察した。

本研究では、抗菌薬の代替療法としてのプロバイオティクス療法を主観的指標（治療期間、治癒率および糞便スコア）および一般的な血液生化学検査項目を指標として評価しても、抗菌薬療法との治療効果の比較において同等であることは証明できても優位性にまで言及することはできなかった。この結果は、抗菌薬の代替療法の評価において推奨する根拠が無いとする過去の報告者の研究結果[19、77]を覆すものには至らない。しかしながら、本研究では血液中 DAO 活性値を下痢症子ウシの病態評価に加えることでこれまで困難であった抗生物質代替療法の有効性評価を可能にすることができた。今後、この様な下痢症に対する抗菌薬の代替療法の有効性試験に血液中 DAO 活性値を加えることは理にかなっていると思われた。

3.5 小括

第 3 章では下痢症治療における抗菌薬の代替療法としてのプロバイオティクス療法の有効性を従前の主観的指標（治療日数、治癒率および糞便スコア）に血液中 DAO 活性値を客観的指標として加えることでプロバイオティクス療法の優位性を示せるか否か検証した。その結果、抗菌薬の代替療法としてのプロバイオティクス療法を主観的指標（治療期

間、治癒率および糞便スコア)および一般的な血液生化学検査項目を指標として評価しても、抗菌薬療法との治療効果の比較において同等であることは証明できても優位性にまで言及することはできなかったのに対して客観的指標として血清 DAO 活性値を加えることでプロバイオティクス療法の抗菌薬代替療法の優位性を明確に示すことができた。

このことは、同様に抗菌薬の代替療法を評価する臨床試験において血液中 DAO 活性値を指標に加える意義を示すものであり、子ウシ下痢症に対する抗菌薬代替療法の研究手法を明らかにしたことから、畜産界において極めて価値が高い。

表 3.1 動物用ビオスリーの組成

細菌種	含有量 (/g)
<i>Streptococcus faecalis</i> T-110	7×10 ⁶ 以上
<i>Bacillus mesentericus</i> TO-A	3×10 ⁵ 以上
<i>Clostridium butyricum</i> TO-A	2×10 ⁵ 以上

動物用ビオスリー、東亜薬品工業、東京

<http://www.toabio.co.jp/animal/livestock/product/detail/1>

表 3.2 抗菌薬群およびプロバイオティクス群における初診時の日齢、糞便スコア、病原体の検出状況および治療日数

群	個体番号	第1病日所見		糞便ストリップ試験 検出病原体			治療日数*
		日齢	糞便スコア	クリプトスポリジウム	K99 大腸菌	ロタ/コロナウイルス	
抗菌薬群	01	6	3	-	-	-	8
	02	9	2	+	-	-	5
	03	11	3	-	-	-	4
	04	21	3	-	-	-	5
	05	10	2	-	-	-	4
	06	7	3	-	-	-	4
	07	12	3	-	-	ロタ+	7
	08	5	3	-	-	ロタ+	5
	09	12	2	-	-	ロタ+	5
	10	13	2	-	-	-	4
	11	13	2	-	-	ロタ+	2
	平均値	10.8	2.5				4.8
	標準偏差	4.4	0.5				1.6
プロバイオティクス群	101	10	2	-	-	-	8
	102	7	2	+	-	-	7
	103	12	3	-	-	-	4
	104	7	3	-	-	-	3
	105	10	2	-	-	ロタ+	3
	106	11	3	-	-	-	8
	107	14	2	-	-	-	5
	108	12	2	-	-	-	4
	109	6	2	-	-	-	5
	110	5	3	-	-	-	4
	111	11	2	-	-	-	4
	平均値	9.5	2.4				5.0
	標準偏差	2.9	0.5				1.8

*糞便スコアが0になるまでの日数

表 3.3 抗菌薬群、プロバイオティクス群および対照群における血清生化学検査結果

項目	群	第1病日	第3病日	第8病日	対照群
T-cho (mg/dl)	抗菌薬群	90.7±33.0	91.7±40.6	122.1±38.5	128.5±46.6
	プロバイオティクス群	99.7±18.8	111.8±28.5	142.2±25.8	
TG (mg/dl)	抗菌薬群	18.2±19.6	19.3±14.1	30.1±15.9	27.2±20.5
	プロバイオティクス群	19.9±9.8	33.9±17.2	43.6±20.4	
BUN (mg/dl)	抗菌薬群	18.4±4.6	17.6±8.2	10.7±2.0	18.7±12.5
	プロバイオティクス群	14.4±2.8	12.4±3.9	10.4±1.7	
TP (g/dl)	抗菌薬群	6.4±0.8	6.2±0.8	6.0±0.6	6.7±0.6
	プロバイオティクス群	6.0±0.3	5.9±0.4	5.8±0.4	
Alb (g/dl)	抗菌薬群	3.0±0.2	3.0±0.3	3.2±0.4	3.2±0.3
	プロバイオティクス群	3.0±0.2	3.0±0.3	3.1±0.2	
AST (IU/l)	抗菌薬群	44.0±7.8	50.7±9.3	49.8±6.1	58.8±6.1
	プロバイオティクス群	45.2±6.7	54.1±7.7	51.0±7.5	
GGT (IU/l)	抗菌薬群	116.6±45.6	86.7±26.5	56.8±16.9	187.5±119.9
	プロバイオティクス群	156.5±96.3	118.5±65.2	77.5±40.7	

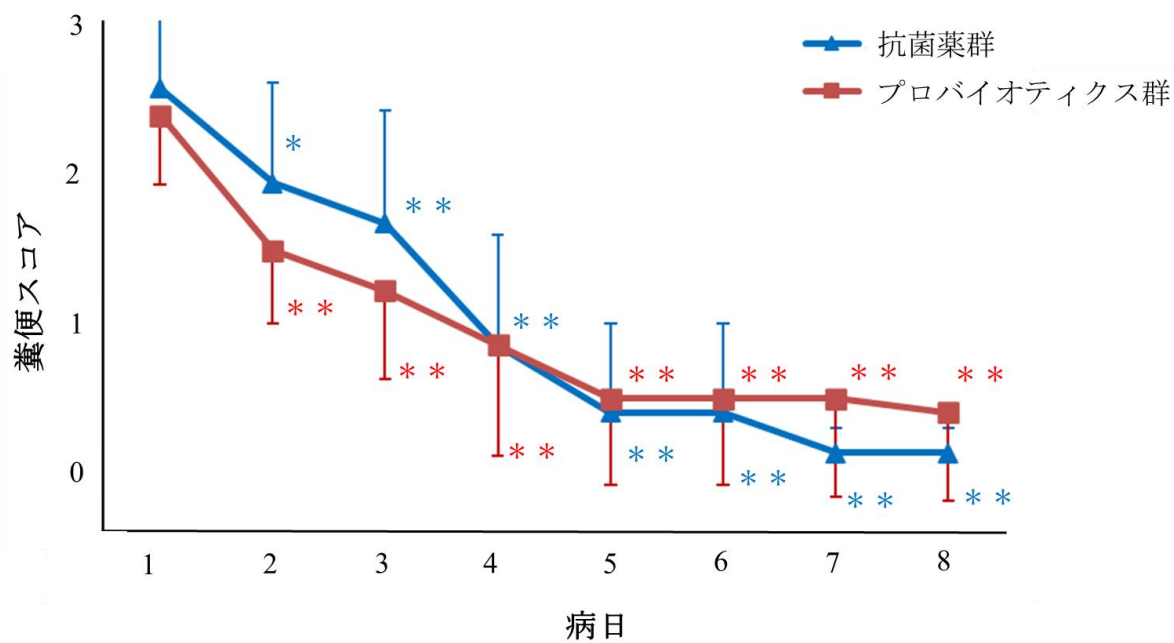


図 3.1 抗生薬群およびプロバイオティクス群の糞便スコアの推移

平均値 ± SD、抗生薬群 (▲) n=11、プロバイオティクス群 (■) n=11

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$: VS 第 1 病日: Student's t 検定

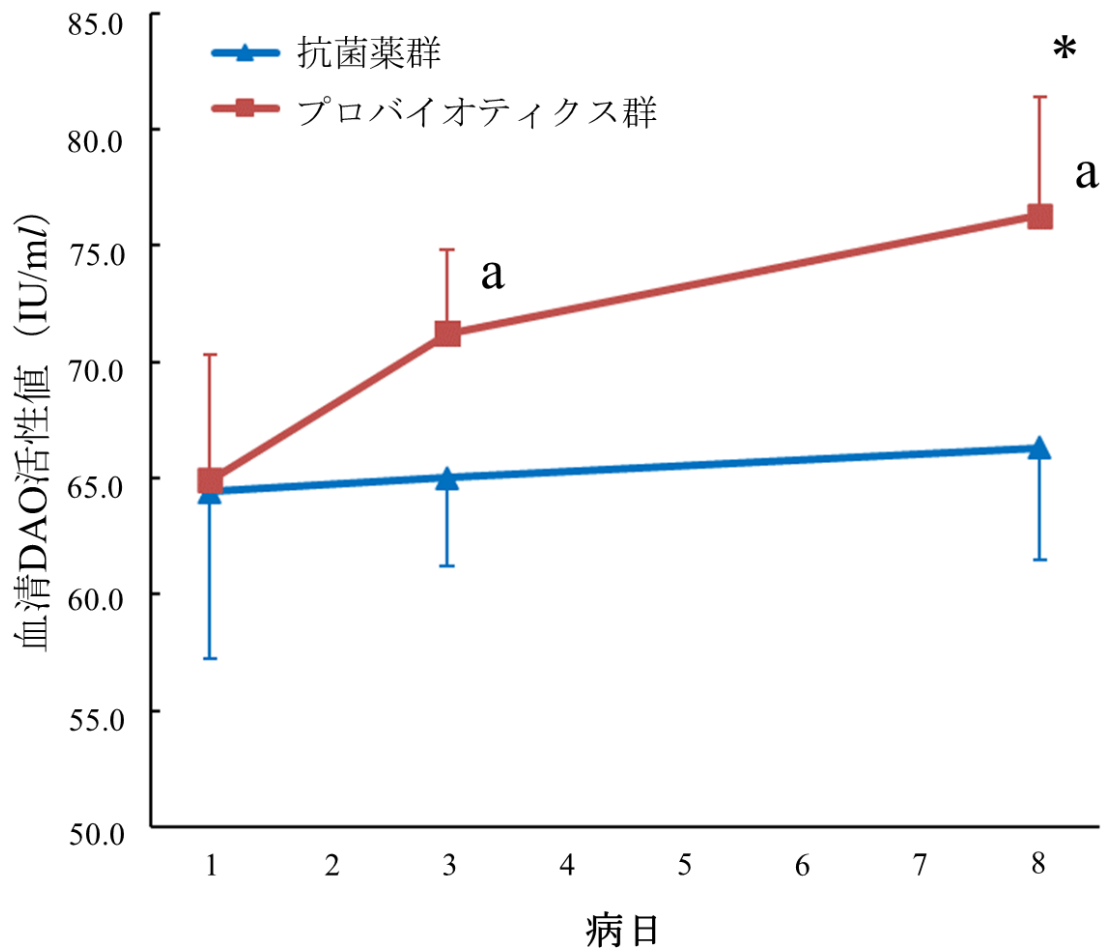


図 3.2 抗菌薬群およびプロバイオティクス群の血清 DAO 活性値の推移

平均値±SD、抗菌薬群 (▲) n=11、プロバイオティクス群 (■) n=11

* : 繰り返しのある二元配置分散分析で交互作用あり

a: 同時点で群間に有意差あり ($p < 0.01$: Student's t 検定)

総括

本研究は、はじめに子ウシの下痢症における腸絨毛の損傷や機能低下を反映するバイオマーカーとして血液中 DAO 活性値がヒトと同様にウシにおいても応用できるかを評価し、応用可能であれば市販されているプロバイオティクス製剤が抗菌薬療法の代替になり得るか否かを従前の主観的指標に血液中 DAO 活性値を客観的な指標として加えることで抗菌薬代替療法の優位性を示せるか検討した。

本研究で着目した DAO は、小腸粘膜の完全性と成熟度を反映することが報告されており、ヒトにおいて腸の萎縮、虚血、炎症などのさまざまな疾患における腸疾患のバイオマーカーとして利用されている [3、54、58、80、82]。第 1 章第 1 節では、黒毛和種下痢症および健常子ウシを用い、血清 DAO 活性値が下痢症の影響を受けてヒト [3、54、58、80、82]と同様に低下するか否か調査した。その結果、下痢群および対照群の血清 DAO 活性値はそれぞれ、 71.9 ± 16.0 および 170.2 ± 78.8 IU/ml であり、下痢群において対照群のそれと比較して有意に低値を示した ($p < 0.01$)。同様に血清生化学検査項目のうち T-cho 濃度、AST 値および TG 濃度は対照群のそれらと比較して下痢群で有意に低値を示した。これらの項目について、二項ロジスティック回帰分析および ROC 解析により評価した結果、血清 DAO 活性値が最も信頼できるパラメーターであった。よって、血清 DAO 活性値はヒト [3、54、58、80、82]と同様に子ウシにおいても下痢症により低下することおよび下痢に対する診断能が高いことを明らかにした。したがって、血清 DAO 活性値はヒト [3、54、58、80、82]と同様に子ウシにおいても下痢症のマーカーとして有用であることが明らかとなった。しかしながら、血液中 DAO 活性値の低下が重症度つまり腸粘膜の状態を反映するか否かは不明である。したがって、第 1 章第 2 節では、下痢症子ウシの重症度を糞便性状お

よび血液 pH を基に分類し、血漿 DAO 活性値の低下が重症度を反映しているか否かを調査した。その結果、血漿 DAO 活性値は重症群、軽症群および対照群でそれぞれ 95.4 (23.5-196.0)、146.7 (86.8 - 246.0) および 293.2(130.7-444.9)IU/ml であり、重症群($p<0.01$)と軽症群($p<0.01$)で対照群のそれよりも有意に低値を示した。さらに重症群は軽症群のそれと比較しても有意に低値を示した ($p<0.05$)。また、血漿 DAO 活性値と下痢の重症度に相関が認められ、ウシにおいてもヒトと同様に下痢の重症度、おそらく腸粘膜の障害の程度を反映していることが明らかとなった。このことから、第 1 章では血液中 DAO 活性値は下痢症子ウシの腸粘膜の状態および病態を反映するバイオマーカーとなり得ることを明らかとした。

血液中 DAO 活性値はラットにおいて成長に伴って増加することが報告されている[51]。しかし、ウシでも出生後の成長に伴い変化するかは不明である。また、DAO は Cu 含有酵素であるため Cu 欠乏症のバイオマーカーとしても有用であることが報告されている[2、40、45、68]。それゆえに、子ウシの下痢症によって Cu 欠乏状態が生じているならば、血液中 DAO 活性値の低下が下痢症によるものか Cu 欠乏によるものか不明となる。下痢症子ウシの腸粘膜の状態を反映するバイオマーカーとして血液中 DAO 活性値を利用するためには、生後日齢による血液中 DAO 活性値および血液中 Cu 濃度の変化、下痢症によって子ウシに Cu 欠乏状態が生じているか否か、また下痢症子ウシにおける血液中 Cu 濃度と血液中 DAO 活性値との関係について調査する必要がある。そこで、第 2 章第 1 節では黒毛和種健常子ウシを用い、血清 DAO 活性値および血漿 Cu 濃度の出生後の日齢変化を調査した。その結果、血清 DAO 活性値は 2 日齢で最高値の 388.7 ± 75.1 IU/ml に達し、その後 7 日齢

(180.0 ± 70.6 IU/ml, $p < 0.01$ vs 2 日齡) から 180 日齡 (130.6 ± 71.9 IU/ml, $p < 0.01$ vs 2 日齡) まで安定して低値を推移した。出生後の血漿 Cu 濃度の推移は血清 DAO 活性値とは異なり、2 日齡で最も低く (0.32 ± 0.03 $\mu\text{g/ml}$)、7 日齡 (0.54 ± 0.13 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0.05$ vs 2 日齡) から 180 日齡 (0.58 ± 0.13 $\mu\text{g/ml}$, $p < 0.01$ vs 2 日齡) まで安定して高値を推移した。各生後日齡において、血清 DAO 活性値と血漿 Cu 濃度の間に有意な相関関係は認められなかった。したがって、子ウシにおける血液中 DAO 活性値は 7 日齡以降であれば、日齡を考慮する必要がないことが明らかとなった。第 2 章第 2 節では、7 日齡以降の黒毛和種下痢症子ウシを用いて下痢症によって子ウシに Cu 欠乏状態が生じているか否かを調査し、血漿 Cu 濃度が血清 DAO 活性値に与える影響を評価した。その結果、下痢群の血清 DAO 活性値 (66.78 ± 14.37 IU/ml) は、対照群 (170.33 ± 97.83 IU/ml) のそれと比較して有意に低値を示した。 ($p < 0.01$)。一方、血漿 Cu 濃度は下痢および対照群で、それぞれ 0.54 ± 0.16 $\mu\text{g/ml}$ および 0.56 ± 0.17 $\mu\text{g/ml}$ であり、群間に有意な差を認めなかった ($p = 0.74$)。本研究ではすべての子ウシが血漿 Cu 濃度の基準値である $0.50 \mu\text{g/ml}$ [48] を満たしていたため、下痢と Cu 欠乏の関係は認められなかった。以上のことから、急性下痢における血清 DAO 活性値は血漿 Cu 濃度の影響を考慮することなく、腸粘膜の状態を評価するバイオマーカーとして利用可能であることが明らかとなった。

第 1 章および第 2 章において、ヒトで腸粘膜の損傷程度を反映するバイオマーカーとして利用されている血液中 DAO 活性値がウシにおいても利用可能であることが明らかとなった。このことは、これまで治療日数、治療率および糞便スコアなどの主観的指標でしか評価できなかった下痢症の治療効果を血液中 DAO 活性値により評価できる可能性を

示した。しかしながら、実際に抗菌薬の代替療法の有効性試験において血液中 DAO 活性値を指標として利用することが適正であるか否かは検証されていない。そこで、第 3 章では下痢症治療における抗菌薬の代替療法の有効性を主観的指標（治療日数、治療率および糞便スコア）に客観的指標として血清 DAO 活性値を加えて評価した。その結果、プロバイオティクス群と抗菌薬群の治療日数はそれぞれ 4 (3-8) 日と 5 (2-8) 日と群間に有意な差は認められなかった。同様に、治癒率はプロバイオティクス群で 81.8% (9/11 頭)、抗菌薬群で 90.9% (10/11 頭) であり、両群で有意な差は認められなかった。また、試験期間中において糞便スコアはいずれも両群間に有意な差は認められなかった。主観的評価項目では下痢症の改善は認められたが、両群間に差は認められずプロバイオティクスの優位性は明らかにできなかった。一方、客観的指標として用いた血清 DAO 活性値は治療開始時において下痢症子ウシでは 64.7 ± 7.7 IU/ml (n=22) と対照群から得られた基準値 153.9 ± 72.0 IU/ml よりも有意に低値を示した ($p < 0.01$)。第 1 病日のプロバイオティクス群および抗菌薬群の血清 DAO 活性値は、それぞれ 64.4 ± 7.2 および 64.9 ± 5.4 IU/ml であり、両群間に有意な差は認められなかった。しかし、治療効果を評価するために繰り返しのある二元配置分散分析により各群の血清 DAO 活性値の経時的変化を比較したところ交互作用が確認された ($p < 0.001$)。この交互作用は抗菌薬群の血清 DAO 活性値に有意な経時的変化は観察されなかったが(第 8 病日: 66.3 ± 4.9 IU/ml)、プロバイオティクス群の血清 DAO 活性値が対照群から得られた基準値 (153.9 ± 72.0 IU/ml) まで復することはなかったが、第 8 病日で 76.3 ± 5.1 IU/ml と治療開始時のそれよりも有意に高値を示した ($p < 0.01$) ことによる。さらに、第 8 病日のプロバイオティクス群の血清 DAO 活性

値は、抗菌薬群よりも有意に高値を示した ($p<0.01$)。血液生化学検査は T-Chol 濃度、TG 濃度、BUN 濃度、TP 濃度、Alb 濃度、AST 値および GGT 値のすべての項目においてそれぞれ治療と期間に交互作用は認められなかったが、血清 DAO 活性値のみがプロバイオティクス療法で改善を示したことは興味深い。本研究では、抗菌薬の代替療法としてのプロバイオティクス療法を主観的指標（治療期間、治癒率および糞便スコア）および一般的な血液生化学検査項目を指標として評価しても、抗菌薬療法との治療効果の比較において同等であることは証明できても優位性にまで言及することはできなかった。この結果は、抗菌薬の代替療法の評価において推奨する根拠が無いとする過去の報告者の研究結果[19、77]を覆すものには至らない。しかしながら、本研究では血液中 DAO 活性値を下痢症子ウシの病態評価に加えることでこれまで困難であった抗生物質代替療法の有効性評価を可能にすることができた。今後、この様な下痢症に対する抗菌薬の代替療法の有効性試験に血液中 DAO 活性値を加えることは理にかなっていると思われた。

これらの結果をまとめると、本研究では以下のことを明らかとした。

1. 血液中 DAO 活性値は子ウシの下痢症において腸絨毛の状態を反映し低下する。
2. 子ウシの下痢症における血液中 DAO 活性値は、血中 pH および糞便性状を基に分類した重症度、おそらく腸粘膜の障害の程度を反映して反映して低下する[28]。
3. 血液中 DAO 活性値は、7 日齢以降の子ウシにおいて血中 Cu 濃度の影響を考慮せずに利用可能である[30]。
4. 急性下痢における血清 DAO 活性値は血漿 Cu 濃度の影響を考慮す

ることなく、腸粘膜の状態を評価するバイオマーカーとして利用可能である[30]。

5. 血液中 DAO 活性値はこれまで困難であった抗生物質代替療法の有効性評価を可能にすることができる[29]。

本研究は、子ウシの下痢症における腸絨毛の損傷や機能低下を反映するバイオマーカーとして血液中 DAO 活性値がヒトと同様に下痢症子ウシにおいても利用可能か否かを評価し、血液中 DAO 活性値を客観的な指標として下痢症に対する抗菌薬代替療法の評価が行えるか検証したものである。本研究の結果は、これまで糞便性状や身体一般所見などの主観的指標でしか評価できなかつた子ウシの下痢症治療の効果判定を、血液中 DAO 活性値を客観的指標として加えることにより「子ウシ下痢症に対する新たな代替療法および治療薬の開発」などの臨床評価を可能とするため、畜産業界への貢献は極めて高い。今後、プロバイオティクス以外の様々な代替療法について従前の臨床所見といった主観的評価に腸粘膜の状態と関係のある血液中 DAO 活性値を客観的指標として加えることでその有用性を科学的に証明できれば、子ウシ下痢症の治療のみならず畜産界全体において抗菌薬の使用量削減に寄与するであろう。

謝辭

本論文は筆者が酪農学園大学大学院獣医学研究科獣医学専攻博士課程に在籍し、研究成果をまとめたものである。稿を終えるにあたり、本研究の実施の機会を与えて戴き、その遂行に当たって終始ご指導ご助言を賜りました同獣医学研究科 鈴木一由 教授（主査）に心より感謝の意を表します。同獣医学研究科 樋口豪紀 教授（副査）および岩野英知 教授（副査）にはご助言を戴くとともに本論文の細部にわたりご指導を戴き、ここに深謝いたします。

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 係長 塚野健志 博士に心から感謝いたします。採材、サンプルの測定、論文製作に御協力を戴いた同研究科同窓の嶋守俊雄博士、西 康暢 博士、大塚まりな 氏、北出泰之 氏および村上義樹氏、さらに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の所属学生諸氏に感謝いたします。

そして、仕事をしながらの研究、通学に理解を頂き多大なご協力を賜りました宮城県農業共済組合 本所家畜部諸氏および家畜診療研修所 損防指導課長 松田 敬一 博士をはじめとする、NOSAI 宮城の各診療センターの同僚諸氏に心から感謝申し上げます。また、データの解析に欠かせないサンプルを快く提供頂きました栗原市栗駒 菅原 伸氏をはじめとする宮城県内の畜産農家の方々に心から感謝の意を表します。

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妻 純子、娘 七海、息子 航琉に親愛の念を込めて感謝いたします。

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。

第1章2節、第2章1節および2節は、酪農学園大学「学内共同研究 助成（2019年）」の支援を受けて実施した。

第3章は公益財団法人 伊藤記念財団 「食肉および食肉製品の研究助成金（2017年）」の支援を受けて実施した。

上記の研究助成金を除いて、著者は本研究に直接関連する利益相反はありません。

引用文献

1. Abe, F., Ishibashi, N. and Shimamura, S. 1995. Effect of administration of bifidobacterial and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.* **78**: 2838-2846.
2. Acres, S. D., Laing, C. J., Saunders, J. R. and Radostits, O. M. 1975. Acute undifferentiated neonatal diarrhea in beef calves. I. Occurrence and distribution of infectious agents. *Can. J. Comp. Med.* **39**: 116-132.
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. Akobeng, A. K. 2007. Understanding diagnostic tests 3: receive operating characteristic curves. *Acta. Paediatr.* **96**: 644-647.
5. Asano, K., Suzuki, K., Chiba, M., Sera, K., Matsumoto, T., Asano, R. and Sakai, T. 2005. Correlation between 25 element contents in mane hair in riding horses and atrioventricular block. *Biol. Trace Elem. Res.* **108**: 127-136.
6. Bartels, C. J., Holzhauer, M., Jorritsma, R., Swart, W. A. and Lam, T. J. 2010. Prevalence, prediction and risk factors of enteropathogens in normal and non-normal faeces of young Dutch dairy calves. *Prev. Vet. Med.* **93**: 162-169.
7. Bendali, F., Bichet, H., Schelcher, F. and Sanaa, M. 1999. Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France. *Vet. Res.* **30**: 61-74.
8. Berchtold, J. 2009. Treatment of calf diarrhea: intravenous fluid

- therapy. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **25**: 73-99.
9. Berge, A. C., Moore, D. A., Besser, T. E. and Sischo, W. M. 2009. Targeting therapy to minimize antimicrobial use in preweaned calves: effects on health, growth, and treatment costs. *J. Dairy Sci.* **92**: 4707-4714.
10. Best, C. H. and McHenry, E. W. 1930. The inactivation of histamine. *J. Physiol.* **70**: 349-372.
11. Biegański, T. and Ulatowska, M. A. 1983. Diamine oxidase in the hen. *Agents Actions* **13**: 257-62.
12. Bjorkman, C., Svensson, C., Christensson, B., and Verdier, K. 2003. *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in calf diarrhoea in Sweden. *Acta. Vet. Scand.* **44**:145-152.
13. Bounous, G., Echavé, V., Vobecky, S. J., Navert, H. and Wollin, A. 1984. Acute necrosis of the intestinal mucosa with high serum levels of diamine oxidase. *Dig. Dis. Sci.* **29**: 872-874.
14. Broughton, C. W. and Lecce, J. G. 1970. Electron microscopic studies of the jejunal epithelium from neonatal pigs fed different diets. *J. Nutr.* **100**: 445-449.
15. Buntain, B. J. and Selman, J. E. 1980. Controlled studies of various treatment for neonatal calf diarrhea in calves of known immunoglobulin levels. *Vet. Rec.* **107**: 245-248.
16. Castillo, M., Martin-Orue, S. M., Roca, M., Manzanilla, E. G., Badiola, I., Perez, J. F. and Gasa, J. 2006. The response of gastrointestinal microbiota to avilamycin, butyrate, and plant extracts

- in early weaned pigs. *J. Anim. Sci.* **84**: 2725-2734.
17. Chase, C. C. L. 2018. 'Enteric immunity. Happy gut, healthy animal'.
Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. **34**: 1-18.
18. Constable, P. D. 2004. Antimicrobial Use in the Treatment of Calf
Diarrhea. *J. Vet. Intern. Med.* **18**: 8-17.
19. Constable, P. D. 2009. Treatment of calf diarrhea: antimicrobial and
ancillary treatments. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **25**: 101-
20.
20. DiSilvestro, R. A., Jones, A. A., Smith, D. and Wildman, R. 1997.
Plasma diamine oxidase activities in renal dialysis patients, a human
with spontaneous copper deficiency and marginally copper deficient
rats. *Clin. Biochem.* **30**: 559-563.
21. Elitok, B., Elitok, O. M. and Pulat, H. 2005. Efficacy of azithromycin
dihydrate in treatment of cryptosporidiosis in naturally infected dairy
calves. *J. Vet. Intern. Med.* **19**: 590-593.
22. Ewaschuk, J. B., Zello, G. A. and Naylor, J. M. 2006. Lactobacillus GG
does not affect D-lactic acidosis in diarrheic calves, in a clinical
setting. *J. Vet. Intern. Med.* **20**: 614-619.
23. FAO/WHO/OIE. 2007. Report of the Joint FAO/WHO/OIE expert
meeting on critically important antimicrobials. Rome, Italy. November:
26-30.
24. Foditsch, C., Pereira, R. V., Ganda, E. K., Gomez, M. S., Marques, E.
C., Santin, T. and Bicalho, R. C. 2015. Oral administration of
Faecalibacterium prausnitzii decreased the incidence of severe

- diarrhea and related mortality rate and increased weight gain in preweaned dairy heifers. *PLOS ONE* **10**: e0145485.
25. Foster, D. M. and Smith, G. W. 2009. Pathophysiology of diarrhea in calves. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* **25**: 13-36.
26. Friedman, D. B., Kanwat, C. P., Headrick, M. L., Patterson, N. J., Neely, J. C. and Smith, L. U. 2007. Importance of prudent antibiotic use on dairy farms in south Carolina: a pilot project on farmers' knowledge, attitudes, and practices. *Zoonoses Public Health.* **54**: 366-375.
27. Frizzo, L. S., Soto, L. P., Zbrun, M. V., Bertozzi, E., Sequeira, G., Armesto, R. R. and Rosmini, M. R. 2010. Lactic acid bacteria to improve growth performance in young calves fed milk replacer and spray-dried whey powder. *Anim. Feed Sci. Tech.* **157**: 159-167.
28. Fukuda, T., Tsukano, K., Nakatsuji, H. and Suzuki, K. 2019. Plasma diamine oxidase activity decline with diarrhea severity in calves indicating systemic dysfunction related to intestinal mucosal damage. *Res. Vet. Sci.* **126**: 127-130.
29. Fukuda, T., Otsuka, M., Nishi, K., Nishi, Y., Tsukano, K., Noda, J., Higuchi, H. and Suzuki, K. 2019. Evaluation of probiotic therapy for calf diarrhea with serum diamine oxidase activity as an indicator. *Jpn. J. Vet. Res.* **67**: 305-311.
30. Fukuda, T., Tsukano, K., Otsuka, M., Murakami, Y., Kitade, Y., Nakatsuji, H., Sera, K. and Suzuki, K. 2020 Relationship between postnatal days, serum Cu concentration and plasma diamine oxidase

- activity in Japanese Black calves. *J. Vet. Med. Sci.* **82**: 1488-1491.
31. Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**: 365-378.
32. Gibson, G. R. and Roberfroid, M. B. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125**: 1401-1412.
33. Hayakawa, T., Masuda, T., Kurosawa, D. and Tsukahara, T. 2016. Dietary administration of probiotics to sows and/or their neonates improves the reproductive performance, incidence of post-weaning diarrhea and histopathological parameters in the intestine of weaned piglets. *Anim. Sci. J.* **87**: 1501-1510.
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. Heine, J., Pohlenz, J. F., Moon, H. W. and Woode, G. N. 1984. Enteric lesions and diarrhea in gnotobiotic calves monoinfected with *Cryptosporidium* species. *J. Infect. Dis.* **150**: 768-775.
36. Honzawa, Y., Nakase, H., Matsuura, M. and Chiba, T. 2011. Clinical significance of serum diamine oxidase activity in inflammatory bowel disease: Importance of evaluation of small intestinal permeability. *Inflamm. Bowel. Dis.* **17**: e23-25.
37. Izzo, M. M., Kirkland, P. D., Mohler, V. L., Perkins, N. R., Gunn, A. A. and House, J. K. 2011. Prevalence of major enteric pathogens in

- Australian dairy calves with diarrhoea. *Aust. Vet. J.* **89**: 167-173.
38. 岩松 茂, 向原 要一, 高本 一義, 清松 邦章 1991. 黒毛和種子牛における下痢症の発生状況および病原検索 日本獣医師会雑誌 **44**: 1000-1004.
39. Javad, T., Saeed, N., Mojtaba, S. N. and Abbas, R. G. 2012. Comparison of electrocardiographic parameters and serum electrolytes and microelements between single infection of rotavirus and coronavirus and concurrent infection of *Cryptosporidium parvum* with rotavirus and coronavirus in diarrheic dairy calves. *Comp. Clin. Path.* **21**: 241-244.
40. Jones, A. A., DiSilvestro, R. A., Coleman, M. and Wagner. T. L. 1997. Copper supplementation of adult men: Effects on blood copper enzyme activities and indicators of cardiovascular disease risk. *Metabolism* **46**:1380-1383.
41. 勝田賢 2013. 耐性菌と抗生物質による治療 家畜感染症学会誌 **2**: 1-8.
42. Kanda, Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone. Marrow Transplant.* **48**: 452-458.
43. 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.
44. 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.
45. Kehoe, C. A., Faughnan, M. S., Gilmore, W. S., Coulter, J. S., Howard, A. N. and Strain. J. J. 2000. Plasma diamine oxidase activity is greater in copper-adequate than copper-marginal or copperdeficient rats. *J. Nutr.* **130**: 30-33.
46. 国際的に脅威となる感染症対策関係閣僚会議. 2016. 薬剤耐性 (AMR) 対策アクション・プラン 2016-2020.
47. Laurent, F., McCole, D., Eckmann, L. and Kagnoff, M. F. 1999. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes. Infect.* **1**: 141-148.
48. Legleiter, L. R. and Spears, J. W. 2007. Plasma diamine oxidase: a biomarker of copper deficiency in the bovine. *J. Anim. Sci.* **85**: 2198-2204.
49. Lhermie, G., Grohn, Y. T. and Raboisson, D. 2016. Addressing antimicrobial resistance: an overview of priority actions to prevent suboptimal antimicrobial use in food-animal production. *Front Microbiol.* **7**: 2114.
50. Lorenz, I. 2004. Investigations on the influence of serum D-lactate levels on clinical signs in calves with metabolic acidosis. *Vet. J.* **168**: 323-327.
51. Luk, G. D., Bayless, T. M. and Baylin, S. B. 1980. Diamine oxidase (histaminase). A circulating marker for rat intestinal mucosal maturation and integrity. *J. Clin. Invest.* **66**: 66-70.

52. Maldonado, N. C., Chiaraviglio, J., Bru, E., Chazal, D. L., Santos, V. and Nader-Macías, M. E. F. 2018. Effect of milk fermented with lactic acid bacteria on diarrheal incidence, growth performance and microbiological and blood profiles of newborn dairy calves. *Probiotics Antimicrob. Proteins*. **10**: 668-676.
53. 三浦潔、三浦泰斗、菊地薫、岡田啓司 2004. 黒毛和種子牛の白痢治療における抗菌剤使用の是非に関する考察 日本家畜臨床学会誌 **27**: 20-24.
54. Miyoshi, J., Miyamoto, H., Goji, T., Taniguchi, T., Tomonari, T., Sogabe, M., Kimura, T., Kitamura, S., Okamoto, K., Fujino, Y., Muguruma, N., Okahisa, T. and Takayama, T. 2015. Serum diamine oxidase activity as a predictor of gastrointestinal toxicity and malnutrition due to anticancer drugs. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **30**: 1582-1590.
55. Mosier, D. A. and Oberst, R. D. 2000. Cryptosporidiosis. A global challenge. *Ann. NY. Acad. Sci.* **916**: 102-111.
56. Mountzouris, K. C., Tsitsikos, P., Palamidi, I., Arvaniti, A., Mohnl, M., Schatzmayr, G. and Fegeros, K. 2010. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poult. Sci.* **89**: 58-67.
57. Nakas, C. T., Dalrymple-Alford, J. C., Anderson, T. J. and Alonzo, T. A. 2013. Generalization of Youden index for multiple-class classification problems applied to the assessment of externally

- validated cognition in Parkinson disease screening. *Stat. Med.* **32**: 995-1003.
58. Namikawa, T., Fukudome, I., Kitagawa, H., Okabayashi, T., Kobayashi, M. and Hanazaki, K. 2012. Plasma diamine oxidase activity is a useful biomarker for evaluating gastrointestinal tract toxicities during chemotherapy with oral fluorouracil anti-cancer drugs in patients with gastric cancer. *Oncology* **82**: 147-152.
59. National Research Council. 1996. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. pp. 1-70. National Academy Press, Washington, D.C.
60. Ngeleka, M., Godson, D., Vanier, G., Desmarais, G., Wojnarowicz, C., Sayi, S., Huang, Y., Movasseghi, R. and Fairbrother, J. M. 2019. Frequency of *Escherichia coli* virotypes in calf diarrhea and intestinal morphologic changes associated with these virotypes or other diarrheagenic pathogens. *J. Vet. Diagn. Invest.* **31**: 611-615.
61. 農林水産省経営局保険数理室. 2017. 農業災害補償制度家畜共済統計表.
62. Nowak, P., Kasproicz-Potocka, M., Zaworska, A., Nowak, W., Stefańska, B., Sip, A., Grajek, W., Juzwa, W., Taciak, M., Barszcz, M., Tuśnio, A., Grajek, K., Foksowicz-Flaczyk, J. and Frankiewicz, A. 2017. The effect of eubiotic feed additives on the performance of growing pigs and the activity of intestinal microflora. *Arch. Anim. Nutr.* **71**: 455-469.
63. OIE. 2003. OIE International standards on antimicrobial resistance.:

17-22.

64. Okada, K. Takoh, M. Naito, Y. and Takeuchi, A. 1999. Relationship between occurrence of white diarrhea and changes of properties and components of blood and milk in their dams after parturition in Japanese Black calves. *J. Vet. Med. Sci.* **61**: 929-934.
65. Ortman, K. and Svensson, C. 2004. Use of antimicrobial drugs in Swedish dairy calves and replacement heifers. *Vet. Rec.* **154**: 136-140.
66. Osteras, O., Gjestvang, M. S., Vatn, S. and Solverod, L. 2007. Perinatal death in production animals in the Nordic countries- Incidence and cost. *Acta. Vet. Scand.* **49** (suppl 1): S14.
67. Pempek, J. A., Holder, E., Proudfoot, K. L., Masterton, M. and Having, G. 2018. Investigation of antibiotic alternatives to improve health and growth of veal calves. *J. Dairy. Sci.* **101**: 4473-4478.
68. Quezada-Tristán, T., García-Flor, V. L., Ortiz-Martínez, R., Arredondo-Figueroa, J. L., Medina-Esparza, L. E., Valdivia-Flores, A. G. and Montoya-Navarrete, A. L. 2014. Biochemical parameters in the blood of Holstein calves given immunoglobulin Y-supplemented colostrums. *BMC. Vet. Res.* **10**: 159.
69. Renaud, D. L., Kelton, D. F., Weese, J. S., Noble, C. and Duffield, T. F. 2019. Evaluation of a multispecies probiotic as a supportive treatment for diarrhea in dairy calves: A randomized clinical trial. *J. Dairy Sci.* **102**: 4498-4505.
70. Rolfe, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* **130**: 398S-402S.

71. Roussel Jr. A. J. and Brumbaugh, G. W. 1991. Treatment of neonatal calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Prac.* **7**: 713-728.
72. Seo, J. K., Kim, S. W., Kim, M. H., Upadhaya, S. D., Kam, D. K. and Ha, J. K. 2010. Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **23**: 1657-1667.
73. Sharma, C., Rokana, N., Chandra, M., Singh, B. P., Gulhane, R. D., Gill, J. P. S., Ray, P., Puniya, A. K. and Panwar, H. 2017. Antimicrobial resistance: Its surveillance, impact, and alternative management strategies in dairy animals. *Front. Vet. Sci.* **4**: 237.
74. Signorini, M. L., Soto, L. P., Zbrun, M. V., Sequeira, G. J., Rosmini, M. R. and Frizzo, L. S. 2012. Impact of probiotic administration on the health and fecal microbiota of young calves: a meta-analysis of randomized controlled trials of lactic acid bacteria. *Res. Vet. Sci.* **93**: 250-258.
75. Silbergeld, E. K., Graham, J. and Price, L. B. 2008. Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu. Rev. Public Health* **29**: 151-169.
76. Smith, G.W. 2009. Treatment of calf diarrhea: oral fluid therapy. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* **25**: 55-72.
77. Smulski, S. Turlewicz-Podbielska, H. Wylandowska, A. and Włodarek, J. 2020. Non-antibiotic Possibilities in Prevention and Treatment of Calf Diarrhoea. *J. Vet. Res.* **64**: 119-126.
78. Stott, G. H., Marx, D. B., Menefee, B. E. and Nightengale, G. T. 1979. Colostral immunoglobulin transfer in calves I. Period of absorption. *J.*

Dairy Sci. **62**: 1632-1638.

79. Suzuki, K., Noda, J., Yanagisawa, M., Kawazu, I., Sera, K., Fukui, D., Asakawa, M. and Yokota, H. 2012. Particle-induced X-ray emission analysis of elements in plasma from wild and captive sea turtles (*Eretmochelys imbricate*, *Chelonia mydas* and *Caretta caretta*) in Okinawa, Japan. *Biol. Trace. Elem. Res.* **148**: 302-308.
80. 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.
81. Thomas, P. V. B., Charles, B., Marius, G., Bryan, T. G., Simon, A. L., Timothy, P. R., Aude, T. and Ramanan, L. 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**: 5649-5654.
82. Thompson, J. S., Petersen, P., Nguyen, B. L. and Quigley, E. M. 1992. Serum and intestinal diamine oxidase activity during intestinal adaptation. *J. Invest. Surg.* **5**: 297-304.
83. USDA, 2007. Dairy 2007, Part I: Reference of dairy cattle health and management practices in the United States. United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service Veterinary Services (USDA-APHIS-VS), Fort Collins, CO, USA: 91-95.
84. Ushida, K., Yoshida, Y., Tsukahara, T., Watanabe, T. and Inoue, R. 2010. Oral administration of *Enterococcus faecalis* EC-12 cell

- preparation improves villous atrophy after weaning through enhancement of growth factor expression in mice. *Biomed. Res.* **31**: 191-198.
85. Weese, J. S., Giguère, S., Guardabassi, L., Morley, P. S., Papich, M., Ricciuto, D. R. and Sykes, J. E. 2015. ACVIM consensus statement on therapeutic antimicrobial use in animals and antimicrobial resistance. *J. Vet. Intern. Med.* **29**: 487-498.
86. Wolvekamp, M. C. and Bruin, R. W. 1994. Diamine oxidase: an overview of historical, biochemical and functional aspects. *Dig. Dis.* **12**: 2-14.
87. 山田裕 2014. 子牛の下痢治療における抗菌剤の使用法を考える 家畜感染症学会誌 **3**: 123-127.
88. Yoshida, Y., Tsukahara, T. and Ushida, K. 2009. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* Lq80 and *Megasphaera elsdenii* iNP-001 induces efficient recovery from mucosal atrophy in the small and the large intestines of weaning piglets. *Anim. Sci. J.* **80**: 709-715.
89. Zani, J. L., Cruz, F. W., Santos, A. F. and Turnes, C. G. 1998. Effect of probiotic CenBiot on the control of diarrhoea and feed efficiency in pigs. *J. Appl. Microbiol.* **84**: 68-71.

略語一覽

Alb	:	血清アルブミン
AMR	:	薬剤耐性
AST	:	血清アスパラギン酸トランスアミナーゼ
AUC	:	曲線下面積
BUN	:	血液中尿素窒素
Cu	:	銅
DAO	:	ジアミンオキシダーゼ
ELISA	:	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
GGT	:	血清 γ -グルタミルトランスフェラーゼ
Glu	:	グルコース
NEB	:	負のエネルギーバランス
OIE	:	国際獣疫事務局
PIXE	:	Particle Induced X-Ray Emission
ROC	:	Receiver Operating Characteristic
SD	:	標準偏差
T-cho	:	血清総コレステロール
TG	:	血清トリグリセリド
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 1 節

福田達也、塚野健志、鈴木一由. 子牛下痢症と腸管機能指標である血清中ジアミンオキシダーゼ活性値の関係. 日本獣医師会雑誌 (審査中、令和 2 年 11 月 26 日投稿)

第 1 章 第 2 節

Fukuda, T., Tsukano, K., Nakatsuji, H. and Suzuki, K. 2019. Plasma diamine oxidase activity decline with diarrhea severity in calves indicating systemic dysfunction related to intestinal mucosal damage. *Res. Vet. Sci.* **126**: 127-130.

第 2 章 第 1 節 第 2 節

Fukuda, T., Tsukano, K., Otsuka, M., Murakami, Y., Kitade, Y., Nakatsuji, H., Sera, K. and Suzuki, K. 2020 Relationship between postnatal days, serum Cu concentration and plasma diamine oxidase activity in Japanese Black calves. *J. Vet. Med. Sci.* **82**:1488-1491.

第 3 章

Fukuda, T., Otsuka, M., Nishi, K., Nishi, Y., Tsukano, K., Noda, J., Higuchi, H. and Suzuki, K. 2019. Evaluation of probiotic therapy for calf

diarrhea with serum diamine oxidase activity as an indicator. *Jpn. J. Vet. Res.* **67**: 305-311.

学位論文要旨

血液中ジアミンオキシダーゼ活性値を客観的指標として用いた

下痢症子ウシに対する抗菌薬代替療法の評価法の検討

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 福田 達也

本研究は、「食の安全・安心」および薬剤耐性菌対策の観点から求められている子ウシ下痢症に対する抗菌薬代替療法について、従前から行われている主観的指標に加え血液中ジアミンオキシダーゼ (DAO) 活性値を客観的指標として用いることで抗菌薬代替療法の評価が可能か否か検討した。本研究で着目した血液中 DAO 活性値は、ヒトにおいてさまざまな腸疾患のバイオマーカーとして利用されている。しかし、子ウシにおいてもヒトと同様に血液中 DAO 活性値が腸粘膜の状態を反映する客観的指標として利用可能か否かは明らかではない。そこで本研究では、はじめに (1) 下痢症子ウシにおける血液中 DAO 活性値の低下と重症度との関係性を評価し、(2) 健常子ウシの日齢が血液中 DAO 活性値に与える影響と下痢症が血液中 DAO 活性値および血液中銅 (Cu) 濃度に与える影響を調査した。その結果、血液中 DAO 活性値がウシにおいても腸粘膜の状態を反映する客観的な指標として利用可能であることを明らかにした。次に、(3) 血液中 DAO 活性値を客観的指標として加えることで抗菌薬代替療法の優位性を示せるか否か検証した。

すなわち第 1 章第 1 節では、黒毛和種子ウシを用いて下痢により血清中 DAO 活性値が低下するか否か調査したところ、下痢症子ウシの血清中 DAO 活性値は 71.9 ± 16.0 IU/ml と健常子ウシの 170.2 ± 78.8 IU/ml と比較して有意に低値を示した ($p < 0.01$)。また、血清中 DAO 活性値はカットオフ値 < 107.23 IU/ml のとき感度 84.6 % および特異度 100.0 % と優れた診断能を有することを明らかにした。第 1 章第 2 節では、子ウシ下痢症の重症度を糞便性状および血液 pH に基づいて分類し、血漿中 DAO 活性値が下痢の重症度を反映するか否かを調査した。その結果、血漿中 DAO 活性値と下痢の重症度との間に有意な相関が認められた。した

がって、血液中 DAO 活性値はウシにおいてもヒトと同様に下痢の重症度、おそらく腸粘膜の障害の程度を反映していることを明らかにした。

第 2 章第 1 節では黒毛和種健全子ウシを用いて血清中 DAO 活性値および血漿中 Cu 濃度の出生後の日齢変化を調査した。その結果、日齢変化に伴う血漿中 Cu 濃度と血清中 DAO 活性値に関連性は認められず、どちらも 7 日齢以降で安定して推移することを確認した。よって、子ウシにおける血液中 DAO 活性値は 7 日齢以降であれば日齢を考慮せず評価可能であることを明らかにした。第 2 章第 2 節では、低 Cu 血症で血液中 DAO 活性値が低下する可能性があるため、7 日齢以降の黒毛和種下痢症子ウシの血漿中 Cu 濃度が低値を示すか否か、またその血漿中 Cu 濃度と血清中 DAO 活性値の関係を調査した。その結果、子ウシの下痢では血漿中 Cu 濃度が欠乏値の基準である $0.50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 未満を示すことはなく、血清中 DAO 活性値との相関もなかったため、子ウシの下痢において血清中 DAO 活性値は血漿中 Cu 濃度の影響を考慮する必要が無いことを明らかにした。

第 3 章では、下痢症治療における抗菌薬の代替療法としてのプロバイオティクス療法の有効性を従前の主観的指標（治療日数、治癒率および糞便スコア）に血液中 DAO 活性値を客観的指標として加えることでプロバイオティクス療法の優位性を示せるか否か検証した。その結果、抗菌薬の代替療法であるプロバイオティクス療法の有効性は主観的指標では過去の報告と同様に抗菌薬療法に対して優位性を示すことができなかったが、血清中 DAO 活性値を客観的指標として加えたことでプロバイオティクス療法の抗菌薬代替療法としての優位性を明確に示すことができた。

本研究は、腸絨毛の損傷や機能低下を反映するバイオマーカーとして血液中 DAO 活性値がヒトと同様に下痢症子ウシに対しても利用可能か否かを評価し、その結果をふまえて血液中 DAO 活性値を客観的な指標として下痢症に対する抗菌薬代替療法の評価が可能か否か検証したものである。その結果、これまで糞便性状や治療日数などの主観的指標でしか評価できなかった子ウシの下痢症治療の効果判定を、血液中 DAO 活性値を客観的指標として加えることで明確な優位性を示すことが可能となった。すなわち本研究の成果は子ウシ下痢症に対する新たな代替療法および治療薬の開発などを可能とするため、畜産業界への貢献は極めて高い。今後、プロバイオティクス以外の様々な代替療法について従前の臨床所見といった主観的評価に腸粘膜の状態と密接な関係のある血液中 DAO 活性値を客観的指標として加えることでその有用性を科学的に証明することができれば、子ウシ下痢症の治療のみならず畜産界全体において抗菌薬の使用量削減に寄与するであろう。

Study of the evaluation method using blood diamine oxidase activity as an objective indicator in antimicrobial alternative therapy for calves with diarrhea

Rakuno Gakuen University Graduate School
Veterinary Medicine, Large Animal Surgery
Tatsuya Fukuda

The objective of this study was to clarify whether an indicator of blood diamine oxidase (DAO) activity can be added as an objective indicator in addition to the subjective indicators used to evaluate the therapeutic effects for calf diarrhea. The blood DAO activity is used as a biomarker for several intestinal diseases in humans. However, it is unclear whether it can be used as an objective indicator reflecting the state of the intestinal mucosa in calves as in humans. Therefore, this study investigated whether the DAO activity in blood can be used as an objective indicator reflecting the condition of the intestinal mucosa in cattle.

As described in chapter 1 section 1, we enrolled Japanese Black calves with diarrhea and investigated whether diarrhea reduces the serum DAO activity. The calves were divided into a diarrhea group (n=25) and a clinically healthy control group (n=39) without diarrhea. The serum DAO activity in the diarrhea group and the control group was 71.9 ± 16.0 and 170.2 ± 78.8 IU/dl, respectively. The diarrhea group had significantly lower values than the control group ($p < 0.01$). In addition, based on comparison of the odds ratio and the diagnostic ability of the DAO activity and the other indicators that significantly differed between groups, the serum DAO activity value was the most reliable indicator. The aim of chapter 1 section 2 was to investigate whether abnormalities in plasma DAO activity reflect the severity of calves with diarrhea. A total of 50 Holstein calves were enrolled. Thirty-six of the 50 calves presented with diarrhea and were sub-classified by severity based on fecal status (0: firm, 1: pasty, 2: loose, and 3: watery) and blood pH (acidemia: blood pH < 7.25) as follows: Seventeen calves exhibiting watery diarrhea and/or acidemia were sub-categorized into the severe group. The other nineteen calves exhibiting pasty or loose diarrhea without acidemia were sub-categorized into the moderate group. The remaining 14 calves without diarrhea were assigned to the control group. The plasma DAO activity was significantly lower ($p < 0.01$) in the severe and moderate groups than in the control group. In addition, the plasma DAO activity was significantly lower

($p < 0.05$) in the severe group than in the moderate group. The plasma DAO activity and fecal score ($r = -0.55$, $p < 0.01$) in calves with diarrhea were significantly and negatively correlated by Spearman's rank test. This suggested that the plasma DAO activity reflects the degree of intestinal mucosal disorder due to diarrhea.

The blood DAO activity is known to be affected by postnatal days and the blood copper (Cu) concentration. Therefore, in chapter 2 section 1, we investigated changes in serum DAO activity and plasma Cu concentration postnatally using healthy Japanese Black calves. Fifty-eight healthy calves at 2 (n=8), 7 (n=10), 10 (n=12), 14 (n=7), 21 (n=10), and 180 postnatal days (n=11) were enrolled. The serum DAO activity was significantly higher at 2 postnatal days than at ≥ 7 postnatal days, and no significant changes were observed after 7 postnatal days. In addition, no significant correlation was found between the serum DAO activity and plasma Cu concentration at all postnatal days in healthy calves. Therefore, for the blood DAO activity, the postnatal days do not need to be considered in calves after 7 postnatal days. As described in chapter 2 section 2, the effects of the plasma Cu concentration on serum DAO activity were evaluated in Japanese Black calves older than 7 postnatal days with diarrhea. Fourteen calves with diarrhea (watery and/or muddy feces) but no other clinical signs were enrolled in the diarrhea group and 19 healthy calves were enrolled as the control group. As a result, the serum DAO activity in the diarrhea group (66.78 ± 14.37 IU/ml) was lower than that in the control group (170.33 ± 97.83 IU/ml, $p < 0.01$), but plasma Cu concentrations in all calves remained within the normal range. Therefore, the serum DAO activity value in acute diarrhea can be used as a biomarker reflecting the state of the intestinal mucosa without considering the influence of the plasma Cu concentration.

In chapter 3, we examined whether it is possible to evaluate the effectiveness of alternative antibiotic therapies in the treatment of diarrhea using serum DAO activity as an objective indicator in addition to the conventional subjective indicator (days of treatment, cure rate, and fecal score). Twenty-two diarrheic Japanese Black calves received probiotic (n=11) or antibiotic (n=11) therapy for up to 8 days from the initial examination. However, there were no significant differences between the antibiotic group and the probiotic group in the subjective indicators. The serum DAO activity on day 1 in the probiotic and antibiotic groups was 64.4 ± 7.2 and 64.9 ± 5.4 IU/ml, respectively. Serum DAO activity in all calves with diarrhea at the start of treatment (64.7 ± 7.7 IU/ml, n=22) was significantly lower than the reference value of 153.9 ± 72.0 IU/ml obtained from control group. Based on the

repeated measures ANOVA, there were significant differences in the relationship between treatment and time ($p < 0.01$). Sequential change in the serum DAO activity of the antibiotic group was not observed (66.3 ± 4.9 IU/ml on day 8). Although the serum DAO activity in the calves in the probiotic group did not reach the reference value, the serum DAO activity on day 8 (76.3 ± 5.1 IU/ml) was significantly higher than that at the start of treatment ($p < 0.01$). Furthermore, serum DAO activity in the probiotic group on day 8 was significantly higher than that in the antibiotic group ($p < 0.01$). Although improvement of diarrhea was observed based on the subjective indicator, no significant difference was observed between the probiotics group and antibiotics group, and the superiority of probiotics was not clarified. However, the addition of serum DAO activity as an objective indicator demonstrated the superiority of alternative antibiotic therapy to probiotic therapy. In this study, by adding the blood DAO activity as an objective indicator to the evaluation of calves with diarrhea, it was possible to evaluate the effectiveness of alternative antibiotic therapy, which was previously difficult. In the future, adding blood DAO activity to the efficacy test of alternative antimicrobial therapies for diarrhea may be reasonable.

This study improved the evaluation of the effects of treatment for diarrhea in calves, which can only be evaluated by subjective indicators, such as fecal properties and general condition, by adding the blood DAO activity as an objective indicator. This will help the livestock industry, and is highly useful because it enables the development of new alternative therapies and therapeutic agents for calf diarrhea. In the future, alternative therapies other than probiotics will be evaluated using the blood DAO activity as an indicator and a new treatment method for calf diarrhea will be established in clinical practice, which will reduce the dose and number of antibacterial agents used.

