

子牛の牛呼吸器疾患におけるプロカルシトニンの血清濃度変動と
臨床兆候との関連解析

山口大学大学院共同獣医学研究科

興石 智子

2026 年 3 月

目次

序章 緒言	3
本研究の目的	3
牛呼吸器疾患 (BRD)	4
呼吸器疾患の診断	5
プロカルシトニン (PCT) について	7
ハプトグロビン (Hp) について	9
第1章 牛呼吸器疾患罹患子牛における血清プロカルシトニン濃度の測定	16
小序	16
材料および方法	17
結果	19
小括	22
第2章 子牛の牛呼吸器疾患における血清ハプトグロビンと血清プロカルシトニンの 比較検討	31
小序	31

材料および方法	32
結果	34
小括	37
終章 総括と結論	51
研究発表実績.....	54
要約	55
謝辞	57
参考文献.....	58

序章 緒言

本研究の目的

本研究は牛呼吸器疾患（bovine respiratory disease; BRD）におけるプロカルシトニン（PCT）の予後および重症度評価におけるバイオマーカーとしての有用性を評価すること、さらに BRD の臨床兆候、PCT、ハプトグロビン（Hp）の関連性を明らかにすることを目的とする。

BRD は罹患率および死亡率が高く、畜産農家へ多大な経済的損失をもたらす重要な疾患である[36, 49]。重症化による治療期間の長期化と子牛の生産性の低下は畜産農家への経済的損失を増大させるため、早期に的確な予後および重症度判定できる効果的な診断ツールの検討が必要である。その候補の一つとして考えられるのはバイオマーカーである。我々は、人において細菌感染症の特異的バイオマーカーとして注目されている PCT に着目した。BRD は環境要因およびウイルス感染に起因するが、二次性細菌感染が重症化リスクを増大させることが知られており、この相互作用は viral-bacterial synergy と呼ばれる[18]。従って、PCT のような細菌感染に特異的なバイオマーカーは BRD の重症度に関連すると考えられる。実際に BRD 罹患子牛において、健康個体と比較して血中 PCT 濃度が上昇することがすでに報告されており、PCT の BRD

におけるバイオマーカーとしての有用性が指摘されている[14]。しかし、血中 PCT 濃度と BRD の予後および重症度との関連性は明らかになっていない。一方、Hp は牛の主要な急性期蛋白質として知られており[26, 37]、BRD の診断にも有用であると考えられている[14, 27, 46]。BRD の viral-bacterial synergy により重症化するという特徴から、広範な炎症や組織損傷に応答する Hp と細菌感染特異的な PCT は異なる反応と時間経過を示す可能性がある。しかし、BRD の子牛の臨床兆候と PCT や Hp との関係を比較検討した報告はない。

本研究では、BRD を発症した子牛において血清 PCT が重症度判定に有用であるか検討するために、BRD 発症子牛における PCT 値の各血液パラメータとの関連について調査した（研究 1）。さらに、Hp と PCT の BRD 罹患子牛における動態および関連性を明らかにするために、これらのバイオマーカーとしての有用性および臨床兆候との関連性を評価した（研究 2）。これにより、BRD に対するより迅速かつ的確な診断体制の構築に寄与することが期待される。

牛呼吸器疾患（BRD）

牛呼吸器疾患（BRD）は bovine respiratory syncytial virus (BRSV)、parainfluenza virus 3 (PIV3)、bovine herpes virus-1 (BoHV-1)、bovine viral diarrhea virus (BVDV)、

Mannheimia haemolytica, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*, *Mycoplasma* sp.

などのウイルスや細菌を含む様々な病原微生物、宿主の免疫状態の変調、環境要因などからなる複合疾患である。BRD は罹患率および死亡率が高く、子牛の発育速度や生産性へ影響を与え、畜産農家に多大な経済的損失をもたらすため、肉用牛および乳用牛において最も重要な疾患の一つとなっている[36,49]。呼吸器疾患において、初期はウイルス感染が起こり、引き続き細菌感染が起こることで重症化のリスクが増大することが様々な動物種で確認されている[18]。この viral-bacterial synergy は、ヒトのインフルエンザで初めて確認されたものである[18]。BRD においても同様に、ウイルス感染に続き細菌の二次感染が起こり重症化するという特徴を示す[18]。重症化による治療期間の長期化は畜産農家の経済的負担を増大させる[43]。さらに、治療期間の長期化による抗菌薬使用量の増加は薬剤耐性を助長し[34]、農場内の薬剤耐性の蔓延により治療をさらに困難にする。それゆえ、早期に診断および予後判定できる効果的な方法が必要である。

呼吸器疾患の診断

ヒトの市中肺炎においては咳嗽、喀痰、呼吸困難、胸痛といった呼吸器症状と、発熱、倦怠感、食思不振、意識障害といった全身症状、胸部聴診、胸部 X 線検査に加え、PCT、

C-反応性蛋白 (CRP)、tumor necrosis factor-related apoptosis ligand、interferon- γ -induced protein 10、赤血球沈降速度、白血球数、好中球数など様々なバイオマーカーが評価され、補助診断ツールとして利用されている[54]。これらのなかでも、PCT は重度細菌感染症の診断予後判定において優れた結果を示している[4, 30, 38, 47]。また、A-DROP スコア (市中肺炎の重症度分類)、qSOFA および SOFA (敗血症診断) といったスコアリングシステムが市中肺炎の重症度診断に用いられる[54]。

ウシにおいては身体検査 (発熱、頭頸部の伸長、運動を嫌がる、起立時肘関節外転、呼吸数増加、発咳増加、鼻汁、可視粘膜チアノーゼ)、聴診、内視鏡検査、X 線撮影法、超音波検査、血液ガス検査などにより診断が行われる[35]。上記の診断方法に加えて、畜産生産現場においてスコアリングシステムが用いられることがある。スコアリングシステムは高価な機器を必要とせず、BRD 診断精度を改善し、標準化するためのシンプルで客観的な診断方法である。カリフォルニア BRD スコアリングシステムは、以下のように 6 つの臨床徴候の有無に基づいており、BRD 診断における各徴候の重み (寄与する度合い) によってそれぞれにスコアが割り当てられている[3]: 目やに (スコア 0 または 2)、鼻汁 (スコア 0 または 4)、耳介下垂・斜頸 (スコア 0 または 5)、発咳 (0 または 2)、強制呼吸 (0 または 2)、直腸温 (0 または 2; $\geq 39.2^{\circ}\text{C}$) [3] (Table 1)。このシステムでは、スコアの合計が 5 以上で BRD と診断することが推奨されている[3]。

カルフォルニア BRD スコアリングシステムは、臨床兆候の有無でスコア化することか

ら客観性に優れるため、本研究でも BRD 診断の指標として使用した。しかし、診療現場において臨床兆候に基づくスコアリングシステムのみに基づき BRD の確実な診断を行うのは限界がある。臨床現場では設備、機器、費用、人員などの制限があり、現状の診断体制は十分とは言えないが、このような制限の中で BRD 診断の精度を高めるためには、簡便かつ信頼性のある診断ツールの整備が早急に対処すべき課題である。特に BRD においてはバイオマーカーに関する研究は未だ少ないため、新たな有用なバイオマーカーの開発が強く求められる。

プロカルシトニン (PCT) について

PCT は血中カルシウム (Ca) 濃度を調節するカルシトニン (CT) の前駆物質で、アミノ酸 116 個よりなる分子量 13 kDa のペプチドである。PCT の合成はカルシトニン遺伝子 I (CALC-I) により制御されており、通常では CT は細胞内で PCT の蛋白スプライシングにより合成され、高 Ca 血症に反応して甲状腺の濾胞傍細胞より分泌される。従って、健常動物では PCT が循環血中に見られることはない。しかし、細菌感染時には細菌の Lipopolysaccharide (LPS) やその他の毒素により直接的に、または IL- 1β 、TNF- α 、IL-6 などの感染に反応して分泌される炎症誘発性サイトカインにより間接的に刺激を受けて、肺、腎臓、肝臓、脂肪細胞、筋肉といった全身組織で PCT の

産生が誘導される[33] (Figure 1)。このため、血中 PCT 濃度の顕著な上昇は全身性の細菌感染症で認められる[13, 20]。一方、ウイルス感染時は抗ウイルス免疫に主要な役割を持つインターフェロン- γ により PCT の発現は抑制される[23] (Figure 1)。PCT が特に細菌感染マーカーとして認識されているのは、これらの分泌メカニズムにより、非ウイルス感染（特に細菌感染）で上昇し、ウイルス感染で上昇しないという特徴を持つためである。ヒトにおける全身感染症では血清 PCT は感染後 2〜3 時間で上昇を始め、14 時間後にピークを示し、24 時間以上高値を維持する (Figure 2)。ヒトにおける PCT の研究は、1992 年に熱傷患者を対象とした炎症マーカーとしての意義を報告したことに端を発しているが[31]、その後の研究により、PCT 産生は炎症性サイトカインと比較して LPS でより強く誘導されることが示され、重度細菌感染症や敗血症の指標として提案されている[39]。ヒトでは血清 PCT は敗血症と非感染性の全身性炎症反応症候群 (SIRS) の鑑別診断[47]、細菌感染の有無の診断[13]、敗血症患者の予後診断[4]などに有用であり、血清 PCT 値を基準とした抗菌薬投与アルゴリズムにより抗菌薬投与期間を減少させることができたと報告されている[10]。PCT の上昇はヒトだけではなくマウス[8, 51]、ハムスター[32]、ブタ[48]、ウマ[5]、ウシ[9, 15]の細菌感染時にも観察されている。ウシでは子牛の敗血症、BRD、牛乳房炎において PCT の上昇が認められている[2, 9, 14, 15, 29, 42]。しかしながら、BRD において PCT と臨床兆候、予後および重症度との関連についての報告はない。

ハプトグロビン (Hp) について

ハプトグロビン (Haptoglobin; Hp) は肝細胞で合成される急性期蛋白質である[44]。Hp は、 α -グロブリンの構成成分であり、血漿中で遊離ヘモグロビン (Hb) と結合し、溶血に伴う酸化的損傷を軽減するとともに、細菌の増殖に必要な鉄をキレートすることにより静菌効果を有すると考えられている[53]。Hp-Hb 複合体はマクロファージ上の特異的表面レセプターである CD163 を介して認識され、肝臓の食細胞によって血中から除去される。また、Hp には様々な免疫調節作用がある。免疫調節作用の一部は、Hp がエフェクター細胞の CD11/CD18 レセプターに結合することによってもたらされる。Hp は顆粒球の走化性、貪食、殺菌活性の阻害、肥満細胞の増殖抑制、表皮ランゲルハンス細胞（皮膚の抗原提示細胞）の自然成熟の阻害、T 細胞の増殖抑制などの作用を示す[28]。ウシにおいては血清アミロイド A と並んで、炎症時に放出される最も顕著な急性期蛋白質であると考えられている (Table 2)。Hp は LPS により活性化された単球から、または組織損傷により線維芽細胞や内皮細胞から分泌される IL-1、IL-6、および TNF- α などの炎症性サイトカインにより誘導され[37] (Figure 3)、乳房炎、肺炎、腸炎、腹膜炎、心内膜炎、膿瘍、子宮内膜炎、その他の自然感染または実験感染状態にあるウシにおける、炎症反応の発生および重症度を測定する臨床的に有用なパラ

メータとして重要性が示されている。Hp濃度の上昇は炎症だけでなく、第四胃変位[17]、脂肪肝[21]、飢餓[52]、デキサメタゾン処理[52]、分娩時、および輸送ストレスを受けた子牛[19]においても認められることが知られている。このように Hp は様々な疾患において有用なバイオマーカーであることが報告されているが、BRD 罹患子牛における PCT との関連性についての報告はない。

Table 1. 離乳前の乳用子牛向けカリフォルニア牛呼吸器疾患（BRD）スコアリングシ

ステム¹.

Clinical sign	Score if normal	Score if abnormal (any severity) ²
Eye discharge	0	2
Nasal discharge	0	4
Ear droop/Head tilt	0	5
Cough	0 No cough	2 Spontaneous cough
Breathing	0 Normal	2 Rapid or difficult breathing
Temperature	0 <39.2°C	2 ≥39.2°C (102.5°F)

全 6 徴候のスコアを合計し、合計スコアが≥5 の場合、当該子牛は BRD の可能性があ
る

¹BRD3 scoring system を引用 ‘Development of a novel clinical scoring system for on-
farm diagnosis of bovine respiratory disease in pre-weaned dairy calves.’ Love et al.
(2014). <https://peerj.com/articles/238.pdf>

² 各項目に関する異常の有無

(Aly et al. 2014)

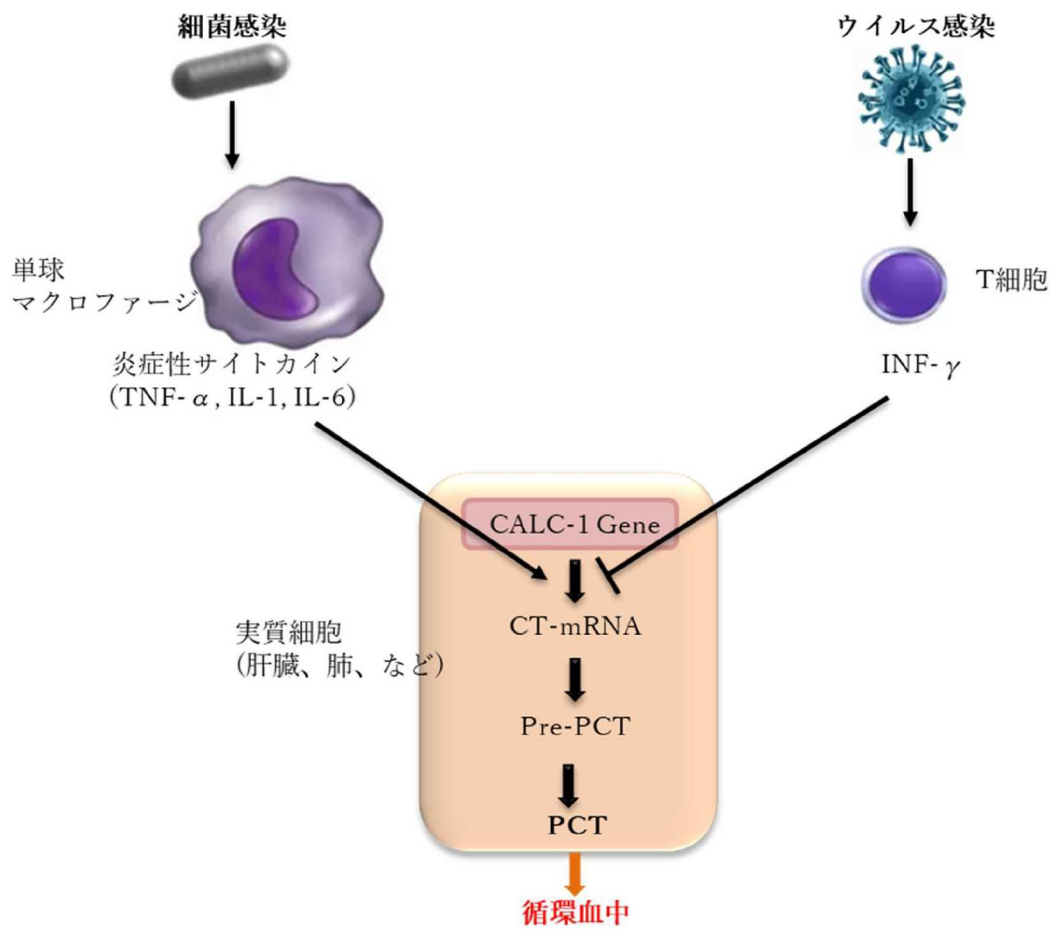


Figure 1. プロカルシトニン (PCT) の分泌機序

TNF :腫瘍壊死因子、IL :インターロイキン、INF :インターフェロン

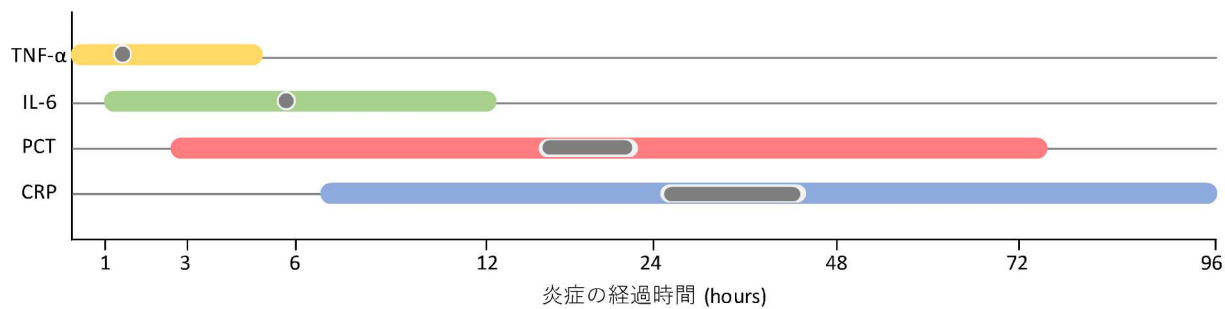


Figure 2. ヒトにおける全身感染症発症時のプロカルシトニン（PCT）および炎症性サ

イトカイン、C 反応性蛋白（CRP）の発現期間

TNF :腫瘍壊死因子、IL :インターロイキン

バーは炎症性サイトカイン、PCT、CRP の発現期間を示す

グレー領域はピーク期間を示す

Table 2. 各種生物における典型的な急性期炎症反応における急性期蛋白質のピーク濃度変化

	Swine	Cattle	Dog	Cat	Man	Mouse	Rat	Rabbit
Albumin	NEG	NEG	NEG	NEG?	NEG	NEG	NEG	NEG
Haptoglobin	III	III	II	I/II	II	III	II	III
α_1 -acid glycoprotein	0	II	II	II	II	II	III	II
Fibrinogen	I	I	II	?	II	II	II	II
C-reactive protein	II	0	III	0	III	I	II	II
Serum amyloid A	III	II	III	II	III	III	0	III
Serum amyloid P	?	0	?	?	0	I-III*	0	0
Major acute phase protein	III	II	?	?	?	?	II	?

* 血清アミロイド P の通常レベルおよび急性期濃度の変化は、異なるマウス系統間で大きく異なる

?: 蛋白質反応に関して文献での報告はなし; NEG: 濃度減少 (10-30%); 0: 変化しない; I: 50%から 100% 増加; II: 100%から 10 倍の増加; III: 10 倍以上の増加

(Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry - Vet.

Res. - Volume 35, Number 2, March-April 2004 - Henrik Hagbard Petersen, Jens Peter

Nielsen and Peter Mikael Helweg Heegaard - <https://doi.org/10.1051/vetres:2004002>

より引用)

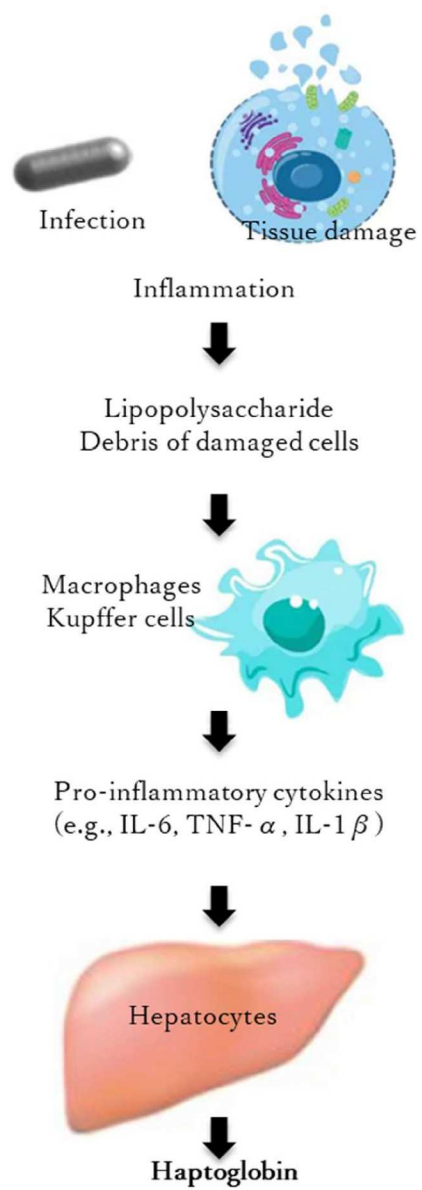


Figure 3. 感染、組織の損傷、炎症時のハプトグロビンの分泌機序

IL :インターロイキン, TNF :腫瘍壊死因子

第 1 章 牛呼吸器疾患罹患子牛における血清プロカルシトニン濃度の測定

小序

BRD は罹患率および死亡率が高く、発育速度や生産性へ影響を与え、畜産農家に経済的損失をもたらすため、肉用牛および乳用牛において最も重要な疾患の一つとなっている[36, 49]。それゆえ、早期診断および早期に予後判定できる効果的な方法が必要である。複合的要因で発症する BRD は、ウイルスに起因したとしても細菌感染による二次感染により重症化する[18]。BRD の診断ではリンパ球数、好中球数、好中球/リンパ球比[6]、Hp[14, 28]、PCT、neopterin、serum amyloid A[14]などのバイオマーカーについて有用性が報告されている。しかしながら、これらのバイオマーカーに関する知見は十分とは言えず、これらが BRD において臨床兆候、他の血液パラメータ、予後とどのように関連するかは明らかになっていない。PCT のような細菌感染に特異的なバイオマーカーは BRD の重症度と関連する可能性がある。第 1 章では、初診時 (day 1) の血中 PCT と BRD の臨床兆候との関連性について、BRD の重症度に関するスコアリングシステムを用いて定量化して調査することを目的とした。特に、day 1 における PCT 値が高値であった症例と検出限界以下であった症例を比較し、臨床兆候および血液検査結果の違いに焦点を当てた。

材料および方法

供試動物

本研究では愛媛県の肥育農場で飼養されており、BRD と診断された子牛 41 頭（黒毛和種 30 頭、ホルスタイン種 1 頭、交雑種（F1: 黒毛和種とホルスタイン種の一代交雑種 10 頭）を供試牛とした。供試牛の出生後日齢は 38～399 日齢であった。また健康子牛（F1）5 頭（出生後日齢 118.4 ± 4.2 日）を対照動物とした。試験期間中に死亡した子牛は認められなかった。BRD 罹患子牛は抗菌薬により治療され、2～9 回の治療期間後治癒と判定された。

BRD の診断

畜主による異常発見から 0～1 日後に診療依頼を受けた後、初診時（day 1）に供試牛は California BRD scoring system に基づき兆候の有無により診断された。California BRD scoring system（Table 1）は、目やに（スコア 0 または 2）、鼻汁（スコア 0 または 4）、耳介下垂・斜頸（スコア 0 または 5）、発咳（0 または 2）、強制呼吸（0 または 2）、直腸温（0 または 2; $\geq 39.2^{\circ}\text{C}$ ）の合計で評価するとされており[3]、本研究でもそれに従

い評価した。このスコアリングシステムでは、合計 BRD スコア ≥ 5 で BRD と診断することが提唱されている[24]。BRD スコアは day 2、3、7 にも評価を行った。

採血および血液検査

Day 1、2、3 および day 7 にヘパリン加真空採血管および真空採血管を使用して頸静脈から全血および血清を採取した。全血サンプルは直ちに多項目自動血球計数装置 (KX-21NV; Sysmex, Kobe, Japan) を用いて測定を行った。また、血液塗抹標本を作製し白血球を分類した。血清は $2500\times g$ 、20 分間、 4°C で遠心分離を行い、生化学検査 (AU400; Beckman Coulter, Brea, CA, USA) および PCT 濃度測定が行われるまで 20°C で保存した。

血清 PCT の測定

血清 PCT 濃度は bovine procalcitonin ELISA kit (Cusabio Biotech, Houston, TX, USA) を用いて測定した。この ELISA キットの検出可能範囲は 40-2500 pg/mL である。検出限界以下であった症例の PCT 値は 0 pg/mL とした。Day 1 または day 2 に PCT が検出された症例を PCT+群、検出されなかった症例を PCT-群とした。

原因菌検索

11 症例（PCT+群 4 症例、PCT-群 7 症例）について、主要な BRD の原因菌である *Pasteurella multocida* と *Mannheimia haemolytica* [14] について細菌検査を行った。初診時に罹患牛の左右鼻腔よりアルコール綿で消毒後、滅菌綿棒を用いて採材し、5%羊血液加普通寒天培地（島津ダイアグノスティクス、東京、日本）に塗布、37°C、24 時間好気培養を行った。*P. multocida* および *M. haemolytica* はグラム染色後顕微鏡にて観察、ID Test HN-20 Rapid（島津ダイアグノスティクス、東京、日本）で同定を行った。

統計解析

PCT+群およびPCT-群における BRD スコアは Mann-Whitney's U test、リンパ球数、単球数、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）は Welch's t test を用いて統計解析を実施し、有意差水準 5%以下を統計学的に有意差ありと判断した。結果の数値は平均 $\pm$ SE で示した。

結果

BRD スコアと臨床症状

供試牛の 41 頭中 37 頭は初診時（day 1）の BRD スコアが ≥ 5 であった。全 BRD 罹

患子牛の day 1 の BRD スコアの平均値は 9.3 ± 0.5 であった。血球計算、血液性化学検査、その他の臨床症状は Table 3 および 4 に示した。BRD の症例ではアルブミン濃度の低下、桿状核好中球の増加、リンパ球の微増、血中尿素窒素 (BUN) の低下、非エステル化脂肪酸の上昇が認められた。聴診所見は水泡音 (coarse crackles) が 2 例 (4.9%)、笛音 (wheezing) が 8 例 (19.5%)、いびき音 (rhonchi) が 3 例 (7.3%)、胸膜摩擦音 (pleural friction rub) が 1 例 (2.4%)、肺野における気管支音 (bronchial sounds in the lung fields) が 11 例 (26.8%) に認められた (Table 3)。

血清 PCT

対照群としたすべての健康子牛では血清中 PCT 濃度は検出限界以下であった。一方で、BRD の子牛の 41 頭中 10 頭で day 1 または day 2 における血清 PCT 濃度の上昇が認められた。この PCT の上昇を認めた子牛を PCT+群とした。PCT+であった症例では試験期間中 PCT 濃度が高い状態が持続した。PCT+群の day 1、2、3 および day 7 における PCT 濃度の平均 $\pm$ SE はそれぞれ 411 ± 160 、 358 ± 156 、 569 ± 231 、 530 ± 254 pg/mL であった。残りの 31 症例の血清 PCT 濃度は検出限界 (40 pg/mL) 以下であり、PCT-群とした。

PCT+群および-群における day 1、2、3、7 の BRD スコアの変化を Figure 4 に示した。Day 1 における BRD スコアの分布には有意差は認められなかったが (Figure 4A)、

day 3 および 7 における PCT+群の BRD スコアは PCT-群のスコアより有意に高値を示した (Figure 4B; $P = 0.003$ および 0.048 ; Mann-Whitney's U test)。

PCT+群およびPCT-群の day 1 における臨床兆候および血清生化学検査結果を Table 3 に示した。Day 1 におけるリンパ球数、AST 濃度は有意な違いが認められた。PCT+群における day 1 のリンパ球数は PCT-群と比較して有意に低値を示し、PCT+群における AST 濃度は PCT-群と比較して有意に高値を示した (Table 3)。Day 1 においてはその他の項目について両群間で有意差は認められなかった。リンパ球数の経時的変化では、day 1 および day 2 における PCT+群のリンパ球数が day 1 および day 2 における PCT-群と比較してそれぞれ有意に低値を示した (Figure 5A)。これに対し、PCT+群における day 2 の単球数は PCT-群より有意に高値であることが認められた (Figure 5B)。Day 1 において、AST 濃度もまた PCT+群で PCT-群と比較して有意に高値を示した (Figure 5C)。

原因菌検査

P. multocida は PCT-群の 1 症例を除いてすべての症例から分離された。それに対し、*M. haemolytica* はどの症例からも検出されなかった。従って、少なくとも *P. multocida* と *M. haemolytica* において細菌感染と PCT の positive/negative であることの関連性について言及することはできなかった。

小括

急性期蛋白質には炎症時血中濃度が増加するポジティブな急性期蛋白質と、血中濃度が減少するネガティブな急性期蛋白質があり、ウシにおいて Hp、 α 1-acid glycoprotein、Serum amyloid A などはポジティブに分類される[37]。血清アルブミンはネガティブな急性期蛋白質[37]であり、BRD で低下すると報告があるように、本研究でも BRD の炎症を反映してアルブミン濃度の低下が認められ、さらに、桿状核好中球の増加、リンパ球の微増、BUN の低下、非エステル化脂肪酸の上昇が認められた (Table 3)。PCT+群および PCT-群における血液検査の結果、PCT+群における day 2 の単球数は PCT-群より有意に高値であることが認められた (Figure 5B)。単球は急性ストレスや急性および慢性炎症からの回復過程において増加するため[40]、PCT+群における単球の上昇はこれらを反映していると推察された。Day 1 において、AST 濃度もまた PCT+群で PCT-群と比較して有意に高値を示した (Figure 5C)。AST 濃度の上昇は PCT+群におけるより重度の組織ダメージの結果であると示唆された。PCT+群と PCT-群間でリンパ球数、単球数、AST 濃度に有意差は認められたが、これらの値は両群とも正常範囲内であった。それゆえこれらを有効なバイオマーカーとすることは困難であると考えられた。それに対し、血清 PCT は、感染していない健康な子牛では通常検出されず、

特に細菌感染に特異的であるため、BRD のバイオマーカーとして有用であると考えられた。

BRD は発咳、呼吸困難、発熱などの臨床兆候、身体検査、聴診、臨床検査などを基に診断されることが多い。本研究で用いた BRD スコアリングシステムは、多数の臨床兆候を定量化する簡便な手法であるが、初診時の BRD スコアの分布は PCT+群と PCT-群において明らかな違いはなかった。しかしながら、我々のデータは初診時の PCT 値と day 3 および day 7 の BRD スコアとの相関を示した (Figure 4B)。これらの結果は、血清中 PCT 濃度の測定が、BRD の診断および予後判定を行うにあたり有益な情報を提供することを示唆している。すなわち、初診時に PCT 陽性であることは重症化と関連しており、その後症状が残存する可能性を示すことが明らかとなった。PCT は細菌感染に特異的なバイオマーカーであり、BRD の症状を増悪させる viral-bacterial synergy を評価するにあたり特に重要な指標である。これらの知見から、BRD 診断および予後判定における PCT 測定の有用性が示されたと考えられる。

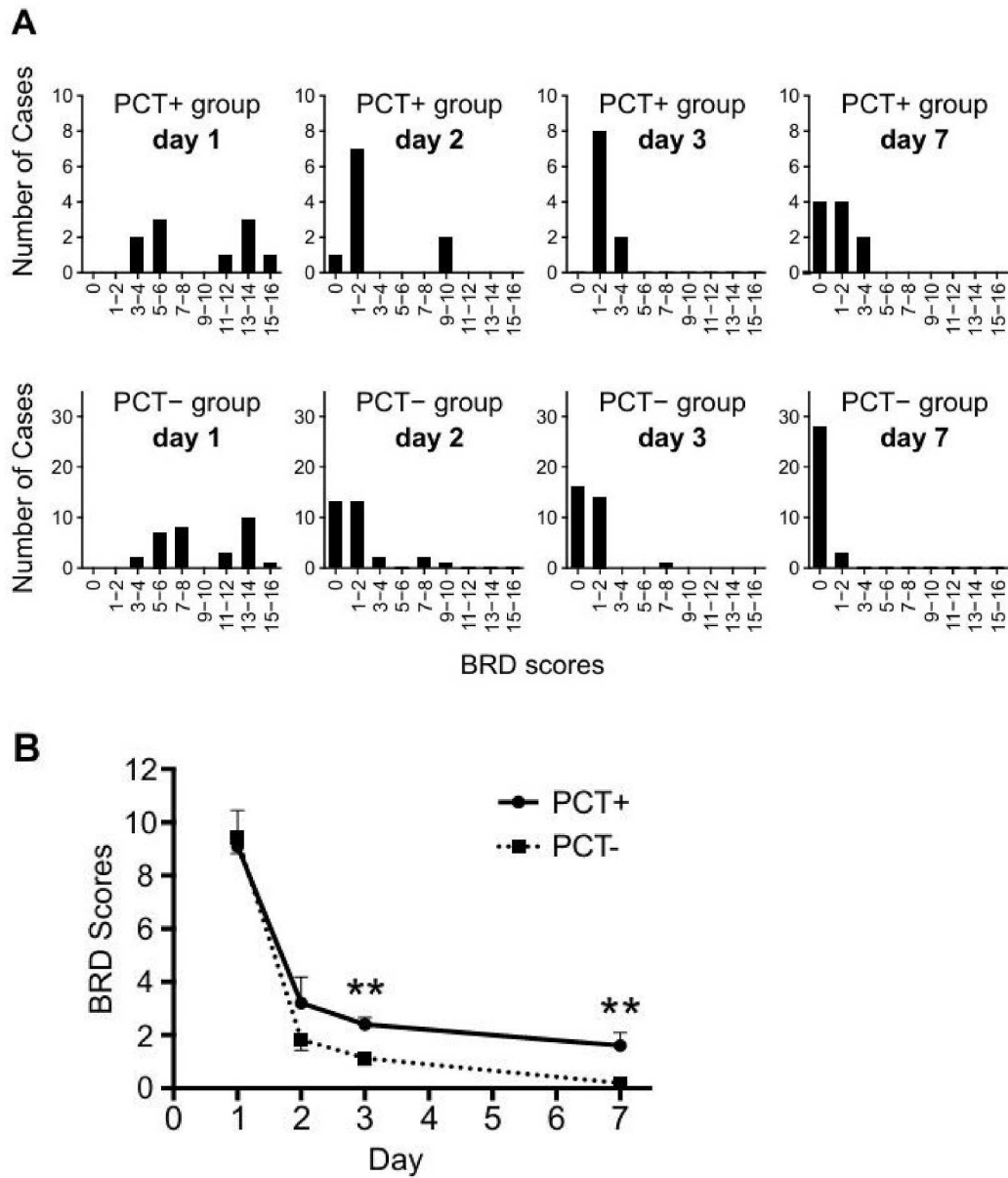


Figure 4. プロカルシトニン (PCT) 陽性群および陰性群における牛呼吸器疾患 (BRD)

スコアの比較

(A) PCT+群 (上段、n = 10) および PCT-群 (下段、n = 31) の BRD 子牛における

BRD スコアの分布

(B) PCT+群と PCT-群における BRD 子牛の BRD スコアの時間経過

データは平均値 $\pm$ SE で示す

PCT+群の BRD スコアは、day 3 および day 7 において PCT-群よりも有意に高い

** $: P < 0.01$; Mann-Whitney's U test

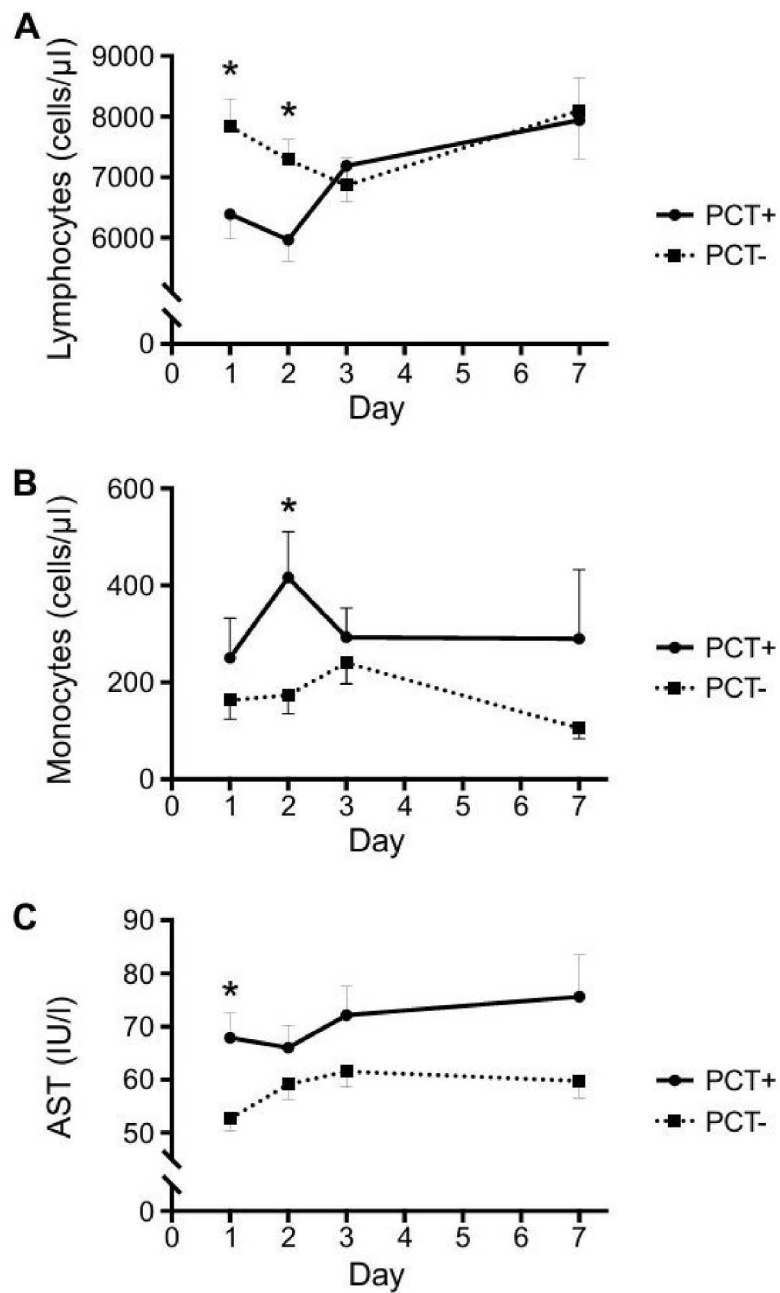


Figure 5. プロカルシトニン (PCT) 陽性群および陰性群におけるリンパ球数、単球数、

およびアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 濃度の比較

(A) PCT+群および PCT-群の BRD 子牛におけるリンパ球数の経時変化

(B) PCT+群および PCT-群の BRD 子牛における単球数の経時変化

(C) PCT+群および PCT-群の BRD 子牛における AST 値の経時変化

データは平均値 $\pm$ SE で示す

* $P < 0.05$; Welch's t test

Table 3. Day 1 におけるプロカルシトニン (PCT) 陽性群および陰性群にける臨床徴候

および血液生化学検査結果との関連性

	PCT+ group	PCT- group	Normal value ^{a)}
Age (days)	218.5 ± 25.7 ^{b)}	172.0 ± 18.6	
Temperature (°C)	40.2 ± 0.3	40.4 ± 0.1	38-39
Heart rate (/min)	109.5 ± 6.2	119.3 ± 5.4	40-80
Respiration (/min)	72.0 ± 12.7	63.1 ± 3.6	12-36
BRD score	9.1 ± 1.4	9.4 ± 0.6	
WBC (/μl)	8870 ± 621	10028 ± 590	4000-12000
Neu (/μl)	2105 ± 427	2021 ± 319	600-4000
Band (/μl)	163 ± 55	121 ± 56	0-120
Lym (/μl)	6388 ± 406*	7839 ± 453	2500-7500
Mon (/μl)	250 ± 81	162 ± 39	25-840
Eos (/μl)	155 ± 63	81 ± 24	0-2400
RBC (×10 ⁴ /l)	803 ± 10	801 ± 24	500-1000
Ht (%)	32.8 ± 0.8	33.9 ± 1.0	29-39
Hb (g/dl)	10.7 ± 0.1	11.3 ± 0.7	8-15
AST (IU/l)	67.9 ± 4.6**	52.7 ± 2.2	43-127
TP (g/dl)	6.5 ± 0.3	6.4 ± 0.1	6.7-7.5
Alb (g/dl)	2.4 ± 0.1	2.8 ± 0.2	3-3.6
Tchol (mg/dl)	88.8 ± 9.4	100.0 ± 7.7	80-120
Glu (mg/dl)	77.3 ± 5.7	78.9 ± 3.9	45-75
BUN (mg/dl)	11.7 ± 1.0	10.8 ± 1.0	20-30
NEFA (μEq/l)	242.1 ± 49.7	224.0 ± 25.2	144.6 ± 4.3

a) 正常値は引用文献[16, 41]より引用

b) データは平均値 ± SE で示す

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

BRD:牛呼吸器疾患, WBC:白血球, Neu:好中球, Band:桿状核好中球, Lym:リンパ球,

Mon:単球, Eos:好酸球, RBC:赤血球, Ht:ヘマトクリット, Hb:ヘモグロビン, AST:アス

パラギン酸アミノトランスフェラーゼ, TP:総蛋白, Alb:アルブミン, Tchol:総コレステ

ロール, Glu:グルコース, BUN:尿素窒素, NEFA:遊離脂肪酸

Table 4. 牛呼吸器疾患（BRD）罹患子牛の day 1 における臨床兆候

	n	(%)
Ausculation of abnormal lung sounds		
Discontinuous sounds	Coarse crackles	2 (4.9)
	Fine crackles	0 (0)
Continuous sounds	Wheezes	8 (19.5)
	Rhonchi	3 (7.3)
Pleural friction rub	1	(2.4)
Bronchial sounds in the lung fields	11	(26.8)
Clinical signs		
Abdominal respiration	7	(17.1)
Oral respiration	1	(2.4)
Cough	41	(100)
Purulent nasal discharge	2	(4.9)
Dyspnea	22	(53.7)
Polypnea ^{a)}	36	(87.8)
Low auricular reflex	19	(46.3)
Cyanosis	0	(0)

a) 成牛および子牛（30 日齢未満）の呼吸数の正常値は、それぞれ 12～36 回および 30

～60 回

n = 41

第2章 子牛の牛呼吸器疾患における血清ハプトグロビンと血清プロカルシトニンの

比較検討

小序

第1章で、BRD罹患子牛における血清PCT検出の有無がBRD関連症状の持続と関連していることを実証し、PCTがBRDの予後判定に有用なバイオマーカーとなる可能性を示した。第2章では、BRDにおけるPCTの変動とその上昇の意義を明らかにするために、ウシの主要な急性期蛋白質として既に知られているHpとPCTの関連性に焦点を当てた。

BRDは、ウイルスや細菌などの病原体の感染と環境ストレスの複合的な影響によって引き起こされる疾患である。そのため、BRDの複雑な病態をより正確に評価するには、反応性の異なるバイオマーカーを適切に用いることが重要である。第1章で示されたように、細菌感染に特異的なPCTはBRDの診断や重症度評価において有用性が示唆される。一方、Hpはウシの主要な急性期蛋白質として知られ、外傷、非感染性炎症、ウイルス感染、細菌感染に反応して上昇する[26, 37]。HpはBRDの診断にも有用性が報告されている[14, 27, 46]。BRDの主原因がウイルス感染であっても、二次的な細菌感染が病態の進行に関与する可能性があるため[18]、BRDではHpとPCTは異なる

反応と時間経過を示す可能性がある。しかし、BRD の子牛の臨床兆候と PCT や Hp との関係を検討した報告はない。そこで第 2 章では、BRD に罹患した子牛のバイオマーカーとしての Hp と PCT の特徴を、血清中濃度の動態、予後との相関、臨床兆候との関連を比較検討した。

材料および方法

供試牛

供試牛は、愛媛県の 3 農場で飼育された生後 157～399 日の子牛 22 頭であった。調査期間は 2013 年 12 月から 2016 年 2 月までで、この間に畜主により異常を発見された子牛は、その後 0～1 日後までに BRD と診断された (day 1)。BRD を発症した子牛 22 頭は、黒毛和種の子牛 13 頭と黒毛和種とホルスタイン種の交雑種 (F1) の子牛 9 頭で構成されていた。BRD 罹患子牛は抗菌薬による治療が開始され、抗炎症剤などの他の薬剤は使用しなかった。治療回数は 4.2 ± 0.9 回 (2～9 回) で、治療後に治癒転帰となった。試験期間中に死亡した子牛はいなかった。対照群は、前述の農場の 1 つで飼育された健康な F1 子牛 5 頭 (105～127 日齢) とした。

BRD の診断

BRD 群では、診断のために day 1 に身体検査、聴診、BRD スコア測定を実施した。

BRD スコアは第 1 章と同様にカリフォルニア BRD スコアリングシステム[3] (Table 1) を用いた。合計 BRD スコア 5 以上で BRD と診断することが提唱されている[24]。

BRD スコアは day 2、day 3、day 7 に再評価された。

採血、血液・生化学検査

採血のタイミング、処理、測定方法は第 1 章と同様に行った。要約すると、day 1、day 2、day 3、day 7 に BRD 子牛から採血した。ヘパリン処理した全血サンプルから、白血球を分類し、自動血球計数装置 (KX-21NV; シスメックス、神戸、日本) で分析した。血清サンプルは、遠心分離して調製し生化学検査 (AU400; Beckman Coulter, Brea, CA, USA)、血清 Hp および PCT 測定を開始するまで-20°Cで保存した。

血清 Hp および PCT 濃度の測定

血清中の Hp 濃度は、bovine haptoglobin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) test kit (Life Diagnostics, Inc., ウェストチェスター、ペンシルベニア州、米国) を用いて測定した。血清中 PCT 濃度の測定には第 1 章と同様の ELISA キットを用いた。

BRD 原因微生物検査

Day 1 に BRD 罹患子牛 11 頭において左右鼻腔から滅菌綿棒を用いて検体を採取し、*P. multocida*、*M. haemolytica*、*Streptococcus* spp. について検査を行った。*P. multocida* および *M. haemolytica* における分離培養方法および同定方法は第 1 章と同様に行った。*Streptococcus* spp. はグラム染色後顕微鏡観察およびカタラーゼ試験陰性を確認した。

牛伝染性鼻気管炎ウイルス (IBRV)、牛パラインフルエンザウイルス 3 型 (PI-3)、牛 RS ウイルス (BRSV) の抗原検査を愛媛県南予地方局八幡浜支局南予家畜保健衛生所に依頼した。

統計解析

得られたデータは、GraphPad Prism 7 version 7.0e (GraphPad Software、サンディエゴ、カリフォルニア州、米国) または R version 4.2.1 14 を使用して統計解析を行った。

結果

臨床症状および BRD スコア

Day 1 の BRD 罹患子牛における BRD スコアは 9.5 ± 0.9 、22 頭中 18 頭が BRD スコ

ア 5 以上、残りの 4 頭はスコア 4 であった。BRD 群の体温は $40.4 \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ 、心拍数は $114.8 \pm 7.0/\text{min}$ 、呼吸数は $65.3 \pm 5.3/\text{min}$ であった。異常な呼吸様態は腹式呼吸 (abdominal respiration) を示した子牛が 22.7%、開口呼吸 (oral respiration) は 9.1% で観察された。聴診では異常な呼吸音として笛音 (wheezing) 31.8%、いびき音 (rhonchi) 9.1%、捻髪音 (fine crackles) 9.1%、水泡音 (coarse crackles) 4.5%、気管支音増強 (increased bronchial sounds) 22.7%、胸膜摩擦音 (pleural friction rub) 4.5% が認められた。

血清 Hp および PCT 濃度

対照群の健康な子牛 5 頭は、低レベルの血清 Hp ($2.7 \pm 0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$) および、検出限界未満の血清 PCT 濃度 ($\text{PCT} = 0 \text{ pg}/\text{ml}$) を示した。一方、day 1 の BRD 群 22 頭の血清 PCT および Hp 濃度 (それぞれ $186.6 \pm 83.5 \text{ pg}/\text{ml}$ および $479.8 \pm 75.7 \mu\text{g}/\text{ml}$) は、対照群のそれらの値よりも有意に高かった (Figure 6A および B)。個々の症例について、血清 PCT 濃度を血清 Hp 濃度に対してプロットしたところ (Figure 6C)、PCT と Hp との間に有意な相関は認められなかった ($r = -0.100$ 、 $P = 0.6593$)。

BRD 群における試験期間中の血清 PCT、Hp および BRD スコアの変化を Figure 7 に示した。BRD 群の血清 Hp は day 1 と比較し day 7 では有意に低下した。一方、BRD 群の血清 PCT は試験期間中有意な変化は見られなかった。BRD 群の BRD スコアは

day 1 と比較して day2 、 day 3 および day 7 に有意に低下した。

BRD 群の血清 Hp 濃度は、day 1 において体温（直腸温）と正の相関を示した（ $r = 0.687$ 、 $P = 0.0016$ ）（Figure 8A）。一方、血清 Hp 濃度と呼吸数との間には有意な相関は認められなかった（ $r = 0.364$ 、 $P = 0.1659$ ）（Figure 8B）。PCT と体温または呼吸数との間にも有意な相関は認められなかった（それぞれ $r = -0.110$ 、 $P = 0.6627$ ； $r = 0.091$ 、 $P = 0.7387$ ）。

また、BRD 群の day 1 の血清 Hp は day 1 の白血球数およびリンパ球数と負の相関を認め（それぞれ $r = -0.438$ 、 $P = 0.0471$ 、 $r = -0.601$ 、 $P = 0.00369$ ）（Table 5）、BRD 群の day 1 の血清 PCT は day 1 の血清 AST と弱い相関を示した（ $r = 0.452$ 、 $P = 0.0348$ ）（Table 5）。BRD 群において血清アルブミンの低値が認められたが、Hp および PCT との関連性は見られなかった（Table 5）。その他のパラメータは Hp および PCT と有意な関連性は認められなかった。

原因微生物検査

11 頭の鼻腔スワブによる原因微生物検査結果と検出微生物ごとの血清 PCT、Hp、BRD スコアを Table 6 に示した。サンプル数が少ないため、病原体の種類による各マーカーの明らかな傾向は認められず、統計学的な処理を行うには至らなかった。

Hp および PCT と BRD 症状の関連性

Day 2、3 および day 7 の採材、BRD スコア評価の際に、7 頭で day 7 まで BRD スコア >0 、すなわち BRD の症状が持続していた。Day 7 まで持続していた症状は呼吸異常 5 頭（笛音 1 頭、気管支音増強 4 頭）、気管支音増強と熱発 1 頭、水泡音と熱発 1 頭であった。Day 1 の PCT は day 7 の BRD スコアと正の相関を示した ($r = 0.611$, $P = 0.00255$) (Table 5)。Day 1 の Hp および BRD スコアは day 7 の BRD スコアと有意な相関は認められなかった（それぞれ、 $r = 0.218$, $P = 0.33$, $r = -0.00502$, $P = 0.982$ ）。

Day 1 の Hp、PCT、BRD スコアと day 7 の症状の有無（BRD スコア ≥ 0 ）との関係を調べるため、Hp、PCT、BRD スコアの感度と特異度を算出し、ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線を作成した (Figure 9)。分類モデルの予測性能の指標である ROC 曲線下面積 (AUC) は、Hp、PCT、BRD スコアでそれぞれ 0.657、0.824、0.543 であった。Day 7 の症状の有無を予測するための、血清中 PCT 濃度および Hp 濃度のカットオフ値は、それぞれ 17.8 pg/ml (感度 0.867, 特異度 0.857) および 435.8 $\mu\text{g/ml}$ (感度 0.533, 特異度 0.857) であった。

小括

PCT はヒトの細菌感染症の特異的バイオマーカーであると考えられている [20, 23,

38]。最近の研究では子牛の血液中の PCT が測定されており [2, 9, 14]、ホルスタイン種の健康な新生子牛の血漿中 PCT 濃度の平均値は 33.3 pg/ml であると報告されている [9]。また、健康な黒毛和種の子牛の血漿中 Hp 濃度の平均値は 0.1 μ g/ml であると報告されている [46]。本研究で測定した健康な F1 肥育子牛の血清中 PCT および Hp 濃度は、それぞれ検出限界以下および $2.7 \pm 0.2 \mu$ g/ml であった (Figure 6A)。これらの低値は、以前に報告された値と類似していた。一方、BRD を発症した子牛の血清中 Hp および PCT 濃度は、健康な対照子牛と比較していずれも有意に高値を示した (Figure 6)。本研究では血清 PCT と Hp 濃度には関連が認められなかった。これは、PCT と Hp の分泌機序が異なるためであると推察された。すなわち、急性期蛋白質である Hp は炎症性サイトカイン (IL-6、TNF- α 、IL-1 β) により合成分泌が刺激され血中濃度が上昇する [28, 37]。PCT は TNF、IL-1 β 、IL-6、IL-8、IL-10 といった炎症性サイトカインの刺激により分泌されるとともに、組織損傷や細菌の LPS により直接的に PCT の発現が誘導される [12]。PCT と Hp が比較的独立した反応を示すという事実は、それらの時間経過を評価した際にも浮き彫りになった (Figure 7)。血清 Hp は day 1 に高かったが、day 7 に有意に減少した (Figure 7)。これは、BRD の治療後に Hp が減少したという報告と一致する [50]。

Day 1 において血清 Hp 濃度はリンパ球数と負の相関を示した (Table 5)。BRD による急性炎症でリンパ球の減少が報告されており [6]、本研究で見られた Hp とリンパ球

の負の相関は day 1 における急性期炎症の強さを反映していると推察された。しかしながら、day 1 リンパ球数の平均値は正常範囲内であった。Day 1 の Hp と直腸温には有意な正の相関が認められた (Figure 8A および Table 5)。Hp はウシにおける主要な急性期蛋白質として知られているように、本研究においても急性期の炎症を反映していると考えられた。

Hp とは対照的に、PCT では持続的な上昇が観察された (Figure 7)。PCT 値の持続的な高値は敗血症患者の予後不良と関連することが報告されており、PCT は重症敗血症の予後予測バイオマーカーとして有用であることが示されている[4]。さらに、day 1 の PCT 値と AST の間に相関が認められたことから (Table 5)、PCT 値が高い子牛は肺組織の損傷を伴う BRD により、呼吸異常が 7 日目まで続いた可能性がある。本研究で実施した ROC 解析では、PCT が最も優れた AUC 値を示し (Figure 9)、day 1 の血清 PCT 濃度と day 7 の症状 (呼吸異常) の有無との間に関連性があることが示された。また、ROC 解析の結果は、PCT 値が疾患の持続性を反映している可能性を示唆しており、予後予測に関しては Hp よりも優れていると考えられた。これらの所見から、PCT 測定は、BRD の持続的病態、特に呼吸異常を引き起こす可能性のある組織損傷 (例えば肺損傷) の診断および治療戦略の選択に有用であることが示唆された。

BRD 罹患子牛において、血清アルブミンの低下傾向が認められた (Table 5)。ウシにおいてアルブミンは、ネガティブな急性期蛋白質として知られており[26, 37]、本研究

においてアルブミンの低下は BRD の炎症を反映したものであると推察された。Day 1 における呼吸数、好中球数、単球数、アルブミン/グロブリン比は PCT および Hp と有意な関連は見られなかった (Table 5)。BRD 罹患子牛において呼吸数の増加が観察されたが、これは熱発と肺機能低下によるものであると考えられた[1]。呼吸数増加は暑熱、運動、急性ストレスでも起こりうる[45]ことから、BRD における呼吸数の増加は、症状の重症度とは無関係であると報告されている[1]。好中球は重度の BRD で上昇すると報告されている[1]。本研究では好中球数は関連が認められなかったが、おそらく重度の症例が含まれていなかったためであると推察された。単球増加は急性ストレス、急性および慢性感染症の回復期に認められる[40]。第 1 章では、PCT の上昇が見られた BRD 罹患牛において単球増加を認めたが[22]、本研究の day 1 においては観察されなかった (Table 5)。BRD においてアルブミン/グロブリン比は低下すると報告されている[25]。一方で、アルブミン/グロブリン比が低下しない BRD 症例もあるとの報告もあり[7, 25]、アルブミン/グロブリン比の低下は BRD 重症度と関連している[25]。本研究では基準値内であったがこれは本研究では重症 BRD の症例がなかったためと推察された。

本研究により明らかとなった PCT と Hp の特徴的な反応性および持続性の違いは、これらのマーカーを組み合わせることで、BRD 罹患牛の病態をより多角的かつ詳細に評価できることを示唆している。BRD 慢性症例の長期的な追跡調査、より重

症例の調査、BRDの原因となる病原体の分類など、さらなる研究により、HpとPCTのBRDのバイオマーカーとしての有用性について、より詳細な情報が得られることが期待される。

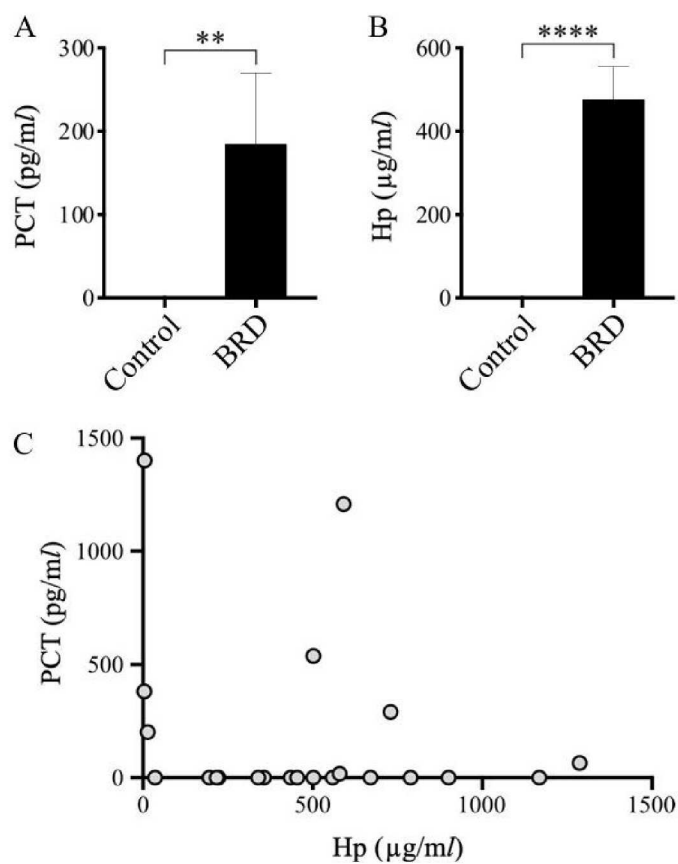


Figure 6. 健康な対照子牛および牛呼吸器疾患（BRD）罹患子牛における day 1 の血清

プロカルシトニン（PCT）およびハプトグロビン（Hp）濃度

(A) Day 1 の対照群（n = 5）および BRD 罹患子牛（n = 22）の血清 PCT 濃度

血清濃度は平均値 ± SE で示す

**: $P < 0.01$ (Brunner–Munzel 検定)

(B) Day 1 の対照群（n = 5）および BRD 罹患子牛（n = 22）の血清 Hp 濃度

血清濃度は平均値 ± SE で示す

****: $P < 0.0001$ (Mann-Whitney U test)

(C) BRD 罹患子牛の day 1 における血清 Hp 濃度と血清 PCT 濃度の相関関係(n = 22)

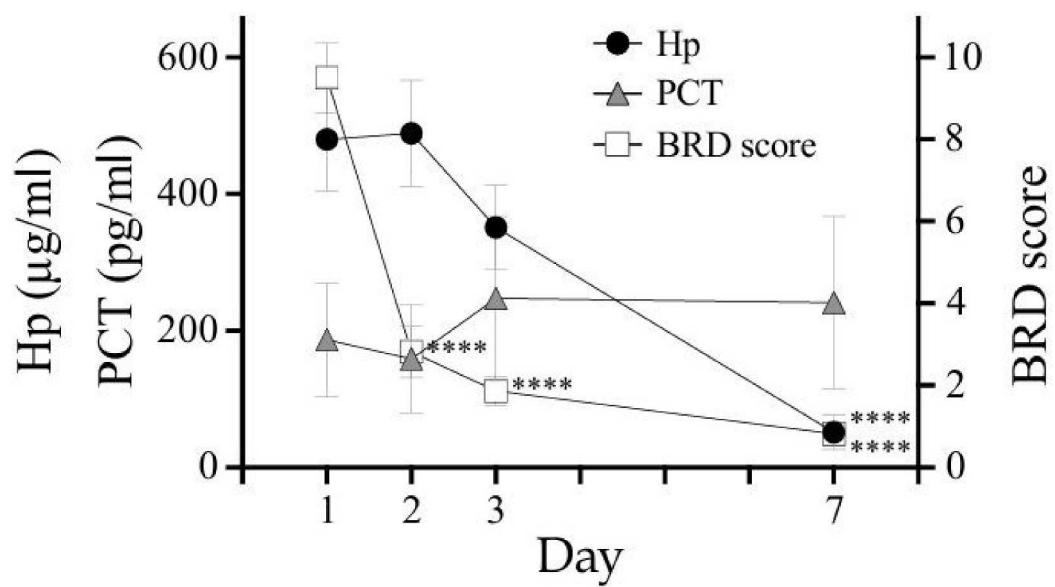


Figure 7. 牛呼吸器疾患（BRD）罹患子牛における血清プロカルシトニン（PCT）、ハプトグロビン（Hp）、および BRD スコアの変化

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ (Bonferroni's multiple comparison)

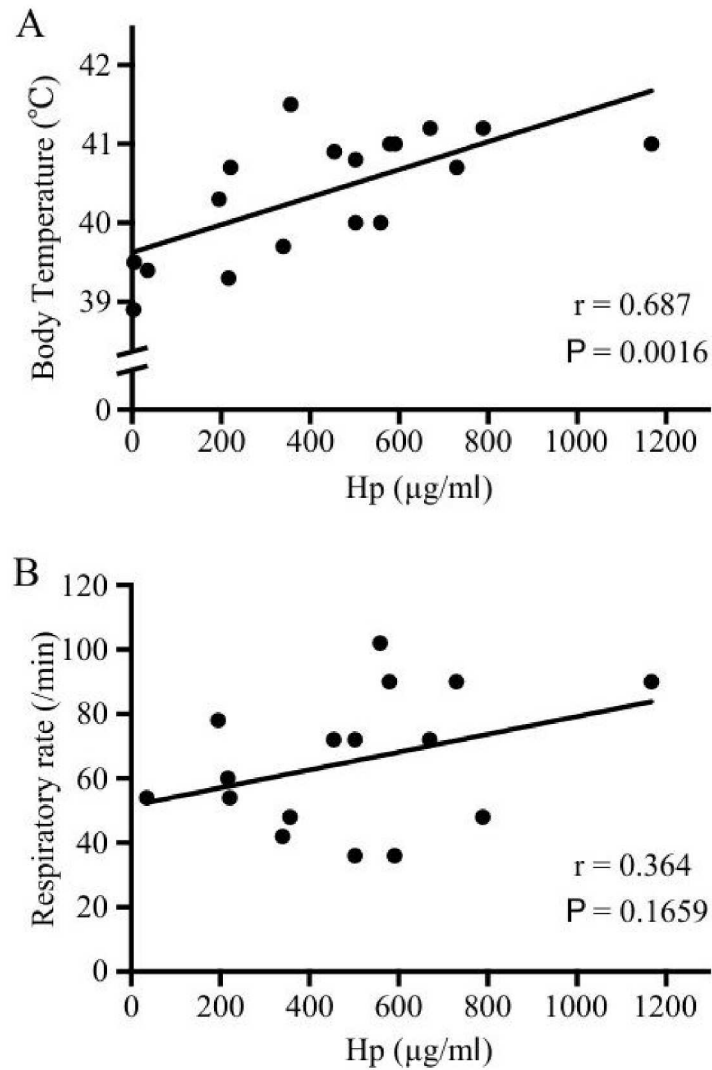


Figure 8. 牛呼吸器疾患（BRD）罹患子牛の day 1 における血清ハプトグロビン（Hp）

濃度と体温および呼吸数の相関関係

(A) Day 1 における血清 Hp 濃度と体温（直腸温）の相関（n = 18）

(B) Day 1 における血清 Hp 濃度と呼吸数の相関（n = 16）

r: ピアソンの積率相関係数

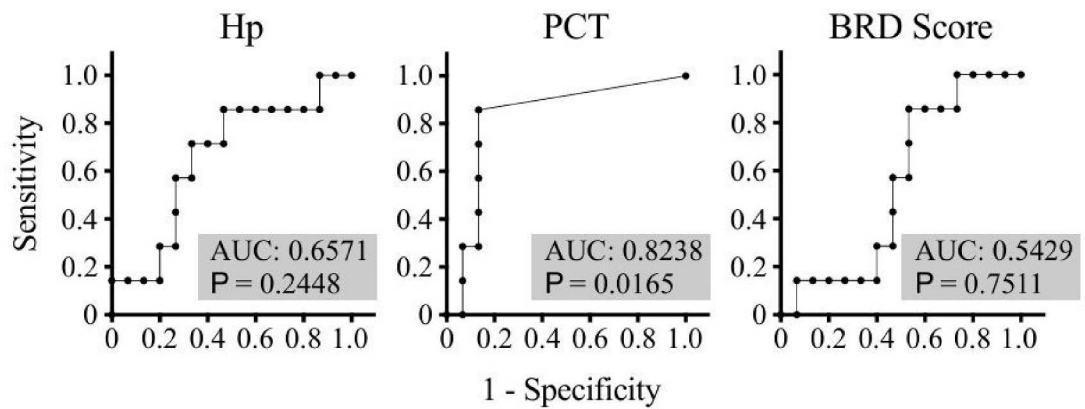


Figure 9. 牛呼吸器疾患 (BRD) 罹患子牛の day 1 における血清ハプトグロビン (Hp)、プロカルシトニン (PCT) 濃度、BRD スコアを用いた day 7 の症状有無予測 : Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析

Day 7 に症状なし : $n = 15$ 、症状あり : $n = 7$

AUC : 曲線下面積

Table 5. 牛呼吸器疾患（BRD）罹患子牛における day 1 プロカルシトニン（PCT）およびハプトグロビン（Hp）と一般身体検査値、血液検査値、BRD スコア値との関連性

Parameter	Reference value [11, 16, 41]	Value in BRD-affected calves (day 1 value except for BRD score)	vs. day 1 PCT		vs. day 1 Hp	
			Correlation coefficient	P value	Correlation coefficient	P value
Temperature (°C)	38-39	40.4 ± 0.2	-0.11	0.663	0.732	0.000549
Respiration (min)	12-36	65.3 ± 5.3	0.0906	0.739	0.261	0.329
WBC (/μl)	4000-12000	9276.2 ± 520.2	-0.0097	0.967	-0.438	0.0471
Neu (/μl)	600-4000	1864.8 ± 284.6	0.227	0.31	-0.0734	0.745
Band (/μl)	0-120	117.9 ± 37.3	0.176	0.434	0.292	0.187
Lym (/μl)	2500-7500	7175.2 ± 344.2	-0.185	0.411	-0.601	0.00369
Mon (/μl)	25-840	212.2 ± 49.2	-0.0559	0.805	-0.114	0.613
AST (IU/L)	43-127	57.4 ± 3.1	0.452	0.0348	-0.255	0.252
Alb (g/dL)	3.03-3.55	2.9 ± 0.2	-0.435	0.0553	0.0634	0.791
Albumin/Globulin	0.84-0.94	0.9 ± 0.2	-0.273	0.243	-0.147	0.534
Day 1 BRD score		9.8 ± 0.9	-0.0618	0.785	0.22	0.325
Day 7 BRD score		0.8 ± 0.3	0.611	0.00255	0.218	0.33

WBC: 白血球, Neu: 好中球, Band: 桿状核好中球, Lym: リンパ球, Mon: 単球, AST:

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ, Alb: アルブミン

データは平均 ± SE で示す

スピアマンの順位相関係数

Table 6. 牛呼吸器疾患 (BRD) 罹患子牛 11 頭における鼻腔スワブによる細菌培養およびウイルス抗原検査の結果ならびに day 1 の血清プロカルシトニン (PCT)、ハプトグロビン (Hp)、および BRD スコア

Detected pathogen(s)	Number of calves	PCT (pg/ml)	Hp (μg/ml)	BRD score
<i>Pasteurella multocida</i>	3	118.7 ± 87.8	972.5 ± 164.9	7.0 ± 3.0
<i>Pasteurella multocida</i> and <i>Streptococcus</i> spp.	5	107.6 ± 107.6	603.2 ± 170.6	11.0 ± 1.4
<i>Pasteurella multocida</i> , <i>Streptococcus</i> spp., and BRSV	2	604.1 ± 604.1	523.0 ± 68.2	14.0 ± 1.0
Not detected	1	Below detection limit	558.8	13.0

BRSV: 牛 RS ウイルス

データは平均 ± SE で示す

終章 総括と結論

本論文においては、子牛の BRD に対する新規バイオマーカーである PCT の有用性を検討することを目的として、2 つの研究を実施した。研究 1（第 1 章）では、健康群および BRD 罹患群の子牛における血清 PCT 濃度を測定し、血清 PCT の上昇と重症度との関連性を初めて示した。研究 2（第 2 章）では、ウシにおける従来の炎症マーカーである Hp と PCT の比較を行い、PCT の臨床指標としての優位性および両マーカーの違いを明らかにした。本章では、これら 2 つの研究結果を統合的に考察し、PCT の診断および重症度評価における意義、臨床応用への可能性、ならびに今後の課題について論じる。

研究 1 は血中 PCT と、BRD の臨床症状との関連性について、BRD の重症度に関するスコアリングシステムを用いて定量化して調査することを目的とした。特に day 1 における PCT 値の上昇と血液パラメータとの関連について調査した。BRD 罹患子牛において PCT 値は上昇する症例（PCT+群）と検出できない症例（PCT-群）が存在し、PCT+群は有意なリンパ球減少、単球増加、AST 増加、day 7 の BRD スコアの高値を認め、BRD における PCT のバイオマーカーとしての有用性および予後診断の可能性を示唆した。続いて研究 2 として、BRD の炎症マーカーとして知られている Hp と PCT を比較し、それらのバイオマーカーとしての有用性および臨床症状との関連性を

評価することを目的として、PCT および Hp 濃度の時間経過（day 1、2、3、7）における変動、day 1 における PCT および Hp と BRD 症状、血液パラメータとの関連性について調査した。Day 1 に高値を示した Hp は体温、白血球数、リンパ球数と相関し、その後速やかに減少したことから、BRD における急性炎症を反映していると示唆された。一方、PCT は調査期間中を通じて高値を示し、day 1 の PCT は day 7 の BRD スコアおよび day 1 の AST と相関を示した。これらの結果は、BRD における PCT の高値が肺を初めとする組織の損傷を示唆し、それに伴い呼吸異常および発熱などの BRD 症状の持続が day 7 まで持続することを反映していると推察された。すなわち、急性期蛋白質である Hp が初期の炎症を示すのに対し、PCT は持続的な病態の進行を反映していると推察された。この推察は、day 7 の BRD スコアの有無を予測する ROC 解析において、PCT が最も良好な AUC 値を示したことから支持されており、day 1 時点での予後診断において、PCT が Hp および BRD スコアより優れていることが示唆された。

さらに本研究では、Hp と PCT の時間変動を比較することにより、これらのバイオマーカーが異なる動態を示すことが明らかになった。Hp は急性期の炎症を反映し、感染初期に高値を示した後速やかに減少する。一方、PCT は持続的に高値を保ち、BRD の複雑な病態の進行を反映していた。これらの異なる特性を持つバイオマーカーを同時に測定することにより、BRD の複雑な病態を多角的にとらえることができ、急性期の

BRD の診断にとどまらず、これまで診断困難であった 7 日後の予後診断も可能になることが示唆されており、診断精度向上への学術的基盤を提供した。さらに、PCT 測定を用いることで予後診断に客観性を持たせることができ、診療現場でのインフォームドコンセントにおいて畜主および獣医師双方が納得した治療方針の選定に寄与すると期待される。

しかしながら、本研究における限界は重症例および死亡例が存在しなかったこと、症例が愛媛県に限定されていること、症例数が研究 1 は 41 頭、研究 2 では 22 頭と十分とはいえないこと、原因微生物検査が十分でなかったことであり、今後血清 PCT 濃度変化と BRD 病態形成に関与する各種細菌種との関係、ならびに慢性化・重症化した BRD 患畜における PCT 変化をさらに調査することで、BRD に対する PCT のより正確かつ包括的な理解が得られるであろう。さらに、ウシにおいて急性期蛋白質として知られる血清アミロイド A と PCT の関連を調査することで、BRD における PCT の更なる診断的意義が示される可能性がある。

以上より、PCT は BRD 罹患子牛の炎症評価や重症度評価に有用な新規バイオマーカーである可能性が高く、獣医臨床における早期予後診断および治療方針決定の一助となることが期待される。

研究発表実績

研究論文

1. Koshiishi, T., Shibutani, S., Chuma, T. and Iwata, H. 2023. Measurement of serum procalcitonin concentrations in calves with bovine respiratory disease. Japanese Journal of Veterinary Research. 71: 65–71.
2. Koshiishi, T., Hisaeda, K., Nasu, M., Shibutani, S., and Iwata, H. 2025. Comparison of serum haptoglobin and procalcitonin in calves with bovine respiratory disease Japanese Journal of Veterinary Research 73(2): 36–44.

学会発表

興石 智子, 久枝 啓一, 那須 正信, 渋谷 周作, 中馬 猛久, 岩田 祐之. 2024. 牛呼吸器疾患罹患牛における血清プロカルシトニン濃度の測定. 第 46 回動物臨床医学会年次大会.

要約

牛呼吸器疾患 (BRD) は罹患率および死亡率が高く、畜産農家に経済的損失をもたらすため、肉用牛および乳用牛において最も重要な疾患の一つとなっている。BRD の早期診断のためのツールは十分とはいえず、血液バイオマーカーの研究は限られている。BRD の早期診断のための有用性が期待できるバイオマーカーとしてプロカルシトニン (PCT) が挙げられる。PCT はカルシトニンの前駆物質で、ヒトにおいて PCT は細菌感染時に全身組織で産生が誘導され、血中濃度が上昇することが知られている。医療では血清 PCT は重症細菌感染症の診断、予後診断などに利用されている。ウシにおける PCT の測定は子牛の敗血症、BRD、牛乳房炎で行われた報告があり、罹患牛で上昇が認められている。一方、ハプトグロビン (Hp) は BRD 診断においてすでに有用性が認められている。

本研究は、(1) BRD 罹患子牛における PCT の重症度判定の有用性および血液パラメータとの関連性、(2) BRD 罹患子牛における PCT と Hp の時間的変動ならびに臨床兆候との関連性を検討した。研究 1 の結果、PCT は血液パラメータとの関連が認められ、BRD における診断および予後診断の有用性が示唆された。研究 2 では、PCT は Hp と独立した動態を示した。PCT は高値が持続し肺組織損傷による持続的病態を反映することが示され、7 日目の呼吸異常の持続などの予後予測に際し、Hp より優れて

いることが示唆された。一方、急性期蛋白質として知られる Hp は急性炎症を反映した。これらの PCT および Hp の特徴の違いは分泌機序の違いが関連していると考えられた。

PCT および Hp を同時に測定することで、BRD の病態を多角的に評価でき、急性期の BRD の診断にとどまらず 7 日目の予後診断の可能性を示したことは、診断精度向上の学術的基盤となる。また、PCT 測定は予後診断に客観性を付与し、畜主および獣医師双方が納得した治療方針の選定に貢献することが期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、指導教官として終始多大なご指導を賜った、山口大学共同獣医学部 病態制御学講座 獣医衛生学分野 岩田祐之教授ならびに渋谷周作准教授に深謝致します。また、本研究の遂行に関し、多大なるご理解とご協力をいただいた愛媛県農業共済組合連合会南予家畜診療所および大洲駐在所の皆様にも厚く御礼申し上げます。

多大なご助言、ご協力頂きました獣医衛生学研究室の皆様にも心より感謝申し上げます。

最後に、学業および私生活において支えてくれた家族にも心から感謝の意を表します。

参考文献

1. Aktaş, M. S., Eren, E., Aydın, Ö., Yanar, K. E., Küçükler, S., Eroğlu, M. S., Değirmençay, Ş. and İlgin, M. 2024. Research on Hematology, Inflammatory and Antimicrobial Peptide Levels according to Clinical Scoring in Calves with Bovine Respiratory Disease (BRD). *Van Vet J.* **35**: 196–201.
2. Akyüz, E. and Gökce, G. 2021. Neopterin, procalcitonin, clinical biochemistry, and hematology in calves with neonatal sepsis. *Trop Anim Health Prod.* **53**: 354.
3. Aly, S. S., Love, W. J., Williams, D. R., Lehenbauer, T. W., Eenennaam, A. V., Drake, C., Kass, P. H. and Farver, T. B. 2014. Agreement between bovine respiratory disease scoring systems for pre-weaned dairy calves. *Animal Health Research Reviews.* **15**: 148–150.
4. Azevedo, J. R. A. de, Torres, O. J. M., Czczko, N. G., Tuon, F. F., Nassif, P. A. N. and Souza, G. D. de 2012. Procalcitonin as a prognostic biomarker of severe sepsis and septic shock. *Rev. Col. Bras. Cir.* **39**: 456–461.
5. Barton, A. K., Pelli, A., Rieger, M. and Gehlen, H. 2016. Procalcitonin as a

- biomarker in equine chronic pneumopathies. *BMC Vet Res.* **12**: 1–7.
6. Baruch, J., Cernicchiaro, N., Cull, C. A., Lechtenberg, K. F., Nickell, J. S. and Renter, D. G. 2021. Assessment of bovine respiratory disease progression in calves challenged with bovine herpesvirus 1 and *Mannheimia haemolytica* using point-of-care and laboratory-based blood leukocyte differential assays. *Translational Animal Science.* **5**: txab200.
7. Bielałowicz, L. P., Celestino, M. L., Menta, P. R., Fernandes, L., Ballou, M., Neves, R. C. and Machado, V. S. 2024. Association of Bovine Respiratory Disease during the Pre-Weaning Period with Blood Cell Counts and Circulating Concentration of Metabolites, Minerals, and Acute Phase Proteins in Dairy Calves Transported to a Calf Raising Facility. *Animals.* **14**: 1909.
8. Biju, P. G., Garg, S., Wang, W., Choudhry, M. A., Kovacs, E. J., Fink, L. M. and Hauer-Jensen, M. 2012. Procalcitonin as a predictive biomarker for total body irradiation-induced bacterial load and lethality in mice. *Shock.* **38**: 170–176.
9. Bonelli, F., Meucci, V., Divers, T. J., Boccardo, A., Pravettoni, D., Meylan, M., Belloli, A. G. and Sgorbini, M. 2018. Plasma procalcitonin

- concentration in healthy calves and those with septic systemic inflammatory response syndrome. *The Veterinary Journal*. **234**: 61–65.
10. Bouadma, L., Luyt, C.-E., Tubach, F., Cracco, C., Alvarez, A., Schwebel, C., Schortgen, F., Lasocki, S., Veber, B., Dehoux, M., Bernard, M., Pasquet, B., Régnier, B., Brun-Buisson, C., Chastre, J. and Wolff, M. 2010. Use of procalcitonin to reduce patients' exposure to antibiotics in intensive care units (PRORATA trial): a multicentre randomised controlled trial. *The Lancet*. **375**: 463–474.
 11. Debra D, M. 2008. Alterations in the leukogram. In: Large Animal Internal Medicine, 4th ed. Bradford PS. eds., 4th ed ed., Elsevier, St Louis. pp. 405-410.
 12. Dong, R., Wan, B., Lin, S., Wang, M., Huang, J., Wu, Y., Wu, Y., Zhang, N. and Zhu, Y. 2019. Procalcitonin and Liver Disease: A Literature Review. *J Clin Transl Hepatol*. **7**: 51–55.
 13. Eberhard, O. K., Haubitz, M., Brunkhorst, F. M., Kliem, V., Koch, K. M. and Brunkhorst, R. 1997. Usefulness of procalcitonin for differentiation between activity of systemic autoimmune disease (systemic lupus erythematosus/systemic antineutrophil cytoplasmic antibody-associated

- vasculitis) and invasive bacterial infection. *Arthritis & Rheumatism*. **40**: 1250–1256.
14. El-Deeb, W., Elsohaby, I., Fayez, M., Mkrtchyan, H. V., El-Etriby, D. and ElGiouhy, M. 2020. Use of procalcitonin, neopterin, haptoglobin, serum amyloid A and proinflammatory cytokines in diagnosis and prognosis of bovine respiratory disease in feedlot calves under field conditions. *Acta Tropica*. **204**: 105336.
15. Ercan, N., Tuzcu, N., Başbug, O., Tuzcu, M. and Alim, A. 2016. Diagnostic value of serum procalcitonin, neopterin, and gamma interferon in neonatal calves with septicemic colibacillosis. *J Vet Diagn Invest*. **28**: 180–183.
16. Gary P, C. 2008. Clinical chemistry tests. In: Large Animal Internal Medicine, 4th ed. Bradford PS. eds., 4th ed ed., Elsevier, St Louis. pp. 375-397.
17. Guzelbektes, H., Sen, I., Ok, M., Constable, P. d., Boydak, M. and Coskun, A. 2010. Serum Amyloid A and Haptoglobin Concentrations and Liver Fat Percentage in Lactating Dairy Cows with Abomasal Displacement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. **24**: 213–219.

18. Hodgson, P. D., Aich, P., Manuja, A., Hokamp, K., Roche, F. M., Brinkman, F. S. L., Potter, A., Babiuk, L. A. and Griebel, P. J. 2005. Effect of stress on viral–bacterial synergy in bovine respiratory disease: novel mechanisms to regulate inflammation. *Comparative and Functional Genomics*. **6**: 244–250.
19. 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. *American Journal of Veterinary Research*. **72**: 1349–1360.
20. Jarešová, M., Stříž, I., Čermáková, J., Lácha, J., Sedláček, J., Mudra, K., Hána, I. and Vítko, Š. 1999. Serum procalcitonin concentrations in transplant patients with acute rejection and bacterial infections. *Immunology Letters*. **69**: 355–358.
21. Katoh, N. 2002. Relevance of Apolipoproteins in the Development of Fatty Liver and Fatty Liver-Related Peripartum Diseases in Dairy Cows. *Journal of Veterinary Medical Science*. **64**: 293–307.

22. Koshiishi, T., Shibutani, S., Chuma, T. and Iwata, H. 2023. Measurement of serum procalcitonin concentrations in calves with bovine respiratory disease. *Japanese Journal of Veterinary Research*. **71**: 65–71.
23. Linscheid, P., Seboek, D., Nylen, E. S., Langer, I., Schlatter, M., Becker, K. L., Keller, U. and Müller, B. 2003. In Vitro and in Vivo Calcitonin I Gene Expression in Parenchymal Cells: A Novel Product of Human Adipose Tissue. *Endocrinology*. **144**: 5578–5584.
24. Love, W. J., Lehenbauer, T. W., Kass, P. H., Eenennaam, A. L. V. and Aly, S. S. 2014. Development of a novel clinical scoring system for on-farm diagnosis of bovine respiratory disease in pre-weaned dairy calves. *PeerJ*. **2**: e238.
25. Mahmoud, A. E., Fathy, A., Ahmed, E. A., Ali, A. O., Abdelaal, A. M. and El-Maghraby, M. M. 2022. Ultrasonographic diagnosis of clinical and subclinical bovine respiratory disease in Holstein calves. *Vet World*. **15**: 1932–1942.
26. Marcato, F., van den Brand, H., Kemp, B. and van Reenen, K. 2018. Evaluating Potential Biomarkers of Health and Performance in Veal Calves. *Front. Vet. Sci*. **5**: 133.

27. Moisés, 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.
28. Murata, H., Shimada, N. and Yoshioka, M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal.* **168**: 28–40.
29. Neumann, S., Siegert, S. and Fischer, A. 2023. Procalcitonin as an Endogenous Biomarker for Mastitis in Cows. *Animals.* **13**: 2204.
30. Nobre, V. and Borges, I. 2016. Prognostic value of procalcitonin in hospitalized patients with lower respiratory tract infections. *Rev Bras Ter Intensiva.* **28**: 179–189.
31. Nylen, E. S., O'Neill, W., Jordan, M. H., Snider, R. H., Moore, C. F., Lewis, M., Silva, O. L. and Becker, K. L. 1992. Serum Procalcitonin as an Index of Inhalation Injury in Burns. *Horm Metab Res.* **24**: 439–442.
32. Nylen, E. S., Whang, K. T., Snider, R. H., Steinwald, P. M., White, J. C. and Becker, K. L. 1998. Mortality is increased by procalcitonin and

decreased by an antiserum reactive to procalcitonin in experimental sepsis.

Crit Care Med. **26**: 1001–1006.

33. Oberhoffer, M., Stonans, I., Russwurm, S., Stonane, E., Vogelsang, H., Junker, U., Jäger, L. and Reinhart, K. 1999. Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *J Lab Clin Med.* **134**: 49–55.
34. O'Neill, J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. <https://apo.org.au/node/63983>.
35. Pamela A, W. 2008. Disease of the respiratory system. In: Large Animal Internal Medicine, 4th ed. Bradford PS. eds, 4th ed ed., Elsevier, St Louis. pp. 490-495.
36. Pardon, B., Hostens, M., Duchateau, L., Dewulf, J., De Bleecker, K. and Deprez, P. 2013. Impact of respiratory disease, diarrhea, otitis and arthritis on mortality and carcass traits in white veal calves. *BMC Vet Res.* **9**: 79.
37. Petersen, H. H., Nielsen, J. P. and Heegaard, P. M. H. 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical

- chemistry. *Vet Res.* **35**: 163–187.
38. Principi, N. and Esposito, S. 2017. Biomarkers in Pediatric Community-Acquired Pneumonia. *International Journal of Molecular Sciences.* **18**: 447.
39. Reinhart, K., Karzai, W. and Meisner, M. 2000. Procalcitonin as a marker of the systemic inflammatory response to infection. *Intensive Care Medicine.* **26**: 1193–200.
40. Roland, L., Drillich, M. and Iwersen, M. 2014. Hematology as a diagnostic tool in bovine medicine. *J VET Diagn Invest.* **26**: 592–598.
41. Ronald L, T. 2008. Ruminant history, physical, examination, and records. In: Large Animal Internal Medicine, 4th ed. Bradford PS. eds., 4th ed ed., Elsevier, St Louis. pp. 3-14.
42. Sala, G., Orsetti, C., Meucci, V., De Marchi, L., Sgorbini, M. and Bonelli, F. 2023. Case–Control Study: Endogenous Procalcitonin and Protein Carbonylated Content as a Potential Biomarker of Subclinical Mastitis in Dairy Cows. *Veterinary Sciences.* **10**: 670.
43. Sasaki, Y., Iki, Y., Anan, T., Hayashi, J. and Uematsu, M. 2022. Economic loss due to treatment of bovine respiratory disease in Japanese

- Black calves arriving at a backgrounding operation in Miyazaki. *Journal of Veterinary Medical Science*. **84**: 1328–1334.
44. Susan L, W. 2008. Alterations in body temperature. In: Large Animal Internal Medicine, 4th ed. Bradford PS. eds, 4th ed ed., Elsevier, St Louis. pp. 32-41.
 45. Trevisi, E. and Bertoni, G. 2009. Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science*. **8**: 265–286.
 46. Tsukano, K., Fukuda, T., Ikeda, K., Sato, K. and Suzuki, K. 2021. Serum iron concentration is candidate inflammatory marker for respiratory diseases in beef cows. *Journal of Veterinary Medical Science*. **83**: 824–828.
 47. Wacker, C., Prkno, A., Brunkhorst, F. M. and Schlattmann, P. 2013. Procalcitonin as a diagnostic marker for sepsis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*. **13**: 426–435.
 48. Wagner, K. E., Martinez, J. M., Vath, S. D., Snider, R. H., Nylén, E. S., Becker, K. L., Müller, B. and White, J. C. 2002. Early immunoneutralization of calcitonin precursors attenuates the adverse

- physiologic response to sepsis in pigs. *Crit Care Med.* **30**: 2313–2321.
49. Windeyer, M. C., Leslie, K. E., Godden, S. M., Hodgins, D. C., Lissemore, K. D. and LeBlanc, S. J. 2014. Factors associated with morbidity, mortality, and growth of dairy heifer calves up to 3 months of age. *Preventive Veterinary Medicine.* **113**: 231–240.
50. Wittum, T. E., Young, C. R., Stanker, L. H., Griffin, D. D., Perino, L. J. and Littledike, E. T. 1996. Haptoglobin response to clinical respiratory tract disease in feedlot cattle. *American Journal of Veterinary Research.* **57**: 646–649.
51. Wu, D., Zhou, S., Hu, S. and Liu, B. 2017. Inflammatory responses and histopathological changes in a mouse model of *Staphylococcus aureus*-induced bloodstream infections. *J Infect Dev Ctries.* **11**: 294–305.
52. Yoshino, K., Katoh, N., Takahashi, K. and Yuasa, A. 1993. Possible involvement of protein kinase C with induction of haptoglobin in cows by treatment with dexamethasone and by starvation. *American Journal of Veterinary Research.* **54**: 689–694.
53. Zakaria-Meehan, Z., Massad, G., Simpson, L. M., Travis, J. C. and Oliver, J. D. 1988. Ability of *Vibrio vulnificus* to obtain iron from hemoglobin-

haptoglobin complexes. *Infection and Immunity*. **56**: 275–277.

54. 成人肺炎診療ガイドライン 2024 - 学会誌・出版物 | 一般社団法人
日本呼吸器学会.

https://www.jrs.or.jp/publication/jrs_guidelines/20240319125656.html.