

急性大腸菌性乳房炎牛の血清微量および主要元素における 粒子励起 X 線分析

嶋守俊雄¹、大塚まりな¹、西 康暢¹、福田達也¹、塚野健志¹、能田 淳¹、

世良耕一郎²、鈴木一由¹

¹酪農学園大学大学院獣医学研究科
069-8501 北海道江別市文教台緑町 582

²岩手医大サイクロトロンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

1 はじめに

近年、牛の跛行、呼吸器疾患、甚急性乳房炎などの炎症性疾患は肉牛および乳牛の生産性を著しく低下させる増悪因子であり、解決すべき最優先課題となっている。牛の乳房炎は乳房内への微生物の感染によって起こる炎症疾患であり乳牛ではよく見られる経済的損失が大きい病気である^{20,21}。アメリカにおいては乳房炎が原因となり年間 20 億相当の乳破棄があると報告されている^{20,21,26}。様々な起因菌がある中で特にグラム陰性菌である大腸菌やクレブシエラが重度の炎症を起こし甚大な乳損失をもたらす¹⁶。大腸菌性乳房炎が原因となった敗血症は珍しいがしばしば致死性的となる。グラム陰性菌が原因となった重症な乳房内炎症 (IMI) の 25%の牛では死産の転帰をとる⁶。非典型的であるが大腸菌やクレブシエラなどのグラム陰性菌の細胞の破壊が生じた際に放出され炎症を起こす病因となるのがエンドトキシンや LPS である。エンドトキシンは牛の生体反応に多くのダメージを与える⁶。エンドトキシンが誘因となった急性炎症では体内でインターロイキン 1 が放出され血清微量元素の放出を順番にもたらすとされている¹²。

牛医療において大腸菌性乳房炎は早期の治療だけでなく予後診断の確立が求められている。本症は重症例で高い死産率を示す全身性炎症性疾患であるが網羅的な微量元素動態の評価はほとんど行われていない。そこで本研究では実際の臨床症例を用いて、エンドトキシン (ETX) 由来の全身性炎症性疾患である甚急性大腸菌性乳房炎の血清中微量元素について粒子励起 X 線分析 (PIXE) 法により多元素同時定性定量を行い、炎症性疾患の病態解明とその動態によって予後診断となるターゲット元素の抽出を試みた。

2 材料及び方法

2.1 生体微量元素の測定

【臨床試験】

供試動物は臨床獣医師が急性性乳房炎と診断し、E.coli または K.pneumoniae が分離された大腸菌性乳房炎罹患ホルスタイン種泌乳牛を供試した。症例のうち、一週間以内に治癒し牛乳生産に復帰した牛を予後良好群、治療が奏功せず死産転帰、または一カ月以内に乳生産に復帰しなかった牛を予後不良群

とした。その結果、53頭の大腸菌性乳房炎牛のうち、予後予後良好群は35頭、予後不良群は18頭であった。陰性対象として本学の健常で乳房炎の認められない39頭のホルスタイン種泌乳牛を用いた。

2.2 生体微量元素の測定

静脈より採血し遠心分離し、血清を -80°C にて冷凍保存後、インジウムを内標準とした血清試料をPIXE専用ホルダーに添付したマイラー膜に重層固化し、サイクロトロンセンターにおいて小型サイクロトロンからの陽子ビームを照射して多元素同時定性定量によるスクリーニング検査を実施した。被検物質に陽子ビームを照射し測定を行った。測定は仁科記念サイクロトロンセンター(岩手)にて行った。

2.3 統計処理

統計分析は2群間の比較にはMann-WhitneyU-test、3群間の比較にはpost-hocとしてKruskal-Wallis testを用いた(IBM SPSS Statistics, v.21, IBM Co, Somers, NY, USA)。予後評価に有用な元素はROC解析により診断能を評価した。

3 結果

3.1 多元素同時定性定量試験

PIXE法で同時定性が可能であった元素は、Al、As、Br、Ca、Cl、Co、Cr、Cu、Fe、Ga、Hg、K、Mg、Mn、Mo、Na、Nb、Ni、P、Pb、Rb、S、Se、Si、Sr、Ti、V、YおよびZnの29元素であった(表1)。さらに大腸菌性乳房炎牛と健常牛で差が認められた元素が11種類あり、その中で予後評価の指標として有用と思われる第四周期に含まれ、炎症反応に関与するとされる、鉄、亜鉛、および臭素を選抜した。図1は急性大腸菌性大腸菌性乳房炎にて得られた鉄、亜鉛、および臭素の血清中濃度であり有意差が認められた。

健常、予後良好および予後不良牛の血清中铁濃度を比較したところ、健常群の血清中铁濃度の中央値は、 $1.458\ \mu\text{g/ml}$ ($1.458\pm 0.391\ \mu\text{g/ml}$, $p<0.01$)であった。これに対し予後良好群および予後不良群ではそれぞれ $0.945\ \mu\text{g/ml}$ ($0.945\pm 0.393\ \mu\text{g/ml}$, $p<0.05$) および $0.751\ \mu\text{g/ml}$ ($0.751\pm 0.583\ \mu\text{g/ml}$) と健常群に比べ低値を示した。予後不良群では健常群の血清中Fe濃度よりも有意に低く、血清中Fe濃度は大腸菌性乳房炎の重篤度との間に関連性が認められた。同様に、予後良好および予後不良群の血清中亜鉛濃度を比較したところ、健常群の血清中亜鉛濃度の中央値は、 $1.322\ \mu\text{g/ml}$ ($0.897\pm 0.561\ \mu\text{g/ml}$, $p<0.05$)であった。これに対し予後良好群および予後不良群ではそれぞれ $0.945\ \mu\text{g/ml}$ および $0.751\ \mu\text{g/ml}$ と健常群に比べ低値を示したが、大腸菌性乳房炎の重篤度との間には関連性は認められなかった。血清中臭素濃度を比較すると、健常群の血清中臭素濃度の中央値は、 $27.03\ \mu\text{g/ml}$ でであった。これに対し予後良好群および予後不良群ではそれぞれ $6.70\ \mu\text{g/ml}$ および $7.75\ \mu\text{g/ml}$ と健常群に比べ低値を示した。血清中臭素濃度も大腸菌性乳房炎の重篤度との間には関連性が認められなかった。亜鉛、臭素においては予後良好群と予後不良群との間に顕著な有意差は認められなかった。急性大腸菌性乳房炎時の血清中微量元素が予後不良の診断能を有するのか、ROC解析によって評価した結果、鉄で有用な診断能が示唆された。Jインデックスによる理想的カットオフ値を求めたところ $0.819\ \mu\text{g/ml}$ 未満であれば、感度77.8%、特異度77.0%の確立で予後不良と診断できることが示唆された(図2)。

表 1

	(n=39)	(n=53)	(n=35)	(n=18)
Na	380.2 ± 97.0	564.4 ± 281.6	591.1 ± 312.5	512.3 ± 207.3
Mg	5.03 ± 4.66	8.09 ± 6.81	8.10 ± 4.59	8.07 ± 9.99
Al	4.98 ± 2.41	2.32 ± 2.56	2.12 ± 2.41	2.71 ± 2.86
Si	3.06 (0-16.8)	5.34 (0-20.9)	5.33 (0-20.9)	5.56 (0-14.0)
S	500.6 ± 105.5	573.0 ± 157.4	595.9 ± 175.7	528.3 ± 103.9
Cl	1523.2 ± 337.2	2033.5 ± 764.0	2156.2 ± 880.2	1795.0 ± 380.8
K	93.1 ± 18.8	125.2 ± 36.9 ^a	133.0 ± 40.0 ^a	109.9 ± 24.6
Ca	67.6 ± 13.0	62.8 ± 19.3	65.4 ± 21.8	57.9 ± 12.5
Ti	0.049 ± 0.136	0.033 ± 0.066	0.041 ± 0.072	0.017 ± 0.050
V	0.037 ± 0.054	0.047 ± 0.063	0.052 ± 0.070	0.036 ± 0.046
Cr	0.076 ± 0.053	0.080 ± 0.055	0.078 ± 0.052	0.085 ± 0.061
Mn	0.011 ± 0.034	0.017 ± 0.038	0.022 ± 0.044	0.007 ± 0.023
Fe	1.458 ± 0.391	0.879 ± 0.470 ^b	0.945 ± 0.393 ^b	0.751 ± 0.583 ^{b,c}
Co	0.009 ± 0.017	0.009 ± 0.017	0.011 ± 0.020	0.004 ± 0.009
Ni	0.022 ± 0.026	0.018 ± 0.026	0.019 ± 0.028	0.017 ± 0.022
Cu	0.736 ± 0.184	0.706 ± 0.279	0.709 ± 0.320	0.701 ± 0.182
Zn	1.322 ± 0.580	0.897 ± 0.651 ^a	0.910 ± 0.527 ^a	0.872 ± 0.861 ^a
Ga	0.031 ± 0.030	0.021 ± 0.025	0.022 ± 0.026	0.021 ± 0.025
As	0.001 ± 0.005	0.003 ± 0.013	0.002 ± 0.008	0.007 ± 0.019
Se	0.097 ± 0.062	0.067 ± 0.046	0.068 ± 0.047	0.065 ± 0.044
Br	26.6 ± 5.6	10.4 ± 7.4 ^b	10.5 ± 7.7 ^b	10.2 ± 7.1 ^b
Rb	0.001 ± 0.007	0.060 ± 0.070	0.072 ± 0.112	0.037 ± 0.051
Sr	0.065 ± 0.044	0.098 ± 0.073	0.106 ± 0.076	0.084 ± 0.057
Y	0.023 ± 0.043	0.032 ± 0.052	0.039 ± 0.062	0.018 ± 0.021
Zr	0.062 ± 0.073	0.073 ± 0.115	0.083 ± 0.129	0.053 ± 0.078
Nb	0.019 ± 0.042	0.023 ± 0.052	0.023 ± 0.057	0.022 ± 0.044
Mo	0.045 ± 0.066	0.066 ± 0.095	0.068 ± 0.106	0.061 ± 0.071
Pb	0.052 ± 0.076	0.053 ± 0.057	0.055 ± 0.056	0.049 ± 0.060

a: $p < 0.05$ vs control, b; $p < 0.01$ vs control, c: $p < 0.05$ vs good prognosis

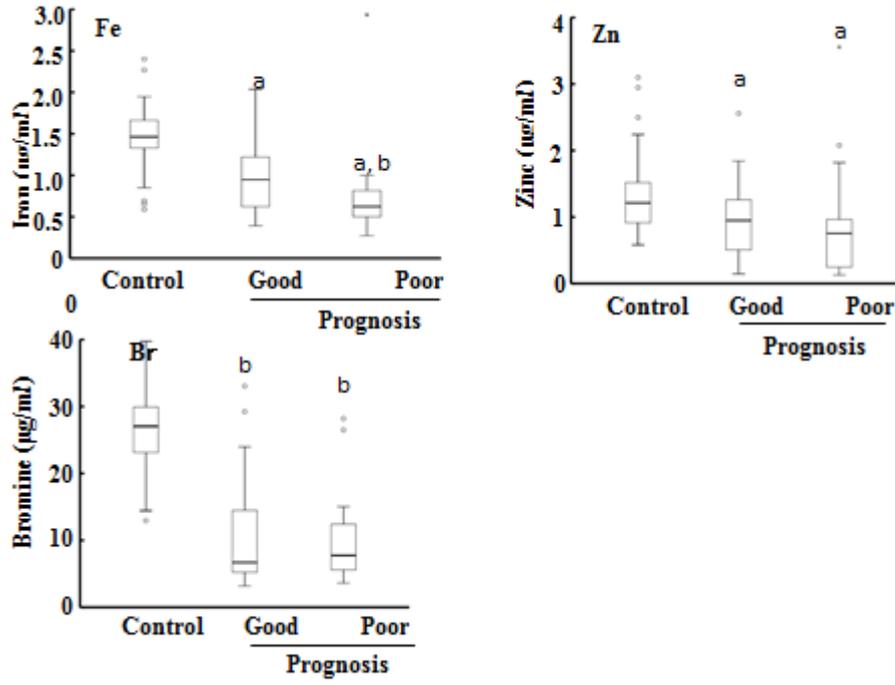


図 1

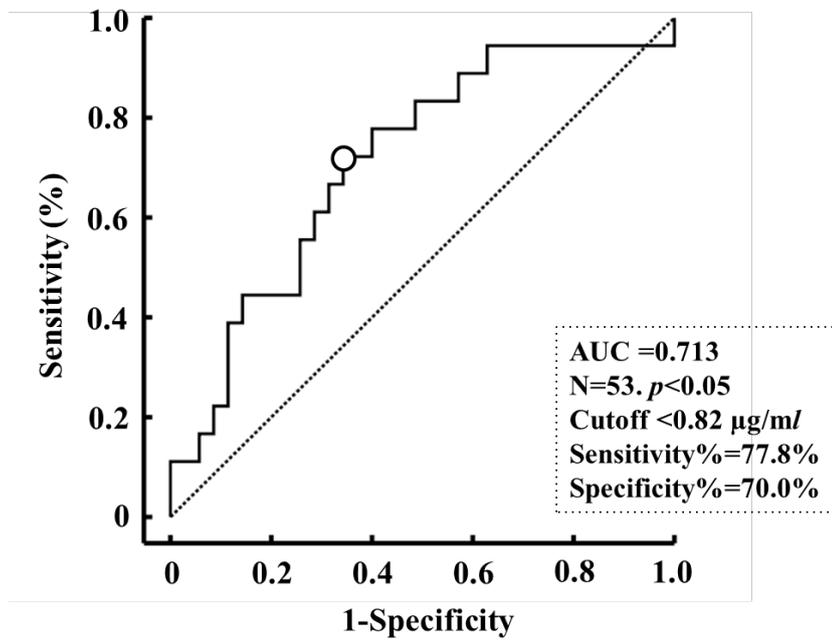


図 2

4 考察

本研究では、PIXE法により29種類の血清中主要および微量元素を牛で定性することが可能であった。Br、FeとZnの血清中濃度は、健常牛と比較し急性大腸菌性乳房炎牛で低値を示していた。さらに、血清Fe濃度は、予後良好群に比較し予後不良群では優位に低値を示していた。

したがって、血清Fe濃度が0.82 µg/ml未満であればROC曲線より予後不良と診断することができるとことが示唆された。ETXはグラム陰性菌が死滅される際、放出され、牛ではグラム陰性菌感染症にて発熱や白血球の遊走、血漿中の様々な物質の代謝などの恒常性を変化させるが、特に大腸菌性乳房炎においては重篤な炎症をもたらす死産の転帰をもたらす。

ボルヘスら⁴は、全身性炎症を馬の血漿中微量元素濃度の診断価値を調査し、血漿Fe濃度が馬での全身性炎症を診断するマーカーとしてほかの元素よりもより優れていることを報告している。したがって、いくつかの動物種では血清微量元素を炎症マーカーとして評価されてはいるが、急性大腸菌性乳房炎牛の予後評価を行った報告は限られている。Huら¹⁷は腸管の炎症に対する亜鉛の役割はTLR4-MyD88の炎症による遺伝子発現の抑制に密接にかかわっていることを報告している。そのことから急性大腸菌性乳房炎による炎症にはイオン化された亜鉛濃度が家畜において防衛機能に關与している可能性が示唆される¹⁷。好中球から放出されるミエロペルオキシダーゼは特殊な能力を持っていることが最近、報告されている。次亜臭素酸^{5,30}を合成し抗ウイルス活性や抗菌、抗寄生虫活性³⁰を示し、炎症における多くの病態生理に關与していることが報告されている。ところが、これらの微量元素（亜鉛、臭素）は急性大腸菌性乳房炎にて予後良好群、予後不良群の間には重要な差は認められなかった。血清中微量元素濃度の違いが乳房炎罹患牛と健常牛との間に存在したとしても、過去の研究では乳房炎罹患牛の予後判定にふさわしいと考えられていなかった。我々は今回の研究の中で急性大腸菌性乳房炎牛の初診時の血清鉄の値が著しく低値を示していることを明らかにした。鉄は多くの酵素活性に重要な役割を果たし、宿主、病原体にとっても必須の微量元素として知られている。過去の研究より、急性炎症にて血清や血漿の鉄濃度減少は人や動物で起こることが報告されている^{8,9}。鉄の減少は腸管からの吸収、網内皮系細胞からの放出が抑制されることにより減少する。血清鉄の減少は人や馬で急性炎症の指標として使われており、多くの動物種で炎症時の減少が過去に報告されている。微生物にとっても必須の鉄を制限することは宿主の先天的な防御反応である。Jacobsenら¹²馬の手術における炎症が生じてから24時間以内に血清鉄の減少が生じることを報告している。これらの報告は家畜の急性大腸菌性乳房炎時の初診時の血清鉄濃度が予後判定の有用なツールであることを示している。PIXE法は複雑な前処理を必要としないため、前処理による環境中金属汚染のリスクを低減させることが可能であり、また、29種類の血清中主要および微量元素を牛で定性定量することが可能であることがわかった。さらに、網羅的な定性定量検査において大腸菌性乳房炎牛では血清中の鉄、亜鉛、および臭素濃度は健常牛よりも有意に低値であり、特に鉄は予後不良症例では著減していることが明らかになった。血清鉄濃度の値が0.82 µg/ml以下であれば予後不良であることがROC曲線から導きだされた。したがって我々は甚急性大腸菌性乳房炎時の血清微量元素組成とりわけ鉄濃度が有望な予後判定のツールになると予測している。

PIXE法は多元素同時定性定量試験として用いられている¹⁰。煩雑な前処理を測定前に必要とせず、また試料の汚染も少なく、少量で測定が可能な優れた方法であるとされる^{27,28}。

以上の結果から、乳牛の急性大腸菌性乳房炎の予後判定には他の微量元素よりも鉄がより優れていると示唆している。甚急性乳房炎症例の血清中微量元素、特に鉄の動態を評価することは重度の大腸菌性乳房炎の予後診断する方法として有用なツールであることが示唆された。

引用文献

- 1) Borges, A. S., Divers, T. J., Stokol, T. and Mohammed, O. H. 2007. Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. *J. Vet.*

- Intern. Med.* **21**(3): 489-494.
- 2) Brottman, G. M., Regelman, W. E., Slungaard, A. and Wangenstein O. D.1996. Effect of eosinophil peroxidase on airway epithelial permeability in the guinea pig. *Pediatr. Pulmonol.* **21**:159–166.
 - 3) Burvenich, C., Bannerman, D. D., Lippolis, J. D., Peelman, L., Nonnecke, B. J., Kehrli, M. E. Jr. and Paape, M. J. 2007. Cumulative physiological events influence the inflammatory response of the bovine udder to *Escherichia coli* infections during the transition period. *J. Dairy Sci.* **90** Suppl 1: E39-54.
 - 4) Cherayil, B. J. 2011. The role of iron in the immune response to bacterial infection. *Immunol. Res.* **50**(1): 1-9.
 - 5) Cherayil, B. J., Ellenbogen, S. and Shanmugam, N. N. 2011. Iron and intestinal immunity. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **27**(6): 523-528.
 - 6) Chiba, M. 1994. Bioinorganic chemistry: a science in the spotlight—interface of chemistry, biology, agriculture and medicine. *Int. J. PIXE.* **4**: 201–216.
 - 7) Etzel, K. R., M. R. Swerdel, J. N. Swerdel, and R. J. Cousins. 1982. Endotoxin-induced changes in copper and zinc metabolism in the Syrian hamster. *J. Nute.***112**(12): 2363-2373.
 - 8) Hogan, J. and Larry Smith, K. 2003 Coliform mastitis. *Vet. Res.* **34**(5): 507-519.
 - 9) Hu, C. H., Song, Z. H., Xiao, K., Song, J., Jiao, L. F. and Ke, Y. L. 2013. Zinc oxide influences intestinal integrity, the expressions of genes associated with inflammation and TLR4-myeloid differentiation factor 88 signaling pathways in weanling pigs. *Innate. Immun.* **20**(5): 478-486.
 - 10)) Kandasamy, S., Green, B. B., Benjamin, A. L. and Kerr, D. E. 2011. Between-cow variation in dermal fibroblast response to lipopolysaccharide reflected in resolution of inflammation during *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy Sci.* **94**(12): 5963-5975.
 - 11) Kerro Dego, O., Oliver, S. P. and Almeida, R. A. 2012. Host-pathogen gene expression profiles during infection of primary bovine mammary epithelial cells with *Escherichia coli* strains associated with acute or persistent bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **155**(2-4): 291-297.
 - 12) Sordillo, L. M. and Streicher, K. L. 2002. Mammary gland immunity and mastitis susceptibility. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia.* **7**(2): 135-146.
 - 13) Suzuki, K., Higuchi, H., Iwano, H., Lakritz, J., Sera, K., Koiwa, M. and Taguchi, K. 2012. Analysis of trace and major elements in bronchoalveolar lavage fluid of *Mycoplasma bronchopneumonia* in calves. *Biol. Trace Elem. Res.* **145**(2): 166-171.
 - 14) Suzuki, K., Yamaya, Y., Kanzawa, N., Chiba, M., Sera, K. and Asano, R. 2008. Trace and Major elements Status in bronchoalveolar Lavage Fluid in dogs with or without Bronchopneumonia. *Biol. Trace Elem. Res.* **124**(1): 92-96.
 - 15) Wu, W., Samoszuk, M. K., Comhair, S. A., Thomassen, M. J., Farver, C. F, Dweik, R. A., Kavuru, M. S, Erzurum, S. C. and Hazen, S. L. 2000. Eosinophils generate brominating oxidants in allergen-induced asthma. *J. Clin. Invest.* **105**:1455–1463.

Particle-Induced X-ray emission analysis of serum trace and major elements in cattle with acute coliform mastitis

Toshio Shimamori¹, Marina Ootuka¹, Yasuaki Nishi¹, Tatuya Fukuda¹,
Kenji Tsukano¹, Jun Noda¹, Kouichiro Sera² and Kazuyuki Suzuki¹

¹School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University
582 Midorimachi, Bunnkyoudai, Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan

²Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

Abstract

The aim of the present study was to evaluate the reliability and effectiveness of the direct determination of trace and major element concentrations in serum samples collected from dairy Holstein cattle with acute coliform mastitis (n=53) and healthy controls (n=39). Twenty-eight elements (Na, Mg, Al, Si, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ce, Ni, Cu, Zn, Ga, As, Se, Br, Rb, Sr, Y, Zr, Nb, Mo, and Pb) were detected by particle-induced X-ray emission (PIXE). Significant differences were observed in serum Fe, Zn, and Br concentrations, but not in those of the remaining twenty-four elements. Furthermore, serum Fe concentrations ($0.751 \pm 0.583 \mu\text{g/ml}$, n=18) were significantly lower in dairy cattle with a poor prognosis than in those with a good prognosis ($0.945 \pm 0.393 \mu\text{g/ml}$, n=35, $p < 0.05$) and healthy controls ($1.458 \pm 0.391 \mu\text{g/ml}$, n=39, $p < 0.01$). We proposed a diagnostic cut-off point for serum Fe concentrations of $< 0.82 \mu\text{g/ml}$ based on receiver operating characteristic (ROC) curves in order to identify cattle with a poor prognosis. The results of the present study indicated that assessing the elemental composition of serum, particularly iron, is a promising prognostic tool for determining the outcomes of cattle with severe acute coliform mastitis.