

乳牛における蹄疾患発症物質としての  
エンドトキシンに関する研究

皇 月 学

乳牛における  
蹄疾患発症物質としての  
エンドトキシンに関する研究

望月 学

# 目次

第1章	序論	1
第2章	東京近郊の乳牛における蹄の病理組織学的検索	
	第1節 緒言	6
	第2節 材料および方法	8
	第3節 結果	10
	第4節 考察	14
	第5節 小括	18
第3章	ヤギにおけるエンドトキシン全身投与による蹄葉炎作出の試み	
	第1節 緒言	40
	第2節 材料および方法	43
	第3節 結果	45
	第4節 考察	48
	第5節 小括	52
第4章	ヤギにおける炭水化物過食時の第一胃液、全身静脈血および消化管静脈血中エンドトキシン濃度の検索	
	第1節 緒言	64
	第2節 材料および方法	66
	第3節 結果	68
	第4節 考察	70
	第5節 小括	74
第5章	分娩後の乳牛における第一胃液および全身静脈血中エンドトキシン濃度の検索	
	第1節 緒言	81
	第2節 材料および方法	83
	第3節 結果	85
	第4節 考察	87
	第5節 小括	90
第6章	総合考察	97
第7章	総括	102
	謝辞	107
	文献	108

## 第1章 序論

近年、全世界的に牛、とくに乳牛の運動器病の発生率が増加傾向にある。これにともなって農家がこうむる経済的損失は著しく大きいことから、牛の運動器病の原因や予防に対する関心が飛躍的に高まっている。

1960年代からヨーロッパを中心に乳牛の跛行に関していくつかの大規模な疫学的調査が行われている。英国における1960年のLeechらの報告[95]では乳牛の跛行率は3.88%であったが、1980年のEddyとScottの報告[29]では4.72%、1982年のRussellら[70]によれば5.5%と徐々に跛行率の増加していることが示されている。英国以外にもフランス、オランダ、ドイツなどからも同様の疫学的調査の報告があるが、その跛行率は5~30%ときわめて高い[26]。また、跛行による経済的損失は、その発生の増加にともない莫大なものとなってきているが、それは疼痛による乳量や産肉量の減少といった直接的な生産性の低下によるものだけではないことが指摘されている。跛行牛では妊娠率が低下し、淘汰率が増加するため一頭あたりの稼働期間が短くなり[23]、また治療費も他の疾患に比べて長期の治療期間を必要とするため、高額に上る。Whitakerらの報告[90]によれば、乳牛の跛行による経済的損失は平均して乳牛100頭あたり1175ポンド、イギリス全体では年間35,000,000ポンドにも上ると推定されている。

我が国においてはこのような乳牛の跛行に関する疫学的調査報告はきわめて少ないが、農林水産省の畜産統計[94]によると、運動器疾患は着実な増加傾向にあることが示されている。すなわち乳房炎や消化器病、周産期疾患といった従来より重視されてきた疾病は減少傾向にあるのに対して、運動器疾患は1990年には乳用雌牛の死産事故原因の第2位となり、畜産業に及ぼすその影響は無視できないものとなっている (Fig. 1-1)。

一方、これら牛の跛行の大部分は蹄の疾患に原因があることが指摘されている。前出のEddy and Scott[29]やRussellの報告[70]では、跛行原因のそれぞれ88.3%および92.2%が蹄病によるものとされており、また日本における調査でも、乳牛の運動器病の

うち70%近くを蹄病が占めるという報告がある[96]。これらの報告や臨床での経験から、跛行の原因としての蹄病の重要性が1970年代より認識され、牛の蹄病が多大な関心を集めるようになった。1976年からは研究者や臨床家によって定期的に国際的なシンポジウムが開かれ、混乱していた解剖用語や病名の統一などが計られるようになり、蹄病の原因、発生機序、病理変化などについての研究が発表されている。

このシンポジウムを中心にして1981年には牛の蹄病として11の病名が定義された[88]。このうち現在もっとも注目を集めている疾患は蹄葉炎（びまん性無菌性蹄皮炎）と蹄底潰瘍（限局性蹄皮炎）である。これら2つの蹄病は、趾間皮膚炎や趾間過形成といった蹄の周辺に発生する蹄病と異なり、蹄角質そのものを侵す疾病でその症状の重篤さゆえ古くから知られた蹄病であるが、双方ともその原因や発生機序に関してはいまだに明快な解決が得られていない。

牛の蹄葉炎は蹄皮（蹄真皮と表皮層の嵌合部）を中心とした非化膿性の炎症と定義されている。蹄底潰瘍は後肢外側蹄の底の特定の部位に頻発する角質の欠損である。従来、蹄底潰瘍の発生原因は肢勢異常や蹄骨の解剖学的形態から来る過剰な負重による真皮の外傷性損傷とされていた。これに対してNilssonは、蹄底潰瘍と蹄葉炎の発生部位や発生時期が密接に関連していることから、これらが同一の発生機序による疾患である可能性を示唆している[61]。Weaverはこの考え方をさらに推し進め、蹄葉炎をさまざまな蹄病、ひいては跛行の原因として位置づけた[87]。すなわち蹄葉炎によって蹄の角質合成部位である蹄皮が侵され、異常な角質が産成された結果、白線病や蹄底潰瘍などの角質の崩壊もしくは蹄の変形が起こり、それが肢勢の異常や化膿性関節炎、骨髄炎などへ発展するという考えである。さらにPeterseは分娩後3-4か月の乳牛で臨床的な跛行を示さないものの、蹄底に出血斑が見られるものが多数存在することに注目し、潜在性蹄葉炎の概念を提出した[63]。これは、分娩前後の時期に軽度の蹄葉炎の病態が蹄皮深部に発生し、それ自体では臨床的な症状をあらわすことなく耐過するが、角質の成長とともに遅れて病変が出現するという説である。すなわち、急性蹄葉炎のような疼痛あるいは慢性蹄葉炎のような蹄の変形といった臨床症状を示さない牛でも、角質合成の異常が

起きている可能性を指摘したものであり、蹄病増加の一要因としてこの潜在性蹄葉炎が大きく寄与しているものと考えられる。現在これらの仮説は研究者や臨床家の間で広く受け入れられており、蹄葉炎の重要性は非常に高いものとして認識されている。

蹄葉炎の病態の本質は病理組織学的検索から、真皮層における循環障害を起点とした虚血病変であると推測されている。しかし循環障害の詳細な発生機序はいまだ判っていない。疫学的調査から全身性疾患、年齢、産次、泌乳ステージ、肢勢、遺伝、栄養、牛舎構造、運動量、行動、環境などのさまざまな発生要因が提案されている[83]。現在では、蹄葉炎はひとつの因子によって説明できる疾病ではなく、いくつもの因子が複雑に絡み合って発症する多因子性の疾患であると考えられている。

しかしながら盗食や分娩後などの濃厚飼料多給時に急性蹄葉炎が発生するという事実はよく知られており、また飼養方法の変化とともに蹄疾患の発生が増加していることから、これらの因子のなかでも栄養学的因子、特に炭水化物の大量摂取と蹄葉炎との関係は最も注目されてきた。易発酵性の炭水化物を多く含む濃厚飼料の多給によって、第一胃内では乳酸発酵が優勢となり、ルーメンアシドーシスが惹起される。このとき第一胃内でさまざまな物質が生成されるが、それらが蹄真皮の血管に作用し虚血を引き起こすものと考えられ、初期の研究では特に乳酸とヒスタミンが注目された。しかし、いずれの物質も単独投与による蹄葉炎作出は失敗におわり[11, 77, 78]、これらの蹄葉炎原因物質としての可能性には疑問が持たれている。

現在これらの物質に代わり、エンドトキシンが蹄葉炎の起因物質として最も注目されている。エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁成分であり、馬においては、実験的な炭水化物の大量投与時に急性蹄葉炎が惹起されるとともに全身的なエンドトキシン血症が起きていることが示されている[74]。牛においても実験的に作出された濃厚飼料多給時に第一胃内のエンドトキシン量が増加することが示されている[8, 59]。また乳房炎や子宮内膜炎など、エンドトキシンを放出する可能性のある重度の感染症にともなって蹄葉炎が起きることが経験的に知られている。エンドトキシンはきわめて多様な生理活性をもつ物質であるが、なかでも血管および血液凝固におよぼす影響が蹄葉炎時にみられ

る蹄の循環障害と関連があると考えられている[42]。人およびラットやウサギなどの実験動物では、消化管内の細菌もしくはエンドトキシンが消化管粘膜を貫通し循環血中に入るbacterial translocationとよばれる現象が見いだされており、ショック時の多臓器不全などの原因となりうると考えられている[25, 97]が、複胃という独特の消化器官をもつ反芻獣におけるbacterial translocationに関する詳細な研究はいまだ見当たらない。しかし第一胃内に存在する莫大な細菌が内因性エンドトキシンのソースとなる可能性は十分に考えられる。

以上の観点から、本研究では乳牛における蹄疾患の発生機序を明らかにすることを目的とし、我が国における乳牛の蹄葉炎の発生状況および蹄葉炎の原因物質としてのエンドトキシンの可能性について検討した。すなわち第2章では、屠場材料を中心に蹄の組織像を検討し、東京近郊の乳牛における潜在性蹄葉炎を含む蹄疾患の発生状況について考察した。次いで第3章では同じ反芻獣で取扱いの容易なヤギをモデル動物として、エンドトキシンの全身的投与による蹄葉炎様変化の作出を試みた。第4章では同じくヤギを用いて実験的な炭水化物多給によるルーメンアシドーシスを作成し、この時の第一胃内エンドトキシン濃度の変動に伴う全身的なエンドトキシン血症の有無、および消化管静脈へのエンドトキシンの移行の有無を検討した。最後に飼養形態の異なる2つの搾乳牛群を用いて、飼養方法が大きく変化する分娩前後での第一胃液pH、第一胃液および全身静脈血中エンドトキシン濃度の変動を検索した。

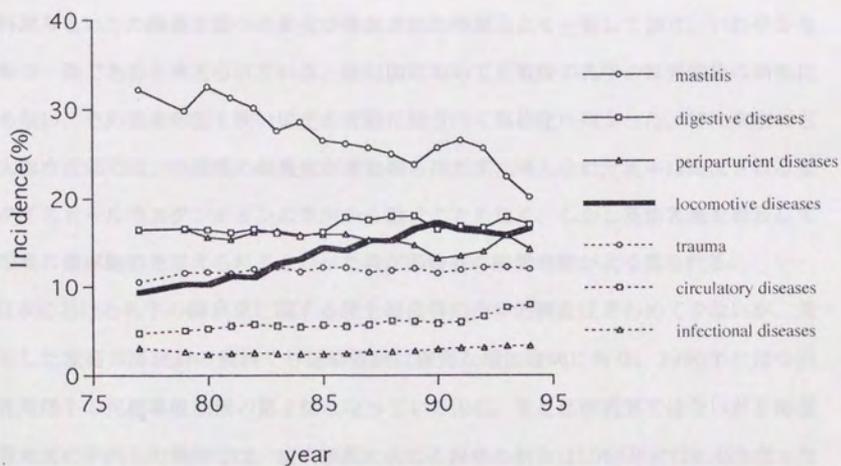


Fig. 1-1. Incidence of the causes of death and disuse of dairy cows in Japan (1977-1994)

## 第2章 東京近郊の乳牛における蹄の病理組織学的検索

### 第1節 緒言

全世界的な乳牛の蹄疾患の増加は、畜産形態の集約化、すなわち集団飼育、牧野への放牧をしないフリーストールやコンクリート牛床の採用、そして高能力のための高栄養飼料給与といった飼養形態への変化が推進された時期とよく一致しており、いわゆる生産病の一種であると考えられている。我が国においても戦後の乳牛の飼養頭数の増加にともない、その畜産形態も狭い国土を有効に使うべく集約化へ向かった。特に東京などの大都市近郊では、小規模の酪農家が運動場も持たず、導入された乳牛は淘汰されるまでタイストールやスタンションの牛床から動くこともなく、しかし高泌乳量を追及して高栄養の濃厚飼料を与えられるといった我が国特有の飼養形態がよく見られる。

日本における乳牛の蹄疾患に関する発生頻度等の疫学的調査はきわめて少ないが、先に示した家畜共済統計の資料でも運動器病は確実な増加傾向にあり、1990年にはついに乳用雌牛の死産事故原因の第2位となっている[94]。また都市近郊ではないが北海道天塩地区の平内らの報告では、疾病頭数に占める蹄病の割合は1965年には0.48%だったものが1974年には6.50%と、多頭飼育と管理の省力化が進むに従って蹄病の症例が激増していることを示している[96]。これらの報告から我が国においても飼養形態の集約化が蹄病の発生に影響を及ぼしていることが推察される。

急性蹄葉炎は、分娩後や盗食時あるいは飼料の急変時に発症する蹄の疼痛を主徴とする疾患として、また慢性蹄葉炎は急性蹄葉炎に続く蹄の変形として古くから知られていた。病理学的検索から蹄葉炎の病態の本質は蹄真皮の循環障害であり、それに伴う非化膿性の炎症や角化の異常が急性あるいは慢性の蹄葉炎症状としてとらえられてきた[12]。近年これに加えて蹄葉炎は、他の蹄病のみならず肢の疾患をも含んだ運動器病全体の原因疾患として注目されるようになった。すなわち、循環障害の二次的結果として産生さ

れた不良な角質が、その後角質の成長ともなって蹄底潰瘍や白線病あるいは蹄の変形などの他の蹄疾患に発展し、さらには感染や肢勢の異常につながりさまざまな跛行の原因になりうるという考えである[87]。

一方、Peterseらによって新たにその概念が提唱された潜在性蹄葉炎は、周産期に多発する蹄底の出血・変色として定義されている[18]。潜在性蹄葉炎の病理組織学的所見に関する報告は見当たらないが、急性蹄葉炎と同様の循環障害が軽度なレベルで起きており、臨床症状を表わさずに耐過したものが角質の成長とともに蹄底角質へ表出したものと考えられている。したがって、潜在性蹄葉炎では跛行や疼痛といった臨床症状は認められなくとも循環障害に続く角質合成阻害はすでに始まっており、さまざまな蹄疾患へと発展する最初のきっかけとなるものと考えられている[18]。その後Bradley[20]やGreenough[38]の調査によって、潜在性蹄葉炎が乳牛に広く存在していることが確認され、増加する運動器病の原因疾患のひとつとして重要視されるようになった。我が国においても集約的な乳牛の飼養形態がこのような蹄の組織に潜在的な影響を及ぼしていることが予想されるが、いまだそのような報告はなされていない。

そこで本章では、我が国特有の集約的飼養管理下の乳牛における蹄の障害の程度や頻度およびその発生要因を探ることを目的として、以下の二つの実験を行った。まず実験1として、東京近郊の屠場において無作為に採取した乳牛の蹄に対し病理組織学的検索を行い、潜在性蹄葉炎を含む蹄疾患の発生状況について検討した。次に実験2として、蹄底潰瘍と診断され淘汰された乳牛8頭の蹄に対して同様の病理組織学的検索を行い、その結果を実験1と比較検討することで、高度な蹄疾患へ発展するための要因を考察した。

## 第2節 材料と方法

### <実験1>

茨城県と栃木県の屠場から無作為に採取されたホルスタイン種乳牛45頭の右前肢および両後肢の蹄、合計239蹄を実験材料として使用した。試料は採取後速やかに水洗し、必要に応じて蹄底の削蹄を行った後、肉眼的に観察を行った。その後硬組織標本切断機（バンダーMC-140D、マルトー、東京）を用いて、蹄底の中央やや尾側よりのいわゆる“蹄底潰瘍好発部位”（Fig. 2-1）を第3趾骨、皮下織、蹄底真皮層、表皮層（蹄底角質層）が連続した状態で切り出した。ついでメスを用いて第3趾骨、皮下織および余分な角質層を切除し、真皮層とそれに続く表皮層の一部を試料として使用した。試料は10%ホルマリンで固定後常法に従ってパラフィン包埋し、3~5 $\mu$ m厚に薄切した。組織染色としてヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い、病理組織学的検討を行った。一部の切片には磷タングステン酸ヘマトキシリン（PTAH）染色を併用した。

ほとんど全ての蹄において真皮層における循環障害と表皮層における角化異常が共通した病理組織学的所見として認められた。そこでこれらの変化のうち、比較的判定しやすいと思われた角化異常の程度によって以下のように5段階の基準を作成し、全ての蹄を分類した。

#### グレード1（正常な角化）

有棘層と角化層の境界は明瞭であり、正常な角化と考えられる（Fig. 2-2）。

#### グレード2（軽度の角化異常）

有棘層と角化層の境界線はやや不規則な形となり、有棘層内に少量のケラチン体が認められた（Fig. 2-3）。

#### グレード3（中等度の角化異常）

有棘層と角化層の境界は著しく不整となり、有棘層内に入り込むような形の角化の亢進が認められた（Fig. 2-4）。

#### グレード4（重度の角化異常）

表皮層全体が角化しており、一部変性、壊死も認められる (Fig. 2-5)。

グレード5 (蹄底潰瘍形成)

角質層は一部欠損し、蹄底潰瘍を形成していた (Fig. 2-6)。

グレードの分布の比較にはマン・ホイットニ検定を用い、危険率5%未満を有意と判定した。

### <実験2>

栃木県内の牧場で臨床獣医師によって蹄底潰瘍と診断され、重度の跛行とそれに伴う乳量の減少から淘汰されたホルスタイン種乳牛8頭 (3~8歳) を実験に供した。これらの牛の飼養環境は、コンクリート床のフリーバーンで飼育され、完全飼料を不断給餌されていた。乳量等の各個体の生理的な情報は不明である。

これらの牛から右前肢 (#73の牛のみ左前肢) および両後肢の蹄計48蹄を採取した。実験1と同様に蹄底の”潰瘍好発部位” から表皮層と角質層を含む部分を採取し、切片を作成した。これらの試料について病理組織学的検索を行い、実験1と同じく角化の程度を基準にして5段階に分類し、実験1の結果と比較検討した。なお統計学的検定法には2群間の差の検定にはマン・ホイットニ検定を、3群以上の多群の検定にはクラスカル・ワーリス検定を用い、危険率5%未満を有意と判定した。

### 第3節 結果

#### <実験1>

##### 1) 肉眼的所見

45頭の供試牛のうち、5頭において明らかな蹄底潰瘍が認められ、なかには第3趾骨にまで到達する癭管を形成しているものもあった。これらの明らかな蹄底潰瘍罹患牛を除いた、40頭211蹄における肉眼的所見とその発生率をTable 2-1に示す。72.7%と大多数の蹄が明らかな過長蹄であった。白線部の裂開はほぼ1/4の蹄で、また蹄球びらんは約15%の蹄で認められた。蹄底角質における重度の出血は全体の蹄のうち12.1%のみで見られたが、Fig. 2-7に示すようなごく軽度の点状の出血はほとんど全ての蹄底に存在した。この点状出血は蹄底中央部もしくは白線部に位置しており、また非常に薄い層にのみ存在し、削蹄することで消失してしまうものがほとんどであった。

##### 2) 病理組織学的所見

各グレードごとの病理組織学的所見を以下に述べる。

###### グレード1 (正常な角化)

真皮乳頭の形態は規則的で基底細胞の配列も乱れていない (Fig. 2-8)。真皮層における循環障害はほとんど認められないか、きわめて軽微であった。

###### グレード2 (軽度の角化異常)

蹄真皮には、血管拡張や鬱血、血管壁の水腫性変化、血液細胞の漏出といった循環障害が時に認められた。また血管周囲には好中球および円形細胞の浸潤を伴うごく軽度の炎症が散見された。基底細胞の中には空胞化したものや核濃縮を伴うものが散見された。またエオジン好染性に変性した有棘細胞も観察された。

###### グレード3 (中等度の角化異常)

グレード2と同様の血管拡張や鬱血に加え、毛細血管の増生や血栓の存在も認められた。多数の小動脈において、内膜の増殖と中膜の著名な肥厚を伴う動脈硬化像に酷似し

た所見が認められ (Fig. 2-9)、膠原線維の水腫性膨化像も散見されるなど、真皮層の循環障害は顕著であった。グレード2で認められた好中球や円形細胞の浸潤はより高頻度に認められた。基底細胞の空胞変性は顕著となり、一部では不整な増殖も認められた。また有棘層にも細胞の変性、壊死が認められた (Fig. 2-10)。

#### グレード4 (重度の角化異常)

真皮層の循環障害は高度であり、血管拡張、血管増生、動脈硬化に類似した血管の内腔の変化以外にも、出血や血栓が多数認められた (Fig. 2-11)。真皮層には膠原線維の水腫性膨化像や神経周膜の線維化も存在した。基底層、有棘層、角質層は全体が一様に角化亢進しており一部には変性・壊死も認められた。

#### グレード5 (蹄底潰瘍形成)

表皮層は一様に角化亢進しており、基底層、有棘層、角化層の判別は不可能であり、脆弱な組織となった角質の一部は欠損して蹄底潰瘍を形成していた。欠損部に隣接した真皮層には菌塊とともに円形細胞、好中球の著しい浸潤を伴う炎症像が観察された。炎症の激しい材料では真皮層の循環障害の程度は不明であったが、残った部分の真皮層にはグレード4と同様の、高度の循環障害が認められた。

各蹄の部位と組織学的グレードの分布ならびにその割合をTable 2-2に示した。正常と考えられたグレード1は全239蹄中わずかに11.7%であった。グレード2が半数以上を占め、ついでグレード3が23.9%、グレード4と5がそれぞれ5.4%であった。一方、右前肢と左右両後肢間の組織学的グレードの分布をFig. 2-12に示したが、前肢蹄 (n=81) と後肢蹄 (n=158) のあいだならびに左後肢蹄 (n=77) と右後肢蹄 (n=81) の間のグレード分布に有意差は認められなかった。また前肢および後肢それぞれの内側蹄と外側蹄の間の分布の差をFig. 2-13に示した。グレード3以上の蹄は前肢では内側蹄に後肢では外側蹄に多く分布する傾向があったが、右前肢および後肢ともに内外蹄間の統計的な有意差は検出されなかった。

### <実験2>

全48蹄のグレード分布をTable 2-3に示す。臨床的に蹄底潰瘍と診断された蹄は12蹄であり、8頭中5頭は2つの蹄に潰瘍が存在した。12の蹄底潰瘍は4蹄が後肢内側蹄に8蹄が後肢外側蹄と全て後肢に位置していた。一方組織学的にグレード5、すなわち蹄底潰瘍と分類された蹄は15蹄であったが、このうち臨床的にも蹄底潰瘍と診断されていた蹄は8例であった。すなわち臨床的に蹄底潰瘍と診断されたが組織学的にはグレード5でなかった蹄が4蹄、逆に臨床的に蹄底潰瘍と診断されなかったが組織学的にはグレード5を示した蹄が7例存在した。これは潰瘍の位置が採材部位とはくいちがっていたこと、あるいはごく軽度の蹄底潰瘍が二重蹄底や蹄に付着した汚れのために生前には発見されなかったことが原因と思われた。

病理組織学的所見は実験1と同様に真皮層では循環障害を、表皮層では角化異常を主徴とするものであった。真皮層の循環障害は鬱血や血管増生、動脈壁中膜の肥厚 (Fig. 2-14)、血栓 (Fig. 2-15) などの血管の異常がほとんど全ての蹄に存在した。表皮層にはさまざまな程度の角化亢進もしくは錯角化が存在し (Fig. 2-16)、基底層および有棘層の細胞には空胞化変性や壊死しているものが散見された (Fig. 2-17)。全体として表皮層の変性変化よりも真皮層の循環障害のほうが高頻度に出現していた。明らかな炎症性の所見は蹄底潰瘍の角質欠損部に近接した部位にのみ認められ、それらは好中球を主体とした化膿性炎症が主体であった。

全48蹄における各グレードの比率をFig. 2-18に示した。実験1の無作為抽出した239蹄に比べて、実験2の48蹄は有意に高いグレードの比率が高く (Table 2-4)、グレード4と5をあわせると全蹄のうちの50%を超えた。また各蹄の位置におけるグレードの比率をFig. 2-19に示す。両側の後肢外側蹄はグレード3以上の蹄で占められており、他の位置の蹄に比べて高度に障害されていた。Table 2-4に示すように統計学的にも、左前肢を除く6箇所蹄位置の間には有意なグレードの差があり、さらに前肢よりも後肢が、後肢内蹄よりも後肢外蹄の方が有意に高いグレードを示していた。左右の後肢間には有意差はなかった。この明らかに高いグレードを呈した後肢外側蹄を除いた4箇所

蹄位置の間には有意差がなく、そのグレードは位置によらずほぼ等しいことが示された。

しかしこれら4箇所30蹄のグレードを実験1の無作為採取された牛の蹄と比べると有意に高度であることが認められた。

#### 第4節 考察

実験Iで用いた乳牛の生前の飼養管理や護蹄管理、跛行の有無などに関しては全く不明である。しかし採材を行った屠場のある茨城県と栃木県は東京近郊の酪農地帯であり、これらの地域の飼養形態は、20～40頭程度の小規模酪農家によるタイストールやスタンションの繋ぎ飼いで、運動場や牧野への放牧は行われず、かつ高栄養の濃厚飼料を比較的多量に与えられるといったスタイルが大部分を占めている。今回用いた乳牛もそのほとんどが、このような集約化された飼養管理下にあったものと想像される。また肉眼的な観察で、顕著な蹄底潰瘍を罹患していない211蹄のうち72.3%もの高率で過長蹄が存在した。このことはこれらの乳牛のほとんどにおいて、適切な削蹄や十分な運動量、牛床の材質に関する配慮といった護蹄管理が不十分であることを示唆するものと思われた。

臨床的に急性もしくは慢性蹄葉炎と診断された牛蹄の病理組織像はNilsson[61]、Maclean[47]、Andersson[12]、Boosman[16]、Singh[71]らによって報告されている。これらの報告に共通する所見として、急性蹄葉炎では蹄真皮における充血、血栓、出血、結合織や神経周膜の浮腫といった循環障害が、また表皮層における基底細胞の膨化、空胞化変性、有棘層内のケラチン体出現などの変化があげられている。一方慢性蹄葉炎の真皮層には、より高度な血管の拡張および増生、慢性化した血栓などより発展した循環障害が認められる。また慢性蹄葉炎に特有の所見として、小動脈において内膜の増殖と中膜の肥大を主体とした動脈硬化に類似した血管病変が報告されている。また表皮層では、角化亢進もしくは錯角化といった角化異常が特徴的であると報告されている。

これらの所見から蹄葉炎の病態の本態は、蹄真皮における循環障害であると考えられている。すなわち、蹄葉炎の急性期にはまず蹄真皮の循環障害が起こり、虚血による無菌性の炎症から疼痛などの臨床症状をもたらす。その後循環障害の結果として、角質合成細胞である基底層、有棘層への栄養供給が阻害されるため、正常な角質形成が妨げられ、数箇月後には異常な蹄輪や蹄型を主徴とする慢性蹄葉炎へと移行するものと考えら

れている。

今回の病理組織学的所見はこれら過去の報告と基本的に一致しており、真皮層ではさまざまな循環障害が、表皮層では角化の亢進が主体であった。このうち判定しやすいと考えられた表皮層の角化の状態を基準にして、正常と思われるグレード1から著しい角化亢進を示すグレード4、さらに角質層の消失であるグレード5までの分類を行った。このとき低いグレードすなわち角化異常が軽度な蹄では、真皮層における循環障害も軽度な血管拡張や鬱血であり、高度の角化異常を伴う高グレードの蹄では血管壁の肥厚や血栓、出血等の高度な循環障害が認められる傾向があった。また実験2では全体として表皮層の変性変化よりも真皮層の循環障害のほうが高頻度に出現していた。これらの所見はWeaverによって提唱された、蹄葉炎による真皮の循環障害が角質合成を阻害し、その結果産成された不良角質が将来他の蹄病に発展するという説[87]を支持するものであり、今回5段階に分類された所見はその一連の過程を示しているものと考えられた。

この中で、中等度から高度の角化亢進もしくは錯角化を主徴とするグレード3および4の病理組織学的所見には、真皮層における血栓や出血等の循環障害とともに動脈硬化像に酷似した小動脈壁の肥厚像が散見され、また基底層および有棘層には細胞の空胞変性や壊死が広く存在した。これらの組織像は前述した慢性蹄葉炎の組織像の報告にきわめてよく一致しており、今回の分類におけるグレード3ないし4の変化は慢性蹄葉炎にあたるものと考えられた。

一方グレード2に見られた循環障害と角化異常は、本質的にはグレード3、4のそれと同種の病変であるがその程度がより軽度であり、慢性蹄葉炎の前段階に当たる状態を示しているものと考えられた。グレード2は全体の半数を占めており、今回無作為に採材した乳牛の半数が急性蹄葉炎の症状を示していたと考えることは困難である。近年急性および慢性蹄葉炎とは別の蹄葉炎の形態として、Peterseらによって潜在性蹄葉炎の概念が提出されている[18]。潜在性蹄葉炎は、臨床的な跛行は示さないものの蹄底の出血や変色およびロウ状の柔らかい蹄角質を主徴とする肉眼的に病的な蹄の状態として定義されている。その病理組織学的な所見は報告がないが、本質的には急性蹄葉炎と同様の、

しかし疼痛を伴わない程度の軽度な循環障害が、ある一時期に蹄真皮に存在しており、このとき引き起こされた出血や角質合成の異常が蹄の成長に伴い、数箇月後に表出したものがその病態と考えられている。したがって、このグレード2に分類された蹄は潜在性蹄葉炎に当たる病変を示しているものと思われた。

今回グレード1すなわちほぼ正常と分類された蹄はわずか11.9%に過ぎず、53.6%と半数以上がグレード2に分類された。また潜在性蹄葉炎の重要な所見である蹄底の肉眼的な出血は、重度なものは12.1%にしか認められなかったものの、点状の微小な出血はほとんど全ての蹄底に見いだされた。これら2つの結果から、今回実験に用いられたような我が国に特有の集約的な飼養管理下にある乳牛においては、かなりの割合で潜在性蹄葉炎が存在することが推察され、この潜在的な蹄真皮と角質の異常が最近の蹄疾患の増加の遠因になっていることが想像された。

実験1では各蹄の位置におけるグレード2の割合は41.5~60.5%とほぼ一定しており、実際、前肢と後肢の間、後肢の左右間、内側蹄と外側蹄の間には統計的に有意な差は検出されなかった。このことは一般的な乳牛では蹄の位置によらず全ての蹄で同程度の潜在性蹄葉炎様変化が起きていることを示しており、全ての蹄を均等に障害するような全身的な要因の関与が示唆された。

一方蹄底潰瘍を罹患した乳牛を用いた実験2では、両側後肢外側蹄のグレードは特異的にきわめて高度だが、それ以外の4蹄ではほぼ同じレベルであること、かつこれら4蹄のグレードでも正常な乳牛より有意に高度であることが示された。この結果から、蹄底潰瘍をもつ乳牛では潰瘍の位置に関わらず全ての蹄で一般牛よりも高度な病変が起きていることが示され、全蹄を障害する全身的な要因がより強く作用している可能性が示唆された。さらにこの全身的要因の存在下で後肢外側蹄のみにおいて病変を進行させる別の局所的な要因が存在するものと考えられた。

今回の調査では、蹄葉炎および蹄底潰瘍の発生に関与すると考えられるこれらの全身のあるいは局所的な要因が何であるかを推察することは困難であった。蹄葉炎の原因は未だに不明であり、発生状況の分析などからさまざまな誘発要因が提唱されているが、現

在では蹄葉炎は様々な要因が相互に協力して発生する多因子性の疾患であると考えられている。古くから乳房炎や子宮内膜炎あるいはルーメンアシドーシスといった全身疾患時に急性蹄葉炎が併発することが知られており、蹄葉炎の発生になんらかの全身性因子が関与するという考え方は以前より広く認められていた[18, 24, 54]。とくに集約的な管理法の普及とともに栄養学的な側面が注目され、濃厚飼料の過食によって引き起こされるルーメンアシドーシス時に第一胃内で産成されるいくつかの物質が蹄葉炎の原因物質の候補にあげられたが、未だに確定されたものはない。今回用いた蹄底潰瘍罹患牛は完全飼料の不断給餌を受けており、濃厚飼料の過剰摂取が起りえる飼養管理下であったが、詳細は不明である。

一方、後肢外側蹄に集中して蹄病が多発することはいくつかの報告があり広く知られているが、この原因も未だに不明である。Ossentらは牛の後肢蹄にかかる負重を詳細に検討し、一般的に後肢内側蹄よりも外側蹄の方が負重大きいこと、分娩後重度な蹄病が発生した群では分娩前から後肢外側蹄への負重大きかったこと、年齢が上がるに連れて後肢外側蹄への負重が増加することなどを示した[62]。Tousaint Ravenは負重の大きな後肢外側蹄では真皮層が刺激され、過剰な角質形成が起こる結果さらに負重の不均衡が進行すると述べている[82]。また牛床の材質や運動量、削蹄管理といった蹄を取り巻く管理面や、牛群のなかでの個体の牛の行動、たとえば競争による横臥時間の差などの外的要因が、このような負重の不均衡を助長し、跛行の発生率に影響を与えていると考えられている。

以上をまとめると、我が国に特有の集約的な飼養管理下にある乳牛においては、かなりの割合で潜在性蹄葉炎が存在することが示され、この蹄真皮と角質の潜在的な異常が最近の蹄疾患の増加の遠因になっていることが推察された。また蹄底潰瘍をもつ乳牛では、潰瘍の位置に関わらず全ての蹄で一般の乳牛よりも高度な病変が起きていることが示され、全蹄を障害する全体的な要因がより強く作用している可能性が示唆された。さらにこの全体的要因の存在下で後肢外側蹄のみにおいて病変を進行させる別の局所的な要因が存在するものと考えられた。

## 第5節 小括

我が国における蹄の障害の程度や頻度およびその発生要因を探ることを目的として、以下の二つの実験を行った。

まず実験1として、日本の都市近郊における集約的飼養管理下に置かれ、適切な蹄管理を受けていないと考えられるホルスタイン種乳牛の45頭239蹄を屠場から無作為に採取し、蹄底の真皮層および表皮層の病理組織学的検索を行った。その結果、程度の差はあるものの真皮層では循環障害を主体とした病変が、表皮層では変性や角化の異常が広く認められた。これらの所見を、循環障害と角化の程度によりグレード1から5までの5段階に分類した。ほぼ正常であるグレード1はわずか11.7%しか存在せず、軽度の病変を示したグレード2は潜在性蹄葉炎と考えられたが、半数以上を占めていた。グレード3 (23.9%) および4 (5.4%) の病変は従来報告されている慢性蹄葉炎の組織像によく一致していた。また蹄底潰瘍を伴うグレード5も5.4%存在した。これらグレード1から5の所見は、潜在性蹄葉炎が他の蹄病へ進行する一連の病変の表れと推察された。

次いで実験2として、蹄底潰瘍と診断され淘汰された乳牛8頭の蹄について、実験1と同様の病理組織学的検索を行い、その結果を実験1と比較した。その結果、蹄底潰瘍を罹患した乳牛の蹄病変のグレードは、蹄底潰瘍の位置に関わらず全ての蹄において、正常な乳牛よりも高度であった。後肢の外側蹄における病変は他の蹄に比べて明らかに高度であったが、それ以外の蹄ではほぼ同じレベルであった。したがって、蹄底潰瘍のような高度の蹄疾患をもつ乳牛では、全ての蹄を均等に障害するような全身的な要因が存在しており、さらにその存在下で後肢外側蹄のみ病変を進行させる別の局所的な要因が存在するものと考えられた。

以上の結果から、我が国の集約的な飼養管理下の乳牛において、かなり高率に潜在性蹄葉炎が存在すること、および全蹄を均等に傷害するような全身性の因子の存在が示され、これが近年の蹄疾患の増加の素因となっているものと考えられた。

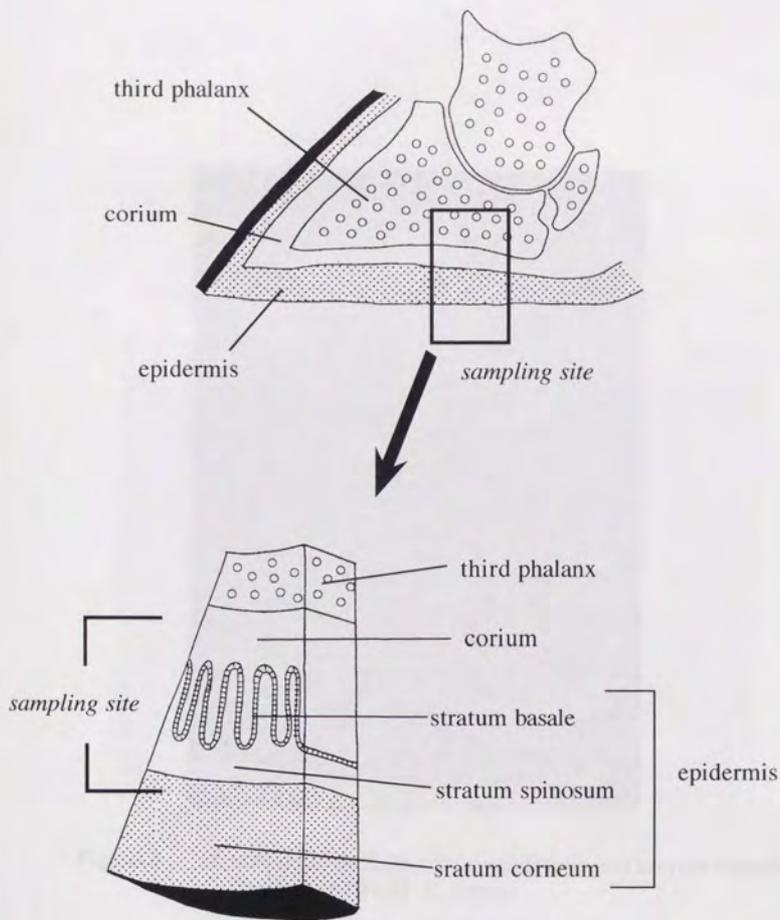


Fig. 2-1. Schematic figures of the sampling site in the bovine hoof.

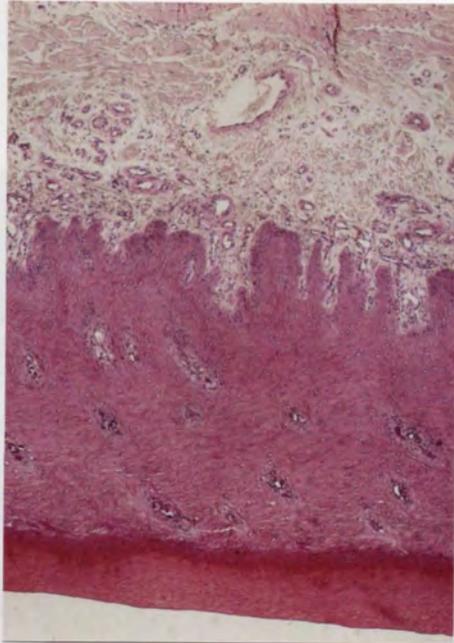


Fig. 2-2. Histological findings of the epidermis and corium classified as Grade 1 ( $\times 100$ , H. E. Stain)

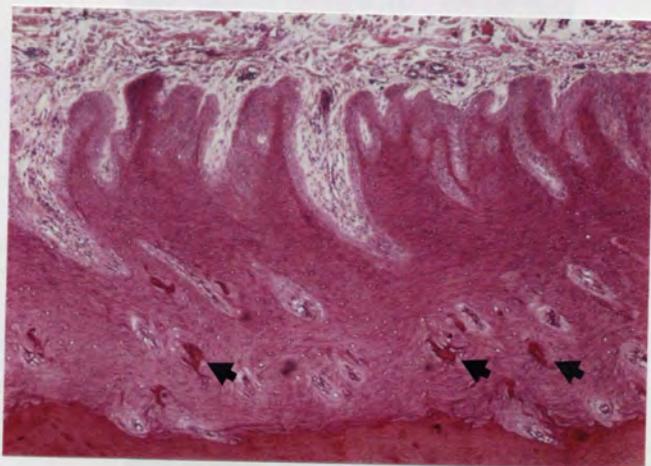


Fig. 2-3. Histological findings of the epidermis and corium classified as Grade 2 ( $\times 100$ , H. E. Stain).  
Note the keratine bodies in the stratum spinosum (arrows).

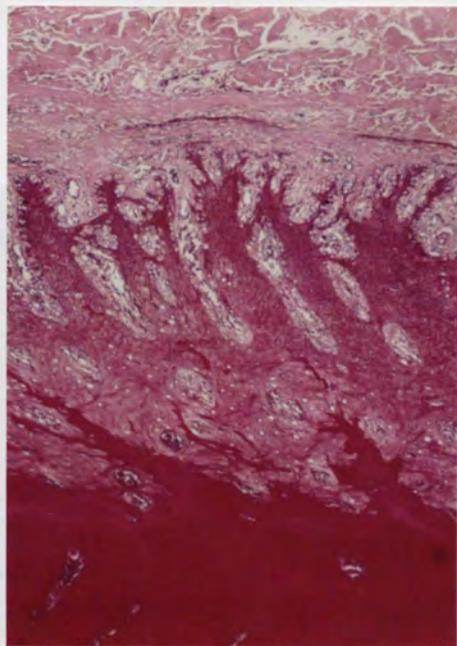


Fig. 2-4. Histological findings of the epidermis and corium classified as Grade 3 ( $\times 100$ , H. E. Stain). Note the progressive keratinization in the stratum spinosum (arrows).

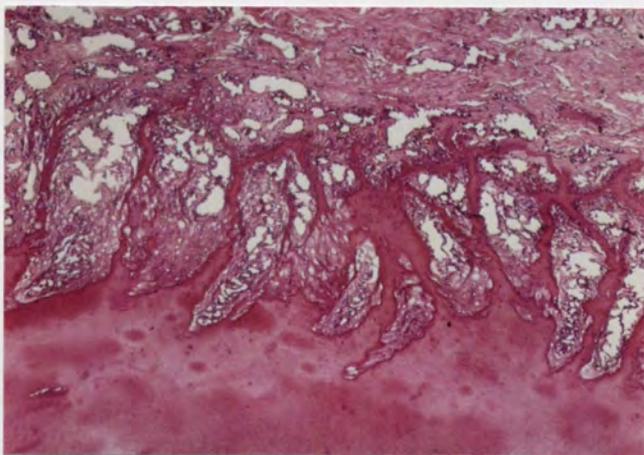


Fig. 2-5. Histological findings of the epidermis and corium classified as Grade 4 ( $\times 100$ , H. E. Stain).  
Note the cornification of all area of the stratum internum.

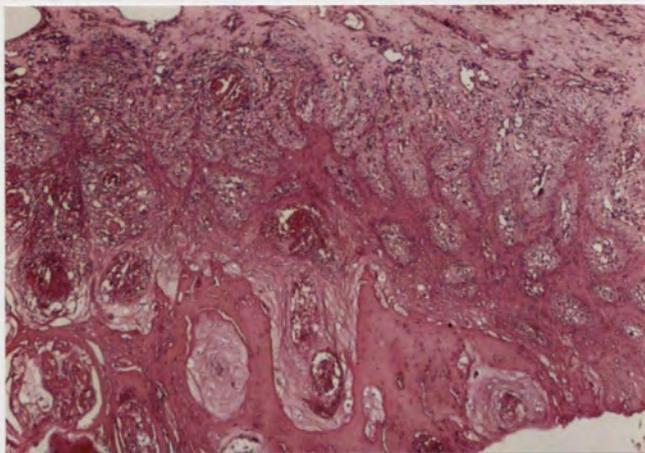


Fig. 2-6. Histological findings of the epidermis and corium classified as Grade 5 ( $\times 100$ , H. E. Stain).  
Note the partial loss of the stratum corneum.

Table 2-1. The incidences of macroscopic hoof lesions in the cows without sole ulcer (211 digits of 40 cows)

---

Overgrown claw	72.7%
Traumas or cracks in the solar horn	49.4%
White zone disease	27.5%
Heel erosion	14.8%
Severe hemorrhage in the solar horn	12.1%

---



Fig. 2-7. Petechial hemorrhage on the surface of the solar horn.

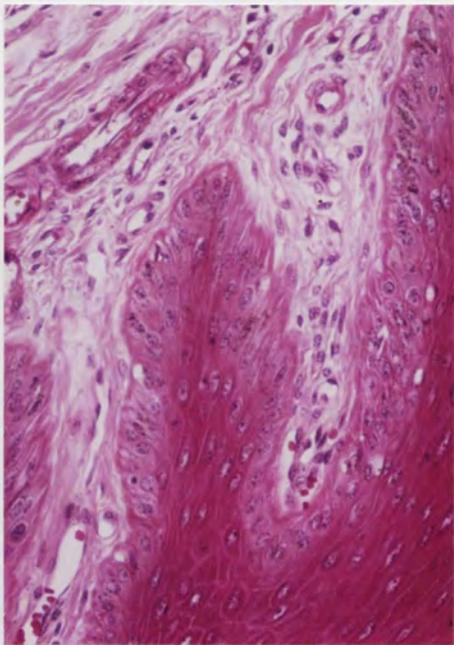


Fig. 2-8. Normal appearance of the stratum basale and the stratum spinosum in Grade 1 ( $\times 400$ , H. E. Stain)

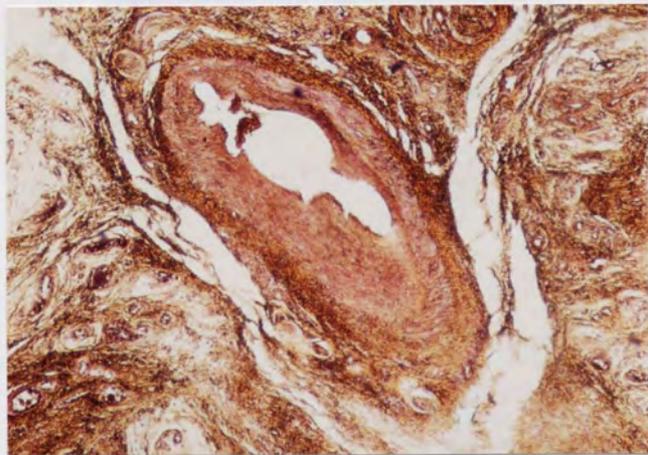


Fig. 2-9. Arteriosclerosis-like change of the vessel in Grade 3 ( $\times 200$ , PTAH Stain).  
Note the proliferations of the tunica media.

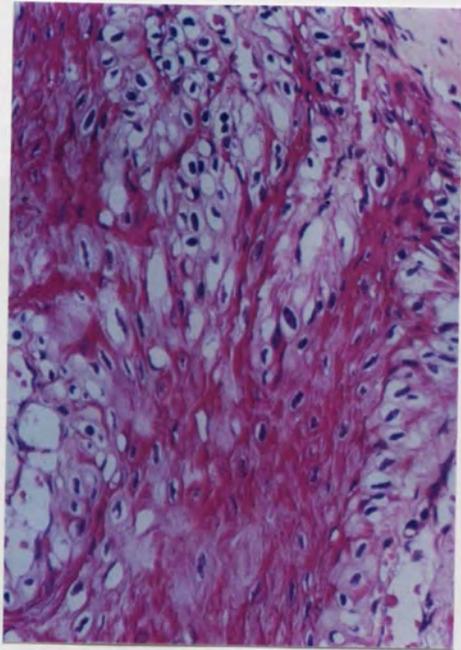


Fig. 2-10. Vacuolization of the stratum basale and degenerative changes of the stratum spinosum in Grade 3 ( $\times 400$ , H. E. Stain).

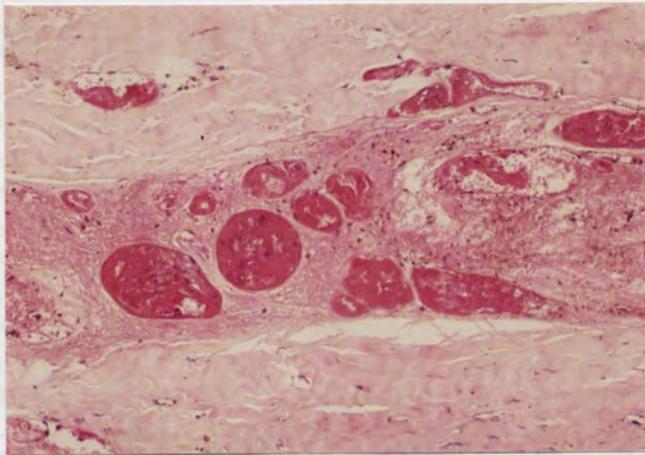


Fig. 2-11. Multiple thrombi in the corium in Grade 4 ( $\times 200$ , H. E. Stain).

Table 2-2. The incidence of grades in each claw position

Claw position	Grade					total
	1	2	3	4	5	
Right fore medial	<b>6</b> <i>14.6</i>	<b>17</b> <i>41.5</i>	<b>13</b> <i>31.7</i>	<b>3</b> <i>7.3</i>	<b>2</b> <i>4.9</i>	<b>41</b> <i>100</i>
Right fore lateral	<b>6</b> <i>15.0</i>	<b>23</b> <i>57.5</i>	<b>8</b> <i>20.0</i>	<b>1</b> <i>2.5</i>	<b>2</b> <i>5.0</i>	<b>40</b> <i>100</i>
Left hind medial	<b>2</b> <i>5.1</i>	<b>23</b> <i>59.0</i>	<b>9</b> <i>23.1</i>	<b>2</b> <i>5.1</i>	<b>3</b> <i>7.7</i>	<b>39</b> <i>100</i>
Left hind lateral	<b>4</b> <i>10.5</i>	<b>23</b> <i>60.5</i>	<b>7</b> <i>18.4</i>	<b>2</b> <i>5.3</i>	<b>2</b> <i>5.3</i>	<b>38</b> <i>100</i>
Right hind medial	<b>5</b> <i>12.8</i>	<b>21</b> <i>53.9</i>	<b>10</b> <i>25.6</i>	<b>1</b> <i>2.6</i>	<b>2</b> <i>5.1</i>	<b>39</b> <i>100</i>
Right hind lateral	<b>5</b> <i>11.9</i>	<b>21</b> <i>50.0</i>	<b>10</b> <i>23.8</i>	<b>4</b> <i>9.5</i>	<b>2</b> <i>4.8</i>	<b>42</b> <i>100</i>
Total	<b>28</b> <i>11.7</i>	<b>128</b> <i>53.6</i>	<b>57</b> <i>23.9</i>	<b>13</b> <i>5.4</i>	<b>13</b> <i>5.4</i>	<b>239</b> <i>100</i>

(The italic numbers show the percentages in each grade)

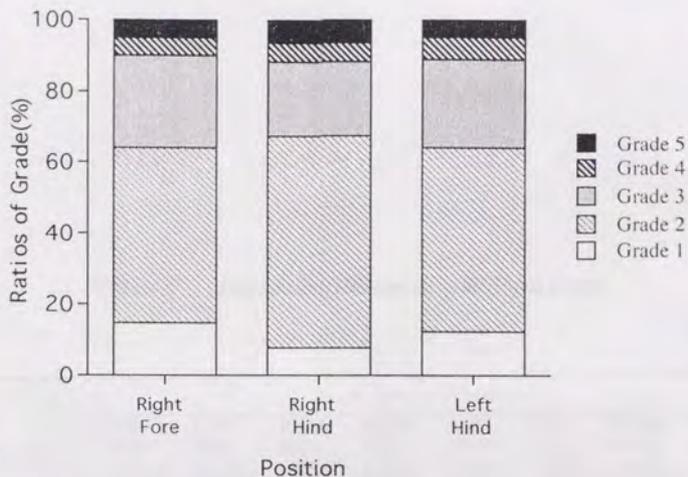


Fig. 2-12. Differences in ratios of grades between the fore and hind, and right and left limbs.

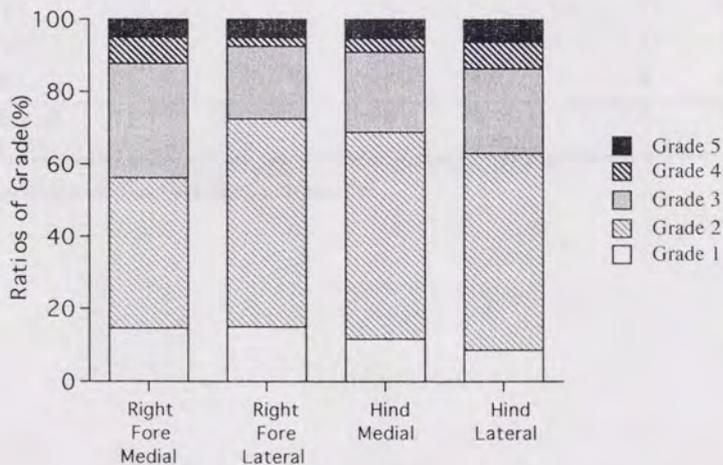


Fig. 2-13. Differences in ratios of grades between the medial and lateral digits.

Table 2-3 Grade distribution in individual cows

Cow #	Claw positions							
	Left Fore Lateral	Left Fore Medial	Right Fore Medial	Right Fore Lateral	Left Hind Lateral	Left Hind Medial	Right Hind Medial	Right Hind Lateral
#63			4	2	5*	2	2	3
#68			2	2	5	1	1	4*
#73	3	3			5*	3	5*	3
#75			3	4	5*	3	4	5*
#76			4	3	5	4	3	5*
#77			5	5	5	5*	5*	3
#78			2	2	4	5	2*	5
#83			2	3	4*	2	4	4*
Number of Sole ulcers	0	0	0	0	4	1	3	4

\* : digits diagnosed as sole ulcers clinically.

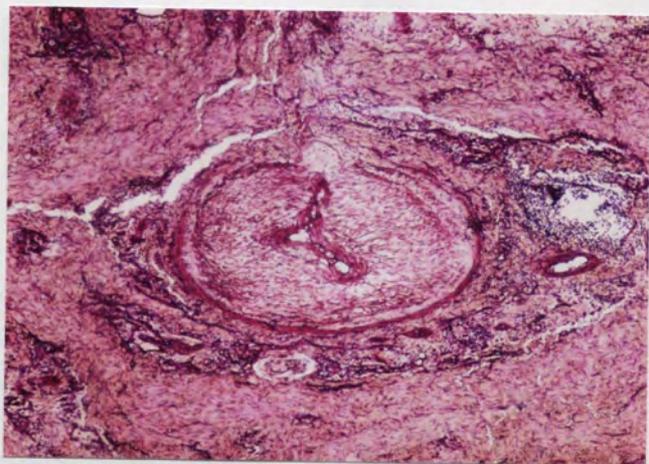


Fig. 2-14. Proliferation of the tunica media in arteioles in the solar corium of the right hind lateral digits of cow #68 ( $\times 200$ , H. E. Stain).

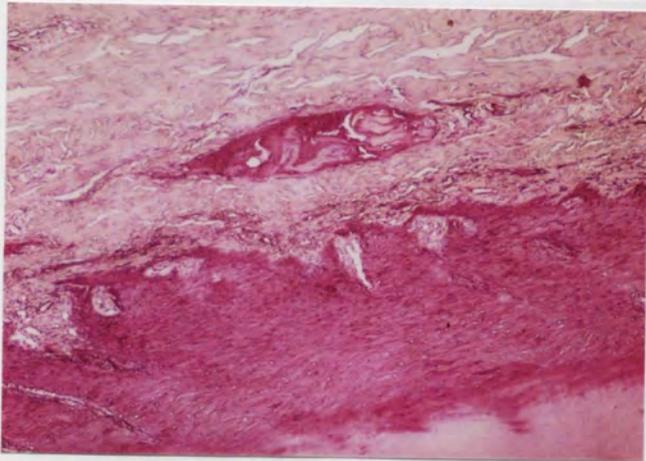


Fig. 2-15. Thrombi in the solar corium of the left hind lateral digit of cow #75 ( $\times 100$  H. E. Stain).

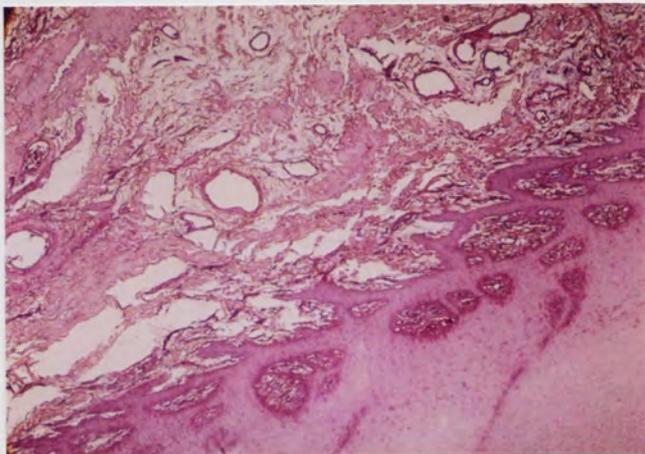


Fig. 2-16. Hyper-and/or parakeratosis in the epidermis of the right fore medial digit of cow #63 ( $\times 100$  H. E. Stain).

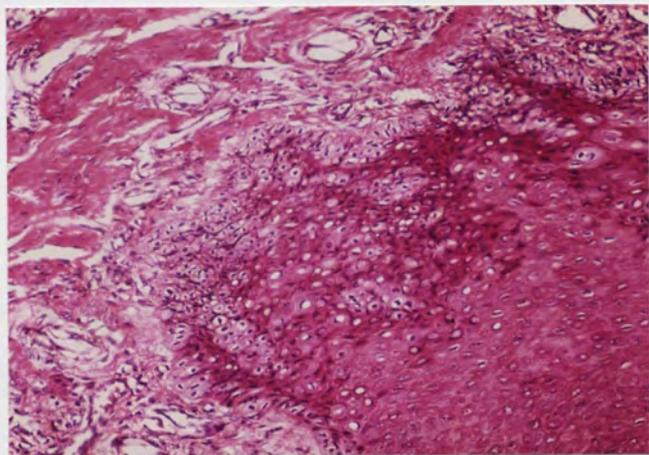


Fig. 2-17. Vacuolization of the cells in the stratum basale and spinosum of the right hind lateral digit of cow #75 ( $\times 200$  H. E. Stain).

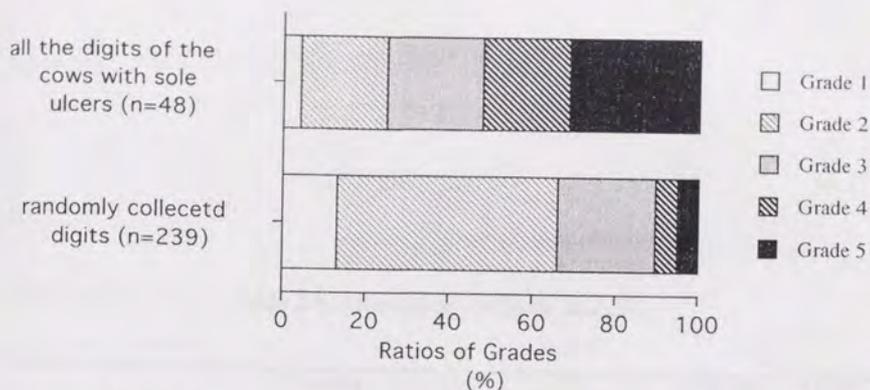


Fig. 2-18. Differences in ratios of grades between the digits of the cows with sole ulcers and the digits collected randomly.

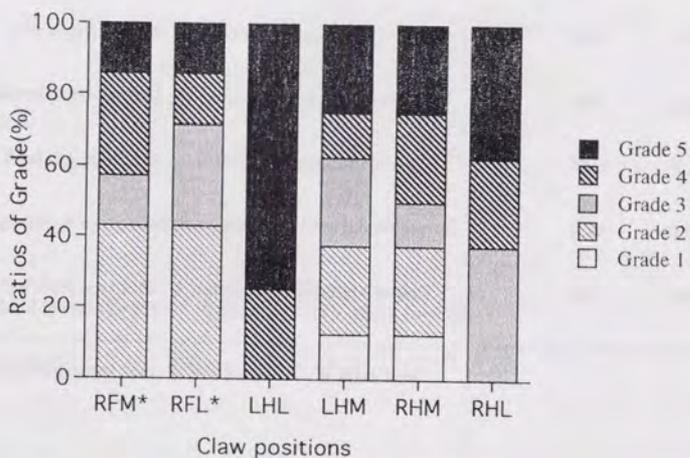


Fig. 2-19. Incidence of grades in each claw position

RFM: Right Fore Medial      RFL: Right Fire Lateral,  
 LHL: Left hind Lateral      LHM: Left Hind Medial,  
 RHM: Right Hind Medial      RHL: Right Hind Lateral

n=8 in each claw position

\* : n=7 (excluding cow #73)

Table 2-4. Results of statistical analysis

Grouping	Analysing Method*	P Value
all digits of the cows with sole ulcers (n=48) / randomly collected samples in our previously report (n=239)	MH	<0.0001
6 claw positions except left fore limbs	KW	0.0388
fore digits (n=16) / hind digits (n=32)	MH	0.0435
hind lateral digits (n=16) / hind medial digits (n=16)	MH	0.0138
right hind digits (n=16) / left hind digits (n=16)	MH	0.2538
4 claw positions except left fore limbs and hind lateral claws	KW	0.9877
digits in 4 claw positions except hind lateral (n=30) / randomly collected samples in our previously report (n=239)	MH	0.0014

\* MH: Mann-Whitney test, KW: Kruskal-Wallis test

### 第3章 ヤギにおけるエンドトキシン全身投与による蹄葉炎作出の試み

#### 第1節 緒言

前章の結果から、乳牛における蹄疾患の発生には全ての蹄を同程度に障害するような全身的な要因が存在していることが示唆された。牛の蹄葉炎の発生素因を総括した Vermunt の報告[83]によれば、全身性疾患、年齢、産次、泌乳ステージ、肢勢、遺伝、栄養、牛舎構造、運動量、行動、環境などきわめて多数の要因の関与が挙げられており、現在では蹄葉炎はさまざまな要因が複雑に作用しあって発生する多因子性の疾患であると考えられている。一方酪農における飼養方法の変化とともに蹄疾患の発生が増加してきたことや、盗食や分娩後の飼料変化時に急性蹄葉炎が多く発生することは経験的に広く知られており、また疫学的調査でも濃厚飼料を多量に与えた牛群では蹄葉炎や蹄底潰瘍の発生率が高くなることが実際に示されている[46, 50, 64]。これらの事実から栄養性の要因、なかでも炭水化物を多く含む濃厚飼料の多給は蹄葉炎発生において特に大きな役割を果たしていると考えられている。

乾草と濃厚飼料のバランスの取れた飼料を給与されている牛では、第一胃内では *Bacteroides* などのグラム陰性菌群が優勢であり、第一胃内容の pH は 6~7 に保たれている。しかし易発酵性の炭水化物を多く含む濃厚飼料を急激に過食した場合、第一胃内では酸生成性のグラム陽性菌群が優勢となり、最初に酪酸やプロピオン酸が次いで乳酸が増加する結果、第一胃内 pH の急激な低下を招く。乳酸の蓄積が続くと、遂には全身的なアシドーシスと脱水を生じ、さまざまな臨床症状を示すルーメンアシドーシスと呼ばれる状態に至る。この第一胃 pH の低下時には、乳酸以外にも蛋白質の腐敗から生成されるヒスタミンなどの有毒アミン類[76]や、死滅したグラム陰性菌の構成物質であるエンドトキシンなどが増加することが示されており、これらの物質が蹄葉炎の発生に預かると目されてきた。

しかし第一胃内への乳酸投与による蹄葉炎の発症実験は失敗に終わり[11]、また Takahashiらによるヒスタミンを用いた蹄葉炎発症実験[77, 78]では部分的に成功したものの、濃厚飼料過食との併用や高用量の動脈注射といった生理的とは考えられない条件下であったことなどから、これら2種類の物質の関与には疑問がもたれている。

このような背景のもとに、最近蹄葉炎の発症物質として最も注目されているのがエンドトキシンである。エンドトキシンはグラム陰性菌の細胞壁の構成成分であり、リポ多糖がその活性本体である。近年その測定法として、カプトガニの血球成分を用いたリムルステストの精度が飛躍的に発展したこともあって、そのさまざまな生体活性に関する研究が進んでいるが、凝固異常や血管内皮の障害を引き起こす作用あるいは血管作動薬的な作用が蹄葉炎の発症に深く関与していると考えられている。

草食獣においては第一胃あるいは盲腸といった発酵タンクの働きをする消化管内にグラム陰性菌は多量に常在しており、上述のルーメンアシドーシスのような菌叢の変動時には、グラム陰性菌の破壊によってエンドトキシンが大量に放出されることが容易に想像される。牛や馬における濃厚飼料過食時の蹄葉炎発生は経験的によく知られた事実であり、実際、馬においては、炭水化物過食による蹄葉炎症状の発症と同時に全身血中のエンドトキシン血症が起きていることが検出されている[74]。牛においては実験的な炭水化物過食によって蹄葉炎発症に成功した報告はないが、実験的な炭水化物過食時に第一胃液中のエンドトキシン濃度の上昇を検出した報告[8, 59]や全身血中のエンドトキシンを検出した報告[4, 27]はいくつかある。また乳房炎や分娩後の子宮内膜炎など重度の細菌性疾患の罹患時に蹄葉炎症状を表わすことが知られており、この事実もエンドトキシンの蹄葉炎発生の可能性を支持するものである。

このような間接的証拠が集まる一方で、牛におけるエンドトキシン投与による蹄葉炎誘起の試みはごくわずかしか報告されていない。Mortensenらは趾動脈内への局所投与で軽度の蹄葉炎症状が作出されたと報告している[72]。またBoosmanらの全身投与実験では、臨床症状は表れず、わずかに蹄真皮における血栓と基底細胞の空胞化が組織学的に認められるにとどまった[17]。このような組織レベルの病変は臨床的には潜在性

蹄葉炎と同様の变化と考えられ、かならずしも臨床症状を伴わなくても蹄葉炎発症と見做すことが可能である。しかし、実際にエンドトキシン投与時の蹄の病理組織学的検索を行うためには、多数の牛が必要となり経済的にも実験の実施は困難である。

そこで今回の実験では、牛に比べて入手と取扱いが簡便なヤギを用いて、エンドトキシン全身投与による蹄の組織病変の作出を試みた。また同時に静脈血中のエンドトキシン濃度を経時的に測定し、その変動を検討した。

## 第2節 材料と方法

### 〈実験動物、処置および採材〉

臨床的に健康な雄6頭、雌3頭の計9頭の成ヤギ（体重20～57kg）を用いた。全てのヤギはあらかじめキシラジンによる鎮静とリドカインによる局所麻酔下で左後肢外側蹄を外科的に切除し、蹄の組織検索の対照として用いた。断趾後少なくとも10日以上経過してからエンドトキシン投与実験を行った。3頭ずつA、B、Cの3群に分け、E. coli (0111:B4) 由来のエンドトキシン（Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, U.S.A.）をA群には10  $\mu$ g/kg、B群には50  $\mu$ g/kg、C群には100  $\mu$ g/kgずつ生理食塩水で適当量に希釈し、外頸静脈からbolusで投与した。投与前および投与後30分、1、2、3、6、9、12、24、36、48、72時間に採血および体温測定、全身的な検査を行った。投与後5分、15分後にはエンドトキシン測定用の採血のみを行った。72時間の採血後チオペンタール麻酔下で放血殺し、左前肢を除く3肢から蹄底の組織を採取した。採取部位は第2章と同様とした。実験途中で斃死した動物については、死亡後なるべく早く同様の採材を行った。採取した組織はホルマリン固定後常法に従って薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色にて観察した。蹄底の組織像においては、様々な所見のなかでも判別しやすいと思われた蹄底真皮における出血、同じく蹄底真皮の血管における血栓および表皮層の基底細胞における空胞変性の3種を指標とし、各蹄におけるその有無を調査した。

採血した血液試料はその一部をエンドトキシン測定用として無菌的に乾熱滅菌（250℃2時間）済みガラス試験管に、残りを血液一般測定用にEDTA加試験管に分注した。EDTA加血は採取後速やかに自動血球計算装置（Sysmex、東亜メディカル、東京）で総白血球数を算定した。エンドトキシン測定用サンプルは室温に30分間放置後、遠心分離し血清を無菌的に乾熱滅菌済みガラス試験管に分注し、測定まで-20℃で保存した。

### 〈エンドトキシンの測定〉

血中エンドトキシン濃度の測定はMotoiらの手技[58]に従い、リムルスES-Jテストワークー、トキシノメーターET-201（ともに和光純薬、東京）を使用する比濁時間分析法

で行った。本法はカプトガニの血球抽出物 (limulus amoebocyte lysate; LAL) がエンドトキシンによって凝固する性質を利用したもので、その凝固時間からエンドトキシン濃度を求める方法である。以下のエンドトキシン濃度測定操作には乾熱滅菌済みガラス器具あるいはガンマ線滅菌済みのプラスチック製器具を用いた。

完全に融解した血清サンプルを注射用蒸留水で10倍に希釈し、ドライバス上で100℃ 10分間インキュベートした後、速やかに氷浴槽で冷却した。この前処理したサンプル 100  $\mu$ l を、あらかじめLAL試薬100  $\mu$ l を分注しておいた専用ガラス管に加え、攪拌後トキシノメーターにセットした。サンプルのゲル化時間を比濁法で測定し、コントロール標準エンドトキシン (E. coli UKT-B株由来、和光純薬、東京) を用いて作成した検量線からエンドトキシン濃度を求めた。各サンプルは2重測定を行い、その平均値を採用した。

### 第3節 結果

#### <臨床症状>

各個体におけるエンドトキシン投与後の著明な臨床症状をTable 3-1に示した。B群(50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )のうちB-3はエンドトキシン投与直後にけいれんを起こして死亡した。他の全てのヤギは30分後から食欲低下、沈鬱状態を示した。B群の残りの2頭およびC群(100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )の全頭では1時間後から呼吸促進が認められた。またA-2(10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ )、B-2、C-2、C-3の4頭では同じく1時間後から下痢が認められた。これらの全身症状は12時間後にはほぼ消失していた。C-3は12時間後に、B-2は48時間後に死亡しているのが発見された。最も症状の重篤な1~12時間後には伏坐したまま起立をいやがる個体が多かったが、実験期間を通して蹄の疼痛や跛行等の蹄葉炎症状を示した個体はいなかった。

Fig. 3-1に示すように、ほとんどの個体でエンドトキシン投与後30分から1時間の間に体温の一過性的上昇が、またFig. 3-2に示すように約3時間後をピークとする白血球数の急激な減少とそれに続く緩やかな増加が認められた。

#### <病理組織学的所見>

蹄底の組織像における蹄底真皮の出血、蹄底真皮血管の血栓および表皮層の基底細胞における空胞変性の3つの所見の出現頻度をTable 3-2に示した。真皮層の出血は、どの群においても対照である処置前に摘出した左後肢外側蹄には認められなかった。エンドトキシン投与後では、C-3を除く全ての個体で1~4箇所蹄に出血が認められた(Fig. 3-3)。真皮層の血管における血栓は、C-3において対照とした左後肢外側蹄にも認められた。エンドトキシン投与後にはA、B両群で2頭に、C群で1頭にそれぞれ一箇所ずつ血栓が認められた(Fig. 3-4)。基底細胞の空胞化は対照とした蹄ではどの群にも認められなかった。しかしエンドトキシン投与後の蹄では前肢後肢を問わず多数認められた(Fig. 3-5)。A-1、B-3、C-3の3頭ではこの変化は認められなかったが、このうちB-3とC-3は投与直後と12時間後に死亡した個体であった。なおこれら3種類の所見の

出現頻度とエンドトキシンの投与量との間には一定の傾向は認められなかった。

これら指標とした所見以外には、小動脈における動脈硬化に類似した変化、すなわち内膜が不整に増殖し血管内腔に向かって突出している像 (Fig. 3-6) や、中膜の肥厚や (Fig. 3-7) が多数の蹄で観察された。これらの所見を定量的に判定するのは困難であったが、対照とした蹄を含めてほとんど全ての蹄に広く存在した。

またB-1、B-2では角化の亢進が認められた (Fig. 3-8)。

#### <血中エンドトキシン濃度>

各群の血中エンドトキシン濃度の変化をFig. 3-9に示した。エンドトキシン投与前に血中でエンドトキシンが検出された個体は存在しなかった。投与後、全9頭中5頭のヤギで血中エンドトキシンが検出され、その全てで投与5分後に最大のエンドトキシン濃度を示した。しかしその値は投与量によって大きな差があった。また5頭中4頭の血中エンドトキシンは、5分後のピーク値の出現後、一旦検出されなくなり、その後再度検出されるという二峰性の変動を示した。

A群中、A-1とA-3のヤギでは実験中一度もエンドトキシンは検出されなかった。A-2では5分後に6.9pg/mlと小さなピークを示した後、9時間後と48時間後に同程度の濃度のエンドトキシンが検出された。

直後に死亡したB-2は投与後の採材は不可能であった。B-3ではエンドトキシンは検出されなかった。B-1は5分後に28.9pg/mlとA-2よりも高いピークを示した。その後30分から6時間後までは検出されなかったが、9および12時間後にそれぞれ3.8pg/mlおよび5.0pg/mlとごく低いレベルの上昇が見られた。

C群の3頭では5分後に126.5~790pg/mlときわめて高濃度のエンドトキシンが検出され、その後急激に減少した。C-1では12時間まで低レベルで推移したが、24~48時間では検出されなくなり、60および72時間では再び低濃度のエンドトキシンが検出された。C-2では5分時のエンドトキシンレベルは126.5pg/mlと3頭のなかでは最も低かった。しかしその後は18.5~80.5pg/mlと比較的高濃度で推移し、9時間後の採材の後で死亡した。C-3では5分後の790pg/mlのピークの後急激に減少し、1~2時間後にはエ

ンドトキシンは検出されなかった。3時間後に再び上昇を始め、9時間後には247.5pg/mlと大きなピークを示し12時間後まで高濃度を維持したが、24時間以降は検出されなかった。

#### 第4節 考察

牛におけるエンドトキシンの投与実験は多数報告がありその投与量も様々であるが、 $0.5\sim 1\mu\text{g}/\text{kg}$ 程度の低用量の静脈内投与で、エンドトキシン血症の典型的な症状である沈鬱、食欲廃絶、呼吸数の増加、ふるえ、横臥、下痢、体温上昇、白血球数の一時的な減少とその後の増加などが観察されている[3, 30, 39, 45]。一方ヤギにおけるエンドトキシンの投与実験の報告は少ないが、 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ の静脈内投与で体温の上昇は認められたが他の臨床症状は表さなかったという報告があり[1]、ヤギは牛に比べてエンドトキシンに対する感受性が低いと考えられる。

今回入手や取扱いの簡便さから、実験動物としてヤギを用いた。実験に先立ち、ヤギに対し $1\mu\text{g}/\text{kg}$ のエンドトキシンを静脈内投与する予備実験を行ったが、やはり臨床症状はほとんど示すことなく耐過したため、その10倍である $10\mu\text{g}/\text{kg}$ を最低用量として、 $50$ 、 $100\mu\text{g}/\text{kg}$ と比較的高用量の投与群を設定した。 $50\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群のうち2頭と $100\mu\text{g}/\text{kg}$ 投与群の1頭が実験途中で斃死したが、これらを含めて全てのヤギで、上述の牛におけるエンドトキシン症とほぼ同様の臨床症状が観察され、また体温の変化や白血球数の変動もきわめて典型的であった。したがって今回のエンドトキシン投与量はヤギにおいても十分な生理活性をもたらしたものと思われた。

牛においてエンドトキシン全身投与時の蹄の組織病変を観察した報告は、Boosmanら[17]とSingh[72]のわずかに2つを数えるに過ぎない。Boosmanらの実験では、低用量のエンドトキシン ( $75$ 、 $100\mu\text{g}/\text{頭}$ ) の投与では蹄の組織病変は見いだされなかったが、高用量 ( $2225$ 、 $6350\mu\text{g}/\text{頭}$ ) 投与から72時間後の組織では鬱血、血栓、リンパ球浸潤、基底細胞の空胞化が認められた。 $5\sim 8\mu\text{g}/\text{kg}$ のエンドトキシン投与を行ったSinghの実験では、5日後に基底細胞の変性、真皮の血管増生、表皮層内の細胞の離開、錯角化などが観察され、さらに5週後の組織では動脈硬化に似た所見を示す血管や血栓で完全に閉塞した血管が認められている。今回の実験では、対照蹄ではほとんど認められなかった出血、血栓、基底細胞の空胞化の3種の所見が、エンドトキシン投与後

の蹄では多数認められ、また少数ではあるが角化亢進の像も認められた。これらの変化は先の報告の結果とよく一致しており、エンドトキシンによって引き起こされたものと考えられた。

血管や血液性状に対するエンドトキシンの直接的あるいは間接的作用はきわめて多岐にわたる。エンドトキシン投与によって血管内皮細胞が脱落や変形などの障害を受けることは古くから知られている[35, 36, 37, 67]。この細胞毒性に対して牛の内皮細胞はヤギ、犬、ヒトのそれよりも高い感受性をもつことが培養内皮細胞を用いた実験で示されている[40]。またエンドトキシンやTNFなどのサイトカインは内皮細胞の透過性を増加させ、毛細血管からの漏出を促進する[21]。一方エンドトキシンは血管内血液凝固を引き起こし、播種性血管内凝固(DIC)の一因となると考えられている。これにはエンドトキシンの刺激により単球や血管内皮細胞が産生する組織因子が関与しているとされる[92]。またエンドトキシンは血管内皮においてICAM-1などの接着分子の発現を促進する[92]。これによる白血球と血管内皮の接着は血管内腔での血行力学に影響を与えるものと思われる。今回観察された出血や血栓といった循環障害は、このような血管内皮や凝固能に関するエンドトキシンの作用によって引き起こされたものと推察される。またエンドトキシンによって放出されるサイトカインのなかには血管作動性をもつアラキドン酸代謝物、たとえばプロスタサイクリンやトロンボキサンなどが含まれる。牛においては、エンドトキシン投与後にこれらの血中濃度が上昇することが示されており[44]、今回観察された血栓や出血のような形態的な循環障害だけではなく、血管の収縮といった機能的な循環障害を引き起こしている可能性も示唆されている。Maclean[47]は、蹄葉炎における表皮層の細胞の変性は、循環障害から来る低酸素状態によるものと示唆しているが、今回の実験でも実験の早期に死亡したB-3とC-3を除いたほとんどの個体で基底細胞の空胞化が観察され、この仮説を支持する所見と考えられた。

内膜の増殖や中膜の肥厚を主徴とする動脈硬化に類似した小動脈壁の変化は、実際の蹄葉炎罹患牛においても[12, 15, 16, 19, 71]、また第2章で行った乳牛の蹄の検索でも観察されている。エンドトキシンによって血管内皮や血液細胞から放出されるサイト

カイン類の多くは、動脈硬化の進展に関与するとされるサイトカインと一致している[91]。Singhはエンドトキシン投与5週間後の牛の蹄に、同様の血管壁の変化を見いだしており、エンドトキシンによる血管内皮の障害や炎症性メディエーターの放出によって起こったものと推察している[72]。今回の実験でも、動脈硬化に類似した血管壁の異常は多数存在したが、エンドトキシン処理後の蹄だけではなく対照とした蹄やエンドトキシン投与直後に死亡した個体の蹄を含め、ほとんど全ての蹄に広く認められた。したがって今回観察された動脈硬化に類似した血管壁の異常は、エンドトキシン投与によって惹起されたものではなく、実験以前から存在したものと考えられた。しかしその成因や蹄の循環に及ぼしていた影響等については今回の実験からは不明である。

エンドトキシンの牛における血中半減期は非常に短く3分以内という報告がある[52, 53]。それぞれ10  $\mu\text{g}/\text{kg}$ および50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与したA群とB群では直後に死亡した1頭を除いて、3頭では血中エンドトキシンは検出されず、A-3で5分後に、B-1で5分後と15分後に検出されたのみであった。100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ を投与したC群でも全頭で5分後にピークを示した後、急激に減少した。これらの結果から、ヤギにおいてもその半減期はごく短いものと推察され、検出しなかった個体では5分以内にピークがあったものと思われた。

血中エンドトキシンが検出された5頭のうち4頭では、一度エンドトキシン濃度が0になった後2度目のピークが検出されている。2度目のピークの出現時間は4頭中3頭では3~9時間に集中していたが、その濃度は個体によって大きな差があった。Aiumlamaiはヤギを用いたエンドトキシンの全身投与実験で、血中エンドトキシン濃度に今回の実験で認められたのと同様の二相性の上昇が認められたことを報告している[1]。またこのときに消化管運動が停滞していたことを示し、これら2度目の血中エンドトキシン上昇のソースは内因性のエンドトキシン、特に消化管内からの漏出であろうと推察している。今回の実験でも下痢を呈した個体が存在したことから、消化管粘膜にはなんらかの変化が起きており、そこから漏出したエンドトキシンが二相目のピークを形成したものと考えられた。

なお、今回は雌雄両方の動物を用いたが、とくに両者に差は見られず、ヤギにおいてはエンドトキシンに対する感受性に大きな性差はないものと考えられた。

今回の実験で疼痛や跛行といった蹄葉炎症状を示した個体はいなかった。上述の2つの蹄葉炎作出実験[17, 72]でも臨床症状は認められていない。したがってエンドトキシンの静脈内投与では組織レベルの蹄葉炎、すなわち潜在性蹄葉炎と同様の変化を引き起こすことは可能であったが、臨床症状を伴う急性蹄葉炎は作出できなかった。急性蹄葉炎の発症にはエンドトキシン血症以外の別の要因の協力が必要であることが示唆された。

## 第5節 小括

蹄葉炎の発症物質としてエンドトキシンに着目し、取扱いの容易なヤギを用いて、エンドトキシンの全身投与による蹄の組織病変の作出を試みた。また同時に血中エンドトキシン濃度の変動も測定した。

対照として使用するために、あらかじめ左後肢外蹄を外科的に切除した9頭の健康な成ヤギを用いた。3頭ずつ3群のヤギにE. coli由来エンドトキシンをそれぞれ10、50、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ を外頸静脈からbolusで投与し、72時間後まで観察および血液採取を行い、その後安楽死して蹄底の組織を採取した。

全てのヤギは、沈鬱、食欲廃絶、呼吸数の増加、下痢、体温上昇、白血球数の一時的な減少とその後の増加などの典型的なエンドトキシン血症の症状を示し、実験途中で斃死する個体もあった。しかし跛行や蹄の疼痛といった急性蹄葉炎の症状を示した個体は存在しなかった。

蹄底の組織では、対照蹄にはほとんど認められなかった真皮層の出血や血栓、基底細胞の空胞化変性がエンドトキシン投与後の蹄では多数認められた。また少数ではあるが一部の蹄では角化亢進が認められ、これらの変化はエンドトキシンの作用による蹄葉炎類似の変化と考えられた。したがって、エンドトキシン投与によって臨床症状を伴う急性蹄葉炎は作出できなかったが、潜在性の蹄葉炎を引き起こすことは可能であると思われた。

血中エンドトキシン濃度は5頭で検出されたが、いずれも5分後に最高値をし、以後急速に減少した。このことからヤギにおいても牛と同様エンドトキシンの血中半減期はごく短いものと推定された。また4頭では一度エンドトキシン濃度が0になった後再度上昇する二峰性のピークが認められ、内因性とくに消化管内のエンドトキシンの漏出の可能性が示唆された。

Table 3-1. Clinical signs after administration of endotoxin in goats of three groups

Groups	Goats	Sex	Clinical Signs				
			anorexia	depression	increase in respiratory rate	diarrhea	death
A(10 $\mu$ g/ml)	A-1	M	+	+	-	-	
	A-2	M	+	+	-	+	
	A-3	F	+	+	-	-	
B(50 $\mu$ g/ml)	B-1	M	+	+	+	-	
	B-2	F	+	+	+	+	36-48hrs
	B-3	F					0hr
C(100 $\mu$ g/ml)	C-1	M	+	+	+	-	
	C-2	M	+	+	+	+	
	C-3	M	+	+	+	+	9-12hrs

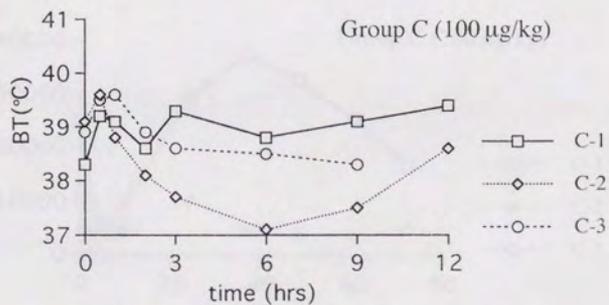
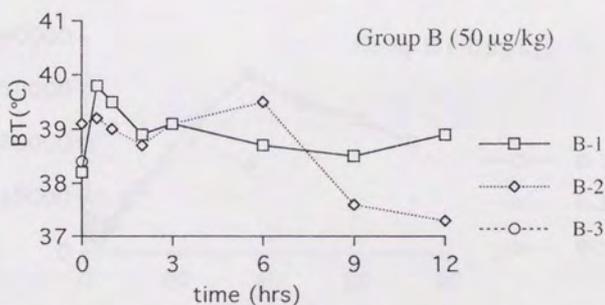
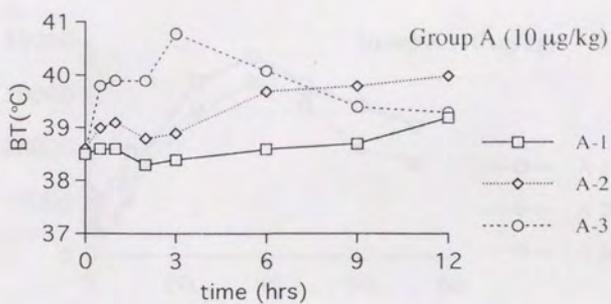


Fig. 3-1. Changes in body temperature (BT) after administration of endotoxin in goats of three groups

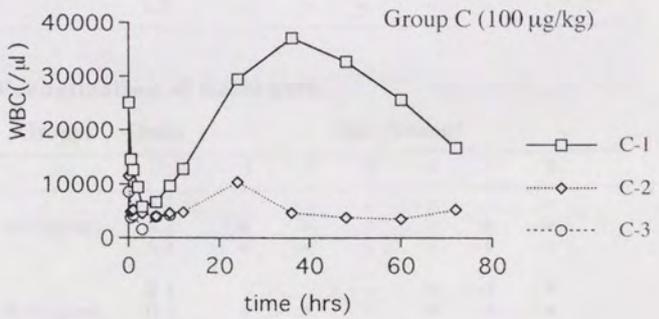
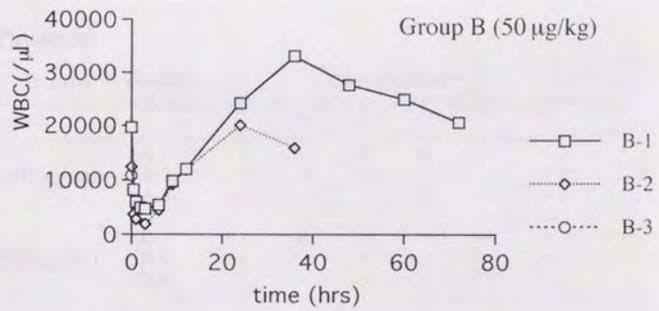
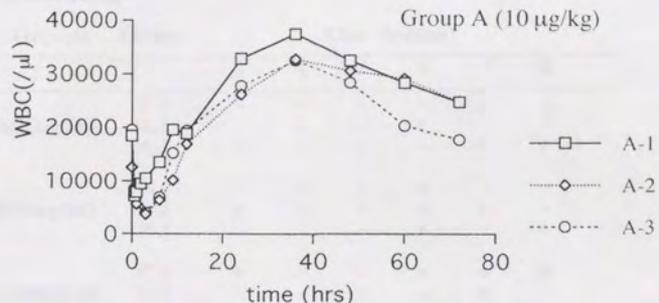


Fig. 3-2. Changes in white blood cell count (WBC) after administration of endotoxin in goats of three groups



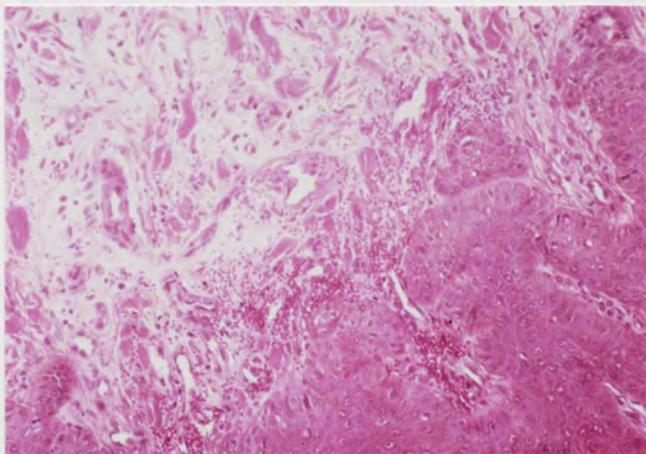


Fig. 3-3. Hemorrhage in the solar corium of the left hind medial digit of goat B-1 ( $\times 200$ , H. E. Stain).

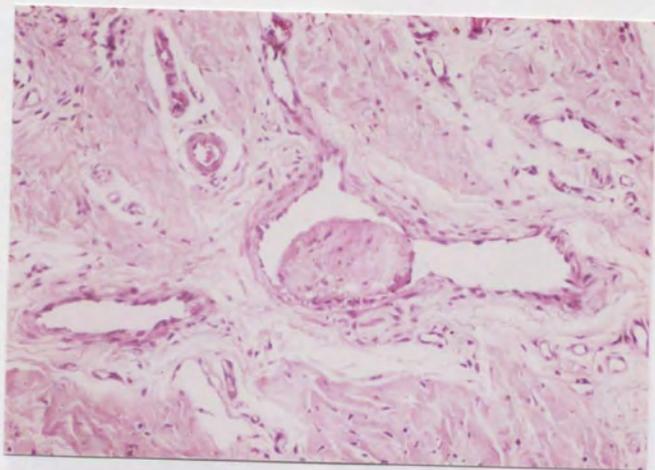


Fig. 3-4. Thrombus in the solar corium of the left hind medial digit of goat C-1 ( $\times 200$ , H. E. Stain).

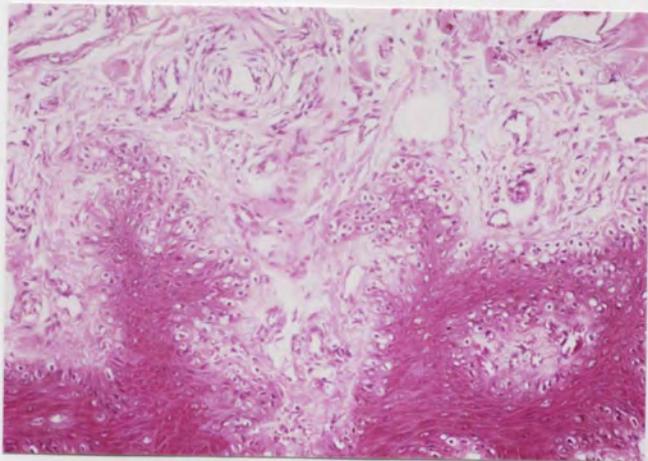


Fig. 3-5. Vacuolization of the cells in the stratum basale of the right fore lateral digit of goat B-2 ( $\times 200$ , H. E. Stain).

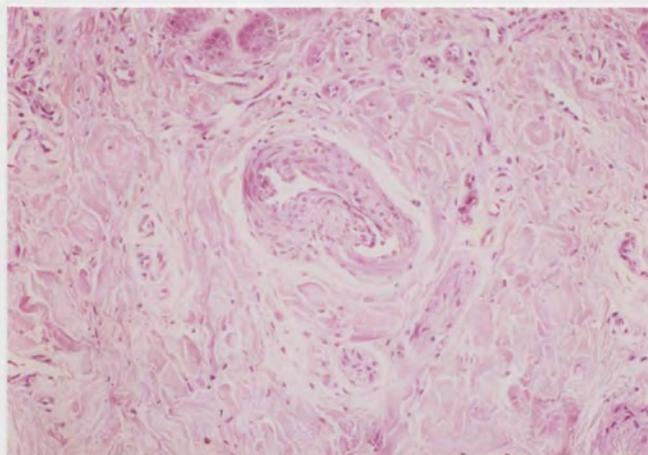


Fig. 3-6. Proliferative change of the tunica intima in the solar corium of the left hind medial digit of goat B-1 ( $\times 200$ , H. E. Stain).

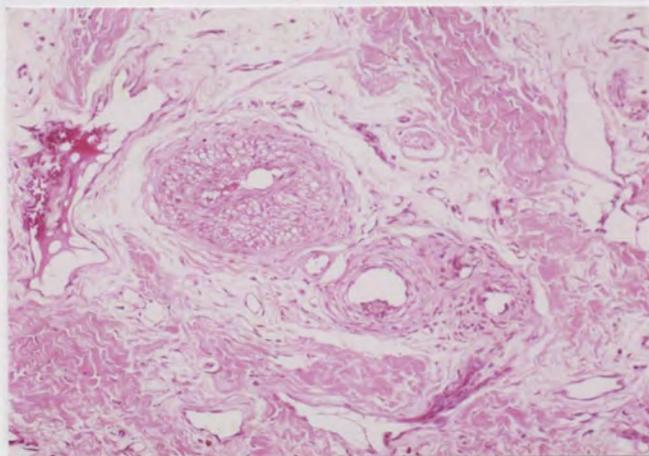


Fig. 3-7. Proliferative change of the tunica media in the solar corium of the right fore medial digit of goat A-3 ( $\times 200$ , H. E. Stain).

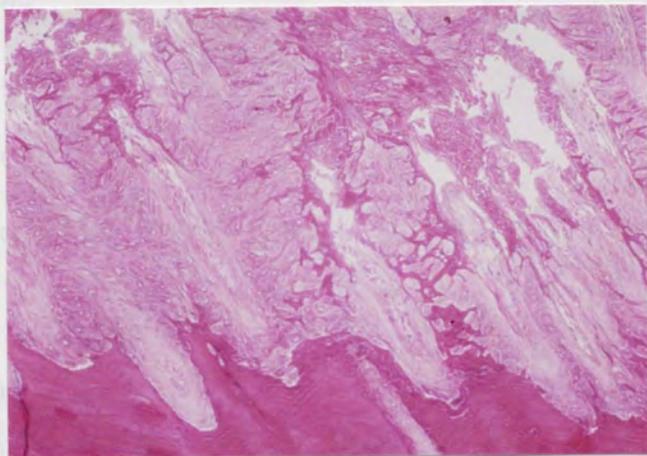


Fig. 3-8. Hyper-and/or parakeratosis in the epidermis of the right fore lateral digit of goat B-1 ( $\times 100$  H. E. Stain).

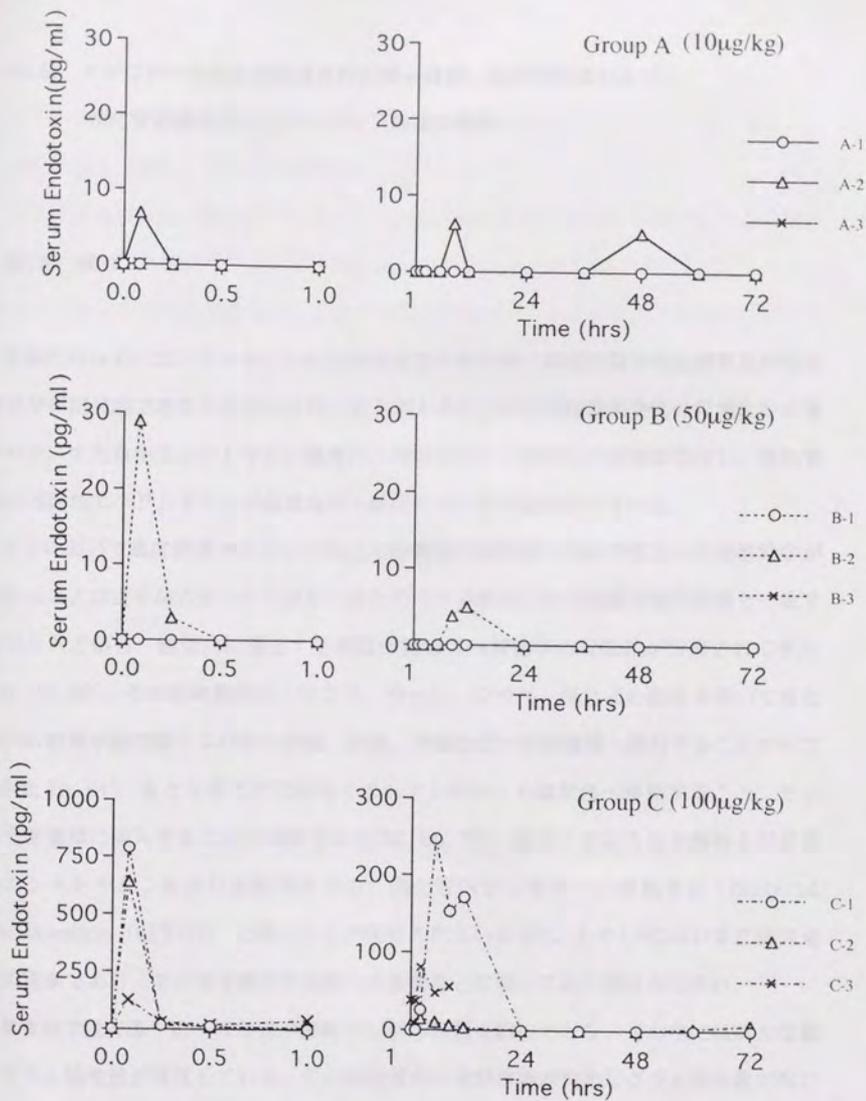


Fig. 3-9. Changes in serum endotoxin concentrations after administratin of endptoxin in goats of three groups

Left : Changes from 0 to 1 hr  
 Right : Changes from 1 to 72 hrs

#### 第4章 ヤギにおける炭水化物過食時の第一胃液、全身静脈血および 消化管静脈血中エンドトキシン濃度の検索

##### 第1節 緒言

前章において、エンドトキシンの全身投与でヤギの蹄に病理組織学的な蹄葉炎類似の病変が作出可能であることが示され、エンドトキシンによる蹄葉炎発症の可能性が示唆された。また血中エンドトキシン濃度に二峰性のピークを示した個体が存在し、消化管内の内因性エンドトキシンが循環血中へ移行している可能性が示された。

ヒトにおいて重度熱傷やショックなどの侵襲時に感染源の特定できない全身感染症が起きることは古くから知られており、またそこから検出される細菌が腸内細菌と一致することなどから、腸管内に常在する細菌が腸管外へ移動する可能性が指摘されてきた[51, 73, 80]。その後実験的に、マウス、ラット、ウサギ、豚などの動物を用いて消化管内の細菌が腸間膜リンパ節や肝臓、脾臓、腎臓などの腹腔臓器へ移行することが示され[48, 75, 81]、また生菌だけではなくエンドトキシンも腸管外へ移動すること、そして全身循環に流入することが証明された[32, 66, 79]。現在このような生菌および死菌やエンドトキシンを含む細菌性因子の、消化管内から管外への移動を広くbacterial translocation (以下BT) と呼ぶことが提唱されている[97]。しかしBTはいまだ研究途上の現象であり、その発生機序や生体への影響などに関しては不明な点も多い。

草食獣では盲腸や第一胃などが発酵タンクの役割を担っており、その中には莫大な量のグラム陰性菌が常在している。この消化管内の発酵環境が変化しグラム陰性菌が死に至れば、その構成成分であるエンドトキシンの量はダイナミックに変化することが想像され、ヒトや実験動物で示されているようなショックや重度熱傷などの大きな侵襲でなくともBTが起きる可能性は十分考えられる。

実際馬では蹄葉炎症状を惹起するような実験的な炭水化物の過食方法が確立されてい

るが[33]、このとき盲腸内pHが低下しグラム陰性菌数が減少すること[34]、盲腸内エンドトキシン濃度が上昇すること[57]、さらには蹄葉炎症状の発症時に全身血中でエンドトキシン濃度が増加すること[74]が示されている。

牛では濃厚飼料過食時に第一胃内のpHが低下し、蹄葉炎以外にも様々な全身症状を呈するルーメンアシドーシスの存在がよく知られている。実験的に作出されたルーメンアシドーシス下で第一胃液中のエンドトキシンが増加することは複数の研究者によって報告されている[8, 59]が、このとき全身血流中のエンドトキシンの存在は、議論のあるところである[4, 10, 27, 59]。実験動物におけるBTは腸管で起こると報告されている[31]。しかしながら複胃という特殊な消化管構造をもつ反芻獣ではBTに関する研究はほとんど見当たらず、BTにおける第一胃の役割に関しては全く判っていない。

そこで本章では、ヤギを用いて実験的に炭水化物過食状態を作成し、第一胃内pHの変動、および第一胃液、第一胃静脈血、小腸静脈血、外頸静脈血それぞれにおけるエンドトキシン濃度の変動を測定し、ルーメンアシドーシス時のBTの可能性を検討した。

## 第2節 材料と方法

### 〈実験動物〉

実験動物として健康な雌の成ヤギ5頭、体重43~53kg (#1~5)を用いた。イソフルレン麻酔下でこれらのヤギの左側けん部にシリコン製フィステル(小牧式第一胃フィステル、三伸工業、横浜)を外科的に装着した。その後同じくイソフルレン麻酔下で右けん部より腹腔内にアプローチし、右第一胃静脈の分枝および小腸静脈の分枝にそれぞれヘパリン処理血管内留置カテーテル(アンスロン、東レ、東京)を設置し、コネクタは皮下から背部へ誘導し、随時採血可能な状態とした。各臓器ごとの還流した静脈血を採取することが目的であるため、これらのカテーテルは静脈のなるべく末梢に近い部位から挿入し、先端が門脈からできるだけ離れたところに位置するように配慮した。カテーテルはヘパリンと抗生物質(ゲンタマイシン、アンピシリン)を含む生理食塩水で1日1回フラッシュし、血餅による閉塞と感染を防止した。過食実験開始までは全てのヤギを自由飲水と乾草の自由採食で飼養した。

### 〈炭水化物の過食と採材〉

カテーテル設置後少なくとも10日間の間隔をあけてから、全てのヤギで実験的炭水化物過食作成後と正常摂食時の採材をそれぞれ一度ずつ行った。炭水化物としては馬鈴薯デンプンを用い、予備実験で22.5g/kgの投与量が十分な第一胃液pHの低下をもたらすこと、および正常摂食時には第一胃内には内容物が充満し投与予定量のデンプンが入りきらない可能性があることが判明した。そこで実験的過食法としては、投与の24時間前から絶食絶水とし、第一胃内容が減じたところで懸濁させるための必要最小限の水道水とともにデンプンを第一胃フィステルから注入した。投与後24時間は絶食絶水を続け、その後自由飲水と少量の乾草を与えた。正常摂食時は自由飲水と乾草の自由採食とした。

過食直前を0時間とし過食後24、48、72、96、120、144時間に、また正常摂食時にも同じく24時間おきに144時間まで、フィステルから第一胃液を、各カテーテルから第一胃静脈血および小腸静脈血を、また静脈穿刺で外頸静脈血を採材した。ただし正常摂

食群における第一胃液の採取は、#4、#5の2頭のみで行った。採材と同時に全身状態、蹄葉炎症の有無を観察し、体温を測定した。

第一胃液は2本のポリスチレン製遠心管に分注し、1本はそのままpHの測定に使用した。もう一本は採材後ただちに3000rpmで15分間遠心分離し、無菌的に採取した上清をバイロジェンフリーのポアサイズ0.45  $\mu$ mメンブレンフィルターで濾過したものを乾熱滅菌済みガラス管内で-20℃に保存し、エンドトキシン測定用に使用した。

カテーテルからの血液採取は、まずカテーテル内に残留した血液および生理食塩水を吸引して廃棄した後、新鮮な静脈血を採取した。採取した血液は第2章と同様にEDTA管と乾熱滅菌済みガラス管に分注し、それぞれ白血球数の測定および遠心分離した上清をエンドトキシン濃度の測定に用いた。なお実験開始7日前から実験終了までカテーテル経由で採血した血液少量を血液寒天培地上で好氣的に3日間培養し、カテーテルの感染の有無を確認した。

#### <測定>

第一胃液のpHは自動pHメーター（EA 940, Orion Research Incorporated Laboratory products Group, Cambridge, U. S. A）を用いて測定した。第一胃液中のエンドトキシン濃度はMotoiらの方法[58]にしたがって測定した。すなわち注射用蒸留水で100,000倍に希釈した後、ドライバス上で100℃10分間加熱処理したものをLALと等量混合し、比濁時間分析法で分析した。白血球数および血液中エンドトキシン濃度は第3章と同じ方法で測定した。

### 第3節 結果

#### <血液培養結果>

ヤギ#3の過食後96、120、144時間およびヤギ#4の過食後24時間の計4点で、小腸静脈側のカテーテルからの採血が不可能であった。これら以外のカテーテルから採取した血液の好気培養の結果は実験前、実験中を通してすべて陰性であった。

#### <臨床症状>

正常摂食群では異常な臨床症状はなんら認められなかった。ヤギ#1の過食後48時間の採材時には下痢が認められ、72時間後には伏坐したまま歩きたがらず、強制的に歩かせると強拘歩様を示した。しかし96時間後にはこれらの症状は認められなかった。過食群の残りの4頭では臨床症状は認められなかった。

体温と白血球数の変動をFig. 4-1およびFig. 4-2に示した。正常摂食群では体温はほぼ一定であり、白血球数も個体間の差はあるもののほとんど変動しなかった。一方過食群では体温、白血球数ともに一定の傾向はないが実験中に大きく変動する個体があった。ヤギ#2、#5ではそれぞれ72時間、48時間後に体温の上昇がみられ、また#4の体温は72時間後に36.7℃まで低下した。白血球数は#1で48時間後まで減少しその後72時間後には増加した。またヤギ#3および#5では48時間後に白血球数の増加がみられた。

#### <第一胃液のpHとエンドトキシン濃度>

正常摂食群および過食群における第一胃液pHと第一胃液中エンドトキシン濃度の変動をそれぞれFig. 4-3およびFig. 4-4に示した。正常摂食時の第一胃液を採取したのは5頭中の#4と#5の2頭のみであったが、そのpHは実験期間中を通して6.40~6.86ときわめて安定していた。第一胃液エンドトキシン濃度もほとんど変動せず、最高でも2.3  $\mu\text{g/ml}$ とごく低い濃度を維持していた。一方過食時の第一胃液pHはデンプン投与前には平均7.37であったものが、投与後全頭で急激に低下し、24~48時間後には最低値4.98~6.04に達した。最低値に達した後は徐々に回復したが、144時間後でも投与前のレベルに達するものはなかった。第一胃液中エンドトキシン濃度は、投与前は平均3.9

$\mu\text{g/ml}$ と低値であったが、その後全ての個体で大きく増加した。上昇のパターンや到達濃度は個体によって大きな差があった。#2、#4、#5の3頭では緩やかに上昇し144時間後に最高濃度37.7~53.1  $\mu\text{g/ml}$ に達した。#1と#3の個体ではより大きな一過性のピークを形成し、#1は48時間後には103.5  $\mu\text{g/ml}$ 、#3では120時間後に544.0  $\mu\text{g/ml}$ に達した。

#### 〈各静脈血中エンドトキシン濃度〉

正常摂食群および過食群における3箇所（外頸静脈、第一胃静脈、小腸静脈）の静脈血中のエンドトキシン濃度の変動をそれぞれFig. 4-5およびFig. 4-6に示した。正常摂食時の外頸静脈血にはわずかに#3の96時間後で3.8  $\mu\text{g/ml}$ のエンドトキシンが検出されたのみであった。第一胃静脈血では同じく#3のヤギで、0、24、48時間後にエンドトキシンが検出され、そのレベルは最高値でも24時間後の18.2  $\text{pg/ml}$ であった。小腸静脈では#2と#3の0時間で、それぞれ29.5および14.1  $\text{pg/ml}$ のエンドトキシンが検出されたのみであった。

過食時の外頸静脈血では、#2のヤギで4  $\text{pg/ml}$ 前後の低レベルであるが、デンブン投与前からエンドトキシンが検出され、120時間後には14  $\text{pg/ml}$ のピークを形成した。また小腸静脈血でも#3のヤギでデンブン投与前から72時間後まで10  $\text{pg/ml}$ 程度の一定したレベルでエンドトキシンが検出され続けた。96時間以降はカテーテルの不備から採血は不可能であった。これら以外に外頸静脈血および小腸静脈血からエンドトキシンが検出された個体はいなかった。第一胃静脈血では#2と#3のヤギできわめて高濃度のエンドトキシンが検出されたが、残りの3頭ではいずれも検出されなかった。#2では48時間後に一度だけ180  $\text{pg/ml}$ のエンドトキシンが検出され、他の時間では検出されなかった。#3では投与前から65.1  $\text{pg/ml}$ と比較的高濃度のエンドトキシンが検出されていたが、24時間後には393.5  $\text{pg/ml}$ と急激に増加し、48時間後には31.9  $\text{pg/ml}$ 、72時間後に6.6  $\text{pg/ml}$ と急激に減少した。144時間後にはエンドトキシンは検出されなかった。

#### 第4節 考察

第一胃静脈と小腸静脈に設置したカテーテルから採取した血液の培養結果は、実験前および実験中を通じて陰性であり、カテーテル内の感染は十分に防止されていたものと考えられた。

牛における炭水化物過食時には、食欲不振、下痢、沈鬱、脱水などの全身的な臨床症状がおき、重度の場合にはショックから死に至ることが実験的にも臨床的にも知られている[8, 9, 10, 28]。一方ヤギに濃厚飼料を自由採食させたMgasaらの報告では、第一胃液pHは変動せず、臨床症状も示さなかったことから、ヤギは牛に比べて消化能が高く様々な飼料に容易に適応することが示唆されている[56]。今回の実験では実験動物としてヤギを、また炭水化物として馬鈴薯デンプンを用いた。過食後の全身的な症状は、#1のヤギで軽度の下痢と強拘歩様をごく短時間示したに過ぎず、それ以外の個体ではいわゆる牛で認められるようなルーメンアシドーシス様症状は全く認められなかった。しかしながら、第一胃液pHは投与前平均値が7.37であったものが、24~48時間後には最低値4.98~6.04と大きく低下しており、ヤギにおいてもデンプンのような形態の易発酵性炭水化物を用いれば、第一胃内の細菌叢の変動は十分起こりうるものと思われ、今回の過食方法は実験目的を達していると考えられた。

今回の実験では過食後の体温と白血球数は、正常摂食時に比べると明らかに大きく変動する個体が多く認められ、なんらかの生理的变化がおきていることが示唆されたが、その変動には一定のパターンは認められなかった。第3章ではエンドトキシン投与後、ヤギにおいても典型的な体温の上昇や白血球数の急激な減少とそれに続く増加が示されたが、これらの変化はほぼ24時間以内に大きく変動していた。したがって、今回の24時間ごとの採材ではその変動パターンを検出するのは困難と思われ、今実験でのこれらの変動がエンドトキシンによるものかどうか推察することは不可能であった。

正常摂食時の第一胃液pHとエンドトキシン濃度はほとんど変化せず、特にエンドトキシン濃度はごく低い濃度で推移した。これに対して過食後のpHは急激に低下し、徐々

に回復へ向かい、牛における実験的過食時の報告とほぼ同様の変化を示した[10]。一方、第一胃液エンドトキシン濃度も正常摂食時とは明らかに異なり全個体で増加した。牛の実験的ルーメンアシドーシス時における第一胃内エンドトキシン濃度の変動は、Nagarajaら[59]とAndersenら[8]によって24時間以内の上昇が報告されているが、今回のような数日間にわたる上昇は初めて示された。その増加パターンには徐々に増加して144時間で最高値に達したものと、きわめて大きなピークを48時間および120時間で示したものの2通りが認められた。この2種類のパターンの差の原因は不明である。エンドトキシンはグラム陰性菌が死滅するときと増殖するときに放出されるといわれている[7]。後者の大きなピークはpHの低下に伴うグラム陰性菌の急激な死滅によるものであり、前者のゆっくりした増加はpHの回復に伴うグラム陰性菌の緩徐な増殖によるものとも考えられたが、両方のパターンが並存した個体は存在しなかった。

今回の実験全体を通してみると、3箇所(頸静脈、門脈、肝静脈)の静脈血から正常摂食時および過食時の双方においてそれぞれ何点かずつでエンドトキシンが検出されていた。また一般に外頸静脈血に比べ、消化管静脈血でのエンドトキシン濃度の方が高いレベルであることから、第一胃から全身循環へのエンドトキシンの移行は起きているものと考えられた。しかし、静脈血中にエンドトキシンが検出された個体は、正常時、過食時を問わず#2と#3のヤギに限られており、残りの3頭では第一胃液中エンドトキシン濃度は#2や#3と同様に増加しているにもかかわらず、静脈血中には1点も検出されなかった。このことから、消化管から血中へのエンドトキシンの移行の有無は、第一胃内のエンドトキシンの増加によって起こるのではなく、個体ごとの条件によって起きる可能性が考えられた。Andersenらは2頭の牛を用いて実験的ルーメンアシドーシスを作成し、そのときの門脈血、肝静脈血および頸動脈血中のエンドトキシン濃度の変動を測定した[9]。このとき1頭では門脈血中に高濃度のエンドトキシンが頻りに検出されたが、もう1頭ではほとんど検出されず、今回の実験と同様に個体差があることが報告されている。

このような消化管からのエンドトキシン吸収を左右する要因としては、消化管粘膜の状態が大きな役割を果たしていると考えられている。とくに牛では濃厚飼料の多給や粗

飼料の不足で第一胃上皮の角化異常であるルーメンバラケラトーシスが起きることが知られており、この状態が進行すると第一胃炎を起こし、細菌やエンドトキシンの通過が起きやすくなるとされる。実際、第一胃炎を起こした牛では肝膿瘍が多発することが知られており、第一胃壁を通した細菌の移動が原因と考えられている[13]。今回の実験では第一胃壁の状態は不明であるが、pH低下のレベルは十分に第一胃壁を障害するに足るものと思われた。

#2および#3の個体で過食後に観察された最も大きな変化は、第一胃静脈血中の大きなエンドトキシン濃度の上昇であった。しかし、過食後の小腸静脈血には正常時と同程度の濃度のエンドトキシンが検出されたのみであった。すなわち過食後には小腸からではなく、第一胃からのエンドトキシンの移行が大きく増大することが推察された。またこの所見は前述のルーメンバラケラトーシス-第一胃炎がBTを促進するという仮説にも一致した。

しかしながらこの第一胃静脈血中のエンドトキシンの上昇に伴う全身血中のエンドトキシン増加は観察されなかった。門脈血中のエンドトキシンの局所的な存在はportal endotoxemiaと呼ばれ、肝の網内皮系によるエンドトキシン処理能が正常であれば全身血中には高濃度では到達せず、全身状態には影響を与えないものと考えられている。正常なヒトにおいてもportal endotoxemiaが存在することは以前から知られていた[43]。また先に引用したAndersenの報告では、牛においても同様の状況が起きうることが示されている[9]。今回のヤギにおいてもportal endotoxemiaは存在したものの、肝においてエンドトキシンは処理され、全身血中では上昇を示さなかったものと考えられた。

以上をまとめると、ヤギにおける炭水化物の実験的過食によって第一胃内のpHは低下し、それとともに第一胃液中エンドトキシン濃度は増加した。5頭中の2頭で第一胃静脈血で高濃度のエンドトキシンが検出され、移行経路としては反芻獣に特異的な第一胃壁を介したBTが考えられた。しかしながら、正常時にもBTが起きていることや、第一胃液中濃度とBTの発生との間に明らかな関連がないことが判明し、BTの発生やその程度には、第一胃壁の障害状態や肝のエンドトキシン処理能が深く関与しているもの

と思われた。

ナズにおいて実地的な調査は動物の調査が断る放棄し、植物学内エンドトキシンの調査および観察について検討した。あらかじめ第一頁にアイスケルを、第二頁動物および小動物類にカザーゲルを記載したナズ(図 147, 148)に對し、正統派会館の7日間のおよび調査データ(22.4g/ha)の24日経まで24時間毎に第一頁葉、刺およびエンドトキシンの調査、第一頁葉のみ、の調査結果および動物類中のエンドトキシン濃度を測定した。正統派会館では第一頁葉はほとんど変動せず、第一頁葉中でエンドトキシン濃度もごく低いレベルで一定していた。ナズ(ナズ)も、その3種では各調査中にエンドトキシンは検出されなかった。ナズ(2)の小動物類はナズ(ナズ)の各調査中で各々1-3個のシベリのエンドトキシンが検出された。一方正統派では第一頁葉には調査(1-2)日に急激に低下し、それに伴って第一頁葉中エンドトキシン濃度は大きく上昇したが、そのゾーク種に種名によって大きな差があった。正統派と対して2種のナズで調査結果はエンドトキシンは検出されなかった。調査結果ではナズ(2)に、また小動物類ではナズ(2)で正統派会館とほぼ同じレベルのエンドトキシンの検出された。またナズ(2)のゾークの第一頁葉中で検出された濃度のエンドトキシンが検出された。しかしながらその2種における各調査中のエンドトキシン濃度の変動パターンには、第一頁葉やエンドトキシン濃度との相関性が見いだすなかった。

以上の結果から、ナズにおいては何れも動物類科で第一頁葉内のエンドトキシン濃度が上昇し、植物学内エンドトキシンが第一頁葉から検出される存在量に入る可能性がある。しかし調査時の異なるナズ(ナズ)も濃度は異なることがわかる。今の調査の結果は第一頁葉中エンドトキシン濃度によって一時的に異なるものでなく、むしろ調査によるところが大きいことが確認された。

#### 第4節 小括

ヤギにおいて実験的な炭水化物の過食状態を作成し、消化管内エンドトキシンの変動および吸収について検討した。あらかじめ第一胃にフィステルを、第一胃静脈および小腸静脈にカテーテルを装着したヤギ5頭（#1～#5）に対し、正常摂食時の7日間および馬鈴薯デンプン22.5g/kg投与6日後まで24時間毎に第一胃液pHおよびエンドトキシン濃度、第一胃静脈血、小腸静脈血および頸静脈血中のエンドトキシン濃度を測定した。正常摂食時では第一胃液pHはほとんど変動せず、第一胃液中Eエンドトキシン濃度もごく低いレベルで一定していた。5頭中ヤギ#1、4、5の3頭では各血液中にエンドトキシンは検出されなかった。ヤギ#2の小腸静脈血およびヤギ#3の各血液中で各々1～3回低いレベルのエンドトキシンが検出された。一方過食時では第一胃液pHは術後1～2日目に急激に低下し、それに伴って第一胃液Eエンドトキシン濃度は大きく上昇したが、そのピーク値は個体によって大きな幅があった。正常時と同じく3頭のヤギでは各血液中にエンドトキシンは検出されなかった。頸静脈血ではヤギ#2に、また小腸静脈血ではヤギ#3で正常摂食時とほぼ同じレベルのエンドトキシンが検出され、またヤギ#2および#3の第一胃静脈血ではきわめて高濃度のエンドトキシンが検出された。しかしながらこの2頭における各血液中のエンドトキシン濃度の変動パターンには、第一胃液中エンドトキシン濃度との相関性は見いだせなかった。

以上の結果から、ヤギにおいては炭水化物多給時に第一胃液内のエンドトキシン濃度が上昇し、消化管中のエンドトキシンが主に第一胃静脈から吸収され全身循環に入る可能性が示唆された。しかし過食時のみならず正常時にも吸収は起きていることが示され、その吸収の程度は第一胃液中エンドトキシン濃度によって一意的に決まるものではなく、むしろ個体差によるところが大きいことが推測された。

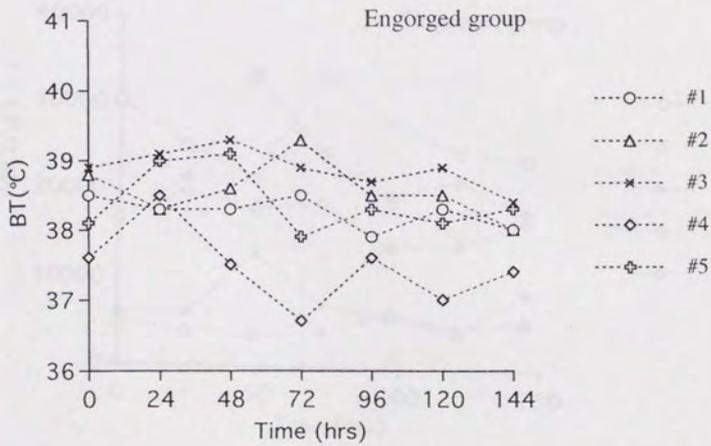
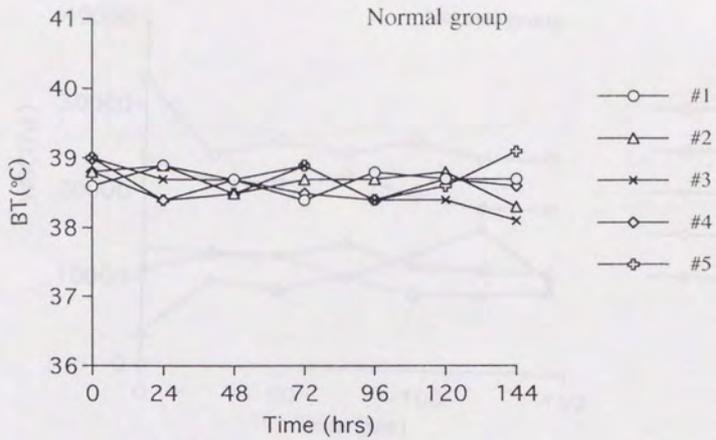


Fig. 4-1. Changes in body temperature (BT) in goats of normal group and engorged group

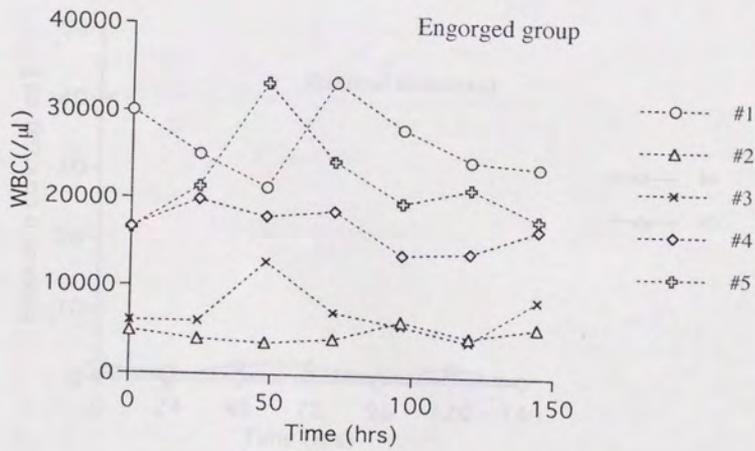
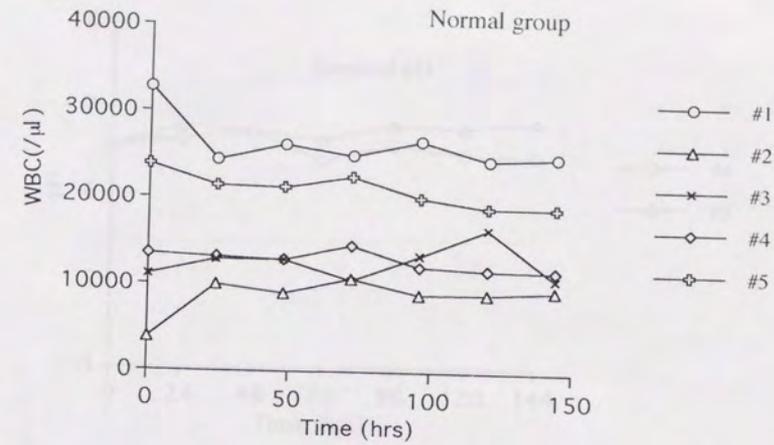


Fig. 4-2. Changes in white blood cell count (WBC) in goats of normal group and engorged group.

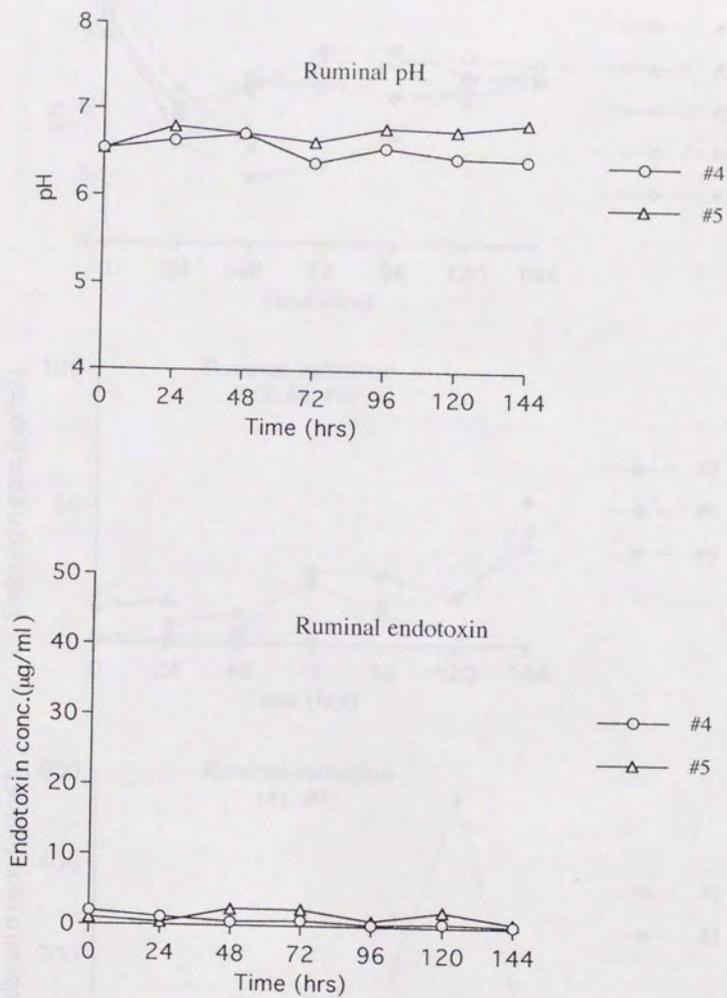


Fig. 4-3. Changes in ruminal pH and ruminal endotoxin concentrations in two goats (#4, #5) of normal group.

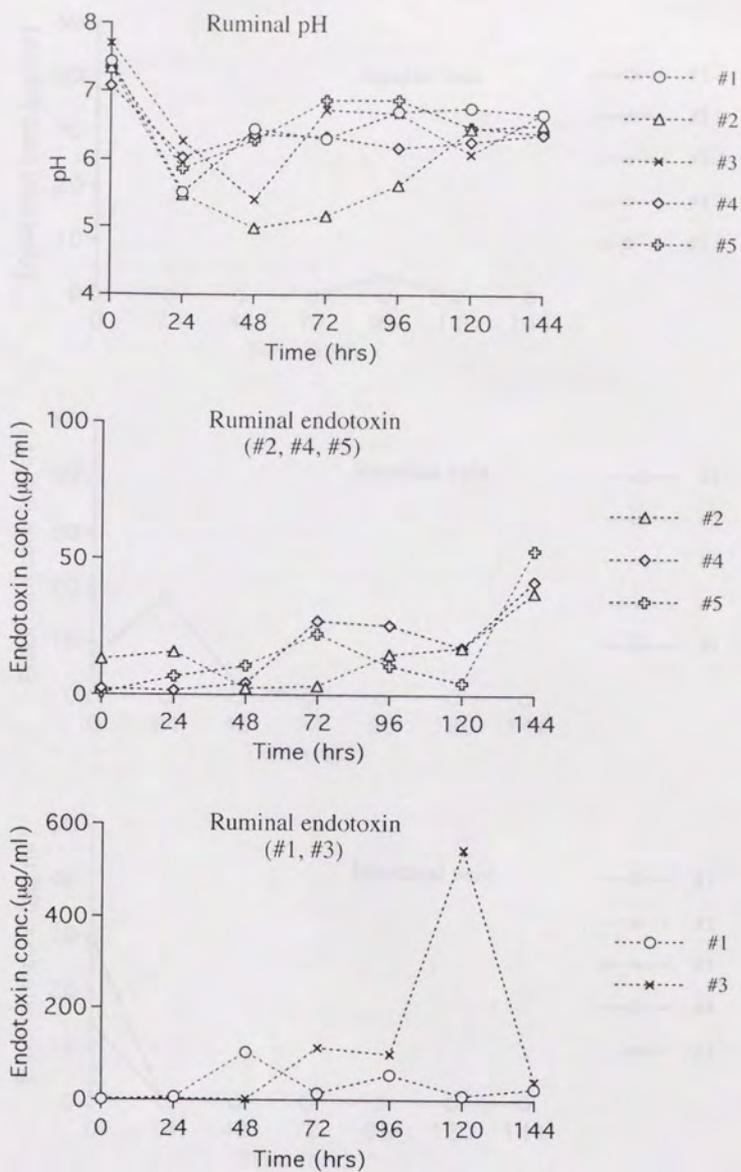


Fig. 4.4. Changes in ruminal pH and ruminal endotoxin concentrations in goats of engorged group.

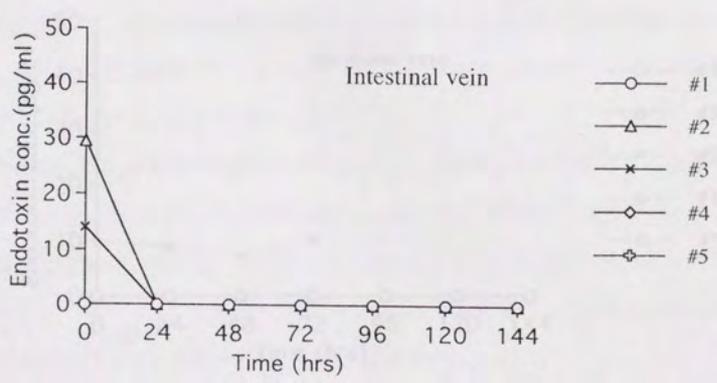
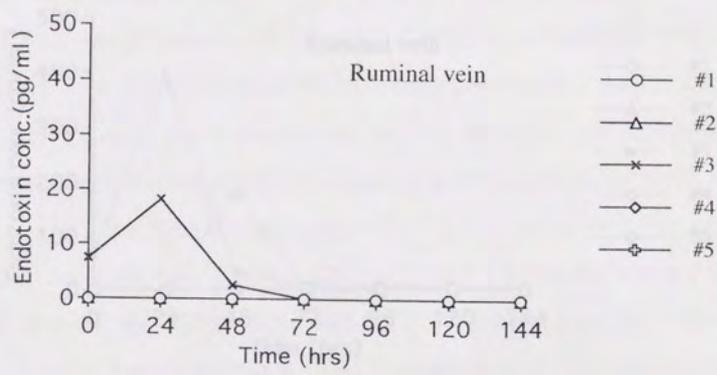
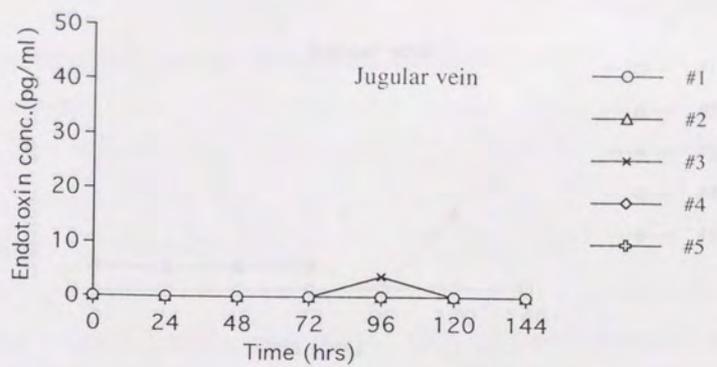


Fig. 4-5. Changes in endotoxin concentrations of the jugular, ruminal and intestinal venous blood in goats of normal group.

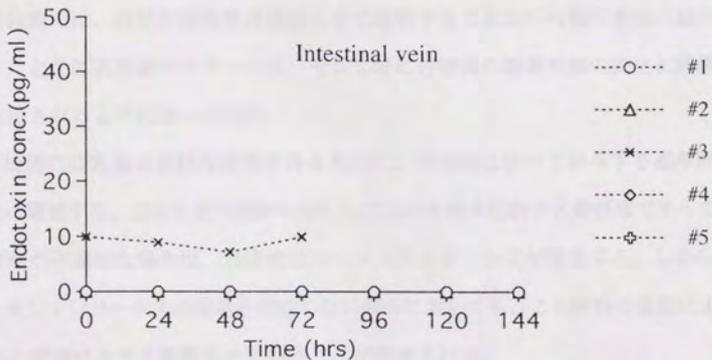
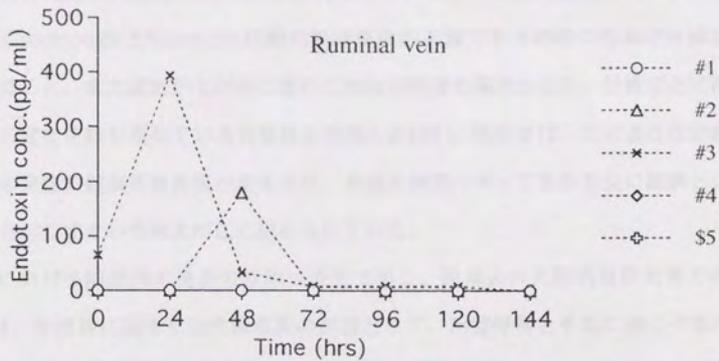
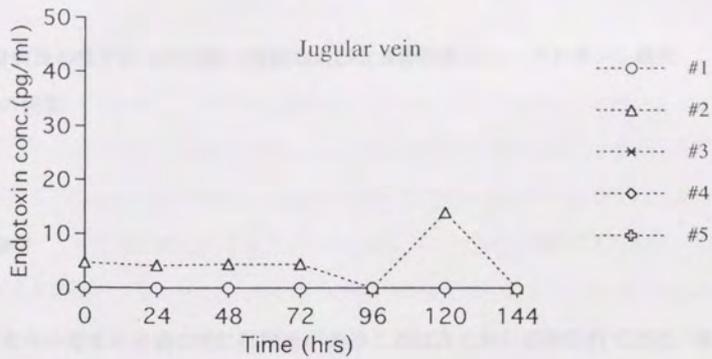


Fig. 4-6. Changes in endotoxin concentrations of the jugular, ruminal and intestinal venous blood in goats of engorged group.

## 第5章 分娩後の乳牛における第一胃液および全身静脈血中エンドトキシン濃度の検索

### 第1節 緒言

乳牛の蹄葉炎の発生と分娩の間には関連があることは古くから指摘されてきた。事実乳牛の跛行の発生は分娩後の3~4か月に集中していることが多数報告されている[65, 69, 90]。GreenoughとVermuntは潜在性蹄葉炎の主徴である蹄底の出血が分娩以降に増加すること、また産次が上がるに連れて出血の程度も高度になり、分娩ごとに潜在性蹄葉炎の発症を繰り返している可能性を指摘した[38]。現在では、このような分娩後の蹄葉炎の発症の結果不良角質が産生され、角質の成長に伴って数か月後に蹄病として跛行を引き起こすという考えが広く認められている。

分娩時における蹄葉炎の発生の原因は不明である。蹄葉炎の先駆的な研究者であるNilssonは、分娩後に起きる急性蹄葉炎の原因として、胎盤停滞とそれに続く子宮内膜炎を挙げ、このとき子宮内で産成されるヒスタミンが原因物質であると説明した[61]。しかしこの仮説では、近年の蹄疾患の増加を全て説明することは不可能であり、他の周産期疾患、たとえば乳房炎やケトーシス、そして特に分娩後の飼養形態の変化と蹄葉炎の関連が注目されるようになった[83]。

乳牛の分娩後には乳量の良好な増加を得るために、分娩前に比べて給与する濃厚飼料の量が急激に増加する。このときの飼料の変化はすなわち炭水化物の大量摂取であって、実際飼養管理が不適切な場合は、分娩後にルーメンアシドーシスが発生する。しかし臨床的なルーメンアシドーシスの症状を発症しない個体においても、この飼料の急変によって第一胃内の環境は大きく影響されていることが想像される。

第4章では、実験的な炭水化物過食時にヤギの第一胃エンドトキシンが主に第一胃壁から吸収され、循環血中に移行する可能性が示唆された。また牛においても実験的に作

出されたルーメンアシドーシス時に、第一胃液中のエンドトキシン濃度が上昇すること [8, 59]、また議論はあるが、このとき全身循環血中にもエンドトキシンが検出されたことが報告されている [4, 27]。しかしこれらの成績はいずれも実験的に作出された条件下での変化である。実際の搾乳牛においては濃厚飼料とともに粗飼料も給与されており、また個体によっても濃厚飼料の摂取量は異なるため、第一胃内の発酵環境の変化はこれらの実験結果とは大きく異なるものと考えられる。現在までのところ、実際の乳牛における分娩前後の第一胃液ならびに血中エンドトキシン濃度の変動を検討した報告はなく、この部分の詳細は全く不明の状態にある。

そこで本章では飼養形態および泌乳量の大きく異なる2つの乳牛群を用い、分娩前後の第一胃液pH、エンドトキシン濃度ならびに外頸静脈血中エンドトキシン濃度を経時的に測定し、分娩に伴うこれらの変動および飼養形態による差異について検討した。

## 第2節 材料と方法

### <実験動物>

実験には東京大学農学部付属牧場に飼養される妊娠牛5頭（A群、A-1～5、ホルスタイン種、産次：0～5）および栃木県下のH牧場で飼養される妊娠牛5頭（B群、B-1～5、ホルスタイン種、産次：1～4）を用いた。A群の5頭は、分娩1か月前より1日6kgの圧扁大麦の給与と乾草の自由摂取を行った。分娩後は乾草の自由摂取とともに、各個体の泌乳能力に合わせた配合飼料を給与した。すなわち、前回の泌乳期の乳量を参考にして、各個体ごとに配合飼料の量が決定された。その量は牛A-1～5に対しそれぞれ1日あたり10、11.9、16、8および8kgであり、可消化粗蛋白質（DCP）と可消化養分総量（TDN）の平均はそれぞれ約84%と48%であった。一方B群の牛では、分娩前は乾乳期用の完全飼料を不断給餌した。分娩後は泌乳期用の完全飼料を同じく不断給餌した。この泌乳期用完全飼料の成分は、乳量36.9kg/day、乳脂肪分4.0%、体重650kgと仮定して1頭あたりDCP、TDNともに100%であった。

### <採材>

A、B両群において、分娩前後で外頸静脈血および第一胃液を採材した。分娩日がかならずも予定どおりではなかったため、分娩前の採材は2～7回と回数や間隔にバラツキがあるが、分娩後は連日14日までの採材を行った。あらかじめ乾草で飼養される乾乳牛を用いた予備実験で、第一胃液および血中エンドトキシン濃度に著明な日内変動が認められなかったことから、採材時間は1日1回ほぼ午前10時とした。また採材時には全身状態の観察と直腸温の測定を行った。また分娩後40日までの泌乳量を記録した。

試料の採材および処理法は基本的に前章と同様である。外頸静脈から経皮的穿刺で採取した血液をEDTA管と乾熱滅菌済みガラス管に分注した。EDTA管の全血は白血球数の測定に用いた。ガラス管に分注された血液は室温で凝固後遠心分離し、上清の一部をエンドトキシン測定用に乾熱滅菌済みガラス管に、またのこりはaspartate aminotransferase（AST）および $\gamma$ -glutamyl transferase（GGT）測定用としてポリ

プロピレン製バイアルに移し、測定まで-20℃で凍結保存した。第一胃液は、カテーテル挿入器具（オーラルクロス、共済薬事、東京）ならびに第一胃カテーテル（富士平工業、東京）を用いて口腔から採材した。唾液の混入を避け、第一胃内の数か所から得られたサンプルを混合し、エチレンオキサイドガス滅菌済みスピッツ管2本に分注した。1本のサンプルはただちに遠心分離し、上清を孔径0.45 $\mu$ mのガンマ線滅菌済みメンブレンフィルターで濾過し、その濾液をエンドトキシン測定用として乾熱滅菌済みガラス管に移し、-20℃で保存した。もう1本のスピッツ管はpH測定用に使用した。

#### <測定法>

各測定法についても前章と同様である。第一胃液および血中エンドトキシン濃度はLAL試薬を用いた比濁時間分析法で測定した。第一胃液pHは市販のpHメーター（堀場、東京）で、白血球数はA群では血球計算板を用いて、B群では自動血球計算装置（Sysmex、東亜メディカル、東京）にて測定した。血中ASTはAutomatic analyzer（HITACHI 736-20、日立、東京）で、血中GGTはドライケミストリー（FUJI DRY-CHEM 5000、富士メディカル、東京）で測定した。

#### <統計処理>

群間の差の統計的処理はunpaired t-testを用い、危険率5%未満を有意と判定した。

### 第3節 結果

#### <臨床症状>

全ての牛は正常分娩であり、実験期間を通じて感染症を含む重大な異常を示した個体はいなかった。泌乳量は全頭で順調に増加した (Fig. 5-1)。A群では牛A-3の泌乳量が比較的多く、分娩から40日間の平均泌乳量は40.5kg/dayであったが、残りの4頭では平均泌乳量は22.7~30.8kg/dayであった。B群では各個体の平均泌乳量は27.7~37.2kg/dayの範囲にあった。A群およびB群の群全体の平均泌乳量はそれぞれ28.5kg/dayおよび33.2kg/dayであり、A群に比べてB群は有意に高い泌乳量を示した。

分娩後の体温はA群ではほぼ一定していたが、B群では分娩2日後に小さな上昇が認められ、その後もやや高いレベルで推移した (Fig. 5-2)。

#### <第一胃液pH、第一胃液エンドトキシン濃度および血中エンドトキシン濃度>

A、B群における第一胃液pH、第一胃液エンドトキシン濃度および血中エンドトキシン濃度の変動をそれぞれFig. 5-3およびFig. 5-4に示した。

分娩前には7前後であった第一胃液pHは、両群において分娩後速やかに低下した。A群ではA-3の牛で分娩翌日に5.5まで低下したが、他の個体はほぼ6.5前後で推移した。A群5頭の第一胃液pHの平均値が分娩後6.42~6.71の範囲で推移したのに対し、B群の平均値は6.30~7.02の範囲であり、A群よりも変動の幅が大きい傾向にあった。

第一胃液中エンドトキシン濃度も、分娩後両群において増加する傾向にあったが、その上昇パターンはいずれも高値を維持するものではなく、一過性の短い上昇を繰り返す形であった。またこのピークの出現時間には一定の傾向は認められず、個体によって様々であった。A-3を除くA群の4頭では分娩後数回の一過性の上昇が認められたが、これらの値はいずれも4  $\mu\text{g/ml}$ 以下であり比較的低値であった。A-3の第一胃液エンドトキシン濃度は分娩前より12.0、4.7  $\mu\text{g/ml}$ と比較的高かったが、分娩後も大きく変動し13日目には約20  $\mu\text{g/ml}$ を超える高値を示した。B群の第一胃液中エンドトキシン濃度の上昇は、A群に比べて高値に達する個体が多かったが、統計的な有意差は検出されなかった。

分娩前より $20\mu\text{g/ml}$ を超えていたB-1では、分娩後4日目に $44.0\mu\text{g/ml}$ の最高値に達した。B-2も分娩翌日に $17.6\mu\text{g/ml}$ の第一胃液中エンドトキシン濃度を示し、その後も $10\mu\text{g/ml}$ 近い一過性の上昇が数回認められた。B-3~5では分娩後数回にわたり、 $5\mu\text{g/ml}$ 近いピークを持つ一過性の上昇を示した。

A群の血中エンドトキシン濃度はきわめて低く、検出される頻度もごく低かった。分娩後に検出されたピークは、A-1で分娩2日後に $3.7\text{pg/ml}$ 、A-2で8日目に $13.5\text{pg/ml}$ の2点のみであった。A-5は分娩2日前であるが $31.8\text{pg/ml}$ の比較的高い値を示した。A-3およびA-4ではいずれの時点においても全て検出限界以下であった。一方B群の血中エンドトキシン濃度は一過性の上昇を繰り返す形で変動し、そのピークの出現頻度はA群に比べ明らかに高かった。B-3では $32.2\text{pg/ml}$ および $22.2\text{pg/ml}$ の高いピークが認められたが、その他の4頭では $10\text{pg/ml}$ 以下の小さいピークが1~3回ずつ出現した。A、B両群ともこれらの血中エンドトキシン濃度と第一胃液中エンドトキシン濃度の間に明らかな関連は認められなかった。

#### <血液検査結果>

A群およびB群の総白血球数、AST、GGT濃度の変化をそれぞれFig. 5-5およびFig. 5-6に示した。総白血球数は両群とも分娩当日あるいは翌日に一過性に上昇し、速やかに分娩前のレベルに回復した後は大きな変動を示さなかった。B-3では実験期間を通じて白血球数が高値で推移したが、感染症等の臨床症状は認められなかった。AST濃度はA群では分娩後わずかに増加する傾向にあったが、B群では明らかに増加し、B-4では分娩後4日後には $100\text{IU/l}$ を超えた。GGT濃度はA群ではほとんど変動しなかったが、B群ではわずかな増加傾向が認められ、特にB-2では分娩後8日目以降急増し、14日目には $89\text{IU/l}$ という高値を示した。

#### 第4節 考察

実験中、全頭において全身的な異常は観察されず、今回の分娩後の飼料の変化では臨床的なルーメンアシドーシスは惹起されていないものと考えられた。実際、今回測定された第一胃液pHの低下は、平均値でA群、B群それぞれ6.42~6.71および6.30~7.02であり、報告されている実験的な炭水化物の過食[4, 6, 8, 9, 28]や、前章のヤギの実験結果に比べるときわめて小さく、ほぼ生理的な範囲内の変動と考えられた。これは分娩前から適量の濃厚飼料が与えられており、また常に十分な量の粗飼料が与えられていたために、飼料の急激な変化にもある程度の適応が可能であり、pHは最小限の変動に押さえられたものと思われた。

しかしながら、両群のいずれの個体においても、第4章で実験的過食後のヤギのみられたような第一胃液中エンドトキシン濃度の大幅な上昇が分娩後に認められた。すなわち、実際の搾乳牛における分娩後の飼料変化ではごく軽度な第一胃液pHの低下しか起きていないが、その場合でも第一胃内の細菌叢およびその発酵環境は大きく変動しており、その結果エンドトキシンが放出されるものと推察された。

今回用いた牛群のうちB群では、完全飼料の不断給餌が行われているためその摂取量は不明である。しかし、飼料の成分は明らかにB群の方が高カロリーであり、また平均乳量もB群の方が有意に高かったことから、B群の個体は平均してA群よりも濃厚飼料の摂取量が多かったと考えられる。またA群のなかでも泌乳量の多いA-3は、他のA群の4頭に比べて大量の配合飼料を給与されていた。一方、第一胃液pHは、A群よりもB群の方がわずかではあるが低下の程度が大きく、またA群の5頭のなかではA-3が最も大きな低下を示した。さらに第一胃液中エンドトキシン濃度に関しても、A群に比べてB群では高い値を示す個体が多く、またA群のなかではA-3が最高値を示した。現在のところ、濃厚飼料の給与量が第一胃液pHやエンドトキシン濃度に与える影響について言及した報告は見当たらないが、以上の結果から、第一胃液pHの低下とエンドトキシン濃度が上昇の程度に、摂取した濃厚飼料の量が関与している可能性が示唆された。

分娩前後の牛の血中エンドトキシン濃度の変化に関する報告はほとんどなく、わずかにAiumlamaiらによる報告を数えるのみである[2]。これによると、6頭中3頭の牛で分娩後に血中エンドトキシンの上昇が認められ、筆者らはこのエンドトキシン濃度の上昇の原因を、分娩後の第一胃停滞による第一胃内の異常発酵にあると類推しているが、第一胃液中エンドトキシン濃度は測定されておらずその関連は不明である。今回の実験では分娩後の血中エンドトキシンはA群の5頭中2頭およびB群の5頭全頭で検出され、実際の搾乳牛でも分娩後に全身血中エンドトキシン濃度が上昇する可能性が示された。またピークの出現頻度もA群に比べてB群での方が明らかに多く、やはり濃厚飼料の多給が血中エンドトキシン濃度の上昇にも関与しているものと推察された。

しかしその一方で、分娩前から第一胃液エンドトキシン濃度が増加している個体も存在し、また第一胃液および血中エンドトキシン濃度のピークの出現時間は各個体によって様々であった。個体ごとにみると、エンドトキシン濃度の上昇と第一胃液pHの低下、あるいは第一胃液中エンドトキシン濃度の上昇と血中エンドトキシン濃度の上昇はかならずしもパターンが一致していなかった。今回の実験結果からはこれらの理由は不明であるが、第一胃液および血中におけるエンドトキシン濃度の変動は単に濃厚飼料の多給のみと相関するのではなく、第4章のヤギの結果と同様に個体ごとの様々な他の条件も反映しているものと考えられた。

消化管から全身循環へのエンドトキシンの移行は、消化管からの吸収能だけに依存するのではなく、肝ないし肺の細網内皮系が有するエンドトキシンのクリアランス能にも大きく影響される[97]。今回肝機能の指標として血中AST、GGT濃度を測定したところ、双方ともA群ではほとんど変動しなかったが、B群においては軽度の増加を示した。周産期に肝障害を起こす病態としては肥満牛症候群が知られているが、今回の牛にはそのような臨床症状は認められなかった。しかし、分娩時の高泌乳牛においてなんらかの潜在的な肝障害が発展し、全身循環へ移行したエンドトキシンの処理能力が低下している可能性を示唆するデータとして興味深い。

以上をまとめると、実際の搾乳牛においても、高泌乳量を追及するための濃厚飼料の

多給によって分娩後に第一胃液pHが低下し、第一胃内エンドトキシン濃度が上昇していることが示された。またこのとき全身血中にもエンドトキシンが増加していること、およびその頻度は飼料の量と関連があることが示唆されたが、第一胃液中と全身血中のエンドトキシン濃度の変動はかならずしも一致せず、内因性エンドトキシンの移行経路や代謝についてさらなる研究が必要と思われた。

## 第5節 小括

分娩後の飼養形態が異なる2つの牛群、すなわち泌乳量に応じて濃厚飼料給与量を調節するA群と完全飼料を自由に摂取させるB群各5頭の乳牛について、分娩後2週間の第一胃液中および血中エンドトキシン濃度の変動を検討した。分娩後40日間の平均乳量はB群の方が有意に高く、自由採食のため正確な量は不明だが、B群の牛ではA群より多量の濃厚飼料を摂取していたものと思われた。分娩後の濃厚飼料給与量の増加とともに第一胃内pHは両群で低下したが、B群の方がより低い傾向があった。またA群のなかでも高泌乳量のため多量の濃厚飼料を与えられていた個体(A-3)では比較的大きなpHの低下を示した。第一胃液中エンドトキシン濃度は分娩後の両群で間欠的な上昇を示した。A群では1頭(A-3)が高いピークを示したほかは全て低いレベルで推移したが、B群ではA群に比べて高値を示す個体が多かった。一方A群における頸静脈血中エンドトキシン濃度は、5頭中2頭で分娩後にまた1頭では分娩前に各々1度だけピークを示した。B群でも同様に頸静脈血中エンドトキシン濃度の間欠的な上昇が認められ、そのレベルはA群とほぼ同等であったが、ピークが出現する頻度はA群よりもきわめて高かった。両群とも第一胃液と頸静脈血中のエンドトキシン濃度の変動の間には明らかな関連性は認められなかった。以上の結果から、実際の搾乳牛においても、高泌乳量を追及するための濃厚飼料の多給によって分娩後に第一胃液pHが低下し、第一胃内エンドトキシン濃度が上昇していることが示された。またこのとき全身血中にもエンドトキシンが増加していること、およびその頻度は飼料の量と関連があることが示唆されたが、第一胃液中と全身血中のエンドトキシン濃度の変動はかならずしも一致せず、内因性エンドトキシンの移行経路や代謝についてさらなる研究が必要と思われた。

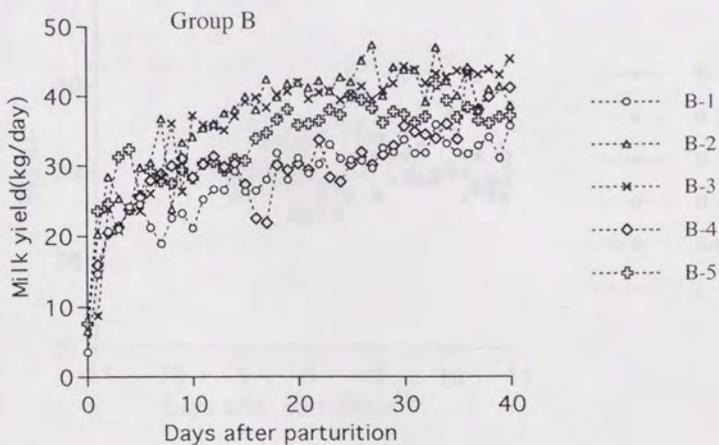
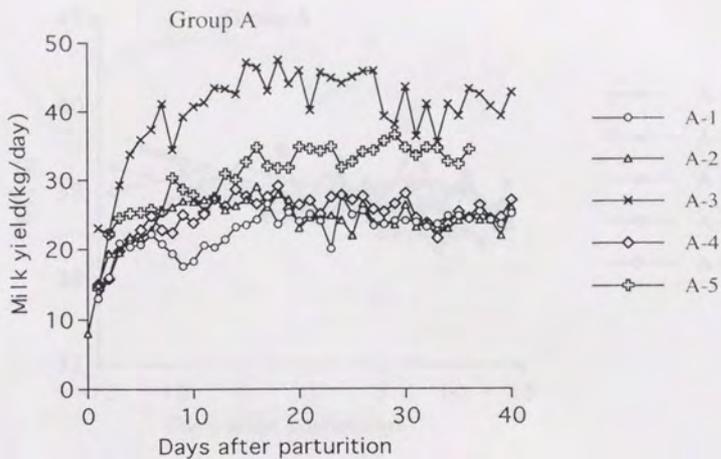


Fig. 5-1. Changes in milk yeild in the cows of groups A and B.

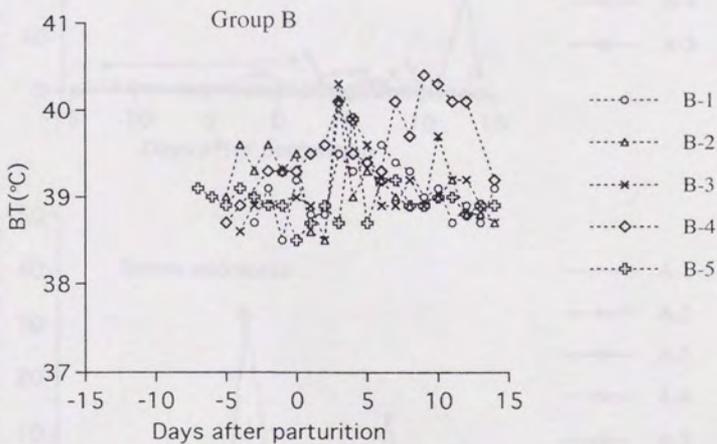
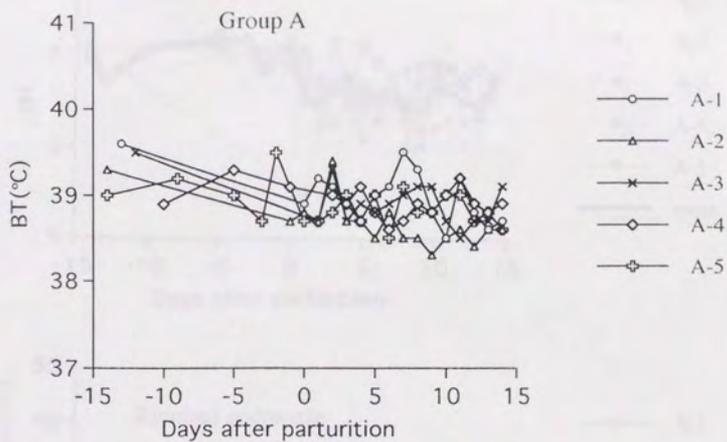


Fig. 5-2. Changes in body temperature (BT) in cows of groups A and B.

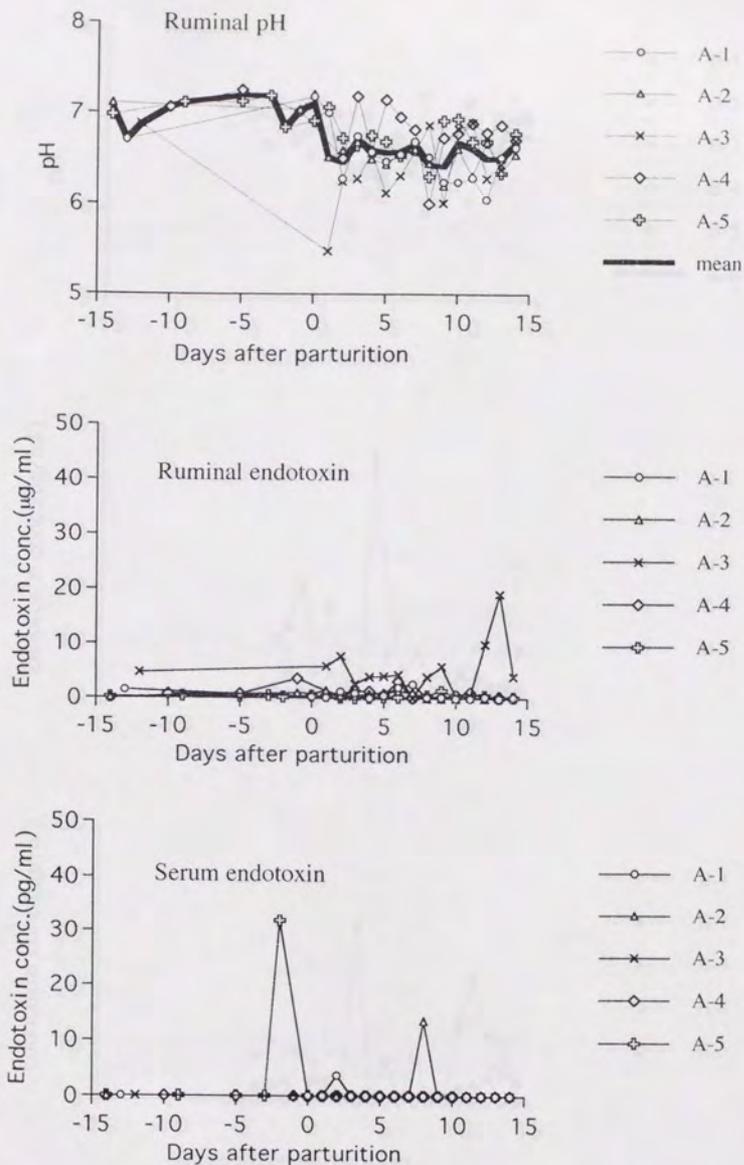


Fig. 5-3. Changes in ruminal pH, and ruminal and serum endotoxin concentrations in cows of group A.

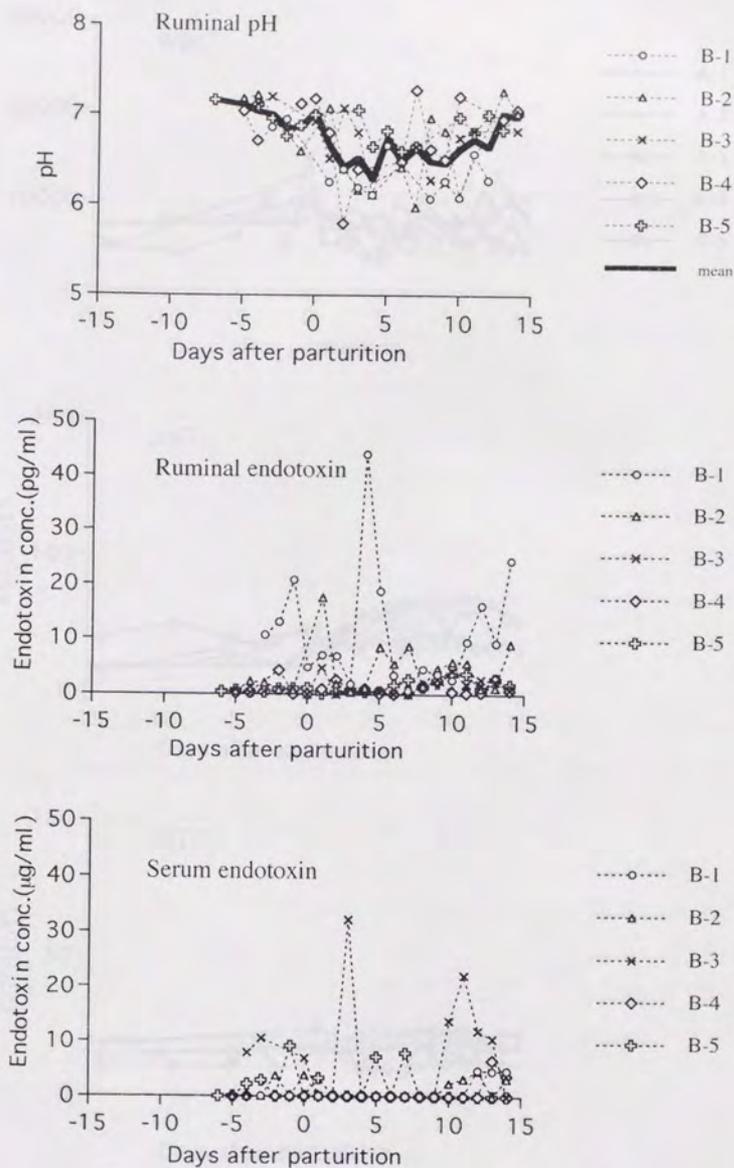


Fig. 5-4. Changes in ruminal pH, and ruminal and serum endotoxin concentrations in cows of group B.

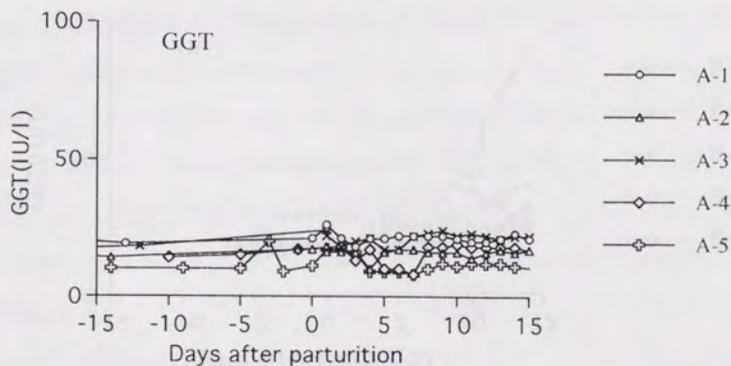
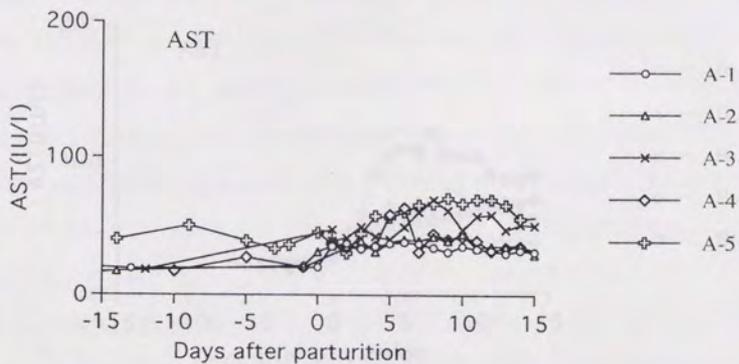
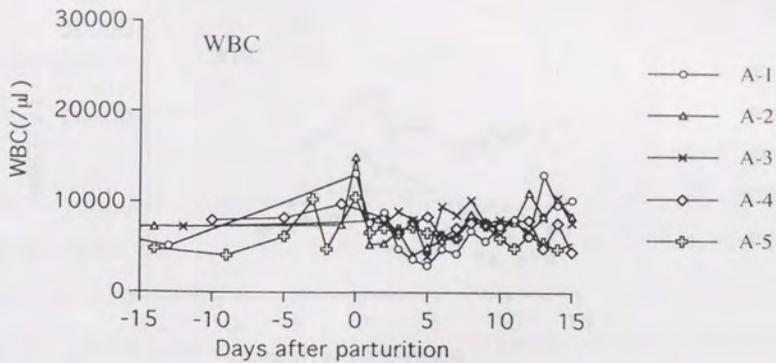


Fig. 5-5. Changes in white blood cell counts, serum AST levels and serum GGT levels in cows of group A.

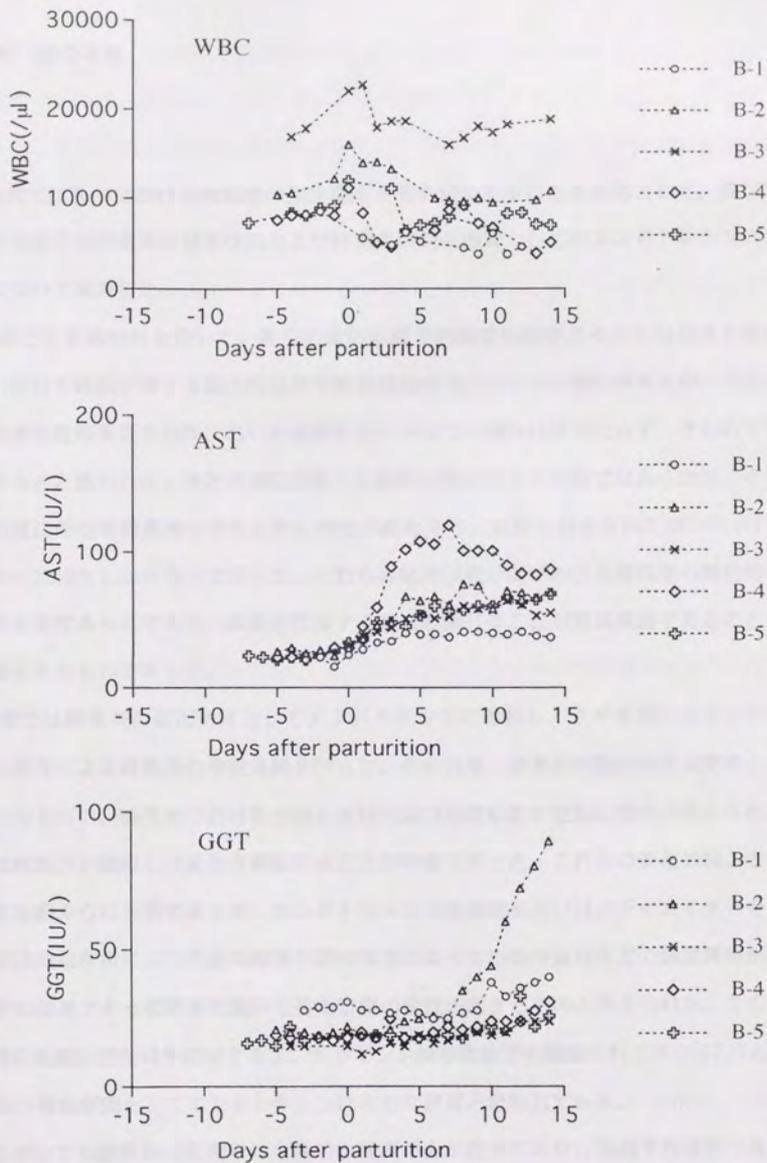


Fig. 5-6. Changes in white blood cell counts, serum AST levels and serum GGT levels in cows of group B

## 第6章 総合考察

本研究では乳牛における蹄疾患の発生機序を明らかにすることを目的として、我が国における乳牛の蹄葉炎の発生状況および蹄葉炎の発生物質としてのエンドトキシンの可能性について検討した。

第2章では屠場材料を用いて、乳牛の蹄の組織学的病変の程度とその出現頻度を検索した。跛行や蹄病に関する臨床的な疫学調査は国内外にいくつか報告があるが、今回のような潜在性蹄葉炎を念頭においた組織学的レベルでの報告は見当たらず、きわめて意義あるものと思われた。また45頭239蹄と比較的少数のサンプル数ではあったが、半数以上の蹄に潜在性蹄葉炎と考えられる変化が認められ、正常と判定されたグレード1はわずかに11.9%しか存在しなかった。これらの結果は我が国における蹄疾患の潜在的な蔓延を示唆するものであり、蹄疾患に対する対策を講じることが緊急課題であることを再認識させるものであった。

第3章では蹄葉炎の起因物質としてエンドトキシンに着目し、ヤギを用いたエンドトキシン投与による蹄葉炎の発症実験を行った。その結果、蹄葉炎の臨床症状は認められなかったものの、蹄真皮における出血と血栓および基底細胞の空胞化変性が認められ、潜在性蹄葉炎と類似した変化を惹起することが可能であった。これらの変化の起こる過程は本実験からは不明であるが、エンドトキシンの直接的あるいはメディエーターを介した間接的な作用による内皮の障害や凝固異常によって出血や血栓などの循環障害が起き、その結果である低酸素状態から基底細胞の変性が起きたものと考えられた。このような蹄の組織の変化は牛に対するエンドトキシン投与実験でも観察されており[17, 72]、蹄葉炎の発症原因としてエンドトキシンは有力な候補と思われる。

馬においても蹄葉炎の初期には全身的な凝固不全が起きており、組織学的検索で血栓が認められ、同時に血中からエンドトキシンが検出されたという報告もある[89]。しかしその一方で、馬においては蹄葉炎発症時の蹄の血流について詳細な研究がなされてい

る[5]。それによると、濃厚飼料の多給によって作出した急性蹄葉炎の初期には、まず蹄血管末梢の静脈の収縮が起こり、続いて毛細血管の内圧が高まり、血液成分が管外へ漏出する。蹄真皮は第3趾骨と蹄角質に囲まれているため、浮腫による間質圧の増加は逃げ場がなく、間質圧が高まって毛細管を圧迫し、虚血が起こるとされている。またこのとき動静脈吻合が開き、血流を迂回させることで虚血を助長する。この一連の変化で最初に起きるべき静脈収縮の原因は判っていない。エンドトキシンの存在下では血管作動薬に対する血管の反応性が変化することがin vitroの実験で示された[14]が、実際にエンドトキシンを投与した馬では蹄血流は減少したものの、動脈が収縮した結果であることが判明し、実際の蹄葉炎との関連が疑問視されている[41]。

牛においてはこのような詳細な血行動態に関する検討は行われていない。蹄皮（蹄真皮と表皮の嵌合部）の構造は牛と馬では大きく異なり、また牛の蹄血管における動静脈吻合の有無についてはいまだ議論がある[60, 84]。したがってこのような馬における蹄葉炎の発症機序がそのまま反芻獣である牛やヤギに適応可能かどうかは不明である。今回の実験で認められた組織学的な変化は、エンドトキシンの持つ細胞障害性あるいは凝固能の変化によるものと考えられたが、馬で報告されているこれらの血管反応性の変化による影響の可能性も否定できない。今後は反芻獣においても、蹄葉炎発症時あるいはエンドトキシン投与時の蹄血流の変動に関する詳細な研究が必要になると思われる。

第4章および第5章では反芻獣における炭水化物過食時の第一胃内エンドトキシン濃度の変化と、それに伴うbacterial translocation (BT)の可能性について検討した。その結果、実験的炭水化物過食時にも分娩後の濃厚飼料多給時にも同様の第一胃液pHの低下と第一胃液中エンドトキシン濃度の上昇が認められた。またこの消化管内エンドトキシンが第一胃静脈から吸収され、全身循環に入る可能性が示唆された。しかしながら、正常時にも吸収が起きていることや、第一胃液と第一胃静脈血および外頸静脈血中のエンドトキシン濃度の変動はかならずしも一致しないことが判明した。

BTの起こる条件としてDeitchは(1)常在細菌相の破綻とその結果としてのグラム陰性菌異常増殖、(2)機械的あるいは機能的消化管バリア機能の消失、(3)宿主免疫防

御能の障害の3つを挙げた[25]。ヒトや実験動物では出血性ショックや広範な熱傷受傷時にこのような条件が満たされるとされている。

今回の実験では炭水化物の過食を行ったヤギや分娩後の搾乳牛の全てで第一胃液中エンドトキシン濃度の増加が認められたが、その上昇パターンは様々であった。Andersen[8]は過食前の飼養形態によって、過食後の第一胃液中エンドトキシン量の変動パターンが異なることを示している。今回用いた動物においても、過食前の第一胃内環境の差が過食後のエンドトキシン産生に反映される可能性が考えられた。

エンドトキシン吸収を促進する第一胃粘膜の障害として、第一胃不全角化症 (rumen parakeratosis、以下RPK) の可能性が考えられる。RPKは重層扁平上皮である第一胃粘膜上皮における角化異常であり、発生機序は不明であるが濃厚飼料多給による第一胃内pHの低下や粗飼料不足によるものと考えられている。RPKが発展すると第一胃炎となり、しばしば肝膿瘍を伴うことから、臨床的にはRPK・第一胃炎・肝膿瘍複合症とよばれている[13, 93]。今回の実験では第一胃にこのような変化が起きていたかどうかは不明である。しかしながら第4章で高濃度のエンドトキシシンが検出されたのは小腸静脈ではなく第一胃静脈血だったことから、第一胃壁にRPKおよび炎症が起きて、その障害部位からエンドトキシシンが移行した可能性は十分考えられる。また臨床的にRPKに肝膿瘍が併発するのも、RPK後のBTによって肝臓まで生菌が到達した結果と考えられ、この仮説を支持する。実験動物ではBTの起こる部位は腸管全体であることが示されているが、複胃という特殊な構造の、かつ莫大なエンドトキシシンのプールを持つ反芻獣ではこのような特殊な形式のBTが起きている可能性が考えられる。

一方、門脈に入ったエンドトキシシンは肝の網内皮系において処理される。したがって肝機能不全の有無はBTの程度に影響するものと考えられる。過肥の状態にある牛においては、分娩前後の異常な体脂肪の動員によって肥満牛症候群 (fat cow syndrome) が起きる[13]。とくに高泌乳牛に多くみられるこの疾病は、脂肪肝をともない肝機能を障害する。今回第4章で用いたヤギでは、第一胃静脈中で高濃度のエンドトキシシンが検出されたものの、全身血中で検出されず、肝におけるエンドトキシシン処理能力は正常で

あると思われた。しかし濃厚飼料を多給する不適当な飼養管理下の牛では、分娩前後で肝機能が障害され、十分なエンドトキシン処理が行われない可能性も考えられる。実際、第5章で用いたB群の牛では分娩後に肝酵素値の軽度な上昇が観察された。

実際の搾乳牛においてはこのような第一胃内の発酵状態、第一胃粘膜の障害程度、肝におけるクリアランス等の様々な条件が複雑に関係しつつ、BTの有無や程度を規定しているものと考えられ、今後より詳細な検討が必要と思われた。

今回の一連の実験では蹄葉炎の発生要因としてエンドトキシンを中心とした栄養学的側面に注目した。その結果は残念ながら、第一胃で発生するエンドトキシンが常に蹄葉炎を発症させるという確証を得るには至らなかった。しかしエンドトキシンの作用で蹄の組織には循環障害が起きうることが示され、さらに実際の搾乳牛においても分娩後に第一胃液中から全身血中へのエンドトキシンの移行が起きていることが示唆されたことから、乳牛における蹄葉炎の発症に内因性のエンドトキシンが深く関与している可能性が示された。

一方、蹄葉炎の発生にはエンドトキシン以外にもきわめて多数の要因の関与の可能性が考えられている。Vermuntは広範な文献をもとに全身疾患、栄養（大麦、蛋白質、炭水化物、粗飼料、亜硝酸塩）、牛舎構造、牛床の質、運動量、分娩、季節、年齢、発育期の状態、遺伝、肢勢、行動などの発生要因を挙げ、蹄葉炎はこれらの因子の総合的な作用として起こる多因子性の疾患であるとしている[83]。とくに近年は、牛群内での個体の順位や起立時間といった行動学的因子や、敷料の種類あるいは削蹄の回数といった管理法が、蹄病や跛行の発生に少なからず影響をあたえていることが明らかにされ[22, 49, 55, 68, 86]、栄養学的因子以外の要因の重要性が認識されるようになってきた。今回の実験でもエンドトキシンの単独投与では蹄葉炎の臨床症状は惹起されず、組織レベルでの病変が症状の発現に至るには他の要因の関与が必要であることが示唆された。

増加傾向にある運動器病への対策は急務であるが、その最大の原因とされる蹄疾患は上述のごとく多因子性の疾患と考えられており、根本的な予防法はいまだ確立されていない。VermuntとSmartは、蹄病が多発する乳牛群に対して行われ、実際に成功を納

めた蹄病管理法のひとつの試みを報告している[85]。その内容はやはり完全飼料への変換、コンピューターフィーディングによる飼養管理、十分な長さの粗飼料の給与といった栄養学的なアプローチを中心としているが、さらに未經産牛のコンクリート床への導入時期の検討、土の上での運動量の増加、適切な薬剤によるフットバスの励行、年2回の削蹄など管理面における様々な改善を含んでいる。さらにこのような飼養管理法の変化が効果を表すには、かなり長い期間（少なくとも6か月以上）が必要であることが強調されている。蹄疾患の原因が特定できない現在、その予防にはこのような長期的な展望と群管理の視野に立った生産獣医学（production medicine）的な方法が最適であると考えられる。

今後はエンドトキシンの蹄に及ぼす直接的あるいは間接的な作用についてさらに詳細な検討をすすめるとともに、蹄疾患に関する他の因子についても検討をすすめ、総合的な蹄疾患の予防法を確立する必要があるものと考えられた。

## 第7章 総括

近年、濃厚飼料の多給や多頭飼育など飼養管理の集約化の普及にともなうて、乳牛の運動器疾患が全世界的に増加傾向にあり、新しい生産病として注目されるようになっていいる。牛の運動器病の多くは蹄疾患が原因といわれており、なかでも蹄葉炎は蹄の角質合成部位である蹄皮を侵し、異常な角質産生から他のさまざまな蹄疾患へ発展する原因疾患として最も重要視されている。また、従来の急性および慢性蹄葉炎に対し、臨床的な跛行を示さない潜在性蹄葉炎が広く乳牛に存在することが近年見いだされ、蹄病増加の一要因として大きく寄与しているものと考えられている。我が国においても乳牛の運動器疾患は死傷事故原因の第2位となるまでに増加しており、その経済的損失の大きさから早急な対策の必要性が叫ばれている。しかし日本における潜在性蹄葉炎を含む蹄疾患に関する詳細な調査・研究はほとんど行われておらず、その発生状況等は明らかになっていない。

蹄葉炎の病態の本質は真皮層における循環障害を起点とした虚血病変であると推測されているが、循環障害の詳細な発生機序はいまだに判っていない。疫学的調査から全身性疾患、年令、産次、泌乳ステージ、肢勢、遺伝、栄養、牛舎構造、運動量、行動、環境などさまざまな発生要因の関与が挙げられており、いくつもの因子が複雑に絡み合って発症する多因子性の疾患であると考えられている。これらの因子のなかでも、盗食や分娩後などの濃厚飼料多給時に急性蹄葉炎が発生するという事実はよく知られており、栄養学的因子、特に炭水化物の大量摂取と蹄葉炎との関係が古くから注目されてきた。すなわち、濃厚飼料の多給によって第一胃内では乳酸発酵が優勢となり、ルーメンアシドーシスが惹起される。このとき第一胃内で生成される物質が蹄真皮の血管に作用し循環障害を引き起こすものと考えられ、乳酸やヒスタミンが候補としてあげられたが、いずれも蹄葉炎の原因物質として確定されるには至っていない。現在これらの物質の中で直接的あるいは種々のサイトカイン類を介して間接的に血管にさまざまな反応を引き起

こすエンドトキシンが最も注目されている。馬においては、実験的な炭水化物の大量投与時に急性蹄葉炎が惹起されるとともに全身的なエンドトキシン血症が起きていることが報告されており、また牛においても実験的に作出された濃厚飼料多給時に第一胃内のエンドトキシン量が増加することが示されている。人やラットなどの実験動物では、消化管内の細菌もしくはエンドトキシンが消化管粘膜を貫通し循環血中に入るbacterial translocationとよばれる現象が証明されており、ショック時の多臓器不全などの原因となりうると考えられている。しかし複胃という独特の消化器官をもつ反芻獣におけるbacterial translocationに関する詳細な研究はいまだ見当たらない。

以上の観点から、本研究では乳牛における蹄疾患の発生機序を明らかにすることを目的とし、我が国における乳牛の蹄葉炎の発生状況および蹄葉炎の原因物質としてのエンドトキシンの可能性について検討した。

#### 実験1

我が国の乳牛における蹄疾患の発生状況およびその発生要因を探ることを目的として、以下の二つの実験を行った。

まず東京近郊の屠場においてホルスタイン種乳牛の45頭239蹄を無作為に採取し、蹄底の真皮層および表皮層の病理組織学的検索を行った。その結果、程度の差はあるものの真皮層では循環障害を主体とした病変が、表皮層では変性や角化の異常が広く認められた。これらの所見を角化の程度によりGrade 1から5までの5段階に分類した。正常と判定されたGrade 1はわずか11.7%しか存在せず、Grade 3 (23.9%) および4 (5.4%) の病変は従来報告されている慢性蹄葉炎の組織像によく一致していた。これらの前段階に当たるGrade 2は潜在性蹄葉を示す所見と考えられ、実に53.6%と半数以上の蹄を占めていた。また蹄底潰瘍を伴うGrade 5も5.4%存在した。これらGrade 1から5の所見は、潜在性蹄葉炎が他の蹄病へ進行する一連の病変の表れと推察され、日本の乳牛においてもかなり高率に潜在性蹄葉炎が存在することが示された。

次いで蹄底潰瘍と診断され淘汰された乳牛8頭の蹄について、前実験と同様の病理組織学的検索を行いグレードの分布を比較した。その結果、蹄底潰瘍を罹患した乳牛の蹄

病変のグレードは、蹄底潰瘍の位置に関わらず全ての蹄において、正常な乳牛よりも高度であった。後肢外側蹄における病変は他の蹄に比べて明らかに高度であったが、それ以外の蹄ではほぼ同じレベルであった。したがって、蹄底潰瘍のような高度の蹄疾患をもつ乳牛では、全ての蹄を均等に障害するような全身的な要因が存在しており、その存在下で後肢外側蹄のみ病変を進行させる別の局所的な要因が存在するものと考えられた。

### 実験2

乳牛は高価でかつその飼育も容易でないため、取扱いの容易なヤギを用いてエンドトキシン投与による蹄葉炎の発症実験を行った。対照として比較するために左後肢外側蹄を外科的に切断した後、10、50、100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ のエンドトキシンを各3頭ずつのヤギに静脈内投与し、3日間の観察後に安楽死し蹄の組織を観察した。全てのヤギは沈鬱、食欲低下、下痢、体温上昇などの典型的な症状を示し、50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群中の2頭および100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ 群中の1頭は実験途中で斃死した。臨床的な蹄葉炎症状は観察されなかったが、組織学的には3群とも対照とした左後肢外側蹄ではほとんど認められなかった出血、血栓および基底細胞の空胞変性が出現しており、蹄葉炎と同様の循環障害の存在が示唆された。

### 実験3

ヤギにおいて実験的な炭水化物の過食状態を作成し、消化管内エンドトキシンの変動および吸収について検討した。あらかじめ第一胃にフィステルを、第一胃静脈および小腸静脈にカテーテルを装着したヤギ5頭（#1～#5）に対し、正常摂食時の7日間および馬鈴薯デンプン22.5g/kg投与6日後まで24時間毎に第一胃液pHおよびエンドトキシン濃度、第一胃静脈血、小腸静脈血および頸静脈血中のエンドトキシン濃度を測定した。正常摂食時では第一胃液pHはほとんど変動せず、第一胃液中エンドトキシン濃度もごく低いレベルで一定していた。5頭中ヤギ#1、4、5の3頭では各血液中にエンドトキシンは検出されなかった。ヤギ#2の小腸静脈血およびヤギ#3の各血液で各々1～3回低いレベルのエンドトキシンが検出された。一方過食時では第一胃液pHは術後1～2日目に急激に低下し、それに伴って第一胃液エンドトキシン濃度は大きく上昇したが、そ

のピーク値は個体によって大きな幅があった。正常時と同じく3頭のヤギでは各血液中にエンドトキシンは検出されなかった。頸静脈血ではヤギ#2に、また小腸静脈血ではヤギ#3で正常摂食時とはほぼ同じレベルのエンドトキシンが検出され、またヤギ#2および#3の第一胃静脈血ではきわめて高濃度のエンドトキシンが検出された。しかしながらこの2頭における各血液中のエンドトキシン濃度の変動パターンには、第一胃液中エンドトキシン濃度との相関性は見いだせなかった。

以上の結果から、ヤギにおいては炭水化物多給時に第一胃液内のエンドトキシン濃度が上昇し、消化管中のエンドトキシンが主に第一胃静脈から吸収され全身循環に入る可能性が示唆された。しかし過食時のみならず正常時にも吸収は起きていることが示され、その吸収の程度は第一胃液中エンドトキシン濃度によって一意的に決まるものではなく、むしろ個体差によるところが大きいことが推測された。

#### 実験4

潜在性蹄葉炎や他の蹄疾患は分娩後3~4か月後に多発することが知られており、分娩に伴う生理的な変化および分娩前後の飼養形態の変化がこれら蹄病の発生要因として考えられている。そこで分娩後の飼養形態が異なる2つの牛群、すなわち泌乳量に応じて濃厚飼料給与量を調節するA群と完全飼料を自由に摂取させるB群各5頭の乳牛について、分娩後2週間の第一胃液中および血中エンドトキシン濃度の変動を検討した。分娩後40日間の平均乳量はB群の方が有意に高く、自由採食のため正確な量は不明だが、B群の牛ではA群より多量の濃厚飼料を摂取していたものと思われた。分娩後の濃厚飼料給与量の増加とともに第一胃内pHは両群で低下したが、報告されている実験的な炭水化物過食や実験3で得られた結果に比べるとその程度は小さかった。A群に比べるとB群の方がpHの低下は大きい傾向があり、またA群のなかでも高泌乳量のため多量の濃厚飼料を与えられていた個体(A-3)では比較的大きなpHの低下を示した。第一胃液中エンドトキシン濃度は分娩後の両群で間欠的な上昇を示した。A群では1頭(A-3)が高いピークを示したほかは全て低いレベルで推移したが、B群ではA群に比べて高値を示す個体が多かった。一方A群における頸静脈血中エンドトキシン濃度は、5頭中2頭で分娩後に

また1頭では分娩前に各々1度だけピークを示した。B群でも同様に頸静脈血中エンドトキシン濃度の間欠的な上昇が認められ、そのレベルはA群とほぼ同等であったが、ピークが出現する頻度はA群よりもきわめて高かった。両群とも第一胃液と頸静脈血中のエンドトキシン濃度の変動の間には明らかな関連性は認められなかった。以上の結果から、実際の搾乳牛においては、分娩後の飼料変化による第一胃液pHの低下は比較的軽度であるが、第一胃内エンドトキシン濃度は大きく上昇していることが示された。またこのとき全身血中にもエンドトキシンが増加していること、およびその頻度は飼料の量と関連があることが示唆されたが、第一胃液中と全身血中のエンドトキシン濃度の変動はかならずしも一致せず、内因性エンドトキシンの移行経路や代謝についてさらなる研究が必要と思われた。

以上の実験の結果を総合すると、1) 我が国においても大部分の乳牛の蹄に潜在性蹄葉炎が存在する。2) 反芻獣においてエンドトキシン投与によって蹄葉炎と同様の組織病変を惹起することが可能である。3) 実験的にも実際の搾乳牛においても、濃厚飼料の多給後の第一胃液pH低下によって第一胃内のエンドトキシン濃度が増加する。4) 移行経路は不明だが、消化管内のエンドトキシンが全身循環に入り蹄葉炎の発生に関与している可能性があることが示された。

## 謝 辞

本研究を終えるに当たり、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました東京大学獣医外科学教室 佐々木伸雄教授に深謝いたします。

さらに、研究・論文作成に当たり、多大の協力と適切な御助言をいただきました東京大学獣医外科学教室 西村亮平助教授に深厚なる謝意を表します。

貴重なる材料の提供および実験の遂行にご協力をいただくとともに、適切なる御助言をいただきました東京大学農学部付属牧場 沢崎 徹教授ならびに関係者各位に深く感謝いたします。

同じく貴重なる材料の提供および実験の遂行にご協力をいただいた山田動物病院 山田裕先生に心から謝意を表します。

また病理組織学的検討に当たり、適切な御指導をいただいた東京大学農学部病理学教室 後藤直彰元教授ならびに中山裕之助教授に深く感謝いたします。

最後に、本研究を実施するに際し、深い御理解、ご協力をいただいた東京大学農学部獣医外科学教室 松永悟助手ならびに獣医外科学教室の皆様心から感謝の意を表します。

## 文 献

1. Aiumlamai, S., Fredriksson, G., Kindahl, H., Edqvist, L. E., Kulander, L., and Eliksson, O. 1990. Endotoxin concentrations in the blood following intravenous injection and effect on prostaglandin F<sub>2a</sub> release, calcium and bile acids in goats. *Res. Vet. Sci.* 48: 190-195.
2. Aiumlamai, S., Fredriksson, G., Kindahl, H., and Edqvist, L. E. 1992. A possible role of endotoxin in spontaneous paretic cows around parturition. *J. Vet. Med. A* 39: 57-68.
3. Aiumlamai, S. and Kindahl, H. 1990. Clinical and blood biochemical changes during induction of endotoxaemia in heifers. *Acta Vet. Scand.* 31: 501-504.
4. Aiumlamai, S., Kindahl, H., Edqvist, L. E., Kulander, L., and Eriksson, O. 1992. The role of endotoxins in induced ruminal acidosis in calves. *Acta Vet. Scand.* 33: 117-127.
5. Allen, D., Clark, S., Moore, J. N., and Prasse, K. W. 1990. Evaluation of equine digital Starling forces and hemodynamics during early laminitis. *Am. J. Vet. Res.* 51: 1990-1993.
6. Allison, J. M., Robinson, I. M., Dougherty, R. W., and Bucklin, J. A. 1975. Grain overload in cattle and sheep: changes in microbial populations in the cecum and rumen. *Am. J. Vet. Res.* 36: 181-185.
7. Andersen, P. H. 1990. Aspects of bovine endotoxaemia possible relevance to lesion in the ruminant digit. 6th International Symposium on Ruminant Digital Disease 59-70.
8. Andersen, P. H., Bergelin, B., and Christensen, K. A. 1994. Effect of feeding regimen on concentration of free endotoxin in ruminal fluid of cattle. *J. Anim. Sci.* 72: 487-491.
9. Andersen, P. H., Hasselholt, M., and Jarlov, N. 1994. Endotoxin and arachidonic acid metabolites in portal, hepatic, and arterial blood of cattle with acute ruminal acidosis. *Acta vet. scand.* 35: 223-234.
10. Andersen, P. H. and Jarlov, N. 1990. Investigation of possible role of endotoxin, TXA<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> and PGE<sub>2</sub> in experimentally induced rumen acidosis in cattle. *Acta Vet. Scand.* 31: 27-38.
11. Andersson, L. 1981. An attempt to induce laminitis in cows by intraruminal infusion of lactic acid. *Acta Vet. Scand.* 22: 140-142.

12. Andersson, L. and Bergman, A. 1980. Pathology of bovine laminitis especially as regards vascular lesions. *Acta Vet. Scand.* 21: 559-566.
13. Andrews, A. H. 1992. *Bovine Medicine*. Blackwell Scientific Publication, Oxford
14. Baxter, G. M. 1995. Alterations of endothelium-dependent digital vascular responses in horses given low-dose endotoxin. *Vet. Surg.* 24: 87-96.
15. Boosman, R. 1990. The influence of calving and puerperium on clinical and histopathologic changes associated with laminitis and sole ulceration in a group of first-calving cows. *J. Vet. Med. A* 37: 513-519.
16. Boosman, R., Koeman, J., and Nap, R. 1989. Histopathology of the bovine pododerma in relation to age and chronic laminitis. *J. Vet. Med. A* 36: 438-446.
17. Boosman, R., Mutsaers, C. W. A. A. M., and Klarenbeek, A. 1991. The role of endotoxin in the pathogenesis of acute bovine Laminitis. *Vet. Q.* 13: 155-162.
18. Boosman, R., Nemeth, F., and Gruys, E. 1991. Bovine laminitis: clinical aspects, pathology and pathogenesis with reference to acute equine laminitis. *Vet. Q.* 13: 163-171.
19. Boosman, R., Nemeth, F., Gruys, E., and Klarenbeek, A. 1989. Arteriographical and pathological changes in chronic laminitis in dairy cattle. *Vet. Q.* 11: 144-154.
20. Bradley, H. K., Shannon, D., and Neilson, D. R. 1989. Subclinical laminitis in dairy heifers. *Vet. Rec.* 125: 177-179.
21. Briner, V. A. and Luscher, T. F. 1994. Role of vascular endothelial abnormalities in clinical medicine: atherosclerosis, hypertension, diabetes, and endotoxemia. *Advances in Internal Medicine* 39: 1-22.
22. Colam-Ainworth, P., Lunn, G. A., Thomas, R. C., and Eddy, R. G. 1989. Behaviour of cows in cubicles and its possible relationship with laminitis in replacement dairy heifers. *Vet. Rec.* 125: 573-575.
23. Collick, D. W., Ward, W. R., and Dobson, H. 1989. Associations between types of lameness and fertility. *Vet. Rec.* 125: 103-106.

24. David, G. P. 1990. Terminology and pathogenesis associated with laminitis in cattle. 6th International Symposium on Ruminant Digital Disease 1-5.
25. Deitch, E. A. 1992. Multiple organ failure. *Ann. Surg.* 216: 117-134.
26. Distl, O. 1994. Genetic improvement of claw and leg traits. Proceedings of the 8th International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit 124-135.
27. Dougherty, R. W., Coburn, K. S., Cook, H. M., and Alisson, M. J. 1975. Preliminary study of appearance of endotoxin in circulatory system of sheep and cattle after induced grain engorgement. *Am. J. Vet. Res.* 36: 831-832.
28. Dougherty, R. W., Riley, J. L., Baetz, A. L., Cook, H. M., and Coburn, K. S. 1975. Physiologic studies of experimentally grain-engorged cattle and sheep. *Am. J. Vet. Res.* 36: 833-835.
29. Eddy, R. G. and Scott, C. P. 1980. Some observation on the incidence of lameness in dairy cattle in Somerset. *Vet. Rec.* 106: 140-144.
30. Fredriksson, G. 1984. Some reproductive and clinical aspects of endotoxins in cows with special emphasis on the role of prostaglandins. *Acta vet. scand.* 1984: 365-377.
31. Fukushima, R., Gianotti, L., and Alexander, W. 1994. The Primary site of bacterial translocation. *Arch. Surg.* 129: 53-58.
32. Gans, H. and Matsumoto, K. 1974. Are enteric endotoxins able to escape from the intestine? Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine 147: 736-739.
33. Garner, H. E., Coffman, J. R., Hahn, A. W., Hutchenson, D. P., and Tumbleson, M. E. 1975. Equine laminitis of alimentary origin: an experimental model. *Am. J. Vet. Res.* 36: 441-444.
34. Garner, H. E., Moore, J. N., Johnson, J. H., Clark, L., Amend, J. F., Tritschler, L. G., Coffman, J. R., Sprouse, R. F., Hutchensin, D. P., and Salem, C. A. 1978. Changes in the caecal flora associated with the onset of laminitis. *Equine vet. J.* 10: 249-252.
35. Gaynor, E., Bouvier, C., and Spaet, T. H. 1970. Vascular lesions: possible pathogenetic basis of the generalized Shwartzman reaction. *Science* 170: 986-988.

36. Gerrity, R. G., Caplan, B. A., Richardson, M., Cade, J. F., Hirsh, J., and Schwartz, C. J. 1975. Endotoxin-induced endothelial injury and repair 1. Endothelial cell turnover in the aorta of the rabbit. *Exp. Mol. Pathol.* 23: 379-385.
37. Gerrity, R. G., Richardson, M., Caplan, B. A., Cade, J. F., Hirsh, J., and Schwartz, C. J. 1975. Endotoxin-induced vacular endothelial injury and repair 2. Focal injury, en face morphology, [3H]thymidine uptake and circulating endothelial cells in the dog. *Exp. Mol. Pathol.* 24: 59-69.
38. Greenough, P. R. and Vermunt, J. J. 1991. Evaluation of subclinical laminitis in a dairy herd and observations on associated nutritional and management factors. *Vet. Rec.* 128: 11-17.
39. Griel, L. C., Zarkower, A., and Eberhart, R. J. 1975. Clinical and clinico-pathological effects of *Escherichia coli* endotoxin in mature cattle. *Can. J. comp. Med.* 39: 1-6.
40. Harlan, J. M., Harker, L. A., Reidy, M. A., Gajdusk, C. M., Schwartz, S. M., and Striker, G. E. 1983. Lipopolysaccharide-mediated bovine endothelial cell injury in vitro. *Lab. Invest.* 48: 269-274.
41. Hunt, R. J., Allen, D., and Moore, J. N. 1990. Effect of endotoxin administration on equine digital hemodynamics and Starling forces. *Am. J. Vet. Res.* 51: 1703-1707.
42. Hunt, R. V. 1991. The pathophysiology of acute laminitis. *Compend. Contin. Educ. Pract.* 13: 1003-1010.
43. Jacob, A. I., Goldberg, P. K., Bloom, N., Degenshein, G. A., and Kozinn, P. J. 1977. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* 72: 1268-1270.
44. Jarlov, N., Andersen, P. H., and Hasselholt, M. 1992. Pathophysiology of experimental bovine endotoxemia: endotoxin induced synthesis of prostaglandins and thromboxane and the modulatory effect of some non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Acta Vet. Scand.* 33: 1-8.
45. Kenison, D. C., Elsasser, T. H., and Fayer, R. 1991. Tumor necrosis factor as a potential mediator of acute metabolic and hormonal responses to endotoxemia in calves. *Am. J. Vet. Res.* 52: 1320-1326.
46. Livesey, C. T. and Fleming, F. L. 1984. Nutritional influences on laminitis, sole ulcer and bruised sole in Friesian cows. *Vet. Rec.* 114: 510-512.

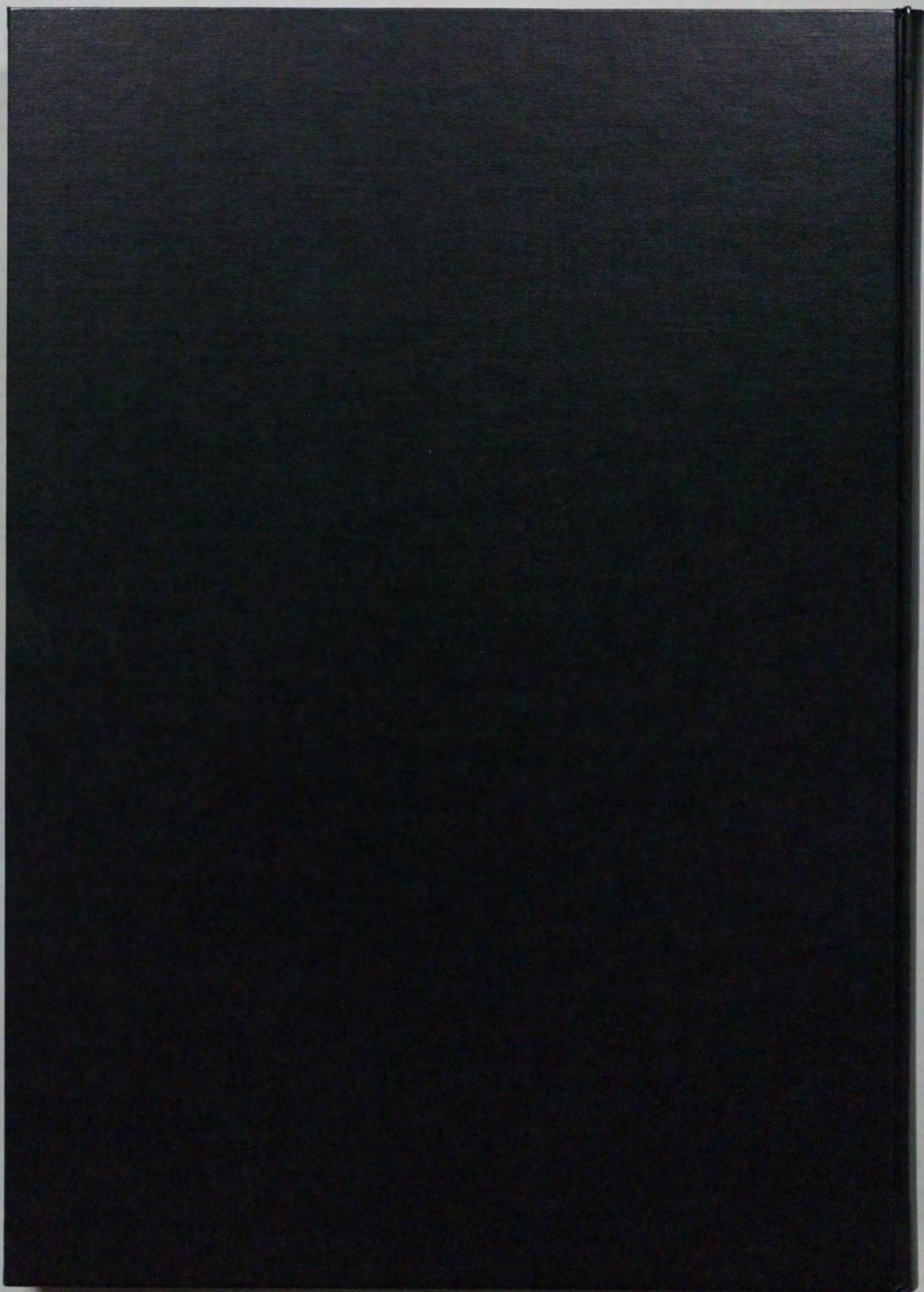
47. Maclean, C. W. 1971. The histopathology of laminitis in dairy cows. *J. Comp. Path.* 81: 563-570.
48. Maejima, K., Deitch, E. A., and Berg, R. D. 1984. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury. *Infect. Immun.* 43: 6-10.
49. Manson, F. J. and Leaver, J. D. 1988. The influence of concentrate amount on locomotion and clinical lameness in dairy cattle. *Anim. Prod.* 47: 185-190.
50. Manson, F. J. and Leaver, J. D. 1989. The effect of concentrate: silage ratio and of hoof trimming on lameness in dairy herd. *Anim. Prod.* 49: 15-22.
51. Mason, A. D., McManus, A. T., and Pruitt, B. A. 1986. Association of burn mortality and bacteremia. *Arch. Surg.* 121: 1027-1031.
52. Maxie, M. G., Valli, V. E. O., and Lumsden, J. H. 1974. Studies with radioactive endotoxin; 2. Clearance of 3H-labelled endotoxin from the blood of calves. *Can. J. comp. Med.* 38: 367-382.
53. Maxie, M. G., Valli, V. E. O., Robinson, G. A., Truscott, R. B., and McSherry, B. J. 1974. Studies with radioactive endotoxin; 1. Clearance of 51Cr-labelled endotoxin from the blood of calves. *Can. J. comp. Med.* 38: 347-366.
54. Mgas, M. N. 1987. Bovine pododermatitis aseptica diffusa (laminitis) aetiology, pathogenesis, treatment and control. *Vet. Res. Com.* 11: 235-241.
55. Mgas, M. N., Amaya-Posada, G., and Hesselholt, M. 1984. Pododermatitis aseptica diffusa (laminitis) in free range beef cattle in tropical Africa. *Vet. Rec.* 115: 413-414.
56. Mgas, M. N. and Mbassa, G. K. 1988. Tolerance of goats to experimental grain engorgement and intraruminal lactic acid injection. *Vet. Res. Com.* 12: 143-147.
57. Moore, J. N., Garner, H. E., Berg, J. N., and Sprouse, R. F. 1979. Intracecal endotoxin and lactate during the onset of equine laminitis: a preliminary report. *Am. J. Vet. Res.* 40: 722-723.
58. Motoi, Y., Oohashi, T., Hirose, H., Hiramatsu, M., Miyazaki, S., Nagasawa, S., and Takahashi, J. 1993. Turbidimetric-kinetic assay of endotoxin in rumen fluid or serum of cattle

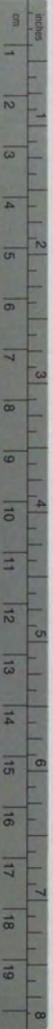
- fed rations containing various levels of rolled barley. *J. Vet. Med. Sci.* 55: 19-25.
59. Nagaraja, T. G., Bartley, E. E., Fina, L. R., and Anthoney, H. D. 1978. Relationship of rumen Gram-negative bacteria and free endotoxin to lactic acidosis in cattle. *J. Anim. Sci.* 47: 1329-1337.
60. Nasu, T., Kitazaki, K., Nakai, M., and Ogawa, H. 1994. Microvascularization of the cattle digit. *Proceedings of the 8th International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit* 400.
61. Nilsson, S. A. 1963. Clinical, morphological, and experimental studies of laminitis in cattle. *Acta vet scand.* 4, supplement 1:
62. Ossent, P., Peterse, D. J., and Schamhardt, H. C. 1987. Distribution of load between the lateral and medial hoof of the bovine hind limb. *J. Vet. Med. A* 34: 296-300.
63. Peterse, D. J. 1985. Laminitis and interdigital dermatitis and heel horn erosion; a European perspective. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 1: 83-91.
64. Peterse, D. J., Korver, S., Oldenbroek, J. K., and Tamlon, F. P. 1984. Relationship between levels of concentrate feeding and incidence of sole ulcers in dairy cattle. *Vet. Rec.* 115: 629-630.
65. Prentice, D. E. and Neal, P. A. 1972. Some observations on the incidence of lameness in dairy cattle in West Cheshire. *Vet. Rec.* 91: 1-7.
66. Ravin, H. A., Rowley, D., Jenkins, C., and Fine, J. 1960. On the absorption of bacterial endotoxin from the gastro-intestinal tract of the normal and shocked animal. *J. Exp. Med.* 112: 783-792.
67. Reidy, M. A. and Bowyer, D. E. 1977. Scanning electron microscopy: morphology of aortic endothelium following injury by endotoxin and during subsequent repair. *Atherosclerosis* 26: 319-328.
68. Rowlands, G. J., Russel, A. M., and Williams, L. A. 1983. Effects of season, herd size, management system and, veterinary practice on the lameness incidence in dairy cattle. *Vet. Rec.* 113: 441-445.
69. Rowlands, G. J., Russell, A. M., and Williams, L. A. 1985. Effects of stage of lactation,

- month, age, origin and heart girth on lameness in dairy cattle. *Vet. Rec.* 117: 576-580.
70. Russell, A. M., Rowlands, G. J., Shaw, S. R., and Weaver, A. D. 1982. Survey of lameness in british dairy cattle. *Vet. Rec.* 111: 155-160.
71. Singh, S. S., Murray, R. D., and Ward, W. R. 1992. Histopathological and morphometric studies on the hooves of dairy and beef cattle in relationship to overgrown sole and laminitis. *J. Comp. Path.* 107: 319-328.
72. Singh, S. S., Murray, R. D., and Ward, W. R. 1994. Gross and histopathological study of endotoxin-induced hoof lesions in cattle. *J. Comp. Path.* 110: 103-115.
73. Sittig, K. and Deitch, E. A. 1988. Effect of bacteremia on mortality after thermal injury. *Arch. Surg.* 123: 1367-1370.
74. Sprouse, R. F., Garner, H. E., and Green, E. M. 1987. Plasma endotoxin levels in horses subjected to carbohydrate induced laminitis. *Equine vet. J.* 19: 25-28.
75. Steffen, E. K. and Berg, R. D. 1983. Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. *Infect. Immun.* 39: 1252-1259.
76. Suber, R. L., Hentges, J. F., Gudat, J. C., and Edds, G. T. 1979. Blood and ruminal fluid profiles in carbohydrate-foudered cattle. *Am. J. Vet. Res.* 40: 1005-1008.
77. Takahashi, K. and Young, A. B. 1981. Effects of histamine injections on physical responses to laminitis in cattle exposed to warm and cold temperature. *Jpn. J. Sci.* 43: 261-265.
78. Takahashi, K. and Young, B. A. 1981. Effects of grain overfeeding and histamine injection on physiological responses related to acute bovine laminitis. *Jpn. J. Vet. Sci.* 43: 375-385.
79. Tamakuma, S., Rojas-Corona, R., Cuevas, P., and Fine, J. 1971. Demonstration of a lethal endotoxemia of intestinal origin in refractory non-septic shock. *Ann. Surg.* 173: 219-224.
80. Tancrede, C. H. and Andreumont, A. O. 1985. Bacterial translocation and gram-negative bacteremia in patients with hematological malignancies. *J. Infect. Dis.* 152: 99-103.
81. Tokyay, R., Zeigler, S. T., Loick, H. M., et al. 1992. Mesenteric lymphadenectomy prevents postburn systemic spread of translocated bacteria. *Arch. Surg.* 127: 384-388.

82. Toussaint Raven, E. 1973. Determination of weight-bearing by the bovine foot. *Neth. J. Vet. Sci.* 5: 99-103.
83. Vermunt, J. J. 1994. Predisposing causes of laminitis. *Proceedings of the 8th International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit* 236-258.
84. Vermunt, J. J. and Leach, D. H. 1992. A scanning electron microscopic study of the vascular system of the bovine hind limb claw. *New Zealand Vet J.* 40: 146-154.
85. Vermunt, J. J. and Smart, M. E. 1994. The impact of lameness management programme. *Proceedings of the 8th International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit* 275-298.
86. Ward, W. R. 1994. The measurement of behaviour of UK dairy cattle by 24-hours observations. *Proceedings of the 8th International Symposium on Disorders of the Ruminant Digit* 303-304.
87. Weaver, A. D. 1985. Lameness in cattle-investigational and diagnostic check lists. *Br. Vet. J.* 141: 27-33.
88. Weaver, A. D., Anderssn, L., Banting, A. D. L., et al. 1981. Review of disorders of the ruminant digit with proposals for anatomical and pathological terminology and recording. *Vet. Rec.* 108: 117-120.
89. Weiss, D. J., Geor, R. J., Johnston, G., and Trent, A. M. 1994. Microvascular thrombosis associated with onset of acute laminitis in ponies. *Am. J. Vet. Res.* 55: 606-612.
90. Whitaker, D. A., Kelly, J. M., and Smith, E. J. 1983. Incidence of lameness in dairy cows. *Vet. Rec.* 113: 60-62.
91. 北徹. 1994. 動脈硬化の分子医学. 羊土社, 東京
92. 遠藤重厚, 稲田捷也. 1995. エンドトキシンと病態. へるす出版, 東京
93. 津田恒之, 柴田章夫. 1987. 新 乳牛の科学. 農産漁村文化協会, 東京
94. 農林水産省統計情報部. 1977-1994. 畜産統計 - 家畜飼養の概況 -.

95. 幡谷正明. 1985. 牛の蹄病について. 家畜診療 268, 269: 3-13, 5-14.
96. 平内邦夫, 黒沢重人, 草刈直吉, 宮沢敏夫, 岩田一孝, 飯田八洲司. 1975. 天塩町における蹄病の発生状況と臨床所見について. 家畜診療 149: 29-33.
97. 吉村一克, 望月英隆, 玉熊正悦. 1995. Bacterial translocationの概念と研究の歴史. 集中治療 7: 557-565





# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM, Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black
1	2	3	4	5	6	7	8	9
10	11	12	13	14	15	16	17	18
19	20	21	22	23	24	25	26	27

# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM, Kodak

A	1	2	3	4	5	6	M	8	9	10	11	12	13	14	15	B	17	18	19
20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39