



飼育下の若齢アジアゾウにおける骨代謝評価法とゾウ血管内皮ヘルペスウイルス血症の簡易診断法の開発

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2021-06-10 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 竹鼻, 一也 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24729/00017405

大阪府立大学博士（獣医学）学位論文

飼育下の若齢アジアゾウにおける骨代謝評価法と
ゾウ血管内皮ヘルペスウイルス血症の簡易診断法の開発

竹鼻 一也

2021年

目次

略語一覧	3
緒言	5
第1章. アジアゾウにおける血中骨代謝マーカーを用いた骨代謝の評価	10
第1節:年齢別の血中骨代謝マーカー値	12
1. 材料と方法	12
2. 結果	14
3. 考察	15
4. 小括	19
5. 図表	20
第2節:アガロースゲル電気泳動法を用いた血中骨型 ALP 活性の測定	23
1. 材料と方法	24
2. 結果	26
3. 考察	27
4. 小括	29
5. 図表	30
第2章. 人工哺育仔アジアゾウの血中骨代謝マーカー値の推移	35
1. 材料と方法	36
2. 結果	39
3. 考察	40
4. 小括	44
5. 図表	46
第3章. LAMP 法による血中ゾウ血管内皮ヘルペスウイルス EEHV の診断と モニタリング	53

1. 材料と方法	54
2. 結果	58
3. 考察	59
4. 小括	62
5. 図表	63
総合考察	68
総括	71
謝辞	73
参考文献	74

略語一覧

Aem	人工ゾウミルク
AGE	アガロースゲル電気泳動法
ALP	アルカリホスファターゼ
ALP2	肝臓型 ALP アイソエンザイム
ALP3	骨型 ALP アイソエンザイム
ALT	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AST	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
A/G	アルブミン：グロブリン比
BAP	骨型アルカリホスファターゼ
BUN	血中尿素窒素
BW	体重
B/T index	血清 BAP 活性値 / 血清 TRAP5b 活性値 ×10
Ca	カルシウム
CBC	全血球計算
CTX	I 型コラーゲン架橋-C-テロペプチド
EEHV	ゾウ血管内皮ヘルペスウイルス
EEHV1A	ゾウ血管内皮ヘルペスウイルス 1A 型
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法
FPT	受動免疫不全
GGT	ガンマグルタミントランスフェラーゼ
Glu	グルコース
iP	無機リン
LoA	一致限界
NTX	I 型コラーゲン架橋-N-テロペプチド
OC	オステオカルシン
PCV	血球容積率
PICP	I 型プロコラーゲン-C-ペプチド
PINP	I 型プロコラーゲン-N-ペプチド
RBC	赤血球
Rgm	ヤギ生乳
RIA	放射免疫測定法
t-ALP	総アルカリホスファターゼ
t-Cho	総コレステロール
TP	総タンパク
TRAP5b	酒石酸耐性酸ホスファターゼ 5b

WBC	白血球
WGLP	小麦胚芽レクチンを用いた分光光度法
WH	体高
γ -Glb	ガンマグロブリン
ICTP	I型コラーゲン-C-テロペプチド

緒言

アジアゾウ (*Elephas maximus*) はゾウ科に属する最大級の陸棲哺乳類であり、東南アジアに生息する。また、アジアゾウは、その生息地によりインドゾウ、セイロンゾウおよびスマトラゾウの3つの亜種に分類される。野生の生息頭数は2013年の調査で35,000~45,000頭と推測され、年々減少傾向にある。日本には野生のアジアゾウは生息していないが、1888年に恩賜上野動物園で2頭のアジアゾウ飼育が始まって以降、これまでに200頭以上が国内の動物園で飼育されてきた。2020年現在、北海道から沖縄まで全国33カ所の動物園に合計83頭のアジアゾウが飼育されている。

アジアゾウは東南アジア諸国ではゾウ使い (Mahout) と呼ばれる人々により古くから家畜として林業や観光業に利用されてきた[77]。そのため、アジアゾウの獣医学には、少なくとも4,000年以上の歴史があり、伝統医学、東洋医学、西洋医学など複数の医学知識を活用した健康管理や診断治療が行われてきた[38]。巨大なゾウは攻撃的な動きをせずとも、その一挙一動は常に人間を命の危険に晒す可能性があるため、獣医師および飼育管理者はゾウの動作・行動を制御するための特別な知識や技術が必要とされる。ゾウ使いにより管理されるアジアゾウは良くトレーニングされており、身体検査、採血、削蹄などの日常的な診療を行うことは可能である。しかし、ゾウ使いが在籍していない動物園やサファリパークでは、アジアゾウの動作・行動を制御する術が乏しく、日常診療の難易度が各段に上がってしまう。ゾウ使いが在籍しない日本の多くの動物園では、飼育管理者の事故を未然に防ぐため、人間と動物が同一空間を共有せずに間接的に世話をを行う、いわゆる「間接飼育」が採用されてきた[42, 81, 85]。そのため、日常診療が必要な場面でも、ゾウの動作・行動の制御が難しいために診察ができず、結果として、アジアゾウに関する獣医学的知見の蓄積も

ままならなかった。しかし、近年、ゾウに対するトレーニング理論が導入され、ゾウ使いのような伝統的な知識や技術を持たない飼育担当者でも、ゾウを指示通りに操ることが可能になってきた。日本でも、このトレーニング理論の普及により、柵越しの耳介からの採血や前肢の処置といった簡単な診察行為を実施可能な動物園が増加し、獣医師が積極的にアジアゾウの健康管理に取り組める環境が整いつつある。したがって、我が国におけるゾウの獣医療は未だ発展途上ではあるが、疾病の診断や治療に関する研究は牛、馬、犬、猫など他種動物に関する獣医学的知見を取り入れながら進みつつある[3, 46, 105]。

アジアゾウの飼育下における成育成績は、世界的に見ても、良いものとは言えない。北米および欧州の飼育下ゾウに関する調査では、繁殖ゾウの5歳までの死亡率は、それぞれ39.6% (61/154) および41.5% (81/195) であった[57, 88]。その主な死亡原因は出産時の事故であり、母ゾウの育児拒否による攻撃が大半を占めていた。母ゾウの育児拒否は仔ゾウの成育を妨げる主要な原因であり[72]、育児放棄によって人工哺育された仔ゾウは、栄養失調や代謝性骨疾患による成長不良に陥り、将来、死亡の転帰を辿るとされる。その他にも、飼育管理の失宜による栄養性代謝性疾患、飼育施設の不備や同居ゾウに起因する事故など、仔ゾウの順調な成育を妨げる要因が報告されている[59, 72]。さらに、近年、世界各国において、ゾウ血管内皮ヘルペスウイルス(*Elephant endotheliotropic herpes virus; EEHV*)に関連する出血病による若齢アジアゾウの死亡例が多数報告されている。2017年の北米での調査では、1980年以降に北米で出生したアジアゾウの死亡例のうち、EEHVが原因のものが53%を占めていた[34]。ヨーロッパでの調査では、1995年以降にヨーロッパで出生したアジアゾウの死亡例のうち60%が、EEHVが原因で死亡したと報告されている[34]。

日本国内では、これまでに200頭以上が国内の動物園で飼育され、現在も合

計83頭のアジアゾウが飼育されている。しかし、日本での飼育下繁殖はこれまでわずか13例で、現在まで順調に成育しているのはわずか8例である。国内繁殖個体13頭のうち5頭はすでに死亡しているが、そのうち4頭は人工哺育個体である。死亡個体5頭のうち3頭は代謝性骨疾患が疑われ死亡しており、残り2頭はEEHVが原因による死亡と診断されている。したがって、日本国内におけるアジアゾウの飼育個体数の維持ならびに繁殖個体の成育向上のためには、若齢個体の代謝性骨疾患やEEHV関連疾患を早期に診断するための技術の開発が急務である。

アジアゾウの血液から簡便に骨状態を評価できる指標として、骨代謝マーカーの測定が注目されている。Aryaら[2]は、飼育下雌アジアゾウ24頭における血中の骨型アルカリホスファターゼ（BAP）およびオステオカルシン（OC）値は年齢と負の相関関係を有することを明らかにした。Kilgallonら[47]は、飼育下アジアゾウ12頭の血中BAP、OCおよびI型コラーゲン-C-テロペプチド

（ICTP）値は年齢と負の相関を示すが、互いに正の相関を有することを報告した。さらに、彼らは23歳の雌アジアゾウ4頭から7日間隔で計4回の採血を行い、血中BAP、OCおよびICTP値に変動が少ないことを示した。Van Sonsbeekら[111]は、血中のBAPおよびI型コラーゲン架橋-N-テロペプチド（NTX）値を用いた骨代謝評価に関する検討を行っている。このように、飼育下アジアゾウにおける骨代謝マーカーに関する研究では、血中の骨形成マーカーとしてBAPを採用したものが多く[2, 47, 111]。血中のBAPは骨芽細胞の数や分化状態を反映する指標となるため、人や動物の骨代謝評価に広く利用されている[27, 54, 118]。アジアゾウにおける骨吸収マーカーとして骨コラーゲン分解産物であるICTPやNTxが採用されてきたが、研究者により選択されるマーカーが異なっており、現時点で推奨されるものは定まっていないように見える。医学および獣

医学の両分野では、破骨細胞数の指標となる骨吸収マーカーとして酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b (TRAP5b) が知られている[28, 58, 117]が、アジアゾウを対象に測定した報告は見当たらない。したがって、本学位論文では、飼育下アジアゾウの血中BAPとTRAP5bを測定することで骨芽細胞と破骨細胞の数や分化状態を指標とした骨代謝評価を試みるとともに、哺乳期あるいは成長期の仔アジアゾウにおける骨代謝の経時的変化や飼育管理による影響について検討を行った。

EEHVはアジアゾウおよびアフリカゾウ (*Lodonxa Africana*) を自然宿主とし生涯に渡って潜伏感染するが、突発的に回帰感染を起こし、高ウイルス血症になると致死的な出血病 (EEHV-HD) を発症する[34, 56]。10歳以下の仔ゾウでは、発症から半日で死に至ることも報告されている[108]。EEHVに対する治療に関する報告は多いが[34, 56]、救命率は極めて低く、未だに確立された治療法があるとは言い難い。しかし、発症初期に積極治療を行った症例では総じて生存率は高く、EEHV血症の早期発見が最も有効な対応策である[34, 56, 100]。

EEHV血症の診断法としてPCR法が確立されている[24, 53, 83]が、疑わしい症例がある場合には、高価な検査機器と実験室レベルの操作環境を有する大学や検査センターなどへ検体を送付し、数日間、検査結果を待つ必要がある。しかし、EEHV血症への早期対応を行うためには、迅速かつ簡易的で、動物園のような臨床現場でも実施可能な診断法の開発が望まれる。

本学位論文では、我が国における飼育下アジアゾウの個体数の維持ならびに繁殖個体の成育向上に貢献することを最終目標として、若齢アジアゾウの健全な成育を妨げている要因である骨代謝障害ならびにEEHV血症の早期診断を可能にする血中骨代謝マーカー測定法と血中EEHV検出法の確立を行った。第1章では、血中骨代謝マーカーの骨代謝評価のための指標となる基準値を把握する

ために飼育下アジアゾウ群の血中TRAP5bおよびBAP活性値を測定し、年齢や性別との関係についての検討を行った。また、医学領域で広く普及しているアガロースゲル電気泳動（AGE）法を用いてアジアゾウの血中骨型アルカリホスファターゼ活性値の測定を行い、この測定法がアジアゾウでも応用可能であることを検証した。第2章では、飼育下の仔アジアゾウの健康管理記録ならびに凍結保存血清の骨代謝マーカー値を解析し、突然死した人工哺育個体の骨代謝状態について生存した自然哺育個体との比較を行った。第3章では、EEHV-HDの迅速な生前診断の観点からLoop-mediated isothermal amplification（LAMP）法による血中EEHVの検出法を確立するとともに、若齢アジアゾウ個体群におけるEEHVのモニタリングを行った。

第1章：アジアゾウにおける血中骨代謝マーカーを用いた骨代謝の評価

骨代謝マーカーは、血中や尿中に存在する骨に特異的な酵素やコラーゲン分解産物を指し、骨吸収や骨形成を反映して変動する[10]。医学領域では、骨粗鬆症の診断や骨折リスクの評価などで骨代謝マーカーが利用されている[10, 16, 27]。骨形成マーカーとして、骨芽細胞が産生するプロコラーゲンである I 型プロコラーゲン-C-ペプチド (PICP) や I 型プロコラーゲン-N-ペプチド (PINP)、活性化した骨芽細胞から分泌されるアルカリホスファターゼ (ALP) アイソザイムの 1 つである骨型アルカリホスファターゼ (Bone-specific Alkaline Phosphatase; BAP) [18]、成熟した骨芽細胞から分泌される非コラーゲン性の骨基質タンパクのオステオカルシン (OC) が知られている。骨吸収マーカーとして、多核化した成熟破骨細胞により産生・分泌される酵素である酒石酸耐性酸ホスファターゼ 5b (Tartrate-resistant Acid phosphatase 5b; TRAP5b) [84]、骨基質の9割を占める I 型コラーゲンの分解産物である I 型コラーゲン架橋-N-テロペプチド (NTX)、I 型コラーゲン架橋-C-テロペプチド (CTX) ならびに I 型コラーゲン-C-テロペプチド (ICTP) が知られている [93]。

獣医学領域でも、犬・猫をはじめとした伴侶動物から牛・馬などの産業動物に至るまで、骨代謝マーカーを用いた研究が行われている[1]。基礎研究として測定法の検討、食餌、運動、妊娠、出産あるいは泌乳による影響、日内変動や季節変動、骨成長との関係などが検討されており [15, 30, 41, 97, 117]、臨床研究として骨折治癒、骨粗鬆症ならびに骨腫瘍に関する報告がある [7, 52, 91]。

アジアゾウにおける骨関連疾患として、飼育管理失宜による骨形成異常症、くる病、遺伝的な変形関節症が知られる [17, 19]。特に成長期の仔ゾウでは、

性急な離乳、栄養失調、不適切なサプリメント投与による骨代謝疾患の潜在的リスクが高い[19]。ゾウの骨疾患では症状は主に四肢に現れ、運動不耐、跛行、関節炎、骨折、蹄病によって巨体を支えることができず、起立不能に陥り、最終的に死に至ることが多い。骨疾患の早期発見やリスク評価を目的として、アジアゾウでもX線撮影が行われる[19, 61, 96, 109]が、巨体ゆえに撮影条件の設定が難しく、撮影時の姿勢を保つためのトレーニングも必要である[47, 61, 96]ため、日常的に実施できる飼育施設は限られている。一方、骨代謝マーカーは血液や尿から簡便に骨状態を評価できる指標として、近年、アジアゾウでの測定報告が増えているが[2, 47, 111]、日常診療に利用されるまでには至っていない。採血はアジアゾウの日常診療において実施可能であることから、血中骨代謝マーカーの利用によって骨代謝の評価が可能になれば、骨代謝疾患の早期発見につながることを期待される。本章では、骨代謝評価のための基準を構築する目的で、骨芽細胞ならびに破骨細胞に由来する骨代謝マーカーである血中のBAPならびにTRAP5b活性値を測定した。さらに、BAPの測定法に関する検討も行った。

第1節：年齢別の血中骨代謝マーカー値

医学領域において、血中骨代謝マーカーは患者の骨代謝を評価するための血液生化学検査項目として利用されている。獣医学領域では、イヌ、ウマあるいはウシを対象に、加齢や運動負荷の影響、骨折治癒、骨腫瘍、変形性関節症の軟骨における骨形成と骨吸収の状態を評価するために活用されてきた[1, 22, 37, 99, 117]。アジアゾウに関する報告では、骨代謝マーカーとして骨芽細胞の数や分化状態の指標となるBAPが、骨吸収マーカーとして骨コラーゲン分解産物であるICTPやNTXが測定されてきた[2, 47, 111]。

酒石酸耐性酸ホスファターゼ (TRAP) は、骨、赤血球、血小板、脾臓および前立腺に分布する酵素であり、そのアイソフォーム5b (TRAP5b) は活性化した破骨細胞から分泌されるリソソーム酵素である[18]。血中TRAP5b活性値は破骨細胞数を反映する骨吸収の指標であり、日内変動が少なく、肝および腎疾患や食餌の影響を受けないことから、医学領域では骨粗鬆症、癌の骨転移、多発性骨髄腫、腎性骨疾患、骨パジェット病の診断に利用されている[28]。獣医学領域では、牛、羊、犬において血中TRAP5b活性値に関する報告があり[58, 97, 98, 117]、アジアゾウにおいても利用価値が高い骨代謝マーカーと考えられる。

本節では、飼育下アジアゾウ10頭の血清を用いてBAPおよびTRAP5b活性値を測定し、年齢別および性別との関係を検討した。

1. 材料と方法

1-1 供試動物ならびに血液採材

市原ぞうの国で飼育されている臨床的に健康なアジアゾウ10頭（雄3頭、3カ

月齢～25歳／雌7頭、3歳～39歳)を供試動物とした。成獣ゾウは乾草、市販の飼料、野菜や果物を給餌し、自由飲水で飼育されていた。雄1頭(3ヵ月齢)は、ヤギ生乳(木村ヤギ牧場、大分)と人工エレファントミルク(森乳サンワールド、東京)の混合乳による人工哺乳にて飼育されていた。当園ではアジアゾウの健康管理の一環として定期的に血液検査を実施しており、今回、その余剰サンプルを骨代謝マーカーの測定に供した。なお、採血は耳介静脈より行い、血清は分析まで凍結保存(-20℃)した。

1-2 血清TRAP5b活性値の測定

TRAP5b活性値は蛍光測定法により測定した[58, 117]。本測定法では、反応液(pH 6.6)としてナフトール-ASBI-リン酸(和光純薬、大阪; 0.25 mM)、酢酸ナトリウム(関東化学; 100 mM)、酒石酸ナトリウム(和光純薬; 50 mM)、NP-40(Bio Vision, Lyon, フランス; 2%)、エチレングリコールモノエチルエーテル(和光純薬; 1%)、ヘパリン(和光純薬; 23 U/mL)の混合液を作製し、反応停止液として水酸化ナトリウム(0.1 M)とNP-40(0.05%)の混合液を使用した。血清10 µLと反応液50 µLを37℃・30分間でインキュベート後、反応停止液125 µLを加え、速やかにマルチラベルカウンター(ALVO MX/ Light 1429; PerkinElmer, Norwalk, 米国)により蛍光強度を測定した(励起スペクトル405 nm、蛍光スペクトル535 nm)。検量線には、酸ホスファターゼの段階希釈溶液を使用した。

1-3 血清BAP活性値の測定

BAP活性値は小麦胚芽由来レクチンを用いた分光測光法により測定した[4]。本測定法では、血清30 µLにTriton X-100(富士フィルム和光純薬)30 µLを添加し、37℃、30分間のインキュベートを行い、さらに小麦胚芽由来レクチン(*Triticum vulgare* 由来; Sigma-Aldrich, St Louis, 米国)溶液(5 mg/mL)30 µL

を加え、37℃・30分間のインキュベーションを追加した。氷上で冷却後、2,000×g・10分間の遠心分離を行い、その上清をレクチン処理血清とした。LabAssay ALP kit（富士フィルム和光純薬）を用いて、無処理の血清とレクチン処理血清のALP活性値を測定し、BAP活性値は無処理血清のALP活性値からレクチン処理血清のALP活性値を減じた値として求めた。

1-4 B/T indexの算出

BAP活性値とTRAP5b活性値の比（B/T index）は以下の計算式によって求めた。

$$B/T\ index = serum\ BAP\ activity / serum\ TRAP5b\ activity \times 10$$

1-5 統計処理

血清TRAP5b、BAP活性値およびB/T indexにおける相互の相関ならびに各測定値と年齢との相関は、Spearmanの順位相関係数分析ならびに回帰分析を用いて解析した。若齢ゾウ（15歳以下）と成獣ゾウ（16歳以上）における各測定値の比較にはMann-Whitney U検定を使用した。統計処理には、Prism ver.6 for Windows（GraphPad Software Inc., La Jolla, 米国）ならびにEZR on R commander（<http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmed.html>）を使用し、有意水準を $P<0.05$ とした。

2. 結果

Table 1に10頭のアジアゾウの血清TRAP5bおよびBAP活性値ならびにB/T indexを示した。血清TRAP5b活性値は3ヵ月齢の仔ゾウで4.5 U/Lであり、2歳～39歳のゾウでは0.8～8.9 U/Lの範囲であった。血清BAP活性値は3ヵ月齢の仔ゾウで最も高値（1076.8 U/L）であり、2歳～39歳のゾウでは加齢に伴って低下傾向（551.0～71.7 U/L）を示した。B/T indexは2頭のゾウ（3ヵ月齢および25歳）

で高値（それぞれ24.1と19.2）を示したが、他の8頭のゾウでは6.0－10.8の範囲であった。

Spearmanの順位相関係数分析では、血清TRAP5bおよびBAP活性値は年齢と負の相関関係を有した（それぞれ $\rho = -0.87$ 、 $P = 0.002$ および $\rho = -0.95$ 、 $P < 0.0001$; Figure 1A および 1B)。全供試動物10頭における血清TRAP5b活性値と年齢との近似直線は $y = -0.19x + 7.43$ ($r^2 = 0.74$) であり、3ヵ月齢の仔アジアゾウを除いた9頭における近似直線は $y = -0.23x + 8.65$ ($r^2 = 0.90$) であった (Figure 1A)。全10頭における血清BAP活性値と年齢との近似曲線は $y = -293.4 \times \log(x) + 634.5$ ($r^2 = 0.95$) であり、3ヵ月齢の仔アジアゾウのデータを除く9頭における近似直線は $y = -12.7x + 553.3$ ($r^2 = 0.89$) であった (Figure 1B)。血清TRAP5bとBAP活性値との間に有意な正の相関が認められ ($\rho = 0.86$ 、 $P = 0.003$)、3ヵ月齢の仔アジアゾウのデータを除く9頭における近似直線は $y = 0.017x - 1.04$ ($r^2 = 0.86$) であった (Figure 1C)。B/T indexと年齢との間には有意な相関は見られなかった ($\rho = -0.40$ 、 $P = 0.09$; Figure 1D)。

若齢ゾウと成獣ゾウにおける血中TRAP5bおよびBAP活性値の比較では、若齢ゾウの方が有意に高い値を示した（それぞれ $P = 0.00952$ および $P = 0.00952$; Figure 2)。

3. 考察

本節では、3ヵ月齢～39歳のアジアゾウ10頭を対象に、初めて血清TRAP5b活性値を測定した。今回の血清TRAP5b活性値の範囲は0.8－8.9 U/Lであり、6ヵ月齢－20歳の黒毛和種牛（67頭）における測定結果（0.38－8.81 U/L）[117]と類似していた。血中の骨吸収マーカーは加齢に伴い低下するが[1, 93]、今回のアジアゾウにおいて血清TRAP5b活性値は年齢に対して負の相関関係を有し ($\rho =$

-0.87、 $P < 0.005$)、これはヒトや各種動物における結果と一致していた[28, 98, 117]。また、アジアゾウの年齢別の血中ICTP濃度を測定した研究[47]においても、今回と同等の相関 ($\rho = -0.848$ 、 $P < 0.001$) が認められていた。したがって、アジアゾウでは、加齢に伴い、活性化した破骨細胞数の減少と骨コラーゲン分解の低下によって骨吸収が減退することが推察された。

今回のアジアゾウにおける血清BAP測定値は71.7–1076.8 U/Lの範囲であり、過去の報告[2]の測定値 (40.4–141.4 U/L) に比べ高値を示す傾向があった。この要因として、総ALP活性値の測定法の違いが推察された。日本現行のJSCC標準化対応による総ALP活性値は、海外で一般的に用いられているIFCC標準化対応による総ALP活性値の約3倍の高値で測定されることが報告されている[21]。その他にも、年齢構成が異なっていたこと、本研究で用いた小麦胚芽レクチンを用いた分光測光法では、小麦胚芽レクチンの製品ロットの違いにより、測定値にわずかな影響が出ること[4, 60]などが原因として挙げられる。なお、今回のアジアゾウにおける血清BAP活性値は、過去の報告[2, 47]と同様に、年齢と負の相関関係を有し、これは加齢による骨芽細胞数の減少を反映した所見と考えられた。

アジアゾウにおける血清TRAP5bとBAP活性値との間にも有意な正の相関関係が認められた。ヒトや各種動物においても骨吸収マーカーと骨形成マーカーとの間に同様の相関関係が示されており[1, 93]、これは骨吸収と骨形成が一定のバランスを保ちながら骨代謝回転が営まれることを表す所見である[5]。したがって、各年齢における破骨細胞と骨芽細胞による骨代謝回転は一定のバランスで営まれていたと考えられた。

血中の骨形成マーカーと骨吸収マーカーの測定値の比は、骨代謝異常を検出する上で、単一の骨代謝マーカーによる評価より優れていることの報告がある

[9, 63, 113]。この比は、骨吸収と骨形成のバランスが保持された健常な骨代謝では一定の範囲内の数値（健常範囲）を示すが、骨吸収や骨形成のどちらかが過度に優位な状態では健常範囲から外れる値を示す[9]。本節において、B/T indexはアジアゾウ10頭中8頭（Nos.1-3および5-9）で6.0-10.8の範囲に収まったが、残りの2頭（Nos. 4および10）では2倍以上の高値（19.2および24.1）を示した。今回の供試動物はいずれも临床上は健康であると判断されたものであり、10頭中8頭で示されたB/T indexの範囲が、アジアゾウにおける破骨細胞と骨芽細胞による骨代謝バランスの健常範囲であろうと考えられた。一方、B/T indexが高値であった2頭では、临床上は健康であっても、潜在的に骨芽細胞による骨形成が優位な状態であったと考えられた。このうち1頭（No. 4）は唯一の成獣オス（25歳）の個体であった。ヒトや他種動物において、血中骨代謝マーカー値には雌雄差があり[41, 79]、雄性ホルモンであるアンドロジェンは、破骨細胞形成を抑制することで間接的に骨芽細胞の活性を促進することが知られている[43]。オスのアジアゾウには、性的活動が高まり、アンドロジェン分泌が盛んな時期（Musth；マスト）があり[25]、骨代謝に影響を与えることが推察される。本個体はマスト期終了後に採血を行ったため、その影響が血中骨代謝マーカー値に影響を与えた可能性が考えられた。残り1頭（No.10）は人工哺育下の3ヵ月齢のオスの個体であった。ヒトでは幼少期の積極的な運動は骨形成を促進するとの報告がある[112]。ウシの乳汁（牛乳）に含まれるラクトフェリンは骨芽細胞の活性を刺激し、破骨細胞の分化を抑制することが知られている[62]。この仔ゾウが摂取したヤギ生乳と人工エレファントミルクの混合乳中におけるラクトフェリンの含有量は不明であるが、哺乳期や幼獣期には運動刺激や母乳摂取などの様々な因子が骨代謝に影響を及ぼし、血中骨代謝マーカー値が変動することが予想される。今後、アジアゾウの成獣オスや哺乳期における

破骨細胞と骨芽細胞による骨代謝バランスに影響を与える要因を明らかにするには、調査個体数を増やしデータを蓄積する必要がある。

アジアゾウの性成熟は10–15歳と言われており、その間、野生下では成獣ゾウの世話を受けながら成育する[19, 77]。そのため、本節では、15歳を基準として若齢ゾウ（15歳以下）と成獣ゾウ（16歳以上）を区分し、血中骨代謝マーカーの活性値を比較した。若齢ゾウの血清TRAP5bおよびBAP活性値は成獣ゾウに比べ高く、若齢ほど破骨細胞と骨芽細胞の数が多く骨代謝が活発であることが示された。アジアゾウの体重は出生時の約100kgから15歳時には約3,000kgまで増加するため[72]、その巨体を支えるために骨代謝を活発にして急激な骨成長を支えていると考えられる。

血液検査値の基準範囲とは、一定の条件で選んだ健常動物の個体から測定された検査値（基準値）が正規分布を取る場合、中央95%の区間を指す[65]。基準値は、性差、年齢、肥満度、食餌内容など様々な要因の影響を受けるため、基準範囲は、本来であれば、該当検査値に影響を及ぼす生理的変動や病態変動の要因をもたない十分な個体数の健常動物の基準値により求められるべきである。日本国内にはアジアゾウを飼育管理している施設は限られており、本節で用いた個体数10頭は同一個体群として設定できる国内最大個体数であると考えているが、基準範囲を設定するために十分な個体数とは言い難い。また、国内の飼育施設だけでは雌雄や年齢層の偏りもあり、成獣オス個体や哺乳期ゾウを対象とするデータ蓄積には多くの時間を要する。したがって、将来的には、海外の研究者と協力し、複数の大きな個体群から得られる血中TRAP5bおよびBAP活性値から基準範囲を設定し、臨床応用の可能性を探る研究が必要である。

4. 小括

アジアゾウ10頭の血清を用いて骨吸収マーカーである酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b (TRAP 5b) と骨形成マーカーである骨型アルカリホスファターゼ (BAP) の活性値を測定し、年齢による変動を分析した。両骨代謝マーカーの活性値には年齢と有意な負の相関関係が認められた。15歳以下の若齢ゾウの活性値は成獣ゾウの活性値よりも有意に高く、加齢に伴う破骨細胞数と骨芽細胞活性の低下が示唆された。各個体のTRAP5bおよびBAP活性値の間には有意な正の相関関係が認められた。BAPとTRAP5bの比 (B/T index) を算出したところ、10頭中8頭で6.0–10.8の範囲内に収まり、骨芽細胞と破骨細胞による骨代謝バランスの指標になると考えられた。以上より、アジアゾウにおける血清TRAP5bとBAPは、他の動物種と同様、骨吸収および骨形成を反映する骨代謝マーカーとして有用であると考えられた。

5. 図表

Table 1. 飼育下アジアゾウ10頭の概要と血中骨代謝マーカーの測定結果

No.	年齢	性別	TRAP5b ¹⁾ (U/L)	BAP ²⁾ (U/L)	B/T index ³⁾
1	39	♀	0.8	71.7	9.3
2	30	♀	2.4	160.3	6.7
3	26	♀	1.2	126.3	10.8
4	25	♂	1.8	342.3	19.2
5	25	♀	3.2	243.8	7.6
6	18	♀	3.7	302.0	8.2
7	9	♀	5.9	398.0	6.7
8	3	♀	8.9	551.0	6.2
9	2	♂	8.8	531.0	6.0
10	0.25	♂	4.5	1076.8	24.1

1) TRAP5b : 酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b

2) BAP : 骨型アルカリホスファターゼ

3) B/T index : 血清BAP活性値 / 血清TRAP5b活性値×10

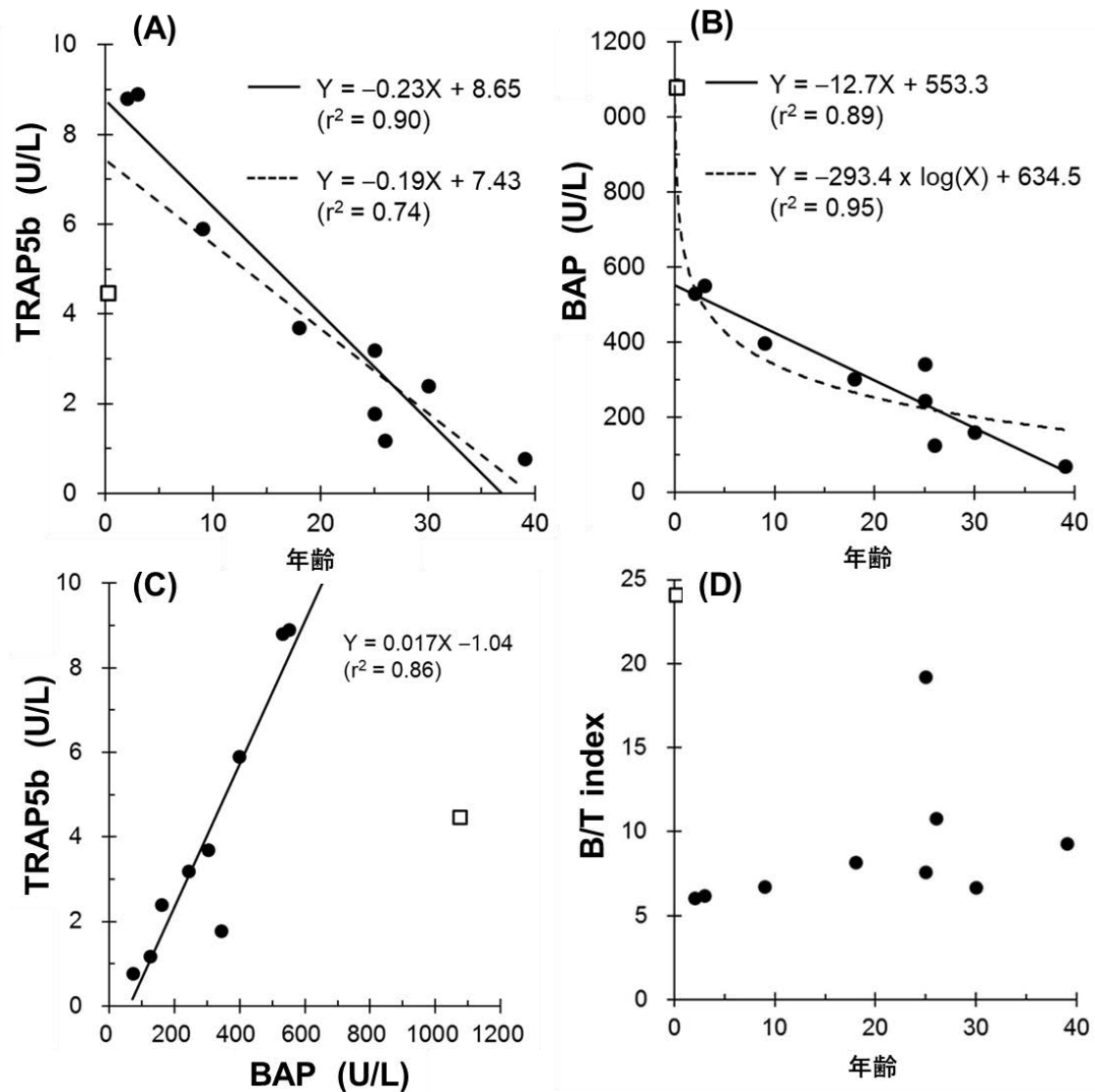


Figure 1. 飼育下アジアゾウ10頭における血中骨代謝マーカー値と年齢との関係

(A) TRAP5b活性値と年齢との相関関係

(B) BAP活性値と年齢との相関関係

(C) TRAP5b活性値とBAP活性値との相関関係

(D) B/T index と年齢との相関関係

□: 3ヵ月齢♂アジアゾウ ●: 9頭のアジアゾウ (2歳以上)

実線: 3ヵ月齢♂アジアゾウ (□)を除くデータにおける近似線

破線: 10頭のデータにおける近似線

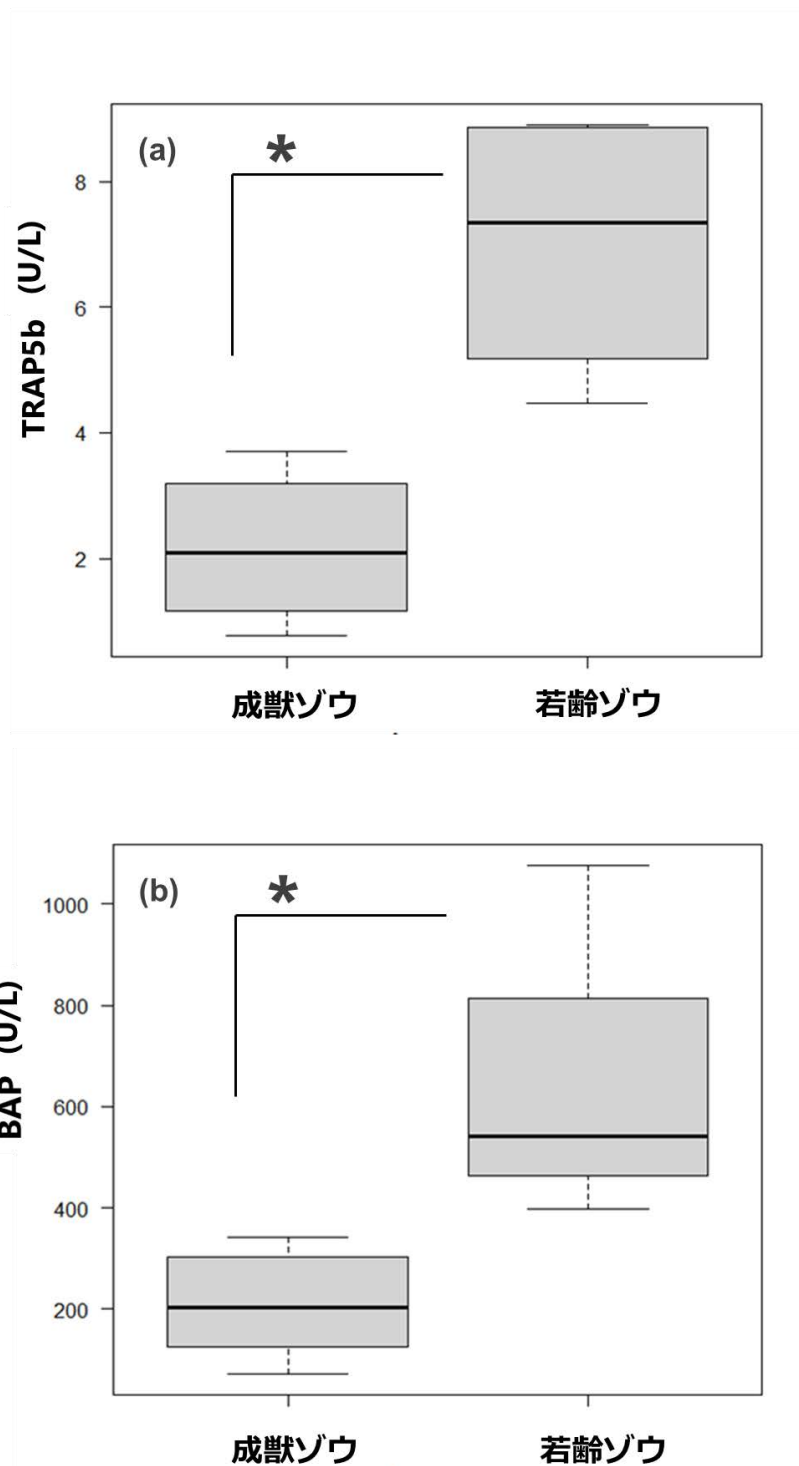


Figure 2. 成獣ゾウ群（16歳以上、6頭）と若齢ゾウ群（15歳以下、4頭）における血中 TRAP5b および BAP 活性値の比較 (* $p < 0.01$)

第2節：アガロースゲル電気泳動法を用いた血中骨型 ALP 活性の測定

骨芽細胞膜上に存在する骨型ALPは、細胞分化の初期に発現する酵素であり、骨のピロリン酸石灰化のインヒビターを分解することで骨形成に関与する[9, 27]。本酵素は循環血中への放出量は骨芽細胞の数や分化状態に比例するため、骨形成を鋭敏に反映する血中の骨代謝マーカーとして活用されている[27, 54]。血中の骨型ALPは電気泳動法、酵素結合免疫吸着法（ELISA）、放射免疫測定法（RIA）などによって測定されるが、測定法には大きな優劣はないとされている[78]。アジアゾウの骨代謝マーカーに関する研究では、骨形成マーカーとしてBAPが採用され、その有用性が示されている[2, 47, 111]。測定法として、小麦胚芽レクチン沈殿法（wheat germ lectin precipitation; WGLP）やヒト用市販キットを用いたELISAが使用されているが、いずれも習熟した実験技術と高価な機器やELISAキットを必要とする[26, 40]。また、WGLP法では小麦胚芽レクチンの製品ロットにより測定値が変動することが報告されている[4, 60]。

ヒトや哺乳動物において、ALPは肝臓、骨、腎臓、腸および胎盤などで産生され[19, 36, 89, 94]、各臓器に特異的な糖鎖付加を受けることで肝型（ALP2）、骨型（ALP3）、胎盤型（ALP4）、腸型（ALP5）のアイソエンザイムとして電気泳動により分離が可能である[36]。このうち、ALP2とALP3は血中に多く存在するアイソエンザイムである[31, 39]。医学領域では、アガロースゲル電気泳動（AGE）による市販のALPアイソエンザイム測定キットがあり、対応装置を用いて全自動での測定が可能である。そのため、測定者による誤差が少なく、全国の臨床検査センターに血液検体を送れば測定結果を得られることから、医学分野では臨床応用が進んでいる。本法では、血中の骨形成マーカーとしてALP3を測定するが、同時に肝機能の指標としてALP2を測定できるという利点もある

[78]。

獣医学領域ではウシやウマ、ネコにおいてAGE法により測定した血中ALP3活性値の報告はあるが[8, 33, 106]、アジアゾウでの測定は行われていないため、本節では飼育下アジアゾウにおける血中ALP3活性値の測定を行った。なお、本節ではWGLP法とAGE法による骨型ALPを区別するために、前者によるものをBAP、後者によるものをALP3と呼称し、血清ALP3活性値がBAP活性値の代替になることを検証した。さらに、AGE法で同時測定されるALP2と肝胆道系由来酵素との相関に関する検討も行った

1. 材料と方法

1-1 供試動物ならびに血液採材

市原ぞうの国で飼育されている臨床的に健康なアジアゾウを供試動物とした。当園では、毎月1回、健康管理の一環として血液検査を行っており、本節では、アジアゾウA（非妊娠雌；n=16、年齢9.5–10.8歳）、B（非妊娠雌；n=14、年齢3.5–4.6歳）、C（雄；n=10、年齢2.7–4.2歳）およびD（非妊娠雌；n=11、年齢31.0–32.3歳）の4頭の冷凍保存（-20℃）血清（計51検体）を用いた。なお、供試ゾウは、乾草、市販の飼料、野菜や果物の給餌と自由飲水により飼育されていた。

1-2 血清BAP活性値の測定

血清BAP活性値の測定は第1章・第1節と同様に、WGLP法で行った[4]。

1-3 血清ALP3およびALP2活性値の測定

血清ALP3およびALP2活性は、QuickGel ALP agarose gel kit（J713; Helena Laboratories、埼玉）、QuickGel ALP (bone type) reagent（J871; Helena Laboratories）および自動電気泳動アナライザー（Epalyzer-2; Helena

Laboratories) を用いてAGE法により解説書に従って測定した。また、ALP分画の参照のためにヒトコントロール血清 (Lot. 118J-5104; Helena Laboratories) を使用した。血清30 μ Lにプロテアーゼ溶液 (1.5 U/ml) 4 μ Lとノイラミニダーゼ含有溶液2 μ Lを添加したものを電気泳動用サンプルとし、室温で30分間インキュベートした。プロテアーゼの添加はALP3の分画に重複する高分子腸由来ALPをALP5に変換してALP3から分離するため[73]、ノイラミニダーゼの添加はALP2とALP3を分離するため[92]に必要な操作である。電気泳動は230V・23°C・15分間の条件で実施し、アガロース膜をニトロブルーテトラゾリウムで染色した。Edbank III software (Helena Laboratories) を用いてアガロース膜上の電気泳動像からデンストグラムを作成し、ALP2およびALP3の割合を算出した。各アイソエンザイムの活性値は、総ALP活性値に各割合を乗じて算出した。

1-4 血清TRAP5b活性値の測定

血清TRAP5b活性値の測定は第1章・第1節と同様の方法で行った。

1-5 血中肝胆道系由来酵素活性値の測定

血液化学アナライザー (DRI-CHEM 4000sV ; 富士フィルムメディカル、東京) を用いて、血中アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) およびガンマグルタミルトランスペプチダーゼ (GGT) 活性値を測定した。

1-6 統計処理

血清ALP3およびBAP活性値の相関と一致度について、Deming回帰分析とBland-Altman解析を用いて解析した。今回、各個体において時期を変えて繰り返し採取した (10–16回) 血清の測定結果を使用したため、一致限界 (LoA) の調整[6]を行った。また、Critchleyら[12]の方法に準じて各測定値の差

(difference) を算出し、その差が±20%未満である頻度が75%以上の場合に2つの測定値が一致すると判定した。各アジアゾウの血清ALP3およびALP2活性値はKruskal-Wallis検定およびSteel-Dwass法を用いて比較した。血清ALP3活性値と血清TRAP5b活性値あるいは血清ALP2活性値と各肝胆道系由来酵素活性値との相関関係は、Pearson相関係数分析および単回帰分析を用いて解析した。統計処理には、前節と同様、Prism ver.6 for WindowsならびにEZR on R commanderを使用し、有意水準を $P<0.05$ とした。

2. 結果

Figure 3はプロテアーゼ溶液のみを添加した血清とプロテアーゼ溶液とノイラミニダーゼ含有溶液の両方を添加した血清のAGE画像である。プロテアーゼ溶液とノイラミニダーゼ含有溶液の両方を添加した血清において、ALP2とALP3の分離が確認された。Figure 4は、ヒトコントロール血清とゾウ血清のAGE画像とデンシトグラムである。このデンシトグラムにおいて、アジアゾウA~Dの各血清中のALP2の割合はそれぞれ 24.8 ± 4.1 、 18.4 ± 5.8 、 17.0 ± 2.0 および 46.6 ± 3.5 %、ALP3の割合はそれぞれ 75.2 ± 4.1 、 81.6 ± 5.8 、 82.9 ± 2.0 および 53.4 ± 3.5 %と判定された。

Figure 5はアジアゾウ4頭における血清ALP3およびBAP活性値のDeming回帰分析およびBland-Altman解析の結果である。Deming回帰分析では、回帰直線の傾きは1.0、切片は5.3であり、有意な正の相関 ($r=0.98$ 、 $P<0.0001$) が示された。Bland-Altman解析におけるmean biasは-9.3で、全プロットが95 %LoAの範囲内に存在した。また、各測定値の差が±20%未満である頻度は98 % (50 / 51) であり、両測定値は一致基準を満たすと判定された。

Figure 6 は各個体における血清ALP3およびALP2活性値である。アジアゾウD

の血清ALP3活性値 (147.5 ± 25.5 U/L, $n=11$) は、アジアゾウA (329.9 ± 71.4 U/L, $n=16$)、B (475.0 ± 120.6 U/L, $n=14$) およびC (450.7 ± 76.6 U/L, $n=10$) に比較して低く ($P < 0.001$)、アジアゾウAはBおよびCに比べ低値を示した ($P < 0.01$, Figure 6a)。アジアゾウDの血清ALP2活性値 (128.5 ± 23.2 U/L, $n=11$) は、A (107.7 ± 25.1 U/L, $n=16$) およびC (91.9 ± 13.7 U/L, $n=10$) に比べ高値を呈した ($P < 0.05$)。

Figure 7は、血清ALP3活性値とTRAP5b活性値あるいは血清ALP2と肝胆道系由来酵素活性値との関係を示した散布図である。血清ALP3とTRAP5b活性値には有意な正の相関関係がみられた (相関係数 0.81、 $P < 0.001$)。一方、血清ALP2と肝胆道系由来酵素活性値との間に相関関係は見られなかった。

3. 考察

ヒト血清を用いたALPのAGEでは、ノイラミニダーゼ処理によりALP3の易動度を変化させ、ALP2から分離する[49, 92]。高分子小腸型ALP (HIAP) の易動度はALP3と同程度であることから、プロテアーゼによりHIAPを低分子サイズのALP5に分解することで、ALP3を単独で分離する[73]。今回、ヒト血清と同様にプロテアーゼおよびノイラミニダーゼ処理を行うことで、アジアゾウ血清においてもALP2とALP3を分離が可能であった。

AGE法は血中ALP3活性値を直接定量するものではなく、総ALP活性値に占めるデンストグラム上の割合から算出するため、分光光度法により直接定量するWGLP法の活性値と差異が生じる可能性がある。そのため、本節では、異なる方法によって測定した測定値の一致度の評価する手法として、Bland-Altman解析[6]を行った。Critchelyら[12]は異なる測定法による測定結果が臨床上の解釈において問題を生じない程度であれば、互換が可能であるとしている。今回、

Bland-Altman解析では全プロットが95 %LoAの範囲内に存在し、AGE法とWGLP法の測定値の差が±20%未満である頻度は98 %であったことから、測定値の一致基準を満たし、互換性があることが示された。また、Deming回帰分析においても血清ALP3活性値はBAPと強い相関 ($y=1.0x+5.3$ 、 $P<0.0001$) を有したことから、血清ALP3活性値はBAP活性値に代わる指標として利用可能と考えられた。

供試個体4頭の血清ALP3活性値を比較すると、アジアゾウD (31.0–32.3 歳) の活性値が最も低く、次いで、A (A; 9.5–10.8 歳) が他の2頭 (B; 3.5–4.6 歳、C; 2.7–4.2 歳) と比べ低値であった。これは前節の血清BAP活性値と同様の所見であり、加齢に伴う骨形成の低下を示唆するものと言える。また、血清ALP3とTRAP5b活性値との間に正の相関関係があったことから、これも前節と同様、各個体の良好な骨代謝回転を反映した所見と考えられた。

AGE法によって同時に測定できる血清ALP2活性値は最高齢の個体 (アジアゾウD) で最も高く、ヒトの所見[35, 95, 110]と同様であった。また、ヒトでは、血清ALP2活性値は胆石症、脂肪肝、肝硬変、悪性肝腫瘍などで上昇するため[104]、アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) やアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、ガンマグルタミントランスフェラーゼ (GGT) などとともに肝胆道系疾患の診断指標とされている。アジアゾウでもALT、ASTおよびGGTは肝胆道系疾患の診断に用いられている[19]。本節の供試動物はすべて临床上健康な個体であり、血清ALP2活性値と肝胆道系由来酵素活性値の間に相関は見られなかった。今後、肝疾患の個体を対象に血清ALP2活性値の診断指標としての価値を検討する必要がある。

以上より、アジアゾウの血清においてALP3活性値はBAP活性値との互換性が高く、骨芽細胞による骨形成の指標になると考えられた。また、市販AGEキッ

トによる血清ALP3測定は、国内の各臨床検査センターで実施可能であることから、検査の依頼体制が整えば、動物園などの臨床現場でも普及することが期待される。

4. 小括

従来法（小麦胚芽レクチン沈殿法）ならびにアガロースゲル電気泳動法（AGE）による骨型ALP活性値（本節ではそれぞれBAPおよびALP3と呼称する）の比較を行った。AGE法にはヒトの医療分野で使用されている市販キットを用いた。4頭のアジアゾウから得られた血清51検体のBAPとALP3の活性値は近似し、有意な正の相関関係が認められた。Bland-Altman分析において、両活性値は測定法の一致基準を満たし、アジアゾウにおいて血清ALP3活性値はBAP活性値に代替可能と考えられた。AGE法は全自動装置で測定が可能のため測定者による誤差が少なく、血清中のALP2（肝型分画）とALP3活性値を同時に測定できる利点もある。

5. 図表

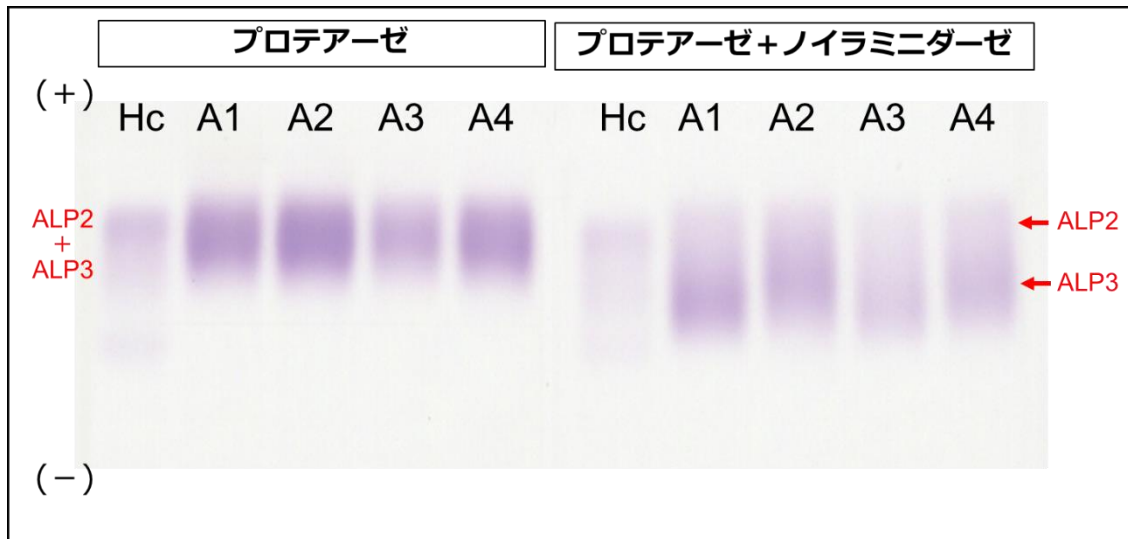


Figure 3. アジアゾウAにおける血清ALPアイソエンザイムのアガロースゲル電気泳動像

Hc: ヒトコントロール血清 (Helena, lot. 118J-5104)

A1: アジアゾウ血清 (9.5歳時)

A2: アジアゾウ血清 (9.6 歳時)

A3: アジアゾウ血清 (9.7 歳時)

A4: アジアゾウ血清 (9.8 歳時)

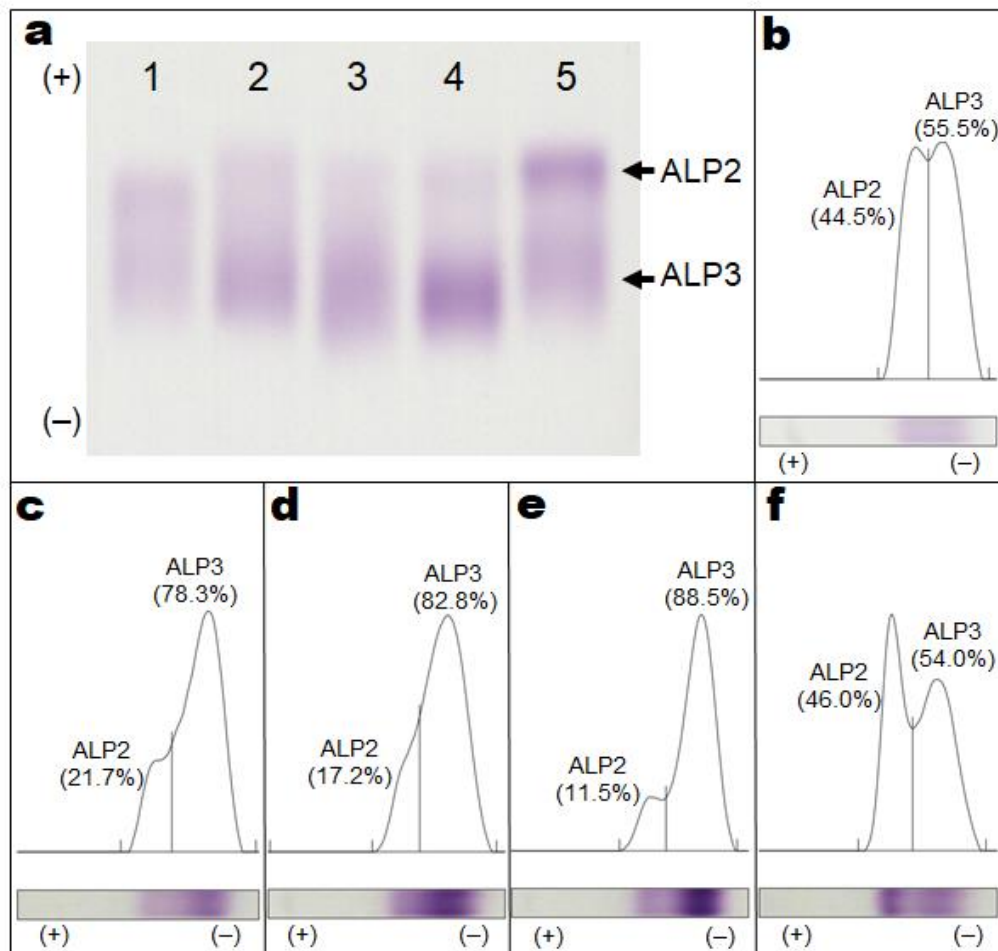


Figure 4. アジアゾウにおける血清ALPアイソエンザイムのアガロースゲル電気泳動像 (a) とデンストグラム (b~f)

Lane 1 : ヒトコントロール血清 (Helena, Lot. 118J-5104)

Lane 2 : アジアゾウAの血清 (10.8歳時)

Lane 3 : アジアゾウBの血清 (4.6歳時)

Lane 4 : アジアゾウCの血清 (3.8 歳時)

Lane 5 : アジアゾウDの血清 (32.2 歳時)

(b) : Lane 1のデンストグラム、(c) : Lane 2のデンストグラム、(d) : Lane 3のデンストグラム、(e) : Lane 4のデンストグラム、(f) : Lane 5のデンストグラム

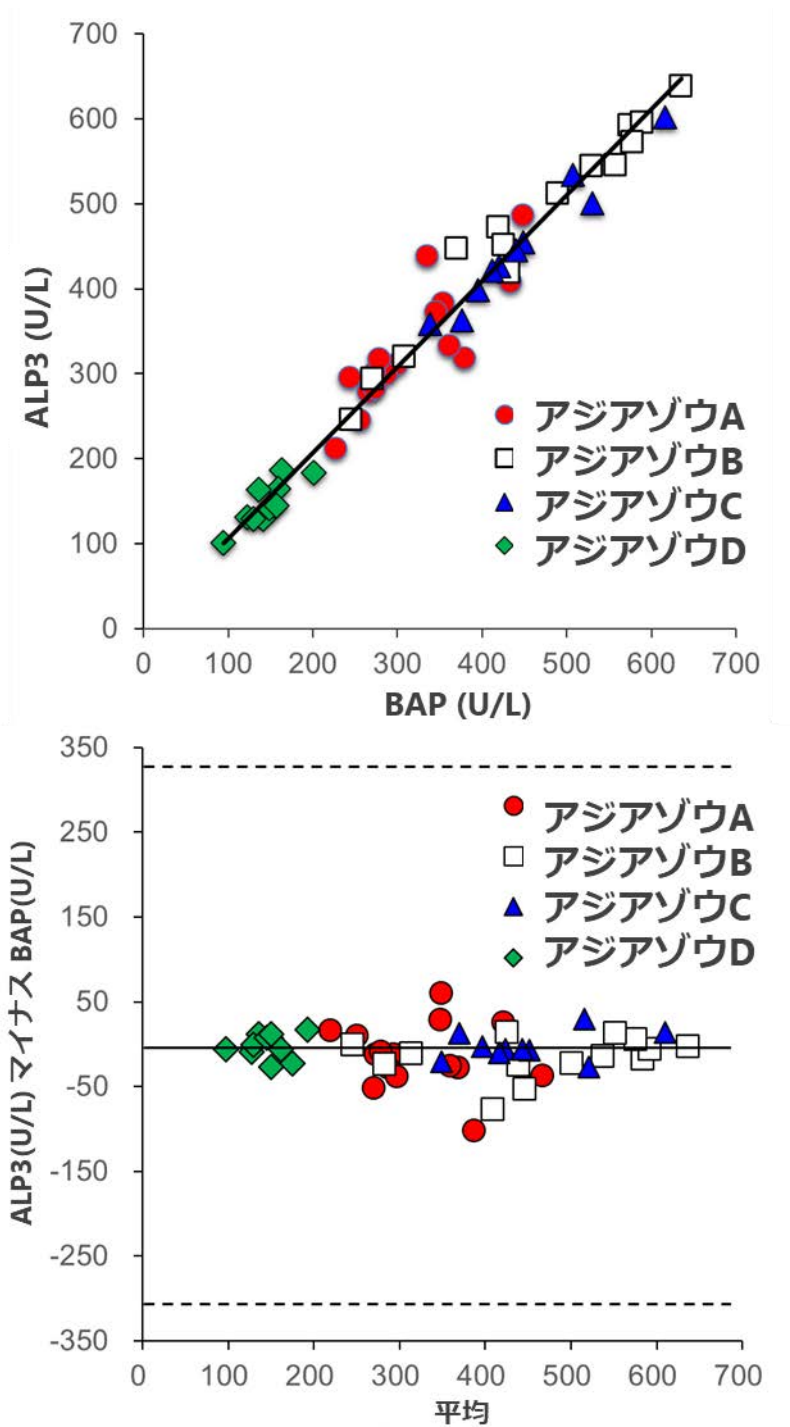


Figure 5. アジアゾウ4頭における血清ALP3およびBAP活性値の関係 (n=51)

上段：デミング回帰： $y=1.0x + 5.3$ ($r=0.98, P<0.0001$).

下段：平均バイアス (実線)：-9.3、95% 一致限界 (破線)：-330.9 ~ 312.2

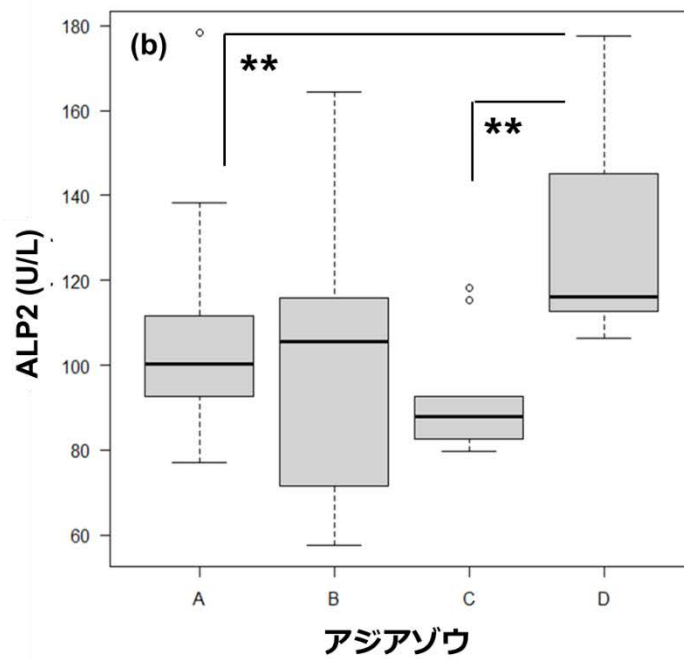
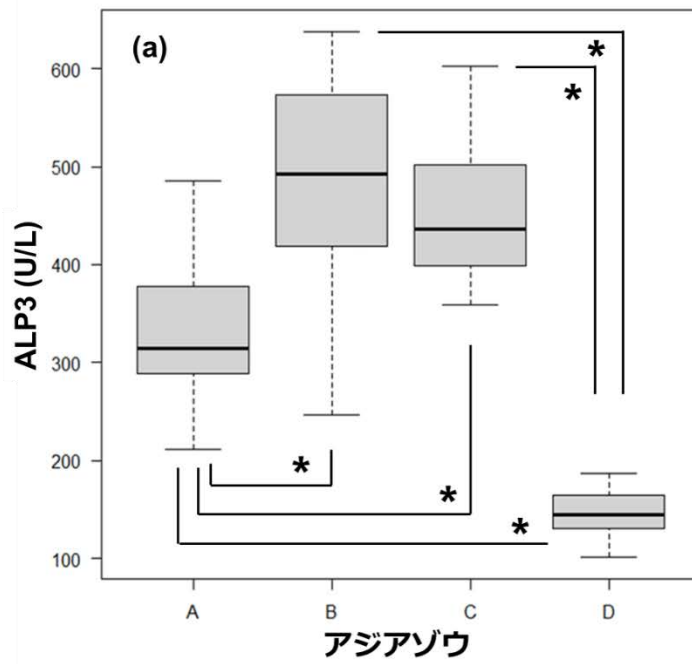


Figure 6. アジアゾウ4頭における血清ALP3 (a) およびALP2活性値 (b) (* $P < 0.001$, ** $P < 0.005$).

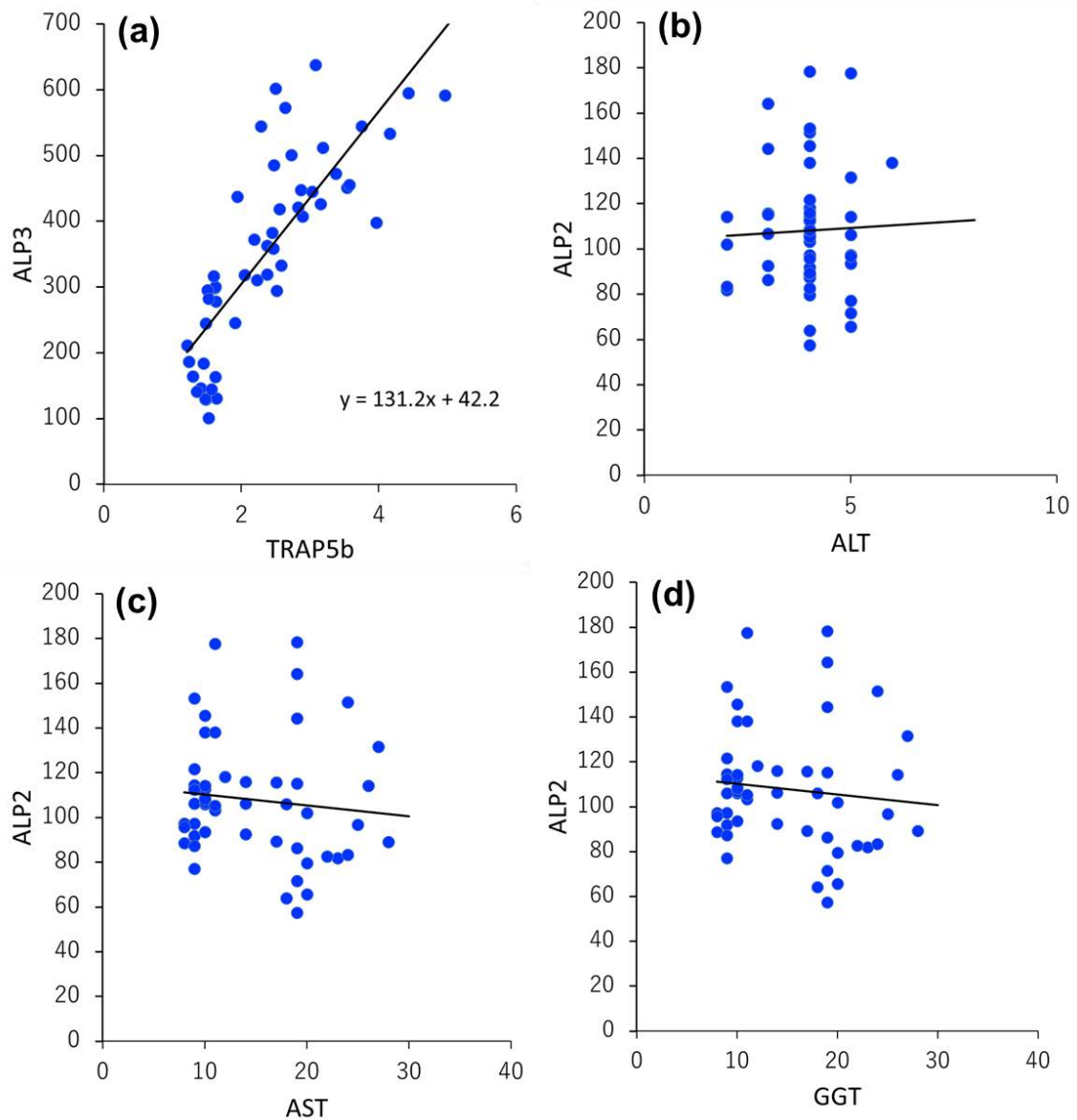


Figure 7. アジアゾウ 4 頭における血清 ALP アイソエンザイム活性値と各種検査項目との関係

- (a) 血清ALP3およびTRAP5b活性値（相関係数0.81、 $P < 0.001$ ）
- (b) 血清ALP2およびALT活性値（相関係数0.04、有意な相関なし）
- (c) 血清ALP2およびAST活性値（相関係数0.11、有意な相関なし）
- (d) 血清ALP2およびGGT活性値（相関係数0.003、有意な相関なし）

第2章：人工哺育仔アジアゾウの血中骨代謝マーカー値の推移

飼育下では母ゾウの育児放棄により仔ゾウの成育の妨げられることが多い[23]。ゾウは群れの中で近親ゾウの出産や子育てを見てその様子を記憶・学習するが、雌の若齢個体が他の飼育施設へ輸送されて単独あるいは数頭の管理下で成長すると、子育ての学習機会を逸する。そのような雌ゾウが妊娠・出産を迎えた場合に育児放棄が発生すると考えられている[11, 23]。アジアゾウの人工哺育成功例は世界的にも極めて稀で、日本国内での成功例はない。ヨーロッパの調査では、母ゾウの22%が育児放棄し、その出生個体の人工哺育による育成成功例はなかった[29]。育児放棄された個体の育成には人工哺育手法の改善が必要と考えられるが、アジアゾウの哺乳期や人工哺育に関する科学的知見は限られている[48, 66, 114]。人工哺育の仔ゾウでは、飼料中のカルシウム (Ca) – リン (P) 比率の偏りにより代謝性骨疾患が発症することがある[19]。哺乳期は乳汁が主なミネラル供給原であるが、正常な母ゾウの乳中ミネラル含有量に関する情報は少なく、人工哺育における代用乳中のCaとPの推奨含有量は確立されていない[19]。また、舎飼いの日光浴不足に起因するビタミンD欠乏や人工乳の給餌による慢性消化不良とミネラル吸収不全なども、人工哺育個体に代謝性骨疾患をもたらす原因と考えられている[72]。その他、人工哺育個体では、初乳による受動免疫や骨格の成長にも支障が生じやすいと考えられるが、体格測定や血液検査の結果に関する報告は見当たらない。

市原ぞうの国では、最近、育児放棄された仔アジアゾウの人工哺育を1例経験した。本例は、外見上、健康に成育していると考えられていたが、1歳2ヵ月齢で急死し、後日、組織からEEHVが検出された個体である。本章では、この人工哺育個体の健康管理記録簿に記載があった体格測定および血液検査の記録

ならびに凍結保存されていた血清を用いて、この個体が転帰不良の経過を辿った要因を明らかにするための回顧的研究を行った。なお、本章では、自然哺育個体における健康管理記録簿上の各種データと凍結保存血清、さらに人工哺育ならびに自然哺育における凍結保存乳汁についても解析を行った。

1. 材料と方法

1-1 供試動物の概要

人工哺育個体（仔ゾウA）：本個体は 2016年10月に市原ぞうの国で生まれた。母ゾウは2産目であったが、他園で経験した1産目では仔ゾウの育児を拒否していた。母ゾウは仔ゾウAに対しても育児を拒否して哺乳を許さず、仔ゾウAに対して攻撃的な態度を示した。当時、同園には仔ゾウAを育てるために適した代理母がおらず、人工哺育以外の選択肢はなかった。そのため、出生当日から、ゾウ使いが母ゾウから搾乳したわずかな量（約12.5mL）の初乳を哺乳瓶で与え、その後、ヤギ生乳（木村ヤギ牧場、大分）を約1時間毎に与えた。仔ゾウに対するミルクの哺乳量と内容はTable 2に記載の通りである。1ヵ月齢以降は、Elephant care manual for mahouts and camp managers [77] に準じ、栄養補給の目的で重湯と煮バナナの混合飼料を総ミルク量の20%分として追加した。3ヵ月齢以降はヤギ生乳75%と人工ゾウミルク（森乳サンワールド、東京）25%からなる混合乳をミルクとして与え、その後もミルクの量を増量していった [72, 77]。1歳齢時点では、仔ゾウは1日約58Lのミルクを飲んでいて、また、仔ゾウは成長に伴い、市販の乾草、青草、野菜、果物を少量ずつ自由採食するようになった。仔ゾウは、ゾウ使いの世話のもと夜間は屋内放飼場で過ごし、日中は運動と紫外線吸収のために屋外放飼場で過ごし、同園で飼育する他の11頭のアジアゾウとは良好な関係であった。仔ゾウAの健康状態は、外見上良好であっ

たが、14ヵ月齢で急死した。後日、死亡後に採取した鼻部筋組織を用いてPCR検査を行なったところ、EEHV1A型の遺伝子が検出された（第3章）。

自然哺育個体：2013–2019年に当園で出生した仔ゾウ4頭（仔ゾウ1–4）であり、仔ゾウ1（雄）は代理母ゾウによる子育てによって成長し、仔ゾウ2–4（雌）はそれぞれの母ゾウによって育てられた。全ての仔ゾウは、現在まで順調に成育してしている。

1-2 体格測定結果の記録

健康管理記録簿に記載があった人工哺育個体（仔ゾウA）ならびに自然哺育個体3頭（仔ゾウ1–3）における1歳齢時点までの毎月の体重（BW）ならびに出生時および1歳齢時の体高（WH）のデータを抽出した。また、出生時および1歳齢時までのBWとWHのデータから各々の1日増量を算出した。なお、仔ゾウ4はデータ解析時に6ヵ月齢であったため、解析対象から除外した。

1-3 血液検査結果の記録

健康管理記録簿に記載があった人工哺育個体（仔ゾウA）ならびに自然哺育個体2頭（仔ゾウ3および4）における3、6、9ヵ月齢および1歳齢時の全血球計算（CBC）と血液生化学検査データを抽出した。血液一般検査では白血球（WBC）、赤血球（RBC）および血球容積率（PCV）を、血液生化学検査ではアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、カルシウム（Ca）、無機リン（iP）、グルコース（Glu）、総コレステロール（t-Chol）、血中尿素窒素（BUN）、総アルカリホスファターゼ（t-ALP）、総タンパク（TP）を対象項目とした。血液一般検査は全自動セルカウンター（PCE-210；エルマ、東京）を用いて、血液化学検査は血液生化学アナライザー（DRI-CHEM 4000sV；富士フィルムメディカル、東京）を用いて実施された。なお、仔ゾウ1および2について健康管理記録簿に検査記録がなかつ

た。

1-4 冷凍保存血清の測定

健康管理の一環で実施されていた定期血液検査時の凍結（-20℃）保存血清の残余があった人工哺育個体（仔ゾウA）ならびに自然哺育個体2頭（仔ゾウ3および4）の検体について、骨代謝マーカー測定とタンパク電気泳動解析を行なった。仔ゾウAおよび3の検体については3、6、9ヵ月齢および1歳齢時の血清を用いたが、仔ゾウ4では残余があった3および6ヵ月齢時の血清について測定を行なった。

ALP3およびTRAP5b活性値は、それぞれ第1章・第2節および第1章・第1節に記載の方法で測定した。タンパク電気泳動解析は、QuickGel SP（J711、Helena Laboratory）を用いて行った。なお、仔ゾウ1と2では、血清の残余がなかったため測定は行われなかった。

1-5 乳中骨代謝マーカーの測定

市原ぞうの国において2016–2019年に出産した母ゾウ5頭より採取し凍結（-20℃）保存された乳汁を乳中代謝マーカーの測定に供した。初乳サンプル（3検体）は母ゾウ3頭より分娩後12時間以内に採取し凍結保存されたものとし、常乳サンプル（5検体）は母ゾウ5頭より分娩後1ヵ月以上経過した任意の時点で採取し凍結保存した乳汁とした。また、仔ゾウAの人工哺育時に用いた市販のヤギ生乳（木村ヤギ牧場、大分）および人工ゾウミルク（森乳サンワールド、東京）も測定に供した。

骨代謝マーカーとして、BAPおよびTRAP5b活性値を第1章・第1節に記載の方法で測定した。なお、ALP3活性値の測定は各乳汁中に含まれる粗雑物の影響で困難であったため、本章ではALP3活性値の代替としてBAP活性値を測定した。

1-6 統計処理

人工哺育個体（仔ゾウA）および自然哺育個体（仔ゾウ3）の3、6、9ヵ月齢および1歳齢時における血液検査データならびに血清骨代謝マーカーの比較ならび初乳および常乳サンプルの乳中骨代謝マーカーの比較のためにMann-Whitney U検定を行なった。統計処理には、EZR on R commanderを使用し、有意水準を $P<0.05$ とした。

2. 結果

体格測定結果において、雄の仔ゾウAおよび1のBWは同等であり、雌の仔ゾウ2および3よりも低い値で推移した（Figure 8）。仔ゾウAおよび1-3の1歳齢時までの1日体重増量は、それぞれ1.16、0.96、1.41、1.39 kgであった。仔ゾウAおよび1-3の1歳齢時のWHは、それぞれ135、139、136、135 cmであり、1日体高増量は0.11、0.08、0.11、0.12 cmであった。

仔ゾウAと3-4の1歳齢までの3ヵ月間隔の血液検査データをTable 3に示す。仔ゾウ4に関してはデータの最終収集時に6ヵ月齢であったため、その時点までのデータを記した。仔ゾウAの血清BUN濃度（9.9-13.1 mg/dL）は全期間を通して仔ゾウ3（3.9-5.2 mg/dL）および4（4.2-5.0 mg/dL）よりも高く、仔ゾウ3と比較して有意に高かった（Figure 9a）。同様に、仔ゾウAの血清T-Cho濃度、t-ALP活性値とTP濃度（それぞれ37-49 mg/dL、816-1079 U/L、6.0-6.2 mg/dL）は全期間を通して仔ゾウ3（それぞれ72-95 mg/dL、1601-3334 U/L、7.2-8.6 mg/dL）および4（それぞれ65-92 mg/dL、1491-2250 U/L、8.0-8.6 mg/dL）よりも低く、仔ゾウ3と比較して有意に低かった（Figure 9b-d）。タンパク電気泳動解析の結果から、仔ゾウAの γ グロブリン（ γ -Glb）濃度（0.22-0.37 g/dL）は仔ゾウ3（0.94-2.26 g/dL）および4（1.70-2.46 g/dL）よりも極端

に低く、仔ゾウAのアルブミン：グロブリン比（A/G）（1.7–2.2）は仔ゾウ3（1.0–1.6）および4（1.1–1.2）と比べて高かった。 α -Glb濃度は仔ゾウAが仔ゾウ3よりも有意に低く、A/Gは仔ゾウAが仔ゾウ3よりも有意に高かった（Figure 9e–f）。骨代謝マーカーでは、血清ALP3およびTRAP5b活性値は、全期間を通して、仔ゾウAは（671–863および1.6–5.3 U/L）では仔ゾウ3（1403–2977および5.5–11.5 U/L）と4（1233–2021 および7.4–9.0 U/L）よりも低く、両活性値とも仔ゾウAが仔ゾウ3より有意に低かった（Figure 10a–b）。

乳中骨代謝マーカーの測定結果をTable 4に示す。初乳サンプル3検体におけるTRAP5bおよびBAP活性値は、3.0–7.4 U/Lおよび137–362 U/Lであった。常乳サンプル5検体におけるTRAP5bおよびBAP活性値は、それぞれ1.1–1.8 U/Lおよび30.5–81.8 U/Lであった。初乳と常乳の比較では、両活性値とも初乳の方が常乳よりも有意に高かった（Figure 11a–b）。仔ゾウAの人工哺育に用いた市販のヤギ生乳におけるTRAP5bおよびBAP活性値は1.0 U/Lおよび66.7 U/Lであった。人工エレファントミルクのTRAP5bとBAP活性値は0.4 U/Lと1.5 U/Lであった。

3. 考察

BWは最も分かりやすく簡便に得られる動物の成長指標である。アジアゾウの仔ゾウにおけるBW増量の雌雄差はこれまでに報告されている[51]。本研究における雄ゾウ（仔ゾウAおよび1）と雌ゾウ（仔ゾウ2および3）のBW推移に違いが見られたが（Figure 8）、これは雌雄差によるものと考えられた。アジアゾウにおいて健康な仔ゾウの1日体重増量は0.5–1.4kgであるが[72]、本章の人工哺育個体（仔ゾウA）および自然哺育個体（仔ゾウ1–3）の1日体重増量はこの範囲内であった。また、過去の報告[72]における1歳齢までの体重の最大–最小

範囲 (Figure 8) と比較しても、明らかな相違は認められなかった。これまでにアジアゾウの成長過程におけるWHの推移を記録した報告は見当たらないが、人工哺育個体 (仔ゾウA) は自然哺育個体 (仔ゾウ1-3) と同等であった。以上の結果から、人工哺育個体 (仔ゾウA) の1歳齢までの成長は母ゾウや代理母ゾウによって育てられた自然哺育個体と同等であることが示された。

アジアゾウの骨代謝を評価する上で血中骨代謝マーカーは有用な指標となる [2, 47]。体格測定の結果からいずれの仔ゾウも同等の成長過程を示したように見えたが、人工哺育個体 (仔ゾウA) の血清t-ALP、ALP3およびTRAP5b活性値は自然哺育個体と比べて低値であり、骨芽細胞と破骨細胞による骨代謝は抑制されていたことが示唆された。これらの結果は、BWやWHだけでは仔ゾウの正常な骨成長や骨代謝状態を評価できないことを示しており、血中骨代謝マーカーは仔ゾウの成長の指標として有用であると考えられた。仔ゾウAの骨代謝が抑制された要因として、運動、日光浴、Ca摂取量、母乳成分、ホルモン動態などを挙げることは可能であるが、今回の回顧的研究結果だけでは原因を明確に特定はできなかった。仔ゾウAが他の仔ゾウと大きく異なっている点として、摂取したミルクの違いを挙げるができる。生乳には骨代謝に直接影響を与えるビタミンK2やイソフラボンが豊富に含まれており、それ以外にも新生仔の骨成長に必要な様々な栄養素が多量に含有する [107]。生乳の成分は動物種により異なり、仔ゾウAの人工哺育で用いたヤギ生乳や人工ゾウミルクには、仔ゾウの骨の健全な成長を促進する何かしらの要素が不足していた可能性がある。アジアゾウや他の哺乳動物における生乳成分と骨代謝の関係について明らかにするためには追加研究が必要である。

近年、乳中の骨代謝マーカーに関する研究が注目を集めており、乳中骨代謝マーカーが授乳中の幼獣にとって重要な役割を担っていることが示唆されて

いる。Oliveiraら[71]は、牛由来の生乳に含まれる細胞外小胞などのナノ粒子が貪食機能をもたない未成熟なTRAP5b陽性の破骨細胞の分化を促進することを明らかにした。また、Hatateら[30]は乳中の骨代謝マーカー値は初乳で高いことを報告し、新生仔牛における血中ALPおよびBAP活性値は初乳摂取量に依存することを明らかにした。仔ゾウAの初乳摂取量は、過去の報告[72]にある推奨摂取量（2–10L）に比較すると非常に少なく、そのことが骨代謝に影響を与えた可能性がある。本研究において、アジアゾウの初乳（3検体）中のTRAP5bおよびBAP活性値（3.0–7.4および137.4–362.9 U/L）は、分娩後1ヵ月以上経過した常乳（5検体；1.1–1.8および30.5–81.8 U/L）に比べて高値であることから、これらの酵素は摂取する新生仔ゾウにおいて何らかの役割を担っていることが推測される。人工哺育に用いたヤギ生乳のTRAP5bおよびBAP活性値（1.0および66.7 U/L）はアジアゾウの常乳と大佐はなかったものの、人工エレファントミルク（0.4および1.5 U/L）では非常に低い値であった。これらの点から、仔ゾウAの血清骨代謝マーカー値が低値で推移したことには摂取したミルクに要因があったことが推測されるものの、その原因究明には仔ゾウの骨代謝活性に対する母乳の生理作用についての解明が必要である。

動物において血清 γ -Glb濃度は免疫状態の指標であり、新生仔の受動免疫成否の判断に用いられる[72]。人工哺育個体（仔ゾウA）の γ -Glb値は全期間を通して極端に低く（0.22–0.37 g/dL）、低免疫状態であったことが示唆された。多くの哺乳動物において、新生仔は大量の免疫グロブリンを含む初乳を十分に摂取することで受動免疫を獲得する[87]。初乳摂取量が不十分であると、新生仔は受動免疫不全（Failure of passive transfer；FPT）となり自然免疫のみで病原体に対抗する状態となる。初乳を与えず人工乳のみを与えた新生仔牛と初乳を十分に与えた新生仔牛ではいずれも順調に成育したものの、初乳を与えなかった仔

牛では血中グロブリン濃度が低いことが報告されている[50]。アジアゾウでは出生後30分以内に2~10 Lの初乳を摂取させることが推奨されており[72]、仔ゾウAでは初乳摂取量が不十分であったためFPTとなった可能性がある。一方、アジアゾウの胎盤構造は犬や猫に近い内皮絨毛性胎盤であり[14, 19]、受動免疫は初乳摂取よりも胎盤移行のほうが有意であること[68]、胎盤移行による受動免疫は母ゾウの年齢や免疫状態が影響することが報告されている[75]。これらの点から、仔ゾウAの低 γ -Glb濃度は母ゾウの免疫状態が影響している可能性もある。いずれにせよ、仔ゾウAでは低免疫状態によりウイルスや細菌による感染症のリスクは高いと判断されるため、補助療法が必要であったと考えられる。アジアゾウにおいて低免疫状態が疑われる場合、血漿輸血やグロブリン製剤の経口摂取が推奨されている[72]。しかし、アジアゾウにおいてFPTを診断するための血中 γ -Glb濃度の基準範囲は確立されておらず、今後、受動免疫獲得機構の解明と併せて、FPTの診断・治療に関する研究が必要である。

血清t-Cho濃度はエネルギー摂取の指標である[19]。人工哺育個体（仔ゾウA）では自然哺育個体（仔ゾウ3および4）と比較して血清t-Cho濃度は全期間を通して低値（37–49 mg/dL）であり、エネルギー摂取が不十分であったと考えられた。一方、人工哺育個体（仔ゾウA）では自然哺育個体（仔ゾウ3および4）と比較して血清BUN濃度は全期間を通して高値（9.9–13.1 mg/dL）であった。栄養不足によるタンパク異化亢進は血清BUN濃度上昇の原因の一つである[19]。これらの点から、仔ゾウAは栄養とエネルギーが不足した状態であり、より多くのミルクや飼料を摂取する必要があったと考えられた。母乳は1歳齢までの仔ゾウの主要な栄養源である。仔ゾウの完全な離乳には約3年かかるが、3ヵ月齢以降は徐々に果物や野菜などの固形の餌を口にし、粗飼料の摂取量も増加する[77]。仔ゾウAにおいては重湯と煮バナナの混合液をミルクに追加してお

り、さらに3ヵ月齢以降は青草、果物や野菜を自由に摂餌できる環境で管理されていた。しかし、このような飼育下でも、巨大な体と急激な成長を支えるためには栄養とエネルギーの摂取が不十分であったと考えられる。

以上より、アジアゾウの人工哺育において、骨代謝異常、低免疫状態、栄養・エネルギー不足といった課題が明らかになった。これらは潜在的に進行したため、致命的になる前に特定することが肝要であった。本章で示した体格測定や血液検査の各種データは、これらの課題のリスク評価の指標として有用と考えられた。今後、人工哺育個体だけでなく、自然哺育個体も含めた仔ゾウの育成技術の向上を図るため、体格測定と血液検査のデータを蓄積する必要がある

4. 小括

育児放棄により人工哺育された仔アジアゾウは、栄養失調や代謝性骨疾患による成長不良に陥り、死亡の転帰を辿るものが多い。本章では、1歳2ヵ月齢で急死した人工哺育個体が転帰不良となった要因を明らかにするために、健康管理記録簿上の体格測定および血液検査所見ならびに凍結保存されていた血清を用いて回顧的研究を行った。併せて、自然哺育個体における健康管理記録簿上の各種データと凍結保存血清、さらに人工哺育ならびに自然哺育に用いた凍結保存乳汁の分析も行った。人工哺育個体の体重および体高の推移は自然哺育個体と同等であったが、骨代謝マーカーである血清TRAP5bおよびALP3活性値は常に低値であった。アジアゾウの初乳中TRAP5bおよびALP3活性値は常乳より高く、人工哺育に用いた2種類の代用乳の骨代謝マーカー活性値は、アジアゾウの常乳と同等もしくは低値であった。以上の結果から、人工哺育個体は骨代

謝の低下が示唆され、新生仔ゾウへの初乳摂取の重要性が再認識された。

Table2: 仔ゾウAにおける哺乳量

週齢／月齢	哺乳量 liters/日		哺乳量 liters/時間		哺乳量 liters/回		哺乳組成 Rgm:Aem ^{a)}
	仔ゾウA	参考 [72]	仔ゾウA	参考 [72]	仔ゾウA	仔ゾウA	
週							
1	2.45-4.00	5.00-10.70	0.102-0.167	0.208-0.446	0.040-0.200		10:0
2	4.27-6.65	8.75-11.60	0.178-0.277	0.364-0.483	0.240-0.300		10:0
3	5.70-8.00	11.00-13.20	0.238-0.333	0.458-0.550	0.350-0.400		10:0
4	8.60-9.35	11.80-12.00	0.358-0.390	0.490-0.500	0.400-0.450		10:0
月							
1	2.45-12.50	5.00-13.20	0.102-0.521	0.208-0.550	0.040-0.500		10:0
2	11.00-16.25	12.00-18.00	0.458-0.677	0.500-0.750	0.500-0.650 ^{b)}		10:0
3	13.07-18.30	10.90-20.00	0.545-0.763	0.456-0.833	0.650-0.750 ^{b)}		10:0
4	16.30-19.30	12.10-24.00	0.679-0.804	0.504-1.000	0.750-0.800 ^{b)}		7.5:2.5
5	17.00-20.40	14.50-29.00	0.708-0.850	0.606-1.210	0.800-0.850 ^{b)}		7.5:2.5
6	19.17-25.38	13.70-31.00	0.799-1.058	0.573-1.290	0.850-0.900 ^{b)}		7.5:2.5
7	19.92-24.00	10.90-24.60	0.830-1.000	0.456-1.020	0.900-1.000 ^{b)}		7.5:2.5
8	20.67-27.60	12.70-25.80	0.861-1.150	0.531-1.080	1.000-1.200 ^{b)}		7.5:2.5
9	20.40-28.80	15.00-28.50	0.850-1.200	0.625-1.190	1.200-1.400 ^{b)}		7.5:2.5
10	28.00-39.10	10.60-28.30	1.167-1.629	0.441-1.180	1.400-1.700 ^{b)}		7.5:2.5
11	35.70-39.10	12.70-30.60	1.488-1.629	0.531-1.260	1.700-1.800 ^{b)}		7.5:2.5
12	36.00-41.40	-	1.500-1.725	-	1.800-1.900 ^{b)}		7.5:2.5

a) ヤギ生乳 (Raw goat milk) : 人工ゾウミルク (Artificial elephant milk)

b) 栄養補助として重湯と煮バナナの混合飼料 (重湯3L : 煮バナナ500g目安) を哺乳量の20%分添加[77]

5. 図表

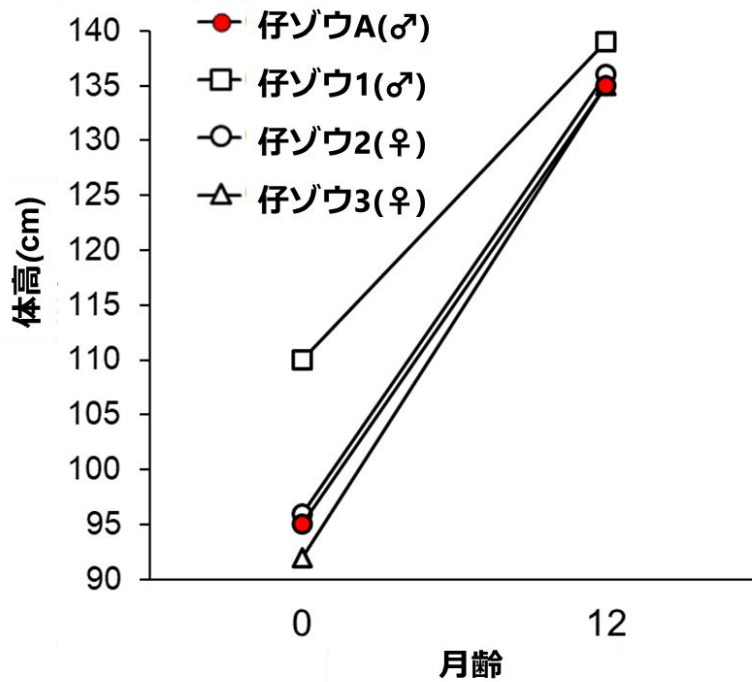
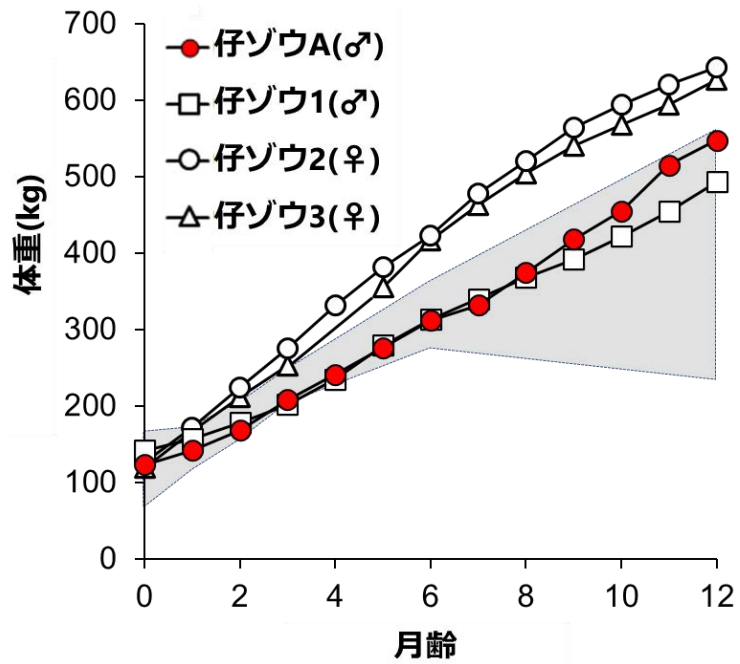


Figure 8. 人工哺育仔個体（仔ゾウA）と自然哺乳個体（仔ゾウ1-3）における生後12カ月間の体重（上段）と体高（下段）の推移

- ・ 体重は大型フロアスケール(DLF-3000, Dream Links, 東京) を用いて測定
- ・ グレーゾーン：最大体重と最小体重の間の基準範囲[72]

Table 3. 人工哺育仔アジゾウと2頭の自然哺育仔アジゾウにおける3-12ヵ月齢の血液検査結果

項目	単位	仔ゾウ A				仔ゾウ 3				仔ゾウ 4	
		3ヵ月齢	6ヵ月齢	9ヵ月齢	12ヵ月齢	3ヵ月齢	6ヵ月齢	9ヵ月齢	12ヵ月齢	3ヵ月齢	6ヵ月齢
<i>Complete blood count</i> ^a											
WBC	μL	13,300	16,700	15,100	22,700	19,000	24,100	28,400	24,700	19,300	24,000
RBC	x10 ³ /μL	2,720	2,720	3,270	3,030	2,930	2,670	2,890	3,410	2,770	3,620
PCV	%	35.2	28	25.9	20.4	32.1	24.7	22.7	25.3	29.9	29.7
<i>Serum chemistry</i>											
ALT ^b	U/L	4	2	4	5	4	5	3	2	5	1
AST ^b	U/L	21	14	14	17	23	28	17	14	29	16
Ca ^b	mg/dL	11.9	11.2	11.8	12.5	11.7	11.7	11.3	11.2	11.2	11
IP ^b	mg/dL	9.9	8.2	8.8	8.9	9	9.2	8.3	7.6	8.8	8.5
Glu ^b	mg/dL	127	147	157	118	166	149	135	129	139	135
t-Chol ^b	mg/dL	49	37	38	48	95	94	90	72	92	65
BUN ^b	mg/dL	11.5	9.9	9.9	13.1	3.9	4.5	4.5	5.2	4.2	5.0
t-ALP ^b	U/L	1,033	997	1,079	816	3,334	3,168	1,899	1,601	2,250	1,491
ALP3 ^c	U/L	756	863	671	684	2,977	2,934	1,610	1,403	2,021	1,233
TRAP5b ^d	U/L	5.3	1.6	2.4	3.2	10.2	11.5	7.0	5.5	9.0	7.4
TP ^b	g/dL	6.2	6.0	6.0	6.6	8.6	8.0	7.6	7.2	8.6	8.0
Alb ^e	g/dL	4.19	4.15	4.15	4.12	4.36	4.09	4.39	4.46	4.45	4.35
α ₁ -glob ^e	g/dL	0.63	0.61	0.61	0.71	0.40	0.50	0.47	0.48	0.25	0.37
α ₂ -glob ^e	g/dL	0.32	0.30	0.30	0.51	0.18	0.30	0.26	0.32	0.08	0.18
β ₁ -glob ^e	g/dL	0.17	0.20	0.20	0.28	0.31	0.35	0.33	0.24	0.34	0.43
β ₂ -glob ^e	g/dL	0.58	0.53	0.53	0.61	0.88	0.98	0.85	0.76	1.02	0.97
γ-glob ^e	g/dL	0.31	0.22	0.22	0.37	2.26	1.78	1.30	0.94	2.46	1.70
AL/G ^e		2.1	2.2	2.2	1.7	1.1	1.0	1.4	1.6	1.1	1.2

ALB: アルブミン, glob: グロブリン, AL/G: アルブミン: グロブリン比

^a 全自動セルカウンター (PCE-210, エルマ, 東京) を用いて測定

^b 血液化学アナライザー (DR1-CHEM 4000sv, 富士フイルムメデイカル, 東京) を用いて測定

^c 第1章第2節の方法で測定

^d 第1章第1節の方法で測定

^e Quickgel SP (J711, Helena Laboratory Japan, 埼玉) を用いた電気泳動法により測定

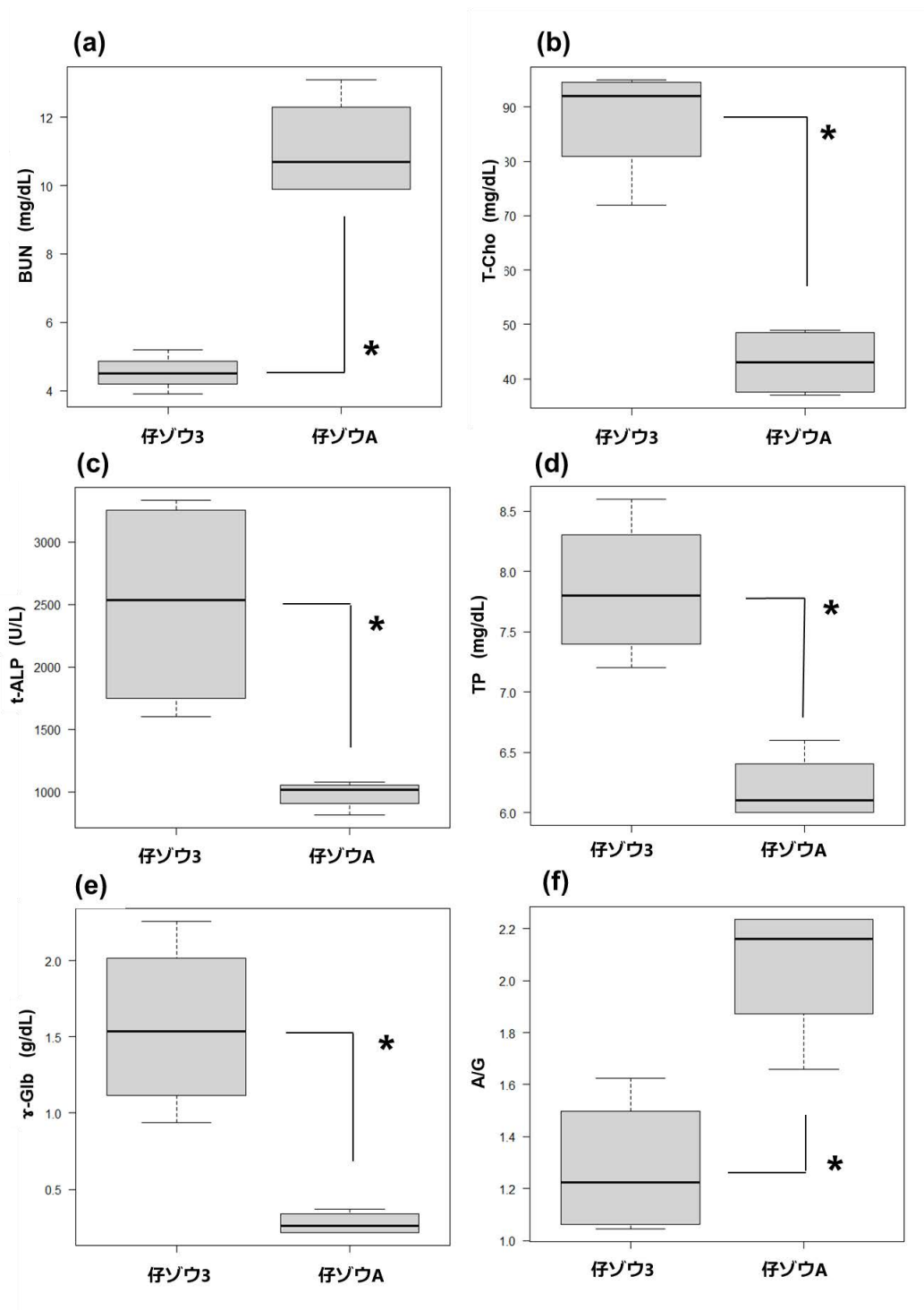


Figure 9. 自然哺育個体（仔ゾウ3、n=4）ならびに人工哺育個体（仔ゾウA、n=4）における血清BUN (a)、T-Chol (b)、t-ALP (c)、TP (d)、 α -Glb (e) および A/G (f) の比較 * 有意差あり (P<0.05).

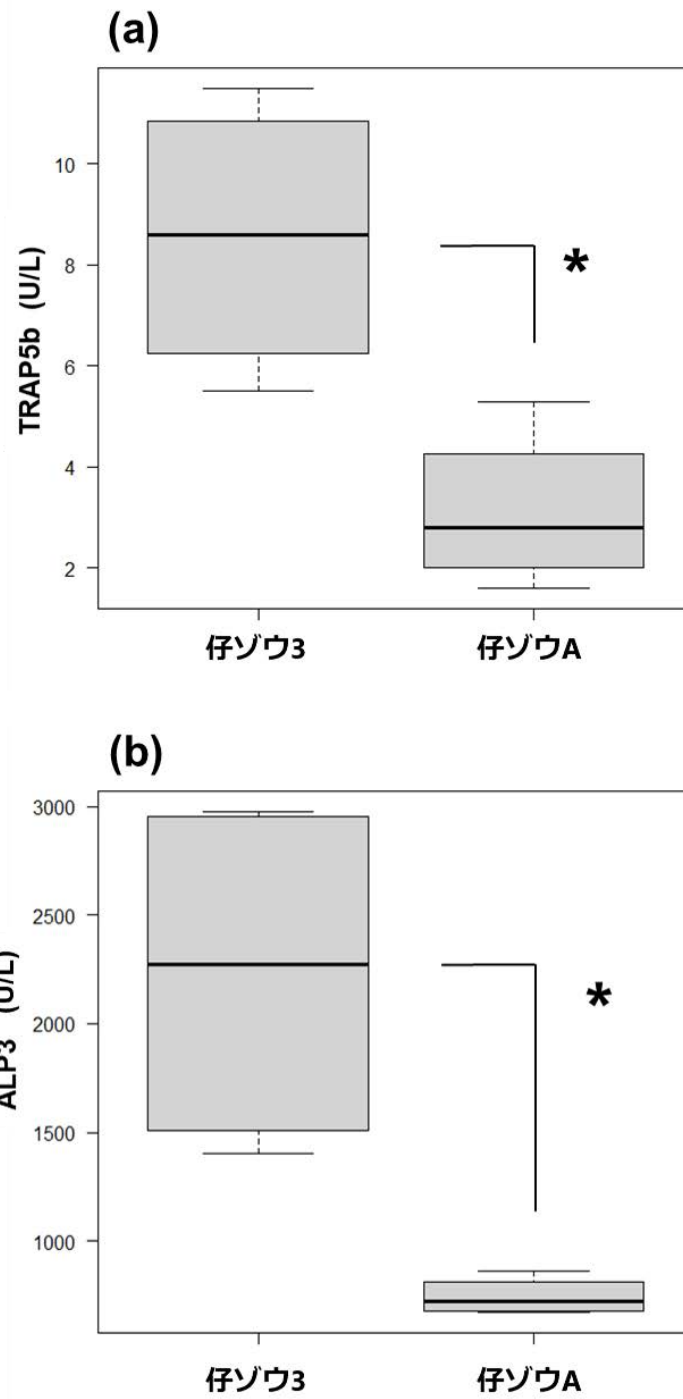


Figure 10. 自然哺育個体（仔ゾウ3、n=4）ならびに人工哺育個体（仔ゾウA、n=4）における血清TRAP5b (a) およびALP3 (b) 活性値の比較

* 有意差あり ($P < 0.05$)

Table 4. 各ミルクにおける骨代謝マーカー値

No.	ミルクの種類	TRAP5b ¹⁾ (U/L)	BAP ²⁾ (U/L)	B/T index ³⁾	ALP ⁴⁾ (U/L)
1	アジアゾウ母乳 (初乳)	3.0	137.4	4.6	288.1
2	アジアゾウ母乳 (初乳)	7.4	362.9	4.9	631.7
3	アジアゾウ母乳 (初乳)	4.7	236.8	5.1	348.7
	平均	5.0	245.7	4.8	422.8
4	アジアゾウ母乳 (常乳)	1.6	35.2	2.2	115.9
5	アジアゾウ母乳 (常乳)	1.5	30.5	2.0	146
6	アジアゾウ母乳 (常乳)	1.1	55.6	5.2	135.3
7	アジアゾウ母乳 (常乳)	1.8	47.4	2.7	125.6
8	アジアゾウ母乳 (常乳)	1.3	81.8	6.1	156.1
	平均	1.5	50.1	3.7	135.8
9	市販ヤギ生乳	1.0	66.7	6.9	299.6
10	人工ゾウミルク	0.4	1.5	0.3	699.5

¹⁾TRAP5b: 酒石酸耐性酸ホスファターゼ 5b, ²⁾BAP: 骨型アルカリフォスファターゼ, ³⁾B/T index: 血清 BAP 活性値 / 血清 TRAP5b 活性値 ×10, ⁴⁾ALP: アルカリフォスファターゼ

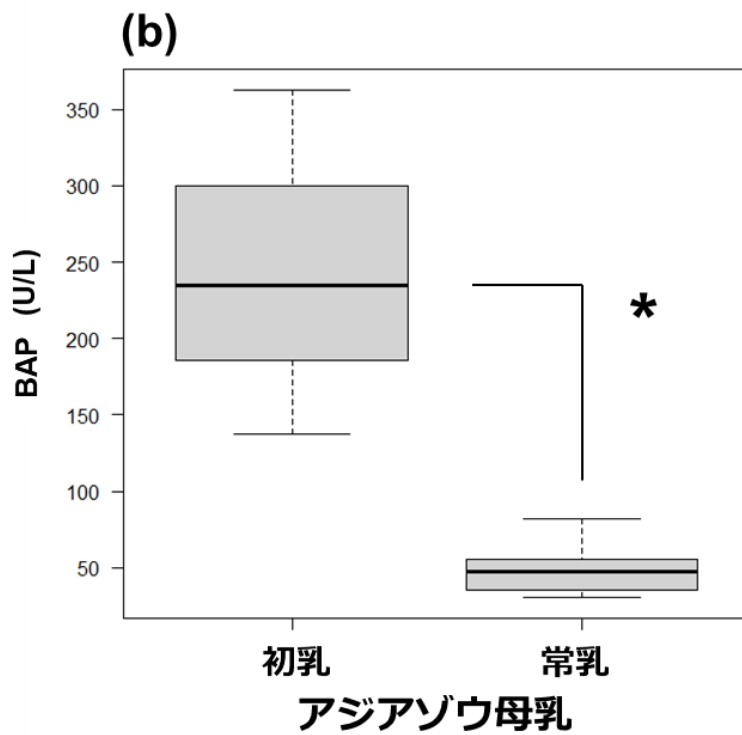
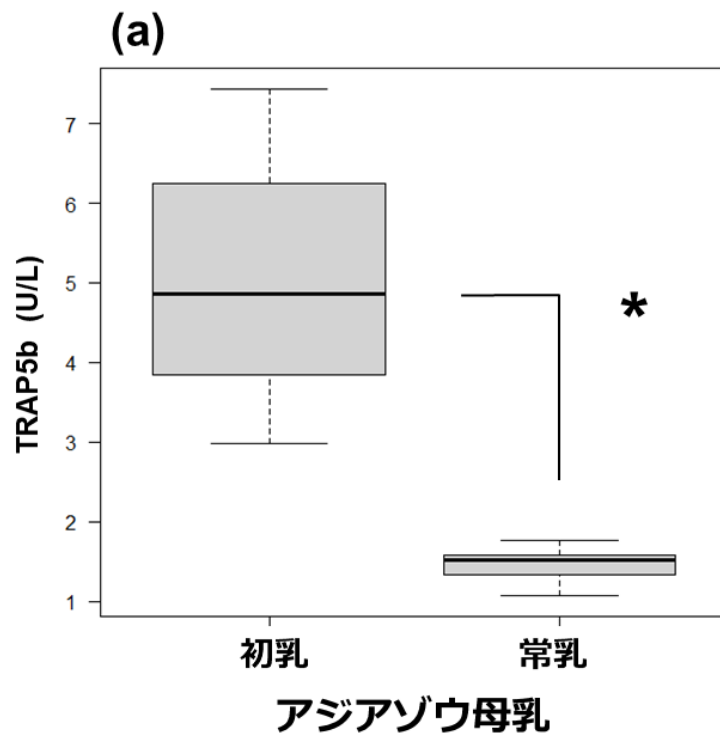


Figure 11. アジアゾウの初乳 (n=3) と常乳中 (n=5) の TRAP5b (a) および BAP (b) 活性値の比較

* 有意差あり ($P < 0.05$)

第3章：LAMP法による血中ゾウ血管内皮ヘルペスウイルスEEHV診断とモニタリング

ゾウ血管内皮ヘルペスウイルス (Elephant Endotheliotropic Herpes Virus; EEHV) は1999年に特定されて以来、若齢アジアゾウおよびアフリカゾウに致死性的出血病を引き起こす最も主要な原因として、世界中で認知されている [83]。現在までに7つの型 (EEHV1-7) が特定されており、それぞれの病原性はゾウの種類やウイルス型で異なっている。EEHVはアジアゾウおよびアフリカゾウを自然宿主とし、生涯に渡って潜伏感染すると考えられている。EEHV1、4と5型はアジアゾウを宿主とし、EEHV2、3、6と7型はアフリカゾウを宿主としている。また、EEHV1、4と5型はいずれも病原性が高い [55]。EEHV1型は1A型と1B型の2つのサブタイプがあり、アジアゾウに致死性的出血病を引き起こす主要な型である [89, 100]。報告されている死亡例のうちEEHV1型由来は93%、EEHV1A型由来は84%を占める [34]。また、タイにおける362頭のサーベイランスでは、EEHVを保有した20例すべてがEEHV1型 (EEHV1A型:16頭、EEHV1B型:4頭) であり [101]、アジアゾウで最も警戒すべきEEHVのタイプである。日本で過去に発生したEEHV関連出血病 (EEHV-associated hemorrhagic disease; EEHV-HD) による死亡例は、いずれもEEHV1A型であった。ゾウの体内ではEEHVの回帰感染と免疫応答による回復を繰り返しており、ストレスなど何かしらの原因でウイルス血症が持続すると、EEHV-HDを誘発する [56, 108]。EEHV-HDでは血管の傷害と出血、それに伴うショックが起こり、10-15歳以下の仔ゾウでは臨床症状が現れてから12-72時間で死に至る。末期の臨床症状は舌のチアノーゼ、顔面の浮腫などが特徴であるが、初期には

診断は難しい。現在までに、様々な治療法が報告されているが、その救命率は低い。しかし、発症初期に積極的な治療を行った症例は総じて生存率が高く、EEHV血症の早期発見が最も重要な対抗策として支持されている[56, 100]。

EEHV血症の生前診断にはU38遺伝子（DNAポリメラーゼ領域；POL）をターゲットとし、すべてのEEHV型に共通したプライマーを用いたPCR法が行われ[53, 82]、増幅産物のシーケンスによってウイルス型を診断する[56]。しかし、PCR法は検出までに数時間を要し、実験室のような清潔な検出環境と高価な測定機器が必要との理由から、動物園やサファリパーク、エレファントキャンプといったアジアゾウ飼育施設で実施されることは稀である。急性経過への対応や早期の積極治療により救命率を上げるためにも、簡便で迅速な高感度診断法の開発が期待されている。Loop-mediated isothermal amplification

（LAMP）法は簡易的な核酸増幅法であり、獣医領域で細菌・ウイルス感染症の診断に応用されている[69, 76, 86]。LAMP法では一定温度下で核酸を迅速かつ特異的に増幅し染色することで、肉眼で増幅産物を確認することができる。LAMP法は高価な機器を必要とせず、電気泳動などの反応後の操作も不要なため、臨床現場での応用が可能である。本章では、臨床現場で実用可能なEEHV血症の迅速・高感度診断法の開発を目的とし、世界中で最も発生の多く、日本でも発生報告があったEEHV1型をターゲットとしたLAMP法によるEEHV血症診断法の検討を行なった。また、本章で確立したLAMP法を用いて若齢アジアゾウ群の血中EEHV1型の継続的なモニタリングを実施した。

1. 材料と方法

1-1 プライマー設計

LAMP法では、6つのプライマー、すなわちforward inner primer（FIP）、

backward inner primer (BIP)、outer forward primer (F3)、outer backward primer (B3)、loop forward primer (LF) およびloop backward primer (LB) が必要となるため、すでに公開されているEEHV1Aおよび1B型のPOL遺伝子とターミナーゼ (terminase; TER) 遺伝子のシーケンス情報 (GenBank accession number HM568510、JF692761、MF579090) をもとに、Primer Explorer V5 (富士通、東京) を用いてこれらのプライマーを設計した。プライマーのターゲット領域をクエリ配列、アジアゾウにおける他の重要疾患の病原体 (口蹄疫ウイルス、狂犬病ウイルス、結核菌群など) の遺伝子配列を対照のターゲット配列として、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により相同性配列がないことを確認した。その上で、作成したプライマーの中で最も感度の高かったものを採用した (Table 5)。

1-2 LAMP法

LAMP法は市販のDNA増幅キット (Loopamp DNA Amplification Kit、栄研化学、東京) を用いて取扱説明書の手順に従い実施した。すなわち、付属の Reaction Mix. 12.5 μ L、FIP 1 μ LおよびBIPプライマー 1 μ L (それぞれ40 μ M)、F3およびB3プライマー 各1 μ L (それぞれ5 μ M)、LFおよびLBプライマー 各1 μ L (それぞれ20 μ M)、*Bst* DNA ポリメラーゼ 1 μ L、発光試薬 各1 μ L

(Loopamp Fluorescent Detection Regant、栄研化学)、精製水 2.5 μ LおよびDNA サンプル 2 μ Lからなる反応液をチューブ内で調整した。反応液はヒートブロック (MyBL-10C、アズワン、大阪) 上で60 $^{\circ}$ Cで60分間の反応を行い、その後95 $^{\circ}$ Cで2分の加温により反応を停止させた。目視にてチューブ内の反応物を確認し、蛍光緑色に発色した場合、DNA増幅があったものと判断し、橙色のまま変色がなかった場合にDNA増幅はなかったものと判断した (Figure 12)。

1-3 PCR法

PCR法は過去の報告通りすべての型のEEHVのPOL遺伝子をターゲットとしたプライマーセット（6710と6711；Table 5）を用いて以下の条件で実施した：94℃で2分の反応ののち、（98℃ 10秒、55℃ 30秒、68℃ 30秒）を40サイクル、最後に68℃で5分のfinal extension を行った。PCR法はKOD Fx Neo（東洋紡、大阪）を用いて取扱説明書の手順に従い実施した。増幅産物はアガロースゲル電気泳動により分離し、エチジウムブロマイドとUVトランスイルミネーターを用いて視覚化し、確認した。本法によるスクリーニングで陰性の場合には、PCR産物を用いてインナープライマーセット（6710と6712；Table 5）によるnested PCRを上記と同条件で実施した。

1-4 LAMP法の特異性確認試験

2017–2018年に市原ぞうの国で飼育されていた臨床的に健康なアジアゾウ12頭（雄3頭、3ヵ月齢–26歳；雌9頭、1ヵ月齢–51歳）から得られたのべ20検体の全血サンプルについて、事前にPCR法によりEEHV陰性であることを確認し、これらを陰性コントロールとした。また、2018年に沖縄こどもの国で飼育されていた雌アジアゾウ1頭（2歳）より得られた全血サンプルを陽性コントロールとした。当該ゾウは2018年1月に死亡し、EEHV1A型に起因する出血病と診断されたものである。本サンプルは当該ゾウが死亡する直前に採取し、冷凍保存（-20℃）したものを扱い、PCR法によりEEHV陽性を確認した。これらのサンプルはQIAamp DNA Blood Mini Kit（QIAGEN、Hilden、ドイツ）を用いて取扱説明書の手順に従いDNA抽出を行い、LAMP法用の検体とした。以上の陰性コントロール20検体および陽性コントロール1検体を用いてLAMP法を実施し、野外サンプルにおける特異性の確認を行った。反応は2重測定で実施した。

EEHV1Aおよび1B型におけるPOL遺伝子（それぞれHM568510およびJF692761）のターゲット領域を含む遺伝子座558bpの情報から人工合成プラスミドDNAを作製した。EEHV4および5型におけるPOL遺伝子（それぞれKR781027およびJX011013）のターゲット領域を含む遺伝子座561bpの情報から人工合成プラスミドDNAを作製した。これらの人工合成DNAを上述の陰性コントロール20サンプルに添加し、EEHV1A、1B、4と5型の血症を模倣したサンプルをそれぞれ20サンプル作製した。血中DNA量はそれぞれ 10^5 copies/ μ Lになるよう調整した。これらのサンプルからQIAamp DNA Blood Mini Kit（QIAGEN）を用いてDNAを抽出後、LAMP法を実施し、模倣サンプルにおける特異性の確認を行った。反応は2重測定で実施した。

1-5 LAMP法の感度確認試験

EEHV1Aおよび1B型におけるPOL遺伝子（それぞれHM568510およびJF692761）のターゲット領域を含む遺伝子座558bpの情報から人工合成プラスミドDNAを作製した。これらの10倍段階希釈液（ $10^5 - 10^{-1}$ copies/ μ L）を用いて、LAMPおよびPCR法を実施し、検出限界を確認した。Salmon sperm DNA（BioDynamic Laboratory、日本）をキャリアDNAとして希釈液に添加した。DNAコピー数は人工合成DNAの濃度より算出した。また、実際のウイルス血症を模倣するため、EEHV陰性アジアゾウ全血に人工合成DNAを添加したサンプル（DNA抽出操作前 $10^5 - 10^{-1}$ copies/ μ L）を作製し、QIAamp DNA Blood Mini Kit（QIAGEN）を用いて解説書通りにDNA抽出を行った。これらのサンプルを用いて、同様にそれぞれの検出限界を確認した。これらの反応は2重測定で実施し、各サンプルを10回反復して反応を確認し、検出限界算出に用いた。検出限界はReed and Muenchの方法[80] による50%検出限界を採用し、算出した。

1-6 LAMP法の臨床試験

2018年10月－2020年10月にかけて市原ぞうの国で飼育されていた臨床的に健康な15歳以下の若齢アジアゾウ5頭（0ヵ月齢－13歳）において、週に1回の採血を行い、LAMP法によるEEHV血症のモニタリングを実施した。採血後はEDTA添加済みマイクロ採血チューブ（エルマ販売、東京）に分注し、速やかにQIAamp DNA Blood Mini Kit（QIAGEN）を用いて解説書通りにDNA抽出を行い、LAMP法を実施した。各検査は2重測定で行った。

また、第2章の仔アジアゾウAにおいて死亡後に採取した凍結鼻部筋組織を用いてLAMP法によるEEHV1型検出を実施した。本組織では既にPCR法によりEEHV1A型陽性が確認されている。QIAamp DNeasy Blood & Tissue Kit（QIAGEN）を用いて解説書に従って組織からDNA抽出を行い、LAMP法を実施した。検査は2重測定で行った。

2. 結果

LAMP法の野外サンプルを用いた特異性確認試験において、陰性コントロール20検体はすべて陰性を示し、陽性コントロール1検体は陽性となった（Figure 12）。また、EEHV1A、1B、4および5型のウイルス血症を模倣したサンプルを用いた特異性確認試験において、EEHV1Aと1B型の模倣サンプルそれぞれ20検体はすべて陽性を示し、EEHV4と5型の模倣サンプルそれぞれ20検体はすべて陰性を示した。

EEHV1A型の人工合成プラスミドを用いた感度確認試験の結果をTable 6 に示す。人工合成プラスミド段階希釈液を用いた際のLAMP法およびPCR法の50%検出限界はそれぞれ $10^{0.7}$ および $10^{3.3}$ copies/ μ Lであった。人工DNAを添加した全

血サンプルを用いた際のLAMPおよびPCR法の50%検出限界はそれぞれ $10^{1.2}$ および $10^{3.5}$ copies/ μ Lであった。EEHV1B型の人工合成プラスミドを用いた感度確認試験の結果をTable 7 に示す。段階希釈液を用いたLAMPおよびPCR法の50%検出限界はそれぞれ $10^{0.5}$ および $10^{3.4}$ copies/ μ Lであり、DNA添加全血サンプルを用いた50%検出限界はそれぞれ $10^{1.2}$ および $10^{3.5}$ copies/ μ Lであった。

2018年10月－2020年10月にかけて市原ぞうの国で飼育され臨床的に健康な15歳以下の若齢アジアゾウ5頭のLAMP法によるモニタリングでは、合計104週にわたり検査を実施したが、陽性は一度も確認されなかった。

第2章の仔アジアゾウAの鼻部筋組織を用いたLAMP法検査では、陽性が確認された (Figure 13)。

3. 考察

一般的にLAMP反応は標的遺伝子の8つの領域に対して6つのプライマーを設定し増幅反応を進めるため、特異性は高い。本研究で設計したプライマーはBLAST検索で特異性が高いことを確認しており、陽性／陰性が判別しているすべての臨床サンプルについて正確に判定した。また、アジアゾウを自然宿主とするEEHV1A、1B、4および5型について、それぞれのウイルス血症を模倣したサンプルではEEHV1Aと1B型のみ陽性を示し、EEHV4と5型は陰性を示した。以上の結果より、EEHV1型をターゲットとしたプライマーセットは、LAMP法によってEEHV1型のみを特異的に検出できると判断した。50%検出限界は、人工合成プラスミド段階希釈液および実験的DNA添加全血サンプルいずれもPCR法と比較してLAMP法が100倍以上高く、本研究で開発したLAMP法は、既報のPCR法よりも感度が高いと言えた。過去にLAMP法とPCR法を比較した報告では、LAMP法の感度はPCR法の10－100倍高いことが示されているものもあるが

[67, 76]、適した条件が設定されているPCR法であればLAMP法よりも感度が高いため[45, 64]、既報のEEHV血症診断のためのPCR法にも、さらなる改良が必要と考えられる。本研究においては両検査ともDNA添加全血サンプルの方が段階希釈液よりもわずかに感度が落ちていた。これは血中の様々な増幅阻害物質の影響を受けたためと考えられた。ウイルス血症を模倣したDNA添加全血は、血中でのウイルス遺伝子の喪失、血中阻害物による増幅阻害、抽出時のDNA損失など、実際の野外陽性サンプルに限りなく近いサンプルであると考えられる。本研究で用いた野外陽性サンプル数は、LAMP法の感度を議論する上では少ないため、今後、サンプル数を増やし評価する必要がある。現在まで、日本でEEHV-HDと診断されたアジアゾウは2例のみであり、他に陽性の臨床症例は報告されていない。今後、海外の研究者と協力し、より多くの野外陽性サンプルを用いて感度、利便性、再現性に関する検証を行うとともに、定量PCR法などの検査法との比較も必要である。

臨床症状の出現期間における血中EEHVウイルス量は 10^3 copies/ μ L以上であると報告されている[13, 20, 100, 103]。本研究におけるLAMP法の50%検出限界は $10^{1.2}$ copies/ μ Lであり、ウイルス血症の検出に十分な感度であった。臨床症状の出現数日前から血中のウイルス遺伝子をPCR法で検出可能であることから、致死性出血病の予防あるいは早期発見による治療のため、15歳以下の若齢アジアゾウでは日常的なウイルス血症の検査が推奨されている[13, 34, 56]。したがって、動物園などの臨床現場では、LAMP法を導入することにより、実践的な予防措置が実施可能となる。さらに、アジアゾウはEEHVの自然宿主で多くの個体で潜伏感染していることから、症状を示さない回帰感染が時折起こる[48, 82, 90]。本章で確立したLAMP法は高感度であるため、潜伏感染個体を検出できる可能性がある。今後、多くのアジアゾウを対象に血中のEEHV遺伝子のモニタ

リングを行うことで、回帰感染とEEHV-HDの回帰発症との関係に関する知見が得られると考えられる。今回のLAMP法はEEHV1型を標的としたものであったが、海外ではEEHV4型や5型に由来する出血病による死亡例が報告されている[30]。したがって、今後、アジアゾウの日常的な検査体制を万全化するためには、EEHV4型や5型を標的としたLAMP法の開発も必要である。

今回、0-13歳の仔ゾウ5頭について、2018-2020年の約2年間、毎週の採取血液を材料にLAMP法による検査を実施したが、EEHV1型は1度も検出されることはなかった。同じヘルペスウイルスに属するヒト単純ヘルペスウイルスは知覚神経節細胞内に潜伏し、発熱、紫外線、性交、治療などのストレスで細胞性免疫が低下すると、潜伏ウイルスが増殖し、疱疹の発症を招く[116]。EEHV-HDの発症は、他のヘルペスウイルスに類似し、離乳、飼育担当者・飼料・トレーニング法の変更、季節の変動などの様々なライフイベントによるストレスが誘因とされている[56]。適切な飼育管理下では、通常のライフイベントが大きなストレスにはならずEEHV血症を起こしにくい。人工哺育や早期離乳あるいは孤児といった状態下では免疫状態が低下しやすく、EEHV血症を起こすリスクが高い[47]。したがって、動物園などの臨床現場でのLAMP法による継続的なモニタリングの実施は、EEHV-HDの早期発見に貢献するものと考えられる。

第2章の仔ゾウは、死後、鼻部筋組織を用いたPCR法とシーケンスによりEEHV1A型陽性と診断された個体である。今回、同組織を用いてLAMP法を実施したところEEHV1A型陽性であった。本例の飼育当時は園内でEEHVに対する警戒を行っておらず、月に1度の定期健康診断のみを実施していた。仮に、本例に対してLAMP法による定期的検査を実施していたならば、ウイルス血症を事前に検知できた可能性が高く、早期治療も可能であったと考えられた。本

例は、生前、無症状のまま突然死し、死後にEEHV-HDと診断されたが、今後、同様の例を未然に防ぐためにもウイルス血症を事前に検知することが重要である。また、今回、LAMP法によるEEHV1型検出は組織材料を用いても可能であったことから、死後診断でも有用と考えられた。また、EEHV血症個体の鼻腔内洗浄液や唾液からのウイルス検出の報告[32]もあることから、今後、LAMP法においても血液以外の生体材料を用いた検査についての検討が必要である。

4. 小括

EEHVは、若齢アジアゾウに急性致死性出血病を引き起こす原因ウイルスである。本章では臨床現場で実施可能なEEHV診断法の開発を目的とし、新たに設計したEEHV1型検出用のプライマーを使用するLAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法によるEEHV診断を試みた。既に陽性/陰性が診断されている全血21サンプルを材料に検討したところ、陽性1サンプルと陰性20サンプルを正確に検出した。人工EEHV1型DNAを添加した全血サンプルを用いた検討では、検出限界は $10^{1.2}$ コピー/ μL となり、既存のPCR法よりも100倍以上高感度であった。若齢アジアゾウ5頭に対して本法を用いて、週に1回の血中EEHV1型のモニタリングを約2年間実施したところ、1度も検出されなかった。また、死亡後に採取した第2章の人工哺育個体の組織サンプルを検査したところ、EEHV1型陽性の所見が得られ、PCR法による診断と一致した。LAMP法は迅速・高感度で増幅産物を直ちに目視できる比較的簡易な検査方法である。以上の結果から、本章で開発したLAMP法を使い、若齢アジアゾウのEEHV血症をモニタリングし早期に診断することで早期治療への臨床応用が期待できる。

Table 5. EEHV1型検出LAMP法用に設計したプライマーセットおよびPCR法に用いたプライマーセット

方法	プライマー名	ヌクレオチドシーケンス(5'-3')	参照
LAMP法	F1P(F1c+F2)	CGACTTTTCTAACATGCGGGTTTAA CGA-GAGGAGGATGTTACAATGGTCA	This study
	B1P(B1c+B2)	CTCTCGCAACTGTTAACGTCGTG-CATAAGGGGATCTTTACAATGCTTC	This study
	LF	ACCCTAACC GGTTGGTGG	This study
	LB	CGGAACGCAAAAGCTGTCAGG	This study
	F3	TGTAACCCGAGTATCATTTCAAGC	This study
PCR法 ¹⁾	B3	GCACGTTAGTTT TAGAGCCAG	This study
	6710	ACAAACACGCGTGTGTRGTRTCYCORTA	[53]
	6711	GTATTTGATTTYGCNAGYYTGTAYCC	[53]
	6712	TGYAAYGCCGTTNTAYGGATTTYACCCGG	[53]

¹⁾初回ラウンド PCR: 6710/6711, 第2ラウンド PCR: 6710/6712 [53].

5. 図表

Table 6.人工合成EEHV1A POL DNA プラスミドを用いたLAMP法とPCR法の感度の比較

	精製水/全血中の人工合成EEHV1A POL DNA (コピー数/μL)										DNA無添加の 精製水/全血		50% 検出限界 (コピー数/μL)
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹						
LAMP 法													
精製水 + DNA	20/20 ^a	20/20	20/20	20/20	10/20	6/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	10 ^{0.7}
全血 + DNA	20/20	20/20	20/20	18/20	6/20	4/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	10 ^{1.2}
PCR 法													
精製水 + DNA	20/20	20/20	6/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	10 ^{3.3}
全血 + DNA	20/20	20/20	1/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	10 ^{3.5}

^a 陽性数 / 試験数. ^b NT: 試験未実施.

Table 7. 人工合成EEHV1B POL DNA プラスミドを用いたLAMP法とPCR法の感度の比較

	精製水/全血中の人工合成EEHV1B POL DNA (コピー数/μL)										DNA無添加の 精製水/全血	50% 検出限界 (コピー数/μL)
	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10 ¹	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹		
LAMP 法												
精製水 + DNA	20/20 ^a	20/20	20/20	20/20	20/20	14/20	5/20	0/20	0/20	0/20	0/20	10 ^{0.5}
全血 + DNA	20/20	20/20	20/20	16/20	8/20	2/20	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20	10 ^{1.2}
PCR 法												
精製水 + DNA	20/20	20/20	2/20	0/20	0/20	0/20	0/20	NT ^b	0/20	0/20	0/20	10 ^{3.4}
全血 + DNA	20/20	20/20	1/20	0/20	0/20	0/20	0/20	NT	0/20	0/20	0/20	10 ^{3.5}

^a 陽性数 / 試験数. ^b NT: 試験未実施.

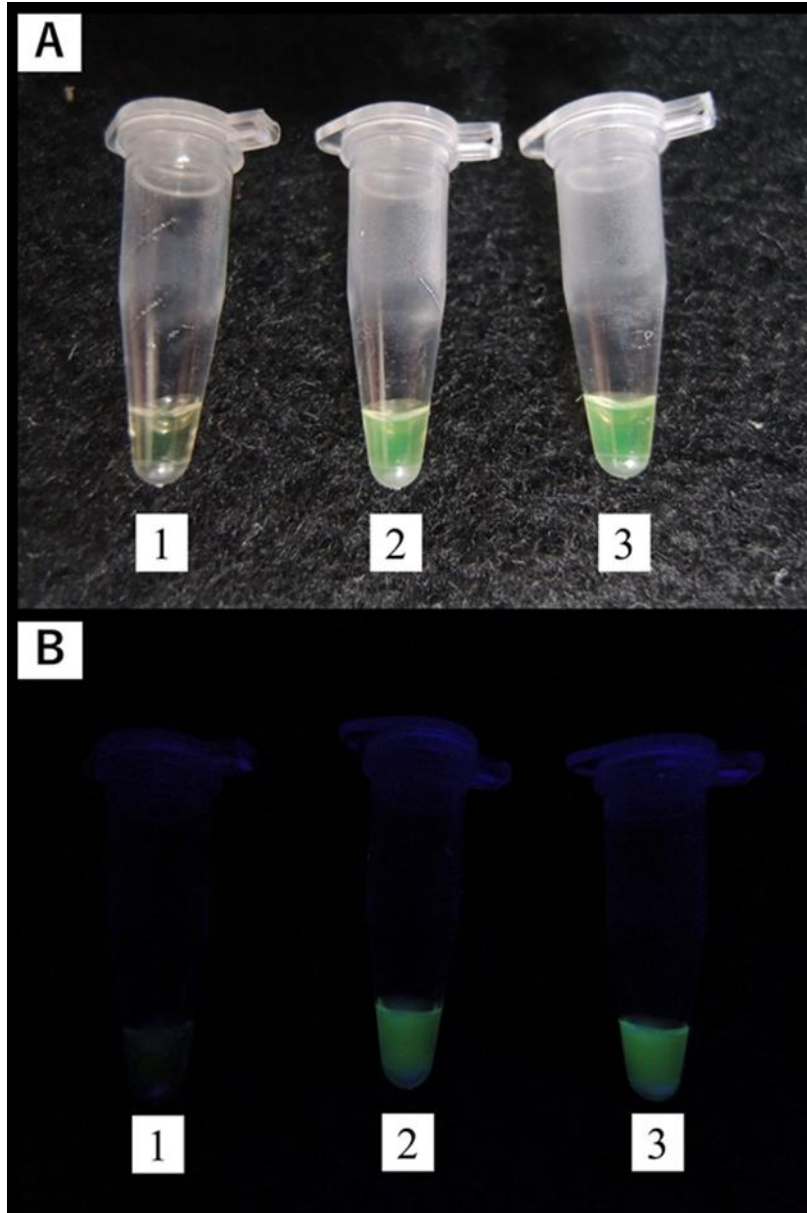


Figure 12. LAMP法によるEEHV1型陽性／陰性の判定

No.1: EEHV1型 陰性サンプル

No.2: EEHV1型 陰性サンプル+人工合成EEHV1型DNAプラスミド

No.3: EEHV1型 陽性サンプル

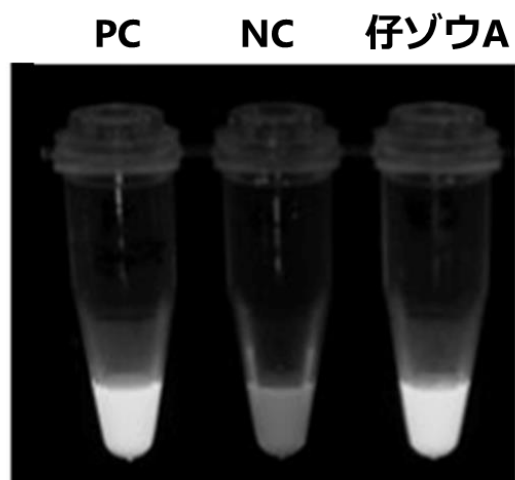


Figure 13. LAMP法による仔ゾウAの鼻部筋組織由来EEHV1型DNAの検出

PC: ポジティブコントロール

NC: ネガティブコントロール

総合考察

本学位論文では、若齢アジアゾウの健全な成育を妨げる要因である骨代謝障害ならびにEEHV血症に着目し、これらの早期診断を可能にする血中骨代謝マーカー測定法と血中EEHV検出法の開発を行った。

第1章では、アジアゾウの血中骨代謝マーカーの骨代謝評価のための基準を把握するために、破骨細胞由来の骨吸収マーカーであるTRAP5bならびに骨芽細胞由来の骨形成マーカーであるBAPを測定し、年齢や性別との関係を検討した。また、BAPの代替指標として血中ALP3の測定に関する検討も行なった。第1章第1節にて、アジアゾウ10頭の骨代謝マーカー値は年齢と負の相関係数を示しており、加齢に伴う骨代謝の低下が示唆された。第1章第2節でも同様に、4頭のアジアゾウ個体の骨代謝マーカー値には年齢による差が認められた。第2章の自然哺乳個体の結果も併せると、アジアゾウの一生涯における血中骨代謝マーカー値はL字型に近い推移を示すと考えられた。すなわち、血中骨代謝マーカー値は出生後に最高値を示し、1歳齢では約50%まで低下した。さらに2歳齢では約25%まで下降し、以降は緩やかに減少した。このような推移は、ヒトの一生涯の血中骨代謝マーカー値の変化[70]と類似するものであった。血中骨代謝マーカー値の低下が緩慢になるのは、骨代謝の主体が骨の発育・成長を伴う形成過程であるモデリングから発育後の大きさや形態変化を伴わない骨の再構築であるリモデリングへ転換される時期であり、ヒトでは18歳頃に相当する[70]。アジアゾウでは出生後の体重（約100kg）は3歳齢頃まで急速に増加（約1000kg）し、その後の増加は緩やかである[72]。このように、アジアゾウの体重増加が減速する年齢は、血中骨代謝マーカーの低下が収まる年齢とおおむね一致していた。一方、ヒトでは、血中骨代謝マーカー値の測定結果から、骨発育のピークが幼児期（1-4歳）と思春期前半（10-14歳）の2度あることが報

告されている[70, 74]。アジアゾウにおいても、今後、多くの個体の血中骨代謝マーカー値を測定することで、成長時期における骨の発達過程や骨代謝動態の詳細が明らかになると考えられる。

哺乳期のアジアゾウにおいて様々な要因が骨代謝に影響を及ぼすことが予想される。第2章において、自然哺育個体の血中骨代謝マーカー値は人工哺育個体より高値を示したことから、仔ゾウの骨代謝に母乳とその摂取量が影響を与えた可能性がある。牛における先行研究では、牛乳中に含まれるナノ粒子が破骨細胞の分化を促進すること[71]、新生子牛の血中ALPおよびBAP活性値は初乳の摂取量に依存すること[30]が報告されており、今回のアジアゾウの所見と類似していた。また、乳中の骨代謝マーカー値を測定した結果、アジアゾウの初乳中の骨代謝マーカー値は常乳よりも高く、人工哺育に用いたヤギ生乳の値はアジアゾウの常乳と同程度であるが、人工ゾウミルク中の値は明らかに低値であった。このことから哺乳期の仔ゾウの骨代謝に乳中の骨代謝マーカーの関与が推測されるが、その因果関係の究明には、仔ゾウの骨代謝に対する母乳の生理作用を解明する必要がある。

第3章では、若齢アジアゾウに急性致死性出血病を引き起こすEEHV-HD[55]の迅速・高感度な診断法の開発を目的として、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を応用した血中EEHV1型検出法を検討した。作製した6種のプライマーを用いて、LAMP法により2017-2018年に日本国内で得られた全血21サンプルを検査したところ、陽性1サンプルと陰性20サンプルを正確に診断することができた。また、人工合成EEHV1型DNAを添加した全血サンプルを用いて検討した結果、検出限界は $10^{1.2}$ コピー/ μL であり、従来のPCR法よりも100倍以上高感度であった。2年にわたりLAMP法を用いて15歳以下のアジアゾウ5頭のEEHV1型のモニタリングを実施したところ、ウイルス遺伝子は1度も検

出されることはなかった。なお、LAMP法では、第2章の人工哺育個体の死亡後の組織サンプルでもEEHV1型の検出が可能であった。以上より、LAMP法は迅速・高感度で増幅産物を直ちに目視できる比較的簡易な検査方法であり[67, 76]、臨床現場においても実施可能な検査であった。

人工哺育個体は死亡後にEEHV-HDと診断されたが、当時、当園ではEEHVに対する警戒を行っておらず、生前に診断することができなかった。今後、LAMP法によるモニタリングを導入することでウイルス血症を迅速に生前診断することが可能となり、本例のような無症状の例に対しても早期の治療開始が可能と考える。一方、この人工哺育個体は、血中骨代謝マーカ値から骨代謝が低下した状態であったため、LAMP法によるモニタリングでEEHV-HDを回避できたとしても、骨代謝異常により成長が阻害された可能性がある。

本研究では若齢アジアゾウの成長を妨げる危険因子として、骨疾患とEEHV-HDに着目したが、これらの他にも様々な危険要因がアジアゾウの周りには存在するため[59]、日頃からの警戒が必要である。アジアゾウの健全な育成のためには、日常的な健康管理に加え、血中骨代謝マーカ値の測定による骨代謝評価とLAMP法を用いたEEHV血症のモニタリングを同時に行う総合的診療システムの構築が必要と考えられる。最後に、本研究の成果が国内外で有効活用され、将来的な飼育下アジアゾウの個体数増加につながることを期待する。

総括

1. アジアゾウにおいて、骨代謝マーカーであるTRAP5bとBAPの血中活性を測定した。これらの活性値には年齢と負の相関関係が認められ、加齢に伴い低下した。また、両骨代謝マーカーの活性値には正の相関関係が認められ、両者の比は多くの個体で一定範囲内に収まった。他の動物種と同様に、血中TRAP5bとBAP活性値は骨吸収と骨形成を反映する指標となり、これらの比率から骨代謝バランスの推定が可能であると考えられた。

2. ヒト医療分野で普及しているAGEキットを用いて、アジアゾウの血清中ALPアイソエンザイムALP3（骨型分画）を測定し、従来法で測定したBAP活性値と比較した。のべ51サンプルのALP3およびBAP活性値は高い正の相関関係が認められた。両活性値は医学的測定法の一致基準を満たしたことから、アジアゾウのALP3活性値はBAP活性値に代替できると考えられた。従来法と比較し、AGE法は全自動で測定が可能であること、また肝型分画であるALP2も同時に測定できる利点を持つ。

3. 1歳2ヵ月齢で突然死した人工哺育アジアゾウの仔ゾウについて生前の健康状態を調べる目的で、個体管理記録データと凍結保存血清を用いて測定した骨代謝マーカー値をもとに回顧的検討を行った。人工哺育個体の体格は健全な自然哺育個体と同等であったが、血液検査所見から栄養不足と低免疫状態が疑われた。人工哺育個体の血清ALP3とTRAP5b活性値は自然哺育個体より低値であったことから、骨代謝低下の状態が疑われた。骨代謝の異常は、体格測定所見には現れず、一般血液検査では検出できなかったため、骨代謝マーカー測定の必要性有用が改めて示唆された。

4. 遺伝子増幅法であるLAMP法を応用し、アジアゾウEEHV血症の簡易診断法を開発した。これまでに陽性、陰性が判明している全血サンプルを用いた

検証は、既存のPCR法と一致する結果が得られた。LAMP法による検出限界は、PCR法よりも100倍以上高感度であった。LAMP法を用いて、第2章の人工哺育個体の死亡後の組織サンプルからEEHVの検出が可能であった。LAMP法は迅速・高感度な遺伝子増幅法で、目視によりウイルス感染の陽性・陰性が判別できるため、臨床における汎用性は高い。今後、LAMP法を若齢アジアゾウのEEHV血症を現場で直ちに判定することが可能になり、診断と早期治療開始による救命率向上が期待される。

謝辞

稿を終えるにあたり、終始ご指導とご校閲を賜りました大阪府立大学生命環境科学研究科獣医学専攻（元帯広畜産大学獣医学研究部門）教授・山岸則夫博士に深甚なる謝意を表します。本研究における実験手技およびサンプル測定にご協力いただき、数々のご助言を賜りました北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター講師・松野啓太博士、岐阜大学大学連合獣医学研究科研究員（兼帯広畜産大学客員研究員）・羽立薫博士、帯広畜産大学大学院畜産学研究科畜産科学専攻前期課程大学院生・大吞瑠莉花氏ならびに日本競走馬協会競走馬総合研究所研究役・根本学博士に心から感謝申し上げます。本学位論文の作成に際して数多くのご指導・ご助言を賜りました大阪府立大学生命環境科学研究科獣医学専攻教授・小川和重博士、教授・川手憲俊博士ならびに教授・嶋田照雅博士に深く感謝申し上げます。最後に本研究の重要性を理解し、実施を快諾していただいた、市原ぞうの国園長・坂本小百合氏をはじめ、研究にご協力いただいた市原ぞうの国ならびに豊橋総合動植物公園、恩賜上野動物園、神戸市立王子動物園、沖縄こどもの国のスタッフ各位に衷心より感謝いたします。

参考文献

1. Allen, M. J. 2003. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Vet. Clin. Pathol.* **32**: 101-113.
2. Arya, N., Moonarmart, W., Cheewamongkolnimit, N., Keratikul, N., Poon-lam, S., Routh, A., Bumpenpol, P. and Angkawanish, T. 2015. Osteocalcin and bone-specific alkaline phosphatase in Asian elephants (*Elephas maximus*) at different ages. *Bri. Vet. J.* **206**: 239-240.
3. Barber, M. R., Lee, S. M., Steffens, W. L., Ard, M., and Fayrer-Hosken, R. A. 2001. Immunolocalization of zona pellucida antigens in the ovarian follicle of dogs, cats, horses and elephants. *Theriogenology.* **55**: 1705-1717.
4. Behr, W. and Barnet, J. 1986. Quantification of bone alkaline phosphatase in serum by precipitation with wheat-germ lectin: a simplified method and its clinical plausibility. *Clin. Chem.* **32**: 1960-1966.
5. Bieglmayer, C., and Kudlacek, S. 2009. The bone marker plot: an innovative method to assess bone turnover in women. *Eur. J. Clin. Invest.* **39**: 230-238.
6. Bland, J. M., and Altman, D. G. 2007. Agreement between methods of measurement with multiple observations per individual. *J. Biopharm. Stat.* **17**: 571-582.
7. Camassa, J. A., Diogo, C. C., Sousa, C. P., Azevedo, J. T., Viegas, C. A., Reis, R. L.,

- Dourado, N. and Dias, I. R. 2017. Bone turnover markers in sheep and goat: A review of the scientific literature. *An. Acad. Bras. Cienc.* **89**: 231-245.
8. Chiba, A., Onomi, R., Hatate, K., Moriyama, T., Goto, A. and Yamagishi, N. 2020. Peripartum changes in serum activities of three major alkaline phosphatase isoenzymes in Holstein dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* **23**: 457-459.
9. Chopin, F., Garnero, P., le Henanff, A., Debiais, F., Daragon, A., Roux, C., Sany, J., Wendling, D., Zarnitsky, C. and Thomas, T. 2008. Long-term effects of infliximab on bone and cartilage turnover markers in patients with rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* **67**: 353-357.
10. Civitelli, R., Armamento-Villareal, R., and Napoli, N. 2009. Bone turnover markers: understanding their value in clinical trials and clinical practice. *Osteoporos. Int.* **20**: 843-851.
11. Clubb, R., and Mason, G. 2002. A review of the welfare of zoo elephants in Europe. West Sussex: RSPCA, Horsham.
12. Critchley, L. A., and Critchley, J. A. 1999. A meta-analysis of studies using bias and precision statistics to compare cardiac output measurement techniques. *J. Clin. Monit. Comput.* **15**: 85-91.
13. Dastjerdi, A., Seilern-Moy, K., Darpel, K., Steinbach, F., and Molenaar, F. 2016.

- Surviving and fatal Elephant Endotheliotropic Herpesvirus-1A infections in juvenile Asian elephants—lessons learned and recommendations on anti-herpesviral therapy. *BMC Vet. Res.* **12**: 178.
14. Davis, S., and Benirschke, K. 1991. Observation on the placenta of elephants. pp. 39-45. *In*: 33rd International Symposium on Erkrankungen der Zoo und Wildtiere.
15. DeLaurier, A., Jackson, B., Pfeiffer, D., Ingham, K., Horton, M. A., and Price, J. S. 2004. A comparison of methods for measuring serum and urinary markers of bone metabolism in cats. *Res. Vet. Sci.* **77**: 29-39.
16. Eastell, R., Robins, S. P., Colwell, T., Assiri, A. M. A., Riggs, B. L., and Russell, R. G. G. 1993. Evaluation of bone turnover in type I osteoporosis using biochemical markers specific for both bone formation and bone resorption. *Osteoporos. Int.* **3**: 255-260.
17. Finnegan, M., and Monti, M. 2001. Surgical management of phalangeal osteomyelitis in a female Asian elephant (*Elephas maximus*). pp. 135-137. *In*: The Elephant's Foot: Prevention and Care of Foot Conditions in Captive Asian and African Elephants (Csuti, B. A., Sargent, E. L. and Bechert, U. S. eds.), Iowa State University Press, Ames.
18. Fohr, B., Dunstan, C. R. and Seibel, M. J. 2003. Markers of bone remodeling in

- metastatic bone disease. *J. Clin. End. Metab.* **88**: 5059-5075.
19. Fowler, M., and Mikota, S. K. 2008. Biology, medicine, and surgery of elephants. Blackwell Publishing, Ames.
20. Fuery, A., Tan, J., Peng, R., Flanagan, J. P., Tociłowski, M. E., Howard, L. L., and Ling, P. D. 2016. Clinical infection of two captive Asian elephants (*Elephas maximus*) with elephant endotheliotropic herpesvirus 1B. *J. Zoo. Wildl. Med.* **47**: 319-324.
21. 藤本文志, 城田正則, 秋山功, 坪井五三美, 星野忠. 2020. L-タイプワコー ALP・IFCC 試薬の基本性能の評価と基準範囲に関する検討—アルカリホスファターゼ活性測定の IFCC 法と JSCC 法の比較—. *医学検査*, **69**: 577-583.
22. Fuller, C. J., Barr, A. R., Sharif, M., and Dieppe, P. A. 2001. Cross-sectional comparison of synovial fluid biochemical markers in equine osteoarthritis and the correlation of these markers with articular cartilage damage. *Osteoarthritis Cartilage.* **9**: 49-55.
23. Gage, L. J. 2008. Neonatal elephant mortality. pp.365-368. *In: Zoo and wild animal medicine* (Fowler, M. E. and Miller R. E. eds.), Saunders Elsevier, St. Louis.
24. Garner, M. M., Helmick, K., Ochsenreiter, J., Richman, L. K., Latimer, E., Wise, A. G., Mase, R. K., Kiupel, M., Nordhausen, R. W., Zong, J. C. and Hayward, G. S.

2009. Clinico-pathologic features of fatal disease attributed to new variants of endotheliotropic herpesviruses in two Asian elephants (*Elephas maximus*). *Vet. Pathol.* **46**: 97-104.
25. Ghosal, R., Ganswindt, A., Seshagiri, P. B. and Sukumar, R. 2013. Endocrine correlates of musth in free-ranging Asian elephants (*Elephas maximus*) determined by non-invasive faecal steroid hormone metabolite measurements. *PLoS One.* **8**: e84787.
26. Gomez Jr, B., Ardakani, S., Ju, J., Jenkins, D., Cerelli, M. J., Daniloff, G. Y., and Kung, V. T. 1995. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin. Chem.* **41**: 1560-1566.
27. Greenblatt, M. B., Tsai, J. N. and Wein, M. N. 2017. Bone Turnover Markers in the Diagnosis and Monitoring of Metabolic Bone Disease. *Clin. Chem.* **63**: 464-474.
28. Halleen, J. M., Tiitinen, S. L., Ylipahkala, H., Fagerlund, K. M., and Vaananen, H. K. 2006. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP 5b) as a marker of bone resorption. *Clin. Lab.* **52**: 499-510.
29. Hartley, M. and Stanley, C. 2016. Survey of Reproduction and Calf Rearing in Asian and African Elephants in Europe. *J. Zoo Aqua. Res.* **4**: 139-146.
30. Hatate, K., Kayano, M., Kawashima, C., Hanada, M., Bicalho, R. C., and

- Yamagishi, N. 2018. The effect of colostrum intake on osteoprotegerin and bone metabolic markers in the blood of newborn calves during the first week of life. *J. Vet. Med. Sci.* **81**: 15-21.
31. Hatayama, K., Nishihara, Y., Kimura, S., Goto, K., Nakamura, D., Wakita, A., and Urasoko, Y. 2011. Alkaline phosphatase isoenzymes in mouse plasma detected by polyacrylamide-gel disk electrophoresis. *J. Toxicol. Sci.* **36**:211-219.
32. Hengtrakul, P., Sudlapa, P., Chaisurat, N., Sodsaengthien, S., Chamnankij, C., Noimoon, S., Punkong, C., Phatthanakunanan, S., Lertwatcharasarakul, P. and Sripiboon, S. 2020. Biological and environmental factors associated with the detection of elephant endotheliotropic herpesvirus in Asian elephants (*Elephas maximus*) in Thailand. *J. Vet. Med. Sci.*: 20-0309.
33. Horney, B. S., Farmer, A. J., Honor, D. J., MacKenzie, A., and Burton, S. 1994. Agarose gel electrophoresis of alkaline phosphatase isoenzymes in the serum of hyperthyroid cats. *Vet. Clin. Pathol.* **23**: 98-102.
34. Howard, L. L., and Schaftenaar, W. 2018. Elephant Endotheliotropic Herpesvirus. pp. 672-679. *In*: Miller-Lus's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy, Volume 9. (Miller, R. E., Lamberski, N., and Calle, P. eds.), Elsevier Health Sciences, Amsterdam.

35. Hsu, S. H. J., and Tsai, K. S. 1997. Different age-related trends of bone and nonbone forms of alkaline phosphatase in Chinese men and women. *Clin. Chem.* **43**: 186-188.
36. 飯野四郎. 1995. アイソザイム分析による病態診断 アルカリホスファターゼ アイソザイム. *日本臨床* **53**: 1157-61.
37. Inoue, Y., Matsui, A., Asai, Y., Aoki, F., Yoshimoto, K., Matsui, T., and Yano, H. 2008. Response of biochemical markers of bone metabolism to exercise intensity in Thoroughbred horses. *J. Equine. Sci.* **19**: 83.
38. Isaza, R., and Hunter, R. P. 2004. Drug delivery to captive Asian elephants-treating Goliath. *Curr. Drug. Deliv.* **1**: 291-298.
39. Itoh, H., Kakuta, T., Genda, G., Sakonju, I., and Takase, K. 2002. Canine serum alkaline phosphatase isoenzymes detected by polyacrylamide gel disk electrophoresis. *J. Vet. Med. Sci.* **64**: 35-39.
40. Jackson, B., Eastell, R., Russell, R. G. G., Lanyon, L. E., and Price, J. S. 1996. Measurement of bone specific alkaline phosphatase in the horse: a comparison of two techniques. *Res. Vet. Sci.* **61**: 160-164.
41. Jackson, B.F., Lonnell, C., Verheyen, K., Wood, J. L., Pfeiffert, D. U. and Price, J.S. 2003. Gender differences in bone turnover in 2-year-old Thoroughbreds. *Equine.*

Vet. J. **35**: 702-706.

42. 片井信之, 乙津和歌, 成島悦雄. 2017. ゾウの知恵. SPP出版, 東京.
43. Kawano, H., Sato, T., Yamada, T., Matsumoto, T., Sekine, K., Watanabe, T., Nakamura, T., Fukuda, T., Yoshimura, K., Yoshizawa, T., Aihara, K., Yamamoto, Y., Nakamichi, Y., Daniel, M., Pierre, C., Nakamura, K., Kawaguchi, H. and Kato, S. 2003. Suppressive function of androgen receptor in bone resorption. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 9416-9421.
44. Kendall, R., Howard, L., Masters, N., and Grant, R. 2016. The impact of elephant endotheliotropic herpesvirus on the captive Asian elephant (*Elephas maximus*) population of the United Kingdom and Ireland (1995–2013). *J. Zoo. Wildl. Med.* **47**: 405-418.
45. Khan, M., Wang, R., Li, B., Liu, P., Weng, Q., and Chen, Q. 2018. Comparative evaluation of the LAMP assay and PCR-based assays for the rapid detection of *Alternaria solani*. *Front. Microbiol.* **9**: 2089.
46. Kido, N., Tanaka, S., Omiya, T., Shoji, Y., Senzaki, M., Hanzawa, S., Ando, M., Osaki, T., Hatai, H., Miyoshi, N., Hifumi, T., Suzuki, N. and Kawakami, S. 2018. Novel treatment for chronic pododermatitis in an Indian elephant (*Elephas maximus indicus*) with Mohs' paste. *J. Vet. Med. Sci.* **80**: 1834-1838.

47. Kilgallon, C., Flach, E., Boardman, W., Routh, A., Strike, T. and Jackson, B. 2008. Analysis of biochemical markers of bone metabolism in Asian elephants (*Elephas maximus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* **39**: 527-536.
48. Kiso, W. K., Wiedner, E., Isaza, R., Lindsay, W., Aria, J., Jacobson, G., Jacobson, K. and Schmitt, D. 2017. Reproductive parameters and birth statistics for a herd of Asian elephants (*Elephas maximus*) in North America over a 20-year period. *J. Zoo. Wildl. Med.* **48**: 987-996.
49. 小山英則, 田畑勉, 森田有津子, 井上隆, 三木隆巳, 西沢良記, & 森井浩世. 1990. Neuraminidase 前処理によるアルカリフォスファターゼ・アイソザイムの解析. *日本透析療法学会雑誌* **23**: 1267-1270.
50. Kurihara, A., Okada, A., Morimoto, K. and Iwao, K. 1999. Effects of different feeding methods on growth and blood properties in calves. *Bull. Tottori. Anim. Husb. Exp. Stn.* **29**: 12-16 (in Japanese).
51. Kurt, F. and Garai, M. E. 2006. The Asian elephant in captivity: a field study. Cambridge University Press, New Delhi.
52. Lacoste, H., Fan, T. M., Lorimier, L-P. Charney, S. C. 2006. Urine N-telopeptide excretion in dogs with appendicular osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* **20**: 335-341.
53. Latimer, E., Zong, J. C., Heaggans, S. Y., Richman, L. K., and Hayward, G. S. 2011.

- Detection and evaluation of novel herpesviruses in routine and pathological samples from Asian and African elephants: identification of two new probosciviruses (EEHV5 and EEHV6) and two new gammaherpesviruses (EGHV3B and EGHV5). *Vet. Microbiol.* **147**: 28-41.
54. Leung, K. S., Fung, K. P., Sher, A. H., Li, C. K., and Lee, K. M. 1993. Plasma bone-specific alkaline phosphatase as an indicator of osteoblastic activity. *J. Bone. Joint. Surg. Bri.* **75**: 288-292.
55. Long, S. Y., Latimer, E. M., and Hayward, G. S. 2016. Review of elephant endotheliotropic herpesviruses and acute hemorrhagic disease. *ILAR J.* **56**: 283-296.
56. Luz, S., and Howard, L. 2016. Elephant endotheliotropic herpesvirus (EEHV) in Asia: recommendations from the 1st Asian EEHV strategy meeting. Guidelines for management 2nd edition. Wildlife Reserves Singapore Group, Singapore.
57. Mason, G. J., and Veasey, J. S. 2010. What do population - level welfare indices suggest about the well - being of zoo elephants? *Zoo. Biol.* **29**: 256-273.
58. Matsuo, A., Togashi, A., Sasaki, K., Devkota, B., Hirata, T. and Yamagishi, N. 2014. Diurnal variation of plasma bone markers in Japanese black calves. *J. Vet. Med. Sci.* **76**: 1029-1032.
59. Miller, D., Jackson, B., Riddle, H. S., Stremme, C., Schmitt, D., and Miller, T. 2015.

- Elephant (*Elephas maximus*) health and management in Asia: variations in veterinary perspectives. *Vet. Med. Int.* **2015**: 614690.
60. Mohebbi, A., Khaghani, K. and Mohammadnia, A. 2010. Bone-specific alkaline phosphatase activity in dairy cows. *Comp. Clin. Pathol.* **19**: 33–36.
61. Mumby, C., Bouts, T., Sambrook, L., Danika, S., Rees, E., Parry, A., Rendle, M., Masters, N. and Weller, R. 2013. Validation of a new radiographic protocol for Asian elephant feet and description of their radiographic anatomy. *Vet. Rec.* **173**: 318.
62. Naot, D., Grey, A., Reid, I. R. and Cornish, J. 2005. Lactoferrin—a novel bone growth factor. *Clin. Med. Res.* **3**: 93-101.
63. Nawawi, H., Samson, D., Apperley, J., and Girgis, S. 1996. Biochemical bone markers in patients with multiple myeloma. *Clin. Chim. Acta.* **253**: 61-77.
64. Nemoto, M., Ohta, M., Tsujimura, K., Bannai, H., Yamanaka, T., Kondo, T., and Matsumura, T. 2011. Direct detection of equine herpesvirus type 1 DNA in nasal swabs by loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *J. Vet. Med. Sci.* **73**: 1225-1227.
65. 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会編. 2009. 臨床検査のガイドラインJSLM2009. 日本臨床検査医学会, 東京.

66. Nirmalan, G., and Nair, S. G. 1969. Biochemical studies on the blood of Indian elephants (*Elephas maximus*). *Res. Vet Sci.* **10**: 176-180.
67. Njiru, Z. K. 2012. Loop-mediated isothermal amplification technology: towards point of care diagnostics. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**: e1572.
68. Nofs, S. A., Atmar, R. L., Keitel, W. A., Hanlon, C., Stanton, J. J., Tan, J., Flanagan, J. P., Howard, L. and Ling, P. D. 2013. Prenatal passive transfer of maternal immunity in Asian elephants (*Elephas maximus*). *Vet. Immunol. Immunopathol.* **153**: 308-311.
69. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids Res.* **28**: E63.
70. 太田博明. 2012. 骨形成マーカー 「骨型アルカリフォスファターゼ」 測定の意義と測定法に関する新たな進展. *Modern Media*, **58**: 143-148.
71. Oliveira, M. C., Ceglie, I. D., Arntz, O. J., Van Den Berg, W. B., Van Den Hoogen F. H. J., Ferreira, A. V. M., Van Lent, P. L. E. M. and Van De Loo, F. A. J. 2017. Milk-derived nanoparticle fraction promotes the formation of small osteoclasts but reduces bone resorption. *J. Cell. Physiol.* **232**: 225-233.
72. Olson, D. 2004. Elephant Husbandry Resource Guide. Amer. Zoo. Aquar. Assoc.,

Silver Spring, Maryland.

73. Ooi, K., Shiraki, K., Morishita, Y., and Nobori, T. 2007. High - molecular intestinal alkaline phosphatase by agarose gel electrophoresis. *J. Clin. Lab. Anal.* **21**: 140-146
74. Orito, S., Kuroda, T., Onoe, Y., Sato, Y., and Ohta, H. 2009. Age-related distribution of bone and skeletal parameters in 1,322 Japanese young women. *J. Bone. Miner. Metab.* **27**: 698-704.
75. Palmeira, P., Quinello, C., Silveira-Lessa, A. L., Zago, C. A., and Carneiro-Sampaio, M. 2011. IgG placental transfer in healthy and pathological pregnancies. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**:985646.
76. Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L., and Morita, K. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. med. virol.* **18**: 407-421.
77. Phuangkum, P., Lair, R. C., and Angkawanith, T. 2005. Elephant care manual for mahouts and camp managers. FAO Regional Office for Asia and the Pacific, Bangkok.
78. Rauch, F., Middelman, B., Cagnoli, M., Keller, K. M., and Schönau, E. 1997. Comparison of total alkaline phosphatase and three assays for bone - specific

- alkaline phosphatase in childhood and adolescence. *Acta. Paediatr.* **86**: 583-587.
79. Rauchenzauner, M., Schmid, A., Heinz-Erian, P., Kapelari, K., Falkensammer, G., Griesmacher, A., Finkenstedt, G. and Högler, W. 2008. Sex- and age-specific reference curves for serum markers of bone turnover in healthy children from 2 months to 18 years. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **92**: 443-449.
80. Reed, L. J., and Muench, H. 1938. A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hyg.* **27**: 493-497.
81. Rees, P. A. 2011. Animal welfare and veterinary care. pp. 223-244. *In*: An introduction to zoo biology and management. (Rees, P. A. eds.), John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
82. Richman, L. K., and Hayward, G. S. 2012. Elephant herpesviruses. pp. 496-502. *In*: Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine Current Therapy Volume 7. (Miller, R. E., and Fowler, M. eds.), Elsevier Health Science, Amsterdam.
83. Richman, L. K., Montali, R. J., Garber, R. L., Kennedy, M. A., Lehnhardt, J., Hildebrandt, T., Schmitt, D., Hardy, D., Alcendor, D. J. and Hayward, G. S. 1999. Novel endotheliotropic herpesviruses fatal for Asian and African elephants. *Science*, **283**: 1171-1176.
84. Rissanen, J. P., Suominen, M. I., Peng, Z. and Halleen, J. M. 2008. Secreted tartrate-

- resistant acid phosphatase 5b is a marker of osteoclast number in human osteoclast cultures and the rat ovariectomy model. *Calcif. Tissue Int.* **82**: 108–115.
85. Roocroft, A., 川口幸男. 2019. 動物園は進化する. 筑摩書房, 東京.
86. Sahoo, P. R., Sethy, K., Mohapatra, S., and Panda, D. 2016. Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Vet. World.* **9**: 465-469.
87. Sangild, P. T. 2003. Uptake of colostral immunoglobulins by the compromised newborn farm animal. *Acta Vet. Scand. Suppl.* **98**: 105-122.
88. Saragusty, J., Hermes, R., Göritz, F., Schmitt, D. L., and Hildebrandt, T. B. 2009. Skewed birth sex ratio and premature mortality in elephants. *Anim. Reprod. Sci.* **115**: 247-254.
89. Sato, J., Kanata, M., Yasuda, J., Sato, R., Okada, K., Seimiya, Y., and Naito, Y. 2005. Changes of serum alkaline phosphatase activity in dry and lactational cows. *J. Vet. Med. Sci.* **67**: 813-815.
90. Schaftenaar, W., Reid, C., Martina, B., Fickel, J., and Osterhaus, A. D. M. E. 2010. Nonfatal clinical presentation of elephant endotheliotropic herpes virus discovered in a group of captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* **41**: 626-632.

91. Schmit, J. M., Pondenis, H. C., Barger, A. M., Borst, L. B., Garrett, L. D., Wypij, J. M., Neumann, Z. L. and Fan, T. M. 2012. Cathepsin K expression and activity in canine osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* **26**: 126-134.
92. Schreiber, W. E., and Sadro, L. C. 1988. Agarose gel patterns of alkaline phosphatase isoenzymes before and after treatment with neuraminidase. *Am. J. Clin. Pathol.* **90**:181-186.
93. Seibel, M. J. 2005. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin. Biochem. Rev.* **26**: 97-122.
94. Shimizu, M., Iida, K., Yoshida, H., and Shichinohe, K. 1996. Electrophoretic study of lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase isoenzymes of the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*). *J. Vet. Med. Sci.* **58**: 401-406.
95. Shimizu, Y., and Ichihara, K. 2015. Sources of variation analysis and derivation of reference intervals for ALP, LDH, and amylase isozymes using sera from the Asian multicenter study on reference values. *Clin. Chim. Acta.* **446**: 64-72.
96. Siegal-Willott, J. L., Alexander, A., and Isaza, R. 2012. Digital radiography of the elephant foot. pp. 515-523. *In: Zoo and Wild Animal Medicine* (Fowler, M. E. and Miller, R. E. eds.). Saunders Elsevier, St. Louis.
97. Sousa, C. P., de Azevedo, J. T., Reis, R. L., Gomes, M. E. and Dias, I. R. 2014.

- Short-term variability in biomarkers of bone metabolism in sheep. *Lab. Anim.* **43**: 21-26.
98. Sousa, C. P., Nery, F., de Azevedo, J. T., Viegas, C. A., Gomes, M. E. and Dias, I. R. 2011. Tartrate-resistant acid phosphatase as a biomarker of bone turnover in dog. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **63**: 40-45.
99. Sousa, C., Abreu, H., Viegas, C., Azevedo, J., Reis, R., Gomes, M., and Dias, I. 2011. Serum total and bone alkaline phosphatase and tartrate-resistant acid phosphatase activities for the assessment of bone fracture healing in dogs. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **63**: 1007-1011.
100. Sripiboon, S., Angkawanish, T., Boonprasert, K., Sombutputorn, P., Langkaphin, W., Ditcham, W., and Warren, K. 2017. Successful treatment of a clinical elephant endotheliotropic herpesvirus infection: The dynamics of viral load, genotype analysis, and treatment with acyclovir. *J. Zoo. Wildl. Med.* **48**: 1254-1259.
101. Sripiboon, S., Ditcham, W., Vaughan-Higgins, R., Jackson, B., Robertson, I., Thitaram, C., Angkawanish, T., Phatthanakunanan, S., Lertwatcharasarakul, P., and Warren, K. 2020. Subclinical infection of captive Asian elephants (*Elephas maximus*) in Thailand with elephant endotheliotropic herpesvirus. *Arch. Virol.* **165**: 397-401.

102. Stanton, J. J., Cray, C., Rodriguez, M., Arheart, K. L., Ling, P. D., and Herron, A. 2013. Acute phase protein expression during elephant endotheliotropic herpesvirus-1 viremia in Asian elephants (*Elephas maximus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* **44**: 605-612.
103. Stanton, J. J., Zong, J. C., Eng, C., Howard, L., Flanagan, J., Stevens, M., Schmitt, D., Wiedner, E., Graham, D., Junge, R. E., Weber, M. A., Fischer, M., Mejia, A., Tan, J., Latimer, E., Herron, A., Hayward, G. S., and Ling, P. D. 2013. Kinetics of viral loads and genotypic analysis of elephant endotheliotropic herpesvirus-1 infection in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *J. Zoo. Wildl. Med.* **44**: 42-54.
104. Syakalima, M., Takiguchi, M., Yasuda, J., and Hashimoto, A. 1998. The canine alkaline phosphatases: a review of the isoenzymes in serum, analytical methods and their diagnostic application. *Jpn. J. Vet. Res.* **46**: 3-11.
105. Takatsu, Z., Tsuda, M., Yamada, A., Matsumoto, H., Takai, A., Takeda, Y., and Takase, M. 2016. Elephant's breast milk contains large amounts of glucosamine. *J. Vet. Med. Sci.* **79**: 524-533.
106. Thorén - Tolling, K. 1988. Serum alkaline phosphatase isoenzymes in the horse—variation with age, training and in different pathological conditions.

Zentralbl. Veterinarmed. A. **35**: 13-23.

107. Toba, Y., Takada, Y., Matsuoka, Y., Morita, Y., Motouri, M., Hirai, T., Suguri, T., Aoe, S., Kawakami, H., Kumegawa, M., Takeuchi, A. and Itabashi, A. 2001. Milk basic protein promotes bone formation and suppresses bone resorption in healthy adult men. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 1353-1357
108. Van den Doel, P. B., Prieto, V. R., van Rossum-Fikkert, S. E., Schaftenaar, W., Latimer, E., Howard, L., Chapman, S., Masters, N., Osterhaus, A. D. M. E., Ling, P. J. and Dastjerdi, A. 2015. A novel antigen capture ELISA for the specific detection of IgG antibodies to elephant endotheliotropic herpes virus. *BMC Vet. Res.* **11**: 203.
109. Van Der Kolk, J. H., Van Leeuwen, J. P. T. M., Van Den Belt, A. J. M., Van Schaik, R. H. N., and Schaftenaar, W. 2008. Subclinical hypocalcaemia in captive Asian elephants (*Elephas maximus*). *Vet. Rec.* **162**: 475-479.
110. Van Hoof, V. O., Hoylaerts, M. F., Geryl, H., Van Mullem, M., Lepoutre, L. G., and De Broe, M. E. 1990. Age and sex distribution of alkaline phosphatase isoenzymes by agarose electrophoresis. *Clin. Chem.* **36**: 875-878.
111. Van Sonsbeek, G. R., Van der Kolk, J. H., Van Leeuwen, J. P. and Schaftenaar, W. 2011. Preliminary validation of assays to measure parameters of calcium metabolism in captive Asian and African elephants in western Europe. *J. Vet. Diagn.*

- Invest.* **23**: 504-510.
112. Vignochi, C. M., Silveira, R. C., Miura, E., Canani, L. H. and Procianoy, R. S. Physical therapy reduces bone resorption and increases bone formation in preterm infants. 2012. *Am. J. Perinatol.* **29**: 573-8.
113. Viljakainen, H. T., Väisänen, M., Kemi, V., Rikkonen, T., Kröger, H., Laitinen, E.K., Rita, H. and Lamberg-Allardt, C. 2009. Wintertime vitamin D supplementation inhibits seasonal variation of calcitropic hormones and maintains bone turnover in healthy men. *J. Bone Miner. Res.* **24**: 346-352.
114. Wiedner, E., Kiso, W. K., Aria, J., Isaza, R., Lindsay, W., Jacobson, G., Jacobson, K. and Schmitt, D. 2017. Vital signs and first occurrences in normal and abnormal newborn asian elephant (*elephas maximus*) calves. *J. Zoo. Wildl. Med.* **48**: 997-1015.
115. Wilkie, G. S., Davison, A. J., Watson, M., Kerr, K., Sanderson, S., Bouts, T., Steinbach, F., and Dastjerdi, A. 2013. Complete genome sequences of elephant endotheliotropic herpesviruses 1A and 1B determined directly from fatal cases. *J. virol.* **87**: 6700-6712.
116. 山田雅夫, 新居志郎. 1985. 単純ヘルペスウイルスの潜伏感染とその機構. *ウイルス*, **35**: 1-10.

117. Yamagishi, N., Takehana, K., Kim, D., Miura, M., Hirata, T., B. Devkota, Sato, S. and Furuhashi, K. 2009. Fluorometric method for measuring plasma tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b and its application in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* **71**: 1637-1642.
118. Zhan, F., Watanabe, Y., Shimoda, A., Hamada, E., Kobayashi, Y., and Maekawa, M. 2016. Evaluation of serum bone alkaline phosphatase activity in patients with liver disease: comparison between electrophoresis and chemiluminescent enzyme immunoassay. *Clin. Chim. Acta.* **460**: 40-45.