

総説

乳牛罹患牛におけるカルシウム治療への反応性と末梢血単核球の遺伝子発現プロファイリングに関する研究

佐々木 恒弥

要約

乳熱症例を対象とした診療記録の回顧的調査によって、従前のバイオマーカーであった臨床症状および血液生化学検査所見では乳熱の病態と予後を判定することは困難であるが、乳熱罹患牛への初回治療では、Ca単独製剤を選択することが妥当と考えられた。また、臨床現場において採取可能な細胞材料である末梢血単核球細胞を標的細胞とした遺伝子発現プロファイリングにより、乳熱の病態を反映する可能性が高い6遺伝子 (*PKIB*, *DDIT4*, *PER1*, *NUAK1*, *EST (BI537947)* および *NESP55*) が抽出され、乳熱の診断および病態解析のバイオマーカーとしての臨床応用が期待された。

キーワード：乳熱，カルシウム，疫学研究，遺伝子発現プロファイリング

乳熱は分娩前後の乳牛に発生する非発熱性の疾患であり、罹患牛は弛緩麻痺を伴う進行性の神経筋障害、起立不能、循環障害、皮温低下、意識低下ならびに昏睡等の特徴的な臨床症状を呈する [1-4]。本疾病は、高産歴および高泌乳能力を有する乳牛での発症が多い代謝性疾患である [5-8]。米国における1970年代から現在までの乳熱の発生率は5~10% [4, 5] であり、日本国内でも年間およそ6万頭が発症している [9]。今日に至るまで乳熱に関して様々な研究が実施されてきたが、未だ完全な治療や予防法の確立には至っておらず、その病態についても不明な点が多い。現在、乳熱の治療法として、体重100kgあたりのCa投与量として2gのCa製剤の静脈内投与 (Ca治療) が推奨されている [10]。臨床現場において、獣医師の判断によってPおよびMgを含有するCa製剤 [1, 4, 11] や上記推奨量より多いCa投与量 [1, 12] での静脈内投与による治療が行われることも多いが、十分な科学的根拠のないまま獣医師の裁量によって使用されているのが現状である。乳熱罹患牛の多くが初回Ca治療に良好な反応を示す一方で、治療に反応せずに複数回の治療を必要とする症例も多く、Ca治療に反応せず死亡または廃用の転帰を辿る症例も少なくない [1]。これまでCa治療の反応性に影響を与える要因や生物学的指

標 (バイオマーカー) を探求する研究が多く行われてきたが [13-18]、一定の知見が得られているとは言い難い。これは、乳熱が代謝性疾患であることを勘案すれば、泌乳能力だけでなく、乳牛の飼養管理やそれを取り巻く各種環境が、乳熱の病態に複雑な影響を与えるためと考えられる。

近年、分子生物学的手法の発展に伴い、細胞材料における包括的な遺伝子発現情報の集積が可能となり、細胞の生理的あるいは病的状態と遺伝子発現動態とを直接関連付けて解析する遺伝子発現プロファイリング (gene expression profiling) が可能となり、従来のバイオマーカーである臨床症状や血液生化学所見とは異なる側面からの、新たな病態解明ツールとして注目されている。特に、マイクロアレイ法は細胞由来のmRNAの発現を網羅的に解析する画期的な遺伝子発現解析手法であり、疾病の病態解析に広く応用されている。しかし、臨床現場において、生体の体組織や細胞を採取するためには、生検や部位によっては手術が必要であり、このような侵襲性が高い組織材料の採取には、飼主の同意を得にくく、日常のかつ継続的な採材は困難である。そのため、乳熱発症時における細胞レベルでの病態は不明な点が多く、未開拓な分野と言える。近年、このような問題点を克服できるとして、末

表1 初回治療に用いた2種類のCa製剤の治療成績

	n=	転機		
		単回治療治癒	複数回治療治癒	死亡・廃用
Ca単剤投与群	32	9 (28.1 %)	15 (46.9 %)	8 (25.0 %)
Ca混剤投与群	32	10 (31.2 %)	14 (43.8 %)	8 (25.0 %)
総計	64	19 (29.7 %)	29 (45.3 %)	16 (25.0 %)

表2 乳熱罹患牛の初診時年齢、分娩後日数および臨床症状スコア所見

	Ca単剤投与群			Ca混剤投与群		
	単回治療治癒 (n=9)	複数回治療治癒 (n=15)	死亡・廃用 (n=8)	単回治療治癒 (n=10)	複数回治療治癒 (n=14)	死亡・廃用 (n=8)
年齢 (歳)	6.2 ± 1.7	7.1 ± 1.6	6.9 ± 1.8	6.8 ± 1.7	6.6 ± 1.6	6.6 ± 1.4
分娩後日数 (日)	1.2 ± 1.4	0.6 ± 1.1	0.4 ± 0.5	0.7 ± 1.2	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.7
臨床症状スコア*	3.0 ± 0.9	3.6 ± 1.1	3.8 ± 1.3	3.2 ± 0.8	3.3 ± 1.0	4.3 ± 1.0

Mean±SD.

*：臨床症状スコア：乳熱の診断基準に用いた起立不能，食欲不振，四肢冷感，尾力低下，頻脈 (>80回/分)，呼吸促進 (>36回/分)，低体温 (<38.0℃)，昏睡の8つの乳熱症状の総数。

梢白血球を標的細胞とした研究が開始され，ウシの一部の疾病に対して解析が進められている [19, 20, 21]. また，Kimuraら [22] は乳熱罹患牛では分娩前および低Ca血症の発現以前からPBMC内のCa²⁺貯留量は減少するため，生体内Caの欠乏による細胞機能への影響は低Ca血症を呈する前に生じることを報告している．細胞内Ca²⁺はセカンドメッセンジャーとして，遺伝子発現，アポトーシス，細胞接着，細胞遊走ならびに細胞増殖などの様々な細胞機能の調節に重要な役割を果たしている [23, 24] ことから，末梢白血球を利用した細胞内の遺伝子発現解析は乳熱の診断や病態解析のための新たなバイオマーカーを抽出できる可能性があると考えられる．本研究では，未解決の課題が少なくない乳熱の病態を再検証することを目的として，以下の研究を行った．

1 乳熱罹患牛における2種類のCa製剤による治療への反応性に関する回顧的研究

岩手県北部を診療地域とする産業動物診療施設における診療記録の回顧的調査を行い，乳熱罹患牛に対して日本国内で広く普及している2種類のCa製剤を初回治療に用いた場合の治療効果を検証するとともに，従前からの病態と予後判断のバイオマーカーである臨床症状および血液生化学検査所見と治療への反応性との関係について検討した．

過去4年間の診療記録より抽出した64症例を，初回治療としてボログルコン酸Caの単独製剤（グルカ注：共立製薬，東京，日本）500ml（Caとして10.5g）を静脈内投与された群（Ca単剤投与群；n=32）と，PとMgを含有したボログルコン酸Ca混合製剤（ニューグ

ロンプラス：共立製薬，東京，日本）500ml（Caとして12.4g，Pとして1.5g，Mgとして2.6g）を静脈内投与された群（Ca混剤投与群；n=32）に分類した．さらに，これらをCa治療に対する反応性によって，治療後1日以内に起立した場合（単回治療治癒），起立までに複数日，複数回の治療を実施した場合（複数回治療治癒）および治療に反応せず死亡・廃用になった場合（死亡・廃用）の3つのカテゴリーに分類した．両群の治療成績を比較した結果，初回治療に用いた2種類のCa製剤の治療効果に有意な差は認められなかった（表1）．

また，乳熱の病態ならびに予後判断のバイオマーカーとして初診時の年齢，分娩後日数，臨床症状スコア（乳熱の診断基準に用いた起立不能，食欲不振，四肢冷感，尾力低下，頻脈 (>80回/分)，呼吸促進 (>36回/分)，低体温 (<38.0℃)，昏睡の8つの乳熱症状の総数)，血清生化学検査所見として初診時の血清Ca，iP，Mg，AST濃度の各項目を解析した．64症例中6症例（9.4%）は低Ca血症のみを呈し，残り58症例（90.6%）は低Ca血症 (<7.0mg/dl) と低P血症 (<4.0mg/dl) を併発したが，低Mg血症は全症例で認められなかった．治療への反応性に関する各カテゴリーにおける年齢，分娩後発症日数および臨床スコアには，各Ca製剤投与群の群内比較および各カテゴリーの異なるCa治療群間比較において有意差はみられなかった（表2）．同様に，血清生化学検査所見（血清中のCa，iPおよびMg濃度ならびにAST活性値）においても有意差は認められなかった（図1）．

以上より，乳熱罹患牛に対する初回Ca治療において，Ca単独製剤とPとMgを含有するCa混合製剤の静

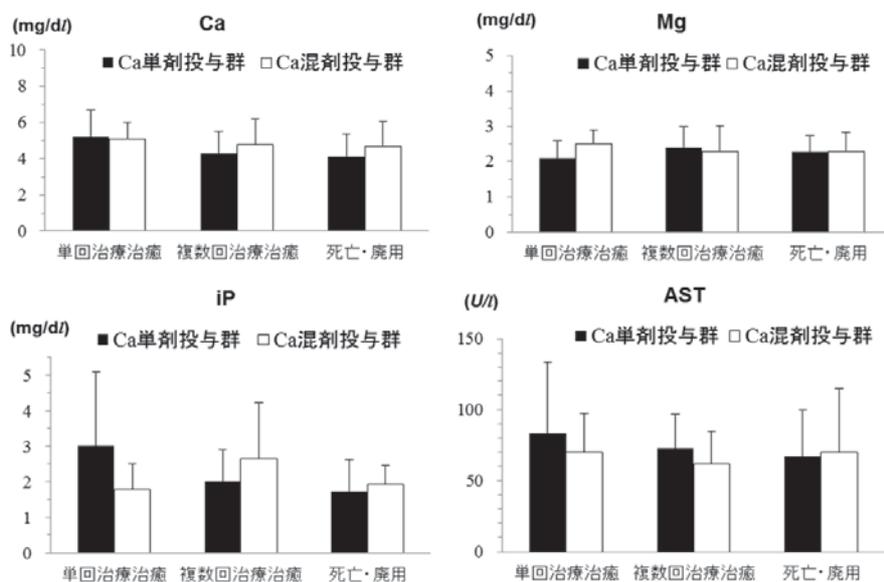


図1 乳熱罹患牛の初診時血清生化学検査所見
Mean±SD.

脈内投与の治療効果は同程度であることが明らかとなった。すなわち、血液検査所見が得られない臨床現場において、乳熱の臨床診断が下された乳牛への初回治療には、Ca単独製剤を選択することが妥当と考えられた。また、臨床症状および血液生化学検査所見では、乳熱の病態と予後を判定することは困難と考えられた。

2 実験的低Ca血症モデル牛ならびに乳熱罹患牛における末梢血単核球 (PBMC) の遺伝子発現プロファイリング

乳熱の新たな病態解明手法としてPBMC内遺伝子発現に着目し、低Ca血症および乳熱の病態に関わる新規バイオマーカーになる可能性が高い遺伝子の探索を目的に、実験的低Ca血症モデル牛ならびに乳熱罹患牛から採取したPBMCについてcustomized bovine oligonucleotide microarray (GPL9284, Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA)を用いたマイクロアレイ解析を実施するとともに、両者に共通して発現変動が認められた遺伝子について定量的Real-time RT-PCR (qRT-PCR)による定量を行った。

実験的低Ca血症実験では子宮・卵巣摘出済ホルスタイン種乳牛4頭(6.3~8.3歳, 体重520~665kg)を用いて2週間間隔の2×2のクロスオーバーデザインで実施した。10%Na₂EDTA溶液を4時間静脈内投与し(低Ca血症誘発群), 実験的低Ca血症を誘発した。この対照処置として, 11%CaEDTA溶液の4時間静脈内投与(対照群)を行った。低Ca血症誘発群ではNa₂EDTAの投与中に全頭で第一胃運動の減少, 鼻鏡乾燥, 耳介及び四肢冷感といった低Ca血症に特徴的な

臨床症状が認められ, 投与開始後2.5~4時間の間で乳牛は起立不能を呈した。Na₂EDTA投与の終了によって臨床症状は改善し, 8時間後には全ての臨床症状は消失した。血漿Ca濃度は低Ca血症誘発群においてNa₂EDTA投与開始後に速やかに減少し, 2時間後に最低値(3.6±0.4 mg/dl)を示した(図2)。投与終了後の血漿Ca濃度は速やかに上昇し, 24時間後には投与前と同レベルに回復した。対照群では低Ca血症に特徴的な臨床症状の発現は認められず, 血漿Ca濃度にも有意な変動は認められなかった。

両処置の0, 4および24時間後の血液についてPBMCを分離し, RNAを抽出後, PBMC内遺伝子発現プロファイリングに供した結果, 32遺伝子が低Ca血症に対して特異的な発現変化(上昇または減少)を示した遺伝子として同定された。

乳熱罹患牛に関する実験では, 分娩後2日以内に低Ca血症(<7.0mg/dl)を伴い乳熱と診断された起立不能牛8例を, Ca治療への反応性から, 初回治療に良好に反応し単回治療によって起立した群(単回治療治癒群; n=4)と起立までに複数回の治療を必要とした群(複数回治療群; n=4)の2群に分類した。また, 分娩後2日以内の健常分娩牛(対照群; n=5)を対照とした。これらから採取したPBMCの遺伝子発現プロファイリングの結果, 乳熱罹患牛(単回治療治癒群および複数回治療群)に特異的な発現を示した98遺伝子を検出した(図3)。

実験的低Ca血症モデル牛より同定された32遺伝子ならびに乳熱罹患牛より同定された98遺伝子を照合した結果, 低Ca血症と乳熱に特異的な5つの遺伝子とし

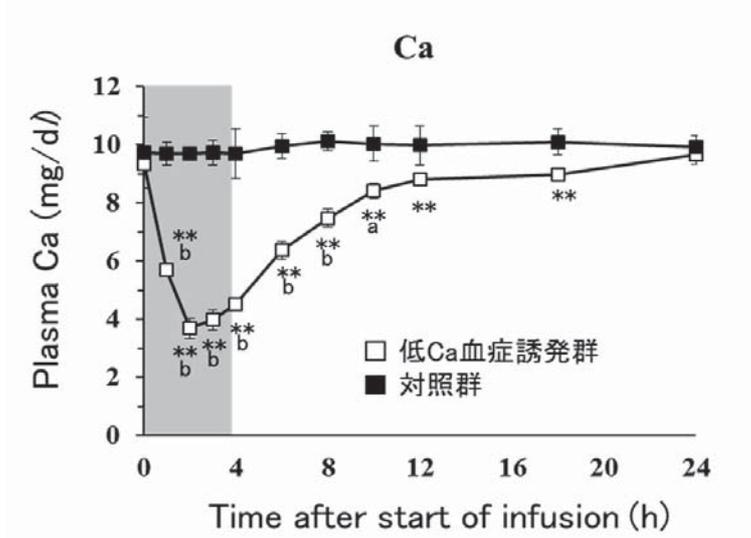


図2 実験的低Ca血症モデル牛作製実験における血漿Ca濃度の推移 Mean±SD.
 a : P < 0.05, b : P < 0.01 (各群の投与前と比較).
 * : P < 0.05, ** : P < 0.01 (同時間で両群間の比較).

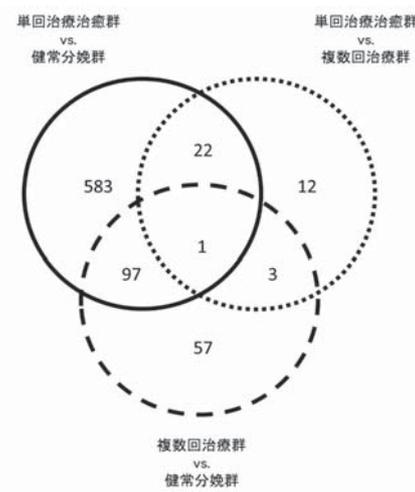


図3 乳熱罹患牛（単回治療治癒および複数回治療群）ならびに健常分娩群の遺伝子プロファイリングにおいて検出された遺伝子数
 実線円：単回治療治癒群と健常分娩群の比較にて有意差の認められた遺伝子。
 破線円：複数回治療群と健常分娩群の比較にて有意差の認められた遺伝子。
 点線円：単回治療治癒群と複数回治療群の比較にて有意差の認められた遺伝子。

て、protein kinase (cAMP-dependent, catalytic) inhibitor beta (*PKIB*), DNA-damage-inducible transcript 4 (*DDIT4*), period homolog 1 (*PER1*), NUA family, SNF1-like kinase, 1 (*NUAK1*) およびEST (BI537947) の5遺伝子が抽出された。qRT-PCR解析において、これらの遺伝子は、乳熱罹患牛（単回治療治癒群および複数回治療群）において健常分娩群に比較して有意に高い遺伝子発現量を示した（図4）。*PKIB*は小胞体からのCa放出を誘起するIP3の産生を抑制するcAMP依存性プロテインキナーゼ (PKA) 抑制因子の一つであり [25-27]、乳熱罹患牛におけるこのmRNA発現の増強は、乳熱罹患牛のPBMC内小胞体からのCa放出の減弱 [22] を裏付

ける所見と考えられた。*DDIT4* および*PER1* 発現の増加はストレスやデキサメサゾン投与によって発現の増強が報告されている遺伝子であり [28, 29]、低Ca血症および乳熱に起因する血中コルチゾールの増加との関連が示唆された。また、細胞のインスリン感受性を減弱させることで細胞内グルコース代謝を抑制する事が報告されている*NUAK1* [30] の発現増強は、乳熱罹患牛において低Ca血症が生体内エネルギー代謝に抑制的な影響を与えることが示唆された。*BI537947* は未だに機能が不明であるが、今後コードするタンパク質の機能が明らかになることで乳熱との関連が明らかになる可能性があると考えられた。また、マイクロアレイおよびqRT-PCRによる解析において、実験的

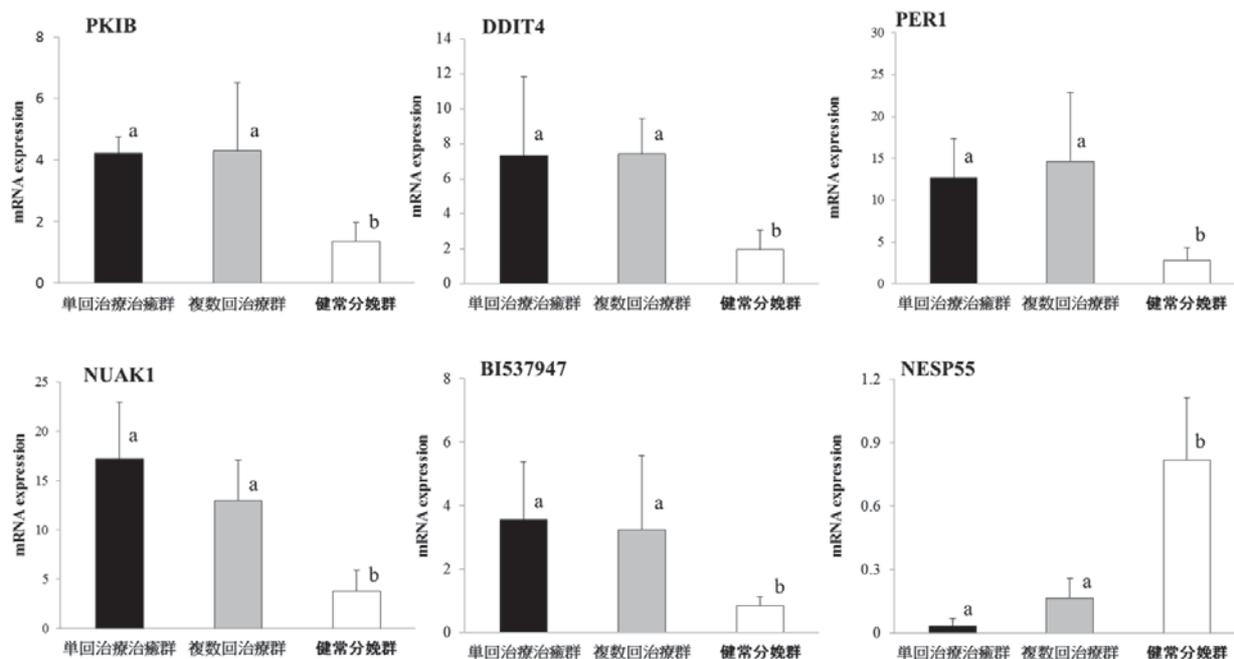


図4 乳熱罹患者牛（単回治療治療群および複数回治療群）ならびに健常分娩群における各遺伝子のPBMC内mRNA発現（qRT-PCR）GAPDHにて補正。
Mean±SD。
a-b：P<0.05（異なる文字間で有意差有）。

低Ca血症モデルでは抽出されなかったが、乳熱罹患者牛（単回治療治療群および複数回治療群）と健常分娩群との間の発現量に有意差を示す遺伝子として neuroendocrine secretory protein 55 (*NESP55*) が検出された。この遺伝子は、低Ca血症とは別の観点から、乳熱の病態を反映した可能性が推察された。

本研究により、従前のバイオマーカーであった初診時の臨床症状および血液生化学検査所見では乳熱の病態と予後を判定することは困難であるが、臨床的に乳熱と診断された乳牛への初回治療では、Ca単独製剤を選択することが妥当と考えられた。これは、臨床獣医師が往診現場で獣医師が科学的根拠に基づく治療（evidence-based medicine, EBM）を行う上での根拠になると考えられた。また、今回、臨床現場において採取可能な細胞材料であるPBMCを標的細胞とした遺伝子発現プロファイリングにより乳熱の病態を反映する可能性が高い6遺伝子が抽出され、将来、乳熱の診断および病態解析の新たなバイオマーカーとしての臨床応用が期待された。

謝 辞

本研究にあたり、多大なる御指導を賜りました岩手大学産業動物臨床学研究室 山岸則夫教授に深謝いたします。また、研究にご協力頂いた生理学研究室 橋

爪一善先生および木崎景一郎先生に心より感謝の意を表します。

なお、本研究の一部はSasaki K, Sasaki K, Sato Y, Devkota B, Furuhashi K, Yamagishi N: Response of Holstein Cows with Milk Fever to First Treatment using Two Calcium Regimens: A Retrospective Clinical Study, The Journal of Veterinary Medical Science, 75, 373-376 (2013) ならびにSasaki K, Yamagishi N, Kizaki K, Sasaki K, Devkota B, Hashizume K: Microarray-based Gene Expression Profiling of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Dairy Cows with Experimental Hypocalcemia and Milk Fever, Journal of Dairy Science, 97, 247-258 (2014) に掲載されていますので、興味のある方は参照していただければ幸いです。

引用文献

- [1] Goff JP: Large Animal Internal Medicine, Smith, B. P, eds, 4th ed., 1369-1377, Mosby, St. Louis (2009)
- [2] Littledike ET, Glazier D, Cook HM: Electrocardiographic changes after induced hypercalcemia and hypocalcemia in cattle: reversal of the induced arrhythmia with atropine, American Journal of Veterinary

- Research, 37, 383-388 (1976)
- [3] Mulligan FJ, Doherty ML : Production diseases of the transition cow, *The Veterinary Journal*, 176, 3-9 (2007)
- [4] Radostits OM, Gay CC, Hinchcliff KW : *Veterinary Medicine. A textbook of the Disease of Cattle, Horses, Sheep, Pigs, Goats and Horses*, Radostits OM, et al. eds, 1626-1644, Saunders, London (2007)
- [5] DeGaris PJ, Lean IJ : Milk fever in dairy cows : A review of pathophysiology and control principles, *The Veterinary Journal*, 176, 58-69 (2008)
- [6] Goff JP, Kimura K, Horst RL : Effect of mastectomy on milk fever, energy, and vitamin A, E and beta-carotene status at parturition, *Journal of Dairy Science*, 85, 1427-1436 (2002)
- [7] Hansen SS, Ersboll AK, Blom JY : Preventive strategies and risk factors for milk fever in Danish dairy herds: A questionnaire survey, *Preventive Veterinary Medicine*, 80, 271-286 (2007)
- [8] Rajala-Schultz PJ, Grohn YT, McCulloch CE : Effects of Milk Fever, Ketosis, and Lameness on Milk Yield in Dairy Cows, *Journal of Dairy Science*, 82, 288-294 (1999)
- [9] 農林水産省経営局保険課 編集 : 平成15-22年度家畜共済統計表, 農林水産省経営局, 東京 (2003-2010)
- [10] Goff JP : The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows, *The Veterinary Journal*, 176, 50-57 (2008)
- [11] Hunt E, Blackwelder JT : *Large Animal Internal Medicine*, Smith BP, eds, 3rd ed, 1248-1252, Mosby, St. Louis (2002)
- [12] Doze JG, Donders R, van der Kolk JH : Effects of intravenous administration of two volumes of calcium solution on plasma ionized calcium concentration and recovery from naturally occurring hypocalcemia in lactating dairy cows, *American Journal of Veterinary Research*, 69, 1346-1350 (2008)
- [13] Fenwick DC : Parturient Paresis (milk Fever) of cows. 4. Rectal temperature, *Australian Veterinary Journal*, 45, 123-126 (1969)
- [14] Fenwick DC : Parturient Paresis (milk Fever) of cows: 6. Significance of the position of cows when attended, *Australian Veterinary Journal*, 45, 454-455 (1969)
- [15] Fenwick DC : The relationship between certain blood constituents in cows with milk fever and the response following treatment with calcium borogluconate solutions, *Australian Veterinary Journal*, 67, 102-104 (1990)
- [16] Gelfert CC, Alpers I, Dallmeyer M : Factors affecting the success rate of treatment of recumbent dairy cows suffering from hypocalcaemia, *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 54, 191-198 (2007)
- [17] Menard L, Thompson A : Milk fever and alert downer cows: does hypophosphatemia affect the treatment response?, *The Canadian Veterinary Journal*, 48, 487-491 (2007)
- [18] Waage S, Jaastad OV, Blom AK : Plasma concentrations of cortisol in cows with hypocalcaemia in relation to their responses to treatment with calcium, *Research in Veterinary Science*, 36, 164-168 (1984)
- [19] Almeida PE, Weber PSD, Burton JL : Gene expression profiling of peripheral mononuclear cells in lame dairy cows with foot lesions, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 120, 234-245 (2007)
- [20] Ishida S, Yonezawa T, Eirai S : Hormonal differences in peripheral blood and gene profiling in the liver and lymphocytes in Japanese black cattle with growth retardation, *The Journal of Veterinary Medical Science*, 75, 17-25 (2013)
- [21] Newman JH, Holt TN, Hedges LK : High-altitude pulmonary hypertension in cattle (brisket disease) : Candidate genes and gene expression profiling of peripheral blood mononuclear cells, *Pulmonary Circulation*, 4, 462-469 (2011)
- [22] Kimura K, Reinhardt TA, Goff JP : Parturition and hypocalcemia blunts calcium signals in immune cells of dairy cattle, *Journal of Dairy Science*, 89, 2588-2595 (2006)
- [23] Hardingham GE, Bading H : Calcium as a Versatile Second Messenger in the Control of Gene Expression, *Microscopy Research and Technique*, 46, 348-355 (1999)

- [24] Yang H, Zhang Q, He J : Regulation of calcium signaling in lung cancer, *Journal of Thoracic Disease*, 2, 52-56 (2010)
- [25] Guse AH, Roth E, Emmrich F : Intracellular Ca^{2+} pools in Jurkat T-lymphocytes, *Biochemical Journal*, 291, 447-451 (1993)
- [26] Oh-hora M, Rao A : Calcium signaling in lymphocytes, *Current Opinion in Immunology*, 20, 250-258 (2008)
- [27] Zheng L, Yu L, Tu Q : Cloning and mapping of human PKIB and PKIG, and comparison of tissue expression patterns of three members of the protein kinase inhibitor family, including PKIA, *The Biochemical Journal*, 349, 403-407 (2000)
- [28] Nebzydowski SJ, Pozzo S, Nemeč L : The effect of dexamethasone on clock gene mRNA levels in bovine neutrophils and lymphocytes, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 138, 183-192 (2010)
- [29] Wang H, Kubica N, Ellisen L : Dexamethasone Represses Signaling through the Mammalian Target of Rapamycin in Muscle Cells by Enhancing Expression of REDD1, *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 39128-39134 (2006)
- [30] Inazuka F, Sugiyama N, Tomita M : Muscle-specific Knock-out of NUA Family SNF1-like Kinase 1 (NUAK1) Prevents High Fat Diet-induced Glucose Intolerance, *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 16379-16389 (2012)

文 献 抄 録

アデノウイルス性筋胃びらんがみられたブロイラー種鶏
およびブロイラーにおける垂直感染および臨床徴候

Grafl B, Aigner F, Liebhart D, Marek A,
Prokofieva I, Bachmeier J, Hess M
(ウィーン獣医大学, オーストリア)
Avian Pathol, 41, 599-604 (2012)

この研究では、ドイツにおける22のブロイラー群でみられたアデノウイルス性筋胃びらの発生が詳述されている。臨床症状は感染ブロイラーの不揃いな成長によって特徴づけられ、これはと殺時の平均重量の著しい低下を引き起こした。トリアデノウイルス血清型1 (FAdV-1) は、筋胃の病変から分離され、組織学的検査では *in situ* hybridization により感染ブロイラーの筋胃上皮細胞にFAdV-1 陽性の核内封入体が証明された。全ての感染群の鳥は、1つのブロイラー種鶏農場に由来していた。感染鶏が出現した間、ブロイラー種鶏は27～32週齢であっ

た。親鳥の血清を用いたELISAや特異的ウイルス中和法は、生産サイクルの始めの5週以内における急性FAdV-1感染を示した。臨床的には、ブロイラー種鶏の産卵は正常のままであったが、ひなのふ化率はゆるやかな低下を示した。その他の臨床症状は観察されなかった。遺伝的に同一のFAdV-1株が、ふ化率が最低の時の鶏胚の筋胃と、別の農場で育った感染ブロイラーから分離された。これまでで初めて、鶏胚の筋胃から生存可能なFAdV-1が直接的に検出されたことと、アデノウイルス性筋胃びらの発生がみられたFAdV-1血清陽性のブロイラー種鶏農場由来の子孫ウイルスが証明されたことから、本病の垂直感染の重要性が強調された。加えて、成長遅延とそれに伴うと殺時におけるブロイラー鶏の平均重量の減少は、家禽生産物に対するアデノウイルス性筋胃びらの経済的影響が強調される。

(岩手大学獣医病理学研究室)