

乳牛の胎盤における副甲状腺ホルモン関連タンパク質と

カルシウムトランスポーターに関する研究

麻布大学

獣医学部産業動物内科学研究室

風間 啓

目次

略語	1
要約	4
ABSTRACT (英文要約)	9
緒論	15

第1章

乳牛における子宮捻転に関する臨床疫学的調査	18
-----------------------	----

緒言

材料および方法

結果

考察

小括

第2章

乳牛の胎盤における副甲状腺ホルモン関連タンパク質と新生子牛のミネラル代謝の関係	36
---	----

緒言

材料および方法

結果

考察

小括

第3章

ウシ栄養膜由来培養細胞における副甲状腺ホルモン関連タンパク質の

ミネラル輸送調節作用・・・・・・・・・・・・・・・・・・49

緒言

材料および方法

結果

考察

小括

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・61

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・63

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・64

表および図・・・・・・・・・・・・・・・・・・85

略語

ACTB β -アクチン Beta Actin

Ba バリウム Barium

Ca カルシウム Calcium

CaBP カルシウム結合タンパク質 Calcium binding protein

CaSR カルシウム感知受容体 Calcium-sensing receptor

cDNA 相補的DNA complementary DNA

Co コバルト Cobalt

Cr クロム chromium

CTR1 銅輸送タンパク質1 Copper transporter 1

Cs セシウム Cesium

Cu 銅 Copper

DMT1 二価金属イオントランスポーター1 Divalent metal transporter 1

DNA デオキシリボ核酸 Deoxyribonucleic acid

Fe 鉄 Iron

FPN1 フェロポーチン Ferroportin

Ga ガリウム Gallium

GAPDH グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

iP 無機リン Inorganic phosphorus

LRP2 メガリン Low-density lipoprotein receptor-related protein 2

Mg マグネシウム Magnesium

Mn マンガン Manganese

Mo モリブデン Molybdenum

PCR ポリメラーゼ連鎖反応 Polymerase chain reaction

PTH 副甲状腺ホルモン（上皮小体ホルモン） Parathyroid hormone

PTH1R 副甲状腺ホルモン受容体 1（上皮小体ホルモン受容体 1）

Parathyroid hormone receptor 1

PTHrP 副甲状腺ホルモン関連タンパク質（上皮小体ホルモン関連タンパ

ク質） Parathyroid hormone-related protein

qPCR 定量的 PCR Quantitative real-time PCR

Rb ルビジウム Rubidium

RNA リボ核酸 Ribonucleic acid

RT 逆転写 Reverse transcription

Se セレン Selenium

Sr ストロンチウム Strontium

TFRC トランスフェリン受容体タンパク質 1 Transferrin receptor protein

1

TRPV 一過性受容体電位カチオンチャンネルサブファミリーV Transient
receptor potential cation channel subfamily vanilloid

VD ビタミン D Vitamin D

VDR ビタミン D 受容体 Vitamin D receptor

Zn 亜鉛 Zinc

ZIP7 Zrt- and Irt-like protein 7

ZNT5 亜鉛トランスポーター5 Zinc transporter 5

要約

乳牛において、周産期疾患は母牛の死亡リスクを高め、生産性の低下につながる事が知られている。特に、泌乳によって乳汁中にカルシウム (Ca) が大量に分泌されるため、分娩前後の低 Ca 血症が問題となっている。乳牛の低 Ca 血症は、第四胃変位、ケトosisなどの疾患の素因となり、母牛にかかる負担が大きい。一方で、母牛の血液中のミネラルは、胎盤を通じて胎子に移行していることから、母牛の低 Ca 血症は胎子にも影響があると考えた。しかし、乳牛の胎盤における Ca 輸送機構は十分に明らかにされていない。マウスにおいて、副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) が、胎盤における Ca 輸送を調節することが報告されている。そこで本研究では、乳牛の胎盤において、PTHrP が母体から胎子への Ca 輸送を調節するかを検討した。

乳牛の周産期疾患として、特に難産は胎子の死亡にもつながり、発症すると経済的損失が大きい。乳牛においては、分娩期の子宮捻転が難産の主要な原因として挙げられている。さらに、子宮捻転を含む難産は、低 Ca 血症がリスクとなることが知られている。また、正常産の牛よりも難産の牛で血漿中亜鉛 (Zn) 濃度が低いことが報告されており、ミネラル代謝異常は、ウ

シの難産のリスクを高めると考えられる。一方で、母牛が子宮捻転を発症した場合、胎子への捻転の影響を検討した報告は少ない。また、子宮捻転は、通常妊娠中に発症するが、分娩後に発症する例が少数ながら報告されており、その臨床疫学的特徴は明らかになっていない。そこで、第1章では、分娩後に子宮捻転を発症した乳牛23例について、臨床徴候、疫学的所見を調査したところ、分娩後10日前後に子宮内に悪露とガスが貯留し、子宮体部が捻転することが明らかとなった。さらに、起立困難や不能といった起立能力の異常を認め、血液検査では、軽度の低Ca血症が認められた。治療法としては、経直腸より手で、または開腹して腹腔内より捻転方向と反対方向に子宮を回転させることで容易に整復できた。一方、分娩期の子宮捻転では、子宮捻転を発症した乳牛から産まれた子牛は、捻転していない牛から産まれた子牛よりも7.85倍死産率が高かった。さらに、子宮捻転を発症した乳牛(n=15)、発症していない牛(n=27)、およびそれらから出生した新生子牛(n=9、およびn=26)について、血液中の微量ミネラル濃度を測定したところ、血清Zn濃度は子宮捻転を発症した牛で有意に低く($p < 0.01$)、銅(Cu)/Zn比は有意に高かった($p < 0.05$)。また、新生子牛については、子宮捻転を発症した母牛から産まれた子牛は、血清中のコバルト(Co)濃度が有意に高いことが明らかとなった($p < 0.01$)。これらの結果

から、子宮捻転は妊娠期のみならず分娩後にも発症することが示唆され、子宮捻転を発症した母牛は、血液中の Ca 濃度が低下していることが明らかとなった。さらに、子宮捻転は、母牛のみならず胎子のミネラル代謝にも影響を及ぼすことが明らかになった。

第 2 章では、分娩末期の乳牛の胎盤におけるミネラル輸送機構について着目した。マウスの胎盤において、Ca 感知受容体 (CaSR) は、胎盤に発現する PTHrP の作用を調節し、胎子の Ca 代謝に影響を与えられている。そこで、妊娠末期の乳牛について帝王切開を行い、胎盤節を採取した。胎盤節を子宮小丘と小葉に分け、それぞれの組織においてリアルタイム PCR 法により遺伝子発現を調べたところ、PTHrP は小葉よりも子宮小丘で ($p < 0.01$)、CaSR は子宮小丘よりも小葉で ($p < 0.05$) 有意に高い遺伝子発現が認められた。また、Ca 輸送に関わる Transient receptor potential cation channel subfamily V member (TRPV) 5 ($p < 0.05$)、TRPV6 ($p < 0.05$)、および LRP2 ($p < 0.01$) の遺伝子発現量は、子宮小丘よりも小葉で有意に高かった。一方で、子宮小丘と小葉の間で、微量ミネラルの輸送に関わるトランスポーターの遺伝子発現量に有意差は認められなかった。さらに、帝王切開時に母牛、新生子牛の頸静脈、臍動脈、および臍静脈から採血を行い、血液中の PTHrP 濃度、および Ca 濃度を測定したところ、母体の

血液中からは PTHrP は検出されなかったが、新生子牛、臍動脈、および臍静脈血からは PTHrP が検出された。また、血液中 Ca 濃度は、母体よりも新生子牛、臍動脈、および臍静脈血で有意に高値だった ($p < 0.01$)。これらのことから、乳牛の胎盤では、小葉側で胎子の血液中 Ca 濃度を CaSR が感知し、子宮小丘で産生された PTHrP が母体から胎子への Ca 輸送を調節していると考えられた。

第 3 章では、ウシ栄養膜由来培養細胞 (BT-C) 細胞を用いて、PTHrP がウシ栄養膜におけるミネラル輸送に関与するかを検討した。ラットの腸管において、PTHrP は、Ca トランスポーターである TRPV6、Calcium-binding protein (CaBP)、Sodium calcium exchanger 1 (NCX1)、Plasma membrane Ca^{2+} ATPase (PMCA) 1 の発現をアップレギュレートすることが報告されている。さらに、TRPV6 をノックアウトすると、マウスの胎盤において母体から胎子への Ca^{2+} 輸送活性が低下することが知られている。これらのことから、ウシ胎盤においても、CaSR が Ca 濃度を感知し、PTHrP が Ca トランスポーターの発現を調節すると仮説を立てた。そこで、遺伝子組換えウシ PTHrP[1-141]を作成し、BT-C 細胞に 0, 0.1, 1.0pM の濃度で作用させた。RNA シーケンス法、リアルタイム PCR 法により、Ca トランスポーターの遺伝子発現量の変化を調べたところ、0pM よ

りも 1.0pM の群で、TRPV5 ($p < 0.05$), TRPV6 ($p < 0.01$), および CaBP ($p < 0.05$) の有意な遺伝子発現量の増加を認めた。さらに、ウェスタンブロット法により、TRPV6 の発現量を調べたところ、PTHrP 0pM よりも、1.0pM で有意に高い発現量が認められた ($p < 0.05$)。実際に、Ca が細胞内に取り込まれているかを Ca イメージング法により調べたところ、PTHrP 0pM よりも 1.0pM で BT-C 細胞内に強い蛍光強度を認めた。このことから、BT-C 細胞では、ウシ PTHrP[1-141]によって TRPV6 の発現量が増加し、Ca の取り込みが促進されると考えられた。

以上のことから、乳牛の子宮捻転は分娩後 10 日前後にも発症し、起立能力に異常を認めることが明らかとなった。さらに、分娩期に子宮捻転を発症した母牛、およびその胎子では、ミネラル代謝異常が起こっていると推測された。本研究の結果から、通常母牛の血液からは検出されない PTHrP が新生子牛の頸静脈血、臍動脈、および臍静脈血から検出された。また、ウシ胎盤において、胎子側の Ca 濃度を小葉の CaSR が感知し、子宮小丘由来の PTHrP が胎子の Ca 代謝を調節すると考えられた。さらに、ウシ栄養膜由来培養細胞において、ウシ PTHrP は TRPV5, TRPV6, および CaBP の遺伝子発現量を増加させることから、ウシ胎盤において、PTHrP が Ca の取り込みを促進することが示唆された。

Abstract

In dairy cows, perinatal diseases increase the risk of maternal mortality and lead to decreased productivity. In particular, difficult childbirth can lead to fetal death, and when it occurs, there is a large economic loss. In dairy cows, uterine torsion during parturition has been cited as a major cause of difficult delivery. Furthermore, hypocalcemia (Ca) is known to be a risk for difficult delivery, including uterine torsion. In addition, it has been reported that plasma zinc (Zn) concentrations are lower in cows with difficult birth than in cows with normal birth, and abnormalities in mineral metabolism are thought to increase the risk of difficult birth in cows. On the other hand, there are few reports that have investigated the effects of uterine torsion on the fetus when a mother cow develops uterine torsion. Furthermore, although uterine torsion usually develops during pregnancy, a small number of cases have been reported in which it occurs after delivery, and its clinical and epidemiological characteristics are not clear. Therefore, in Chapter 1, we investigated the clinical signs and epidemiological findings of 23 dairy cows that developed uterine torsion after parturition, and found that lochia and gas accumulated in

the uterus around 10 days after parturition, and the uterine body It became clear that it was twisted. In addition, he had abnormalities in his ability to stand, such as difficulty or inability to stand, and blood tests revealed mild hypocalcemia. As for treatment, it was easy to reduce the uterus either manually via the rectum or by rotating the uterus in the opposite direction of the torsion via the abdominal cavity through laparotomy. On the other hand, in the case of uterine torsion during parturition, calves born from cows with uterine torsion had a stillbirth rate 7.85 times higher than calves born from cows without torsion. In addition, trace minerals in the blood of dairy cows with uterine torsion (n = 15), cows without uterine torsion (n = 27), and their newborn calves (n = 9, and n = 26) were investigated. When the concentrations were measured, serum Zn concentrations were significantly lower in cows with uterine torsion ($p < 0.01$), and copper (Cu)/Zn ratios were significantly higher ($p < 0.05$). Regarding newborn calves, it was revealed that calves born to mothers who developed uterine torsion had significantly higher serum cobalt (Co) concentrations ($p < 0.01$). These results suggest that uterine torsion occurs not only during pregnancy but also after parturition, and it has become clear that mother cows that develop uterine torsion have a

decreased blood Ca concentration. Furthermore, it has been revealed that uterine torsion affects not only the mother's cow but also the mineral metabolism of the fetus.

From the results in Chapter 1, blood Ca concentration decreased in dairy cows with uterine torsion, regardless of the calving period or postpartum. In addition, mineral metabolism was affected in calves born to mothers with uterine torsion, which led us to believe that mineral transport from the mother to the fetus via the placenta may be affected. Therefore, in Chapter 2, we focused on the mineral transport mechanism in the placenta of dairy cows at the end of calving. In the mouse placenta, the Ca-sensing receptor (CaSR) is thought to regulate the action of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) expressed in the placenta and influence fetal Ca metabolism. Therefore, a caesarean section was performed on dairy cows at the end of pregnancy, and placental nodes were collected. We divided the placental nodes into the uterine caruncle and lobules, and examined gene expression in each tissue using real-time PCR. We found that PTHrP was more prominent in the uterine caruncle than in the lobules ($p < 0.01$), and CaSR was found in the lobules more than in the uterine caruncle. ($p < 0.05$) Significantly higher gene

expression was observed. In addition, gene expression levels of Transient receptor potential cation channel subfamily V member (TRPV) 5 ($p < 0.05$), TRPV6 ($p < 0.05$), and LRP2 ($p < 0.01$), which are involved in Ca transport, were higher in the lobules than in the uterine caruncle. was significantly higher. On the other hand, there were no significant differences in the gene expression levels of CTR1, DMT1, FPN1, TFRC, ZNT5, and ZIP7 between the uterine caruncle and lobules. Furthermore, blood was collected from the jugular vein, umbilical artery, and umbilical vein of the mother cow and newborn calf at the time of caesarean section, and the PTHrP and Ca concentrations in the blood were measured. PTHrP was not detected in the mother's blood. However, PTHrP was detected in the blood of newborn calves, umbilical artery, and umbilical vein. In addition, blood Ca concentration was significantly higher in newborn calves, umbilical artery, and umbilical vein blood than in the mother ($p < 0.01$). These results suggest that in the placenta of dairy cows, CaSR senses the blood Ca concentration of the fetus on the lobular side, and PTHrP produced in the uterine caruncle regulates Ca transport from the mother to the fetus. .

From the results in Chapter 2, it was inferred that PTHrP is involved in Ca

transport in the placenta of dairy cows. Therefore, in Chapter 3, we investigated whether PTHrP is involved in mineral transport in bovine trophoblasts using cultured bovine trophoblast-derived cells (BT-C). It has been reported that PTHrP upregulates the expression of the Ca transporters TRPV6, Calcium-binding protein (CaBP), Sodium calcium exchanger 1 (NCX1), and Plasma membrane Ca²⁺ ATPase (PMCA) 1 in the intestinal tract of rats. ing. Furthermore, knocking out TRPV6 is known to reduce Ca²⁺ transport activity from mother to fetus in the mouse placenta. Based on these findings, we hypothesized that CaSR senses Ca concentration and PTHrP regulates the expression of Ca transporters in the bovine placenta as well. Therefore, we created recombinant bovine PTHrP[1-141] and applied it to BT-C cells at concentrations of 0, 0.1, and 1.0 pM. When we examined changes in Ca transporter gene expression using RNA sequencing and real-time PCR, we found that TRPV5 ($p < 0.05$), TRPV6 ($p < 0.01$), and CaBP ($p < 0.05$) significant increase in gene expression level was observed. Furthermore, when the expression level of TRPV6 was examined by Western blotting, it was found that the expression level was significantly higher at 1.0 pM than at 0 pM of PTHrP ($p < 0.05$). In fact, when we investigated whether

Ca was taken into cells using Ca imaging, we found stronger fluorescence intensity in BT-C cells at 1.0 pM of PTHrP than at 0 pM. This suggests that in BT-C cells, bovine PTHrP[1-141] increases TRPV6 expression and promotes Ca uptake.

From the above, it has become clear that uterine torsion in dairy cows develops around 10 days after calving, and abnormalities are observed in the ability to stand. Furthermore, it was assumed that mother cows that developed uterine torsion during parturition and their fetuses had abnormalities in mineral metabolism. The results of this study showed that PTHrP, which is normally not detected in maternal blood, was detected in the jugular vein blood, umbilical artery, and umbilical vein blood of newborn calves. In addition, in the bovine placenta, CaSR in the lobules sensed the Ca concentration on the fetal side, and PTHrP derived from the uterine caruncle was thought to regulate fetal Ca metabolism. Furthermore, bovine PTHrP increased the gene expression levels of TRPV5, TRPV6, and CaBP in cultured cells derived from bovine trophoblasts, suggesting that PTHrP promotes Ca uptake in bovine placenta.

緒論

牛において、分娩時の低カルシウム（Ca）血症や低リン血症は難産の原因となることが報告されている (Bahrami-Yekdangi et al., 2022)。さらに、分娩時に低 Ca 血症を発症した牛は、死産の発生率がより高いことが明らかとなっている (Bahrami-Yekdangi et al., 2022)。そのため、難産や分娩前後のミネラル代謝異常は、母牛の消耗や新生子牛の死亡の要因となり、大きな経済的損失につながる。乳牛における一般的な難産のひとつとして、子宮捻転が挙げられる (Klaus-Halla et al., 2018; Sickinger et al., 2018)。子宮捻転は、局所の虚血を引き起こし、胎子死あるいは母牛の死亡につながることを報告されている (Klaus-Halla et al., 2018)。子宮捻転は、胎子が子宮内に存在する妊娠期に発生し、そのほとんどは分娩時に起こる。一方で、牛の子宮捻転は、分娩後にも発症することが 2 例のみ報告されている (Matthijsen and Putker, 1989)。著者らは、国内においても分娩後に子宮捻転が起こり得ることを報告している (風間 啓 et al., 2017)。しかし、分娩後子宮捻転の症例数は少なく、その疫学情報、病態については不明な点が多い。そこで第 1 章では、分娩後に子宮捻転を発症した乳牛 23 例について、臨床徴候、疫学的情報、診断方法、および治療法について検討した。さらに、乳牛の分娩期

には低 Ca 血症が問題となっており、低 Ca 血症の牛から生まれた子牛は死産の発生率が高いことから、分娩期の子宮捻転とミネラル代謝に関して、子宮捻転を発症した母牛、およびその新生子牛の血液中ミネラル濃度の特徴を調査した。

乳牛における低 Ca 血症は、死産率を上げることから、母牛のみならず、胎子にも影響を与えると考えた。そこで、母体、および胎子の Ca 代謝を調節するタンパク質として、副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) に着目した。PTHrP は、泌乳期の乳腺組織で高発現しており (Thiede and Rodan, 1988)、母体の Ca 代謝に関与していることが報告されている (Grill et al., 1992)。さらに、PTHrP ノックアウトマウスでは、正常な胎子の Ca 代謝を維持することができないため (Kovacs et al., 1996)、PTHrP は、正常な胎子の発育に必須の役割を果たしていると考えられている。そこで第 2 章では、分娩期の乳牛の血液、新生子牛の血液、および胎盤を採取し、PTHrP を介した胎盤における母体から胎子へのミネラル輸送について検討した。

第 2 章の結果から、牛の胎盤由来の PTHrP が胎盤を介した母体から胎子への Ca 輸送に関与すると考えられた。胎盤における母体から胎子への Ca 輸送には、TRPV6 や CaBP といったトランスポーターが関与していること

が報告されている (Dilworth and Glazier, 2009; Suzuki et al., 2008)。しかし、PTHrP は全身の様々な臓器で発現しており、Ca トランスポーターを含むそれらの作用を生体の胎盤で明らかにすることは困難である。*In vitro* におけるウシの胎盤モデルとして、栄養膜より確立されたウシ栄養膜由来培養細胞系 (BT 細胞系) が報告されている (Suzuki et al., 2011)。そこで第 3 章では、遺伝子組換えウシ PTHrP を作成し、BT 細胞系の一系統である BT-C 細胞に添加し、Ca 輸送体の発現の変化について検討した。

第1章

乳牛における子宮捻転に関する臨床疫学的調査

緒言

牛において、一般的な子宮捻転は、分娩期に起こるとされている (Bertschinger, 1997)。さらに、分娩前の子宮捻転(Frazer et al., 1996)や妊娠中期の子宮捻転(Brooks, 1999; Penny, 1999; Ruegg, 1988; Tandle, 2005)が報告されており、子宮捻転は妊娠中に起こるとされている。しかし、分娩後2週と4週にそれぞれ子宮捻転を発症したという報告がある(Matthijsen and Putker, 1989)。我々は、分娩後12日の乳牛において、右子宮角が360°捻転した症例に遭遇し、その後、分娩後10日前後に子宮捻転を発症する牛が散発的に認められた。そのため、本章では、分娩後子宮捻転を発症した23例について、その臨床徴候、疫学的特徴、および治療方法を明らかにすることを目的とした。

また、分娩期の子宮捻転は、乳牛の難産において一般的に認められ (Klaus-Halla et al., 2018; Sickinger et al., 2018)、胎子の死亡や、時に母牛の死亡にもつながる経済的損失の大きな疾患である(Klaus-Halla et al.,

2018)。分娩期の子宮捻転では、他の難産に比べて、獣医師による Ca 投与治療が積極的に行われており (Aubry et al., 2008)、難産の牛では、安産の牛に比べて血漿中亜鉛 (Zn) 濃度が低いことが報告されている (Dufty et al., 1977)。ヒトにおいては、血液中 Zn、銅 (Cu)、および鉄 (Fe) レベルの低下は、流産につながるとされている (Shen et al., 2015; Thaker et al., 2019; Turan et al., 2019)。さらに、Cu/Zn 比の異常もまた流産に関連するといわれている (Thaker et al., 2019)。コバルト (Co) は、正常な胎子の成長に重要な元素であり、Co レベルの低値は、巨大児のリスクを増加させる (Kocylowski et al., 2019)。血清セレン (Se) 濃度は、成熟児よりも未熟児で低く、新生児の出生体重と正の相関があることが報告されている (Tsuzuki et al., 2013)。このように、様々なミネラル代謝の異常が、分娩期の母体、および胎子の異常につながる。しかし、著者の知る限り、乳牛の子宮捻転における血液中のミネラル濃度の特徴に関する報告はない。そのため、分娩期の子宮捻転について、妊娠期間、死産率といった臨床疫学的情報とともに、母牛と新生子牛中の微量ミネラルを含むミネラル濃度の測定を行った。

材料および方法

1) 供試牛

2013年6月から2020年7月までに、北海道釧路地方において、分娩後子宮捻転と診断された23頭のホルスタイン種乳牛を調査した。その診断方法、それぞれの症例の所見を診療簿に記載し、臨床徴候を調べた。さらに、疫学的情報として、診療簿から、捻転した子宮角、および捻転方向、妊娠期間、分娩から診断までの日数、産次、胎数、および胎子死の有無を抽出した。胎数および胎子死の有無から、多産率および胎子死率を算出した。

さらに、北海道釧路地方で飼養されているホルスタイン種乳牛42頭、およびそれらから出生した子牛を分娩期の子宮捻転の調査に供試した。分娩期の状況に応じて、子宮捻転を発症した母牛 (maternal cows with uterine torsion; MUT, n = 15)、子宮捻転を発症していない母牛 (maternal cows without uterine torsion; non-MUT, n = 27)、MUTから出生した新生子牛 (neonatal calves from cows with uterine torsion; NUT, n = 9)、non-MUTから出生した新生子牛 (neonatal calves from cows without uterine torsion; non-NUT, n = 26) のそれぞれの群に分けた。母牛の産次、妊娠期間、および死産率を調査した。

2) 血液検査

分娩後子宮捻転の牛の診療簿から、17例において、診断日前後3日以内

の血液検査結果を抽出した。血液は、頸静脈から採取し、EDTA-2K、フッ化ナトリウム (NaF)、およびプレーン管 (Terumo Corporation, Tokyo, Japan) に分注した。NaF、およびプレーン管は、1,200×g、15分遠心し、それぞれ血漿、および血清を得た。得られた検体は4°Cに保存し、速やかに札幌臨床検査センター (Hokkaido, Japan) に送付し、全血球計数 (Sysmex XT 1800i, Sysmex Corporation, Hyogo, Japan)、血液生化学検査 (TBA-200FR, Toshiba Corporation, Tokyo, Japan)、および血清蛋白分画 (ALC-760, Jokoh Co. Ltd., Tokyo, Japan) にて検査を行った。血液生化学検査は、総タンパク質 (TP)、アルブミン (Alb)、 α -グロブリン (α -Glb)、 β -グロブリン (β -Glb)、 γ -グロブリン (γ -Glb)、血中尿素窒素 (BUN)、シアル酸 (Sial)、グルコース (Glu)、カルシウム (Ca)、無機リン (iP)、マグネシウム (Mg)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT)、および非エステル化脂肪酸 (NEFA) を検査した。血液検査結果は、平均値を算出し、基準範囲 (Akamatsu et al., 2007; Alberghina et al., 2011; Motoi et al., 1984; Smith et al., 2019) を逸脱したものを異常値と判定した。

分娩期の子宮捻転の牛について、分娩直後の母牛、および新生子牛の頸静脈から血液を採取した。なお、新生子牛の血液は初乳給与前に採取した。

死産した子牛からは血液は得られなかった。得られた血液は、プレーン管 (Terumo Corporation, Tokyo, Japan) に分注し、37°Cで15分加温後、4°C、1,700×g、15分遠心し、得られた血清を実験に供するまで-20°Cで凍結保存した。一部の血清は、札幌臨床検査センター (Hokkaido, Japan) に送付し、Ca, iP, およびMgを測定した。残りの検体は、微量ミネラル濃度の測定に使用した。すなわち、血清60μL、および1mLの硝酸(63% wt/wt)をテトラフルオロメトキシル (TFM) インサートに添加した。前処理として、50°C2分、30°C1分、180°C20分のマイクロウェーブ (START D, Milestone General K.K., Kanagawa, Japan) で分解した。分解した検体は、1%硝酸(v/v)で250倍に希釈した。これを希釈液とし、誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS, Agilent 7700×, Agilent Technologies Co., Tokyo, Japan) で微量ミネラル濃度を測定した。ICP-MSの分析条件は、表1に示した。内部標準として、テルリウムとイリジウム (Merck, Tokyo, Japan) を使用し、超純水 (18.2 MQ cm) は、Milli Q SP-TOC system (Nihon Millipore Kogyo, Tokyo, Japan) より得た。市販の多元素基準液 (TraceCERT®, Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan), およびモリブデン (Mo) 基準液 (Wako Pure Chemical Industries Inc., Osaka, Japan) を段階希釈し、ICP-MSにより検量線を作成し、検体中の微量ミネラル濃度を測定し

た。測定した微量ミネラルは、クロム (Cr)、マンガン (Mn)、⁵⁶Fe、⁵⁷Fe、Co、ガリウム (Ga)、Se、ルビジウム (Rb)、ストロンチウム (Sr)、Mo、セシウム (Cs)、バリウム (Ba)、Cu、Zn とした。

3) 超音波検査

分娩後子宮捻転症例 No. 23 について、経直腸より子宮および子宮内の超音波検査を行った。超音波検査には、10MHz の直腸検査用プローブ (MyLabOneVet, Esaote S.p.A, Genoa, Italy) を用いた。また、超音波検査は、治療前として第 1、治療後として第 6 病日にそれぞれ行った。

4) 子宮内貯留液の細菌学的検査

分娩後子宮捻転を発症した 8 症例について、子宮内貯留液を採取した。症例 No. 1-5, 7, および 8 は、開腹手術を行った際に、捻転した子宮角の漿膜面から 18G の注射針を刺入し、10ml シリンジで吸引して子宮内貯留液を採取した。No. 6 は開腹手術を行わなかったため、外陰部を消毒し、経膣にて滅菌カテーテルを子宮内に挿入し、20ml シリンジで吸入して子宮内貯留液を得た。得られた子宮内貯留液は、血液寒天培地に播種し、37°C で 24 時間後期培養を行った。発育したコロニーについて細菌種の同定を行った。症例 No. 5, および 6 については、北海道釧路家畜保健衛生所に詳細な細菌種の同定を依頼した。

5) 治療方法

分娩後子宮捻転を発症した9例について、経直腸より用事にて分娩後子宮捻転を整復した（経直腸用手法）。1例は、子宮内にカテーテルを挿入し、子宮内貯留液を排泄することで整復を試みた（子宮内カテーテル法）。13例は、右臍部切開を行い、腹腔より分娩後子宮捻転の整復を行った（開腹法）。それぞれの治療法の予後を調査した。症例 No. 7, および 10 では、開腹術による腹腔内からの整復が不可能であったため、子宮を創外に牽引し、子宮切開を行って排液した。排液後、ユトレヒト法にて子宮を二重縫合し、滅菌生理食塩液で子宮の漿膜面を洗浄後、腹腔より捻転を整復した。

6) 統計解析

分娩後子宮捻転を発症した牛の捻転子宮角と捻転方向の解析、および分娩期の子宮捻転の産次、妊娠期間、死産率の解析は、Fisher の正確検定を用いた。分娩期の子宮捻転の血清ミネラル濃度は、Mann-Whitney の U 検定により UT 群と non-UT 群を比較した。すべての統計解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のグラフィカル・ユーザー・インターフェースである EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター, 埼玉, 日本) を使用した。 $p < 0.05$ は統計的に有意とみなし、 $p < 0.10$ は有意な傾向があるとみなした。

結果

分娩後子宮捻転を発症した 23 例のうち、20 例は直腸検査で、3 例は開腹術の際の腹腔内精査で診断された。直腸検査による診断では、直腸より子宮内に貯留したガスと捻転部位を触診することによって診断が可能であった。開腹術で診断された 3 例のうち、2 例は腸管疾患を疑って行った試験開腹で、1 例は第四胃変位整復術中に診断された。それぞれの症例において、捻転部位は子宮体部であり、一方の子宮角が捻転して他方を巻き込んでいた（図 1）。

23 例すべてにおいて、食欲不振と悪臭を放つガスを伴う子宮内貯留液が認められた（図 2）。治療前に行った子宮の超音波検査では、子宮内に貯留したガスを示す多重反射（図 3A）、子宮壁の肥厚を伴うエコー源性の子宮内膜、および低エコーの貯留液が認められた（図 3B）。治療後、子宮内にガスの貯留は認められず、多重反射は消失したが、子宮内の貯留液は認められた（図 3C）。さらに、 39.3°C 以上の発熱が 23 例中 13 例（56.5%）に認められた。23 例中 16 例（69.6%）で起立能力の異常が認められ、2 例（8.7%）は起立不能だった。

捻転した子宮角は、左子宮角が9例、右子宮角が14例だった（表2）。左子宮角が右方向に捻転したものは2例で、左方向は7例だった。右子宮角が右方向に捻転したものは11例で、左方向は3例だった。捻転は左右どちらの子宮角も左右どちらの方向にも捻転したが、右子宮角は右方向に、左子宮角は左方向に捻転する傾向にあった（ $p < 0.05$ ）。分娩後子宮捻転の妊娠期間、および分娩から診断までの日数（平均値±SD）は、それぞれ274.3±10.7日、および9.6±3.7日だった。産次（平均値±SD）は、3.3±1.6産で、90%以上は経産牛だった。多産率は、23例中8例（34.8%）で、7例は双胎、1例は品胎だった（表2）。胎子死率は、23例中8例（34.8%）だった。さらに、確認できなかった3例を除く20例で胎盤停滞を併発し、3例は難産の既往歴があった。

血液検査の結果（表3）では、血清TP、Alb、 α -Glb、 β -Glb、Ca、およびiPは、基準範囲よりも低値を示した。一方、血清 γ -Glb、Sial、AST、およびNEFAは基準範囲よりも高値だった。

子宮内貯留液の細菌学的検査では、8例すべてにおいて *Echerichia coli* を始めとする大腸菌群が検出された。さらに、症例No.4では *Trueperella pyogenes*、No.6では *Streptococcus uberis* および *Brevibacterium* spp. の混合感染が認められた。

経直腸用手法，子宮内カテーテル法，および開腹術の治癒率は，それぞれ 9 例中 8 例 (88.9%)，1 例中 0 例 (0%)，および 13 例中 9 例 (81.8%) だった。開腹術を行ったうちの 2 例は，1 例は経直腸用手法で，1 例は子宮内カテーテル法で整復不可能だったものだった。経直腸用手法後に開腹術を行った 1 例は治癒したが，子宮内カテーテル法後に開腹した 1 例は予後不良だった。開腹術で治癒した 9 例について，腹腔内で捻転子宮角を把持し，術創方向に牽引しながら捻転と反対方向に回転させることで，容易に捻転を解除することができた (図 4A)。捻転整復後，子宮の位置は正常に戻り，子宮の収縮が認められた (図 4B)。

分娩期の子宮捻転では，産次，妊娠期間について，MUT と non-MUT の間に有意な差は認められなかったが，死産率は MUT で non-MUT より有意に高かった ($p < 0.05$ ，オッズ比 7.85) (表 4)。

表 5 に，MUT と non-MUT の血清ミネラル濃度の測定結果を示した。血清中 Ca，および iP 濃度は，MUT，non-MUT とともに基準範囲よりも下回っていた (Smith et al., 2019)。特に，iP は，MUT で non-MUT よりも有意に低い傾向があった ($p = 0.083$)。血清 Zn 濃度は，MUT で non-MUT よりも有意に低く ($p < 0.01$)，Cu/Zn 比は，MUT で non-MUT よりも有意に高かった ($p < 0.05$)。血清 Se 濃度は，MUT で non-MUT よりも有意に

高い傾向にあった ($p = 0.067$)。

新生子牛の血清中ミネラル濃度は、表 6 に示した。血清 Co 濃度は、NUT で non-NUT よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。血清 iP ($p = 0.070$)、Mg ($p = 0.090$)、および Zn ($p = 0.058$) 濃度は、non-NUT よりも NUT で低い傾向があった。血清 Se 濃度は、non-NUT よりも NUT で高い傾向があった。

考察

乳牛において、一般的な子宮捻転は、妊娠子宮の不安定さが発症に重要であると考えられている (Aubry et al., 2008) が、明らかな発症要因は不明である。本研究では、分娩後の子宮捻転は、子宮内に胎子が存在する一般的な子宮捻転と異なっていた。分娩後子宮捻転の特徴は、子宮内に腐敗臭のする悪露やガスの貯留が認められ、悪露停滞と関連していた。妊娠期の子宮捻転では、捻転の程度に依存して子宮の虚血が認められる (Frazer et al., 1996) が、分娩後子宮捻転では、開腹術で目視する限り、明らかな充血は認められなかった。そのため、分娩後子宮捻転の虚血の程度は、一般的な子宮捻転と異なり軽度であると考えられた。超音波検査は、子宮内貯留物の評価に有用であ

った。多くの症例において、直腸検査で子宮内に貯留したガスを認め、捻転部位を触知することができた。捻転部位は子宮体部で、左子宮角は左方向に、右子宮角は右方向に捻転する傾向にあった。胎盤停滞は、確認できなかった3例を除く20例すべてで認められ、分娩後食欲不振や発熱を呈し、子宮内貯留液からは大腸菌群が検出された。さらに、産褥熱と類似する点があった。産褥性子宮炎は、分娩後21日以内の発熱を伴う全身徴候に関連して赤褐色の子宮内貯留液が認められる(Galvão, 2012)。分娩後子宮捻転は、分娩後約10日に悪露停滞や発熱が認められ、産褥性子宮炎の徴候と類似していた。しかし、分娩後子宮捻転は、起立困難や不能といった起立能力の異常が認められることが特徴として挙げられた。それゆえ、分娩後子宮捻転に特異的な臨床徴候は乏しいが、起立能力の異常や直腸検査所見が他の周産期疾患との鑑別に有用と考えられた。血液生化学検査の結果、血清TP、およびAlb濃度の低下、 γ -Glb、およびSial濃度の高値が認められた。Albの低下、および γ -Glbの増加(Karreman et al., 2000)、およびSialの高値(Motoi et al., 1984)は、細菌感染による炎症を示していると考えられ、血清中AST、NEFA濃度の高値とCa濃度の低値は、分娩後子宮捻転の牛が負のエネルギーバランスに陥っていると考えられた。しかしながら、負のエネルギーバランスは、周産期の乳牛で一般的であり(Wankhade et al., 2017)、分

娩後子宮捻転に特異的な血液生化学所見は明らかでなかった。

一般的に、乳牛における双胎の分娩率は 0.7-9.5%といわれている (Esslemont and Kossaibati, 1996; Markusfeld, 1987)。しかしながら、分娩後子宮捻転の多産率は、23 例中 8 例 (34.8%) と高い傾向にあった。このことは、分娩後子宮捻転を発症した牛は、子宮の容積が大きい傾向にあったことを示唆している。さらに、乳牛における胎盤停滞の発生率は、3.6-28.1%と報告されているが (Esslemont and Kossaibati, 1996; Han and Kim, 2005; Markusfeld, 1987)、分娩後子宮捻転の牛は、少なくとも 23 例中 20 例 (87%) で胎盤停滞を併発していた。また、分娩後子宮捻転を発症した牛は、軽度の低 Ca 血症を示した。胎盤停滞 (Hajurka et al., 2005)、子宮炎、および潜在性低 Ca 血症 (Heppelmann et al., 2015) は、子宮回復の遅延の要因となりうる。さらに、子宮内にはガスが貯留しており、子宮の回復遅延とガスの貯留による子宮容積の増大が持続する子宮の不安定性につながり、分娩後子宮捻転の発症リスクを高めたと考えられた。

本研究では、開腹術を行った 17 例中 9 例で治癒の転記をとったことから、開腹術は本症の効果的な治療法であると考えられた。しかしながら、開腹術は高い侵襲性がある。一方、経直腸用手法で治癒した 8 例は、捻転した子宮角を頭腹側方向に圧迫しながら、捻転と反対方向に圧力をかけること

で捻転を整復することができた。それゆえ、分娩後子宮捻転の治療法は、経直腸用手法による捻転整復を試み、整復が不可能であった場合に開腹術を行うことが適切であると考えられた。しかしながら、妊娠中に発症する軽度の子宮捻転は、牛の寝起きによって自然に整復されることもある。そのため、分娩後子宮捻転の治療法の選択、および介入のタイミングは、さらに頭数を増やし検討する必要がある。

対照的に、23例中6例は予後不良となった。特に、腹腔内での捻転整復が不可能であったため、子宮切開を行った2例では、腹膜炎によって予後不良となった。このことから、分娩後子宮捻転において、子宮切開は腹膜炎のリスクが高く、事前に子宮内カテーテル法を併用して子宮内容積を減らしておくことも考慮する必要があると推測された。しかしながら、子宮内カテーテルは、子宮穿孔のリスクがあり、症例に応じて複数の治療法を併用するなど、適切な治療法を選択するためにはさらなる研究が必要と考えられた。さらに、最も適切な治療法を確立するためには、嫌気細菌やウイルスを含む、子宮内貯留液の微生物学的検索や、子宮の病理組織学的検索といった病態生理学的特徴を明らかにすべきと考えられた。

分娩期の子宮捻転は、子宮の虚血から胎子の死亡、および母牛の死亡につながりうる(Klaus-Halla et al., 2018)。本研究の結果では、子宮捻転の牛の

死産率は、子宮捻転を発症していない牛よりも 7.85 倍高かった。このことは、子宮捻転が胎子の死亡に伴う大きな経済損失につながることを示唆している。

血液中のミネラル濃度の測定結果から、分娩期の乳牛は、血清中 Ca、および iP 濃度が基準範囲(Smith et al., 2019)を下回ることが確認された。特に Ca の低値は、活力の低下や起立異常の要因となり、潜在的に子宮捻転のリスクを高めた可能性があった。また Zn は、DNA や RNA 合成を含む様々な酵素の必須構成成分である (Spears and Weiss, 2008)。Zn 欠乏は、免疫力を低下させ、感染性疾患に対する抵抗を弱める (Shankar and Prasad, 1998)。乳牛における血清 Zn 濃度の低下は潜在性ケトーシスで認められている (Zhang et al., 2010)。さらに、血清 Zn 濃度の低下は、乳牛における潜在性低 Ca 血症でも認められる (Wang et al., 2014)。これらのことから、Zn 欠乏は、免疫抑制、生産性の低下、および繁殖成績の低下につながると予測される。本研究の結果から、血清 Zn 濃度は、子宮捻転を発症していない牛よりも、子宮捻転の牛で有意に低かった。血液中の Zn 濃度は、分娩前、分娩期、および分娩後 1 週間で低下することが報告されている (Goff and Stabel, 1990; Wang et al., 2014)。本研究の結果は、これらの報告と一致しており、子宮捻転の牛では、特に血液中 Zn 濃度の低下が顕著であることが

明らかとなった。Cu/Zn 比は、血清 Zn 濃度の低下に伴い、子宮捻転を発症していない牛よりも子宮捻転の牛で有意に高かった。Cu/Zn 比は、栄養失調、酸化ストレス、炎症、および免疫不全に関連することが報告されている (Guo et al., 2011)。Cu/Zn 比は、Cu や Zn 単体よりも有用な臨床的指標であると感が下られている (Mocchegiani et al., 2012)。ヒトにおいては、子宮外妊娠の酸化ストレスの有用なマーカーとして Cu/Zn 比が使用されている (Tok et al., 2021)。子宮捻転は、マロンジアルデヒド、スーパーオキシドジスムターゼ、およびグルタチオンの高値によって示される通り、フリーラジカルの生成のため酸化ストレスが増加している (Abrol et al., 2019)。それゆえ、Cu/Zn 比は、乳牛の子宮捻転の病態について有用な情報を提供する可能性がある。

Se は、動物の健康とパフォーマンスにとって重要な役割を果たす微量ミネラルである (Huang et al., 2023)。牛では、Se 欠乏は、胎盤停滯 (Julien et al., 1976)、乳房炎 (Wang et al., 2021)、受胎能力、および子宮炎 (Khalili et al., 2019) に関連しており、乳生産や繁殖成績の低下により大きな経済損失につながる。しかしながら、妊娠牛に Se を給与した研究では、潜在性 Se 中毒が死産につながることを報告している (Yaeger et al., 1998)。本研究では、血清 Se 濃度は子宮捻転の母牛、およびその新生子牛の両方で高い傾向

にあり、Seと子宮捻転の関連についてさらなる研究が必要である。

Coは、ビタミンB12の構成に必須である(González-Montaña et al., 2020)。ビタミンB12欠乏は、大赤血球症を引き起こすことが知られている(Aslinia et al., 2006)。子宮捻転を伴う水牛は、大赤血球症を引き起こすことが報告されている(Mustapha and Peter, 2020)。しかしながら、子宮捻転を発症した母牛から産まれた新生子牛の血清Co濃度は、子宮捻転を発症していない母牛から産まれた新生子牛よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。塩化Coは、妊婦、乳児、および長期血液透析を受けている慢性貧血患者の貧血の治療に使用されてきた。塩化Coは、in vivoで赤血球生成や血管新生などの低酸素様反応を誘発することが知られている(Lippi et al., 2005)。子宮捻転は局所虚血を引き起こし(Klaus-Halla et al., 2018)、その結果胎子への酸素供給が不十分となり、潜在的な低酸素血症を引き起こす。低酸素誘導因子(HIF)は、低酸素応答要素を含む遺伝子の発現を活性化し、細胞が低酸素に適応するのを助ける(Yuan et al., 2003)。HIFは、酸素によって調節される α サブユニット(HIF-1 α , -2 α , -3 α)で構成されるヘテロ二量体転写因子である(Semenza, 2007)。CoおよびHIF-1 α mRNAは、用量および時間依存性に相関することが報告されている(Dai et al., 2012)。したがって、子宮捻転を発症した母牛から産まれた新生子牛の血清Co濃度が高いと、虚

血性の低酸素血症を防ぐ可能性がある。

小括

乳牛の子宮捻転は分娩後 10 日前後にも発症し、起立異常を伴うことが明らかとなった。特に、多産の牛が分娩後 10 日前後に食欲不振を呈する場合には、積極的に直腸検査を行うことで診断が可能であった。分娩期の子宮捻転は、高い死産率から経済的損失が大きい。分娩期の牛は、血清 Ca、iP 濃度が低下することが確認された。子宮捻転を発症した牛の血清 Zn 濃度は低く、Cu/Zn 比は高いことから、疾患に対する抵抗力が低下していた。子宮捻転の母牛から産まれた新生子牛は、血清 Co 濃度が高いという特徴があった。

第2章

乳牛の胎盤における副甲状腺ホルモン関連タンパク質と

新生子牛のミネラル代謝の関係

緒論

第1章の結果から、乳牛の子宮捻転は、妊娠期から分娩後まで発症する可能性があり、経済的損失が大きいことが明らかとなった。また、分娩期の子宮捻転を発症した牛では、血清 Zn 濃度が低下しており、それらの子牛の血清 Co 濃度は高値を認め、子宮捻転は母子ともにミネラル代謝に影響を及ぼすと考えられた。さらに、分娩期、および分娩後に子宮捻転を発症した乳牛では、血液中 Ca 濃度が低下していることが明らかとなった。

副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) は、腫瘍随伴症候群の高カルシウム血症の原因物質として発見された (Moseley et al., 1987)。PTHrP 遺伝子は、様々な組織で発現しており、特に泌乳期の乳腺組織で高発現している (Thiede and Rodan, 1988)。健康な動物の血液中 PTHrP 濃度は極めて低く、検出限界以下である (Onda et al., 2006)。しかしながら、ヒトにおいて、泌乳中に血液中 PTHrP 濃度が上昇し、母体のカルシウム (Ca) 代謝に

関与していることが報告されている (Grill et al., 1992)。そのため、泌乳期間中に局所において産生された PTHrP が全身循環に入り、ホルモン様の作用をすると考えられている。

さらに、PTHrP は、皮膚、脳、膵臓、血管平滑筋、心臓、肺、および腎臓を含む、正常な胎子や新生子の組織でも発現している (Campos et al., 1991; Mangin et al., 1990)。それらの組織において、オートクライン、パラクライン様に作用し、細胞の増殖や分化を調節している (Lee et al., 1995)。In vitro において、PTHrP はラットの胎子肺の発達を促進することが示唆されている (Rubin et al., 1994)。PTHrP は、軟骨細胞の発育と成長板軟骨の分化を抑制することによって、軟骨内骨の伸長を促進する (Lee et al., 1996)。PTHrP ノックアウトマウスでは、正常な胎子の Ca 代謝を維持するのに PTHrP が必要であることが報告されている (Kovacs et al., 1996)。そのため、PTHrP は、正常な胎子の発育に必須の役割を果たしていると考えられる。

PTHrP は、ヒトやラットの胎盤においても発現しており (Dunne et al., 1994; Ferguson et al., 1992; Senior et al., 1991)、栄養膜細胞が胎盤の Ca 輸送の調節を含む Ca を感知する役割があるとされている (Hellman et al., 1992)。さらに、Ca 感知受容体 (CaSR) は、マウスの胎盤における

PTHrP の作用を調節し、胎子の Ca 代謝に影響を与えると推測されている (Kovacs et al., 1998)。しかしながら、ヒトやマウスとは胎盤の形態が異なる乳牛では、胎盤における PTHrP と CaSR の役割は明らかになっていない。ヒトでは、胎子側の絨毛は脱落膜の母体血液に浸かっているが、マウスでは、胎子の血管内皮は母体の血液に浸かっている。一方、ウシの胎盤では、胎子胎盤の絨毛上皮（胎盤葉）は、母胎盤の子宮内膜上皮（子宮小丘）と接している。それゆえ、ウシの母体から胎子へ物質交換を行うためには、ヒトやマウス以上に多数の細胞層を通過する必要がある。

PTHrP は胎盤における Ca 輸送に関わること、Ca は胎子の骨格形成を含む必須栄養素であることから、乳牛の胎盤における PTHrP と健康な胎子の発育に関連があると考えた。そこで第 2 章では、乳牛の帝王切開時に、母牛、新生子牛、臍静脈、および臍動脈の血液を採取し、血液中の PTHrP、Ca、無機リン (iP)、およびマグネシウム (Mg) 濃度を測定した。さらに、胎盤節を採取し、子宮小丘と胎盤小葉の PTHrP と CaSR の遺伝子発現量を比較した。

材料および方法

1) 供試牛

本研究は、麻布大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号：171113-1）。北海道釧路地区で飼養されている21頭のホルスタイン種乳牛について、妊娠末期に帝王切開を行った（表7）。帝王切開は、予定帝王切開、難産、あるいは子宮捻転により経膣分娩不可と判断し、臍部切開により実施した。子宮を切開し、胎子を摘出した後、ユトレヒト二重縫合により子宮を縫合、常法にて閉腹した。

血液は、母牛、および新生子牛の頸静脈、臍静脈、および臍動脈から採取した。検体は、21頭の母牛、17頭の新生子、および12頭の臍帯から採血した。採取した血液は、1500-IUのアプロチニンが添加されたEDTA-2K真空採血管（NIPRO, Osaka, Japan）、およびプレーン真空採血管に分注した。3,000 rpm, 4°C, 15分間遠心し、それぞれ血漿、および血清を分離後、測定まで-20°Cで凍結保存した。

胎盤節の組織は、21頭中13頭で採取した。得られた胎盤節は、用手にて子宮小丘と胎盤小葉に分離した(Diniz et al., 2021) (図5)。それぞれの組織は、直ちにRNAlater（Thermo Fisher Scientific K.K., Tokyo, Japan）に浸漬し、-20°C凍結保存した。

2) 血漿 PTHrP および血清ミネラル濃度測定

血漿 PTHrP 濃度は、市販の 2-site immunoradiometric assay (PTHrP IRMA; Sceti Medical Labo, Tokyo, Japan) を使用して測定した(Onda et al., 2006)。本キットの検出限界は 0.57pmol/L, intra assay CV は 3.4-5.8%, inter assay CV は 4.0-7.5%だった。血清 Ca, iP, および Mg 濃度の測定は、自動生化学分析装置 (Cobas 6000; Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) を使用した。

3) RNA 抽出および逆転写反応 (RT)

RNA later 中の組織からの総 RNA 抽出は、ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を使用して、説明書通りに行った。RT は、0.5 μ g の総 RNA から、ReverTraAce qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Osaka, Japan)を使用して、一本鎖 cDNA を合成し、解析まで-20°Cで凍結保存した。

4) 定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (RT-qPCR)

RT-qPCR 法により、PTHrP, CaSR, 銅輸送タンパク質 1 (CTR1), 二価金属イオントランスポーター1 (DMT1), フェロポーチン (FPN1), トランスフェリン受容体タンパク質 1 (TFRC), Zrt- and Irt-like protein 7 (ZIP7), 亜鉛トランスポーター5 (ZNT5) およびグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) の遺伝子発現量を FastStart SYBR

Green Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて、LightCycler 96 System (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) で分析した。使用したプライマーは、表 8 に示した。PCR 条件は、95°C10 分で熱変性後、95°C10 秒、60°C10 秒、72°C15 秒を 45 サイクル行った。遺伝子発現量は、E-method 法(Pfaffl, 2001)により算出し、GAPDH を内部標準とした。

5) 統計解析

新生子牛の頸静脈、臍静脈、臍動脈血の測定値は、Kruskal-Wallis 検定を用いて統計的に解析した。母牛の頸静脈血との多重比較は、Steel 検定を用いた。PTHrP と血液中のミネラル濃度の相関は、Spearman の順位相関係数を用いて分析した。子宮小丘と胎盤葉における遺伝子発現比の比較は、Mann-Whitney U 検定で行った。すべての統計解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のグラフィカル・ユーザー・インターフェースである EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター, 埼玉, 日本) を使用した。 $p < 0.05$ は統計的に有意とみなし、 $p < 0.10$ は有意な傾向とみなした。

結果

血漿中 PTHrP と血清中 Ca, iP, および Mg 濃度の測定結果を表 9 に示した。母牛の血漿中 PTHrP 濃度は検出限界以下であった。一方, 新生子牛の頸静脈, 臍静脈, および臍動脈の血漿中からは PTHrP が検出された。しかし, これらの血漿中 PTHrP 濃度間に有意な差は認められなかった。新生子牛の頸静脈, 臍静脈, および臍動脈の血清 Ca, iP 濃度は, 母牛の頸静脈血よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。一方で, 血清 Mg 濃度に有意な差は認められなかった。新生子牛の頸静脈における血症 PTHrP と血清 Ca 濃度との間には有意な負の相関があった ($r = 0.76 ; p < 0.05$) (図 6a)。新生子牛の頸静脈では, 血漿 PTHrP と血清 iP の間に有意な相関は認められなかったが (図 6d), 臍動脈では負の相関の傾向がみられた ($r = 0.57 ; p < 0.10$) (図 6e)。胎盤では, PTHrP の遺伝子発現は, 胎盤葉よりも子宮小丘で有意に高かった ($p < 0.01$) (図 7)。一方, CaSR は, 子宮小丘よりも胎盤葉で有意に高かった ($p < 0.05$) (図 8)。また, TRPV5 ($p < 0.05$), TRPV6 ($p < 0.05$), および LRP2 ($p < 0.01$) の遺伝子発現量は, 子宮小丘よりも胎盤小葉で有意に高かった (図 9)。一方で, 微量ミネラルの輸送に関わるトランスポーターの遺伝子発現量は, 子宮小丘と胎盤小葉で有意差は認められなかった (図 10)。

考察

Kovacs は、PTHrP ノックアウト胎子では、胎子の Ca 濃度が母体よりも低下していることを報告している (Kovacs et al., 1996)。ヒトやその他の哺乳類では、胎子の血液中 Ca 濃度は母体より高く、PTH や 1,25-ジヒドロキシビタミン D 濃度は、成体と比べて非常に低い (Hosking, 1996; Kovacs and Kronenberg, 1997)。乳牛では、胎子大静脈 (Wilson et al., 1977)、および新生子頸静脈 (Szenci et al., 1994) の血漿中 Ca 濃度が母体の頸静脈血よりも高いことが報告されている。本研究では、ウシにおいても胎子血液中 Ca 濃度が高く、新生子頸静脈、臍静脈、臍動脈の血清 Ca 濃度は母牛の静脈血よりも有意に高いことが示された。

ヒトでは、胎子の血液中 iP 濃度が母体よりも高いことが報告されている (Pitkin et al., 1980)。本研究では、乳牛の新生子および臍帯血の iP 濃度が母牛よりも高いことが示された。臍動脈と臍静脈の間に有意差は認められなかった。母体の血液と新生子牛、臍帯血の iP 濃度の間に濃度勾配があったことから、血液中の iP が母牛から胎子へ積極的に通過する可能性を示している。PTHrP が胎子のリン濃度を調節している可能性はあるが、そ

の詳細は不明である。

さらに、母牛、胎子、臍静脈、および臍動脈の血清 Mg 濃度間に有意差はなかった。しかしながら、ヒツジ(Barri et al., 1990)やラット(Dancis et al., 1971)では、胎子の血漿 Mg 濃度が母体より高いことが報告されている。

Care らは、ヒト PTHrP がヒツジにおける Mg の胎盤輸送を刺激することを報告した(Care et al., 1990)。そして、Kovacs らは、マウスの正常な Mg 恒常性を維持するためには、胎子の副甲状腺が必要であると報告している(Kovacs et al., 2001)。しかし、Care らの報告は、ヒト PTHrP をヒツジに用いており、ヒツジ本来の生理作用とは異なる可能性がある。乳牛の胎盤における iP と Mg の輸送を明らかにするためには、ウシ由来の PTHrP を用いてさらなる研究が必要である。

ウシの PTHrP は 141 個のアミノ酸 (aa) からなり(Wojcik et al., 1998), 以下のような 3 つの異なる機能ドメインを持つ：N 末端領域[1-34 aa]は副甲状腺ホルモン (PTH) 受容体に結合し、中間領域[67-86 aa]は胎盤の Ca 輸送に関与すると推測されており、C 末端領域[107-111 aa]にはオステオスタチン活性がある(Martin, 2016)。本研究では、PTHrP が新生子牛の臍動脈から検出された。ヒトにおいて、PTHrP[109-141 aa]を測定し、PTHrP の臍動脈レベルが臍静脈レベルよりも高かったことから、臍帯血

PTHrP の主な由来は胎児である可能性が示唆されている (Seki et al., 1994)。しかし、乳牛の PTHrP [1-34 aa] と [50-83 aa] を測定した (Onda et al., 2006) 本研究では、臍動静脈血中間の PTHrP 濃度に有意差は認められなかった。これらのことから、測定方法と動物種の違いが、臍動静脈血中の PTHrP 濃度の違いにつながったと考えられる。さらに、ヒツジの PTH は母体から胎子へ胎盤を通過しないことが報告されている (Garel, 1972; Northrop et al., 1977)。全長の PTHrP は、PTH の 2 倍の分子量を持つことから (Kovacs and Kronenberg, 1997)、PTHrP が胎盤を通過する可能性は低いと考えられる。さらに、本研究では母体の循環血液中から PTHrP は検出されなかった。そのため、胎盤由来の PTHrP が母体の全身循環に入る可能性は非常に低いと考えられた。

本研究では、乳牛の胎盤における PTHrP の遺伝子発現は、胎盤葉よりも子宮小丘で有意に高かった。副甲状腺と PTH を欠損させた *Hoxa3*-null マウスの胎子は、循環血液中 PTHrP レベルが正常であることが報告されている (Kovacs et al., 2001)。すなわち、PTHrP が母体血中からは検出されず、新生子血と臍帯血では検出されたことから、新生子血中の PTHrP は子宮小丘に由来する可能性を示している。PTHrP は、ヒトや水牛の胎盤 (Ferguson et al., 1992; Liu et al., 2015)、および妊婦の子宮 (Thiede et al.,

1990)で発現していることが報告されている。ヒトでは、羊膜における PTHrP mRNA 量は、絨毛、脱落膜、子宮筋層、および胎盤よりも 10~400 倍高いことが報告されている (Ferguson et al., 1992)。さらに、免疫組織化学染色により可視化されたヒト妊娠末期胎盤において、PTHrP は、羊膜の立方上皮細胞、絨毛の細胞栄養膜細胞、脱落膜、および合胞体栄養細胞で検出されている (EMLY et al., 1994)。乳牛では、脱落膜は形成されないが、PTHrP は子宮小丘で高い遺伝子発現を認めたことから、その局在を明らかにする必要がある。

帝王切開で出生した新生子牛の血漿 PTHrP と血清 Ca 濃度の間には負の相関があった。胎盤由来の PTHrP は、胎子の血液中 Ca を調節する役割を果たしており (Grill et al., 1992)、乳牛の胎子血中の PTHrP は、胎子の Ca ホメオスタシスに何らかの生理的影響を及ぼすと推定されている。PTHrP 欠損胎子の Ca は、母体レベルまで低下するため、PTHrP は胎子の血液中 Ca を調節すると考えられるが、PTHrP 欠損胎子は高リン血症を呈する (Kovacs, 2014)。PTHrP と PTH は、ヒツジの胎盤において iP 輸送には影響しないと報告されている (Barlet et al., 1994)。対照的に、PTH が *in vitro* でヒト胎盤の絨毛膜におけるリン酸輸送を減少させることが示唆されている (Brunette et al., 1989)。本研究では、新生子血液中の PTHrP と iP 濃度と

の間に関連はみられなかったが、臍動脈血では負の相関の傾向がみられた。このことは、胎子の体内で、PTHrP が iP の利用に影響していることを示唆している。

乳牛の胎盤における CaSR 遺伝子発現は、小葉の方が子宮小丘よりも有意に高かった。CaSR ノックアウトマウスでは、胎盤の Ca 移行が減少することが報告されている (Kovacs et al., 1998)。妊娠糖尿病では、合胞体栄養膜細胞および絨毛外細胞性栄養膜細胞における CaSR 免疫染色の減少は、臍帯血の Ca レベルの低下との関連が示唆されている (Papadopoulou et al., 2014)。ヒト胎盤の CaSR は、合胞体栄養膜細胞の刷子縁と、絨毛を形成する細胞にみられると報告されている (Bradbury et al., 2002)。子宮侵入の過程と胎盤免疫の維持における絨毛外栄養膜細胞の重要性を考えると、CaSR は母体の細胞外 Ca^{2+} 濃度が胎盤形成を促進または維持する潜在的な指標であると考えられた。胎盤栄養膜細胞は、細胞外 Ca^{2+} 濃度の変化に敏感であり、上昇したレベルは、PTHrP の放出を抑制することが示唆されている (Bradbury et al., 1998; Hellman et al., 1992)。これらのことから、胎盤の CaSR は、胎盤を介した Ca 輸送に重要な役割を果たしており、乳牛の PTHrP 分泌調節にも影響を与えている可能性がある。さらに、細胞外の Ca を細胞内に取り込む作用を持つ TRPV5、TRPV6 や、VD を細胞内に取り込

む LRP2 の遺伝子発現量は、子宮小丘よりも胎盤小葉で有意に高かった。

このことから、胎盤において Ca を細胞内に積極的に取り込む機構が存在すると推測された。以上のことから、乳牛の胎盤に存在する CaSR が、母体や胎児の血液中 Ca を感知し、胎盤での Ca 輸送や PTHrP 分泌調節に影響を及ぼすかどうかを検討する必要があると考えられた。

小括

結論として、血漿 PTHrP は、ウシの新生子頸静脈、臍動脈、および臍静脈から検出された。したがって、子宮小丘で産生された PTHrP は、ヒトやマウスと同様に、新生子の血清 Ca 濃度を母牛よりも高く維持するように働いていると考えられた。さらに、PTHrP 遺伝子は乳牛の子宮小丘に、CaSR 遺伝子は小葉に高発現していることが示された。

第3章

ウシ栄養膜由来培養細胞における

副甲状腺ホルモン関連タンパク質のミネラル輸送調節作用

緒言

周産期のミネラル代謝異常は胎子の死亡リスクを高める。特に乳牛では、Ca代謝異常が母子ともに死亡のリスクとなりうる。胎子へのCa輸送は胎盤を経て行われるため、Ca輸送機構の解明は子牛の死産リスクを減らす一助になると考えた。

第2章において、牛の子宮小丘由来のPTHrPが胎盤を介した母体から胎子へのCa輸送に関与すると考えられた。ヒトやマウスにおいて、胎盤を介したCa輸送には、TRPVチャネルやCaBPなどが関与することが報告されている(Dilworth and Glazier, 2009; Suzuki et al., 2008)。本章では、ウシ栄養膜由来培養細胞系のひとつであるBT-C細胞(Suzuki et al., 2011)を用いて、遺伝子組換えウシPTHrPを細胞に感作させ、Ca輸送に関わるトランスポーターの発現に変化がみられるかを検討した。さらに、第1章で分娩期の子宮捻転を発症した母牛、およびその新生子牛では、ZnやCoといった微量ミネラ

ル代謝にも異常があった。そこで、胎盤において遺伝子の発現が認められているトランスポーターの遺伝子発現量を調べ、BT-C 細胞が微量ミネラルの輸送の研究モデルになりうるかを検討した。

材料および方法

1) 細胞培養

牛栄養膜由来の細胞株、BT-C 細胞は、bone morphogenetic protein 4 を使用して牛の胚盤胞から確立された(Suzuki et al., 2011)。BT-C 細胞は岩手大学の木崎景一郎先生のご厚意で分与された。培養は、I-C 型コラーゲン (Cellmatrix Type I -C, Nitta Gelatin, Osaka, Japan) でコーティングした T25 フラスコを用いて、10%ウシ胎児血清 (FBS), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のストレプトマイシン, 100 IU/ml のペニシリンを添加した DMEM/F12 Ham で 37°C, 5%CO₂ 大気条件下で培養した。

2) 遺伝子組換えウシ PTHrP の作製

泌乳期のウシ乳腺組織から ISOGEN (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を使用して総 RNA を抽出した。RT は、0.5 μg の総 RNA から、ReverTraAce qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Osaka, Japan) を使

用して、一本鎖 cDNA を合成した。N 末端に His-タグを付与したウシ PTHrP[1-141]のプライマーを設計し（表 10）、PCR 法により増幅した。PCR プロトコルは、25 μ l の PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)に、0.3 μ M のフォワード、およびリバースプライマー、1 μ l の cDNA を添加し、Nuclease-free water で 50 μ l にメスアップして反応させた。サーマルサイクラーの条件は、98 $^{\circ}$ C10 秒、55 $^{\circ}$ C5 秒、72 $^{\circ}$ C5 秒を 35 サイクル行った。PCR 産物は、1.5%アガロースゲル、TBE Buffer で電気泳動を行った。染色はエチジウムブロマイドを使用し、UV ライトによるバイオイメージングシステム UVP (UVP, inc., California, USA) で DNA バンドを検出した。PCR 産物は、NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて精製した。その後、In-Fusion[®] HD Cloning Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用いて説明書通りにクローニングを行った。コンピテントセルは、E. coli HST08 Premium Competent Cells (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を使用し、ベクターは、pUC19 を用いた。形質転換した細胞を SOC 培地に播種し、37 $^{\circ}$ C、200 rpm、1 時間振盪培養した。100 μ l の培地を 100 μ g/ml のアンピシリンを含む L プレートで、37 $^{\circ}$ C、12 時間培養した。得られたコロニーを無作為に抽出し、NucleoSpin[®] Plasmid (Takara Bio Inc., Shiga, Japan)を用いてプラ

スミドを抽出した。

得られたプラスミドは、ウシ乳腺上皮細胞（MAC-T）細胞にトランスフェクションした。MAC-T 細胞は Dr. Roh（東北大学）の厚意により分与された。MAC-T 細胞を 6 ウェルプレートで 1.0×10^5 個/ml の濃度で播種し、10%FBS を含む DMEM で培養した。トランスフェクション試薬は、TransIT®-LT1 Reagent (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を使用し、説明書通りに行った。48 時間培養後、培地を採取し、Capturem™ His-Tagged Purification Miniprep Kit (Takara Bio Inc., Shiga, Japan) を用いて、His タグを付与した遺伝子組換えウシ PTHrP (rbPTHrP) [1-141] を抽出した。得られたタンパク質をウシ PTHrP [1-141] として実験に供与した。

3) PTHrP 測定

得られた遺伝子組換えウシ PTHrP の濃度は、市販の 2-site immunoradiometric assay (PTHrP IRMA; Sceti Medical Labo, Tokyo, Japan) を使用して測定した (Onda et al., 2006)。本キットは、ウサギ抗ヒト PTHrP [50-83] ポリクローナル抗体、およびマウス抗ヒト PTHrP [1-34] モノクローナル抗体で PTHrP を検出することが可能である。

4) 遺伝子組換えウシ PTHrP 添加細胞培養

BT-C 細胞を 6 ウェルプレート上に 1.0×10^5 個/ml の濃度で播種し、

DMEM/F12 Ham 10%FBS で 37°C, 5%CO₂ で培養した。2) で得られた rbPTHrP を 0, 0.1, 1.0pM の濃度でそれぞれ添加した。培養は, 各濃度において二点分析で行った。RNA 抽出のためには 7 時間, タンパク質抽出のためには 12 時間培養した。Ca イメージング用の BT-C 細胞は, 96 ウェルプレート上に 1,5000 個/well の濃度で播種し, 100 μL の DMEM/F12 Ham 10%FBS で 37°C, 5%CO₂ で培養した。2) で得られた rbPTHrP を 0, 1.0pM の濃度でそれぞれ添加し, 1 時間培養した。

5) RNA 抽出および RT

総 RNA の抽出は, RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) を使用して, 説明書通りに行った。RT は, ReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, Osaka, Japan) を使用して, 0.5μg の RNA から cDNA を合成した。得られた cDNA は解析まで -20°C で保存した。

6) RNA シーケンス解析

rbPTHrP を 0, および 1.0pM の濃度で培養した BT-C 細胞について, 5) で得られた RNA サンプルの一部を Novogene Co., LTD (Beijing, China) に依頼し, RNA シーケンス解析を行った。得られたデータは, リファレンス配列 (ensembl_bos_taurus_ars_ucd1_2_gca_002263795_2) にマッピングした。 $p < 0.05$, および $|\log_2(\text{FoldChange})| > 0$ を遺伝子発現量に

違いがあるとみなした。

7) qPCR

qPCR は、FastStart SYBR Green Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて、LightCycler® 96 System (Roche Diagnostics K.K., Tokyo, Japan) で解析した。PCR 条件は、95°C10 分、および 95°C10 秒、60°C10 秒、72°C15 秒を 45 サイクル行った。遺伝子発現量は、E-method 法(Pfaffl, 2001)により算出し、ACTB を内部標準とした。

8) ウェスタンブロッティング

rbPTHrP を 0, 0.1, 1.0pM ずつ添加したウェルについて、培地を除去し、PBS で洗浄後、500µl の laemuli サンプルバッファーを添加し、よくサスペンドして細胞を回収した。タンパク質濃度は、XL-Bradford assay kit (Pharma Foods International Co., Ltd., Tokushima, Japan) を用いて測定しサンプルを Mini-PROTEAN TGX Gels 4-15% (BIO-RAD Laboratories, Inc., Tokyo, Japan) のウェルにロードし、170V, 1 時間で SDS-PAGE を行った。その後、0.2 µm PVDF Blotting Membrane (Cytiva, Tokyo, Japan) に 100V, 30 分転写した。転写膜は、5%スキムミルク/TBST, 4°C, 1 時間ブロッキングした。一次抗体 (Anti-TRPV6 Antibody, allomone labs, Jerusalem, Israel) を 5%BSA/TBST で 3,000 倍に希釈し、4°Cで一晩反応さ

せた。二次抗体は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗ウサギ IgG を 2,500 倍に希釈して、4°C、1 時間反応させた。ローディングコントロールとして、HRP 標識抗 ACTB 抗体を 20,000 倍に希釈して使用した。画像は、Immobilon Western chemiluminescent HRP substrate (Merck Millipore, Tokyo, Japan) および iBright imager (Thermo Fisher Scientific, Tokyo, Japan) を使用して得た。

9) Ca イメージング

Ca イメージングには、Calcium Kit II – Fluo 4 (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を使用し、説明書通りに行った。Fluo 4-AM 50 µg を Dimethylsulfoxide 50µL で溶解した。Quenching Buffer 5 mL に、Hanks' HEPES Buffer (10X) 500 µL を加え、5% Pluronic® F-127 を 160 µL、250 mmol/L Probenecid 100 µL を添加し、超純水で 10 mL に調整した後、よく混合した。Dimethylsulfoxide で溶解した Fluo 4-AM を 50 µL 添加して、よく混合し、Loading Buffer とした。培養した BT-C 細胞に Loading Buffer を 100 µL ずつ添加し、37°C、5%CO₂ 大気条件下で 1 時間培養した。その後、rbPTHrP を 1.0 pM 添加し、37°C、5%CO₂ 大気条件下で 1 時間培養した。対照として、rbPTHrP を添加しなかった細胞を 0 pM とした。

rbPTHrP の添加前後の細胞について、オールインワン蛍光顕微鏡

(KEYENCE CORPORATION, Osaka, Japan) を用いて、480 nm の蛍光強度変化を測定した。

1 0) 統計解析

rbPTHrP 0pM 群との多重比較は、Dunnett 検定を用いた。統計解析は、R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) のグラフィカル・ユーザー・インターフェースである EZR (自治医科大学附属さいたま医療センター, 埼玉, 日本) を使用した。 $p < 0.05$ は統計的に有意とみなした。

結果

BT-C 細胞に rbPTHrP を 0pM, 1pM ずつ添加し培養し、RNA シーケンス解析を行ったところ、クラスター解析により PTHrP0pM と 1pM の群では、異なる遺伝子発現パターンを示した (図 11)。さらに、Volcano plots の結果、有意に \log_2 FoldChange が認められた遺伝子は、発現が上昇したものが 1366 個、低下したものが 1507 個認められた (図 12)。遺伝子発現に変化があったもののうち、Ca 輸送に関わる遺伝子発現量、および微量ミネラルトランスポーターの遺伝子発現量を qPCR により検討した (図 13-

16)。その結果、rbPTHrP を添加しなかった群よりも 1.0pM 添加した群で有意に遺伝子発現量が増加したものは、TRPV5、TRPV6、および CaBP だった。TRPV5、および VDR では、0pM よりも 0.1pM で有意に遺伝子発現量が高かった。微量ミネラルトランスポーターについて、DMT1 の遺伝子発現量は、0.1pM よりも 1.0pM で有意に高値を示した ($p < 0.05$)。さらに、ウェスタンブロット法により、PTHrP 0pM より、1pM の群で TRPV6 の発現量が有意に上昇した (図 17)。Ca イメージングの結果、rbPTHrP を添加しなかった場合よりも、1.0pM 添加した方が、強い蛍光強度が得られた (図 18)。

考察

胎盤では、様々なトランスポーター遺伝子が発現しており、胎子の成長に重要な役割を果たしている。本研究において、ウシ栄養膜由来培養細胞 BT-C を異なる Ca 濃度で培養したところ、PTHrP、CaSR、および TRPV6 の遺伝子発現量に有意な変化は認められなかった。このことから、BT-C 細胞細胞では、Ca 濃度を感知して PTHrP による Ca 輸送を調節しているわけではないと考えられた。

BT-C 細胞に rbPTHrP を添加したところ、Ca 輸送に関わる遺伝子群の発現上昇が認められた。HEK293 細胞において、PTHrP の N 末端と高い相同性を有する PTH 刺激によって TRPV5 を介した Ca²⁺の流入が増加することが報告されている(de Groot et al., 2009)。また、ラット腸管上皮細胞株 (IEC-6) において、PTHrP[1-40]は、Ca トランスポーターである TRPV6, CaBP, NCX1, PMCA1 の発現をアップレギュレートすることが報告されている(Liu et al., 2018)。さらに、TRPV6 をノックアウトしたマウスでは、胎盤を介した母体から胎子への Ca²⁺の輸送活性が低下することが報告されている(Suzuki et al., 2008)。ヒトでは、胎盤の合胞体栄養膜細胞において、母体側の TRPV6 を介して Ca²⁺が細胞内に取り込まれ、CaBP が Ca²⁺と結合して細胞内を移動し、基底膜に発現する PMCA により胎子側に Ca²⁺が輸送されると報告している(Dilworth and Glazier, 2009)。本研究において、rbPTHrP を BT-C 細胞に感作させると、PMCA2 の遺伝子発現量に変化はなかったが、TRPV5, TRPV6, および CaBP の遺伝子発現量が有意に増加した。特に、TRPV6 では、タンパク質の発現量も有意に増加した。VDR の遺伝子発現について、rbPTHrP 0pM よりも 0.1pM で有意に高く、1.0pM では有意差が認められなかった。この理由は明らかでないが、VD は、PTHrP が作用する受容体の一つである PTH1R の発現を増加させるこ

とが知られている (Nishishita et al., 1998)。また、VDR はケラチノサイトにおいて PTHrP に対し負のフィードバック機構があるともいわれている (Haussler et al., 2013)。これらのことから、ウシの胎盤において、PTHrP と VDR の遺伝子発現に何らかの調節機構がある可能性があった。さらに、VD やプロラクチンはマウス十二指腸における TRPV6、CaBP の遺伝子発現を調節することが報告されており (Ajibade et al., 2010)、今後はこれらのホルモンがウシ胎盤における Ca 輸送に関与するかも検討する必要があった。また、微量ミネラルトランスポーターについて、rbPTHrP を感作させると、DMT1 の遺伝子発現量が有意に増加したが、上昇比は 2 未満であり、生物学的に有意ではないと判断した。さらに、BT-C 細胞に rbPTHrP を添加し、Ca イメージングによって細胞内への Ca の取り込みを調べたところ、rbPTHrP を添加しなかった 0pM よりも添加した 1.0pM の方が強い蛍光強度が得られた。以上のことから、PTHrP は、ウシ由来の栄養膜細胞について、TRPV5、TRPV6 チャネルを介した細胞内への Ca 取り込みを促進し、その後 CaBP によって細胞内 Ca が輸送されと考えられた。

rbPTHrP による微量ミネラルトランスポーターの遺伝子発現量にほとんど変化はみられなかったが、BT-C は、DMT1、FPN1、TFRC といった遺伝子を発現しており、ウシ胎盤における微量ミネラル輸送研究に使用できる可

能性があった。

小括

ウシ栄養膜由来培養細胞である BT-C 細胞では, PTHrP を感作させることによって TRPV5, TRPV6, および CaBP の遺伝子発現量が増加し, 細胞内 Ca の取り込み, 輸送が促進されると考えられた。

総括および結論

第1章の結果から、乳牛の子宮捻転は分娩後10日前後にも発症し、起立異常を伴うことが明らかとなった。また、分娩期、分娩後、どちらの時期に子宮捻転を発症しても、血液中Ca濃度が低下していた。さらに、分娩期に子宮捻転を発症した牛は血清Zn濃度が低く、その母牛から産まれた新生子牛は血清Co濃度が高いという特徴があった。これらのことから、牛の子宮捻転は、低Ca血症が大きな問題となり、胎子のミネラル代謝にも影響があると考えられた。

第2章では、胎盤を介したCa輸送に着目したところ、新生子牛の血清中Ca濃度は母牛よりも高かった。血液中のCa恒常性を維持するPTHrPは、通常母牛の血液からは検出されないが、新生子牛の頸静脈血、臍動脈、および臍静脈血から検出された。さらに、ウシ胎盤において、胎子側のCa濃度を小葉のCaSRが感知し、子宮小丘由来のPTHrPが胎子のCa代謝を調節すると考えられた。

第3章では、*in vitro*モデルを使用して、ウシ胎盤におけるPTHrPの作用を調べた。ウシ栄養膜由来培養細胞において、ウシPTHrPはTRPV5、TRPV6、およびCaBPの遺伝子発現量を増加させることから、ウシ胎盤に

おける PTHrP が Ca の取り込みを促進することが示唆された。

以上のことから、ウシにおいて、胎子の血液中 Ca 濃度を胎盤小葉の CaSR が感知し、主に子宮小丘を由来とする PTHrP が、栄養膜の TRPV5, TRPV6, および CaBP の遺伝子発現を調節し、母体から胎子への Ca 輸送を調節すると考えられた (図 19)。

本論文の一部は以下に公表した。

K. Kazama, S. Fujita, A. Nishikawa, K. Onda. A study of 23 dairy cows with post-partum uterine torsion. *Veterinary Medicine and Science*. 10(2): e1357, 2024.

K. Kazama, K. Sugita, K. Onda. Trace element concentrations in blood samples from dairy cows with uterine torsion and their neonatal calves. *Veterinary World*. 16(12): 2533-2537, 2023.

K. Kazama, T. Nishio, M. Nagane, S. Arai, K. Onda. Relationship of parathyroid hormone-related protein and neonatal mineral metabolism in dairy cow placentas. *Animal science journal*. 93(1): e13723, 2022.

謝辞

本研究を遂行するにあたり終始懇切なるご指導賜りました麻布大学産業動物内科学研究室の恩田賢教授，新井佐知子講師，堀香織助教に深甚なる感謝の意を表します。また，細胞培養実験にあたり，貴重な細胞を分与頂いた，岩手大学の木崎景一郎教授，東北大学の盧尚建教授に心より感謝申し上げます。最後に、本研究に甚大なるご協力をいただきました麻布大学産業動物内科学研究室の学生諸氏に深謝いたします。

引用文献

- Abrol, A., Singh, M., Sharma, A., Kumar, P., 2019. A Review on Diagnostic and Prognostic Techniques Employed During Bovine Uterine Torsion. *Vet Sci Res Rev* 6. <https://doi.org/10.17582/journal.vsrr/2020/6.1.7.13>
- Ajibade, D. V., Dhawan, P., Fechner, A.J., Meyer, M.B., Pike, J.W., Christakos, S., 2010. Evidence for a Role of Prolactin in Calcium Homeostasis: Regulation of Intestinal Transient Receptor Potential Vanilloid Type 6, Intestinal Calcium Absorption, and the 25-Hydroxyvitamin D3 1 α Hydroxylase Gene by Prolactin. *Endocrinology* 151, 2974–2984. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0033>
- Akamatsu, H., Saitoh, Y., Serizawa, M., Miyake, K., Ohba, Y., Nakashima, K., 2007. Changes of serum 3-methylhistidine concentration and energy-associated metabolites in dairy cows with ketosis. *J Vet Med Sci* 69, 1091–1093. <https://doi.org/10.1292/jvms.69.1091>
- Alberghina, D., Giannetto, C., Vazzana, I., Ferrantelli, V., Piccione, G., 2011. Reference intervals for total protein concentration, serum protein fractions, and albumin/globulin ratios in clinically healthy dairy cows. *J Vet Diagnostic Investig* 23, 111–114.

<https://doi.org/10.1177/104063871102300119>

Aslinia, F., Mazza, J.J., Yale, S.H., 2006. Megaloblastic anemia and other causes of macrocytosis outpatient practice tips management. *Clin Med Res* 4, 236–241.

Aubry, P., Warnick, L.D., DesCôteaux, L., Bouchard, É., 2008. A study of 55 field cases of uterine torsion in dairy cattle. *Can Vet J* 49, 366–372.

Bahrami-Yekdangi, M., Ghorbani, G.R., Sadeghi-Sefidmazgi, A., Mahnani, A., Drackley, J.K., Ghaffari, M.H., 2022. Identification of cow-level risk factors and associations of selected blood macro-minerals at parturition with dystocia and stillbirth in Holstein dairy cows. *Sci Rep* 12, 1–17.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-09928-w>

Barlet, J.-P., Davicco, M.-J., Rouffet, J., Coxam, V., Lefaiivre, J., 1994. Parathyroid hormone-related peptide does not stimulate phosphate placental transport. *Placenta* 15, 441–444.
[https://doi.org/10.1016/0143-4004\(94\)90010-8](https://doi.org/10.1016/0143-4004(94)90010-8)

Barri, M., Abbas, S., Pickard, D., Hammonds, R., Wood, W., Caple, I., Martin, T., Care, A., 1990. Fetal magnesium homeostasis in the sheep. *Exp Physiol* 75, 681–688.

<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1990.sp003446>

Bertschinger, H.J., 1997. Veterinary reproduction & obstetrics (7th edn),
edited by G.H. Arthur, D.E. Noakes, H. Pearson and T.J. Parkinson :
book review. J S Afr Vet Assoc 68, 205–210.

<https://doi.org/10.4102/jsava.v68i1.863>

Bradbury, R., Sunn, K., Crossley, M., Bai, M., Brown, E., Delbridge, L.,
Conigrave, A., 1998. Expression of the parathyroid Ca(2+)-sensing
receptor in cytotrophoblasts from human term placenta. J Endocrinol
156, 425–430. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1560425>

Bradbury, R.A., Cropley, J., Kifor, O., Lovicu, F.J., de Iongh, R.U., Kable, E.,
Brown, E.M., Seely, E.W., Peat, B.B., Conigrave, A.D., 2002.
Localization of the Extracellular Ca²⁺-sensing Receptor in the Human
Placenta. Placenta 23, 192–200. <https://doi.org/10.1053/plac.2001.0765>

Brooks, G., 1999. Uterine torsion in a cow. Vet Rec 145, 292.

Brunette, M.G., Auger, D., Lafond, J., 1989. Effect of Parathyroid Hormone
on PO₄ Transport through the Human Placenta Microvilli. Pediatr Res
25, 15–18. <https://doi.org/10.1203/00006450-198901000-00004>

Campos, R. V, Asa, S.L., Drucker, D.J., 1991. Immunocytochemical

Localization of Parathyroid Hormone-like Peptide in the Rat Fetus¹.

Cancer Res 51, 6351–6357.

Care, A., Abbas, S., Pickard, D., Barri, M., Drinkhill, M., Findlay, J., White,

I., Caple, I., 1990. Stimulation of ovine placental transport of calcium and magnesium by mid-molecule fragments of human parathyroid

hormone-related protein. *Exp Physiol* 75, 605–608.

<https://doi.org/10.1113/expphysiol.1990.sp003437>

Dai, Z.J., Gao, J., Ma, X. Bin, Yan, K., Liu, X.X., Kang, H.F., Ji, Z.Z., Guan,

H.T., Wang, X.J., 2012. Up-regulation of hypoxia inducible factor-1 α by cobalt chloride correlates with proliferation and apoptosis in PC-2 cells. *J*

Exp Clin Cancer Res 31, 1–7. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-28>

Dancis, J., Springer, D., Cohlan, S.Q., 1971. Fetal Homeostasis in Maternal

Malnutrition. II. Magnesium Deprivation. *Pediatr Res* 5, 131–136.

<https://doi.org/10.1203/00006450-197103000-00005>

de Groot, T., Lee, K., Langeslag, M., Xi, Q., Jalink, K., Bindels, R.J.M.,

Hoenderop, J.G.J., 2009. Parathyroid Hormone Activates TRPV5 via PKA-Dependent Phosphorylation. *J Am Soc Nephrol* 20, 1693–1704.

<https://doi.org/10.1681/ASN.2008080873>

- Dilworth, M., Glazier, J., 2009. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP): a modulator of fetal growth and development. *Physiol News* 22–24. <https://doi.org/10.36866/pn.75.22>
- Diniz, W.J.S., Reynolds, L.P., Borowicz, P.P., Ward, A.K., Sedivec, K.K., McCarthy, K.L., Kassetas, C.J., Baumgaertner, F., Kirsch, J.D., Dorsam, S.T., Neville, T.L., Forcherio, J.C., Scott, R.R., Caton, J.S., Dahlen, C.R., 2021. Maternal Vitamin and Mineral Supplementation and Rate of Maternal Weight Gain Affects Placental Expression of Energy Metabolism and Transport-Related Genes. *Genes (Basel)* 12, 385. <https://doi.org/10.3390/genes12030385>
- Dufty, J.H., Bingley, J.B., Cove, L.Y., 1977. the Plasma Zinc Concentration of Nonpregnant, Pregnant and Parturient Hereford Cattle. *Aust Vet J* 53, 519–522. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1977.tb07935.x>
- Dunne, F.P., Ratcliffe, W., Mansour, P., Heath, D., 1994. Parathyroid hormone related protein (PTHrP) gene expression in fetal and extra-embryonic tissues of early pregnancy. *Hum Reprod* 9, 149–156. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138306>
- EMLY, J., GREGORY, J., BOWDEN, S., AHMED, A., WHITTLE, M.,

RUSHTON, D., RATCLIFFE, W., 1994. Immunohistochemical localization of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in human term placenta and membranes. *Placenta* 15, 653–660.

[https://doi.org/10.1016/S0143-4004\(05\)80411-4](https://doi.org/10.1016/S0143-4004(05)80411-4)

Esslemont, R.J., Kossaibati, M.A., 1996. Papers and Articles Incidence of production diseases and other health problems in a group of dairy herds in England 486–490.

Ferguson, J.E., Gorman, J. V, Bruns, D.E., Weir, E.C., Burtis, W.J., Martin, T.J., Bruns, M.E., 1992. Abundant expression of parathyroid hormone-related protein in human amnion and its association with labor. *Proc Natl Acad Sci* 89, 8384–8388. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.17.8384>

Frazer, G.S., Perkins, N.R., Constable, P.D., 1996. Bovine uterine torsion: 164 hospital referral cases. *Theriogenology* 46, 739–758.

[https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(96\)00233-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(96)00233-6)

Galvão, K.N., 2012. Postpartum uterine diseases in dairy cows. *Anim Reprod* 9, 290–296.

Garel, J., 1972. Distribution of Labeled Parathyroid Hormone in Rat Fetus.

Horm Metab Res 4, 131–132. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1097089>

Goff, J.P., Stabel, J.R., 1990. Decreased Plasma Retinol, α -Tocopherol, and Zinc Concentration During the Periparturient Period: Effect of Milk Fever. *J Dairy Sci* 73, 3195–3199. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(90\)79010-8](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(90)79010-8)

González-Montaña, J.-R., Escalera-Valente, F., Alonso, A.J., Lomillos, J.M., Robles, R., Alonso, M.E., 2020. Relationship between Vitamin B12 and Cobalt Metabolism in Domestic Ruminant: An Update. *Animals* 10, 1855. <https://doi.org/10.3390/ani10101855>

Grill, V., Hillary, J., Ho, P.M.W., Law, F.M.K., Macisaac, R.J., MacIsaac, I.A., Moseley, J.M., Martin, T.J., 1992. Parathyroid hormone-related protein: a possible endocrine function in lactation. *Clin Endocrinol (Oxf)* 37, 405–410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1992.tb02350.x>

Guo, C.H., Chen, P.C., Yeh, M.S., Hsiung, D.Y., Wang, C.L., 2011. Cu/Zn ratios are associated with nutritional status, oxidative stress, inflammation, and immune abnormalities in patients on peritoneal dialysis. *Clin Biochem* 44, 275–280. <https://doi.org/10.1016/J.CLINBIOCHEM.2010.12.017>

Hajurka, J., Macák, V., Hura, V., 2005. Influence of health status of

- reproductive organs on uterine involution in dairy cows. *Bull Vet Inst Pulawy* 49, 53–58.
- Han, Y.K., Kim, I.H., 2005. Risk factors for retained placenta and the effect of retained placenta on the occurrence of postpartum diseases and subsequent reproductive performance in dairy cows. *J Vet Sci* 6, 53–59. <https://doi.org/10.4142/jvs.2005.6.1.53>
- Haussler, M.R., Whitfield, G.K., Kaneko, I., Haussler, C.A., Hsieh, D., Hsieh, J.-C., Jurutka, P.W., 2013. Molecular Mechanisms of Vitamin D Action. *Calcif Tissue Int* 92, 77–98. <https://doi.org/10.1007/s00223-012-9619-0>
- Hellman, P., Ridefelt, P., Juhlin, C., Åkerström, G., Rastad, J., Gylfe, E., 1992. Parathyroid-like regulation of parathyroid-hormone-related protein release and cytoplasmic calcium in cytotrophoblast cells of human placenta. *Arch Biochem Biophys* 293, 174–180. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90381-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90381-6)
- Heppelmann, M., Krach, K., Krueger, L., Benz, P., Herzog, K., Piechotta, M., Hoedemaker, M., Bollwein, H., 2015. Involution in Dairy Cows Evaluated By Sonomicrometry. *J Reprod Dev* 61.
- Hosking, D.J., 1996. Calcium homeostasis in pregnancy. *Clin Endocrinol*

(Oxf) 45, 1–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2265.1996.tb02052.x>

Huang, Q., Wang, S., Yang, X., Han, X., Liu, Y., Khan, N.A., Tan, Z., 2023.

Effects of organic and inorganic selenium on selenium bioavailability, growth performance, antioxidant status and meat quality of a local beef cattle in China. *Front Vet Sci* 10.

<https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1171751>

Julien, W.E., Conrad, H.R., Jones, J.E., Moxon, A.L., 1976. Selenium and Vitamin E and Incidence of Retained Placenta in Parturient Dairy Cows.

J Dairy Sci 59, 1954–1959. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(76\)84467-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(76)84467-0)

Karreman, H.J., Wentink, G.H., Wensing, T., 2000. Using serum amyloid a to screen dairy cows for sub-clinical inflammation. *Vet Q* 22, 175–178.

<https://doi.org/10.1080/01652176.2000.9695051>

Khalili, M., Chamani, M., Amanlou, H., Nikkhah, A., Sadeghi, A., Dehkordi,

F.K., Rafiei, M., Shirani, V., 2019. The effect of feeding inorganic and organic selenium sources on the hematological blood parameters,

reproduction and health of dairy cows in the transition period. *Acta Sci Anim Sci* 42, e45371.

<https://doi.org/10.4025/actascianimsci.v42i1.45371>

Klaus-Halla, D., Mair, B., Sauter-Louis, C., Zerbe, H., 2018. Uterine torsion in cattle: Treatment, risk of injury for the cow and prognosis for the calf. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere* 46, 143–149.

<https://doi.org/10.15653/TPG-170680>

Kocylowski, R., Grzesiak, M., Gaj, Z., Lorenc, W., Bakinowska, E., Barańkiewicz, D., von Kaisenberg, C.S., Lamers, Y., Suliburska, J., 2019. Associations between the level of trace elements and minerals and folate in maternal serum and amniotic fluid and congenital abnormalities. *Nutrients* 11, 1–12. <https://doi.org/10.3390/nu11020328>

Kovacs, C.S., 2014. Bone metabolism in the fetus and neonate. *Pediatr Nephrol* 29, 793–803. <https://doi.org/10.1007/s00467-013-2461-4>

Kovacs, C.S., Ho-Pao, C.L., Hunzelman, J.L., Lanske, B., Fox, J., Seidman, J.G., Seidman, C.E., Kronenberg, H.M., 1998. Regulation of murine fetal-placental calcium metabolism by the calcium-sensing receptor. *J Clin Invest* 101, 2812–2820. <https://doi.org/10.1172/JCI2940>

Kovacs, C.S., Kronenberg, H.M., 1997. Maternal-Fetal Calcium and Bone Metabolism During Pregnancy, Puerperium, and Lactation*. *Endocr Rev*

18, 832–872. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.6.0319>

Kovacs, C.S., Lanske, B., Hunzelman, J.L., Guo, J., Karaplis, A.C.,

Kronenberg, H.M., 1996. Parathyroid hormone-related peptide

(PTHrP) regulates fetal–placental calcium transport through a receptor

distinct from the PTH/PTHrP receptor. *Proc Natl Acad Sci* 93, 15233–

15238. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.26.15233>

Kovacs, C.S., Manley, N.R., Moseley, J.M., Martin, T.J., Kronenberg, H.M.,

2001. Fetal parathyroids are not required to maintain placental calcium

transport. *J Clin Invest* 107, 1007–1015.

<https://doi.org/10.1172/JCI11321>

Lee, K., Deeds, J.D., Segre, G. V, 1995. Expression of parathyroid hormone-

related peptide and its receptor messenger ribonucleic acids during fetal

development of rats. *Endocrinology* 136, 453–463.

<https://doi.org/10.1210/endo.136.2.7835276>

Lee, K., Lanske, B., Karaplis, A.C., Deeds, J.D., Kohno, H., Nissenson, R.A.,

Kronenberg, H.M., Segre, G. V, 1996. Parathyroid hormone-related

peptide delays terminal differentiation of chondrocytes during

endochondral bone development. *Endocrinology* 137, 5109–5118.

<https://doi.org/10.1210/endo.137.11.8895385>

Lippi, G., Franchini, M., Guidi, G.C., 2005. Cobalt chloride administration in athletes: a new perspective in blood doping? *Br J Sports Med* 39, 872–873. <https://doi.org/10.1136/bjism.2005.019232>

Liu, C., Shao, G., Lu, Y., Xue, M., Liang, F., Zhang, Z., Bai, L., 2018. Parathyroid Hormone-Related Protein (1-40) Enhances Calcium Uptake in Rat Enterocytes Through PTHR1 Receptor and Protein Kinase $C\alpha/\beta$ Signaling. *Cell Physiol Biochem* 51, 1695–1709. <https://doi.org/10.1159/000495674>

Liu, J., Qian, L.D., Huo, J.L., Bi, B.L., Li, D.L., Wang, S.F., Chen, T., Li, L.J., Mao, H.M., Miao, Y.W., 2015. Identification, molecular characterization, and tissue expression of parathyroid hormone-related protein gene (PTHrP) from water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Genet Mol Res* 14, 2290–2301. <https://doi.org/10.4238/2015.March.27.14>

Mangin, M., Ikeda, K., Broadus, A.E., 1990. Structure of the mouse gene encoding parathyroid hormone-related peptide. *Gene* 95, 195–202. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90362-U](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90362-U)

Markusfeld, O., 1987. Periparturient Traits in Seven High Dairy Herds.

- Incidence Rates, Association with Parity, and Interrelationships Among Traits. *J Dairy Sci* 70, 158–166. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(87\)79990-1](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(87)79990-1)
- Martin, T.J., 2016. Parathyroid Hormone-Related Protein, Its Regulation of Cartilage and Bone Development, and Role in Treating Bone Diseases. *Physiol Rev* 96, 831–871. <https://doi.org/10.1152/physrev.00031.2015>
- Matthijsen, H.F., Putker, P.H., 1989. Postpartum torsion of the right uterus horn in a cow. *Tijdschr Diergeneeskd* 114, 17—19.
- Mocchegiani, E., Malavolta, M., Lattanzio, F., Piacenza, F., Basso, A., Abbatecola, A.M., Russo, A., Giovannini, S., Capoluongo, E., Bustacchini, S., Guffanti, E.E., Bernabei, R., Landi, F., 2012. Cu to Zn ratio, physical function, disability, and mortality risk in older elderly (ilSIRENTE study). *Age (Omaha)* 34, 539–552. <https://doi.org/10.1007/s11357-011-9252-2>
- Moseley, J.M., Kubota, M., Diefenbach-Jagger, H., Wettenhall, R.E., Kemp, B.E., Suva, L.J., Rodda, C.P., Ebeling, P.R., Hudson, P.J., Zajac, J.D., 1987. Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

<https://doi.org/10.1073/pnas.84.14.5048>

Motoi, Y., author_in_Japanese, author_in_Japanese, author_in_Japanese,
author_in_Japanese, author_in_Japanese, 1984. Determination and
Clinical Evaluation of Sialic Acid and Mucoprotein in Bovine Blood. J
Japan Vet Med Assoc 37, 643–649.

<https://doi.org/10.12935/jvma1951.37.643>

Mustapha, A., Peter, I.D., 2020. Case Report Sahel Journal of Veterinary
Sciences Management of Dystocia Due to Uterine Torsion in a Murah
Buffalo.

Nishishita, T., Okazaki, T., Ishikawa, T., Igarashi, T., Hata, K., Ogata, E.,
Fujita, T., 1998. A Negative Vitamin D Response DNA Element in the
Human Parathyroid Hormone-related Peptide Gene Binds to Vitamin D
Receptor Along with Ku Antigen to Mediate Negative Gene Regulation
by Vitamin D. J Biol Chem 273, 10901–10907.

<https://doi.org/10.1074/jbc.273.18.10901>

Northrop, G., Misenhimer, H.R., Becker, F.O., 1977. Failure of parathyroid
hormone to cross the nonhuman primate placenta. Am J Obstet Gynecol
129, 449–453. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(77\)90593-2](https://doi.org/10.1016/0002-9378(77)90593-2)

Onda, K., Sato, A., Yamaguchi, M., Matsuki, N., Ono, K., Wada, Y., 2006.

Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and Ca levels in the milk of lactating cows. *J Vet Med Sci* 68, 709–713.

<https://doi.org/10.1292/jvms.68.709>

Papadopoulou, A., Gole, E., Moutafi, A., Sfikas, C., Oehrl, W., Samiotaki, M.,

Papadimitriou, A., Papaevagelou, V., Nicolaidou, P., 2014. Calcium sensing receptor in pregnancies complicated by gestational diabetes mellitus. *Placenta* 35, 632–638.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2014.05.001>

Penny, C.D., 1999. Uterine torsion of 540(o) in a mid-gestation cow. *Vet Rec*

145, 230. <https://doi.org/10.1136/vr.145.8.230>

Pfaffl, M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in

real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 45e – 45.

<https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>

Pitkin, R.M., Cruikshank, D.P., Schauburger, C.W., Reynolds, W.A.,

Williams, G.A., Hargis, G.K., 1980. Fetal Calcitropic Hormones and Neonatal Calcium Homeostasis. *Pediatrics* 66, 77–82.

<https://doi.org/10.1542/peds.66.1.77>

Rubin, L.P., Kifor, O., Hua, J., Brown, E.M., Torday, J.S., 1994. Parathyroid hormone (PTH) and PTH-related protein stimulate surfactant phospholipid synthesis in rat fetal lung, apparently by a mesenchymal-epithelial mechanism. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1223, 91–100. [https://doi.org/10.1016/0167-4889\(94\)90077-9](https://doi.org/10.1016/0167-4889(94)90077-9)

Ruegg, P.L., 1988. Uterine torsion of 720 degrees in a midgestation cow. *J Am Vet Med Assoc* 192, 207—208.

Seki, K., Wada, S., Nagata, N., Nagata, I., 1994. Parathyroid Hormone-Related Protein during Pregnancy and the Perinatal Period. *Gynecol Obstet Invest* 37, 83–86. <https://doi.org/10.1159/000292530>

Semenza, G.L., 2007. Life with oxygen. *Science* (80-) 318, 62–64. <https://doi.org/10.1126/science.1147949>

Senior, P. V., Heath, D.A., Beck, F., 1991. Expression of parathyroid hormone-related protein mRNA in the rat before birth: demonstration by hybridization histochemistry. *J Mol Endocrinol* 6, 281–290. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0060281>

Shankar, A.H., Prasad, A.S., 1998. Zinc and immune function: The biological basis of altered resistance to infection. *Am J Clin Nutr* 68.

<https://doi.org/10.1093/ajcn/68.2.447S>

Shen, P.J., Gong, B., Xu, F.Y., Luo, Y., 2015. Four trace elements in pregnant women and their relationships with adverse pregnancy outcomes. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 19, 4690–4697.

Sickinger, M., Roth, J., Failing, K., Wehrend, A., 2018. Serum neuropeptide concentrations in cows with intrapartum uterine torsion. *Anim Reprod Sci* 196, 193–196. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2018.08.007>

Smith, B., Van Metre, D., Pusterla, N., 2019. *Large Animal Internal Medicine, Sixth Edit. ed, Large Animal Internal Medicine. Elsevier.*
<https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55445-9.00064-1>

Spears, J.W., Weiss, W.P., 2008. Role of antioxidants and trace elements in health and immunity of transition dairy cows. *Vet J* 176, 70–76.
<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.015>

Suzuki, Y., Koshi, K., Imai, K., Takahashi, T., Kizaki, K., Hashizume, K., 2011. Bone morphogenetic protein 4 accelerates the establishment of bovine trophoblastic cell lines. *Reproduction* 142, 733–743.
<https://doi.org/10.1530/REP-11-0275>

Suzuki, Y., Kovacs, C.S., Takanaga, H., Peng, J., Landowski, C.P., Hediger,

- M.A., 2008. Calcium Channel TRPV6 Is Involved in Murine Maternal–Fetal Calcium Transport. *J Bone Miner Res* 23, 1249–1256.
<https://doi.org/10.1359/jbmr.080314>
- Szenci, O., Chew, B.P., Bajcsy, A.C., Szabó, P., Brydl, E., 1994. Total and Ionized Calcium in Parturient Dairy Cows and Their Calves. *J Dairy Sci* 77, 1100–1105. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(94\)77045-4](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(94)77045-4)
- Tandle, M.K., 2005. Uterine torsion in a Buffalo, *Indian Veterinary Journal*.
- Thaker, R., Oza, H., Shaikh, I., Kumar, S., 2019. Correlation copper and zinc in spontaneous abortions. *Int J Fertil Steril* 13, 97–101.
<https://doi.org/10.22074/ijfs.2019.5586>.Introduction
- Thiede, M.A., Daifotis, A.G., Weir, E.C., Brines, M.L., Burtis, W.J., Ikeda, K., Dreyer, B.E., Garfield, R.E., Broadus, A.E., 1990. Intrauterine occupancy controls expression of the parathyroid hormone-related peptide gene in preterm rat myometrium. *Proc Natl Acad Sci* 87, 6969–6973. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.18.6969>
- Thiede, M.A., Rodan, G.A., 1988. Expression of a Calcium-Mobilizing Parathyroid Hormone-Like Peptide in Lactating Mammary Tissue. *Science* (80-) 242, 278–280. <https://doi.org/10.1126/science.3175653>

Tok, A., Özer, A., Baylan, F.A., Kurutaş, E.B., 2021. Copper/Zinc Ratio Can Be a Marker to Diagnose Ectopic Pregnancy and Is Associated with the Oxidative Stress Status of Ectopic Pregnancy Cases. *Biol Trace Elem Res* 199, 2096–2103. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02327-0>

Tsuzuki, S., Morimoto, N., Hosokawa, S., Matsushita, T., 2013. Associations of Maternal and Neonatal Serum Trace Element Concentrations with Neonatal Birth Weight. *PLoS One* 8. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0075627>

Turan, K., Arslan, A., Uçkan, K., Demir, H., Demir, C., 2019. Change of the levels of trace elements and heavy metals in threatened abortion. *J Chinese Med Assoc* 82, 554–557. <https://doi.org/10.1097/JCMA.0000000000000077>

Wang, D., Jia, D., He, R., Lian, S., Wang, J., Wu, R., 2021. Association Between Serum Selenium Level and Subclinical Mastitis in Dairy Cattle. *Biol Trace Elem Res* 199, 1389–1396. <https://doi.org/10.1007/s12011-020-02261-1>

Wang, J., Zhu, X., Wang, Z., Li, X., Zhao, B., Liu, G., 2014. Changes in serum copper and zinc levels in peripartum healthy and subclinically

hypocalcemic dairy cows. *Biol Trace Elem Res* 159, 135–139.

<https://doi.org/10.1007/s12011-014-9997-4>

Wankhade, P.R., Manimaran, A., Kumaresan, A., Jeyakumar, S., Ramesha, K.P., Sejian, V., Rajendran, D., Varghese, M.R., 2017. Metabolic and immunological changes in transition dairy cows: A review. *Vet World* 10, 1367–1377. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2017.1367-1377>

Wilson, G.D.A., Hunter, J.T., Derrick, G.H., Aitken, W.M., Kronfeld, D.S., 1977. Fetal and Maternal Mineral Concentrations in Dairy Cattle During Late Pregnancy. *J Dairy Sci* 60, 935–941. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(77\)83966-0](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(77)83966-0)

Wojcik, S., Schanbacher, F., McCauley, L., Zhou, H., Kartsogiannis, V., Capen, C., Rosol, T., 1998. Cloning of bovine parathyroid hormone-related protein (PTHrP) cDNA and expression of PTHrP mRNA in the bovine mammary gland. *J Mol Endocrinol* 20, 271–280. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0200271>

Yaeger, M.J., Neiger, R.D., Holler, L., Fraser, T.L., Hurley, D.J., Palmer, I.S., 1998. The effect of subclinical selenium toxicosis on pregnant beef cattle. *J Vet Diagnostic Investig* 10, 268–273.

<https://doi.org/10.1177/104063879801000307>

Yuan, Y., Hilliard, G., Ferguson, T., Millhorn, D.E., 2003. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- α and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- α . *J Biol Chem* 278, 15911–15916. <https://doi.org/10.1074/jbc.M300463200>

Zhang, Z., Liu, G., Li, X., Gao, L., Guo, C., Wang, H., Wang, Z., 2010. Evaluation of the change of serum copper and zinc concentrations of dairy cows with subclinical ketosis. *Biol Trace Elem Res* 138, 8–12. <https://doi.org/10.1007/s12011-009-8606-4>

風間 啓, 藤田 慎悟, 西川 晃豊, 2017. 乳牛における分娩後子宮捻転の12症例に関する検討. *家畜診療* 64, 507–514.

表および図

表1 誘導結合プラズマ質量分析の分析条件。

ICP-MS: Agilent 7700 ×	Conditions
Plasma conditions	
RF power	1.55 kW
Plasma gas flow rate	15.0 L/min Ar
Auxiliary gas flow rate	0.90 L/min Ar
Makeup gas flow rate	0 L/min Ar
Carrier gas flow rate	1.0 L/min Ar
Sampling depth (mm from load coil)	He mode: 8.00 mm
	H ₂ mode: 10.00 mm
Cell gas	He mode: 4.3 mL/min Ar
	H ₂ mode: 6.0 mL/min Ar
Nebulizer	Micro Mist
Sample uptake rate	0.45 mL/min
Data acquisition:	
Accumulation time	0.3–1.0 s/point
Data point	3 points/peak
Repetition	3 times
ICP-MS=Inductively coupled plasma mass spectrophotometry	

表 2 分娩後子宮捻転の症例一覧。

No.	Torsion horn	Torsion direction	Gestation period (day)	Days from delivery to diagnosis (day)	Calving number	Fetal number	Fetal death	Retained placenta	Complications
1	Right	Left	262	15	2	1	+	+	-
2	Left	Left	279	8	3	1	+	+	Mastitis
3	Left	Left	284	4	2	1	-	N/A	Dystocia
4	Left	Right	279	6	5	1	-	+	-
5	Left	Left	274	7	3	1	-	+	Pneumonia
6	Left	Left	279	3	3	2	-	N/A	Dystocia
7	Right	Right	275	12	3	2	-	+	-
8	Right	Left	273	12	2	3	+	+	-
9	Right	Right	274	12	4	2	-	+	Ketosis
10	Right	Right	262	7	3	2	+	+	-
11	Left	Left	N/A	10	6	2	-	+	LDA
12	Right	Right	247	14	4	1	+	+	Phlegmone
13	Right	Right	285	6	7	1	-	+	Milk fever
14	Left	Right	275	14	4	2	-	+	-
15	Right	Right	276	13	3	1	-	+	Ketosis
16	Left	Left	270	16	2	1	-	+	Arthritis, Ketosis
17	Right	Right	277	7	6	1	-	+	Ketosis
18	Right	Left	293	8	3	1	-	+	Bloody milk
19	Right	Right	252	11	1	1	+	+	Puerperal fever, Mastitis
20	Right	Right	280	11	2	1	-	+	Ketosis
21	Right	Right	271	8	1	2	+	+	Ketosis
22	Right	Right	283	11	4	1	-	+	Mastitis, Dislocation of hip joint
23	Left	Left	N/A	5	3	1	-	N/A	Dystocia, Abomasal impaction

表3 分娩後子宮捻転を発症した牛の血液検査結果。

No.	WBC ^{a)} (10 ⁹ / μ L)	RBC ^{a)} (10 ⁴ / μ L)	Hb ^{a)} (g/dL)	Ht ^{a)} (%)	TP ^{b)} (g/dL)	Alb ^{b)} (g/dL)	α -Glb ^{b)} (g/dL)	β -Glb ^{b)} (g/dL)	γ -Glb ^{b)} (g/dL)	Sial ^{c)} (mg/dL)	Glu ^{a)} (mg/dL)	Ca ^{a)} (mg/dL)	iP ^{a)} (mg/dL)	Mg ^{a)} (mg/dL)	AST ^{a)} (IU/L)	γ -GTP ^{a)} (IU/L)	NEFA ^{d)} (mEq/L)
n	20	20	20	20	20	19	19	19	19	17	18	20	20	19	20	20	19
mean \pm SD	7.1 \pm 2.9	6.27 \pm 1.24	10.8 \pm 1.8	33.4 \pm 4.8	6.6 \pm 0.9	2.6 \pm 0.37	1.0 \pm 0.15	0.7 \pm 0.14	2.4 \pm 0.14	69.3 \pm 8.6	66 \pm 19	7.9 \pm 1.0	4.8 \pm 1.6	1.9 \pm 0.3	178.2 \pm 121.6	24.2 \pm 9.3	0.9 \pm 0.36

a) Smith et al. 2019, b) Alberghina et al. 2011, c) Motoi et al. 1984, d) Akamatsu et al. 2007

WBC; white blood cell, RBC; red blood cell, Hb; hemoglobin, Ht; hematocrit, TP; total protein, Alb; albumin, α -Glb; α -globulin, β -Glb; β -globulin, γ -Glb; γ -globulin, Sial; sialic acid, Glu; glucose, Ca; calcium, iP; inorganic phosphorus, Mg; magnesium, AST; aspartate aminotransferase, γ -GTP; γ -glutamyl transpeptidase, NEFA; nonesterified fatty acid

表 4 分娩期の子宮捻転の臨床疫学的情報
 MUT; 子宮捻転を発生した母牛, non-MUT; 子宮捻転を発生していない母牛
 *: $p < 0.05$

Group	Calving number	Gestational age (days)	Fetal mortality
non-MUT	3.2 ± 1.7	281.14 ± 4.94	2 / 27
MUT	3.5 ± 2.3	280.53 ± 10.24	6 / 15
Odds ratio			7.85*

表5 分娩期の母牛の血清中ミネラル濃度。
MUT; 子宮捻転を発生した母牛, non-MUT; 子宮捻転を発生していない母牛
ns; no significance

Minerals	MUT		non-MUT		p value
	(mg/dL)	n	(mg/dL)	n	
Ca	8.18 ± 1.65	14	8.48 ± 1.41	25	ns
iP	1.92 ± 1.36	14	4.42 ± 1.56	25	0.083
Mg	1.80 ± 0.66	9	1.95 ± 0.45	18	ns
Cr	1.92 ± 1.36	9	2.09 ± 1.74	16	ns
Mn	0.60 ± 0.60	5	1.18 ± 0.98	16	ns
⁵⁶ Fe	123.21 ± 49.70	9	157.70 ± 101.10	19	ns
⁵⁷ Fe	120.68 ± 44.95	9	154.65 ± 100.98	19	ns
Co	0.12 ± 0.05	7	0.19 ± 0.11	14	ns
Ga	1.42 ± 0.64	9	1.34 ± 0.69	18	ns
Se	4.53 ± 1.64	9	3.62 ± 1.71	18	0.067
Rb	18.08 ± 3.58	9	16.74 ± 6.19	19	ns
Sr	5.66 ± 1.28	9	7.14 ± 4.72	18	ns
Mo	2.86 ± 1.84	9	3.68 ± 4.29	19	ns
Cs	0.17 ± 0.05	9	0.19 ± 0.10	18	ns
Ba	9.21 ± 4.95	9	8.74 ± 3.87	18	ns
Cu	69.83 ± 21.67	9	82.33 ± 44.37	19	ns
Zn	49.84 ± 7.95	5	112.94 ± 61.60	15	0.008
Cu / Zn ratios	1.60 ± 0.45	5	1.10 ± 1.25	15	0.025

表6 新生子牛の血清中ミネラル濃度。
 NUT; 子宮捻転を発症した母牛から産まれた新生子牛, non-NUT; 子宮捻転を
 発症していない母牛から産まれた新生子牛
 ns; no significance

Minerals		NUT		non-NUT		<i>p</i> value
		n		n		
Ca	(mg/dL)	12.51 ± 0.87	9	12.59 ± 1.22	26	ns
iP	(mg/dL)	7.20 ± 1.40	8	7.72 ± 1.14	26	0.070
Mg	(mg/dL)	1.88 ± 0.55	6	2.07 ± 0.30	18	0.090
Cr	(µg/dL)	1.59 ± 1.21	5	1.35 ± 1.38	14	ns
Mn	(µg/dL)	0.49 ± 0.20	2	1.25 ± 1.26	16	ns
⁵⁶ Fe	(µg/dL)	147.43 ± 47.47	6	185.33 ± 96.29	20	ns
⁵⁷ Fe	(µg/dL)	138.40 ± 44.52	6	187.83 ± 96.76	20	ns
Co	(µg/dL)	0.54 ± 0.23	4	0.17 ± 0.12	14	0.005
Ga	(µg/dL)	1.14 ± 0.24	5	1.36 ± 0.85	18	ns
Se	(µg/dL)	3.33 ± 0.68	6	2.36 ± 1.26	20	0.073
Rb	(µg/dL)	23.44 ± 3.01	6	22.28 ± 8.27	20	ns
Sr	(µg/dL)	4.72 ± 0.89	6	6.57 ± 4.87	19	ns
Mo	(µg/dL)	1.87 ± 1.22	6	2.74 ± 3.14	20	ns
Cs	(µg/dL)	0.23 ± 0.08	6	0.23 ± 0.10	19	ns
Ba	(µg/dL)	6.70 ± 2.70	6	8.76 ± 5.27	19	ns
Cu	(µg/dL)	19.14 ± 4.22	5	23.37 ± 7.04	19	ns
Zn	(µg/dL)	87.75 ± 62.34	5	182.61 ± 105.18	17	0.058
Cu/Zn ratios	(µg/dL)	0.40 ± 0.38	5	0.18 ± 0.14	17	ns

表7 帝王切開で胎盤節を採取した牛の個体情報。
N/A; data not available

No.	Collection location	Age (y)	Gestational age (days)	Complicating disorder
1	Hokkaido	3	279	Uterine torsion
2	Hokkaido	8	275	Uterine torsion
3	Hokkaido	2	278	Uterine torsion
4	Hokkaido	8	281	Uterine torsion
5	Hokkaido	8	279	Dystocia
6	Hokkaido	5	284	Uterine torsion
7	Hokkaido	7	263	Death imminent
8	Hokkaido	10	266	Dystocia
9	Azabu univ.	6	240	Enzootic bovine leukosis
10	Azabu univ.	3	260	Fracture
11	Azabu univ.	4	213	Abomasal impaction
12	Azabu univ.	4	296	Prolonged gestation
13	Azabu univ.	9	N/A	Without complication

表8 実験に使用したプライマー一覧。

プライマー		位置 (nt)	シーケンス (5' to 3')	product size (bp)	Accession number
Bovine GAPDH	Forward	167-186	tgacccttcattgaccttc	143	U85042.1
	Reverse	309-290	gatctcgtctctggaagatg		
Bovine ACTB	Forward	436-456	accgtgagaagatgaccaga	90	NM_173979.3
	Reverse	525-506	aggcatacaggggacagcaca		
Bovine HPRT1	Forward	350-371	actgtaacgaccagtcaacagg	138	NM_001034035.2
	Reverse	487-468	tgaccaaggcaagcaaaagtc		
Bovine PTHrP	Forward	296-315	gacttacggcgtcgggtctt	120	AB097837.1
	Reverse	415-397	gggtgtgttcttgggtgtg		
Bovine CaSR	Forward	2315-2336	aggagatcgagtttctgtcgtg	72	NM_174002.3
	Reverse	2386-2367	aaatgcccgacacagcaaaag		
Bovine TRPV5	Forward	891-910	agggaacaactgtgatgttc	108	XM_010804626.3
	Reverse	998-977	aggagtcactctgtgaggtc		
Bovine TRPV6	Forward	842-861	actgttcagcacctttgagc	122	NM_001206189.1
	Reverse	963-944	tgagcaaacgacgatgatg		
Bovine CaBP	Forward	198-218	agcacctcgtatgagctttt	147	NM_174257.2
	Reverse	344-325	cccaggcactcttctccag		
Bovine LRP2	Forward	97-118	accatctttgaccagagtgtcc	96	AB863206.1
	Reverse	192-173	aaagcagaattggcgcatc		
Bovine Klotho	Forward	2793-2812	tgccgcaaatcagtttgagc	87	NM_001191195.1
	Reverse	2879-2858	agagtttcaggacctgaaagc		
Bovine ORAI1	Forward	489-507	ccaagctcaaagcctccag	88	NM_001099002.1
	Reverse	576-556	tggtcagcatccagtgtacc		
Bovine PMCA1	Forward	2498-2519	agcgggattatcaggatgctag	90	NM_174696.2
	Reverse	2572-2551	tgctcatggactttctgacagg		
Bovine PMCA2	Forward	833-852	gagagcaacgaaggatgtgc	103	NM_001191245.3
	Reverse	935-916	agatgaccgacaggaggatg		
Bovine CTR1	Forward	223-245	tgatgatgatgatgcctatgacc	88	NM_001100381.1
	Reverse	310-290	tctccagccgtattgatcacc		
Bovine DMT1	Forward	403-422	ttcttctgttggccaccatc	129	NM_001101103.1
	Reverse	531-511	acaggatgattcgtggaacc		
Bovine FPN1	Forward	536-557	tgatgggttcttacttcatgc	127	NM_001077970.1
	Reverse	662-642	tctgtctctctctcaacaac		
Bovine TFRC	Forward	1002-1022	tgacatgctcatctgggaac	99	NM_001206577.1
	Reverse	1100-1079	ttggcaatcctgatgactgag		
Bovine ZNT5	Forward	359-381	cactaaggaccttctgtctattc	86	NM_001192174.2
	Reverse	444-423	tctctccagaactagtgaac		
Bovine ZIP7	Forward	905-925	tcctcatgctttggaacctc	139	NM_001076237.3
	Reverse	1043-1024	ttctccaccacaagaaggc		

表9 母牛の頸静脈, 新生子牛の頸静脈, 臍静脈, 臍動脈の血漿PTHrP, 血清Ca, iP, Mg濃度。

母牛の血漿中PTHrP濃度は検出限界以下であった。

**：母牛と比較して有意差あり ($p < 0.01$)

	Maternal jugular vein	n	Neonatal jugular vein	n	Umbilical vein	n	Umbilical artery	n
PTHrP (pmol/L)	<1.0	(11)	4.2 ± 1.48	(10)	4.0 ± 1.14	(11)	4.2 ± 1.38	(11)
Ca (mg/dL)	8.5 ± 1.72	(21)	13.1 ± 1.44**	(17)	13.9 ± 1.53**	(12)	13.5 ± 0.65**	(12)
iP (mg/dL)	5.3 ± 1.55	(21)	7.7 ± 1.08**	(17)	7.5 ± 2.02**	(12)	7.3 ± 1.57**	(12)
Mg (mg/dL)	1.8 ± 0.48	(12)	2.4 ± 0.85	(13)	2.3 ± 0.94	(12)	2.2 ± 0.93	(12)

表10 Hisタグ付加遺伝子組換えウシPTHrP作製に使用したプライマー

プライマー	シーケンス(5' to 3')	Accession number
pUC19 inverse PCR	Forward GCGGCATCAGAGCAGAIT Reverse ATAGTTAAGCCAGCCCCCG	L09137
His-Tagged PTHrP InFusion ATG	Forward GGCTGGCTTAACTATATATGCACCATCACCA	AB097837.1
His-Tagged PTHrP InFusion TAA	Reverse CTGCTCTGATGCCGCTTATTAATGCCCTCCGTGAGT	



図1 右脇部の試験的開腹術によって分娩後子宮捻転と診断した1症例（症例 No. 1）。大網（*）を頭側によけると、左方向に 360° 捻転し、膨満した右子宮角（白矢印）と、それに牽引され緊張した右子宮広間膜（白矢頭）が確認された。



図2 分娩後子宮捻転発症牛の子宮内貯留液。捻転して膨満した子宮角には腐敗臭を伴う悪露よびガスが貯留していた（症例 No. 1）。

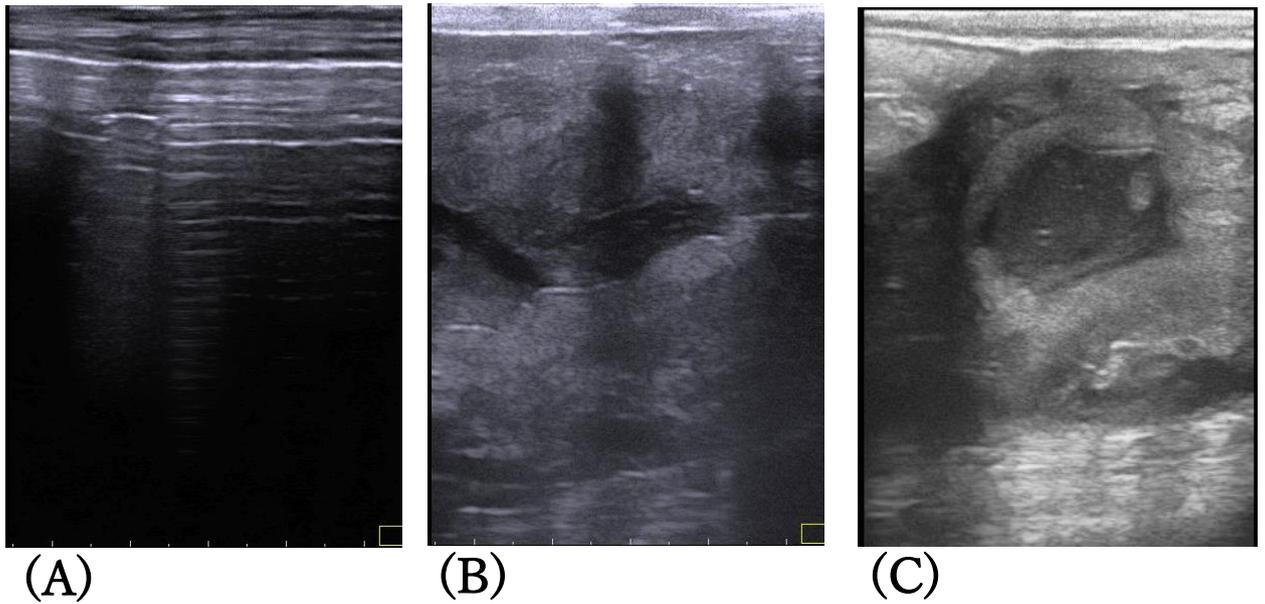


図3 子宮の超音波検査（症例 No. 23）では，貯留したガスの多重反射（A），子宮壁の肥厚を伴うエコー源性の子宮内膜，低エコーの貯留液（B）を認めた。捻転整復後，多重反射は消失したが，子宮内貯留液は認められた（C）。



(A)

(B)

図4 開腹術による分娩後子宮捻転の整復方法

立位右臍部切開により，右方向に180°捻転していた左子宮角（白矢印）と巻き込まれていた右子宮角（白矢頭）を把持し，術創方向へ牽引しながら捻転と逆方向へ回転させることで捻転を整復した（A）。捻転整復後，子宮壁に皺壁がみられ，子宮の収縮が認められた（B）。



図5 牛の胎盤節。
母体側の子宮小丘（黄矢印），および胎子側の胎盤小葉（黄矢頭）。

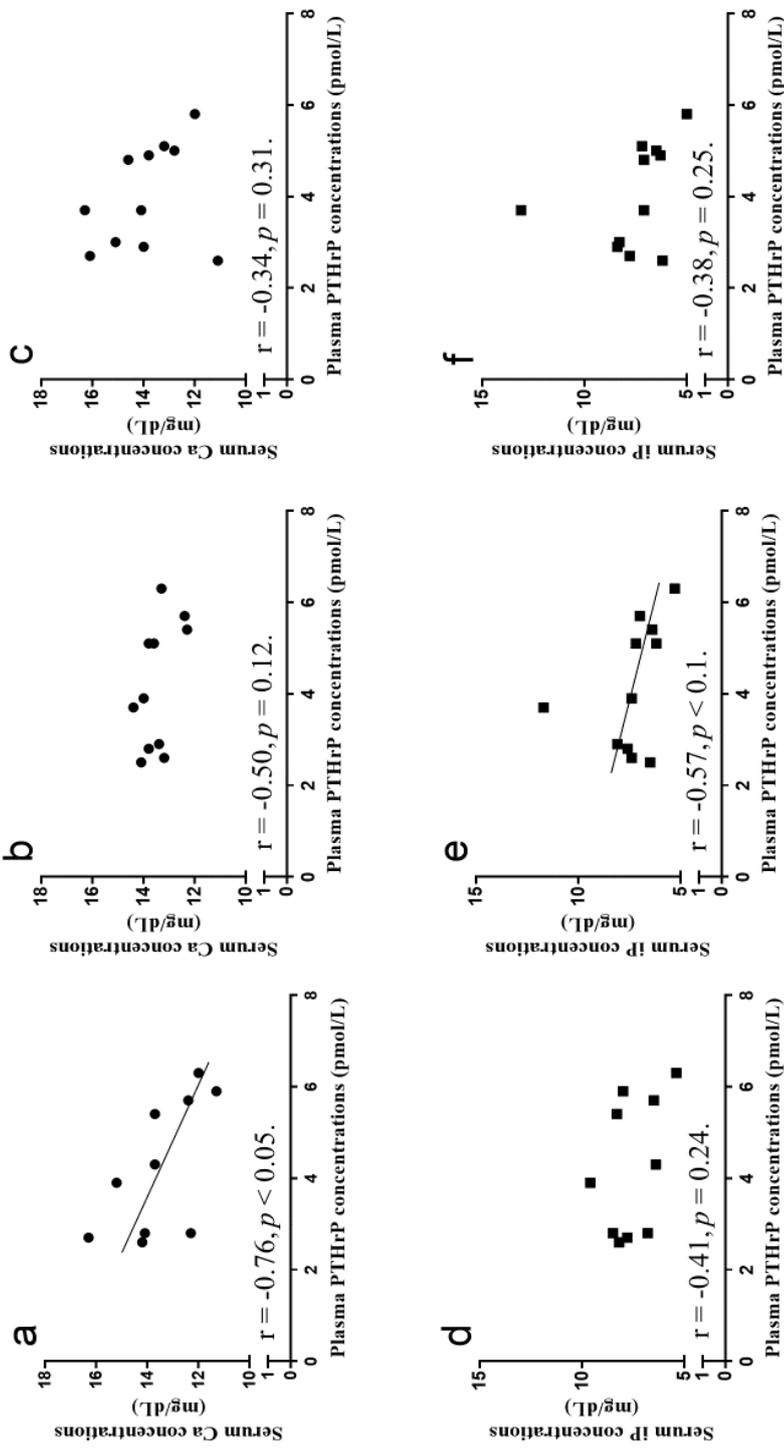


図6 新生子牛頸静脈 (aおよびd)、臍動脈 (bおよびe)、臍静脈 (cおよびf) における血漿中副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) 濃度と血清中Ca (上段)、またはiP (下段) 濃度との相関。 p : p 値。動物数 (n)は以下の通り: aおよびd, $n = 10$; b, c, e, およびf, $n = 11$ 。

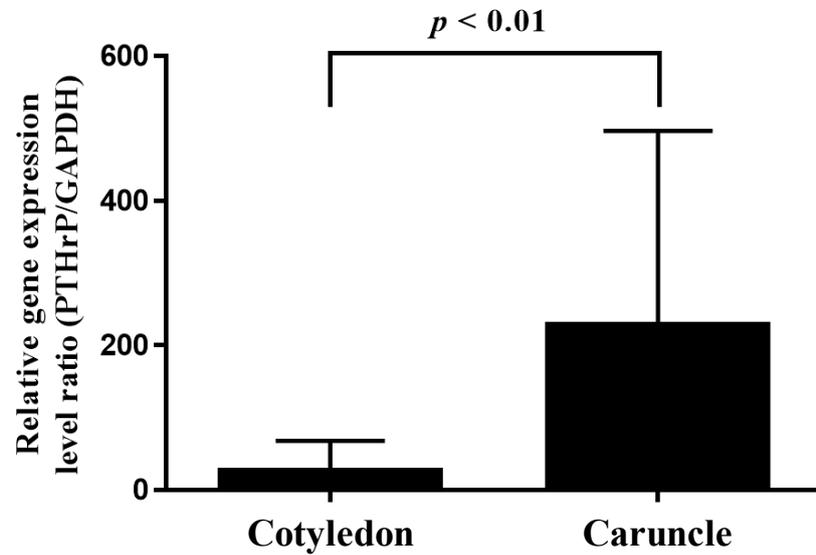


図7 胎盤節における副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) の遺伝子発現量比。子宮小丘 (Caruncle, 平均値±SD=227.6±269.2, n=13) の PTHrP 遺伝子発現量は、小葉 (Cotyledon, 平均値±SD=26.8±41.3, n=13) よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。

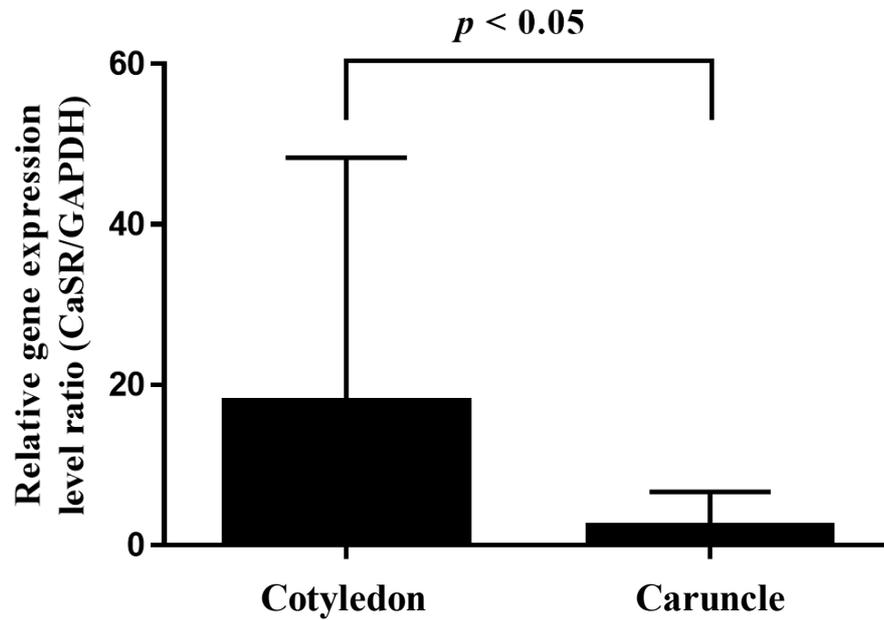


図8 胎盤節におけるカルシウム感知受容体 (CaSR) の遺伝子発現量比。小葉 (Cotyledon, 平均値±SD=18.0±30.4, n=13) の CaSR 遺伝子発現量は, 子宮小丘 (Caruncle, 平均値±SD=2.6±4.3, n=13) よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。

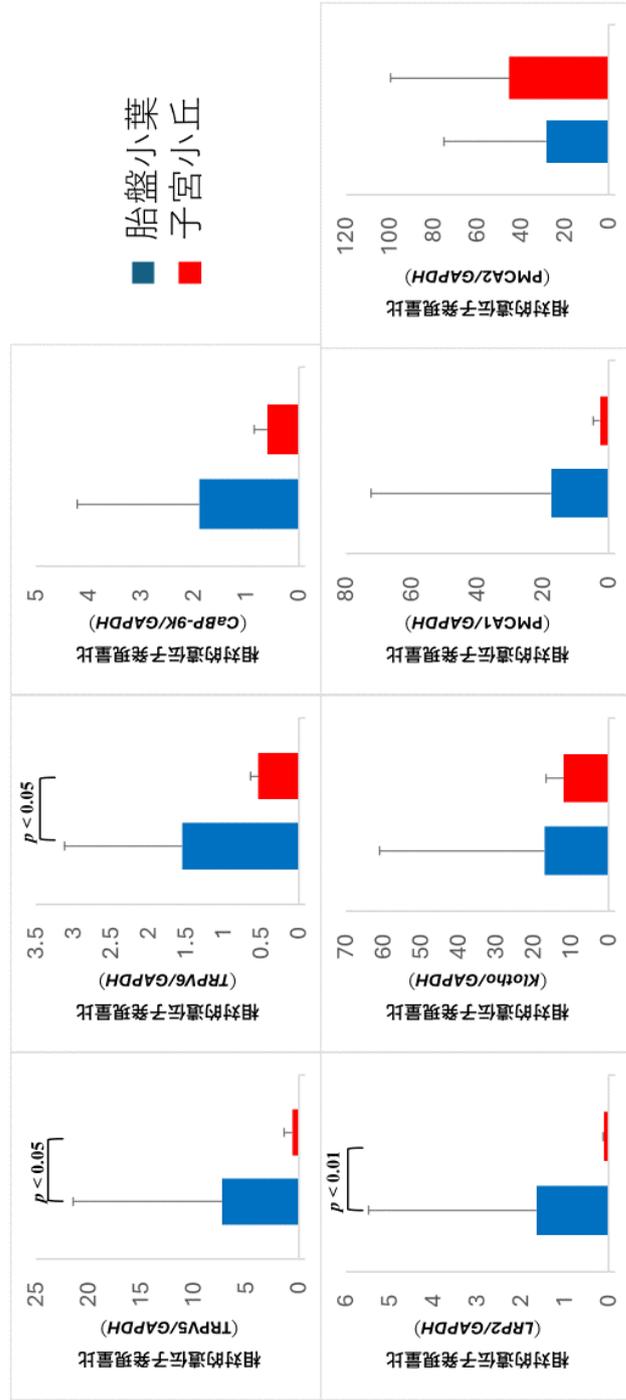


図9 胎盤節におけるCaトランスポーターの遺伝子発現量比
 TRPV5, TRPV6, LRP2の遺伝子発現量は子宮小丘 (赤, n=13) よりも小葉
 (青, n=13) で有意に高かった。

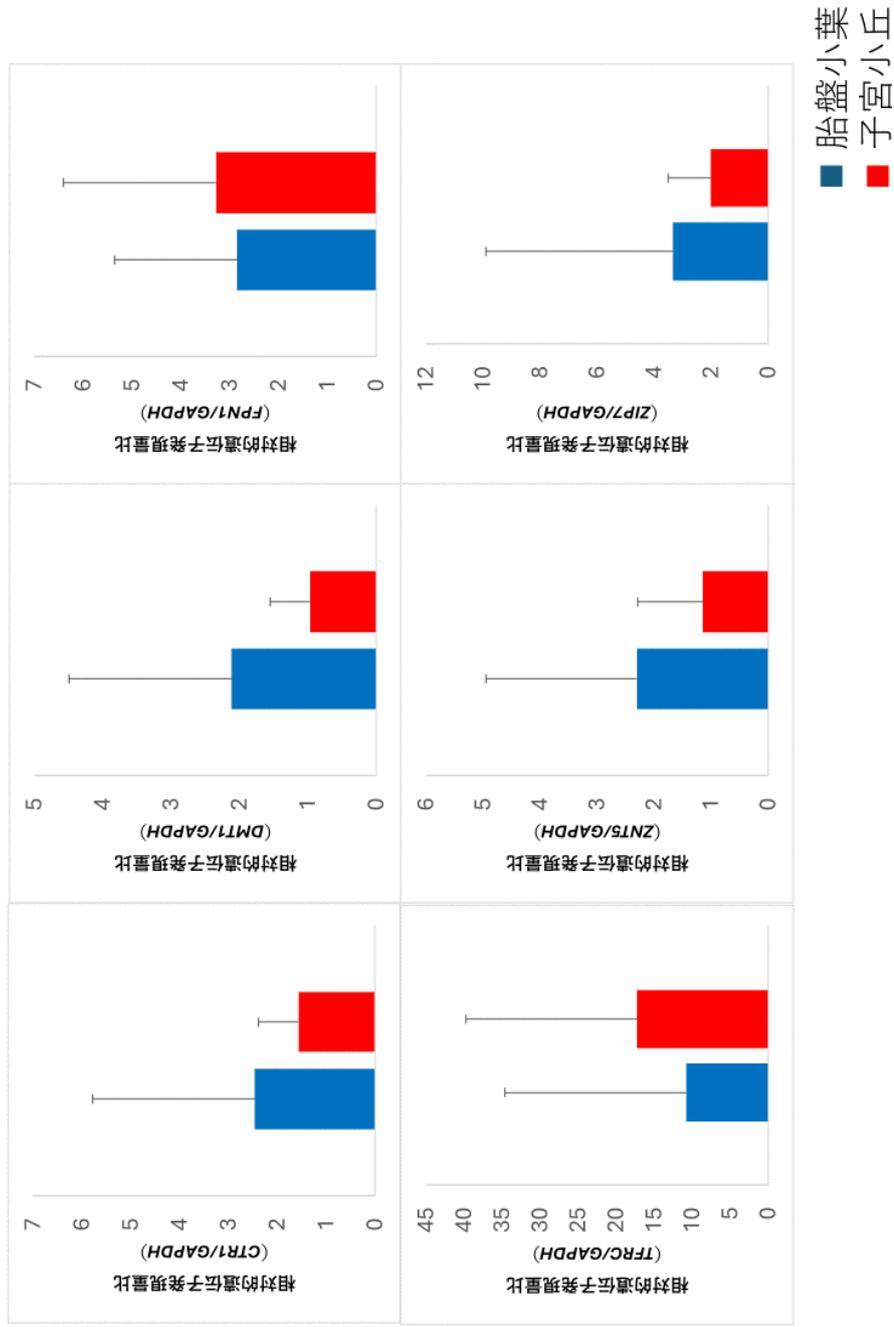


図10 胎盤節における微量ミネラルトランスポーターの遺伝子発現量比
 微量ミネラルトランスポーターの遺伝子発現量は、子宮小丘（赤, n=13）と小葉
 （青, n=13）で有意差は認められなかった。

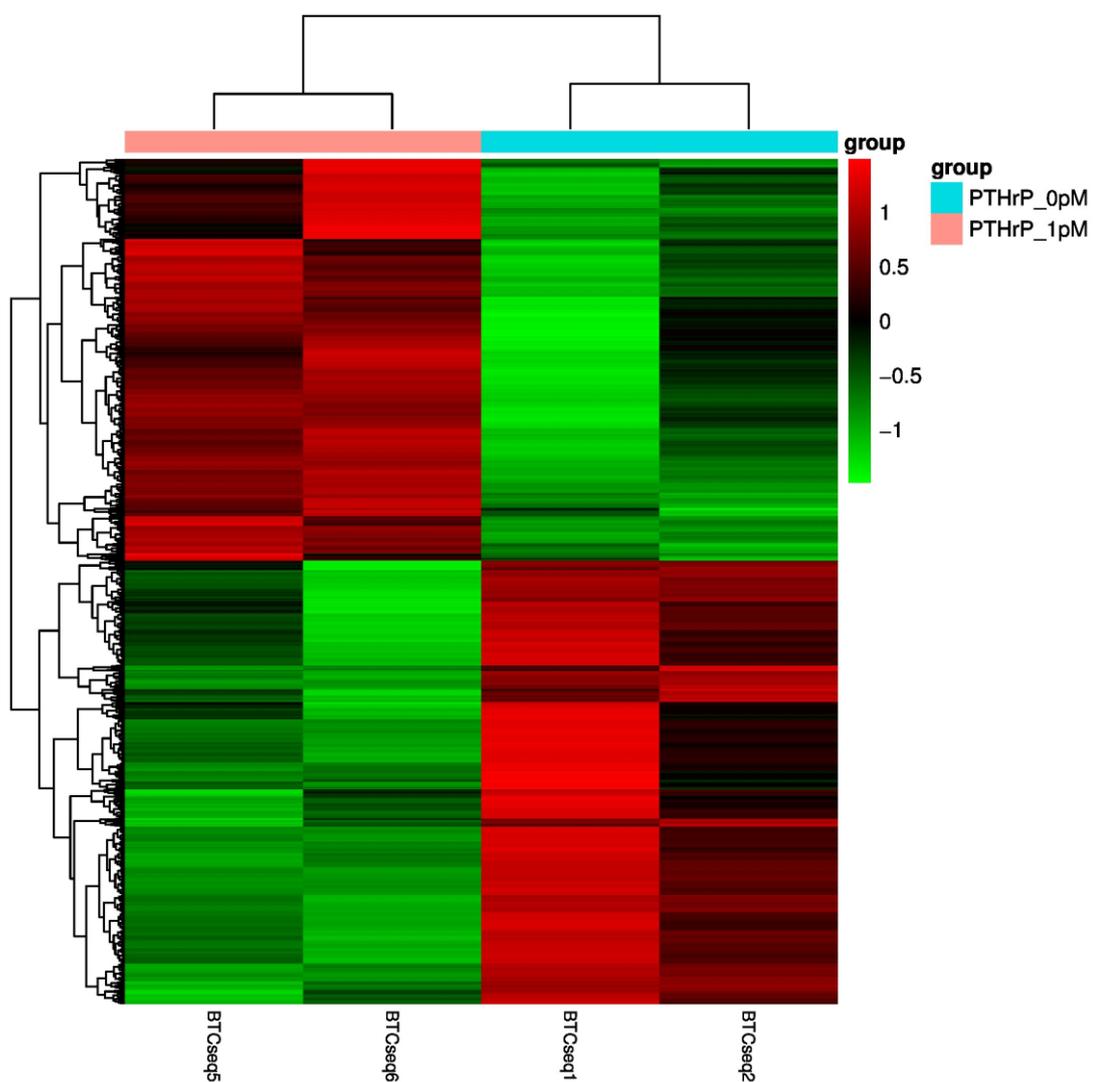


図 11 BT-C に PTHrP を添加して培養した RNA シーケンスの結果。遺伝子組換えウシ PTHrP を 0pM, または 1pM ずつ添加した群の \log_2 (FPKM+1) 値を用いてクラスタ化した FPKM クラスタ解析を示す (n = 2)。赤色は発現量の多い遺伝子, 緑色は発現量の少ない遺伝子を表す。

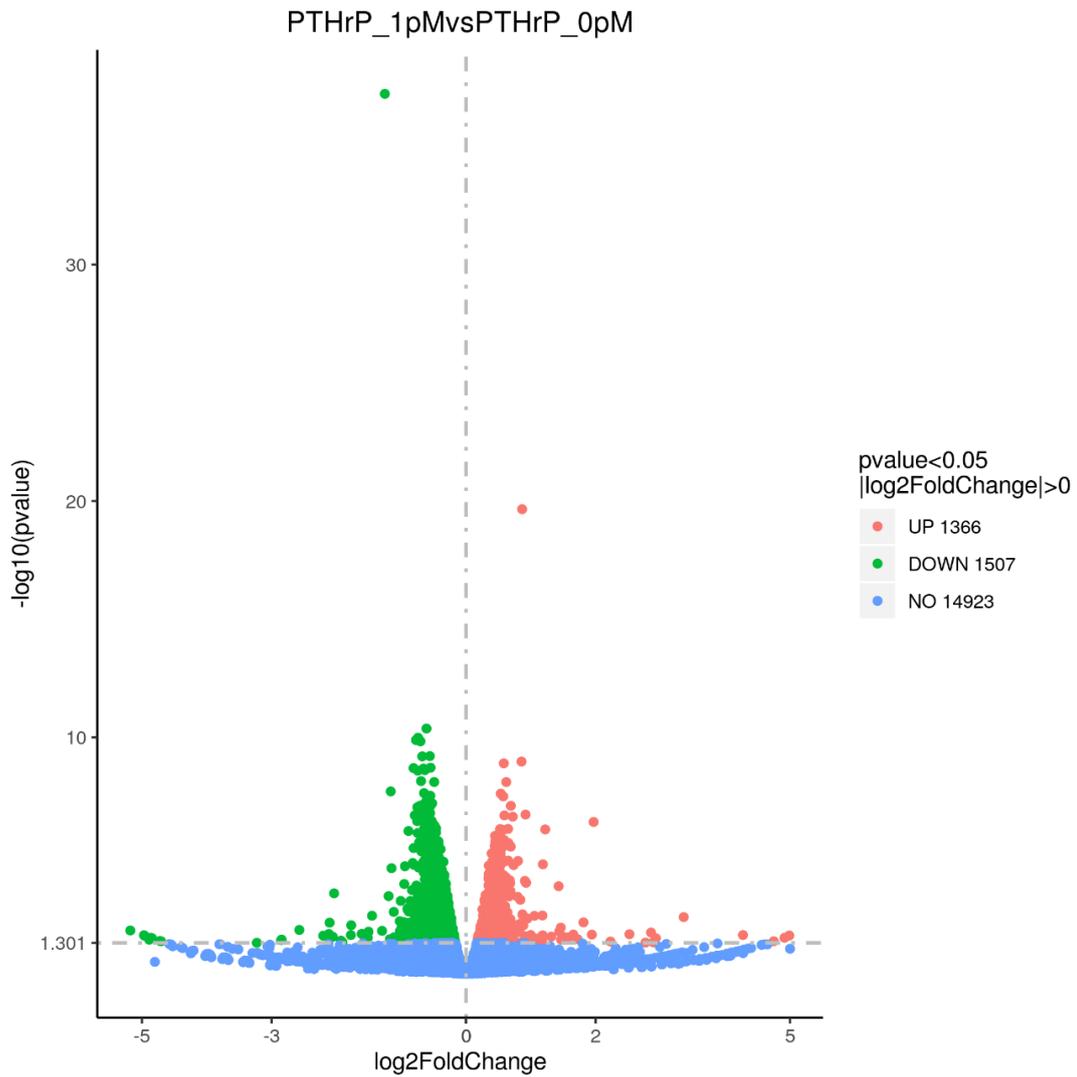


図 12 BT-C に PTHrP を添加して培養した RNA シーケンスの volcano plot 解析結果。発現変動遺伝子として、遺伝子組換えウシ PTHrP 0pM で培養した群に比べ、1pM で培養した群で遺伝子発現が上昇したものは赤色、低下したものは緑色で示す。

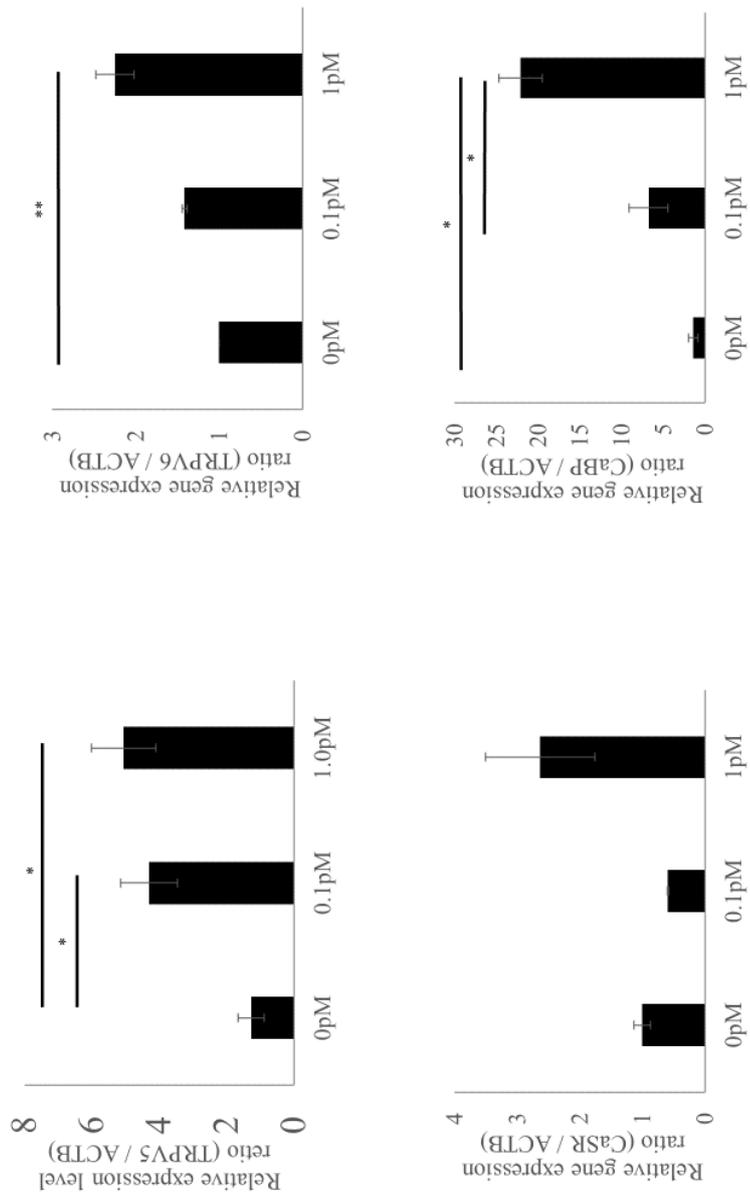


図13 遺伝子組換ええウシPTHrPを感作させたウシ栄養膜由来細胞 (BT-C) のミネラル輸送因子の相対的遺伝子発現量比
 PTHrP 0pMに比べ, PTHrPは0.1pM, 1pMで, TRPV5は0.1pM, 1pMで, TRPV6は1pMで有意な遺伝子発現の増加が認められた。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

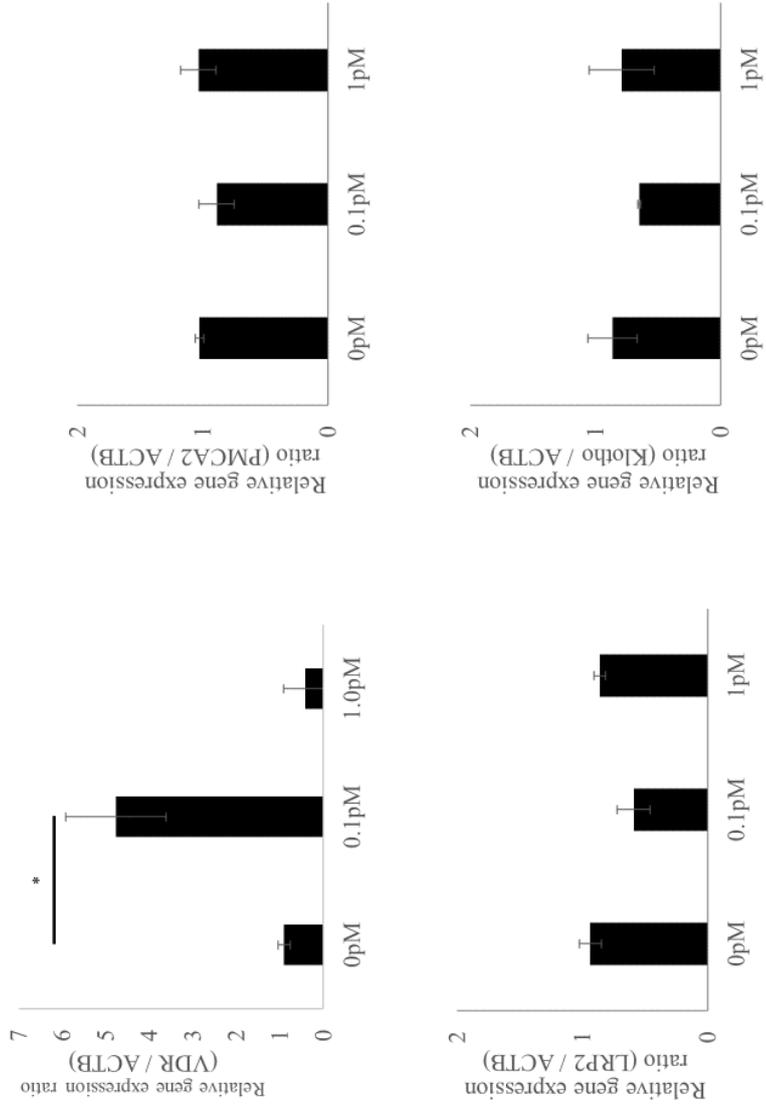


図14 遺伝子組換えウシPTHrPを感作させたウシ栄養膜由来細胞 (BT-C) のミネラル輸送因子の相対的遺伝子発現量比 PTHrP 0pMに比べ、CaBPは0.1pM, 1pMで有意な遺伝子発現の増加が認められた。
*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

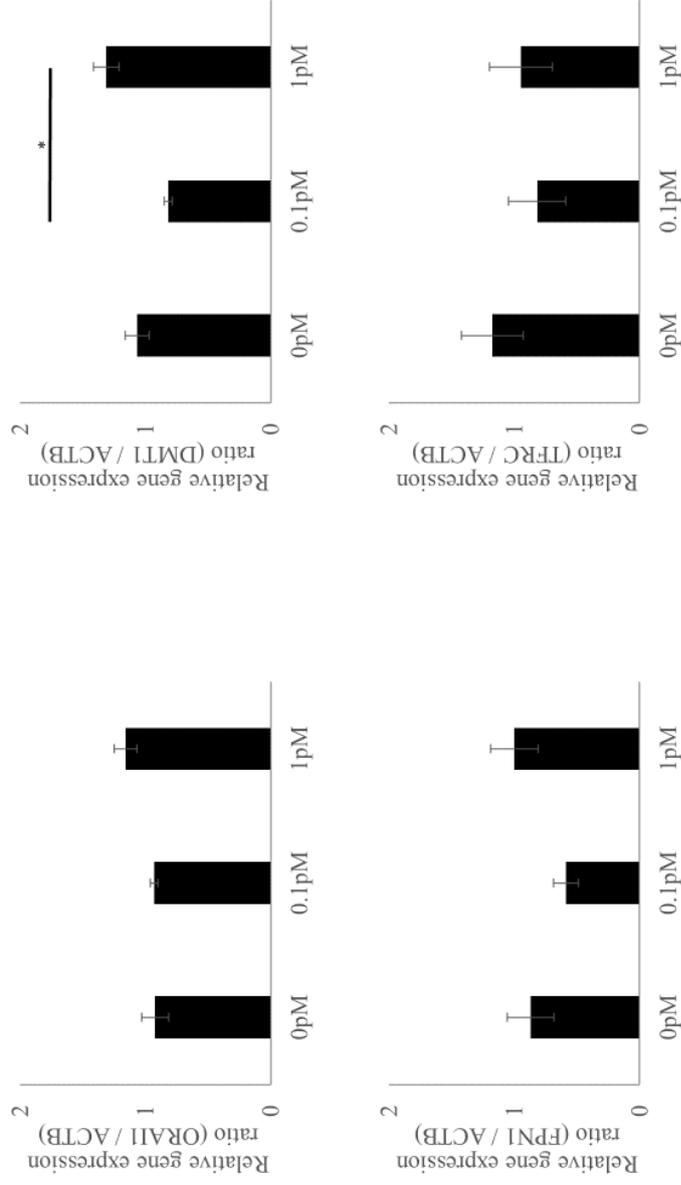


図15 遺伝子組換えウシPTHrPを感作させたウシ栄養膜由来細胞 (BT-C) のミネラル輸送因子の相対的遺伝子発現量比
 PTHrP 0.1pMに比べ、DMT1は1pMで有意な遺伝子発現の増加が認められた。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。



図16 遺伝子組換えウシPTHrPを感作させたウシ栄養膜由来細胞 (BT-C) のミネラル輸送因子の相対的遺伝子発現量比
 PTHrP 0.1pMに比べ、DMT1は1pMで有意な遺伝子発現の増加が認められた。*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 。

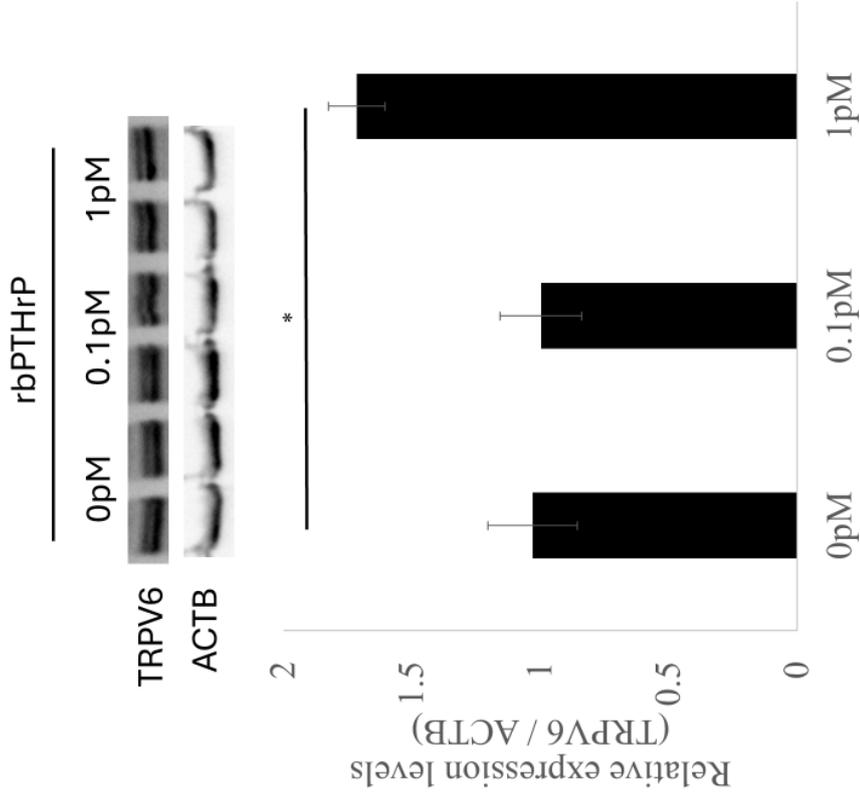


図17 遺伝子組換えウシPTHrPを感作させたウシ栄養膜由来細胞 (BT-C) のTRPV6のタンパク質発現量比
 PTHrP 0pMに比べ、1pMで有意な発現の増加が認められた。*: $p < 0.05$

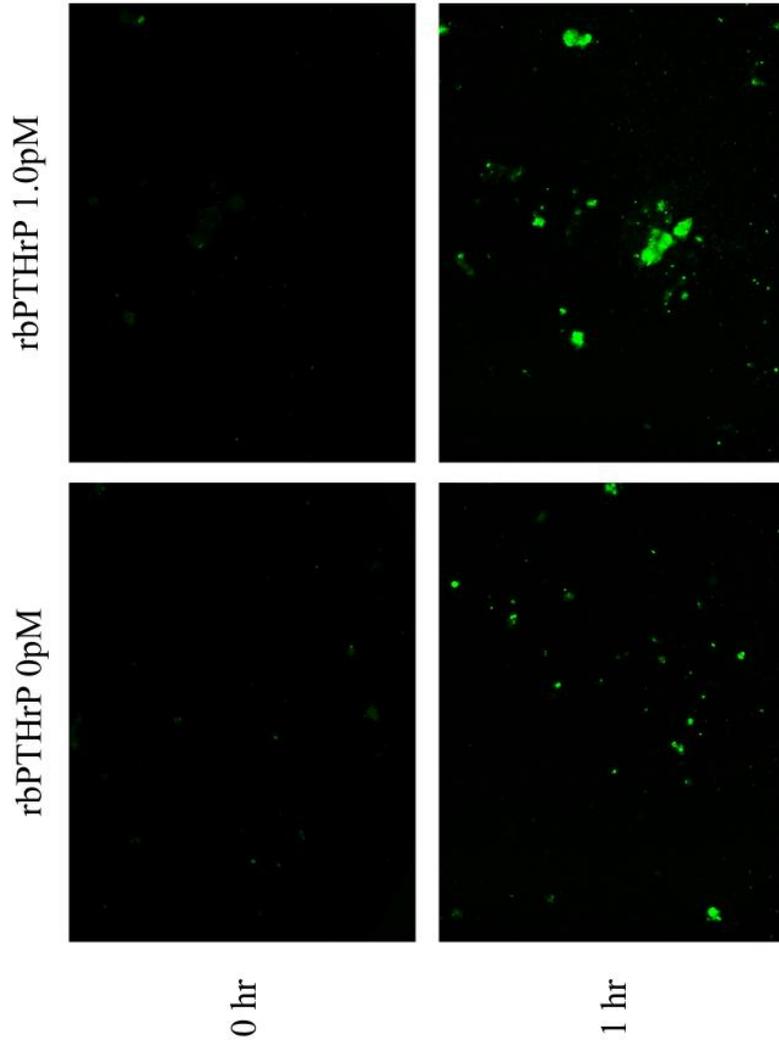


図18 遺伝子組換えウシPTHrPを感作させたウシ栄養膜由来細胞 (BT-C) のCa²⁺メーキング

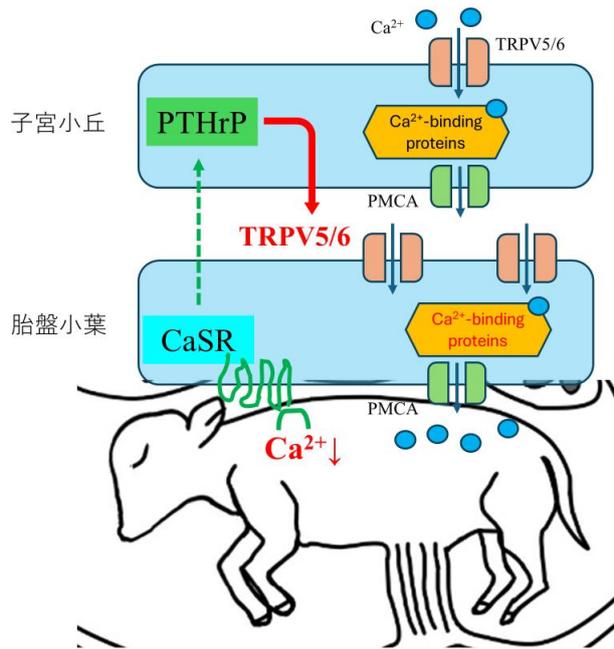


図 19 ウシ胎盤における Ca 輸送の模式図

胎子の血液中 Ca 濃度の低下を胎盤小葉の CaSR が感知し、主に子宮小丘由来の PTHrP が胎盤栄養膜細胞の TRPV5, TRPV6, および CaBP の遺伝子発現量を増加させ、母体から胎子への Ca 輸送を調節する。