

氏名(本籍)	風間 啓(山梨県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第 445 号
学位授与年月日	令和 6 年 2 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 3 条第 3 項該当
学位論文題名	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
論文審査委員	(主査) 恩 田 賢 (副査) 村 上 賢 河 合 一 洋

論 文 内 容 の 要 旨

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が大量に分泌されるため、分娩前後の低カルシウム血症が問題となっている。乳牛の低カルシウム血症は乳熱だけではなく、第四胃変位、ケトosisなどの疾患の素因にもなり、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、母牛の低カルシウム血症は胎子にも影響があると考えられる。しかし、乳牛の胎盤におけるカルシウム輸送機構は十分にわかっていない。マウスにおいては、副甲状腺ホルモン関連タンパク質(PTHrP)が、胎盤におけるカルシウム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カルシウム輸送を調節するかを検討した。

第 1 章では、乳牛の子宮捻転について、その臨床疫学的特徴について調査した。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く、特に乳牛においては、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、低カルシウム血症がリスクとなることが知られている。また、正常産のウシよりも難産のウシで血漿中亜鉛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、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、軽度の低カルシウム血症が認められた。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、捻転していないウシ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 ($n = 15$)、発症していない乳牛 ($n = 27$)、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、血清亜鉛濃度は子宮捻転を発症した乳牛で有意に低く ($p < 0.01$)、銅亜鉛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、カルシウム感知受容体 (CaSR) は、胎盤に発現する PTHrP の作用を調節し、胎子のカルシウム代謝に影響を与えると考えられている。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 ($p < 0.05$) 有意に高い発現が認められた。また、カルシウム輸送に関わる Transient receptor potential cation channel subfamily V member (TRPV) 5 ($p < 0.05$)、TRPV6 ($p < 0.05$)、および Low-density lipoprotein receptor related protein 2 ($p < 0.01$) 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、およびカルシウム濃度を測定したところ、母体の血液からは 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、血液中カルシウム濃度は、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カルシウム濃度を 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カルシウム輸送を調節していると考えられた。

第 3 章では、牛栄養膜由来培養細胞 (BT-C) 細胞を用いて、PTHrP が牛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、カルシウムトランスポーターである TRPV6、Calcium-binding protein (CaBP)、Sodium calcium exchanger 1、Plasma membrane Ca^{2+} ATPase 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カルシウム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、牛胎盤においても、CaSR がカルシウム濃度を感知し、PTHrP がカルシウ

ム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、遺伝子組換え牛 PTHrP [1-141] を作成し、BT-C 細胞に無添加、0.1、1.0 pM 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、カルシウム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、無添加よりも 1.0 pM 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 無添加よりも、1.0 pM で有意に高い発現量が認められた ($p < 0.05$)。実際に、カルシウムが細胞内に取り込まれているかをカルシウムイメージング法により調べたところ、PTHrP 無添加よりも 1.0 pM 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、牛 PTHrP [1-141] によって TRPV6 の発現量が増加し、カルシウム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、牛胎盤において、胎子側のカルシウム濃度を小葉の CaSR が感知し、子宮小丘由来の PTHrP が胎子のカルシウム代謝を調節すると考えられた。さらに、牛栄養膜由来培養細胞において、牛 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、牛胎盤において、PTHrP がカルシウムの取り込みを促進することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

1. 論文内容

生産性の高い乳牛は健康な母牛から生まれるが、周産期は乳牛の疾病の 80% が発生する最も飼養管理が難しい時期でもある。分娩時に発生する代表的な周産期疾患である乳熱の主要病態は低カルシウム血症であり、低カルシウム血症は第四胃変位や胎盤停滞の誘因にもなることが知られている。分娩期に発生することが多い子宮捻転についても低カルシウム血症の関与が疑われているが、病態の詳細については不明な点が多い。本研究では子宮捻転の臨床的・疫学的解析を行い、このことをきっかけに胎盤におけるカルシウムをはじめとするミネラル代謝に PTHrP が関与していることを明確にし、牛胎盤培養細胞を用いて PTHrP がカルシウム輸送体に作用し、胎子へのカルシウム取り込みに関与していることを明らかにした。

本論文は 3 章から構成されている。第 1 章では、子宮捻転を発症した乳牛と発症していない乳牛、およびそれらから出生した新生子牛について、血液中の微量ミネラル濃度を測定し、血清亜鉛濃度が子宮捻転を発症したウシで有意に低く、銅/亜鉛の比が有意に高いことを示した。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、血清中のコバルト濃度が有意に高い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わかった。第2章では、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、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。その結果、PTHrPは小葉よりも子宮小丘で、CaSRは子宮小丘よりも小葉で有意に高い遺伝子発現が認められた。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、およびカルシウム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、血液中カルシウム濃度は、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。第3章ではBT-C細胞を用いて、PTHrPが牛栄養膜におけるミネラル輸送に関与するかを検討した。遺伝子組換え牛PTHrP [1-141]を作成し、BT-C細胞に無添加、0.1、1.0 pM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、カルシウム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、遺伝子組換え牛PTHrP [1-141]が無添加よりも1.0 pMの群で有意な増加を認めた。さらに、ウェスタンブロット法により、カルシウムトランスポーターの1種であるTRPV6の発現量を調べたところ、PTHrP [1-141]無添加よりも、1.0 pMで有意に高い発現量が認められた。実際に、カルシウムが細胞内に取り込まれているかをカルシウムイメージング法により調べたところ、PTHrP [1-141]無添加よりも1.0 pMでBT-C細胞内に強い蛍光強度を認めた。

本研究で得られた知見は、子宮捻転をはじめとする乳牛の周産期疾患の発生メカニズムを解明し、健康な子牛の生産を促進することにより、獣医療・家畜生産に貢献することが期待できる。

なお、本研究の一部は以下の学術論文に公表済みである。

1. Kazama, K., Fujita, S., Nishikawa, A., Onda, K.: A study of 23 dairy cows with post - partum uterine torsion. *Veterinary Medicine and Science*, 10(2): e1357, 2024. (第1章)
2. Kazama, K., Sugita, K., Onda, K.: Trace element concentrations in blood samples from dairy cows with uterine torsion and their neonatal calves. *Veterinary World*, 16(12): 2533-2537, 2023. (第1章)
3. Kazama, K., Nishio, T., Nagane, M., Arai, S., Onda, K.: Relationship of parathyroid hormone-related protein and neonatal mineral metabolism in dairy cow placentas. *Animal Science Journal*, 93(1): e13723, 2022. (第2章)

2. 論文審査

1) テーマの立て方

本研究を開始するきっかけは、学位申請者が現場の臨床獣医師として仕事をしている中で発見した乳牛の産後の子宮捻転である。通常、子宮捻転の発生はほとんどが分娩時であるが、その発生要因は明確でなく、整復できたとしても母牛の生産性や子牛の発育に悪影響をもたらすことが多い。この問題を解決するために周産期の低カルシウム血症や各種微量ミネラルの不均衡の関与を、多数の症例と健康牛を比較した。

さらにメカニズムについては、培養細胞を用いた *in vitro* の系でも研究されている。実体験から得られた疑問に対して解決可能な仮説を立て、それらについて疫学調査から培養細胞を用いたメカニズムまで、調査項目が明確に設定されている。

2) 研究の背景

乳牛の周産期に発生する多くの疾患への低カルシウム血症の関与は知られているものの、個々の疾患への関与の仕方や程度は明確ではない。乳熱はもちろん、ケトosis、第四胃変位、子宮脱ではカルシウム、難産や流産では亜鉛、銅、鉄など、さらに新生子異常にはセレンやコバルトなどの微量ミネラルの関与も指摘されているが、乳牛の子宮捻転ではそのような報告はない。信頼できる多くの先行研究の知見を参考に研究目的を設定し、研究遂行に的確に活用している。

3) 研究の方法

研究目的に従って、第1章では子宮捻転の疫学と臨床的特徴を臨床獣医師としての視点から整理し、微量ミネラルの測定には ICP-MS を用いた。第2章では胎盤での PTHrP のカルシウム代謝への関与を明らかにするために、qPCR や RIA も利用している。第3章では牛胎盤細胞を用いて、自ら作成したリコンビナント牛 PTHrP の添加実験を行い、RNA シークエンス、ウエスタンブロッティング、カルシウムイメージングなども実施し、PTHrP のカルシウム輸送への関与を証明している。研究目的を達成するにふさわしい、複数の研究手法を用いて解析を行い、目的の達成を試みていることは評価できる。ウシの胎盤培養細胞を用いた研究は少数で貴重であるが、培養細胞自体のキャラクタライズを明確にする必要があり、どの妊娠ステージの細胞であるかなど性質を明示すべきである。

4) 研究の結果

子宮捻転に対する低カルシウム血症の関与は明確に示すことはできなかったが、微量ミネラルの測定結果には興味深い知見も含まれていた。また、ウシでは一般的に血中で検出することが困難であった PTHrP を、新生子牛の静脈血と臍動静脈血で検出したことは重要である。また、PTHrP とカルシウム受容体の胎盤における遺伝子発現と、母子間のミネラル濃度勾配への関与の可能性も示している。さらに、牛胎盤培養細胞を用いた実験では PTHrP のカルシウム輸送への関与を明確にすることができた。各章で得られた結果は、簡潔で適切な図表を用いて示されており、重要な点が理解しやすいように工夫がなされている。

5) 考察と結論

各章で得られた結論から次の章の実験の目的が設定され、臨床疫学、病態解析、メカニズムの解明とストーリーが明確であり、各章で適切な考察がおこなわれていると判断した。しかし、低カルシウム血症と子宮捻転の直接的関係が示されないまま、PTHrP と母体間のカルシウム濃度勾配の有無と機序が検討さ

れており、子宮捻転発生の原因解明には至っていない。低カルシウム血症が子宮捻転の発生に関わる 1 要因として重要なことは理解でき、主論文でもこの点には配慮され、オーバーディスカッションにはなっていない。子宮捻転の母牛と産子の微量ミネラルの結果には興味深い点が多く含まれており、さらに詳細な考察があってもよいかもしれない。本研究から得られた知見は的確に整理され、これまでの経験から得られた知識を効果的に用いて、仮説の整合性を論理的に説明できていると判断した。

6) 参考論文

本研究の内容と先行研究の関連性を明確にし、方法の適切性や独創性、得られた結果の価値を立証するために、適当な参考文献が、十分な数、適切な部分で引用されていると判断した。

3. 審査結果

本論文の内容と発表会での質疑応答に対する的確な回答から、臨床獣医学的に、子宮捻転の発生と胎盤におけるミネラル代謝について、その特徴と重要性を十分に理解している。また、実験手技の選択と実施、結果の評価と統計処理、考察の展開からも研究遂行に十分な専門知識を有していることが判断できる。本研究で得られた成果は、獣医学および畜産学の知見として意義ある業績として高く評価できる。さらに最終試験における口頭試問と英語能力の評価も良好であったことから、博士（獣医学）の学位を授与するのに相応しいと判定した。