

骨代謝マーカーおよび乳汁中副甲状腺ホルモン関連
タンパク質を用いた周産期乳牛の骨代謝の
評価に関する研究

佐藤 礼一郎

略 語

BAP	Bone-specific alkaline phosphatase
Ca	Calcium
CT	Calcitonin
CTX	type I collagen cross-linked C-telopeptide
Cre	Creatinine
DPD	Deoxypyridinoline
iP	inorganic Phosphorus
OC (BGP)	Osteocalcin
PTH	Parathyroid hormone
PTHrP	Parathyroid hormone related protein
PYD	Pyridinoline
1,25(OH) ₂ D ₃	1,25-dihydroxyvitamin D ₃
25-(OH)D ₃	25-hydroxyvitamin D ₃

目 次

緒 論	1
第 1 章 各月齢における血清オステオカルシン濃度、血清骨型アルカリフォスファターゼ活性値および尿中デオキシピリジノリン濃度の動態	
1. 緒言	7
2. 材料と方法	10
3. 成績	13
4. 考察	15
5. 小括	17
第 2 章 周産期における血清オステオカルシン濃度、血清骨型アルカリフォスファターゼ活性値および尿中デオキシピリジノリン濃度の変動	
1. 諸言	19
2. 材料と方法	22
3. 成績	24
4. 考察	27
5. 小括	31
第 3 章 周産期における乳汁中副甲状腺ホルモン関連タンパク質濃度の変動	
1. 諸言	33
2. 材料と方法	35
3. 成績	38
4. 考察	40
5. 小括	43
総括ならびに結論	44
謝 辞	50
引用文献	52
表および図	70

緒 論

近年、乳牛の生産性向上は著しく、個体乳量は年々増加傾向にある。また、酪農家の規模拡大も急速に進み、農家戸数は減少しているが一戸当たりの飼養頭数は増加している。乳牛は分娩することで泌乳を開始するが、分娩は乳牛にとって大きな生理的ストレスであり、分娩を機に体内の生理・内分泌機能が大きく変化する。乳牛の分娩前後における疾病の一つに分娩性低カルシウム（Ca）血症がある。

生体中の Ca の 98% は骨などの硬組織に存在しており、残りの 2% が細胞外液とすべての細胞内に存在している。細胞外液中の Ca は骨格形成や血液凝固および乳汁の構成成分として、また、細胞内 Ca は神経の刺激伝導や筋収縮、神経伝達物質やホルモンの放出、外分泌、細胞膜の興奮性、シナプスの可塑性など細胞内セカンドメッセンジャーとしての機能を有するなど、多彩な細胞機能を仲介する重要な元素である（Goff *et al.*, 1997b, Goff, 2000, Horst *et al.*, 1994, Horst *et al.*, 2003, Horst *et al.*, 2005, Hove *et al.*, 1982）。

体重 600kg の乳牛では、細胞外液中に約 8.0～9.0g、血漿中に約 3.0g の Ca が存在しており（Goff, 2000, Horst *et al.*, 1994）、血漿中の Ca 濃度は 8.5～10.0mg/100ml の範囲で厳密に維持されている。

通常、生体内の Ca 恒常性は副甲状腺ホルモン（PTH）、1,25-ジヒドロキシビタミン D₃（1,25(OH)₂D₃）やカルシトニン（CT）といった内分泌ホルモンが関与しており、血漿中の Ca 濃度は一定に保たれている（Horst *et al.*, 1994）。また、妊娠中や泌乳期間中はこれらのホルモンの他に副甲状腺ホルモン関連タンパク質（PTHrP）、エストロゲンやプロラクチンも血漿中 Ca 濃度の調節に関与している。

1,25(OH)₂D₃ や PTH は、血漿中の Ca 濃度が低下すると、Ca 濃度を上昇させるように機能する。PTH は血液中に分泌されると、数分以内に腎臓の尿細管において Ca の再吸収量を増加させる（Payne, 1977）。ま

た、腎臓の近位尿細管の上皮細胞に局在する 1α -hydroxylase を活性化し、 25 ヒドロキシビタミン D_3 (25 -(OH) D_3) を活性型である $1,25$ (OH) $_2D_3$ への転換を促進させる (Deluca, 1984)。 $1,25$ (OH) $_2D_3$ は生理活性が最も高い Vitamin D_3 代謝産物で、標的細胞である腸粘膜の上皮細胞における Ca 能動輸送を間接的に促進させ (Bikle *et al.*, 1981)、さらに、骨表面を覆う扁平な休止期の骨芽細胞にも作用してその形態変化を生じさせ (Rodan *et al.*, 1981)、Osteoclast Differentiation Factor (ODF) 発現を誘導して骨代謝回転を促進させる (Yasuda *et al.*, 1998)。

しかし、妊娠末期における胎子の骨格形成や食欲の低下、泌乳の開始に伴う大量の Ca 喪失に対して、腸管からの Ca 吸収と腎臓での Ca 保持だけでは補うことができないために、血漿中の Ca 濃度が低下し分娩性低 Ca 血症を発症する (Payne, 1977, Smith, 2002)。

このような分娩直前から分娩後数日以内に発症する起立不能症は、乳熱 (milk fever)、産褥麻痺 (parturient paresis) あるいは分娩性低 Ca 血症 (parturient hypocalcemia) と呼ばれている。

分娩と同時に泌乳が始まる乳牛のほとんどが一時的ではあるが低 Ca 血症状態を呈している (Goff, 2000, Green *et al.*, 1981, Horst *et al.*, 1994, Horst *et al.*, 2005)。一般的に分娩性低 Ca 血症は分娩後 12~24 時間以内に発症し、血液中 Ca 濃度が $5.5\text{mg}/100\text{ml}$ 以下になると臨床症状を呈するようになる (Horst *et al.*, 2005)。その程度は様々で、軽症では皮温の低下や食欲不振程度であるが、症状が重篤化するにつれ骨格筋の機能障害や循環障害、重症では意識低下を呈するようになる (Smith, 2002)。また、分娩性低 Ca 血症は難産や胎盤停滞や子宮炎、乳房炎、ケトーシス、第四胃変位の発生など周産期疾病との関連も指摘されている (Curtis *et al.*, 1983, Delgado-Lecaroz *et al.*, 2000)。米国における乳熱の発生率は 5~10% (Horst, 1986) であり、一症例当たりの損失は約

334 ドルであると試算されているが (Horst *et al.*, 1997)、上記の周産期疾病による間接的な経済損失を考慮すると、経営に与える影響はさらに大きいものと推察される。

Ramberg ら (1970, 1984) によると、分娩前後の乳牛では分娩に伴い乳汁中への急激な Ca 流出により体内の Ca 貯蔵量が不足し、さらに分娩後 1~2 週間は骨吸収が抑制されるため Ca は消化管からの吸収に依存するとされる。

分娩後に骨吸収が抑制される原因として、エストロジェンの関与が示唆されている (Goff, 2000)。乳牛では分娩前日に血液中のエストロジェン濃度が上昇するが (Hollis *et al.*, 1981)、この濃度が高い個体では分娩性低 Ca 血症のリスクが高いとの報告がある (Goff, 2000, Hollis *et al.*, 1981)。しかし分娩性低 Ca 血症と血液中エストロジェン濃度との間には関係がないとの報告もあり (Sasser, 1979)、乳牛の周産期における骨代謝には不明なことが多く残されている。

ヒトや動物の骨代謝を評価する際、従来は骨生検法が一般的であったが、この方法は侵襲性が強く複数部位行うことは困難であり、単一箇所採取では他の部位の代謝を反映していない可能性があった (Calvo *et al.*, 1996)。非侵襲的な方法としては、尿中あるいは血液中の各種骨代謝マーカーを用いる方法があり、医学分野では悪性腫瘍の骨転移の診断、代謝性骨疾患や内分泌疾患の病態評価、特に骨粗鬆症においては、骨量の減少や骨折の予知、治療効果のモニターなどに利用されている。

非侵襲的に複数回のサンプリングが可能であることは、骨代謝を評価する上で、骨への直接的な侵襲による影響やストレスによる泌乳への影響を最小限に抑えることができるため、乳牛の骨代謝動態を把握する上で有用な手法となり得ると考えられる。

そこで、第 1 章ではまず医学領域で使用されており、乳牛においても

応用が可能であると考えられるオステオカルシン（OC）、骨型アルカリフォスファターゼ（BAP）およびデオキシピリジノリン（DPD）について、骨代謝に大きな影響を与える要因の一つである月齢と上記の骨代謝マーカーとの関係について検討した。

第 2 章では第 1 章の結果を踏まえ、分娩性低 Ca 血症の発症率が大きく異なる初産牛と経産牛について、OC、BAP および DPD の周産期における変動を観察し、さらに骨吸収マーカーと骨形成マーカーの比を用いて骨代謝動態について検討した。

骨代謝に影響を与える物質として PTHrP がある。PTHrP はヒトの悪性腫瘍に随伴する高 Ca 血症の誘発液性因子として発見された。乳牛において、泌乳の開始に伴い乳腺組織での PTHrP 遺伝子発現が増加し、乳汁中に PTHrP が高濃度に分泌されることが知られている。しかしながら、この乳腺組織で産生される PTHrP の生物学的な意味については多くの研究がおこなわれているが、未だその答えは得られていない。

VanHouten（2005）は、乳腺組織の Ca 感受性レセプターが泌乳中の母体の Ca 不足を感知し、それに続いて乳腺上皮細胞での PTHrP の合成と末梢血への分泌が増加し、母体での骨吸収や腎臓での Ca 再吸収を促進することで Ca の恒常性を維持していると推測しており、乳牛の分娩性低 Ca 血症においても同様に Ca 恒常性維持のために PTHrP 分泌の増加が起きていることが考えられる。

そこで第 3 章では、骨代謝と関係があると推測される PTHrP について、周産期の乳汁中 PTHrP 濃度の変動を解析し、PTHrP と骨代謝との関係について検討した。

第 1 章

各月齡における血清オステオカルシン濃度、血清骨型
アルカリフォホスファターゼ活性値および
尿中デオキシピリジノリン濃度の動態

1. 諸 言

骨は生体の支持組織、あるいは運動の支柱、内臓や中枢神経系の保護組織として機能することに加え、血液中 Ca 濃度の維持や造血機能を有する多様な機能を持つ臓器である。

骨組織は、骨芽細胞が産生・分泌する I 型コラーゲンを主とする骨基質に、ハイドロキシアパタイト結晶が沈着することで硬組織としての骨が形成される。また、骨組織では破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成からなる代謝再構築過程リモデリングが常に行われており、通常、骨吸収と骨形成とのバランスは平衡状態にあり、骨密度が一定に保たれている。

医学領域には、骨吸収と骨形成の平衡異常に起因する骨粗鬆症という疾病があり、骨の強度（骨密度と骨質）の評価が臨床上重要である。

従来まで、骨の強度の評価には腸骨骨生検による骨組織形態計測が用いられてきたが、侵襲的で繰り返し評価をすることが困難であること、全身の骨代謝動態を必ずしも反映しないこと、解析に時間と熟練を要するなど多くの欠点があった。

近年では、骨代謝に伴い、血液中または尿中に分泌される骨代謝関連タンパク質や酵素などのいわゆる骨代謝マーカーが利用されている。骨は沈黙の臓器ではなく、常に骨吸収と骨形成を繰り返すことでダイナミックな動的状態の中にあるが、骨代謝マーカーは骨吸収および骨形成を鋭敏に反映し、刻々と変化する動的状態を動的のままに表現することが可能である (Allen, 2003)。

人医療領域では、骨粗鬆症や骨軟骨症、線維性骨炎などの代謝性骨疾患において、骨代謝マーカーによってこれらの疾患の病態を把握し、診断、病態解明、治療方針の決定、治療効果の評価を行っている。

骨代謝マーカーには、骨芽細胞から放出される骨芽細胞のマーカー（骨形成マーカー）と破骨細胞から放出される破骨細胞のマーカー（骨吸収マーカー）とがあり、それら骨代謝マーカーの変動には、年齢、性別、妊娠、泌乳、疾患やサーカディアンリズム、季節、飼料や運動などが影響する（Hannon *et al.*, 2000）。

骨代謝マーカーの一つである OC は、ビタミン K 依存性のカルボキシラーゼによりグルタミン酸残基（Glu 残基）が γ -カルボキシグルタミン酸残基（Gla 残基）となることから bone Gla protein（BGP）ともよばれている。OC や BAP は骨形成の指標として用いられるが、OC は成熟した骨芽細胞から分泌される骨基質蛋白質であり、BAP は他の骨形成マーカーに比べ未分化な骨芽細胞を反映し、Vitamin D や腎機能の影響を受けづらく、さらに BAP 濃度と骨生検による骨形成パラメーターとの間に強い正の相関があることから、有用な骨形成マーカーである。また、血中半減期は OC が 20 分と短い一方、BAP は 40 時間と長く、代謝経路は OC が腎臓で BAP は肝臓で代謝される（Cremers *et al.*, 2008）。

また、OC は明らかなサーカディアンリズム（Nielsen, 1994）や季節変動性があるが（Woitge *et al.*, 1998）、BAP にはないとされる（Tobiume *et al.*, 1997）。さらに BAP は保存安定性がよく、繰り返しの凍結溶解にも安定である（Gomez *et al.*, 1995）が、OC は不安定で（Peel *et al.*, 1993）、Vitamin D 投与の影響を受ける（Markowitz, 1987）。

骨吸収マーカーはヒトや牛で報告され、以前はヒドロキシプロリンが用いられていたが（Van Mosel *et al.*, 1990）、最近では DPD や I 型コラーゲン架橋 C 末端テロペプチド（Liesegang *et al.*, 1998）、酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（Yamagishi *et al.*, 2009）が用いられている。

DPD やピリジノリン（PYD）はコラーゲン線維間の架橋成分として骨基質に多く存在している。PYD は軟骨、靭帯や血管といった骨以外の組

織にも存在しているが、DPDは骨以外の組織にはほとんど存在していないため、骨コラーゲン線維の破壊を反映する特異的な骨吸収マーカーと考えられている (Liesegang *et al.*, 1998)。

しかしながら、これらの骨代謝マーカーについて、ヒト (Ikeda *et al.*, 1995)、犬 (Allen *et al.*, 1998) や猫 (DeLaurier *et al.*, 2004) ではそれらの月齢動態についての報告あるものの、乳牛において詳細に検討された報告はない。

そこで、本章では、代表的な骨代謝マーカーである OC、BAP および DPD について、月齢がそれらの骨代謝マーカーに与える影響について検討した。

2. 材料と方法

1) 供試動物

骨代謝マーカーの月齢動態を観察するため、北海道野付郡別海町の一農事組合法人で飼養されていた、臨床上健康な生後 1 日齢から 10 歳齢までのホルスタイン種乳牛を供試した。血清 OC 濃度の測定には、生後 11 日 (0.36 ヲ月) 齢から 10 歳 (119.21 ヲ月) 齢までの 144 頭、血清 BAP 活性値の測定には、生後 11 日 (0.36 ヲ月) 齢から 10 歳 (119.21 ヲ月) 齢までの 104 頭、尿中 DPD 濃度の測定には、生後 1 日 (0.03 ヲ月) 齢から 10 歳 (125.42 ヲ月) 齢までの 100 頭を供試した。周産期の骨代謝への影響を考慮し、分娩前後 2 ヲ月の個体は除いた。

子牛は生後 2 週目まで子牛用ハッチで飼養され、代用乳を 1 日 2 回給与されていた。生後 2 週目以降は子牛用ペンに移動し、代用乳に加えスターターの給与も行った。成牛はフリーストール牛舎で、泌乳ステージによって 5 群 (①分娩直後群、②泌乳初期群、③泌乳中期群、④泌乳後期群、⑤乾乳期群) に分けて飼養され、搾乳は 1 日 3 回 (4:00~7:00、12:00~15:00、19:00~22:00) であった。育成牛、成牛ともにコーンサイレージ、グラスサイレージ、イタリアンライグラスおよびビートパルプによる total mixed ration (TMR) を給与し、自由飲水であった。また、分娩性低 Ca 血症に対する予防は一切行っていなかった。

2) 血液ならびに尿の採取

採血は頸静脈から行い、採取した血液は室温で 10 分間静置し凝固した後、遠心分離機にて遠心後 (3,000rpm, 20min, 4°C)、血清を分離した。血清は分析に供するまで -40°C で凍結保存した。

尿は午前 10~11 時の間に、滅菌した導尿カテーテルを直接膀胱内に挿

入し採取した。採取した尿は孔径 0.2 μ m のシリンジフィルターにて濾過滅菌後、分析に供するまで -40 $^{\circ}$ C で凍結保存した。

3) 骨代謝マーカーの測定

(1) 血清 OC 濃度

血清 OC 濃度は、immunoradiometric assay (IRMA 法, BGP IRMA 「ミツビシ」, 三菱メディエンス, 東京) により測定した。本法はヒト BGP[1-49,^{17, 21, 24}Gla] の中間部 [12-33] を認識するモノクローナル抗体と牛 BGP [1-49] の C 端部 [30-49] を認識するモノクローナル抗体を用いた intact BGP に特異的な測定法である。検体中の OC とビオチン化 OC 抗体及びアビジンビーズで形成した複合体にトレーサーのヨウ化 OC 抗体 (¹²⁵I) を反応させ、形成された複合体の放射能をガンマカウンター (ARC-370M; 日立 ALOKA, 東京) により測定した。得られた値と標準 OC 液で作成された標準曲線から検体中の OC 濃度を算定した。

(2) 血清 BAP 活性値

血清 BAP 活性値は、enzyme immunoassay (EIA 法, オステオリンクス「BAP」, DS ファーマバイオメディカル, 大阪) により測定した。マイクロプレートのウェルに固相化したマウス抗 BAP モノクローナル抗体で検体中の BAP を選択的に補足した後、アルカリフォスファターゼの基質 (p-ニトロフェニルリン酸) を添加して、補足された BAP による酵素反応を行い、生成物 (p-ニトロフェノール) の発色をマイクロプレートリーダー (Wellreader SK603; 生化学工業, 東京) により測定した。得られた値と標準 BAP 液で作成された標準曲線から検体中の BAP 濃度を算定した。

(3) 尿中 DPD 濃度

尿中 DPD 濃度は、enzyme immunoassay (EIA 法, オステオリンクス「DPD」, DS ファーマバイオメディカル, 大阪) により測定した。抗 Dpd 抗体が結合したマイクロプレートウェルに DPD を含む検体とアルカリフォスファターゼ標識 DPD を同時添加し、抗体に対して一定時間競合的に反応させた後、洗浄を行って未反応の試薬(酵素標識ニルリン酸; pNPP) を添加してウェル上に捕捉された酵素標識 DPD の量を、その酵素活性により基質が分解されて生成された物質の吸光度をマイクロプレートリーダー (Wellreader SK603; 生化学工業, 東京) によって測定した。得られた値と標準 DPD 液で作成された標準曲線から検体中の DPD 濃度を算定した。得られた成績は、クレアチナーゼ-サルコシンオキシダーゼ-ペルオキシダーゼ法 (日立自動分析装置 9000、東京) により測定したクレアチニン (Cr) 濃度により補正した。

4) 測定成績の統計学的解析

各骨代謝マーカーと月齢との関係は正規分布を検定後、Pearson の相関係数の検定法により行った (Graph Pad Prism 3.03 for Windows software (Graph Pad Software for Science Inc., San Diego, CA, USA))。また、各月齢の測定間は single-way ANOVA 法によって行い、有意な差が認められた場合には、Scheffe's F test の多重比較検定を用いて有意差を検定し、 $P < 0.05$ を有意と判断した。

3. 成績

1) 血清 OC 濃度

血清 OC 濃度と月齢との関係を表 1 および図 1 に示した。各月齢における血清 OC 濃度は、それぞれ 1 ヶ月齢未満が $106.5 \pm 12.6 \text{ ng/mL}$ 、1~3 ヶ月齢未満が $94.7 \pm 8.5 \text{ ng/mL}$ 、3~6 ヶ月齢未満が $93.0 \pm 8.8 \text{ ng/mL}$ 、6~12 ヶ月齢未満が $88.7 \pm 5.2 \text{ ng/mL}$ 、12~24 ヶ月齢未満が $54.0 \pm 4.1 \text{ ng/mL}$ 、24~36 ヶ月齢未満が $31.0 \pm 2.5 \text{ ng/mL}$ 、36~48 ヶ月齢未満が $19.5 \pm 0.9 \text{ ng/mL}$ 、48~60 ヶ月齢未満が $18.7 \pm 1.4 \text{ ng/mL}$ 、60 ヶ月齢以上が $12.7 \pm 1.0 \text{ ng/mL}$ であった。

若齢期に高値を示し、その後緩やかに低下した ($y = 107.9 - 3.475x + 0.0407x^2 - 0.0002x^3$, $r = -0.58$, $P < 0.01$)。

また、泌乳期牛の血清 OC 濃度を産歴別にみると、初産牛が $37.6 \pm 3.0 \text{ ng/mL}$ 、経産牛が $17.5 \pm 0.8 \text{ ng/mL}$ で、初産牛が有意 ($P < 0.01$) に高値を示した。

2) 血清 BAP 活性値

血清 BAP 濃度と月齢との関係を表 2 および図 2 に示した。各月齢における血清 BAP 活性値は、それぞれ 1 ヶ月齢未満が $134.9 \pm 12.9 \text{ U/L}$ 、1~3 ヶ月齢未満が $232.0 \pm 25.6 \text{ U/L}$ 、3~6 ヶ月齢未満が $198.3 \pm 18.3 \text{ U/L}$ 、6~12 ヶ月齢未満が $104.1 \pm 8.5 \text{ U/L}$ 、12~24 ヶ月齢未満が $74.0 \pm 10.5 \text{ U/L}$ 、24~36 ヶ月齢未満が $37.0 \pm 3.9 \text{ U/L}$ 、36~48 ヶ月齢未満が $42.5 \pm 3.5 \text{ U/L}$ 、48~60 ヶ月齢未満が $27.8 \pm 2.0 \text{ U/L}$ 、60 ヶ月齢以上が $25.7 \pm 2.6 \text{ U/L}$ であった。

血清 OC 濃度と同様に若齢期に高値を示し、その後緩やかに低下した ($y = 197.3 - 8.026x + 0.1179x^2 - 0.0005x^3$, $r = -0.57$, $P < 0.01$)。

また、泌乳期牛の血清 BAP 活性値を産歴別にみると、初産牛が $37.0 \pm 3.9 \text{U/L}$ 、経産牛が $26.7 \pm 1.2 \text{U/L}$ で、初産牛が有意 ($P < 0.05$) に高値を示した。

3) 尿中 DPD 濃度

尿中 DPD 濃度と月齢との関係を表 3 および図 3 に示した。各月齢における尿中 DPD 濃度は、それぞれ 1 ヶ月齢未満が $31.5 \pm 9.8 \text{nmol DPD/mmol Cr}$ 、1~3 ヶ月齢未満が $14.9 \pm 2.8 \text{nmol DPD/mmol Cr}$ 、3~6 ヶ月齢未満が $16.2 \pm 2.8 \text{nmol DPD/mmol Cr}$ 、6~12 ヶ月齢未満が $17.2 \pm 6.0 \text{nmol DPD/mmol Cr}$ 、12~24 ヶ月齢未満が $12.0 \pm 1.6 \text{nmol DPD/mmol Cr}$ 、24~36 ヶ月齢未満が $6.1 \pm 0.2 \text{nmol DPD/mmol Cr}$ 、36~48 ヶ月齢未満が $10.5 \pm 2.3 \text{nmol DPD/mmol Cr}$ 、48~60 ヶ月齢未満が $8.7 \pm 0.8 \text{nmol DPD/mmol Cr}$ 、60 ヶ月齢以上が $10.1 \pm 1.3 \text{nmol DPD/mmol Cr}$ であった。

血清 OC 濃度および血清 BAP 活性値と同様に若齢期に高値を示し、その後緩やかに低下した ($y = 23.99 - 0.8491x + 0.0127x^2 + 5.257e-005x^3$, $r = -0.18$, $P < 0.05$)。

また、泌乳期牛の尿中 DPD 濃度を産歴別にみると、初産牛が $6.0 \pm 0.2 \text{nmol DPD/mmol Cr}$ 、経産牛が $9.5 \pm 0.8 \text{nmol DPD/mmol Cr}$ で、経産牛が有意 ($P < 0.01$) に高値を示した。

どの骨代謝マーカーも若齢期においてばらつきが大きいですが、加齢とともに小さくなり安定していった。

4. 考 察

血清 OC 濃度は若齢期で高く、ヒト (Kasai *et al.*, 1993) で報告されているような思春期でのピークはみられなかった。また、若齢期でばらつきが大きくなる傾向が認められた。

Davicco ら (1990) は血清 OC 濃度について、新生子や育成牛、成牛に比べ妊娠後期の胎子が最高値を示し、9 歳齢の妊娠牛が最低値を示したと報告している。胎子の血清 OC 濃度が高いということは、骨形成が盛んな胎子の血清 OC が母体の血清 OC 濃度に影響する可能性が考えられ、妊娠後期での胎子の骨格形成の影響と分娩の影響を避けるために、分娩前後 2 ヶ月の個体は除いた。

その結果、2 歳齢以下の初産牛における血清 OC 濃度は経産牛に比べ高値を示した。Heinrichs ら (1998) は、2 歳齢までは骨格形成が進行中であり、加えて、大家畜では若齢期に層板骨の形成が生じるため (Mori *et al.*, 2005)、今回の結果は、活発な骨代謝回転と成長を反映したものと考えられた。

また、同じく血清 BAP 活性値および尿中 DPD 濃度とも、若齢個体が高値を示した。しかし、20 ヶ月齢以下の若い個体では血清 OC 濃度と同様に血清 BAP 活性値、尿中 DPD 濃度ともにばらつきが大きかった。

一般に成長期の骨代謝は活発で、一旦、骨成熟すると骨芽細胞および破骨細胞の安定性が低下するため、全体の骨代謝回転は低下していく (Marks *et al.*, 1996, Ramberg *et al.*, 1970, Seyedin *et al.*, 1993)。このような変動は他の哺乳動物でもみられ (Goff *et al.*, 1997a, Nishizawa *et al.*, 1999, Eyre, 1996)、牛においても OC や BAP、DPD は骨成熟に伴う骨代謝回転の変化を反映しているものと考えられた。

若齢個体における骨代謝マーカーのばらつきについては不明な部分が

多いが、ヒトでは、幼児や子供の方が成人よりも有意に高値を示し（Hannon *et al.*, 2000）、また、黒毛和種牛における血清 BAP 活性値は子牛で高値を示し、またばらつきも多い（Yamagishi *et al.*, 2009）とする報告もあることから、若齢期の骨代謝マーカーは若齢期以降に比べ高値を示す傾向にあるが、一方でばらつきも多いということがいえる。

尿中 DPD 濃度についても、若齢個体におけるばらつきの原因については不明であるが、前述の Yamagishi ら（2009）の黒毛和種における報告では、骨吸収マーカーの尿中ヒドロキシプロリン濃度は、血清 BAP 濃度と同様に子牛で高く、ばらつきも大きいと報告しており、今回測定した尿中 DPD 濃度と同様の変動を示した。

以上より、OC、BAP および DPD の月齢による変動を明らかにすることができ、さらにこれらの骨代謝マーカーは、牛においても骨代謝動態や骨形成、骨吸収の状態を評価する有力な指標となりうることが示された。

しかし、血清 OC 濃度、血清 BAP 活性値および尿中 DPD とともに若齢期でのばらつきが大きいため、これらの骨代謝マーカーを用いて若齢期の骨代謝を評価する際には、個体差を十分に考慮する必要があることが必要である。

5. 小 括

ヒトの骨代謝疾患において、骨代謝を評価する際に使用される代表的な骨代謝マーカーの血清 OC 濃度、血清 BAP 活性値および尿中 DPD 濃度について、乳牛における月齢変動について検討した。供試動物は、周産期を除いた生後 1 日齢から 10 歳齢までのホルスタイン種乳牛で、血清 OC 濃度は IRMA 法により、血清 BAP 活性値と尿中 DPD 濃度はそれぞれ EIA 法により測定した。

血清 OC 濃度、血清 BAP 活性値および尿中 DPD 濃度の回帰式はそれぞれ $y = 107.9 - 3.475x + 0.0407x^2 - 0.0002x^3$ 、 $y = 197.3 - 8.026x + 0.1179x^2 - 0.0005x^3$ および $y = 23.99 - 0.8491x + 0.0127x^2 + 5.257e-005x^3$ であった。各マーカーとも若齢期にピークを示し、それ以降、緩やかに低下していった。また、各マーカーともに若齢期においてばらつきが大きかったが、若齢期の活発な骨代謝回転と成長を反映しており、乳牛においてこれらの骨代謝マーカーは骨代謝動態を評価する有力な指標となりうることが明らかとなった。しかしながら、血清 OC 濃度、血清 BAP 活性値および尿中 DPD を用いて、若齢期の骨代謝を評価する際には個体差を十分に考慮する必要があることが示された。

第 2 章

周産期における血清オステオカルシン濃度、血清骨型
アルカリフォスファターゼ活性値および尿中デオキシ
ピリジノリン濃度の変動

1. 諸 言

通常、健康な乳牛の血漿 Ca 濃度は約 8.5～10.0mg/dl の範囲内に制御されている。乾乳期から分娩直前においては、胎子の骨格形成および初乳生成により、生体内の Ca、マグネシウムおよび iP 等の電解質が大きく変化し (Horst *et al.*, 1997)、さらに分娩後数日間は泌乳の開始に伴う急激な Ca 要求量の増加が生じ、3 産以上の乳牛のほぼすべてで一時的に血漿 Ca 濃度が低下する (Horst *et al.*, 1997)。しかし高泌乳牛や高齢、産歴の多い個体の中には、分娩時の血清中 Ca 濃度の低下が著明で、起立不能症を呈する個体もいる。このように分娩時に発症する起立不能を主徴とする疾病は分娩性低 Ca 血症や産褥麻痺、乳熱と呼ばれる。

これまで、分娩性低 Ca 血症の予防法として、乾乳後期における低 Ca 飼料の給与や飼料中陽イオン－陰イオン差 (DCAD)、分娩前のビタミン D₃ の投与など種々の予防法が検討されてきた (Horst *et al.*, 2005)。低 Ca 飼料の給与および DCAD による予防方法は、分娩前の体内の Ca 恒常性の活性化を目的としており (Goff, 2008, Vagg *et al.*, 1970)、その効果については未だ議論の余地がある。その原因として、乳牛の周産期における Ca 代謝について知見が十分に得られていないことも一つの原因である。

Ca の要求に対し、生体は骨の Ca 再吸収や消化管からの Ca 吸収量を増加させることで、生体内の Ca の恒常性を維持している。

これまでは乳牛の Ca 代謝機構に関する検討は血液中電解質やビタミン D₃、PTH といったホルモンを利用してきたが (Green *et al.*, 1981, Horst *et al.*, 2003)、これらは体内における Ca の代謝機構を総合的にもしくは間接的に表しているにすぎない。

一方で、放射性同位元素を用いた乳牛の分娩前後の Ca 動態の解析では、

①分娩に伴い乳汁中への急激な Ca 流出により体内の Ca 貯蔵量が減少していること、②生体は骨や消化管からの Ca を動員して恒常性を保持するように働くが、分娩後 1~2 週間は骨における Ca 吸収は抑制されており、消化管からの Ca 吸収に依存することが報告されている (Ramberg *et al.*, 1970, Ramberg *et al.*, 1984)。

骨は生体の支持組織、あるいは運動の支柱、内臓や中枢神経系の保護組織として作用する一方で、Ca の貯蔵庫としての機能も有している。一旦形成された骨は、生涯破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨形成を繰り返しており、これは骨リモデリング (骨の再構築) と呼ばれている。リモデリングは、皮質骨では第二次骨単位 (secondary osteon)、海綿骨では骨梁単位 (trabecular packet) として観察され、皮質骨における微細損傷を骨単位が修復する過程を、標的化リモデリング、Ca 濃度の低下や内分泌異常など骨以外の原因により Ca が血中に放出される過程を非標的化リモデリングと呼ばれている (Burr, 2002, Parfitt, 2002)。

骨リモデリングの意義は、力学的負荷など外的環境に対する順応と、血清 Ca 濃度の維持である。骨リモデリングは厳密に調節されている必要があり、実際に PTH やエストロゲンや甲状腺ホルモン、成長ホルモンなど各種ホルモン、サイトカイン、神経系、骨基質蛋白質、骨への力学的負荷など、多くの因子が骨リモデリングに影響することが知られている。

ヒトや動物の骨における Ca 代謝の評価には、種々の生化学的マーカーが使用されており、骨細胞の活性情報をリアルタイムに反映している (Allen, 2003)。

医療領域では、OC や BAP、DPD などの骨代謝マーカーを指標として、骨粗鬆症や骨軟骨症といった骨代謝異常に起因する疾病の研究および治療への利用が行われている (Healy *et al.*, 2005)。

乳牛においても、これらの指標を用い周産期の骨代謝を評価した報告がある (Liesegang *et al.*, 2007) が、血清 Ca 濃度の劇的な変動が考えられる分娩直後から分娩後数日間について観察したものは少ない。

また、骨における骨吸収、骨形成に基づく細胞外液との Ca の移動は、骨のリモデリングを反映するものであり、両者の平衡は骨代謝回転を評価する上で重要であると考えられる。そこで、本章では、周産期における初産牛と経産牛における骨代謝マーカーの変動と、骨吸収マーカーの尿中 DPD 濃度と骨形成マーカーである血清 BAP 活性値との比を用いて、周産期の乳牛における骨代謝動態について解析した。

2. 材料と方法

1) 供試動物

周産期における骨代謝マーカの変動を詳細に検討するために、北海道野付郡別海町の一農事組合法人で飼養されていた、臨床上健康な周産期ホルスタイン種初産牛 7 頭 (24.8 ± 3.9 ヲ月齡) と経産牛 7 頭 (2~5 産、 73.8 ± 15.9 ヲ月齡) を供試した。牛はフリーストール牛舎で飼養されており、泌乳ステージによって 5 群 (①分娩直後群、②泌乳初期群、③泌乳中期群、④泌乳後期群、⑤乾乳期群) に分けて飼養されていた。分娩後の搾乳は 1 日 3 回 (4:00~7:00、12:00~15:00、19:00~22:00) であった。乾乳牛にはコーンサイレージ、グラスサイレージ、イタリアンライグラス、大豆粕およびビートパルプによる TMR を、泌乳牛にはコーンサイレージおよびグラスサイレージによる TMR を給与し、自由飲水であった。また、分娩性低 Ca 血症に対する予防は一切行っていなかった。

2) 血液ならびに尿検体の採取

血液ならびに尿検体は、分娩 14 日前、7 日前、分娩直後、分娩 1 日後、2 日後、3 日後、7 日後、14 日後および 21 日後の計 9 回採材した。

採血は頸静脈から行い、採取した血液は室温で 10 分間静置し凝固した後、遠心分離機にて遠心後 (3,000rpm, 20min, 4°C)、血清を分離した。血清は分析に供するまで -40°C で凍結保存した。

尿は午前 10~11 時の間に、滅菌した導尿カテーテルを直接膀胱内に挿入し採取した。採取した尿は孔径 0.2 μ m のシリンジフィルターにて濾過滅菌後、分析に供するまで -40°C で凍結保存した。

3) 骨代謝マーカーおよび骨代謝関連項目の測定

(1) 血清 Ca 濃度

血清中 Ca 濃度は、*o*-クレゾールフタレインコンプレクソン (*o*-CPC) 直接法 (Connerty *et al.*, 1966, 日立自動分析装置 9000, 東京) により測定した。

(2) 血清無機リン (iP) 濃度

血清中 iP 濃度は、モリブデン酸・UV 法 (Drewes, 1972, 日立自動分析装置 9000, 東京) により測定した。

(3) 血清 OC 濃度

前章と同様に、immunoradiometric assay (IRMA 法, BGP IRMA 「ミツビシ」, 三菱メディエンス, 東京) により測定した。

(4) 血清 BAP 活性値

前章と同様に、enzyme immunoassay (EIA 法, オステオリンクス 「BAP」, DS ファーマバイオメディカル, 大阪) により測定した。

(5) 尿中 DPD 濃度

前章と同様に、enzyme immunoassay (EIA 法, オステオリンクス 「DPD」, DS ファーマバイオメディカル, 大阪) により測定し、得られた成績は Cr 濃度により補正した。

4) 測定成績の統計学的解析

統計学的解析は Statistical Analysis System (SAS Institute Inc., Cary, NC) を用いて行った。各群間、各群内における各測定値間の比較は MIXED 法によって行い、すべての主効果と交互作用の検定は Tukey-Kramer の多重比較検定を用い、 $P < 0.05$ を有意と判断した。

3. 成績

1) 周産期における血清 Ca 濃度の経時的変動

血清 Ca 濃度の経時的変動を表 4 および図 4 に示した。初産牛の血清 Ca 濃度は、 $8.9 \pm 0.2 \text{mg/dl}$ ~ $9.9 \pm 0.2 \text{mg/dl}$ の範囲内で推移した。経産牛の血清 Ca 濃度は $7.4 \pm 0.5 \text{mg/dl}$ ~ $9.8 \pm 0.1 \text{mg/dl}$ の範囲内で推移したが、分娩直後に $7.4 \pm 0.5 \text{mg/dl}$ と一過性の低下を示し、分娩 1 日後に $7.7 \pm 0.6 \text{mg/dl}$ 、分娩 2 日後に $7.5 \pm 0.6 \text{mg/dl}$ を示した。分娩 3 日後には $8.7 \pm 0.2 \text{mg/dl}$ まで回復し、以後基準値範囲内で推移した。

経産牛は初産牛に比べ、分娩直後と分娩 2 日後に有意 ($P < 0.05$) に低値を示した。経産牛では分娩 14 日前に比べ、分娩直後、分娩 1 日後および分娩 2 日後に有意 ($P < 0.05$) に低値を示した。

2) 周産期における血清 iP 濃度の経時的変動

血清 iP 濃度の経時的変動を表 5 および図 5 に示した。初産牛の血清 iP 濃度は、 $4.9 \pm 0.4 \text{mg/dl}$ ~ $6.2 \pm 0.2 \text{mg/dl}$ の範囲内で推移した。経産牛の血清 iP 濃度は $3.0 \pm 0.4 \text{mg/dl}$ ~ $5.5 \pm 0.6 \text{mg/dl}$ の範囲内で推移し、分娩直後に $3.0 \pm 0.4 \text{mg/dl}$ と一過性の低下を示したが、以後は基準値範囲内に回復した。経産牛は初産牛に比べ、分娩直後に有意 ($P < 0.05$) に低値を示した。

3) 周産期における血清 OC 濃度の経時的変動

血清 OC 濃度の経時的変動を表 6 および図 6 に示した。初産牛の血清 OC 濃度は、 $10.7 \pm 6.6 \text{ng/ml}$ ~ $25.1 \pm 15.6 \text{ng/ml}$ の範囲内で推移した。分娩直後に $10.7 \pm 6.6 \text{ng/ml}$ まで低下し、分娩 21 日後にようやく分娩前のレベルまで回復した。経産牛の血清 OC 濃度は $2.6 \pm 0.5 \text{ng/ml}$ ~ $9.3 \pm 1.3 \text{ng/ml}$

の範囲内を推移し、初産牛ほど大きな変化をみなかった。すべての測定地点において、初産牛が経産牛より有意 ($P<0.05$) に高値を示した。経産牛では、分娩 14 日前に比べ、分娩直後、分娩 1 日後、2 日後、3 日後に有意 ($P<0.05$) に低値を示した。

4) 周産期における血清 BAP 活性値の経時的変動

血清 BAP 活性値の経時的変動を表 7 および図 7 に示した。初産牛の血清 BAP 活性値は $18.1 \pm 1.8 \text{U/L} \sim 48.4 \pm 5.0 \text{U/L}$ の範囲内で推移し、経産牛は $12.3 \pm 5.1 \text{U/L} \sim 26.5 \pm 10.4 \text{U/L}$ の範囲内で推移した。分娩前から分娩後にかけて初産牛が経産牛よりも高値を示し、分娩 14 日前、7 日前および分娩直後に有意 ($P<0.05$) に高値であった。両群とも分娩直後にピーク (初産牛: $48.4 \pm 5.0 \text{U/L}$ 、経産牛: $26.5 \pm 10.4 \text{U/L}$) を示し、以降、分娩 7 日後まで急激に減少し 21 日後まで低値を示した。初産牛は分娩 14 日前に比べ分娩直後に有意 ($P<0.05$) に高値を示し、分娩 7 日後、14 日後、21 日後に有意 ($P<0.05$) に低値を示した。また、経産牛は分娩 14 日前に比べ、分娩直後および分娩 1 日後に有意 ($P<0.05$) に高値を示した。

5) 周産期における尿中 DPD 濃度の経時的変動

尿中 DPD 濃度の経時的変動を表 8 および図 8 に示した。初産牛の尿中 DPD 濃度は $4.7 \pm 0.6 \text{nmol DPD/mmol Cr} \sim 8.6 \pm 0.7 \text{nmol DPD/mmol Cr}$ の範囲内で推移し、経産牛は $3.7 \pm 0.4 \sim 8.5 \pm 0.7 \text{nmol DPD/mmol Cr}$ の範囲内で推移した。両群とも分娩前に比べ分娩直後に軽度上昇し、その後一旦低下、分娩 3 日後には再度増加に転じ 7 日後をピークに推移した。初産牛、経産牛ともに分娩 14 日前に比べ分娩 7 日後、14 日後および 21 日後に有意 ($P<0.05$) に高値を示した。

6) 周産期における尿中 DPD 濃度と血清 BAP 活性値の比の経時的変動

尿中 DPD 濃度と血清 BAP 活性値の比の経時的変動を表 9 および図 9 に示した。初産牛の尿中 DPD 濃度/血清 BAP 活性値の比は、0.11~0.49 の範囲内で推移し、経産牛は 0.19~0.73 の範囲内で推移した。すべての測定地点において経産牛が初産牛より高値を示し、分娩 7 日後、14 日後、21 日後に有意 ($P<0.05$) に高値を示した。初産牛、経産牛ともに分娩 14 日前に比べ分娩 7 日後、14 日後および 21 日後に有意 ($P<0.05$) に高値を示した。

4. 考 察

周産期の血清 OC 濃度はすべての測定時において、経産牛より初産牛の方が有意に高値であった。経産牛では分娩 14 日前が分娩直後、分娩 1 日後、2 日後および 3 日後に比べ有意に高値を示した。Kurosaki ら (2007b) や Taylor ら (2008) も、周産期における血清 OC 濃度の変動について経産牛よりも初産牛の方が高値を示したと報告している。前章で血清 OC 濃度は若齢期に高値を示し、月齢と共に低下していく動態が観察されたため、その結果を基に周産期における初産牛および経産牛の血清 OC 濃度について検討した。前章の結果において、泌乳期の血清 OC 濃度を産歴別に観察したところ、初産牛 ($37.6 \pm 3.0 \text{ ng/mL}$) が経産牛 ($17.5 \pm 0.8 \text{ ng/mL}$) に比べ有意 ($P < 0.01$) に高値を示した。しかしながら、分娩 14 日前の血清 OC 濃度は、初産牛が $20.5 \pm 2.7 \text{ ng/mL}$ 、経産牛が $7.7 \pm 1.4 \text{ ng/mL}$ とともに非周産期牛の濃度よりも低い値を示したことから、分娩前の血清 OC 濃度の低下は月齢によるものではなく、初産牛および経産牛ともにすでに骨代謝回転が抑制されていることが示唆された。

初産牛は分娩直後に最低値を示し、経産牛では分娩 1 日後に最低値を示した。また、両群とも分娩 21 日後までには分娩前の濃度まで回復し、これは Liesegang ら (2007) の報告と同様の結果を示した。

分娩時、一時的に血清 OC 濃度が低下した原因として、エストロゲンなどのホルモンによる骨代謝への影響 (Holtenius *et al.*, 2005) や胎盤におけるトラップやクリアランスの上昇 (Rodin *et al.*, 1989)、腎臓における分解亢進などが考えられるが (Cole *et al.*, 1987)、その直接的な原因は今後検討する必要がある。

周産期における血清 BAP 活性値は、初産牛および経産牛ともに分娩 14 日前に比較して分娩時にピークを迎えるように上昇した。また、初産牛

は分娩 14 日前の血清 BAP 活性値が分娩直後に比べ有意に低値を示し、分娩 7 日後、14 日後および 21 日後に比べ有意に高値を示した。一方で、経産牛は分娩 14 日前の血清 BAP 活性値が、分娩日および分娩 1 日後より有意に低値を示した。

分娩後、一時的に血清 BAP 活性値が上昇するが、その後低下していくことから泌乳量の増加に伴い、乳汁中に大量の Ca が流出することに反応し骨形成が抑制されていることが示された。

血清 OC 濃度の変動は血清 BAP 活性値とは異なり、分娩 14 日後にはすでに上昇傾向にあることから、OC を単なる骨形成マーカーと捉えるのではなく、骨単位の活動の総和である骨代謝回転を反映するマーカーとしてとらえる方が適当であると考えられる。

周産期における尿中 DPD 濃度は、分娩に向けて若干増加し分娩直後に低下、その後再度増加しており、Kurosaki ら (2007b) と同様に初産牛と経産牛の間で有意な差は認められず、分娩 12 日前から分娩 140 日後までの血清中 DPD 濃度の変化を観察した Taylor (2008) らの報告と同様であった。さらに、尿中 DPD 濃度の変化は、同じ骨吸収マーカーである血液中の PYD を測定した Moreira ら (2009) の変化と同様の推移を示した。

今回、初産牛と経産牛の間で尿中 DPD 濃度に有意差は認められなかった。Kamiya ら (2005) は、周産期の初産牛と経産牛の血清 DPD 濃度に有意な差があったと報告している。これらの報告と本研究における結果の違いが、サンプルの違い (尿、血液) であるのか、それともそれ以外の要因であるのかは今回明らかにできなかった。

しかしながら、尿中の DPD 濃度の変化は、分娩後の泌乳の開始に伴う骨吸収の促進をよく反映し、さらに骨吸収による Ca の動員は分娩後 1 週間程度経過してから増加するという従来の報告 (Rabmerg *et al.*, 1970, Rabmerg *et al.*, 1984) を裏付けるものであった。

骨では各々の機能的単位で非同調的に骨吸収と骨形成が繰り返し行われ、正常な状態では骨吸収が亢進した分、骨形成が生じることで動的な恒常性を維持している。乳牛では分娩後、泌乳の開始に伴い急激な Ca の要求が生じ、それに対し骨からの Ca 動員が生じることが推測されるため、骨吸収と骨形成のバランスが損なわれる可能性が考えられる。

医学領域では、骨形成マーカーと骨吸収マーカーの比が骨吸収抑制に関与する *osteoprotegerin* のレベルと相関することが知られており (Indridason *et al.*,2005)、さらに悪性腫瘍性高 Ca 血症 (HHM) および局所腫瘍産生骨吸収因子による高 Ca 血症 (LOH) における骨リモデリングの評価にも骨吸収マーカーと骨形成マーカーの比が利用されている (Nakayama *et al.*,1996)。

Lepage ら (1998) は、馬の骨吸収マーカーである I 型コラーゲン架橋 C 末端テロペプチド (CTX) と OC との比について、年齢や性別に影響されないことを報告している。また、Liesegang ら (2000) は、CTX と OC との比は泌乳初期の骨代謝回転を反映していることから、骨吸収マーカーの比は骨代謝回転の診断ツールになることを示している。

本研究において、尿中 DPD 濃度と血清 BAP 活性値の比は分娩前から分娩後にかけて経産牛が初産牛群より高値を示していた。

加齢は乳牛の Ca 代謝において影響を与える要因であり、前章では血中骨形成マーカーおよび骨吸収マーカーは加齢に伴い低下することが示されている (Sato *et al.*,2011)。さらに血清 Ca 濃度の調節に関与する PTH の標的器官における反応性は加齢によって抑制される (Goff *et al.*,1997) ことや、血中 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 濃度は年齢と負の相関を示すことが知られている (Yamagishi *et al.*,2006)。また、乳牛の消化管における細胞質内 Ca 輸送に関与する Ca 結合タンパク質 (CaBP9K) の遺伝子発現は十二指腸に限局しており (Yamagishi *et al.*,2002)、さらにその遺伝子発現量は年齢

と負の相関関係を示す (Yamagishi *et al.*,2006) ことが報告されている。これらのことから、経産牛は初産牛に比べ分娩後の泌乳の開始に伴い血清 Ca 濃度が低下しやすいため、骨代謝回転を骨形成より骨吸収側に傾けて Ca の要求に対応していることが示された。

また、初産牛、経産牛ともに分娩 14 日前に比べ分娩 7 日後、14 日後および 21 日後において高値を示したことから、骨吸収のみならず骨代謝回転自体が分娩後 1 週間程度まで低下していることが明らかとなった。

5. 小 括

本章では、周産期における初産牛と経産牛における骨代謝マーカーの変動と骨形成マーカーの血清中 BAP 活性値と骨吸収マーカーである尿中 DPD 濃度の比を用いて、周産期の乳牛における骨代謝動態について解析した。

周産期の血清 OC 濃度は血清 BAP 活性値の変動とは異なり、分娩 14 日後にはすでに上昇傾向にあり、その周産期動態から OC は単なる骨形成マーカーと捉えるのではなく、骨単位の活動の総和である骨代謝回転を反映するマーカーとしてとらえる方が適当であると考えられた。

また、血清 BAP 活性値および尿中 DPD 濃度の変動は、泌乳量の増加に伴い、乳汁中に大量の Ca が流出することに反応し骨形成が抑制され骨吸収が促進していることを反映しており、骨吸収による Ca の動員は分娩後 1 週間程度経過してから増加するという、放射性同位元素を用いて周産期の骨代謝動態を解析した従来の報告 (Rabmerg *et al.*, 1970, Rabmerg *et al.*, 1984) を裏付けるものであった。

骨形成マーカーと骨吸収マーカーの比を用いて骨代謝状態を評価したところ、経産牛の尿中 DPD 濃度と血清 BAP 活性値の比は、分娩前から分娩後にかけて初産牛より高値を示しており、さらに初産牛、経産牛ともに分娩 14 日前に比べ分娩 7 日後、14 日後および 21 日後において高値を示した。経産牛では生理的に分娩後の泌乳開始に伴い血清 Ca 濃度が低下しやすいため、骨代謝回転を骨形成より骨吸収側に傾けて Ca の要求に対応していることが示された。また、初産牛、経産牛ともに骨吸収のみならず骨代謝回転自体が分娩後 1 週間程度まで低下していることが明らかとなった。

第 3 章

周産期における乳汁中副甲状腺ホルモン 関連タンパク質濃度の変動

1. 諸 言

PTHrP は、1980 年代に悪性腫瘍に随伴する高 Ca 血症の誘発液性因子として同定され、その後乳腺を含む正常組織にも存在することが分かった

(Philbrick *et al.*, 1996)。PTHrP とそのレセプターのノックアウトマウスを用いた実験では、出生時または子宮内で死亡することから、PTHrP は体内の恒常性を維持する上で非常に重要な役割を果たしていると考えられている (Clemens *et al.*, 2001)。

ヒトでは、授乳期の循環血液中の PTHrP 濃度は上昇することが報告されており (Dobning, *et al.*, 1995, ; Lippuner, *et al.*, 1996, ; Sowers, *et al.*, 1996)、これは、PTHrP が授乳期において Ca 恒常性に関与していることを示唆している。また、Law ら (1991) や Seki (1997) らは、牛やヒトにおいて乳汁中 PTHrP 濃度と乳汁中 Ca 濃度との関係から、PTHrP の Ca 代謝への関与を推測している。一方で、乳汁中 PTHrP 濃度は乳汁中 Ca 濃度と相関しないとの報告 (Yamamoto ら, 1992) もあり、PTHrP の Ca 代謝への関与について一致した見解は得られていない。しかしながら、牛の泌乳期乳腺において PTHrP 遺伝子の発現率が高いことが分かっており、近年の研究では、PTHrP が母体の Ca 恒常性に重要な役割を果たしているのではないかと考えられている。

VanHouten (2005) は、乳腺組織の Ca 感受性レセプターが泌乳中の母体の Ca 不足を感知し、それに続いて乳腺上皮細胞での PTHrP の合成と末梢血への分泌が増加し、母体での骨吸収や腎臓での Ca 再吸収を促進することで Ca の恒常性を維持していると推測しており、乳牛の分娩性低 Ca 血症においても同様の現象が起きていることが考えられる。

Filipović ら (2008)、Kocabagli ら (1995a) は、成牛の血液中 PTHrP レベルは非常に低いことを発見し、Onda ら (2006) は、成牛の血漿中 PTHrP 濃度は検出限界以下であることを報告している。そのため、現状では牛において血液中の PTHrP が、母体の Ca 代謝に与える影響については不明である。

乳汁中には比較的高濃度の PTHrP が含まれることは知られており、Ratcliffe ら (1992) は山羊を用いた実験で、泌乳期乳腺由来の PTHrP は少量ながらも母体の循環血液に分泌されていると報告しているが、乳汁中の PTHrP の生物学的役割は今のところ分かっていない (Thiede, 1994)。

乳汁中 PTHrP の研究において重要な点は、牛の乳汁中には悪性高 Ca 血症患者の循環血液中に分泌される PTHrP 濃度の 100~1,000 倍高いレベルの PTHrP が含まれているということである (Thiede, 1994)。Onda ら (2010) も、乳牛の乳汁中には高 Ca 血症の犬や猫の血液中 PTHrP 濃度の約 1,000 倍近くが含まれていると報告している。血液中に比べ乳汁中に多くの PTHrP が分泌される理由として、従来から子牛に対して何らかの作用があると推測されている。新生子における Ca 恒常性の維持や腸管における上皮細胞の分化・増殖への関与が考えられるが、現在のところ明確な答えは得られていない。

VanHouten ら (2003) は、PTHrP コンディショナル・ノックアウトマウスを用いた研究で、泌乳期乳腺由来の PTHrP が微量ながら母体の循環血液中に分泌され骨吸収を促進したと報告している。

分娩前後の乳牛では、妊娠末期の胎子の成長に伴う Ca 要求量の増大や採食量の低下、消化管運動の低下により Ca 吸収量の持続的な不足が生じ、さらに、分娩後の泌乳開始に伴い乳汁中へ多量の Ca の流出が生じ (Ellenberger *et al.*, 1950)、その結果、分娩性低 Ca 血症を発症すると考えられている。

第 2 章において、周産期の乳牛における骨代謝動態について、初産牛と経産牛の骨代謝の違いと特徴について明らかとなった。そこで本章では、ヒトやマウスでは骨代謝に影響を与えると知られている PTHrP について、周産期の乳牛における骨代謝動態との関係を明らかにする目的で、分娩後の乳汁中 PTHrP の変化について経時的に観察し、さらに乳汁中 PTHrP 濃度と月齢、乳量および乳汁中 Ca 濃度との関係について検討した。

2. 材料と方法

1) 供試動物

分娩後の乳汁中 PTHrP 濃度の変動を観察するために、北海道野付郡別海町の一農事組合法人で飼養されていた臨床上健康な周産期ホルスタイン種初産牛 8 頭 (25.5 ± 4.1 ヲ月齡) と経産牛 8 頭 (3~6 産、 83.9 ± 32.1 ヲ月齡) を供試した。また、乳汁中 PTHrP 濃度と月齡および乳量との関係を検討するために分娩 3 日後のホルスタイン種乳牛 113 頭 (初産牛 47 頭、経産牛 66 頭) を、さらに乳汁中 Ca 濃度との関係を検討するために上記乳牛のうち 103 頭 (初産牛 40 頭、経産牛 63 頭) を供試した。牛はフリーストール牛舎で飼養されており泌乳ステージによって 5 群 (①分娩直後群、②泌乳初期群、③泌乳中期群、④泌乳後期群、⑤乾乳期群) に分けて飼養されていた。分娩後の搾乳は 1 日 3 回 (4:00~7:00、12:00~15:00、19:00~22:00) であった。乾乳牛にはコーンサイレージ、グラスサイレージ、イタリアンライグラス、大豆粕およびビートパルプによる TMR を、泌乳牛にはコーンサイレージおよびグラスサイレージによる TMR を給与し、自由飲水可能であった。また、分娩性低 Ca 血症に対する予防は一切行っていなかった。

2) 乳汁検体の採取

分娩後の経時的な検体は分娩時、分娩 1 日後、2 日後、3 日後、7 日後、14 日後および 21 日後の計 7 回採材した。上記乳汁と乳汁中 PTHrP 濃度と年齢、乳量および乳汁中 Ca 濃度との関係を検討するための検体採材はいずれも 9:00~12:00 の間に行った。採取した乳汁は分析に供するまで -80°C で凍結保存した。

3) 乳汁中 PTHrP 濃度および Ca 濃度の測定

(1) 乳汁中 PTHrP 濃度

乳汁中 PTHrP 濃度は immunoradiometric assay (IRMA 法、PTHrP IRMA 「ミツビシ」, 三菱化学メディエンス, 東京) を用い、恩田ら (2010) の方法にて測定した。本法はヒト PTHrP [1-34] を認識するモノクローナル抗体と、ヒト PTHrP [50-83] を認識するポリクローナル抗体とを用いた方法で、生理活性を有する PTHrP の N 端から中間部、あるいはそれより大分子型の PTHrP 濃度の測定が可能である。乳汁中 PTHrP 濃度の測定には、解凍した乳汁 1ml に 2M の酢酸を 100 μ l ずつ入れ、ボルテックス後、遠心分離機にて遠心 (3,000rpm, 20min, 4 $^{\circ}$ C) した。浮遊している脂質層や沈殿物を吸わないように注意深く上清を吸引し、PTHrP の測定 (ARC-370M; 日立 ALOKA, 東京) に供した。本法での乳汁の測定限界は 0.57pM で、intra and inter-assay における変動率はそれぞれ 11.2% と 4.6%であった。

(2) 乳汁中 Ca 濃度

乳汁中 Ca 濃度は、原子吸光法により測定した。乳汁中 Ca 濃度の測定には、ボルテックスにてよく混和し 10 倍に希釈した乳汁 0.5ml に試料希釈用液 (塩化ランタン 18g、TCA 40g を Q 水で 2L にメスアップしたもの) 10ml を加え、遠心分離機にて遠心 (3,000rpm, 5min, 4 $^{\circ}$ C) した。沈殿物を吸わないように上清を原子吸光分析装置 (AA-7000; Shimadzu, Kyoto, Japan) を用いて測定した。

4) 測定成績の統計学的解析

初産牛と経産牛の分娩後における乳汁中 PTHrP 濃度の比較は Student's *t* test により、群間の比較は fixed-effects linear regression に

よって行った (Stata[®] software Release 11.2, StataCorp LP, College Station, Texas)。乳汁中 PTHrP 濃度と月齢、乳量および乳汁中 Ca 濃度との相関は正規性を確認後、ピアソンの相関係数の検定により行った (Graph Pad Prism 5.04 for Windows software (Graph Pad Software for Science Inc., San Diego, CA, USA))。

3. 成績

1) 周産期における乳汁中副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) 濃度の経時的変化

乳汁中 PTHrP 濃度の経時的変化を表 10 および図 10 に示した。初産牛の乳汁中 PTHrP 濃度は、 $3.1 \pm 0.5 \text{ nM}$ ~ $6.2 \pm 0.8 \text{ nM}$ の範囲内で推移し、経産牛は $1.6 \pm 0.3 \text{ nM}$ ~ $6.0 \pm 0.5 \text{ nM}$ の範囲内で推移した。初産牛および経産牛ともに分娩日に最低値を示し、分娩 3 日後から 7 日後にかけて著しく増加した。以降、初産牛は分娩 21 日後までほぼ同じ濃度で推移し、分娩直後に比べ分娩 14 日後および 21 日後に有意 ($P < 0.05$) に高値を示した。経産牛は分娩直後、分娩 1 日後、2 日後、3 日後に比べ、分娩 7 日後、14 日後および 21 日後に有意 ($P < 0.05$) に高値を示した。初産牛の乳汁中 PTHrP 濃度は、分娩 1 日後、2 日後および 3 日後に経産牛より有意 ($P < 0.05$) に高値を示した。

2) 乳汁中 PTHrP と月齢、乳量および乳汁中 Ca 濃度との関係

分娩 3 日後の乳汁中 PTHrP 濃度と月齢との間に有意な負の相関がみられた ($r = -0.57$ 、 $P < 0.01$ 、表 11、図 11)。各月齢における乳汁中 PTHrP 濃度は、30 ヶ月未満が $6.2 \pm 0.4 \text{ nM}$ 、30~40 ヶ月未満が $5.0 \pm 0.4 \text{ nM}$ 、40~50 ヶ月未満が $3.3 \pm 0.2 \text{ nM}$ 、50~60 ヶ月齢未満が $3.0 \pm 0.5 \text{ nM}$ 、60~70 ヶ月齢未満が $2.5 \pm 0.3 \text{ nM}$ 、70~80 ヶ月齢未満が $3.0 \pm 0.5 \text{ nM}$ 、80 ヶ月齢以上が $1.8 \pm 0.3 \text{ nM}$ であった。30 ヶ月齢未満が 40~50 ヶ月齢未満、60~70 ヶ月齢未満および 80 ヶ月齢以上に比べ危険率 1% 水準で、70~80 ヶ月齢未満に比べ危険率 5% 水準で有意に高かった。

乳汁中 PTHrP 濃度と乳量との間に有意な相関はみられなかった (表 12、図 12)。各乳量における乳汁中 PTHrP 濃度は、20kg 未満が $4.4 \pm 0.7 \text{ nM}$ 、

20～30kg が $5.0 \pm 0.4 \text{ nM}$ 、30～40kg が $3.7 \pm 0.3 \text{ nM}$ 、40kg 以上が $3.5 \pm 0.9 \text{ nM}$ であった。乳汁中 PTHrP 濃度と乳量との関係を産歴別で検討すると、初産牛では有意な相関をみななかった ($r = -0.001$, 図 13) が、経産牛で有意な正の相関がみられた ($r = 0.29$, $P < 0.05$, 図 14)。乳汁中 PTHrP 濃度と乳汁中 Ca 濃度との関係では、十分なサンプル量を確保できなかった個体を除く 103 頭 (初産牛 40 頭、経産牛 63 頭) の分娩 3 日後乳汁を供試したところ有意な相関はみられなかった (図 15)。

4. 考 察

VanHouten (2005) は、泌乳期乳腺由来のPTHrPについて、内分泌学的因子として母体のCa恒常性を維持する機能を有することを報告している。しかし、乳腺が大量のPTHrPを乳汁に分泌するのかは明らかでない。泌乳期乳腺では、血清アルブミンや水分などは血液から直接乳汁へと輸送される。乳脂肪や乳糖は、乳腺に存在する酵素と触媒タンパク質によって母体の循環血液中に存在する前駆体から合成される。カゼイン、 α -ラクトアルブミンや β -ラクトグロブリンなどの乳汁に特有のタンパク質の生合成は遺伝子制御されている (Neville *et al.*, 1983)。PTHrP遺伝子の発現は、泌乳開始時および乳汁中へのPTHrP 分泌開始時に著しく増加するため、乳汁中PTHrPは母体の循環血液からではなく泌乳中の乳腺由来であると考えられている (Thiede, 1994)。

分娩時から分娩21日後までの乳汁中PTHrP濃度の変化を観察したところ、分娩3日後までは経産牛に比べ初産牛が有意に高値を示すことが明らかとなった。初産牛の免疫グロブリンG (IgG) の量および濃度は、経産牛に比べ著しく低いことが指摘されているが (Levieux *et al.*, 1999)、本章では泌乳初期における乳汁中PTHrP濃度は、初産牛の方が経産牛より高いという他の乳成分ではない側面が明らかとなった。

Kocabagliら (1995b) は、初産および2産の牛群と3産以上の牛群において、分娩後6日間の乳汁中PTHrP濃度の変化を観察した結果、両群とも分娩後初日の乳汁中PTHrP濃度が最も高いことを示している。また、Thompsonら (1994) やRatcliffeら (1992) のヤギによる研究では、分娩日に乳汁PTHrP濃度が最高値に達したと報告している。

牛の乳汁中IgG、 α -ラクトアルブミン、 γ -ラクトグロブリン濃度 (Perez *et al.*, 1990) およびラクトフェリン濃度は (Sánchez *et al.*, 1988)、初乳の方が常乳より高濃度であったと報告されており、ヒトでは上皮細胞増殖因子、インス

リン (Read *et al.*, 1984) およびレプチン (Ilcol *et al.*, 2006) 濃度について、常乳よりも初乳の方が高濃度であることが分かっている。

泌乳期間は動物種で異なるが、乳汁中N末端 PTHrPの濃度は一般的に初乳で低く、分娩後、徐々に増加しブタでは分娩14日後 (Thurston *et al.*, 1990)、ラットでは分娩21日後 (Rakopoulos *et al.*, 1992, Yamamoto *et al.*, 1992)、ヒトでは分娩30日後に最高値となることが知られており (Seki *et al.*, 1997)、本章において初産牛および経産牛ともに同様の推移を示した。Kocabagliら (1995b) やThompsonら (1994) の報告と異なる結果になった原因は不明であるが、初産牛と経産牛で明らかな有意差がみられたことは他の報告と一致するものであった。

泌乳開始後の乳汁中PTHrP濃度が初産牛と経産牛で異なる点を検討するため、両牛群間で血清Ca濃度に有意な差がなくなった分娩3日後の個体113頭から乳汁を採取し、乳汁中PTHrP濃度と月齢、乳量および乳汁中Ca濃度について検討した。その結果、乳汁中PTHrP濃度は月齢との間に有意な負の相関関係が認められた。牛では産歴が増すにつれ乳量が増加することが知られており (Kume *et al.*, 2003)、本章では泌乳開始後の乳汁中PTHrP濃度の経時変化では、初産牛が経産牛よりも高い値を示したため、乳汁中PTHrP濃度と乳量との間には負の相関関係があると予想された。また、Uemuraら (1997) は、ヒトの分娩4日目の乳量とN末端PTHrP [1-83] 濃度の間には正の相関があったと報告しているが、本章では、両牛群とも分娩3日目の乳量と乳汁中PTHrP濃度との間に有意な相関はみられなかった。したがって、分娩3日後における両牛群間の乳汁中PTHrP濃度の差は、乳量よりも月齢による影響が強いことが示された。

牛では月齢と分娩性低Ca血症の発症率の間に正の相関があることは知られており (Curtis *et al.*, 1984)、今回の結果からもPTHrPが分娩性低Ca血症に関与している可能性が示唆された。

乳汁中PTHrP濃度と乳汁中Ca濃度との間に、有意な相関関係は認められなかった。ウシ (Law *et al.*, 1991, Onda *et al.*, 2006) やウマ (Care *et al.*, 1997)、ヒト (Uemura *et al.*, 1997) では乳汁中PTHrP濃度と乳汁中Ca濃度との間に有意な正の相関関係があるとした報告がある一方で、ヒツジ (Kocabagli *et al.*, 1995b) ではそのような相関はみられないという報告がある。また、産歴の多い牛群では有意な正の相関が認められ、産歴の少ない牛群では有意な負の相関が認められたとの報告 (Kocabagli *et al.*, 1995a) もあり、乳汁中PTHrP濃度と乳汁中Ca濃度との関係について一致した見解は得られていない。本章の結果からも乳汁中PTHrP濃度と乳汁中Ca濃度との間に生物学的な関連性は認められなかった。

以上から、乳汁中PTHrP濃度は、初産牛、経産牛ともに分娩3日後までは低値を示し、分娩後1週間程度経過してから増加するという、他の乳成分とは異なる変動を示すことが明らかとなった。また、分娩3日後までは経産牛に比べ初産牛が有意に高値を示し、さらに、骨代謝マーカーと同様に若齢個体が高値を示したことから、PTHrPがCa代謝、中でも骨代謝に深く関与していることが示唆された。

5. 小 括

本章では、ヒトやマウスでは骨代謝に影響を与えると知られている PTHrP について、周産期の乳牛における骨代謝動態との関係を明らかにする目的で、分娩後の乳汁中 PTHrP の変化について経時的に観察し、さらに乳汁中 PTHrP 濃度と月齢、乳量、乳汁中 Ca 濃度との関係について検討した。

分娩時から分娩 21 日後までの乳汁中 PTHrP 濃度の変化を観察したところ、分娩 3 日後までは経産牛に比べ初産牛が有意に高値を示すことが明らかとなった。

乳汁中 PTHrP 濃度が初産牛と経産牛で異なる原因を検討するため、両牛群間で血清 Ca 濃度に有意な差がなくなった分娩 3 日後の乳汁中 PTHrP 濃度と月齢、乳量および乳汁中 Ca 濃度との関係を検討した。月齢との間には有意な負の相関関係がみられたが、乳量との間には有意な相関関係は認められなかった。乳汁中 PTHrP 濃度と乳量との関係を産歴別で検討すると、初産牛では有意な相関をみなかったが、経産牛で有意な正の相関がみられた。また、乳汁中 Ca 濃度との間に有意な相関関係は認められなかった。

以上から、乳汁中 PTHrP 濃度は、初産牛、経産牛ともに分娩 3 日後までは低値を示し、分娩後 1 週間程度経過してから増加するという、他の乳成分とは異なる変動を示すことが明らかとなった。また、分娩 3 日後までは経産牛に比べ初産牛が有意に高値を示し、さらに、骨代謝マーカーと同様に若齢個体が高値を示したことから、PTHrP が Ca 代謝、中でも骨代謝に深く関与していることが示唆された。

総括ならびに結論

乳牛をはじめ、哺乳動物は分娩することで泌乳を開始するが、分娩は乳牛にとって大きな生理的ストレスであり、分娩を機に体内の生理・内分泌機能は大きく変化する。乳牛の分娩前後における疾病の一つに分娩性低カルシウム（Ca）血症がある。

血液中の Ca 濃度は 8.5~10.0mg/100ml の範囲で厳密に維持されており、PTH、1,25(OH)₂D₃ や CT といった内分泌ホルモンによってその恒常性が保たれている。しかし、妊娠末期における胎子の骨格形成や食欲の低下、泌乳の開始に伴う大量の Ca 喪失に対して、腸管からの Ca 吸収と腎臓での Ca 保持だけでは補うことができないために、血液中の Ca 濃度が低下し分娩性低 Ca 血症を発症する。

分娩性低 Ca 血症は難産や胎盤停滞や子宮炎、乳房炎、ケトーシス、第四胃変位の発生など周産期疾病との関連も指摘されており、これら周産期疾病による間接的な経済損失も考慮すると、経営に与える影響は非常に大きいものと考えられる。

分娩性低 Ca 血症の予防法としていくつかあるが、完全に予防できる方法は未だ確立されていない。それは乳牛の周産期における Ca 代謝には不明なことが多く残されているためである。

そこで本研究は、ヒトの骨疾患や内分泌疾患の評価や予知、治療効果のモニターに使用されている骨代謝マーカーを用いて乳牛の骨代謝について解析し、さらに骨代謝マーカーを用いて、骨代謝と深い関係があるといわれる PTHrP と骨代謝との関係について検討した。

第1章 各月齢における血清オステオカルシン（OC）濃度、血清骨型アルカリフォスファターゼ（BAP）活性値および尿中デオキシピリジノリン（DPD）濃度の動態

ヒトの骨代謝疾患において、骨代謝を評価する際に使用される代表的

な骨代謝マーカーの血清 OC 濃度、血清 BAP 活性値および尿中 DPD 濃度について、乳牛における月齢動態について検討した。供試動物は、周産期を除いた生後 1 日齢から 10 歳齢までのホルスタイン種乳牛で、血清 OC 濃度は IRMA 法により、血清 BAP 活性値と尿中 DPD 濃度はそれぞれ EIA 法により測定した。

血清 OC 濃度、血清 BAP 活性値および尿中 DPD 濃度ともに若齢期にピークを示し、それ以降、緩やかに低下していった。また、各マーカーともに若齢期においてばらつきが大きかったが、若齢期の活発な骨代謝回転と成長を反映しており、乳牛においてこれらの骨代謝マーカーは骨代謝動態を評価する有力な指標となりうるということが明らかとなった。しかしながら、血清 OC 濃度、血清 BAP 活性値および尿中 DPD を用いて、若齢期の骨代謝を評価する際には個体差を考慮する必要があることが示された。

第 2 章 周産期における血清オステオカルシン (OC) 濃度、血清骨型アルカリフォスファターゼ (BAP) 活性値および尿中デオキシピリジノリン (DPD) 濃度の変動

周産期の初産牛と経産牛における骨代謝マーカーの変動と骨形成マーカーの血清中 BAP 活性値と骨吸収マーカーである尿中 DPD 濃度の比を用いて、周産期の乳牛における骨代謝動態について解析した。

血清 Ca 濃度は、経産牛では分娩 14 日前に比べ、分娩直後、分娩 1 日後および分娩 2 日後に有意 ($P<0.05$) に低値を示し、さらに経産牛は初産牛に比べ、分娩直後と分娩 2 日後において有意 ($P<0.05$) に低値を示した。

周産期の血清 OC 濃度は分娩前から分娩後にかけて、経産牛より初産牛の方が有意 ($P<0.05$) に高値であった。血清 BAP 活性値の変動とは異

なり、分娩 14 日後にはすでに上昇傾向にあり、その周産期動態から OC は単なる骨形成マーカーと捉えるのではなく、骨単位の活動の総和である骨代謝回転を反映するマーカーとしてとらえる方が適当であると考えられた。

また、血清 BAP 活性値および尿中 DPD 濃度の変動は、泌乳量の増加に伴い、乳汁中に大量の Ca が流出することに反応し骨形成が抑制され骨吸収が促進していることを反映しており、骨吸収による Ca の動員は分娩後 1 週間程度経過してから増加するという、放射性同位元素を用いて周産期の骨代謝動態を解析した従来報告 (Rabmerg *et al.*, 1970, Rabmerg *et al.*, 1984) を裏付けるものであった。

骨形成マーカー (尿中 DPD 濃度) と骨吸収マーカー (血清 BAP 活性値) の比を用いて骨代謝状態を評価したところ、分娩前から分娩後にかけて経産牛が初産牛より高値を示しており、さらに初産牛、経産牛ともに分娩 14 日前に比べ分娩 7 日後、14 日後および 21 日後において高値を示した。経産牛では生理的に分娩後の泌乳開始に伴い血清 Ca 濃度が低下しやすいため、骨代謝回転を骨形成より骨吸収側に傾けて Ca の要求に対応していることが示された。また、初産牛、経産牛ともに骨吸収のみならず骨代謝回転自体が分娩後 1 週間程度まで低下していることが明らかとなった。

第 3 章 周産期における乳汁中副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) 濃度の変動

ヒトやマウスでは骨代謝に影響を与えると知られている PTHrP について、周産期の乳牛における骨代謝動態との関係を明らかにする目的で、分娩後の乳汁中 PTHrP の変化について経時的に観察し、さらに乳汁中 PTHrP 濃度と月齢、乳量および乳汁中 Ca 濃度との関係について検討した。

分娩時から分娩 21 日後までの乳汁中 PTHrP 濃度の変化を観察したところ、分娩 3 日後までは経産牛に比べ初産牛が有意 ($P<0.05$) に高値を示すことが明らかとなった。

周産期における乳汁中 PTHrP 濃度が初産牛と経産牛で異なる点を検討するため、両牛群間で血清 Ca 濃度に有意な差がなくなった分娩 3 日後の乳汁中 PTHrP 濃度と月齢、乳量および乳汁中 Ca 濃度との関係を検討した。月齢との間には有意 ($P<0.01$) な負の相関関係がみられたが、乳量との間には有意な相関関係は認められなかった。乳汁中 PTHrP 濃度と乳量との関係を産歴別で検討すると、初産牛では有意な相関をみなかったが、経産牛で有意 ($P < 0.05$) な正の相関がみられた。また、乳汁中 Ca 濃度との間に有意な相関関係は認められなかった。

乳汁中 PTHrP 濃度も第 1 章の骨代謝マーカーと同様に若齢牛で高値を示すことが明らかとなった。また、分娩性低 Ca 血症の発症が少ない初産牛において、低 Ca 血症を発症しやすい分娩 3 日後までの乳汁中 PTHrP 濃度が経産牛より有意 ($P<0.05$) に高値を示した。初産牛、経産牛ともに乳汁中 PTHrP 濃度は分娩 3 日後までは低値を示し、分娩後 1 週間程度経過してから増加することは、骨吸収による Ca 動員時期と一致し、さらに他の乳成分とは異なる変動を示すことが明らかとなった。これらのことから、PTHrP が周産期乳牛の Ca 代謝、中でも骨代謝に深く関与していることが示唆された。

分娩性低 Ca 血症は、産業動物獣医師が遭遇する周産期乳牛の主要疾病の一つである。今日まで病態や治療、予防に関して多くの研究や報告が行われてきたが、今なお発症を制御できない疾病である。反芻動物特有の Ca 調節機構や、PTHrP のような Ca 代謝関連物質の乳牛における生理作用が未だ完全に解明されていないことなどが本疾病の理解を困難

にしている。

本研究では、乳牛の周産期の骨代謝動態を骨代謝マーカーという簡便かつ低侵襲な方法により把握できることが明らかとなった。また、PTHrPの骨代謝への関与が示唆されたことから、本研究の成果は分娩性低Ca血症の発症機構に結び付くものと思われ、さらに効果的な治療や予防法の開発へつながるものと考えられる。

本論文の一部は以下に公表した。

- Sato, R., Onda, K., Kazama, K., Ohnishi, M., Ochiai, H., Kawai, K., Kaneko, K., Ohashi, T., Miyamoto, T., and Wada, Y. 2014. Changes in parathyroid hormone-related protein concentrations in bovine milk from the early stage of lactation. *Livest Sci.* 159: 117-122
- Sato, R., Onda, K., Kato, H., Ochiai, H., Iriki, T., Kaneko, K., Yamazaki, Y., and Wada, Y. 2013. An evaluation of the effect of age and the peri-parturient period on bone metabolism in dairy cows as measured by serum bone-specific alkaline phosphatase activity and urinary deoxypyridinoline concentration. *Vet. J.* 197: 358-362
- Sato, R., Onda, K., Ochiai, H., Iriki, T., Yamazaki, Y., and Wada, Y. 2011. Serum osteocalcin in dairy cows: Age-related changes and periparturient variation. *Res. Vet. Sci.* 91: 196-198

謝 辭

本研究の遂行および本論文をまとめるにあたり、終始懇切なるご指導とご校閲を賜りました麻布大学獣医学部獣医学科内科学第三研究室 和田恭則教授ならびに恩田賢准教授、同内科学第二研究室 土屋亮教授、麻布大学附置生物科学総合研究所 落合秀治准教授に深謝致します。

また、本研究を遂行するにあたり、終始懇切なるご指導とご助言を賜りました麻布大学 小原嘉昭客員教授、同内科学第一研究室 伊東正吾准教授に深く感謝致します。

さらに、本研究を遂行するにあたり終始多大なるご協力をいただきました独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 宮本亨上席研究員ならびに大橋傳氏、根室地区農業共済組合 山崎幸夫獣医師、大西守獣医師、中尾茂獣医師、加藤肇獣医師、澤向陽一獣医師、江村有希子獣医師、西松栄光獣医師、宮崎大学農学部産業動物衛生学研究室 佐々木羊介研究員、麻布大学獣医学部臨床繁殖学研究室 金子一幸教授、農事組合法人夢ファーム職員各位ならびに麻布大学獣医学部獣医学科内科学第三研究室の学生諸氏に深謝致します。

引用文献

Allen, M. J., Hoffmann, E., Richardson, D., and Breur, G J. 1998. Serum markers of bone metabolism in dogs. *Am. J. Vet. Res.* 59: 250-254.

Allen, M.J., 2003. Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Vet Clin Pathol.* 32: 101-113.

Bikle, D. D., Morrissey, R. L., Zolock, D. T., and Rasmussen, H. 1981. The intestinal response to vitamin D. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 89: 63-142.

Burr, D. B. 2002. Targeted and nontargeted remodeling. *Bone.* 30: 2-4.

Calvo, M. S., Eyre, D. R., and Gundberg, C. M. 1996. Molecular basis and clinical application of biological markers of bone turnover. *Endocr. Rev.* 17: 333-368.

Care, A. D., Abbas, S. K., Ousey, J., and Johnson, L. 1991. The relationship between the concentration of ionised calcium and parathyroid hormone-related protein (PTHrP[1-34]) in the milk of mares. *Equine Vet. J.* 29: 186-189.

Clemens, T. L., Cormier, S., Eichinger, A., Endlich, K., Fiaschi-Taesch, N., Fischer, E., Friedman, P. A., Karaplis, A. C., Massfelder, T., Rossert, J., Schlüter, K. D., Silve, C., Stewart, A. F., Takane, K., and Helwig, J. J. 2001. Parathyroid hormone-related protein and its receptors: nuclear functions and roles in the renal and cardiovascular systems, the

placental trophoblasts and the pancreatic islets. *Br. J. Pharmacol.* 134: 1113-1136.

Connerty, H. V., and Briggs, A. R. 1966. Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 290-296.

Cremers, S., Garnero, P., and Seibel, M. J., 2008. Biochemical markers of bone metabolism. In: Principles of Bone Biology. Third eds. Academic Press, San Diego, CA, USA, pp. 1857-1881.

Cole, D.E., Gundberg, C.M., Stirk, L.J., Atkinson, S.A., Hanley, D.A., Ayer, L.M., and Baldwin, L.S., 1987. Changing osteocalcin concentrations during pregnancy and lactation: implications for maternal mineral metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 65: 290–294.

Curtis, C. R., Erb, H. N., Sniffen, C. J., Smith, R. D., Powers, P. A., Smith, M. C., White, M. E., Hillman, R. B., and Pearson, E. J., 1983. Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183: 559-561.

Curtis, C. R., Erb, H. N., Sniffen, C. J., and Smith, R. D. 1984. Epidemiology of parturient paresis: predisposing factors with emphasis on dry cow feeding and management. *J. Dairy Sci.* 67: 817-825.

Davicco, M. J., Coxam, V., Roux, R., and Barlet, J. P., 1990. Plasma

osteocalcin concentrations in cattle under various pathophysiological conditions. *Bone Miner.* 10: 131-137.

DeLaurier, A., Jackson, B., Ingham, K., Horton, M. A., and Price, J. S. 2004. A comparison of methods for measuring serum and urinary markers of bone metabolism in cats. *Res. Vet. Sci.* 77: 29-39

Delgado-Lecaroz, R., Warnick, L. D., Guard, C. L., Smith, M. C. and Barry, D. A. 2000. Cross-sectional study of the association of abomasal displacement or volvulus with serum electrolyte and mineral concentrations in dairy cows. *Can. Vet. J.* 41: 301-305.

Dobnig, H., Kainer, F., Stepan, V., Winter, R., Lipp, R., Schaffer, M., Kahr, A., Nocnik, S., Patterer, G., and Leb, G. 1995. Elevated parathyroid hormone-related peptide levels after human gestation: relationship to changes in bone and mineral metabolism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80: 3699-3707.

Drewes, P. A. 1972. Direct colorimetric determination of phosphorus in serum and urine. *Clin. Chim. Acta.* 39: 81-88.

Ellenverger, H. B., Newlander, J. A., and Jones, C. H. 1950. Composition of the bodies of dairy cows. *Vt. Agric. Exp. Stn. Bull.* Pp.1-66.

Eyre, D. R., 1996. Biochemical basis of collagen metabolites as bone turnover markers. In: Principles of Bone Biology. Bilezikian, J. P., Raisz,

L. G., and Rodan, G. A., eds. Academic Press, London, pp. 143-155.

Filipović, N., Stojević, Z., Zdelar-Tuk, M., and Kusec, V. 2008. Plasma parathyroid hormone-related peptide and bone metabolism in periparturient dairy cows. *Acta Vet. Hung.* 56: 235-244.

Goff, J. P., and Horst, R. L. 1997a. Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum rations on milk fever in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80: 176-186.

Goff, J. P., and Horst, R. L. 1997b. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *J. Dairy Sci.* 80: 1260-1268.

Goff, J. P. 2000. Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16: 319-337.

Goff, J. P. 2008. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet. J.* 76: 50-57.

Gomez, B. Jr., Ardakani, S., Ju, J., Jenkins, D., Cerelli, M. J., Daniloff, G. Y., and Kung, V. T. 1995. Monoclonal antibody assay for measuring bone-specific alkaline phosphatase activity in serum. *Clin. Chem.* 41: 1560-1566.

Green, H. B., Horst, R. L., Beitz, D. C, and Little, E. T. 1981. Vitamin D metabolites in plasma of cows fed a prepartum low-calcium diet for

prevention of parturient hypocalcemia. *J. Dairy Sci.* 64: 217-226.

Hannon, R., and Eastell, R., 2000. Preanalytical variability of biochemical markers of bone turnover. *Osteoporos Int. Suppl.* 6: S30-44.

Healy, K. D., Vanhooke, J. L., Prah, J. M., and DeLuca, H. F. 2005. Parathyroid hormone decreases renal vitamin D receptor expression in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 29: 4724-4728.

Heinrichs, A. J., and Losinger, W. C. 1998. Growth of Holstein dairy heifers in the United States. *J. Anim. Sci.* 76: 1254-1260.

Hollis, B. W., Draper, H. H., Burton, J. H., and Etches, R. J. 1981. A hormonal assessment of bovine parturient paresis: evidence for a role of oestrogen. *J. Endocrinol.* 88: 161-171.

Holtenius, K., and Ekelund, A. 2005. Biochemical markers of bone turnover in the dairy cow during lactation and the dry period. *Res. Vet. Sci.* 78: 17-19.

Horst, R. L. 1986. Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 69: 604-616.

Horst, R. L., Goff, J. P., and Reinhardt, T. A. 1994. Calcium and vitamin D metabolism in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 77: 1936-1951.

Horst, R. L., Goff, J. P., Reinhardt, T. A., and Buxton, D. R. 1997. Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 80: 1269-1280.

Horst, R. L., Goff, J. P., and Reinhardt, T. A. 2003. Role of vitamin D in calcium homeostasis and its use in prevention of bovine periparturient paresis. *Acta Vet Scand. Suppl.* 97: 35-50

Horst, R. L., Goff, J. P., and Reinhardt, T. A. 2005. Adapting to the transition between gestation and lactation: differences between rat, human and dairy cow. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 10: 141-156.

Hove, K., and Kristiansen, T. 1982. Prevention of parturient hypocalcemia: effect of a single oral dose of 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Dairy Sci.* 65: 1934-1940.

Ikeda, T., Nagai, Y., Yamaguchi, A. Yokose, S., and Yoshiki, S. 1995. Age-related reduction in bone matrix protein mRNA expression in rat bone tissues: application of histomorphometry to in situ hybridization. *Bone.* 16: 17-23.

Ilcol, Y. O., Hizli, Z. B., and Ozkan, T. 2006. Leptin concentration in breast milk and its relationship to duration of lactation and hormonal status. *Int Breastfeed J.* 17; 1: 21.

Indridason, O. S., Franzson, L., and Sigurdsson, G., 2005. Serum

osteoprotegerin and its relationship with bone mineral density and markers of bone turnover. *Osteoporos Int.* 16: 417-423.

Kamiya, Y., Kamiya, M., Tanaka, M., and Shioya, S. 2005. Effects of calcium intake and parity on plasma minerals and bone turnover around parturition. *Anim. Sci. J.* 76: 325-330.

Kasai, R., Yamamuro, T., Okumura, H., and Iguchi, H. 1993. Statistical analysis of age and sex-related changes of serum osteocalcin. *J Bone Miner Met.* 11: 7-16.

Kocabagli, N., Riond, J. L., Spichiger, U. E., and Wanner, M. 1995a. Parathyroid hormone-related protein and calcium homeostasis during the periparturient period of dairy cows. *Am. J. Vet. Res.* 56: 380-385.

Kocabagli, N., Riond, J. L., Küng, K., and Wanner, M. 1995b. Parathyroid hormone-related protein and calcium concentrations in milk and blood of ewes. *Domest. Anim. Endocrinol.* 12: 215-218.

Kume, S., Nonaka, K., and Oshita, T. 2003. Relationship between parity and mineral status in dairy cows during the periparturient period. *Anim. Sci. J.* 74: 211-215.

Kurosaki, N., Yamato, O., Sato, J., Naito, Y., Mori, F., Imoto, S., and Maede, Y. 2007b. Biomarkers for the activation of calcium metabolism in dairy cows: elevation of tartrate-resistant acid phosphatase activity by

lowering dietary cation-anion difference is associated with the prevention of milk fever. *J. Vet. Med. Sci.* 69: 265-270.

Law, F. M., Moate, P. J., and Leaver, D. D., Diefenbach-Jagger, H., Grill, V., Ho, P. W., and Martin, T. J. 1991. Parathyroid hormone-related protein in milk and its correlation with bovine milk calcium. *J. Endocrinol.* 128: 21-26.

Lepage, O.M., Hartmann, D.J., Eicher, R., Uebelhart, B., Tschudi, P., and Uebelhart, D. 1998. Biochemical markers of bone metabolism in draught and warmblood horses. *Vet. J.* 156: 169–175.

Levieux, D., and Ollier, A. 1999. Bovine immunoglobulin G, beta-lactoglobulin, alpha-lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post partum period. *J. Dairy Res.* 66: 421-430.

Liesegang, A., Sassi, M. L., Risteli, J., Eicher, R., Wanner, M., and Riond, J. L. 1998. Comparison of bone resorption markers during hypocalcemia in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 81: 2614-2622.

Liesegang, A., Eicher, R., Sassi, M.L., Risteli, J., Kraenzlin, M., Riond, J.L., and Wanner, M. 2000. Biochemical markers of bone formation and resorption around parturition and during lactation in dairy cows with high and low standard milk yields. *J. Dairy Sci.* 83: 1773-1781.

Liesegang, A., Chiappi, C., Ristli, .T., Kessler, J., and Hess, H. D. 2007. Influence of different calcium contents in diets supplemented with

anionic salts on bone metabolism in periparturient dairy cows. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 91: 120-129.

Lippuner, K., Zehnder, H. J., Casez, J. P., Takkinen, R., and Jaeger, P. 1996. PTH-related protein is released into the mother's bloodstream during lactation: evidence for beneficial effects on maternal calcium-phosphate metabolism. *J. Bone Miner. Res.* 11: 1394-1399.

Markowitz, M. E., Gundberg, C. M., and Rosen, J. F. 1987. The circadian rhythm of serum osteocalcin concentrations: effects of 1,25 dihydroxyvitamin D administration. *Calcif. Tissue Int.* 40: 179-183.

Marks Jr., S. C., and Hermey, D. C. 1996. The structure and development of bone. In: Principles of Bone Biology. Bilezikian, J. P., Raisz, L. G., Rodan, G.A. (Eds.), Principles of Bone Biology. Academic Press, San Diego, pp. 3-15.

Moreira, V. R., Zeringue, L. K., Williams, C. C., Leonardi, C., and McCormick, M. E. 2009. Influence of calcium and phosphorus feeding on markers of bone metabolism in transition cows. *J. Dairy Sci.* 92: 5189-5198.

Mori, R., Kodaka, T., Soeta, S., Sato, J., Kakino, J., Hamato, S., Takaki, H., and Naito, Y. 2005. Preliminary study of histological comparison on the growth patterns of long-bone cortex in young calf, pig, and sheep. *J. Vet. Med. Sci.* 67: 1223-1229.

Nakayama, K., Fukumoto, S., Takeda, S., Takeuchi, Y., Ishikawa, T., Miura, M., Hata, K. Hane, M., Tamura, Y., Tanaka, Y., Kitaoka, M., Obara, T., Ogata., and Matsumoto, T. 1996. Differences in Bone and Vitamin D Metabolism between Primary Hyperparathyroidism and Malignancy Associated Hypercalcemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81: 607-611

Neville, M. C., Allen, J. C., and Watters, C. 1983. The Mechanisms of Milk Secretion. In: Lctaton, Physiology, nutrition, and breast-feeding. Neville, M. C., and Neifert, M. R., eds. New York. Plenum Press. pp. 49-102.

Nielsen, H. K. 1994. Circadian and circatrigintan changes in osteoblastic activity assessed by serum osteocalcin. Physiological and methodological aspects. *Dan Med Bull.* 41: 216-227.

Nishizawa, Y., and Nakatsuka,K. 1999. Clinical usefulness of bone-specific alkaline phosphatase in metabolic bone disease, especially osteoporosis. *The Bone.* 13: 109-116.

Onda, K., Sato, A., Yamaguchi, M., Matsuki, N., Ono, K., and Wada, Y. 2006. Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) and Ca levels in the milk of lactating cows. *J. Vet. Med Sci.* 68: 709-713.

Onda, K., Yamaguchi, M., Ohashi, M., Sato, R., Ochiai, H., Iriki, T., and Wada, Y. 2010. Modification of the analysis of parathyroid

hormone-related protein in milk and concentrations of this protein in commercial milk and milk products in Japan. *J. Dairy Sci.* 93: 1861-1867.

Parfitt, A. M. 2002. Targeted and nontargeted bone remodeling: relationship to basic multicellular unit origination and progression. *Bone*. 30: 5-7.

Payne, J. M. 1977. Metabolic disease in farm animals. William Heinemann Medical Book, London.

Peel, N., and Eastell, R. 1993. Measurement of bone mass and turnover. *Baillière's Clinical Rheumatology*. 7: 479-498.

Perez, M. D., Sanchez, L., Aranda, P., Ena, J. M., Oria, R., and Calvo, M. 1990. Synthesis and evolution of concentration of beta-lactoglobulin and alpha-lactalbumin from cow and sheep colostrum and milk throughout early lactation. *Cell. Mol. Biol.* 36: 205-212.

Philbrick, W. M., Wysolmerski, J. J., Galbraith, S., Holt, E., Orloff, J. J., Yang, K. H., Vasavada, R. C., Weir, E. C., Broadus, A. E., and Stewart, A. F. 1996. Defining the roles of parathyroid hormone-related protein in normal physiology. *Physiol. Rev.* 76: 127-173.

Ramberg, C. F. Jr. Mayer, G. P., Kronfeld, D. S., Phang, J. M., and Berman, M. 1970. Calcium Kinetics in cows during late pregnancy, parturition, and early lactation. *Am. J. Physiol.* 219: 1166-1177

Ramberg, C. F. Jr., Johnson, E. K., Fargo, R. D., and Kronfeld, D.S. 1984. Calcium homeostasis in cows, with special reference to parturient hypocalcemia. *Am. J. Physiol.* 246: R698-704.

Ratcliffe, W. A., Thompson, G. E., Care, A. D., and Peaker, M. 1992. Production of parathyroid hormone-related protein by the mammary gland of the goat. *J. Endocrinol.* 133: 87-93.

Rakopoulos, M., Vargas, S. J., Gillespie, M. T., Ho, P. W., Diefenbach-Jagger, H., Leaver, D. D., Grill, V., Moseley, J. M., Danks, J. A., and Martin, T. J. 1992. Production of parathyroid hormone-related protein by the rat mammary gland in pregnancy and lactation. *Am. J. Physiol.* 263: E1077-1085.

Read, L. C., Upton, F. M., Francis, G. L., Wallace, J. C., Dahlenberg, G. W., and Ballard, F. J. 1984. Changes in the growth-promoting activity of human milk during lactation. *Pediatr. Res.* 18: 133-139.

Rodan, G. A., and Martin, T. J. 1981. Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption-a hypothesis. *Calcif. Tissue Int.* 33: 349-351.

Rodin, A., Duncan, A., Quartero, H.W., Pistofidis, G., Mashiter, G., Whitaker, K., Crook, D., Stevenson, J.C., Chapman, M.G., and Fogelman, I., 1989. Serum concentrations of alkaline phosphatase isoenzymes and osteocalcin in normal pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 68:

1123-1127.

Sánchez, L., Aranda, P., Pérez, M. D., and Calvo, M. 1988. Concentration of lactoferrin and transferrin throughout lactation in cow's colostrum and milk. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler*. 369: 1005-1008.

Sasser, R. G., Falk, D. E., Ross, R. H. 1979. Estrogen in plasma of parturient paretic and normal cows. *J. Dairy Sci.* 62: 551-556.

Sato, R., Onda, K., Ochiai, H., Iriki, T., Yamazaki, Y., and Wada, Y. 2011. Serum osteocalcin in dairy cows: Age-related changes and periparturient variation. *Res. Vet. Sci.* 91: 196-198

Sato, R., Onda, K., Kato, H., Ochiai, H., Iriki, T., Kaneko, K., Yamazaki, Y., and Wada, Y. 2013. An evaluation of the effect of age and the peri-parturient period on bone metabolism in dairy cows as measured by serum bone-specific alkaline phosphatase activity and urinary deoxypyridinoline concentration. *Vet. J.* 197: 358-362

Sato, R., Onda, K., Kazama, K., Ohnishi, M., Ochiai, H., Kawai, K., Kaneko, K., Ohashi, T., Miyamoto, T., and Wada, Y. 2014. Changes in parathyroid hormone-related protein concentrations in bovine milk from the early stage of lactation. *Livest Sci.* 159: 117-122

Seki, K., Kato, T., Sekiya, S., Makimura, N., Kudoh, K., Furuya, K., and Nagata, I. 1997. Parathyroid-hormone-related protein in human milk and its relation to milk calcium. *Gynecol. Obstet. Invest.* 44: 102-106.

Seyedin, S. M., Kung, V. T., Daniloff, Y. N., Hesley, R. P., Gomez, B., Nielsen, L. A., Rosen, H. N., and Zuk, R. F. 1993. Immunoassay for urinary pyridinoline: the new marker of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 8: 635-641.

Smith, B. P. 2002. Large Animal Internal Medicine. 3rd. eds. Mosby, inc. St. Louis, Missouri. U.S.A. pp.1358-1399.

Sowers, M. F., Hollis, B. W., Shapiro, B., Randolph, J., Janney, C. A., Zhang, D., Schork, A., Crutchfield, M., Stanczyk, F., and Russell-Aulet, M. 1996. Elevated parathyroid hormone-related peptide associated with lactation and bone density loss. *JAMA.* 276: 549-554.

Taylor, M. S., Knowlton, K. F., McGilliard, M. L., Seymour, W. M., and Herbein, J. H. 2008. Blood mineral, hormone, and osteocalcin responses of multiparous Jersey cows to an oral dose of 25-hydroxyvitamin D3 or vitamin D3 before parturition. *J. Dairy Sci.* 91: 2408-2416.

Taylor, M. S., Knowlton, K. F., McGilliard, M. L., Swecker, W. S., Ferguson, J. D., Wu, Z., and Hanigan, M. D. 2009. Dietary calcium has little effect on mineral balance and bone mineral metabolism through twenty weeks of lactation in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 92: 223-237.

Thiede, M. A. 1994. Parathyroid hormone-related protein: a regulated calcium-mobilizing product of the mammary gland. *J. Dairy Sci.* 77:

1952-1963.

Thompson, G. E., Ratcliffe, W. A., Hughes, S., Abbas, S. K., and Care, A. D. 1994. Local control of parathyroid hormone-related protein secretion by the mammary gland of the goat. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 108: 485-490.

Thurston, A. W., Cole, J. A., Hillman, L. S., Im, J. H., Thorne, P. K., Krause, W. J., Jones, J. R., Eber, S. L., and Forte, L. R. 1990. Purification and properties of parathyroid hormone-related peptide isolated from milk. *Endocrinology.* 126: 1183-1190.

Tobiume, H., Kanzaki, S., Hida, S., Ono, T., Moriwake, T., Yamauchi, S., Tanaka, H., and Seino, Y. 1997. Serum bone alkaline phosphatase isoenzyme levels in normal children and children with growth hormone (GH) deficiency: a potential marker for bone formation and response to GH therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 2056-2061.

Uemura, H., Yasui, T., Yoneda, N., Irahara, M., and Aono, T. 1997. Measurement of N- and C-terminal-region fragments of parathyroid hormone-related peptide in milk from lactating women and investigation of the relationship of their concentrations to calcium in milk. *J. Endocrinol.* 153: 445-451.

Vagg, M. J., and Payne, J. M. 1970. The effect of ammonium chloride induced acidosis on calcium metabolism in ruminants. *Br. Vet. J.* 126:

531-537.

VanHouten, J. N., Dann, P., Stewart, A. F., Watson, C. J., Pollak, M., Karaplis, A. C., and Wysolmerski, J. J. 2003. Mammary-specific deletion of parathyroid hormone-related protein preserves bone mass during lactation. *J. Clin. Invest.* 112: 1429-1436.

VanHouten, J. N. 2005. Calcium sensing by the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 10: 129-139.

Van Mosel, M., and Corlett, S.C. 1990. Assessment of bone turnover in the dry period of dairy cows by measurement of plasma bone GLA protein, total plasma alkaline phosphatase activity and urinary hydroxyproline. *Exp. Physiol.* 75: 827-837.

Woitge, H. W., Scheidt-Nave, C., Kissling, C., Leidig-Bruckner, G., Meyer, K., Grauer, A., Scharla, S.H., Ziegler, R., and Seibel, M.J. 1998. Seasonal variation of biochemical indexes of bone turnover: results of a population-based study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83: 68-75.

Yamagishi, N., Ayukawa, Y., Ishiguro, N., Soeta, S., Lee, IH., Oboshi, K., and Yamada, H. 2002. Expression of calbindin-D9k messenger ribonucleic acid in the gastrointestinal tract of dairy cattle. *J vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 49: 461-465.

Yamagishi, N., Miyazaki, M., Naito, Y. 2006. The expression of genes for

transepithelial calcium-transporting proteins in the bovine duodenum. *Vet J.* 171: 176-186.

Yamagishi, N., Takehana, K., Kim, D., Miura, M., Hirata, T., Devkota, B., Sato, S., and Furuhashi, K. 2009. Fluorometric method for measuring plasma tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b and its application in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 1637-1642.

Yamamoto, M., Fisher, J. E., Thiede, M. A., Caulfield, M. P., Rosenblatt, M., and Duong, L. T. 1992. Concentrations of parathyroid hormone-related protein in rat milk change with duration of lactation and interval from previous suckling, but not with milk calcium. *Endocrinology.* 130: 741-747.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. and Suda, T. 1998. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95: 3597-3602

表および図

表 1 各月齢における血清オステオカルシン (OC) 濃度

Age	～ 1 month	～ 3 months	～ 6 months	～ 12 months	～ 24 months	～ 36 months	～ 48 months	～ 60 months	60 months～
head	15	14	15	26	29	15	10	10	10
OC (ng/mL)	106.5 ± 12.6*	94.7 ± 8.5	93.0 ± 8.8	88.7 ± 5.2	54.0 ± 4.1	31.0 ± 2.5	19.5 ± 0.9	18.7 ± 1.4	12.7 ± 1.0
*: mean ± SE.									
～ 1 month									
～ 3 months	ns								
～ 6 months	ns	ns							
～ 12 months	ns	ns	ns						
～ 24 months	**	**	*	**					
～ 36 months	**	**	**	**	ns				
～ 48 months	**	**	**	**	ns	ns			
～ 60 months	**	**	**	**	*	ns	ns		
60 months～	**	**	**	**	ns	ns	ns	ns	ns

** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$

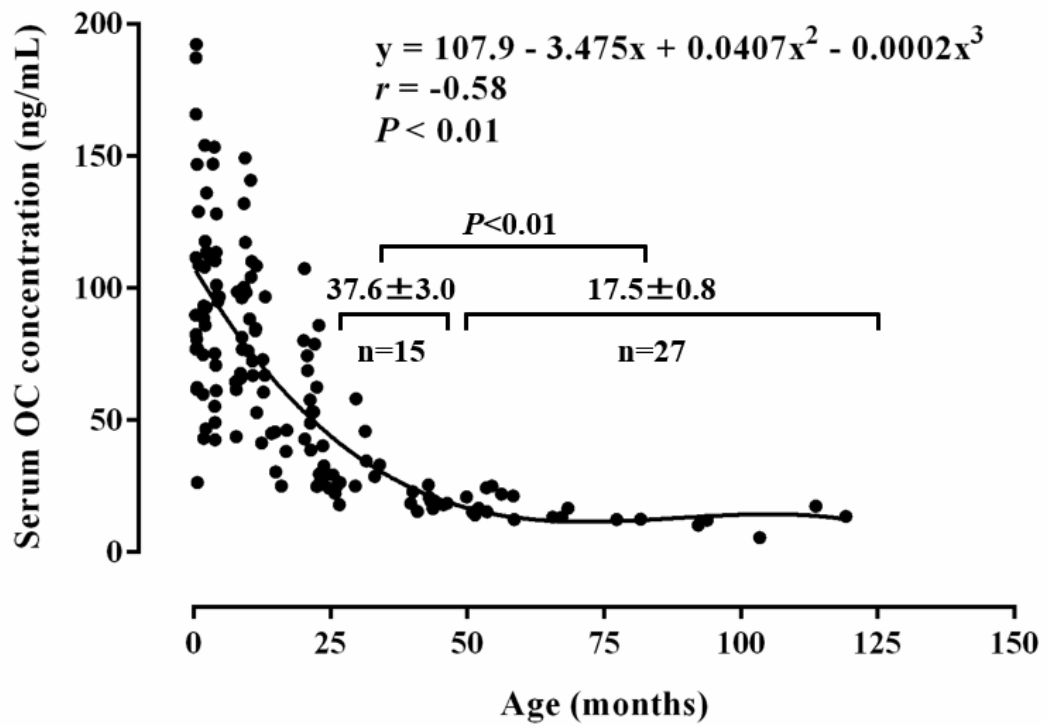


図 1 血清オステオカルシン（OC）濃度と月齢との関係

表 2 各月齢における血清骨型アルカリフォスファターゼ (BAP) 活性値

Age	～ 1 month	～ 3 months	～ 6 months	～ 12 months	～ 24 months	～ 36 months	～ 48 months	～ 60 months	60 months～
head	15	14	15	10	10	10	10	10	10
BAP (U/L)	134.9 ± 12.9*	232.0 ± 25.6	198.3 ± 18.3	104.1 ± 8.5	74.0 ± 10.5	37.0 ± 3.9	42.5 ± 3.5	27.8 ± 2.0	25.7 ± 2.6
*: mean ± SE.									
～ 1 month									
～ 3 months	**								
～ 6 months	ns	ns							
～ 12 months	ns	**	*						
～ 24 months	ns	**	**	ns					
～ 36 months	**	**	**	ns	ns				
～ 48 months	*	**	**	ns	ns	ns			
～ 60 months	**	**	**	ns	ns	ns	ns		
60 months～	**	**	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns

** : $P < 0.01$, * : $P < 0.05$

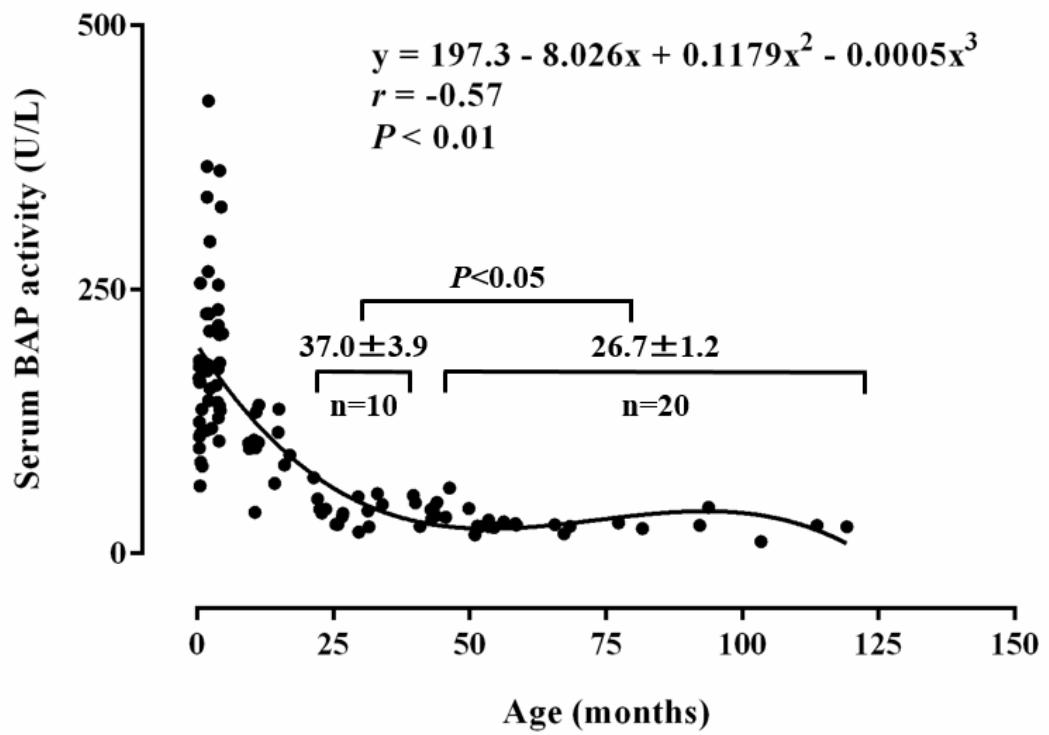


図 2 血清骨型アルカリフォスファターゼ（BAP）活性値と月齢との関係

表 3 各月齢における尿中デオキシピリジノリン (DPD) 濃度

Age	~ 1 month	~ 3 months	~ 6 months	~12 months	~24 months	~36 months	~48 months	~60 months	60 months~
head	10	10	10	10	12	15	11	10	12
DPD (nmol DPD/mmol Cr)	31.5 ± 9.8*	14.9 ± 2.8	16.2 ± 2.8	17.2 ± 6.0	12.0 ± 1.6	6.1 ± 0.2	10.5 ± 2.3	8.7 ± 0.8	10.1 ± 1.3
* : mean ± S.D.									
~ 1 month		~ 3 months	~ 6 months	~12 months	~24 months	~36 months	~48 months	~60 months	60 months~
~ 3 months	ns								
~ 6 months	ns	ns							
~12 months	ns	ns	ns						
~24 months	ns	ns	ns	ns					
~36 months	**	ns	ns	ns	ns				
~48 months	ns	ns	ns	ns	ns	ns			
~60 months	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		
60 months~	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

** : $P < 0.01$

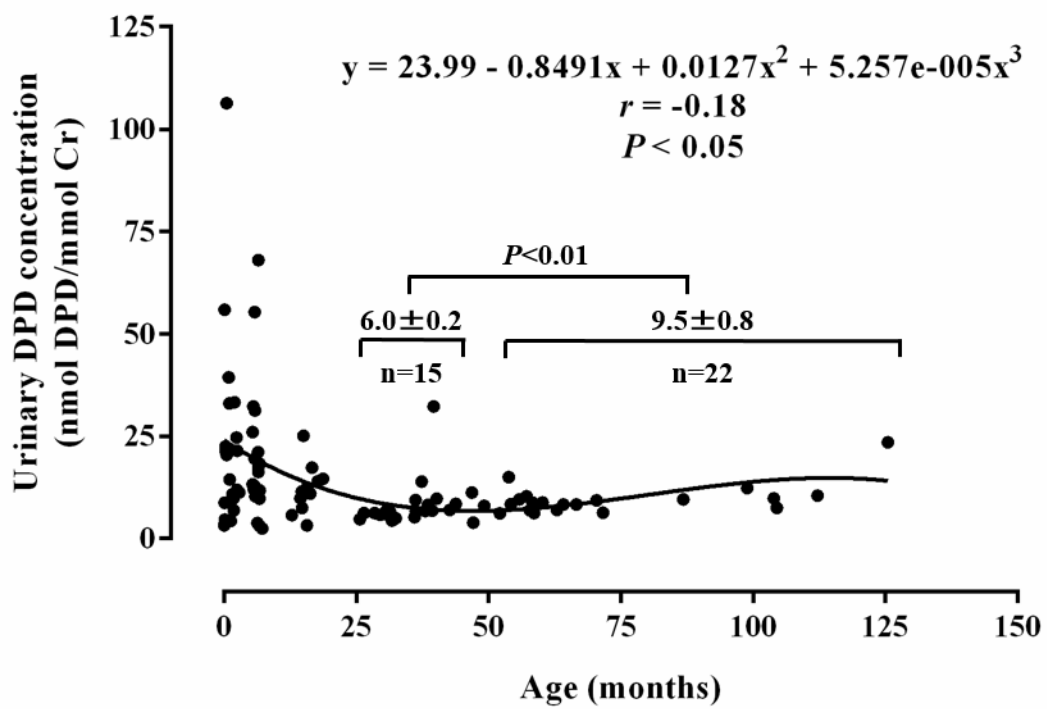


図 3 尿中デオキシピリジノリン (DPD) 濃度と月齢との関係

表 4 周産期における血清カルシウム (Ca) 濃度の経時的変化

No.	分娩後日数										
	-14	-7	0	+1	+2	+3	+7	+14	+21		
1	10.5	9.9	9.7	9.9	8.9	9.9	10.0	11.2	9.7		
2	10.1	9.5	8.8	8.4	10.0	8.7	9.3	9.4	9.9		
3	10.2	9.7	9.8	9.4	9.8	9.9	9.6	9.8	9.7		
4	9.5	9.5	8.8	9.2	9.0	8.9	8.9	9.2	8.8		
5	10.0	10.1	8.8	8.5	9.3	9.3	9.2	9.3	9.9		
6	8.8	8.9	8.9	8.3	8.0	8.7	9.6	9.8	9.7		
7	10.2	9.3	8.4	8.7	9.1	9.5	9.5	10.0	9.4		
初産牛											
mean	9.9	9.6	9.0	8.9	9.2	9.3	9.4	9.8	9.6		
SE.	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.3	0.1		
経産牛											
11	10.2	9.8	9.1	9.3	8.6	8.7	9.5	10.3	10.2		
12	9.3	9.4	6.7	7.9	8.0	8.4	7.9	9.8	9.7		
13	8.9	8.8	5.1	4.3	4.1	8.1	8.9	9.5	9.5		
14	10.1	9.2	7.9	7.7	8.1	7.7	8.7	9.1	9.8		
15	9.7	9.4	8.0	8.3	6.7	9.0	8.9	10.4	10.1		
16	9.6	10.0	8.2	9.0	9.0	9.1	9.9	9.4	9.7		
17	9.8	9.9	6.6	7.1	8.2	9.6	9.6	9.2	9.6		
mean	9.7	9.5	7.4	7.7	7.5	8.7	9.1	9.7	9.8		
SE.	0.2	0.2	0.5	0.6	0.6	0.2	0.3	0.2	0.1		

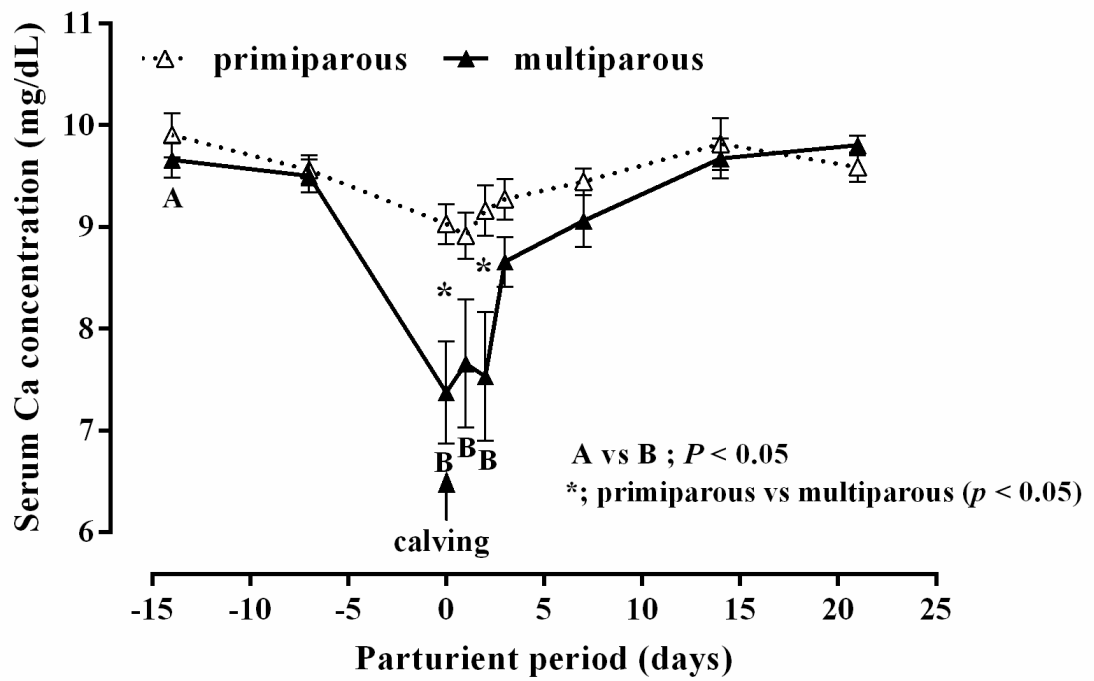


図 4 周産期における血清カルシウム (Ca) 濃度の経時的変化

表 5 周産期における血清無機リン (iP) 濃度の経時的変化

		分娩後日数												
		-14	-7	0	+1	+2	+3	+7	+14	+21				
供試牛		No.												
初産牛	1	5.8	6.5	5.2	4.5	5.1	4.8	5.1	5.9	5.2				
	2	5.9	5.4	3.9	3.9	4.8	4.2	5.3	4.4	5.1				
	3	5.9	5.9	6.2	7.0	7.3	6.5	4.9	6.5	6.0				
	4	6.5	7.2	4.8	6.7	6.1	5.6	6.0	5.9	5.2				
	5	7.3	5.0	3.6	4.2	4.6	5.9	5.8	5.3	6.8				
	6	6.4	6.5	5.3	5.1	5.5	4.5	3.3	4.5	5.0				
	7	5.9	5.7	7.5	5.9	5.2	4.2	3.9	3.8	4.1				
	mean	6.2	6.0	5.2	5.3	5.5	5.1	4.9	5.2	5.3				
	SE.	0.2	0.3	0.5	0.5	0.4	0.3	0.4	0.4	0.3				
経産牛	11	5.9	5.3	3.1	5.5	3.7	4.4	5.9	4.9	6.6				
	12	3.9	5.5	2.1	5.7	5.4	7.3	4.2	5.0	4.6				
	13	6.0	4.7	1.9	1.7	6.2	7.6	4.9	5.8	6.2				
	14	5.1	5.3	5.2	6.5	5.4	5.9	3.9	4.4	5.2				
	15	5.3	5.0	2.6	3.7	2.4	3.8	3.3	5.4	5.3				
	16	5.4	5.6	3.4	4.8	5.0	5.6	6.0	6.9	5.5				
	17	5.5	5.0	2.7	2.5	2.5	4.2	4.3	3.4	5.4				
	mean	5.3	5.2	3.0	4.3	4.4	5.5	4.6	5.1	5.5				
	SE.	0.3	0.1	0.4	0.7	0.6	0.6	0.4	0.4	0.3				

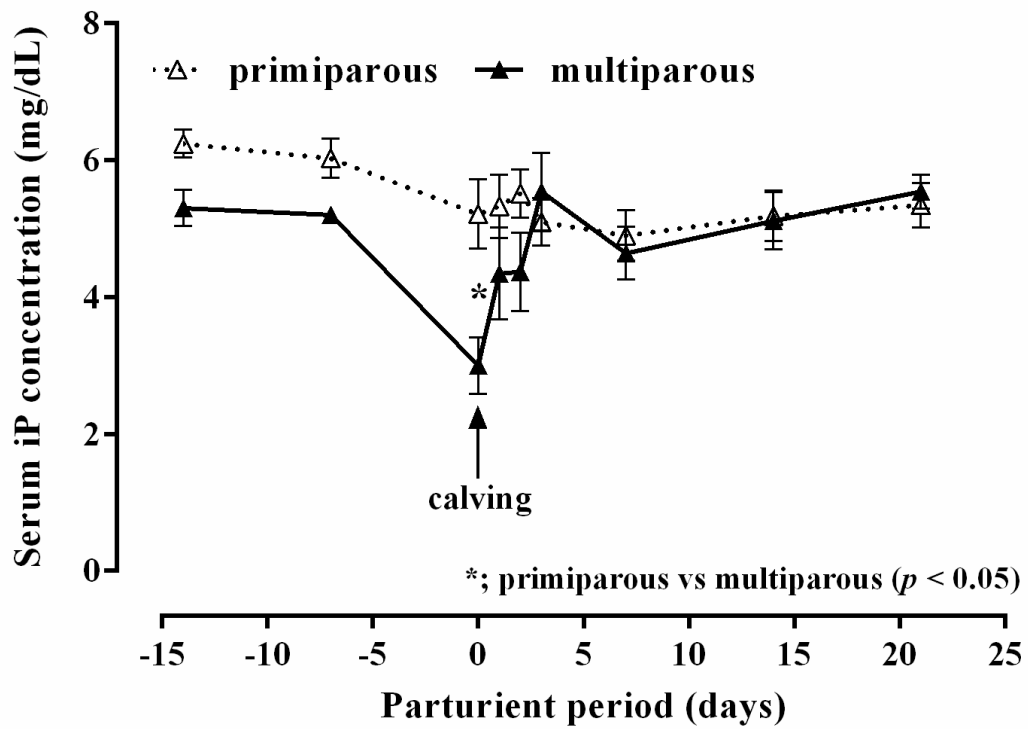


図 5 周産期における血清無機リン (iP) 濃度の経時的変化

表 6 周産期における血清オステオカルシン (OC) 濃度の経時的変化

	供試牛 No.	分娩後日数									
		-14	-7	0	+1	+2	+3	+7	+14	+21	
初産牛	1	23.5	34.1	13.6	20.2	18.8	20.6	18.2	26.1	26.3	
	2	22.4	40.0	7.5	5.7	15.2	24.1	23.7	36.7	54.8	
	3	23.1	26.5	18.5	25.7	36.0	31.9	16.1	23.7	25.0	
	4	29.8	27.5	19.2	13.9	22.5	17.0	14.4	16.1	20.0	
	5	23.2	13.6	6.5	8.6	6.0	8.9	14.9	16.2	30.3	
	6	13.2	15.1	8.5	8.4	6.7	6.4	6.4	9.7	15.4	
	7	8.4	3.4	1.3	1.2	3.1	4.8	4.4	4.5	4.3	
	mean	20.5	22.9	10.7	12.0	15.5	16.3	14.0	19.0	25.1	
	SE.	7.2	12.8	6.6	8.5	11.5	10.1	6.7	10.8	15.6	
経産牛	11	12.1	9.8	7.8	5.2	6.3	7.4	15.8	11.7	14.3	
	12	5.7	6.5	2.9	2.6	2.5	3.2	6.0	6.0	10.2	
	13	3.5	6.1	2.7	1.8	2.2	2.4	3.6	5.2	8.3	
	14	5.2	3.2	1.6	0.8	1.0	1.5	3.1	3.0	5.1	
	15	13.4	12.2	6.3	2.6	2.6	2.3	5.4	7.4	8.3	
	16	8.5	10.4	5.1	3.6	4.0	5.1	6.9	9.1	12.9	
	17	5.8	3.3	1.6	1.8	2.8	3.0	4.0	5.8	5.6	
	mean	7.7	7.3	4.0	2.6	3.1	3.6	6.4	6.9	9.3	
	SE.	1.4	1.3	0.9	0.5	0.6	0.8	1.6	1.1	1.3	

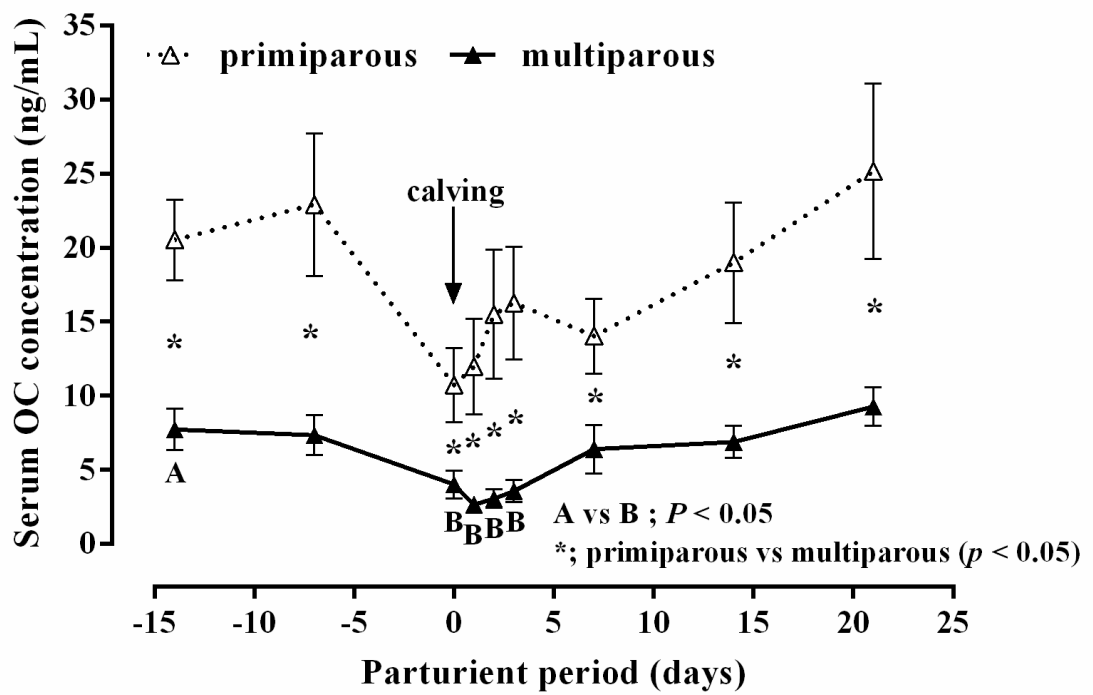


図 6 周産期における血清オステオカルシン（OC）濃度の経時的変化

表 7 周産期における血清骨型アルカリホスファターゼ (BAP) 活性値の経時的変化

		分娩後日数									
		No.	-14	-7	0	+1	+2	+3	+7	+14	+21
初産牛	1	35.9	37.3	42.8	39.9	31.9	26.7	16.4	14.9	17.0	
	2	38.2	55.2	53.6	40.4	31.8	30.0	18.2	17.5	22.4	
	3	40.0	39.6	44.7	45.0	40.8	36.7	21.3	18.4	22.9	
	4	60.9	62.2	67.5	80.5	79.0	71.9	49.1	27.3	30.8	
	5	39.2	46.8	54.9	36.6	31.4	25.5	18.3	19.8	21.0	
	6	35.5	35.7	50.6	39.8	34.7	29.8	23.4	17.0	19.4	
	7	20.8	23.8	24.6	21.7	18.4	17.5	15.3	11.9	10.0	
mean		38.7	42.9	48.4	43.4	38.3	34.0	23.1	18.1	20.5	
SE.		4.5	4.9	5.0	6.8	7.3	6.7	4.4	1.8	2.4	
経産牛	11	32.0	29.3	35.0	37.3	31.3	32.1	24.9	14.8	15.1	
	12	12.5	11.7	22.1	17.1	19.0	17.7	15.2	11.4	8.2	
	13	11.0	8.5	17.5	16.9	17.0	16.0	11.9	13.5	14.7	
	14	14.0	16.6	26.9	24.4	15.1	14.2	11.0	9.5	12.0	
	15	19.9	22.5	31.2	30.0	23.2	23.7	16.6	13.7	13.9	
	16	23.7	25.0	41.5	40.4	31.3	23.9	18.4	20.5	18.9	
	17	8.7	3.3	11.6	7.9	7.5	7.3	4.6	4.2	3.4	
mean		17.4	16.7	26.5	24.8	20.6	19.3	14.7	12.5	12.3	
SE.		8.3	9.4	10.4	11.8	8.7	8.0	6.4	5.0	5.1	

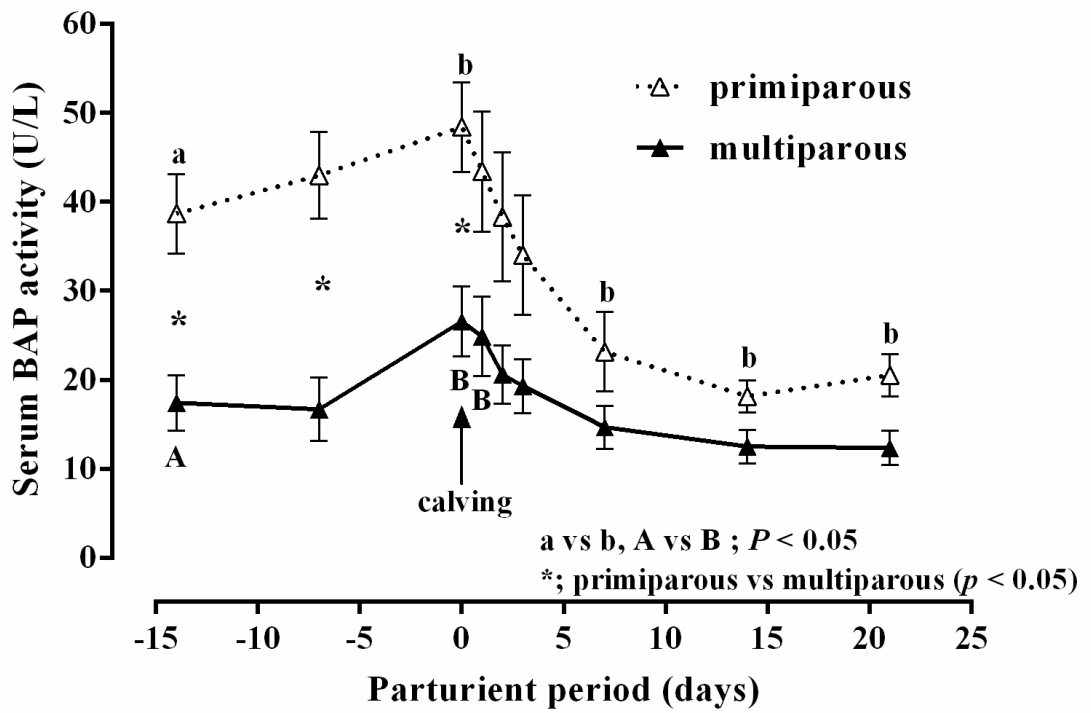


図 7 周産期における血清骨型アルカリフォスファターゼ (BAP) 活性値の経時的変化

表 8 周産期における尿中デオキシピリジノリン (DPD) 濃度の経時的変化

No.	分娩後日数										
	-14	-7	0	+1	+2	+3	+7	+14	+21		
1	4.7	5.6	7.0	6.0	7.0	8.8	8.0	9.2	9.2		
2	5.3	6.7	5.5	4.6	5.2	7.7	7.7	8.0	5.9		
3	4.5	3.7	4.7	4.8	4.9	6.0	7.3	5.9	5.9		
4	5.4	5.9	6.7	5.8	6.1	7.3	11.0	10.5	9.7		
5	5.3	2.5	6.0	5.0	4.0	5.0	7.9	7.6	6.5		
6	5.1	5.7	8.5	4.5	4.9	5.9	10.7	11.0	8.6		
7	3.3	3.0	4.3	3.6	3.7	7.7	7.2	7.7	6.6		
mean	4.8	4.7	6.1	4.9	5.1	6.9	8.5	8.6	7.5		
SE.	0.3	0.6	0.6	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.6		
11	3.5	3.3	4.5	4.4	4.1	5.3	6.6	5.5	5.3		
12	3.2	3.0	3.8	4.5	3.7	6.0	7.2	9.0	7.4		
13	2.7	3.0	3.2	3.0	3.9	4.3	11.4	9.5	8.1		
14	3.6	4.0	4.9	5.1	3.8	4.9	8.2	8.1	8.6		
15	5.1	4.8	4.8	4.8	4.2	3.8	8.7	9.0	9.6		
16	5.0	5.0	5.5	4.7	5.8	7.0	10.6	8.2	10.8		
17	3.3	2.6	4.3	2.6	3.2	4.5	7.0	5.2	4.6		
mean	3.8	3.7	4.4	4.2	4.1	5.1	8.5	7.8	7.8		
SE.	0.3	0.4	0.3	0.4	0.3	0.4	0.7	0.7	0.8		

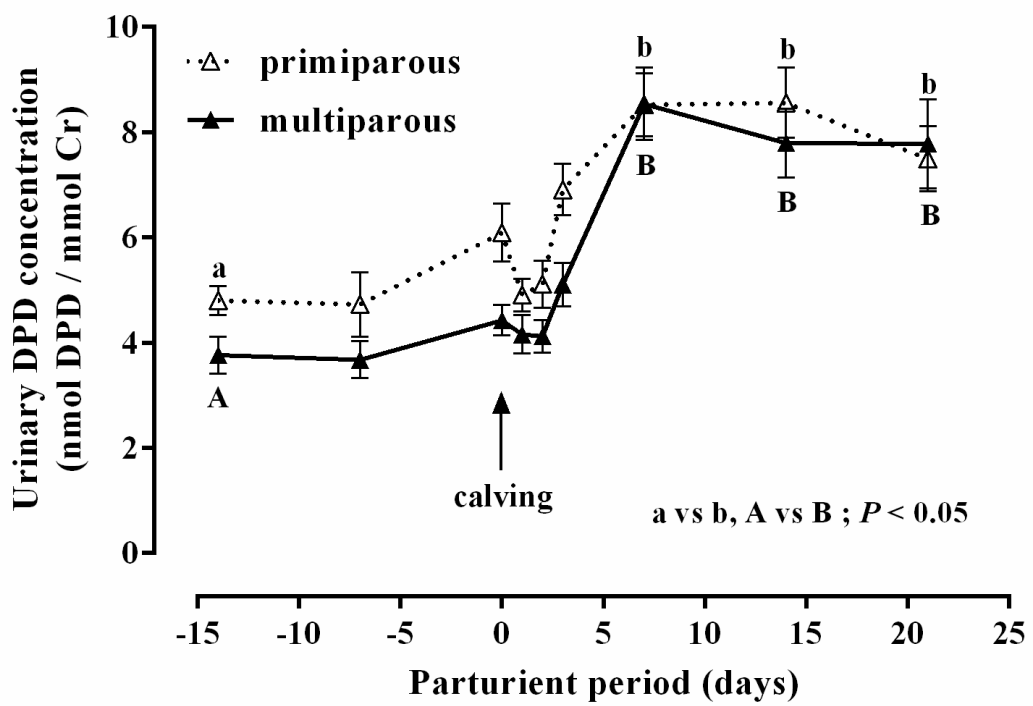


図 8 周産期における尿中デオキシピリジノリン (DPD) 濃度の経時的変化

表9 周産期における尿中デオキシピリジノリン (DPD) 濃度と
血清骨型アルカリホスファターゼ (BAP) 活性値比の経時的変化

供試牛	分娩後日数										
	No.	-14	-7	0	+1	+2	+3	+7	+14	+21	
初産牛	1	0.13	0.15	0.16	0.15	0.22	0.33	0.49	0.62	0.54	
	2	0.14	0.12	0.10	0.11	0.16	0.26	0.42	0.46	0.26	
	3	0.11	0.09	0.10	0.11	0.12	0.16	0.34	0.32	0.26	
	4	0.09	0.09	0.10	0.07	0.08	0.10	0.22	0.38	0.32	
	5	0.13	0.05	0.11	0.14	0.13	0.20	0.43	0.38	0.31	
	6	0.14	0.16	0.17	0.11	0.14	0.20	0.46	0.65	0.44	
	7	0.16	0.12	0.17	0.17	0.20	0.44	0.47	0.64	0.66	
	mean	0.13	0.11	0.13	0.12	0.15	0.24	0.40	0.49	0.40	
	SE.	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	
経産牛	11	0.11	0.11	0.13	0.12	0.13	0.17	0.27	0.37	0.35	
	12	0.25	0.26	0.17	0.26	0.19	0.34	0.47	0.79	0.90	
	13	0.25	0.36	0.18	0.18	0.23	0.27	0.96	0.71	0.55	
	14	0.26	0.24	0.18	0.21	0.26	0.34	0.75	0.85	0.71	
	15	0.26	0.21	0.15	0.16	0.18	0.16	0.52	0.66	0.69	
	16	0.21	0.20	0.13	0.12	0.19	0.29	0.58	0.40	0.57	
	17	0.38	0.79	0.37	0.33	0.43	0.61	1.54	1.24	1.33	
	mean	0.24	0.31	0.19	0.20	0.23	0.31	0.73	0.72	0.73	
	SE.	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.1	0.1	

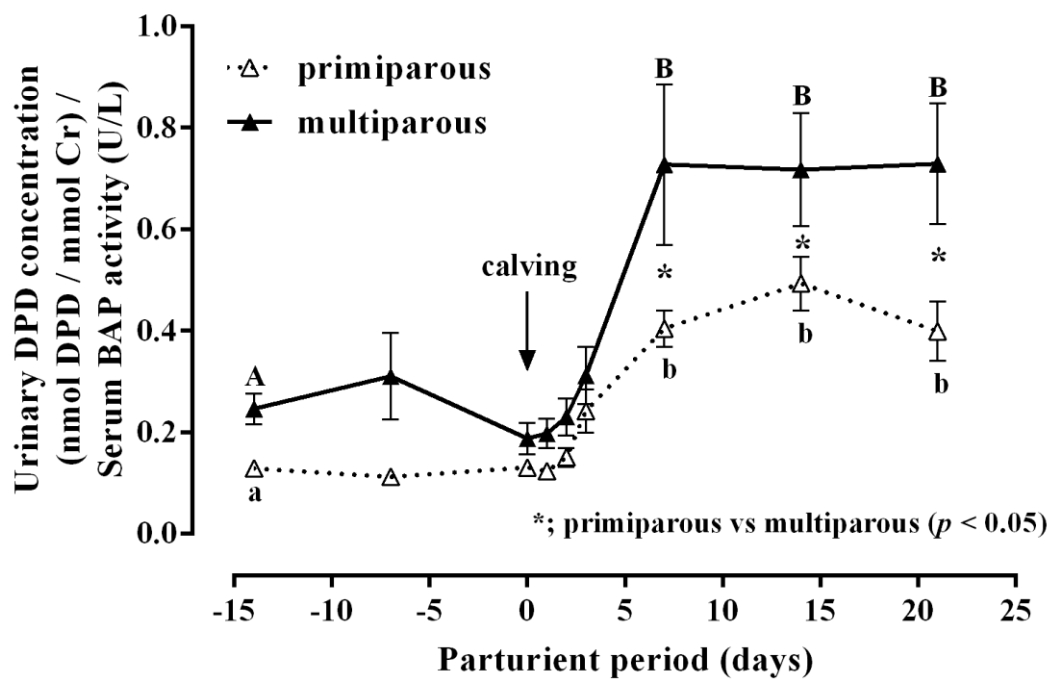


図 9 周産期における尿中デオキシピリジノリン (DPD) 濃度と血清骨型アルカリフォスファターゼ (BAP) 活性値比の経時的変化

表 10 周産期における乳汁中副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) 濃度の経時的変化

	供試牛						分娩後日数					
	No.	0	+1	+2	+3	+7	+14	+21				
初産牛	1	3.3	1.7	5.8	8.0	8.3	9.3	7.8				
	2	3.1	4.2	5.5	5.2	4.6	3.7	4.6				
	3	5.9	6.1	—	2.7	7.8	7.4	4.2				
	4	4.6	3.5	2.9	2.0	3.0	—	4.7				
	5	1.6	—	1.8	2.5	5.4	4.7	5.0				
	6	2.3	4.3	2.5	4.4	4.8	5.6	6.3				
	7	1.8	2.3	3.3	4.6	2.2	4.4	4.4				
	8	2.3	6.2	5.8	5.7	7.9	8.6	10.0				
PTHrP (nM)												
	mean	3.1	4.1	3.9	4.4	5.5	6.2	5.9				
	SE.	0.5	0.6	0.6	0.7	0.8	0.8	0.7				
経産牛	11	1.3	1.8	2.3	2.2	3.4	4.1	7.0				
	12	3.6	2.5	1.8	1.8	4.4	3.9	5.1				
	13	1.6	1.7	1.8	2.3	4.7	6.1	8.8				
	14	1.3	2.1	2.1	2.0	3.8	2.4	5.1				
	15	1.1	—	1.4	1.6	4.1	3.8	5.3				
	16	1.1	1.5	2.1	1.8	3.9	5.2	5.3				
	17	1.4	1.8	1.7	2.4	5.0	3.9	5.1				
	18	1.3	1.8	3.1	3.2	3.9	5.5	6.2				
		mean	1.6	1.9	2.0	2.2	4.1	4.4	6.0			
		SE.	0.3	0.1	0.2	0.2	0.2	0.4	0.5			

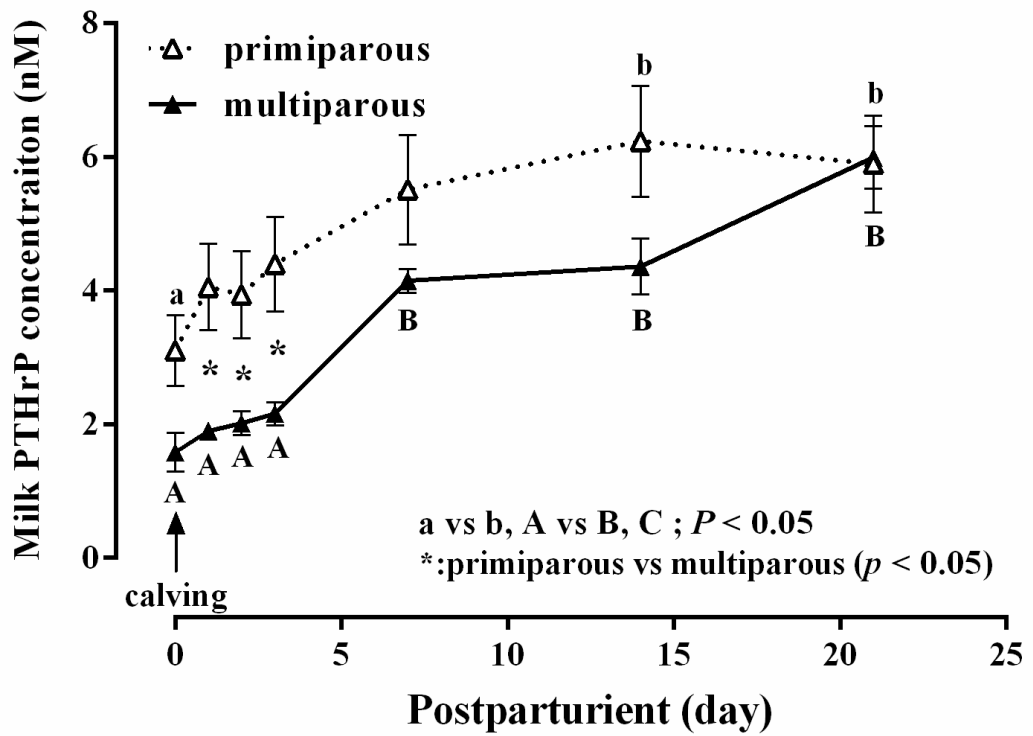


図 10 周産期における乳汁中副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) 濃度の経時的変化

表 11 各月齢における乳汁中副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) 濃度

Age	～ 30 month	～ 40 months	～ 50 months	～60 months	～70 months	～80 months	80 months～
head	36	31	16	6	10	8	6
PTHrP (nM)	6.2 ± 0.4*	5.0 ± 0.4	3.3 ± 0.2	3.0 ± 0.5	2.5 ± 0.3	3.0 ± 0.5	1.8 ± 0.3
*: mean ± SE.							
～ 30 month		～ 40 months	～ 50 months	～60 months	～70 months	～80 months	80 months～
～ 40 months	ns						
～ 50 months	**	ns					
～60 months	ns	ns	ns				
～70 months	**	ns	ns	ns			
～80 months	*	ns	ns	ns	ns		
80 months～	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns
** : P < 0.01, * : P < 0.05							

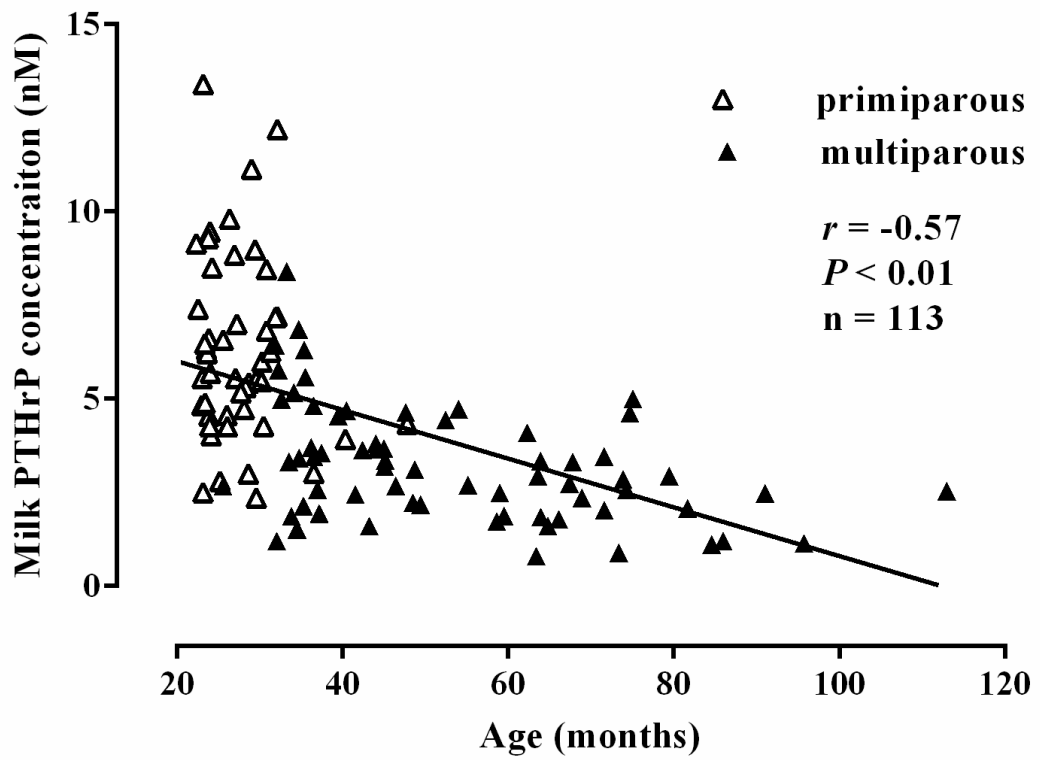


図 11 乳汁中 PTHrP 濃度と月齢との関係

表 12 各乳量における乳汁中副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) 濃度

Milk Yield	~20 kg	~30 kg	~40 kg	40 kg~
head	21	51	26	7
PTHrP (nM)	4.4 ± 0.7*	5.0 ± 0.4	3.7 ± 0.3	3.5 ± 0.9.
*: mean ± SE.				
Milk Yield	~20 kg	~30 kg	~40 kg	40 kg~
~20 kg				
~30 kg	ns			
~40 kg	ns	ns		
40 kg~	ns	ns	ns	
**: P < 0.01, *: P < 0.05				

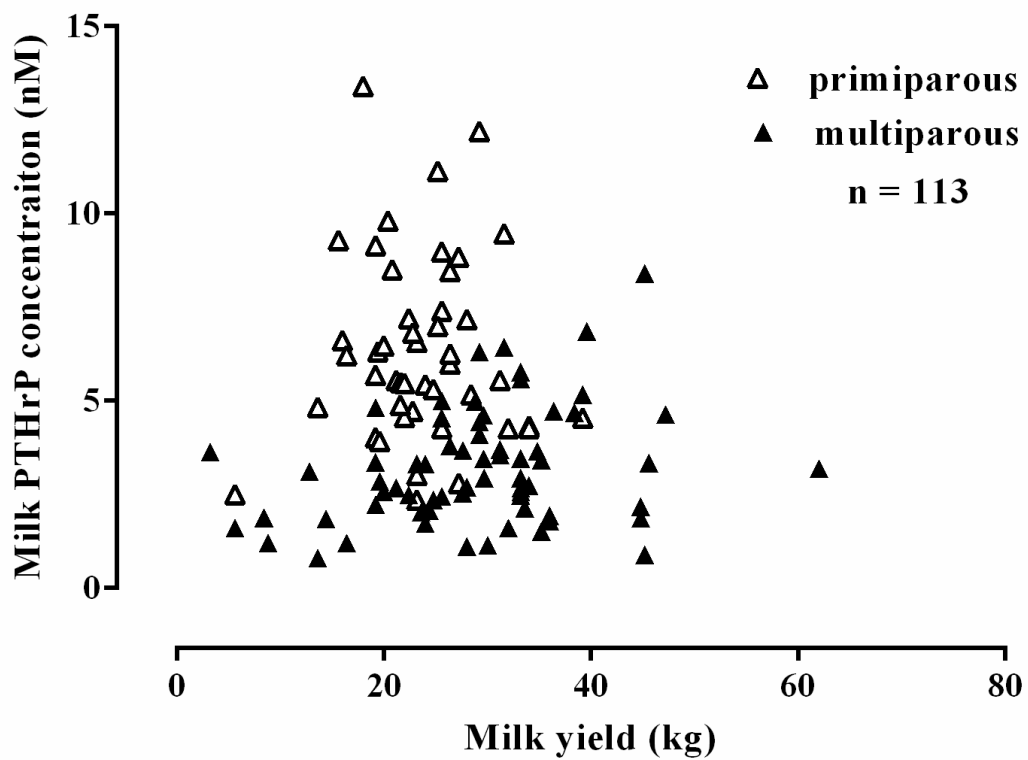


図 12 乳汁中 PTHrP 濃度と乳量との関係

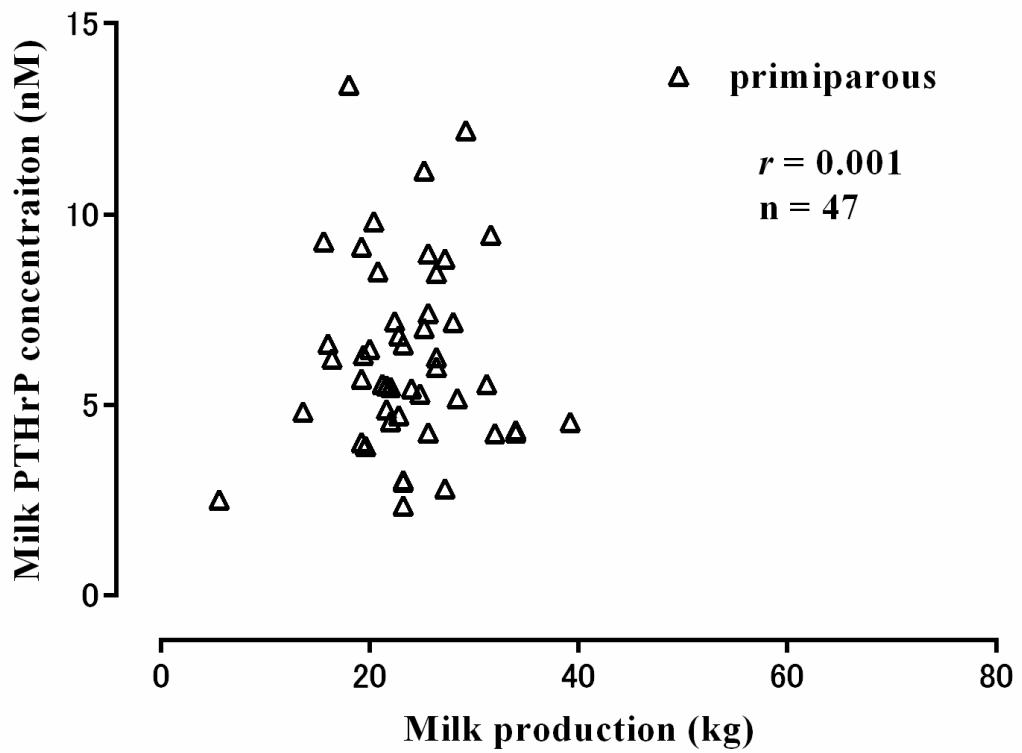


図 13 初産牛における乳汁中 PTHrP 濃度と乳量との関係

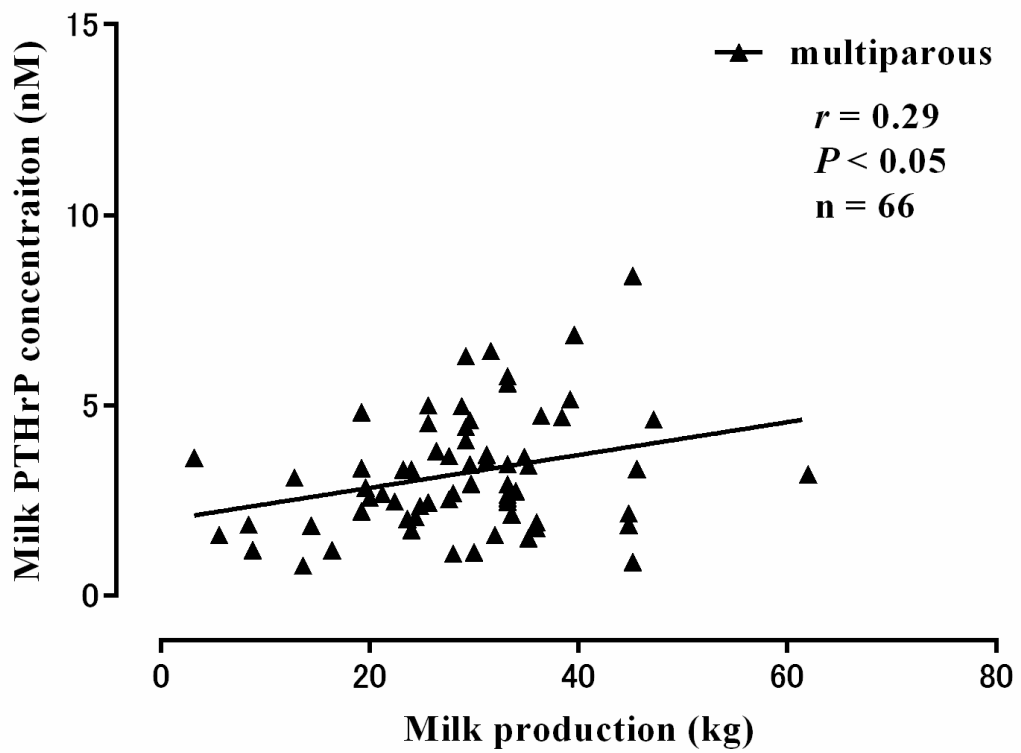


図 14 経産牛における乳汁中 PTHrP 濃度と乳量との関係

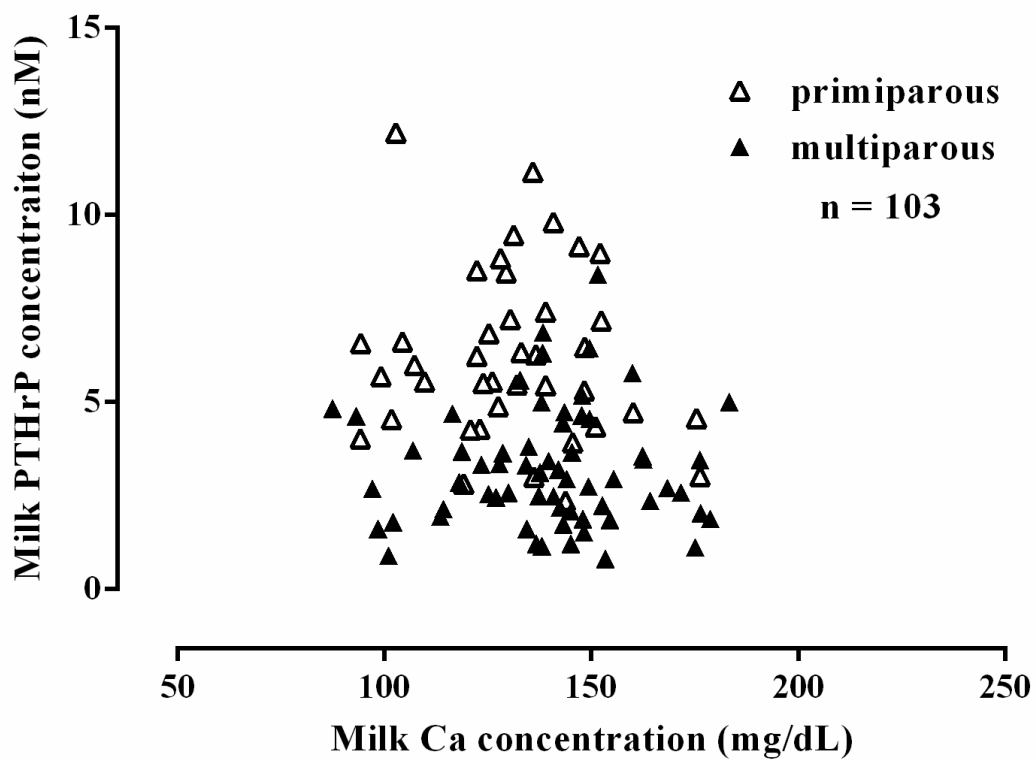


図 15 乳汁中 PTHrP 濃度と乳汁中 Ca 濃度との関係