

氏名(本籍)	佐藤 礼一郎 (大分県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第 430 号
学位授与年月日	平成 25 年 12 月 16 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	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
論文審査委員	(主査) 和田 恭 則 (副査) 土屋 亮 落合 秀 治

論 文 内 容 の 要 旨

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。

乳牛の血液中 Ca 濃度は内分泌ホルモンにより厳密に維持されているが、分娩前後における胎子の骨格形成や食欲の低下、泌乳の開始に伴う乳汁中への大量の 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、通常の内分泌的反応では対応できず分娩性低 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、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大きい。

分娩性低 Ca 血症の予防法として、乾乳後期の低 Ca 飼料の給与や飼料中陽イオン-陰イオン差 (DCAD)、分娩前の Vitamin D 投与などいくつかあるが、完全に予防できる方法は未だ確立されていない。乳牛の周産期における Ca 代謝について解析することは分娩性低 Ca 血症の予防や治療のための基礎的知見となりうる。そこで本研究では、Ca 代謝の中でも中心的な役割を果たしている骨代謝に注目した。ヒトでは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副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) と骨代謝との関係についても検討した。

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 (DPP) 濃度の動態

医学領域では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とし

て血清 OC 濃度、血清骨型 BAP 活性値および尿中 DPD 濃度がある。第 1 章では、乳牛においてこれらの骨代謝マーカーの変動に大きな影響を与えると考えられる月齢との関係について解析した。

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

第 2 章では前章の結果を踏まえ、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、Ca、無機リン、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乳牛の周産期における骨代謝動態について解析した。

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 日後にはすでに増加傾向にあり、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、むしろ骨代謝回転を反映するマーカーと理解する方が適当であると考えられた。

血清 BAP 活性値および尿中 DPD 濃度の変動から、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、放射性同位体を用いて周産期の骨代謝動態を解析した従来の報告を裏付けるものであった。

骨吸収マーカー (尿中 DPD 濃度) と骨形成マーカー (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、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

第 3 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 濃度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、初産牛および経産牛と

もに乳汁中 PTHrP 濃度は、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 日後まではほぼ同じ濃度で推移し、分娩日に比べ分娩 14 日後および 21 日後の乳汁中 PTHrP 濃度は有意 ($P < 0.05$) に高値を示した。経産牛は分娩日、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 ($P < 0.05$) な増加がみられた。初産牛の乳汁中 PTHrP 濃度は、分娩 1 日後、2 日後および 3 日後において経産牛より有意 ($P < 0.05$) に高値を示した。

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、両牛群間の血中 Ca 濃度に有意差がなくなった、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。

分娩 3 日後の乳汁中 PTHrP 濃度と月齢の間に有意 ($P < 0.01$) な負の相関がみられた。

一方、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が、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。

以上のことから、幼～若齢牛は骨代謝回転が盛んで、このことが若い個体の低 Ca 血症になりにくい要因の一つであることが明らかとなった。また、骨吸収による Ca の動員には分娩後 1 週間ほどかかるというこれまでの知見も骨代謝マーカーを用いた研究から裏付けられ、乳牛において骨代謝動態を評価する際に骨代謝マーカーが有用であることが明らかとなった。乳汁中 PTHrP は骨代謝マーカーと同様に若齢牛で高値を示し、骨代謝マーカーを用いる際には、各マーカーの月齢変動や特性を十分に考慮する必要があることが示された。さらに、PTHrP が Ca 代謝に関与していることはヒトやマウスで知られているが、周産期の乳牛においても同様に 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。

論文審査の結果の要旨

乳牛の疾病発生は分娩前後に集中し、乳熱は中でも代表的疾患といえる。乳熱の病態としての低カルシウム血症は多くの周産期疾患の原因になるが、高泌乳量を目的に改良された乳牛にとっては宿命ともいえる。本研究では低カルシウム血症の病態理解と予防への応用を目指して、乳牛において骨代謝マーカーによるミネラルバランスの評価が可能であるかを検討した。また、母体のカルシウム代謝に影響すると考えられている泌乳期乳腺組織由来の副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP)

の周産期における乳汁中濃度変化を観察し、低カルシウム血症への関与についても検討を加えた。

第一章では、ホルスタイン種雌牛における血清オステオカルシン (OC) 濃度、血清骨型アルカリホスファターゼ (BAP) 活性値および尿中デオキシピリジノリン (DPD) 濃度の月齢動態を検討した。

骨代謝マーカには様々な変動要因が存在するが、その中でも年齢は最も大きな要因である。生後 1 日齢から 10 歳齢までの非泌乳牛合計 144 頭の測定結果から、これらの骨代謝マーカは若齢期に高値を示し、若齢期の値に変動が大きいことを明らかにした。ヒトでは乳児期と思春期で二回、それらの値が上昇するのに対し、ウシでは出生直後が最も高く、その後は加齢とともに低下することを明らかにした。若齢期の骨関連疾患においてはこれらの骨代謝マーカの評価に注意が必要であるが、低カルシウム血症が問題となる高齢牛ではその変動は少なく、また、初産牛においても個体差が少ないことから、骨代謝の判断に利用可能なことを明らかにした。

第二章では、周産期乳牛において第一章で調べた三つの骨代謝マーカ (血清 OC 濃度、血清 BAP 活性値および尿中 DPD 濃度) とミネラル濃度の変化を検討した。

初産牛と経産牛それぞれ 7 頭について分娩 14 日前から分娩 21 日目まで経時的に観察した結果、経産牛では血清中の Ca と iP 濃度がこれまでの報告と同様に分娩時に一時的に低下した。骨形成マーカとしての血清 BAP 活性値は分娩時に上昇し最高値を示した後、徐々に低下していくのに対して、骨吸収マーカとしての尿中 DPD 濃度は分娩 3 日後より急激に上昇していた。また、実験期間中はすべての測定項目で、初産牛が高値を示す傾向が認められた。ここでの結果から、血清 OC 濃度はこれまで骨形成マーカと考えられてきたが、分娩後の変化が血清 BAP 活性値と異なることから、骨代謝回転を反映するマーカであると結論している。さらに、骨形成マーカ (血清 BAP 活性値) と骨吸収マーカ (尿中 DPD 濃度) の比を用いて骨代謝の状態を評価したところ、周産期において経産牛は骨代謝回転を強く骨吸収へ傾けることによって、Ca の乳汁中への喪失に対応していることを明らかにした。

第三章では、周産期における乳汁中 PTHrP 濃度の変化を観察し、初産牛と経産牛で初乳において明らかとなった PTHrP 濃度の違いが、なぜ生じたかを検討している。

初産牛と経産牛それぞれ 8 頭の乳汁を分娩直後より経時的に 21 日後まで採取して PTHrP 濃度を測定したところ、実験期間を通じて初産牛が高い傾向を示し、分娩 1 日後、2 日後、3 日後においてはその差が有意であることを明らかにした。また、分娩 3 日目の乳汁中 PTHrP 濃度は、初産牛が経産牛よりも高く、乳量や乳汁中 Ca 濃度ではなく年齢と深く関係していることを明らかにした。乳汁中 PTHrP には常乳よりも初乳で低く、初産牛で経産牛よりも高いという、他の乳汁成分と異なる特徴を持つことも明らかにしている。

これらの研究結果からバイオブシーなどに比べ動物への侵襲性が低く、骨代謝の状態をリアルタイム

ムで知ることができる骨代謝マーカーを、乳熱をはじめとする低 Ca 血症に関連する疾患の診断や治療に応用することが可能になった。また、骨代謝マーカーの比を用いて骨代謝をすることの有用性を明らかにし、ホルスタイン種乳牛においては骨形成マーカーとして血清 BAP 活性値、骨吸収マーカーとして尿中 DPD 濃度が適切であるとした。さらに、これまで骨形成マーカーと考えられてきた血清 OC 濃度の評価の問題点と、骨代謝回転を評価すべきとの提案もしている。PTHrP 濃度については血液中の濃度によりその動態が明らかにされていないのは残念であるが、乳汁中 PTHrP 濃度の変化の検討により骨代謝への関与の可能性が示唆された。加えて、乳汁中 PTHrP 濃度の変化が他の乳汁成分と大きく異なることを明らかにしたことは、牛乳という食品の一性質として今後、栄養生理学的に検討される価値のある発見といえる。

本研究を構成する二つの章の研究成果は既に権威のある学術雑誌に掲載されており、もう一つの章の研究成果も現在学術雑誌に掲載受理されている。以上のことより本研究は、博士（獣医学）の学位を授与するにふさわしい業績であると判断した。