

乳用牛の血中ならびに乳中の
オステオプロテゲリン濃度に関する研究

2019 年

岐阜大学大学院
連合獣医学研究科
(帯広畜産大学)

羽立 薫

乳用牛の血中ならびに乳中の
オステオプロテゲリン濃度に関する研究

羽立 薫

目次	
緒言	3
第 I 章 骨代謝マーカーに関する文献的展望	7
1. 人医療域における代表的な骨代謝マーカー	8
2. 乳牛の分娩性低 Ca 血症と骨代謝評価に関連する研究	11
3. オステオプロテゲリン(OPG)の発見と骨代謝マーカーとしての臨床応用	13
4. 乳汁中に現れる骨代謝マーカーに関する研究の現状	16
第 II 章:ホルスタイン種乳牛における分娩前後の血中 OPG 濃度の推移	17
第一節:初産牛と経産牛における比較	17
1. はじめに	18
2. 材料および方法	18
3. 結果	22
4. 考察	22
5. 小括	28
第二節:産歴の影響	29
1. はじめに	30
2. 材料および方法	30
3. 結果	33
4. 考察	39
5. 小括	44
第 III 章:ホルスタイン種乳牛における初乳中 OPG と母体の骨代謝との関係	46
1. はじめに	47
2. 材料および方法	47
3. 結果	51
4. 考察	57
5. 小括	62
第 IV 章:初乳中 OPG がホルスタイン種新生子牛の血中骨代謝マーカー濃度に与える影響	63
1. はじめに	64
2. 材料と方法	65
3. 結果	68
4. 考察	74
5. 小括	76
総括	77
和文要旨	82
英文要旨	85
謝辞	88
引用文献	89
付録	110

略語一覧

ALP	アルカリホスファターゼ
AUC	曲線下面積
BAP	骨型アルカリホスファターゼ
BCS	ボディ・コンディション・スコア
BW	体重
Ca	カルシウム
CTX	I 型コラーゲン架橋-C-テロペプチド
DMI	乾物摂取量
Dpd	デオキシピリジノリン
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法
HRP	西洋わさびペルオキシダーゼ
ICTP	I 型コラーゲン C 末端テロペプチド
IgG	免疫グロブリン G
Intra-CV	測定内変動誤差
Inter-CV	測定間変動誤差
iP	無機リン
NRC	米国国立研究評議会
NTX	I 型コラーゲン架橋-N-テロペプチド
OC	オステオカルシン
OPG	オステオプロテゲリン
pNPP	p-ニトロフェニルリン酸
PICP	I 型プロコラーゲン-C-ペプチド
PINP	I 型プロコラーゲン-N-ペプチド
PTH	上皮小体ホルモン
Pyr	ピリジノリン (Pyr)
RANK	NF- κ B 活性化受容体
RANKL	NF- κ B 活性化受容体リガンド
TMR	完全混合飼料
TP	総蛋白
TRAP5b	酒石酸耐性酸ホスファターゼ 5b

緒言

乳牛は初乳中に大量のカルシウム(Ca)を喪失するため、分娩時に一過性に血中のCa濃度が低下する。骨は体内のCa総量の98%を貯蔵するが、血中Ca濃度の低下を受け、骨吸収によってCaを溶出する。乳牛は分娩時の血中Ca濃度の低下に対する骨吸収反応が遅れることが指摘されてきた(52, 141)。分娩後に重篤な低Ca血症に陥る乳牛では、分娩前に負のCaバランスに陥っているとの報告もあるが(141, 182)、分娩前後の骨吸収と低Ca血症との関係は明らかになっていない。人医療の現場では、骨代謝の際に生じる体液中の酵素や代謝産物を骨代謝活性の指標とし、骨代謝疾患の診断に利用している。破骨細胞による骨吸収の結果として生じる骨コラーゲン断片は骨吸収マーカーとして利用されているが(24, 65, 124, 130)、乳牛では、これらの血中濃度は分娩後数日間低値で推移することから、分娩時に骨吸収が低下すると考えられてきた(40, 72, 104, 105, 169, 171)。一方、低Ca血症を呈した乳牛でも分娩後のこれらの血中や尿中の骨代謝マーカー濃度は健常牛と差がなく(106, 161)、両者の骨代謝動態に違いは見出だされなかった。近年、乳牛において酒石酸耐性酸ホスファターゼ 5b (TRAP5b)の血中濃度が分娩前1週から分娩時にかけて上昇することが明らかとなり、破骨細胞数が増加する(2, 29, 30, 89)との見方も出てきた。したがって、乳牛における分娩前後の骨吸収状態を正確に把握するためには、破骨細胞の分化を評価するための新たな骨吸収マーカーが必要であると考えた。

オステオプロテゲリン(OPG)は骨髄間質細胞や骨芽細胞で産生・分泌される腫瘍壊死因子受容体(TNFR: Tumor necrosis factor receptor)スーパーファミリーに属する可溶性の糖タンパク質である。破骨細胞の前駆細胞膜上のNF- κ B活性化受容体(RANK: Receptor activator NF- κ B)にRANKリガンド(RANKL: RANK ligand)が結合すると、シグナル伝達が活性化し破骨細胞の分化が促進される。OPGはRANKLのおとり受容体として、このシグナル伝達を阻害することにより、破骨細胞分化を制御する(44, 60, 158)。マウスでOPG遺伝子を過剰発現させると骨化石症を呈するため、骨(=オステオ)を保護する(=プロテクト)という働きから、OPGと命名された(158)。OPGは二量体または単量体の糖タンパク質として分泌され、細胞外で380個のアミノ

酸残基からなる分泌タンパク質へと合成される。OPG はヒトの骨代謝性疾患でその血中濃度の変動が報告されており(131, 147)、血中の骨吸収の指標として臨床研究に用いられている。さらに、血中の RANKL/OPG 比は信頼性の高い骨吸収の指標として着目されている(57, 172)。そのため、血中の OPG 濃度を測定することにより、分娩前後の乳牛の骨吸収状態に関して、破骨細胞分化の観点からの評価が可能であると考えた。

Bouroutzoglou ら(13)は、母体の骨代謝状態が乳中の骨吸収マーカー濃度に変動をもたらすことから、母乳による骨代謝評価の可能性を指摘した。ヒトの母乳は血中よりも高濃度の OPG を含むことが報告されている(127, 179)が、母乳 OPG がもつ生体情報マーカーとしての適格性について検討した報告は未だない。一方、牛乳中の OPG に関する報告はこれまでほとんどなく、その濃度も明らかではない。OPG は多数の臓器で発現し、骨代謝以外にも免疫系細胞分化や妊娠期の乳腺の発達にも関与するなど多様な生理活性を有する。乳牛の初乳産生は分娩数週間前から開始するため(6, 18)、初乳中の OPG は妊娠後期の母体の生体情報を含むことが期待される。

ヒト母乳や牛乳中 OPG の生理活性は、哺乳した新生児の骨代謝に影響することが示唆されている(179)。さらに、新生子牛において、数種の血中骨代謝マーカー濃度は初乳摂取後半日に一過性に急上昇する(67)。新生子期の初乳摂取状況は、子牛の血中酵素(82, 192)やホルモン(59, 63)、様々な栄養代謝産物(83, 85, 162, 191)濃度に影響を与え、その後の増体や飼料効率(38, 86, 88, 90, 159)ならびに泌乳や繁殖成績(120, 125)に影響する。このことから、初乳中の OPG の吸収により、新生子牛の骨代謝は影響を受けることが予測される。

本学位論文では、乳用牛の血中ならびに乳中の OPG 濃度を測定することで、分娩前後の乳牛の骨吸収状態の変化を評価するとともに、初乳中の OPG 濃度と母牛・子牛の骨代謝との関係について明らかにすることを目的とした。そのために、第 I 章では、分娩期の乳牛の骨代謝に関する文献的知見を回顧し、新規性の高い血中骨代謝マーカーである OPG に関して、乳牛における血中および乳中濃度を測定すること

により得られる期待と可能性を述べた。第 II 章では、乳牛の分娩前後の血中 OPG と複数の骨代謝マーカー濃度を測定し、産次ごとの経時的推移から分娩時の骨吸収状態に関する検討を行った。第 III および IV 章では、初乳中の OPG と骨代謝マーカー濃度を測定し、母牛ならびに初乳摂取後の子牛の骨代謝との関係を検討した。

第 I 章 骨代謝マーカーに関する文献的展望

1. 人医療域における代表的な骨代謝マーカー

骨組織は、骨芽細胞による骨の形成と、破骨細胞による骨の破壊・吸収を常に繰り返すことによりその強度や構造を保つ (**Fig. 1-1**)。骨形成と骨吸収による骨代謝回転は骨代謝マーカーにより評価が可能である。人医療域において、骨代謝マーカーの測定は骨粗しょう症における治療薬の選択や、骨折リスクと治療効果の評価を目的に利用されており、骨密度とともに患者の骨強度を評価する臨床指標となっている (124, 130)。我が国では骨代謝マーカーとして、血中・尿中の骨芽細胞・破骨細胞由来の酵素や、数種の骨コラーゲン断片が保険適用の対象となっており、臨床診断に用いられている (124, 130)。ここでは、我が国において、ヒトの骨粗しょう症診療に使用される代表的な骨代謝マーカーを紹介する。

骨形成マーカー

(1) プロコラーゲン

骨芽細胞が産生する I 型コラーゲンの前駆体物質 (プロコラーゲン) であり、C 末端が切断された I 型プロコラーゲン-C-ペプチド (PICP) と N 末端が切断された I 型プロコラーゲン-N-ペプチド (PINP) が存在する (124, 154)。これらは骨以外でも合成されるため取り扱いには注意が必要であるが、骨特異性の高い intact PINP の測定が可能になったことから、2010 年に保険適用となった (76, 124)。

(2) 骨型アルカリホスファターゼ (BAP: Bone-specific Alkaline Phosphatase)

アルカリホスファターゼ (ALP) は小腸や胎盤、肝臓や骨で産生される。これらは、臓器特異的な糖鎖の修飾を受けるため、アイソザイムとして分離することが可能である (134)。この中で、骨組織由来のアイソザイムである BAP は活性化した骨芽細胞から分泌され、その血中濃度は骨形成の指標として有用である (154)。

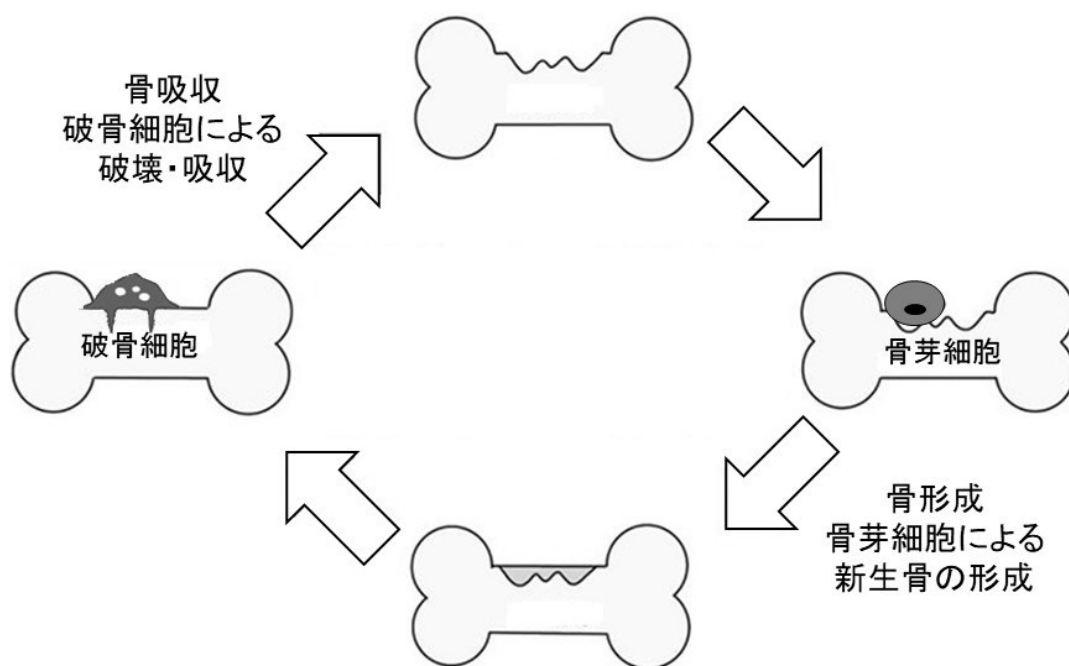


Fig. 1-1: 骨代謝回転

(3) オステオカルシン(OC: Osteocalcin)

非コラーゲン性の骨基質タンパクであり、成熟した骨芽細胞から分泌される。大部分は骨基質中に蓄積され、そのグルタミン酸残基がカルボキシル化されることで、Ca 沈着による石灰化を促進する。一部は血中に放出され、骨形成マーカーとして利用される(76, 154)。血中に放出された一部の OC は急速に分解を受けるため、その断片の分子構造の不均一性により、測定結果にばらつきが生じやすい(154)。

骨吸収マーカー

(1) 酒石酸耐性酸ホスファターゼ 5b (TRAP5b: Tartrate Resistant Acid Phosphatase 5b)

多核化した成熟破骨細胞により産生・分泌される酵素であり、その血中濃度は破骨細胞の数と高い相関性を有する(2)。TRAP5b は破骨細胞質内の小胞中に局在し、骨吸収窩から取り込まれた骨基質の分解に関与する(61)。また、トランスサイトosisによりコラーゲン分解産物とともに血中へ放出されと考えられている(62)。TRAP5b は循環中で失活し、尿中に排泄されないため、その血中濃度は腎機能の影響を受けず、腎疾患患者にも適用可能である(76, 156)。

(2) I 型コラーゲン分解産物

I 型コラーゲンは骨基質の 90%を構成するタンパク質である。I 型コラーゲンのポリペプチド鎖は 3 重らせん構造をしており、ピリジノリン(Pyr)やデオキシピリジノリン(Dpd)によって架橋され、この架橋部分は成熟コラーゲンの分解時に血中に放出され、尿中に遊離型として放出される(130)。また、N 末端側から生じるコラーゲン断片は I 型コラーゲン架橋-N-テロペプチド(NTX)、C 末端側からは I 型コラーゲン架橋-C-テロペプチド(CTX)や ICTP(I 型コラーゲン C 末端テロペプチド)がある(130)。特に Dpd や NTX、CTX は感度の高い免疫測定法が開発され、我が国では信頼度の高い臨床マーカーとして測定に保険が適用可能である(130)。また、NTX や CTX は尿

中のみならず血中での測定も可能であるため、腎機能や日内変動の影響を受けにくい(76)。一方、ICTP は CTX と異なる代謝経路を経て生じ、破骨細胞性の骨吸収を反映しにくいとされる(46, 72, 152)。

2. 乳牛の分娩性低 Ca 血症と骨代謝評価に関連する研究

臨床獣医療において、骨代謝マーカーの測定は一般的ではないが、その臨床的有用性が注目されている。イヌでは骨折治癒(136)や骨腫瘍(99)の予後診断ツールとして期待される。また、競走馬では運動負荷と骨成長の関連(139)や、臨床応用のための基礎データの構築(56, 100, 101)など複数報告されている。乳牛では、分娩期の骨代謝マーカー濃度に関する報告が複数あるが、いずれも臨床応用には至っていない。分娩は母体の Ca 代謝に多大な影響を与える。妊娠後期には胎子の著しい骨格成長が起こり、分娩後には乳に大量の Ca が流出する。高い泌乳能力をもつ乳牛は 1 日に約 30～80 g の Ca を初乳中に喪失し(48, 143)、これは細胞外 Ca 量の約 8 倍に相当する(48)ため、分娩時に低 Ca 血症に陥りやすい。骨は体内の Ca の約 98%を貯蔵する器官であることから、この時期の骨からの Ca 動員は恒常性維持に重要な役割をもつと考えられる。通常、血中 Ca 濃度は、消化管での吸収、骨からの動員、腎尿細管からの再吸収によって厳密に維持される(48, 117, 122)が、分娩後は消化管や骨の反応が 1－2 日遅れるため(52, 116)、分娩直後に急激な負の Ca バランスに陥る(48, 51, 143, 182)。乳牛の分娩時の低 Ca 血症は様々な産褥性疾患の引き金となることが多数報告されており(20, 115, 123, 146)、産乳および繁殖成績(21, 129)、さらにはその後の淘汰率(145, 155)との関連も指摘されている。そのため、乳牛の分娩期の低 Ca 血症発症と骨からの Ca 動員との関連について、様々な研究が報告されてきた。

血中 Ca 濃度の低下に対し、上皮小体ホルモン(PTH)が分泌され、尿への Ca の排出低下と再吸収促進に加え、骨からの動員ならびに腎臓での 1,25-dihydroxyvitamin

D(活性化ビタミン D)の産生を促進する(117)。活性化ビタミン D は腸管での Ca 吸収を促進し、血中の Ca 濃度を正常に戻す(119)。Reinhardt ら(144)の調査によると、経産牛の約 50%は分娩直後に低 Ca 血症に陥るが、これらのホルモンの働きにより 2-3 日以内に補正され、臨床的な変化を起こさない(潜在性低 Ca 血症)。しかし、一部の乳牛では低 Ca 状態から回復することができず、重篤な臨床症状を呈する(臨床型低 Ca 血症)。Ca の欠乏は、骨格筋の弛緩性麻痺による起立不能に加え、平滑筋収縮力の低下による心拍出量の減少を引き起こす。このため四肢や耳温の低下や消化管アトニー、瞳孔散大の症状を併発し、重症の場合は、獣医療の介入なしでは死の転帰を辿る(132)。この疾病は、乳牛の泌乳能力の向上とともに頻発するようになり、泌乳開始直後に顕著で重篤な症状を呈することから、“乳熱”と名付けられた(69)。

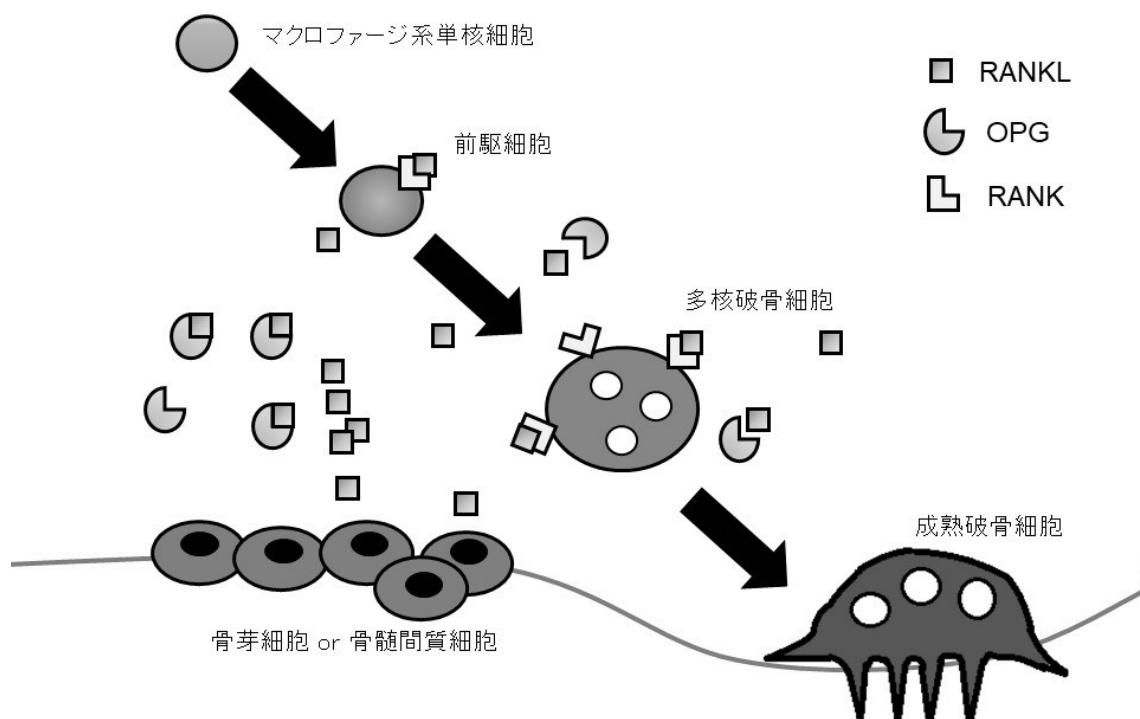
分娩時の低 Ca 血症に対する骨の生理反応は、様々な手法により調査されてきた。Ward(182)は餌、糞尿、血中および乳中の Ca 量から、乳牛の Ca 収支の変化を観察し、乳熱牛では分娩前に排出が吸収を上回る負の Ca バランスを呈すると報告した。分娩直後の乳牛は PTH の投与に対する血中 Ca 濃度の上昇反応が欠如し(79)、これは PTH の標的器官の反応性の低下によるものとされた(119)。Stott ら(166)は乳牛の上皮小体を組織学的に調査し、分娩 1~2 週間前にはその分泌機能が活性化するとした。また、Rowland(148)は乳牛の骨標本の顕微 X 線法により分娩約 1 週前から骨溶解像が増加し始めることを報告した。Ramberg ら (141, 142)は、分娩期の乳牛に放射性同位体 ^{45}Ca を投与後、血液、乳、糞尿を採取し、コンパートメントモデルを作成することで、体内の Ca 動態の解析を行った。このモデルによると、血中 Ca 濃度は消化管での吸収、骨からの動員、腎臓での再吸収による調節で維持されるが、分娩性の低 Ca 血症牛では骨からの Ca 動員反応が分娩後約 1 週間遅れるとされた。その後も分娩牛の PTH 分泌に対する反応性の低下は様々な文献で報告された(71, 108, 114)。この頃、Kraut ら(94)や Bichara ら(8)は、体内のアシドーシス状態が PTH に対する反応性を向上させ、骨吸収を促進することを報告した。これを受け、Goff ら(48, 50)は、分娩後の代謝性アルカローシスが PTH の反応性低下を増強し、低 Ca 血症の原因と

なることを指摘した。

2000 年代になると、分娩牛の骨代謝評価法として、様々な骨代謝マーカーを利用した研究が報告されてきた。血中や尿中の ICTP 濃度(104, 105)や CTX 濃度(40, 72)は分娩 1～2 週間後に、また Dpd 濃度(105, 169)や NTX 濃度(171)は数日後に上昇を示し、その後は乳期を通して低下する(34)。つまり、分娩による血中 Ca 濃度の減少は、PTH や活性化ビタミン D による Ca 補正を促進するが、活性化した破骨細胞が骨基質を融解するまでに数日のタイムラグが存在すると考えられる(37, 52, 53, 55)。一方、乳熱牛において、分娩後の血中 ICTP ならびに尿中 Dpd 濃度(106)や血中 CTX 濃度(161)は健常牛と同様に推移し、統計学的な差は見られないとされている。これまでの報告をまとめると、分娩直後の乳牛の骨からの Ca 動員は抑制されているが、血中の骨吸収マーカー濃度に関して、Ca 濃度の違いによる差は生じにくいと考えられる。一方、破骨細胞数と相関する血中 TRAP5b 濃度は分娩前から分娩時にかけて上昇することから、分娩時に破骨細胞は増加する可能性が報告された(29, 30, 89)。しかしこの破骨細胞の変化が分娩後の骨吸収活性や血中 Ca 濃度に及ぼす影響に関して検証した報告は他になく、不明な点が多い。

3. オステオプロテゲリン(OPG)の発見と骨代謝マーカーとしての臨床応用

破骨細胞は、造血幹細胞に由来するマクロファージ系の単核細胞が融合し、多核化することで骨吸収能を有する成熟破骨細胞に分化する。この破骨細胞の分化は osteoclastogenesis と呼ばれ、この分化段階は破骨細胞分化の促進因子と抑制因子により協調的に調節されている(**Fig. 1-2**)。RANKL は、破骨細胞の前駆細胞膜の受容



体である RANK と結合することで、細胞内の分化シグナルが活性化し、破骨細胞の多核化ならびに成熟を誘導する(70, 98)。この分化調節機構は、1997 年に抑制因子である OPG の発見をきっかけに明らかとなった(158)。OPG は 380 個のアミノ酸からなる可溶性受容体タンパクであり、その遺伝子は骨や免疫細胞を含む全身の臓器で発現が見られる(70, 158)。OPG は、様々なホルモンやサイトカイン(活性化ビタミン D、IL-1 α など)により、骨髄間質系細胞を含む骨芽細胞系細胞での発現量が増加する。OPG は RANKL に対し高い親和性を有するため、RANKL のおとり受容体(decoy receptor)とも呼ばれ、RANK-RANKL の結合により生じたシグナル伝達を直接阻害することにより、破骨細胞分化を制御する(70, 158, 180, 181, 189)。OPG 遺伝子を過剰発現させたマウスは高い骨密度を有し(158)、組織学的に骨化石症を認めたことから、骨(=オステオ)を保護する(=プロテクト)作用を有するとし、OPG と命名された(158)。反対に、OPG 遺伝子欠損マウスは骨密度の低下と骨粗しょう症を呈する(15)ことから、RANK-RANKL ならびに OPG は破骨細胞分化の律速因子であると考えられている。さらに、RANKL は濃度依存性に成熟破骨細胞を活性化するが、この効果は OPG により抑制される(98)。OPG には成熟破骨細胞の貪食能を直接抑制する作用も認められおり(44, 60)、これらのサイトカインは破骨細胞の分化だけでなく、活性にも関わることが期待されている。

OPG は骨代謝回転のモニタリングに有効であるとされ、関節リウマチを始めとするヒトの各種の骨免疫疾患(131)や閉経後骨粗しょう症(147)、多発性骨髄腫(172)、乳がん(78, 87)や、その他様々な疾患(5, 150, 151, 170)においてその血中濃度が報告された。血中 RANKL/OPG 比は、様々な骨破壊性疾患患者で増加することから、有用な骨吸収マーカーとして注目されている(57, 172)。また、RANKL や OPG は骨粗しょう症や多発性骨髄腫の分子標的治療薬の開発に貢献した(27, 153, 187)。一方、妊娠後期の女性(127, 177, 179)やマウス(188)において血中 OPG 濃度が上昇し、分娩後に急激に減少することが報告されている。しかし、他の動物種において血中 OPG 濃度に関する報告はない。

4. 乳汁中に現れる骨代謝マーカーに関する研究の現状

Bouroutzoglou ら(13)は、ヒト母乳中において、骨吸収マーカーである NTX の濃度は骨吸収状態の低い帝王切開や甲状腺機能低下症の母親では低値であり、産乳により高い骨吸収状態にある母乳育児の母親では高値であることを明らかにした。このことにより、母体の骨吸収状態が母乳中骨吸収マーカー濃度に反映されることが示唆された。ヒトの母乳は血中と比較して数百～千倍の OPG 濃度を有する(127, 179)。Vidal ら(179)は培養破骨細胞を用いて、ヒト母乳や牛乳が破骨細胞の骨吸収活性を抑制することを報告した。また、この生理活性は RANKL の存在により抑制されたことから、乳汁中 OPG は牛乳がもつ骨吸収抑制作用に貢献する可能性を指摘した。近年、乳牛の診断治療において、乳汁中バイオマーカーの重要性が認識されつつある。乳汁中のバイオマーカーにより、妊娠や泌乳といった特異的な生理的状态の評価を低侵襲に行うことが可能となる。例えば、乳房炎における各種炎症性タンパク(1, 75)、潜在性ケトーシスにおける β ヒドロキシ酪酸(81)、早期妊娠診断における妊娠関連糖タンパク(25)など、有用な乳汁中バイオマーカーが続々と発見されている。しかし、乳牛の分娩時の Ca 代謝に対する乳中骨代謝マーカーは知られていない。

第Ⅱ章:ホルスタイン種乳牛における分娩前後の血中

OPG 濃度の推移

第一節:初産牛と経産牛における比較

1. はじめに

OPG は破骨細胞の分化を制御する律速因子である(158)。乳牛は泌乳開始時に血中の Ca を初乳中に大量に喪失するため低 Ca 血症に陥りやすい。Reinhardt ら(144)が約 1500 頭の乳牛を対象に行った調査によると、分娩後 48 時間以内に血中 Ca 濃度が 8.0 mg/dL を下回る乳牛は、初産牛で 25%に対し、経産牛では約 50%に上る。分娩時の血中 Ca 濃度低下に対する骨吸収反応は、加齢により低下する(48, 143)。周産期における初産牛の血中骨代謝マーカー濃度は、経産牛と比較して高値で推移し、より活発な骨代謝回転を示唆する(30, 97)。破骨細胞数との高い相関性を示す血中の TRAP5b 活性値は(2, 62)、分娩乳牛において分娩前に上昇することが報告され(89)、分娩時の Ca 喪失に先立って破骨細胞が増加することが示唆されたが、初産牛と経産牛における分娩期の破骨細胞分化の違いは明らかでない。OPG は破骨細胞前駆体の分化シグナルの伝達を阻害することで、破骨細胞分化を制御する(158)。そこで本実験では、初産牛と経産牛の分娩期の骨吸収状態の違いを明らかにする目的で、両者の分娩前後の血中 OPG 濃度推移の比較を行った。

2. 材料および方法

2-1 供試牛ならびに血液採材

2016 年 6 月から 11 月までに帯広畜産大学フィールド科学センターで分娩した初産牛 9 頭、経産牛 9 頭(平均産次 2.7 産)を供試した。期間中、供試牛には完全混合飼料(TMR)を 1 日 2 回給餌し、乾草を自由採食させた。TMR の試料組成は **Appendix A** に示した。いずれも単胎分娩であり、介助を要さない自然分娩または 1~2 人の介助により分娩した。また、全ての供試牛で、分娩後 5 日間の食欲や泌乳量に問題がなく、獣医師による診療を要しなかった。供試牛の期間中のボディ・コンディション・スコア(BCS)は 3.00~3.50 の範囲であった。また、各群の乾乳後期の体重、分娩時の年齢、

分娩後 5 日間の平均日乳量、乾乳後期および初乳期(分娩後 5 日間)の乾物摂取量(DMI)を **Table 2-1** に示した。DMI は 米国国立研究評議会(NRC:National Research Council)の計算式(128)を参考に算出した。

採血は、分娩前 3 週(-21 d)ならびに分娩直後 1 h 以内(0 d)、半日後(0.5 d)、2 日後(2 d)、5 日後(5 d)の計 5 回行い、尾静脈から 15 mL 採取した。採血後、速やかに遠心分離($1,680 \times g$, 15 min)し、分離した血漿ならびに血清を解析時まで冷凍保存(-80°C ならびに -60°C)した。本実験計画は帯広畜産大学実験動物委員会より承認された(#28-156)。

2-2 血液生化学解析

(1) 血清 Ca および無機リン(iP)濃度の測定

自動血液生化学分析装置(TBA 120-FR、東芝メディカルシステムズ)を用いて、Ca は orthocresolphthalein complexone による比色法(26)、iP は purine nucleoside phosphorylase・xanthine oxidase による酵素的測定法(112)により測定した。成牛における血中濃度の参照値は Ca で 8.5~10 mg/dL、iP で 4~8 mg/dL である(48)。

(2) 血清 OPG 濃度の測定

市販のキット(Bovine OPG Elisa kit, NeoScientific, USA)を用いて、競合酵素結合免疫吸着測定法(ELISA; Enzyme-linked immunosorbent assay)により測定した。本キットでは、あらかじめ固相化された OPG 抗体に対し、検体中の目的タンパクと西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP: Horseradish peroxidase)により標識された抗原を競合反応(37°C , 60 min)させた。発色基質(Tetramethylbenzidine)を添加し、室温で 15 分間反応後、450 nm の吸光度測定により HRP 酵素活性を検出し、検体中の OPG 濃度を算出した。測定内(intra-CV)および測定間変動誤差(inter-CV)は、それぞれ 11.3%およ

Table 2-1: 供試動物¹⁾

群	分娩前 BW (kg)	年齢	平均 日乳量 ²⁾ (kg/d)	DMI ³⁾ (kg/d)	
				乾乳後期	初乳期
初産牛 (n=9)	594 ± 17	2.95 ± 0.03	28 ± 1.1	10.2 ± 0.3	10.8 ± 0.3
経産牛 (n=9)	729 ± 29	3.82 ± 0.28	20 ± 1.2	14.2 ± 0.5	13.6 ± 0.4

¹⁾ 平均値 ± 標準誤差

²⁾ 分娩後5日間

³⁾ NRC の算出式(128) を用いて乾乳後期(分娩前3週)と初乳期(分娩後5日間)のDMIを算出した

び 9.7%であった。

(3) 血漿 TRAP5b 活性値の測定

ナフトール-ASBI-リン酸 (FUJIFILM Wako Chemical) を基質とした酵素反応による蛍光測定法 (80, 118, 186) により測定した。この測定法では、酢酸ナトリウム (100 mmol/L) と酒石酸ナトリウム (50 mmol/L) を含む反応液中で、検体 10 μ L を基質 (0.25 mmol/L) と反応 (37°C、30 min) させマルチラベルカウンター (ALVO MX/ Light 1429; PerkinElmer) により蛍光度を測定した (励起波長 405 nm、蛍光波長 535 nm)。Intra-CV は 5.6%、inter-CV は 7.8%であった。

(4) 血漿 BAP 活性値の測定

p-ニトロフェニルリン酸 (pNPP: p-Nitrophenylphosphate) を基質とした ALP の酵素活性を市販のキットを用いて測定した (LabAssay ALP、FUJIFILM Wako Chemical)。BAP アイソザイムは 56°C で 15 分間加熱することにより不活性化するため、総 ALP 活性値から熱不活化後の ALP 値を引き、BAP 活性値を算出した (126)。pNPP との反応 (37°C、15 min) 後に、検体の吸光度を分光光度法により 405 nm で測定した (NIVO 5S, PerkinElmer Japan Co., Ltd.)。

2-3 統計処理

統計処理には SAS enterprise guide (ver. 7.1, SAS institute Inc.) を使用した。血中の各測定値の推移を、固定効果 (群、時間、群 \times 時間)、供試牛を変量効果とした混合効果モデルを用いて反復測定分散分析を行った。有意差が出た場合は Tukey's post-hoc 法により、群内、群間の多重比較を行った。また、血清 Ca 濃度と OPG 濃度間の相関解析はスピアマンの順位相関解析により行った。全てのデータは平均 \pm 標準誤差により表記し、有意水準は 5%とした。

3. 結果

血清 Ca ならびに iP 濃度の推移を **Fig. 2-1** に示した。これらの推移には、初産、経産牛群間で差が見られなかった。経産牛の血清 Ca ならびに iP 濃度は -21 d (Ca: 9.9 ± 0.2 , iP: 5.8 ± 0.3 mg/dL) から 0 d (Ca: 8.4 ± 0.3 , iP: 4.2 ± 0.4 mg/dL) において有意な低下が見られ (それぞれ $P < 0.01$ および $P < 0.05$)、5 d (Ca: 9.6 ± 0.2 , iP: 6.1 ± 0.5 mg/dL) には分娩前の水準に回復した。

血清 OPG 濃度を **Fig. 2-2** に示した。血清 OPG 濃度は -21 d において、経産牛群で初産牛群より有意に高値 (7.5 ± 0.4 vs. 5.0 ± 0.6 ng/mL; $P < 0.01$) であった。また、経産牛群では -21 d (7.5 ± 0.4 ng/mL) から 0 d (3.9 ± 0.3 ng/mL) に有意な低下が見られ ($P < 0.01$)、そのまま 5 d まで維持された ($3.7 - 4.4$ ng/mL)。しかし、初産牛ではそのような変化なく、期間を通して一定に推移した ($5.0 - 5.6$ ng/mL)。

血漿 TRAP5b ならびに BAP 濃度の推移を **Fig. 2-3** に示した。血漿 TRAP5b 濃度は両群で 0 d にピークに達した (経産牛; 2.1 ± 0.2 U/L、初産牛; 3.1 ± 0.3 U/L)。さらに、期間を通して初産牛群は経産牛群よりも常に高値で推移した ($P < 0.01$)。初産牛の血漿 BAP 活性値は、-21 d (116.6 ± 23.0 U/L) と比較して、分娩当日 ($189.2 - 216.1$ U/L) に有意に増加した ($P < 0.01$) が、経産牛では一定に推移した ($66.4 - 112.7$ U/L)。そのため、分娩当日 (0 d および 0.5 d) において有意な群間差がみられた ($P < 0.01$)。

Table 2-2 に血清中の OPG と Ca 濃度の相関分析による相関係数ならびに P 値を示した。期間中、両者の間に有意な相関関係は見られなかった。

4. 考察

経産牛の分娩 3 週前の血清 OPG 濃度は、初産牛よりも高値を示し、分娩直後から低下した。一方、初産牛の血清 OPG 濃度は分娩前後で一定に推移した。OPG は骨

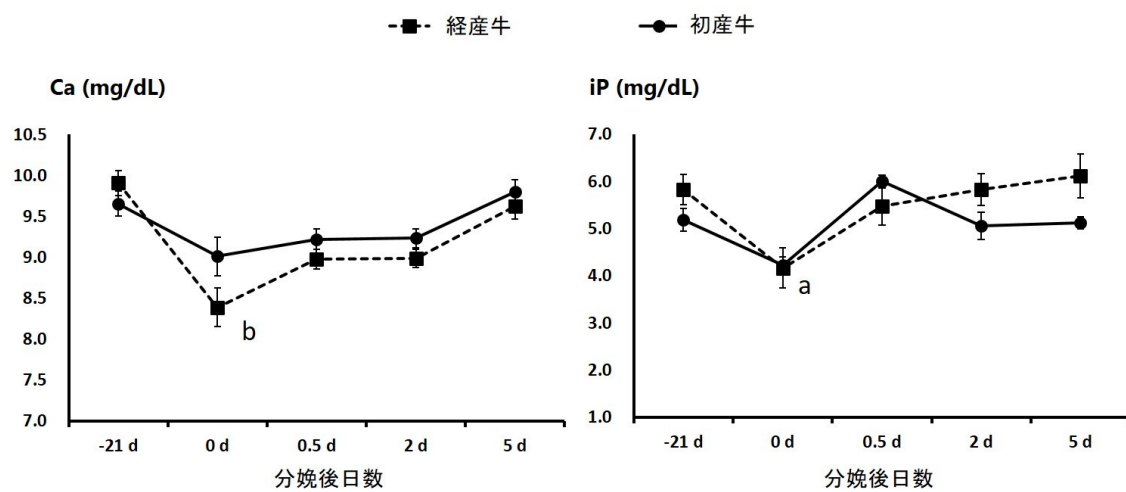


Fig. 2-1: 血清カルシウム(Ca)ならびに 無機リン(iP)濃度の推移

群内差 (-21 dとの比較) b: $P < 0.01$, a: $P < 0.05$

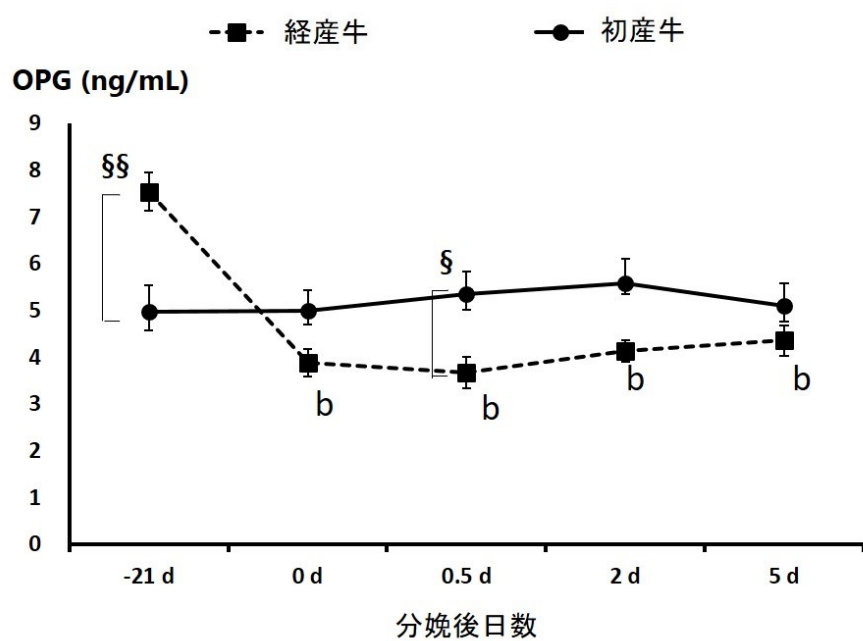


Fig. 2-2: 血清オステオプロテゲリン(OPG)濃度の推移

群内差 (-21 dとの比較) b: $P < 0.01$

群間差 §§: $P < 0.01$, §: $P < 0.05$

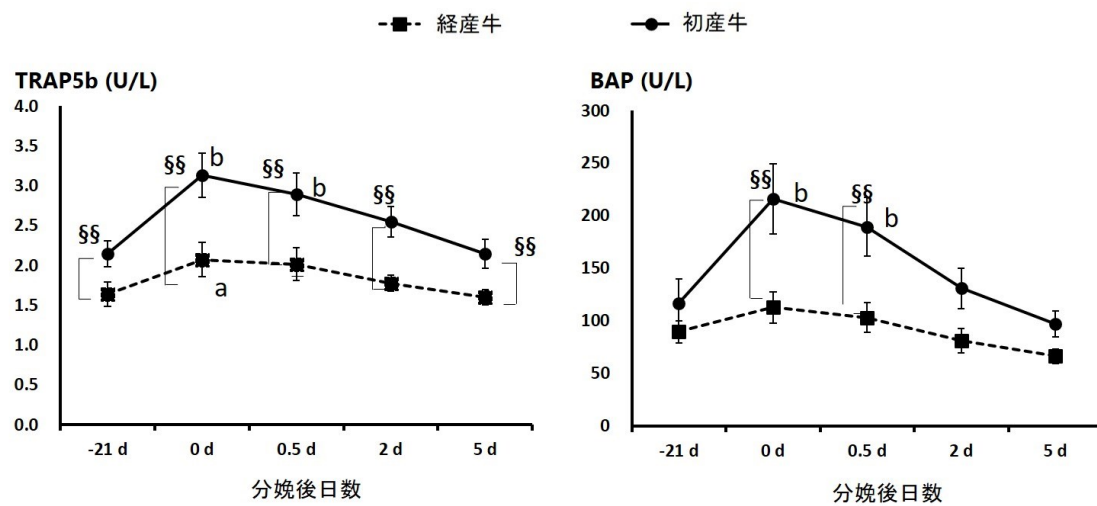


Fig. 2-3: 血漿酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b (TRAP5b) ならびに骨型アルカリホスファターゼ (BAP) 濃度の推移

群内差 (-21 dとの比較) b: $P < 0.01$, a: $P < 0.05$
 群間差 §§: $P < 0.01$, §: $P < 0.05$

Table 2-2: 供試牛18頭の血清中のオステオプロテゲリン(OPG)とカルシウム(Ca)濃度のスピアマンの相関係数(ρ) ならびに P 値

-21 d	0 d	0.5 d	2 d	5 d
$\rho = 0.06$	$\rho = 0.45$	$\rho = 0.04$	$\rho = 0.29$	$\rho = 0.14$
$P = 0.81$	$P = 0.06$	$P = 0.87$	$P = 0.25$	$P = 0.57$

吸収抑制作用を有し、卵巣摘出後のラットにおける骨ミネラル喪失を抑制する(158)。経産牛にとって、乾乳期は、泌乳期に失った骨ミネラルを蓄える時期である(143)。高い血中 TRAP5b 濃度からも分かるように、初産牛では妊娠期間中も骨成長し、骨代謝は経産牛よりも活発である(183, 186)。これに対し、経産牛では、乾乳期の OPG を高値に保つことにより、泌乳期に重度に喪失した骨量の回復を促すことが予想される。

分娩後の乳牛は、泌乳によるCa要求量の増大により、多くが低Ca血症に陥る(143)。本実験でも、経産牛では分娩時に急激な血中のCaおよびOPG濃度の低下を示したが、初産牛ではこのような分娩時の低下は見られなかった。また、血中 TRAP5b 濃度変動から、両群で分娩時に破骨細胞数の増加が示唆され、その濃度は初産牛で顕著に高かった。OPG は破骨細胞分化を抑制することで、TRAP5b 陽性の破骨細胞の形成を阻害する(43, 190)。以上のことから、経産牛では分娩時に破骨細胞の分化が亢進したと推察された。一方、初産牛では分娩時の OPG による分化制御の変化がないにもかかわらず、活発な骨代謝回転により破骨細胞数が高値で維持されたと考えられた。血清中の OPG 濃度とCa濃度間に相関関係が見られなかったことから、OPG による破骨細胞分化の調節は、Ca 欠乏に対する即時的な効果はないことが暗に示された。しかし、本実験からは分娩に際した血中 OPG 濃度の詳細な経時的变化は明らかでないため、分娩に伴う血中Ca低下に対するOPGの作用は不明であった。

経産牛では分娩当日に血中の TRAP5b 濃度の上昇による破骨細胞の増加が見られたにもかかわらず、Ca 濃度低下が見られた。TRAP5b は様々な成熟段階の破骨細胞でも産生され(61)、骨吸収能をもたない多核破骨細胞からも分泌される(3)ことから、分娩時の TRAP5bの増加は骨吸収活性を持たない未熟な破骨細胞の増加も反映すると予測される。実験的に作出した骨粗鬆症のラットの骨細胞や骨芽細胞中に TRAP5b が発現し、RANKL や OPG と協調して破骨細胞分化に作用する可能性が示唆されている(160)。また、泌乳期のマウスでは骨細胞性の骨代謝が活性化しており、TRAP5b 遺伝子の発現量が上昇することが報告されている(140)。このことから血中 TRAP5b 活性は骨芽細胞、破骨細胞ならびに骨細胞による複雑で相互的な骨吸収作

用を反映する可能性が考えられる。骨吸収における血中 TRAP5b 活性の重要性を明らかにするためには、骨細胞による骨吸収作用のメカニズムの解明が求められる。

5. 小括

分娩乳牛の血中 OPG 濃度は、経産牛では分娩 3 週前から分娩時にかけて低下し、初産牛では分娩前後を通して低値で推移することから、経産牛と初産牛では分娩前後の破骨細胞の分化制御が異なることが示唆された。経産牛では分娩前後で血中 OPG 濃度の低下が起こり、破骨細胞の分化が亢進する可能性が示された。一方、初産牛では血中 OPG 濃度に変化はないが、活発な骨代謝回転により破骨細胞の数が高く維持され、分娩時の血中 Ca 濃度の低下が抑えられると考えられた。

第Ⅱ章:ホルスタイン種乳牛における分娩前後の血中

OPG 濃度の推移

第二節:産歴の影響

1. はじめに

前節において、経産牛の分娩前後の血中 OPG 濃度は、分娩 3 週前から分娩時にかけて減少したことから、分娩前の 3 週間で OPG による破骨細胞分化の制御に変化が生じ、破骨細胞の分化が亢進することが示唆された(66)。乳牛は分娩時期には血中 TRAP5b 濃度が上昇することから、分娩に伴い、破骨細胞数が増加することが示唆されている(29, 89)。一方、産次の増加に従い分娩時の血中 Ca 濃度は減少し(95, 122, 144)、乳熱の発症リスクは上昇する(22, 28)。ラットを用いた実験により、加齢に伴い活性化ビタミン D(73)や PTH(64)の受容体は減少するとされている。また、ウシの骨代謝マーカー活性は年齢と負の相関を有する(186)。分娩後の血中骨吸収マーカー濃度の変動から、乳熱牛と健常牛では分娩後の骨からの Ca 動員に差がないことが示唆されているが(106, 161)、産次の増加が分娩期の骨吸収状態の変化および分娩時の血中 Ca 濃度に及ぼす影響は明らかでない。本実験では経産分娩牛の分娩前の血中 OPG 濃度の経時的変動に関して、産次による違いを明らかにすることで、分娩前の破骨細胞分化と分娩時の血中 Ca 濃度との関係を推察することを目的とした。

2. 材料および方法

2-1 供試牛ならびに血液採材

2016 年から 2018 年までに帯広畜産大学フィールド科学センターで分娩した経産牛 27 頭を供試した。分娩時の産次は 2 産(Parity 2)が 14 頭、3 産(Parity 3)が 6 頭、4 産以上(Parity 4+)が 7 頭(平均 4.9 産)であった。いずれも単胎分娩であり、産子の平均体重は 48.4 kg、性別はオスが 11 頭、メスが 16 頭であった。分娩後 2 日までに分娩に起因する低 Ca 血症で獣医師の治療を要した個体は各群でそれぞれ 0 頭、1 頭、5 頭であった。期間中、TMR(Appendix A～C)を 1 日 2 回給与し、乾草は自由採食であった。供試牛の乾乳後期の体重、分娩時の年齢、分娩後 5 日間の平均日乳量、

乾乳期と分娩後 5 日間の DMI ならびに分娩後 2 日間の Ca 治療の有無を **Table 2-3** に示した。DMI は NRC の計算式(128)より算出した。

採血は、分娩 3 週前(-21 d)、2 週前(-14 d)、1 週前(-7 d)、分娩後 12 h 以内(0 d)ならびに 2 日後(2 d)の計 5 回行い、尾静脈から 15 mL 採取した。採血後、速やかに遠心分離(1,680 ×g、15 min)し、分離した血漿ならびに血清を解析時まで冷凍保存(−80°Cならびに−60°C)した。実験計画は帯広畜産大学実験動物委員会より承認された(#28-156、29-187、18-137)。

2-2 血液生化学解析

(1) 血清 Ca, 無機リン(iP)およびマグネシウム(Mg)濃度の測定

第 II 章・第一節と同様に自動血液生化学分析装置(TBA 120-FR、東芝メディカルシステムズ)を用いて測定した。Mg 濃度は glucokinase による酵素的測定法(157)により測定した。成牛における血中 Mg 濃度の参照値は 1.8~2.4 mg/dL である(49)。

(2) 血中 OPG, TRAP5b および BAP 濃度の測定

第 II 章・第一節の方法を用いて測定を行った。TRAP5b ならびに BAP の測定に関して、2018 年に分娩した 7 頭は血清を用いたが、他の 21 頭は血漿を用いた。

2-3 統計解析

統計処理ソフトは SAS enterprise guide (ver. 7.1, SAS institute Inc.)ならびに GraphPad Prism (ver. 6, GraphPad software)を使用した。血中の各測定値について、固定効果として群と時間を(群、時間、群×時間)、変量効果として個体ならびに分娩年度の違いを反復測定混合効果モデルに投入し、各群の推移を解析した。群内ならび

Table 2-3: 供試動物¹⁾

群	分娩前BW (kg)	年齢	平均日乳 量 ²⁾ (kg/d)	DMI ³⁾ (kg/d)		低Ca血症によるCa治 療の有無 ⁴⁾	
				乾乳後期	初乳期	無	有
Parity 2	732 ± 13	3.1 ± 0.1	29 ± 1.5	14.2 ± 0.2	13.7 ± 0.3	14	0
Parity 3	800 ± 37	4.3 ± 0.2	26 ± 0.6	13.7 ± 0.6	13.6 ± 0.2	5	1
Parity 4+ ⁵⁾	861 ± 30	6.0 ± 0.6	25 ± 2.2	14.7 ± 0.5	14.0 ± 0.5	2	5

1) 平均値 ± 標準誤差

2) 分娩後5日間

3) NRC の算出式(128) を用いて乾乳後期(分娩前3週)と初乳期(分娩後5日間)のDMIを算出した

4) 分娩後2日以内にボログルコン酸カルシウムの投与を実施

5) 平均産次 4.9 ± 0.5.

に群間の多重比較は、Tukey's post-hoc 法を用いて行った。さらに、分娩前の血中 OPG/TRAP5b 濃度比-時間曲線下面積(AUC)を台形法により算出した(175)。採材日や AUC についての 3 群間の比較は Kruskal-Wallis 検定を用いて行った。血中 OPG/TRAP5b 濃度比ならびに AUC について、産次、年齢ならびに分娩直後の血中 Ca 濃度とのスピアマンの順位相関解析を行った。さらに、Mann-Whitney U 検定により血中 OPG/TRAP5b 濃度比ならびに AUC の、分娩後の Ca 治療の有無による違いを解析した。全てのデータは平均 \pm 標準誤差または中央値(四分位範囲)により表記し、有意水準は 5%とした。

3. 結果

それぞれの群の分娩前のサンプリングにおける実際の分娩前日数を **Table 2-4** に示した。全ての供試牛で実際の分娩日からのずれは 2 日以内であり、それぞれの採材日において、群間に差はなかった。

血清ミネラル(Ca, iP, Mg)濃度の推移を **Fig. 2-4** に示した。血清 Ca 濃度は全ての群で-21 dと比較して 0 d で有意に低下した($P < 0.01$)。0 d における血中 Ca 濃度は 8.4 ± 0.2 (Parity 2)、 6.3 ± 0.6 (Parity 3)ならびに 6.8 ± 0.7 (Parity 4+) mg/dL であり、Parity 2 は Parity 4+よりも有意に高かった($P < 0.01$)。血清 iP 濃度は全群で分娩当日に有意な低下が見られ($P < 0.01$)、血清 Mg 濃度は期間中一定に推移した。

血中骨代謝マーカー濃度推移を **Fig. 2-5** および **2-6** に示した。血清 OPG 濃度(**Fig. 2-5**)は Parity 2 で、-21 d(8.9 ± 0.7 ng/mL)と比較すると-7 d から 2 d まで($4.8 - 5.9$ ng/mL)有意に減少した($P < 0.01$)。一方 Parity 3 および 4+では有意な変動なく推移した。また、-21 d において Parity 2 は Parity 4+ (5.7 ± 0.9 ng/mL)より有意に高値で($P < 0.05$)であった。血中 TRAP5b 濃度(**Fig. 2-6**)は全群で-21 dと比較して、分娩当日に上昇が見られた($P < 0.01$)が、期間を通して群間で差は見られなかった。血中 BAP 活性値(**Fig. 2-6**)は Parity 2 で-21 d (85.7 ± 12.6 U/L)から分娩当日 (115.9 ± 9.8 U/L)

に有意な上昇が見られたが($P < 0.05$)、他の 2 群では一定に推移した。

Table 2-4: 分娩前のサンプリングにおける実際の分娩前日数¹⁾

群	-21 d	-14 d	-7 d
Parity 2	21.6 ± 0.3	14.8 ± 0.3	7.6 ± 0.3
Parity 3	21.3 ± 0.7	14.2 ± 0.7	7.3 ± 0.6
Parity 4+	22.1 ± 0.2	14.1 ± 0.6	7.6 ± 0.3

¹⁾ 平均値 ± 標準誤差

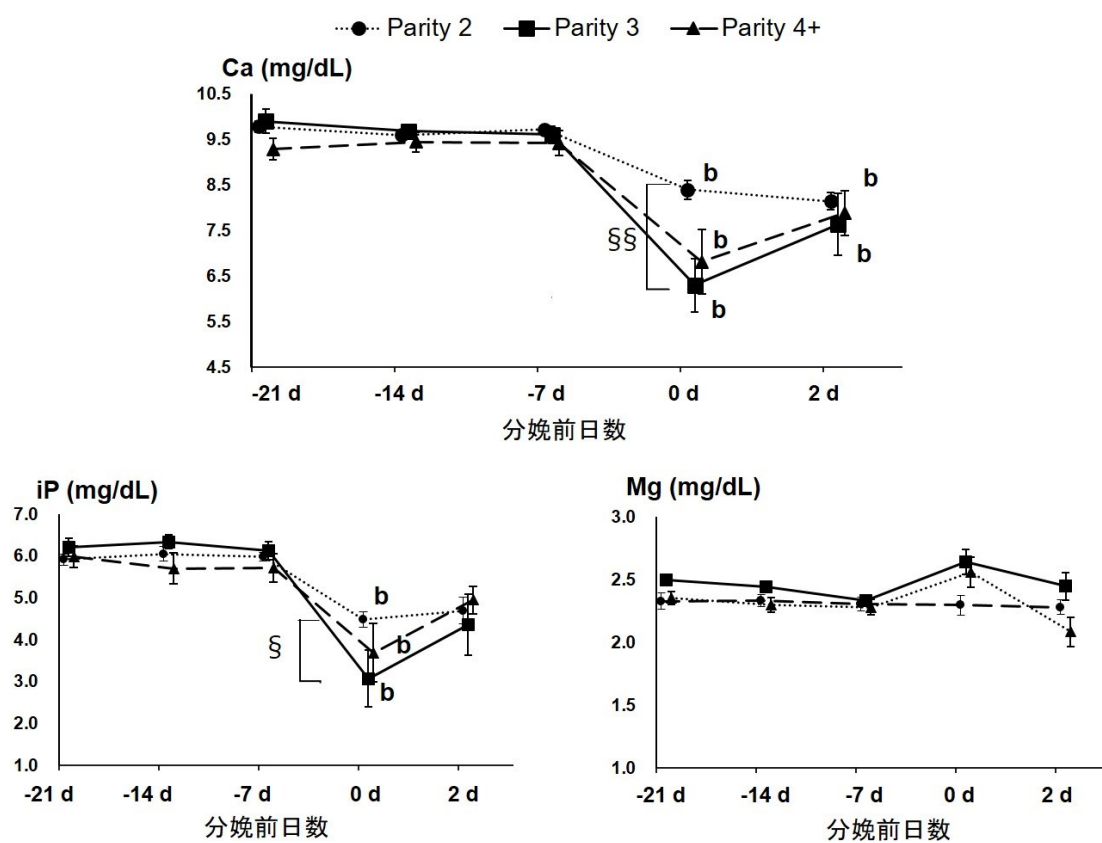


Fig. 2-4: 血清カルシウム (Ca), 無機リン (iP), マグネシウム (Mg) 濃度の推移
 群内差 (-21 dとの比較) b: $P < 0.01$
 群間差 §§: $P < 0.01$, §: $P < 0.05$

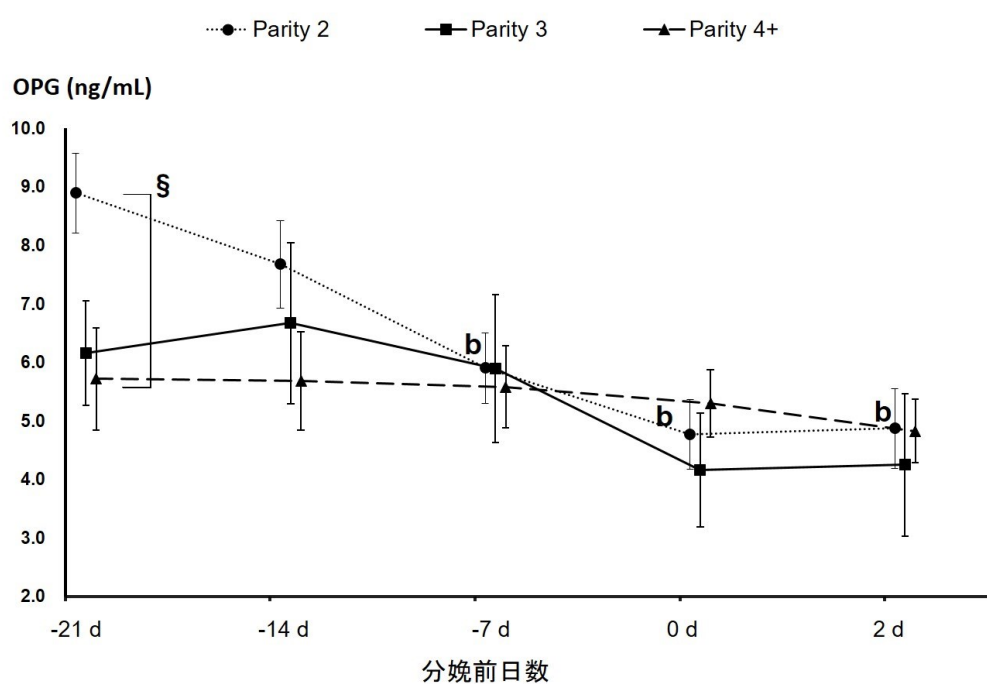


Fig. 2-5: 血清オステオプロテゲリン(OPG)濃度の推移

群内差 (-21 dとの比較) b: $P < 0.01$

群間差 §§: $P < 0.01$, §: $P < 0.05$

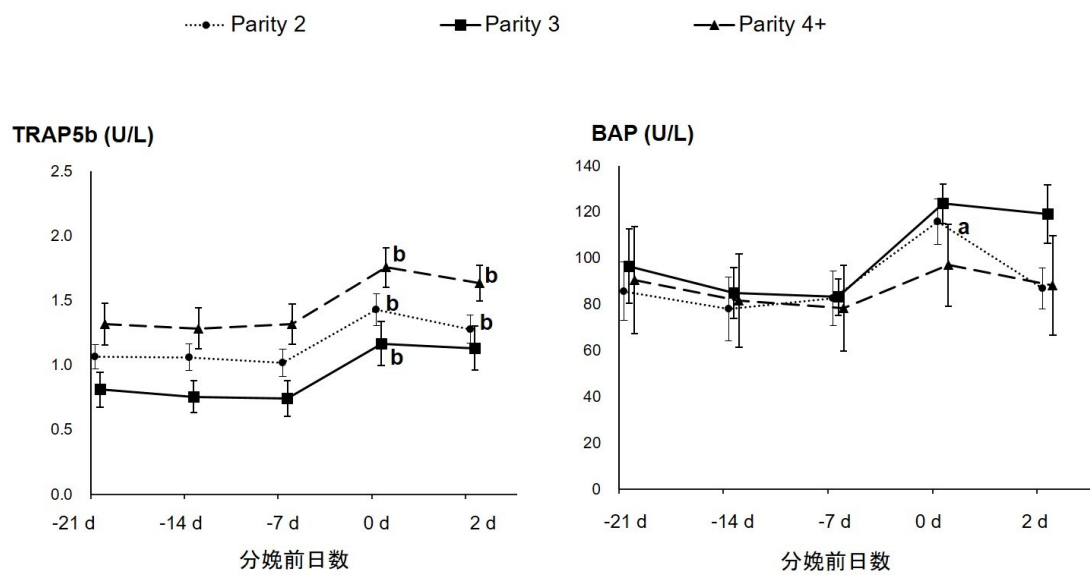


Fig. 2-6: 血中酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b (TRAP5b) ならびに骨型アルカリホスファターゼ (BAP) 濃度の推移

群内差 (-21 dとの比較) b: $P < 0.01$, a: $P < 0.05$

血中 OPG/TRAP5b 濃度比の推移を **Fig. 2-7** に示した。-21 d (Parity 2: 9.2 ± 1.1 $\mu\text{g}/\text{U}$, Parity 3: 8.0 ± 1.2 $\mu\text{g}/\text{U}$) と比較し、Parity 2 で -7 d 以降 ($3.5 - 6.0$ $\mu\text{g}/\text{U}$)、Parity 3 で 0 d 以降 ($3.5 - 4.6$ $\mu\text{g}/\text{U}$) に有意な低下 ($P < 0.05$) が見られた。しかし、Parity 4+ では期間中低値で推移し ($3.1 - 4.6$ $\mu\text{g}/\text{U}$)、-21 d では Parity 2 よりも ($P < 0.01$)、-14 d では Parity 2 および 3 よりも ($P < 0.05$)、有意に低値であった。次に、分娩前 (-21 から -7 d) の血中 OPG/TRAP5b 濃度比曲線下面積 (AUC $_{-21 \text{ d to } -7 \text{ d}}$) を算出したところ、3 群間に有意差は見られなかった [Parity 2: 91.7 ($72.8 - 134.2$), Parity 3: 97.7 ($70.7 - 177.5$), Parity 4+ : 63.5 ($55.6 - 76.4$) $\mu\text{g}/\text{U} \times \text{d}$; $P = 0.075$]。

分娩前各時間の血中 OPG/TRAP5b 濃度比および AUC $_{-21 \text{ d to } -7 \text{ d}}$ と、産次、年齢ならびに 0 d の血清 Ca 濃度との相関解析の結果を **Table 2-5** に示した。血中 OPG/TRAP5b 濃度比は、産次と -21 d で負の相関を有し ($P < 0.01$)、年齢とは分娩前の全ての時間で負の相関を有した ($P < 0.05$) が、分娩時の血中 Ca 濃度とは相関が見られなかった。一方、AUC $_{-21 \text{ d to } -7 \text{ d}}$ は年齢と負の相関を有した ($P < 0.05$)。

今回供試した 27 頭のうち、分娩後 2 日以内に低 Ca 血症の臨床症状を示し、獣医師による治療を有した 6 頭を Ca 治療群 (Treated) とし、その他の 21 頭を無治療群 (Untreated) とした。分娩前各時間の血中 OPG/TRAP5b 濃度比および AUC $_{-21 \text{ d to } -7 \text{ d}}$ に関して 2 群間の比較を行った結果を **Table 2-6** に示した。分娩前の血中 OPG/TRAP5b 濃度比ならびに AUC $_{-21 \text{ d to } -7 \text{ d}}$ は Ca 治療群で有意に低値であった ($P < 0.01$)。

4. 考察

本実験では、経産乳牛 27 頭の分娩 3 週前から分娩時にかけての血中の OPG ならびに他の骨代謝マーカーの濃度の推移について産次に分けて解析した。分娩 3 週間における血中 OPG 濃度の平均値は産次の増加に伴い低下し、Parity 4+ では Parity 2

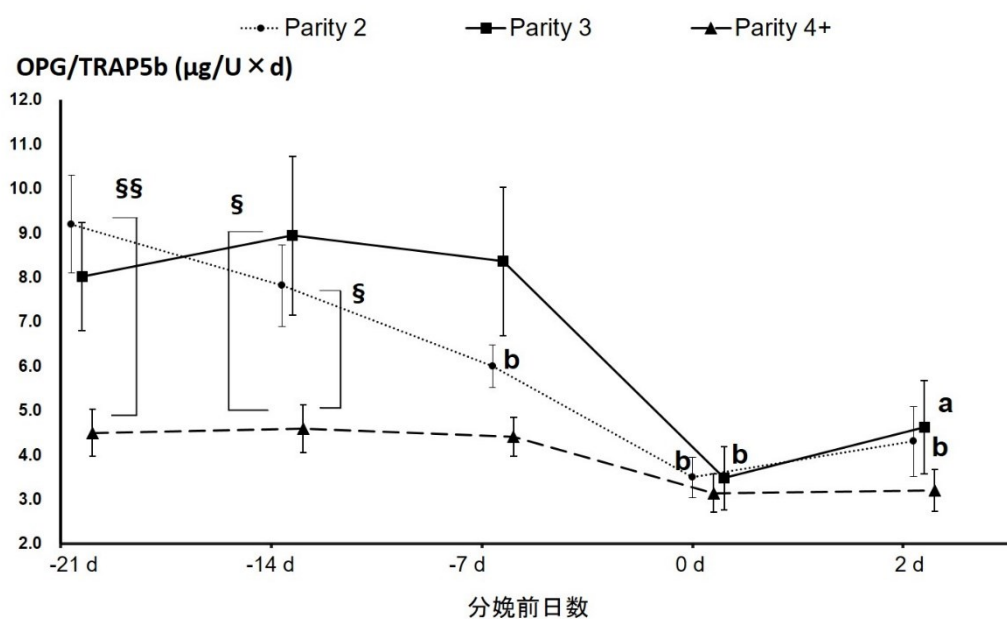


Fig. 2-7: 血中オステオプロテゲリン (OPG) /酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b (TRAP5b) 濃度比の推移

群内差 (-21 dとの比較) b: $P < 0.01$, a: $P < 0.05$
 群間差 §§: $P < 0.01$, §: $P < 0.05$

Table 2-5: 血中オステオプロテゲリン(OPG)/酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b (TRAP5b)濃度比およびその曲線化面積(AUC)と産次, 年齢, 分娩時の血清Ca濃度とのスピアマンの相関係数(ρ) ならびに P 値

項目	産次		年齢		分娩時の血清Ca濃度	
	ρ	P -value	ρ	P -value	ρ	P -value
OPG/TRAP5b						
-21 d	-0.56	<0.01	-0.67	<0.01	0.17	0.39
-14 d	-0.35	0.07	-0.45	0.02	0.21	0.29
-7 d	-0.28	0.15	-0.40	<0.05	0.17	0.40
AUC-21d to -7d	-0.35	0.07	-0.48	<0.05	0.25	0.20

Table 2-6: 分娩前の血中オステオプロテゲリン (OPG)/酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b (TRAP5b) 濃度とその曲線下面積の比較¹⁾

項目	Untreated	Treated	P値
OPG/TRAP5b			
-21 d	7.0 (5.1 – 9.6)	4.3 (4.3 – 6.3)	0.01
-14 d	6.9 (4.6 – 9.1)	4.7 (3.8 – 5.2)	0.005
-7 d	6.0 (4.2 – 7.2)	4.8 (4.2 – 5.2)	0.03
AUC-21d to -7d	101.7 (71.1 – 138.0)	60.7 (54.3 – 64.8)	0.0025

¹⁾ 分娩後2日以内に低Ca血症の治療を有したCa治療群 (Treated, n=6) と無治療群 (Untreated, n=21) のMann-Whitney U 検定による群間比較

よりも有意に低値を示した。ウシは4～5歳で骨成長が落ち着き、成熟を迎える(186)。マウス(16)やヒト(113)の骨髄間質細胞における OPG 遺伝子発現量は加齢により低下する。加齢マウスでは破骨細胞の分化形成の誘因因子である RANKL の発現量が多く(17, 137)、加齢に伴う破骨細胞分化の亢進(91)は、骨強度の低下による骨折や骨粗鬆症リスクの一因とされる(12)。生涯泌乳と分娩を繰り返す乳牛において、4産以上では分娩3週前の破骨細胞分化の制御が低下していることが示唆された。

Kumeらの報告(95)で示された通り、血中 Ca 濃度は全ての経産牛で分娩時に低下し、Parity 4+で最も低値を示した。分娩前3週間の血中 OPG 濃度の推移は Parity 2では分娩1週前から低下が見られたが、Parity 3および4+では分娩前後で差はなく低値で推移し、産次による違いが見られた。過去の報告(29, 30, 89)と同様に、血中 TRAP5b 濃度は分娩時に全群で上昇し群間による差は見られなかった。乳牛は初乳産生により、少なくとも分娩9時間前から血中 Ca 濃度の低下が開始する(122)。血中 Ca 濃度が 10 mg/dL を下回ると PTH の分泌が促進され、骨吸収が亢進する(74)。PTH は骨における OPG 遺伝子の発現を抑制し(43, 111)、PTH を投与したラットの血中 OPG 濃度は、上皮小体を除去したコントロールよりも 32%減少する(111)。血中 OPG 濃度の変動から、2産の乳牛では少なくとも分娩1週前に OPG 産生が低下し、破骨細胞分化の制御が緩和されたと考えられたが、3産以上ではこの変化は見られなかった。一方、TRAP5bは破骨細胞から分泌され、その数と相関する(2)ことから、全ての経産牛で分娩時に破骨細胞数が増加したと推察された。

3産以上の乳牛の血中 OPG 濃度推移は、前節で示された初産牛と同様に分娩前後で変化せず低値で推移した。加齢により骨吸収が骨形成を上回り、骨代謝回転はアンバランスになる(16)が、骨成長中の動物では両者とも活発である(4,186)。前節で示された通り、初産牛の分娩前後の血中 TRAP5b 濃度は経産牛群よりも常に高値を維持し、分娩時の血中 Ca 濃度の低下も見られなかった。これらのことから、分娩時の破骨細胞分化の制御は骨代謝回転の状態に影響を受けるために、破骨細胞数の増加と協調して変化すると仮定し、血中の OPG と TRAP5b 濃度の比を分析した。分娩前

の血中 OPG/TRAP5b 濃度比は、4 産以上の乳牛では 2 および 3 産の乳牛よりも顕著に低く、分娩前の各時点で産次や年齢と負の相関を示した。以上より、血中 OPG/TRAP5b 濃度比は、分娩前の破骨細胞分化の制御に関して、産次や年齢による違いをより鋭敏に反映するマーカーとなる可能性が示された。

一方、血中 OPG/TRAP5b 濃度比やその AUC は分娩時の血中 Ca 濃度との相関が見られなかったことから、分娩前の破骨細胞分化の制御と分娩時の血中 Ca 濃度には直接的な因果関係がないと推察された。Ca 恒常性は複数のホルモンにより調整されており、分娩乳牛の骨からの Ca 動員は腸管での Ca 吸収が満たされない場合に起こると想定される(117)。また、分娩性低 Ca 血症により治療を要した個体では分娩前の血中 OPG/TRAP5b 濃度比やその AUC が低値であったことから、分娩時に低 Ca 血症に陥る経産乳牛では分娩前の破骨細胞分化の制御が低下している可能性が示された。これは重篤な乳熱を発症した乳牛では分娩前から骨吸収が活性化しているとした、Ramberg(141)の報告とも矛盾しない。しかし、6 頭の Ca 治療群のうち 5 頭は、4 産以上の高産次牛であったことから、今後症例頭数を増やし産次の影響を取り除いて検討する必要がある。

5. 小括

経産乳牛の血中 OPG 濃度は、分娩前 3 週の時点で産次が増加するほど低値を示した。また分娩までの濃度推移は産次による違いが見られ、2 産の若い乳牛では分娩当日にかけて減少したが、3 産以降の乳牛では一定に推移した。分娩前 3 週間の血中 OPG/TRAP5b 濃度比は、低産次(2 および 3 産)と高産次(4 産以上)牛の間では顕著な違いが見られ、年齢や産次とも有意な相関が見られた。このことから、産次を重ねた乳牛では OPG による破骨細胞分化の制御が低下しており、分娩時の破骨細胞分化の制御の変化を欠くことが示唆された。さらに分娩前 3 週間の OPG/TRAP5b 濃度比は破骨細胞分化の制御に関して産次による違いを鋭敏に示す指標となる可能性

が示された。しかし、分娩時の血中 Ca 濃度は、血中 OPG/TRAP5b 濃度比やその AUC と相関せず、分娩前の破骨細胞分化との関連は見られなかった。

第 III 章:ホルスタイン種乳牛における初乳中 OPG と母体の 骨代謝との関係

1. はじめに

ヒトの母乳には血中濃度と比較して数百から数千倍の OPG が含まれる(127, 179)。ヒト母乳中の NTX 濃度は、甲状腺機能低下症患者や帝王切開による出産をした母親で有意に低く、母体の骨代謝状態を反映する可能性が示唆されている(13)。一方、ウシの乳中における OPG 濃度や骨代謝マーカーに関する報告はない。前章より、乳牛における分娩 3 週前の OPG による破骨細胞分化の制御は産次により異なり、分娩時の低 Ca 血症の発症との関連が示唆されている。初乳の産生は分娩前 5 週間頃から始まり(18)、その性状はこの時期の母体の生理状態に大きく左右される(121)。そこで本章では、乳牛の分娩後 5 日間の初乳に着目し、OPG ならびに骨代謝マーカー濃度の変動(実験 1)と分娩直後の血中 Ca 濃度との関連(実験 2)を明らかにすることで、初乳中 OPG 濃度と母体の骨代謝マーカー濃度との関係性を明らかにした。

2. 材料および方法

2-1 供試牛ならびに採材

実験 1: 2016 年に帯広畜産大学フィールド科学センターで分娩した初産牛 9 頭と経産牛 10 頭を供試した。経産牛の 1 頭を除き、供試牛は第 II 章・第一節と同じであった。分娩は全て単胎分娩であり、産子の平均体重は 43.9 kg、性別はオスが 8 頭、メスが 11 頭であった。いずれの分娩も自然分娩または 1~4 人の介助を有する分娩であり、分娩後 5 日間に臨床症状を呈さず、獣医師による治療を要さなかった。実験期間中の飼養管理は第 I 章・第一節と同様であった(**Appendix A**)。供試牛の分娩時の産次および年齢、乾乳後期の体重、分娩日と 5 日目の平均日乳量を **Table 3-1** に示した。初乳ならびに血液サンプルは、分娩 2 h 以内(0 d)と 5 日目(5 d)に採取した。採材後、速やかに遠心分離(初乳:1,500×g、20 min、血液:1,680 ×g、15 min)し、分

Table 3-1: 供試牛¹⁾

項目	初産牛 (n=9)	経産牛 (n=10)
産次	1 ± 0	2.6 ± 0.25
年齢	2.95 ± 0.03	3.75 ± 0.25
分娩前BW	594 ± 16	736 ± 25
平均日乳量 (kg/d)		
0 d	12.7 (9.2 – 13.6)	11.9 (7.0 – 16.6)
5 d	22.6 (22.0 – 30.9)	37.6 (32.0 – 39.2)

¹⁾ 平均値 ± 標準誤差あるいは中央値 (四分位範囲)

離した乳清ならびに血清・血漿を解析時まで冷凍保存(−20°Cならびに−60°C)した。実験計画は帯広畜産大学実験動物委員会より承認された(#28-156)。

実験 2: 2016~2017 年に帯広畜産大学フィールド科学センターで分娩した初産牛 13 頭と経産牛 20 頭を供試した。供試牛の平均産次は 2.4 産、産子の性別はオスが 16 頭、メスが 17 頭、平均出生体重は 44.4 kg あった。自然分娩および軽度から重度の牽引を有する難・死産を含み、母牛の分娩後の臨床症状も様々であった。分娩時の血中 Ca 濃度が 8.5 mg/dL を下回り、低 Ca 血症が認められた(146) 19 頭を低 Ca 群とし、血中 Ca 濃度が 8.5 mg/dL 以上であった 14 頭を正常群とした。実験期間中の飼養管理は **Appendix A, B** に示した。各群の分娩時の産次および年齢、乾乳後期の体重、分娩後 5 日間の平均日乳量を **Table 3-2** に示した。初乳ならびに血液サンプルを分娩 2 時間以内(0 d)に採取し、実験 1 と同様の条件で遠心処理後、測定まで凍結保存した。実験計画は帯広畜産大学実験動物委員会より承認された(#28-156 および 29-187)。

2-2 血液生化学解析

(1) 血清 Ca 濃度の測定

第 II 章・第一節と同様に、自動血液生化学分析装置(TBA 120-FR、東芝メディカルシステムズ)を用いて測定した。

(2) 血中ならびに乳中 OPG, TRAP5b および BAP 濃度の測定

第 II 章・第一節の方法を用いて測定を行った。

Table 3-2: 供試牛¹⁾

項目	単位	血中Ca濃度	
		正常群	低Ca群 ²⁾
頭数		14	19
産次		1.8 ± 0.3	2.8 ± 0.4
年齢		3.3 ± 0.3	4.3 ± 0.4
分娩前BW	kg	682.7 ± 23.9	734.7 ± 27.0
平均日乳量 (分娩後5日間)	kg/d	19.6 ± 1.8	21.7 ± 1.6

¹⁾ 平均値 ± 標準誤差

²⁾ 分娩時の血中Ca濃度が8.5 mg/dL (146)を下回り、低Ca血症が認められた

2-3 統計解析

いずれの実験においても統計処理は GraphPad Prism (ver. 6, GraphPad software) を使用した。実験 1 では初乳および血中各骨代謝マーカー濃度の分娩後 5 日間の推移について、D'Agostino-Pearson 検定による正規性の確認後、経産群および初産群の変動を 2 元配置分散分析法 (Two-way factorial ANOVA) を用いて解析した (時間, 群, 時間×群)。群内ならびに群間の比較を、Sidak's 多重検定を用いて行った。さらに初乳中と血中の OPG について、血中ならびに乳中の各骨代謝マーカー濃度とのスピアマンの順位相関解析を行った。

実験 2 では初乳中と血中骨代謝マーカーについて低 Ca 群と正常群の差を Mann-Whitney U 検定を用いて解析し、分娩直後の血中 Ca 濃度とのスピアマンの順位相関解析を行った。全てのデータは平均 ± 標準誤差または中央値 (四分位範囲) により表記し、有意水準は 5% とした。

3. 結果

3-1 実験 1

分娩後 5 日間の初乳中ならびに血中骨代謝マーカー濃度の推移を **Fig. 3-1** と **Table 3-3** に示した。初乳中の各骨代謝マーカー濃度は 0 d から 5 d にかけて有意に減少し ($P < 0.01$)、0 d の初乳中 OPG 濃度は初産牛では経産牛よりも有意に高値であった ($P < 0.01$)。血中の骨代謝マーカー濃度は、分娩後 5 日間で変化は見られなかった。分娩直後 (0 d) における初乳中と血中の骨代謝マーカー濃度の比較 (**Table 3-4**) では、経産牛の初乳中の OPG 濃度は血中よりも低値で ($P < 0.05$)、TRAP5b と BAP 活性値は血中よりも高値 ($P < 0.05$ および $P < 0.01$) であった。初産牛の初乳中 NTX 濃度は血中濃度よりも高値 ($P < 0.05$) であった。

分娩直後 (0 d) の初乳ならびに血中の OPG 濃度と、各骨代謝マーカー濃度との相関を **Table 3-5** に示した。初乳中の OPG と NTX 濃度には強い正の相関がみられ (P

<0.01)、血中 OPG 濃度は血液と初乳中の BAP と相関がみられた ($P < 0.05$)。

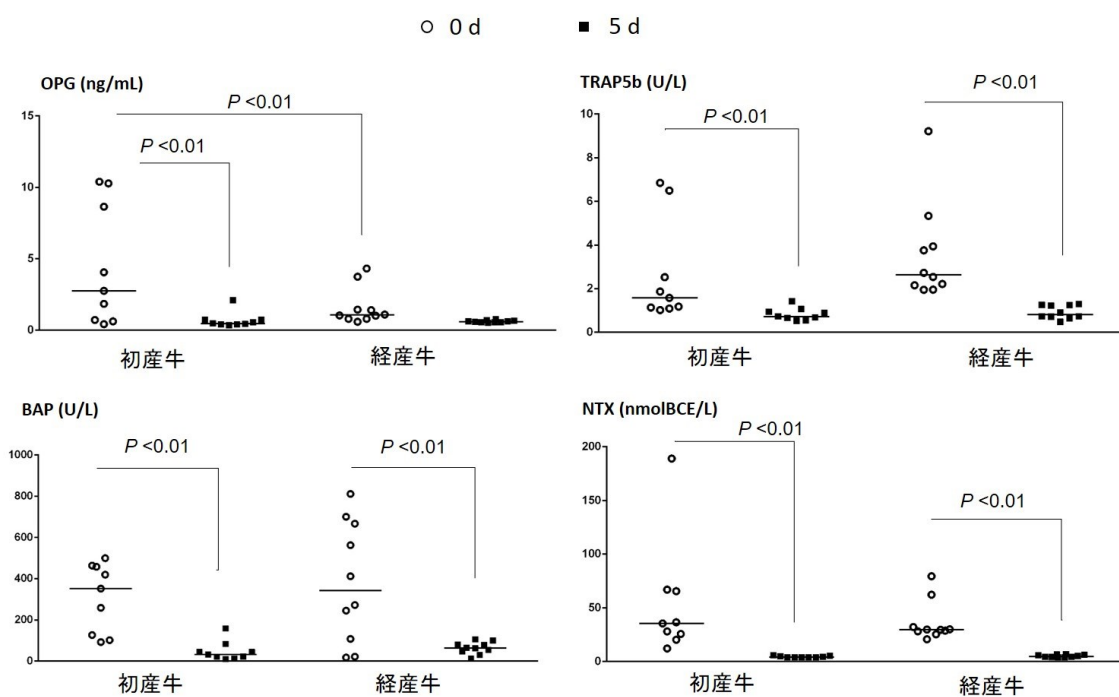


Fig. 3-1: 分娩後5日間の初乳中オステオプロテグリン(OPG), 酒石酸耐性酸ホスファターゼ 5b(TRAP5b), 骨型アルカリホスファターゼ(BAP), I型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTX)濃度の推移

Table 3-3: 分娩後5日間の血中の各骨代謝マーカー濃度の推移¹⁾

項目	単位	初産牛 (n=9)		経産牛 (n=10)	
		0 d	5 d	0 d	5 d
OPG	ng/mL	4.6 (3.7 – 6.2)	5.0 (4.0 – 5.8)	3.8 (3.2 – 4.4)	4.0 (3.9 – 4.9)
TRAP5b	U/L	3.3 (1.8 – 3.6)	2.1 (1.8 – 2.5)	1.9 (1.8 – 2.1)	1.5 (1.3 – 1.8)
BAP	U/L	218.2 (156.4 – 271.7)	94.6 (67.4 – 116.5)	120.3 (71.8 – 153.5)	58.8 (51.3 – 75.0)
NTX	nmolBCE/L	20.5 (18.9 – 28.5)	23.6 (21.2 – 35.6)	20.9 (17.8 – 24.5)	20.8 (18.0 – 25.6)

¹⁾中央値 (四分位範囲)

オステオプロテゲリン (OPG), 酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b (TRAP5b), 骨型アルカリホスファターゼ (BAP), I型コラーゲン架橋N-テロペプチド (NTX)

Table 3-4: 分娩直後(0 d)における初乳中と血中の骨代謝マーカー濃度の比較¹⁾

項目	単位	初産牛 (n=9)		経産牛 (n=10)	
		初乳	血液	初乳	血液
OPG	ng/mL	2.8 (0.7 – 8.6)	4.6 (3.7 – 6.2)	1.1* (0.9 – 1.4)	3.8 (3.2 – 4.4)
TRAP5b	U/L	1.6 (1.1 – 2.5)	3.3 (1.8 – 3.6)	2.6* (2.2 – 3.9)	1.9 (1.8 – 2.1)
BAP	U/L	351.9 (126.9 – 457.8)	218.2 (156.4 – 271.7)	342.0** (142.4 – 640.9)	120.3 (71.8 – 153.5)
NTX	nmolBCE/L	35.5* (25.7 – 65.6)	20.5 (18.9 – 28.5)	29.7 (28.4 – 31.7)	20.9 (17.8 – 24.5)

¹⁾中央値 (四分位範囲)血中濃度との有意差; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

オステオプロテゲリン (OPG), 酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b (TRAP5b), 骨型アルカリホスファターゼ (BAP), I型コラーゲン架橋N-テロペプチド (NTX)

Table 3-5: 分娩直後(0 d)の初乳ならびに血中のオステオプロテゲリン(OPG)と骨代謝マーカー濃度とのスピアマン相関係数

項目	初乳中OPG	血中OPG
血液		
OPG	0.43	—
TRAP5b	-0.11	0.12
BAP	0.37	0.69**
NTX	0.28	0.39
初乳		
TRAP5b	0.18	-0.16
BAP	-0.08	-0.50*
NTX	0.73**	0.29

相関分析におけるP値; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

オステオプロテゲリン(OPG), 酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b(TRAP5b), 骨型アルカリホスファターゼ(BAP), I型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTX)

3-2 実験 2

正常群と低 Ca 群の分娩直後の血中 Ca 濃度と、初乳中の各骨代謝マーカー濃度の比較を **Table 3-6** に、血中の各骨代謝マーカー濃度の比較を **Table 3-7** に示した。全ての初乳中骨代謝マーカーに関して、正常群と低 Ca 群で差はなかったが、血中の TRAP5b ならびに BAP 濃度は低 Ca 群で有意に低値を示した ($P < 0.05$)。

分娩直後の初乳中ならびに血中の骨代謝マーカーと血中 Ca 濃度との相関を **Table 3-8** に示した。初乳中の骨代謝マーカー濃度は血中 Ca 濃度との相関を示さなかったが、血中 TRAP5b ならびに BAP 濃度は血中 Ca 濃度と正の相関を有した ($P < 0.05$ および $P < 0.01$)。

4. 考察

本実験では初乳中の OPG と母体の骨代謝の関係を明らかにする目的で、初乳ならびに血中の骨代謝マーカー濃度を明らかにした。実験 1 の結果から、分娩後 5 日間で臨床症状を示さなかった分娩乳牛の初乳中の OPG は、分娩直後 (0 d) の初乳に最も高濃度に含まれたが、その濃度は血中骨代謝マーカー濃度とは相関しなかった。実験 2 より、分娩時に低 Ca 血症に陥った乳牛の分娩直後の初乳の OPG 濃度は正常群と差がなく、分娩直後の血中 Ca 濃度と相関がなかった。

乳牛の初乳中には OPG が含まれ、特に分娩直後の初乳で高値であったが、その濃度は初産牛では血中濃度と同等であり、経産牛ではより低値を示した。また、初乳中の骨代謝マーカー濃度は分娩直後に最も高値であった。ヒトの母乳の調査 (127, 179) では、乳中 OPG 濃度は血中濃度と比較して数百から数千倍の高濃度で存在し、その高値は乳期に関わらず維持される (179)。牛の分娩後 1 回目の初乳中には、子牛の成長促進や免疫、代謝、内分泌機能強化のために種々のホルモンや成長因子

Table 3-6: 正常群と低Ca群の分娩直後の血中Ca濃度と、初乳中の各骨代謝マーカー濃度の比較¹⁾

項目	単位	正常群		低Ca群		P値 ²⁾
		頭数	濃度	頭数	濃度	
血清Ca	mg/dL	14	9.2 (8.9 – 9.4)	19	8.1 (7.4 – 8.3)	
初乳中濃度						
OPG	ng/mL	13	5.4 (2.4 – 7.4)	17	4.5 (2.6 – 7.8)	0.89
TRAP5b	U/L	14	2.8 (2.0 – 6.4)	19	3.2 (1.7 – 4.2)	0.50
BAP	U/L	14	421.7 (82.7 – 542.6)	19	252.1 (119.1 – 441.6)	0.71
NTX	nmolBCE/L	14	30.2 (23.3 – 41.7)	19	30.1 (22.9 – 33.7)	0.70

¹⁾中央値(四分位範囲)

²⁾Mann-Whitney U検定

カルシウム(Ca), オステオプロテゲリン(OPG), 酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b(TRAP5b), 骨型アルカリホスファターゼ(BAP), I型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTX)

Table 3-7: 正常群と低Ca群の分娩直後の血中の各骨代謝マーカー濃度の比較¹⁾

項目	単位	正常群		低Ca群		P値 ²⁾
		頭数	濃度	頭数	濃度	
血中濃度						
OPG	ng/mL	5	6.8 (6.3 – 6.8)	10	6.8 (5.6 – 7.7)	>0.99
TRAP5b	U/L	13	2.5 (2.0 – 3.6)	14	1.8 (1.6 – 2.3)	0.02
BAP	U/L	13	176.7 (145.9 – 256.1)	14	113.8 (89.0 – 156.8)	0.005
NTX	nmolBCE/L	8	21.0 (18.5 – 28.6)	14	27.1 (24.0 – 36.2)	0.11

¹⁾中央値(四分位範囲)²⁾Mann-Whitney U検定

カルシウム(Ca), オステオプロテゲリン(OPG), 酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b(TRAP5b), 骨型アルカリホスファターゼ(BAP), I型コラーゲン架橋n-テロペプチド(NTX)

Table 3-8: 分娩直後の初乳中ならびに血中の骨代謝マーカーと血中Ca濃度とのスピアマン相関係数(ρ)

項目	血中Ca濃度	
	頭数	ρ
初乳		
OPG	30	0.26
TRAP5b	33	0.12
BAP	33	0.15
NTX	33	0.19
血液		
OPG	15	0.28
TRAP5b	32	0.39*
BAP	32	0.51**
NTX	22	-0.37

相関分析におけるP値; *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$

カルシウム(Ca), オステオプロテゲリン(OPG), 酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b(TRAP5b), 骨型アルカリホスファターゼ(BAP), I型コラーゲン架橋N-テロペプチド(NTX)

などの生理活性物質が高濃度で含まれる(9, 11, 31, 42, 59)。Vidal ら(179)によると、母乳由来 OPG は哺乳により、ラットの消化管から血中に移行することが確認され、*in vitro* の実験においてウシの初乳が有する骨吸収抑制作用は RANKL により低下することが確認された。ウシの初乳中の OPG 含有量は、ヒトとは異なり、血中濃度と同程度ではあったが、他の生理活性物質のように分娩直後の初乳に最も多く含まれ、新生子牛の骨代謝に作用する可能性が示唆された。

BAP は活性化した骨芽細胞から分泌され、その血中濃度は骨形成活性を反映する(4, 178, 184)。OPG は骨芽細胞を始めとする様々な組織での発現が確認され(158, 178)、骨代謝のみならず免疫細胞の分化調節や抗アポトーシス作用など複数の生理活性を有する(173)が、妊娠期の血中 OPG の由来は明らかでない(127, 179)。ヒトの妊娠後期には胎盤での OPG の発現上昇が確認され、羊膜から母胎盤(絨毛膜や脱落膜)への分泌が示唆されている(109)。OPG はヒト乳腺上皮細胞での発現が確認されており(179)、リガンドである RANKL は妊娠後期の乳腺発達を促進する(39)。しかし、乳腺で発現した OPG が妊娠期の乳腺発達に及ぼす作用は明らかでない(78)。本実験から乳牛の分娩期の血中の OPG 濃度は BAP 濃度と正の相関を有したため、BAP と同様に骨芽細胞から分泌され、骨芽細胞の活性を反映した可能性が示唆された。一方、初乳中の OPG 濃度は、血中の骨代謝マーカーや Ca 濃度との相関は見られず血中の OPG とは異なる組織に由来する可能性も考えられた。

胎子娩出に際し胎盤において細胞死に関わる多数の転写因子の発現量が変化することで、胎子(胎盤)と母体は互いを異物と認識する(7, 68, 107, 149)。胎盤由来の OPG は妊娠中の母子間の免疫寛容の維持に働くと考えられ(109, 138)、分娩時に胎盤 OPG の発現量が低下することにより、母子間のアポトーシス反応が亢進すると示唆されている(109)。本実験から、初乳中の OPG と NTX 濃度は強い相関関係を有し、両者の生成あるいは分泌の関連性が考えられた。また、ヒト羊水中には高濃度の OPG が含まれる(109)。分娩開始時の母子間のアポトーシスの進行と同時に、コラゲナーゼ活性が上昇し(7)、羊膜を構成する I 型コラーゲン線維の断片化が起こり破水に至ると

される(102)。牛の胎盤は I 型コラーゲンを含むため(45)、破水により I 型コラーゲン断片である NTX が大量に出現することが推測される。以上より、初乳中の OPG と NTX の由来組織として胎盤や羊膜が考えられたため、今後は胎盤の剥離や破水等の生理的变化との関連を検証する必要がある。

5. 小括

分娩後の初乳中 OPG 濃度は分娩直後に最も高値で、初産牛で 2.8 (0.7 – 8.7) ng/mL、経産牛で 1.1 (0.9 – 1.4) ng/mL であった。分娩直後の初乳中の OPG 濃度は、血中の Ca や骨代謝マーカー濃度と相関がなく、低 Ca 血症牛と正常群との間にも差が見られなかった。このことから、初乳中の OPG は分娩時の骨代謝および血中 Ca 濃度の影響を受けないことが推察された。同様に他の骨代謝マーカーも初乳中と血中で相関関係が見られなかったが、初乳中の NTX と OPG 濃度は強い相関関係を有した。今後、これらの初乳中マーカーがもつ生理学的背景やその意義の解明に、さらなる研究が必要であると考えられる。

第 IV 章:初乳中 OPG がホルスタイン種新生子牛の血中 骨代謝マーカー濃度に与える影響

1. はじめに

妊娠後期の胎子の血中 Ca 濃度は、胎盤からの供給により維持される(92, 174)。胎子は娩出時の臍帯の切断により、急激に Ca 供給が遮断されることから、初乳や骨からの Ca 吸収が Ca 恒常性維持のために重要となる(93)。ラットを用いた研究において、ヒト母乳中に含まれる OPG は腸管から循環中に吸収される(179)。さらに *in vitro* の培養破骨細胞を用いた実験において、ウシ初乳は骨吸収抑制作用を有することが報告されている(179)。前章では、ウシの初乳中の OPG は分娩直後の初回初乳に最も高濃度に含まれることが明らかとなったが、哺乳した子牛の骨代謝に与える影響は不明である。

一般に初乳には豊富な栄養や生理活性物質が含まれ、生後 24 時間以内の子牛の腸管で高率に吸収される(9, 185)。生後半日の新生子牛では、骨代謝マーカーである破骨細胞や骨芽細胞から分泌される酵素 (TRAP5b や BAP) や、骨を構成するコラーゲンの断片 (NTX) の血中濃度が急激に増加した(67)。これらの血中骨代謝マーカー濃度の一過性の上昇は、初乳摂取によるものと推測されたが、初乳中の各マーカー濃度は不明であった(67)。乳牛では新生子期の初乳や常乳の摂取は消化管の発達や(9, 10)、その後の増体や飼料効率(38, 88, 159)ならびに泌乳や繁殖成績(120, 125, 86, 90)に影響することが明らかとなっている。また、初乳の質や量、摂取時間の違いは、子牛の血中の γ -グルタミルトランスぺプチターゼや ALP などの酵素(82, 192)やホルモン(59, 63)、免疫グロブリン G (IgG) (83) やグルコースやアミノ酸などの栄養代謝物質(59, 85, 162, 191)やミネラル(96)濃度に影響を及ぼし、その後の増体や飼料効率(38, 86, 88, 90, 159)ならびに泌乳や繁殖成績(120, 125)を左右することが数多く報告されている。

乳汁中には、新生児の骨成長を促す作用が確認されるタンパク質として、ラクトフェリン(110)、レプチン(19, 133)やインスリン様成長因子(84)などが報告されているが、牛乳中の OPG が新生子牛の骨代謝に与える影響は知られていない。そこで、本章で

は母体由来の OPG が初乳を介して新生子牛の骨代謝に影響すると仮定し、実験を行った。本実験では、骨代謝マーカーの熱感受性(23, 58, 62, 103)を利用し、初乳を加熱(60°C、30 min)により殺菌処理し、各骨代謝マーカー濃度を低下させた初乳を作製した。初乳の加熱殺菌処理の有無による、新生子牛の血中 OPG ならびに他の骨代謝マーカー濃度の推移を比較することで、初乳中の OPG が新生子牛の血中骨代謝マーカー濃度に及ぼす影響を明らかにした。

2. 材料と方法

2-1 実験デザイン

実験デザインの概要を **Fig. 4-1** に示した。2016 年 6 月～11 月までの期間、帯広畜産大学フィールド科学センターにおいて、分娩牛 14 頭から出生したホルスタイン種乳牛の新生子牛雌 14 頭を供試した。供試牛はすべて単胎仔で、自然分娩または軽度の助産により娩出し、生後 1 週の間一般健康状態に異常は認められなかった。全ての子牛に対して生後 1 日目に凍結初乳(−20°C)を給与した。農場の初乳管理の都合上、各子牛に異なる凍結初乳を与えたが、全て比重が 1,044 kg/m³ 以上の良質なものであった(41)。供試した子牛 14 頭を 50°C 以下の温水で融解した非処理初乳(Unheated)を与えた非処理群(UH: unheated, n=7)と、融解後に加熱による殺菌処理(60°C、30 min)を施した殺菌処理乳(35)を給与した処理群(HT: heated, n=7)に無作為に割り付けた。子牛は出生後に母牛から離され、生後 1 日目に初乳 2 L を計 3 回(10 h おき、計 6 L)人工哺乳された。1 回目の哺乳はいずれも生後 1 h 以内に行った。2 日目以降は、2 L の代用乳(カーフトップ EX, 全酪連)を 1 日 2 回給与した。本実験計画は帯広畜産大学実験動物委員会により承認された(#28-157)。

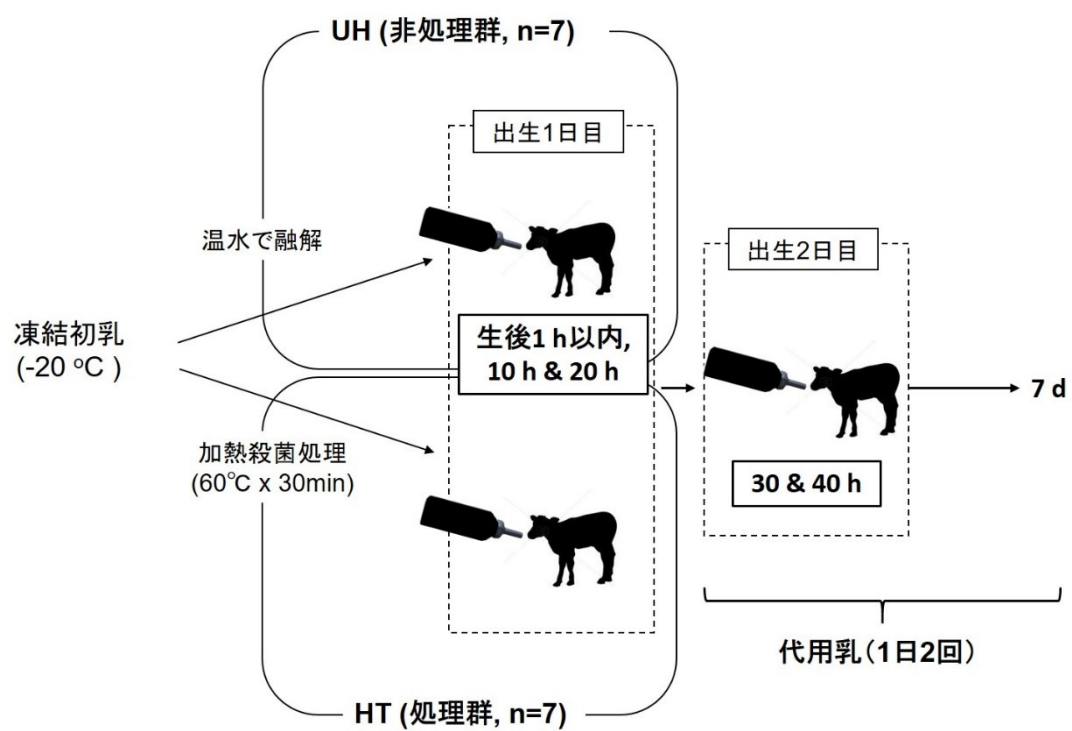


Fig. 4-1: 実験デザイン

2-2 採材

出生直後の初乳給与直前に、頸静脈から採血を行った(Pre-feeding)。初乳摂取直後の急激な血中骨代謝マーカー濃度の変動を観察するため(67)、その後 10 h おきに 2 日間(10, 20, 30, 40 h)と生後 7 日目(7 d)に血液採取を行った。採血直後に毎回 2L の初乳(prefeeding, 10, 20 h)または代用乳(30, 40 h)を給与した。採血は 5 mL プレーン管ならびに 7 mL ヘパリン加真空採血管(Venoject II, テルモ)を用いて行い、2 h 以内に遠心分離($1,680\times g$, 15 min)し、血漿ならびに血清を測定時まで凍結保存(-80°C)した。各子牛に与えた初乳 50 mL も同様に遠心分離($2,000\times g$, 20 min)し、乳清を測定時まで凍結保存(-20°C)した。

2-3 血液と乳汁の生化学解析

(1) 血中ならびに初乳中の OPG ならびに骨代謝マーカー(TRAP5b, NTX, ALP, BAP)濃度の測定

第 I 章・第一節と同様の方法で測定した。殺菌処理乳は、加熱処理の前後に測定を行い、それぞれ加熱処理前を Pre-HT、加熱処理後を Post-HT とした。

(2) 血清中 IgG、総蛋白(TP)、Ca ならびに iP 濃度の測定

血清 IgG 濃度はウシ IgG と交差性を有する市販の ELISA キット(Fast-ELYSA, RD Biotech, France)を用いて行った。血中 TP, Ca および iP 濃度は第 I 章・第一節と同様に生化学自動分析装置(TBA-120FR, キヤノンメディカルシステムズ)を用いて行った。TP は Biuret 法(168)により測定した。

2-4 統計処理

統計処理は SAS enterprise guide (ver. 7.1; SAS institute Inc.) を使用した。全ての測

定値を平均 ± 標準誤差で表記した。出生時の体重(BW)の群間差は D'Agostino & Pearson 検定により正規性を確認後、Mann-Whitney U 検定により解析した。初乳中の各骨代謝マーカー濃度の比較に関して、Unheated と Pre-HT は対応のない t 検定で、また Pre-HT と Post-HT は対応のある t 検定により比較した。新生子牛の血中の各骨代謝マーカー濃度変動における初乳の加熱処理の影響を判定するために、混合モデルによる共分散分析(Analysis of covariance)を用い、群と時間を固定効果(群、時間、群×時間)とし、各子牛による違いを変量効果とした。ここでは各子牛の pre-feeding の値を剰余因子として統制するために、それぞれの pre-feeding の血中濃度を基準(ベースライン)に設定した(167)。分散の差が生じた場合、多重比較検定として Tukey's post-hoc テストにより群間、群内の差を解析した。有意水準は 5%とした。

3. 結果

新生子牛の出生時の BW は UH 群で 40.8(40.0 – 40.6)kg、HT 群で 45.6(37.6 – 46.2) kg であり群間で差は見られなかった($P = 0.64$)。

殺菌処理の有無による初乳中の各骨代謝マーカー濃度を **Table 4-1** に示した。全ての骨代謝マーカー濃度に関して、Unheated と Pre-HT で差は見られなかった。初乳中 OPG 濃度は殺菌処理前(pre-HT)と後(post-HT)で差は見られなかった($P = 0.09$)。一方、殺菌処理により初乳中の TRAP5b、NTX および ALP 濃度は有意に減少した(それぞれ $P < 0.05$, $P < 0.01$ および $P < 0.01$)。初乳中 BAP に関して、Post-HT の平均濃度は Pre-HT の約三分の一であったにも関わらず、各サンプルによる濃度のばらつきが大きく、加熱処理による有意な減少はみられなかった($P = 0.08$)。代用乳中の各骨代謝マーカー濃度は初乳中よりも低値であった(OPG: 1.34 ng/mL, TRAP5b: 0.38 U/L, NTX: 9.1 nmolBCE/L, ALP: 512 U/L, BAP: 308.7 U/L)。

Table 4-1: 初乳中の各骨代謝マーカー濃度¹⁾

項目	単位	Unheated	Pre-HT	Post-HT
OPG	ng/mL	8.8 ± 5.2	7.2 ± 1.5	4.2 ± 1.1
TRAP5b	U/L	3.0 ± 0.2	4.3 ± 1.0 ^a	0.6 ± 0.03 ^b
NTX	nmol BCE/L	37.9 ± 7.8	31.9 ± 1.7 ^c	21.6 ± 1.7 ^d
ALP	U/L	1655.2 ± 55.9	1666.5 ± 60.9 ^c	359.2 ± 92.9 ^d
BAP	U/L	542.7 ± 22.8	441.2 ± 108.9	120.0 ± 75.6

¹⁾平均値 ± 標準誤差

同列内で異なる上付き文字には有意差あり: ^{a-b}:*P* < 0.05, ^{c-d}:*P* < 0.01

Unheated: 非処理初乳 (n = 7)

Pre-HT: 殺菌処理前の濃度 (n = 6)

Post-HT: 殺菌処理後の濃度 (n = 6)

オステオプロテゲリン (OPG), 酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b (TRAP5b), 骨型アルカリホスファターゼ (BAP), I型コラーゲン架橋N-テロペプチド (NTX)

新生子牛の血中 OPG 濃度の変動は、実験期間を通して、両群に差は見られなかった(**Fig. 4-2**)。UH 群では、血中 OPG 濃度は pre-feeding 値(20.7 ± 1.8 ng/mL)と比較して、20 h(30.4 ± 3.7 ng/mL)から 30 h(31.2 ± 4.5 ng/mL)で有意な上昇が見られた($P < 0.01$)。HT 群では出生後 2 日間で一定に推移したが(平均値 $29.8 - 35.6$ ng/mL)、7 d で有意に減少(13.9 ± 2.0 ng/mL)した($P < 0.05$)。

他の骨代謝マーカーの血中濃度変動を **Fig. 4-3** に示した。出生後 2 日間で群間の血中 TRAP5b 濃度は同等であったが、7 d では HT 群(11.3 ± 1.2 U/L)は UH 群(6.6 ± 0.7 U/L)より有意に高値であった($P < 0.01$)。出生後 2 日間の血中 TRAP5b 濃度(UH: $10.5 - 14.4$ U/L, HT: $10.5 - 14.7$ U/L)は、pre-feeding の値(UH: 7.0 ± 0.4 U/L, HT: 7.5 ± 1.0 U/L)と比較して両群で有意に上昇した($P < 0.05$)。血中 NTX 濃度変動は、10 h から 40 h で群間に有意差が見られた($P < 0.05$)。UH 群は pre-feeding 値(14.4 ± 1.9 nmol BCE/L)と比較して 30 h から 7 d($22.7 - 24.8$ nmol BCE/L)で有意に上昇した($P < 0.01$)。一方、HT 群では出生後 2 日間に有意な増加は見られず、7 d(20.4 ± 2.9 nmol BCE/L)で pre-feeding 値(12.5 ± 1.2 nmol BCE/L)よりも有意に上昇した($P < 0.05$)。UH 群の血中 ALP 活性値は 20 h で HT 群よりも有意な高値を示した($P < 0.05$)。UH 群の血中 ALP 濃度変動は、pre-feeding 値(769 ± 90.4 U/L)と比較して 10 h から 30 h($2,660 - 3,159$ U/L)で有意に上昇した($P < 0.01$)。しかし HT 群では生後 7 日間で有意な変動が見られなかった($816 - 1,855$ U/L)。また、UH 群の血中 BAP 活性値変動は、10 h から 30 h で HT 群より高値を示し($P < 0.05$)、pre-feeding 値(563 ± 61.8 U/L)と比較すると 10 h から 30 h($1,690 - 1,986$ U/L)で有意に上昇した($P < 0.01$)。一方、HT 群では実験期間中、有意な変動は見られなかった($553 - 1,128$ U/L)。

生後 1 日目の血中の TP、IgG、Ca ならびに iP 濃度の変動を **Table 4-2** に示した。Pre-feeding から 20 h まで、これらの血中濃度推移に群間差は見られなかった。両群で血中の IgG と TP 濃度は初乳摂取後に有意な増加が見られたが($P < 0.01$)、Ca と iP 濃度は一定に推移した。

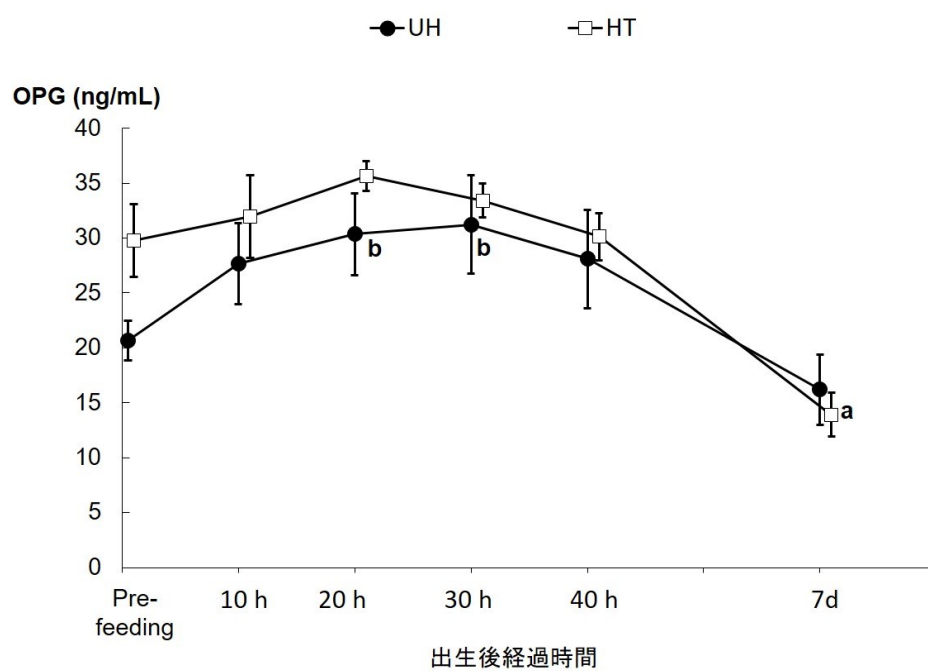


Fig. 4-2: 血清オステオプロテゲリン(OPG)濃度の推移

群内差 (pre-feedingとの差) : b: $P < 0.01$, a: $P < 0.05$

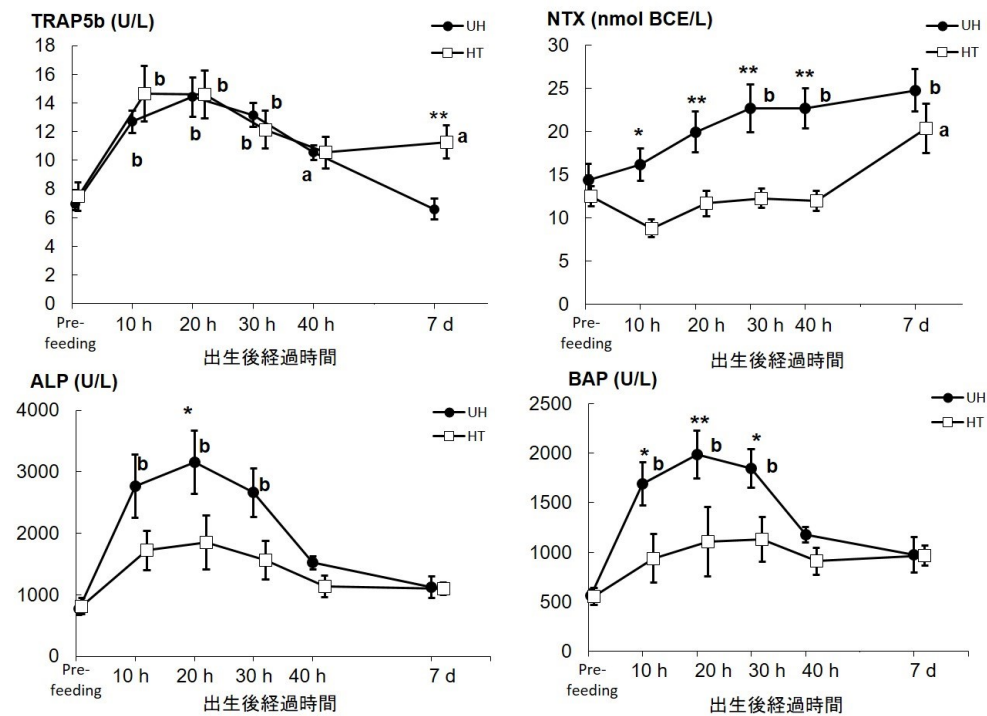


Fig. 4-3: 血中の酒石酸耐性酸ホスファターゼ5b (TRAP5b), I型コラーゲン架橋N-テロペプチド (NTX), アルカリホスファターゼ (ALP), 骨型アルカリホスファターゼ (BAP) 濃度の推移

群内差 (pre-feedingとの比較) b: $P < 0.01$, a: $P < 0.05$

群間差 §§: $P < 0.01$, §: $P < 0.05$

Table 4-2: 血液生化学検査結果¹⁾

項目	単位	群	Pre-feeding	10 h	20 h
IgG	g/L	UH	0.0 ± 0.0 ^c	9.1 ± 1.1 ^d	15.5 ± 2.2 ^d
		HT	0.0 ± 0.0 ^c	12.7 ± 2.2 ^d	20.6 ± 2.7 ^d
TP	g/L	UH	42.4 ± 1.0 ^c	53.5 ± 1.5 ^d	59.9 ± 1.8 ^d
		HT	46.0 ± 1.4 ^c	56.6 ± 2.7 ^d	62.5 ± 2.7 ^d
Ca	mg/dL	UH	11.5 ± 0.3	11.7 ± 0.2	11.3 ± 0.2
		HT	12.2 ± 0.3	11.7 ± 0.3	11.6 ± 0.2
iP	mg/dL	UH	5.7 ± 0.3	6.4 ± 0.1	6.8 ± 0.2
		HT	6.6 ± 0.2	6.8 ± 0.3	7.2 ± 0.5

¹⁾ 平均値 ± 標準誤差

同列内で異なる上付き文字には有意差あり: ^{c-d}: $P < 0.01$

IgG: 免疫グロブリンG, TP: 総蛋白, Ca: カルシウム, iP: 無機リン

4. 考察

本章では、加熱殺菌処理の有無により異なる骨代謝マーカー濃度を含む初乳を新生子牛に与え、血中の OPG を始めとする複数の骨代謝マーカー濃度の変動を比較することで、初乳中 OPG の摂取が新生子牛の骨代謝に与える影響を検討した。血中 IgG 濃度が 10 g/L 以上あるいは血中 TP 濃度が 52 g/L 以上に達すると、初乳による受動免疫の移行が十分であると定義される(176)。本試験では、全ての子牛は出生後 1 日以内に少なくともいずれかの条件を達成し、十分な受動免疫の移行が認められた。さらに、出生後 1 日目の血中の Ca と iP 濃度に群間の差はなく、初乳給与によるミネラルの移行は十分であったと推察された。新生子牛の腸管は、出生後の 24 h は、非特異的吸収機構を有し、ピノサイトーシスにより初乳中の巨大分子を無差別に吸収する(36)。そのため、初乳中の IgG は出生直後から高率に吸収されるが、この吸収率は出生後 8 h でピークに達し 10 h で急速に低下する(163 ~ 165)。本実験では、初乳の殺菌処理により初乳中の複数の骨代謝マーカー濃度の低下が認められ、OPG と TRAP5b を除く血中の骨代謝マーカー濃度は、出生後 2 日間で群間に差が見られた。以上より、本試験における子牛の血中濃度推移の比較によって、初乳中の各骨代謝マーカーの血中への移行を推察することが可能であると考えられた。

加熱殺菌処理により初乳中の OPG 濃度は変化しなかった。初乳摂取後の血中 OPG 濃度の推移は、UH 群では 20 ~ 30 h で有意な上昇を示したが、期間を通して群間に差は見られなかった。Naylor ら(127)は、ヒト母乳中の OPG 濃度は、母体や新生児の血中濃度よりも数百倍高濃度であると報告した。これに対し、本実験ではウシの初乳中の OPG 濃度は 7.8 ± 2.6 ng/mL (n=13)、出生直後の子牛の血中濃度は 25.2 ± 2.1 ng/mL であった。草食動物である子牛は、出生後すぐに起立し歩行する必要があることから、ヒトの新生児と比較して、神経や運動機能がより発達している(33)。すなわち、ヒトの母乳は、ウシよりも発生ステージが比較的未熟である新生児に高濃度の OPG を伝達することによって、新生児の骨格形成を保護する役割を有する可能性が

考えられた(33, 127)。本実験は乳中に含まれる干渉物質の影響により初乳中濃度を正確に測定できていない可能性もあり、添加回収試験を実施後に、再度血中と乳中濃度の比較を行う必要がある。しかし、初乳摂取後の子牛の血中 OPG 濃度の増加は 20 h まで見られなかったことや、HT 群の子牛の出生後 2 日間の血中 OPG 濃度は 7 d よりも高値であったことから、初乳 OPG の移行が子牛の血中濃度に与える影響は限定的であると推察された。

一方、初乳中の OPG 以外の骨代謝マーカー濃度は、殺菌処理により低下した。出生後 2 日間の血中 TRAP5b 濃度は両群で同様に一過性の上昇がみられたことから、初回初乳給与後に内在性の TRAP5b が循環中に放出されたことが示唆された。*In vitro* の破骨細胞の培養において OPG の添加は TRAP5b 陽性の破骨細胞の形成を抑制する(44, 190)。Oliveira ら(135)は、牛乳由来のナノ分子が貪食機能をもたない未成熟な TRAP5b 陽性の破骨細胞の分化を促進することを報告した。すなわち出生当日の新生子牛の破骨細胞分化は初乳摂取を契機として、OPG による抑制作用に反し、急激に亢進したと考えられた。

初乳中の NTX や ALP および BAP 濃度は殺菌処理により低下し、血中濃度推移は初乳摂取後 10 h から群間で明らかな差が見られ、生後 2 日まで UH 群では高値を示した。殺菌処理初乳中の NTX 濃度(21.6 ± 1.7 nmol BCE/L)は、新生子牛の pre-feeding における血中濃度(12.5 ± 1.1 nmol BCE/L)の約 2 倍であったが、HT 群の出生後 2 日間の血中濃度は変化せず推移した。酵素系の骨代謝マーカーとは異なり、骨コラーゲン断片である NTX は循環中で代謝されずに尿中に排出される(24, 65)。新生子牛の腎排出機能は生後 1 週齢まで未熟であるため(32)、HT 群では初乳から吸収された NTX が循環中に蓄積し、7 d で UH 群と同等の濃度に達したと考えられた。

新生子牛にとって初乳は免疫や栄養、成長因子の供給源であり、さらには腸管機能の発達にも貢献することが報告されている(9, 10)。初乳給与のタイミングや量の違いは、日増体量に大きく影響する(38, 192)。血中 TRAP5b 濃度の推移から、初乳摂

取は新生子牛において急激な破骨細胞分化を促すことが示唆された。本実験では初乳 OPG の移行による血中の各骨代謝マーカー濃度に対する影響は極めて限られていると推察された。しかしながら、既報(179)より *in vitro* での実験において牛乳が骨吸収面積の増加を抑制し、抗骨吸収作用を有することが確認された。これはおそらく成熟破骨細胞の活性が抑制されることに起因すると考えられている(135)。さらに、本試験から初乳中の ALP や BAP が大量に吸収されることが示唆された。アルカリホスファターゼはヒドロキシアパタイトの形成を促す効果が認められているが、骨形成に及ぼす作用は未だ明らかではない(54)。以上のことから新生子牛の骨代謝活性に対する初乳の生理作用をより詳細に検討にするためには、初回初乳摂取時間や量の違いによる骨代謝マーカー変動の違いを調査するなど、追加の実験を行う必要がある。

5. 小括

初乳中の OPG の移行が新生子牛の血中の各骨代謝マーカー濃度に与える影響は極めて限定的であり、骨代謝に対する影響は小さいことが示唆された。しかし、初乳摂取を契機とした血中 TRAP5b 濃度の上昇から、初乳摂取により新生子牛の破骨細胞数が増加したことが考えられた。また初乳摂取後の血中の NTX や ALP および BAP 濃度は初乳中濃度の影響を受けることが明らかとなり、初乳の摂取自体は新生子牛の骨代謝に影響を及ぼす可能性が示された。

総括

乳牛は分娩と泌乳をくり返すことで、大量の牛乳を生産することを課せられている。産乳、とくに初乳の産生時に大量の Ca を乳汁中に喪失するため、分娩時には一過性の血中 Ca 濃度の低下が起こり易い。これに対し、生体に備わっている恒常性機構により、骨からの Ca 吸収(骨吸収)を活性化し、Ca の動員を図ろうとするが、分娩期の乳牛では骨吸収が減弱あるいは遅延するとされている。しかし、分娩乳牛の骨吸収と疾病との関連は明らかでない。そのため詳細な骨吸収機構の臨床評価には、骨代謝マーカーの利用が有用と考えられる。

人医療域において、破骨細胞による骨吸収の結果として生じる骨コラーゲン断片 (CTX や NTX) は骨吸収マーカーとして広く利用されてきた。乳牛では、これらの血中濃度が分娩後数日間低値で推移することから、分娩時に骨吸収が低下すると考えられてきた。しかし、近年、乳牛の血中 TRAP5b 濃度が分娩前 1 週から分娩時にかけて上昇することが明らかになり、破骨細胞数は増加するとの考えも示されている。したがって、乳牛における分娩前後の骨吸収状態を正確に把握するためには、破骨細胞の分化を評価するための新たな指標が必要と言える。

OPG は破骨細胞の分化制御を反映する新たな血中の骨吸収マーカーであり、ヒトの骨代謝性疾患での臨床研究が行われている。ヒト母乳中の NTX 濃度は分娩直前の母体の骨吸収状態を反映して変動することが報告されている。母乳中には OPG も多く含まれ、それを哺乳した新生児の骨代謝に影響することも示唆されている。

以上を踏まえ、本研究では分娩乳牛の血中 OPG 濃度を測定して骨吸収状態の変化を評価するとともに、初乳中の OPG 濃度と血中の骨代謝マーカー濃度との関係を明らかにすることにより、母牛および新生子牛の骨代謝との関係を検討することを目的とし、実験を行った。本研究によって得られた知見は、以下の通りである。

1. ホルスタイン種乳牛における分娩前後の血中 OPG 濃度の推移

初産牛と経産牛の比較では、血中 OPG 濃度は、経産牛では分娩 3 週前から分娩時にかけて低下し、初産牛では分娩前後を通して低値で推移したことから、経産牛と

初産牛では分娩前後の破骨細胞の分化制御が異なることが示唆された。経産牛では分娩前に血中 OPG 濃度の低下が起こり、破骨細胞の分化が亢進する可能性が示された。一方、初産牛では血中 OPG 濃度に変化はないが、活発な骨代謝回転により破骨細胞の数が高く維持され、分娩時の血中 Ca 濃度の低下が抑えられると考えられた。

経産乳牛の各産次による比較では、血中 OPG 濃度は分娩 3 週前の時点で産次が増加するほど低値を示した。分娩までの濃度推移は産次による違いが見られ、2 産の若い乳牛では分娩当日にかけて減少したが、3 産以降の乳牛では一定に推移した。分娩前 3 週間の血中 OPG/TRAP5b 濃度比は、低産次 (2 および 3 産) と高産次 (4 産以上) 牛の間では顕著な違いが見られ、年齢や産次とも有意な負の相関が見られた。このことから、産次を重ねた乳牛では OPG による破骨細胞分化の制御が低下しており、分娩前から破骨細胞分化が亢進している可能性が示された。さらに、分娩前 3 週間の OPG/TRAP5b 濃度比は、破骨細胞分化の制御に関して産次による違いを鋭敏に示す指標となる可能性が示された。しかし、分娩時の血中 Ca 濃度は、分娩前の血中 OPG/TRAP5b 濃度比やその AUC と相関せず、分娩前の破骨細胞分化との関連は見られなかった。

2. ホルスタイン種乳牛における初乳中 OPG と母体の骨代謝との関係

分娩後の初乳中 OPG 濃度は分娩直後に最も高値で、初産牛で 2.8 (0.7 – 8.7) ng/mL、経産牛で 1.1 (0.9 – 1.4) ng/mL であった。分娩直後の初乳中の OPG 濃度は、血中の Ca や骨代謝マーカー濃度と相関がなく、低 Ca 血症牛と正常群との間にも差が見られなかった。このことから、初乳中の OPG は分娩時の骨代謝および血中 Ca 濃度の影響を受けないことが推察された。また、血中の OPG 濃度は、BAP 濃度と相関性を有したことから、BAP と同様に骨芽細胞に由来する可能性が示された。同様に他の骨代謝マーカーも初乳中と血中で相関関係が見られなかったが、初乳中の NTX と OPG 濃度は強い相関関係を有したことから、これらの生成や分泌における関

連性が示唆された。OPG は、全身の複数の臓器で遺伝子発現が確認されており、胎盤において母子間の免疫寛容に作用するとされる。さらに、ウシの羊膜は I 型コラーゲンを含み、破水により大量の NTX が出現されることが考えられる。以上より、初乳中の OPG 濃度は母体の骨代謝を反映しないが、胎盤の剥離など骨代謝とは異なる母体の生理的变化を反映する可能性がある。

3. 初乳中 OPG がホルスタイン種乳牛の新生子牛の血中骨代謝マーカー濃度に与える影響

新生子牛に対して、生後 1 日目に非殺菌初乳 (UH 群) または殺菌処理 (60°C, 30 min) 初乳 (HT 群) を与え、出生後 7 日までの初乳と血中の OPG、TRAP5b、NTX、ALP および BAP 濃度を測定した。初乳中の OPG 濃度は殺菌処理により変化せず、それ以外の骨代謝マーカー濃度は加熱処理後に低下した。UH 群の血中 OPG 濃度は、初乳摂取後 20~30 h で上昇したが、期間中において群間差は見られなかった。血中 TRAP5b 濃度は両群で 10~30 h に上昇し、血中 NTX、ALP および BAP 濃度は 10 h から生後 2 日まで UH 群で高値を示した。以上より、初乳中の OPG の移行が新生子牛の血中の各骨代謝マーカー濃度に与える影響は極めて限定的であり、骨代謝に及ぼす影響は小さいことが示唆された。一方、初乳摂取を契機に血中 TRAP5b 濃度が増加したことから破骨細胞数の増加が示唆され、さらに、初乳摂取後の血中の NTX、ALP および BAP 濃度は初乳中のそれぞれの濃度の影響を受けたことから、初乳の摂取自体は新生子牛の骨代謝に影響を及ぼすものと考えられた。

本研究において、乳牛の分娩前後の血中 OPG 濃度を初めて測定し、分娩前の破骨細胞分化の観点から、産次の増加が低 Ca 血症の発症に寄与するという事実の論拠を示すことに成功した。さらに、経産牛の破骨細胞分化の制御状態と産次との関係について、血中 OPG 濃度や OPG/TRAP5b 濃度比といった指標によって評価できる可能性も示した。これは乳牛の分娩前後における骨代謝評価の新たな指標を提案す

るものであり、今後、分娩性低 Ca 血症における予防法の評価や発生メカニズムの解明への貢献が期待される。また、今回、初乳中の OPG 濃度を測定した結果、この濃度から分娩乳牛の骨吸収の状態を把握することは困難であること、初乳中 OPG の摂取が新生子牛の血中骨代謝マーカー濃度に与える影響も限定的であることを明らかにした。このように初乳中の OPG 濃度は母子の骨代謝の指標としての利用価値は低いが、初乳中の NTX 濃度と強い相関関係を有することから骨代謝以外の母牛の生理的变化を示す指標となる可能性が示され、今後の臨床応用に向けた新たな研究に発展することが示唆される。

和文要旨

骨代謝マーカーは人医療では臨床応用されているが、獣医学での応用には未だ研究の余地がある。乳牛では、分娩期の低カルシウム(Ca)血症が産褥期の健康状態や生産性に及ぼす影響が大きく、臨床現場で問題となっている。分娩性低 Ca 血症は血中 Ca 濃度の低下に対する骨からの Ca 動員(骨吸収)の遅れが一因とされるが、詳細な機構は明らかでない。本研究では乳牛の血液中のオステオプロテゲリン(OPG)濃度を測定して、分娩前後の骨吸収状態の変化を評価すると同時に、初乳中の OPG 濃度と母子の血中骨代謝マーカーとの関係を明らかにすることを目的とした。

第 I 章では、分娩期の乳牛の骨代謝に関する研究を文献的に回顧し、OPG の測定によって得られる破骨細胞分化に関する新たな情報について考察と展望を述べた。乳牛の血液中の骨吸収マーカー濃度は分娩から数日遅れて増加するが、破骨細胞の数と相関を有する酒石酸耐性酸ホスファターゼ 5b (TRAP5b)濃度は分娩前から増加することが報告されている。また、ヒト母乳中の I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (NTX)濃度は分娩直前の母体の骨吸収を反映することが示唆されている。OPG は破骨細胞の分化を制御する新たな血中の骨吸収マーカーであり、ヒトの母乳に多く含まれる。そのため、血液中や初乳中の OPG 濃度の測定により乳牛の分娩期の骨吸収機構の解明が期待された。

第 II 章では、乳牛の分娩前後の血中 OPG 濃度を明らかにすることで、破骨細胞分化の観点から分娩による骨吸収状態の変化を観察した。第一節において初産牛と経産牛の分娩 3 週前と分娩直後の血中 OPG 濃度の比較を行った結果、経産牛では分娩前後で減少が見られたが初産牛では低値のまま一定に推移することを示した。次いで、第二節において経産牛の分娩前 3 週間の血中 OPG 濃度の推移を産次別に比較した。その結果、2 産では分娩前に血中 OPG 濃度が低下したが、3 産以上では分娩前後の変化がなく低値で推移した。血中 TRAP5b 濃度は分娩時に増加するため、OPG による破骨細胞分化の制御は破骨細胞の数の影響を受けると考えられる。こ

これらの血中濃度比 (OPG/TRAP5b) を検証したところ、その推移と曲線下面積は年齢や産次と有意に相関したが、分娩時の血中 Ca 濃度との相関はなかった。以上、本章において、低産次 (2 および 3 産) の乳牛では分娩に伴い破骨細胞分化の制御が緩和されるが、高産次 (4 産以上) ではこの変化を欠くことが示唆された。しかし、分娩前の破骨細胞分化の変化と分娩時の血中 Ca 濃度との関連は不明であった。

第 III 章では、初乳中の OPG 濃度と分娩牛の血中骨代謝マーカー濃度との関係を明らかにした。OPG は分娩直後の初乳に最も高濃度に含まれるが、血中の骨代謝マーカーや Ca 濃度との関係は見られず、低 Ca 血症牛と正常牛の間で濃度差は見られなかった。一方、初乳中の OPG と NTX 濃度は強い相関関係を示した。過去に分娩期の羊膜での OPG 発現の上昇が報告されており、破水により I 型コラーゲンの分解が起こると推察される。以上より、分娩直後の初乳中の OPG は母体の骨代謝を反映しないが、胎盤の剥離などの分娩による生理的変化の指標となる可能性が示された。

第 IV 章では、初乳中 OPG の新生子牛への移行と骨代謝に与える影響を検討するために、生後 1 日目に非殺菌初乳を与える非処理群と、殺菌処理初乳 (60°C, 30 min) を与える処理群を設定し、初乳と血中の OPG, TRAP5b, NTX, アルカリホスファターゼ (ALP) およびその骨型アイソザイム (BAP) 濃度を測定した。初乳中の OPG 濃度は殺菌処理により変化せず、それ以外の骨代謝マーカー濃度は殺菌処理後に低下した。非処理群の血中 OPG 濃度は初乳摂取後 20~30 h で上昇したが、群間差はなかった。血中 TRAP5b 濃度は両群で 10~30 h に上昇し、血中 NTX, ALP および BAP 濃度は 10 h から生後 2 日まで非処理群で高値を示した。生後 24 h 以内の子牛の腸管は初乳中の高分子を非特異的に吸収し、その吸収効率は生後 8 h でピークに達する。今回、血中 TRAP5b 濃度は両群で、血中 NTX や ALP および BAP 濃度は非処理群で 10 h から高値を示したが、血中 OPG 濃度は 20 h まで上昇はなかった。したがって、初乳からの OPG が新生子牛の骨代謝に与える影響は小さいと考えられた。

本研究では乳牛の血中 OPG 濃度の推移を用いて分娩前後の破骨細胞分化を評価し、その分化制御が産次により異なることを明らかにした。このことは、乳牛の産次の増加が低 Ca 血症のリスク要因の一つであるという事実の論拠となり、低 Ca 血症の発症メカニズムの解明に繋がる可能性を示した。一方、乳牛の初乳中に OPG が含有されることを明らかにしたが、初乳中の OPG から分娩期の骨代謝情報を取得することは困難であり、またその生理活性が新生子牛の骨代謝に与える影響は限定的であると考えられた。以上より、初乳中の OPG 濃度は母子の骨代謝マーカーとしての有用性は低いと考えられた。一方、初乳中の NTX 濃度との強い相関性より、分娩牛における何らかの生理現象を反映する指標になることが示唆された。

英文要旨

The clinical application of bone markers in veterinary medicine has not been realized. Dairy cows experience various degrees of hypocalcemia immediately after calving, which makes them susceptible to post-parturient diseases and reduces production. A delay in calcium (Ca) mobilization from bone is one of the causes of parturient hypocalcemia; however, its precise mechanism remains unclear. This thesis evaluated the change in bone resorption status associated with parturition by measuring the blood osteoprotegerin (OPG) concentrations and investigated the colostral OPG concentrations in association with bone metabolism in dairy cows and newborn calves.

Chapter I presents the expected research outcomes and discusses them by reviewing studies of bone metabolism in parturient dairy cows. Although circulating bone resorption markers increase a few days after parturition, some studies showed a prepartum increase of tartrate resistant acid phosphatase 5b (TRAP5b), another bone resorption marker that is strongly associated with osteoclast numbers. The collagen cross-linked N-telopeptide (NTX) concentrations in human milk reflect the maternal bone resorption status during late pregnancy. In humans, OPG negatively regulates osteoclast differentiation (osteoclastogenesis). Human milk contains large amounts of OPG compared with blood; therefore, a profound understanding of the bone resorption status would be expected by measuring the blood and colostral OPG concentrations in dairy cattle.

Chapter II investigated the change in blood OPG concentrations in dairy cows around parturition to evaluate the change in bone resorption status. Section 1 (Experiment #1) presents the peripartum changes in the blood OPG concentrations in primiparous and multiparous cows. The blood OPG concentrations in multiparous cows were reduced from 3 weeks prepartum to immediately after parturition, while they

remained low around parturition in the primiparous cows. Section 2 (Experiment #2) compared the changes of blood OPG concentrations in multiparous cows of different parities for 3 weeks before parturition. During this period, the blood OPG concentrations fell in the parity 2 cows, but not in the cows of parity 3 or more than 4. The circulating TRAP5b concentration peaked at calving in all cows, suggesting that the number of osteoclasts is related to an inhibitory effect of OPG on osteoclastogenesis. Parity and age influenced the prepartum changes in the blood OPG/TRAP5b ratio and its area under the curve, although there was no association with the blood Ca concentrations at calving. The results of these two experiments imply that young multiparous cows (parities 2 and 3) are likely to reduce the inhibitory effect of OPG on osteoclastogenesis before parturition, while this change is absent in the older multiparous cows (parity >4). However, it is still not known whether the prepartum change in osteoclastogenesis is related to hypocalcemia at calving.

Chapter III determined the colostral OPG concentrations to evaluate the relationship with the bone metabolic status in parturient dairy cows. The OPG concentration was highest in the colostrum collected immediately after calving. However, the colostral OPG concentrations did not exhibit a significant relationship with the blood concentrations of the other bone markers or Ca. There was no difference in the colostral OPG concentrations between normocalcemic and hypocalcemic cows, whereas there was a strong correlation between the OPG and NTX concentrations in the colostrum. These results imply that the colostral OPG did not reflect the maternal bone metabolic status, and that the OPG in colostrum and blood may have different origins.

Chapter IV randomly allocated neonatal calves into two groups, fed either unheated or heated (60°C, 30 min) colostrum on the day of calving, to elucidate the bone metabolic status after taking colostrum. The concentrations of OPG, TRAP5b, NTX, alkaline phosphatase (ALP), and bone-specific ALP (BAP) were measured in the

colostrum and blood of newborns for 1 week after birth. Heating did not decrease the colostral OPG concentrations and the blood OPG concentrations were increased 20 and 30 h after taking the first colostrum in the calves that were fed unheated colostrum; however, there was no significant difference between the groups. The circulatory TRAP5b peaked from 10 to 30 h after taking the first colostrum in both groups; the circulatory NTX, ALP, and BAP increased from 10 h after taking the first colostrum to the second day after calving in the newborns fed unheated colostrum. During the first 24 h of life, calves exhibit non-selective absorption through the intestines, with the highest rate of absorption 8 h after birth, before the rate decreases. This study revealed that the increase in blood concentrations of bone markers begins at 10 h, although the OPG concentrations did not increase until 20 h after taking the first colostrum; therefore, colostral OPG absorption is less likely to affect bone metabolism in neonatal calves.

Based on the blood OPG changes, the data reported here demonstrated the influence of parity on the periparturient changes in osteoclastogenesis in dairy cows. These findings provide new perspectives on the bone resorption status at parturition in dairy cows and warrant further research into the contribution of bone metabolism to post-parturient hypocalcemia. The data also suggested that colostral OPG does not indicate the bone metabolic status around calving, and its bioactivity did not affect neonatal bone metabolism. Colostral OPG is unlikely to be used as a bone marker in either dams or calves; however, it may reflect maternal physiological changes associated with parturition because of the strong correlation with colostral NTX.

謝辞

本研究は筆者が岐阜大学大学院獣医学研究科博士課程において行った実験をまとめたものであり、全実験は帯広畜産大学畜産フィールド科学センター(FSC)にて実施させて頂きました。主指導教員である帯広畜産大学教授・山岸則夫先生、公表論文の共同著者としてご指導を賜りました准教授・花田正明先生、准教授・川島千帆先生、講師・茅野光範先生には、終始、励ましと、手厚いご指導・ご援助を賜りましたことに深く御礼申し上げます。また、岩手大学教授・木崎景一郎先生、帯広畜産大学教授・猪熊壽先生、岩手大学教授・山崎真大先生、東京農工大学教授・福島隆治先生、岐阜大学准教授・神志那弘明先生には、本学位論文の完成のために大変有意義なご指導とご助言を賜り、厚く御礼申し上げる次第です。最後に、実験遂行にご協力を頂きました帯広畜産大学・山岸研究室の学生各位ならびに同 FSC 教授・木田克弥センター長ならびにスタッフ各位に感謝申し上げます。

引用文献

1. Addis, M. F., Tedde, V., Puggioni, G. M. G., Pisanu, S., Casula, A., Locatelli, C., Rota, N., Bronzo, V., Moroni, P. and Uzzau, S. (2016). Evaluation of milk cathelicidin for detection of bovine mastitis. *J. Dairy Sci.* 99, 8250 ~ 8258.
2. Alatalo, S. L., Halleen, J. M., Hentunen, T. A., Mönkkönen, J. and Väänänen, H. K. (2000). Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin. Chem.* 46, 1751 ~ 1754.
3. Alataro, S. L., Ivaska, K. K., Waguespack, S. G., Econs, M. J., Väänänen, H. K. and Halleen, J. M. (2004). Osteoclast-derived serum tartrate-resistant acid phosphatase 5b in Albers-Schönberg disease (Type II Autosomal dominant osteopetrosis). *Clin. Chem.*, 50, 883 ~ 890.
4. Allen, M. J. (2003). Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Vet. Clin. Pathol.* 32, 101 ~ 113.
5. Ambroszkiewicz, J., Sands, D., Gajewska, J., Chelchowska, M. and Laskowska-Klita, T. (2013). Bone turnover markers, osteoprotegerin and RANKL cytokines in children with cystic fibrosis. *Adv. Med. Sci.*, 58, 338 ~ 343.
6. Barrington, G. M., McFadden, T. B., Huyler, M. T. and Besser, T. E. (2001). Regulation of colostrogenesis in cattle. *Lives Livest. Prod. Sci.* 70, 95 ~ 104.
7. Beagley, J. C., Whitman, K. J., Baptiste, K. E. and Scherzer, J. (2010). Physiology and treatment of retained fetal membranes in cattle. *J. Vet. Intern. Med.*, 24, 261 ~ 268.
8. Bichara, M., Mercier, O., Borensztein, P. and Paillard, M. (1990). Acute metabolic acidosis enhances circulating parathyroid hormone, which contributes to the renal response against acidosis in the rat. *J. Clin. Invest.*, 86, 430 ~ 444.
9. Blum, J. W. and Hammon, H. (2000). Colostrum effects on the gastrointestinal tract, and on nutritional, endocrine and metabolic parameters in neonatal calves. *Livest. Prod. Sci.* 66, 151 ~ 159.
10. Blättler, U., Hammon, H. M., morel, C., Philipona, C., Rauprich, A., Romé, V., Huërou-Luron, I. L., Guilloteau, P. and Blum, J. W. (2001). Feeding colostrum, its composition and feeding duration variably modify proliferation and morphology of the intestine and

- digestive enzyme activities of neonatal calves. *J. Nutr.*, 131, 1256 ~ 1263.
11. Bojkovski, J., Borožan, S., Jozef, I. and Šamanc, H. (2005). Colostrum composition before and after calving in Holstein-Friesian cows. *Vet. Rec.*, 156, 744 ~ 745.
 12. Boskey, A. L. and Coleman, R. (2010). Aging and bone. *J. Dent. Res.*, 89, 1333 ~ 1348.
 13. Bouroutzoglou, M., Malamitsi-Puchner, A., Boutsikou, M., Marmarinos, A., Baka, S., Boutsikou, T., Hassiakos, D., Gourgiotis, D. and Briana, D. D. (2014). Biochemical markers of bone resorption are present in human milk: implications for maternal and neonatal bone metabolism. *Acta Paediatrica*, 103, 1264 ~ 1269.
 14. Boyle, W. J., Simonet, W. S. and Lacey, D. L. (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature*. 423, 337 ~ 342.
 15. Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., Scully, S., Tan, H. L., Xu, W., Lacey, D. L., Boyle, W. and Simonet, W. S. (1998). Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes. Dev.*, 12, 1260 ~ 1268.
 16. Cao, J., Venton, L., Sakata, T. and Halloran, B. P. (2003). Expression of RANKL and OPG correlates with age-related bone loss in male C57BL/6 Mice. *J. Bone Miner. Res.*, 18 270 ~ 277.
 17. Cao, J., Wronski, T. J., Iwaniec, U., Phleger, L., Kurimoto, P., Boudignon, B. and Halloran, B. P. (2005). Aging increases stromal/osteoblastic cell- induced osteoclastogenesis and alters the osteoclast precursor pool in the mouse. *J. Bone Miner. Res.*, 20, 1659 ~ 1668.
 18. Capuco, A. V., Akers, R. M. and Smith, J. J. (1997). Mammary growth in Holstein cows during the dry period: quantification of nucleic acids and histology. *J. Dairy Sci.* 80, 477 ~ 487.
 19. Casabiell, X., Pineiro, V., Tome, M. A., Peino, R., Dieguez, C. and Casanueva, E. F. (1997). Presence of leptin in colostrum and/or breast milk from lactating mothers: a potential role in the regulation of neonatal food intake. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 82, 4270 ~ 4273.
 20. Chapinal, N., Carson, M. E., Duffield, T. F., Capel, M., Godden, S., Overton, M., Santos, J. E. P. and LeBlanc, S. J. (2011). The association of serum metabolites with clinical

- disease during the transition period. *J. Dairy Sci.* 94, 4897 ~ 4903.
21. Chapinal, N., Carson, M. E., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E., Godden, S., Capel, M., Santos, J. E. P., Overton, M. W. and Duffield, T. F. (2012). The association of serum metabolites in the transition period with milk production and early-lactation reproductive performance. *J. Dairy Sci.*, 95, 1301 ~ 1309.
 22. Chiwome, B., Kandiwa, E., Mushonga, B., Sajeni, S. and Habarugira, G. (2017). A study of the incidence of milk fever in Jersey and Holstein cows at a dairy farm in Beatrice, Zimbabwe. *J. S. Afr. Vet. Assoc.*, 11, 1019 ~ 1028.
 23. Claeys, W. L., Ludikhuyze, L. R., Van Loey A. M. and Hendrickx, M. E. (2001). Inactivation kinetics of alkaline phosphatase and lactoperoxidase, and denaturation kinetics of β -lactoglobulin in raw milk under isothermal and dynamic temperature conditions. *J. Dairy Res.* 68, 95 ~ 107.
 24. Clemens, J. D., Herrick, M. V., Singer, F. R. and Eyre, D. R. (1997). Evidence that serum NTx (collagen-type I N-telopeptides) can act as an immunochemical marker of bone resorption. *Clin. Chem.* 43, 2058 ~ 2063.
 25. Commun, L., Velek, K., Barby, J. –B., Pun, S., Rice, A., Mestek, A., Egli, C. and Leterme, S. (2016). Detection of pregnancy-associated glycoproteins in milk and blood as a test for early pregnancy in dairy cows. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 28, 207 ~ 213.
 26. Connerty, H. V. and Briggs, A. R. (1966). Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, 290 ~ 296.
 27. Dahiya, N., Khadka, A., Sharma, A. K., Gupta, A. K., Singh, N. and Brashier, D. B. S. (2015). Denosmab: A bone antiresorptive drug. *Med. J. Armed Forces India*, 7, 71 ~ 75.
 28. DeGaris, P. J. and Lean, I. J. (2009). Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *Vet. J.*, 176, 58 ~ 69.
 29. Devkota, B., Takahashi, M., Sato, S., Sasaki, K., Ueki, A., Osawa, T., Takahashi, M. and Yamagishi, N. (2015). Plasma fluctuation in estradiol-17 β and bone resorption markers around parturition in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 875 ~ 878.
 30. Devkota, B., Takahashi, M., Sasaki, K., Osawa, T., Izaike, Y. and Yamagishi, N. (2013). Fluctuation in plasma bone metabolic markers in multiparous and primiparous

- Holstein cows during early to peak lactation. *J. Vet. Med. Sci.* 75, 1257 ~ 1260.
31. Donovan, S. M. and Odle, J. (1994). Growth factors in milk as mediators of infant development. *Annu. Rev. Nutr.*, 14, 147 ~ 167.
 32. Dratwa A. (2006). Atrial natriuretic peptide and renal haemodynamics in newborn calves. *Acta vet Brno.* 75, 477 ~ 483.
 33. Dunsworth, H. M., Warrener, A. G., Deacon, T. Ellison, P. T. and Pontzer, H. (2012). Metabolic hypothesis for human altriciality. *PNAS.* 109, 15212 ~ 15216.
 34. Ekelund, A., Spömdly, R. and Holtenius, K. (2006). Influence of low phosphorus intake during early lactation on apparent digestibility of phosphorus and bone metabolism in dairy cows. *Livest. Sci.*, 99, 227 ~ 236.
 35. Elisondo-Salazar, J. A. and Heinrichs, A. J. (2008). Review: heat treating bovine colostrum. *T PAS.* 24, 530 ~ 538.
 36. Elisondo-Salazar, J. A. and Heinrichs, A. J. (2009). Feeding heat-treated colostrum or unheated colostrum with two different bacterial concentrations to neonatal dairy calves. *J. Dairy Sci.* 92, 4565 ~ 4571.
 37. Erben, R. G. (2001). Vitamin D analogs and bone. *J. Musculoskel. Neuron Interact.*, 2, 59 ~ 69.
 38. Faber, S. N., Faber, N. E., McCauley, T. C. and Ax, R. L. (2005). Case study: effects of colostrum ingestion on lactational performance. *Prof. Anim. Scientist.* 21, 420 ~ 425.
 39. Fata, J. E., Kong, Y. -Y., Li, J., Sasaki, T., Irie-Sasaki, J., Moorehead, R. A., Elliot, R., Scully, S., Voura, E. B., Lacey, D. L., Boyle, W. J., Khokha, R., and Penninger, J. M. (2000). The osteoclast differentiation factor osteoprotegerin-ligand is essential for mammary gland development. *Cell*, 103, 41 ~ 50.
 40. Filipović, N., Stojević, Z., Zdelar-Tuk, M. and Kušec, V. (2008). Plasma parathyroid hormone-related peptide and bone metabolism in periparturient dairy cows. *Acta Vet. Hung.* 56, 235 ~ 244.
 41. Fleenor, W. A. and Stott, G. H. (1980). Hydrometer test for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. *J. Dairy. Sci.* 63, 973 ~ 977.
 42. Foley, J. A. and Otterby, D. E. (1978). Availability, storage, treatment, composition, and

- feeding value of surplus colostrum: a review. *J. Dairy Sci.* 61. 1033 ~ 1060.
43. Fu, Q., Jilka, R. L., Manolagas, S. C. and O'Brien, C. A. (2002). Parathyroid hormone stimulates receptor activator NF κ B ligand and inhibits osteoprotegerin expression via protein kinase A activation of cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.*, 277, 48868 ~ 48875.
 44. Fu, Y. -X., Gu, J. -H., Zhang, Y. -R., Tong X. -S., Zhao, H. -Y., Yuan, Y., Liu, X. -Z., Bian, J. -C. and Liu, Z. -P. (2013). Inhibitory effects of osteoprotegerin on osteoclast formation and function under serum-free conditions. *J. Vet. Sci.* 14, 4045 ~ 412.
 45. 福永重治, 田中晶子, 原環, 竹之内一昭, 中村富美男(1997). ウシ胎盤コラーゲンの特徴, 北畜会報, 39, 43 ~ 46.
 46. Garnero, P., Ferreras, M., Karsdal, M. A., Nichmhlaoibh, R., Risteli, J., Borel, O., qvist, P., Delmas, P. D., Foged, N. T. and Delaiss , J. M. (2003). The type I collagen fragments ICTP and CTX reveal distinct enzymatic pathways of bone collagen degradation. *Miner. Res.* 18, 859 ~ 867.
 47. Godden, S. (2008). Colostrum management for dairy calves. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 24, 19 ~ 39.
 48. Goff, J. P. (2000). Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 16, 319 ~ 337.
 49. Goff, J. P. (2008). The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet. J.* 176: 50 ~ 57.
 50. Goff, J. P., Horst, R. L., Mueller, F. J., Miller, J. K., Kiess, G. A. and Dowlen, H. H. (1991). Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever. *J. Dairy Sci.*, 74, 3863 ~ 3871.
 51. Goff, J. P., Kimura, K. and Horst, R. L. (2002). Effect of mastectomy on milk fever, energy, and vitamins A, E, and β -carotene status at parturition. *J. Dairy Sci.* 85, 1427 ~ 1436.
 52. Goff, J. P., Littledike, E. T. and Horst, R. L. (1986). Effect of synthetic bovine parathyroid hormone in dairy cows: prevention of hypocalcemic parturient paresis. *J. Dairy Sci.* 69,

2278 ~ 2289.

53. Goings, R. L., Jacobson, N. L., Beitz, D. C., Littledike, E. T. And Wiggers, K. D. (1974). Prevention of parturient paresis by a prepartum, calcium-deficient diet. *J. Dairy Sci.*, 57, 1184 ~ 1188.
54. Golub, E. E. and Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. *Curr. Opin. Orthp.* 18, 444 ~ 448.
55. Green, H. B., Horst, R. L., Beitz, D. C. and Littledike, 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.
56. Greiner, C., Cavalier, E., Remy, B., Gabriel, A., Farnir, F., Gajewski, Z. and Carstensen, B. (2012). Biochemical markers of bone turnover during pregnancy in horses: a longitudinal study. *Pol. J. Vet. Sci.* 15, 793 ~ 795.
57. Grimaud, E., Soubigou, L., Couillaud, S., Coipeau, P., Moreau, A., Passuti, N., Gouin, F., Redini, F. and Heymann, D. (2003). Receptor activator of nuclear factor κ B Ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. *Am. J. Pathol.* 163, 2021~ 2031.
58. Gursoy, U. K., Könönen, E., Huuonen, S., Tervahartiala, T., Pussinen, P. J., Suominen, A. L. and Sorsa, T. (2013). Salivary type I collagen degradation end-products and related matrix metalloproteinases in periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 40, 18 ~ 25.
59. Hadorn, U., Hammon, H., Bruckmaier, R. M. and Blum, J. W. (1997). Delaying colostrum intake by one day has important effects on metabolic traits and on gastrointestinal and metabolic hormones in neonatal calves. *J. Nutr.* 127, 2011 ~ 2023.
60. Hakeda, Y., Kobayashi, Y., Yamaguchi, K., Yasuda, H., Tsuda, E., Hagishio, K., Miyata, T. and Kumegawa, M. (1998). Osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) directly inhibits bone-resorbing activity of isolated mature osteoclasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 796 ~ 801.
61. Halleen, J. M., Räisänen, S., Salo, J. J., Reddy, S. V., Roodman, G. D., Hentunen, T. A., Lahenkari, P. P., Kaija, H., Vihko, P. and Väänänen, H. K. (1999). Intracellular

- fragmentation of bone resorption products by reactive oxygen species generated by osteoclastic tartrate-resistant acid phosphatase. *J. Biol. Chem.* 274, 22907 ~ 22910.
62. Halleen, J. (2006). Tartrate-resistant acid phosphatase 5b (TRACP5b) as a maker of bone resorption. *Clin Lab.* 52, 499 ~ 509.
 63. Hammon, H. M., Zanker, I. A. and Blum, J. (2000). Nutrition, feeding, and calves. Colostrum feeding affects IGF-I and insulin plasma concentrations in neonatal calves. *J. Dairy Sci.* 83, 85 ~ 92.
 64. Hanai, H., Brennan, D. P., Cheng, L., Goldman, M. E., Chorev, M., Levine, M. A., Sacktor, B. and Liang, C. T. (1988). Downregulation of parathyroid hormone receptors in renal membranes from aged rats. *Am. J. Physiol.*, 259, F444 ~ F450.
 65. Hanson, D. A., Weis, M. E., Bollen, A-M., Maslan, S. L., Singer, F. R. and Eyre, D. R. (1992). A specific immunoassay for monitoring human bone resorption: quantitation of type I collagen cross-linked N-telopeptides in urine. *J. Bone Miner. Res.* 7, 1251 ~ 1258.
 66. Hatate, K., Kawashima, C., Hanada, M., Kayano, M. and Yamagishi, N. (2018). Short communication: serum osteoprotegerin concentrations in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 101, 6622 ~ 6626.
 67. Hatate, K., Shinya, K., Matsu-Sato, A., Sasaki, S., Devkota, B., Takahashi, M., Hirata, T., Yamagishi, N. (2016). Changes in the plasma levels of several bone markers in newborn calves during the first two days of life. *J. Vet. Med. Sci.* 78, 337 ~ 340.
 68. Harirah, H. M., Borahay, M. A., Zaman, W., Ahmed, M. S. and Hankins, G. D. (2012). Increased apoptosis in chorionic trophoblasts of human fetal membranes with labor at term. *Int. J. Clin. Med.*, 3, 136 ~ 142.
 69. Hibbs, J. W. (1950). Milk fever (parturient paresis) in dairy cows – a review. *J. Dairy Sci.*, 33, 758 ~ 789.
 70. Hofbauer, L. C., Khosla, S., Dunstan, C. R., Lacey, D. L., Boyle, W. J. and Riggs, L. (2000). The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J. Bone Miner. Res.* 15, 2 ~ 12.
 71. 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. Endocr.*, 88,

161 ~ 171.

72. 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.
73. Horst, R. L., Goff, J. P. and Reinhardt, T. A. (1990). Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25 – dihydroxyvitamin D receptor. *Endocrinology*, 126, 1053 ~ 1057.
74. 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.
75. Hussein, H. A., El-Razik, K. A. E. A., Gomaa, A. M., Elbayoumy, M. K., Abdelrahman, K. A. and Hosein, H. I. (2018). Milk amyloid A as a biomarker for diagnosis of subclinical mastitis in cattle. *Vet. World*, 11, 34 ~ 41.
76. 稲葉正章, 西澤良記 (2008). III. 骨粗鬆症 2. 骨粗鬆症の検査, 診断の進歩, 日内会誌 97, 2452 ~ 2458.
77. Indrodason, 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.
78. Infante, M., Fabi, A., Cognetti, F., Gorini, S., Caprio, M. and Fabbri, A. (2019). RANKL/RANK/OPG system beyond bone remodeling: involvement in breast cancer and clinical perspectives. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 8, doi: <https://doi.org/10.1186/s13046-018-1001-2>
79. Jackson, H. D., Pappenhagen, A. R., Goetsch, G. D. and Noller, C. H. (1962). Effect of parathyroid hormone on calcium and other plasma constituents of dairy cattle near parturition. *J. Dairy Sci.*, 45, 897 ~ 903.
80. Janckila, A. J., Takahashi, K., Sun, S. Z. and Yam, L. T. (2001). Naphtol-ASBI phosphate as a preferred substrate for tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b. *J. Bone Miner. Res.* 16, 788 ~ 793.
81. Ježek, J., Cincović, M., Belić, N. B., Djoković, R., Klinkon, M. and Starić, J. (2017). Beta-hydroxybutyrate in milk as screening test for subclinical ketosis in dairy cows. *Pol. J. V. Sci.*, 20, 507 ~ 512.

82. Ježek, J. and Klinkon, M. (2004). Influence of colostral immunity on gain and health status in calves. *Acta Agric. Slov. supplement 1*, 179 ~ 184.
83. Jones, C. M., James, R. E., Quigley, J. D. III. And McGilliard, M. L. (2004). Influence of pooled colostrum or colostrum replacement on IgG and evaluation of animal plasma in milk replacer. *J. Dairy Sci.* 87, 1806 ~ 1814.
84. Kelly, O., Cusack, S. and Cashman, K.D. (2003). The effect of bovine whey protein on ectopic bone formation in young growing rats. *Br. J. Nutr.* 90, 557 ~ 564.
85. Kenž, A., Koch, C., Korst, M., Kesser, J., Eder, K., Sauerwein, H. and Huber, K. (2018). Different milk feeding intensities during the first 4 weeks of rearing dairy calves: Part 3: Plasma metabolomics analysis reveals long-term metabolic imprinting in Holstein heifers. *J Dairy Sci.* 101, 1 ~ 15.
86. Kesser, J., Korst, M., Koch, C., Romberg, F. –J., Müller, U., Schmicke, M., Eder, K., Hammon, H. M., Sadri, H. and Sauerwein, H. (2017). Different milk feeding intensities during the first 4 weeks of rearing in dairy calves: Part 2: Effects on the metabolic and endocrine status during calfhod and around the first lactation. *J. Dairy Sci.* 100, 3109 ~ 3125.
87. Kiesel, L. and Kohi, A. (2016). Role of the RANK/RANKL pathway in breast cancer. *Maturitas*, 86, 10 ~ 16.
88. Kiezebrink, D. J., Edwards, A. M., Wright, T. C., Cant, J. P. and Osborne, V. R. (2015). Effect of enhanced whole-milk feeding in calves on subsequent first-lactation performance. *J. Dairy Sci.* 98, 349 ~ 356.
89. Kim, D., Yamagishi, N., Ueki, A., Miura, M., Saito, F., Sato, S. and Furuham, K. (2010). Changes in plasma bone metabolic markers in periparturient dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 773 ~ 776.
90. Korst, M., Koch, C., Kesser, J., Müller, U., Romberg, F. –J., Rehage, J., Eder, K. and Sauerwein, H. (2017). Different milk feeding intensities during the first 4 weeks of rearing in dairy calves: Part 1: Effects on performance and production from birth over the first lactation. *J. Dairy Sci.* 100, 3096 ~ 3108.
91. Koshihara, Y., Suematsu, A., Feng, D., Okawara, R., Ishibashi, H. and Yamamoto, S.

- (2002). Osteoclastogenic potential of bone marrow cells increases with age in elderly women with fracture. *Mech. Ageing. Dev.*, 123, 1321 ~ 1331.
92. Kovacs, C. S. and Kronenberg, H. M. (1997). Maternal-fetal calcium and bone metabolism during pregnancy, puerperium, and lactation. *Endocr. Rev.* 18, 832~872.
 93. Kovacs, C. S. (2015). Calcium, phosphorus and bone metabolism in the fetus and newborn. *Early Hum. Dev.* 91, 623 ~ 628.
 94. Kraut, J. A., Mishler, D. R. Singer, F. R. and Goodman, W. G. (1986). The effect of metabolic acidosis on bone formation and bone resorption in the rat. *Kidney Int.*, 30, 694 ~ 700.
 95. Kume, S., Nonaka, K. and Osita, T. (2003). Relationship between parity and mineral status in dairy cows during the periparturient period. *Anim. Sci. J.* 74, 211 ~ 215.
 96. Kume, S., Toharmat, T. and Kobayashi, N. (1998). Effect of restricted feed intake of dams and heat stress on mineral status of newborn calves. *J. Dairy Sci.* 81, 1581 ~ 1590.
 97. Kurosaki, N., Yamato, O., Sato, J., Naito, Y., Mori, F., Imoto, S. and Maeda, Y. (2007). Biomarkers or 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.
 98. Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. –L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliot, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. –X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J. Delaney, J. and Boyle, W. J. (1998). Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93, 165 ~ 176.
 99. Lacoste, H., Fan, T. M., Lorimier, L-P. Charney, S. C. (2006). Urine N-telopeptide excretion in dogs with appendicular osteosarcoma. *J. Vet. Intern. Med.* 20, 335 ~ 341.
 100. Lapage, O. M., Côtéaux, L. D., Marcoux, M. and Tremblay, A. (1991). Circadian rhythms of osteoclastin in equine serum correlation with alkaline phosphatase, calcium, phosphate and total protein levels. *Can. J. Vet. Res.*, 55, 5 ~ 10.
 101. Lapage, O. M., Carstanjen, B. and Uebelhart, D. (2001). Non-invasive assessment of equine bone: an update. *Vet. J.*, 161, 10 ~ 23.

102. Lei, H., Furth, E. E., Kalluri, R., Chiou, T., Tilly, K. I., Tillu, J. L., Elkon, K. B., Jeffrey, J. J. and Strauss, J. F. III. (1996). A program cell death and extracellular matrix degradation is activated in the amnion before the onset of labor. *J. Clin. Invest.*, 98, 1971 ~ 1978.
103. Leikina, E., Merts, M. V., Kuznetsova, N. and Leikin, S. (2002). Type I collagen is thermally unstable at body temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 1314 ~ 1318.
104. Liesegang, A., Chiappi, C., Risteli, J., 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 (Berl)* 91, 120 ~ 129.
105. 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.
106. 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.
107. Lim, S., MacIntyre, D. A., Lee, Y. S., Khanjani, S., Terzidou, V., Teoh, T. G. and Bennett, P. R. (2012). Nuclear factor kappa B activation occurs in the amnion prior to labour associated genes. *Plos One.*, 7, e34707.
108. Littledike, E. T. (1976). Relationship of milk secretion to hypocalcemia in the dairy cow. *J. Dairy Sci.*, 59, 1947 ~ 1953.
109. Lonergan, M., Aponso, D., Marvin, K. W., Helliwell, R. J. A., Sato, T. A., Mitcheli, M. D., Chaiwaropongsa, T., Romero, R. and Keelan, J. A. (2003). Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL), TRAIL receptors, and the soluble receptor osteoprotegerin in human gestational membranes and amniotic fluid during pregnancy and labor at term and preterm. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 88, 3835 ~ 3844.
110. Lorget, F., Clough, J., Oliveira, M., Daury, M. C., Sabokbar, A. and Offord, E. (2002). Lactoferrin reduces in vitro osteoclast differentiation and resorbing activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 261 ~ 266.
111. Ma, Y. L., Cain, R. L., Halladay, D. L., Yang, X., Zeng, Q., Miles, R. R., Chandrasekhar,

- S., Martin, T. J. and Onyia, J. E. (2001). Catabolic effects of continuous human PTH (1-38) *in Vivo* is associated with sustained stimulation of RANKL and inhibition of osteoprotegerin and gene-associated bone formation. *Endocrinology*, 142, 4047 ~ 4054.
112. Machida, Y. and Nakanishi, T. (1982). Utilization of bacterial xanthine oxidase for inorganic phosphorus determination. *Agri. Biol. Chem.*, 46, 807 ~ 808.
113. Makhluף, H. A., Mueller, S. M., Mizuno, S. and Glowacki, J. (2000). Age-related decline in osteoprotegerin expression by human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 268, 669 ~ 672.
114. Martig, J. and Mayer, G. P. (1973). Diminished hypercalcemic response to parathyroid extract in prepartum cows. *J. Dairy Sci.*, 56, 1042 ~ 1046.
115. Martinez, N., Risco, C. A., Lima, F. S., Bisinotto, R. S., Greco, L. F., Ribeiro, E. S., Maunsell, F., Galvão, K. and Santos, J. E. P. (2012). Evaluation of periparturient calcium status, energetic profile, and neutrophil function in dairy cows at low or high risk of developing uterine disease. *J. Dairy Sci.*, 95, 7158 ~ 7172.
116. Martin-Tereso, J., Puijenbroek, R. Vuuren, A. M., Laar, H., Hartog, L. A., Verstegen, M. W. A. (2011). Effect of feeding rumen protected rice bran on calcium homeostasis of non-lactating multiparous cows. *J. Anim. Physiol. An. N.*, 95, 236 ~ 244.
117. Martin-Tereso, J. and Verstegen, W. A. (2011). A novel model to explain dietary factors affecting hypocalcemia in dairy cattle. *Nutr. Res. Reviews*, 24, 228 ~ 243.
118. Matsuo, A., Togashi, A., Sasaki, S., Devkota, B., Hirata, T. and Yamagishi, N. (2014). Diurnal variation of plasma bone markers in Japanese Black calves. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 1029 ~ 1032.
119. Mayer, G. P. (1968). Role of the parathyroid glands in cows. *Fed. Prod.*, 27, 139 ~ 141.
120. Mayer, M. J., Capuco, A. V., Ross, D. A., Lintault, L. M. and Van Amburgh, M. E. (2006). Developmental and nutritional regulation of the prepubertal heifer mammary gland: I. parenchyma and fat pad mass and composition. *J. Dairy Sci.* 89, 4289 ~ 4297.
121. McGrath, B. A., Fox, P. F., McSweeney, P. L. H. and Kelly, A. L. (2016). Composition and properties of bovine colostrum: a review. *Dairy Sci. & Technol.*, 96, 133 ~ 158.
122. Megahed, A. A., Hiew, M. W. H., Badawy, S. A. E. and Constable, P. D. (2018). Plasma

- calcium concentrations are decreased at least 9 hours before parturition in multiparous Holstein-Friesian cattle in a hard fed an acidogenic diet during late gestation. *J. Dairy Sci.* 101, 1 ~ 14.
123. Melendez, P., Donovan, A. Risco, C. A. and Goff, J. P. (2004). Plasma mineral and energy metabolite concentrations in dairy cows fed an anionic prepartum diet that did or did not have retained fetal membrane after parturition. *AJVR.*, 65, 1071 ~ 1076.
124. 三浦雅一 (2012). 骨粗鬆症診療における骨代謝マーカーの適正使用ガイドライン (2012 年版) の解説. *Animus* 72, 65 ~ 69.
125. Moallem, U., Werner, D., Lehrer, H., Zachut, M., Livshitz, L., Yakoby, S. and Shamay, A. (2010). Long-term effects of ad libitum whole milk prior to weaning and prepubertal protein supplementation on skeletal growth rate and first-lactation milk production. *J. Dairy Sci.* 93, 2639 ~ 2650.
126. Mohebbi, A., Khaghani, A. and Mohammadnia, A. (2010). Bone-specific alkaline phosphatase activity in dairy cows. *Comp. Clin. Path.*, 19, 33 ~ 36
127. Naylor, K. E., Rogers, A., Fraser, R. B., Hall, V., Eastell, R. and Blumsohn, A. (2003). Serum osteoprotegerin as a determinant of bone metabolism in a longitudinal study of human pregnancy and lactation. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88, 5361 ~ 5365.
128. National Research Council (2001). NRC. 7th revised edi., pp. 258 ~ 275. National academy press, Washington, D. C.
129. Neves, R. C., Leno, B. M. Stokol, T., Overton, T. R. and McArt, J. A. A. (2016). Risk factors associated with postpartum subclinical hypocalcemia in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 100, 3796 ~ 3804.
130. 西沢良記, 中村利孝, 市村正一, 太田博明, 串田一博, 五來逸雄, 白木正孝, 茶木修, 福永仁夫, 細井孝之, 三木隆己, 中塚喜義, 三浦雅一 (2004). 骨粗鬆症診療における骨代謝マーカーの適正使用ガイドライン (2004 年度版), *Osteoporosis Jpn.* 12, 11(191) ~ 27(207).
131. Numan, M. S., Amiable, N., Brown, J. P. and Michou, L. (2015). Paget's disease of bone: an osteoimmunological disorder? *Drug Des. Devel. Ther.* 9, 4695 ~ 4707.
132. Oetzel, G. R. (1988). Parturient paresis and hypocalcemia in ruminant livestock. *Vet. Clin.*

- N. Am-Food. A. 4, 351 ~ 364.
- 133.Ogueh, O., Sooranna, S., Nicolaides. K. H. and Johnson, M. R. (2000). The relationship between leptin concentration and bone metabolism in the human fetus. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 85, 1997 ~ 1999.
- 134.太田博明(2012). 骨形成マーカー「骨型アルカリフォスファターゼ」測定の意義と測定法に関する新たな進展 *モダンメディア*, 58, 143 ~ 148.
- 135.Oliveira, M. C., Ceglie, I. D., Arntz, O. J., Van Den Berg, W. B., Van Den Hoogen F. H. J., Ferreira, A. V. M., Van Lent, P. L. E. M. and Van De Loo, F. A. J. (2017). Milk-derived nanoparticle fraction promotes the formation of small osteoclasts but reduces bone resorption. *J. Cell Physiol.* 232, 225 ~ 233.
- 136.Paskalev, M. D. (2010). Comparative investigation on blood bone markers in normally healing and infected bone fracture models in dogs. *BJVM*, 13, 235 ~ 244.
- 137.Perkins, S. L., Gibbons, R., Kling, S. and Kahn, A. J. (1994). Age-related bone loss in mice is associated with an increased osteoclast progenitor pool. *Bone*, 15, 65 ~ 72.
- 138.Phillips, T. A., Ni, J., Pan, G., Ruben, S. M., Wei, Y. -F., Pace, J. L. and Hunt, J. S. (1999). TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J. Immunol.*, 162, 6053 ~ 6059.
- 139.Price, J. S., Jackson, B.F., Gray, J. A., Harris, P. A., Wright, I. M., Pfeiffer, D. U., Robins, S. P., Eastell, R. and Ricketts, S. W. (2001). Biochemical markers of bone metabolism in growing thoroughbreds: a longitudinal study. *Res. Vet. Sci.*, 71, 37 ~ 44.
- 140.Qing, H., Ardeshirpour, L., Pajevic, P. D., Dusevich, V., Jähn, K., Kato, S., Wysolmerski, J. and Bonewald, L. F. (2012). Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodelling in mice during lactation. *J. Bone Miner. Res.* 27, 1018 ~ 1029.
- 141.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.
- 142.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 ~ R704.

143. Reinhardt, T. A., Horst, R. L. and Goff, J. P. (1988). Calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis in ruminants. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, 4, 331 ~ 350.
144. Reinhardt, T. A., Lippolis, J. D., McCluskey, B. J. and Goff, J. P. and Horst, R. L. (2011). Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet. J.*, 188, 122 ~ 124.
145. Roberts, T., Chainal, N., LeBlanc, S. J., Kelton, D. F., Dubuc, J. and Duffield, T. F. (2012). Metabolic parameters in transition cows as indicators for early-lactation culling risk. *J. Dairy Sci.*, 95, 3057 ~ 3063.
146. Rodriguez, E. M., Aris, A. and Bach, A. (2017). Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows. *J. Dairy Sci.*, 100, 7427 ~ 7434.
147. Rogers, A., Saleh, G., Hannon, R. A., Greenfield, D. and Eastell, R. (2002). Circulating estradiol and osteoprotegerin as determinants of bone turnover and bone density in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 87, 4470 ~ 4475.
148. Rowland, G. N., Capen, C. C. and Black, H. E. (1972). Microradiographic evaluation of bone from cows with experimental hypervitaminosis D, diet-induced hypocalcemia, and naturally occurring parturient paresis. *Calc. Tiss. Res.*, 9, 179 ~ 193.
149. Runic, R., Lockwood, C. J., LaChapelle, L., Dipasquare, B., Demopoulos, R. I., Kumar, A. and Guller, S. (1998). Apoptosis and fas expression in human fetal membranes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 83, 660 ~ 666.
150. Sagar, D. R., Ashraf, S., Xu, L., Burston, J. J., Menhinick, M. R., Poulter, C. L., Bennett, A., Walsh, D. A. and Chapman, V. (2014). Osteoprotegerin reduces the development of pain behaviour and joint pathology in a model of osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 73, 1558 ~ 1565.
151. Sasaki, N., Kusano, E., Ando, Y., Nemoto, J., Imura, O., Ito, C., Takeda, S., Yano, K., Tsuda, E. and Asano, Y. (2002). Changes in osteoprotegerin and markers of bone metabolism during glucocorticoid treatment in patients with chronic glomerulonephritis. *Bone*, 30, 853 ~ 858.
152. Sassi, M. -L., Eriksen, H., Risteli, L., Niemi, S., Mansell, J., Gowen, M. and Risteli, J.

- (2000). Immunochemical characterization of assay for carboxyterminal telopeptide of human type I collagen: loss of antigenicity by treatment with cathepsin K. *Bone* 26, 367 ~ 373.
153. Schieferdecker, A., Vigt, M., Riecken, K., Braig, F., Schinke, T., Loges, S., Bokemeyer, C., Fehse, B. and Binder, M. (2014). Denosmab mimics the natural decoy receptor osteoprotegerin by interacting with its major binding site on RANKL. *Oncotarget*, 5, 6647 ~ 6653.
154. Seibel, M. J. (2005). Biochemical markers of bone turnover part I: biochemistry and variability. *Clin. Biochem. Rev.* 26, 97 ~ 122.
155. Seifi, H. A., LeBlanc, S. J., Leslie, K. E. and Duffield, T. F. (2011). Metabolic predictors of post-partum disease and culling risk in dairy cattle. *Vet. J.*, 188, 216 ~ 220.
156. Sidara, K., Inaba, M., Okuno, S., Yamada, S., Kumeda, Y., Imanishi, Y., Yamakawa, T., Ishimura, E. and Nishizawa, Y. (2008). Serum levels of TRAP5b, a new bone resorption marker unaffected by renal dysfunction, as a useful marker of cortical bone loss in hemodialysis patients. *Calcif. Tissue Int.* 82, 278 ~ 287.
157. 白石登業, 鈴木裕史, 越智尚, 川原一恵, 近藤仁司, 永田和彦, 富田耕右 (1991). グルコキナーゼを利用したマグネシウムの酵素的測定法 *臨床化学*, 20, 37 ~ 41.
158. Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H-L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Lee, R., Amgen EST Program and Boyle, W. J. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 89, 309 ~ 319.
159. Soberon, F., Raffrenato, E., Everett, R. W. and Van Amburgh, M. E. (2012). Preweaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *J Dairy Sci.* 95, 783 ~ 793.
160. Solberg, L. B., Stang, E., Brorson, S. -H., Anderson, G. and Reinholt, F. P. (2015). Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) co-localizes with receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) in lysosomal-associated membrane

- protein 1 (LAMP1)-positive vesicles in rat osteoblasts and osteocytes. *Histochem. Cell Biol.* 143, 195 ~ 207.
161. Starić, J. and Zadnik, T. (2010). Biochemical markers of bone metabolism in dairy cows with milk fever. *Acta Vet. Beogr.*, 60, 401 ~ 410.
162. Steinhoff-Wagner, J., Görs, S., Junghans, P., Bruckmaier, R. M., Kanitz, E., Metges, C. C. and Hammon, H. M. (2011). Intestinal glucose absorption but not endogenous glucose production differs between colostrum- and formula-fed neonatal calves. *J. Nutr.* 141, 48 ~ 55.
163. Stott, G. H., Marx, D., Menefee, B. E. and Nightengale, G. T. (1979). Colostral immunoglobulin transfer in calves. I. Period of absorption. *J. Dairy Sci.* 62, 1632 ~ 1638.
164. Stott, G. H., Marx, D., Menefee, B. E. and Nightengale, G. T. (1979). Colostral immunoglobulin transfer in calves. II. The rate of absorption. *J. Dairy Sci.* 62, 1766 ~ 1773.
165. Stott, G. H., Marx, D., Menefee, B. E. and Nightengale, G. T. 1979. Colostral immunoglobulin transfer in calves. III. Amount of absorption. *J. Dairy Sci.* 62, 1902 ~ 1907.
166. Stott, G. H. and Smith, V. R. (1964). Histology, cytology, and size of the parathyroid in bovine related to age and function, *J. Dairy Sci.*, 47, 426 ~ 432.
167. Sugiyama, K., Sakakibara, R., Tachimoto, H., Kishi, M., Kaga, T. and Tabata, I. (2010). Effect of acetic acid bacteria supplementation on muscle damage after moderate-intensity exercise. *Anti-Aging Medicine.* 7, 1 ~ 6.
168. 鈴木祥夫(2018). 総タンパク質の定量法, *ぶんせき*, 1 ~ 9.
169. Taylor M. S., Knowlton, K. F., McGillard, 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.
170. Tenta, R., Bourgiezi, I., Aliferis, E., Papadopoulou, M., Gounaris, A. and Skouroliaou, M. (2013). Bone metabolism compensates for the delayed growth in small for gestational age neonates. *Organogenesis*, 9, 55 ~ 59.

171. Teramura, M., Wynn, S., Reshalaitihan, M., Kyuno, W., Sato, T., Ohtani, M., Kawashima, C. and Hanada, M. (2015). Supplementation with difructose anhydride III promotes passive calcium absorption in the small intestine immediately after calving in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 8688 ~ 8697.
172. Terpos, E., Szydlo, R., Apperley, J. F., Hatjiharissi, E., Politou, M., Meletis, J., Viniou, N., Yataganas, X., Goldman, J. M. and Rahemtulla, A. (2003). Soluble receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio predicts survival in multiple myeloma. Proposal for a novel prognostic index. *Blood*, 102, 1064 ~ 1069.
173. Theill, L. E., Boyle, W. J. and Penninger, J. M. (2002). RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 795 ~ 823.
174. Tivane, C., Rodrigues, M. N., Favaron, P. O., Assis-Neto, A. C., Birgel-Jr, E. H. and Miglino, M. A. (2013). Mechanisms of calcium transport across the placenta: Review. *Open J. Anim. Sci.* 3, 13 ~ 20.
175. Turner, J. R. (2013). Area under the curve (AUC). *In*: Gellman, M. D. and Turner, J. R, [eds] *Encyclopedia of Behavioral Medicine*, pp. 8. Springer, New York.
176. Tyler, J. W., Hancock, D. D., Parish, S. M., Rea, D. E., Besser, T. E., Sanders, S. G. and Wilson, L.K. (1996). Evaluation of 3 assays for failure of passive transfer in calves. *J. Vet. Intern. Med.* 10, 304 ~ 307.
177. Uemura, H., Ysui, T., Kiyokawa, M., Kuwahara, A., Ikawa, H., Matsuzaki, T., Maegawa, M., Furumoto, H. and Irahara, M. (2002). Serum osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor during pregnancy and lactation and the relationship with calcium-regulating hormones and bone turnover markers. *J. Endocrinol.*, 174, 353 ~ 359.
178. Udagawa, N., Takahashi, N., Yasuda, H., Mizuno, A., Itoh, K., Ueno, Y., Shinki, T., Gillespie, M. T., Martin, T. J., Higashino, K. and Suda, T. (2000). Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an important regulator in osteoclast development and function. *Endocrinology*, 141, 3478 ~ 3484.
179. Vidal, K., Van Den Broek, P., Lorget, F. and Donnet-Hughes, A. (2004). Osteoprotegerin in human milk: a potential role in the regulation of bone metabolism and immune development. *Pediatr Res.* 55, 1001 ~ 1008.

180. Wada, T., Nakashima, T., Nishina, H. and Penninger, J. (2006). RANKL-RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease. *Trend Mol. Med.*, 12, 17 ~ 25.
181. Walsh, M. C. and Choi, Y. (2014). Biology of the RANKL-RANK-OPG system in immunity, bone, and beyond. *Front. Immunol.*, 5, 1 ~ 11.
182. Ward, G. M., Blosser, T. H. and Adams, M. F. (1952) The relation of prepartal and postpartal mineral balances to the occurrence of parturient paresis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 35, 587 ~ 594
183. Wathes, D. C., Cheng, Z., Bourne, N., Taylor, V. J., Coffey, M. P. and Brotherstone, S. (2007). Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domest. Anim. Endocrinol.* 33, 203 ~ 225.
184. Watts, N. B. (1999). Clinical utility of biochemical markers of bone remodeling. *Clin. Chem.*, 45, 1359 ~ 1368.
185. Weaver, D.M., Tyler, J.W., VanMetre, D.C., Hostetler, D.E., Barrington, G.M., (2000). Passive transfer of colostral immunoglobulins in calves. *J. Vet. Inter. Med.*, 14, 569 ~ 577
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.
187. 保田 尚孝 (2013). 骨粗鬆症に適応が拡大された抗 RANKL 抗体 *Jpn. J. Clin. Immunol.*, 36, 209 ~ 216.
188. Yano, K., Shibata, O., Mizuno, A., Kobayashi, F., Higashio, K., Morinaga, T and Tsuda, E. (2001). Immunological study on circulating murine osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor (OPG/OCIF): possible role of OPG/OCIF in the prevention of osteoporosis in pregnancy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 288, 217 ~ 224.
189. Yavropoulou, M. P. and Yovos, J. G. (2008). Osteoclastogenesis – current knowledge and future perspectives. *J. Musculoskelet. Neuronal. Interact.* 8, 204 ~ 216.
190. Yokota, K., Sato, K., Miyazaki, T., Kitaura, H., Kayama, H., Miyoshi, F., Araki, Y., Akiyama, Y., Takeda, K. and Miura, T. (2014). Combination of tumor necrosis factor α

and interleukin-6 induced mouse osteoclast-like cells with bone resorption activity both In Vitro and In Vivo. *Arthritis Rheumatol.*, 66, 121 ~ 129.

191. Zanker, I. A., Hammon H. M. and Blum J. W. (2000). Plasma amino acid pattern during the first month of life in calves fed the first colostrum at 0-2 h or at 24-25 h after birth. *J. vet. Med. A*, 46, 107 ~ 121.

192. Zanker, I. A., Hammon H. M. and Blum J. W. (2001). Activities of γ -glutamyltransferase, alkaline phosphatase and aspartate-aminotransferase in colostrum, milk and blood plasma of calves fed first colostrum at 0-2, 6-7, 12-13 and 24-25 h after birth. *J. Vet. Med. A* 48, 179 ~ 185.

付録

Appendix A: 2016年完全混合飼料(TMR)の試料組成

項目	乾乳期飼料	泌乳期飼料
一般成分 (% DM)		
Grass silage	33.6	32.3
Corn silage	29.1	15.5
Orchard hay	12.0	0.0
Soy bean meal	6.4	0.0
Concentrate feed	18.7 ¹	52.0 ²
Vitamin and mineral pre-mix ³	0.2	0.2
DM (%)	41.6	42.5
栄養組成		
CP (%DM)	15.6	15.4
ADF (%DM)	23.5	20.9
Ca (%DM)	0.4	0.5
P (%DM)	0.4	0.4
K (%DM)	1.9	1.6
Mg (%DM)	0.2	0.3
S (%DM)	0.2	0.3
Na (%DM)	0.01	0.1
Cl (%DM)	0.4	0.4
DCAD (meq/100g of DM)	23.4	15.3

¹Dry Base 17 (ホクレンくみあい飼料株式会社, 北海道).

²Milk Trend 74 (中部飼料株式会社, 愛知)

³Yokabita M (雪印種苗株式会社, 北海道)

Appendix B: 2017年完全混合飼料(TMR)の試料組成

項目	乾乳期飼料	泌乳期飼料
一般成分 (% DM)		
Grass silage	24.6	25.6
Corn silage	13.6	28.7
Orchard hay	47.5	2.9
Oilseed & Grain byproduct	6.5	3.5
Beet pulp	-	5.0
Ground Corn	-	2.3
Concentrate mix ¹	6.2	31.6
Vitamin and mineral pre-mix ²	1.6	0.4
DM (%)	46.6	37.5
栄養組成		
CP (%DM)	11.9	14.1
ADF (%DM)	31.3	21.5
Ca (%DM)	0.7	0.5
P (%DM)	0.4	0.4
K (%DM)	2.0	1.6
Mg (%DM)	0.3	0.2
S (%DM)	0.4	0.4
Na (%DM)	0.0	0.1
Cl (%DM)	0.6	0.5
DCAD (meq/100g of DM)	77.8	87.4

¹Farm Aid 18 (雪印種苗株式会社, 北海道)

²酸化マグネシウム, ビタミンE, 天然石膏を含有

Appendix C: 2018年完全混合飼料(TMR)の試料組成

項目	乾乳期飼料	泌乳期飼料
一般成分 (% DM)		
Grass silage	49.8	23.5
Corn silage	16.2	22.7
Orchard hay	12.0	15.7
Beet pulp	0.0	7.2
Ground Corn	0.0	3.4
Concentrate mix ¹	13.0	27.2
Vitamin and mineral pre-mix ²	9.0	0.3
DM (%)	40.3	43.4
栄養組成		
CP (%DM)	13.5	15.2
ADF (%DM)	30.2	22.6
Ca (%DM)	0.7	0.6
P (%DM)	0.5	0.3
K (%DM)	2.1	1.5
Mg (%DM)	0.3	0.2
S (%DM)	0.4	0.2
Na (%DM)	0.0	0.1
Cl (%DM)	0.6	0.5
DCAD (meq/100g of DM)	130.0	165.0

¹Farm Aid 18 (雪印種苗株式会社, 北海道) or Lucey 18 (釧路飼料株式会社, 北海道)

²自家配合10% 天然石膏, 4% ベントナイト, 1% メチオニン, 0.8% マグネシウム, 0.8% ビタミンA, 0.4% ビタミンE, 80% 米ぬか