

氏名 (本 (国) 籍)	羽 立 薫 (東京都)		
主指導教員氏名	帯広畜産大学 教授 山 岸 則 夫		
学位の種類	博士 (獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第551号		
学位授与年月日	令和元年9月20日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻		
研究指導を受けた大学	帯広畜産大学		
学位論文題目	乳用牛の血中ならびに乳中のオステオプロテグリン濃度に関する研究		
審査委員	主査	岩手大学 教授	木崎 景一郎
	副査	帯広畜産大学 教授	猪熊 壽
	副査	帯広畜産大学 教授	山岸 則夫
	副査	岩手大学 教授	山崎 真大
	副査	東京農工大学 教授	福島 隆治
	副査	岐阜大学 准教授	神志那 弘明

学位論文の内容の要旨

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グリン (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变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 分) 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 時間で上昇したが、群間差はなかった。血中 TRAP5b 濃度は両群で 10~30 時間に上昇し、血中 NTX, ALP および BAP 濃度は 10 時間から生後 2 日まで非処理群で高値を示した。生後 24 時間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 時間でピークに達する。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 時間から高値を示したが、血中 OPG 濃度は 20 時間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。

以上、本研究では、分娩前後の乳牛の血中 OPG 濃度の推移を解析し、産次の増加が乳牛の低 Ca 血症のリスク要因であることを示した。また、血中 OPG 濃度の測定が、分娩時の低 Ca 血症における骨代謝の評価に繋がることも示した。一方、初乳は OPG を含有するが、初乳中 OPG 濃度から母子の骨代謝を評価することは困難と考えられた。しかし、初乳中の OPG 濃度は NTX 濃度と強い相関を示すことから、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。

審 査 結 果 の 要 旨

申請者は、分娩乳牛の血中オステオプロテゲリン (OPG) 濃度から分娩前後の骨吸収状態と血中カルシウム (Ca) 濃度の低下 (低 Ca 血症) との関係を一明らかにするとともに、初乳中の OPG 濃度により母牛と新生子牛の骨代謝を評価することを目的に、以下の研究を行った。

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

血中 OPG 濃度は、初産牛では分娩前後を通して低値で推移した。経産牛の血中 OPG 濃度は分娩前 3 週で産次が高いほど低値であったが、2 産ではその後分娩日にかけて減少し、3 産以上では一定の値で推移した。以上より、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、産次を重ねた高齢牛では OPG による破骨細胞分化の制御が低いことが示唆された。

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連

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 血症牛と健常牛との間にも差が見られなかった。以上より、初乳中の OPG は分娩時の骨代謝および血中 Ca 濃度の影響を受けず、母体血中の OPG とは由来が異なることが示唆された。

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 分) 初乳 (HT 群) を与え、初乳と出生後 7 日までの血中の OPG 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、UH 群の血中 OPG 濃度は初乳摂取後 20~30 時間で上昇したが、群間差はなかった。したがって、初乳中の OPG が新生子牛の骨代謝に及ぼす影響は小さいと考えられた。

申請者は、乳用牛で初めて分娩前後の血中 OPG 濃度の推移を明らかにし、産次の増加が乳牛の低 Ca 血症のリスク要因であることを示した。また、血中 OPG 濃度の測定が、分娩時の低 Ca 血症における骨代謝の評価に繋がることも示した。一方、初乳は OPG を含有するが、初乳中 OPG 濃度から母子の骨代謝を評価することは困難と考えられた。しかし、初乳中の OPG 濃度は I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (NTX) 濃度と強い相関を示すことから、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。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

1) 題 目 : *Short communication*: Serum osteoprotegerin concentrations in periparturient dairy cows

著 者 名 : Hatate, K., Kawashima, C., Hanada, M., Kayano, M. and Yamagishi, N.

学術雑誌名 : Journal of Dairy Science

巻・号・頁・発行年 : 101 (7): 6622–6626, 2018

2) 題 目 : The effect of colostrum intake on osteoprotegerin and bone metabolic markers in the blood of newborn calves during the first week of life

著 者 名 : Hatate, K., Kayano, M., Kawashima, C., Hanada, M., Bicalho, R. C. and Yamagishi, N.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 81 (1): 15–21, 2019

既発表学術論文

1) 題 目 : Humeral fracture in a Japanese Black calf repaired by closed approach and two methods of external skeletal fixation

著 者 名 : Yamagishi, N., Kajiwara, A., Shibano, K., Aoki, T., Itoh, M., Hatate, K. and Iino, K.

学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年 : 79 (6): 1056–1060, 2017

2) 題 目 : Polysplenia syndrome with duodenal and pancreatic dysplasia in a

Holstein calf: a case report

著者名：Kondoh, D., Kawano, T., Kikuchi, T., Hatate, K., Watanabe, K., Sasaki, M., Yamagishi, N., Inokuma, H. and Kitamura, N.

学術雑誌名：BMC Veterinary Research

巻・号・頁・発行年：13 (1) : 292, 2017

- 3) 題 目：Evaluation of usefulness of a commercial agarose gel electrophoresis kit (QuickGel SP) for bovine serum protein electrophoresis

著者名：Okatsu, Y., Yamagishi, N., Hatate, K. and Devkota, B.

学術雑誌名：Polish Journal of Veterinary Sciences

巻・号・頁・発行年：20 (3) 527-534, 2017

- 4) 題 目：Serum activities of two bone markers in captive Asian elephants (*Elephas maximus*) at different ages

著者名：Takehana, K., Hatate, K. and Yamagishi, N.

学術雑誌名：The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年：80 (1) 63-67, 2018

- 5) 題 目：Effective hands-on treatment of a corneal dermoid in a calf

著者名：Hatate, K., Sasaki, J., Katayama, M., Sekiguchi S. and Yamagishi, N.

学術雑誌名：Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society

巻・号・頁・発行年：69 (1) 883-888, 2018

- 6) 題 目：Effect of dietary difructose anhydride III supplementation on bone mineral density and calcium metabolism in late-lactation dairy cows

著者名：Maetani, A., Ohtani, M., Hatate, K., Matsumoto, K. and Yamagishi, N.

学術雑誌名：The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年：80 (7): 1061-1067, 2018

- 7) 題 目：Determination of serum bone-specific alkaline phosphatase isoenzyme activity in captive Asian elephants (*Elephas maximus*) using an agarose gel electrophoresis method

著者名：Takehana, K., Onomi, R., Hatate, K. and Yamagishi N.

学術雑誌名：The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年：81 (4): 551-554, 2019