アガロースゲル電気泳動キットを用いて測定した乳用牛の血清アルカリフォスファターゼアイソザイム活性に関する研究

2020 年

岐阜大学大学院連合獣医学研究科

（帯広畜産大学）

千葉　暁子

アガロースゲル電気泳動キットを用いて測定した乳用牛の血清アルカリフォスファターゼアイソザイム活性に関する研究

略語一覧

AGE	アガロースゲル電気泳動
ALP	アルカリフォスファターゼ
ALP2	肝型アルカリフォスファターゼ
ALP3	骨型アルカリフォスファターゼ
ALP4	胎盤型アルカリフォスファターゼ
ALP5	高分子小腸型アルカリフォスファターゼ
BAP	骨特異的アルカリフォスファターゼ
BW	体重
HI 法	熱不活性化法
P 処理	プロテアーゼ処理
PN 処理	プロテアーゼ+ノイラミニダーゼ処理
t-ALP	総 ALP
WGLP 法	小麦胚芽レクチン沈殿法
WH	体高

目次

緒言……………………………………………………………………………3

第1章：ホルスタイン種乳用牛における出生から18ヶ月齢までの血清アルカリフォスファターゼ活性値の経時的変化……………………………6

１．はじめに…………………………………………………………………....7

２．材料および方法……………………………………………………………8

３．成績……………………………………………………………………..11

４．考察……………………………………………………………………..14

５．小括……………………………………………………………………..16

６．図および図説明…………………………………………………………..18

第2章：ホルスタイン種乳牛における泌乳期ならびに周産期の血清ALPアイソザイム活性値の推移…………………………………………………...22

１．はじめに…………………………………………………………………...23

２．材料および方法…………………………………………………………...24

３．成績……………………………………………………………………...26

４．考察……………………………………………………………………...28

５．小括……………………………………………………………………...30

６．図および図説明…………………………………………………………...32

総括……………………………………………………………………………36

謝辞……………………………………………………………………………40

引用文献………………………………………………………………………41

緒言

アルカリフォスファターゼ（alkaline phosphatase: ALP）は，アルカリ性条件下にてリン酸エステル化合物を無機リンとアルコールに加水分解する酵素であり，全身の細胞膜上に局在し，一部が血清中に水溶性形態として存在している（18）。多くの動物種と同様に，子牛（出生から生後83日）の血中総ALP（t-ALP）活性値は成牛よりも有意に高値であり（26），妊娠や泌乳により上昇することが報告されている（43, 44）。そのため牛の血清t-ALP活性値の正常範囲は広いため（0～488 U/*l*），牛臨床における臨床的価値が高いとは見なされず（25），診断に利用される機会が少ないのが現状である。

ALPにはアイソザイムが存在し，家畜においては組織非特異型と腸型の２つが大別されている（17）。組織非特異型は肝臓，骨，胎盤などで多く産生され，各臓器に特異的な糖鎖付加を受けることから，肝型（ALP2），骨型（ALP3），胎盤型（ALP4）のアイソザイムとして電気泳動法により検出可能である（10, 39）。ヒト医療ではALPアイソザイムをALP2，ALP3，ALP4，腸型（ALP5）に分類しており，骨や肝臓の疾患で血中のALP2やALP3の活性値が上昇することが知られている（5, 27）。

血中のALP3に相当する骨型アルカリフォスファターゼ（Bone-specific alkaline phosphatase: BAP）の活性値の測定方法として熱変性（heat inactivation; HI）法と小麦胚芽レクチン沈殿（wheat germ lectin precipitation; WGLP）法が知られている。HI法とWGLP法では安定した測定結果を得るには習熟した実験技術を有する実験者が測定する必要があり，肝型ALPの影響を受けて感度や特異性に悪影響が生じることが指摘されている（40）。一方，電気泳動法はALPアイソザイムを分画として正確に分離することが可能と報告されている（40, 34）。

近年，血中ALPアイソザイム活性値を測定する方法としてアガロースゲル電気泳動（AGE）法が開発され，医療分野にて肝臓や骨に関わる疾病の診断・治療に広く臨床応用されている。一方，牛臨床における血清ALPアイソザイム活

性値の有用性や活用法に関する報告は少なく，その臨床意義は明らかにされていない。AGE法はヒトの臨床検査センターで広く採用されている方法であり，獣医療分野においても利用できれば広く普及することが可能と考えられる。そこで，本学位論文では，AGE法による血中ALPアイソザイム活性値の測定が獣医療分野へ臨床応用可能であるという仮説のもと，ヒト用AGEキットを用いた血中ALPアイソザイム活性値の測定法の確立ならびに獣医療への応用に向けた基礎データの収集を目的とした。第１章では，乳用子牛の出生後18ヶ月間に採取した血清を用いてALPアイソザイムの分離について検証するとともに，週齢および月齢の進展に伴うALPアイソザイム活性値の推移を明らかにした。第２章では，乳牛を対象に泌乳ステージならびに周産期の血中ALPアイソザイム活性値の推移を明らかにした。

第１章

ホルスタイン種乳用牛における出生から18ヶ月齢までの血清アルカリフォスファターゼ活性の経時的変化

１.はじめに

酪農場経営において子牛の哺乳は必要不可欠な飼養過程であり，毎年，この期間に約25-35%の子牛が淘汰されるとの報告がある（35）。したがって，哺乳期間の適切な栄養と飼養管理は安定した牧場経営のために重要であり，予定した成育状況からの逸脱は重大な問題と見なされる（35）。子牛の哺乳と離乳，その後の飼養管理の最終目標は，子牛が適正な骨格成長を遂げて成長し初回分娩月齢に到達すること（9）であり，血液生化学検査は子牛の哺乳効率と成長を間接的にモニタリングする手法として期待されている（7）。一方，ウシ血清中のt-ALP活性値ならびにその骨型アイソザイムであるBAP活性値は年齢に応じた骨成長の指標であり，成長と加齢に伴い減少することが報告されている（48）。したがって，血清中のt-ALPならびにALPアイソザイム活性値は，子牛の哺乳期からその後の成長過程の骨格形成のモニタリング指標になると考えられる。

近年，Onomi *et al.*（38）は新生子牛の血清を用いてAGE法とHI法による骨型ALP活性値（前者による活性値をALP3，後者による活性値をBAPと呼称する）の測定を行い，t-ALP活性値が1000 U/*l*未満の血清であれば，希釈をしなくてもALP3活性値とBAP活性値は高い相関と一致度を有し，それ故，AGE法はHI法に代替可能であることを報告した。この報告の測定法は，プロテアーゼとノイラミニダーゼにて前処理（PN処理）した血清を電気泳動してALP2およびALP3の２つの明瞭なバンドを分離する方法であった。ヒト血清ではノイラミニダーゼ処理した検体の電気泳動においてALP5がALP3に重複するものが存在する（46）ことから，プロテアーゼ単体による処理（P処理）によってALP5をALP3から単離する手法も行われている（37）。したがって，現在，医療分野ではP処理ならびにPN処理された2種類の血清を同時に電気泳動する方法（AGE変法）が最も詳細にアイソザイムを分離する手法と考えられている（37）。

ウシ血清においてもAGE変法の使用によって血清ALP3活性値の正確な測定が可能であり，子牛の哺乳期からその後の成長過程の骨格形成を反映する指標になるとの仮説が立てられる。本章では，ホルスタイン雌子牛11頭における出生から18ヶ月齢までの血清ALP3活性値の経時的推移を明らかにし，体重ならびに体高との関係を調査した。併せて，血清ALP2ならびにALP5活性値の推移も明らかにした。

２.材料および方法

２−１．供試動物ならびに実験概要

本研究は，帯広畜産大学附属牧場にて出生した11頭のホルスタイン雌子牛を用いて行った。子牛は出生後直ちに母牛から分離し，比重1044 kg/m^{3}以上の良質な初乳（11）を出生当日中に3回給与した（合計6 *l*）。2日目から７日目までは，3 *l*の代用乳（カーフトップEx；全酪連，東京，日本）を1日2回給与した。その後，カーフスターター（カーフマンナ；フタバ飼料，栃木，日本）と自動カーフフィーダー（VARIO + automatic feeder； Förster- Technik GmbH, Engen, Germany）により代用乳を給与し，乾草，水を自由採食とした。6週齢まで1日6 *l*の代用乳を給与し，体重（BW）が77 kg以上となった子牛は給与量を徐々に減らしていき，７週齢までに1日3 *l*とした。8週齢まで1日3 *l*とし，その後離乳とした。6週齢におけるBWが77 kg未満の場合，77 kgに到達するまで6 *l*の給与を継続した。

離乳（平均±標準偏差[SD]：9.6±0.7週齢，範囲：8.8〜10.9週齢）後，体重に応じて群を移動させた（〜150 kg，〜200 kg，〜300 kg）。配合飼料（新幼牛グリーン；ホクレンくみあい飼料，札幌，日本），ビタミン，ミネラルを成長に合わせて，自由採食の乾草および水と給与した。BW300 kgを超えたのち，再度牛群を移動し， グラスサイレージおよび配合飼料（ファームエイド18；雪印

種苗株式会社，札幌，日本）を含むTMR（Total Mixed Ration）をビタミン，ミネラル類，自由採食の乾草および水と共に給与した。また，13.4±1.1ヶ月齢（範囲：11.8〜15.3ヶ月齢）において人工授精を行った。研究期間中，当牧場における飼料管理は日本飼養標準に準じて行われていた。

血液サンプルは，離乳前においては初乳摂取前（0），1，2，3，4，6および8週齢（0.25，0.5，0.75，1，1.5，2ヶ月齢）にて，離乳後においては3，4，5，6，8，10，12，15，18ヶ月齢にて頸静脈より採取した。血液は5mLのプレイン真空採血管（ベノジェクトII；テルモ，東京，日本）に採取し，遠心後，血清は解析まで-60℃にて保存した。BWは体重計（EziWeight5i Wight System; Datamars Inc., Temple, テキサス，アメリカ）を用いて0，1，2，3，4，5，6，8，10，12，15および18ヶ月齢にて測定した。体高（WH）は2週齢，1，2，3，4，5，6，8，10および12ヶ月齢において測定した。BWとWHの日ごとの増加率（daily BW gainおよびdaily WH gain）は連続した２点間の差を日数で割ることで求めた。

２−２．血清総ALP（t-ALP）活性値の測定

血清t-ALP活性値は，ラボアッセイALPキット（和光純薬株式会社，大阪，日本）ならびに分光光度計（NIVO 5S，PerkinElmer, Inc., アメリカ）を用いて測定した（吸光度：405 nm）。

２−３．AGE法による血清ALPアイソザイム活性値の測定

AGE法によるALPアイソザイム活性値の測定には，クイックジェルALPアガロースゲルキット（J713，株式会社ヘレナ研究所，埼玉，日本），クイックジェルALP（骨型）（J871，株式会社ヘレナ研究所）および全自動電気泳動分析装置（エパライザ2，株式会社ヘレナ研究所）を用いた。ALPアイソザイムの標準指

標として，ALP2およびALP3の分画を有するヒト血清にウシの肝臓（ALP2の指標）と腸管（ALP5の指標）組織抽出液を混合したコントロール血清（218J-5139，株式会社ヘレナ研究所）を用いた。血清サンプルは60 µ*l*用意し，専用のサンプルウェルプレートの各ウェル上に，①サンプル30 µ*l*にプロテアーゼ（300 U/ml）4 µ*l*と精製水2 µ*l*を添加混合したサンプル（P処理サンプル）と，②サンプル30 µ*l*にプロテアーゼ（300 U/ml）4 µ*l*とノイラミニダーゼ試薬2 µlを添加混合したサンプル（PＮ処理サンプル）を注入し，室温で30分間反応させた。次いで，装置に入れ，アガロースゲルに塗布し15℃，230 V，23分の条件で電気泳動を行った。電気泳動後，アガロースゲルをnitroblue tetrazolium色素で染色し，Edbank IIIソフトウェア（株式会社ヘレナ研究所）によってALP2，ALP3ならびにALP5の各割合を判定した。AGE変法において，P処理サンプルではALP5分画は陰極側に単独分離され，陽極側にはALP2とALP3が重複して描出される（21）。一方，PN処理サンプルでは，ALP2単独分離が陽極側に単独分離されるが，陰極側でALP3にALP5が重複して描出される。したがって，各分画の割合の判定には，P処理ならびにPN処理サンプルでそれぞれALP5ならびにALP2の割合を算出し，次いで，PN処理サンプルの陰極側分画よりALP5の割合を除して算出した。それぞれの活性値はt-ALP活性値にそれぞれの分画割合を乗じて算出した。

２−４．血清BAP活性値の測定

BAP活性値は，Mohebbi *et al.*（33）が報告した熱不活化法により測定した。すなわち，同一血清からt-ALP活性値測定用サンプルと熱処理用サンプルを用意し，熱処理用血清のみを56℃のウォーターバスで15分保温した。その後，直ちに冷却（4℃）後，t-ALP活性値測定用サンプルと熱処理用サンプルのALP活性値を，ラボアッセイALPキットならびに分光光度計（NIVO 5S）を用いて測

定した。BAPは56℃の加温により失活する性質を有するため，t-ALP活性値から熱処理用サンプルのALP活性値を差し引いた値をBAP活性値とした。

２−５．統計学的解析

血清t-ALPおよびALPアイソザイム（ALP2，ALP3およびALP5）活性値，BWならびにWHの経時的推移の解析において，各時期の数的データを平均値±標準偏差にて示した。血清t-ALPおよびALPアイソザイム（ALP2，ALP3およびALP5）活性値における離乳前後の比較ならびに離乳前および離乳後の各期間内での変化は，Kolmogorov-Smirnov normality testによる正規性検定の実施後，one-way repeated-measures ANOVAおよびHolm post hoc testを用いて解析した。これらの統計処理には，R（The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria）のグラフィカルインターフェイスであるEZR（埼玉医療センター，自治医科大学，埼玉，日本）を使用し，有意水準を$P<0.05$とした。

血清ALP3活性値とBAP活性値の相関と一致度について，Deming回帰法ならびにBland-Altman法を用いて解析した。供試牛1頭あたり16回の反復測定があるため一致限界（limit of agreement, LoA）の調整（4）を行った。また，Critchley and Critchley（6）の方法に準じてLoAを算出し，その割合が20％未満の場合に2つの測定値が一致すると判定した。これらの統計処理にはPrism ver. 6 for Windows （GraphPad Software, La Jolla, CA, USA）を使用し，有意水準を$P<0.05$とした。

３．成績

３−１．血清ALPアイソザイムのAGE電気泳動像

Figure 1-1にP処理ならびにPN処理サンプルのAGE電気泳動像を示した。すべての血清において，P処理サンプルではALP5に反応したバンドが陰極に，

ALP2およびALP3が重複したバンドが陽極側に認められた。PN処理サンプルではALP2のバンドが陽極に，ALP3およびALP5の重複バンドが陰極に認められた。

３－２．血清t-ALPおよびALPアイソザイム活性値の推移

Figure 1-2に，血清t-ALP，ALP2，ALP3，ALP5活性値の離乳前（0〜8週齢），離乳後（3〜18ヶ月齢）における変化を示した。ALP3はt-ALP活性値の64.1〜77.5%と大部分を占めており，ALP2およびALP5はそれぞれ19.0〜31.4%，3.5〜6.6%であった。離乳前の6つの採血タイミング（1，2，3，4，6，8週齢）において血清t-ALP活性値は，離乳後における全ての採血タイミング（3，4，5，8，10，12，15，18ヶ月齢）の値より有意に高値であった（P<0.01〜0.05）。離乳前の4つの採血タイミング（1，4，6，8週齢）における血清ALP3活性値は，離乳後の7つの採血タイミング（3，4，8，10，12，15，18ヶ月齢）の値よりも有意に高値であった（P<0.01〜0.05）。血清ALP2活性値は，離乳前の2〜8週齢と比較して離乳後の3ヶ月齢は有意に低値であった（P<0.01〜0.05）。血清ALP5活性値には離乳前後の採血タイミングで有意差はなかった。

離乳前において，11頭の子牛のt-ALP活性値は1週および6週齢において二峰性のピーク（1139.2±297.6および1136.0±263.4U/l）を示し，3週齢において最低値（775.6±149.3U/l；二峰性ピークとの差P<0.01〜0.05）となった。ALP3活性値は，t-ALPと類似した変動をし，1週および6週齢における二峰性ピーク（883.0±266.6，822.0±240.1 U/l）と3週齢における最低値（495.9±133.3 U/l；二峰性ピークとの差 P<0.01〜0.05）を示した。

離乳後において，t-ALP活性値は3ヶ月齢において最低値（423.4±222.8 U/l）を示し，その後増加して6ヶ月齢においてピーク（785.2±179.2 U/l; 最低値との差P<0.05）となった後は18ヵ月齢まで一定であった。同様に，ALP3活性値も3

ヵ月齢において最低値（289.6±188.9 U/*l*）を，その後増加して6ヵ月齢においてピーク（567.3±171.5 U/*l*, 最低値との差*P*<0.05）となった後は一定であった。

３−３．BWならびにWHの推移

Figure 1-3では，BWとWH，1日あたりのBWおよびWHの増加量の変化を示した。出生時（初乳摂取前）のBWは41.1±4.4 kgであり，18ヵ月齢で556.5±32.8 kgまで増加した。WHは2週齢で81.6±3 cmで，12ヵ月齢までに131.3±3.6 cmとなった。これらの測定値は，日本ホルスタイン登録協会（http://hcaj.lin.gr.jp）が公表する子牛のBW（40.0〜458.0 kg）およびWH（75.1〜122.4 cm）の基準値と同等以上の推移を見せた。本研究で用いた子牛の6ヶ月齢までの1日あたりのBW増加率は基準値と近い値であったが，その後は18ヶ月齢まで継続して基準値よりも高値を示していた。特に，4ヶ月齢における1日あたりのBWの増加量（3から4ヵ月齢のBWの増加量を日数で除して求めた）は基準値よりも低値であった。1日あたりのWH増加量は，4ヵ月および5ヵ月齢において著しく減少したものの，12ヵ月齢までに基準データと類似して徐々に減少していた。

３−４．血清ALP3およびBAP活性値の相関と一致度

血清ALP3およびBAP活性値の相関と一致度に関する成績をFigure1-4に示した。Deming回帰解析では，回帰直線は$y = 0.83x + 41.3$で有意な相関関係（*P*<0.0001）を示した。Bland-Altman解析では，平均バイアスは−56.3で，すべてのプロットが95%一致限界の範囲内に存在した。また，Critchley and Critchley（6）の方法に準じて算出したLoAの割合は16.2%［（−86.6 / 534.93）×100］であった。

４．考察

本章では，ホルスタイン種子牛11頭の出生直後から18ヵ月齢までの血清中のt-ALPならびにALPアイソザイム活性値の経時的な変化を調査した。AGE変法によってALPアイソザイムの分離が可能であり，ALP3がt-ALPの大部分を占めること（64.1〜77.5%）が示された。また，本章においてALP3活性値とBAP活性値との間には有意な相関と高い一致度が確認された。したがって，ウシ血清においてもAGE変法で測定したALP3活性値は，従前の報告（38）と同様に，骨形成の指標としてBAP活性値に代替可能と考えられた。一般に幼若動物における血清t-ALP活性値は高値であり（10），子猫，子犬，子馬および子牛等の若齢動物または成長過程の個体において血清ALP3あるいはBAP活性値が大半を占めること（2, 10, 20, 38）が報告されている。本研究の血清t-ALPおよびALP3活性値の結果は，これら既報のデータと類似するものであった。

血中のALP3活性値は骨代謝マーカーの一つであり，骨芽細胞の活性化（2, 45）や細胞外の石灰化（15）を反映する指標と考えられている。本章において，離乳前の血清t-ALPおよびALP3活性値は，1週および6週齢で増加する二峰性ピークの像を示した。Hatate *et al.*（19）は初乳中のALPの大部分が新生子牛の循環中へ移行し，初乳摂取後10〜30時間において血中のt-ALPおよびBAP活性値が著しく増加することを報告した。出生後1〜2日の子猫においても，初乳摂取後に血清t-ALP活性値が増加することが報告されている（10）。したがって，本章で認められた1週齢における血清t-ALPおよびALP3活性値の増加は，初乳摂取に起因する増加と考えられた。

本章では，血清t-ALPおよびALP3活性値は，離乳後の最初の採血タイミングであった3ヶ月齢において，離乳前の全ての採血時点の活性値よりも有意に低下した。また，3ヶ月齢時の血清ALP2活性値も2〜8週齢時の活性値よりも有意な低値を示した。ヒトでは血清t-ALP活性値の減少は低栄養状態の場合に起こ

ることが報告されている（16）。子牛では離乳前後で第四胃対する第一胃の容量は38%から67%に増加する（9）。子牛にとって離乳は採食物を液体（ミルク）から固形（乾草や配合飼料）へと徐々に変化させるものであり，栄養摂取が不十分になりやすい時期である（41, 47）。子牛の成長過程において，血清t-ALP活性値は飼料摂取量（42）や飼料効率（3）と相関することが報告されている。本章において，1日あたりのBWおよびWH増加量はそれぞれ4ヶ月および4〜5ヶ月齢において減少傾向であったことから，体格および骨格の活発な成長が離乳後に一過性に減速したことが推察された。一方，本章の子牛において，離乳後に血清ALP2活性値の有意な低下が認められ，一過性の肝機能の低下が疑われた。今後，他の血液生化学検査項目と併せて栄養状態や肝機能の評価が必要であるが，今回観察された離乳後の一過性の血清t-ALP，ALP2およびALP3活性値の低下は，離乳に伴う飼料摂取量の低下，栄養不足ならびに骨形成の減少に関連する所見と推定された。

離乳後の血清t-ALPおよびALP3活性値は増加し，6ヶ月齢でピークを示し，その後は一定に推移した。離乳後の子牛では採食時間は増加し，6ヵ月齢で成牛と同等になることが知られている（28）。したがって，今回観察された離乳後の血清t-ALPおよびALP3活性値の増加は，採食時間とBW増加に伴う骨形成の増進を反映した所見と推察された。

本章において観察された出生直後から18ヶ月齢までの血清ALP3活性値の推移において，1週齢での一過性の増加と3週齢での有意な低下を除外すれば，6週齢をピークとして徐々に減少する推移を辿るように見えた。子牛の1日あたりのWHの増加量は1〜2ヶ月齢で最も高いことから（Figure 1-3），6週齢前後に骨形成が加速することが示唆された。一方，ALP3には細胞外石灰化の促進を促す作用が示唆されている（15, 19）ため，3週齢における血清ALP3活性値の低下には初乳中ALP3による骨芽細胞由来ALP3の内因性放出抑制が関わった可能性が

疑われた。離乳後最初の採血時（３ヶ月齢）における血清ALP3活性値の低下は骨形成の抑制を示唆する所見である。離乳は子牛に飼料移行による大きなストレスがかかる時期である（47）。本研究において，1日あたりのBWおよびWH増加量は，それぞれ4ヶ月および4〜5ヶ月齢において基準値を下回っており，この変化は離乳や群の移動時期と一致していた。したがって，血清ALP3活性値の減少は，離乳や群移動に関する飼養管理上の異常を検出する血液生化学的指標になることが示唆された。

本章の結論として，AGE変法で測定された血清ALP2およびALP3活性値は，ホルスタイン子牛の哺乳，離乳および成長過程における栄養状態や骨格成長のモニタリングに有用な血液生化学的指標として利用可能であることが示唆された。今後，本法により測定された血清ALPアイソザイム活性値を臨床応用するためには，子牛の栄養状態の異常や肝臓機能および骨代謝に関わる疾患を対象にした検討が必要である。

５．小括

ホルスタイン雌子牛11頭の出生から18ヶ月齢までの期間に経時的採取した血清について，P処理ならびにPN処理された血清について同時にアガロースゲル電気泳動を行うAGE変法による解析を行った。本法により血清中のALP2，ALP3およびALP5の分離と活性値の測定が可能であり，ALP3がt-ALPの最も主要なアイソザイムであった（64.1〜77.5%）。出生直後から18ヶ月齢までの血清t-ALPならびにALP3活性値は，全体として，6週齢をピークとし，その後徐々に減少する推移を示したが，哺乳期間中では1週齢での一過性の増加と3週齢での有意な低下，離乳後は3ヶ月齢で一過性の低下を伴っていた。また，血清ALP2活性値においても3ヶ月齢で一過性の低下が認められた。哺乳期間中の血清t-ALPおよびALP3活性値の二峰性の増加は，初乳からの移行（1週齢）と骨形成

の亢進（6週齢）という二つの要因による影響と考えられた。また，離乳後（3ヶ月齢）の血清t-ALP，ALP2，ALP3活性値は，離乳に伴う飼料摂取量の低下，栄養不足ならびに骨形成の減少に関連する所見と推定された。以上より，AGE変法で測定された血清ALPアイソザイム活性値は，ホルスタイン子牛の哺乳，離乳および成長過程における栄養状態や骨格成長のモニタリングに有用な血液生化学的指標として利用可能であることが示唆された。

６．図および図説明

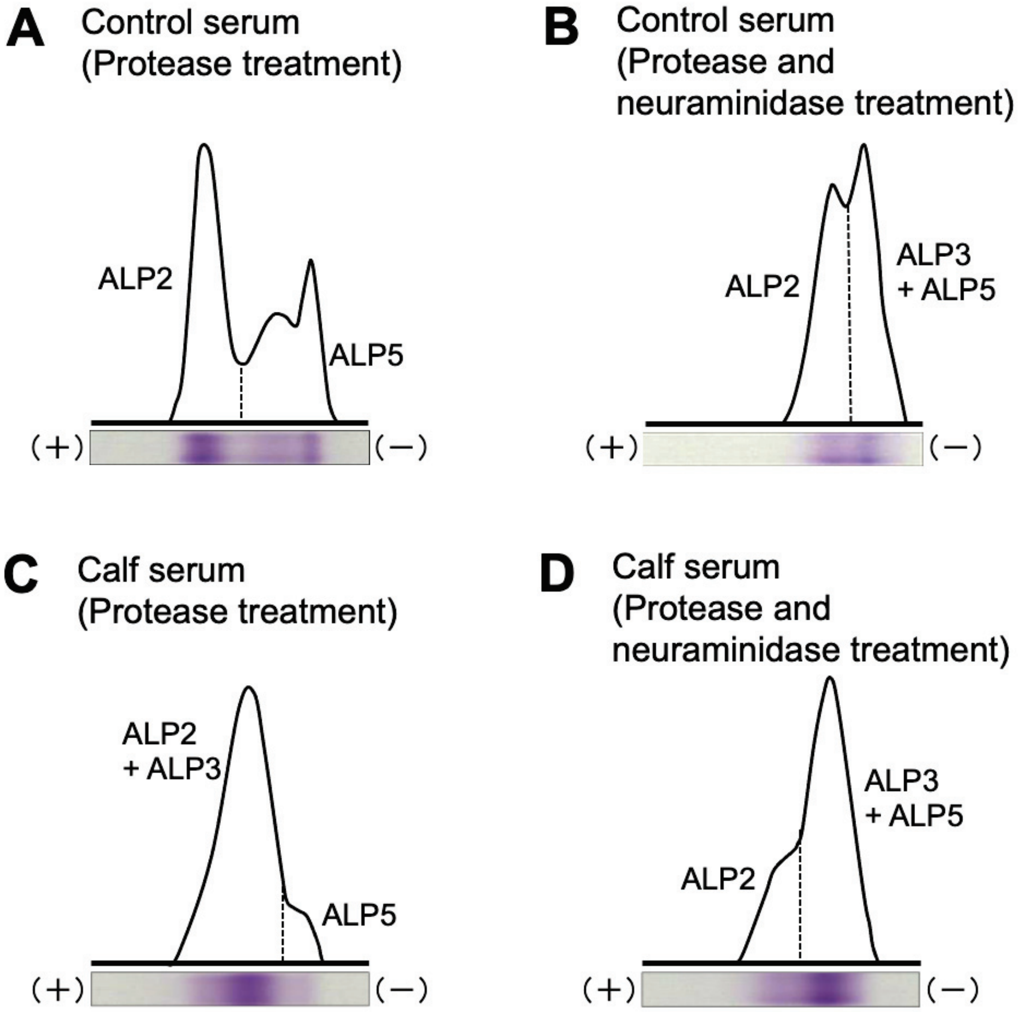

Figure 1-1. Representative densitometric images (electrophoretograms) of control serum (A and B) and a serum sample from a 15-month-old heifer (C and D). ALP2, hepatic ALP isoenzyme; ALP3, bone ALP isoenzyme; ALP5, intestinal ALP isoenzyme; ALP2+ALP3, the overlapping ALP2 and ALP3 fraction; ALP3+ALP5, the overlapping ALP3 and ALP5 fraction.

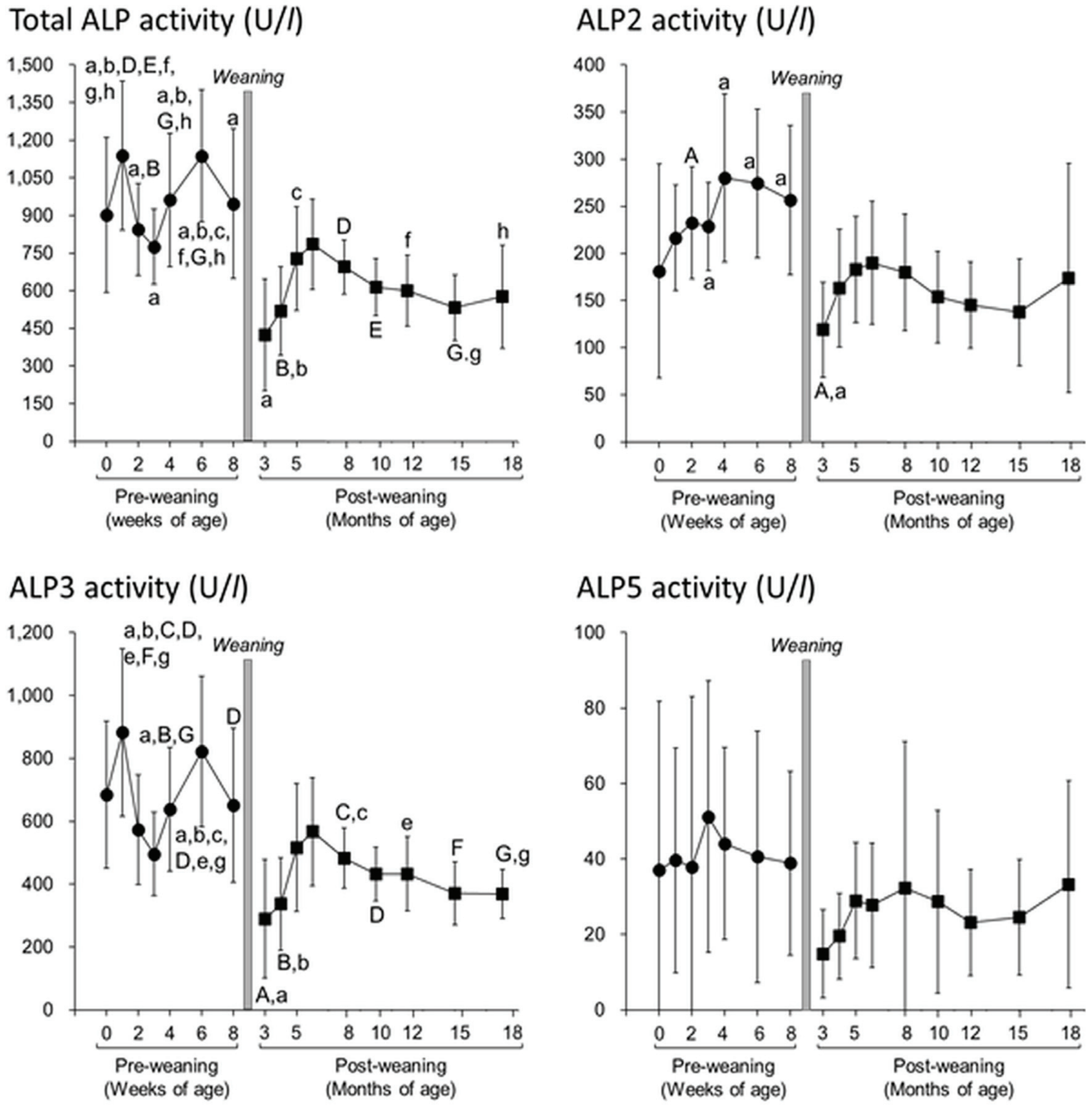

Figure 1-2. Comparison of serum activities (mean ± SD) of total ALP and each ALP isoenzyme (ALP2, ALP3, and ALP5) between the pre-weaning (0–8 weeks; ●) and post-weaning (3–18 months; ■) periods in 11 heifers. Superscript letters indicate significant differences in mean values between the pre-weaning and post-weaning: ^{A,B,C,D,F,G} $P < 0.05$, $^{a,b,c,e,g}P < 0.01$.

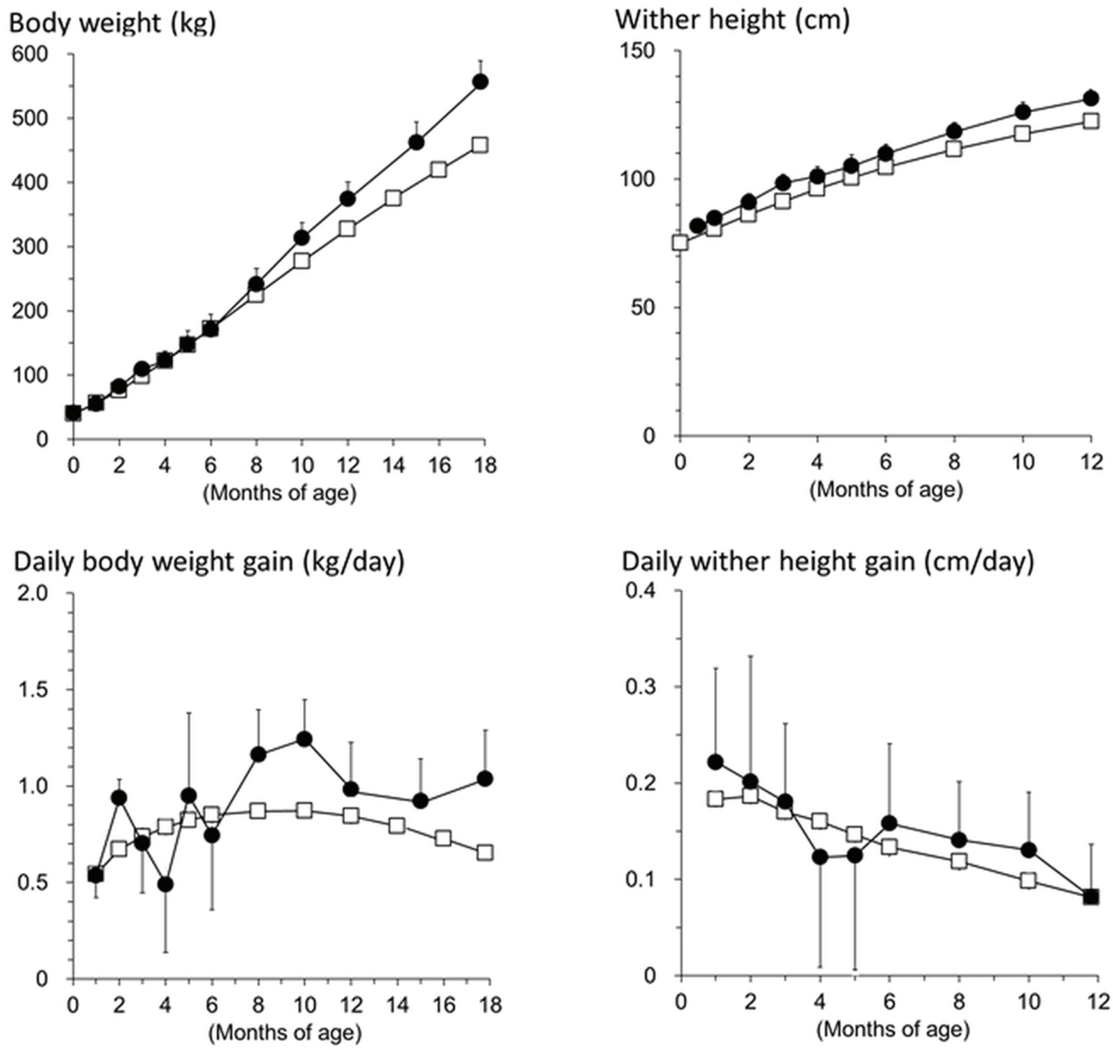

Figure 1-3. Changes in body weight (BW), wither height (WH), and daily BW and WH gains of 11 Holstein heifers (●). For comparison, the standard values of mean BW, WH, and daily BW and WH gains of Holstein heifers in Japan obtained from the public data of the Holstein Cattle Association of Japan (http://hcaj.lin.gr.jp/) are also shown (□).

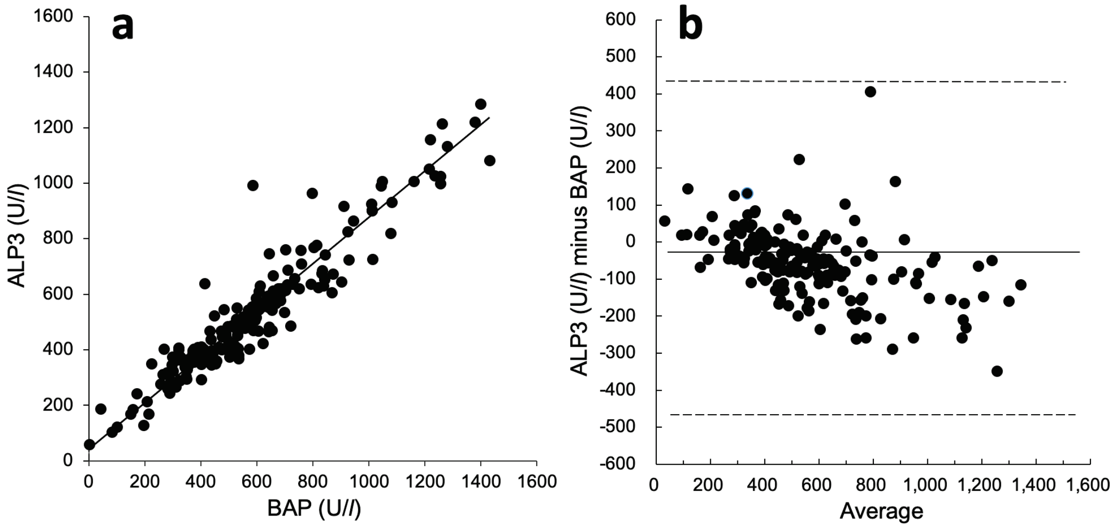

Figure 1-4. Scatterplot (a) and Bland-Altman plot (b) of the serum ALP3 and BAP activities in serum samples from 11 clinically healthy Holstein heifers during the first 18 months of life. (a) Deming's regression: y = 0.83x + 41.3 (r=0.90, *P*<0.0001). (b) Mean bias (solid line): −56.3. The 95% confidence limits of agreement are −523.4 – 410.8 (dotted lines).

第２章

ホルスタイン種乳牛における泌乳期ならびに周産期の血清ALPアイソザイム活性値の推移

１．　はじめに

乳牛は大量の牛乳を生産することが最も重要な仕事とされ，分娩後間も無く大量の泌乳を開始する。泌乳に伴い乳汁中にミネラル等の栄養素を排出しエネルギーも消費するため，ミネラルおよびエネルギー代謝に多くの負荷がかかる。とくに泌乳初期では，乳汁中への急激なカルシウム（Ca）喪失と骨吸収の抑制に伴う低Ca血症や体脂肪の過剰な動員によるケトーシスあるいは肝機能低下といった代謝性疾患に陥る個体もある（12）。骨吸収マーカーの一つとして，血清酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ（TRAP5b）がある。TRAP5bは成熟した破骨細胞によって産生・分泌される酵素であり，その血中濃度は破骨細胞数と高い相関性を有することが報告されている（1）。しかし，その血中濃度と血中Ca濃度との関係性は不明であり，乳牛における実用性は明らかでない。一方で，泌乳期ならびに妊娠期の乳牛における血清中のt-ALP活性値は非泌乳・非妊娠牛と比較して高値を示すこと（43, 44）は知られているが，泌乳ならびに妊娠ステージにおける血清中ALPアイソザイム活性値を測定した報告はほとんど見当たらない。第１章で示した通り，AGE法では3種類のALPアイソザイムを同時に測定可能である。したがって，とくに血清ALP2ならびにALP3活性値は，乳牛の泌乳期ならびに周産期における肝機能ならびに骨代謝の指標になることも考えられる。

本章では泌乳牛ならびに妊娠牛における血清ALPアイソザイム活性値を明らかにする目的で，２つの実験を行った。実験1では，泌乳期を3ステージに分け，各ステージの血清ALPアイソザイム活性値を比較した。実験2では，分娩前3週から分娩後までの周産期における血清ALPアイソザイム活性値の推移を観察した。なお，血清ALPアイソザイム活性値の測定は，全てAGE法によって実施した。

２．材料および方法

２−１．実験１：泌乳期における血清ALPアイソザイム活性値の推移

２−１−１．供試血清

実験には，帯広畜産大学附属牧場におけるホルスタイン種の搾乳牛53頭［1.9〜8.4才齢；初産牛24頭，経産牛29頭（2〜6産）］から採取され，凍結保管（−20℃）されていた血清を用いた。これらの血清は，牧場内で定期的に実施されている代謝プロファイルテスト（MPT）の際に採取されたものであり，全ての供試牛はMPTの結果から健康であると判断されたものである。なお，当牧場において，泌乳牛はフリーストールで1群飼育され，水および乾草の自由摂取と1日2回のTMR［濃厚飼料: 乾物中（DM）27.2%，グラスサイレージ：23.5%DM，コーンサイレージ：22.7%DM］の給餌がされていた。牛群検定における経産牛1頭あたりの平均年間乳量は11,192 kg，個体平均管理乳量は37.9 kg，平均産次数は2.2産，平均分娩間隔は402日であった。

２−１−２．血清t-ALPおよびALP活性値の測定

血清t-ALPおよびALP活性値は，第１章と同様の方法にて測定した。

２−１−３．統計学的解析

解析に際し，供試牛の泌乳ステージを，泌乳前期（泌乳10〜110日；early-to-peak），中期（泌乳111〜220日；middle），後期（泌乳221〜477日；late）の3ステージに区分し，全ての数的データを中央値，最大値および最小値と四分位値（IQR）で表した。データはKruskal-Wallis検定とSteel-Dwass検定を用いて初産牛および経産牛における泌乳ステージ間の有意差の検定を行った。同じ泌乳ステージにおける初産牛と経産牛の比較にはMann-Whitney U検定を用いた。統計処理には，R（The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria）のグ

ラフィカルインターフェイスであるEZR（埼玉医療センター，自治医科大学，埼玉，日本）を使用し，有意水準をP<0.05とした。

２−２．実験２：周産期における血清ALPアイソザイム活性値の推移

２−２−１．供試牛ならびに採血

帯広畜産大学附属牧場にて飼養されていたホルスタイン種乳牛24頭［妊娠末期の経産牛13頭（2～4産），未経産牛11頭］から採血を行った。供試牛は乾乳牛を1群管理するフリーストールにおいて，自由飲水，乾草の自由採食のほか，グラスサイレージ，コーンサイレージ，濃厚飼料，ビタミン，ミネラルを含んだTMRを給与されていた。全ての飼料は，日本飼料標準に準じた移行期乳牛における一般的成分組成に準拠するものであった［Ca: 0.7%DM，Mg: 0.3% DM，飼料中陽イオン・陰イオン格差（dietary cation-anion difference; DCAD）: 7.8-23.3mEq/100g DM］。全供試牛は正常分娩で出産し，採血期間中を通して臨床的に健康と判断されたものであった。

採血は分娩前3週（分娩前18～24日：−3weeks），分娩前2週（分娩前17～11日：−2weeks），分娩前1週（分娩前10～3日：−1week），分娩当日（分娩後12時間以内：day 0），分娩後5日（5 days）に尾静脈より行い，遠心後，−60℃にて凍結保存した。

２−２−２．血清t-ALPおよびALP活性値の測定

血清t-ALPおよびALP活性値は，第１章と同様の方法にて測定した。

２−２−３．TRAP5b活性値の測定

TRAP5bは，ナフトールーASBIーリン酸（富士フイルムワコーケミカル株式会社）を基質とした酵素反応による蛍光測定法（22, 31, 48）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 µlを基質（0.25 mmol/l）と反応（37℃，30 min）させ，マルチラベルカウンター（NIVO 5S）により蛍光度を測定した（励起波長：405 nm，蛍光波長：535 nm）。

２−２−４．血清カルシウム（Ca）濃度の測定

血清カルシウムCa濃度は，自動血液生化学分析装置（TBA-120FR; 東芝医療システム，東京，日本）を用いて測定した。

２−１−４．統計学的解析

数値データは平均±標準偏差で示した。血中の各測定値の推移を固定効果（群，時間，群×時間），供試牛を変量効果とした混合効果モデル（PROC MIXED）を用いて反復測定分散分析（variance quadratic unbiased estimation method; MIVQUE）を行った。有意差が出た場合には，Tukey’s post-hoc法により群内および群間の多重比較を行った。統計処理にはSAS Enterprise Guide 7.1（SAS Institute Japan，東京）を使用し，有意水準は$P<0.05$とした。

３．成績

３−１．実験１：泌乳期における血清ALPアイソザイム活性値

３−１−１．血清ALPアイソザイムのAGE電気泳動像

Figure 2-1-1にP処理ならびにPN処理サンプルのAGE電気泳動像を示した。P処理サンプル53検体中51検体（96.2%）においてALP5に反応したバンドが陰極に，ALP2およびALP3が重複したバンドが陽極に認められた。PN処理サンプルでは，全てにおいてALP2分画のバンドが陽極に，ALP3およびALP5の重複バンドが陰極に認められた。

３−１−２．泌乳ステージ別の血清t-ALPおよびALPアイソザイム活性値

Figure 2-1-2には，各泌乳ステージにおける初産牛と経産牛の血清t-ALPと各ALPアイソザイム活性値を示した。泌乳初期からピークおよび中期の未経産牛では，血清t-ALPおよびALP3活性値は経産牛に比べて有意な高値を示した（$P<0.001$）。経産牛では，泌乳後期の血清ALP3活性値は初期からピークと比べて有意な高値を示した。血清ALP2およびALP5活性値には有意差は認められなかった。

３−２．実験２：分娩前後における血清ALPアイソザイム活性値の推移

３−２−１．血清ALPアイソザイムのAGE電気泳動像

Figure 2-2-1にP処理ならびにPN処理サンプルのAGE電気泳動像を示した。P処理サンプルでは，未経産牛１頭を除く23頭（95.8%）においてALP5分画に反応したバンドが陰極に，ALP2およびALP3が重複したバンドが陽極に認められた。PN処理サンプルでは，全てにおいてALP2のバンドが陽極に，ALP3およびALP5の重複バンドが陰極に認められた。

３−２−２．分娩前後の血清t-ALPおよびALPアイソザイム活性値の推移

Figure2-2-2に，分娩前後の血清t-ALP，ALP2，ALP3，ALP5およびTRAP5b活性値ならびにCa濃度を示した。初産牛群の血清t-ALPおよびALP3活性値は，経産牛群と比較して有意な高値で推移した（$P<0.01$または0.001）。これらの活性値は−3weeksからDay 0まで有意な変動を見せず，Day 5で有意に低下した（$P<0.001$）。一方，未経産牛群のTRAP5b活性値は，−2weeksからDay 5において経産牛群より有意な高値で推移し（$P<0.05$，0.001または0.001），Day 0において一過性の有意な増加を示した。血清Ca濃度は両群においてDay 0で有意に

減少（*P*<0.001）したが，その濃度は経産牛群より未経産牛群の方が有意に高値であった（*P*<0.01）。血清ALP2およびALP5活性値には有意な変動は見られなかった。しかし，初産牛の血清ALP2活性値は−2weeksおよびDay 0において経産牛群より有意に高値であった（*P*<0.05または0.001）。

4. 考察

本章では，ホルスタイン種の泌乳牛53頭（実験1）ならびに分娩牛24頭（実験2）の血清中のt-ALPならびにALPアイソザイム活性値を測定した。本章においてもAGE法によってALP2およびALP3の明確な分離は可能であったが，実験1の泌乳牛53頭中2頭（3.8%），実験2の分娩牛24頭１頭（4.2%）ではALP5の明確なバンドは描出されなかった。本章の2つの実験から泌乳牛ならびに分娩牛における血清ALP5活性値は泌乳ステージでの違いや分娩前後の変化を伴わず，個体により活性値が異なることが示唆された。ヒトでは血液型により血中ALP5活性値が異なることが報告されている（36）。今後，ウシでも血清ALP5活性値の個体差や臨床的意義についての検証が必要である。

実験1において，泌乳初期から中期にかけて初産牛の血清t-ALPおよびALP3活性値は経産牛に比べて有意な高値であった。第１章でも述べた通り，幼若動物における血清t-ALPやALP3活性値が高値を示すことが知られている（2, 10, 20, 38）。これは，初産牛は骨の発育過程にあるため骨代謝が活発であり，加齢により骨代謝活性が低下する（48）ことから，初産群と経産群ではこれらの活性値に有意差が生じたと考えられた。

泌乳後期では血清t-ALPおよびALP3活性値に群間の有意差はなかったが，これは経産牛の泌乳後期での血清ALP3活性値の増加によるものと考えられた。経産牛では分娩直後の急速な泌乳開始に伴って大量にカルシウムが必要なため，

破骨細胞の活性化による骨吸収が亢進すると考えられている（24）。したがって，経産牛では泌乳量が多い泌乳初期から中期にかけては骨形成よりも骨吸収が亢進していたが，泌乳後期では骨形成が優位になったため血清ALP3活性値が増加したことが推察された。

実験2において，周産期の未経産牛群では，血清t-ALPおよびALP3活性値は経産牛群に比べて有意な高値で推移し，TRAP5b活性値は−2weeksからDay 5において経産牛群より有意な高値であった。血清TRAP5b活性値は骨吸収マーカーの一つであり，この血清t-ALP，ALP3およびTRAP5b活性値の所見は，実験1と同様，骨の発育過程にある未経産牛では骨代謝回転が活発であることを反映したものと考えられた。Day0において，血清TRAP5b活性値は未経産牛群でのみで一過性の有意な増加を示し，血清Ca濃度は両群ともに有意に減少した。初産牛群のDay0における血清TRAP5b活性値の増加は，泌乳開始に伴う急激なCa喪失に対する恒常性維持の反応として破骨細胞による骨吸収が促進した結果（24）を考えられた。また，このような骨代謝によるCa恒常性機能は加齢により減弱する（14）ことが知られており，それ故，経産牛群の血清TRAP5b活性値に変化がなかったことが示唆された。一方，Day5において両群ともに血清t-ALPおよびALP3活性値が有意に低下したが，これは泌乳に伴うCa供給を維持するために，骨形成を抑制し骨吸収が優位な骨代謝回転になったことが示唆された。

血清ALP2活性値について，実験１では泌乳ステージによる差は見られなかった。実験2においても未経産牛群・経産牛群ともに周産期で有意な変動を示さなかったが，初産牛では−2weeksおよびDay 0において経産牛群よりも高い活性値を示した。ALP2は肝型アイソザイムであり，肝障害によって高値を示すことが広く知られている（23）。これは肝障害により，肝細胞や胆管上皮細胞からALP2が過剰産生されるため（5）とされるが，牛では正常範囲が広いことから

臨床意義は疑問視されている（43）。本章の供試牛に肝障害を示すようなものはなかった。未経産牛と経産牛における一時的な活性値の違いは年齢による肝機能の活発性の差であることも想像されたが，今回の研究ではその理由を見出すことは難しかった。

本章の結論として，AGE変法で測定された血清ALPアイソザイムのうち，ALP3活性値において，泌乳ステージならびに周産期の推移に特徴が認められた。実験1では，初産牛では活性値は全泌乳ステージを通して経産牛よりも高く一定で推移したが，経産牛では泌乳後期に増加することが明らかになった。実験2では，初産牛・経産牛ともに分娩後5日に活性値が低下した。これらの血清ALP3活性値の変化は，乳牛の年齢や産次ならびに泌乳量の影響を受けた骨形成の状態を示す指標になると考えられた。

5. 小括

本章では健常な乳牛の泌乳期ならびに周産期における血清ALPアイソザイム活性値の変化を明らかにする目的で，2つの実験を行った。実験1では，初産牛（n=24）ならびに経産牛（n=29）における泌乳期ステージ別（泌乳初期，泌乳中期，泌乳後期）の活性値を比較した。実験2では，未経産牛（n=11）ならびに経産牛（n=13）の周産期（分娩前3週から分娩後5日）の血清ALPアイソザイム活性値の推移を観察した。AGE法によってALP2およびALP3の明確な分離は可能であったが，実験1の泌乳牛53頭中2頭（3.8%），実験2の分娩牛24頭中 1頭（4.2%）ではALP5の明確なバンドは描出されなかった。両実験を通して，血清ALP3活性値において特徴的な推移が認められた。すなわち，実験1では，初産牛では血清ALP3活性値は全泌乳ステージを通して経産牛よりも高く一定の値で推移したが，経産牛では泌乳後期で有意に増加した。実験2では，初産牛・経産牛ともに分娩後5日に血清ALP3活性値が低下した。これらの血清ALP3

活性値の変化は，健常な乳牛における産次ならびに泌乳に影響を受けた骨形成の状態を反映したと考えられた。なお，血清ALP2およびALP5活性値において，産次ならびに泌乳ステージによる影響はほとんど見られなかった。

６．図および図説明

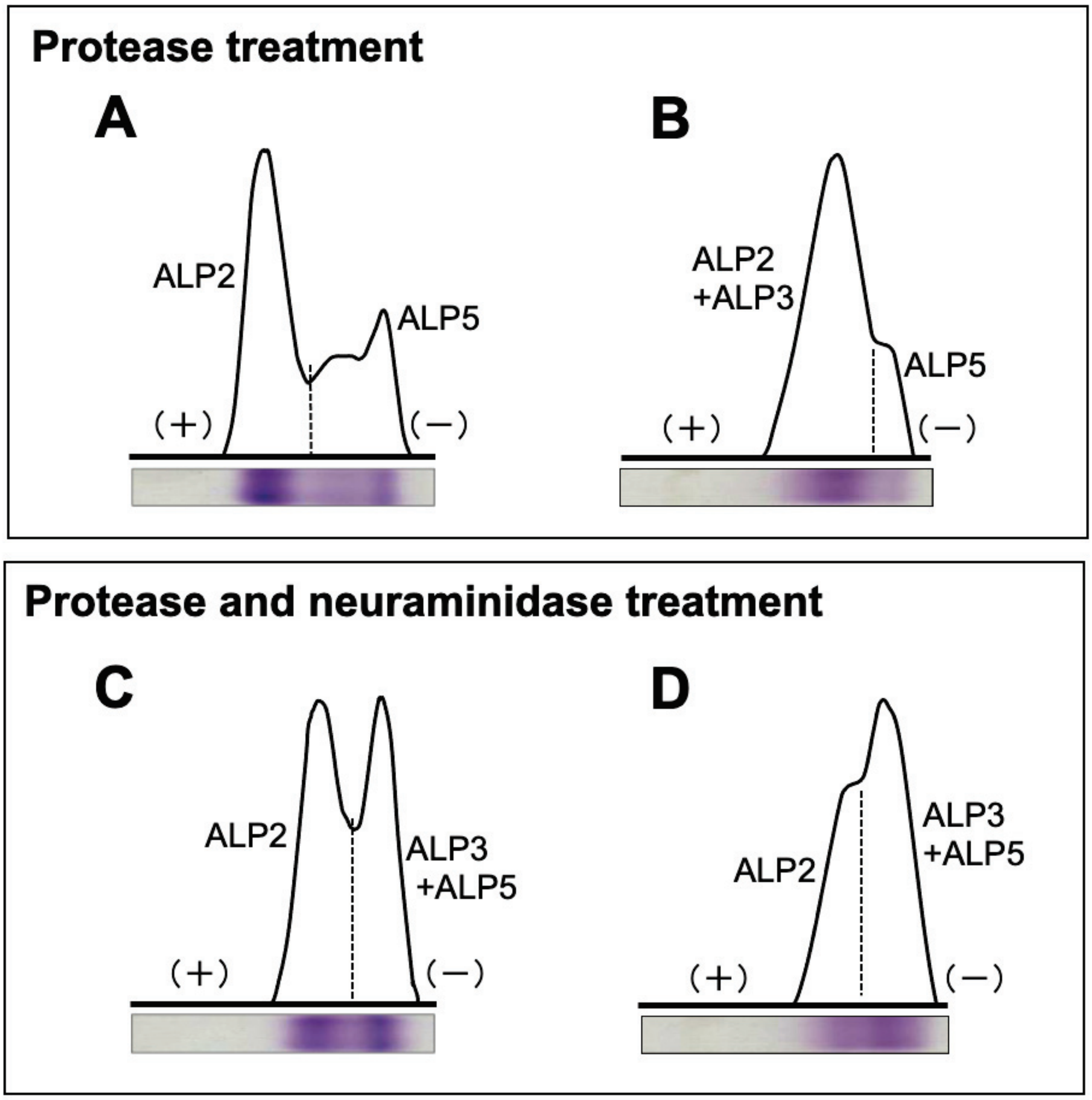

Figure 2-1-1. Representative densitometric images (electrophoretograms) of control serum (A and C) and a serum sample from a 2.1-year-old primiparous cow at 264 days of lactation (B and D). ALP2, hepatic ALP isoenzyme; ALP3, bone ALP isoenzyme; ALP5, intestinal ALP isoenzyme; ALP2+ALP3, the overlapping ALP2 and ALP3 fraction; ALP3+ALP5, the overlapping ALP3 and ALP5 fraction.

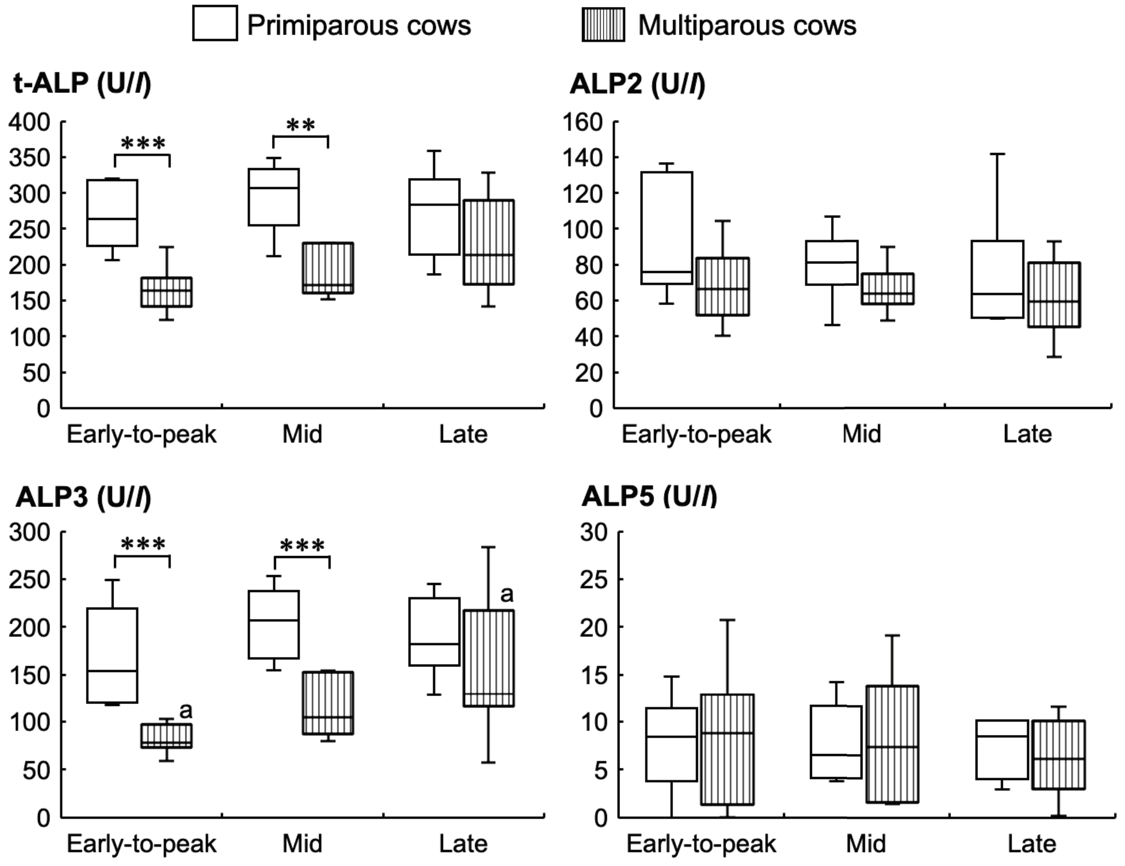

Figure 2-1-2. Box-and-whisker plots (medians, interquartile ranges, maxima, and minima) showing the distributions of the serum activities of total ALP (t-ALP) and each ALP isoenzyme in primiparous and multiparous cows in the early-to-peak (n = 9 and 13, respectively), middle (n=8 and 7, respectively), and late (n = 7 and 9, respectively) lactation periods. ALP2, hepatic ALP isoenzyme; ALP3, bone ALP isoenzyme; ALP5, intestinal ALP isoenzyme. Early, early-to-peak lactation; Late, late lactation; Mid, mid lactation. Significant differences between the primiparous and multiparous cows at each time point are shown: $^{**}p$<0.01, $^{***}p$<0.001. The same letter means a significant difference in the values within multiparous cows: ^{a}p<0.05.

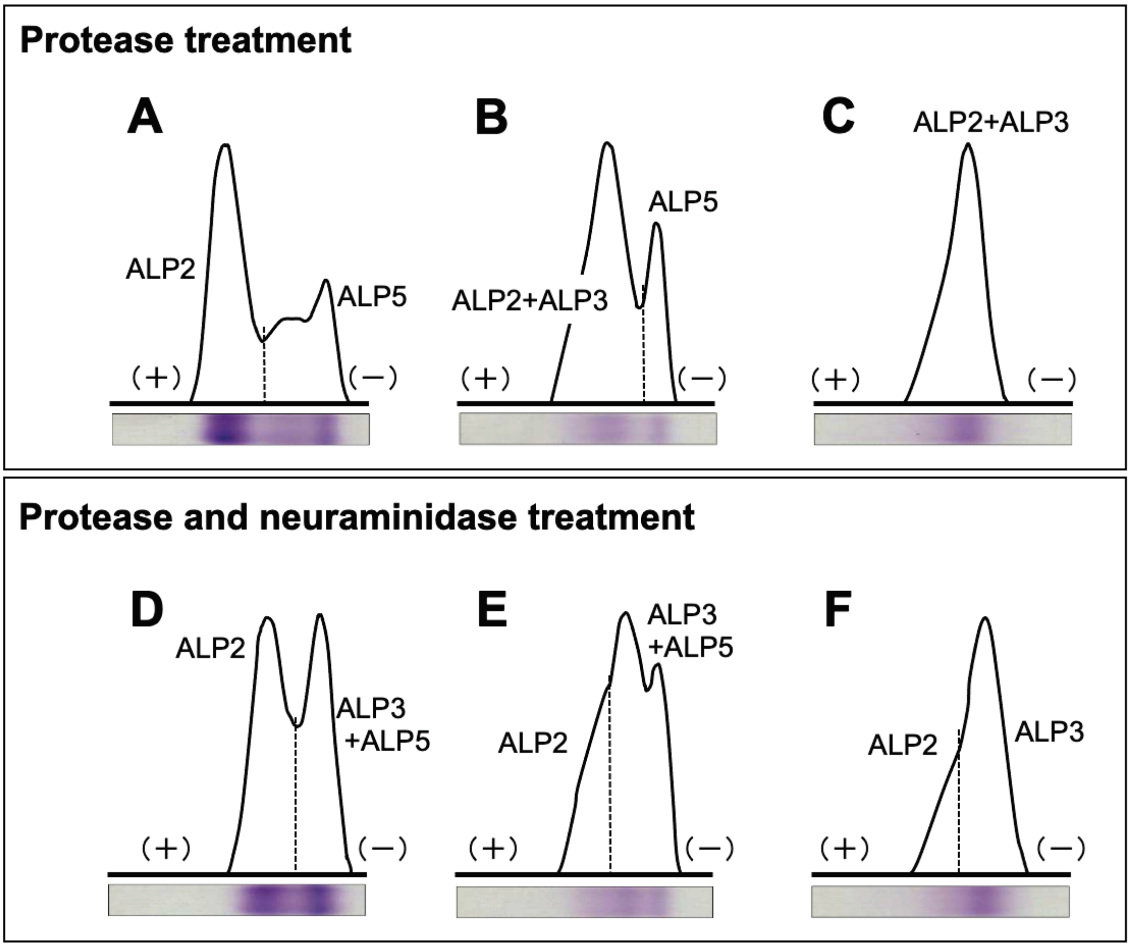

Figure 2-2-1. Representative densitometric images (electrophoretograms) of control serum (A and D), a serum sample from a 4.1-year-old multiparous cow at 2 weeks before parturition (B and E) and a serum sample from a 1.8-year-old heifer at 2 weeks before parturition (C and F). ALP2, hepatic ALP isoenzyme; ALP3, bone ALP isoenzyme; ALP5, intestinal ALP isoenzyme; ALP2+ALP3, the overlapping ALP2 and ALP3 fraction; ALP3+ALP5, the overlapping ALP3 and ALP5 fraction.

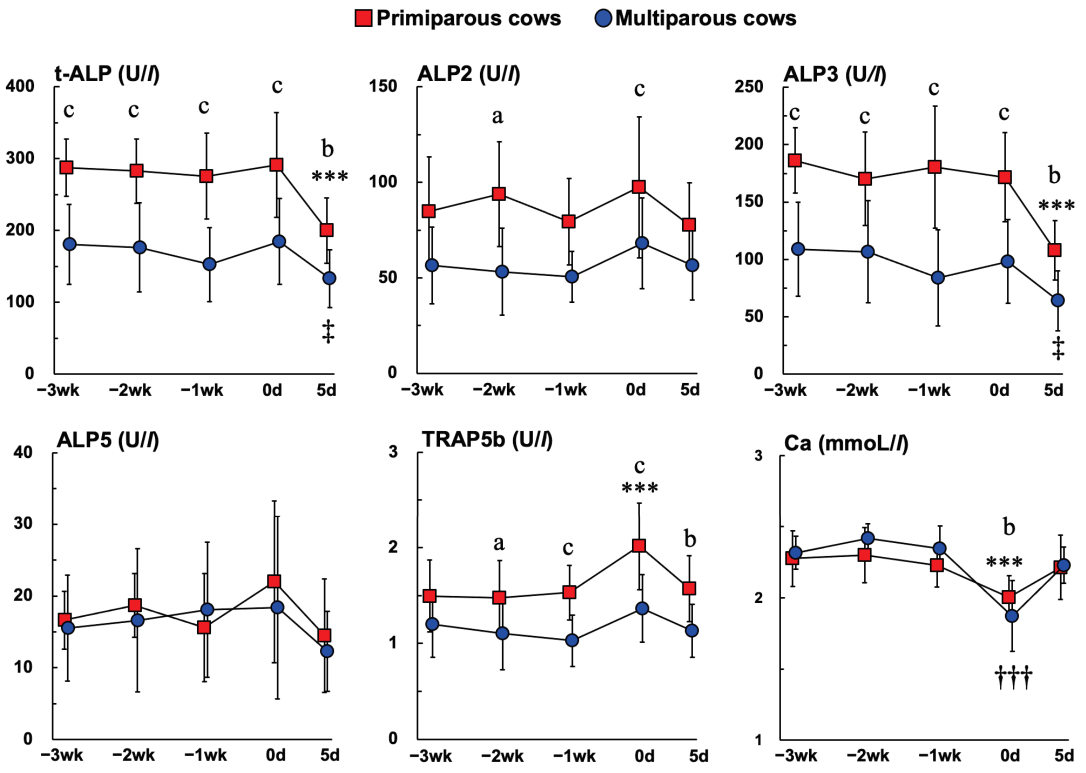

Figure. 2-2-2. Changes in t-ALP, ALP2, ALP3, ALP5, and TRAP5b activities and Ca concentrations in serum around parturition; t-ALP: total alkaline phosphatase; ALP2: alkaline phosphatase isoenzyme 2; ALP3: alkaline phosphatase isoenzyme 3; ALP5: alkaline phosphatase isoenzyme 5; TRAP5b: tartrate-resistant acid phosphatase 5b; Ca: calcium. wk: week; d: day. Significant differences between the primiparous and multiparous groups at each time point are shown: $^{a}p < 0.05$, $^{b}p < 0.01$, $^{c}p < 0.001$. Significant differences compared to the levels at –3 weeks within the group: $^{***}p < 0.001$ in the primiparous, $^{\dagger\dagger\dagger}p < 0.001$ and $^{\ddagger}p < 0.005$ in the multiparous groups.

総括

近年，血中ALPアイソザイム活性値を測定する方法としてアガロースゲル電気泳動（AGE）法が開発され，肝臓や骨に関わる疾患の診断・治療に臨床応用されている。AGE法はヒトの臨床検査センターで広く採用されている方法であり，獣医療分野においても利用できれば広く普及することが可能と考えられる。ALP2（肝型）とALP3（骨型）が血清中に存在する主なALPアイソザイムであるが，従来，プロテアーゼとノイラミニダーゼにて前処理（PN処理）した血清を電気泳動することで，この2つのアイソザイムを区別し活性値を測定してきた。しかし，ノイラミニダーゼ処理した血清の電気泳動において，ALP5がALP3に重複するものが存在することから，プロテアーゼ単体による処理（P処理）によってALP5をALP3から単離する手法も行われている。現在，医療分野では，P処理ならびにPN処理された2種類の血清を同時に電気泳動するAGE変法が，最も詳細にアイソザイムの活性値を測定できる測定法とされている。

牛臨床における血清ALPアイソザイム活性値の有用性や活用法に関する報告は少ないが，獣医療分野においても利用できれば広く普及することが可能と考えられる。そこで，本学位論文では，AGE変法による血中ALPアイソザイム活性値の測定が獣医療分野へ臨床応用可能であるという仮説のもと，ヒト用AGEキットを用いた血中ALPアイソザイム活性値の測定法の確立ならびに獣医療への応用に向けた基礎データの収集を目的に，ホルスタイン種の子牛と成牛を用いて研究を行った。本研究で得られた知見は以下の通りである。

第１章．ホルスタイン種乳用牛における出生から18ヶ月齢までの血清アルカリフォスファターゼ活性値の経時的変化

ホルスタイン雌子牛11頭の出生から18ヶ月齢までの期間に経時的採取した血清についてAGE変法による解析を行い，以下の結果を得た。

１）AGE法により血清中のALP2，ALP3およびALP5の分離と活性値の測定が可能であり，ALP3がt-ALPの最も主要なアイソザイム（64.1〜77.5%）であった。
２）哺乳期間中（出生から2ヶ月齢までの期間）の血清t-ALPおよびALP3活性値には１週齢と6週齢で二峰性の増加が見られ，これには初乳からのALP3移行（1週齢）と骨形成の亢進（6週齢）という二つの要因の関与が示唆された。
３）離乳後最初の採血時（3ヶ月齢）において，血清t-ALP，ALP2およびALP3活性値は一過性に低下したが，これらは離乳に伴う飼料摂取量の低下，栄養不足ならびに骨形成の減少に関連する所見と推察された。

第２章．ホルスタイン種乳牛における泌乳期ならびに周産期の血清ALPアイソザイム活性値の推移

　健常な乳牛の泌乳期ならびに周産期における血清ALPアイソザイム活性値を明らかにする目的で，実験1として初産牛（n=24）ならびに経産牛（n=29）における泌乳期ステージ別（泌乳初期，泌乳中期，泌乳後期）の活性値の比較，実験2として未経産牛（n=11）ならびに経産牛（n=13）における周産期（分娩前3週から分娩後5日）の活性値の推移を観察し，以下の結果を得た。
１）AGE変法によってALP2およびALP3の明確な分離は可能であったが，実験1の泌乳牛53頭中2頭（3.8%），実験2の分娩牛24頭１頭（4.2%）ではALP5の明確なバンドは描出されなかった。
２）泌乳牛（実験1）および妊娠・分娩牛（実験2）ともに，血清ALP3活性値において特徴的な推移が認められた。
３）実験1：初産牛では活性値は全泌乳ステージを通して経産牛よりも高く一定の値で推移したが，経産牛では泌乳後期で増加が認められた。
４）実験2：初産牛・経産牛ともに分娩後5日に血清ALP3活性値が低下した。

５）以上の血清ALP3活性値の変化は，健常な乳牛における産次ならびに泌乳に影響を受けた骨形成を反映した所見と考えられた。

以上の結果から，AGE変法により，出生から18ヶ月齢までの乳用子牛ならびに泌乳期および周産期の成乳牛の血清中のALP2，ALP3およびALP5の3つのアイソザイムを区別し，それぞれの活性値を示すことが可能であった。子牛と成牛の両方において，3つのアイソザイムのうちALP3の活性値の推移に特徴的な変化が認められ，離乳や成長，産次，泌乳に関わる骨代謝の評価に利用できることが示唆された。今後，各種疾患罹患牛の血液検体の解析を通して，ALPアイソザイム活性値の臨床応用の可能性を追及する必要がある。

謝辞

本学位論文を完成させるにあたり，多くの方々にご指導・ご助言を賜りました。まず，主指導教員としてお世話になりました元帯広畜産大学教授（現大阪府立大学教授）・山岸則夫先生ならびに帯広畜産大学教授・松井基純先生には，終始暖かい励ましとご指導を頂きましたことを心より感謝申し上げます。基礎となる学術論文の共同著者としてご指導をいただきました帯広畜産大学准教授・花田正明先生，准教授・川島千帆先生，講師・後藤聡先生には，大変有益なご指摘とご指導を頂きましたこと厚く御礼申し上げます。さらに，帯広畜産大学教授・南保泰雄先生，岩手大学教授・木崎景一郎先生，東京農工大学教授・田中知己先生，岐阜大学教授・大場恵典先生のご指導により，本論文を磨き上げることができたと思います。深く感謝申し上げます。

最後に，本研究は帯広畜産大学フィールド科学センターの教職員の皆様，山岸研究室の皆様，産業動物臨床棟の職員の皆様のご協力により遂行することができました。皆様に心より感謝申し上げます。

引用文献

1. 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.

2. Allen, M. J. (2003). Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. Vet Clin Pathol. 32, 101 ~ 113.

3. Bourgon, S. L., Diel de Amorim, M., Miller, S. P. and Montanholi, Y. R. (2007). Association of blood parameters with age, feed efficiency and sampling routine in young beef bulls. Livestock Sci. 195, 27 ~ 37.

4. Bland, J.M., Altman, D.G. (2007) Agreement between method of measurement with multiple observations per individual. J. Biopharm. Stat. 17, 571 ~ 582.

5. Center, S. A., Slater, M. R., Manwarren, T., and Prymak, K. (1992). Diagnostic efficacy of serum alkaline phosphatase and γ -glutamyltransferase in dogs with histologically confirmed hepatobiliary desease: 270 cases (1980-1990). J. Am. Vet. Med. Assoc. 201, 1258 ~ 1264.

6. Critchley, L.A., Critchley, J.A. (1999) A meta-analysis of studies using bias and precision statistics to compare cardiac output measurement techniques. J. Clin. Monit. Comput. 15, 85 ~ 91.

7. Cônsolo, N. R. B., Munro, J. C., Bourgon, S. L., Karrow, N. A., Fredeen, A. H., Martell, J. E. and Moutanholi, Y. R. (2018). Association of blood analysis with feed efficiency and development stage in grass-fed beef heifers. Animals. 8, 133.

8. Devkota, B., Takahashi, M., Sasaki, K., Osawa, T., Izaike, Y. and Yamagishi, N. (2013). Fluctuation in plasma bone metabolic makers in multiparous and

primiparous Holstein cows during early to peak lactation. J. Vet. Med. Sci. 75, 1257 ~ 1260.

9. Diao, Q., Zhanf, R. and Fu, T. (2019). Reviw of strategies to promote rumen development in calves. Animals (Basel). 9, 490.

10. Fernandez, N. J. and Kidney B. A. (2007). Alkaline phosphatase: beyond the liver. Vet. Clin. Pathol. 36, 223 ~ 233.

11. Fleenor, W. A. and Scott, G. H. (1980). Hydrometer test for estimation of immunoglobulin concentration in bovine colostrum. J. Dairy Sci. 63, 973 ~ 977.

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

13. 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.

14. Goff, J.P. (2000). Pathophysiology of calcium and phosphorus disorders. Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract. 16, 319 ~ 337.

15. Golub, E. E. and Boesze-Battaglia, K. (2007). The role of alkaline phosphatase in mineralization. Curr. Opin. Orthop. 18, 444 ~ 448.

16. Guest, J., Bilgin, A., Pearce, R., Baines, S., Zeuschner, C., Rossignol-Grant, C. L., Morris, M. J. and Grant, R. (2010). Evidence for under-nutrition in adolescent females using routine dieting practices. Asia Pac J. Clin Nutr. 19, 526 ~ 533.

17. Hank, A. M., Hoffman, W. E., Sanecki, R. K., Schaeffer, D. J. and Dorner, J. L. (1993). Quantitative determination of equine alkaline phosphatase isoenzymes in foal and adult serum. J. Vet. Intern. Med. 7, 20 ~24.

18. Harris, H. (1989). The human alkaline phosphatases: what we know and don't. Clin. Chim. Acta. 186, 133 ~ 150.

19. Hatate, K., Kayano, M., Kawashima, C., Hanada, M., Bicalho, R. C. and Yamagishi, N. (2019). The effect of colostrum intake on osteoprotegerin and bone metabolic markers in the blood of newborn calves during the first week of life. J. Vet. Med. Sci. 81, 15 ~ 17.

20. Horney, B. S., Farmer, A. J., MacKensie, A., Hornor, D. J. and Buczkowski, S. (1992). Alkaline phosphatase isoenzymes in feline serum using an agarose gel alkaline phosphatase kit method. Can. J. Vet. Res. 56, 373 ~ 375.

21. 星野忠, 矢内充, 土屋達行, 熊坂一成, 菰田二一 (2008) 高分子小腸型ALPがアガロースゲル電気泳動法における骨型ALP分画値に及ぼす影響. 臨床化学. 37, 63 ~ 67.

22. Janckila, A. J., Takahashi, K., Sun, S. Z., 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.

23. Kaplan, M. M. and Righetti, A. (1970). Induction of rat liver alkaline phosphatase: the mechanism of the serum elevation in bile duct obstruction. J. Clin. Inverst. 49(3), 508 ~ 516.

24. Kim, D., Yamagishi, N., Ueki, A., Miura, M., Saito, F., Sato, S. and Furuhama, K. (2010). Changes in plasma bone metabolic markers in periparturient dairy cows. J. Vet. Med. Sci. 72, 773 ~ 776.

25. Kramer, J. W. (1989). Clinical biochemistry of domestic animals 4th ed. Academic press, Inc., San Diego, California, United States of America. pp.338 ~ 368.

26. Kramer, J. W. and Hoffmann, W. E. (1997). Clinical Enzymology. Clinical Biochememistry of Domestic Animals. 5th ed. 303 ~ 325.

27. Komnenou, A., Karayannoupoulon, M., Polizopolou, Z. S., Constantinidis, T. C. and Dessiris, A. (2004). Correlation of serum alkaline phosphatase activity with the healing process of bone fractures in dogs. Vet. Clin. Pathol. 34, 35 ~ 38.

28. Kondo, S., Juni, K., Kawai, M., Ogawa, K., Yasue, T., Hata, H., Okubo, M. and Asahida, Y. (1997). Behavioral changes of suckler beef calves in gazing cow-calf herd. Res Bull Livestock Far Hokkaido Univ. 16, 29 ~ 35.

29. 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.

30. 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.

31. Matsuo, A., Togashi, A., Sasaki, S., Devkota, B., Hirata, T., Yamagishi, N. (2014) Diurnal variation of plasma bone markers in Japanese Black calves. J. Vet. Med. Sci. 76, 1029 ~ 1032.

32. 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.

33. Mohebbi, A., Khaghani, A. and Mohammadnia, A. (2010). Bone-specific alkaline phosphatase activity in dairy cows. Comp. Clin. Pathol. 19, 33 ~ 36.

34. Moore, W. E. and Feldman, B. F. (1974). The use of isoenzymes in small animal medicine. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 52, 420 ~ 429.

35. Mourits, M. C., Ven der Fels-Klerx, H. J., Huirne, R. B. M and Huyben, M. W. C. (2000). Dairy-heifer management in the Netherlands. Prev. Vet. Med. 46, 197 ~ 208.

36. 西澤良記, 三浦雅一, 稲葉雅章 (2010) 骨代謝マーカー改訂版−これだけは知っておきたい骨代謝マーカーの基礎と適正使用法−,医薬ジャーナル.

37. Ooi, K., Shiraki, K., Morishita, Y. and Nobori, T. (2007). High-molecular intestinal alkaline phosphatase by agarose gel electrophoresis. J. Clin. Lab. Anal. 21, 140 ~ 146.

38. Onomi, R., Hatate, K. and Yamagishi, N. (2019). Determination of plasma bone-specific alkaline phosphatase isoenzyme activity in Holstein calves using a commercial agarose gel electrophoresis kit. Polish J. Vet. Sci. 22, 789 ~ 792.

39. 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.

40. Panteghini, M., Baris, R., van Solinge, W. W. (2006). Enzymes. Burtis, C. A., Ashwood, E. R. and Burns, D. E. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 4th ed. 597 ~ 664.

41. Palczyski, L. J., Bleach, E. C., Brennan, M. L. and Robinson, P. A. (2020). Appropriate dairy calf feeding from birth to weaning: “it’s an investment for the future”. Animals (Basel) 10, 116.

42. Richardson, E. C., Herd, R. M., Archer, J. A. and Arthur, P. F. (2004). Metabolic differences in Angus steers divergently selected for residual feed intake. Aust. J. Exp. Agri. 44, 441 ~ 452.

43. Sato, J., Kanata, M., Yasuda, J., Sato, R., Okada, K., Seimiya, Y. and Naito, Y. (2005). Changes of serum alkaline phosphatase activity in dry and lactational cows. J. Vet. Med Sci. 67(8), 813 ~ 815.

44. Soch, M., Pìsek, L., Broucek, J., Kroupova, P., Silhavá, M. and Stastná, J. (2008). Activity of alkaline phosphatase in cattle blood plasma according to stage of pregnancy. Slovak J. Anim. Sci. 41(1), 39 ~ 41.

45. Siebel, M. J. (2006). Clinical application of biochemical markers of bone turnover. Arp. Bras. Endocrinol. Metab. 4, 603 ~ 620.

46. Van Hoof, V. O., Lepoutre, L. G., Hoylaerts, M. F., Chevigné, R. and De Broe, M. E. (1988). Improved agarose electrophoretic method for separating alkaline phosphatase isoenzymes in serum. Clin. Chem. 34(9), 1857 ~ 1862.

47. Vasseur, E., Borderas, F., Cue, R. I., Lefebvre, D., Pellerin, D., Rushen, J., Wade, K. M. and de Passillé, A. M. (2010). A survey of dairy calf management practices in Canada that affect animal welfare. J. Dairy Sci. 93, 1307 ~ 1315.

48. Yamagishi, N., Takehana, K., Kim, D., Miura, M., Hirata, T., Devkota, B., Sato, S., Fukuhara, 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.