

氏名 (本 (国) 籍)	千 葉 暁 子 (北海道)		
主指導教員氏名	帯広畜産大学 教授 松 井 基 純		
学位の種類	博士 (獣医学)		
学位記番号	獣医博甲第582号		
学位授与年月日	令和3年3月15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	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		
審査委員	主査	帯広畜産大学 教授	南 保 泰 雄
	副査	帯広畜産大学 教授	松 井 基 純
	副査	岩 手 大 学 教授	木 崎 景 一 郎
	副査	東 京 農 工 大 学 教授	田 中 知 己
	副査	岐 阜 大 学 教授	大 場 恵 典
	副査	大 阪 府 立 大 学 教授	山 岸 則 夫

学位論文の内容の要旨

近年、血中アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性の測定法としてアガロースゲル電気泳動 (AGE) 法が普及し、医療分野において肝臓や骨に関わる疾患の診断や治療に広く臨床応用されている。一方、牛臨床分野では、血中 ALP 活性値は正常範囲が広い臨床応用される機会は少なく、アイソザイム活性の測定もほとんど実施されていないのが現状である。本学位論文において、学位申請者は、AGE 法を用いた血中 ALP アイソザイム活性測定が獣医療分野にも臨床応用可能であるとの仮説を立て、牛臨床への応用に向けた基礎データの収集を目的として、ヒト用 AGE キットを用いた乳用牛の血中 ALP アイソザイム活性値の測定を行った。

第1章では、健康なホルスタイン種乳用牛 (n=11) における出生から18ヶ月齢までの血清 ALP アイソザイム活性値の経時的変化を観察した。ALP アイソザイムを詳細に分離するため、申請者は医療分野で利用されているプロテアーゼ処理血清とプロテアーゼおよびノイラミニダーゼ処置血清の二つを同時に電気泳動して測定する方法 (AGE 変法) を採用した。その結果、全ての血清サンプルにおいて ALP2 (肝型)、ALP3 (骨型) および ALP5 (腸型) の分離と活性値の測定が可能であることを示した。ALP3 は総 ALP (t-ALP) の中で最大

割合を占めるアイソザイムであり、哺乳期間中は1週齢および6週齢での二峰性の増加を示した。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であり、離乳後（3ヶ月齢）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減少と栄養不足ならびに骨形成の低下に起因したことが推察された。以上の成績から、申請者は、AGE 変法で測定された血清 ALP アイソザイム活性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形成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を示した。

第2章において、申請者は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）における泌乳ステージ別（泌乳初期、泌乳中期および泌乳後期）の血清 ALP アイソザイム活性値を比較した。実験2では、未經産牛（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。本章の供試牛の血清においても AGE 変法によって ALP2 および ALP3 の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 の分画はみられなかった。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が、血清 ALP2 および ALP5 活性値には産次ならびに泌乳ステージによる変動は見られなかった。すなわち、実験1では、初産牛の血清 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に有意な増加を示した。実験2では、初産牛・経産牛ともに分娩後5日に血清 ALP3 活性値の低下が認められた。以上の成績から、申請者は、血清 ALP3 活性値の変化は健全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する指標になると推察した。

本学位論文は、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 ALP アイソザイム（ALP2、ALP3 および ALP5）の活性の測定にヒト用 AGE キットを用いた AGE 変法が利用可能であることを示した。さらに、血清 ALP3 活性値は各ライフステージにおいて特徴的な変化を示し、離乳時や成長過程、産歴や泌乳に伴った骨代謝の評価に臨床応用できる可能性を提示した。

審査結果の要旨

市販のアガロースゲル電気泳動（AGE）キットにより血中 ALP アイソザイム活性の測定が可能であり、医療分野では肝臓や骨に関わる疾患の診断や治療に臨床応用されている。一方、牛臨床において血清 ALP アイソザイム活性測定の有用性や臨床応用に関する情報は少ない。学位申請者は、AGE 法による血中 ALP アイソザイム活性の測定が獣医療分野でも臨床応用可能であるとの仮説のもと、牛臨床のための基礎データの収集を目的として、ヒト用 AGE キットを用いた乳用牛の血中 ALP アイソザイム活性の測定を行った。

第1章では、健康なホルスタイン種乳用牛の出生から18ヶ月齢までの血清 ALP アイソザ

イム活性値の経時的推移を観察した。なお、本学位論文では、ALP アイソザイムを詳細に分離するため、近年、医療分野で利用されているプロテアーゼ処理血清とプロテアーゼおよびノイラミニダーゼ処置血清の二つを同時に測定する方法（AGE 変法）を用いた。全ての血清サンプルにおいてALP2（肝型）、ALP3（骨型）およびALP5（腸型）の分離と活性値の測定が可能であった。ALP3は総ALPの中で最大割合を占め、その活性値は哺乳期間中の1週齢および6週齢で二峰性の増加を示した。離乳後の3ヶ月齢においてALP2およびALP3活性値は一過性に低下した。これらの推移は、初乳中ALP3の体内への移行（1週齢）、成長に伴う骨形成の亢進（6週齢）、離乳に伴う飼料摂取量の減少と栄養不足ならびに骨形成の低下（3ヶ月齢）に関連した所見と考えられた。

第2章では、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、初産牛ならびに経産牛における泌乳ステージ別（泌乳初期、泌乳中期および泌乳後期）の血清ALPアイソザイム活性値を比較した。実験2では、未経産牛ならびに経産牛の周産期（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解析した。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、初産牛の血清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に有意な増加を示した。実験2では、初産牛・経産牛ともに分娩後5日に血清ALP3活性値の低下が認められた。これら2つの実験における血清ALP3活性値の変化は、健全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。

本研究により、ヒト用AGEキットを用いたAGE変法は、出生から18か月齢までの乳用子牛・育成牛ならびに泌乳期および周産期の成乳牛の血清ALPアイソザイム活性の測定に利用可能であることが明らかになった。また、血清ALP3活性値が子牛・育成牛の離乳や成長あるいは成牛の産歴や泌乳に伴った骨代謝の評価に臨床応用できる可能性も示された。

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：Agarose gel electrophoretic pattern of serum alkaline phosphatase isoenzymes in Holstein cows during lactation
著 者 名：Chiba, A., Hatate, K., Onomi, R., Moriyama, T., Goto, A. and Yamagishi, N.
学術雑誌名：Polish Journal of Veterinary Sciences
巻・号・頁・発行年：23 (2)：317-319, 2020

- 2) 題 目：Peripartum changes in serum activities of three major alkaline phosphatase isoenzymes in Holstein dairy cows
著 者 名：Chiba, A., Onomi, R., Hatate, K., Moriyama, T., Goto, A. and

Yamagishi, N.

学術雑誌名： Polish Journal of Veterinary Sciences

巻・号・頁・発行年：23 (3)： 457-459, 2020

3) 題 目： Consecutive changes in serum alkaline phosphatase isoenzyme 3 activities in Holstein heifers during the first 18 months of life

著 者 名： Chiba, A., Hatate, K., Onomi, R., Kawashima, C., Hanada, M., Moriyama, T., Goto, A. and Yamagishi, N

学術雑誌名： The Journal of Veterinary Medical Science

巻・号・頁・発行年：82 (11)： 1643-1647, 2020