

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450457

研究課題名(和文) ウシ乳腺組織で産生される副甲状腺ホルモン関連タンパク質と低カルシウム血症の関係

研究課題名(英文) Correlation of parathyroid hormone-related protein derived from the lactating mammary glands and milk fever in dairy cows.

研究代表者

恩田 賢 (Onda, Ken)

麻布大学・獣医学部・准教授

研究者番号：70308302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：胎子と新生子の発育にはCaやPなどのミネラルが重要で、これらのミネラルは全て母体から供給される。本研究では牛の乳腺と乳汁、および胎盤における副甲状腺ホルモン関連タンパク質(PTHrP)のミネラル代謝に対する機能について検討した。その結果、乳汁中PTHrP濃度は多くの乳汁中タンパク質と異なり、初乳では経産牛よりも初産牛でその濃度が高く、分娩後は徐々に上昇していくというユニークな性質を持つことが分かった。また、胎子循環血液中の高いPTHrP濃度は主に胎盤節子宮側のPTHrPに由来することが示唆された。牛においてもPTHrPが胎子期から新生子期のミネラル代謝に大きく関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Calcium and phosphorus are very important for the growth of fetus and newborn animals and all amounts of these minerals are derived from the mother's circulation. This study investigated the function of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) on mineral metabolism in the mammary gland, milk, and placenta of dairy cows. The study identified 3 unique characteristics of milk PTHrP concentration in the early stages of lactation: milk PTHrP concentration is higher in primiparous than multiparous cows, milk PTHrP concentration is lower in colostrum than later milk, and the difference in milk PTHrP concentration between primiparous and multiparous cows at 3 days postpartum is more strongly influenced by age than milk yield. Moreover, the higher concentration of PTHrP in the fetal circulation was speculated to come from the maternal placentoma.

研究分野：獣医内科学

キーワード：PTHrP cattle the mammary gland lactation calcium hypocalcemia

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍に随伴する高カルシウム血症の原因物質として発見された副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (parathyroid hormone-related protein; PTHrP) であるが、現在では正常組織に広く存在することが知られている。なかでも分娩後、泌乳を開始すると乳腺組織での PTHrP 遺伝子発現は急激に上昇し、通常血液中では fM から pM オーダーしか含まれないといわれるのに対して、その 1 万倍以上の高濃度で乳汁中に分泌される。しかしこの乳腺組織で産生される PTHrP の生物学的な意味については、いまだ答えが得られていない。また、これまでの研究では牛においては、母子ともに血液中では PTHrP を検出することはできず、カルシウムをはじめとするミネラル代謝などに対する影響は不明なままである。

2. 研究の目的

(1) 乳汁中に大量に存在することが知られる PTHrP であるが、この PTHrP が初乳中の抗体のように子牛の体内に取り込まれ作用するのであれば、初乳の時期とそれ以降の常乳では乳汁中 PTHrP 濃度が異なるはずである。また、初乳中の抗体濃度は初産牛よりも経産牛で高いことが知られている。そこで、分娩直後から牛の乳汁を継時的に採取し、その PTHrP 濃度を測定した。

(2) 乳牛のミネラル代謝疾患である乳熱 (分娩性低カルシウム血症) の発症は泌乳開始による乳汁へのカルシウムの喪失が最大の原因である。そのため、乳汁におけるカルシウムやリンなどの多量に含まれるミネラルの動態については多く研究があるが、一方でこれまで全く測定されていない微量なミネラルも数多く含まれている。泌乳期乳腺組織の PTHrP が乳熱の発症に関与しているのであれば、乳汁中ミネラル濃度やミネラル間の相互関係に対しても何らかの影響を持っていることが推測される。そこで、こういった相互作用を検討するために、多くのミネラルを同時に、かつ迅速に測定できる ICP-MS (誘導結合プラズマ質量分析計) を用いて、牛乳の多元素同時測定を行った。特に多くの周産期疾患が発生する泌乳初期に注目し、分娩後の乳汁中ミネラル濃度の変化を継時的に観察した。

(3) 胎子と新生子の発育にはカルシウム (Ca) とリン (P) が重要で、ミネラルの供給源は胎子期においては胎盤、新生子においては乳汁だとされている。これまで牛の乳腺と乳汁の PTHrP の性質を観察してきたが、ここではこれらに加え、胎盤における PTHrP の機能解析を行った。分娩時の母牛、胎子、臍帯の血液中 PTHrP、Ca、P 濃度や PTHrP の各臓器における遺伝子発現と、新生子血液中の PTHrP、Ca、P 濃度の継時的変化を観

察し子牛ミネラル代謝への関与を検討した。

3. 研究の方法

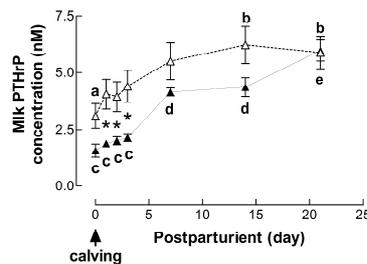
(1) 北海道の一酪農場において、ホルスタイン種初産牛 7 頭と経産牛 7 頭から、分娩直後、1、2、3、7、14、21 の 7 回乳汁を採取し、PTHrP 濃度を測定した。また、初産牛と経産牛で PTHrP 濃度に有意な差があった 3 日目の乳汁を同農場の分娩牛 113 頭から採取し、その原因を検討した。

(2) 先に行った実験の際に継時的に採取した乳汁の各種ミネラルの濃度を ICP-MS によって測定した。さらに周産期において乳熱を発症した牛 22 頭の発症時の乳汁を採取し、健康な牛との乳汁中のミネラル濃度と PTHrP 濃度に違いがないか検討した。

(3) 妊娠満期近くホルスタイン種乳牛の 17 頭において帝王切開で胎子を娩出する際に、母牛頸静脈、胎子頸静脈、臍静脈、臍動脈、更には新生子 1 頭の頸静脈より採血し、血液中 PTHrP、Ca、P 濃度などの測定を行った。また帝王切開時に胎盤節を 4 頭から採取し胎盤節子宮側と胎子側に分離した。加えて娩出後死亡した胎子 1 頭から甲状腺、肝臓、腎臓を採材し、リアルタイム RT-PCR 法にて各臓器における PTHrP 遺伝子発現量について検討した。

4. 研究成果

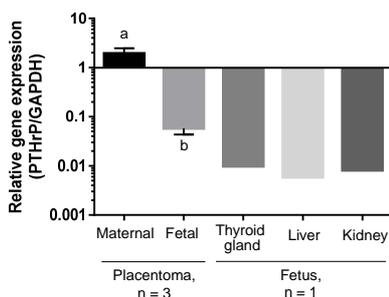
(1) 初産牛と経産牛の乳汁を分娩 21 日まで採取し PTHrP 濃度を比較したところ、分娩後 3 日目までは初産牛の方が有意に高いことが明らかとなった。



ついて初産牛と経産牛でなぜこのような差が生じるのかを明らかにするために、両群合計で 113 頭の牛から分娩 3 日目の乳汁を採取し、乳汁中 PTHrP 濃度と月齢、乳量、更には乳汁中カルシウム濃度との関係を検討した結果、PTHrP 濃度は月齢と有意な負の相関を持っていることが分かった。免疫グロブリンをはじめとする多くの乳汁中タンパク質と異なり乳汁中 PTHrP 濃度は経産牛よりも初産牛の初乳中で高く、また初乳中で最も濃度は低く、その後は徐々に上昇していくというユニークな性質を持つことが分かった。

(2) これまでに分娩後の動態が知られていなかった乳汁中の 13 種類の元素の継時的変動が明らかとなった。その変動は、カゼインなどのタンパク質濃度に影響を受けるものと、ラクトースや乳糖など浸透圧要因に影響を受けるものの、大きく二つのグループに分けることができた。乳熱発症牛の乳汁中ミネラル濃度測定では、乳汁中 Ca 濃度が発症牛において増加していると考えられたが、分娩当日では健康対照群と有意な差は認められなかった。また、これまで議論されてきた乳汁中 Ca 濃度と乳汁中 PTHrP 濃度の関係を検討したが、これらの間にも有意な相関は認められなかった。しかし、乳熱発症牛においては乳汁中 Mg と Mo の有意な濃度上昇が観察されたが、その意味は今後検討する必要がある。

(3) 血液中濃度測定の結果、胎子循環血液中の Ca と P の濃度は母牛より高濃度で、ヒトやマウスと同様であった。血液中 PTHrP 濃度は母牛頸静脈では全て検出限界以下、胎子頸静脈、臍静脈、臍動脈中濃度では 2.5 ~ 6.0 pM であり、この三つの血液中濃度に有意な差はみられなかった。また胎盤節子宮側、胎盤節胎子側、胎子臓器の PTHrP 遺伝子発現を比較したところ、胎盤節子宮側で最も高い発現量であった。



血液中 PTHrP 濃度に臍動静脈間で差がないことと、胎盤節子宮側での高い遺伝子発現量より、胎子循環血液中 PTHrP の主な由来は、胎盤節子宮側であることが示唆された。また新生子 PTHrP 濃度は出生後 3 日齢まで胎子期と同濃度に維持されたが、血液中 Ca 濃度は出生後 1 日以内で低下した。そのため、胎子期と同濃度の血液中 PTHrP 濃度は新生子においては、血液中 Ca 濃度には大きく関与しないことが示唆された。

これらの実験により、PTHrP が胎児期から新生児期のミネラル代謝に大きく関与していることが明らかとなり、胎盤由来と乳腺由来では分子や機能が異なることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

K. Onda, C. Noda, K. Nakamura, R. Sato, H. Ochiai, S. Arai, H. Madarame, K. Kawai and F. Sunaga, Effects of intravenous lactated Ringer's solution in cows suffering from hepatic disorders, Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, 査読有、accepted for publication

恩田賢、乳牛の脂肪肝の診断基準：血液生化学検査、家畜診療、63(3)171、2016

恩田賢、乳牛の周産期における低無機リン血症、家畜診療、63(1)5、2016

R. Sato, T. Ito, T. Suganuma, Y. Une, T. Kudo, H. Kayanuma, E. Kanai, T. Suzuki, H. Ochiai, N. Enomoto, S. Itoh, K. Onda, Y. Wada, Suspected panosteitis in a crossbred calf, Can. Vet. J., 査読有、56(5)465、2016

Yoshida M, Onda K, Wada Y, Kuwahara M, Influence of sickness condition on diurnal rhythms of heart rate and heart rate variability in cows, J Vet Med Sci. 査読有、77(3): 375-9, 2015.

恩田賢 皮下輸液 - 乳熱の治療、臨床獣医 33(2): 37-39, 2015.

内山大士, 佐藤礼一郎, 恩田賢, 牧野祥之, 宇根有美, 伊東正吾, 武藤眞, 和田恭則. 長期生存した頸部心臓逸所症のホルスタイン種乳牛の 1 例. 日獣会誌 査読有、67(6): 405-408, 2014.

Krueger LA, Beitz DC, Onda K, Osman M, O'Neil MR, Lei S, Wattoo FH, Stuart RL, Tyler HD, Nonnecke B. Effects of d-tocopherol and dietary energy on growth and health of preruminant dairy calves. J. Dairy Sci. 査読有、97(6): 3715-27, 2014.

K. Onda, R. Sato, Y. Yamazaki, S. Nakao, H. Kato, S. Itoh, H. Ochiai, Y. Wada, and K. Kaneko. A case of successful insemination in a Holstein cow after ovariectomy for unilateral abscess adjoining the ovary. Indian Vet. J. 査読有、91(1): 72-73, 2014.

R. Sato, K. Onda, K. Kazama, M. Ohnishi, H. Ochiai, K. Kawai, K. Kaneko, T. Ohashi, T. Miyamoto, Y. Wada. Changes in parathyroid hormone-related protein concentrations in bovine milk from the early stage of lactation. Livestock Sci. 査読有、159: 117-122, 2014.

〔学会発表〕(計 10 件)

R. Sato, K. Kawai, Y. Shinozuka, **K Onda**.
A case study of the hindlimb amputation
in a Holstein cow. WBC congress, Dublin.
2016

井坂紗英, **佐藤礼一郎**, 宇根有美, 金井詠
一, 菊池允人, **恩田賢**. 黒毛和種の鼻腔内大
型腫瘍の 1 例. 日本獣医師会獣医学術学会年
次大会, 秋田, 2016

佐藤礼一郎, 石橋愛子, 住吉俊亮, 河合一
洋, 篠塚康典, **恩田賢**. ホルスタイン種乳牛
における後肢断脚の 1 例. 日本獣医師会獣医
学術学会年次大会, 秋田, 2016

佐藤礼一郎, 榎本友弥, 村田俊輔, 伊東正
吾, **恩田賢**. 膿様心嚢水の貯留により循環障
害を呈したホルスタイン種乳牛の 1 例. 日本
産業動物獣医学会, 神奈川(横浜), 2015

西尾卓馬, **佐藤礼一郎**, 石原章和, 須永藤
子, **恩田賢**. 副甲状腺ホルモン関連タンパク
質の周産期ホルスタイン種乳牛の胎盤にお
ける発現および臍帯血液中の濃度. 第 158 回
日本獣医学学会学術集会, 青森, 2015

福田梓, 城田諒也, **佐藤礼一郎**, 久松伸,
恩田賢. 誘導結合プラズマ質量分析計
(ICP-MS) を用いた泌乳初期の牛乳汁中ミネ
ラル動態の解析, 第 157 回日本獣医学学会学術
集会, 北海道, 2014

佐野麻衣, **佐藤礼一郎**, 伊藤哲郎, 金井詠
一, 宇根有美, **恩田賢**. 汎骨炎が疑われた交
雑種子牛の 1 例. 第 157 回日本獣医学学会学術
集会, 北海道, 2014

R. Sato, Y. Une, E. Kanai, S. Itoh, **K.**
Onda, Y. Wada. Suspected panosteitis in a
crossbred calf, WBC congress, Cairns,
Australia. 2014

恩田賢. 牛の輸液療法の理論と実践「牛の
カルシウム代謝と輸液療法」. 2014 年 2 月、
招待公演、H25 年度日本獣医師会獣医学術学
会年次大会(千葉)

K. Onda, **R. Sato**, K. Kazama, H. Ochiai,
and Y. Wada. Changes in parathyroid
hormone-related protein concentrations in
bovine milk from the early stage of
lactation. ADSA-ASAS Joint Annual Meeting,
July 10, 2013, p116, Indianapolis, USA

〔図書〕(計 1 件)

恩田賢 他、緑書房、病態からみた牛の輸
液、2016、139-160、293-300

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)なし

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)なし

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
麻布大学・内科学第三研究室
http://www.azabu-u.ac.jp/lab/vv/vv_015.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

恩田 賢 (ONDA, Ken)
麻布大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号：70308302

(2) 研究分担者

佐藤 礼一郎 (SATO, Reiichiro)
麻布大学・獣医学部・講師
研究者番号：00582826

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：