

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05988

研究課題名(和文) 乳牛の分娩前後の血中・乳中オステオプロテゲリン濃度と診断マーカーとしての臨床応用

研究課題名(英文) Blood and milk osteoprotegerin levels in dairy cows around parturition and those clinical application as diagnostic markers.

研究代表者

山岸 則夫 (Yamagishi, Norio)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：30281877

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：乳牛の分娩後低カルシウム血症(乳熱)の予防に貢献する診断マーカーの確立を目的として、血中ならびに乳汁中の破骨細胞分化抑制因子であるオステオプロテゲリン(OPG)ならびにいくつかの骨代謝マーカーを測定した。乳熱は3産以上の経産牛が発症していた。健常分娩牛では、血中OPG濃度は分娩3週前に高く、分娩後に低下した。乳中のOPG濃度は初乳(分娩直後)が常乳(分娩後5日)よりも高い値を示した。乳熱罹患牛において、分娩前後の血中OPG濃度は非罹患牛と同等の値であった。ROC解析の結果から、骨芽細胞活性の指標であるALP3の血中活性が乳熱発症の事前予測(分娩数週間前の予測)に利用可能と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、乳牛を用いて分娩後低Ca血症(乳熱)の罹患リスク評価に利用可能なバイオマーカーを探索し、予防の基盤となる診断技術を築くことであった。乳牛の分娩前後の骨代謝評価のために骨代謝マーカーを用いた研究は多く行われてきたが、これまで破骨細胞分化抑制因子のOPGに着目した研究はなかった。本研究では乳牛の産次別あるいは乳熱罹患牛の分娩前後の血中OPG濃度ならびに分娩後の乳中OPG濃度を明らかにし、OPGが妊娠末期の破骨細胞の分化動態の指標になることを示唆した。骨芽細胞活性の指標である血中ALP3活性が乳熱発症予測(分娩数週間前)の診断マーカーとして利用可能であることも示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study project was to elucidate the blood and milk concentrations of osteoprotegerin (OPG), an osteoclast differentiation inhibitor, and several bone metabolism markers in periparturient dairy cows and to establish diagnostic biomarkers to help the prevention of bovine parturient hypocalcemia (milk fever, MF). MF occurred in cows experiencing more than 3 parturitions (MF cows). In the clinical healthy parturient (non-milk fever, non-MF) cows, the blood OPG concentration was high at 3 weeks prepartum; then it decreased after calving. The milk OPG concentration was higher in the colostrum (the milk at calving) than in the normal milk (the milk at 5 days postpartum). The blood OPG concentrations around parturition in the MF cows were identical to those concentrations in the non-MF cows. ROC analysis suggested that blood activity of ALP3, an indicator of osteoblast activity, could be used to predict the onset of milk fever at several weeks before parturition.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：乳牛 分娩性低カルシウム血症(乳熱) 妊娠・分娩 オステオプロテゲリン 骨代謝マーカー バイオマーカー 疾病予測診断 獣医臨床化学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 乳牛は分娩後に血中カルシウム (Ca) 濃度が低下 (低 Ca 血症) しやすく、この低下が激しい場合 (血中 Ca 濃度: 3-6 mg/dl) 意識低下と筋肉麻痺が起こるため起立できなくなる。この状態は乳熱あるいは産褥麻痺と呼ばれ、治療が遅れると死亡する。血中 Ca 濃度の低下が軽度 (7-8 mg/dl) でも、周産期疾患 (産褥期子宮疾患、ケトosis、第四胃変位等) を誘発して産乳量と受胎率の低下を招くため、乳牛は本来の生産能力を発揮できない。

(2) 乳牛が本来の生産能力を発揮できる飼養管理には、分娩後低 Ca 血症あるいは乳熱の予防や症状の早期発見と治療が不可欠である。その補助手段として、分娩前の早い時期に罹患リスクを予測する手段が必要である。

(3) 生体は低 Ca 血症に対して骨や消化管から Ca を動員して恒常性を保つが、分娩時の乳牛では骨からの Ca 吸収は抑制される。このことは骨が分娩後低 Ca 血症の予防の鍵になる。研究代表者は乳牛の分娩後低 Ca 血症の解析のための血中バイオマーカーとして骨代謝マーカーの研究を進めてきた。骨芽細胞活性の指標であるアルカリフォスファターゼ (ALP) の骨由来アイソザイム (BAP あるいは ALP3) や破骨細胞の数的変化の指標である酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP5b) が分娩時に増加すること [引用文献]、分娩 1 週間前から血中 TRAP5b が上昇する乳牛では低 Ca 血症が起こりにくいこと [引用文献] を見出した。

(4) オステオプロテゲリン (OPG) は破骨細胞の前駆細胞から成熟破骨細胞への分化の抑制因子である [引用文献]。乳牛の分娩前後において、OPG と TRAP5b の血中推移を同時に解析することで、分娩後低 Ca 血症の罹患リスクを詳細に判定できる可能性がある。

(5) 人の母乳には OPG が高濃度で含まれる [引用文献]。我々は牛の初乳中に TRAP5b が高濃度で存在することを見出しており [引用文献]。今回、初乳中 OPG の測定に成功すれば、乳汁バイオマーカーとして新たな価値を提示できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

(1) 乳牛の分娩後低 Ca 血症予防の基盤技術を確立するために、OPG や他の骨代謝マーカーが低 Ca 血症や乳熱の罹患リスクを予測するバイオマーカーとして利用可能かを検討することを目的とした。そのために健常分娩牛ならびに分娩後低 Ca 血症罹患牛における血中および乳中の OPG ならびに骨代謝マーカーの推移を確認した。さらに、一般牛群を対象にこれらのバイオマーカーが分娩後 Ca 血症や乳熱の早期診断に利用可能であることを検証した。

### 3. 研究の方法

(1) 研究 1: 健常分娩乳牛における血中の OPG ならびに骨代謝マーカーの推移  
ホルスタイン種の初産牛 9 頭と経産牛 9 頭から分娩予定 3 週間前 (-3wks)、分娩直後 (0d)、分娩 12 時間後 (0.5d)、2 日後 (2d)、5 日後 (5d) に採血し、血中 (血清) の OPG 濃度、TRAP5b および Ca 濃度を測定した。

(2) 研究 2: 健常分娩乳牛における乳中の OPG ならびに骨代謝マーカーの濃度  
ホルスタイン種の分娩牛 19 頭 (初産牛 9 頭、経産牛 10 頭) から、分娩 2 時間以内 (0d) および 5 日後 (5d) に乳汁と血液を採取した。バイオマーカーとして、血清ならびに乳清中の OPG、TRAP5b、BAP および I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (NTx) 濃度を測定した。血清 Ca 濃度も測定した。

(3) 研究 3: 乳熱罹患牛の血中 OPG ならびに骨代謝マーカーに関する回顧的研究  
研究 3 では、産次や乳熱 (MF) 発生と血中の骨代謝マーカーとの関係を明らかにする目的で、1 牛群から過去 4 年間に得たホルスタイン種乳牛の血液生化学検査結果を統計学的に解析した。供試牛は 49 頭で、その内訳は初産 8 頭、2 産 17 頭、3 産 12 頭、4 産以上 12 頭であった。乳熱罹患牛 (MF) は、3 産以上の経産牛 7 頭であった。血清は分娩前 3 週から分娩当時まで毎週 1 回採取されたものを使用し、OPG と TRAP5b を測定した。

(4) 研究 4: 一般牛群における血中および乳中 OPG および骨代謝マーカーの分娩後低 Ca 血症の診断バイオマーカーとしての検証

一牛群の妊娠末期のホルスタイン種乳牛 58 頭を供試牛とし、これらは未経産群 (n=13)、初産群 (n=20)、2 産群 (n=13)、3-5 産 (高産群, n=12) に分かれた。さらに、2 産と高産群

では乳熱が発生したため、これらを経産群としてまとめ、乳熱牛 (n=8) と非乳熱牛 (n=17) に分類した。採血は分娩前 3 週 (-3wk) から分娩後 5 日 (5d) まで定期的に行い、血清を測定まで凍結保存した。測定項目は、Ca、TRAP5b、OPG、ALP3 である。

一方、供試牛 58 頭のうち 48 頭から分娩後 12 時間以内 (0d) に乳汁を採取した。これらの内訳は、未経産群 20 頭、初産群 11 頭、経産群 (2-5 産) 17 頭であり、経産群のうち 6 頭は分娩直後に乳熱を発症した (乳熱牛)。0d の乳中 (乳清) および血清の OPG、NTx、TRAP5b 濃度を測定した。

#### (5) 血液 (血清) および乳汁 (乳清) の生化学検査

OPG (オステオプロテグリン): 市販キット (Bovine OPG Elisa kit, NeoScientific, 米国) を用いて競合酵素結合免疫吸着測定法により測定した。

Ca (カルシウム): 自動血液生化学分析装置 (TBA120-FR、東芝メディカルシステムズ) を用いて、orthocresolphthalein complexone による比色法 [引用文献 ] により測定した。

TRAP5b (酒石酸耐性酸フォスファターゼ): ナフトール-ASBI-リン酸 (富士フィルム・和光) を基質とした酵素反応による蛍光測定法 [引用文献 、 ] により測定した。

BAP (骨型アルカリフォスファターゼ骨由来アイソザイム): p-ニトロフェニルリン酸を基質とし ALP の酵素活性を市販のキット (ラボアッセイ ALP、富士フィルム・和光) を用いて測定した。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 活性値を引き、BAP 活性値を算出した [引用文献 ]

ALP3 (骨型アルカリフォスファターゼ骨由来アイソザイム): 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。ALP3 活性値の測定には、プロテアーゼとノイラミニダーゼによる処置を併用した [引用文献 ]

NTx (I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド): 市販のキット (Osteomark NTx Serum, アーリアメディカル株式会社, 東京) を用いて競合酵素結合免疫吸着測定法により測定した。

## 4. 研究成果

### (1) 研究 1: 健常分娩乳牛における血中の OPG ならびに骨代謝マーカーの推移

研究 1 の供試牛は全て健常分娩し、乳熱を発症した個体はなかった。

血中 Ca 濃度は、初産牛では変化なく正常範囲内の値であったが、経産牛では-3wks と比較して 0d から 2d にかけて有意に低下した。血中 OPG 濃度は、経産牛では-3wks の値が初産牛に比べて有意な高値を示したが、0d から 5d では有意に低下した。初産牛では血中 OPG 濃度は分娩前後の変動はなかった。血中 TRAP5b 濃度は、経産牛ならびに初産牛ともに-3wks の値よりも 0d と 0.5d で有意に増加したが、それらの濃度は初産牛の方が有意に高値であった。

血中 TRAP5b 濃度は破骨細胞の数的変化の指標であり、OPG は破骨細胞の分化抑制因子である。今回の結果から、骨代謝が活発な初産牛では分娩前後における破骨細胞の分化抑制は低く保たれるが、経産牛では妊娠末期に破骨細胞の分化抑制は高く、分娩後にその抑制が解除されることが推察された。血中 OPG 濃度は分娩前後の乳牛の破骨細胞の分化動態を示す指標になることが示唆された。

### (2) 研究 2: 健常分娩乳牛における乳中の OPG ならびに骨代謝マーカーの濃度

乳清中の OPG、TRAP5b、BAP および NTx 濃度は、いずれも 0d から 5d にかけて有意に減少した。初産牛の 0d の乳清 OPG 濃度は、経産牛よりも有意に高値であった。血清中の OPG、TRAP5b および BAP 濃度は、0d と 5d で同等であった。

0d の乳清と血清濃度において、経産牛の乳清 OPG 濃度は血清よりも低値で、乳清 TRAP5b と BAP 濃度は血清よりも高値を示した。初産牛の乳清 NTx 濃度は血清よりも高値を示した。乳清および血清中の OPG 濃度と他のバイオマーカー濃度の相関解析では、乳清中の OPG 濃度と NTx 濃度の間に強い正の相関がみられた。乳清 OPG 濃度の血清 Ca 濃度との間に相関はなかった。

今回の結果から、常乳に比べ初乳には OPG や骨代謝マーカーが多く含まれるが、健常分娩牛の乳中には血清より濃度が低いことが明らかになった。乳中の OPG 濃度と NTx 濃度の相関は、乳中 OPG 濃度は骨代謝の影響を受けることを示唆する所見と考えられる。

### (3) 研究 3: 乳熱罹患牛の血中 OPG および TRAP5b に関する回顧的研究

血清 OPG 濃度は、2 産の経産牛においてのみ、分娩前 1 週で下降した。血中 TRAP5b 活性は、初産牛では経産牛よりも高値であったが、その推移は全供試牛ともに分娩前 2 週までは一定で分娩当日に増加した。血中の OPG と TRAP5b の比 (O/T 比) を求めたところ、初産牛では低く一定の値で推移したが、経産牛では分娩前 3 および 2 週で高く、分娩当時に減少した。分娩 3 週前と分娩時の血中 O/T 比の低下比率 (PreCOT) を求めたところ、経産牛で産次数と負の相関が認められた。なお、3 産以上の経産牛において、MF 罹患牛と非罹患牛との間には血中 OPG ならびに TRAP5b の推移に差は見られなかった。

OPG は破骨細胞(OC)の分化を抑制する因子である。OC によって分泌される TRAP5b は、成熟した OC の数を反映する指標である。よって、妊娠末期の OC 分化は産次が進むに伴い低下することが示唆された。また、O/T 比は一つ OC に作用する OPG の活性を評価するものであり、OC の分化状態の指標として利用可能と考えられた。

(4) 研究 4：一般牛群における血中および乳中 OPG および骨代謝マーカーの分娩後低 Ca 血症の診断バイオマーカーとしての検証

全供試牛の解析では、血清 Ca 濃度は 0d に全群で低下し高産群は他群に比べて低値を示した。TRAP5b 活性は未経産群で終始高く 0d で一過性に上昇した。ALP3 活性は未経産群、初産群、2 産群、高産群の順に終始高かった。経産牛の解析では、乳熱牛の 0d の血清 Ca 濃度は非乳熱牛よりも低かった。TRAP5b 活性は乳熱牛では 0d と 5d に、非乳熱牛では 0d に増加した。乳熱牛の乾乳期の ALP3 活性は非罹患牛より低かった。ピアソン相関分析では乾乳期の ALP3 活性は、0d の Ca 濃度と中度の正の相関、産次数と高度の負の相関を示した。ROC (受信者動作特性曲線) 分析では-3 および-2wk の ALP3 活性が乳熱に高い判別能を有し乳熱の発症予測に有用と考えられた (Table 1)。

一方、乳清 OPG 濃度は乳清 NTx 濃度や血清 OPG および NTx 濃度と高い相関を示したが、他の測定値との相関はなかった。高産歴群では、乳熱牛の乳清 OPG 濃度は非乳熱牛に比べ有意に高値であった。乳清 OPG 濃度は乳熱の発症を反映するバイオマーカーになると考えられた。

Table 1. 経産牛25頭における分娩前の血中骨代謝マーカー値による乳熱の診断精度

項目	感度 (%)	特異度 (%)	ROC曲線下面積 (95% CI)
分娩3週前			
TRAP5b	100	52.9	0.77 (0.57 - 0.96)
OPG	75.0	71.0	0.49 (0.24 - 0.75)
ALP3	87.5	81.2	0.89 (0.75 - 1)
O/T ratio	12.5	94.1	0.41 (0.15 - 0.67)
A/T ratio	100	37.5	0.66 (0.43 - 0.90)
分娩2週前			
TRAP5b	75.0	64.7	0.69 (0.44 - 0.93)
OPG	75.0	52.9	0.59 (0.35 - 0.83)
ALP3	87.5	76.5	0.88 (0.74 - 1)
O/T ratio	50.0	82.4	0.62 (0.37 - 0.87)
A/T ratio	100	35.3	0.71 (0.47 - 0.93)
分娩1週前			
TRAP5b	62.5	94.1	0.74 (0.48 - 1)
OPG	50.0	82.4	0.63 (0.39 - 0.88)
ALP3	87.5	58.8	0.68 (0.45 - 0.90)
O/T ratio	50.0	88.2	0.68 (0.43 - 0.92)
A/T ratio	100	23.5	0.52 (0.29 - 0.76)

<引用文献>

Kim, D., Yamagishi, N., Ueki, A., Miura, M., Saito, F., Sato, S. Furuhashi, K. (2010). Changes in plasma bone metabolic markers in periparturient dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science* 72: 773-776.

Devkota, B., Takahashi, M., Sato, S., Sasaki, K., Ueki, A., Osawa, T., Takahashi, M. Yamagishi, N. (2015). Plasma fluctuation in estradiol-17 and bone resorption markers around parturition in dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science* 77: 875-878.

Rissanen, J. P., Suominen, M. I., Peng, Z., Halleen, J. M. (2008) Secreted tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a Marker of osteoclast number in human osteoclast cultures and the rat ovariectomy model. *Calcified Tissue International* 82: 108-115.

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, Boyle, W. J. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 89: 309-319.

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. *Journal of Veterinary Medical Science* 78: 337-340.

Connerty, H. V., Briggs, A. R. (1966). Determination of serum calcium by means of orthocresolphthalein complexone. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45: 290-296.

Matsuo, A., Togashi, A., Sasaki, S., Devkota, B., Hirata, T., Yamagishi, N. (2014) Diurnal variation of plasma bone markers in Japanese Black calves. *Journal of Veterinary Medical Science* 76: 1029-1032.

Yamagishi, N., Takehana, K., Kim, D., Miura, M., Hirata, T., Devkota, B. Sato, S. Furuhashi, K. (2009). Fluorometric method for measuring plasma tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b and its application in cattle. *Journal of Veterinary Medical Science* 71: 1637-1642.

Mohebbi, A., Khaghani, A. and Mohammadnia, A. (2010). Bone-specific alkaline phosphatase activity in dairy cows. *Comparative Clinical Pathology* 19: 33-36

Chiba, A., Hatate, K., Onomi, R., Moriyama, T., Goto, A., Yamagishi, N. (2020) Agarose gel electrophoresis pattern of serum alkaline phosphatase isoenzymes in Holstein cows during lactation. *Polish Journal of Veterinary Science* 23: 317-319.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hatate Kaoru, Kawashima Chiho, Kayano Mitsunori, Hanada Masaaki, Yamagishi Norio	4. 巻 131
2. 論文標題 Blood markers of osteoclastic differentiation in periparturient dairy cows at different parities, with and without milk fever	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Research in Veterinary Science	6. 最初と最後の頁 301 ~ 305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rvsc.2020.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamagishi Norio, Kawashima Chiho	4. 巻 89
2. 論文標題 Prepartum measurement of serum biomarkers reflecting osteoclastic and osteoblastic bone metabolism for predicting the risk of milk fever in dairy cows	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Dairy Research	6. 最初と最後の頁 44 ~ 52
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1017/S0022029922000218	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山岸則夫、川島千帆
2. 発表標題 乳牛の乾乳後期の血中骨代謝マーカー値による乳熱発症予測の可能性
3. 学会等名 令和3年度 獣医学術近畿地区学会日本産業動物獣医学会（近畿）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------