

学 位 論 文 題 名

# Studies on the prevention of milk fever using dietary anion salts in dairy cows

(乳牛における食餌性陰イオン塩を利用した乳熱予防に関する研究)

## 学位論文内容の要旨

乳熱は酪農業において、依然として重要な問題であるが、理想的な治療法や予防は未だ確立されていない。本研究の目的は、食餌性アニオン塩を用いた乳熱予防を開発し、その方法の効果とそれを評価するためのバイオマーカーを同定し、さらに予防効果のメカニズムを明らかにすることである。

最初に、穏やかに飼料中カチオン・アニオン差 (DCAD) を変化させることによって乳牛の乳熱を予防できるかどうかを調べた。30 頭の経産牛と 10 頭の未経産牛 (若牛群) を用い、経産牛には無作為に 10 頭ずつの 3 群に分けた (アニオン群、非アニオン群、及び対照群)。アニオン群には軽度 DCAD を低下させる塩類を補給した。1 頭当たりの 1 日量として、 $\text{CaCO}_3$  115g,  $\text{CaHPO}_4$  42g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  65g 及び  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  80g が、分娩予定日の 21 日前から分娩日まで、胃カテーテルを使って投与された。非アニオン群には、硫酸及び塩化物を含まず、アニオン群と同等の Ca, Mg, iP を含む補充塩が投与された。コントロール群及び若牛群には補充塩は投与されなかった。アニオン群の低 Ca 血症発症率は、非アニオン群及びコントロール群の 3 分の 1 に減少し、若牛群で低 Ca 血症は発症しなかった。さらに、アニオン群においては、低 Ca 血症を治療した日数及び治療に要した薬瓶 (ボログルクロン酸 Ca 溶液) が、非アニオン群及び対照群に比較して半分以上に減少した。分娩時、コントロール群 ( $6.2 \pm 1.9$  mg/dl, 平均値  $\pm$  標準偏差) および非アニオン群 ( $6.4 \pm 1.7$  mg/dl) の血清 Ca 濃度は、若牛群の値 ( $8.3 \pm 0.4$  mg/dl) に比較して有意に低く、アニオン群の値 ( $7.3 \pm 1.3$  mg/dl) はこれらの中間であった。分娩前 2 週間のアニオン群の尿 pH (6.8-7.0) は、対照群 (7.3-7.5) 及び非アニオン群 (7.9-8.1) に比較してやや酸性に維持され、若牛群 (6.3-7.3) に近似していた。すべての経産牛の上皮小体ホルモン及び 1,25-ジヒドロキシビタミン D 濃度には、特別な変化は認められなかったが、若牛群では実験期間中、低い濃度に保たれた。これらの成績から、分娩前に僅かに DCAD を低下させる陰イオン塩の投与が、経産牛において乳熱を予防する効果のあることが示された。この陰イオン投与による安全で穏やかな代謝性アシドーシスの程度は、尿 pH (6.8-7.0) で評価することができた。また、このアシドーシスが分娩時の Ca 要求に対して感受性を増加すると考えられたが、この効果は Ca 関連ホルモンの放出によるものではないと推察された。さらに、未経産牛は突然の Ca 要求に対する高い反応性を有することが明らかになったが、これも関連ホルモンの放出によるものではなかった。また、未経産牛の Ca 代謝は、陰イオンを投与された経産牛の Ca 代謝にいくつかの点で類似していた。

次に、DCAD を低下させることによる乳熱予防効果のメカニズムを調べるために、最初の実験で採取・保管されていた試料を用いて、Ca 代謝活性化を示すと予測される数種のバイオマーカーを分析した。この目的のため、骨特異的アルカリフォスファターゼ (BALP)、オステオカルシン、インスリン様成長因子-I (IGF-I)、デオキシピリジノリン (DPD) 及び酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) を分析した。BALP 活性、オステオカルシン濃度、IGF-I 濃度の変化は、陰イオン塩の投与にかかわらず 3 つの経産牛の間でほぼ同じであった。一方、若牛群のこれらの 3 種の血清中バイオマーカーは、実験期間を通じて、3 つの経産牛群の値に比較して、極めて高い数値であった。また、尿中 DPD 排泄量は、すべての群で周産期にほとんど変化しなかったため、乳牛にとって有用なバイオマーカーではなかった。しかし、3 つの経産牛群のうち、アニオン群において、破骨細胞活性のバイオマーカーとして知られる血清 TRAP 活性が増加し、経産牛対照群の値よりも極めて高かった若牛群の数値に近づいたため、このバイオマーカーの変化が DCAD を低下させる陰イオン塩投与に密接に関連していると考えられた。アニオン群の TRAP 活性の増加は、DCAD を僅かに低下させることで導かれた緩やかなアシドーシス状態によって、予め活性化された破骨細胞を介して、分娩時に骨結合 Ca が血清プールへと速やかに動員されたことを示唆していた。よって、血清 TRAP 活性は、アニオン塩を投与された乳牛において、Ca 代謝の活性化状態をモニターするための最良のバイオマーカーであった。

最後に、DCAD を低下させることによる乳熱予防効果のメカニズムを調べるため、ならびにその効果をより簡単に評価できるパラメーターを同定するため、血清及び尿中の臨床病理学的成分を、最初の実験で採取・保管されていた試料を用いて分析した。若牛群の血清 iP 濃度及び尿中 iP 排泄量が、経産牛の群よりも有意に高かったため、iP は乳熱に関連するパラメーターと考えられた。若牛群とアニオン群の血清クロール濃度は、他の経産牛に比較して高い傾向にあったため、アニオン塩を与えられた乳牛の代謝性アシドーシスの状態と DCAD を低下させた効果を評価する指標として利用できると考えられた。さらに、分娩時に若牛群の血清エストラジオール-17 $\beta$  濃度は、経産牛群に比較して低い傾向があり、乳熱に関連している可能性が示唆された。

結論として、緩やかに DCAD を低下させる技術は、乳熱を予防する効果的で安全かつ自然な方法であると考えられ、今後の実用化が期待される。DCAD を緩やかに低下させるアニオン塩の投与によって生じた軽度のアシドーシスは、経産牛においても破骨細胞を十分に活性化させ、分娩時の急激な Ca 要求に対して反応できる状態にすると考えられた。また、その効果を評価するためには、血清 TRAP が最良のバイオマーカーであり、さらに、尿 pH 及び血清クロール濃度も食餌性アニオン塩による代謝性アシドーシスの状態をモニターする良い指標であると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 前 出 吉 光

副 査 教 授 葉 原 芳 昭

副 査 助教授 田 島 誉 士

副 査 教 授 大 和 修 (鹿児島大学)

## 学 位 論 文 題 名

### Studies on the prevention of milk fever using dietary anion salts in dairy cows

(乳牛における食餌性陰イオン塩を利用した乳熱予防に関する研究)

本研究は、食餌性アニオン塩を用いた乳熱予防を開発し、その方法の効果とそれを評価するためのバイオマーカーを同定し、さらに予防効果のメカニズムを明らかにすることを目的としている。

最初に、穏やかに飼料中カチオン・アニオン差 (DCAD) を変化させることによって乳牛の乳熱を予防できるかどうかを調べた。その結果、DCAD を低下させるアニオン塩類を分娩予定日の 21 日前から分娩日まで補給された経産牛群 (アニオン群) の低 Ca 血症発症率は、コントロール群の 3 分の 1 に減少し、未経産牛群では低 Ca 血症を発症しなかった。また分娩時、アニオン群の血清 Ca 濃度は、コントロール群に比較して高い傾向がみられた。これらの成績から、分娩前に僅かに DCAD を低下させる陰イオン塩の投与が、経産牛において乳熱を予防する効果のあることが示された。この効果は尿 pH(6.8-7.0)で評価することができた。

次に、DCAD を低下させることによる乳熱予防効果のメカニズムを調べるために、Ca 代謝活性化を示すと予測される数種のバイオマーカーを分析した。その結果、血清 TRAP (酒石酸耐性酸フォスファターゼ) 活性が、アニオン塩を投与された乳牛において、Ca 代謝の活性化状態をモニターするための最良のバイオマーカーであることが明らかとなった。

最後に、DCAD を低下させることによる乳熱予防効果のメカニズムを調べるため、ならびにその効果をより簡単に評価できるパラメーターを同定するため、血清及び尿中の成分を分析した。その結果、血清 iP 濃度及び尿中 iP が乳熱に関連するパラメーターと考えられた。血清クロール濃度も、アニオン塩を与えられた乳牛の代謝性アシドーシスの状態と DCAD を低下させた効果を評価する指標として利用できると考えられた。さらに、血清エストラジオール-17 $\beta$  濃度は、乳熱に関連している可能性が示唆された。

以上のように本研究成果は乳熱予防に関する多くの新知見を含んでいる。よって、審査委員一同は上記博士論文提出者黒崎尚敏氏の博士論文は北海道大学大学院獣医学研究科規程第 6 条の規程による本研究科の行う博士論文の審査等に合格と認めた。