分娩前の乳牛に投与された 1α -hydroxyvitamin D_3 の血中カルシウムと 1α , 25-dihydroxyvitamin D 濃度に及ぼす影響

内藤善久*¹⁾ 高橋雅春*²⁾ 佐藤れえ子*³⁾ 金田義宏*¹⁾ 村上大蔵*¹⁾

(平成元年 9 月 22 日受理)

Effects of 1α -Hydroxyvitamin D_3 on Plasma Calcium and 1α , 25-Dihydroxyvitamin D Concentrations in Pre- and Post- Parturient Cows

YOSHIHISA NAITO (Iwate University, Ueda, Morioka-shi 020), MASAHARU TAKAHASHI, REEKO SATO, YOSHIHIRO KANEDA and DAIZO MURAKAMI

SUMMARY

The present study was carried out to determine the prophylactic effects of the injection of 1α -hydroxyvitamin D_3 ($1\alpha(OH)D_3$) on parturient hypocalcemia. Ten pregnant Holstein-Friesian cows were divided into control and treated groups, each consisting of 5 cows. Treated cows were injected once intramuscularly with 500 μ g of $1\alpha(OH)D_3$ (dissolved in 3 ml ethanol) at 6 hrs to 8 days before parturition and control cows were injected with 3 ml ethanol. Three out of 5 treated cows, which were injected with $1\alpha(OH)D_3$ at 6 hrs to 2 days before calving, showed a distinct increase of plasma $1,25(OH)_2D$ concentration at parturition, which inhibited the decrement of plasma Ca and inorganic phosphorus (Pi) concentration after parturition. On the other hand, 2 of the 5 cows were injected with $1\alpha(OH)D_3$ at 7 and 8 days before calving, respectively, but did not show the increase of plasma $1,25(OH)_2D$ at parturition, and caused a decrease of plasma Ca and Pi after parturition. Each treated cow showed an increase in plasma hydroxyproline concentration after parturition, as was also noted in control cows. ————*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 42, 849~853 (1989).

要 約

乳牛の分娩時の低 Ca 血症に対する 1α -hydroxyvitamin D_3 ($1\alpha(OH)D_3$) の予防効果を明らかにする目的でホルスタイン種経産牛 10 頭を用いて、5 頭には分娩前 6 時間から 8 日の間にエタノール 3 ml に溶解した $1\alpha(OH)D_3$ 500 μ g を、また残りの 5 頭には対照群としてエタノール 3 ml のみをそれぞれ筋肉注射した。これらの供試牛について分娩前 10 日から分娩後 7 日まで血漿の $1,25(OH)_2D$, Ca, Pi, Mg および 4-ヒドロキシプロリン (Hyp) 濃度を測定した。その結果、分娩前 6 時間から 2 日の間に $1\alpha(OH)D_3$ を投与された 3 頭 (No. 3, 4, 5) における血漿 $1,25(OH)_2D$ 濃度は、分娩時に明瞭に上昇し、それとともに分娩後の血漿 Ca と Pi 濃度の低下は抑制された。しかし、分娩前 7 日および 8 日に投与された 2 頭 (No. 1, 2) の血漿 $1,25(OH)_2D$ 濃度は、分娩時から分娩後にかけて上昇せず、血漿の Ca および Pi 濃度は、いずれも分娩後に低下した。また、各投与牛の血漿 Hyp 濃度は、対象群のそれとよく一致して分娩後に上昇した。以上のことから、分娩後の低 Ca 血症を防ぐための $1\alpha(OH)D_3$ の投与時期は分娩前 2 日後が最も効果的と考えられた。

分娩麻痺は乳牛の分娩にともなって発生する代謝病の 1 つであり、臨床的には起立不能を呈し、血液的には低

カルシウム (以下, Ca) 血症と低無機リン (以下, Pi) 血症を特徴とする疾患である¹⁰⁾。したがって、分娩後の血中の Ca と Pi 濃度を上昇させることを目的として、分娩前にビタミン D_3 (以下, V- D_3) の 1,000 万単位の筋肉注射が本症の予防法の 1 つとして広く行われてきている¹⁴⁾。とくに、近年、V- D_3 のメタボライトが合成され始め、分娩麻痺の予防剤として V- D_3 誘導体の応用が注目されるようになった。その 1 つが 1α -

*¹⁾ 岩手大学農学部 (盛岡市上田 3-18-8)

*²⁾ 特殊免疫研究所 (栃木県下都賀郡石橋町下石橋 蛙ヶ花 170)

Key Words : 乳牛, $1\alpha(OH)D_3$, 血漿 Ca 濃度, 血漿 $1,25(OH)_2D$ 濃度.

hydroxyvitamin D_3 (以下, $1\alpha(OH)D_3$) である。この $1\alpha(OH)D_3$ は、V- D_3 の最終活性産物である $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 (以下, $1,25(OH)_2D_3$) になるには肝臓で 25 位の水酸化反応を受けるだけで効果を発現するものである。V- D_3 が活性型にまで変換されるには、肝臓と腎臓において 2 回の水酸化反応が必要とされるのに比較すると速やかな効果の発現が期待される¹⁶⁾。McMARRY ら¹²⁾ は、 $1\alpha(OH)D_3$ と V- D_3 との分娩麻痺の予防効果について比較した結果、 $1\alpha(OH)D_3$ の投与が V- D_3 のそれよりも分娩麻痺の発生率が少なかったと報告し、その発症には分娩までの投与間隔が重要であることを示唆している。 $1\alpha(OH)D_3$ の投与間隔について、SACHS ら¹⁸⁾ は、分娩前 1 日以内の投与群は、それ以上の群に比較して分娩麻痺の発生率は高かったとして、その違いを発生率から比較しているが、その機序についてはまだ明らかにされていない。よって、本実験は、分娩前 6 時間から 8 日に投与された $1\alpha(OH)D_3$ の分娩麻痺の予防効果の発現機序を明らかにする目的で、血漿のカルシウムや $1,25(OH)_2D$ 濃度を中心に調べ、その投与時期について検討を加えた。

1. 材 料 と 方 法

1) 供 試 牛 と そ の 飼 養 方 法

供試牛は本学農学部附属農場で飼育されているホルスタイン種産牛 10 頭で、5 頭 (No. 1~5) には $1\alpha(OH)D_3$ を投与し、残る 5 頭は無処置の対照群とした。供試牛の年齢は 3~6 歳、産歴は 1~4 産のものである。飼料は 1 日当たり乾草 8 kg と配合飼料 4 kg を朝夕 2 回に等分して給与した。

2) $1\alpha(OH)D_3$ と そ の 投 与 方 法

$1\alpha(OH)D_3$ は中外製薬より供試されたものを使用した。

図 1 各 $1\alpha(OH)D_3$ 投与牛と対照群の血漿 $1,25(OH)_2D$ 濃度の推移

その投与量は $500\mu g$ として 3 ml エタノールに溶解し、でん部筋肉に 1 回注射した。投与時期は分娩予定日の 2 日前とした。また、対照群には 3 ml のエタノールを同様に投与した。

3) 血 液 採 取 と 測 定 方 法

分娩前の血液採取は毎日夕方の飼料給与前に行った。また、分娩後の血液採取は分娩直後、分娩後 0.5, 1, 2, 3, 5, および 7 日目に行った。血漿 $1,25(OH)_2D_3$ 濃度は LAMBERT らの radioreceptor 法⁹⁾ に準じ、cytosol 精製は志村らの方法¹⁹⁾ によって実施した。血漿の Ca およびマグネシウム (以下, Mg) 濃度は PYBUS の方法¹⁷⁾ に従って、原子吸光法によって測定した。血漿 Pi 濃度は CHEN らの方法³⁾ によって測定した。血漿 4, ヒドロキシプロリン (以下, Hyp) 濃度は血漿をエタノールにて除タンパクした上清について JAMALL らの

図 2 各 $1\alpha(OH)D_3$ 投与牛と対象群の血漿 Ca 濃度の推移

図 3 各 $1\alpha(OH)D_3$ 投与牛と対象群の血漿 Pi 濃度の推移

方法⁸⁾によって測定した。

2. 成績

1) $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ 投与と分娩との時間間隔

$1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ の投与時期は分娩予定日の2日前としたが、分娩予定日に出産した投与牛は No. 3 のみであった。すなわち、投与と分娩との間隔は投与牛 No. 1, 2, 3, 4, および5の順に、それぞれ8, 7, 2, 1日, および6時間であった。

2) 血漿 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ 濃度

対象群の血漿 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度は分娩時から分娩後にかけて上昇する傾向がみられ、分娩後2および3日目に最高値 (110.7 ± 57.6 および 111.8 ± 63.4 pg/ml) を示した。これに対して、各投与牛における血漿 $1,25(\text{OH})_2$

D 濃度は、いずれも投与後上昇して18時間ないし2日目で最高値に達し、その値は $150.2 \sim 429.7$ pg/ml の間であった。しかし、投与後5～8日目までにはほぼ投与前のレベル ($36.9 \sim 69.4$ pg/ml) にまで低下した (図1)。すなわち、分娩前6時間から2日の間に $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ が投与された No. 3, 4 および5の分娩後における血漿 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度は、対照群に比べて高い値で推移した。いっぽう、分娩前7日および8日に投与された No. 1と2の分娩後の血漿 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度は、対照群で見られた分娩後の上昇は示さなかった。

3) 血漿 Ca 濃度

対照群の血漿 Ca 濃度は分娩後1日の間で低下する傾向がみられた。これに対して、分娩前6時間から2日の間に $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ が投与された No. 3, 4 および5の血漿 Ca 濃度は、分娩前後を通じて対照群に比べ高い値で推移した。いっぽう、分娩前7日および8日に投与された No. 1と2の分娩後の血漿 Ca 濃度は、対照群に比較して No. 1では分娩後0.5日 (7.0 mg/dl) と1日目 (6.8 mg/dl) に、また No. 2では分娩後7日目 (6.9 mg/dl) に低下した (図2)。

4) 血漿 Pi 濃度 (図3)

対照群の血漿 Pi 濃度は、分娩時に一過性の低下を示したほかは、分娩前後に著変が見られなかった。これに対して分娩前6時間から2日の間に $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ を投与された No. 3, 4 および5の血漿 Pi 濃度は、分娩後1～3日目において対照群よりも高い値で推移した (図3)。また、分娩前7日および8日に投与された No. 1と2の血漿 Pi 濃度は、対照群に比較して投与後いずれも分娩前は急激に上昇したが、No. 2では分娩後5～7日目には著明に低下し ($1.9 \sim 2.7$ mg/dl), No. 1では対照群のそれよりも高い値で推移した (図3)。

5) 血漿 Mg 濃度

対照群の血漿 Mg 濃度は、分娩前後を通じて著変がみられなかった。これに対して $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ を投与された各投与牛の血漿 Mg 濃度は、いずれも低下する傾向がみられた (図4)。

6) 血漿 Hyp 濃度

対照群の血漿 Hyp 濃度は分娩後明瞭に上昇し、3日目に最高値に達した。また、投与牛 No. 1, 3 および5における血漿 Hyp 濃度の推移は対照群のそれとよく一致して、分娩後明瞭に上昇した。しかし、No. 4では分娩後の上昇は認められず、また No. 2では投与後著明に低下し、いずれも分娩後3日目以後には対照群に比べて低い値で推移した (図5)。

3. 考察

対照群における血漿 $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 濃度は、分娩時から分娩後にかけて上昇する傾向を示した。これと同様の変

図4 各 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ 投与牛と対象群の血漿 Mg 濃度の推移

図5 各 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ 投与牛と対象群の血漿 Hyp 濃度の推移

化は, Horst ら⁶⁾ および Hollis ら⁵⁾ によって報告されており, 分娩に伴う血中の Ca および Pi 濃度の低下に対する生理的な反応として, $1,25(OH)_2D_3$ の生成が促進された結果と考えられる. いっぽう, $1\alpha(OH)D_3$ の $500 \mu g$ を投与された各投与牛の血漿 $1,25(OH)_2D$ 濃度は, いずれも投与後上昇し, 18 時間ないし 2 日目で最高値に達し, 5~8 日にいたって低下した. この推移は, 非分娩期の牛に $1\alpha(OH)D_3$ を投与した結果と一致した^{2,7,15)}. また, 各投与牛のうち, 分娩前 7 および 8 日に投与された No. 1 と 2 では, 分娩後いずれも血漿 Ca 濃度が低下したにもかかわらず, 血漿 $1,25(OH)_2D$ 濃度の上昇はみられなかった. これは, $1\alpha(OH)D_3$ の投与により増加した $1,25(OH)_2D_3$ が自己に対する負のフィードバックによって, 腎臓における 1α 位水酸化反応を停止させた結果, 分娩時の低 Ca 血症に対する反応性の遅延が引き起こされたものと考えられる. いっぽう, 分娩前 6 時間から 2 日の間に $1\alpha(OH)D_3$ が投与された No. 3, 4 および 5 においては, 血漿 $1,25(OH)_2D$ 濃度のピークは分娩時から分娩後 1 日目までの間にあり, 上昇の程度に差があるものの, いずれも対照群よりも高い値で推移した. すなわち, これら 3 頭の血漿 $1,25(OH)_2D_3$ 濃度の上昇は, 対照群における上昇と異なり低 Ca 血症に反応してみられる生理的な変化ではなく, $1\alpha(OH)D_3$ 投与による薬理学的な上昇であり, それによって分娩の血漿 Ca 濃度の低下を抑制したと考えられる.

分娩麻痺の予防を目的として妊娠末期の乳牛に $1\alpha(OH)D_3$ を投与し, 分娩後の血漿 Ca 濃度の低下が抑制されたとする報告はいくつか見られる^{1,4,12,18)}. 本実験における分娩前 6 時間から 2 日の間に $1\alpha(OH)D_3$ が投与された No. 3, 4 および 5 では, それらの報告と一致して, $1\alpha(OH)D_3$ 投与により分娩後の血漿 Ca 濃度の低下は抑制された. しかし, 分娩前 7 日および 8 日に $1\alpha(OH)D_3$ が投与された No. 1 と 2 における血漿 Ca 濃度は分娩後低下した. この血漿 Ca 濃度の低下時における血漿 $1,25(OH)_2D$ 濃度をみるといずれにおいても上昇は見られなかった. すなわち, $1\alpha(OH)D_3$ 投与直後から著明に上昇した血漿 $1,25(OH)_2D$ 濃度は, 腎臓における $1,25(OH)_2D$ の合成を自ら抑制し, 分娩時の生理的な血漿 Ca 濃度の低下に反応して上昇できず, その結果として血漿 Ca 濃度が対照群よりも低くなったものと考えられる. これらの結果は $1\alpha(OH)D_3$ の分娩性低 Ca 血症の予防効果を考えるうえで, 投与から分娩までの時間間隔, すなわち, $1\alpha(OH)D_3$ の投与時期について重要な示唆を与えるものであり, 分娩予定日のみを指標として投与時期を決定する方法の限界を示すものと考えられる.

$1\alpha(OH)D_3$ 投与後の血漿 Pi 濃度は, 血漿 $1,25(OH)_2D$ 濃度の上昇に反応して漸次上昇し, 4~6 日でピークに達した. この推移は非分娩期の牛に $1\alpha(OH)D_3$ を投与し

て得た結果とよく一致していた^{1,7,15)}. いっぽう, 分娩前後の血漿 Pi 濃度の変化に及ぼす影響を論ずる場合には, すでに述べた血漿の $1,25(OH)_2D$ と Ca の濃度の場合と同様に, 投与から分娩までの間隔が問題になる. すなわち, 分娩前 6 時間から 2 日の間に $1\alpha(OH)D_3$ が投与された No. 3, 4 および 5 の血漿 Pi 濃度はいずれも分娩後上昇した. いっぽう, 分娩前 7 および 8 日に $1\alpha(OH)D_3$ が投与された No. 1 と 2 の血漿 Pi 濃度は明瞭に低下し, その推移は, 血漿 Ca 濃度のそれとよく一致していた. このことは, 消化管からの Pi の吸収が, Ca と同様の機構でなされていることを示唆しているものと考えられる.

非妊娠期¹⁵⁾ および妊娠末期¹²⁾ の乳牛に $1\alpha(OH)D_3$ を投与すると血漿 Mg 濃度は対照群に比較して低下するという. 本実験の各投与牛においても, 血漿 $1,25(OH)_2D$ 濃度の上昇にともなって血漿 Mg 濃度が低下する傾向にある. この血漿 Mg 濃度の低下は, $1\alpha(OH)D_3$ 投与による血漿 $1,25(OH)_2D_3$ 濃度の上昇が PTH 分泌を抑制させ, 腎臓からの Mg 排泄を増加させた結果によるものと考えられる.

本実験における血漿 Hyp 濃度の測定は, 骨コラーゲンの分解, すなわち, 骨塩溶出による Ca とリン (P) の血液中への動員の指標とすることを目的として行ったものである. その結果, 対照群における血漿 Hyp 濃度は分娩後に上昇した. これは, Hollis ら⁵⁾ および Manston ら¹¹⁾ の成績とよく一致しており, 分娩時の血漿の Ca および Pi 濃度の低下に反応して, 血中の $1,25(OH)_2D$ および PTH の濃度が上昇し, 血中に Ca と P を動員するために骨塩溶出が促進されたためであると考えられる. Hove ら⁷⁾ は非妊娠で非泌乳の乳牛に $1\alpha(OH)D_3$ を投与し, 血漿 $1,25(OH)_2D$, Ca および Pi 濃度が上昇するときに血漿 Hyp 濃度の上昇は認められないことを報告し, $1\alpha(OH)D_3$ の血漿の Ca および Pi 濃度の上昇作用には骨塩溶出は関与していないと考察している. また, Manston ら¹¹⁾ は分娩前の乳牛に $1\alpha(OH)D_3$ を投与した場合に, 分娩後の血漿 Hyp 濃度が, 対照群と一致して変化したことから, $1\alpha(OH)D_3$ 投与によって骨塩溶出が増強されることはないと報告した. 本実験における $1\alpha(OH)D_3$ 投与牛 No. 1, 3 および 5 の血漿 Hyp 濃度は対照群とほぼ同様に推移した. これは, Manston ら¹¹⁾ が述べているように, $1\alpha(OH)D_3$ の投与が分娩時の骨塩溶出を生理的な程度以上に増強することはないであろうことを示唆するものである. しかし, No. 2 では $1\alpha(OH)D_3$ 投与後に血漿 Hyp 濃度が低下する現象が認められた. Hove ら⁷⁾ は, $1\alpha(OH)D_3$ 投与による高 Ca 血症を示しているときに, 血漿 Hyp 濃度の若干の低下を示した牛がいることを報告しているが, 本例においても血漿 Ca 濃度は $1\alpha(OH)D_3$ 投与後 10.4 mg/dl を示し, この値

は本実験で得られた血漿 Ca 濃度の中で最も高い値であった。おそらく、この血漿 Hyp 濃度の低下はカルシトニンの作用により、骨塩溶出が抑制された結果とも考えられる。いずれにしても、分娩後の血漿 Hyp 濃度の推移から骨塩溶出について論ずるには、分娩後における退縮子宮からのコラーゲンの溶出¹³⁾を十分考慮する必要がある。今後、それらも併せて血漿 Hyp 濃度の推移を再検討する必要がある。

以上、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ の投与時期について、分娩前 6 時間から 2 日に投与された $500\text{ }\mu\text{g}$ の $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ は分娩後の低 Ca 血症を予防させたが、7～8 日前に投与されたときにはその予防効果はみられなかった。すなわち、 $1\alpha(\text{OH})\text{D}_3$ の投与時期は、分娩前 2 日前後の投与が分娩後の低 Ca 血症を防ぐには最も効果的であろうことが示唆された。今後は、さらに例数を重ね投与時期と投与量および投与方法などについて詳細に検討する必要がある。

引用文献

- 1) BAR, A., STRIEM, S., PERLMAN, R. and SACHS, M.: *J. Dairy Sci.*, 71, 2723～2729 (1988).
- 2) CARSTAIRS, J. A., TREUTELAAR, M. K., JORGENSEN, N. A. and DELUCA, H. F.: *J. Dairy Sci.*, 64 (Suppl. 1), 156 (1981).
- 3) CHEN, P. S., TORIBARA, T. Y. and WARNER, H.: *Anal. Chem.*, 28, 1756～1758 (1956).
- 4) GAST, D. R., MARQUARDT, J. P., JORGENSEN, N. A. and DELUCA, H. F.: *J. Dairy Sci.*, 60, 1910～1920 (1977).
- 5) HOLLIS, B. W., DRAPER, H. H., BURTON, J. H. and ETCHES, R. J.: *J. Endocr.*, 88, 161～171 (1981).
- 6) HORST, R. L., EISMAN, J. A., JORGENSEN, N. A. and DELUCA, H. F.: *Science*, 196, 662～663 (1977).
- 7) HOVE, K. L., HORST, R. L. and LITLEDIKE, E. T.: *J. Dairy Sci.*, 66, 59～66 (1983).
- 8) JAMALL, I. S., FINELLI, V. N. and QUEHEE, S. S.: *Anal. Biochem.*, 112, 70～75 (1980).
- 9) LAMBERT, P. W., TOFT, D. O., HODOGSON, S. F., LINDMARK, E. A., WITRAC, B. J. and ROOS, B. A.: *Endocrine Res. Com.*, 5, 293～310 (1978).
- 10) LITLEDIKE, E. T., YOUNG, J. W. and BEITZ, D. C.: *J. Dairy Sci.*, 64, 1465～1482 (1981).
- 11) MANSTON, R., MALLINSON, C. B., VAGG, M. J. and SANSOM, B. F.: *Vet. Rec.*, 109, 357～358 (1981).
- 12) McMURRAY, C. H., RICE, D. A. and McBRIE, P. S.: *Vet. Rec.*, 107, 188～191 (1980).
- 13) MONTFORT, I. and PEREZ-TAMAYO, R.: *Lab. Invest.*, 10, 1240～1258 (1961).
- 14) 内藤善久, 齊藤正則, 渡辺大作, 村上大蔵: 日獣会誌, 37, 297～302 (1984).
- 15) NAITO, Y., SATO, A., SATO, R., TANIGUCHI, K. and MURAKAMI, D.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 49, 477～483 (1987).
- 16) 西井易穂: ビタミン, 56, 1～17 (1982).
- 17) PYBUS, J.: *Clin. Chem. Acta.*, 23, 309～317 (1969).
- 18) SACHS, M., BAR, A., OCHOVSKY, O. N., MACHNAI, B., MEIR, E., WEINER, B. Z. and MAZOR, Z.: *Vet. Rec.*, 120, 39～42 (1987).
- 19) 志村一三夫, 田村正明: ビタミン, 52, 173～181 (1978).

健保略称
強ミノC

慢性肝疾患の 肝機能異常を改善する…

健保適用

- 適応症 「慢性肝疾患における肝機能異常の改善」
- 用法・用量 1日1回, 40ml を静脈内に注射する。
年齢, 症状により適宜増減する。

■グリチルリチン製剤

強力ネオミノファーゲンシ

包装 20ml 10管・30管, 5ml 5管・50管, 2ml 10管・100管

→使用上の注意などについては, 添付文書をご参照下さい。

株式会社 ミノファーゲン製薬本舗 営業本部 〒107 東京都港区赤坂8-10-22 TEL(402)6201