

奨励研究報告：原著

ホルスタイン種乳牛における 泌乳ステージおよび年齢とイオン化カルシウムの関係

高橋俊彦

北海道・釧路地区 NOSAI
〒088-1361 北海道厚岸郡浜中町茶内緑85
(2004年11月29日受領・2005年1月13日受理)

要 約

乳牛の血中イオン化Ca (iCa) 濃度の参照値を確立することを目的に、1ヶ月齢から13歳齢までのホルスタイン種牛 (n=109) の静脈血液 pH, iCa および血清中総カルシウム (TCa) 濃度を測定し、泌乳初期, 最盛期, 中期および後期, そして乾乳期の泌乳ステージ, および月齢または年齢と iCa および TCa の関係について調査した。全供試牛の血液 pH, TCa, iCa およびイオン化率 (iCa/TCa) の平均値は、それぞれ 7.440 ± 0.045 , $9.88 \pm 0.39 \text{mg/dL}$ ($2.47 \pm 0.10 \text{mM}$), $1.30 \pm 0.05 \text{mM}$ および $52.9 \pm 0.97\%$ であった。各泌乳ステージ間において、血液 pH, TCa および iCa 濃度に有意な差は認められなかった。月齢または年齢において、TCa および iCa 濃度は加齢とともに有意に低下した ($p < 0.001$)。また、泌乳初期乳牛を対照に乳熱牛の TCa および iCa を比較したところ、乳熱牛の TCa および iCa はそれぞれ $4.04 \pm 1.24 \text{mg/dL}$ ($1.01 \pm 0.31 \text{mM}$) および $0.57 \pm 0.19 \text{mM}$ であり、泌乳初期と比較して有意に低値を示した ($p < 0.01$)。また、乳熱牛のイオン化率の範囲は $47.9 \sim 62.3\%$ と個体差が大きいため、泌乳初期群のそれと比較して有意な差が認められなかった。従って、乳牛の iCa を測定する際には泌乳ステージよりも年齢を考慮すべきであり、また、乳熱牛の病態判定にはイオン化率よりも血中 iCa が重要であることが示唆された。

キーワード：イオン化カルシウム, 牛, 泌乳期, 年齢

獣医輸液研究会会誌, 5, 1~5. (2005)

健常牛における血液中総 Ca (TCa) 濃度の平均値は 9.10mg/dL (2.28mM) [7] であり、その範囲は $8.5 \sim 10.4 \text{mg/dL}$ ($2.1 \sim 2.6 \text{mM}$) である [2]。ヒトでは、TCa の約40%がアルブミンを主体とした蛋白結合型、約15%がクエン酸やリン酸などと複合体を形成しており、実際に細胞活性を示すイオン化カルシウム (iCa) は TCa の約45%を占める [8]。この iCa が酵素活性、血液凝固、筋収縮および神経刺激伝導において密接に関与しているため、生理活性物質である iCa 濃度を知ることが生理機能や病態の把握において重要である [5, 9]。しかし、iCa 濃度は血液中のアルブミン濃度および血液 pH の影響を大きく受けるため、TCa 濃度に対して必ずしも一定の関係があるわけではない。従って、iCa 濃度を直接測定することが重要であると考えられており、特に近年では電極技術の発達により iCa を往診先でも直接測定

することが可能となった [10]。

Goff ら [2] は、牛もヒトと同様にイオン化率 (iCa/TCa) が $40 \sim 45\%$ の範囲であると考えているが、我が国で飼養管理されている乳牛の iCa およびイオン化率の正常値については著者の知る限り加藤ら [3] の報告があるのみであり、十分に議論されているとはいえない。

本研究では、健常乳牛の iCa およびイオン化率の参照値を確立する一環として、TCa, iCa およびイオン化率と各泌乳期または年齢との関係について調査を行った。また、分娩後に乳熱を呈した牛の TCa, iCa およびイオン化率について同じ泌乳期 (泌乳初期) の健常乳牛のそれらと比較し、iCa またはイオン化率のいずれが病態判定に適しているのかを検討した。

材料および方法

Study 1: 北海道釧路管内浜中町の酪農家に飼育管理されており、身体一般検査で健常であると診断された1ヶ月齢から13歳齢までのホルスタイン種雌牛109頭を供試した。頸静脈または尾静脈より採血し、その直後にポータブル血液分析器 (i-STAT 200A Co., East Windsor., NJ, USA) を用いて pH および iCa を測定した。なお、iCa は次式 [11] を用いて pH 補正を行った。

$$\text{補正 iCa} = \text{実測 iCa} \{1 - 0.53 (7.4 - \text{pH})\}$$

また、遠心分離後に得られた血清を用いて OCPC 法により TCa を測定した。得られた結果から泌乳初期 (分娩日～50日)、最盛期 (51～110日)、中期 (111～210日)、後期 (211日～乾乳開始日)、または乾乳期 (乾乳開始日～分娩前日) の5ステージに分類し、ステージ毎にそれぞれ10頭ずつを無作為に抽出した。従って、各泌乳ステージの統計解析には5ステージ計50頭の結果を用いた。また、月齢を1, 3および6ヶ月未満、年齢を1, 2, 3, 4歳齢、および5歳齢以上の8ステージに分類した。泌乳ステージの検討と同様に、全供試牛から無作為に各年齢群にそれぞれ10頭ずつを抽出した。但し、5歳齢以上を1群とし、計29頭を供試したことから、年齢別の統計解析には99頭を用いた。

データは平均値±標準偏差で示した。各泌乳ステージ間における各測定値の平均値の差を *Kruskal-Wallis* 検定により検討した。また、月齢および年齢と各測定項目の関係については *Spearman* の順位相関検定により検討した。全ての統計学的解析は危険率5%未満を有意とした。

Study 2: 分娩直前から分娩後2日迄の期間で起立不能を呈し、治療依頼のあった7.3±2.9歳齢、10頭のホルスタイン種雌牛を乳熱群とした。

これらの乳熱牛も前述の試験と同様に頸静脈または尾静脈から採血し、血液 pH, TCa および iCa を測定した。得られた結果を同時期の泌乳ステージ乳牛 (泌乳初期群) の値と比較した。泌乳初期群および乳熱群における各測定項目の平均値の差を *Mann-Whitney* 検定を用い、危険率5%未満を有意として検討した。

成績

Study 1: 供試牛 (n=109) の血液 pH, TCa および iCa 濃度は、それぞれ7.440±0.045, 9.88±0.39mg/dL (2.47±0.10mM) および1.30±0.05 mM であった。また、これらの乳牛のイオン化率は52.9±0.97%であった。

血液 pH, TCa, iCa およびイオン化率は各泌乳ステージ間で有意な差が認められなかった (表1)。

月齢および年齢における血液 pH, TCa, iCa およびイオン化率を表2に示した。TCa は、乳牛の年齢に対して有意な負の相関を示し ($r^2=0.228, p<0.001$)、次の回帰式が得られた (図1A)。

$$\text{TCa (mg/dL)} = 10.28 - 0.151 \cdot \text{年齢 (歳)}$$

また、iCa は、TCa と同様に乳牛の年齢に対して有意な負の相関を示し ($r^2=0.220, p<0.001$)、次の回帰式が得られた (図1B)。

$$\text{iCa (mM)} = 1.64 - 0.022 \cdot \text{年齢 (歳)}$$

Study 2: 乳熱牛および泌乳初期乳牛の TCa, iCa およびイオン化率の比較を図2に示した。乳熱牛の TCa は4.04±1.25mg/dL (1.01±0.31mM) であり、その範囲は2.7～6.9mg/dL (0.68～1.73 mM) であった。これらは、健常な泌乳初期乳牛の9.37±0.68mg/dL (2.34±0.17mM) と比較して有意に低値を示した ($p<0.01$)。また、乳熱

表1 各泌乳ステージにおける TCa, iCa およびイオン化率の比較

| ステージ | TCa 濃度 (mg/dL, [mM]) | iCa 濃度 (mM) | イオン化率 (%) |
|------------|-----------------------|-------------|-----------|
| 初期 (n=10) | 9.37±0.68 [2.34±0.17] | 1.25±0.07 | 53.4±3.1 |
| 最盛期 (n=10) | 9.75±0.49 [2.44±0.12] | 1.28±0.06 | 52.6±1.8 |
| 中期 (n=10) | 9.52±0.65 [2.38±0.16] | 1.23±0.06 | 51.7±1.9 |
| 後期 (n=10) | 9.63±0.45 [2.41±0.11] | 1.25±0.05 | 52.0±2.2 |
| 乾乳期 (n=10) | 9.80±0.68 [2.45±0.17] | 1.29±0.06 | 52.9±3.0 |

TCa: 血清中総カルシウム濃度, iCa: 血中イオン化カルシウム濃度

表2 月齢または年齢におけるTCa, iCaおよびイオン化率の比較

| 月齢/年齢 | TCa 濃度 (mg/dL, [mM]) | iCa 濃度 (mM) | イオン化率 (%) |
|-------------|------------------------|-------------|-----------|
| 1 ヶ月 (n=10) | 9.97±0.30 [2.49±0.08] | 1.35±0.05 | 54.4±2.6 |
| 3 ヶ月 (n=10) | 10.66±0.48 [2.67±0.12] | 1.41±0.05 | 53.1±2.9 |
| 6 ヶ月 (n=10) | 10.14±0.62 [2.54±0.15] | 1.30±0.04 | 51.6±2.8 |
| 1 歳 (n=10) | 10.26±0.48 [2.57±0.12] | 1.35±0.07 | 53.0±4.6 |
| 2 歳 (n=10) | 9.70±0.38 [2.43±0.10] | 1.29±0.08 | 53.5±2.6 |
| 3 歳 (n=10) | 9.75±0.56 [2.44±0.14] | 1.31±0.10 | 53.8±3.4 |
| 4 歳 (n=10) | 9.80±0.58 [2.45±0.15] | 1.27±0.06 | 52.2±1.9 |
| 5歳以上 (n=29) | 9.52±0.59 [2.38±0.15] | 1.25±0.07 | 52.8±2.7 |

TCa: 血清中総カルシウム濃度, iCa: 血中イオン化カルシウム濃度

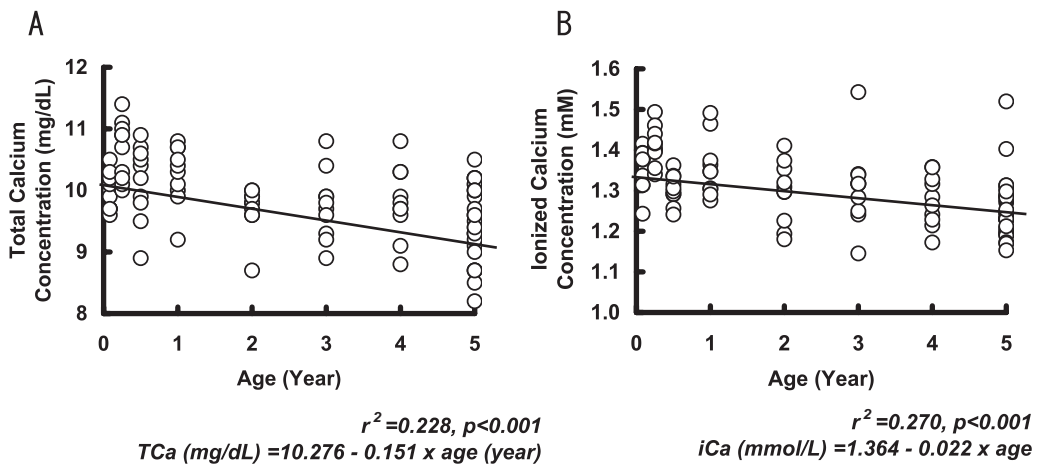


図1 月齢または年齢と血清中総カルシウム(TCa)および血中イオン化カルシウム濃度(iCa)の相関性
A: 血清中総カルシウム濃度 (TCa), B: 血中イオン化カルシウム濃度 (iCa)

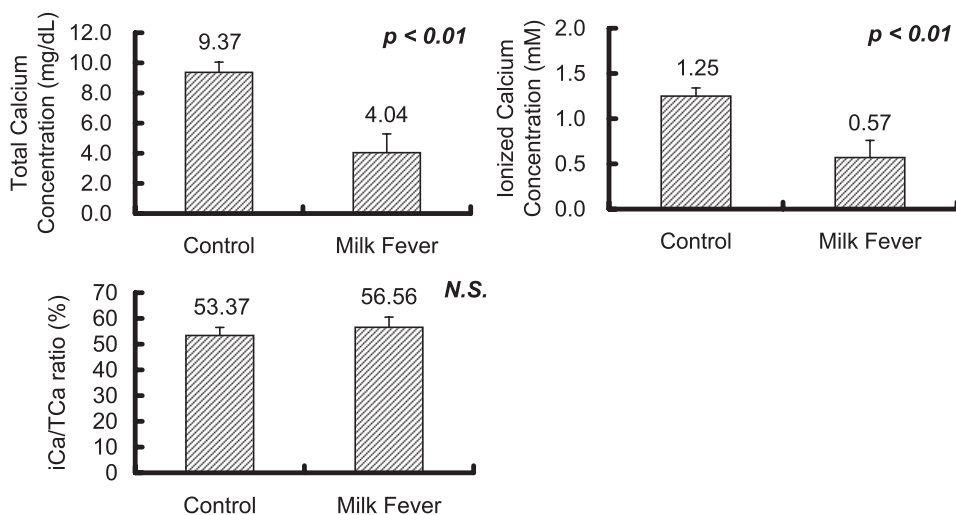


図2 分娩後2日以内に起立不能を呈した乳熱牛における血清中総カルシウム (TCa) および血中イオン化カルシウム濃度 (iCa) の相関性
A: 血清総カルシウム濃度 (TCa), B: 血中イオン化カルシウム濃度 (iCa), C: イオン化率 (iCa/TCa)

牛の iCa の平均は $0.57 \pm 0.19 \text{mM}$ であり、その範囲は $0.39 \sim 0.98 \text{mM}$ であった。これらは、泌乳初期群の $1.25 \pm 0.09 \text{mM}$ と比較して有意に低値であった ($p < 0.01$)。乳熱牛群におけるイオン化率は平均で $56.56 \pm 3.96\%$ であり、その範囲は $47.9 \sim 62.3\%$ と個体差が大きかった。たとえ乳熱牛のイオン化率が泌乳初期群のイオン化率 ($53.37 \pm 3.14\%$) よりも高値を示す傾向が認められたとしても、これらの差は統計学的に有意ではなかった。

考 察

血液 pH によりイオン化型と蛋白質結合型の割合が変化し、測定した iCa 濃度が実際の iCa を反映しないことが報告されている [1, 4]。従って、本研究では実際に測定した iCa 濃度 (実測 iCa 濃度) を血液 pH で補正した値、すなわち補正 iCa を用いて統計学的解析を行った。

牛の iCa 濃度の正常値および参照範囲については未だに議論の余地がある。iCa の正常値として Szenci ら [10] は $1.18 \sim 1.35 \text{mM}$ 、鈴木ら [9] は $1.05 \sim 1.30 \text{mM}$ の値を示しているが、明確な結論は得られていない。本研究において、身体一般検査で健常と診断された 109 頭のホルスタイン種乳牛の iCa 濃度の平均は $1.30 \pm 0.05 \text{mM}$ であり、その範囲は $1.25 \sim 1.41 \text{mM}$ であった。また、子牛を解析に含まなかった各泌乳ステージの検討で用いた 50 頭の乳牛における iCa の範囲は $1.21 \sim 1.28 \text{mM}$ であった。この値は前述の研究者らが示した iCa 濃度の範囲内にあること、またその偏差が小さいことから、より正確な牛の iCa 濃度の参照範囲を反映しているものと思われた。

健康な乳牛では、全乳期を通して TCa および iCa が一定に保たれていることが本研究により明らかになった。このことは、iCa を評価する上で泌乳ステージを考慮する必要がないということを示している。一方、年齢と TCa または iCa との間に有意な負の相関関係が認められた。年齢と iCa の関係について、柳谷ら [13] は若齢牛で iCa が高値を示す傾向があることを報告しているほか、Szenci ら [11] は産子数が iCa に影響を及ぼすため、高齢牛ほど分娩後の iCa が低値を示すことなどを報告している。つまり、本研究で得られた結果は、柳谷ら [13] や Szenci ら [11] の報告と一致しており、乳牛の iCa を評価する際に

泌乳ステージよりも年齢を考慮する必要があるということを示唆している。

イオン化率については、ヒトでは 45% が正常と考えられている [8]。柳谷ら [13]、Goff ら [2] および加藤 [3] は、乳牛のイオン化率について調査し、これがヒトと同様に 45% 前後であることを示している。しかし、本研究において、泌乳牛のイオン化率の平均値は 52.9% であり、前述の値よりも高値を示している。その理由については不明であり、今後の課題として地域や飼養管理法の違いなどの因子を考慮した更なる検討が必要である。

乳熱牛の TCa および iCa はそれぞれ $4.04 \pm 1.24 \text{mg/dL}$ ($1.01 \pm 0.31 \text{mM}$) および $0.57 \pm 0.19 \text{mM}$ と泌乳初期群の $9.37 \pm 0.68 \text{mg/dL}$ ($2.34 \pm 0.17 \text{mM}$) および 1.25 ± 0.07 と比較して有意に低値であった。産後起立不能症の牛では TCa および iCa の低下が認められても、イオン化率が増加し生理活性に必要な iCa を保持する傾向が認められている [13]。その一方で加藤 [3] は分娩前後の牛で TCa および iCa が参照値よりも低値を示すだけでなく、イオン化率も減少していることを報告しており、乳熱牛のイオン化率の動態については見解の一致が得られていない。本研究では、両者の一方を支持するような結果が得られなかっただけでなく、それぞれ低値または高値を示した個体が混在していた。したがって、この問題を解決するためには低カルシウム血症の程度または病歴に基づいた更なる検討が必要であると思われる。内藤 [7] は、分娩に伴って一過性に出現する生理的な低カルシウム血症は進行性であり、細胞内 iCa を減少させて全身の筋肉弛緩、意識障害および循環不全などの障害を発現し、分娩性起立不能症を引き起こすと記している。細胞外液中の Ca 濃度がある一定濃度以下に達すると起立不能を呈するものと考えられているが、細胞外液中 Ca 濃度がその基準値よりも低値を示さない個体でも細胞内 Ca 濃度の恒常性が破綻した場合には筋肉の興奮や弛緩が生じて起立不能を発症することが想定される。また、乳牛が疾病に陥っているときには様々な恒常性が維持されていない可能性が高く、イオン化率も例外ではない [1, 6, 12]。特に低カルシウム血症のときは、TCa と iCa の相互関係の変化に伴ってイオン化率が大きく変動する可能性が十分に考えられるため、確かに TCa の変化が生理活性と密接に関連している iCa

を正確に反映しているとは考えにくい。従って、乳熱牛の病態把握と低カルシウム血症の的確な評価を行うためには、個体差の大きいイオン化率よりも iCa の測定が有用であり、iCa 濃度に基づいて診断および治療指針を計画することが望ましいことが示唆された。

引用文献

1. Agnes F, Sartorelli P, Bisso MC, Domiconi S. Ionized calcium in calf serum: relation total serum calcium, albumin, total protein and pH. *J. Vet. Med. A.* 40: 605-608. 1993.
2. Goff JP. Treatment of calcium, phosphorus, and magnesium balance disorders. *Vet. Clin. North. Am. Food Anim. Pract.* 15: 619-639. 1999
3. 加藤敏英. カルシウム輸液剤の投与方法を再考する. *獣医輸液.* 4: 1-4. 2004
4. 栢森裕三, 片山善章. 1. 電解質・無機成分: Ca, Ca²⁺, IP, Mg. *検査と技術.* 21: 48-49. 1993.
5. 桑 克彦. イオン化カルシウムの測定. *検査と技術.* 19: 119-124. 1991
6. Lincoln S D, Lane V M. Serum ionized calcium concentration in clinically normal dairy cattle, and changes associated with calcium abnormalities. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 197: 1471-1474. 1990.
7. 内藤善久. 分娩性起立不能症. 牛の代謝疾患. 129-165. 学窓社. 東京 1990
8. 中桐逸博, 市原清志, 松田信義. 化学検査: イオン化 Ca 測定におけるサンプリング上の問題点. *臨床病理.* 103: 169-174. 1996.
9. 鈴木一由, 浅野隆司. 牛の補液・輸液療法: カルシウム輸液剤1. *臨床獣医.* 7: 78-81. 2001
10. Szenci O, Brydl E, Bajcsy A C. Effect of storage on measurement of ionized calcium and acid-base variable in equine, bovine, ovine, and canine venous blood. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 199: 1167-1169. 1991
11. Szenci O, Chew B P, Bajcsy A C, Szabo P, Brydl E. Total and ionized calcium in parturient dairy cows and their calves. *J. Dairy Sci.* 77: 1100-1105. 1994
12. Szenci O, Nemeth F, Sollar Z, Brydl E. Effect of storage time and temperature on ionized calcium concentration in bovine and ovine blood, plasma, and serum. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 204: 1242-1244. 1994
13. 柳谷源悦, 堀口隆男, 黒川慶一. 乳牛の血清イオン化カルシウム値について. *家畜診療.* 218: 12-14. 1981