

研 究

イオン交換高速液体クロマトグラフィーを用いた
ホルスタイン種成乳牛のリポタンパク質分画測定の有用性の検討高橋知也¹⁾、森 昭博²⁾、小田民美²⁾、左向敏紀²⁾

1) NOSAI宮城 県北家畜診療センター

2) 日本獣医生命科学大学 獣医看護学科

要 約

乳牛は分娩前後を中心に脂質代謝が盛んに行われる。近年、ヒトおよびウサギにおいてイオン交換高速液体クロマトグラフィー (AEX-HPLC) 法で高密度リポタンパク質 (HDL-C)、低密度リポタンパク質 (LDL-C)、中間密度リポタンパク質 (IDL-C) および超低密度リポタンパク質 (VLDL-C) といったリポタンパク質分画を迅速かつ正確に測定できるようになった。しかしウシにおいてAEX-HPLC法による解析は応用されていない。本研究ではAEX-HPLC法によるウシのリポタンパク質分画測定の基礎的検討を行った。HDL-CおよびLDL-Cは、クロマトグラムにおいて溶出分画が明確に分離され、同時および日差再現性においてCVs 10%未満と良好な結果が得られ、希釈直線性において良好な直線が描かれた。またAEX-HPLC法と超遠心分離法およびゲルろ過高速液体クロマトグラフィー (GP-HPLC) 法と測定値を比較したところ、有意な正相関が確認された。以上より、AEX-HPLC法を用いて、ウシのリポタンパク質分画の測定は有用であることが判明した。次にAEX-HPLC法を用いて泌乳量および繁殖成績が優良なS酪農家と不良なI酪農家で飼養された牛群間で泌乳ステージごとのリポタンパク質分画に違いがあるか比較した。LDL-Cの総コレステロール (Total-C) に占める割合 (LDL-C / Total-C, %) は2酪農家間で有意な違いが認められ、S酪農家では、泌乳初期から泌乳中期にかけて上昇し、泌乳後期以降低下した。一方、I酪農家では、泌乳初期から乾乳期まで大きな変動を示すことなく推移した。S酪農家とI酪農家との間にLDL-C / Total-Cに大きな違いが見られたのは、S酪農家における泌乳量の増加により、乳腺への中性脂肪 (TG) の運搬が盛んに行われる結果、VLDL→IDL→LDLという代謝経路が活性化していることが考えられた。最後に、AEX-HPLC法を用いて健常牛10頭のリポタンパク質分画の分娩前後の推移を算出した後、周産期疾患発症牛におけるリポタンパク質分画の関連性を調査した。脂肪肝群および乳熱群においてHDL-CおよびLDL-Cが低値を示す傾向が認められた。LDL-Cの低値は肝臓からのVLDL-Cによる脂質排出低下を予測し、治療の介入に利用できる可能性が示唆された。

I. はじめに

乳牛は常に脂質代謝が盛んに行われている。本研究では牛の脂質代謝で中心的な役割を果たすリポタンパク質に着目した。リポタンパク質とはTGとコレステロールを血液にのせて全身へ運ぶために、リン脂質膜とアポタンパクで覆った複合体をいう。リポタンパク質の簡略化した代謝の流れを図1に示し

た。摂取された脂質成分は小腸で取り込まれ、カイロミクロンとなって食餌性TGを末梢組織へ運び、主にエネルギー源として利用される。その後レムナントとなり肝臓へ向かった後、新たにVLDLとなって、今度は肝性TGを末梢組織へ運び、エネルギー源や脂肪組織への遊離脂肪酸の蓄積、さらに乳牛では乳腺で乳脂肪の原料に利用される。肝性TGを放出したVLDLはIDLとなり、肝臓へ戻った後LDLと

なり、コレステロールを末梢組織に運び、ステロイドホルモンの原料や細胞膜構成成分を供給する。末梢組織で余剰となったコレステロールはHDLによって回収され肝臓へ戻った後、排泄経路を辿る¹⁾。

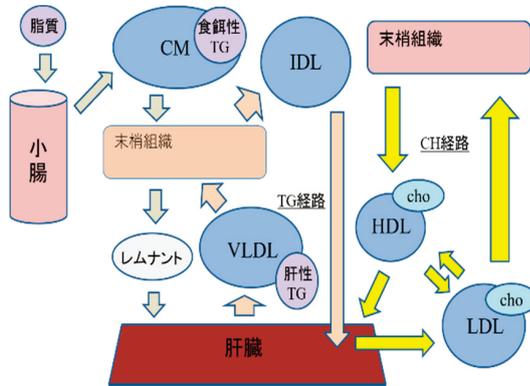


図1 リポタンパク質代謝の流れ

乳牛のリポタンパク質分画の測定は、主に粒子密度により分離を行う超遠心分離法が用いられているが、時間と労力を有するほか、HDLとLDLに共存密度領域が存在するため分離が不十分であり、測定精度に問題があるとされてきた²⁾。近年、ヒトおよびウサギにおいてAEX-HPLC法でHDL-C、LDL-C、IDL-CおよびVLDL-Cといったリポタンパク質分画を迅速かつ正確に測定できるようになった^{3,4)}。しかしウシにおいてAEX-HPLC法による解析は応用されていない。そこで本研究では、第1章として「AEX-HPLC法におけるウシのリポタンパク質分画測定の基礎的検討」、第2章として「飼養形態の異なる2酪農家におけるホルスタイン種成乳牛の泌乳ステージ別のリポタンパク質分画の比較」、および第3章として「健常ホルスタイン種成乳牛における分娩前後のリポタンパク質分画推移と周産期疾患発症との関連性」の3章に分け、AEX-HPLC法によるウシのリポタンパク質分画測定の有用性について研究を行った。

第1章 AEX-HPLC法におけるウシのリポタンパク質分画測定の基礎的検討

II. 材料および方法

宮城県内の1酪農家で飼養されている健常なホルスタイン種成乳牛6頭を供試した。AEX-HPLC法に

よるリポタンパク質分画測定の精度を確認するために、クロマトグラムの確認、同時再現性、日差再現性および希釈直線性を評価した。また、AEX-HPLC法と、既存の測定法である超遠心分離法およびGP-HPLC法を比較対象とし、測定値の相関を評価した。GP-HPLC法は、リポタンパク質分画の粒子サイズから分離を行うものであり、ヒトの他、イヌ⁵⁾およびネコ⁶⁾のリポタンパク質解析に有用であるとされている。統計方法は、ピアソンの積率相関係数を測定値間の有意な相関を示すのに用い、rとして表記した。p<0.05の差は統計的に有意であるとした。

III. 結果

クロマトグラムは、HDL-CおよびLDL-Cに関しては明瞭に波形が現れたが、IDL-CおよびVLDL-Cに関してはわずかに示される程度であった(図2)。

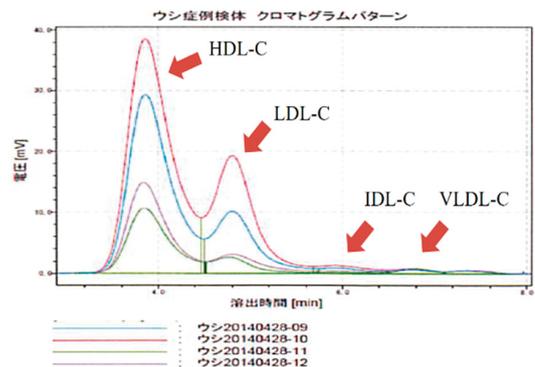


図2 AEX-HPLC法のクロマトグラム

同時再現性においては変動係数(CVs)が各分画ともに10%未満という良好な分析精度を示した。日差再現性の分析評価は、Total-C、HDL-CおよびLDL-CのCVsが10%以下という良好な結果が得られた。しかしながら、IDL-CおよびVLDL-Cに関しては、いくつかの測定ポイントで検出限界値未満を示したため、日差再現性を評価することはできなかった。希釈直線性試験において、Total-C、HDL-CおよびLDL-Cで良好な直線が描かれた(p<0.01)。IDL-CおよびVLDL-Cのいくつかの希釈検体において検出限界値未満であったため、直線性は確認できなかった。また、AEX-HPLC法と超遠心分離法およびGP-HPLC法の間で、Total-C、HDL-CおよびLDL-

Cに関して有意な正相関が確認された ($p < 0.05$)。しかしながら超遠心分離法との比較において、HDL-Cに関してはAEX-HPLC法で高値を示す傾向にあり ($y = 0.33x + 86.16, r = 0.90, p < 0.05$)、LDL-Cに関しては、低値を示す傾向にあった ($y = 1.54x + 6.04, r = 0.93, p < 0.01$)。一方でGP-HPLC法との比較において、HDL-Cに関してはAEX-HPLC法で高値を示す傾向にあり ($y = 0.82x + 25.09, r = 0.98, p < 0.01$)、LDL-Cに関しては、低値を示す傾向にあった ($y = 1.18x - 6.48, r = 0.96, p < 0.01$)。

IV. 考察

AEX-HPLC法によるリポタンパク分画測定においてHDL-CおよびLDL-Cに関しては信頼性および再現性をもって測定が可能であることが分かった。超遠心分離法およびGP-HPLC法との測定値比較において、超遠心分離法およびGP-HPLC法でAEX-HPLC法と比較してHDL-Cが高値を示し、LDL-Cが低値を示す傾向にあったが、これはHDLおよびLDLの密度領域および粒子サイズが重複⁷⁾することで、一部のLDL-CがHDL-Cとして測定されてしまったものと考えられた。以上より、AEX-HPLC法はHDLおよびLDLの密度領域の重複および粒子サイズの重複に影響を受けずに乳牛のリポタンパク質分画を正確に測定できる有用な方法であることが判明した。

第2章 飼養形態の異なる2酪農家におけるホルスタイン種成乳牛の泌乳ステージ別のリポタンパク質分画の比較

II. 材料および方法

宮城県内の泌乳量および繁殖成績が優良なS酪農家で飼養されている成乳牛24頭および両成績が不良なI酪農家で飼養されている成乳牛25頭の計49頭を供試した。いずれも飼養管理上、問題のないもののみを供試した。2酪農家の成績を表1に示した。

泌乳ステージに関しては、分娩日から分娩後50日までを泌乳初期 (early)、分娩後51日から110日までを泌乳最盛期 (peak)、分娩後111日から220日までを泌乳中期 (mid)、分娩後221日から乾乳期までを

泌乳後期 (late)、分娩予定日60日前から10日前までを乾乳期 (dry) として、リポタンパク質分画の比較を行った。

表1 2酪農家実績

	S酪農家	I酪農家
飼養頭数	47	42
1頭あたりの平均日乳量 (kg)	34.2	25.3
乳脂率 (%)	3.96	3.45
乳タンパク率 (%)	3.47	3.16
無脂固形分率 (%)	8.97	8.51
乳中尿素態窒素 (mg / dl)	10.6	9.70
体細胞数 (/ dl)	138,000	225,000
受胎率 (%)	62.3	55.8
平均空胎日数 (日)	117	204
年間死産事故件数 (件)	1	14

III. 結果

各乳期におけるTotal-C、HDL-C、LDL-C、IDL-CおよびVLDL-C値は2酪農家間で有意な差は認められなかった (図3)。Total-C、HDL-CおよびLDL-Cは、両群とも泌乳初期から泌乳中期にかけて上昇し、以降は泌乳後期から乾乳期にかけて低下した。HDL-CのTotal-Cに占める割合 (HDL-C / Total-C、%) は、2酪農家間で有意な違いが認められた (図4)。S酪農家では、泌乳初期から泌乳中期にかけて低下し、泌乳後期以降上昇した。I酪農家では、S酪農家と比較して泌乳中期での低下が緩やかであった。LDL-CのTotal-Cに占める割合 (LDL-C / Total-C、%) は2酪農家間で有意な違いが認められ (図4)、

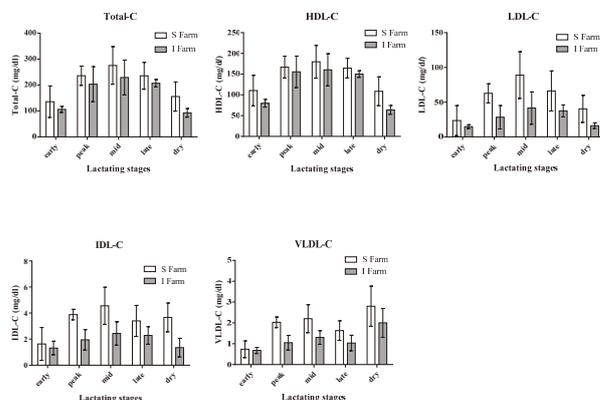


図3 S酪農家 (S Farm) およびI酪農家 (I Farm) における各分画測定値の泌乳期別の推移

S酪農家において泌乳最盛期、泌乳中期および泌乳後期でLDL-C / Total-C (%)がI酪農家と比較して有意に高値を示した。S酪農家では、泌乳初期から泌乳中期にかけて上昇し、泌乳後期以降低下した。一方、I酪農家では、泌乳初期から乾乳期まで大きな変動を示すことなく推移した。

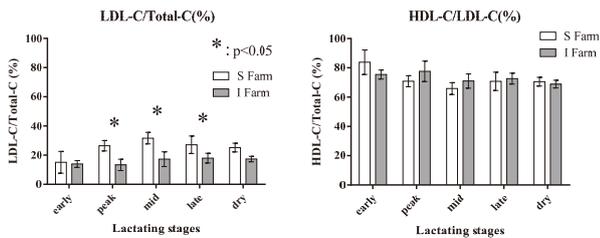


図4 S酪農家およびI酪農家におけるHDL-C/Total-C (%)およびLDL-C/Total-C (%)の泌乳期別の推移

IV. 考察

S酪農家とI酪農家との間にLDL-C / Total-C (%)に大きな違いが見られたのは、S酪農家における泌乳量の増加により肝臓から乳腺へVLDLを介したTG (中性脂肪) の運搬が盛んに行われる⁸⁾結果、VLDL→IDL→LDLという代謝経路が活性化していることが考えられた。一方で、I酪農家はS酪農家と比較して泌乳量が少ないため、VLDLによる肝臓から乳腺へのTG運搬が少ないことが予想され、その結果LDLが低値を示したものと考えられた。以上より、LDL-C / Total-C (%)を測定することで、乳成績の良好な牛群の発見、逆に不良な牛群の摘発が可能と考えられた。

第3章 健康ホルスタイン種成乳牛における分娩前後のリポタンパク質分画推移と周産期疾患発症との関連性

II. 材料および方法

健康牛の分娩前後のリポタンパク質分画の推移を算出するために、宮城県内の優良な2酪農家で飼養された産歴3産以上の成乳牛10頭を用い、分娩予定4週間前、分娩予定2週間前、分娩日、分娩1週間

後、分娩2週間後、分娩4週間後および分娩8週間後の計7ポイントからリポタンパク質分画を測定した。続いて、周産期疾患発症で診療依頼のあった産歴3産以上の成乳牛19頭を供試した。なお発熱した感染性疾患や関節炎といった運動器疾患を併発した症例に関しては対象外とした。周産期疾患発症牛19頭の診療初診時に採血を行い、リポタンパク質分画を測定した。周産期疾患発症牛19頭を第四胃変位6頭 (第四胃変位群)、脂肪肝6頭 (脂肪肝群) および乳熱7頭 (乳熱群)、に群分けした。

III. 結果

健康牛においてリポタンパク質分画のうち、Total-CおよびHDL-Cは、分娩予定4週間前から分娩日まで低下し、分娩後、徐々に増加した。LDL-Cは分娩予定4週間前から低下し、分娩1週間後から増加した。LDL-C / Total-C (%)は分娩予定4週間前から低下し、分娩2週間後で最低値を示した後に上昇した。これをもとに周産期疾患発症牛19頭のリポタンパク質分画測定値を健康牛の推移と比較したところ、第四胃変位群 (図5) には特異所見は認められなかったものの脂肪肝群 (図6) および乳熱群 (図7) においてLDL-CおよびLDL-C / Total-C (%)が低値を示す症例が認められた。

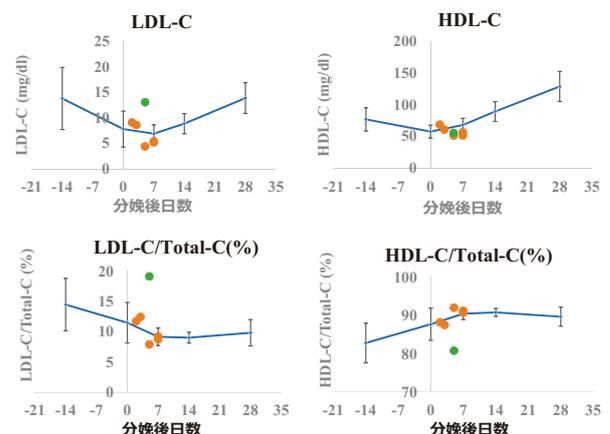


図5 健康牛 (n=10) と脂肪肝発症牛 (n=6) の関連性。ラインが健康牛の推移、○が脂肪肝牛を示す。

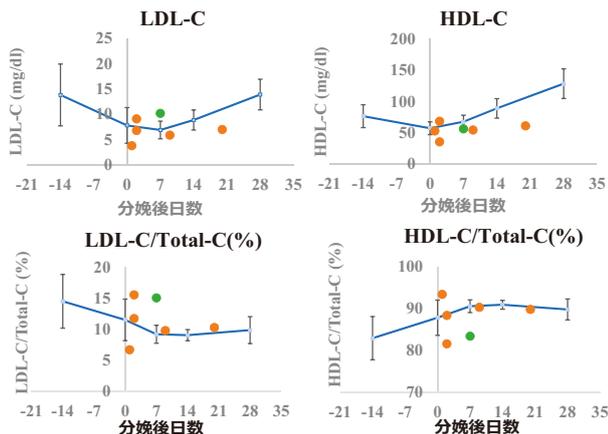


図6 健常牛 (n=10) と脂肪肝発症牛 (n=6) の関連性。ラインが健常牛の推移、○が脂肪肝牛を示す。

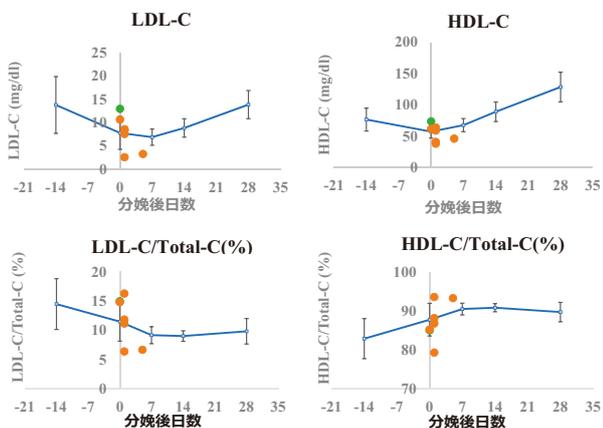


図7 健常牛 (n=10) と乳熱発症牛 (n=7) の関連性。ラインが健常牛の推移、○が脂肪肝牛を示す。

IV. 考 察

周産期疾患発症牛19頭のリポタンパク質分画測定値を健常牛の推移と比較したところ、脂肪肝および乳熱群においてLDL-CおよびLDL-C / Total-C (%)が低値を示す症例が認められた。これは食欲低下や栄養吸収障害に伴い肝臓からVLDL排出が低下し、VLDL→IDL→LDLという代謝経路の不活化が生じたものと考えられた。このことから、周産期疾患発症牛のLDL-Cを測定することで、肝臓からの脂質排出を予測し、治療の介入に利用できる可能性が示唆された。

今後、本研究で得た知見をもとに、臨床例における検討をさらに行っていく必要がある。

引用文献

- 1) Aizawa Y, Seki N, Nagano T, et al. (2015) Chronic hepatitis C virus infection and Lipoprotein metabolism. *World J Gastroenterol.* Sep 28 ; 21(36) : 10299-313.
- 2) Mazur A, Rayssiguier Y. (1988) [Lipoprotein profile of the lactating cow]. *Ann Rech Vet.*19(1) : 53-8.
- 3) Hirowatari, Y., H. Yoshida, H. Kurosawa, et al. (2003) Measurement of cholesterol of major serum lipoprotein classes by anion-exchange HPLC with perchlorate ion-containing eluent. *J. Lipid. Res.*, 44 : 1404-1412.
- 4) Hirowatari, Y., M. Kon, Y. Shimura, et al. (2012) Anion-exchange HPLC separation of five major rabbit lipoproteins using a nonporous diethylaminoethyl-ligated gel with a perchlorate-containing eluent. *Biomed. Chromatogr.*, 26 : 434-440.
- 5) Mizutani H, Sako T, Arai N, et al. (2010) Application of gel permeation HPLC for lipoprotein profiling in dogs. *J Vet Med Sci.* Jun ; 72(6) : 813-7.
- 6) Mizutani H, Sako T, Okuda H, et al. (2016) Analysis of lipoprotein profiles of healthy cats by gel-permeation high-performance liquid chromatography. *J Vet Med Sci.* Sep 1 ; 78(8) : 1277-81.
- 7) Mazur A, Ayrault-Jarrier M, Chilliard Y, et al. (1992) Lipoprotein metabolism in fatty liver dairy cows. *Diabete Metab.* 18 (1Pt2) : 145-9.
- 8) Gleockler DH, Ferreri LF, Flaim E. (1980) Lipoprotein patterns in normal lactating Holstein cows bled at various times : effects of milking. *Proc Soc Exp Biol Med.* Oct ; 165(1) : 118-22.