

研 究

ホルスタイン種成乳牛における分娩後の早期機能性
黄体形成とリポタンパク質分画推移との関連性高橋知也¹⁾, 佐藤真由美²⁾, 松田敬一²⁾, 森昭博³⁾, 小田民美³⁾, 左向敏紀³⁾1) 宮城県農業共済組合 県北家畜診療センター 2) 宮城県農業共済組合 家畜診療研修所
3) 日本獣医生命科学大学 獣医保健看護学科

要 約

乳牛は分娩前後に胎児への栄養供給や分娩後の泌乳等により、体脂肪動員が盛んになり著しい脂質代謝が行われる。LDL-CHの割合は分娩後のエネルギー状態が上向くことで上昇するが、元来LDL-CHは繁殖ホルモンの原料となることから、分娩後の早期機能性黄体の形成と分娩前後のリポタンパク質分画の推移との関連性について調査した。本試験では同等な飼養管理および成績の管内2酪農家で飼養されているホルスタイン種妊娠牛9頭を供試した。このうち分娩後4週間以内に黄体が形成された3頭を黄体形成群、形成されなかった6頭を黄体非形成群とし、分娩予定4週間前、2週間前、分娩日、分娩1週間後、2週間後、4週間後および8週間後の計7つの測定ポイントを設け、AEX-HPLC法を用いて各群の分娩前後のリポタンパク質分画の実測値および割合の推移を比較した。VLDL-CH実測値で群間に有意な違いが認められ、黄体形成群は分娩予定2週間前で黄体非形成群と比較して有意な高値を示した ($p<0.01$)。LDL-CHの割合およびVLDL-CHの割合で群間に有意な違いが認められ、LDL-CHは分娩予定2週間前において黄体非形成群で黄体形成群と比較して有意な高値を示し ($p<0.05$)、VLDL-CHの割合は分娩予定2週間前において黄体形成群で黄体非形成群と比較して有意な高値を示した ($p<0.01$)。以上より、分娩予定2週間前にVLDLによる肝臓からのTG放出が多いものほど、分娩日を肝臓の脂肪沈着が少ない状態で迎えることができるため、肝臓が十分に機能することで黄体形成が早まった可能性が示唆された。一方でLDL-CHの割合と早期機能性黄体との関連性について、有意な結果は得られなかった。LDL-CHの割合は繁殖ホルモン量と泌乳量が複雑に絡み合っている可能性もあり、今後、泌乳量にも着目しながら、LDL-CHと繁殖ホルモンとの関連性を追求していく必要がある。

I. はじめに

リポタンパク質とは、疎水性の脂質成分であるトリグリセリド (TG) とコレステロールを血液に乗せて全身へ運ぶために、親水性のリン脂質膜とアポタンパク質で覆った複合体である。リポタンパク質は組成や役割の違いから大きく4つに分類され、密度が低い順に、カイロミクロン、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、低密度リポタンパク質 (LDL)、および高密度リポタンパク質 (HDL) からなる。

各リポタンパク質の役割として、カイロミクロンは小腸で取り込まれた食餌由来のTGを末梢組織へ運搬し、主にエネルギー源や脂肪酸蓄積に利用される。VLDLは主に肝臓で合成されたTGを末梢組織へ運搬し、カイロミクロン同様に利用される。VLDLはTGを放出したのち肝臓へ戻り代謝され、LDLとなる。LDLは肝臓で合成されたコレステロールを末梢組織へ運搬し、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、肝臓を経由した

後、排泄経路を辿る¹⁾。

乳牛は分娩前後に胎児への栄養供給や分娩後の泌乳等により、体脂肪動員が盛んになり著しい脂質代謝が行われる²⁾。特に分娩後は急激な泌乳量増加にエネルギー供給が追いつかず肝臓へ体脂肪動員が盛んに行われ、周産期疾患の根源である脂肪肝を引き起こし、酪農経営へ大きな負担がかかるため、分娩前後の脂質代謝の詳細を調査することは急務であると考えられる。近年、イオン交換高速液体クロマトグラフィー (AEX-HPLC) 法にて今まで分離が困難であった高密度リポタンパク質コレステロール (HDL-CH)、低密度リポタンパク質コレステロール (LDL-CH)、および超低密度リポタンパク質コレステロール (VLDL-CH) を分離することが可能となった。また我々は乳牛において分娩後のエネルギー状態が向上することでLDL-CHの割合が上昇することを報告した³⁾。一方で、分娩後のエネルギー状態が良いものほど初回排卵が起こり、黄体が形成されることが報告されている⁴⁾。元来LDL-CHはステロイドホルモンの原料であり、黄体形成にはステロイドホルモンの原料であるエストラジオール (E2) およびプロゲステロン (P4) が関与していることから、我々は分娩後のLDL-CHの割合と黄体形成は関与するという仮説を立てた。

以上のことから、本試験の目的として、分娩後の早期機能性黄体の形成と分娩前後のリポタンパク質分画の推移との関連性について調査した。

II. 材料および方法

調査期間は平成30年6月から令和元年10月までとし、管内2酪農家 (A酪農家, B酪農家) で飼養されているホルスタイン種妊娠牛9頭を供試した。いずれの酪農家も繁殖成績および乳成績は同等で、飼養管理に関しても分娩予定2ヶ月前から分娩房を使用し、分娩後はフリーストール管理を行い、同様であった。A酪農家では、乾乳期に配合飼料3kg (TDN ; 76, CP ; 17(%)) およびチモシー11kgを給餌し、分娩後は1日2回TMR給餌 (TDN ; 64.3, CP15.1(%)) を行い、泌乳量によってトップドレスで配合飼料2~4kg (TDN ; 75.0, CP18.0(%))

を増給した。一方で、B酪農家では、乾乳期に配合飼料3kg (TDN ; 75, CP ; 12(%)) およびチモシー11kgを給餌し、分娩後は1日2回TMR給餌 (TDN ; 71.8, CP15.8(%)) を行っていた。

供試牛9頭のうち、分娩後4週間以内に機能性黄体を形成した3頭を黄体形成群とし、分娩後4週間以内に機能性黄体が形成されなかった6頭を黄体非形成群とした。各群の供試牛の詳細は表1に示した。なお機能性黄体の定義として、過去の論文を参考に、黄体直径10mm以上かつP4値が1.0ng/mL以上のものとした⁵⁾。

表1 黄体形成群および黄体非形成群の供試牛のプロフィール

	No	酪農家	生年月日	産歴	分娩月日
黄体形成群	1	B	H27.4.10	2	H30.9.5
	2	B	H27.7.19	2	H30.9.28
	3	A	H24.2.10	5	H30.9.15
黄体非形成群	1	B	H27.3.31	2	H30.7.19
	2	A	H27.6.12	2	H30.9.9
	3	A	H26.1.16	3	H30.7.13
	4	A	H27.7.28	2	H30.8.30
	5	B	H27.5.15	2	H30.9.4
	6	A	H28.2.11	2	R1.8.22

供試動物の血液は尾静脈から採血された。分娩前後のリポタンパク質分画の変動を評価するために、分娩予定4週間前、2週間前、分娩日、分娩1週間後、2週間後、4週間後、および8週間後の計7つの採血ポイントを設定し、推移を調査した。また、採血と同時にボディコンディションスコア (BCS) を過去の論文に従い測定した⁶⁾。得られた血液をなるべく早く遠心機 (ヘマトクリット遠心機センテック3220, 久保田商事株式会社, 東京, 日本) にて血清を分離した。分離した血清を2分割し、1つを株式会社富士フィルムVETシステムズに発送し、AEX-HPLC法によるHDL-CH, LDL-CH, およびVLDL-CHといったリポタンパク質分画測定を依頼した。AEX-HPLC法は東ソー自動リポ蛋白分析計HLC®-729LP II (東ソー株式会社, 東京, 日本) を用いて実施した。もう1つの血清はNOSAI宮城家畜診療研修所に発送し、Dimension RxL Max (シーメンス

ヘルスケア・ダイアグノスティクス株式会社，東京，日本）を用い，トリグリセリド (TG)，遊離脂肪酸 (NEFA)，アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (GOT)， γ -グルタミルトランスフェラーゼ (γ -GTP)，総タンパク質 (TP)，アルブミン (Alb)，血中尿素態窒素 (BUN)，カルシウム (Ca)，無機リン (iP)，E2およびP4を測定した。分娩後は1週間毎に超音波検査にて卵巣動態を調査した。

値は平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した。群間の統計的有意差を評価するために，二元配置分散分析を行い，群間に有意差が認められた場合，Sidak's multiple comparisons test による単純主効果検定を行い，各要因における主効果の検出を行った。危機率5%未満を有意差ありとした。

Ⅲ. 結果

分娩前後の各リポタンパク質分画実測値の推移を図1に示した。VLDL-CH実測値で群間に有意な違いが認められ，黄体形成群は分娩予定2週間前で黄体非形成群と比較して有意な高値を示した ($p<0.01$)。群間に有意な違いは認められなかったが，Total-CH，HDL-CHおよびLDL-CHは分娩8週間後において黄体非形成群で黄体形成群と比較して高値を示す傾向があった。分娩前後の各リポタンパク質分画の割合の推移を図2に示した。LDL-CHの割合およびVLDL-CHの割合で群間に有意な違いが認められ，LDL-CHは分娩予定2週間前において黄体非形成群で黄体形成群と比較して有意な高値を示し ($p<0.05$)，VLDL-CHの割合は分娩予定2週間前において黄体形成群で黄体非形成群と比較して有意な高値を示した ($p<0.01$)。また有意な違いは認められなかったが，分娩日においてLDL-CHの割合が黄体形成群と黄体非形成群で逆転する傾向があった。続いて，分娩前後の生化学検査項目，繁殖ホルモン濃度およびBCSの推移を表2に示した。E2で群間に有意な違いが認められ，黄体形成群は分娩予定2週間前で黄体非形成群と比較して有意な高値を示した ($p<0.05$)。

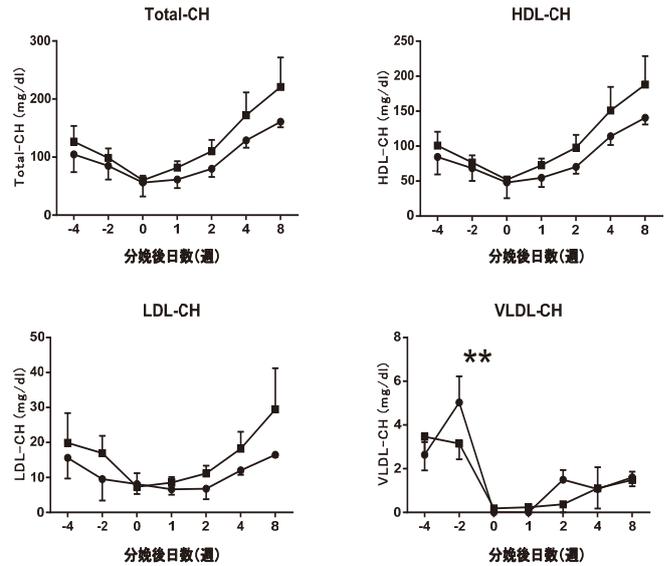


図1 各群における分娩前後の各リポタンパク質分画実測値の推移。値は平均値 \pm SDで示す。
** は $p<0.01$ で群間で有意な違いを示す。
●黄体形成群 (n=3) ■黄体非形成群 (n=6)

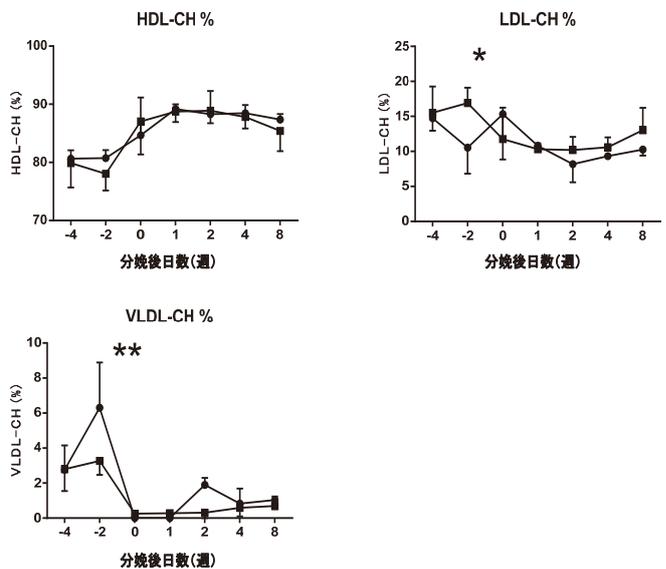


図2 各群における分娩前後の各リポタンパク質分画の割合の推移。値は平均値 \pm SDで示す。
** は $p<0.01$ ，* は $p<0.05$ で群間で有意な違いを示す
●黄体形成群 (n=3) ■黄体非形成群 (n=6)

表2 黄体形成群および黄体非形成群の分娩前後における生化学項目、繁殖ホルモン濃度およびBCSの推移。

分娩後日数(週)		-4	-2	0	1	2	4	8
TG	黄体形成群	14.97 ± 4.97	26.17 ± 8.83	3.23 ± 1.50	6.53 ± 2.90	7.57 ± 4.53	6.90 ± 0.17	7.00 ± 1.71
	黄体非形成群	12.85 ± 6.77	16.97 ± 5.39	2.28 ± 1.48	4.63 ± 3.79	4.05 ± 2.70	6.27 ± 5.16	12.30 ± 6.23
NEFA	黄体形成群	208.00 ± 143.53	332.00 ± 179.70	731.33 ± 648.80	665.33 ± 214.65	533.00 ± 338.11	235.00 ± 164.10	109.00 ± 7.81
	黄体非形成群	104.50 ± 27.14	117.67 ± 60.06	329.17 ± 72.23	429.17 ± 99.08	507.83 ± 112.17	214.17 ± 48.75	146.33 ± 24.25
GOT	黄体形成群	80.33 ± 24.83	70.33 ± 13.01	85.33 ± 4.62	118.00 ± 12.17	95.33 ± 19.14	71.00 ± 6.24	78.33 ± 9.71
	黄体非形成群	84.17 ± 12.73	77.50 ± 11.10	93.00 ± 18.87	105.00 ± 11.92	101.83 ± 13.09	93.00 ± 7.51	102.67 ± 9.56
γ-GTP	黄体形成群	34.00 ± 17.44	26.33 ± 9.29	24.33 ± 10.41	28.00 ± 9.54	28.00 ± 3.61	38.67 ± 19.66	34.67 ± 9.29
	黄体非形成群	26.50 ± 7.82	22.83 ± 5.88	23.33 ± 8.43	23.33 ± 10.80	30.33 ± 10.80	53.17 ± 67.25	35.67 ± 23.41
TP	黄体形成群	7.87 ± 0.81	7.33 ± 0.55	6.97 ± 0.51	7.10 ± 0.26	7.27 ± 0.95	8.55 ± 0.72	8.60 ± 0.96
	黄体非形成群	7.65 ± 0.85	7.67 ± 0.77	6.78 ± 0.42	7.23 ± 0.43	7.22 ± 0.61	7.55 ± 0.46	7.47 ± 0.31
Alb	黄体形成群	3.83 ± 0.21	3.73 ± 0.29	3.53 ± 0.21	3.43 ± 0.32	3.37 ± 0.67	3.97 ± 0.38	3.97 ± 0.12
	黄体非形成群	3.53 ± 0.19	3.57 ± 0.18	3.55 ± 0.27	3.68 ± 0.15	3.62 ± 0.12	3.78 ± 0.10	3.83 ± 0.18
BUN	黄体形成群	7.03 ± 3.66	5.33 ± 0.64	5.73 ± 0.87	9.20 ± 5.20	8.03 ± 4.29	11.73 ± 4.01	11.37 ± 2.23
	黄体非形成群	5.92 ± 2.75	4.67 ± 1.80	7.05 ± 3.58	8.08 ± 3.78	8.53 ± 3.58	13.80 ± 5.24	12.07 ± 4.17
Ca	黄体形成群	9.83 ± 0.15	9.90 ± 0.17	10.27 ± 2.12	9.33 ± 0.91	9.87 ± 0.47	10.47 ± 0.31	10.23 ± 0.72
	黄体非形成群	9.62 ± 0.40	9.95 ± 0.31	8.97 ± 0.67	10.00 ± 0.46	10.03 ± 0.36	9.77 ± 0.32	9.98 ± 0.47
iP	黄体形成群	6.27 ± 0.67	5.87 ± 0.84	4.83 ± 0.90	4.47 ± 1.27	4.83 ± 0.68	6.27 ± 1.40	6.03 ± 0.42
	黄体非形成群	6.22 ± 0.37	5.75 ± 0.60	4.75 ± 0.53	5.27 ± 1.19	6.07 ± 0.87	6.53 ± 1.36	5.95 ± 0.63
E2	黄体形成群	48.87 ± 16.15	306.95 ± 230.93 **	30.83 ± 4.90	16.74 ± 6.67	32.03 ± 24.61	14.84 ± 0.46	12.00 ± 3.59
	黄体非形成群	35.67 ± 7.21	82.72 ± 68.93	24.15 ± 23.28	18.04 ± 7.37	16.27 ± 12.38	15.16 ± 6.27	11.54 ± 5.64
P4	黄体形成群	5.07 ± 2.06	5.17 ± 1.86	0.46 ± 0.64	0.24 ± 0.25	0.25 ± 0.31	4.12 ± 1.36	2.58 ± 2.20
	黄体非形成群	6.98 ± 2.93	6.90 ± 4.71	0.29 ± 0.31	0.24 ± 0.44	0.34 ± 0.37	0.19 ± 0.30	1.90 ± 1.64
BCS	黄体形成群	3.50 ± 0.25	3.50 ± 0.25	3.33 ± 0.14	3.25 ± 0.25	3.08 ± 0.38	2.83 ± 0.14	2.92 ± 0.29
	黄体非形成群	3.25 ± 0.16	3.33 ± 0.13	3.25 ± 0.16	3.13 ± 0.21	2.96 ± 0.10	2.71 ± 0.10	2.92 ± 0.20

値は平均値±SDで示し，**はp<0.01で群間で有意な違いを示す。

IV. 考 察

リポタンパク質分画において、黄体形成群は分娩予定2週間前で黄体非形成群と比較してLDL-CHの割合が有意な低値を示し、VLDL-CHの実測値および割合が有意な高値を示した。これは分娩予定2週間前において黄体形成群の方が黄体非形成群と比較して肝臓からVLDLを介したTG放出が盛んに行われていたことを意味する。乳牛の周産期疾患の代表である脂肪肝は分娩前後の栄養状態の過不足によって発症すると報告されており⁷⁾、脂肪肝を発症すると、肝臓からVLDLおよびLDLの放出が低下し⁸⁾、分娩後の卵胞の反応が減少する⁹⁾ことが報告されている。つまり、黄体形成群のように分娩予定2週間前にVLDLによる肝臓からのTG放出が多いものほど、分娩日を肝臓の脂肪沈着が少ない状態で迎えることができるため、分娩日当日のLDL-CHの割合が上昇し、肝臓が十分に機能することで黄体形成が早まった可能性が示唆された。一方で有意な違いは認められな

かったが、分娩後からはTotal-CH、HDL-CHおよびLDL-CHに関して黄体非形成群は黄体形成群と比較して高値で推移していく傾向があった。Total-CHおよびHDLは分娩後の泌乳量に合わせた飼料の増給など、乾物摂取量に依存する¹⁰⁻¹²⁾。また分娩後のHDLはエネルギー状態を示す指標として報告されている¹³⁾。以上のことから、黄体非形成群の方が黄体形成群と比較して分娩後の栄養状態が良かったことが推察され、早期に機能性黄体を形成させるには、分娩後のエネルギー状態よりも分娩予定2週間前に肝臓からVLDLを介したTGを放出させる方が重要であることが推察された。

E2に関して、黄体形成群は分娩予定2週間前で黄体非形成群と比較して有意な高値を示した。過去に分娩日1週間前から血中E2濃度が上昇することが報告されており¹⁴⁾、本試験において黄体形成群3頭のうち2頭が分娩予定日より1週間ほど早く分娩したことが影響したものと考えられた。

本試験の結果から仮説をたてた分娩後のLDL-CH

の割合と早期機能性黄体との関連性について、有意な結果は得られなかった。乳牛において脂質代謝は繁殖ホルモンの他に泌乳との関連性も深い¹⁵⁾。今回、各供試牛の乳量は測定しておらず、各供試牛におけるLDL-CHの割合は繁殖ホルモン量と泌乳量が複雑に絡み合っている可能性もある。今後、泌乳量にも着目しながら、LDL-CHと繁殖との関連性を追求していく必要がある。

引用文献

- 1) Bauchart, D. (1993) Lipid absorption and transport in ruminants. *J. Dairy. Sci.*, 76 : 3864-3881.
- 2) Gross, J.J., Kessler, E.C., Albrecht, C., et al. (2015) Response of the cholesterol metabolism to a negative energy balance in dairy cows depends on the lactational stage. *PLoS One*. Jun 2 ; 10(6) : e0121956.
- 3) Takahashi, T., Akihiro Mori, A., Toshinori Sako., et al. (2017) Analysis of cholesterol lipoprotein separations in Holstein dairy cattle by anion-exchange high-performance liquid chromatography. *J. Pet Anim. Nutr.*, Vol. 20. 30-38.
- 4) Kawashima, C., Kaneko, E., Matsui, M., et al. (2006) Relationship between the first ovulation within three weeks postpartum and subsequent ovarian cycles and fertility in highproducing dairy cows. *J Reprod Dev*. Aug ; 52(4) : 479-486.
- 5) Okuda, A. (1997) Corpus Luteum Function and Its Morphological Characteristic in Cattle, *J Reprod Dev*. 43, 55-64.
- 6) Edmonson, A.J., Lean, I.J., Weaver, L.D., et al. (1989) A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci*. 72 : 68-78.
- 7) Manka, P., V. Olliges, V., L. P. Bechmann, L.P., et al. (2014) Low levels of blood lipids are associated with etiology and lethal outcome in acute liver failure., *PLoS One* 9 : e102351.
- 8) Fenwick, M.A., Fitzpatrick, R., Kenny, D.A., et al. (2008) Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol*. Jan ; 34(1) : 31-44.
- 9) Galvão, KN., Frajblat, M., Butler, WR., et al. (2010) Effect of early postpartum ovulation on fertility in dairy cows. *Reprod Domest Anim*. Oct ; 45(5) : e207-211.
- 10) Kurpińska, AK., Jarosz, A., Ożgo, M., et al. (2015) Changes in lipid metabolism during last month of pregnancy and first two months of lactation in primiparous cows - analysis of apolipoprotein expression pattern and changes in concentration of total cholesterol, HDL, LDL, triglycerides. *Pol J Vet Sci*. 18(2) : 291-298.
- 11) Miyamoto, T., Y. Sugiyama, J., Suzuki, T., et al. (2006) Determination of bovine serum low-density lipoprotein cholesterol using the N-geneous method. *Vet. Res. Commun.*, 30 : 467-474.
- 12) Turk, R., Juretić, D., Geres, D., et al. (2005) Serum paraoxonase activity in dairy cows during pregnancy. *Res Vet Sci*. Aug ; 79(1) : 15-18.
- 13) Newman, A., S. Mann., D. V. Nydam., et al. (2016) Impact of dietary plane of energy during the dry period on lipoprotein parameters in the transition period in dairy cattle. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, 100 : 118-126.
- 14) 鎌田八郎, 松井義貴 (2017) 血中ホルモン濃度からの分娩日予測の可能性, *日本畜産学会報* 88(4), 431-437
- 15) 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) : 118-122.