

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

(Analysis of cholesterol lipoprotein separations
in Holstein dairy cattle
by anion-exchange high-performance liquid chromatography)

高 橋 知 也

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

(Evaluation of usefulness of cholesterol lipoprotein fraction
in Holstein dairy cattle
using anion-exchange high-performance liquid chromatography)

高 橋 知 也

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科
獣医保健看護学専攻博士後期課程平成 26 年入学

(指導教員：左向 敏紀)

平成 29 年 3 月

目次

第1章 序論	1
・ 図表	11
第2章 ウシにおけるイオン交換高速液体クロマトグラフィーを用いたリポタンパク質分画測定の基礎的検討	15
第1節 イオン交換高速液体クロマトグラフィーを用いたリポタンパク質分画測定信頼性の検討	
・ 緒言	16
・ 材料および方法	18
・ 結果	22
・ 考察	23
第2節 イオン交換高速液体クロマトグラフィーと既存法との測定値比較	
・ 緒言	25
・ 材料および方法	26
・ 結果	29
・ 考察	30

○小括	32
○図表	34

第3章 飼養形態の異なる2つの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

	40
・ 緒言	41
・ 材料および方法	43
・ 結果	47
・ 考察	50
・ 小括	56
・ 図表	57

第4章 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

第1節 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 パク質分画推移の調査

・ 緒言	67
・ 材料および方法	68

・結果	72
・考察	74
第2節 周産期疾患発症牛におけるリポタンパク質分画の測定	
・緒言	78
・材料および方法	80
・結果	81
・考察	83
○小括	88
○図表	89
◇総括	123
◇謝辞	128
◇参考文献	129

第1章 序論

乳牛の体内では常に脂質代謝が盛んに行われている。今現在、日本において酪農家で飼養されている乳牛は年間 8,000kg ほどの乳量を生産しており（農林水産省 畜産統計）、その中でエストロゲンやプロゲステロンといった生理的なステロイドホルモンを脂質から合成しなくてはならず、日々乳牛の体内で脂質代謝は盛んに行われている。これに伴い、乳牛において脂質代謝における乳脂肪合成への脂肪動員[Palmquist. 1976]や生殖組織によるステロイドホルモン産生[Grummer and Carroll. 1988]等の研究が盛んに行われてきた。また、分娩前後の脂質代謝においても盛んに研究が行われており、分娩前においては胎子への栄養供給のために、分娩後は泌乳量確保のために莫大なエネルギー量が求められる。特に分娩後の泌乳に対するエネルギー要求量は著しく大きく、分娩後の乳牛は分娩ストレス等により十分な飼料摂取量が確保できないため、生理的に負のエネルギーバランスに陥る[Gross et al. 2011]。体内でエネルギー不足の状態になると、末梢の脂肪組織で毛細血管内皮細胞に存在するホルモン感受性リパーゼ（HSL）が活性化し、中性脂肪（TG）がグリセロールと遊離脂肪酸（NEFA）に分解される。また、HSL はインスリン作用によって抑制される。グリセロールは血中を介して肝臓に取り込まれ、主にエネルギー源に利用される。NEFA はアルブミンと結合して血液循環を移動し、肝臓においてβ酸化によってエネルギー産生に利用されるほか、TG の再合成の原料となる[Khoo et al. 1974]。一部の NEFA はアセチル CoA を経由して HMG-CoA 還元酵素によりコレステロール合成が行われる。なお、肝臓内のコレステロールの 20% は食餌由来、80% は肝臓で生合成されたものと言われている[津田恒之ら著. 家畜生理学 第二次改訂増補 2004]。乳牛における肝臓からの TG 排出量は、TG 合

成量と比較して著しく少ないといわれており [Davis et al. 1989]、分娩前後において、特に泌乳量が多くボディコンディションスコア (BCS) が高いものほど脂肪肝に陥る。乳牛における分娩前後の周産期疾患発症の背景には脂肪肝が密接に関与しており [Van den Top et al. 2005]、この時期の脂質代謝の詳細を把握することは極めて重要であると考えられる。

飼料を介して摂取されたり、肝臓で合成された TG およびコレステロールは末梢組織へ運搬される必要があるが、脂質は本来疎水性物質のため、そのままの状態では血液循環を介して運搬することはできない。そのため、リポタンパク質の形態をとって血液循環に入る必要がある。リポタンパク質とは、疎水性の脂質成分である TG およびコレステロールを血液中にのせて全身へ運ぶために、脂質成分を内側にし、親水性のリン脂質膜およびアポタンパク質と呼ばれるタンパク質で表面を覆った高分子複合体のことをいう。リポタンパク質は比重や粒子サイズの違いから大きく 5 つに分類される。比重の大きいものから順に、高密度リポタンパク質 (HDL)、低密度リポタンパク質 (LDL)、中間密度リポタンパク質 (IDL)、超低密度リポタンパク質 (VLDL) およびカイロミクロン (CM) となる [Mahley and Innerarity. 1983]。リポタンパク質の構成要素であるアポタンパク質とは主に腸管や肝臓で合成され、リポタンパク質の構造を保持するほか、運搬した脂質を細胞内に取り込む際のリガンドの役割を果たす。また、アポタンパク質は酵素の働きにも作用する。例えばヒトにおいて、アポタンパク質 C-I および C-II はリポタンパク質リパーゼ (LPL) を活性化し、アポタンパク質 C-III は逆に抑制する。またアポタンパク質 A-I はレシチンコレステロールアシルトランスフェラーゼ (LCAT) を活性化し、アポタン

パク質 A-II は逆に LCAT を抑制するほか、肝性トリグリセリドリパーゼ (HTGL) を抑制する [Mahley et al. 1984]。LPL は末梢組織の毛細血管内皮に存在する酵素であり、CM や VLDL といった TG 高含有リポタンパク質によって運搬された TG をグリセロールおよび NEFA に分解し、エネルギー源やエネルギー貯蔵体として細胞内に取り込む作用がある。この LPL はインスリン作用によって活性化される [Tan. 1978]。一方で LCAT は肝臓で合成される酵素であり、HDL の表面で作用し、遊離型コレステロールをコレステロールエステルに転換し、HDL 粒子内部に取り込む。この作用により、HDL は末梢組織の余剰コレステロールを回収し、肝臓へ逆転送される [Frohlich et al. 1982]。また HTGL も、肝臓で合成される酵素であり、肝臓の血管内皮に存在し、CM や IDL といったリポタンパク質の TG を分解する [Baginsky and Brown. 1977]。

ヒトおよびウシのリポタンパク質の分類、密度領域、粒子サイズ、生成部位、リポタンパク質組成、役割および構成アポタンパク質をそれぞれ表 1-1 および表 1-2 に示し、ヒト体内のリポタンパク質代謝を図 1-1 に示した [Aizawa et al. 2015; Bauchart. 1993; Mahley and Innerarity. 1983; Mahley et al. 1984]。

CM はヒトとウシも密度領域が同じであるが、粒子サイズはヒトで大きく、リポタンパク質の中で最も密度領域の小さいリポタンパク質である。ヒトおよびウシの CM は腸管で合成され、TG が豊富であり、主に食餌由来の TG を末梢組織に運搬する役割をもつ。CM は血液循環中でアポタンパク質 A-I を HDL に受け渡し、アポタンパク質 C-II、ヒトの場合はさらにアポタンパク質 E を獲得する。HDL から獲得したアポタンパク質 C-II を介して、脂肪組織や筋肉

の毛細血管内皮に存在する LPL を活性化させ、末梢組織に TG を放出する。

ヒトにおいて、LPL により分解された CM はレムナントとなり、アポタンパク質 E を介して肝臓に取り込まれる。ウシにおいても同様に肝臓に取り込まれると考えられるが、ウシのアポタンパク質 E は同定されておらず、取り込みの詳細は明確にわかっていない[Bauchart. 1993; Mahley and Innerarity. 1983]。

VLDL は、ヒトおよびウシで構造および役割が類似したリポタンパク質であり、脂質、特に肝臓由来の TG を末梢組織へ運搬する役割をもつ。リポタンパク質中、CM に次いで密度領域が低く、腸管および肝臓で合成される。肝臓由来の VLDL は、肝臓で合成されたコレステロールおよび TG を、アポタンパク質 B100 およびミクロソームトリグリセリド輸送タンパク質 (MTP) の作用により形成され、排出される。肝臓から排出された VLDL は血液循環中で、HDL の中でもコレステロールエステルを多く取り込んだ HDL2 からアポタンパク質 C-II を獲得するとともに、コレステロールエステル輸送タンパク質 (CETP) を介してコレステロールエステルを取り込み、TG を放出する。

CETP は、リポタンパク質間でコレステロールエステルと TG の双方向の転送を促進させる酵素である。多くのコレステロールエステルは HDL 表面において LCAT により生成されるため、HDL 中のコレステロールエステルが

VLDL、IDL および LDL に受け渡され、VLDL、IDL および LDL の TG が HDL へ転送される[Tall. 1993]。VLDL に含まれた TG は末梢組織の脂肪組織や筋肉の毛細血管内皮の LPL により分解され、脂質を提供した後、肝臓へ戻り HTGL により LDL に分解される[Mahley and Innerarity. 1983; 内科学 第 10 版. 2013]。ウシの肝臓からの VLDL 排出量は基本的に少ない[Kleppe et al.

1988]ため、一般的にウシの血漿中の VLDL はヒトの血漿中の VLDL と比較して低い[Gruffat et al. 1998]。実際、成乳牛の総リポタンパク質に対する VLDL の割合は 0.5%ほどであるという報告がある[Grummer and Davis. 1984]。成乳牛において VLDL の割合が著しく低いのは、泌乳期において VLDL を介して乳腺に乳脂肪の原料を動員するために起こる、急激な代謝回転が原因であると考えられている[Gleockler et al. 1980]。

IDL は、VLDL が LPL によって分解され、肝臓で LDL になるまでの中間体のリポタンパク質である。しかしながら、これまでにウシの IDL に関する詳細はわかっていない。ヒトの IDL は、VLDL と同様に、血液循環中で HDL2 から CETP を介してコレステロールエステルを受け取ると同時に、TG を放出し、さらにアポタンパク質 C-II を介して LPL により TG を放出していく。

IDL はアポタンパク質 E を豊富に含み、これにより肝臓に取り込まれ、HTGL により LDL となる[Bauchart. 1993; Mahley and Innerarity. 1983]。

LDL においても VLDL 同様にヒトおよびウシで類似した役割をもつ。肝臓で IDL が HTGL を介して LDL となるが、放出された LDL は末梢組織へコレステロールを運搬する役割をもつ。末梢組織へ提供されたコレステロールは主に細胞膜構成成分やステロイドホルモンの原料として利用される。ヒトとウシの LDL で大きく異なる点は、総リポタンパク質に対する LDL の占める割合である。健常なヒトにおいて、LDL は総リポタンパク質の 45~60%程であるのに対し、ウシの LDL は総リポタンパク質の 10%程といわれている[Chapman. 1986]。ヒトにおいて、一部の LDL はマクロファージに取り込まれることがわかっている。さらに LDL を構成するアポリポタンパク質 B-100 にアポタンパ

ク質(a)が結合したものはリポタンパク質(a)と呼ばれ、ヒト医学領域では動脈硬化に関する指標の1つとされている[Mahley et al. 1984; 内科学 第10版. 2013]。

ヒトおよびウシのHDLは粒子サイズおよび組成は類似しており、主にアポタンパク質A-IおよびA-IIを主としたアポタンパク質で構成されている。ヒトおよびウシのHDLはともに小腸および肝臓で合成され、ヒトでは新生HDL、HDL3およびHDL2に、ウシではVery light HDL、Light HDLおよびHeavy HDLに、それぞれ3つの亜分類に分類される。ヒトにおいて小腸由来のHDLは新生HDLであり、アポタンパク質A-Iを豊富に含み、遊離型コレステロールの取り込み能が高いとされている。末梢組織からの余剰コレステロールの取り込みが進むにつれて、新生HDLからHDL3、HDL2へと変化する。HDL中のアポタンパク質A-IによりLCATを活性化させ、HDL表面の遊離型コレステロールをエステル化し、HDL内部に移動させる。これを繰り返すことで末梢組織の余剰コレステロールを回収し、肝臓に逆転送する役割をもつ[Bauchart. 1993; Mahley and Innerarity. 1983]。末梢組織において余剰のコレステロールを回収する際、ATP-結合カセット輸送タンパク質A1 (ABCA1) およびATP-結合カセット輸送タンパク質G1 (ABCG1) が酵素として作用する。ABCA1は、ATPに依存してアポタンパク質A-Iにコレステロールおよびリン脂質を受け渡すことでHDLを構成する。また、ABCG1は新生HDLに非依存的にコレステロールおよびリン脂質を受け渡し、HDL3およびHDL2へと形成する[Feingold. 2015]。コレステロール濃度の最も高いHDL2は、主にアポタンパク質A-Iを介して肝臓に取り込まれ、胆汁酸の形態をとって排泄経路

をとる。一部の HDL2 は CETP により VLDL、IDL および LDL にコレステロールエステルを転送し、TG を受けることで再び HDL3 や新生 HDL となり、末梢組織の余剰コレステロールを回収する[Feingold. 2015]。ヒトの HDL は総リポタンパク質の 25~33%程を占めるのに対し、ウシの HDL は総リポタンパク質の 80%以上を占める[Gruffat et al. 1998; Grummer et al. 1983; 内科学第 10 版. 2013]。ウシの Very light HDL、Light HDL および Heavy HDL は、ヒトの新生 HDL、HDL3 および HDL2 に相当し、ヒトと同様に末梢組織の余剰コレステロールを回収する。ヒトの HDL になく、ウシの HDL にある役割として、LDL と同様にコレステロールを肝臓、卵巣、精巣、および副腎といった主要なステロイドホルモン産生組織に供給するほか、繊維芽細胞といった細胞膜構成のために末梢組織にコレステロールを運搬することが報告されている。ウシの卵巣中のステロイドホルモン産生細胞において、ウシの HDL 中、サイズの最も小さい Heavy HDL は、血液循環から卵胞液と顆粒膜細胞を隔てた基底膜を通過することができる。そのため、卵巣中のステロイドホルモン産生細胞の HDL 結合部位は多い[Brantmeier et al. 1987]。同様に、副腎束状帯細胞によるコルチゾール分泌は主に LDL よりも HDL により刺激される[Cordle et al. 1985]。もう 1 つのウシの HDL の特徴として、Very light HDL の密度領域 1.039~1.060g/ml が LDL と重複することである[Mazur et al. 1992]。これにより、比重法による牛のリポタンパク質分画測定は困難なものになっている。ウシの HDL を構成しているアポタンパク質はアポタンパク質 A-I が約 8 割を占め、HDL 構造の保持の他、LCAT を活性化させる。またアポ

タンパク質 CII および CIII も HDL のアポタンパク質として構成され、血液循環中で VLDL に転写される [Bauchart et al. 1989; Laplaud et al. 1990]。

ウシのリポタンパク質分画の測定において、リポタンパク質代謝や HDL および LDL の密度領域の重複等により高性能な分析方法が求められている。密度勾配超遠心法は密度領域の違いからリポタンパク質を 20 以上のサブフラクションに分ける方法であり、TG 高含有リポタンパク質と HDL の分離に用いられてきた [Laplaud et al. 1990; Puppione et al. 1982]。また、アガロースゲルカラムによるゲルろ過法は、粒子サイズによって乳牛のリポタンパク質分画を分離するのに用いられてきた [Grummer et al. 1983; Grummer and Davis. 1984]。しかしながら、密度勾配超遠心法およびゲルろ過法では、密度領域 1.039~1.076g/ml の範囲にある LDL と very light HDL を完全に分離することができなかった [Laplaud et al. 1990; Grummer et al. 1983]。類似した粒子サイズと密度領域をもつ HDL と LDL の存在はウシのリポタンパク質の特徴である [Mazur et al. 1992]。ウシの HDL と LDL の完全な分離は、ヘパリン-セファロースクロマトグラフィーによって達成されたという報告があるが、アポリポタンパク質を豊富に含む LDL は樹脂により選択的で可逆的な影響を受けたと報告されている [Laplaud et al. 1991]。さらにウシの VLDL の内部には脂肪酸が非常に高い飽和状態で存在しているため、20°C 以下の超遠心分離法では VLDL の回収効率が制限されたという報告もある [Puppione et al. 1982]。このような状況から、HDL および LDL を明確に分けるウシのリポタンパク質分画の測定法の開発は急務とされている。

そこで本研究では、近年ヒトでリポタンパク質分画を迅速かつ正確に測定できる方法として幅広く用いられているイオン交換高速液体クロマトグラフィー法に着目し、

第2章：イオン交換高速液体クロマトグラフィー法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基礎的検討

を実施し、その下で、

第3章：飼養形態の異なる2つの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

第4章：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

を調査することにした。

この3項目について検討し、イオン交換高速液体クロマトグラフィー法を用いた乳牛のリポタンパク質分画の測定が、臨床現場で応用できるか検討することにした。

動物実験許可 No : 28S-5、28S-6

図表

表 1-1 ヒトおよびウシのアポタンパク質の分類、存在の有無、産生部位、構成リポタンパク質および機能。

ヒトおよびウシにおいて存在するアポタンパク質に○を示す。

アポタンパク質	ヒト	ウシ	産生部位	構成リポタンパク質	機能
A-I	○	○	腸、肝	CM、HDL	LCAT 活性、HDL 受容体結合
A-II	○	○	肝	HDL	LCAT、HTGL 活性阻害
A-IV		○	腸	CM、Heavy HDL	LCAT 活性
B-100	○	○	肝	VLDL、IDL、LDL	LDL 受容体結合
B-48	○	○	腸	CM	
C-I	○	○	肝	CM、VLDL、HDL	LPL 活性
C-II	○	○	肝	CM、VLDL、IDL、HDL	(ヒト) LPL 活性
C-III	○	○	肝	CM、VLDL、IDL、HDL	LPL,HTGL 活性阻害
C-IV		○	肝	CM、VLDL、IDL、HDL	?
E	○		肝、末梢	CM、VLDL、LDL、HDL	レムナント、LDL 受容体結合

表 1-2 ヒトにおけるリポタンパク質分画の分類。

	カイロミクロ ン	超低密度 リポタンパク	中間密度 リポタンパク	低密度 リポタンパク	高密度 リポタンパク
略称	CM	VLDL	IDL	LDL	HDL
密度領域 (g/ml)	~0.950	0.950~1.006	1.006~1.019	1.019~1.063	1.063~1.210
粒子サイズ (nm)	75 ~ 1000	30 ~ 80	25 ~ 40	20	7.5 ~ 10
生成部位	腸管	腸管、肝臓	VLDL	IDL	肝臓、腸管
FC	0.8 ~ 1.6	5	5	8	4
CE	0.8 ~ 1.4	5	25	37	16
組成 (%)					
TG	86 ~ 92	50 ~ 60	40	5 ~ 10	5
PL	6 ~ 8	5	20	20 ~ 30	25
Apo	1.0 ~ 1.5	40	10	20	50
役割	食餌由来の 脂質運搬	食餌、肝臓由 来の脂質運搬	VLDL→LDL の中間体	末梢にコレス テロールを運 搬	末梢の余剰コレ ステロールの回 収
構成 Apo	ApoA、ApoB- 48、ApoC、 ApoE	ApoB-100、 ApoC、ApoE	ApoB-100、 ApoE	ApoB-100、 ApoE	ApoA、ApoC、 ApoE

FC ; 遊離が T コレステロール、CE ; コレステロールエステル、

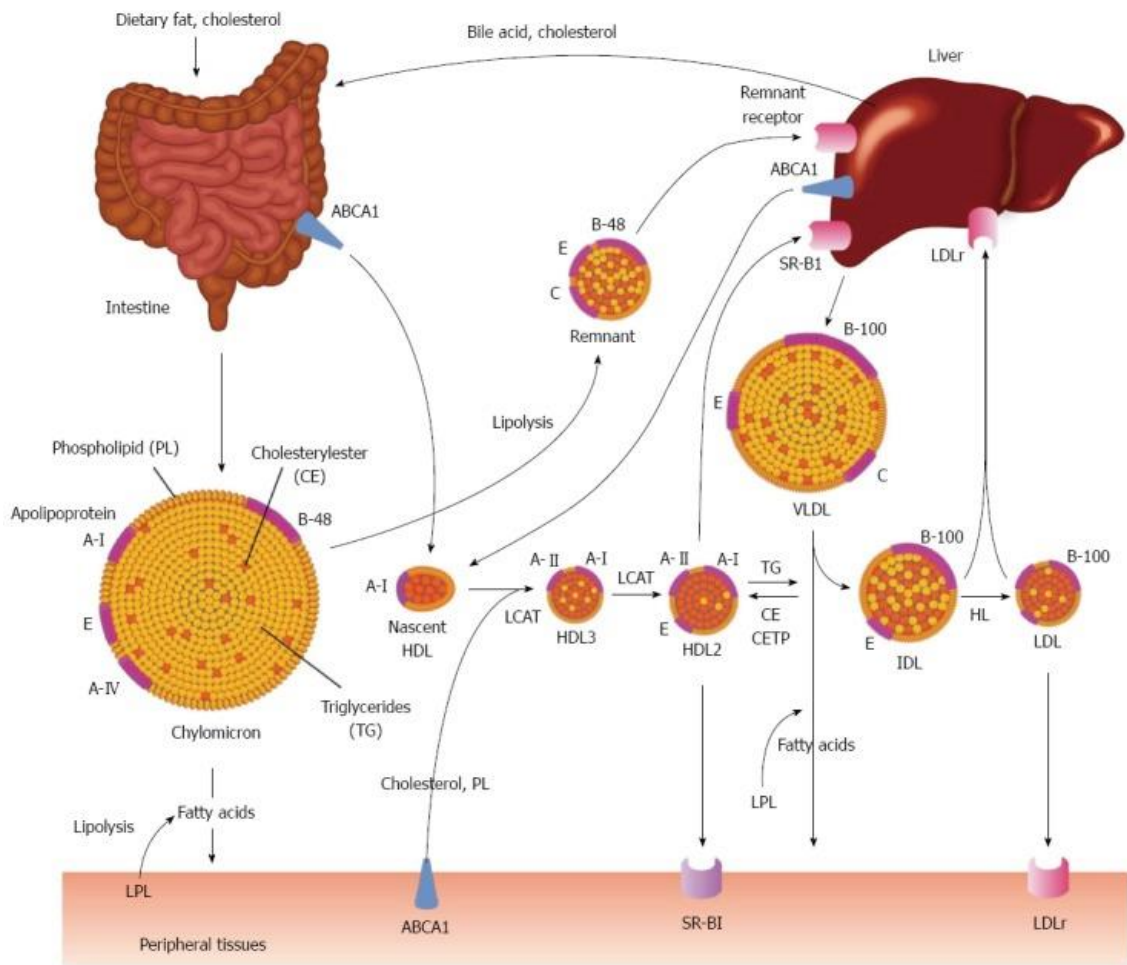
TG ; 中性脂肪、PL ; リン脂質、Apo ; アポタンパク質 を示す。

表 1-3 ウシにおけるリポタンパク質分画の分類。

	カイロ ミクロン	超低密度 リポタンパ ク	中間密度 リポタンパ ク	低密度 リポタンパ ク		高密度 リポタンパ ク	
略称	CM	VLDL	IDL	LDL	Very light HDL	Light HDL	Heavy HDL
密度領域 (g/ml)	~ 0.950	0.950 ~ 1.006	1.006 ~ 1.026	1.026 ~ 1.076	1.039 ~ 1.060	1.060 ~ 1.091	1.091 ~ 1.180
粒子サイズ (nm)	50 ~ 250	34 ~ 86		19 ~ 25		12 ~ 14	9.3 ~ 12
生成部位	腸管	腸管、肝臓	VLDL	IDL		肝臓、腸管	
FC	4 ~ 6	3 ~ 9		6 ~ 8		1 ~ 2	1 ~ 4
CE	1 ~ 4	5 ~ 15	1~3	31 ~ 36		29 ~ 33	13 ~ 29
構成 (%)							
TG	72 ~ 87	45 ~ 63	61 ~ 70	4 ~ 21		1 ~ 3	1 ~ 6
PL	4 ~ 5	12 ~ 17		18 ~ 22		25 ~ 27	12 ~ 27
Apo	2 ~ 3	8 ~ 16		22 ~ 32		33 ~ 39	39 ~ 68
役割	食餌由来の 脂質運搬	食餌、肝臓 由来の脂質 運搬	VLDL→LDL の 中間体	末梢に コレステロ ールを運搬		①末梢にコレステロールを運搬 ②末梢の余剰コレステロールの回収	
構成 Apo	ApoB-48、 ApoA-I、 ApoC	ApoB-100	ApoB-100	ApoB-100		ApoA、ApoC	

FC ; 遊離型コレステロール、CE コレステロールエステル、

TG ; 中性脂肪、PL ; リン脂質、Apo ; アポタンパク質 を示す。



Aizawa et al. 2015 参照

図 1-1 ヒト体内におけるリポタンパク質代謝。

なお、Apolipoprotein ; アポタンパク、Bile acid ; 胆汁酸、
 Cholesterol ; コレステロール、Cholesterylester (CE) ; コレステロール
 エステル、Chylomicron ; カイロミクロン、Dietary fat ; 食餌性脂
 質、Fatty acids ; 脂肪酸、Intestine ; 腸管、LDLr ; LDL レセプター、
 Lipolysis ; 脂質分解、Nascent HDL ; 新生 HDL、Peripheral tissues ;
 末梢組織、Phospholipid (PL) ; リン脂質、Remnant ; レムナント、
 Triglycerides (TG) ; 中性脂肪を示す。

第 2 章

ウシにおけるイオン交換高速液体クロマトグラフィーを用いた
リポタンパク質分画測定の基礎的検討

第1節 イオン交換高速液体クロマトグラフィーを用いたリポタンパク質 分画測定信頼性の検討

緒言

乳牛における血清リポタンパク質の測定は超遠心分離法を用いて行われており、この方法が代表的な測定法として考えられている[Gardner et al. 2003]。しかしながら、超遠心分離法は操作が煩雑で時間がかかるという欠点をもっている。乳牛における HDL は、密度領域 1.091~1.180g/ml の Heavy HDL、密度領域 1.060~1.091g/ml の Light HDL、さらに密度領域 1.039~1.060g/ml の Very light HDL が存在しており[Bauchart et al. 1989; Cordle et al. 1983; Laplaud et al. 1991; Quincey et al. 1989; Tall et al. 1981]、この HDL の密度領域 1.039~1.180 g/ml と LDL の密度領域 1.026~1.076g/ml 内で HDL と LDL が重複する領域が存在するため、超遠心分離法においてクロマトグラムの溶出分画が重複する。そのため乳牛のリポタンパク質分画を評価するための有益で信頼性のある測定法を開発する必要がある。近年、ヒトおよびウサギにおいて、血清リポタンパク質分画がイオン交換高速液体クロマトグラフィー (AEX-HPLC) 法で迅速かつ正確に分離することが可能となった。ヒト領域において AEX-HPLC 法によりコレステロール分画を評価することで血液中の脂質異常症の診断に用いられる等、測定法として幅広く利用されている。AEX-HPLC 法はヒトやウサギにおいて測定時間 20 分間と極めて短く、リポタンパク質表面の電荷の違いを利用して過塩素酸塩を用いた段階的な濃度勾配による溶出を行うことで、迅速かつ正確な測定を実現している[Hirowatari et al. 2003; Hirowatari et al. 2008; Hirowatari et al. 2012; Manita et al. 2015]。このため

AEX-HPLC 法では乳牛でも HDL と LDL を分離できる可能性がある。しかし、AEX-HPLC 法を用いた乳牛のリポタンパク質分析の測定は行われていない。

第 2 章 第 1 節の目的は、乳牛の血清が AEX-HPLC 法でリポタンパク質測定が可能か、HDL や LDL 分画等が分離可能かを検討した。分画の分離が可能であった場合、その分画の同時再現性、日差再現性および希釈直線性について評価した。

材料および方法

1. 供試動物

本試験は平成 26 年 4 月から 9 月にかけて実施された。宮城県内の 1 酪農家で飼養されている飼養管理上問題ない健常なホルスタイン種成乳牛 6 頭から採血して供試した。表 2-1 に供試牛の詳細のプロフィールを示した。本酪農家は飼養頭数 12 頭で、飼料内容はイネ科、マメ科、ビートパルプおよび配合飼料（可消化養分総量（TDN）；74.5%、粗タンパク質（CP）；17.5%）が給餌され、ターストールで自由飲水が可能であった。飼料給餌は AM7:00 および PM6:00 に行われた。本試験の目的、本質、潜在的なリスク、および有益性を説明した後、本酪農家から同意を得た。

2. 検体処理

供試牛の尾静脈から採血針（ベノジェクト II 採血針 S TERUMO、東京、日本）を使用して真空採血管（ベノジェクト II 真空採血管（滅菌品）、TERUMO、東京、日本）内に 10ml 採血を実施した。冷蔵後、できる限り早く遠心機（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 4°C10 分間 1,700g 条件下で血清分注した。血清サンプルは各個体測定用血清サンプルとプール血清を作製して株式会社富士フィルムモノリスに発送した。同時再現性、日差再現性および希釈直線性を評価するにはプール血清を用いた。日差再現性のためのプール血清サンプルは -80°C のディープフリーザー内で凍結保存された。

3. 測定方法および測定項目

①AEX-HPLC

AEX-HPLC 法による総コレステロール (Total-C)、HDL コレステロール (HDL-C)、LDL コレステロール (LDL-C)、IDL コレステロール (IDL-C) および VLDL コレステロール (VLDL-C) のリポタンパク質分画の測定は、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。AEX-HPLC 法による全ての測定は株式会社富士フィルムモノリスによって実施された[Manita et al. 2015]。

測定の概要として、3 種類の溶離液 (LP II 溶離液 第 1 液、LP II 溶離液 第 2 液、LP II 溶離液 第 3 液、東ソー株式会社、東京、日本) をポンプユニット (CCPM II 東ソー株式会社、東京、日本) により段階的にカラム (TSKgel Lipopropak-AEX II、東ソー株式会社、東京、日本) 内部に送液し、途中のオートサンプラー (AS-8021 東ソー株式会社、東京、日本) において測定対象血清を注入する。カラムオーブン (CO-8020 東ソー株式会社、東京、日本) により 25℃で維持されたカラム内の陰イオン交換樹脂表面により注入した血清中のリポタンパク質を吸着させた後、カオトロピックイオンである過塩素酸ナトリウムの濃度依存的な溶出を行うことにより、各リポタンパク質分画をカラムから段階的に溶出させる。カラム内の陰イオン交換樹脂により分離されたりポタンパク質分画は反応液と混合され、リポタンパク質中のコレステロールはコレステロールエステラーゼの作用により遊離型脂肪酸と遊離型コレステロールに分けられる。遊離型コレステロールはコレステロールオキシダーゼにより酸化分解され過酸化水素を生成し、これに 4-アミノアンチピリンおよび N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリンナトリウムがペルオキシダーゼの作用を受

け、キノン色素を生じる。これを可視光検出器（UV-8020 東ソー株式会社、東京、日本）により 590nm の波長で検出し、データ処理装置（SC-8020 東ソー株式会社、東京、日本）にてクロマトグラムを作成した。

②同時再現性

供試牛のプール血清を用いて Total-C、HDL-C、LDL-C、IDL-C および VLDL-C のリポタンパク質分画を反復 10 回測定することで評価した。

③日差再現性

2 ヶ月間の中にランダムで 10 回測定を行い、リポタンパク質分画の日差再現性を評価した。試験期間中、供試牛のプール血清は-80℃のディープフリーザー内で冷凍保存された。

④希釈直線性

供試牛のプール血清を、スクロース 760 g/L およびエチレンジアミン-NNNN-四酢酸二カリウム塩二水和物（EDTA-2K）1.5g/L が混在した保存液を用いて、血清 250 μ ml および保存液 750 μ ml の 1/4 倍希釈検体、血清 500 μ ml および保存液 500 μ ml の 1/2 倍希釈検体、血清 750 μ ml および保存液 250 μ ml の 3/4 倍希釈検体、および血清のみの検体の計 4 検体を作成した。それぞれの希釈検体のリポタンパク質分画を測定し、各分画の希釈直線を描き、相関の確認を行った。

4. 統計

測定値は平均値±標準偏差で表記された。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。全ての試験に関して GraphPad Prism 6 analysis software を用いて実行した。

結果

6頭の供試牛のうちの4頭のAEX-HPLC法によるクロマトグラムを図2-1に示した。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。AEX-HPLC法による各リポタンパク質分画の測定評価に関して、同時再現性においては変動係数(CV s)が各分画ともに10%以下という良好な分析精度を示した(表2-2)。日差再現性の分析評価は、CV sがそれぞれTotal-Cで1.3%、HDL-Cで1.9%、およびLDL-Cで6.6%であり、良好な結果が得られた(表2-2)。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(1.0mg/dL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。4倍まで希釈した希釈直線性において、Total-C、HDL-CおよびLDL-Cで良好な直線が描かれた(図2-2)。しかしながら、0.25倍希釈検体のIDL-C、および0.25倍希釈および0.50倍希釈検体のVLDL-Cで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。

考察

AEX-HPLC 法におけるクロマトグラムにおいて、HDL-C の溶出分画が最も大きく、次いで LDL-C であった。一方、IDL-C および VLDL-C はわずかに示される程度であった。これは HDL-C が総リポタンパク質中の 80%以上を占め、LDL-C が総リポタンパク質中の 10%以内である [Chapman. 1980; Chapman. 1986; Palmquist. 1976; Usui et al. 2000] という報告と一致した [Forte et al. 1981; Grummer et al. 1983; Jonas. 1972; Jonas. 1975; Mazur and Rayssiguier. 1988; Mills and Taylaur. 1971; Puppone et al. 1982; Puppione et al 1982; Quincey et al. 1987; Raphael et al. 1973; Stead and Welch. 1975]。しかし、超遠心分離法とは異なり、HDL 分画と LDL 分画とはクロマトグラムで明確に分離された。このことから、AEX-HPLC 法は、ウシのリポタンパク質測定には優れた方法と考えられた。IDL-C および VLDL-C に関しては、乳牛が本来低値であるという報告と一致している [Van den Top et al. 2005]。同時再現性および日差再現性における Total-C、HDL-C および LDL-C の CV s はいずれも 10%未満であった。さらに同時再現性に関して IDL-C および VLDL-C においても CV s が 10%未満であった。しかしながら、日差再現性における IDL-C および VLDL-C の CV s において、いくつかの測定値が検出限界値未満であったため評価することができなかった。IDL-C および VLDL-C は冷凍凍結により凝集する可能性があることが報告されており、スクロース 760 g/L およびエチレンジアミン-NNNN-四酢酸二カリウム塩二水和物 (EDTA-2K) 1.5g/L が混在した保存液を混在することで、この冷凍凝集を防ぐことが報告されている [Hirowatari et al. 2008]。また前述したように乳牛の IDL-C および VLDL-C は、本来低値である。以上のことから、本試験では保存液を使用せず直接-80℃で保

存したため、もともと低濃度で存在する IDL-C および VLDL-C が冷凍凝集することで、測定検出値未満になったものと考えられた。希釈直線性試験において、良好な直線が Total-C、HDL-C および LDL-C で観察された。しかしながら、いくつかの希釈検体で IDL-C および VLDL-C が検出限界値未満であった。この結果は、健常牛の IDL-C および VLDL-C が本来低い値であるため希釈により測定できる限界以下に濃度が下がったためと考えられる [Newman et al. 2016; Van den Top et al. 2005]。

以上より本試験において、AEX-HPLC 法は HDL-C および LDL-C に関しては高い再現性および信頼性をもって測定が可能であるが、IDL-C および VLDL-C に関しては検体の濃度により再現性が異なることが分かった。

第2節 イオン交換高速液体クロマトグラフィー法と既存法との測定値比較

緒言

第1章 第1節において、AEX-HPLC法はHDL-CおよびLDL-Cはクロマトグラムが明確に分離され、高い再現性および信頼性をもって測定が可能であるが、IDL-CおよびVLDL-Cに関しては検体の濃度に依存することがわかった。

今現在、ウシのリポタンパク質分画の測定は、主に超遠心分離法により行われており、脂質代謝が盛んに行われる分娩前後を中心に数多くの研究報告がなされ、特に分娩前後の脂質代謝の異常が脂肪肝を発症し、周産期疾患発生の引き金になるという報告[Van den Top et al. 2005]もある。しかしながら、超遠心分離法は測定作業の煩雑さおよび時間を要するだけでなく、HDLおよびLDLの分離が不明瞭で臨床応用は困難である。一方でゲルろ過(GP-)HPLC法は粒子サイズにより迅速かつ正確にリポタンパク質分画を測定する方法で、ヒト領域のほかに健常なイヌ[Mizutani et al. 2010]およびネコ[Mizutani et al. 2016]でリポタンパク質分画の測定に有用されているが、ウシでは測定された報告がない。粒子サイズで分離するため、HDL分画とLDL分画が明瞭に分離できない可能性がある。

そこで、第2節では、AEX-HPLC法と、主に牛のリポタンパク質分画測定に用いられてきた超遠心分離法およびヒト、イヌおよびネコでリポタンパク質分析に汎用されているGP-HPLC法と相関性を検討した。

材料および方法

1. 供試動物

第2章 第1節と同一乳牛6頭を供試した（「第2章 第1節 1. 供試動物」参照）。

2. 検体処理

血清採取は、第2章 第1節と同様で行った（「第2章 第1節 2. 検体処理」参照）。供試牛の血清検体をプロピレンチューブ（角小D 中央化学株式会社、埼玉、日本）に3分割し、AEX-HPLC法による解析用検体は株式会社富士フィルムモノリスへ、超遠心分離法による解析用検体は株式会社東ソーへ、GP-HPLC法による解析用検体は株式会社スカイライトバイオテックへ、それぞれ冷蔵発送した。それぞれの検体は4℃で保存された。

3. 測定方法および測定項目

①AEX-HPLC

第2章 第1節と同様に測定された（「第2章 第1節 3. 測定方法および測定項目」参照）。

②超遠心分離法

超遠心分離法はベックマン分離用超遠心機（Optima LE-80K、BECKMAN COULTER、東京、日本）を用いてリポタンパク質分画測定を実施した [Quincey et al. 1989]。下記にプロコールを示した。

超遠心分離法による測定においてローターは SW-41Ti（BECKMAN

COULTER、東京、日本)を使用した。ポリアロマー製遠心チューブ (BECKMAN COULTER、東京、日本) に臭化カリウム 1.05 g をとり、さらに EDTA 加血清 3.5ml を加えた。その後、この上に 8.5ml の 0.01%EDTA および 0.15M の塩化ナトリウムを重層し、ローターにブラケットおよび遠心チューブを設置して、4°C で 3 時間静置した。静置後、ローターを回転室にセットし、40,000rpm、4°C、4 時間で遠心を行い、完了後、チューブの底部よりペリスタポンプ (アトー株式会社、東京、日本) を用いて比重差から分画ごとに採取した。

③GP-HPLC

GP-HPLC 法は LipoSEARCH[®] (湘南島津株式会社、京都、日本) を用いて実施した。GP-HPLC 法による全ての測定は株式会社スカイライトバイオテックによって実施された[Mizutani et al. 2010]。

LipoSEARCH[®]による測定の概要として、オートサンプラーから注入された血清が直列に配属されたゲルろ過カラム (SkylightPakLP1-AA スカイライトバイオテック株式会社、秋田、日本) 中を流れることにより、血清中のリポタンパク質分画が粒子サイズの大きい順に分離される。カラムから排出されたりポタンパク質を含んだ溶液はマイクロスプリッターにより均等に 2 つのラインに分配され、それぞれコレステロール試薬と TG 試薬により 37°C 条件下のもと反応コイル内で酵素反応を受ける。反応後の吸光度を 550nm で UV-VIS 検出器によりモニタリングした。各リポタンパク質分画の粒子サイズは、線形の検量線を使用してクロマトグラムの溶出分画の保持時間により決定した[Usui et al. 2000]。血清検体中のリポタンパク質は、粒子サイズにより 4 つの主要分画と 3 分画の VLDL、4 分画の LDL、および 5 分画の HDL からなる 12 亜分画に分割される。

ガウス曲線適合法によるリポタンパク質の構成要素の溶出分画の検出から、リポタンパク質の主要分画および亜分画に関与したコレステロールおよび TG 濃度を決定した[Okazaki et al. 2005; Okazaki et al. 2006]。

4. 統計

測定値は平均±SD で表記された。ピアソンの積率相関係数は測定値間の有意な相関を示すのに用いられ、 r として表記された。 $p < 0.05$ の差は統計的に有意であると考慮した。GraphPad Prism 6 analysis software を用いて実行した。

結果

遠心分離法によって測定された VLDL-C は検出限界値未満 (1.0mg/dL) であつたので相関の検討は行えなかつた。超遠心分離法および GP-HPLC 法では IDL-C の測定は行えないので、AEX-HPLC 法により測定された LDL-C + IDL-C を LDL-C 測定値として相関を評価した。AEX-HPLC 法と超遠心分離法の間で、Total-C ($y = 0.9264 x + 26.54$, (y; 超遠心, x; AEX-HPLC), $r = 0.9899$, $p < 0.001$)、HDL-C ($y = 0.3329 x + 86.16$, $r = 0.9011$, $p < 0.05$) および LDL-C ($y = 1.5360 x + 6.040$, $r = 0.9331$, $p < 0.01$) に関して有意な正相関が確認された (図 2-3)。AEX-HPLC 法および GP-HPLC 法の間で、Total-C ($y = 1.026 x - 8.003$, (y; GP-HPLC, x; AEX-HPLC), $r = 0.9978$, $p < 0.001$)、HDL-C ($y = 0.8181 x + 25.09$, $r = 0.9792$, $p < 0.001$) および LDL-C ($y = 1.1820 x - 6.477$, $r = 0.9611$, $p < 0.01$) に関して有意な正相関が確認された (図 2-4)。しかしながら、VLDL-C に関して AEX-HPLC 法および GP-HPLC 法の間で有意な相関は認められなかつた ($y = 0.2841 x + 0.0201$, $r = 0.7462$, $p > 0.05$) (図 2-4)。

考察

AEX-HPLC 法と超遠心分離法の間で、リポタンパク質分画の有意な正相関が確認された。しかしながら、AEX-HPLC 法による HDL-C は超遠心分離法による測定値よりも高値を示し、相関式 ($y = 0.3329x + 86.16$, $r = 0.9011$, $p < 0.05$) の x の係数も低値を示した。また、AEX-HPLC 法により測定された LDL-C + IDL-C は超遠心分離法で測定された LDL-C よりも低値を示し、相関式 ($y = 1.5360x + 6.040$, $r = 0.9331$, $p < 0.01$) の x 係数も高値を示した。これらの違いは測定法自体の問題の可能性がある。すなわち、超遠心分離法による血清リポタンパク質分析はヒトにおいて密度勾配により順次分離される。

(VLDL ; $d < 1.006$, IDL ; $1.006 < d < 1.019$, LDL ; $1.019 < d < 1.063$, HDL ; $d > 1.063$ (g/mL)) [Usui et al. 2000] しかしながら、牛 LDL の密度範囲は 1.026 ~ 1.076g/mL の範囲にあり、ヒトと異なることがわかっている[Miyamoto et al. 2006]。さらにウシの HDL の密度領域は 1.060 ~ 1.180g/mL であり、幅広い密度範囲を有している。この密度領域内に light HDL (1.060 ~ 1.091 g/mL) および heavy HDL (1.091 ~ 1.180 g/mL) を含んでいる[Miyamoto et al. 2006]。さらに very light HDL (1.039 ~ 1.060g/mL) がウシ血漿内で認められている[Bauchart et al. 1989; Bauchart. 1993; Mazur and Rayssiguier. 1988]。そのため、超遠心分離法では HDL の密度領域、特に very light HDL 分画と LDL 分画は分離しにくい。したがって、超遠心分離法はウシのリポタンパク質分画の正確な評価を行うことはできないと考えられる[Cordle et al. 1985; Miyamoto et al. 2006]。この点からウシのリポタンパク質分析には超遠心分離法より AEX-HPLC 法を用いるべきと考えられた。

AEX-HPLC 法と GP-HPLC 法の間でも同様に Total-C、HDL-C および LDL-C に正の相関が認められた。GP-HPLC 法は粒子サイズによりリポタンパク質を分離する。このため、超遠心分離法と同様、HDL 分画と LDL 分画を明瞭に分離するのは難しいと考えられる。一方で AEX-HPLC 法はイオン交換樹脂を用いて電荷に基づいてリポタンパク質を分離する。各リポタンパク質は電荷の異なるいくつかのアポタンパク質で構成されているため、AEX-HPLC 法はリポタンパク質を分離するのに正確な測定法であると考えられている [Hirowatari et al. 2010]。実際、本試験において GP-HPLC 法で測定された VLDL-C は、AEX-HPLC 法によって測定された値と比較して相対的に低値を示した。リポタンパク質 A は LDL 粒子のアポタンパク質 B-100 および特有のアポタンパク質 A からなる。GP-HPLC 法では VLDL はリポタンパク質 A と重複することが報告されている。そのため、GP-HPLC 法では VLDL-C が LDL-C として測定され、VLDL-C が低値を示したと考えられた。AEX-HPLC 法では VLDL 特有のアポタンパク質を検知することができる [Hirowatari et al. 2010]。このことから、AEX-HPLC 法は GP-HPLC 法と比較してウシのリポタンパク質分画を測定するのに適していると考えられる。

以上より、AEX-HPLC 法は、超遠心分離法のように HDL および LDL の比重の重複に影響されず、また GP-HPLC 法のように HDL、LDL、VLDL の粒子サイズの重複およびリポタンパク質 A の重複に影響を受けず、正確に乳牛のリポタンパク質分画を測定できる優れた測定法であると考えられた。

小括

第2章では AEX-HPLC 法による健常な成乳牛のリポタンパク質分画測定の精度を確認するために、1) クロマトグラムの波形の確認、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、2) 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。

1) AEX-HPLC 法の HDL-C および LDL-C のクロマトグラムは明瞭に溶出分画が現れた。IDL-C および VLDL-C に関しては少量でわずかに示される程度であった。同時再現性は CV_s が各分画ともに 10%以下で良好な分析精度を示した。日差再現性は、Total-C、HDL-C および LDL-C の CV_s 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 は低値であり、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 で良好な直線が示された。

2) 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。AEX-HPLC 法は超遠心分離法より HDL および LDL 分画が明瞭に分離でき、超遠心分離法によるウシリポタンパク質分画の問題点を取り除いた良好な方法であると考えられた。GP-HPLC 法はリポタンパク質を粒子サイズにより分離する。ウシの HDL および LDL は粒子サイズが類似していることが報告されているため、同様に HDL と LDL の分離が困難であることが考えられる。また、GP-HPLC 法で測定された VLDL-C は、AEX-HPLC 法によって測定された値と比較して相対的に低値を示した。リポタンパク質 A は LDL 粒子のアポ B100 および特有のアポ A からな

るが、GP-HPLC 法では VLDL はアポ A と重複することが報告されており、そのため GP-HPLC 法では VLDL-C が LDL-C として測定され、VLDL-C が低値を示したと考えられた。以上より、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 に関しては高い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。

以上のように、AEX-HPLC 法は①超遠心分離法で認められる HDL および LDL の比重の重複に影響されず、また②GP-HPLC 法に認められる粒子サイズの重複による影響およびリポタンパク質 A の影響が受けにくいと考えられた。AEX-HPLC 法は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と考えられた。

図表

表 2-1 供試されたホルスタイン種成乳牛。

No.	年齢	産歴	最終分娩月日	分娩後日数
1	3.84	2	H26.1.15	245
2	2.07	1	H26.8.1	47
3	2.65	1	H26.5.16	124
4	2.50	1	H26.4.15	155
5	3.00	2	H26.7.27	52
6	6.01	3	H26.3.20	181

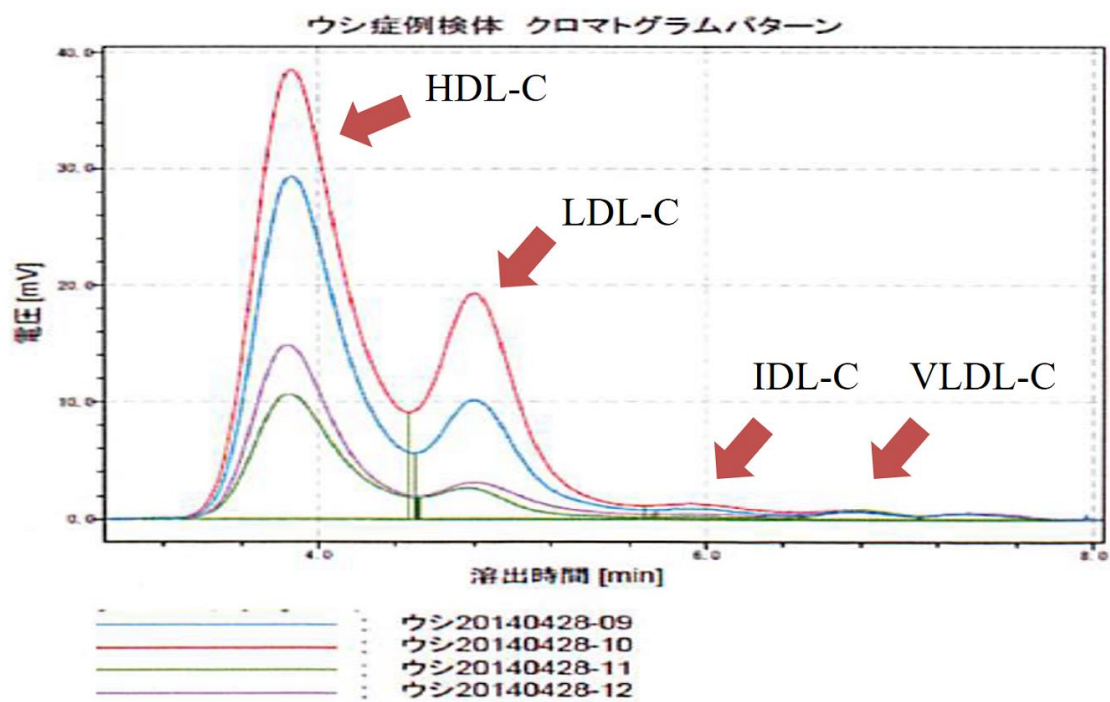


図 2-1 AEX-HPLC 法による供試牛 4 頭のクロマトグラム。

左の溶出分画から順に HDL-C、LDL-C、IDL-C および VLDL-C を示す。

表 2-2 AEX-HPLC 法の同時再現性 (Intra-assay) および日差再現性

(Inter-assay) の結果。

	Intra-assay (n = 10)					Inter-assay (n = 10)			
	Total-C	HDL-C	LDL-C	IDL-C	VLDL-C	Total-C	HDL-C	LDL-C	
Mean	224.5	175.5	44.6	3.0	1.3	Mean	193.6	155.1	38.5
SD	3.0	2.6	1.3	0.2	0.1	SD	2.6	3.0	2.5
CV	1.3	1.5	2.9	5.4	8.5	CV	1.3	1.9	6.6

平均値 (Mean) および標準偏差 (SD) ; mg/dl、変動係数 (CV) ;

%

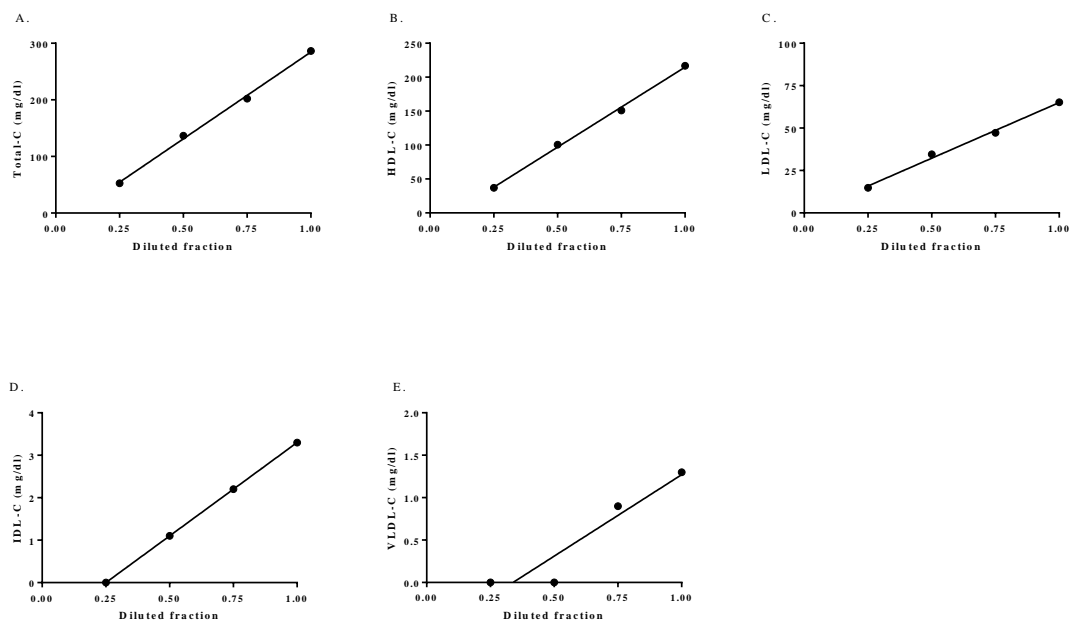


図 2-2 AEX-HPLC 法の希釈直線性の結果。

A. Total-C ($y = 306.7x - 22.25$, $r = 0.9988$, $p < 0.01$)

B. HDL-C ($y = 235.8x - 21.05$, $r = 0.9988$, $p < 0.01$)

C. LDL-C ($y = 65.56x - 0.55$, $r = 0.9969$, $p < 0.01$)

D. IDL-C

E. VLDL-C

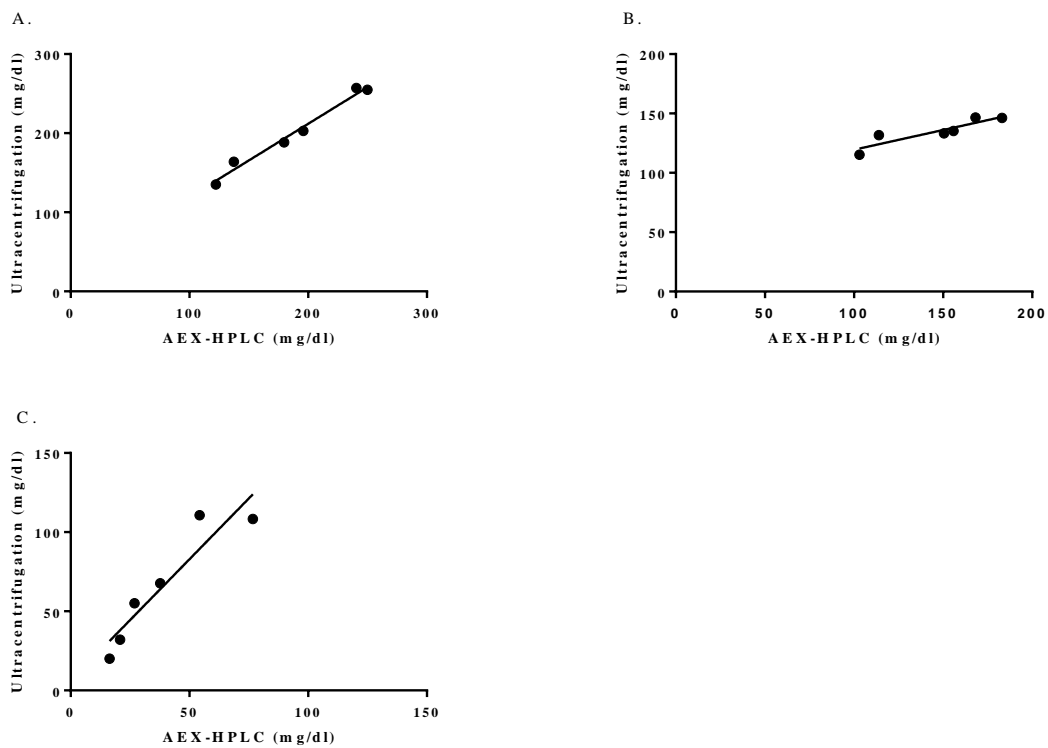


図 2-3 AEX-HPLC 法と超遠心分離法とのリポタンパク質分画測定値の相関図。

A. Total-C ($y = 0.9264x + 26.54$, $r = 0.9899$, $p < 0.001$)

B. HDL-C ($y = 0.3329x + 86.16$, $r = 0.9011$, $p < 0.05$)

C. LDL-C ($y = 1.536x + 6.040$, $r = 0.9331$, $p < 0.01$)

(x ; AEX-HPLC 法、y ; 超遠心分離法)

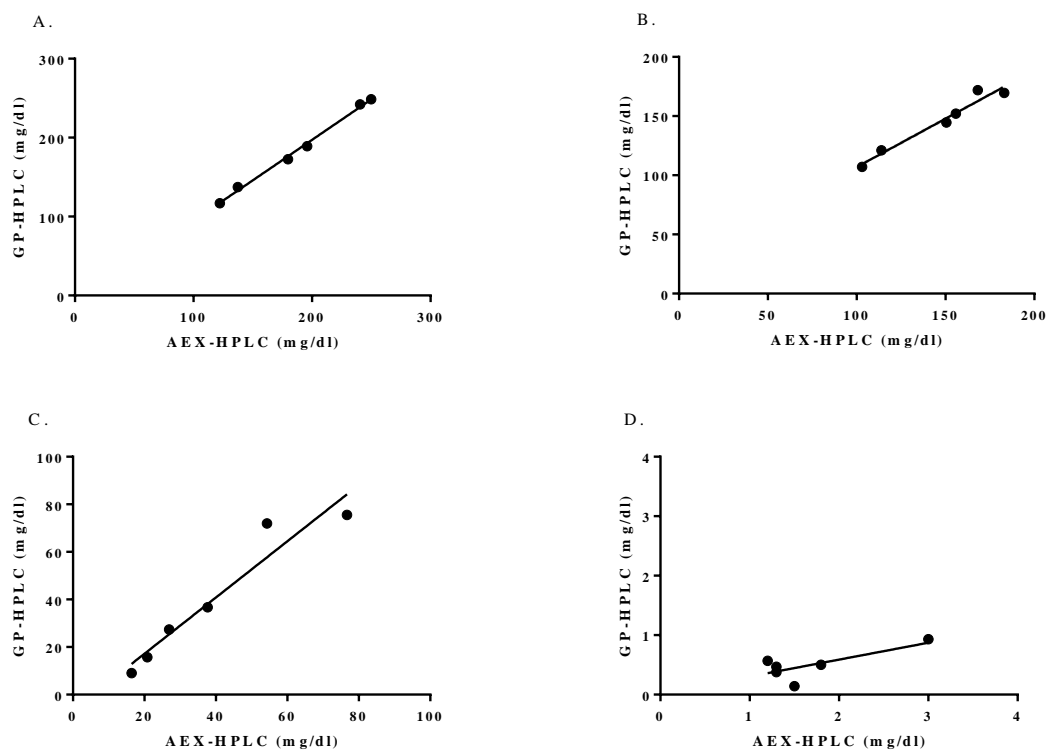


図 2-4 AEX-HPLC 法と GP-HPLC 法とのリポタンパク質分画測定値の相関図。

- A. Total-C ($y = 1.026x - 8.003$, $r = 0.9978$, $p < 0.001$)
 B. HDL-C ($y = 0.8181x + 25.09$, $r = 0.9792$, $p < 0.001$)
 C. LDL-C ($y = 1.182x - 6.477$, $r = 0.9611$, $p < 0.01$)
 D. VLDL-C ($y = 0.2841x + 0.0201$, $r = 0.7462$, $p > 0.05$)

(x ; AEX-HPLC 法、y ; GP-HPLC 法)

第3章

飼養形態の異なる2つの酪農家における
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

緒言

乳牛において分娩前後における負のエネルギーバランスに伴う糖・脂質代謝障害は疾病に大きな影響を与えているということが分かっている。例えば、負のエネルギーバランスは免疫機能の低下、それに伴う乳房炎の発症といった感染性疾患罹患リスクを上昇させる[Liu et al. 2010]。また、能力の高い高泌乳牛は多量の乳量確保のために体内で脂質代謝が盛んに行われることで、体内の酸化脂質や過酸化脂質といった活性酸素濃度が上昇し、これにより卵胞機能に悪影響を及ぼす[Devine et al. 2012; Löhrke et al. 2005; Löhrke et al. 2008]。さらに、泌乳牛におけるエストロゲンおよびプロゲステロン代謝は乾乳牛と比較して2~3倍高いと報告されている[Wathes et al. 2008]。そのため、高泌乳牛はエストロゲンやプロゲステロン濃度が安定せず繁殖機能に影響がでる。酸化脂質の1つに酸化LDLが存在し、牛の顆粒膜細胞に結合し、血中エストロゲン濃度を低下させ、繁殖状況に影響を及ぼすことも報告されている[Löhrke et al. 2008; Weitzel JM. 2014]。特に分娩後は泌乳を開始するため、乳量に見合ったエネルギーを確保するために脂質代謝が盛んに行われる。このような代謝状態の中、生体の恒常性を維持するため、細胞膜やアルドステロン、コルチゾール、エストロゲンおよびプロゲステロンといったステロイドホルモンの原料となるコレステロールを末梢組織へ運搬しなくてはならない。分娩後において生体の恒常性に異常をきたすと、コレステロール代謝にも異常を引き起こすことが予想され、この結果が泌乳や繁殖成績に支障をきたし、酪農業の経営負担が大きくなることが考えられる。このことから、泌乳ステージ全体で脂質代謝における中心的な役割を果たすリポタンパク質の変動を観察する必要がある。

本試験では、宮城県管内で泌乳量および繁殖成績が優れた酪農家および、疾病が多く泌乳量および繁殖成績が不良な酪農家のリポタンパク質分画の泌乳ステージごとの推移を比較することで、各分画の変動および働きについて比較検討することにした。

材料および方法

1. 供試動物

本試験では宮城県内の S 酪農家で飼養されているホルスタイン種成乳牛 24 頭および I 酪農家で飼養されているホルスタイン種成乳牛 25 頭の計 49 頭を供試した。泌乳初期、泌乳最盛期、泌乳中期、泌乳後期および乾乳期の泌乳ステージごとに分類し、リポタンパク質分画を評価するために使用した。泌乳ステージは、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)として区別し、比較検討した。各酪農家の泌乳ステージごとの頭数、年齢、産歴および分娩後日数を表 3-1 に示した。いずれの牛も飼養管理上問題のない乳牛のみを供試した。また S 酪農家および I 酪農家の採材日に最も近い日に実施されたバルク乳生乳検査結果、繁殖成績および年間死廃事故件数(宮城県農業共済組合)の詳細を表 3-2 に示した。バルク乳生乳検査とは宮城県酪農組合により上半期および下半期の月 2 回各酪農家のバルク内に集乳された生乳を検査し、検査日のバルク乳量、乳脂肪率、乳タンパク率、乳中尿素態窒素(MUN)および乳中の体細胞数を測定するものである。また繁殖成績は宮城県農業共済組合の獣医師により月 1~2 回程度の割合で実施される繁殖検診の結果から、年間死廃事故件数は宮城県農業共済組合で記録しているデータから参照した。S 酪農家の 1 頭あたりの平均日乳量(バルク乳量を搾乳牛頭数で割ったもの)は 34.2 kg と I 酪農家の 25.3kg と比較して高く、繁殖成績に関しても S 酪農家の受胎率が 62.3%であるのに対し I 酪農家で 55.8%、また S 酪農家の平均空胎日数は

117日であるのに対し、I酪農家で204日と、S酪農家は乳成績および繁殖成績ともにI酪農家と比較して優れていた。さらに年間死廃事故件数もS酪農家で1件であるのに対し、I酪農家で14件と、S酪農家の方が事故発生数についても優れていた。S酪農家において、供試牛は全てタイストール牛舎に繋留され、飼料は全泌乳ステージでイネ科、サイレージ、マメ科、ビートパルプ、および配合飼料可消化養分総量(TDN); 73.0%、粗タンパク率(CP); 13.0%)を含んだ混合飼料(TMR)飼料を給餌され、水は自由飲水が可能であった。飼料給餌時間はAM8:00およびPM6:00であった。一方でI酪農家において、供試牛は全てタイストール牛舎で繋留され、飼料は全泌乳ステージでイネ科、サイレージ、マメ科、および配合飼料(TDN 70.0%、CP 12.7%)を含んだ飼料を分離給餌され、水は自由飲水が可能であった。飼料給餌時間は粗飼料に関してはAM6:00とPM5:00の1日2回給餌、配合飼料に関しては、AM5:00、AM9:00、AM12:00、PM5:00、およびPM9:00の自動給餌機による1日5回給餌であった。本試験は、目的、本質、潜在的なリスクおよび有益性を説明した後、全ての酪農家から了解を得て実施した。

2. 検体処理

採血は全て午前中に実施した。供試牛の尾静脈から採血針(ベノジェクトII採血針STERUMO 東京 日本)を使用して真空採血管(ベノジェクトII真空採血管(滅菌品)、TERUMO、東京、日本)内に10ml採血を実施した。冷蔵後、できる限り早く遠心機(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4°C10分間3,500g条件下で血清を分離し、各血清検体をポリプロピレンチューブ(角小D 中央化学株式会社 埼玉 日本)にて2つに分

注した。1つは即日株式会社富士フイルムモノリスに血清を冷蔵発送し、AEX-HPLC 法によるリポタンパク質分画の測定を依頼した。もう1つの検体は宮城県農業共済組合家畜診療研修所にて冷蔵した状態で運搬し、血液生化学検査を実施した。

3. 測定項目および測定方法

リポタンパク質分画 (Total-C、HDL-C、LDL-C、IDL-C および VLDL-C) の測定は、AEX-HPLC 法による測定を株式会社富士フイルムモノリスに依頼した。LDL-C/Total-C、HDL-C/Total-C および HDL/LDL 比については結果より算出した。各リポタンパク質分画量は、総コレステロール量に分画割合を乗じて算出した。血液生化学検査は、宮城県農業共済組合家畜診療研修所にて 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、測定を行った。血液生化学検査項目は、総タンパク質 (TP)、アルブミン (Alb)、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ (GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ (γ -GPT)、血中尿素窒素 (BUN)、カルシウム (Ca)、リン (iP)、グルコース (Glu) および NEFA を測定した。また採材日当日のボディコンディションスコア(BCS)を測定した。バルク乳生乳検査法においては、平成 22 年に生乳検査精度管理委員会 生乳検査マニュアル作成検討会議により決められた生乳検査マニュアルに基づいている。すなわち、乳脂率においては集乳された生乳に濃硫酸を加えて脂肪以外の成分を溶解し、エマルジョンを破壊した後、硫酸液中に浮遊する脂肪小滴を遠心分離し脂肪量を求めて算出した。乳タンパク率および MUN においては赤外分光多成分測定装置による測定を行った。無脂固形分率においては生乳を常圧下において一定時

間乾燥し、その乾燥物質量を全乳固形分とする。その後、全乳固形分から算出した乳脂肪分を差し引き、無脂乳固形分とした。

4. 統計

測定値は平均値±標準偏差で表記された。2酪農家間で泌乳ステージごとの各測定項目の統計的有意差は二元配置分散分析(two-way ANOVA)により決定した。2酪農家間で有意差が認められた場合、Sidak's multiple comparisons testにより泌乳ステージごとに有意な違いがあるか確認した。 $p < 0.05$ の差を統計的に有意であるとした。全ての試験に関して GraphPad Prism 6 analysis software を用いて算出した。

結果

2 酪農家における供試牛の泌乳ステージごとのリポタンパク質分画を図 3-1～3 に示した。Total-C、HDL-C、LDL-C、IDL-C および VLDL-C 量は 2 酪農家間で有意差は認められなかった。Total-C は、2 酪農家とも泌乳初期は低値（S 酪農家 $135.9 \pm 60.7\text{mg/dL}$ 、I 酪農家 $106.0 \pm 11.5\text{mg/dL}$ ）であり、泌乳最盛期から泌乳中期にかけて上昇し、泌乳中期に S 酪農家で $275.5 \pm 72.5\text{mg/dL}$ 、I 酪農家で $229.2 \pm 67.2\text{mg/dL}$ と、それぞれ最高値を示した。以降は泌乳後期から乾乳期にかけて低下し、乾乳期で I 酪農家では $92.8 \pm 16.7\text{mg/dL}$ の最低値を示したが、S 酪農家では泌乳初期（ $155.7 \pm 56.1\text{mg/dL}$ ）まで低下することはない（図 3-1）。

HDL-C は、泌乳初期は低値（S 酪農家 $110.5 \pm 36.9\text{mg/dL}$ 、I 酪農家 $80.0 \pm 9.2\text{mg/dL}$ ）であり、泌乳最盛期から泌乳中期にかけて上昇し、泌乳中期に S 酪農家で $179.8 \pm 39.4\text{mg/dL}$ 、I 酪農家で $160.6 \pm 38.7\text{mg/dL}$ と、それぞれ最高値を示した。以降は泌乳後期から乾乳期にかけて低下し、乾乳期で I 酪農家では $63.8 \pm 10.6\text{mg/dL}$ および S 酪農家では $108.9 \pm 34.7\text{mg/dL}$ と、それぞれ最低値を示した（図 3-2）。

LDL-C は、泌乳初期は低値（S 酪農家 $23.5 \pm 21.7\text{mg/dL}$ 、I 酪農家 $14.8 \pm 2.7\text{mg/dL}$ ）であり、泌乳最盛期から泌乳中期にかけて上昇し、泌乳中期に S 酪農家で $89.0 \pm 33.7\text{mg/dL}$ 、I 酪農家で $41.6 \pm 23.3\text{mg/dL}$ とそれぞれ最高値を示した。以降は泌乳後期から乾乳期にかけて低下したが、乾乳期において S 酪農家および I 酪農家ともに泌乳初期ほど低値を示すことはなかった（S 酪農家 $40.4 \pm 19.4\text{mg/dL}$ 、I 酪農家 $16.2 \pm 4.0\text{mg/dL}$ ）（図 3-2）。

IDL-C はほとんどの検体で 5.0mg/dL 以下で推移し、また VLDL-C についても IDL-C 同様にほとんどの検体で 3.0mg/dL 以下で推移し、HDL-C および LDL-C と比較して著しく低値で推移した (図 3-3)。

2 酪農家における供試牛の泌乳ステージごとの HDL-C の Total-C に占める割合 (HDL-C/Total-C(%))、LDL-C の Total-C に占める割合 (LDL-C/Total-C(%)) および HDL/LDL 比を図 3-4,5 に示した。

HDL-C/Total-C(%)は、2 酪農家間で有意な違いが認められたが、泌乳ステージごとの有意差は認められなかった (図 3-4)。S 酪農家では、泌乳初期 83.8 ± 8.4%、泌乳最盛期 70.9 ± 3.7%、泌乳中期 65.9 ± 4.0%、泌乳後期 70.8 ± 6.2%、乾乳期 70.5 ± 3.0%と泌乳中期が最も低かった。I 酪農家では、泌乳初期 75.4 ± 3.1%、泌乳最盛期 77.7 ± 7.0%、泌乳中期 71.0 ± 4.9%、泌乳後期 72.7 ± 3.7%、乾乳期 68.9 ± 2.6%と乾乳期が最も低かったが、S 酪農家と比較して HDL-C/Total-C(%)の変動は緩やかであった。

LDL-C/Total-C(%)は 2 酪農家間で有意な違いが認められ、S 酪農家において泌乳最盛期、泌乳中期および泌乳後期で I 酪農家と比較して有意に高値を示した (図 3-5)。S 酪農家では、泌乳初期 15.1 ± 7.5%、泌乳最盛期 26.5 ± 3.6%、泌乳中期 31.6 ± 4.0%、泌乳後期 27.1 ± 6.0%および乾乳期 25.2 ± 3.0%と泌乳中期が最も高かった。I 酪農家では、泌乳初期 14.0 ± 2.3%、泌乳最盛期 13.4 ± 3.9%、泌乳中期 17.3 ± 5.1%、泌乳後期 18.0 ± 3.3%、乾乳期 17.3 ± 1.8%と、S 酪農家と比較して泌乳中期～後期にかけての比率上昇は緩やかであった (図 3-4)。

HDL/LDL 比においても 2 酪農家間で有意な違いが認められ、S 酪農家にお

いて、泌乳最盛期および泌乳中期で I 酪農家と比較して有意に低値を示した (図 3-6)。S 酪農家では泌乳初期で 6.6 ± 3.1 と最高値を示し、泌乳最盛期から乾乳期にかけて 2.0~3.0 で推移した。一方、I 酪農家では泌乳初期 (5.5 ± 1.0) から泌乳最盛期 (6.2 ± 2.3) にかけて上昇した。その後、泌乳中期から乾乳期にかけて 4.0~5.0 で推移した (図 3-5)。

2 酪農家の血液生化学検査結果を表 3-3 に示した。GOT に関して、2 酪農家間で有意な違いが認められ、S 酪農家において泌乳初期および乾乳期で I 酪農家と比較して有意に高値を示した。また γ -GPT に関しても 2 酪農家間で有意な違いが認められ、I 酪農家において泌乳最盛期で S 酪農家と比較して有意に高値を示した。一般的な脂質代謝マーカーである Total-C および NEFA を含むその他の血液生化学検査項目に関しては有意な違いは認められなかった。

2 酪農家の泌乳期ごとの BCS を図 3-6 に示した。2 酪農家間で有意な違いは認められなかった。

考察

本章ではバルク乳成績、繁殖成績および年間死廃事故件数が大きく異なる 2 酪農家で飼養された牛群の脂質代謝の違いを調査するために、それぞれの牛群を泌乳ステージごとに群分けし、AEX-HPLC 法を用いたりポタンパク質分画測定値、血液生化学検査項目および BCS の比較を行った。

Total-C、HDL-C および LDL-C の泌乳ステージごとの推移については 2 酪農家間に大きな違いは認められなかった。すなわち、泌乳初期で低値を示し、泌乳中期で高値を示すという点である。この結果は超遠心分離法による以前に報告された研究結果と類似していた[Kessler et al. 2014; Miyamoto et al. 2006; Turk et al. 2015]。また、泌乳初期と泌乳中期でコレステロール量が大きく異なるのは、泌乳初期と泌乳中期で直面するエネルギー欠乏の程度の違いにより肝臓で行われる代謝に変化が生じた結果であると考えられた[Gross et al. 2015]。HDL-C は Total-C の 65~83%の割合を占め、また、LDL-C は牛群により異なったが、13~31%の割合を占め、泌乳生産量および泌乳ステージにより変動した。このことは、搾乳牛における TG、コレステロール代謝に深く関連していると考えられる。肝臓で合成された TG を多く含む VLDL は、末梢組織で LPL 活性により乳腺を中心とした末梢組織で TG が取り除かれ IDL に代謝される。この IDL は肝臓に戻った後、HTGL 活性により分解され LDL となる。[Bauchart.1993]。S 酪農家では LDL-C が泌乳最盛期から泌乳後期の高値を示しており、これは乳腺で VLDL から TG の取り込みが盛んに行われていた結果、LDL-C の上昇が認められたと考えた。特に S 酪農家における LDL-C/Total-C(%)が泌乳最盛期、泌乳中期および泌乳後期で I 酪農家と比較して有意に高値

を示したことから、S 酪農家の牛群の方が泌乳期中に VLDL を介して盛んに TG を乳腺へ運ぶことで、VLDL→IDL→LDL という代謝経路が活発に行われていることが推察された。この結果に伴い S 酪農家では HDL 量は高いにも関わらず HDL-C/Total-C(%)が低下し、I 酪農家との間で有意な違いが認められたものと考えられた。実際に S 酪農家の方がバルク乳生乳検査において、1 頭あたりの平均日乳量および乳脂率が高値を示している。一方で HDL-C は泌乳生産の多い時期に高値を示したことから、乳腺細胞内に TG を取り込んだ結果生じた代謝産物の 1 つとして考えた。牛においては CETP により LDL-C から HDL-C へコレステロールを多く転送している可能性もある。また、S 酪農家において HDL-C の泌乳期ごとの変動が LDL-C の変動より緩徐であることから、HDL-C の代謝速度は LDL-C より緩徐であるということも考えられた。

IDL-C および VLDL-C は 2 酪農家ともに全泌乳ステージで低値を示した。これは第 1 章で述べた通り、乳牛の VLDL-C が本来低値であり [Van den Top et al. 2005]、また VLDL の TG が盛んに利用されるために半減期は著しく短い [Glascokk and Welch. 1974] ことも VLDL が全ステージで低濃度である理由として考えられる。しかしながら全体として低値ではあるものの、IDL-C と VLDL-C の推移は類似しており、低値ではあるが VLDL→IDL→LDL という代謝経路が泌乳ステージにより変化することを示唆している。VLDL-C においては泌乳最盛期において、乳腺組織による TG の取り込みにより著しく低値を示すことが報告されている [Bauchart. 1993]。本試験結果では S 酪農家および I 酪農家で VLDL-C が乾乳期に上昇する傾向が見られたが、これは VLDL が乳腺に取り込まれなくなって生じた余剰かもしれない。一方、ウシの IDL に関しては本研究

ではじめて AEX-HPLC 法を用いて測定した。そのため、ウシの IDL の臨床的意義に関しては今後の研究でさらに議論する必要がある。

HDL/LDL 比において 2 酪農家間に有意な違いが認められ、S 酪農家において泌乳最盛期および泌乳中期で I 酪農家と比較して有意に低値を示した。今回の結果から搾乳牛では IDL-C および VLDL-C は微量であり、HDL/LDL 比は Total-C のうちに占める HDL-C および LDL-C の割合に依存する。このため、泌乳初期以降に LDL-C/Total-C(%)が有意に上昇した S 酪農家では HDL/LDL 比は泌乳初期以降低値で推移した。一方 I 酪農家では泌乳初期以降に LDL-C/Total-C(%)の変動がなく、HDL/LDL 比の低下が緩やかであったと考えられた。すなわち、I 酪農家では乳腺での TG 使用が少ないために、VLDL→IDL→LDL という代謝経路が活発に利用されず LDL-C の上昇が小さかったと考えられた。また、I 酪農家において泌乳最盛期および泌乳中期で S 酪農家と比較して有意に HDL/LDL 比で高値を示した理由としては以下のことが考察される。2 酪農家の大きな違いとして給餌方法が挙げられる。I 酪農家では 1 日 5 回の自動給餌機による配合飼料の給餌方法をとっており、十分に粗飼料を摂取する前に配合飼料を摂取する傾向にあった。一方で S 酪農家では 1 日 2 回の TMR 飼料給餌を行っており、粗飼料と配合飼料をバランス良く摂取できるような給餌方法をとっていた。反芻獣において配合飼料に偏る飼料摂取はルーメンアシドーシスを惹起する。ルーメンアシドーシスは配合飼料の多給により、ルーメン液が酸性化し、それに伴いグラム陰性菌であるルーメン微生物の死滅あるいは溶菌が起こり、リポポリサッカライド (LPS) 発生により体内で悪影響を及ぼす[Møller, 1993]。この酸性化したルーメンから発生する LPS により牛は酸化ストレスを受ける

[Minuti et al. 2014]が、酸化ストレスはインスリン抵抗性を惹起すると考えられている[Abuelo et al. 2016]。LPL 活性および HTGL 活性はインスリン等により活性化され、グルカゴン等により抑制される [Geelen et al. 1980]。統計上 2 酪農家間で有意な違いは認められなかったが、LDL-C、IDL-C および VLDL-C において I 酪農家において S 酪農家と比較して全ステージで低値を示した。以上のことから、I 酪農家で飼養されている牛群は給餌方法からルーメンアシドーシスに陥っており、特に飼料給餌が多くなる泌乳最盛期および泌乳中期でその影響は大きく、ルーメン内で発生する LPS から酸化ストレスを受けることでインスリン抵抗性の状態になり、LPL 活性および HTGL 活性が低下していることが示唆された。一方で、泌乳初期において 2 酪農家ともに HDL/LDL が高値を示している。これは分娩後の乳牛において、生理的に負のエネルギーバランスに陥り、体内で代謝が盛んに行われる結果、代謝性の酸化ストレスを受けること [Sordillo and Aitken. 2009]、また分娩後、乳腺へ優先的に栄養素を提供するために生理的に肝外組織でインスリン感受性の低下が発生すること [Hayirli. 2006]、さらに主に肝臓で合成、分泌され、VLDL の構成要素であるアポタンパク質 B-100、アポタンパク質 E、MTP、および LDL レセプターの調節因子であるインスリン様成長因子 (IGF-I) [Li et al. 2016]は、乳牛が負のエネルギーバランスに陥ると低下すると言われている[Fenwick et al. 2008]。これらのことから、2 酪農家ともに生理的に負のエネルギーバランスに陥る泌乳初期で LDL-C 合成が低下し、HDL/LDL 比が高値を示したものと考えられた。

血液生化学検査項目においては GOT および γ -GPT において 2 群間に有意な違いが認められ、GOT に関しては S 酪農家において泌乳初期および乾乳期で I

酪農家と比較して有意に高値を示した。GOT は肝臓の逸脱酵素であり、肝臓における障害を表している可能性もある。しかしながら、前述の通り S 酪農家では乾乳期および泌乳初期において I 酪農家と比較して HDL-C が高値を示していた。移行期における HDL は肝機能および牛のエネルギーバランスの状態を示す良い指標 [Manka et al. 2014; Newman et al. 2016] とされている。これらのことを踏まえると、この結果は S 酪農家において乾乳期および泌乳初期でエネルギーバランスが正に傾き、LDL-C、IDL-C および VLDL-C 放出といった肝臓での代謝が盛んに行われたことにより、肝臓が正常に機能したことで、GOT が高値を示したものと推察された [Kauppinen et al. 1984]。一方で γ -GPT に関しては I 酪農家において泌乳最盛期で S 酪農家と比較して有意に高値を示した。I 酪農家における泌乳最盛期の泌乳牛は 2 頭のため、統計上の信頼性に欠けるが、これは前述で考察した通り、I 酪農家のルーメンアシドーシスの影響かもしれない。ルーメンアシドーシスにより肝臓の逸脱酵素の上昇が報告されている [Møller. 1993]。また泌乳最盛期は飼料摂取量が多給される時期であるため、ルーメンアシドーシスの影響を受けやすい。

BCS は 2 酪農家の間で有意な違いは認められなかったが、I 酪農家において乾乳期で高値を示す傾向にあった。高 BCS で分娩を迎えた牛は食欲が低下するリスクが高く、負のエネルギーバランスにより体脂肪動員が亢進し、肝臓に脂肪が蓄積する [Van den top et al. 1995]。そのため、I 酪農家の牛群は分娩後周産期疾患発症のリスクが高くなり、年間死産事故件数が高くなったと推察された。

本章では泌乳量および繁殖成績が優良な S 酪農家と両成績が不良な I 酪農家で飼養されている牛群の間で泌乳ステージごとのリポタンパク質分画に違いが

あるか検討した。一般的に臨床現場で測定されている脂質代謝を反映するマーカーである Total-C および NEFA では 2 酪農家の間で有意な変動の違いは認められなかったが、LDL-C/Total-C(%)において、2 酪農家間で有意な違いが認められ、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 I 酪農家と比較して有意に高値を示し、LDL-C 量では高値を示す傾向がみられた。S 酪農家と I 酪農家との間に LDL-C の量および割合に違いが見られたのは、S 酪農家の方が泌乳量を補うため、乳腺へ VLDL による TG 運搬を盛んに行ったことで、VLDL の代謝産物である LDL が増加し、VLDL→IDL→LDL という代謝経路が活性化したと考えられた。以上より、LDL-C の量および割合をみることで優良牛群と不良牛群の摘発の判断材料になる可能性が示唆された。

小括

AEX-HPLC 法を用いて宮城県内の泌乳量および繁殖成績が優良な S 酪農家と両成績が不良な I 酪農家で飼養されている牛群の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。Total-C、HDL-C、LDL-C、IDL-C および VLDL-C の変動に関しては 2 酪農家の間で有意差は認められなかった。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。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、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。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。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。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 酪農家と I 酪農家の間に LDL-C/Total-C(%) に大きな違いが見られたのは、S 酪農家の方が泌乳量が多いため、乳腺への VLDL を介した 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。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、乳腺へ VLDL による TG 運搬が少ないことが予想され、その結果、LDL-C が低値を示したものと考えられた。以上より、LDL-C の量および割合を測定することで、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。

図表

表 3-1 供試されたホルスタイン種成乳牛のプロフィール。

S 酪農家	頭数 (n=24)	年齢	産歴	分娩後日数
泌乳初期	3	2.6 ± 1.0	1.7 ± 1.2	21.3 ± 17.9
泌乳最盛期	7	2.9 ± 1.0	1.6 ± 0.8	86.9 ± 11.8
泌乳中期	5	4.6 ± 3.2	2.8 ± 0.9	173.2 ± 12.8
泌乳後期	6	4.4 ± 1.7	2.5 ± 1.4	269.8 ± 19.8
乾乳期	3	3.2 ± 0.6	1.3 ± 0.6	- 38.0 ± 21.0 ^{a)}

I 酪農家	頭数 (n=25)	年齢	産歴	分娩後日数
泌乳初期	5	3.8 ± 2.5	2.2 ± 2.2	15.4 ± 10.1
泌乳最盛期	2	2.6 ± 0.0	1.0 ± 0.0	102.5 ± 6.4
泌乳中期	6	3.6 ± 1.1	2.0 ± 0.9	187.5 ± 27.0
泌乳後期	6	4.4 ± 1.9	2.3 ± 1.5	293.7 ± 85.3
乾乳期	6	5.1 ± 1.0	1.8 ± 0.8	- 28.7 ± 5.5 ^{a)}

(mean±SD)

a) 分娩予定日までの日数

表 3-2 供試牛係留農家成績

	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) ^{a)}	34.2	25.3
乳脂率 (%) ^{a)}	3.96	3.45
乳タンパク率 (%) ^{a)}	3.47	3.16
無脂固形分率 (%) ^{a)}	8.97	8.51
MUN (mg / dl) ^{a)}	10.6	9.70
体細胞数 (/ dl) ^{a)}	138,000	225,000
受胎率 (%) ^{b)}	62.3	55.8
平均空胎日数 (日) ^{b)}	117	204
年間死廃事故件数 (件) ^{c)}	1	14

a) バルク乳生乳検査

b) 繁殖巡回

c) 宮城県農業共済の記録

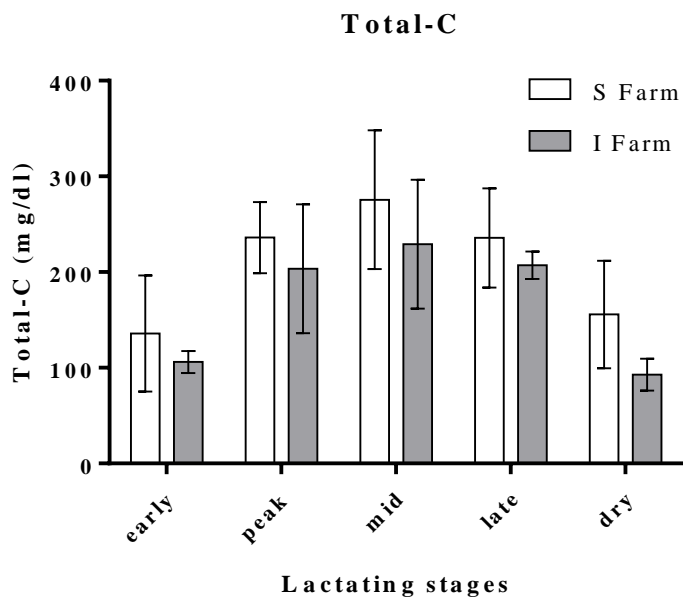


図 3-1 S 酪農家 (S Farm) および I 酪農家 (I Farm) における Total-C 測定値。

表示は平均値±標準偏差で示す。

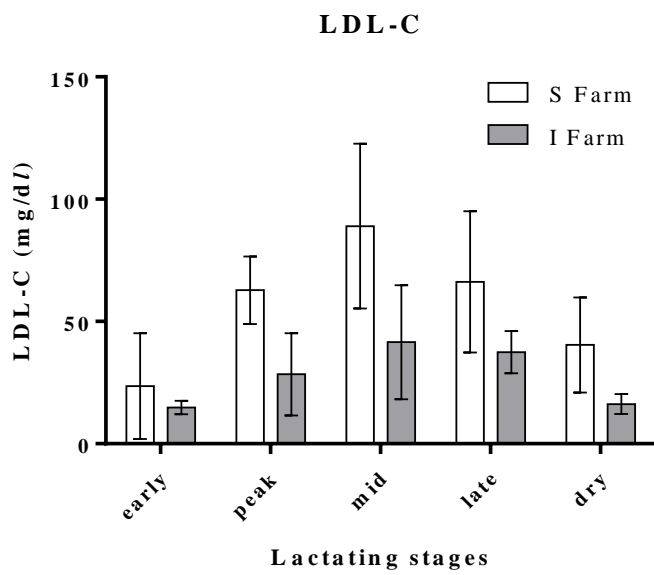
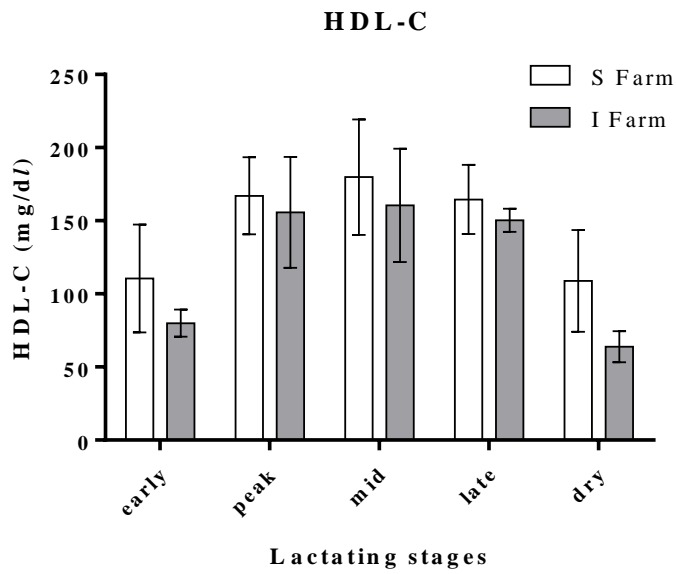


図 3-2 S 酪農家 (S Farm) および I 酪農家 (I Farm) における HDL-C および LDL-C 測定値。表示は平均値±標準偏差で示す。

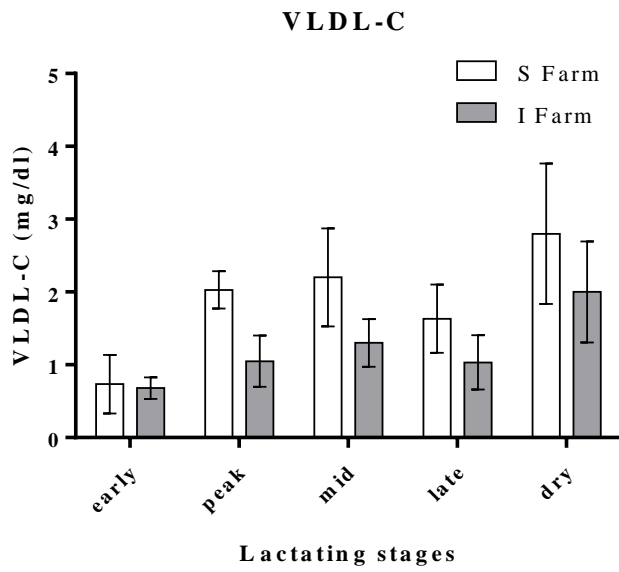
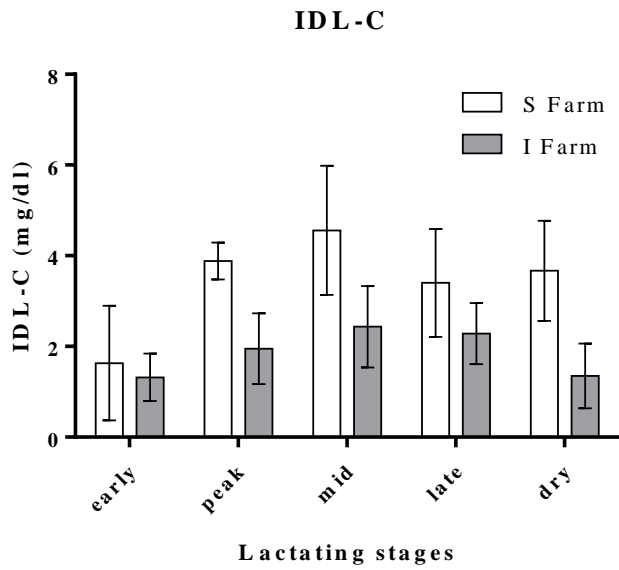


図 3-3 S 酪農家 (S Farm) および I 酪農家 (I Farm) における IDL-C および VLDL-C 測定値。表示は平均値±標準偏差で示す。

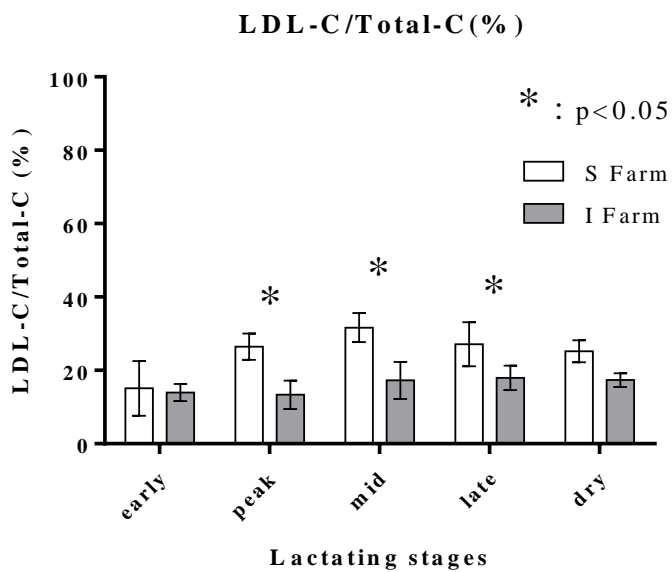
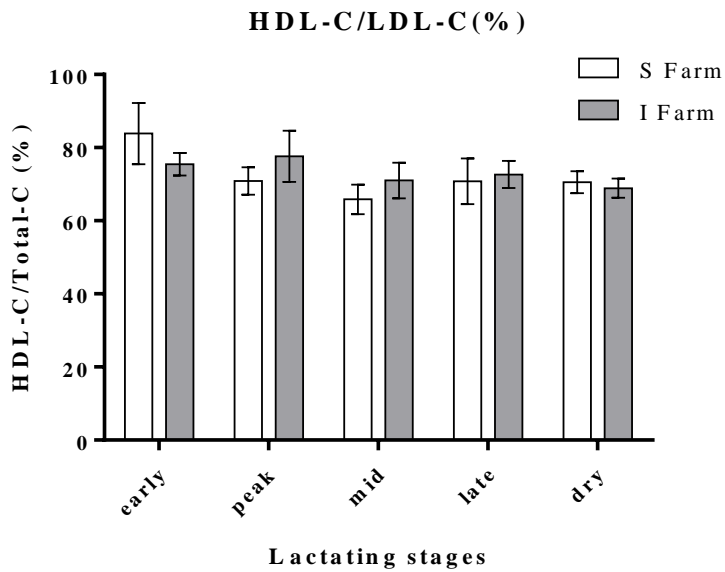


図 3-4 S 酪農家 (S Farm) および I 酪農家 (I Farm) における HDL-C/Total-C(%)

および LDL-C/Total-C(%)測定値。表示は平均値±標準偏差で示す。

* ; S 酪農家にて I 酪農家に対し、有意差(p<0.05)(Sidak's multiple comparisons test)があったもの。

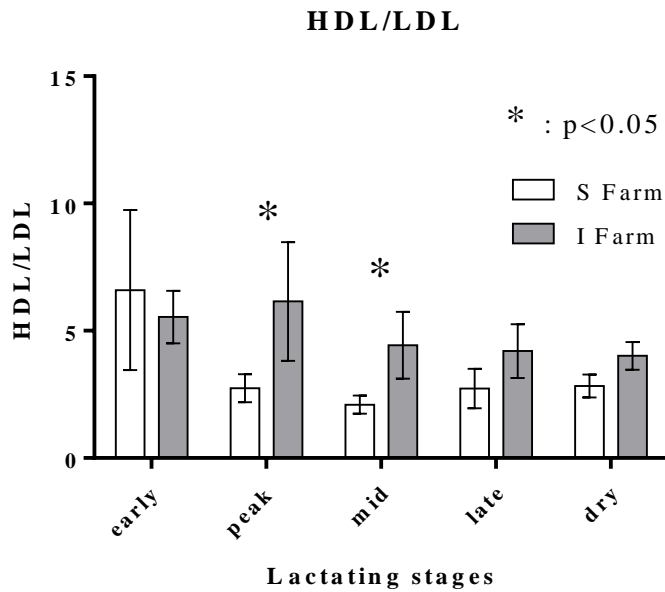


図 3-5 S 酪農家 (S Farm) および I 酪農家 (I Farm) における HDL /LDL 比。

表示は平均値±標準偏差で示す。

* ; S 酪農家にて I 酪農家に対し、有意差($p < 0.05$)(Sidak's multiple comparisons test)があったもの。

表 3-3 S 酪農家および I 酪農家牛群の泌乳初期から乾乳期までの血液生化学
検査項目測定値。

血液生化学 検査項目	酪農家	泌乳初期	泌乳最盛期	泌乳中期	泌乳後期	乾乳期
TP (g/dl)	S	7.3 ± 0.3	8.2 ± 0.7	7.7 ± 0.4	7.7 ± 0.3	7.6 ± 0.3
	I	7.9 ± 0.3	8.2 ± 0.3	8.3 ± 0.8	8.0 ± 0.7	7.8 ± 0.6
Alb (g/dl)	S	3.9 ± 0.3	3.9 ± 0.2	3.8 ± 0.2	4.0 ± 0.2	3.8 ± 0.1
	I	3.9 ± 0.2	3.8 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.8 ± 0.3	3.9 ± 0.1
GOT (IU/l)	S	114.0 ± 10.4 *	88.1 ± 11.1	93.8 ± 5.1	84.3 ± 6.4	105.7 ± 6.6 *
	I	80.0 ± 7.9	108.0 ± 25.0	99.8 ± 14.7	91.0 ± 18.5	69.8 ± 8.6
γ - GPT (IU/l)	S	18.4 ± 4.6	26.6 ± 8.0 *	31.8 ± 2.0	34.5 ± 9.7	32.7 ± 2.4
	I	24.0 ± 4.2	42.0 ± 2.0	38.7 ± 9.4	33.8 ± 7.0	21.2 ± 2.9
BUN (mg/dl)	S	9.0 ± 2.0	12.5 ± 2.9	12.3 ± 2.4	13.6 ± 2.4	9.0 ± 1.7
	I	10.3 ± 2.4	15.7 ± 1.9	15.5 ± 2.0	15.7 ± 4.4	11.0 ± 1.0
Ca (mg/dl)	S	10.3 ± 0.5	9.7 ± 0.4	9.7 ± 0.6	9.6 ± 0.2	9.8 ± 0.3
	I	9.5 ± 0.5	10.0 ± 0.1	9.4 ± 0.4	9.4 ± 0.3	9.4 ± 0.2
iP (mg/dl)	S	5.7 ± 0.6	6.0 ± 0.6	6.4 ± 0.4	6.1 ± 0.6	7.2 ± 0.3
	I	6.0 ± 1.1	5.9 ± 0.3	6.3 ± 0.4	6.2 ± 0.6	6.0 ± 0.6
Glu (mg/dl)	S	56.0 ± 8.5	61.7 ± 6.1	60.4 ± 2.6	61.5 ± 2.7	68.0 ± 1.6
	I	40.2 ± 15.4	31.0 ± 2.0	37.5 ± 3.1	36.5 ± 6.1	40.0 ± 4.2
NEFA (μEQ/l)	S	426.7 ± 320.1	92.4 ± 11.1	106.0 ± 21.6	95.5 ± 14.8	146.3 ± 18.6
	I	499.6 ± 150.4	151.0 ± 13.0	130.5 ± 2.2	106.3 ± 22.3	245.0 ± 59.6

(mean ± SD)

* ; S 酪農家にて I 酪農家に対し有意差(p<0.05)(Sidak's multiple comparisons test)があったもの。

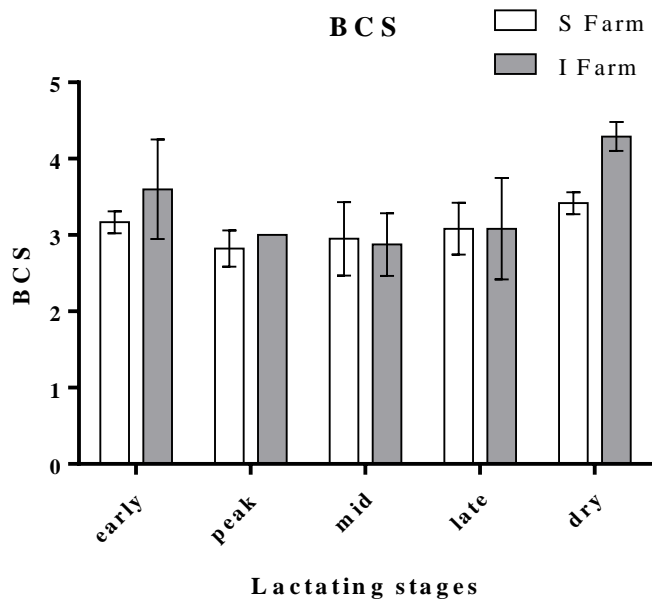


図 3-6 S 酪農家(S Farm)および I 酪農家(I Farm)の泌乳ステージごとの BCS。
表示値は平均値±標準偏差で示す。

第4章

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

第1節 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の調査

緒言

乳牛は分娩後、生理的にエネルギー不足に陥るが、分娩前に蓄えた体脂肪を NEFA として動員することでこの不足を補っている [Drackley, 1999; Gross et al. 2011]。肝臓に動員された NEFA は β 酸化によってエネルギー産生に利用されるほか、TG の再合成の原料となる。肝臓で合成された TG は VLDL を主としたリポタンパク質によって末梢組織へ運搬され、末梢組織でエネルギー等に活用される。分娩直後の乳牛は肝臓からの VLDL 排出能が低いことから TG の蓄積が発生しやすく、この蓄積した TG が脂肪変性を起こすことで肝臓からの VLDL 排出がさらに低下し、その結果、血清中の LDL および HDL といったリポタンパク質濃度が低下すると言われている [Mazur et al. 1992]。分娩直後は生理的に肝臓を主とした糖・脂質代謝が著しく盛んに行われるため、乾乳期の飼養管理が分娩後の健康管理に極めて重要なポイントであると報告されている [Van den Top et al. 2005]。

このように分娩前後のリポタンパク質分画を含めた糖・脂質代謝の研究調査は数々行われているが、HDL と LDL を明確に分離できるようになった測定法である AEX-HPLC 法を用いてリポタンパク質分画を調査した報告はない。第3章では泌乳ステージ全体でのリポタンパク質分画の変動を調査し、泌乳期の乳成績および繁殖成績の良好な牛群の発見、不良な牛群の摘発が可能になると考えられた。本章第1節では、分娩前後のリポタンパク質分画を用いることで詳細な脂質の流れを解明できるか検討した。宮城県内で乳量および繁殖成績が優

良な2酪農家で飼養されている健常乳牛10頭を用いて分娩前後のリポタンパク質分画を測定し、その生理的変動について調査した。

材料および方法

1. 供試動物

宮城県内の第3章で優良農家であったS酪農家で飼養されたホルスタイン種成乳牛5頭およびK酪農家で飼養された成乳牛5頭の計10頭を用いた。いずれの牛も分娩予定日が平成28年2月から7月までで産歴3産以上であり、一般身体検査、血液生化学検査にて健常と判断したものを供試した。供試牛のプロフィールを表4-1に示した。K酪農家では飼養頭数26頭で飼料給餌内容は、イネ科、マメ科、ビートパルプおよび配合飼料（TDN；70.0%、CP；15.5%）が給餌され、タイストール牛舎で水は自由飲水が可能であった。飼料給餌はAM7:00およびPM6:00の1日2回行われた。本酪農家では、分娩予定日の4日前にビタミンD3注射（デュファラル®D3-1000、zoetis、東京、日本）を実施するとともに、分娩予定3週間前から分娩1週間後にかけてカルシウム剤20g/日（ホシケトーゼ® 星家畜薬株式会社、東京、日本）を飼料に添加していた。また、分娩後に強肝剤（ウルソ®5%、DSファーマアニマルヘルス株式会社、大阪、日本）50gを3日間投薬していた。一方でS酪農家では飼養頭数49頭で、飼料給餌内容および給餌時間は第3章と同様で、全頭タイストール牛舎に繋留され、飼料は全泌乳ステージでイネ科、サイレージ、マメ科、ビートパルプ、および配合飼料（TDN；73.0%、CP；13.0%）を含んだTMR飼料を給餌され、水は自由飲水が可能であった。飼料給餌時間はAM8:00およびPM6:00であった。分娩予定1ヶ月前から分娩2ヶ月後において、カシューナッツ殻液配合製品50g/日（ルミナップ®P、共立製薬株式会社、東京、日本）、ルーメンバイパス性メチオニン製剤10g/日（メプロン® Evonik INDUSTRIE、東京、日本）および

ルーメンバイパス性コリン製剤 50 g/日（リーシュア、株式会社エヌワイエス、岩手、日本）を飼料に添加しており、分娩時にはカルシウム剤（ホルサワーリキッド N・G、白石カルシウム株式会社、大阪、日本）の投与を行っていた。さらに分娩日から 4 日間、グリセリン（飼料用グリセリン 85、誠興物産株式会社、東京、日本）、強肝剤（ウルソ®-5%、DS ファーマアニマルヘルス株式会社、大阪、日本）および消化器官用薬（ボバクチン、ミヤリサン株式会社、東京、日本）を投与していた。

2. 試験プロトコール

本試験は平成 28 年 1 月から 8 月にかけて実施された。供試牛の分娩後 1 ヶ月および分娩後 2 ヶ月の乳性状を把握するため、2 酪農家の検定成績表（一般社団法人家畜改良事業団、東京、日本）をもとに乳量および乳成分を追った。また、分娩予定 4 週間前(before 4week)、分娩予定 2 週間前(before 2week)、分娩日(calving)、分娩 1 週間後(after 1week)、分娩 2 週間後(after 2week)、分娩 4 週間後(after 4week)および分娩 8 週間後(after 8week)の計 7 ポイントの測定ポイントを設け、2 酪農家の供試牛 10 頭からそれぞれ午前中に BCS 測定および採血を実施し、得られた血清から血液生化学検査項目およびリポタンパク質分画を測定した。なお、K 酪農家の分娩日の採血は全頭分娩直後に実施している。また本試験の目的、本質、潜在的なリスクおよび有益性を説明した後、全ての酪農家から了解を得て実施した。

3. 検体処理

第 3 章と同様に検体処理を行った。得られた血清は、即日株式会社富士フイ

ルムモノリスに血清を冷蔵発送した。

4. 測定項目および測定方法

月に1度実施される乳検定成績表から分娩日から分娩1ヶ月後まで(0 - 1 month)、および分娩1ヶ月後から分娩2ヶ月後まで(1 - 2 month)の2点において、乳量、乳脂率、乳タンパク率および乳中尿素態窒素 (MUN) の推移の評価に用いた。測定方法は第3章と同様に生乳検査マニュアルに基づいて行われた。なお、分娩日から分娩1ヶ月までの乳検定において、K酪農家およびS酪農家それぞれ1頭が分娩後5日以内の初乳時期に実施されたため、生乳検査が行われず、この時期の結果から除いた。

BCSを測定ポイントごとに測定し、その推移を観察した。

血液生化学検査測定およびAEX-HPLC法によるリポタンパク質分画測定は全て株式会社富士フイルムモノリスに依頼した。血液生化学検査は、血液生化学検査測定機 (BioMajesty Series JCA-BM2250、日本電子株式会社、東京、日本) により、TP、Alb、総ビリルビン (T-Bil)、GOT、 γ -GPT、TG、BUN、クレアチニン (Cre)、Ca、iP、マグネシウム (Mg)、Glu、リン脂質 (PL) およびNEFAを測定した。また、得られたHDL-CおよびLDL-CからHDL/LDL比を算出した。

5. 統計

測定値は平均値±標準偏差で表記された。2酪農家における分娩前後の測定項目の推移の統計的有意差は二元配置分散分析 (Two-way ANOVA) により決定し、2酪農家間で有意差ありと判断された場合、Sidak's multiple comparisons test

を実施して測定ポイントごとの比較を行った。 $p < 0.05$ の差を統計的に有意であると判断した。全ての試験に関して GraphPad Prism 6 analysis software を用いて実行した。

結果

健常乳牛 10 頭の分娩後の乳性状の変動を図 4-1,2、分娩前後の BCS の推移を図 4-3、血液生化学検査項目の変動を表 4-2 に示した。リポタンパク質分画の変動に関しては全ての項目で 2 酪農家間に有意差は認められなかったため、健常乳牛 10 頭を合わせた分娩前後のリポタンパク質分画の推移を図 4-4~7 に示した。Total-C および HDL-C の推移は分娩予定 4 週間前から低下し、分娩日に最低値 (Total-C ; $65.8 \pm 13.3 \text{mg/dl}$ 、HDL-C ; $57.5 \pm 10.3 \text{mg/dl}$) を示した後、増加した(図 4-4,5)。LDL-C の推移は、分娩予定 4 週間前から低下し、分娩 1 週間後に最低値 ($9.2 \pm 1.5 \text{mg/dl}$) を示した後、増加した(図 4-5)。HDL-C/Total-C(%) および HDL/LDL 比の推移は、分娩予定 4 週間前から増加し、分娩 2 週間後に最高値 (HDL-C/Total-C ; $90.9 \pm 1.1\%$ 、HDL/LDL ; 10.2 ± 1.2) を示した後、低下した(図 4-6,7)。LDL-C/Total-C(%)の推移は、分娩予定 4 週間前から低下し、分娩 2 週間後に最低値 ($9.0 \pm 0.9\%$) を示した後、増加した(図 4-6)。

考察

本章第1節では、糖・脂質代謝が著しく盛んに行われる分娩前後に着目し、リポタンパク質分画を詳細に分析できる AEX-HPLC 法を用いて、2酪農家で飼養された健全なホルスタイン種成乳牛 10 頭の分娩予定 4 週間前から分娩 8 週間後までのリポタンパク質分画の推移を調査した。

分娩前後における Total-C、HDL-C、LDL-C、HDL/LDL 比、HDL-C/Total-C および LDL-C/Total-C の割合の推移に 2 酪農家間で有意差は認められなかったため、K 酪農家および S 酪農家を合わせた健全牛 10 頭のリポタンパク質分画の推移を健全牛の推移と判断して考察を行った。Total-C および HDL-C はともに分娩予定 4 週間前から低下し、分娩日に最低値を示した後、上昇した。この推移は過去の報告[Kurpińska et al. 2015; Miyamoto et al. 2006; Turk et al. 2005]に類似していた。Total-C および HDL-C は乾物摂取量 (DMI) に依存するとされており、分娩予定 4 週間前から分娩日にかけて Total-C および HDL-C が低下した要因は、妊娠末期における胎子の発育に伴う腹腔内容積の減少により飼料摂取量が低下したためと考えられた。また Total-C が分娩日に向けて低下するのは胎子への栄養要求量の増加および母体におけるステロイドホルモン産生量が増加するためであるとも言われている[Turk et al. 2005]。さらに分娩直後に Total-C が低値を示すのは、LCAT 活性の低下に伴い末梢組織からコレステロールを回収できないためとの報告もある[Pösö et al. 2000]。このことから、分娩末期になるほど飼料摂取量が減少する一方コレステロール要求量が増加し、余剰のコレステロールが減少する結果、血液中の Total-C および HDL-C が減少したと考えられた。一方、分娩日から Total-C および HDL-C が上昇した要因とし

て、分娩後泌乳量に合わせた DMI 増加および飼料の増給によるものであると考えられた。また HDL は Total-C の約 80%を占めており、そのため Total-C および HDL-C は同様な推移を示したと考えられた[Glascok and Welch. 1974]。

LDL-C に関しては、分娩予定 4 週間前から低下し、分娩 1 週間後に最低値を示した後、上昇した。分娩前の LDL-C の減少に関しては、Total-C および HDL-C と同様に、胎子発育に伴う腹腔内容積の減少による DMI の低下およびコレステロール要求量の増大といった要因が考えられ、分娩前から分娩日にかけて低下するという過去の論文と類似していた[Glascok and Welch. 1974; Turk et al. 2005; Pösö et al. 2000]。本試験結果が過去の論文と異なった点は、超遠心分離法を用いた過去の報告では LDL-C は分娩日より上昇したのに対し、AEX-HPLC 法では分娩 1 週間後から上昇したことであった。前述の通り LDL は、VLDL の代謝産物であるため、この結果は分娩直後において肝臓からの VLDL 排出の遅れにより、LDL-C 合成に遅れが生じたものと考えられた。LDL の増減は肝臓からの VLDL 排出量と LPL 活性の状況によって変動することが予想される。分娩後の乳牛は生理的に NEFA の肝臓への取り込む割合が低く、NEFA からの TG 合成が遅れることで、リポタンパク質による脂質の運搬が遅れると報告されている[Darul and Kruczynska. 2005]。また、肝臓で合成、分泌される IGF-I は、VLDL の調節因子であり、乳牛が負のエネルギーバランスに陥ると血液中の IGF-I が減少し、その結果肝臓からの VLDL の排出低下につながるとされている[Fenwick et al. 2008]。このことから、分娩後の VLDL 排出の遅れは、VLDL の原料の不足が考えられ、この時期の乳牛はリポタンパク質から運搬される TG ではなく、脂肪組織から動員される NEFA をエネルギー源として活用している

ことが推測された。また、LPL 活性はインスリンにより活性化される [Geelen et al. 1980]。詳細な機序は十分に解明されていないが、乳牛は分娩前において、胎子にグルコースを優先的に供給するため、また分娩後においては、インスリン作用に影響を受けない乳腺へのグルコースの取り込みを促進するため、インスリン抵抗性の状態に陥ると言われている [De Koster and Opsomer. 2013]。このことから、LDL-C の上昇が分娩日からではなく分娩 1 週間後から上昇したのは、分娩前後の生理的なインスリン抵抗性により LPL が十分に活性化されないためかもしれない。そして分娩後、時間の経過とともにインスリン抵抗性が緩和され LPL が活性化され始めることから、分娩時にエネルギー源として利用していた NEFA ではなく、リポタンパク質で運搬される TG をエネルギー源として活用するようになり、分娩 1 週間後において LDL-C が上昇したものと推測した。

HDL-C/Total-C(%)および HDL/LDL 比は、分娩予定 4 週間前から分娩 2 週間後まで上昇し、その後低下した。また LDL-C/Total-C(%)は分娩予定 4 週間前から分娩 2 週間後まで低下し、その後上昇した。これらの結果は分娩 2 週間後から LDL-C の上昇速度が上がったことを意味する。乳牛の VLDL 合成には HDL の構成成分であるアポ C と関連があるため、VLDL 代謝回転は、HDL-C の上昇に影響を受ける [Puppione. 1982]。また、移行期における HDL は肝機能および牛のエネルギーバランスの状態を示す良い指標 [Manka et al. 2014; Newman et al. 2016] とされている。以上のことから、本試験で HDL/LDL 比および HDL-C/Total-C が分娩 2 週間後で最大値を示し、また LDL-C/Total-C が分娩 2 週間後で最小値を示した要因としては、分娩日から次第に DMI が増加することで HDL-C が上昇し、栄養状態が上向くことで、分娩 2 週間後から VLDL-C の排

出が盛んに行われるようになり、その結果 LDL-C の合成速度が高まったためと考えられた。このことは LDL の割合の上昇は乳牛が真の意に正のエネルギー状態に向かっているということを表しているかもしれない。実際に LDL-C の上昇は、肝臓からの TG 排出能の改善を反映していると報告している論文が存在する [Gross et al. 2015]。またこの LDL の上昇する時期において測定を行うことにより、優良農家の判別や周産期疾患の予測マーカーとして今後用いることができるかもしれない。

AEX-HPLC 法により健常牛の分娩前後におけるリポタンパク質分画の推移を調査したが、Total-C および HDL-C に関しては分娩予定 4 週間前から低下し、分娩日に最低値を示した後、上昇するという推移をとり、過去の論文と類似した。LDL-C に関しては、分娩日に最低値を示した後、上昇するという超遠心分離法を用いた過去の報告と異なり、本試験では分娩 1 週間後に最低値を示した後、上昇した。これは分娩直後において肝臓からの VLDL を介した TG 供給の遅れにより、LDL-C 合成に遅れが生じたものと考えられた。以上より、AEX-HPLC 法による分娩前後のリポタンパク質分画測定は超遠心分離法では確認できなかった脂質代謝の詳細を検査可能であり、臨床診断に有効な測定法として使用できる可能性があると考えられた。

第2節 周産期疾患発症牛におけるリポタンパク質分画の測定

緒言

分娩後における乳牛の周産期疾患発生は泌乳量の著しい減少や受胎率低下といった繁殖成績の悪化などを招き、酪農業において大きな経済的負担となっている。乳牛の周産期疾患には乳熱、第四胃変位、ケトーシスおよびダウンナー症候群等が挙げられるが、これらの背景には乾乳期の栄養状態および肝臓の状態が密接に影響するとされ、乾乳期の栄養摂取の過不足により肝臓への TG 蓄積に至り、産後の脂肪肝の原因となるといわれている。[Herdt. 1988; Morrow et al. 1979; Roberts et al. 1981; Rukkwamsuk et al. 1999]。乳牛は分娩後、生理的な負のエネルギー状態に陥るため、血液中の NEFA が上昇し[Drackley. 1999]、肝臓でエネルギー源として、あるいは TG を再合成し、VLDL の形態で末梢組織へ運搬しエネルギー源等に活用されるが、合成された TG 量が肝臓からの排出量を上回った時、脂肪肝が進行する[Grummer. 1993]。この時、分娩時の BCS が高値であるほど分娩後の脂肪動員がより盛んに行われるため、脂肪肝の危険性が高い[Vailati-Riboni et al. 2016]。現在一部の酪農家ではこの脂肪肝の予防処置として、分娩前後においてバイパス性コリン、バイパス性メチオニンあるいはグリセリンの投与を行っている。これらの添加剤は VLDL の排泄亢進および LCAT 活性の亢進が起こり[Akamatsu et al. 2007]、分娩後の生理的な VLDL および LDL の排出率低下の影響を緩和させる。このように周産期疾患発生の背景には脂質代謝の異常が判明しているのにも関わらず、臨床現場においては測定に要する時間および労力等によりリポタンパク質分画の測定は実施されていないのが現状である。

本節では、宮城県管内で発生した周産期疾患発症牛のリポタンパク質分画を AEX-HPLC 法を用いて測定し、第 4 章 第 1 節で求めた健常牛 10 頭の分娩前後のリポタンパク質分画の推移と比較することで周産期疾患とリポタンパク質分画の関連性を調査し、乳牛における有用性を検討した。

材料および方法

1. 供試動物

平成 28 年 1 月から 8 月にかけて宮城県農業共済組合に周産期疾患発症で診療依頼のあった産歴 3 産以上のホルスタイン種成乳牛 19 頭を供試した。供試牛 19 頭はいずれも異なった酪農家で飼養されている成乳牛で、脂肪肝、第四胃変位および乳熱といった周産期疾患のみを対象とし、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。供試牛の飼料内容および添加剤内容は問わないものとした。第 4 章第 1 節で調査した健常牛の分娩前後のリポタンパク質分画の推移と各疾患牛のリポタンパク質分画を比較検討することにした。

2. 試験プロトコール

周産期疾患発症牛 19 頭の診療初診時に採血を行い、BCS を測定した。血清分離および測定項目は、第 4 章 第 1 節と同様である（「第 4 章 第 1 節 4. 測定項目および測定方法」参照）。周産期疾患発症牛 19 頭を脂肪肝 6 頭（脂肪肝群）、第四胃変位 6 頭（第四胃変位群）および乳熱 7 頭（乳熱群）、に群分けした。診断は宮城県農業共済組合の獣医師が「家畜共済の診療指針」にそって行った。さらに脂肪肝群、第四胃変位群、および乳熱群にそれぞれ 1 頭ずつ双子分娩牛が存在したため、双子分娩群(3 頭)とした。各群のリポタンパク質分画は第 4 章 第 1 節で測定した健常牛 10 頭のリポタンパク分画測定値と比較した。

3. 検体処理

第 4 章 第 1 節と同様の方法で行った（「第 4 章 第 1 節 3. 検体処理」参照）。

結果

図 4-12～15 に健常牛の分娩前後のリポタンパク質分画の推移と、周産期疾患発症牛 19 頭のリポタンパク質分画を示した。Total-C および HDL-C に関して、分娩後に健常牛の推移と比較して値が低い牛が多く認められた。LDL-C に関してはばらつきが大きかったが、健常牛の変動幅も大きく、健常牛群と周産期疾患発症牛群の間で大きな違いは認められなかった。HDL-C/Total-C(%)において、高値を示す個体と低値を示す個体が認められたが、健常牛群より低値を示す個体が多く認められた。LDL/Total-C(%)においては、高値を示す個体と低値を示す個体が認められたが、健常牛群より高値を示す個体が多く認められた。HDL/LDL 比に関しては健常牛の推移と比較して周産期疾患牛において高値を示す個体と低値を示す個体が認められた。

次に 19 頭を脂肪肝群 (n=6)、第四胃変位群(n=6)、乳熱群(n=7)および双子分娩群(n=3)に群分けし健常牛群と比較した。図 4-16～19 に脂肪肝群、図 4-20 ～23 に第四胃変位群、図 4-24～27 に乳熱群、および図 4-28～31 に双子分娩群のリポタンパク質分画と健常牛の推移を比較した図を示した。また表 4-3 には各疾患牛群の血液生化学検査結果を示した。

健常牛と周産期疾患群を比較するため、周産期疾患が発症した日のリポタンパク質分画を、周産期疾患が発症した日と最も分娩後の日数が近い(分娩日、分娩 1 週間後もしくは分娩 2 週間後のいずれか) 健常参考値(平均値±標準偏差の範囲内とする)と比較した。脂肪肝群において、Total-C は 3 例/6 例で健常参考値より低値を示した。HDL-C は 4 例/6 例で健常参考値より低値を示し、1 例/6 例で高値を示した。LDL-C では 2 例/6 例で低値を示し、1 例/6 例で高値を示

した。HDL-C/Total-C(%)においては2例/6例で低値を示し、1例/6例で高値を示した。LDL-C/Total-C(%)においては1例/6例で低値を示し、2例/6例で高値を示した。HDL/LDL比においては3例/6例で低値を示し、1例/6例で高値を示した。第四胃変位群において、Total-Cでは3例/6例で健常参考値より低値を示した。HDL-Cでは4例/6例で健常参考値より低値を示し、1例/6例で高値を示した。LDL-Cにおいては1例/6例で低値を示し、1例/6例で高値を示した。HDL-C/Total-C (%)は1例/6例で低値を示し、LDL-C/Total-C(%)においては1例/6例で高値を示した。HDL/LDL比では1例/6例で低値を示した。乳熱群は、最も分娩後の日数が近い健常参考値の標準偏差を逸脱した症例数は、Total-CおよびHDL-Cは3例/7例で低値を示し、1例/7例で高値を示した。LDL-Cは2例/7例で低値、1例/7例で高値を示した。HDL-C/Total-C (%)は1例/7例で低値、2例/7例で高値を示し、LDL-C/Total-C(%)においては2例/7例で低値、2例/7例で高値を示した。HDL/LDL比は2例/7例で低値、2例/7例で高値を示した。双子分娩群において、Total-Cでは1例/3例で高値を示し、HDL-Cでは2例/3例で低値を示し、1例/3例で高値を示した。LDL-Cにおいては3例/3例で高値を示した。HDL-C/Total-C (%)は2例/3例で低値を示し、LDL-C/Total-C(%)においては3例/3例で高値を示した。HDL/LDL比では3例/3例で低値を示した。

考察

本章第 2 節では、AEX-HPLC 法を用いて測定した周産期疾患発症牛 19 頭のリポタンパク質分画を、第 4 章第 1 節で算出した健常牛 10 頭の分娩前後のリポタンパク質分画推移と比較して、周産期疾患発症とリポタンパク質分画の関連性を検討した。さらに、周産期疾患発症牛 19 頭を脂肪肝群 6 頭、第四胃変位群 6 頭、乳熱群 7 頭、および双子分娩群 3 頭に群分けし、健常牛 10 頭の分娩前後のリポタンパク質分画推移と比較検討した。

脂肪肝群に関して、Total-C、HDL-C および LDL-C が低値を示す傾向があった。脂肪肝は周産期疾患発症の根本の原因として考えられており、分娩後の負のエネルギーバランスによって発症する。このため、分娩前後の乾物摂取量の低下が脂肪肝発症の要因であると考えられた。また負のエネルギーバランスは、VLDL 構成要素の調節因子および LDL レセプターの増加因子である IGF-I の低下を引き起こす。IGF-I の低下に伴い VLDL 排出が減少し、肝臓内に脂肪が蓄積し、脂肪肝が発症すると考えられている [Li et al. 2016]。周産期疾患発症により、アポタンパク質 B-100 およびアポタンパク質 A-I が減少する [Geishauser. 1995; Oikawa et al. 1997]。このことから、本試験において Total-C および HDL-C の低値は、VLDL、IDL および LDL を構成するアポタンパク質であるアポタンパク質 B-100 と HDL を構成するアポタンパク質 A-I が減少したことにより、リポタンパク質を十分に合成できなかった可能性もある。さらに LDL-C/Total-C(%) が 1 例低値を示したが、これは、脂肪肝により VLDL 排出が低下することで VLDL→IDL→LDL の代謝経路が十分に回転しないためと考えられた。逆に LDL-C/Total-C(%) が 1 例低値を示したが、これは本症例は高 BCS(4.00)であり、

肝臓へ体脂肪動員が盛んに行われ、積極的に VLDL により TG を排出していたものと推察された。

第四胃変位群において、健常推移と比較して Total-C で 3 例/6 例、HDL-C で 4 例/6 例で低値を示した。これは第四胃変位を発症することで食欲が低下するほか、栄養吸収が阻害されることで変化したと考えられる。HDL/LDL、HDL-C/Total-C(%)、LDL-C/Total-C(%)および LDL-C に関しては健常牛と大きな違いは認められなかった。第四胃変位は脂肪肝およびケトosisと関わりが深い周産期疾患と考えられ、前述の通りアポタンパク質 B-100 およびアポタンパク質 A-I が低下すると報告されている[Geishauser. 1995; Oikawa et al. 1997]。また第四胃変位を発症することで血液中の抗酸化物質が低下し、発症牛にインスリン抵抗性の要因となる酸化ストレスを与える[Hasanpour A. 2011]。インスリン抵抗性により VLDL から LDL への変換がされなくなり、第四胃変位を発症した牛は LDL-C が低値を示すと推測されるが、実際に LDL-C において健常牛の推移より低値を示す個体が 1 例/6 例だけしか存在しなかった。このことから、第四胃変位から脂肪肝の併発の可能性は考えられるが、第四胃変位発症に関しては脂質の流れと関連がないものと考えられた。

乳熱群は、HDL-C, LDL-C および HDL-C、および LDL-C/Total-C(%)が低値を示すものが 2 例確認された。乳熱は低カルシウム血症状態であるため、本来消化管運動を司るカルシウムが足りず、消化器の生理的役割が果たせなくなる。このため、食欲低下および栄養吸収が阻害され、エネルギーバランスが負に傾く。これにより肝臓からの VLDL 排出低下に伴い、VLDL→IDL→LDL の代謝経路の不活化に至ったものと考えられた。低カルシウム血症とリポタンパク質分画

の関連として考えられるのは、ステロイドホルモンの原料を末梢組織へ運搬する LDL-C の著しい低下に伴い、ステロイドホルモンの 1 つで血中のカルシウム濃度を調節する 1,25-ジヒドロキシコレカルシフェロールが不足したことが原因ではないかと考えられた。同様な考察をしている論文も存在するが [Oikawa et al. 2002]、詳細な機序は未だ明確に解明されていない。また、HDL-C が低値を示し、LDL-C/Total-C(%) が高値を示すものが 1 例確認された。これは低カルシウム血症により HDL と LDL を調節する CETP が異常をきたし、LDL から HDL に転換できず、LDL-C が高値を示した可能性が示唆された。しかしながら、CETP は未だメカニズムが詳細に解明されておらず、今後さらなる研究が必要と考えられた。

双子分娩群は全頭で一貫して LDL-C および LDL-C/Total-C(%) が高値を示した。一般的に双子分娩牛は産後の代謝性疾患および乳生産の低下を起しやすいため [Eddy et al. 1991]。双子妊娠牛の妊娠時のエネルギー要求量は単胎妊娠牛の 50~70% 増加すると考えられているが (Koong LJ. 1982)、分娩 1 ヶ月前から胎児 2 頭分に伴う子宮拡大により、第一胃および消化管が圧迫され、乾物摂取量が低下する [Van Saun et al. 1993]。これにより分娩前からエネルギー状態が負に傾き、体脂肪動員が亢進し、血液中の NEFA が上昇する [Silva-del-Río et al. 2014]。さらに単胎妊娠牛と比較して妊娠期間が短く、十分な栄養を確保する前に出産を迎える傾向がある [Nielen et al. 1989]。以上のことから双子妊娠牛は分娩後の脂肪肝およびケトーシスの発生率が高いとされる [Grummer . 1993]。その結果、VLDL→IDL→LDL の代謝経路の不活化から LDL-C が低値を示すことが予想されるが、実際は高値を示した。双子妊娠牛は単胎妊娠牛と比較して血漿

中のエストラジオール-17 β が高濃度で存在し[Patel et al. 1999]、このホルモンは脂肪動員を亢進させ、血漿中の NEFA 濃度を上昇させると言われている[Grummer et al. 1990]。このことから、乾乳期にエストラジオール-17 β の原料となるコレステロールを提供するために LDL-C が多く動員されたことが推測された。

これまでの考察をまとめると、Total-C や HDL-C の低下は周産期疾患で起こり、飼料摂取量や消化管の機能低下が関連することが分かった。また、第 3 章でも述べたように乳牛においてはエネルギー状態が良化すると LDL が上昇し、悪化すると低下するという変化が起こると考えられる。この理由として負のエネルギー状態になった場合、VLDL \rightarrow IDL \rightarrow LDL という代謝経路が活発に行われないうちに LDL が産生されなくなり、結果として血中濃度が低下するというものである。本章でも周産期疾患発症牛では負のエネルギー状態から LDL-C 濃度や割合が低下する牛が多く認められた。一方、双子分娩牛は一貫して LDL-C が高値を示した。これは乾乳期にエストラジオール-17 β の原料となるコレステロールを提供するために LDL-C が多く動員されたことが推測された。このことから、双子分娩牛の場合は、LDL-C が高値を示すことがあり、リポタンパク質分画の結果解析には注意が必要であると考えられた。低下した場合には負のエネルギー状態になっていることが予想されるため、例えばメチオニン製剤やコリン製剤等、その症例に合わせた適切な栄養供給および輸液療法による治療介入を行い適切に対応することが必要になると思われる。

以上より周産期疾患発症牛ではリポタンパク質分画の構成、特に LDL-C が変化し、その測定値あるいは濃度の変化によって乳牛のエネルギー状態が予測で

き、治療の介入に利用できる可能性が示された。今後はさらに症例数を増やし周産期疾患時や分娩前後においてのリポタンパク質分画の有用性をさらに検討していく必要がある。

小括

分娩前後の脂質代謝に着目し、健常牛 10 頭のリポタンパク質分画の推移を観察し参考値を算出した後、周産期疾患発症牛のリポタンパク質分画と比較を行い、周産期疾患とリポタンパク質分画の関連性を調査した。健常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 週間前から分娩日に最低値を示した後、上昇した。LDL-C に関しては、超遠心分離法を用いた過去の報告では分娩日に最低値を示した後上昇するとされてきたが、AEX-HPLC 法では分娩 1 週間後に最低値を示した後、上昇した。これは分娩直後において肝臓からの VLDL を介した TG 動員の遅れにより、LDL 合成に遅れが生じたものと考えられた。このことから、AEX-HPLC 法は、超遠心分離法では確認できなかった分娩前後の脂質代謝の詳細を検査可能であることが考えられた。次に、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常牛の推移と比較したところ、脂肪肝および乳熱発症牛において LDL-C が低値を示す傾向が見られた。これは負のエネルギーバランスに対応した肝臓からの VLDL 排出の低下が考えられ、LDL-C の測定値あるいは濃度は、周産期疾患発症牛の肝臓からの脂質排出マーカーになりうるということが考えられた。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、疾患牛の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あることが考えられた。

図表

表 4-1 供試されたホルスタイン種成乳牛 10 頭のプロフィール。

K 酪農家				S 酪農家			
No	生年月日	産歴	分娩月日	No	生年月日	産歴	分娩月日
1	H21.9.26	5	H28.3.23	1	H23.3.11	3	H28.2.19
2	H19.9.14	7	H28.3.27	2	H17.1.29	9	H28.3.19
3	H20.10.18	6	H28.4.11	3	H23.7.19	4	H28.3.26
4	H24.1.1	3	H28.4.2	4	H24.7.5	3	H28.5.22
5	H22.8.16	3	H28.3.31	5	H24.6.2	3	H28.7.6

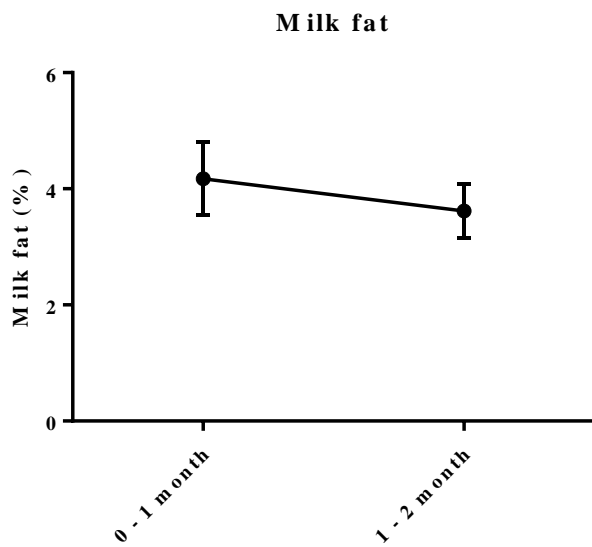
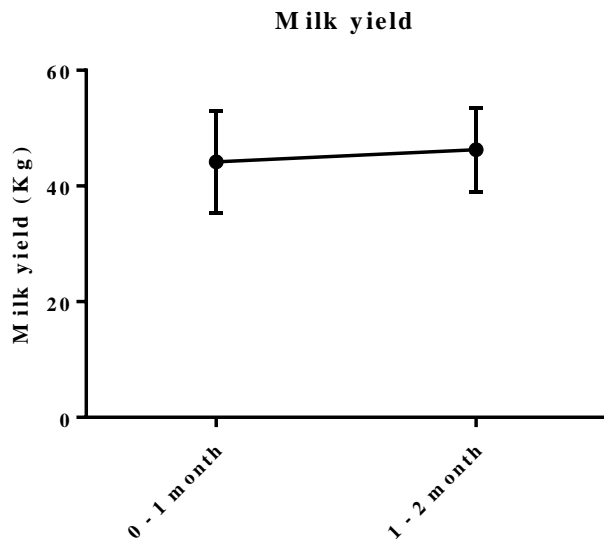


図 4-1 健常乳牛 10 頭における分娩後から分娩 1 ヶ月後(0 - 1 month)

および分娩 1 ヶ月後から 2 ヶ月後(1 - 2 month)までの乳量および乳脂率の推移。値は平均値±標準偏差で示す。

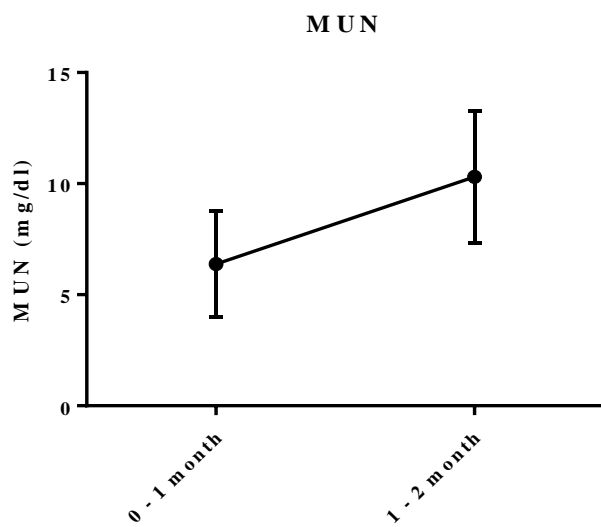
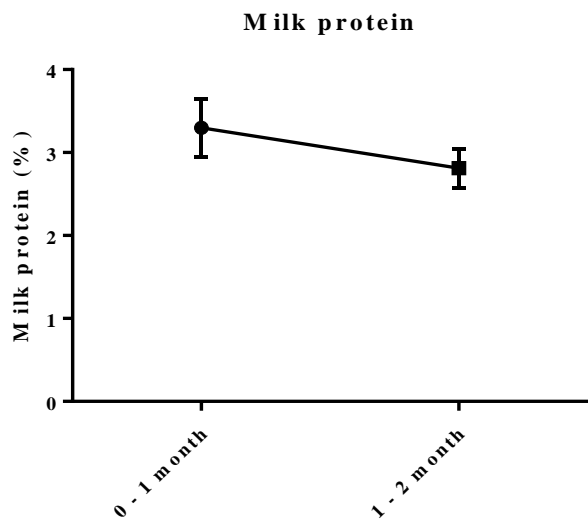


図 4-2 健常乳牛 10 頭における分娩後から分娩 1 ヶ月後(0 - 1 month)

および分娩 1 ヶ月後から 2 ヶ月後(1 - 2 month)までの乳タンパク率

および乳脂率の推移。値は平均値±標準偏差で示す。

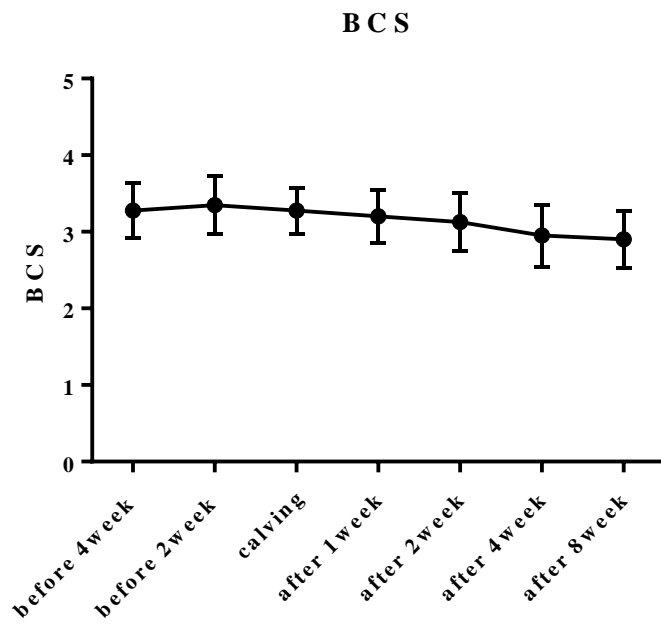


図 4-3 健常乳牛 10 頭における分娩前後の BCS の推移。

値は平均値±標準偏差で示す。

血液生化学 検査項目	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	分娩 8週間後
T.P (g/dl)	7.5 ± 0.8	7.8 ± 0.7	6.6 ± 0.6	6.4 ± 0.4	7.1 ± 0.5	7.7 ± 0.8	7.9 ± 0.4
Alb (g/dl)	3.7 ± 0.4	3.9 ± 0.7	3.5 ± 0.3	3.3 ± 0.2	3.4 ± 0.4	3.4 ± 0.3	3.6 ± 0.3
T-Bil (mg/dl)	0.1 ± 0.1	0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
GOT (IU/l)	65.5 ± 17.3	70.3 ± 11.3	83.0 ± 28.3	96.1 ± 20.1	99.3 ± 26.9	85.2 ± 13.9	85.6 ± 25.1
γ - GPT (IU/l)	25.8 ± 6.1	24.5 ± 3.8	22.4 ± 4.9	21.5 ± 6.1	25.8 ± 9.3	26.8 ± 7.7	31.7 ± 11.9
BUN (mg/dl)	13.1 ± 2.7	13.6 ± 3.7	11.3 ± 2.8	8.9 ± 2.9	9.4 ± 2.4	11.8 ± 2.1	14.7 ± 3.8
Cre (mg/dl)	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.7 ± 0.1
TG (mg/dl)	18.1 ± 5.9	20.8 ± 8.4	1.4 ± 2.7	1.0 ± 1.4	2.4 ± 2.5	4.0 ± 3.1	5.6 ± 2.1
Ca (mg/dl)	10.2 ± 1.1	10.8 ± 1.1	8.6 ± 1.1	9.1 ± 1.2	9.8 ± 0.7	9.7 ± 0.5	9.6 ± 0.6
iP (mg/dl)	6.5 ± 1.0	7.2 ± 1.4	4.1 ± 1.0	5.9 ± 1.8	6.3 ± 1.6	6.1 ± 0.9	5.6 ± 0.7
Glu (mg/dl)	71.1 ± 13.0	80.5 ± 15.1	99.8 ± 33.9	48.4 ± 13.5	48.5 ± 13.5	48.4 ± 12.2	57.3 ± 6.8
Mg (mg/dl)	2.4 ± 0.4	2.6 ± 0.5	2.5 ± 0.6	2.0 ± 0.2	2.4 ± 0.5	2.4 ± 0.2	2.4 ± 0.1
PL (mg/dl)	113.6 ± 30.5	111.0 ± 21.0	66.4 ± 16.8	84.8 ± 11.5	111.1 ± 17.8	157.1 ± 27.4	214.9 ± 37.7
NEFA (μEQ/l)	98.7 ± 29.3	105.5 ± 31.6	530.6 ± 293.4	568.2 ± 270.4	393.2 ± 233.4	328.0 ± 122.8	250.7 ± 203.0

(mean ± SD)

表 4-2 健常乳牛 10 頭における分娩前後の血液生化学検査項目の推移。

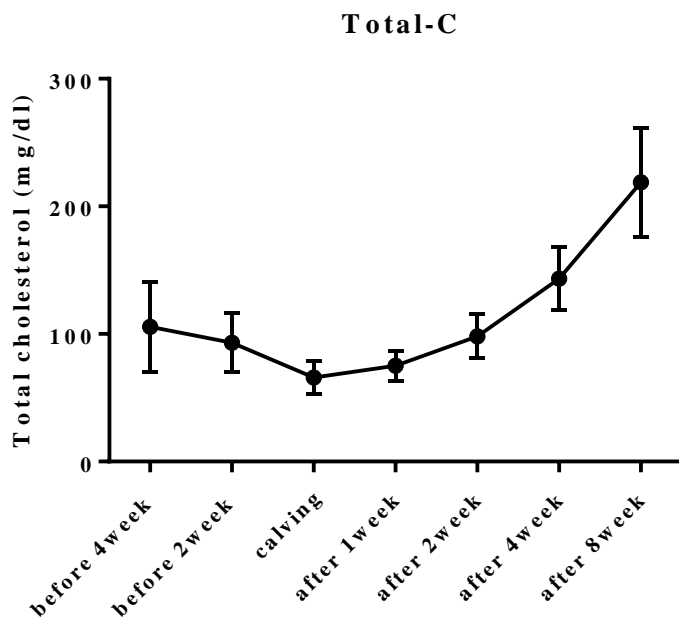


図 4-4 健常牛 10 頭における分娩前後の Total-C の推移。

値は平均値±標準偏差で示す。

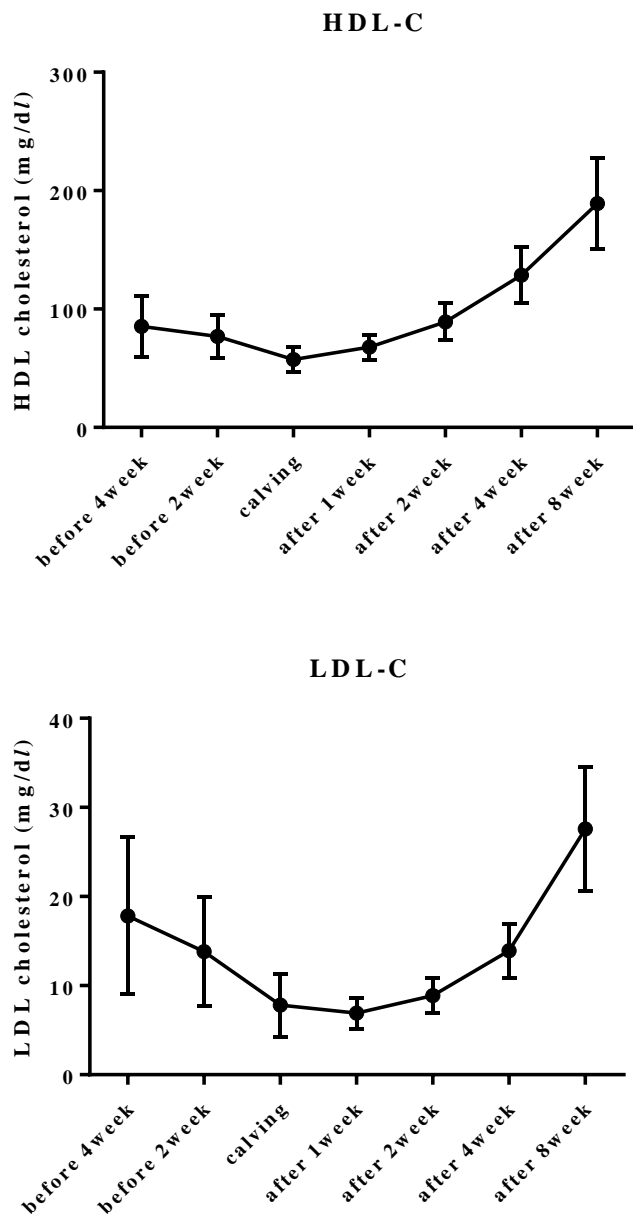


図 4-5 健常牛 10 頭における分娩前後の HDL-C および LDL-C の推移。

値は平均値±標準偏差で示す。

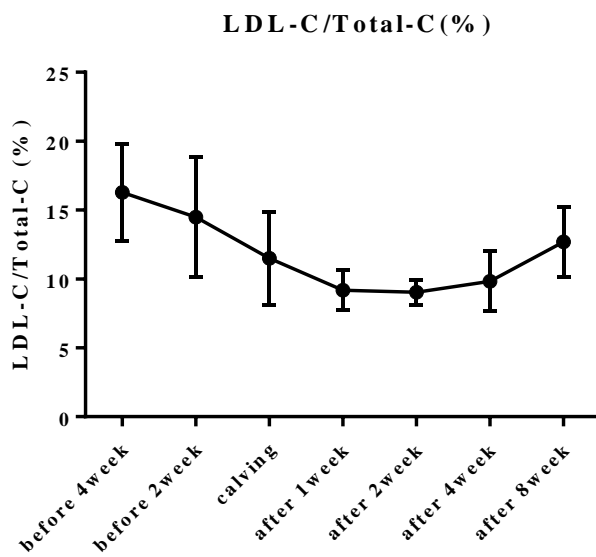
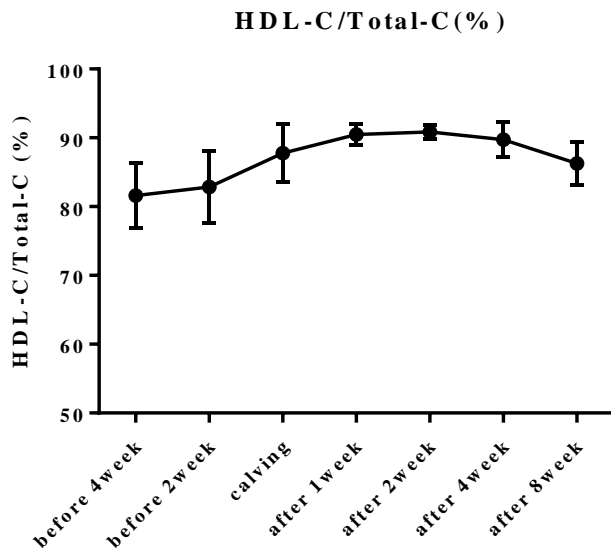


図 4-6 健常牛 10 頭における分娩前後の HDL-C/Total-C(%)および LDL-C/Total-C(%)の推移。
値は平均値±標準偏差で示す。

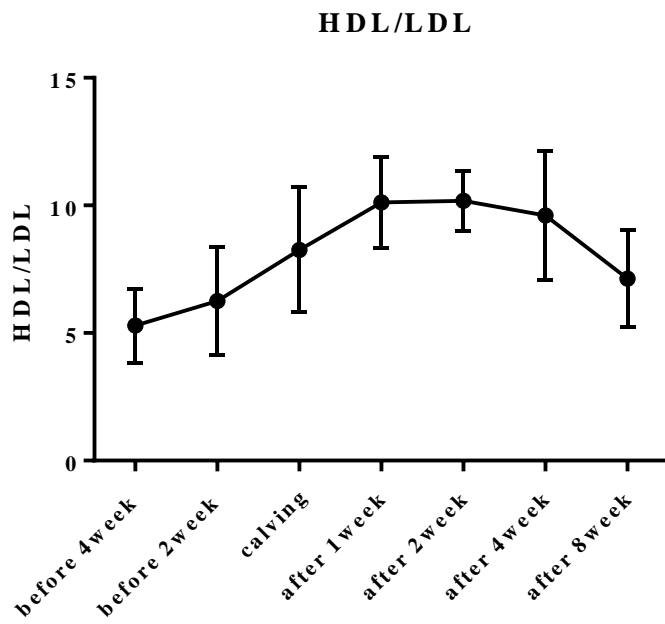


図 4-7 健康牛 10 頭における分娩前後の HDL/LDL 比の推移。

値は平均値±標準偏差で示す。

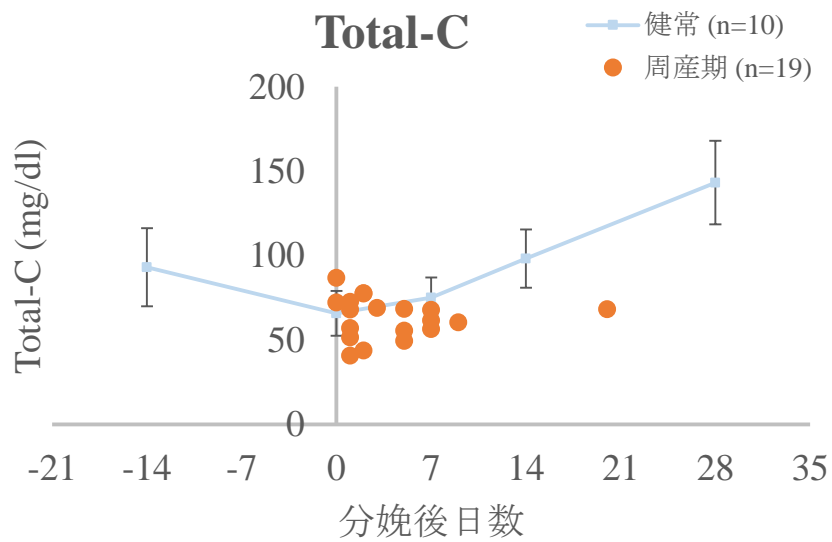


図 4-8 周産期疾患発症牛 19 頭の Total-C 測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。
健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

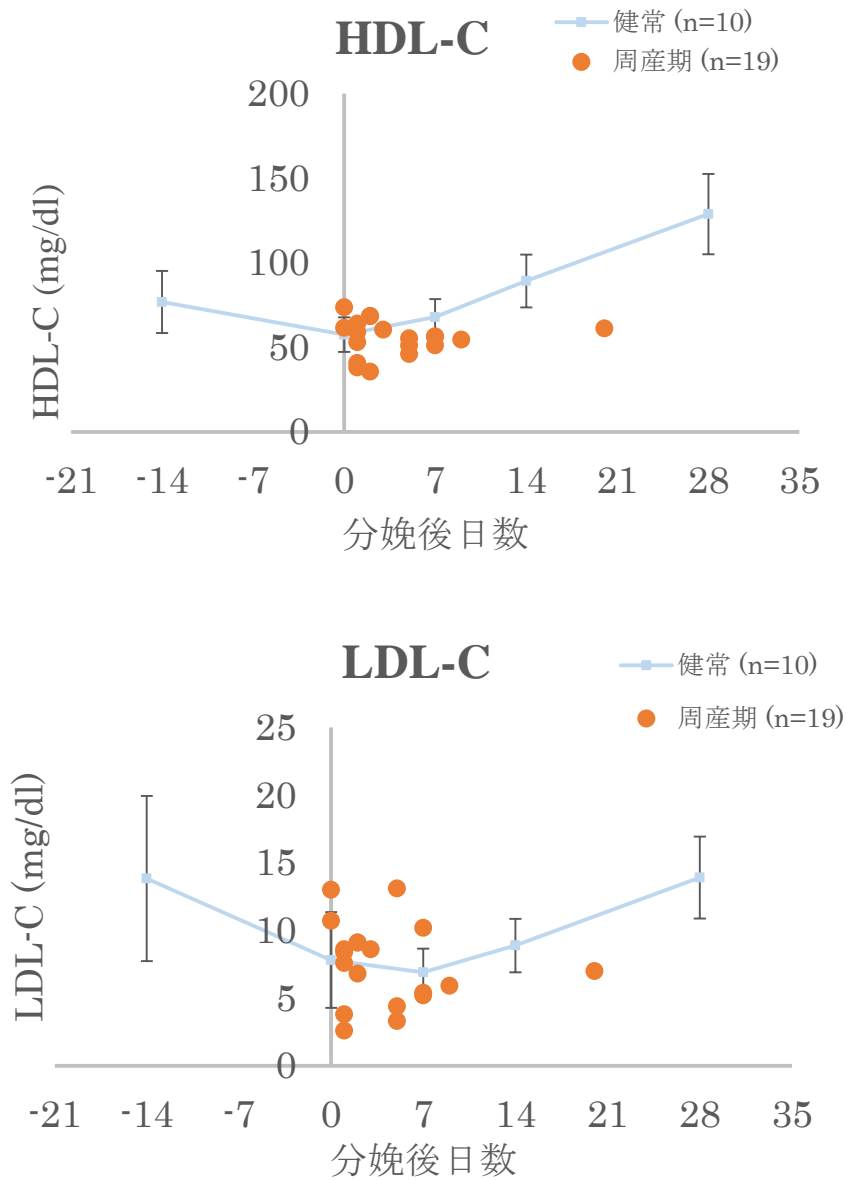


図 4-9 周産期疾患発症牛 19 頭の HDL-C および LDL-C 測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。
健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

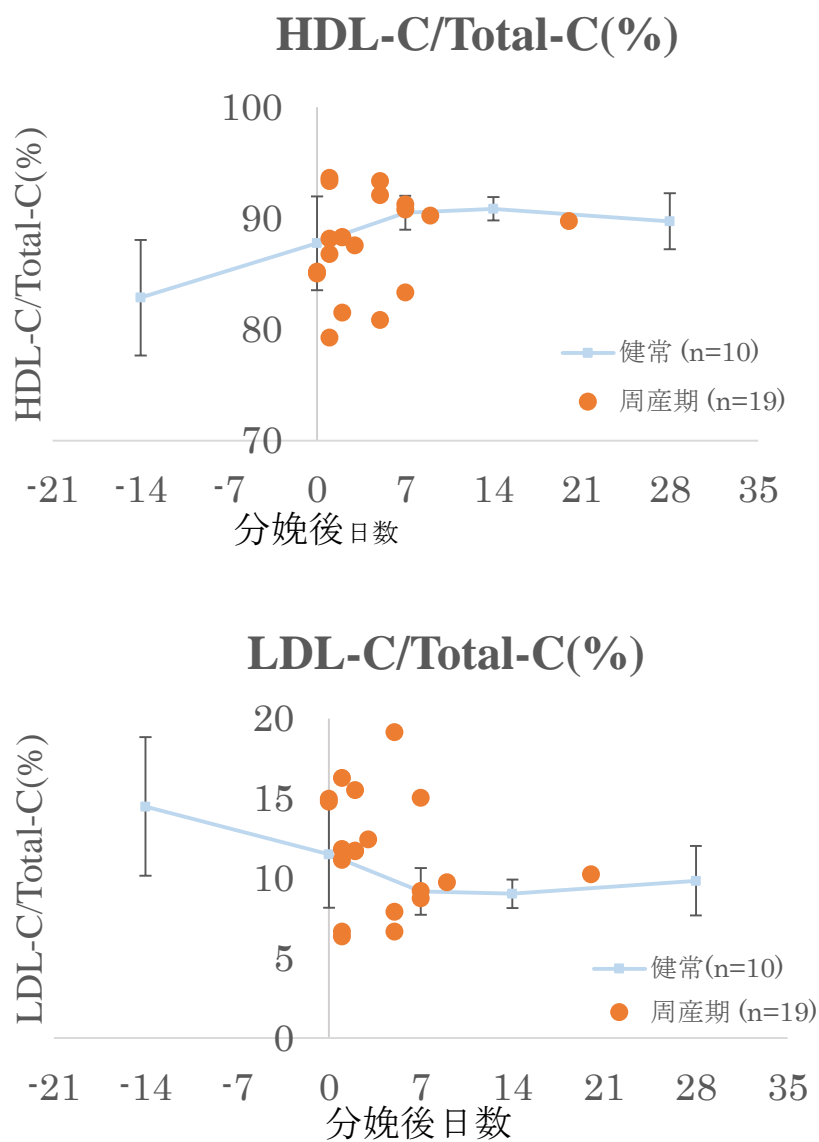


図 4-10 周産期疾患発症牛 19 頭の HDL-C/Total-C(%)および

LDL-C/Total-C(%)測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

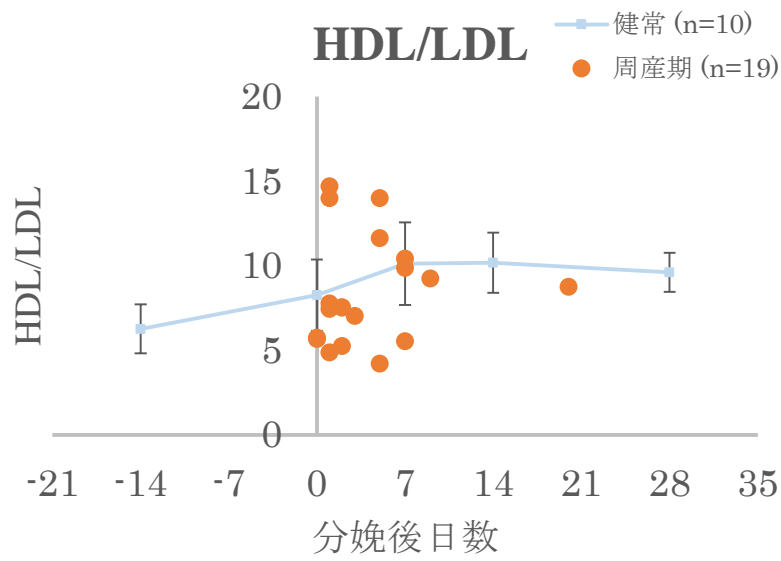


図 4-11 周産期疾患発症牛 19 頭の HDL/LDL 比と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

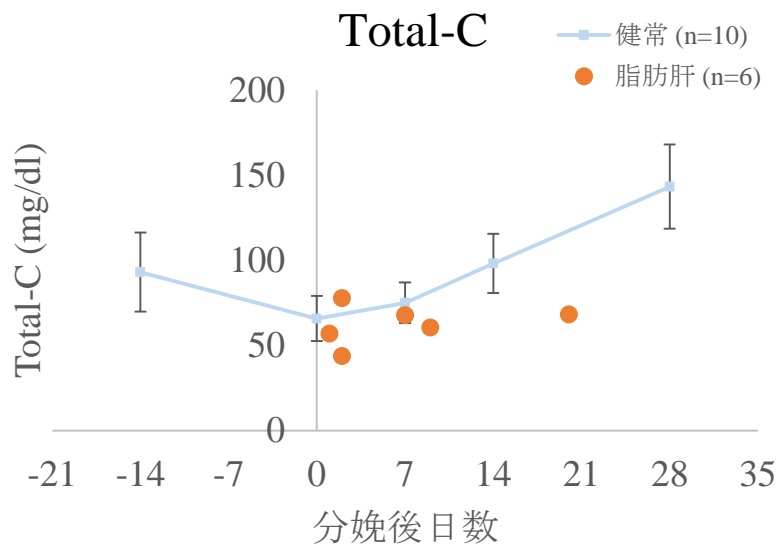


図 4-12 脂肪肝発症牛 6 頭の Total-C 測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

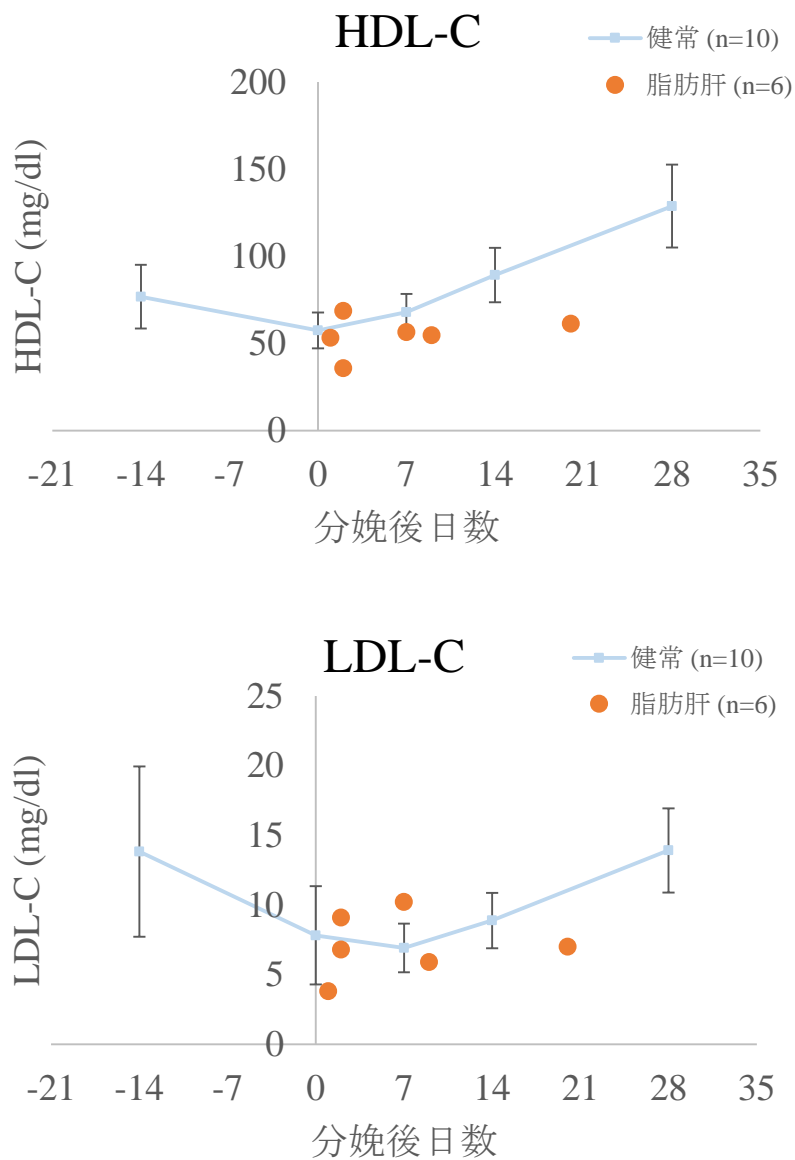


図 4-13 脂肪肝発症牛 6 頭の HDL-C および LDL-C 測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。
健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

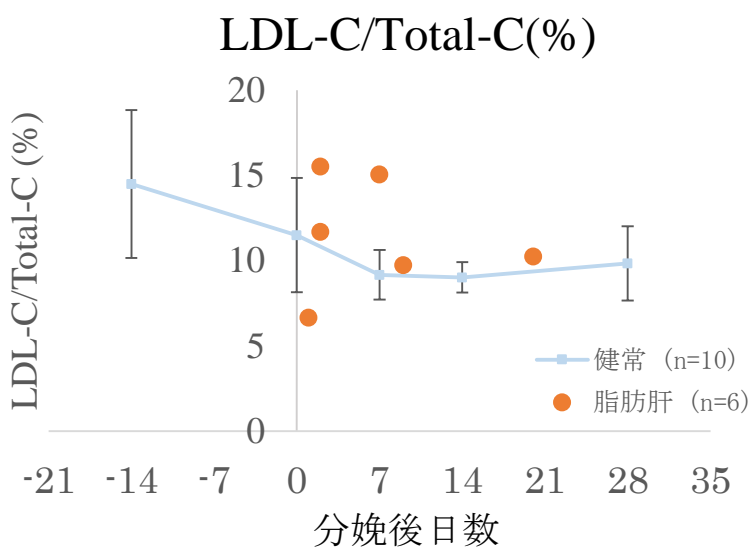
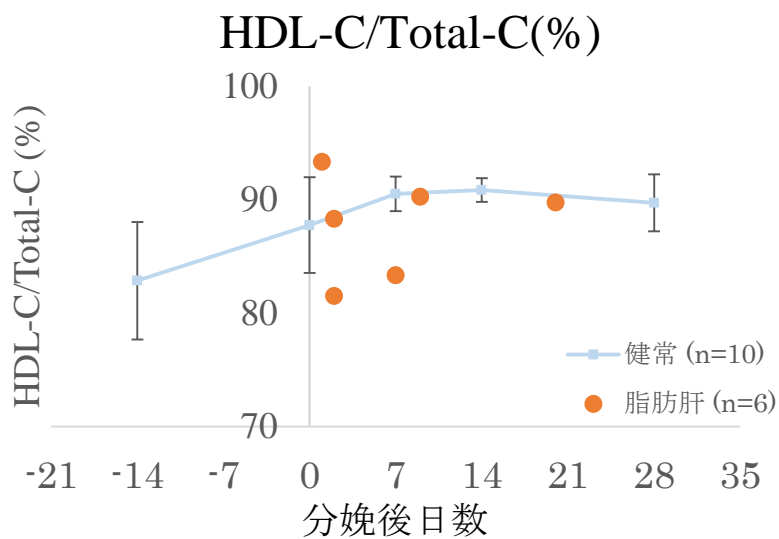


図 4-14 脂肪肝発症牛 6 頭の HDL-C/Total-C(%)および LDL-C/Total-C(%)

測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。

健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

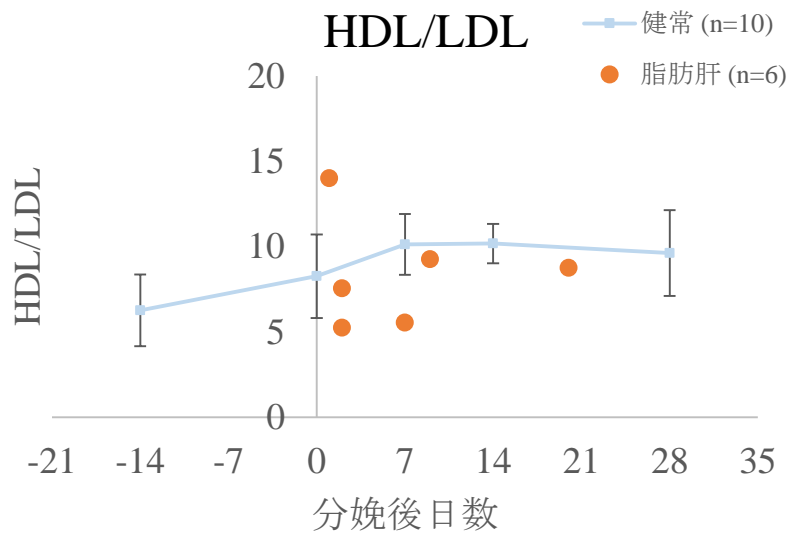


図 4-15 脂肪肝発症牛 6 頭の HDL/LDL 比と分産前後の健常牛 10 頭の

分産前後における推移。健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

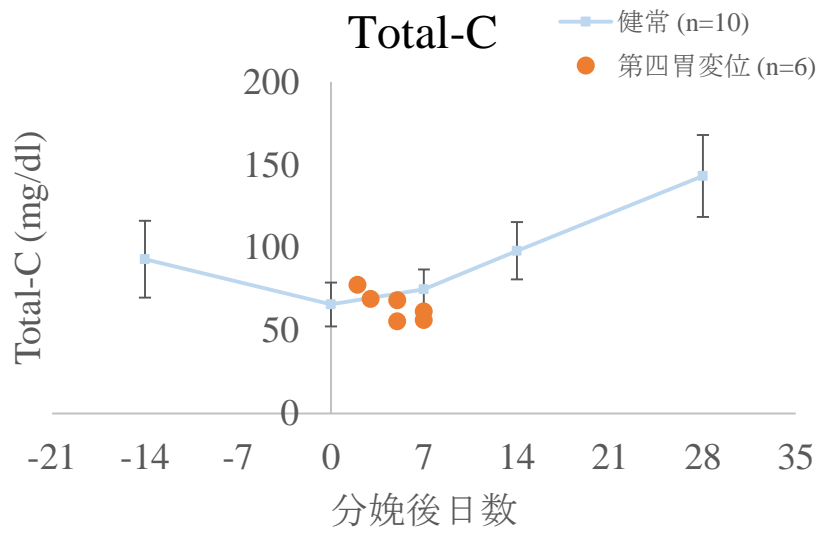


図 4-16 第四胃変位発症牛 6 頭の Total-C 測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

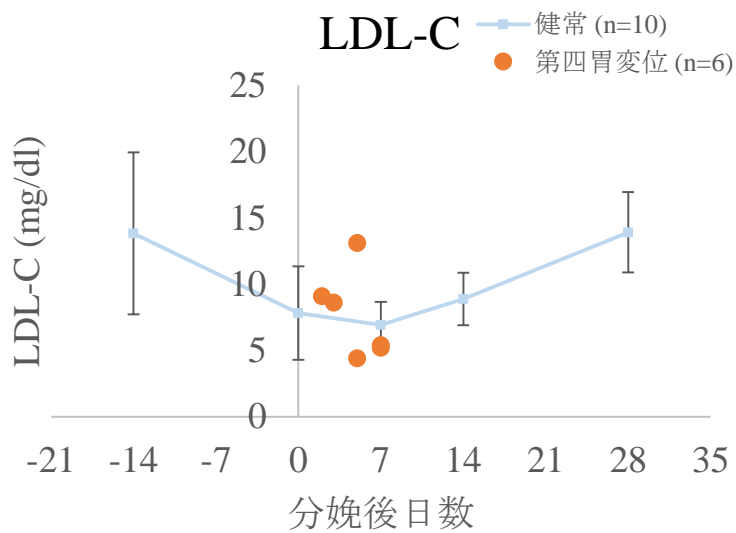
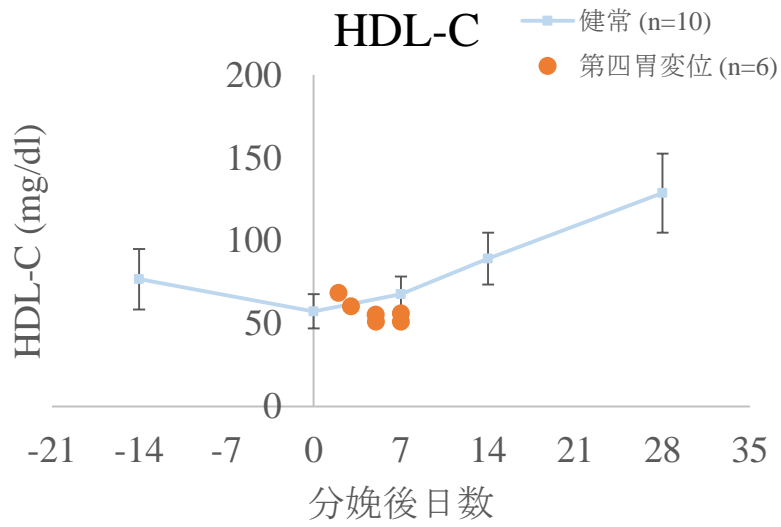


図 4-17 第四胃変位発症牛 6 頭の HDL-C および LDL-C 測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。
健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

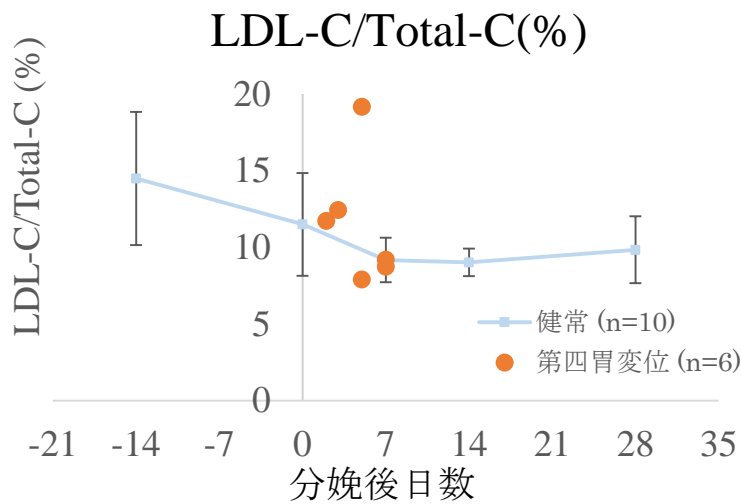
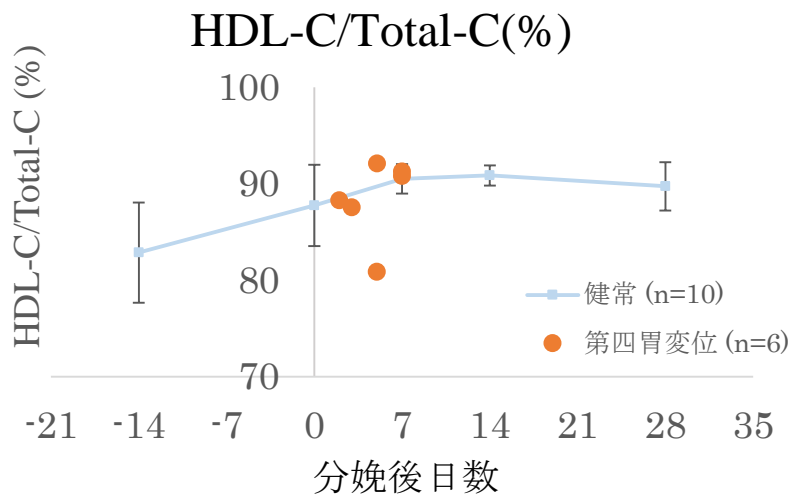


図 4-18 第四胃変位発症牛 6 頭の HDL-C/Total-C(%)および LDL-C/Total-C(%)

測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。

健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

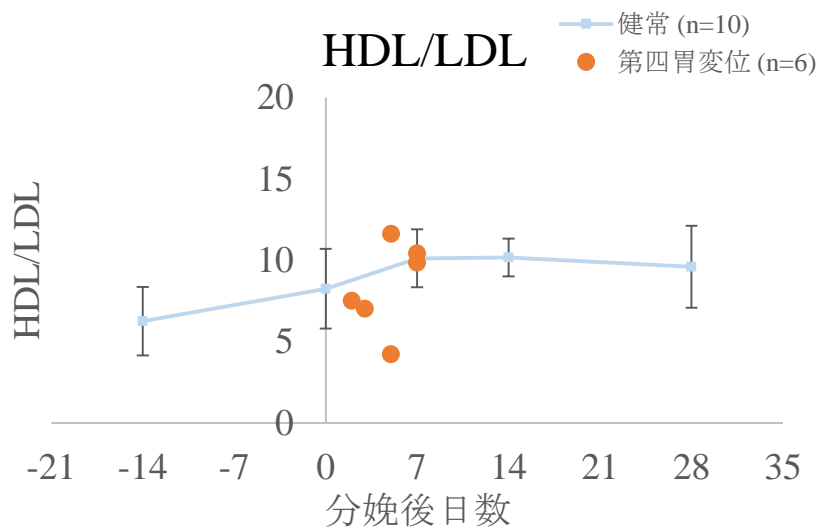


図 4-19 第四胃変位発症牛 6 頭の HDL/LDL 比と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

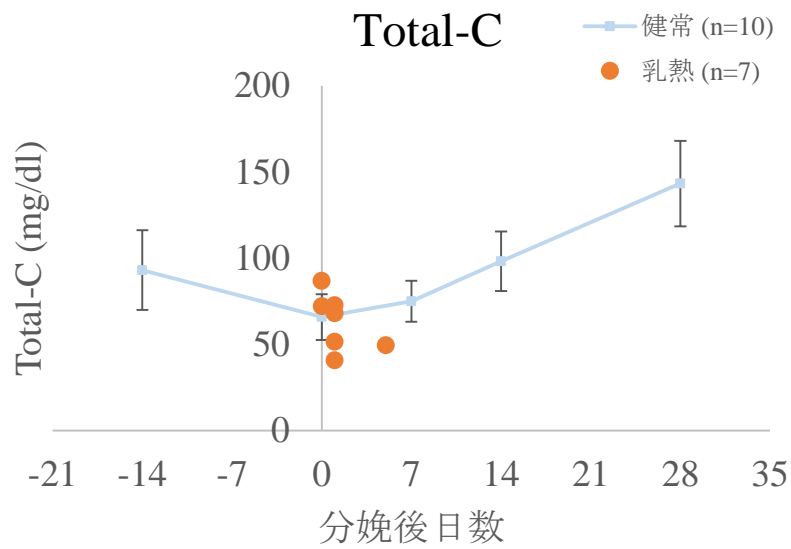


図 4-20 乳熱発症牛 7 頭の Total-C 測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の

分娩前後における推移。健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

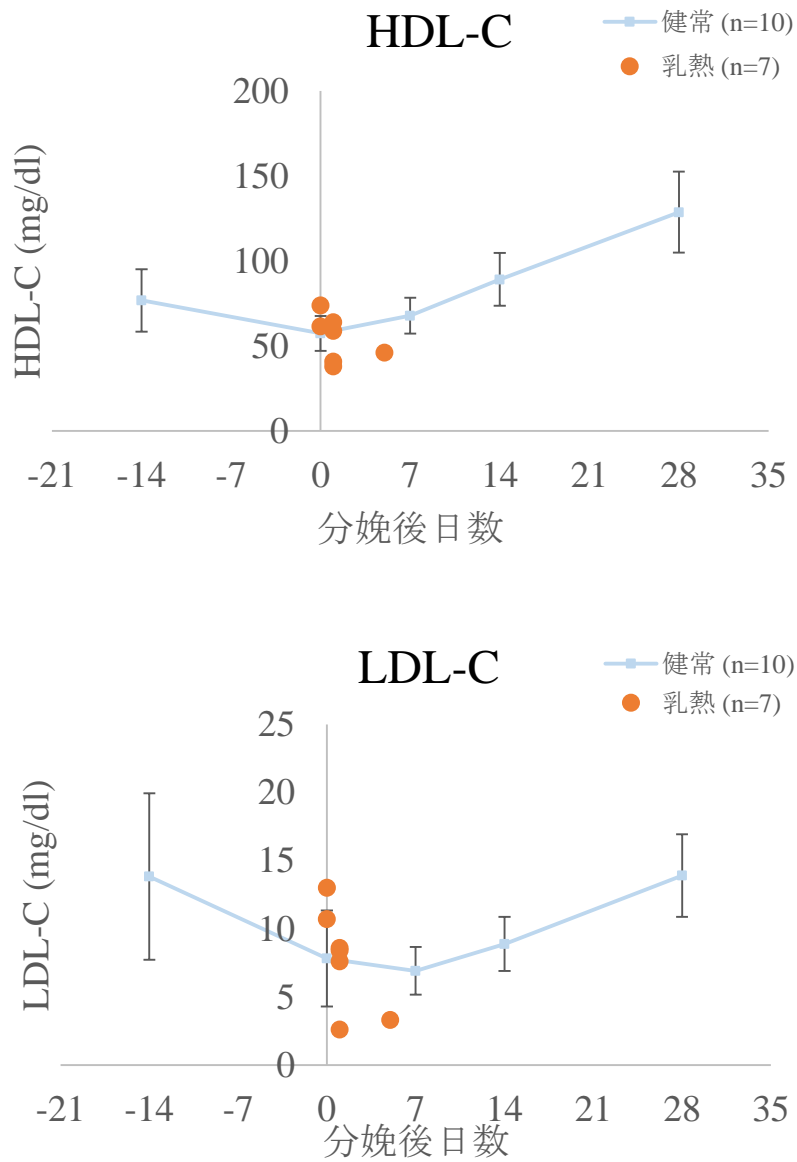


図 4-21 乳熱発症牛 7 頭の HDL-C および LDL-C 測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。
健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

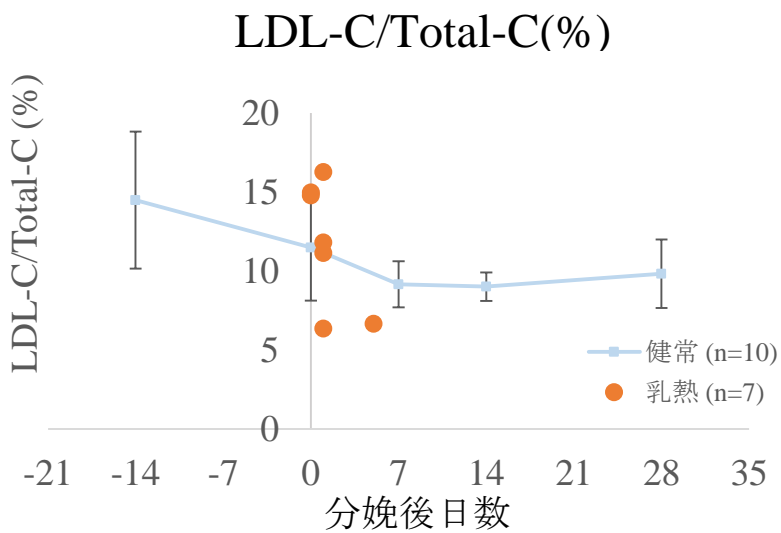
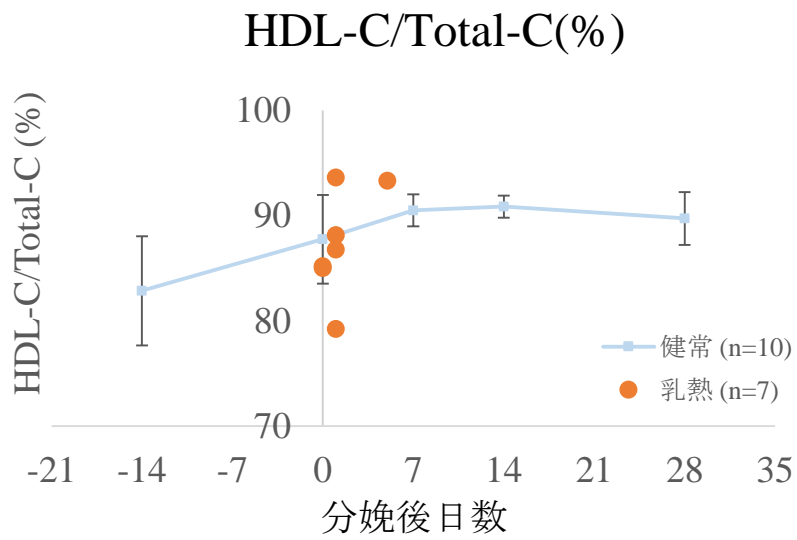


図 4-22 乳熱発症牛 7 頭の HDL-C/Total-C(%)および LDL-C/Total-C(%)

測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。

健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

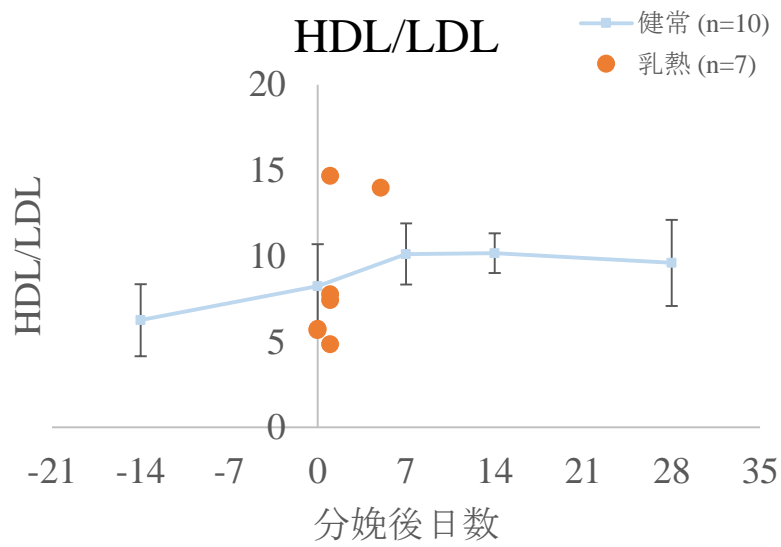


図 4-23 乳熱発症牛 7 頭の HDL/LDL 比と分娩前後の健常牛 10 頭の

分娩前後における推移。健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

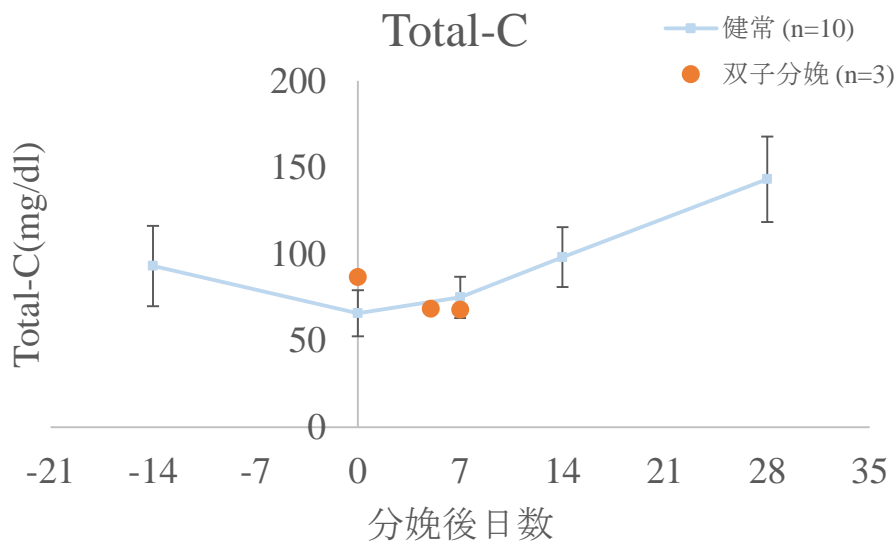


図 4-24 周産期疾患発症牛のうち双子分娩した 3 頭の Total-C 測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。
健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

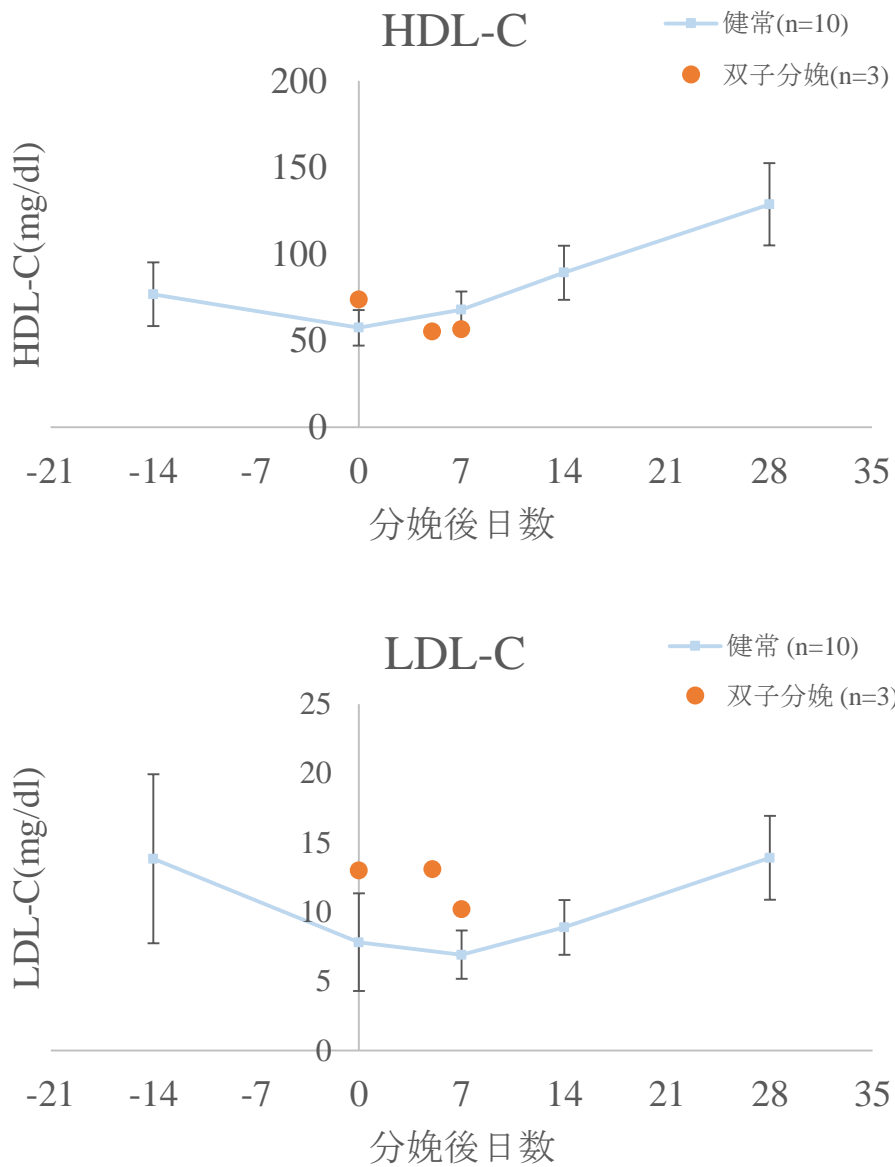


図 4-25 周産期疾患発症牛のうち双子分娩した 3 頭の HDL-C および LDL-C 測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。
健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

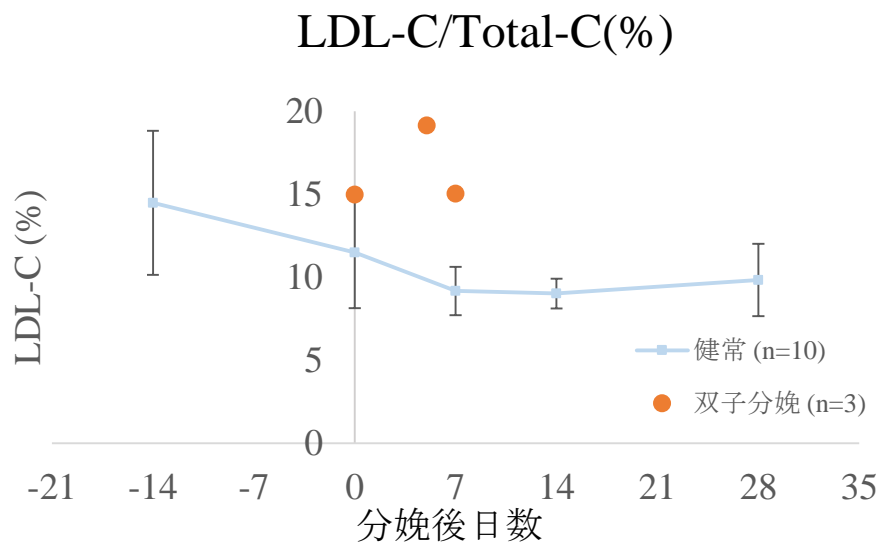
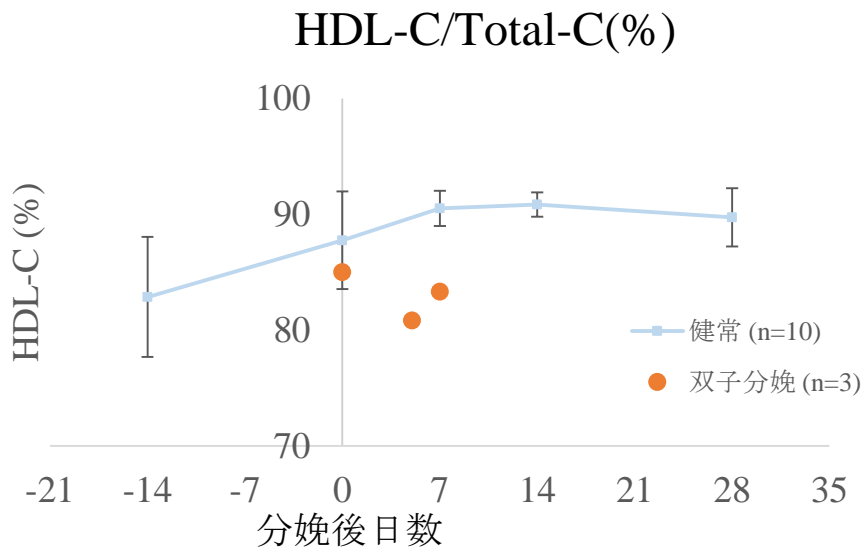


図 4-26 周産期疾患発症牛のうち双子分娩した 3 頭の HDL-C/Total-C(%)

および LDL-C/Total-C(%)測定値と分娩前後の健常牛 10 頭の

分娩前後における推移。健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

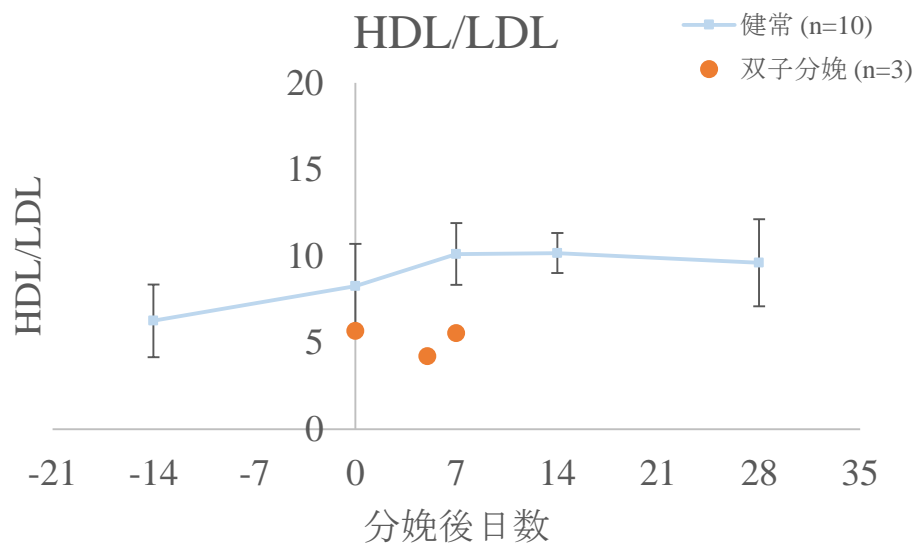


図 4-27 周産期疾患発症牛のうち双子分娩した 3 頭の HDL/LDL 比と

分娩前後の健常牛 10 頭の分娩前後における推移。

健常牛の推移は平均値±標準偏差で示す。

表 4-3 脂肪肝群(n=6)、第四胃変位群(n=6)、乳熱群(n=7)および双子分娩群(n=3)

における産歴、分娩後日数、および血液生化学検査項目測定値。

表示は平均値±標準偏差で示す。

	脂肪肝 (n=6)	第四胃変位 (n=6)	乳熱 (n=7)	双子分娩 (n=3)
産歴	3.8 ± 0.8	3.5 ± 0.8	3.7 ± 0.5	3.3 ± 0.6
分娩後日数	6.8 ± 7.2	4.8 ± 2.0	1.3 ± 1.7	4.0 ± 1.6
BCS	3.3 ± 0.8	3.2 ± 0.4	3.3 ± 0.3	2.8 ± 0.4
TP (mg/dl)	6.8 ± 0.5	7.3 ± 0.5	6.8 ± 0.1	7.0 ± 0.2
Alb (g/dl)	3.4 ± 0.4	3.5 ± 0.6	3.5 ± 0.3	3.4 ± 0.5
T-Bil (mg/dl)	1.1 ± 0.3	0.6 ± 0.4	0.5 ± 0.4	0.7 ± 0.5
GOT (IU/l)	214.0 ± 123.7	142.2 ± 52.8	84.3 ± 20.1	125.7 ± 20.0
γ - GPT (IU/l)	32.7 ± 10.7	27.1 ± 10.8	25.4 ± 3.6	26.5 ± 3.2
BUN (mg/dl)	13.7 ± 3.8	12.8 ± 4.4	14.1 ± 2.1	16.7 ± 2.5
Cre (mg/dl)	1.0 ± 0.2	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.3	1.0 ± 0.2
Ca (mg/dl)	9.9 ± 2.7	9.2 ± 1.4	5.7 ± 1.1	7.2 ± 1.2
iP (mg/dl)	6.2 ± 2.2	5.1 ± 1.6	2.6 ± 1.3	4.7 ± 1.4
Glu (mg/dl)	70.8 ± 55.9	60.5 ± 25.9	65.3 ± 58.0	90.0 ± 58.1
Mg (mg/dl)	1.8 ± 0.3	1.9 ± 0.3	2.5 ± 0.5	1.7 ± 0.2
PL (mg/dl)	78.2 ± 13.2	77.0 ± 10.5	63.9 ± 14.2	79.0 ± 14.1
NEFA (μEQ/l)	1331.3 ± 196.5	1538 ± 739.9	863.1 ± 463.8	1281.7 ± 463.0

総括

第1章 序論

乳牛は泌乳をするため常に脂質代謝が盛んに行われる。特に分娩前は胎児への栄養供給に、分娩後は乳量の確保のために、脂質代謝は著しい変動を示す。この分娩前後の脂質代謝に支障をきたすと脂肪肝発症へ進行し、様々な悪影響を及ぼす。そこで本研究では乳牛の脂質代謝で中心的な役割を果たすリポタンパク質分画に着目した。乳牛のリポタンパク質分画の測定は主に超遠心分離法がゴールドスタンダードとして用いられているが、時間と労力を有するほか、高密度リポタンパク質（HDL）分画と低密度リポタンパク質（LDL）分画の分離が不十分で測定精度に問題があるとされている。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法（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正確にかつ迅速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。そこで本研究では第2章においてウシにおいてもAEX-HPLC法によるリポタンパク質分画測定の基礎的検討を行った。続いて第3章において乳質検定や繁殖成績が優良な酪農家と両成績が不良な酪農家でリポタンパク質分画の比較を行った。最後に第4章にて健常乳牛における分娩前後のリポタンパク質分画の推移を調査し、周産期疾患発症牛と比較検討した。上記の検討により牛におけるリポタンパク質分画の測定が脂質代謝を反映する鋭敏な指標になるか、また、周産期疾患の予防に応用できるかを考察した。

第2章 ウシにおけるイオン交換高速液体クロマトグラフィーを用いたリポタンパク質分画測定の基礎的検討

第2章ではAEX-HPLC法による健常乳牛のリポタンパク質分画測定の精度を確認するために、①クロマトグラム波形の確認、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、②AEX-HPLC法と、既存の測定法である超遠心分離法およびゲルろ過（GP-）HPLC法を比較対象とし、測定値の相関を評価した。GP-HPLC法はヒト、イヌおよびネコのリポタンパク質解析に

有用であるとされている。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。同時再現性においては変動係数 (CVs) が各分画ともに 10%以下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。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。以上より、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。さらに、AEX-HPLC 法は①超遠心分離法のように HDL および LDL の密度領域の重複に影響されず、また②GP-HPLC 法のように粒子サイズの重複に影響を受けないことが分かった。これらの結果より AEX-HPLC 法は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わかった。

第3章 飼養形態の異なる2つの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

AEX-HPLC 法を用いて宮城県内の泌乳量および繁殖成績に優れた S 酪農家と両成績が不良の I 酪農家の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。Total-C、HDL-C、LDL-C、IDL-C および VLDL-C の変動に関しては 2 酪農家の間で有意差は認められなかった。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。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、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。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 TG (中性脂肪) 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。。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 4 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

分娩前後の脂質代謝に着目しを検討するために、健康牛 10 頭のリポタンパク質分画の推移を観察した。また、参考値を算出した後、周産期疾患発症牛のリポタンパク質分画と比較を行い、周産期疾患とリポタンパク質分画の関連性を調査した。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、分娩日に最低値を示した後、徐々に増加した。健康牛において LDL-C は分娩予定 4 週間前から低下し、分娩 1 週間後に最低値を示した後、から増加した。健康牛において 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、上昇した。HDL/LDL 比は分娩予定 4 週間前から分娩 2 週間後まで上昇し、その後低下した。LDL-C に関して、超遠心分離法を用いた過去の報告では、分娩日に最低値を示した後、上昇するとされてきたが、AEX-HPLC 法では分娩 1 週間後に最低値を示した後、上昇するという推移をとった。これは分娩直後において肝臓からの VLDL を介した TG 供給の遅れにより、LDL-C 合

成に遅れが生じたものと考えられた。このことから AEX-HPLC 法は超遠心分離法では解明できなかった分娩前後の脂質代謝の詳細を検査可能であることが考えられた。次に、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、脂肪肝および乳熱群において Total-C, HDL-C および LDL-C および LDL-C/Total-C(%)が低値を示す症例が認められた。において各疾患で特徴的な変化が認められた。これは食欲低下や栄養吸収阻害に伴い肝臓から 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。このようにリポタンパク質分画の測定は周産期疾患と関連があると示唆され、脂質代謝を反映する鋭敏なマーカーとなるのではないかと考えられた。

以上より、AEX-HPLC 法を用いることで高い信頼性をもって、ウシのリポタンパク質分画の測定を行うことが可能となった。また、リポタンパク質分画の中でも LDL-C および LDL-C/Total-C(%)は優良牛群および不良牛群の発見に有効なマーカーになりうるということが考えられた。は分娩後のエネルギー代謝を反映する良いマーカーとなることが分かった。さらに AEX-HPLC 法は超遠心分離法ではできなかった分娩前後の脂質代謝の詳細を検査可能であり、周産期疾患発症牛の LDL-C の測定は肝臓からの脂質排出を予測するマーカーになり、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。

謝辞

本稿にを終わるに臨み、本研究に終始御指導御助言を賜りました日本獣医生命科学大学 獣医保健看護学科臨床部門 左向敏紀教授、森昭博講師、小田民美助教に心から深謝致します。

また、本研究において多大なるご支援、ご協力を頂きました埼玉県立大学 健康開発学科 廣渡祐史准教授、株式会社富士フィルムモノリス、株式会社東ソー、株式会社スカイライトバイオテックの皆様には厚く御礼申し上げます。

また、本研究において多大なるご支援、ご協力賜りました日本獣医生命科学大学 獣医保健看護学科臨床部門 石岡克己准教授、水越美奈准教授、松原孝子准教授、皆上大吾准教授、百田豊講師に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究に多大なるご協力を賜りました日本獣医生命科学大学 獣医保健看護学科臨床部門・代謝栄養学班ならびに室員各位に心から感謝致します。

参考文献

Abuelo A, Hernández J, Benedito JL, Castillo C. Oxidative stress index (OSi) as a new tool to assess redox status in dairy cattle during the transition period. *Animal*. 2013 Aug;7(8):1374-8.

Abuelo A, Hernández J, Benedito JL, Castillo C. Association of oxidative status and insulin sensitivity in periparturient dairy cattle: an observational study. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*. 2016 Apr;100(2):279-86.

Aizawa Y, Seki N, Nagano T, Abe H. Chronic hepatitis C virus infection and lipoprotein metabolism. *World J Gastroenterol*. 2015 Sep 28;21(36):10299-313.

Akamatsu H, Saitoh Y, Serizawa M, Miyake K, Ohba Y, Nakashima K. Changes of serum 3-methylhistidine concentration and energy-associated metabolites in dairy cows with ketosis. *J Vet Med Sci*. 2007 Oct;69(10):1091-3.

Baginsky ML, Brown WV. Differential characteristics of purified hepatic triglyceride lipase and lipoprotein lipase from human postheparin plasma. *J Lipid Res*. 1977 Jul;18(4):423-37.

Bauchart, D. 1993. Lipid absorption and transport in ruminants. *J. Dairy. Sci.*, 76: 3864-3881.

Bauchart D, Durand D, Laplaud PM, Forgez P, Goulinet S, Chapman MJ. Plasma lipoproteins and apolipoproteins in the preruminant calf, *Bos spp*: density distribution, physicochemical properties, and the in vivo evaluation of the contribution of the liver to lipoprotein homeostasis. *J Lipid Res*. 1989 Oct;30(10):1499-514.

Brantmeier SA, Grummer RR, Ax RL. Concentrations of high density

lipoproteins vary among follicular sizes in the bovine. *J Dairy Sci.* 1987 Oct;70(10):2145-9.

Chapman MJ. Animal lipoproteins: chemistry, structure, and comparative aspects. *J Lipid Res.* 1980 Sep;21(7):789-853.

Chapman MJ. Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. *Methods Enzymol.* 1986;128:70-143.

Cordle, S. R., R. A. Clegg, and S. J. Yeaman. 1985. Purification and characterization of bovine lipoproteins: resolution of high density and low density lipoproteins using heparin-Sepharose chromatography. *J. Lipid. Res.*, 26: 721-725.

Cordle SR, Yeaman SJ, Clegg RA. Salt-resistant (hepatic) lipase. Evidence for its presence in bovine liver and adrenal cortex. *Biochim Biophys Acta.* 1983 Sep 20;753(2):213-9.

Davis RA, Prewett AB, Chan DC, Thompson JJ, Borchardt RA, Gallaher WR. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins: immunologic characterization of apolipoprotein B in lipoproteins and hepatic membrane fractions and its intracellular distribution. *J Lipid Res.* 1989 Aug;30(8):1185-96.

Darul K, Kruczynska H. Changes in selected parameters in cows blood involved in pregnancy and lactation. *Acta Sci Pol, Medicina Veterinaria* 2005 4: 73-86.

De Koster JD, Opsomer G. Insulin resistance in dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2013 Jul;29(2):299-322.

Devine PJ, Perreault SD, Luderer U. Roles of reactive oxygen species and antioxidants in ovarian toxicity. *Biol Reprod.* 2012 Feb;86(2):27.

Drackley JK. ADSA Foundation Scholar Award. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier? *J Dairy Sci.* 1999 Nov;82(11):2259-73.

Eddy RG, Davies O, David C. An economic assessment of twin births in British dairy herds. *Vet Rec.* 1991 Dec 14;129(24):526-9.

Feingold KR, Grunfeld C. Introduction to Lipids and Lipoproteins. 2015 Jun 10. In: De Groot LJ, Chrousos G, Dungan K, Feingold KR, Grossman A, Hershman JM, Koch C, Korbonits M, McLachlan R, New M, Purnell J, Rebar R, Singer F, Vinik A, editors. *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-.

Felsenfeld AJ, Levine BS. Milk alkali syndrome and the dynamics of calcium homeostasis. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006 Jul;1(4):641-54.

Fenwick MA, Fitzpatrick R, Kenny DA, Diskin MG, Patton J, Murphy JJ, Wathes DC. Interrelationships between negative energy balance (NEB) and IGF regulation in liver of lactating dairy cows. *Domest Anim Endocrinol.* 2008 Jan;34(1):31-44.

Forte TM, Bell-Quint JJ, Cheng F. Lipoproteins of fetal and newborn calves and adult steer: a study of developmental changes. *Lipids.* 1981 Apr;16(4):240-5.

Frohlich J, McLeod R, Hon K. Lecithin: cholesterol acyl transferase (LCAT). *Clin Biochem.* 1982 Dec;15(6):269-78.

Gardner R. S., N. H. Ogden, P. J. Cripps, and D. Billington. 2003. Separation of Bovine Plasma Lipoproteins by a Rapid Ultracentrifugation Method. *J. Comp. Path.*, 128: 15-23.

Geelen MJ, Harris RA, Beynen AC, McCune SA. Short-term hormonal control of hepatic lipogenesis. *Diabetes*. 1980 Dec;29(12):1006-22.

Geishauser T. Abomasal displacement in the bovine--a review on character, occurrence, aetiology and pathogenesis. *Zentralbl Veterinarmed A*. 1995 Jun;42(4):229-51.

Glascok RF, Welch VA. Contribution of the fatty acids of three low density serum lipoproteins to bovine milk fat. *J Dairy Sci*. 1974 Nov;57(11):1364-70.

Gleockler DH, Ferreri LF, Flaim E. Lipoprotein patterns in normal lactating Holstein cows bled at various times: effects of milking. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1980 Oct;165(1):118-22.

Gross J, van Dorland HA, Bruckmaier RM, Schwarz FJ. Performance and metabolic profile of dairy cows during a lactational and deliberately induced negative energy balance with subsequent realimentation. *J Dairy Sci*. 2011 Apr;94(4):1820-30.

Gross JJ, Kessler EC, Albrecht C, Bruckmaier RM. Response of the cholesterol metabolism to a negative energy balance in dairy cows depends on the lactational stage. *PLoS One*. 2015 Jun 2;10(6):e0121956. doi: 10.1371/journal.pone.0121956.

Gruffat D, Piot C, Durand D, Bauchart D. Developmental changes in

apolipoprotein B gene expression in the liver of fetal calves. *Biol Neonate*. 1998;74(3):233-42.

Grummer RR. 1993. Etiology of lipid-related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy. Sci.*, 76: 3882-3896.

Grummer RR, Carroll DJ. A review of lipoprotein cholesterol metabolism: importance to ovarian function. *J Anim Sci*. 1988 Dec;66(12):3160-73.

Grummer RR, Davis CL, Hegarty HM. Comparison of ultracentrifugation and gel filtration for the isolation of bovine lipoproteins. *Lipids*. 1983 Nov;18(11):795-802.

Grummer RR, Davis CL. Plasma concentration and lipid composition of lipoproteins in lactating dairy cows fed control and high grain diets. *J Dairy Sci*. 1984 Dec;67(12):2894-901.

Harrison FA, Leat WM, Forster A. Absorption of maize oil infused into the duodenum of the sheep. *Proc Nutr Soc*. 1974 Dec;33(3):101A-102A.

Hasanpour A, Saranjam N, Amuoghli Tabrizi B. Antioxidant concentration status in the serum of cows with left displacement abomasum. 2011. *Global Veterinaria* 7: 478-481.

Hayirli A. The role of exogenous insulin in the complex of hepatic lipidosis and ketosis associated with insulin resistance phenomenon in postpartum dairy cattle. *Vet Res Commun*. 2006 Oct;30(7):749-74.

Herdt TH. Fatty liver in dairy cows. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 1988 Jul;4(2):269-87.

Herdt TH, Smith JC. Blood-lipid and lactation-stage factors affecting serum vitamin E concentrations and vitamin E cholesterol ratios in dairy cattle. *J Vet Diagn Invest.* 1996 Apr;8(2):228-32.

Hirowatari, Y., H. Yoshida, H. Kurosawa, K. Doumitu, and N. Tada 2003. Measurement of cholesterol of major serum lipoprotein classes by anion-exchange HPLC with perchlorate ion-containing eluent. *J. Lipid. Res.*, 44: 1404-1412.

Hirowatari, Y., H. Yoshida, H. Kurosawa, Y. Shimura, H. Yanai, and N. Tada. 2010. Analysis of cholesterol levels in lipoprotein(a) with anion-exchange chromatography. *J. Lipid. Res.*, 51: 1237-1243.

Hirowatari, Y., H. Yoshida, Y. Fueki, M. Ito, Y. Ogura, N. Sakurai, and T. Miida. 2008. Measurement of cholesterol concentrations of major serum lipoprotein classes in haemodialysis patients by anion-exchange chromatography. *Ann. Clin. Biochem.*, 45: 571–574.

Hirowatari, Y., M. Kon, Y. Shimura, S. Hirayama, and T. Miida. 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.

Jeon US. Kidney and calcium homeostasis. *Electrolyte Blood Press.* 2008 Dec;6(2):68-76.

Jonas A. Isolation and partial characterization of the major apolipoprotein component of bovine serum high density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta.* 1975 Jun 26;393(2):460-70.

Jonas A. Physicochemical properties of bovine serum high density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1972 Dec 10;247(23):7767-72.

Kauppinen K. ALAT, AP, ASAT, GGT, OCT activities and urea and total bilirubin concentrations in plasma of normal and ketotic dairy cows. *Zentralbl Veterinarmed A.* 1984 Sep;31(8):567-76.

Kessler, E. C., J. J. Gross, R. M. Bruckmaier, and C. Aibrecht. 2014. Cholesterol metabolism, transport, and hepatic regulation in dairy cows during transition and early lactation. *J. Dairy. Sci.*, 97: 5481-5490.

Khoo JC, Aquino AA, Steinberg D. The mechanism of activation of hormone-sensitive lipase in human adipose tissue. *J Clin Invest.* 1974 Apr;53(4):1124-31.

Kleppe BB, Aiello RJ, Grummer RR, Armentano LE. Triglyceride accumulation and very low density lipoprotein secretion by rat and goat hepatocytes in vitro. *J Dairy Sci.* 1988 Jul;71(7):1813-22.

Kurpińska AK, Jarosz A, Ożgo M, Skrzypczak WF. 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.* 2015;18(2):291-8.

Laplaud PM, Bauchart D, Durand D, Beaubatie L, Chapman MJ. Intestinal lymph and plasma lipoproteins in the preruminant calf: partial resolution of particle heterogeneity in the 1.040-1.090 g/ml interval. *J Lipid Res.* 1991 Sep;32(9):1429-39.

Laplaud PM, Bauchart D, Durand D, Chapman MJ. Lipoproteins and apolipoproteins in intestinal lymph of the preruminant calf, *Bos spp.*, at peak lipid absorption. *J Lipid Res.* 1990 Oct;31(10):1781-92.

Li X, Guan Y, Li Y, Wu D, Liu L, Deng Q, Li X, Wang Z, Liu G. Effects of insulin-like growth factor-1 on the assembly and secretion of very low-density lipoproteins in cow hepatocytes in vitro. *Gen Comp Endocrinol.* 2016 Jan 15;226:82-7.

Liu GW, Zhang ZG, Wang JG, Wang Z, Xu C, Zhu XL: Insulin receptor gene expression in normal and diseased bovine liver. *J Comp Pathol.* 2010, 143 (4): 258-261.

Löhrke B, Derno M, Hammon H, Metges C, Melcher J, Viergutz T, Jentsch W, Zühlke H. Nutritional level and energetic source are determinants of elevated circulatory lipohydroperoxide concentration. *Br J Nutr.* 2008 Jun;99(6):1255-65.

Löhrke B, Viergutz T, Kanitz W, Losand B, Weiss DG, Simko M. Short communication: hydroperoxides in circulating lipids from dairy cows: implications for bioactivity of endogenous-oxidized lipids. *J Dairy Sci.* 2005

Mahley RW, Innerarity TL, Rall SC Jr, Weisgraber KH. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. *J Lipid Res.* 1984 Dec 1;25(12):1277-94.

Mahley RW, Innerarity TL. Lipoprotein receptors and cholesterol homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 1983 May 24;737(2):197-222.

Manita, D., Y. Hirowatari, and H. Yoshida. 2015. A rapid anion-exchange chromatography for measurement of cholesterol concentrations in five lipoprotein classes and estimation of lipoprotein profiles in male volunteers without overt diseases. *Ann. Clin. Biochem.*, 52: 638-646.

Manka, P., V. Olliges, L. P. Bechmann, M. Schlattjan, C. Jochum, J. W. Treckmann, F. N. Saner, G. Gerken, W. K. Syn, and A. Canbay. 2014. Low levels of blood lipids are associated with etiology and lethal outcome in acute liver failure., *PLoS One* 9: e102351.

Mazur A, Ayrault-Jarrier M, Chilliard Y, Rayssiguier Y. Lipoprotein metabolism in fatty liver dairy cows. *Diabete Metab.* 1992;18(1 Pt 2):145-9.

Mazur A, Rayssiguier Y. [Lipoprotein profile of the lactating cow]. *Ann Rech Vet.* 1988;19(1):53-8.

Mills GL, Taylaur CE. The distribution and composition of serum lipoproteins in eighteen animals. *Comp Biochem Physiol B.* 1971 Oct;40(2):489-501.

Minuti A, Ahmed S, Trevisi E, Piccioli-Cappelli F, Bertoni G, Jahan N, Bani P. Experimental acute rumen acidosis in sheep: consequences on clinical, rumen, and gastrointestinal permeability conditions and blood chemistry. *J Anim Sci.* 2014 Sep;92(9):3966-77.

Miyamoto, T., Y. Sugiyama, J. Suzuki, T. Oohashi, and Y. Takahashi. 2006. Determination of bovine serum low-density lipoprptein cholesterol using the N-geneous mwthod. *Vet. Res. Commun.*, 30: 467-474.

Mizutani H, Sako T, Arai N, Kuriyama K, Yoshimura I, Mori A, Iwase K, Hirose H. Application of gel permeation HPLC for lipoprotein profiling in dogs.

J Vet Med Sci. 2010 Jun;72(6):813-7.

Mizutani H, Sako T, Okuda H, Arai N, Kuriyama K, Mori A, Yoshimura I, Koyama H. Analysis of lipoprotein profiles of healthy cats by gel-permeation high-performance liquid chromatography. J Vet Med Sci. 2016 Sep 1;78(8):1277-81.

Møller PD. Acidosis in dairy cows. Acta Vet Scand Suppl. 1993;89:111-2.

Morrow DA, Hillman D, Dade AW, Kitchen YJ. 1979. Clinical investigation of a dairy herd with the fat cow syndrome. Am Vet Med Assoc. Jan 15; 174(2):161-7.

Newman, A., S. Mann., D. V. Nydam., T. R. Overton., and E. Behling-Kelly. 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.

Nielen M, Schukken YH, Scholl DT, Wilbrink HJ, Brand A. Twinning in dairy cattle: A study of risk factors and effects. Theriogenology. 1989 Nov;32(5):845-62.

Oikawa S, Katoh N. Decreases in serum apolipoprotein B-100 and A-I concentrations in cows with milk fever and downer cows. Can J Vet Res. 2002 Jan;66(1):31-4.

Oikawa S, Katoh N, Kawawa F, Ono Y. Decreased serum apolipoprotein B-100 and A-I concentrations in cows with ketosis and left displacement of the abomasum. Am J Vet Res. 1997 Feb;58(2):121-5.

Okazaki M., Usui S., Fukui A., Kubota I., Tomoike H. Component analysis of HPLC profiles of unique lipoprotein subclass cholesterol for detection of coronary artery disease. *Clin. Chem.*, 52, 2049-2053 (2006)

Okazaki M., Usui S., Ishigami M., Sakai N., Nakamura T., Matsuzawa Y., Yamashita S. Identification of unique lipoprotein subclasses for visceral obesity by component analysis of cholesterol profile in high-performance liquid chromatography. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25, 578-584 (2005).

Palmquist DL. A kinetic concept of lipid transport in ruminants. *J Dairy Sci.* 1976 Mar; 59(3):355-63.

Patel OV, Takenouchi N, Takahashi T, Hirako M, Sasaki N, Domeki I. Plasma oestrone and oestradiol concentrations throughout gestation in cattle: relationship to stage of gestation and fetal number. *Res Vet Sci.* 1999 Apr; 66(2):129-33.

Pösö AR, Saukko TM, Tesfa AT, Lindberg L. Fat infiltration in liver and activity of lecithin:cholesterol acyltransferase in serum of dry and lactating dairy cows. *Res Vet Sci.* 2000 Apr; 68(2):169-73.

Puppione DL, Kunitake ST, Toomey ML, Loh E, Schumaker VN. Physicochemical characterization of ten fractions of bovine alpha lipoproteins. *J Lipid Res.* 1982 Mar; 23(3):371-9.

Quincey D, Fresnel J, Le Goff D, Silberzahn P. Distribution, composition and image analysis of plasma lipoproteins in steroid-treated calves. *Horm Metab Res.* 1989 Sep; 21(9):473-9.

Quincey D, Le Goff D, Fresnel J, Nouvelot A. Qualitative and quantitative

alterations of bovine serum lipoproteins with ageing. *Comp Biochem Physiol B*. 1987;88(3):929-37.

Raphael BC, Dimick PS, Puppione DL. Lipid characterization of bovine serum lipoproteins throughout gestation and lactation. *J Dairy Sci*. 1973 Aug;56(8):1025-32.

Roberts CJ, Reid IM, Rowlands GJ, Patterson A. 1981. A fat mobilisation syndrome in dairy cows in early lactation. *Vet Rec*. Jan 3; 108(1):7-9.

Rukkwamsuk T, Kruip TA, Wensing T. Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cows during the postparturient period. *Vet Q*. 1999 Jun;21(3):71-7.

Silva-del-Río N, Fricke PM, Grummer RR. Effects of twin pregnancy and dry period feeding strategy on milk production, energy balance, and metabolic profiles in dairy cows. *J Anim Sci*. 2010 Mar;88(3):1048-60.

Sordillo LM, Aitken SL. Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009 Mar 15;128(1-3):104-9.

Stead D, Welch VA. Lipid composition of bovine serum lipoproteins. *J Dairy Sci*. 1975 Jan;58(1):122-7.

Tall AR. Plasma cholesteryl ester transfer protein. *J Lipid Res*. 1993 Aug;34(8):1255-74.

Tall AR, Puppione DL, Kunitake ST, Atkinson D, Small DM, Waugh D. Organization of the core lipids of high density lipoproteins in the lactating

bovine. *J Biol Chem.* 1981 Jan 10;256(1):170-4.

Tan MH. The lipoprotein lipase system: new understandings. *Can Med Assoc J.* 1978 Mar 18;118(6):675-80.

Turk R, Juretić D, Geres D, Turk N, Rekić B, Simeon-Rudolf V, Robić M, Svetina A. Serum paraoxonase activity in dairy cows during pregnancy. *Res Vet Sci.* 2005 Aug;79(1):15-8.

Turk, R., O. Podpečan., J. Mrkun., Z. Flegar-Meštrić., S. Perkov., and P. Zrimšek. 2015. The Effect of Seasonal Thermal Stress on Lipid Mobilisation, Antioxidant Status and Reproductive Performance in Dairy Cows. *Reprod. Domest. Anim.*, 50: 595-603.

Usui S, Nakamura M, Jitsukata K, Nara M, Hosaki S, Okazaki M. Assessment of between-instrument variations in a HPLC method for serum lipoproteins and its traceability to reference methods for total cholesterol and HDL-cholesterol. *Clin Chem.* 2000 Jan;46(1):63-72.

Vailati-Riboni M, Kanwal M, Bulgari O, Meier S, Priest NV, Burke CR, Kay JK, McDougall S, Mitchell MD, Walker CG, Crookenden M, Heiser A, Roche JR, Looor JJ. Body condition score and plane of nutrition prepartum affect adipose tissue transcriptome regulators of metabolism and inflammation in grazing dairy cows during the transition period. *J Dairy Sci.* 2016 Jan;99(1):758-70.

Van den Top, A. M., A. Van Tol., H. Jansen., M. J. Geelen., and A. C. Beynen. 2005. Fatty liver in dairy cows post partum is associated with decreased concentration of plasma triacylglycerols and decreased activity of lipoprotein lipase in adipocytes. *J. Dairy. Res.*, 72: 129-137.

Van den Top, A. M., T. Wensing., M. J. Geelen., G. H. Wentink., A. T. Van't Klooster., and A. C. Beynen. 1995. Time trends of plasma lipid and enzymes synthesizing hepatic triacylglycerol during post-partum development of fatty liver in dairy cows. *J. Dairy. Sci.*, 78: 2208-2220.

Van Saun RJ, Idleman SC, Sniffen CJ. Effect of undegradable protein amount fed prepartum on postpartum production in first lactation Holstein cows. *J Dairy Sci.* 1993 Jan;76(1):236-44.

Wathes DC, Fenwick MA, Llewellyn S, Cheng Z, Fitzpatrick R, McCarthy SD, Morris DG, Patton J, Murphy JJ: Influence of energy balance on gene expression in the liver and reproductive tract of lactating cows and consequent effects on fertility. XXV Jubilee World Buiatrics Congress Hungarian Association for Buiatrics 2008. 2008, Budapest, Hungary, 158-171.

Weitzel JM, Vernunft A, Krüger B, Plinski C, Viergutz T. LOX-1 regulates estrogenesis via intracellular calcium release from bovine granulosa cells. *Cytometry A.* 2014 Jan;85(1):88-93.

津田恒之、小原嘉昭、加藤和雄、荻野顕彦、佐々田比呂志著 家畜生理学 2004 第二次改訂増補

杉本恒明、矢崎義雄著 内科学 第10版 朝倉書店