

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)

学位論文の内容の要約

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

高 橋 知 也

(指導教員：左向 敏紀)

## 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。特に分娩前は胎子への栄養供給に、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)と低密度リポタンパク質(LDL)に共存密度領域が存在するため分離が不十分であり、測定精度に問題があるとされてきた。近年、ヒトおよびウサギにおいてイオン交換高速液体クロマトグラフィー(AEX-HPLC)法で高密度リポタンパク質(HDL-C)、低密度リポタンパク質(LDL-C)、中間密度リポタンパク質(IDL-C)および超低密度リポタンパク質(VLDL-C)といったリポタンパク質分画を迅速かつ正確に測定できるようになった。しかしウシにおいてAEX-HPLC法による解析は応用されていない。そこで本研究では第2章においてAEX-HPLC法におけるウシのリポタンパク質分画測定の基礎的検討を行った。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飼養されている牛群の泌乳ステージごとの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。

## 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、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法はヒトおよび犬のリポタンパク質解析に有用であるとされており、リポタンパク質分画の粒子サイズから分離を行っている。。AEX-

HPLC 法のクロマトグラムは、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 (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。日差再現性の分析評価は、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 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。しかしながら、ウシの HDL と LDL は密度領域および粒子サイズが類似していることが報告されており、分離が不十分であることが考えられる。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が優れた S 酪農家と両成績が不良な I 酪農家で飼養された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調査した。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肝臓から乳腺へ VLDL を介した TG (中性脂肪) の運搬が盛んに行われる結果、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

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た。また、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 週間前から分娩日まで低下し、分娩後、徐々に増加した。LDL-C は分娩予定 4 週間前から低下し、分娩 1 週間後から増加した。LDL-C/Total-C(%) は分娩予定 4 週間前から低下し、分娩 2 週間後で最低値を示した後、上昇した。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常牛の推移と比較したところ、脂肪肝および乳熱群において LDL-C および LDL-C/Total-C(%)が低値を示す症例が認められた。これは食欲低下や栄養吸収障害に伴い肝臓から VLDL 排出が低下し、VLDL→IDL→LDL という代謝経路の不活化が生じたものと考えられた。このことから、周産期疾患発症牛の LDL-C を測定することで、肝臓からの脂質排出を予測し、治療の介入に利用できる可能性が示唆された。

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、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ことが考えられた。。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。