

## 論文審査の結果の要旨

申請者名 高橋 知也

乳牛は分娩後、泌乳という莫大なエネルギー量を確保しながら、脂質代謝を盛んに行い、日々恒常性を保っている。特に分娩前の胎子への栄養供給や、分娩後の急激な乳量確保のために、体脂肪動員をすることで不足するエネルギーを補うなど、分娩前後の脂質代謝は著しい変動を示している。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する。ウシの周産期疾患発症と脂肪肝は密接な関わりがあるという報告は数多い。このように乳牛と脂質代謝には深い関わりがあり、リポタンパク質を含めた詳細な脂質代謝のモニタリングが必要と考えられている。しかしながら、ウシのリポタンパク質分画の主な測定法である超遠心分離法は、時間と労力を有するほか、ウシの HDL と LDL に共存密度領域が存在することから、分離が不十分となり、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。本研究ではこの AEX-HPLC 法によるリポタンパク質分画の測定に着目し、乳牛においても測定が可能か基礎的検討を行っている。さらに泌乳量や繁殖成績が優良な酪農家と不良な酪農家で飼養されている牛群を泌乳ステージごとに分けてリポタンパク質分画の比較を行うとともに、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、周産期疾患発症牛と比較を行い、臨床現場において AEX-HPLC 法によるウシのリポタンパク質分画測定の有用性を検討したものである。

第 2 章ではウシにおけるイオン交換高速液体クロマトグラフィー法を用

いたりポタンパク質分画測定の基礎的検討を行っている。試験 1 では、AEX-HPLC 法による乳牛のリポタンパク質分画測定精度を確認するために、6 頭のホルスタイン種成乳牛を用いて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ている。AEX-HPLC 法によるクロマトグラムは HDL と LDL の溶出分画が分離され、また、各々の溶出分画に大きなズレはみられなかった。また、ウシの IDL および VLDL は微量のため測定値の変動率が不安定となったが、HDL および LDL に関しては、同時再現性、日差再現性および希釈直線性ともに良好な CV 値を示したことから、AEX-HPLC 法は HDL および LDL において信頼できる測定法であると評価した。

試験 2 では、AEX-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、測定値の相関関係を検討している。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、超遠心分離法は HDL および LDL の密度領域の重複により分離が不十分であり、GP-HPLC 法は HDL および LDL の粒子径が類似していることから、クロマトグラムの溶出分画が重複し、測定法としては不適と考えられた。以上のことから、AEX-HPLC 法によるウシのリポタンパク分画測定は従来法と比較して最も信頼性のある測定法であることを示した。

第 3 章として、AEX-HPLC 法を用いて泌乳量および繁殖成績が優れた酪農家（優良農家）と両成績が不良な酪農家（不良農家）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を行っている。総コレステロール(Total-C)に対する LDL-C の割合において、2 酪農家間で有意な違いが認められ、優良農家において泌乳最盛期、泌乳中期および泌乳後期で不良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。優良農家と不良農家との間に LDL-C の量および割合に違いが見られたのは、優良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

が増加したとし、VLDL→IDL→LDL という代謝経路が活性化したと考察している。これにより LDL-C の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という画期的なマーカーになる可能性を秘めている。今まで何をもって牛群を評価するか判断しかねるのが現状であったが、将来、LDL-C 量および割合が優良不良の判断の一助になる他、牛群を優良にする目標マーカーになる可能性もあり、評価に値する。

第 4 章では、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について検討している。試験 1 では、脂質代謝が盛んに行われる分娩前後に着目し、AEX-HPLC 方を用いて、健常牛 10 頭のリポタンパク質分画の推移を観察している。Total-C および HDL-C 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、上昇するという過去の報告と同様の推移を示した。しかしながら LDL-C は、過去の超遠心分離法を用いた報告では Total-C および HDL-C と同様の推移をとると報告されてきたが、AEX-HPLC では、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、上昇する推移を示した。この結果は、AEX-HPLC 法は超遠心分離法では解明できなかった分娩後の肝臓からの TG 動員の遅れを解明することができたことを意味する。AEX-HPLC 法は分娩前後の脂質代謝を今まで以上の詳細な検査が可能となり、将来性の高い研究報告であったと評価した。

試験 2 では、周産期疾患発症が分娩前後に発生する脂肪肝と密接な関わりがあると報告されていることに着目し、脂肪肝発症牛、第四胃変位発症牛、および乳熱発症牛のリポタンパク質を試験 1 で求めた健常牛の推移と比較した試験である。脂肪肝発症牛と乳熱の一部で LDL-C が低値を示す症例が存在し、このようなウシは肝臓からの脂肪排出が低下していることが示唆され、また、GOT や  $\gamma$ -GPT と関連しないことから、臨床現場の診断検査の一助になる可能性があるものと評価した。

以上より、本論文は AEX-HPLC 法を用いた乳牛のリポタンパク質分画測

定の有用性を検討したが、今まで以上に HDL と LDL の分離が可能となり、より詳細な脂質代謝をモニタリングすることが可能となった。特に LDL-C は牛群の比較においても、分娩前後のモニタリングにおいても、学術上および応用上貢献するところが少なくない。

よって審査委員一同は、本論文が博士(獣医保健看護学)の学位論文として十分な価値を有するものと認め、合格と判断した。