

## 乳牛の乳期別血漿リポタンパクの変化

誌名	日本獣医畜産大学研究報告 = The bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College
ISSN	03738361
著者	左向, 敏紀 梅原, 正一 長谷川, 承
巻/号	37号
掲載ページ	p. 10-15
発行年月	1988年12月

## 乳牛の乳期別血漿リポタンパクの変化

左向敏紀・梅原正一・長谷川承・坂本隆子・吉村 格\*  
 小山秀一・内野富称・本好茂一

日本獣医畜産大学 獣医内科学教室

\* 日本獣医畜産大学付属 小野田牧場

**要 約** 乳牛の分娩，泌乳に伴うリポ蛋白の変化を調べるため，ホルスタイン種 18 頭を泌乳初期，最盛期，後期，乾乳期の 4 群に分け採血し，薄層アガロースゲル電気泳動法と，超速心法を用い測定した。超速心分離では総脂質で高比重リポ蛋白 (HDL) が最も優位で全体の 80% 以上をしめ，高比重リポ蛋白 1 (HDL 1)，低比重リポ蛋白 (LDL) および超低比重リポ蛋白 (VLDL) の各分画は，ほぼ同量であった。脂質構成で，HDL は総コレステロール (TC) およびリン脂質 (PL) のみで構成され，また HDL 1 もその 80% 以上が TC と PL で構成されていた。VLDL および LDL はその大半がトリグリセライド (TG) であった。各乳期を通して LDL および VLDL は比較的安定した推移を示したが，HDL および HDL 1 は泌乳最盛期に最高値を示した。薄層アガロースゲル電気泳動法では， $\alpha$ -リポ蛋白が優位で HDL と類似した推移を示した。分画像では泌乳最盛期および後期で， $\alpha$ -リポ蛋白と  $\beta$ -リポ蛋白の境界部が基線まで達せず，また  $\alpha$ -リポ蛋白の移行部が  $\beta$ -リポ蛋白側へ引かれ移動幅が広く認められた。このことは，泌乳期には TG-rich の  $\beta$ -リポ蛋白より TG が取り除かれ，TC および PL より構成される  $\alpha$ -リポ蛋白すなわち HDL が増加すると考えられた。

キーワード：リポ蛋白，牛，アガロースゲル電気泳動法

日獣畜大研報，37，10～15，1988.

### 序 文

乳牛の特徴的な脂質代謝の一つに泌乳生理がある。さらに分娩—泌乳—妊娠—分娩という生活環の中で体重の増減が繰り返され，脂質の動員，蓄積による脂質代謝は複雑になっている。近年この生理的条件下における乳牛の飼育形態の集約化，生産性の高度化が要求され，これらに伴うケトosis，脂肪肝等の代謝性疾患が注目されている。これらの病態の解明，診断，把握，および予後の判定には血漿リポタンパクの動態把握が有用と考えられる。しかしながら，乳牛のリポタンパクレベルにおける研究はその報告が少なく不明解な部分も多く残っている。今回乳牛のリポタンパクの各脂質構成の変化と機能を検索するため，各乳期別に血漿を採材した後，薄層アガロースゲルを用いた電気泳動法と，超速心分離法により測定し，比較検討した。

### 材料および方法

供試牛は，群馬県内の一般農家および本大学付属牧場に飼育されている，臨床症状および一般血液検査で正常

なホルスタイン種雌牛 18 頭を，泌乳初期（分娩後 1-4 wks）5 頭，泌乳最盛期（分娩後 5-10 wks）4 頭，泌乳後期（分娩 16-33 wks）5 頭，乾乳期（分娩前 0-15 wks）4 頭の 4 群に分け実験に用いた。

各乳期別に採材した牛血漿の，トリグリセライド (TG)，リン脂質 (PL)，総コレステロール (TC) を酵素法（ヤトロン社製）にて測定し，総脂質量 (TL) は前三者の合計とした。

血漿リポタンパクの分画は，薄層アガロースゲルフィルム (Corning 社) を用い，アーチ電気泳動法で行い，Fat red 7 B で総脂質 (TL) を染色した<sup>2)</sup>。

超速心法は，GRUMMER *et al.* の変法に従い<sup>2)</sup>，比重差により 4 分画した，超低比重リポタンパク (VLDL) は，比重 1.006 g/ml 以下，低比重リポタンパク (LDL) は比重 1.006-1.040 g/ml，高比重リポタンパクの subclass (HDL 1) は 1.040-1.063 g/ml，高比重リポタンパク (HDL) は 1.063-1.210 g/ml とした。そして，各々 TG，PL，TC を，酵素法により測定し，TL は 3 者の合計とした。

結 果

血漿の TL は、泌乳最盛期に最高値を示し、泌乳初期に最低となった (Table 1)。そして初期と最盛期、後期また、最盛期と後期の値とのあいだに各々有意差を認めた。TG は値、および、総脂質中の割合についても各乳期間に有意な変化は認められなかった。PL は、泌乳最盛期が最高、泌乳初期に最低値を示し、初期と後期との間を除く全ての乳期間に有意差が認められた。TC の推移は、PL のそれと類似しており、泌乳最盛期に最高値、泌乳初期に最低値を示した。初期と乾乳期、および、最盛期と後期を除く各乳期間に有意差が認められた。超遠心後の VLDL ( $\rho < 1.006$ ) の構成脂質の総量 (VLDL-TL) は、4つの分画中最低であった (Table 2)。その構成脂質では、TG が VLDL-TL の大部分を占め、 $85.1 \pm 10.37\%$  であった。LDL ( $1.006 < \rho < 1.040$ ) の構成脂質の総量 (LDL-TL) は VLDL よりは高値であったが、有意な差はみられなかった。脂質構成は、TG が、半分以上を占めるが、その割合は平均  $56.1\%$  と VLDL に比べて低く、PL と TC はほぼ同じ割合で含まれていた。HDL 1 ( $0.040 < \rho < 1.063$ ) の構成脂質の総量 (HDL 1-TL) は VLDL-TL、LDL-

TL よりも高値を示してはいたが、有意差は認められなかった。脂質構成は、TC が  $42.8\%$  と高く、TG は  $19.5\%$  と有意に減少していた。HDL ( $1.063 < \rho < 1.210$ ) の構成脂質の総量 (HDL-TL) は、他の3分画に比較し有意に高値を示した。脂質構成は PL と TC が、各々ほぼ  $50\%$  を占めており、TG は認められなかった。

リポタンパク泳動における  $\alpha$ -リポタンパクは泌乳最盛期に最も高く、乾乳期に最低となった (Fig. 1)。そして、群間では、初期と後期の間以外の全てに有意差を認めた。 $\beta$ -リポタンパクは、乾乳期、泌乳最盛期に各々最高値、最低値を示し、初期、後期の間以外の全てに有意差が認められた。

リポタンパクの分画像においては、 $\alpha$ -リポタンパクと  $\beta$ -リポタンパクの境界部が基線にまで達せず、この距離は、泌乳最盛期、泌乳後期において著明であった。また、 $\alpha$ -リポタンパクから  $\beta$ -リポタンパクにかけての移行部が、やはり最盛期、後期に  $\beta$  側へ引かれるようになり、 $\alpha$ -リポタンパクの移動幅が広がる傾向が認められた。これらの特色を有する泳動像は、泌乳最盛期において著明であった。

Table 1. Changes of serum lipids during gestation and lactation.

	TL(mg/dl)	TG(mg/dl)	PL(mg/dl)	TC(mg/dl)
early lactation	245.4±49.25 <sup>ab</sup>	37.8±17.02 (15.1±4.86)	107.0±14.98 <sup>def</sup> (44.5±7.08)	96.8±23.93 <sup>ij</sup> (39.1±4.57)
peak lactation	361.4±71.64 <sup>ac</sup>	41.9±13.60 (12.0±4.00)	165.3±35.09 <sup>dg</sup> (45.6±3.68)	154.8±31.36 <sup>ik</sup> (42.8±1.62)
late lactation	321.9±45.30 <sup>b</sup>	44.5±17.37 (13.7±4.42)	142.5±17.90 <sup>eh</sup> (44.4±3.38)	134.8±31.36 <sup>jl</sup> (42.0±2.48)
dry period	266.3±63.99 <sup>c</sup>	40.1±22.63 (14.3±5.37)	115.3±19.68 <sup>fgh</sup> (44.1±5.79)	110.4±22.81 <sup>kl</sup> (41.6±1.90)

a, b, d, e, g, i, j, k :  $p < 0.01$ , c, f, h, l :  $p < 0.05$

(%)

Table 2. Changes of lipid components in lipoproteins

	TL(mg/dl)	TG(mg/dl)	PL(mg/dl)	TC(mg/dl)
VLDL $\rho < 1.006$	17.2±7.39 <sup>a</sup>	15.1±7.55 <sup>def</sup> (85.1±10.30)イロハ	1.6±1.38 <sup>j</sup> (10.5±10.41)トチリ	0.6±0.38 <sup>mn</sup> (4.4±7.16)ワカヨ
LDL $1.006 < \rho < 1.040$	18.8±8.12 <sup>b</sup>	10.3±3.94 <sup>dgh</sup> (56.1±12.54)イニホ	4.5±3.44 <sup>k</sup> (21.9±17.77)トヌル	4.0±3.52 <sup>op</sup> (22.5±15.50)ワタレ
HDL1 $1.040 < \rho < 1.063$	19.9±11.50 <sup>c</sup>	4.3±3.07 <sup>egi</sup> (19.5±16.27)ロニへ	6.9±5.38 <sup>l</sup> (35.4±18.04)チヌル	8.6±6.35 <sup>mop</sup> (42.8±17.79)カタ
HDL $1.063 < \rho < 1.210$	68.5±61.33 <sup>abc</sup>	0.0±0.00 <sup>fhi</sup> (0.0±0.00)ハホへ	139.2±34.06 <sup>ikl</sup> (51.3±3.90)リルヲ	129.3±29.08 <sup>npq</sup> (49.2±4.14)ヨレ

a, b, c, e, f, g, h, i, j, k, l, n, p, q, イ, ロ, ハ, ニ, ホ, ヘ, チ, リ, ル, カ, ヨ, レ :  $p < 0.001$   
m, ヲ, ワ, タ :  $p < 0.01$ , d, o, ト, ヌ :  $p < 0.05$

(%)

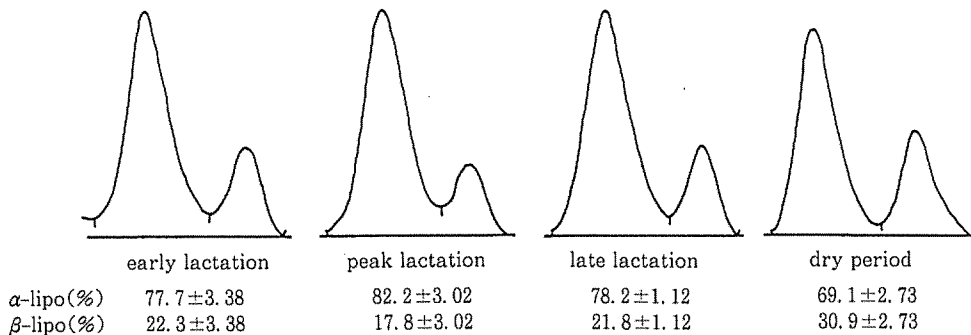


Fig. 1. Changes of lipoprotein electrophoretic patterns of total lipid in cows during gestation and lactation.

## 考 察

乳牛が泌乳のために必要とする栄養素を確保するためには、摂食量の増加は不可欠である。しかし乳牛の摂食量は、分娩後次第に増加するが、最大となるのは8-12週間後である。一方、産乳量のピークはその前にくるので、高泌乳牛のエネルギーバランスはマイナスとなり、その不足分を補正するために体貯蔵エネルギーを利用する。

この乳牛における分娩直前から、摂食量の増加によるエネルギーバランスが平衡状態へ達するまでの間の体重は、分娩後初期の体重減少は著しく<sup>10)</sup>、体重の減少とFFA濃度ピークとの時期が一致していることから体貯蔵エネルギーの動員が活発に行われていることが推察される。

このように、乳牛の分娩—泌乳—妊娠—分娩というサイクルは体内の代謝に大きな影響を与え、これは血清脂質、さらには血清リポタンパクにも影響を及ぼすことが予想される。

血漿中の各脂質構成の推移は、TGにおいて各乳期を通して大きな変動はなく安定していた (Table 1)。これに対して、PLとTCは、泌乳初期から上昇して最盛期にはピークとなり、以後乾乳期にかけて減少するというTLと同様な変化を示していた。これら三者の推移は平塚ら<sup>3)</sup>の報告と同様であった。

超遠心分離法による各分画の脂質構成は、Table 2に示したようにVLDLからLDL, HDL 1, HDL, と比重の増加に伴いTL, PL, TCは増加し、特にHDLはVLDL, LDL, HDL 1に有差な増加を示した。これとは反対にTGは有意に減少しており、HDLでは認められなかった。

またこの各分画の乳期間における変化を見ると、TL

は、VLDL, LDLで泌乳初期から乾乳期にかけて軽い上昇傾向にあるものの有意差はなく安定していたが、HDL 1は泌乳最盛期にピークを示しており、HDLも同様に最盛期にピークがあり、他の乳期との間に有意な差を認めた。さらにTG, PL, TCの各血清脂質を見ると、VLDL, LDL, HDLは乳期間に大きな変化はなく安定した推移を示している。またHDLにおいては各乳期を通してTGは認められず、PL, TCはTLと同様に泌乳初期から最盛期にかけて有意に上昇し、その後乾乳期にかけて有意に減少した。

このような各分画の乳期間における変化を見ると、HDLのTL, TG, PL, TCの変化が、全血清脂質の推移と類似しており、HDLの変化が全血清脂質の推移に反映しているものと推察された。これはHDL分画がTLの80%を占めること、他の分画は乳期による変化が少ないという2点によると考えられる。

このHDLの変化は、アガロースゲル電気泳動法における、 $\alpha$ -リポタンパクの比率の変化とも一致する。 $\beta$ -リポタンパクはTG-richリポタンパク (VLDL, LDL)に相当するといわれている。つまり、この $\alpha$ -リポタンパクと $\beta$ -リポタンパクとの比率の変化は、超遠心分離法における、VLDL, LDLとHDLの推移より $\beta$ -リポタンパクの減少によるのではなく、 $\alpha$ -リポタンパクの増加によるものと推察される。これは、同量の血漿塗布によるアガロースゲル電気泳動法において、 $\alpha$ -リポタンパクを見ると泌乳最盛期、後期、初期、乾乳期の順に染色性が濃く、一方 $\beta$ -リポタンパクには染色性に明確な差は認められなかったことから予想されることである。これらすべての成績が、HDL分画が $\alpha$ 位に泳動されることを意味している。

HDLと共に乳期変化の大きかったHDL 1は直径155  $\mu$ mで、LDL (200-220  $\mu$ m)とHDL (70-100  $\mu$ m)

の中間の大きさである<sup>4)</sup>。また、乳牛以外にラット、ゴマフアザラシ、シャチ、胆汁分泌障害を持つ人にも見られるが、泌乳期の牛には高濃度に含まれる。そして乾乳期にはこの濃度は低下する。これは我々のデータとも一致する。更に、JONAS *et al.*<sup>5)</sup>によれば、未経産牛のリポタンパクには HDL 1 は全く認められなかったとしている。

RAPHAEL *et al.*<sup>1,12)</sup>によれば、泌乳期中に起こる血清脂質増加の 50% は HDL 1 であるとし、これをアガロースゲルフィルムによる電気泳動を行うと最盛期には  $\alpha$ -リポタンパクと  $\beta$ -リポタンパクを認め、乾乳期には主に  $\beta$ -リポタンパクを認めた。またポリアクリルアミドゲルによる電気泳動では、最盛期と、後期に  $\alpha$ -リポタンパクで 2 つの内で HDL に存在する方のバンドを認めたという報告をした。

McCARTHY *et al.*<sup>8)</sup>によれば、泌乳期の血清を分画沈澱法により沈澱した  $\beta$ -リポタンパクに相当する分画を分析していたところ、その脂質構成は超遠心法で分離した  $\alpha$ -リポタンパクの構造に類似していたというのである。

以上のことを総合すると、HDL 1 は泌乳周期を通して TC と PL が、TL の 70-90% を占めること、一方では TG を含んでいることから HDL と LDL の中間に位置する物質と思われる<sup>9)</sup>。つまり HDL 1 は Fig. 1 の泳動像における  $\alpha$ -リポタンパクと  $\beta$ -リポタンパクの境界部に存在すると思われ、泌乳最盛期と後期において、境界部から基線までの距離が広がっていること、また  $\alpha$ -リポタンパクから  $\beta$ -リポタンパクへの移行部が、 $\beta$ -リポタンパク側へ引かれるようになり  $\alpha$ -リポタンパクの移行幅が広がったことは HDL 1 の増加したことを示唆しているものと思われる。このアガロースゲルを利用した電気泳動法によるリポタンパク分画の実験結果は他の研究者のものとも一致している<sup>9)</sup>。

分娩から泌乳最盛期にかけて、泌乳量の増大に伴う乳腺細胞の TG の要求量は増大する。しかし、TG-rich リポタンパクである VLDL と LDL の TL は増加が期待されたが、軽い上昇は見られたものの有意差のない比較的安定した推移を示した。また構成脂質である TG, PL, TC もその割合に変化はみられず安定している。これに対して、HDL の TL は泌乳最盛期をピークとした変化を見せ、HDL 1 においても同様の変化を示している。TG-rich リポタンパクは TG を乳腺細胞に渡した結果、PL, TC-rich リポタンパクである HDL となる<sup>11)</sup>。そしてこの過程における中間産物である HDL 1 は Fig. 1 において泌乳周期に伴う変化で泌乳

最盛期に境界部と基線の距離が広がったばかりか  $\alpha$ -リポタンパクの移行部が  $\beta$ -リポタンパク側へ引かれ  $\alpha$ -リポタンパクの移動幅が広がったことから最盛期には、TG-rich リポタンパクから乳腺細胞への TG の移動が盛んに行われていることが推察された。

また、LIM, C.T. *et al.*<sup>7)</sup>によれば、牛には 5 種類のアポタンパク C (apoC) があり、このうちリポタンパクリパーゼ (LPL) を賦活化させるものは 2 種類であると報告している。apoC は、おもに HDL に含まれ LPL を活性化するが、泌乳期には HDL が増加し、乳腺組織に分布する LPL を活性化し、TG-rich リポタンパクの TG を盛んに乳腺組織内へ取り込むと考えられる。つまり泌乳周期を通して TG-rich リポタンパクに大きな変化が認められないのは、TG-rich リポタンパクの生産と、TG-rich リポタンパクから HDL 1 への異化という 2 つの過程が平衡状態にあると考えられる。

乳牛では、脂肪酸のほとんどが VFA として第一胃から吸収されるため、単胃動物でみられる小腸由来のカイロミクロンの代謝系は、解明されていない。GAGE *et al.*<sup>1)</sup>が暗視野顕微鏡下でその存在を証明した報告があるが、我々の行った 2 つの分画法では、RAPHAEL *et al.*<sup>11)</sup>同様認められなかった。

また今回行った比重差による超遠心法は、人で行う GRUMMER の変法に準じたが、B. HOLLANDERS *et al.*<sup>4)</sup>が行った Rate-zonal 超遠心法では、その分画像が人のものとは異なって 1.035-1.070 に単一のピークを認めたことから乳牛の血漿リポタンパクの超遠心分離法に関しては、今後も検討すべき課題が多いと考えられる。

## 文 献

- 1) GAGE, S.H., and FISH, P.A. (1924). Fat digestion, absorption, and assimilation in man and animals as determined by the dark-field microscope and a fat soluble dye. *Am.J.Anat.* 34, 1.
- 2) GRUMMER, R.R., DAVIS, C.L. and HEGARTY, H.M. (1983). Comparison of ultracentrifugation and gel filtration for the isolation of bovine lipoproteins. *Lipids*, 18, 795-802.
- 3) 平塚博之・横井直美・高橋清志 (1984). 乳牛の分娩前後および各乳期における血清リポタンパクの変化. 畜産の研究, 38, 612-616.
- 4) HOLLANDERS, B., MOUGIN, A., and NOIAYE, F. (1986). Comparison of the lipoprotein profiles obtained from rat, bovine, horse,

- dog, rabbit and pig serum by a new two-step ultracentrifugal gradient procedure. *Comp. Biochem. Physiol.* 84 B, pp. 83-89.
- 5) JONAS, A. (1972). Physicochemical properties of bovine serum high density lipoproteins. *J. Biol. Chem.* 247, 7767.
- 6) 川村明子・林 康之 (1973). ポルーE フィルム システム. *臨床検査*, 17, 77-80.
- 7) LIM, C.T., and SCANU, A.M. (1976). Apoproteins of bovine serum high density lipoproteins: isolation and characterization of the small molecularweight components. *Artery* 2, 482.
- 8) MCCARTHY, R.D., DIMICK, P.C., and PATTON, S. (1966). Field observations on the lipids of cows with depressed milk fat test. *J. Dairy. Sci.*, 49, 205.
- 9) PUPPIONE, D.L., and NICHOLE, A.V. (1970). Characterization of the chemical and physical properties of the serum lipoproteins of certain marine mammals. *Physiol. Chem.*, 2, 49.
- 10) RADLOFF, H.D., SCHULTZ, L.H., and HOEKSTRA, W.G. (1966). Relationship of plasma free fatty acids to other blood components in ruminants under various physiological conditions. *J. Dairy. Sci.*, 49, 179-182.
- 11) RAPHAEL, B.C., DIMICK, P.S., and PUPPIONE, D.L. (1973). Lipid characterization of bovine serum lipoproteins throughout gestation and lactation. *J. Dairy. Sci.*, 56, 1025-1032.
- 12) RAPHAEL, B.C., DIMICK, P.S., and PUPPIONE, D.L. (1973). Electrophoretic characterization of bovine serum lipoprotein throughout gestation and lactation. *J. Dairy. Sci.*, 56, 1411-1414.
-

## Changes of Plasma Lipoprotein during Lactation in Cattle

Toshinori SAKO, Syoichi UMEHARA, Shinogu HASEGAWA, Takako SAKAMOTO,  
Itaru YOSHIMURA\*, Hidekazu KOYAMA, Tomiya UCHINO  
and Sigekatsu MOTOYOSHI

Department of Veterinary Internal Medicine,  
Nippon Veterinary and Zootechnical College

\* Animal Husbandry Experiment Station

## ABSTRACT

We divided 18 Holstein cows into 4 groups, i.e., early lactation, peak lactation, late lactation and dry period, for the purpose of investigating changes in lipoproteins during parturition and lactation and determined blood levels by the thin-layer agarose gel electrophoresis and ultracentrifugation methods. When ultracentrifugation was used, high-density lipoprotein (HDL) was predominant comprising 80% or more of the total. High-density lipoprotein 1 (HDL 1), low-density lipoprotein (LDL) and very-low density lipoprotein (VLDL) were almost equal in amount. With respect to lipid composition, HDL was composed of just total cholesterol (TC) and phospholipid (PL), and 80% or more of HDL 1 was also composed of TC and PL. VLDL and LDL were composed principally of triglycerides (TG). LDL and VLDL were relatively stable throughout the various periods of lactation, but HDL and HDL 1 attained their highest levels during the peak lactation period. When the thin-layer agarose gel technic was used,  $\alpha$ -lipoprotein exhibited changes for the most part resembling HDL. When fraction profiles were examined, in the peak and late lactation periods the boundary between  $\alpha$ -lipoproteins and  $\beta$ -lipoproteins did not reach the baseline, and the  $\beta$ -lipoprotein transition zone was drawn toward the  $\beta$ -lipoprotein side revealing a broad migration band. This may be because TG is removed from TG-rich  $\alpha$ -lipoprotein during the lactation period and  $\beta$ -lipoprotein which is composed of TC and PL, i.e., HDL increases.

**Key words:** lipoprotein, agarose gel electrophoresis, cattle

Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll., No. 37, 10 ~ 15, 1988.