《研究ノート》

ブロイラー (AA-50) 雄ヒナ血漿リポ蛋白質のプロファイル

—Svedberg の浮遊単位—

山 田 一 彦

大阪府立大学農学部獣医学科, 堺市百舌鳥梅町4丁 804

自家ふ化後, 自家配合飼料を用いて規定の二段階育成と管理メニューの下で飼養した, 8 週齢, 体重 1.2 kg のブロイラー, アーバーエーカー50 (AA-50) 雄ヒナのエチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) 処理血漿中には, リポ蛋白質 (LPs) としてクロミクロン (CHYL), 超低比重 LPs (VLDL), 低比重 LPs₂ (LDL₂) および高比重 LPs₂ (HDL₂) の存在が確認された。そして, これら画分の濃度 (mg/100 ml) レベル序列は CHYL>HDL₂>LDL₂>VLDL の通りで, これらのうち, 特に CHYL と HDL₂ の前二者が血漿中総 LPs 量のうちの, それぞれ 48.9% および 43.1% を占めた。

(家禽会誌, 29: 161-164, 1992)

キーワード: 自家配合飼料, AA-50 雄ヒナモデル, EDTA 処理血漿, LPs 浮遊試験法 (Scanu-Ritter's), Svedberg の浮遊単位 (Sf).

家畜の血漿中 LPs には「種」特異性^{1,2)}があり, さらに一部の動物種では, 同一種内に個体特異性^{1,2)}がみられるといわれている。そして, これらの場合に共通する一次的指標として, 血清 LPs の分布型とその濃度レベルの差異があげられている^{1,2)}。しかし, ニワトリにおいては, これらの検討が, まだ十分に行われていない。

そこで本報告では, 白色ロック系の AA-50 雄ヒナ³⁾モデルを用い, LPs 浮遊試験法⁴⁾によって分離・調製したこれらの血漿中各 LPs の Sf 値序列に基づく分布型とそれらの濃度レベルを求めた。

材 料 と 方 法

1. 実験材料

EDTA 血漿 (0.1 g EDTA/100 ml)⁵⁾: 7 時を定刻とする採血当日に 8 週齢, 標準体重 1.2 kg³⁾ の AA-50 雄ヒナ 10 羽から採取した頸静脈血の EDTA 処理血漿を材料とした。

なお, これらのヒナについては, 採血前日に給餌日

1990 年 7 月 27 日受付

Plasma Lipoprotein Profiles of Broiler (AA-50) Cockerels—Flotation Rate, Sf—

Kazuhiko YAMADA

Department of Veterinary Science, College of Agriculture, University of Osaka Prefecture, Osaka 804 (804 Mozu-Umemachi 4-cho, Sakai, Osaka, Japan)

量^{6,7)}のフルフィーディングを確認した。

2. 実験方法

a. 育すう・管理

窪田・星井の方法⁸⁾に従った。

(1) 育すう条件: 湿度 60% 制御下の鶏舎内に, 初生後 0~4 週および 5~10 週の各育すう期に応じて設置した傘型育すう器およびコンクリート床面の平飼区にヒナを収容し, 舎内温度, 飼育密度, 敷料等を一定とした状況で群飼した。なお, この間の明暗条件は 14 時間明 (5:30~19:30) / 10 時間暗とした。

(2) 飼料: ブロイラー・ヒナの二段階育成用飼料メニュー^{6,7)}に基づき自家配合した飼料を給餌日量に従い制限給餌⁸⁾した。給餌にはセルフ・フィーダーを用いた。飼料の配合計算は米国農芸化学系公務員協会 (AOAC) 規定の方法⁹⁾によって測定した飼料中法定規格成分の含量 (%) およびカロリー・蛋白比のデータを参考として行った。

b. 血漿中 LPs の分離・調製と分析

(1) 血漿 LPs の分離・調製法^{5,10,11)}

本実験で用いた LPs 浮遊試験法における主要な精製操作^{5,10)}を表 1 に示した。表中に示した各試料比重の調整は, 数回の測定値に関する誤差 1% 以内¹¹⁾をめどにピクノメトリー¹²⁾によって行った。試料の透析は 0.05 g EDTA/l 生理食塩水 (pH 7.0) によって行った⁵⁾。

表 1. 浮遊試験法による血漿リポ蛋白質の分離法

Table 1. Method for separation of plasma lipoproteins by sequential flotation in the ultracentrifuge

リポ蛋白質クラス Lipoprotein class	一次操作 Initial step	備 考 Remark
EDTA 処理血漿 (0.1 g EDTA/100 ml 血液) EDTA-plasma (0.1 g EDTA/100 ml blood)		
1. CHYL ¹⁾	(1)* d 1.006 (2)* 10,000 g (3)* 10 min. (4)* RPS 25 A	比重 1.006, 同上の超遠心法による再浮上を 2 回くり返す。 Refloated twice at d 1.006 under the same ultracentrifugal condition.
2. VLDL ²⁾	(1)* d 1.006 (2)* 140,000 g (3)* 20 hrs. (4)* RPS 40 T-2	同上 The same as the above.
3. LDL ³⁾	(1)* d 1.063 (2)* 140,000 g (3)* 24 hrs. (4)* RPS 40 T-2	比重 1.019 に調整。上層は LDL ₁ (比重 1.006-1.019)。下層は LDL ₂ (比重 1.019-1.063) を得るために比重 1.063 に調整。 Density was adjusted to d 1.019. Top layer was designated as LDL ₁ (d 1.006-1.019). Undernatant was adjusted to d 1.063 for obtaining LDL ₂ (d 1.019-1.063).
4. HDL ₂ ⁴⁾	(1)* d 1.125 (2)* 150,000 g (3)* 24 hrs. (4)* RPS 40 T	ステップ 3 の超遠心により浮上した LDL を取得後, 沈降 HDL ₂ を比重 1.125 で再浮上。 After the collection of LDL by ultracentrifugation of step 3, HDL ₂ was refloated at d 1.125.
5. HDL ₃ ⁵⁾	(1)* d 1.21 (2)* 150,000 g (3)* 24 hrs. (4)* RPS 40 T	比重 1.21 で再浮上を 3 回くり返す。 Refloated three times at d 1.21.
6. VHDL ₁ ⁶⁾	(1)* d 1.25 (2)* 150,000 g (3)* 24 hrs. (4)* RPS 40 T	きょうざつ物除去のため比重 1.25 で 3 回超遠心。 Repeated three times ultracentrifugation at d 1.25 to remove contaminants.

備 考. 全操作は 15°C で行った。

Remark. All the procedures were conducted at 15°C.

設定比重

(1)* Density adjusted

遠心加速度 (g)

(2)* Centrifugal acceleration (g)

浮遊所要時間

(3)* Time taken for flotation

使用ローターの種類

(4)* Types of rotor employed

キロミクロン

1) CHYL: chylomicron.

超低比重, 低, 高, 超高比重リポ蛋白質

2)-6) VLDL, LDL, HDL and VHDL: very low, low, high and very high density lipoproteins, respectively.

(2) Sf 値の測定および算定法¹³⁻¹⁵⁾

An-D ローター・セル装填の Beckman Spinco Model E 分析用超遠心機¹³⁾を用い、経時的に得られた各画分のフィルムレコード上の界面回転中心からの距離¹⁴⁾を Nikon profile projector Model 6C を用いて直接測定¹³⁾し、定式¹⁵⁾により換算して Sf 値を算定した。また、各試料の粘度、密度および偏比容¹⁵⁾は東芝振動粘度計 VV-1A およびピクノメーターを用い¹³⁾、定法に¹³⁻¹⁵⁾従って測定、算定¹⁵⁾した。

(3) LPs 濃度測定法

HILLYARD らの方法¹⁶⁾に従って定量した画分中脂質と蛋白質量の総和の相対比(%)を原材料血漿の同値に対して求め、その換算実量を、それぞれ LPs 濃度 (mg/100 ml) とした。

結 果

表 2-a および 2-b には、本実験で分取した 4 画分の LPs クラス^{5,10)}ならびにそれらの含有量¹⁷⁾を、ヒト血清 LPs の Sf (1.063) および Sf (1.21) をパラメーター^{5,10)}として同定・分類(表 2-a)するとともにそれらの濃度レベル(表 2-b)で示した。これらにみられるように、AA-50 雄ヒナ血漿中には LDL₁, HDL₃ および VHDL₁ 相当の LPs 成分に欠損がみられ、分取 4 画

分中では、血漿 LPs 962 mg/100 ml 中、CHYL と HDL₂ の両者で約 92% を占めた。なお、血漿 LPs 濃度に対する分離各画分の相対比(%) 序列は、CHYL (48.9%) > HDL₂ (43.1%) > LDL₂ (5.1%) > VLDL (2.9%) であった。

考 察

LEWIS¹⁷⁾ らによれば、ニワトリ雄および雌ヒナ各 3 例の血清中 Sf (1.063) LPs の種類とそれらの濃度 (mg/100 ml) レベルとの間には、雄 {Sf₃₋₈ (3 例)}, 雌 {Sf₉ > Sf₃₋₈ (1 例)}, {Sf₉ > Sf₃₋₈ > Sf₁₀₋₂₀ (2 例)} の関係が認められている。しかし、これらは本実験で得られた Sf (1.063) および Sf (1.21) LPs での関係、すなわち Sf₄₉₇ > Sf₃₋₈ > Sf₁₂₋₂₀ > Sf₁₃₋₄₁₉ とは明らかに異なっている。従って LEWIS らおよび本実験の両結果に基づきニワトリ・ヒナ血漿(清)中 LPs の分布型およびその濃度レベルを要約し、さらに個体による特異的変動の有意性を明らかにしようとするためには、(1) 品種、週齢、飼料の種類とその組成などに基づく被験鶏の適正の確認が必要であり、(2) 臭化カリウム (KBr) により設定された低比重区¹⁸⁾での試料「比重」(g/ml)とその「偏比容」(cc/g)との関係は必ずしも直線にはならない¹⁹⁾ことから画分の精製度の確認が要求され、さ

表 2. ニワトリ雄ヒナ血漿リポ蛋白質スペクトル
Table 2. Spectrum of the plasma lipoproteins in cockerels

a. Sf 値と分離用液比重との関係
a. Relation between Sf value and solution density for separation

パラメーター Parameter	キロミクロン CHYL	超低比重リ ポ蛋白質 VLDL	低比重リポ 蛋白質 ₁ LDL ₁	低比重リポ 蛋白質 ₂ LDL ₂	高比重リポ 蛋白質 ₂ HDL ₂	高比重リポ 蛋白質 ₃ HDL ₃	超高比重リ ポ蛋白質 ₁ VHDL ₁
Flotation rate, Sf (1.063)*	497	13-419	—	12-20	—	—	—
Flotation rate, Sf (1.21)*	—	—	—	—	3-8	—	—
分離用液比重 Solution density for separation	1.006	1.006	1.006 1.019	1.019 1.063	1.063 1.125	1.125 1.21	1.21 1.25

* Sf = Svedberg unit at d 1.063 and 1.21 (10⁻¹³ cm/sec/dyn/g)

b. ニワトリ雄ヒナ血漿リポ蛋白質濃度
b. Plasma lipoprotein concentrations in cockerels

雄ヒナ数 No. of cockerels	キロミクロン CHYL	超低比重リ ポ蛋白質 VLDL	低比重リポ 蛋白質 ₁ LDL ₁	低比重リポ 蛋白質 ₂ LDL ₂	高比重リポ 蛋白質 ₂ HDL ₂	高比重リポ 蛋白質 ₃ HDL ₃	超高比重リ ポ蛋白質 ₁ VHDL ₁
10	510±20	27±1	—	46±1	379±15	—	—

平均値±標準誤差 (mg/100 ml 血漿)

* Mean±S.E. (mg/100 ml plasma)

らに (3) Sf (1.063) および Sf (1.21) をパラメーターとする LPs 分布の全体像の作製, Sf (1.063) 下のカット成分として想定される CHYL, VLDL の追跡, 他のパラメーター値の補追などに関する今後の検討が必要であろう。しかし, 両結果において Sf₃₋₈ (HDL₂) に共通する事実は, 少くとも本画分の存在に関して品種, 性, 飼料の種類, 飼養管理条件などが関与していない可能性を示している。

引用文献

- 久保周一郎 (監訳) (1983) 家畜臨床生化学, 第三版, 61-111 頁, 近代出版, 東京.
- BARTLEY, J.C. (1980) Lipid metabolism and its disorders. In 'Clinical Biochemistry of Domestic Animals (KANEKO, J.J., ed.)', 3rd ed., pp. 61-96. Academic Press, London.
- 斎藤道雄 (1966) 家禽栄養学ブロイラー篇, 2-24 頁, 恒星社厚生閣, 東京.
- 阿部正和 (1963) 血液化学, 505-528 頁, 朝倉書店, 東京.
- 栗岡 晋 (1978) 生化学実験法, 下巻 220-229 頁, 文光堂, 東京.
- 倉田新一郎 (1965) 鶏の飼料計算, 7 頁, エーザイ株式会社, 東京.
- 斎藤道雄 (1966) 家禽栄養学ブロイラー篇, 575-619 頁, 恒星社厚生閣, 東京.
- 窪田大作, 星井 博 (1971) 動物栄養試験法, 28-42 頁, 養賢堂, 東京.
- CRAMPTON, E.W. and L.E. HARRIS, (1969) Applied Animal Nutrition, 2nd ed., pp. 30-55. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- SCANU, A.M. and M.C. RITTER (1973) The properties of plasma lipoproteins: properties and significance. In 'Advances in Clinical Chemistry (BODANSKY, O. and A.L. LATNER, eds.)', pp. 112-151. Academic Press, London.
- deLALLA, O.F. and J.W. GOFMAN (1954) Ultracentrifugal analysis of serum lipoproteins. In 'Methods of Biochemical Analysis (GLICK, D., ed.)', pp. 459-478. Interscience Publishers, New York.
- 藤井暢三 (1964) 生化学実験法 (定量篇) 改訂 13 版, 41-42 頁, 南山堂, 東京.
- 山田一彦 (1979) 麻布獣医科大学博士学位論文集, 16-23 頁.
- 宇井信生 (1967) 生化学研究法 II, 578-589 頁, 朝倉書店, 東京.
- 渡辺 格, 川出由己, 磯見二郎 (1958) 蛋白質化学 2, 347-446 頁, 共立出版, 東京.
- HILLYARD, L.A., C. ENTENMAN, H. FEINBERG and I.L. CHAIKOFF (1955) Lipide and protein composition of four fractions accounting for total serum lipoproteins. J. Biol. Chem., **214**: 79-90.
- LEWIS, L.A., A.A. GREEN and I.H. PAGE (1952) Ultracentrifuge lipoprotein pattern of serum of normal, hypertensive and hypothyroid animals. Am. J. Physiol., **171**: 391-400.
- GREEN, A.A., L.A. LEWIS and I.H. PAGE (1951) Method for the ultracentrifugal analysis of α and β serum lipoproteins. Federation Proc., **10**: 191.
- HATCH, F.T. and R.S. LEES (1968) Plasma lipoprotein analysis. In 'Advances in lipid Research (PAOLETTI, R. and D. KRITCHEVSKY, eds.)', pp. 33-36. Academic Press, New York.