分娩前後の乳牛のリポタンパク質中のコレステロール値と トリグリセリド値のプロファイル

安田英巳¹・松崎 勉²・荒井延明³・飯田涼介^{4*}・瀬瀬雄三⁴

¹ 安田獣医科医院, 〒152-0034 東京都目黒区緑が丘 1-5-22

² 紋別家畜診療センター, 〒094-0013 北海道紋別市南が丘町 7-41-11

³ スペクトラム ラボ ジャパン株式会社, 〒152-0034 東京都目黒区緑が丘 1-5-22-201

⁴ 明治大学農学部, 〒214-8571 神奈川県川崎市多摩区東三田 1-1-1

Profiles of Lipoprotein Cholesterol and Triglyceride Concentrations in Periparturient Cows

Hidemi YASUDA¹, Tsutomu MATSUZAKI², Nobuaki ARAI³, Ryosuke IIDA^{4*} and Yuzo KOKETSU⁴

¹ Yasuda Veterinary Clinic, Midorigaoka 1-5-22, Meguro-ku, Tokyo, Japan 152-0034

² Monbetsu Veterinary Center, Minamigaoka-chou 7-41-11, Monbetsu, Hokkaido, Japan 094-0013

³ Spectrum Lab Japan, Midorigaoka 1-5-22-201, Meguro-ku, Tokyo, Japan 152-0034

⁴ School of Agriculture, Meiji University, Higashi-mita 1-1-1, Tama-ku, Kawasaki, Kanagawa, Japan 214-8571

(Received 14 February, 2013/Accepted 30 October, 2013)

Summary

Lipoproteins are macromolecule complexes of protein, phospholipids, cholesterol, cholesterol esters, and triglycerides, and the lipoproteins transport cholesterol and triglycerides throughout the animal body. The objective of the present study was to investigate a profile of cholesterol and triglyceride concentrations in four lipoproteins during the peripartum period in Holstein dairy cows. Sixty nine blood samples for lipoprotein analysis were taken from 41 periparturient cows on 16 dairy farms. The analysis determined cholesterol and triglyceride concentrations in four lipoprotein fractions which included chylomicron (CM), very low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL), and high density lipoprotein (HDL). Analysis of covariance compared cholesterol and triglyceride concentrations in four lipoprotein fractions between pre- and post-partum periods in cows. Correlation analysis was performed between cholesterol and triglyceride concentrations in the four lipoproteins. Means ($\pm$ SEM) of total concentrations of cholesterol and triglyceride in pre-partum cows were 83.61 ($\pm$ 3.9) and 14.1 ($\pm$ 0.69) mg/dl, respectively. After calving, the total concentrations of cholesterol and triglyceride decreased to 70.31 ($\pm$ 4.07) and 5.53 ($\pm$ 0.57) mg/dl, respectively. The highest HDL cholesterol concentration and the highest VLDL triglyceride concentration were found among the four lipoprotein fractions. Cholesterol concentrations in all the four fractions decreased from pre-partum to post-partum periods ($P < 0.05$), whereas triglyceride concentrations in the two fractions of VLDL and CM decreased ($P < 0.05$). Especially, VLDL cholesterol and VLDL triglyceride concentrations decreased by 70% or higher. In both pre-partum periods and post-partum periods, cholesterol concentrations were correlated between VLDL, LDL and HDL ($P < 0.05$), but no such correlations were found for triglyceride concentrations. In conclusion, cholesterol and triglyceride concentrations in four fractions are differently related with the calving in dairy cows.

Keywords : calving, lipoprotein, peripartum, cholesterol

連絡先 : 飯田涼介*

明治大学農学部 5 号館-501A

〒214-8571 川崎市多摩区東三田 1-1-1

Tel & Fax : 044-934-7826

E-mail : riid@shikon.meiji.ac.jp

序 文

リポタンパク質は、血流でコレステロールやトリグリセリドなどの脂質を運ぶ大きな分子である。リポタンパク質は密度（比重）の違いすなわちコレステロールやトリグリセリドなどの含有割合によって分類され、密度の低い順にカイミクロン（Chylomicron：CM）、超低密度リポタンパク質（Very Low Density Lipoprotein：VLDL）、低密度リポタンパク質（Low Density Lipoprotein：LDL）、および高密度リポタンパク質（High Density Lipoprotein：HDL）と呼ばれている。

消化管由来の脂質は、小腸からCMとしてリンパ管に分泌され、血中を経て肝臓に入る。一方、肝臓で生成された内因性の脂質は、VLDLとなって蓄積または輸送される⁵⁾。VLDLは肝臓や血管壁に存在するリポタンパクリパーゼによって分解されLDLとなり、末梢組織に脂肪酸、コレステロールを与える。HDLは主に肝臓と小腸で合成され、循環血液中に流出し、末梢組織からコレステロールを集めて肝臓に取り込まれる⁵⁾。

乳牛では、飼料中の脂肪量と、血中コレステロール値と血中トリグリセリド値との正の関連が報告されている^{2,6,9)}。さらに授乳初期の多くの乳牛は、乳を生産するために負のエネルギーバランスになり⁸⁾、身体からの代謝で不足エネルギーを補うため、総コレステロールと総トリグリセリドの血中レベルの低下が起ることが知られている^{2,3)}。とくに脂肪肝は初期授乳期の主な代謝病であり、リポタンパク質の不適切な生成が関係しているとされている³⁾。

最近では、HDLコレステロールは、牛では卵巣ステロイド形成の基質であることから、HDLコレステロールと卵胞でのエストロゲン産生との関係が注目されている¹⁾。さらにリポタンパク質は主に小腸と肝臓で生成されるため、栄養と繁殖をつなぐ因子としても注目されている^{1,2)}。しかし、生産現場における周産期の乳牛のコレステロール値とトリグリセリド値の報告は少なく、脂質代謝の動態は、臨床分野に新しい知見をもたらす可能性がある。そこで本研究の目的は、周産期の乳牛のリポタンパク質4分画でのコレステロール値やトリグリセリド値の変化を調べることとした。

材料と方法

牛と血液サンプル採取

北海道紋別市に所在する紋別家畜診療センターにおいて、2007年の1月から3月の間に、本研究に協力的な16農場の中から、分娩前後のホルスタイン種の乳牛を便宜的に41頭選んだ。16農場の農場サイズの平均（幅）は、92

頭（37-236頭）であった。41頭のうち27頭は複数回採血が行われ、69血液サンプルが採取された。69血液サンプルのうち、38サンプルが分娩前であり、31サンプルが分娩後であった。また、スペクトラム ラボ ジャパン株式会社（東京都目黒区）が集積した乳牛の生産データ（産次、分娩日）を分析に用いた。

リポタンパク質分析と分娩前後の減少割合

血液は1,500gで10分間遠心分離され、血清を採取した後、検査会社スカイライト・バイオテック社（秋田県秋田市）へ冷蔵送付され、同社で分析が行われた。分析はすでに報告されている方法に基づいたリポタンパク質詳細解析システムにより行われた^{7,12)}。この方法を用いて、リポタンパク質の主要4分画（CM, VLDL, LDL, HDL）におけるコレステロール値、トリグリセリド値の定量データを得た。4分画のコレステロール値とトリグリセリド値の分娩前後における変化の大きさを示すために、分娩前から分娩後の減少割合を算出した。例えば、VLDLにおける分娩前後のコレステロールの減少割合は、（分娩前のVLDLコレステロール値の平均値－分娩後のVLDLコレステロール値の平均値）/分娩前のVLDLコレステロール値の平均値×100によって算出した。

統計分析

すべての統計分析にはSAS（SAS Inst., Inc., Cary, NC, U.S.A.）を用いた。記述統計と頻度分布を、プロシージャUNIVARIATEとプロシージャFREQを用いて調査した。農場や産次の効果を考慮し、リポタンパク質分画のコレステロール値とトリグリセリド値の分娩前後での比較を行うための統計モデルを、プロシージャMIXEDを用いて構築した。被説明変数は各分画のコレステロール値とトリグリセリド値とし、説明変数に分娩の前後と産次を用いた。分娩の前後と産次との2因子の交互作用も調査した。統計モデルでは、分娩前後に複数回採血されたことを考慮するために、ランダム効果として各農場に入れ子にされた牛IDを用いた⁴⁾。さらに、統計モデルの構造式を以下に示した：

$$Y = \text{切片} + \beta_1 \text{分娩前後} + \beta_2 \text{産次} + \text{乳牛(農場)} + e$$

Y=コレステロール値とトリグリセリド値を示す。また、産次の比較には、説明変数に分娩の前後を用いた。さらに、分娩からの日数と各値の単回帰分析のために、プロシージャREGを用いた。分娩前後別に、リポタンパク質4分画間のコレステロール値とトリグリセリド値のPearsonの相関係数を算出するために、プロシージャFREQを用いた。

結 果

採血時の平均産次は2.47（±0.18 SEM）であり、その幅は0から6であった。分娩からの平均日数は-5.6（±1.11 SEM）日であり、幅は-35日から19日であった。分娩前

表 1 分娩前後の乳牛のリポタンパク質各分画中のコレステロール値とトリグリセリド値 (±SEM) の比較¹

リポタンパク質	分娩前	分画割合	分娩後	分画割合	分娩前後の 減少割合
乳牛の頭数	38		31		
産次	2.08±0.24		2.94±0.26		
単位	mg/dl	%	mg/dl	%	%
コレステロール値					
総コレステロール値	83.61±3.90 ^a	100.00	70.31±4.07 ^b	100.00	15.91
高密度リポタンパク質 (HDL)	68.35±2.41 ^a	81.75	61.19±3.04 ^b	87.02	10.48
低密度リポタンパク質 (LDL)	13.06±1.63 ^a	15.62	8.56±1.43 ^b	12.17	34.46
超低密度リポタンパク質 (VLDL)	2.14±0.15 ^a	2.56	0.54±0.11 ^b	7.68	74.77
カイミクロン (CM)	0.06±0.01 ^a	0.07	0.02±0.01 ^b	0.03	66.67
トリグリセリド値					
総トリグリセリド値	14.10±0.69 ^a	100.00	5.53±0.57 ^b	100.00	60.78
高密度リポタンパク質 (HDL)	2.12±0.22	15.05	1.92±0.16	34.66	9.43
低密度リポタンパク質 (LDL)	1.34±0.05	9.51	1.24±0.21	22.38	7.46
超低密度リポタンパク質 (VLDL)	10.12±0.58 ^a	71.82	2.30±0.47 ^b	41.52	77.27
カイミクロン (CM)	0.51±0.12 ^a	3.62	0.08±0.02 ^b	1.44	84.31

^{a,b} 列内における平均値の異符号間に有意差あり (P<0.05)。

¹ 比較には混合効果モデルを用いた。

図 1 分娩日からの日数と減少割合が多かった超低密度リポタンパク質 (VLDL) のコレステロール値とトリグリセリド値との散布図

後のコレステロール値ならびにトリグリセリド値のそれぞれの総量, および各分画におけるコレステロール値とトリグリセリド値と総量に占める割合, さらに分娩前後の減少割合を表 1 に示した。コレステロール値とトリグリセリド値は, HDL と LDL 分画のトリグリセリド値を除いて, 分娩の前後で変化があったが (P<0.05), 産次とは関連がなかった (P>0.05)。また, 分娩の前後と産次の交互作用は, コレステロール値およびトリグリセリド値と関連がなかった (P<0.05)。なお分娩前後での比較では産次に有意差は

なかった (P>0.05)。分娩前のリポタンパク質中の総コレステロール値と総トリグリセリド値は, それぞれ 83.61 mg/dl と 14.10 mg/dl で, 分娩後は 70.31 mg/dl と 5.53 mg/dl に減少した (P<0.05)。コレステロール値が最も高かったのは HDL 分画であり, トリグリセリド値が最も高かった分画は VLDL であった。分娩前で, 総コレステロールの 81.75% が HDL 分画であり, 総トリグリセリドの 71.82% が VLDL 分画であった。一方, 分娩後では, 総コレステロールの 87.02% が HDL であり, 総トリグリセリドの 41.52%

表 2 分娩前後の乳牛のリポタンパク質各分画中のコレステロール値 (mg/dl) の相関関係

	コレステロール値		
	HDL	LDL	VLDL
分娩前			
高密度リポタンパク質 (HDL)	1.00	—	—
低密度リポタンパク質 (LDL)	0.77**	1.00	—
超低密度リポタンパク質 (VLDL)	0.33*	0.58**	1.00
カイミクロン (CM)	0.06	0.18	0.26
分娩後			
高密度リポタンパク質 (HDL)	1.00	—	—
低密度リポタンパク質 (LDL)	0.57**	1.00	—
超低密度リポタンパク質 (VLDL)	0.32*	0.39*	1.00
カイミクロン (CM)	0.43*	0.06	0.54**

*は $0.01 \leq P < 0.05$ を示し, **は $P < 0.01$ を示す。

表 3 分娩前後の乳牛のリポタンパク質各分画中のトリグリセリド値 (mg/dl) の相関関係

	トリグリセリド値		
	HDL	LDL	VLDL
分娩前			
高密度リポタンパク質 (HDL)	1.00	—	—
低密度リポタンパク質 (LDL)	0.27	1.00	—
超低密度リポタンパク質 (VLDL)	0.13	0.32	1.00
カイミクロン (CM)	0.14	0.07	0.21
分娩後			
高密度リポタンパク質 (HDL)	1.00	—	—
低密度リポタンパク質 (LDL)	0.16	1.00	—
超低密度リポタンパク質 (VLDL)	0.02	0.16	1.00
カイミクロン (CM)	0.01	0.12	0.82**

**は $P < 0.01$ を示す。

が VLDL 分画であった。

分娩後には, コレステロール値はすべての分画で減少し ($P < 0.05$), トリグリセリド値は VLDL と CM 分画のみが減少した ($P < 0.05$)。VLDL と CM 分画のコレステロール値とトリグリセリド値は, 分娩前後で減少割合が高かった。

分娩前後で減少割合が多かった VLDL 分画のコレステロール値とトリグリセリド値, および分娩前後の日の散布図と, 単回帰分析の結果を図 1 に示した。コレステロール値とトリグリセリド値は, 分娩前後にかけて減少傾向があった ($P < 0.05$)。

表 2 と 3 に, 分娩前・分娩後別に, コレステロール値とトリグリセリド値の各リポタンパク質分画間での相関係数

を示した。コレステロール値では分娩前後とも, HDL と LDL と VLDL の 3 分画間に正の相関があった ($P < 0.05$; 表 2)。また分娩後には, CM と HDL 間と, CM と VLDL 間にも正の相関がみられた ($P < 0.05$)。一方, 分娩前トリグリセリド値は, 4 分画間に相関はなかった (表 3)。そして, 分娩後トリグリセリド値は, VLDL と CM 間でのみ正の相関があった ($P < 0.05$)。

考 察

本研究において, 総コレステロールにおける HDL コレステロールの割合が高く, 総トリグリセリドにおける VLDL トリグリセリドの割合が高いという結果は, 先行研

究と一致した^{1,2,9)}。VLDL の代謝は早い上に²⁾、多量に存在することで、分娩前後のトリグリセリドは主に VLDL 分画で運搬されと考えられる。さらに、VLDL によって、乳腺に運搬されたトリグリセリドは、乳脂肪生成に使われると考えられる¹⁰⁾。

さらに本研究で VLDL と CM 分画でコレステロールとトリグリセリド値の分娩前後で減少が大きかったことは、この2つの分画が、分娩・泌乳に関係が深いことが考えられる。このことは、泌乳期の牛の乳腺は、外因性（腸管）由来の VLDL と CM 分画を介してトリグリセリドを取り込み、乳脂肪合成に利用していることを示した過去の研究に合致するものである¹¹⁾。そして HDL と LDL 分画トリグリセリド値は、分娩前後で大きな変化が見られなかったということ、そして VLDL 分画に比して量も少ないことから、両分画のトリグリセリドは、分娩や泌乳への関係が薄いことを示しているかもしれない。

コレステロール値で、分娩前後とも、HDL と LDL と VLDL の3分画間での相関が見られたことは、コレステロールの運搬に、3分画のリポタンパク質が強く関係していることを示した。一方、トリグリセリド値は、分娩後でのみ VLDL と CM 間で強い相関を示した。これは、分娩後の泌乳のためのトリグリセリド運搬における両分画間の強い関係を明らかにした。さらにコレステロール値とトリグリセリド値で、分画での変化に差があったこと、分娩前後での相関関係に違いがあったことは、コレステロールとトリグリセリドで、分娩・泌乳への関係が異なることを示している。

本研究の限界は、リポタンパク質に関し初めての生産現場での研究ということもあり、分娩前後の飼料給与法など栄養管理についての調査や、分娩後初回授精日数や分娩間隔など繁殖成績のデータ収集が実施できなかった。さらに分娩後のケトosisや乳熱などの症例が少ないため、疾病とリポタンパク質の関係が調べられなかった。本研究は、酪農場で飼育されている分娩前後の乳牛から、初めてリポタンパク4分画中のコレステロール値とトリグリセリド値を測定した。今後は、分娩前後の脂質代謝を考慮した飼養管理や繁殖成績の改善にむけた研究が必要である。

引用文献

- 1) Anand, L.N. and Prakash, B.S. : Comparative profiles of different lipoprotein cholesterol parameters and Growth Hormone during hot humid and winter season in Murrah Buffaloes. *Livestock Sci.*, **115**, 294-300, 2008.
- 2) Bauchart, D. : Lipids absorption and transport in ruminants. *J. Dairy Sci.*, **76**, 3864-3881, 1993.
- 3) Bobe, G. et al. : Effects of Exogenous Glucagon on Lipids in Lipoproteins and Liver of Lactating Dairy Cows. *J. Dairy Sci.*, **86**, 2895-2903, 2003.
- 4) Dohoo, I., Martin, W and Stryhn, H. : *Veterinary Epidemiologic Research*, 2nd edition. VER Inc., Charlottetown, Canada, 2009.
- 5) Ganong, W.F. : *Review of Medical Physiology*, 19th ed. 286-292, Appleton & Lange, Stamford, CT, USA., 1999.
- 6) Grummer, R.R. and Davis, C.L. : Plasma concentrations and lipid composition of lipoproteins in lactating cows fed control and high grain diets. *J. Dairy Sci.*, **67**, 2894-2901, 1984.
- 7) Mizutani, H. et al. : Application of gel permeation HPLC for lipoprotein profiling in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, **72**, 813-817, 2010.
- 8) Overton, T.R. and Waldron, M.R. : Nutritional management of transition dairy cows : Strategies to Optimize Metabolic Health. *J. Dairy Sci.*, **87**, Supplement E105-E119, 2004.
- 9) Park, C.S., Rafalowski, S.W. and Mark, G.D. : Effects of dietary fat supplement on lipid metabolism of Holstein heifers. *J. Dairy Sci.*, **66**, 528-534, 1983.
- 10) Palmquist, D.L. : A kinetic concept of lipid transport in ruminants. A review. *J. Dairy Sci.*, **59**, 355-363, 1983.
- 11) Uchida, T. et al. : Utilization of intestinal triglyceride-rich lipoproteins in mammary gland of cows. *J. Vet. Med. Sci.*, **61**, 1143-1146, 1999.
- 12) Usui, S. et al. : A new online dual enzymatic method for simultaneous quantification of cholesterol and triglycerides in lipoproteins by HPLC. *J. Lipid Res.*, **43**, 805-814, 2002.