高速液体クロマトグラフィーによる牛血清 β -カロチンの測定

中間寛徳* 田中幹郎* 中橋真澄*

(昭和 61 年 3 月 28 日受理)

Measurement of Serum β -Carotene by High Performance Liquid Chromatography in Dairy Cows

SANENORI NAKAMA et al. (Department of Veterinary Surgery, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753)

SUMMARY

High performance liquid chromatography (HPLC) was used to measure serum β -carotene in dairy cows. When a Zorbax-ODS column, which is a non-aqueous reversed-phase (NARP) column, was used, a reliable routine method was assumed to be one with a methanol/chloroform (85/15) solution was used as a mobile phase.

When estimated by this method through out a year, serum β -carotene levels of 8 cows fed sufficient roughage were about 350 $\mu\text{g}/\text{dl}$ in winter and about 600 $\mu\text{g}/\text{dl}$ in summer. This difference in level was considered to depend on the amount of green grass fed to the cows.

要 約

牛血清中の β -カロチン値を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて測定する方法を検討した。NARP-カラムの Zorbax-®ODS を用いた場合、メタノール/クロロホルム (85/15) 溶液を移動相とするのが信頼できるルーチンの測定法であると考えられた。

この方法を用いて、粗飼料が多給されている 8 頭の乳牛で血清中 β -カロチンの濃度を年間をつうじて調べたところ、冬期には 350 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 前後と低く、夏期では 600 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 前後の高値を示した。この変動は給与された青草の量に大きく依存しているものと判断された。

β -カロチンはカロチノイドの一つで、その生理的作用としてはプロビタミンA活性が知られている^{2,10,11}。 β -カロチン1分子から2分子のレチナールができ、これが還元されてレチノールができる。レチナールが生じる反応には酸素と β -カロチン-15, 15'-オキシゲナーゼと呼ばれる酵素が作用する^{6-8,18}。この酵素は小腸粘膜、肝臓、黄体などに存在し^{6,17}、とくに小腸粘膜はビタミンAへの転換が行われる最も重要な部位とされている⁹。

イヌ、ヒツジ、ヤギなどでは血中に β -カロチンはほとんど見出されない。これは β -カロチンが小腸壁でレチノールに転換されて体内に取り込まれるためであるとされている^{9,18}。いっぽう、ウシ、ウマ、ヒトでは β -カロチンのまま吸収され、血中に多量の β -カロチンが存在する¹⁸。

従来、ビタミンAの作用はよく研究されており、これが欠乏すると、眼科、運動器および繁殖関係の疾患のほか、神経症状¹⁷や骨格筋の水腫¹⁶もみられる。

近年、 β -カロチン自身の生理的意義も強調され、新たな関心が寄せられている。MEYERら¹⁹およびLOTTHAMMER

ら¹⁸)はドイツ Schwarzbunte 種牛で一連の実験を行い、 β -カロチン欠乏飼料群で繁殖成績の低下や卵巣疾患の発生が増加したことを報告した。しかし、これに否定的な報告⁴)もないわけではない。

β -カロチンは、従来、比色による藤田氏法で測定されていたが、この方法では黄色色素すべてをカロチンとして測定していた。最近、正確にごく微量まで測定できる高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC と略) による方法が開発され、生体からの試料では現在最も信頼性の高い測定法とされている。

そこで、NELISら¹⁵)の報告を参考に non-aqueous reversed-phase (以下 NARP と略) カラムである Zorbax-®ODS を用いた HPLC 法により、牛血清中 β -カロチンのルーチン測定法を確立し、併せて粗飼料が多給されている乳牛についての年間変動を調べた。

1. 材 料 と 方 法

1) HPLC による血清中 β -カロチン測定法

β -カロチンの標準品として β -カロチン試薬特級 (和光純薬) を、また内部標準物質としてズダンⅢ特級 (キシ

* 山口大学農学部 (山口市大字吉田1677-1)

図1 β-カロチンの抽出から高速液体クロマトグラフィーまでの処理法

ダ化学)を用いた。溶剤のうち、エタノール(関東化学)およびジクロロメタン(半井化学)は液体クロマトグラフ用試薬を、メタノール(和光純薬)、n-ヘキサン(半井化学)、クロロホルム(片山化学)、ベンゼン(片山化学)等は試薬特級を用いた。

HPLCは島津製作所製LC-3A型で、カラムはNARPカラムであるZorbax®-ODS, φ75×150 mm (Dupont)を用いた。濃度の測定には、β-カロチンの供試直前の吸光度を測定し、 $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ の値2592 (453 nm in n-Hexene)³⁾と、検量線より求めた。内部標準物質としてのズダンⅢは4 mg/dl, n-ヘキサン溶液として用いた。

血清中からのβ-カロチンの抽出は藤田法の変法(図1)で行った。なお、β-カロチンは空気や紫外線によって容易に分解されるので、測定は遮光した部屋で行い、各試験管には窒素ガスを充填し変性が起こらないように留意した。また、回収率と再現性についても検討を行った。

2) 供試牛

山口大学農学部附属農場に飼育されているホルスタイン種系乳牛雌8頭(2.5~9才)と、実習用乳牛2頭(No. 1:4才 No. 2:4.5才)を用いた。

(1) 飼料: 附属農場牛では、3~4月にイタリアンライグラスの青刈と乾草および稲わら、5~10月に大量のイタリアン、デントコーン、スーダングラスの青刈、11~2月の冬期には少量のイタリアンの青刈とイタリアンあるいはデントコーンのサイレージョおよび稲わらが与えられていた。このほか、配合飼料、圧べん麦、大豆粕などの濃厚飼料が年間をつうじて給与されていた。いっぽう、実習牛については5~8月の間、イタリアンの青刈とフスマおよび稲わらが給与されていた。

(2) 採血: 農場牛については年間をつうじ、毎月1回朝の給餌時に採血を行った。実習牛については、日内変動を調べる目的では2時間間隔で12回の24時間採血を行った。また、性周期との関連を調べる目的では1日1回採血し、直腸検査のほか血中プロジェステロン(以下Pと略)値をラジオイムノアッセイ法で測定した(実習牛 No.1 と農場牛 No.3 使用)。

2. 成績

1) NARP-HPLC 測定

(1) 移動相の検討: 溶出液として、(A) 100% メタノールのみ、(B) メタノール/クロロホルム (85/15)、(C) メタノール/クロロホルム (70/30)、(D) アセトニトリル/ジクロロメタン/メタノール (70/20/10) の4種類で検討したが、(B)がβ-カロチンの保持時間が短くズダンⅢとの分離も良好であった(図2)。なお、検出波長は453 nm, 流速は1.0 ml/分で行った。

(2) β-カロチンの検量線: 分離のよかったメタノール/クロロホルム (85/15) の溶出液について、β-カロチン量と面積比について検討した。β-カロチンの25~1,500 μg/dlの間では、ピーク面積比との相関係数は0.998ときわめて良好な値が得られた。

(3) 回収率の検討: β-カロチン濃度の低い子牛血清0.5 mlにβ-カロチンを130 ng および4,500 ngを加えたサンプルとブランク各2本ずつ作製し、おのおの抽出操作を行い濃度を測定した。その結果、低濃度と高濃度のサンプルでの回収率はそれぞれ106.1%と109%で、両者とも満足できる回収率が得られた。

(4) 再現性の検討: 同一牛の血清を0.5 ml ずつ6本の共栓付き遠心管で抽出を行い定量した結果、これらの値の変動係数(CV)は1.9%と良好であった。

2) 血清中β-カロチン濃度の日内変動

図3で示すようにNo.1牛では、朝夕の採食後約2時間でβ-カロチンの血清中濃度は増加し(470および478

図2 HPLCでのクロマトグラム

図3 乳牛の血清中 β -カロチン濃度の日内変動

図4 乳牛の血清中 β -カロチン濃度の年間変動
($n=8$ 平均値と SD)

$\mu\text{g/dl}$), 採食後 6 時間で採食前の濃度まで低下した。No. 2 牛では, 血清中 β -カロチン濃度は $100\mu\text{g/dl}$ 前後の低い値を示し, 採食による変動は認められなかった。

3) 血清中 β -カロチン濃度の年間変動

図4には 12 カ月間にわたる 8 頭の血清中 β -カロチン濃度の平均値(実線)と標準偏差を示した。冬期では β -カロチン濃度は低く, とくに 12 月では最低値 ($318.9 \pm 97\mu\text{g/dl}$) を示し, 青草給与が多くなる 4 月からは上昇し, 7 月には最高値 ($678.9 \pm 236\mu\text{g/dl}$) を示し, 冬期の 2 倍以上の濃度であった。

4) 性周期中の β -カロチン濃度の変動

No. 1 牛と No. 3 牛について, おのおの 2 性周期中の血清中 β -カロチン濃度と血清中 P 濃度の変動を図5と

図5 乳牛の性周期中の血清 β -カロチンおよび Progesterone 濃度の変化(日)

図6 乳牛の性周期中の血清 β -カロチンおよび Progesterone 濃度の変化(日)

6 に示した。No. 1 牛(図5)では, 1 回目の発情時には外陰部の充血は認められず, 腔内の粘液量も少量であった。黄体は排卵後 7 日までは触知されたが, その後は不明瞭であった。2 回目の発情は前回発情後 20 日目に観察され, その 20 時間以内に排卵を確認した。この時の発情徴候も微弱であったが正常な黄体形成があり, P の動きともよく一致した。No. 3 (図6) は発情徴候も明瞭で, その外部徴候の確認後約 20 時間で排卵が認められた。次の発情は前回発情後 21 日目に観察され, 24 時間以内に排卵を確認した。この 2 回目の性周期では血中 β -カロチン濃度と P 濃度はよく並行して動きを示した。

3. 考 察

われわれは牛の血清中 β -カロチンの測定に市販の NARP カラムである Zorbax®-ODS を用い, これに対する移動相の溶剤, 分離能および保持時間を検討した。その結果, メタノール/クロロホルム (85/15) を移動相とすると良好な結果が得られ, n -ヘキサンで抽出した場合 453 nm の検出波長で β -カロチン域付近に夾雑物がほとんどみられないため, ルーチン測定法として信頼できると考えられた。

乳牛の血清中 β -カロチン濃度について, LINDNER ら¹²⁾ は次のような 4 段階の区分を設けて過不足の評価として

いる。すなわち、400μg/dl 以上を「十分量」、400~200 μg/dl を「限界量」、200~100 μg/dl を「危機量」、さらに 100μg/dl 以下を「欠乏量」としている。今回、われわれは乳牛の血清中β-カロチンの濃度の年間変動を主として検討したが、それと同時に日内変動と性周期についても若干の試験を行った。

年間変動では、青草の給与量の多い夏期に 600 μg/dl 前後と高く、冬期は 350μg/dl 前後に低下するという成績が得られた。このことは、乾草やワラあるいはコーンサイレージなどの飼料ではβ-カロチン濃度の低下をきたすという LINDNER ら¹²⁾の報告を支持するものであった。福富ら⁵⁾は酪農家3戸の乳牛30頭について血漿中β-カロチンとビタミンAを測定しているが、イタリアンライグラス等の青草を多給した4月で各農家ともβ-カロチン濃度は高く、青草の給与が少ない時には 100μg/dl 前後の低値であったと報告している。

日内変動について、2頭の乳牛で検討した結果、β-カロチン濃度の高い1頭は採食後約2時間で最高値を示したあと、もとの値まで低下するという2峰性の変動を示した。しかし、100μg/dl 以下の低濃度の1頭は採食による変動は認められなかった。このことは摂取された青草からのカロチンが約2時間で血中濃度を高めるらしいといえそうであるが、さらに例数を重ねて検討する必要がある。

性周期中の変動では、2頭の乳牛でそれぞれ2性周期にわたって血清中β-カロチン量と血中P値を比較検討した。その結果、β-カロチンの変動とP値の消長がよく一致した例もあったが、あまり関連のない動きもあって、本成績では一定の傾向は見出せなかった。しかし、β-カロチンは牛の黄体にも多量に含まれており¹⁸⁾、Pの産生あるいは放出と何らかの関連があるものと考えられるので、さらに検討する必要がある。

〔なお、本報告の概要は第97回日本獣医学会(1984)において報告した。〕

β-カロチンの測定についてご指導をいただいた、大阪府農林技術センター畜産部の小野忠義博士、プロジェクトの抗血清を分与していただいた帝国臓器製薬の神戸川 明博士、ラジオイムノアッセイで便宜をはかっていただいた山口大学放射性同位元素総合実験室の瀧本晃一助教授ならびに、牛の飼養面でお世話になった山口大

学農学部附属農場の高野寿鶴技官に謝意を表する。

引用文献

- 1) 有本親史, 木村容子, 小泉俊二: 日獣会誌, 29, 489~494 (1976).
- 2) CHEW, B. P., HOLLEN, L. L., HILLERS, J. K., et al.: *J. Dairy Sci.*, 65, 2111~2118 (1982).
- 3) DAVIES, B. H.: in *Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments*, 2nd ed., GOODWIN, T. W. editor, Vol. 2, 38~165, Academic Press, Inc., New York (1976).
- 4) FOLMAN, Y., ASCARELLI, I., HERZ, Z., et al.: *Br. J. Nutr.*, 41, 353~359 (1979).
- 5) 福富豊子, 小野教生, 小沢清一郎: 畜産の研究, 38 (9) 1105~1108 (1984).
- 6) GOODMAN, D. S. and OLSON, J. A.: *The Conversion of All-trans β-Carotene into Retinal*, in *Methods in Enzymology*, CLAYTON, R. B. editor, 15, 462~475 (1969).
- 7) GOODMAN, D. S.: *Vitamin A Metabolism, Federation Proceedings*, 39, 2716~2722 (1980).
- 8) 原島圭二: 生化学, 36, 748~755 (1964).
- 9) 原島圭二: ビタミン学 I, 日本ビタミン学会編集, 51~52, 東京化学同人, 東京 (1980).
- 10) HEMKEM, E. W. and BREMEL, D. H.: *J. Dairy Sci.*, 65, 1069~1073 (1982).
- 11) KALAC, P. and KYZLINK, V.: *Anim. Fed. Sci. Technol.*, 4, 81~89 (1979).
- 12) LINDNER, H. and GADIENT, M.: *European β-Carotene Field Studies*, 1976~1981, Hoffman, F.-La Roche and Co., Switzerland, 1~18 (1981).
- 13) LOTTHAMMER, K.-H. und AHLWEDE, L.: *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, 84, 220~226 (1977).
- 14) MEYER, VON H., AHLWEDE, L. und LOTTHAMMER, K.-H.: *Dtsch. Tierärztl. Wochenschr.*, 82, 444~449 (1975).
- 15) NELIS, H. J. C. F. and DE LEENHEER, A. P.: *Anal. Chem.*, 55, 270~275 (1983).
- 16) 奥田 稔, 千田広文, 山下秀之, ほか: 日獣会誌, 36, 528~533 (1983).
- 17) STACEWICZ-SAPUNAKIS, M., WANG, HUI-HUI C. and GAWIENOWSKI, A. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 380, 264~269 (1975).
- 18) ULLREY, D. E.: *J. Anim. Sci.*, 35, 648~657 (1972).

//////獣 医 師 募 集//////

募集内容: 臨床経験の有無を問わず 待遇: 面談のうえ優遇(履歴書持参)

吉 田 動 物 病 院
〒280 千葉市南町 2-11-6 TEL 0472-61-0668