



Title	実験的脂肪肝牛における血清リポタンパク質とハプトグロビン
Author(s)	内田, 英二
Citation	北海道大学. 博士(獣医学) 乙第4681号
Issue Date	1994-12-26
DOI	10.11501/3080087
Doc URL	<a href="http://hdl.handle.net/2115/51225">http://hdl.handle.net/2115/51225</a>
Type	theses (doctoral)
File Information	000000279881.pdf



[Instructions for use](#)



実験的脂肪肝牛における  
血清リポタンパク質とハプトグロビン

内田 美二



実験的脂肪肝牛における  
血清リポタンパク質とハプトグロビン

内田 英二



## 略語表

$\alpha$  1-AGP =  $\alpha$  1-Acid glycoprotein

ALP = Alkaline phosphatase

Apo = Apolipoprotein

ATP = Adenosine 5'-triphosphate

AST = Aspartate transaminase

CM = Chylomicrons

E-cho = Cholesterol esters

F-cho = Free cholesterol

F/E = F-cho/E-cho

HDL = High density lipoprotein

LCAT = Lecithin-cholesterol acyltransferase

LDL = Low density lipoprotein

2ME = 2-Mercaptoethanol

NEFA = Non esterified fatty acids

PL = Phospholipids

SDS-PAGE = Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SRID = Single radial immunodiffusion

TC = Total cholesterol

TG = Triglycerides

VLDL = Very low density lipoprotein



## 目次

緒論	・・・	1
分析方法	・・・	4
1 肝臓中のトリグリセリド測定法	・・・	4
2 リポタンパク質の分離	・・・	4
3 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	・・・	4
4 ハプトグロビンの測定	・・・	5
5 ApoB-100の測定	・・・	5
6 その他	・・・	6
7 統計学的処理	・・・	6
第1章 エチオニン投与によるウシ脂肪肝の作出	・・・	10
I 目的	・・・	10
II 材料	・・・	11
1 供試動物	・・・	11
2 エチオニン投与	・・・	11
3 採材	・・・	11
III 結果	・・・	14
1 投与後の肝TG量の変化	・・・	14
2 血清および各リポタンパク質中のタンパク質量の変化	・・・	14
3 各リポタンパク質分析	・・・	14
4 血清および各リポタンパク質中のTG、TCおよびPLの変化	・・・	16



5	脂肪肝牛でのエチオニン投与試験	・・・17
6	血清中のNEFA、AST、ALPおよびビリルビンの変化	・・・17
IV	考察	・・・34
V	小括	・・・38
第2章	エチオニン投与によるウシ血清ハプトグロビンの誘導	・・・39
I	目的	・・・39
II	材料	・・・40
III	結果	・・・40
1	血清のSDS-PAGE	・・・40
2	SRIDによるハプトグロビンの測定	・・・40
3	血清コルチゾール	・・・41
4	血清 $\alpha$ 1-AGP	・・・41
IV	考察	・・・45
V	小括	・・・48
第3章	周産期におけるウシ血清ハプトグロビンとApoB-100濃度	・・・49
I	目的	・・・49
II	材料	・・・50
1	供試動物	・・・50
2	採材	・・・50
III	結果	・・・50
1	分娩前後のハプトグロビン	・・・50
2	分娩前後のApoB-100濃度	・・・51
3	分娩前後のタンパク質、 $\alpha$ 1-AGP、TG、NEFAおよび	



コルチゾール濃度 . . . 51

IV 考察 . . . 56

V 小括 . . . 59

総括 . . . 60

謝辞 . . . 62

文献 . . . 63

英文抄録 . . . 71



## 緒論

高泌乳牛の周産期に起こる脂肪肝は、代表的な代謝障害要因の一つと言われ、脂肪肝とケトージス、起立不能症、第四胃変位、胎盤停滯、難産および乳房炎等の感染症との関連が指摘されている [42]。

脂肪肝は、肝細胞にトリグリセリド (TG) が生理的範囲を超えて蓄積した状態である。報告によると肝のTG含量によりウシ脂肪肝の程度を次のように分類している。すなわち、肝の湿重量 1 g中のTG含量が50mg未満を正常、51-100mgを中等度、101mg以上を重度と分類している [36]。しかしながら、周産期のウシでは肝TG量の増加は認めるが特に異常な臨床所見を示さない等、肝TGの蓄積程度と臨床あるいは臨床病理学的所見等には、必ずしも一致した傾向が認められず [19, 36, 66]、ウシ脂肪肝の病態の難しさを示している。

脂肪肝の起こる原因は、分娩前の過肥、ストレス、飢餓、ホルモン分泌の不調および泌乳開始時のエネルギーの負荷など様々な理由が挙げられ [12-14, 41, 42, 51, 54]、特に周産期に大きく変動するホルモンや泌乳開始に伴うストレスが発生原因と考えられている [14, 16, 41, 54, 56, 66, 67]。

肝の脂肪化は、肝におけるTG合成および超低密度リポタンパク質 (VLDL) の合成・分泌のいずれかの過程で障害が生じた際に起こると考えられている。具体的には、①末梢脂肪組織から肝への脂肪酸動員の増加、②肝における脂肪酸合成の促進、③肝における脂肪酸酸化能の低下、④肝でのリポタンパク質の合成・分泌の低下などが考えられている [19, 24, 25, 41, 42, 54, 67]。このうち、特に①と④が肝脂肪化の機序として重要であると思われる。ウシはエネルギー不足の際、体脂肪を分解し遊離脂肪酸としてエネルギーを供給する。しかし、高能力牛の泌乳前期の様に大量の遊離脂肪酸が肝に動員されると、この遊離脂肪酸は、肝で処理しきれなくなりTGとして肝に蓄積する。通常、肝で合成されたTGはコレステロール、リン脂質およびアポリポタンパク質B-100 (ApoB-1



00) と結合してVLDLとなり血液中に運び出される。しかし、反芻獣のTG分泌能は、ラット等に比較すると非常に低いとされている [28]。そのためウシでは肝からのTG分泌障害が脂肪肝を引き起こす大きな要因ではないかと言われている [19, 36, 49]。事実、野外のウシ脂肪肝発症例では、ApoB-100やアポリポタンパク質A-I (ApoA-I) の減少が認められたとの報告 [36, 38] や、肝TG量と血清ApoB-100との関連では、肝TG量が増加すると血清ApoB-100が減少するとの報告 [35] がある。つまり、肝でのリポタンパク質合成・分泌障害が脂肪肝へと誘導する要因の一つであることを示している。このように、リポタンパク質の血中動態に注目することは、ウシ脂肪肝に関する研究において重要な視点と思われる。

ハプトグロビン (Hp) は、肝を起源とするヘモグロビン結合タンパク質として知られており、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖からなるタンパク質である。ヒトでは、この両鎖の化学構造が解明され [2, 4]、生理的機能についても、ヘモグロビン結合に関する機能と急性期反応タンパク質に関する機能の2つに大別されている。ヘモグロビン結合能に関しては、溶血性疾患時にヘモグロビンを回収するタンパク質として機能している [1, 31]。一方、急性期反応タンパク質としての生理的機能は、①プロスタグランジン代謝抑制作用 [23, 53]、②カテプシンB活性抑制作用 [45, 57] などの抗炎症作用を、また③リンパ球芽球化抑制作用 [3, 6, 43] などの抗免疫作用を持つと言われている。しかし、Hpの合成調節などその詳細については明らかにされていない。

ウシのHpは、ヒトに比べて多くの研究がなされてはいない。現在ウシのHpについては、ヒトのHpと分子量、免疫反応性、重合体形成等に違いが確認されている [9, 40]。また、その生理的意義については、急性期反応タンパク質としての研究が主として検討がなされている。ウシの血清Hpは、通常健康な状態で検出されることはなく、急性の炎症反応によって増加するとされている



[5, 33, 40, 60]。そのため、炎症時や手術後の回復を知るマーカーとして応用されている。しかし、炎症反応時以外にも、輸送などによる消耗やストレス、飢餓、デキサメサゾン投与と絶食の組み合わせ等により、Hpが認められる[39, 66, 67]との報告もあり、ヒト同様、ウシ血清Hpの合成調節や生理的意義についてはさらに検討が必要と思われる。

最近、肝TG量が増加した野外のウシ血清中に新たに出現する35kDaと23kDaのタンパク質が報告された。このタンパク質は、同定の結果、ハプトグロビンと確認された。肝TG量の増加時にHpが有意に認められることから、Hpがウシ脂肪肝の新たなマーカーとして利用できるのではと報告している[55, 66]。

ウシ脂肪肝に関する研究は、以上述べてきたようにその発生における多様性、複雑な発生機序、発生予測の困難さなどから、野外の発症例だけを対象とした研究だけでは十分な解明を果たせないと思われる。しかしながら、ウシ脂肪肝に関する研究は、自然発症例に関連した報告[36, 38]が主にされており、実験的に薬物を使用して脂肪肝を誘導した報告はない。メチオニンの誘導体であるエチオニンは、ラットに脂肪肝を起こすことが知られている。これは、肝臓中のアポリポタンパク質等の蛋白質合成阻害によって肝臓にTGが蓄積したと考えられている[10, 24, 27, 65]。

本研究の主目的は、ウシ脂肪肝の病態解明の一助としてエチオニン投与によるウシ脂肪肝の実験モデルを作出することである。この薬物投与によるウシ脂肪肝の誘導において、特に血液中のリポタンパク質およびハプトグロビンの動態に注目し検討した。さらに、分娩後に脂肪肝が多く発生していることから、周産期におけるリポタンパク質およびハプトグロビンを中心としてその血中動態を検討した。



## 分析方法

### 1 肝臓中のトリグリセリド測定法

肝臓中のTG量測定は、Dole [8] と Snyderら [59] の方法により以下の通り実施した。

生検にて採取した肝臓0.5gを5 mlの抽出液（n-Propyl alcohol 40 : n-Heptane 10 : 1N Sulfuric acid 1）中でホモジナイズし、さらにn-Heptane 2mlとH<sub>2</sub>O 3mlを加えて激しく振盪した後、n-Heptane層を0.1ml採取し窒素ガスで風乾した。これに、Alkaline hydroxylamine液（2% Hydroxyl ammonium chloride、4% NaOH、95% Ethyl alcohol）1mlを加えて65°C、2分間加温した。さらに Ferric perchlorate 液（0.2% Iron(Ⅲ) perchlorate、3.4% Perchloric acid(70%)、96% Ethyl alcohol）2.5mlを加えて室温で30分静置後、530nmの吸光度を測定した。

### 2 リポタンパク質の分離

血清中のリポタンパク質は、図1の如く密度の違いを利用する超遠心法 [18] により、キロミクロン（CM）、超低密度リポタンパク質（VLDL）、低密度リポタンパク質（LDL）および高密度リポタンパク質（HDL）に分離した。

### 3 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

SDS-PAGEでのタンパク質の分析は、不連続緩衝液系を用いる Laemmliら [30] の方法に従った。即ち、血清およびリポタンパク質試料を予め3%SDS、5% 2-Mercaptoethanol (2ME)存在下で、100°C、3分間処理した後、7.5、12または13%のポリアクリルアミドゲルに添加した。泳動緩衝液（0.05M Tris、0.38M Glycine、0.1%SDS、pH8.75）下で、150Vで約2 - 4時間泳動をした。その後、ゲルをCoomassie brilliant blueで染色し、タンパク質のバンドを検出した。尚、分子サイズマーカーとして、myosin heavy chain（205kDa）、 $\beta$ -galactosidase（135kDa）、



phosphorylase b (94 kDa)、bovine serum albumin (67 kDa)、ovalbumin (43 kDa)、 $\alpha$ -chymotrypsinogen A (26 kDa)、myoglobin (18.5 kDa) および cytochrome C (12.5 kDa) を使用した。

#### 4 ハプトグロビンの測定

ハプトグロビン測定は、Yoshinoら [67] の Single radial immunodiffusion (SRID) 法にて実施した。

抗ウシHpウサギ血清は、Yoshinoから分与された血清を使用した。2.5mlの2%寒天溶液に、2.5mlの溶液(40mMリン酸緩衝液、0.84M NaCl、2 mM EDTA、0.1% NaN<sub>3</sub>、pH 7.0、0.125 mlの抗ウシHpウサギ血清を含む)を混合した。2 mm以上になるように寒天の厚さを保ち、直径5 mmのホールを開けた。被検血清をそのホールに30 $\mu$ l注入し、37 $^{\circ}$ C、24時間静置した後、沈降線の直径を測定しHpの濃度を決定した。

Yoshinoから分与された標準Hpを用いて測定したところ、図2に示す標準直線が得られ、この方法では、25-500 $\mu$ g/ml範囲内で定量的測定が可能であることが確認された。

#### 5 ApoB-100の測定

ApoB-100の測定は、Katohら [26] のSRID法を用いた。

抗ウシApoB-100ウサギ血清は、Katohから分与された血清を使用した。2.5mlの2%寒天溶液に、2.5mlの溶液(40mMリン酸緩衝液、0.3M NaCl、2 mM EDTA、0.1% NaN<sub>3</sub>、pH 7.2、0.15 mlの抗ウシApoB-100ウサギ血清を含む)を混合した。2 mm以上になるように寒天の厚さを保ち、直径6 mmのホールを開けた。被検血清をそのホールに30 $\mu$ l注入し、4 $^{\circ}$ C、72時間静置した後、沈降線内の面積を測定し、ApoB-100の濃度を決定した。



Katohから分与された標準ApoB-100を用いて測定したところ、図3に示す標準直線が得られ、この方法では、30-150 $\mu$ g/mlの範囲内で定量的測定が可能であることが確認された。

## 6 その他

タンパク質量は、Lowryら[32]の方法に準じて、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質として定量した。

血清および各リポタンパク質中のTG、Total cholesterol (TC)、Free cholesterol (F-cho)、Cholesterol esters (E-cho)、Phospholipids (PL)、また、血清中のNon esterified fatty acids (NEFA)、Aspartate transaminase (AST)、Alkaline phosphatase (ALP) およびビリルビンの測定は、和光純薬工業(株)から発売されている検査キットを、コルチゾールおよび $\alpha$ 1-Acid glycoprotein ( $\alpha$ 1-AGP)測定は、それぞれDiagnostic product corporation (Los Angeles, CA, U.S.A.)、細菌化学研究所(仙台)から発売されているキットを使用した。

各検査における測定は、全て3回行いその平均値を求めた。

## 7 統計学的処理

各測定値について、Student's *t*-testまたは $\chi$ -square testを用いて平均値の差の検定を行い、全て危険率5% ( $P<0.05$ ) および1% ( $P<0.01$ ) 未満で有意と判定した。



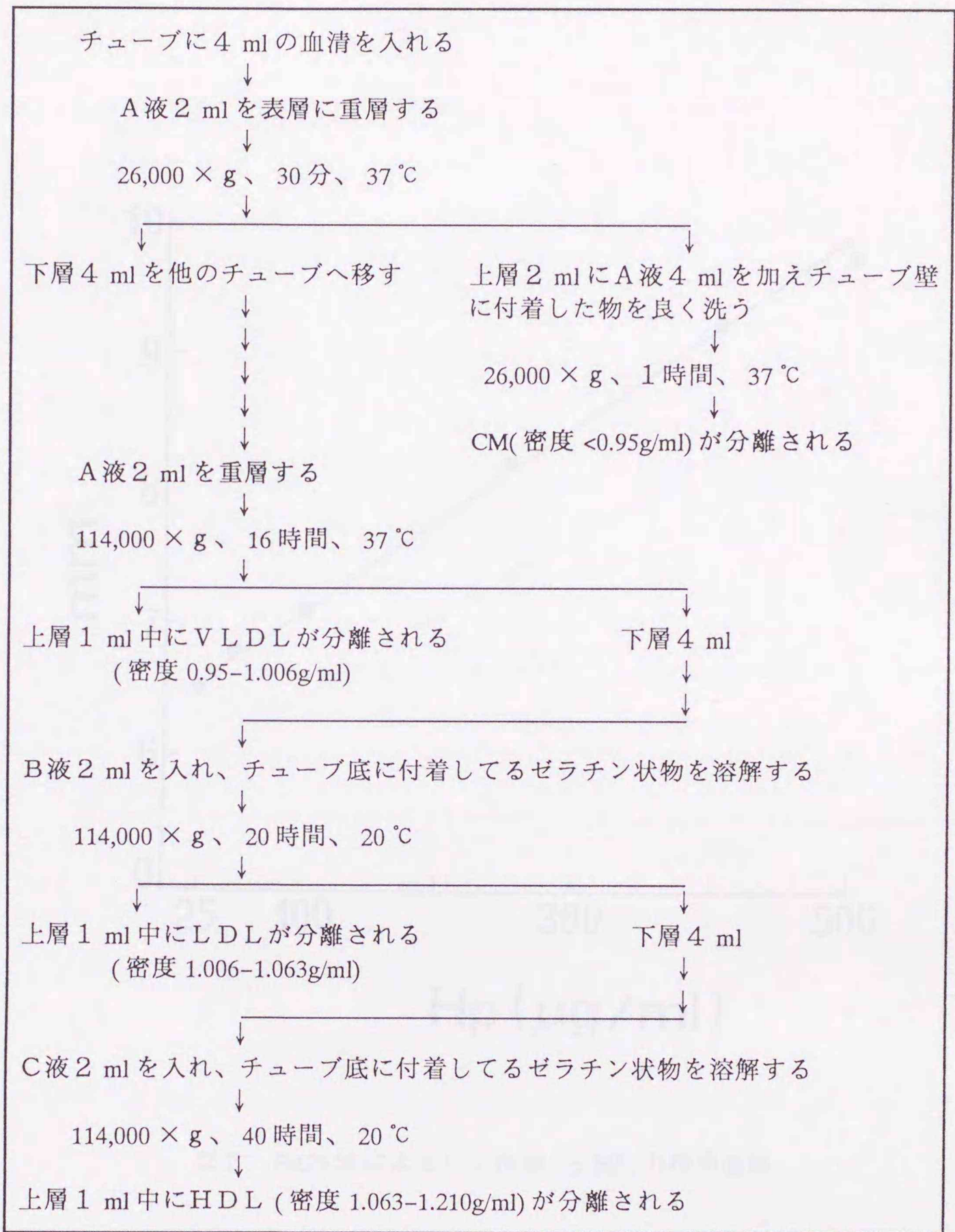


図1 リポタンパク質の分離手順

リポタンパク質の分離手順を示した。A、BおよびC液の組成は、次の通りである。

A液 (密度 1.006 g/ml) : 0.195 M NaCl

B液 (密度 1.182 g/ml) : 0.195 M NaCl、 2.44 M NaBr

C液 (密度 1.478 g/ml) : 0.195 M NaCl、 7.65 M NaBr

(A、B、C液共に 0.01% EDTA、 1mM NaOH を含む)



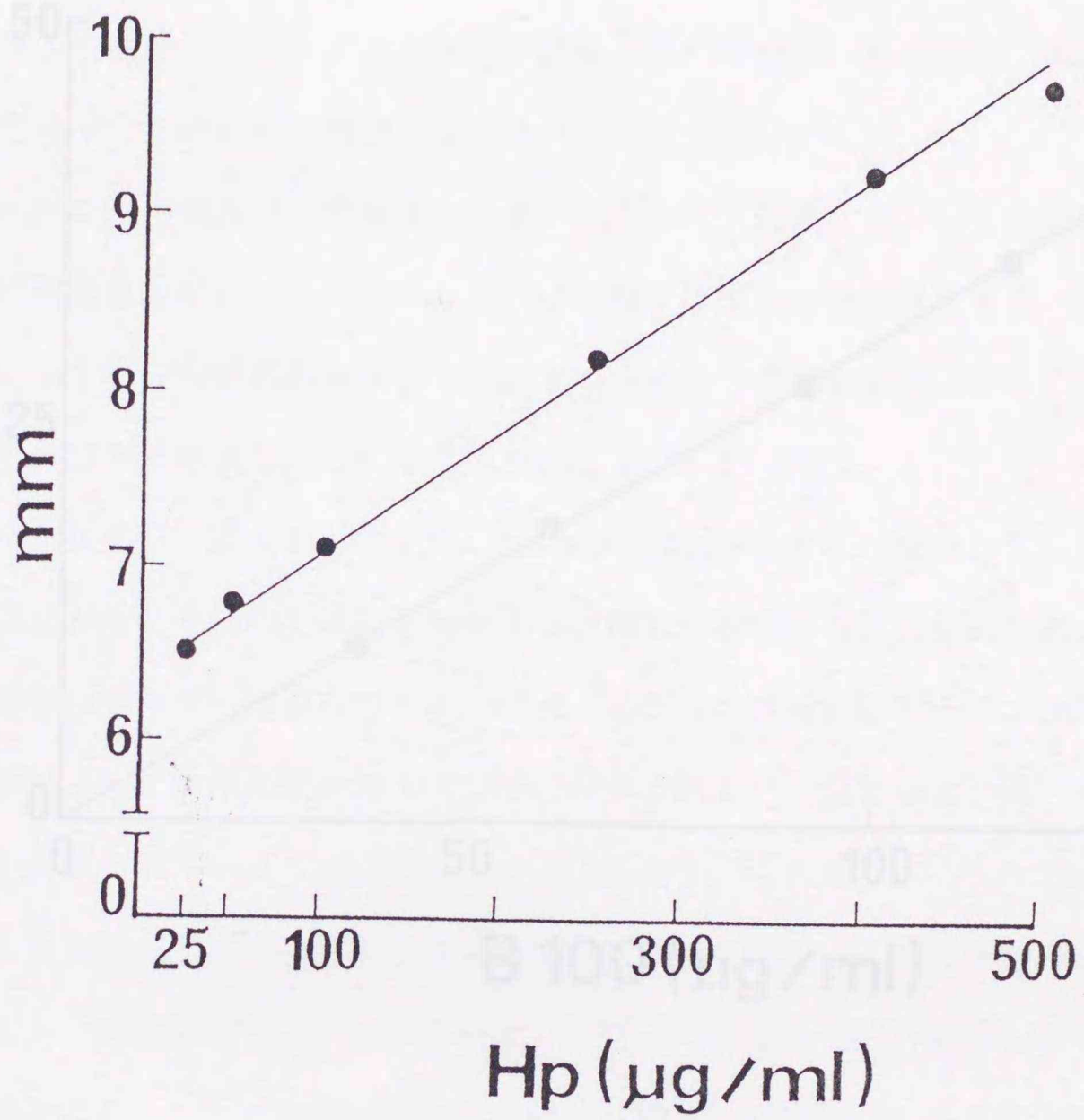


図2 SRID 法によるウシ血清 Hp 測定標準直線



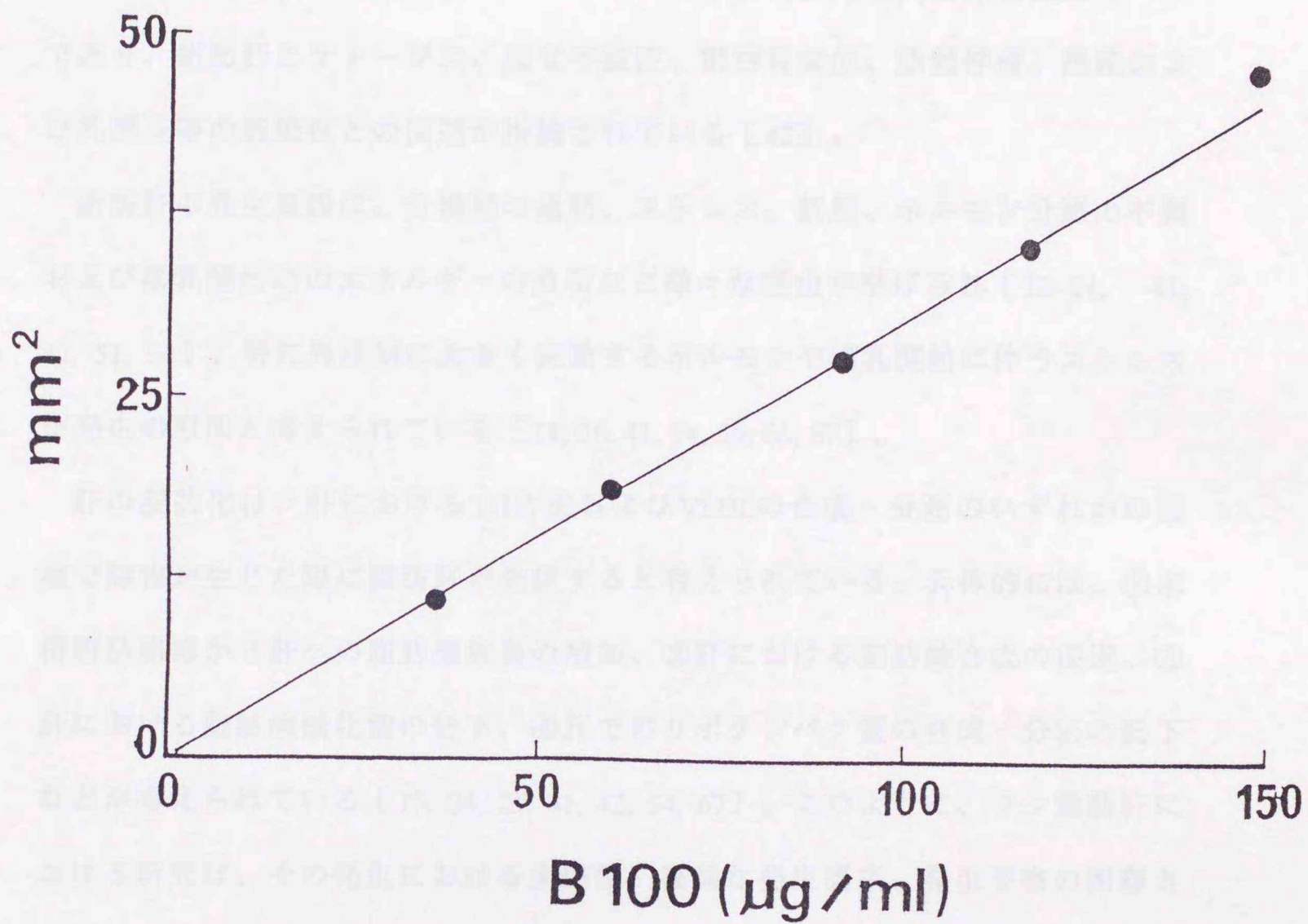


図3 SRID法によるウシ血清 ApoB-100 測定標準直線



## 第1章 エチオニン投与によるウシ脂肪肝の作出

### I 目的

乳用牛の脂肪肝は、高泌乳牛の周産期における代表的な代謝障害要因の一つであり、脂肪肝とケトージス、起立不能症、第四胃変位、胎盤停滞、難産および乳房炎等の感染症との関連が指摘されている [42]。

脂肪肝の発生原因は、分娩前の過肥、ストレス、飢餓、ホルモン分泌の不調および泌乳開始時のエネルギーの負荷など様々な理由が挙げられ [12-14, 41, 42, 51, 54]、特に周産期に大きく変動するホルモンや泌乳開始に伴うストレスが発生の原因と考えられている [14, 16, 41, 54, 56, 66, 67]。

肝の脂肪化は、肝におけるTG合成およびVLDLの合成・分泌のいずれかの過程で障害が生じた際に脂肪肝が発症すると考えられている。具体的には、①末梢脂肪組織から肝への脂肪酸動員の増加、②肝における脂肪酸合成の促進、③肝における脂肪酸酸化能の低下、④肝でのリポタンパク質の合成・分泌の低下などが考えられている [19, 24, 25, 41, 42, 54, 67]。このように、ウシ脂肪肝における研究は、その発生における多様性、複雑な発生機序、発生予察の困難さなどから、野外の発症例だけを対象とした研究だけでは十分な解明を果たせないと思われる。しかしながら、ウシ脂肪肝に関する研究は、自然発症例に関連した報告 [36, 38] が主にされており、実験的に薬物を使用して脂肪肝を誘導した報告はない。メチオニンの誘導體であるエチオニンは、ラットに脂肪肝を起こすことが知られている。即ち、エチオニンが脂肪肝を誘導するのは、肝細胞内の Adenosine5'-triphosphate (ATP) 濃度の低下が引き金とされている。エチオニンは、メチオニンと競合的にATP中の adenosine と結合し、S-adenosylethionine となる。S-adenosylethionine は、物質代謝系の中で利用されず、結果的にATP中



の adenosine濃度の低下が促進されることになる。ATPの低下、即ち S-adenosylmethionine減少によるメチル基転移能低下が、肝におけるアポリポタンパク質の合成阻害となりリポタンパク質の合成・分泌低下が起こり肝の脂肪化が起きると言われている [10, 24, 27, 65]。

そこで、エチオニン投与によるウシ脂肪肝の実験モデルの作出を試み、この薬物投与後の血清リポタンパク質の動態について検討した。

## II 材 料

### 1 供試動物

5頭の雌ホルスタイン牛をエチオニン投与試験に供した。年齢・体重の概要を表1に示した。使用したウシは、全て2産以上の経産牛で、実験中は、非妊娠で且つ、乾乳中であった。実験牛(E1、2、3)および対照牛(C)は、臨床的に正常であったが、E4は実験開始前から元気・食欲低下等の臨床症状を伴う重度の脂肪肝(肝臓中のTG量が119mg/g)と診断されたウシであった。

### 2 エチオニン投与

DL-エチオニンを20mg/mlとなるように0.9%の生理的食塩水に溶解し、体重1kg当りエチオニンを25mgを腹腔内に、7日間隔で投与した。対照には、0.9%の生理的食塩水を実験牛と同様に投与した。

### 3 採材

肝臓中のTG量測定のため、肝臓穿刺により約1gの肝組織材料を採取した。採取間隔は、第1回目のエチオニン投与日を0日目とし、その後7、14日目に実施することを基本とし、最長21日目まで行った。肝臓試料の採取後直ちに



TG量の測定を実施した。

リポタンパク質の分離および各種生化学検査に供するため、血液を頸静脈から採取した。血液採取は、午前8時の給餌前とし、隔日に最長21日間採材を実施した。血液からの血清分離は、室温に2時間放置した後常法により無菌的に行った。リポタンパク質分離は、血清分離後直ちに実施した。生化学的検査等については、採血後4日以内に行い、測定までの保存は、4℃あるいは-20℃とした。

エチオニン投与ならびに材料採材の日程を、投与牛E1を例として図4に示した。その他の実験牛および対照牛における試験日程は、これに準じた。



表1 実験牛の概要

Cow No.	Age (years)	Sex	Body Weight (kg)	Experimental Periods(days)
E 1	8	Female	546	18
E 2	3	Female	573	14
E 3	4	Female	471	14
E 4	6	Female	560	11
C	5	Female	610	21

Day	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Ethionine treatment	▲							▲							▲				
Blood sampling	○		○		○		○		○		○		○		○		○		○
Liver biopsy	◆							◆							◆				◆

図4 E 1におけるエチオニン投与試験プログラム

第1回目のエチオニン投与日を0日目とし、以後7日目および14日目に第2, 3回目のエチオニンを投与した(図中の▲印)。

採血は、第1回目の投与前に採材をし、以後隔日に採血をした(図中の○印)。

肝生検は、第1回目の投与前に行い、以後7, 14, 18日目に実施した(図中の◆印)。

なお、投与日と採血あるいは肝生検実施日が同じ日には、エチオニン投与前に採材を実施した。



### III 結果

#### 1 投与後の肝TG量の変化

エチオニン投与により、実験的に脂肪肝を誘導することに成功した(図5)。投与前の肝TG量は、8.58-12.7mg/g(投与前の4頭の平均は、 $10.8 \pm 2.1$ mg/g)の範囲であった。エチオニン投与後、実験群では肝TG量の増加を認め、特に2回目の投与後は、投与前値に比べて4-14倍量へと増加を示した。このことは、体重1kg当りエチオニンを25mg、1週間隔で腹腔内に投与する方法が、ウシに対して脂肪肝を誘導させることを示している。

#### 2 血清および各リポタンパク質中のタンパク質量の変化

血清タンパク質量は、エチオニン投与によって特に変動は認められなかった。各リポタンパク質でのタンパク質量は、HDLが最も多く次いでLDL、VLDLの順であった(図6)。HDLは、リポタンパク質中の大部分を占めており、従来の報告[7, 17, 22, 47]のとおり、ウシリポタンパク質中の主要な構成成分であった。エチオニン投与後、HDLおよびLDLのタンパク質量は有意に減少したが、VLDLのタンパク質量は特に変動は示さなかった。キロミクロン(CM)中のタンパク質量は、非常に少なく対照を含め実験群についても期間中0.005-0.02mg/mlの範囲で推移したに過ぎなかった。

#### 3 各リポタンパク質分析

リポタンパク質中のアポリポタンパク質の変化を、SDS-PAGEによって確認した。アポリポタンパク質は、従来から報告のあるタンパク質の分子サイズとその局在性から推定をした[10, 22]。キロミクロンは、その含有量が非常に少なかったため、全例でアポリポタンパク質の変動を確認できなかった。しかし、myosin heavy chain (205kDa)より大きな分子サイズをもつタンパク質のバ



ンドが1本僅かに認められた。VLDLの泳動像についても、CM同様そのタンパク質含有量が少ないためか、対照(C)とE2のみで確認できた(図7)。VLDL中のタンパク質は、主として3本のバンドが認められた。このうち、2本はmyosin heavy chain (205kDa)より大きな分子サイズをもつタンパク質であり、分子サイズの小さい方は、CM中に認められたタンパク質と分子サイズが同じであった。一方、分子サイズの大きい方のタンパク質は、CM中には認められなかったが、LDL中にはVLDL中よりさらに明確に認められるタンパク質であった(図8)。これらタンパク質を他の報告にあるリポタンパク質中のタンパク質の局在性と分子サイズ[7, 17]から、この2つのタンパク質は、大きな方をアポリポタンパク質B-100(ApoB-100、分子サイズ約550kDa、VLDLとLDLに多く局在)、小さな方をアポリポタンパク質B-48(ApoB-48、分子サイズ約245kDa、CMに基本的に存在)と推定した。VLDL中の残る1本の71kDaのタンパク質は、VLDLには認めたがLDLには認めなかった。このタンパク質は、ウシ血清アルブミンの分子サイズ67kDaと同じような分子サイズを示したが、このタンパク質については他に報告がなく推定をするには至らなかった。エチオニン投与後8、10、14日目には、ApoB-100は減少を示した。しかし、ApoB-48および71kDaのタンパク質は、特に変化を示さなかった。

E2から得られたLDLのSDS-PAGEを図8に示した。VLDLで認めたApoB-100が、主要なタンパク質として認められ、その他に43kDaのタンパク質が確認できた。この43kDaのタンパク質は、その分子サイズからラットのApoA-IVと類似していた[7]。エチオニン投与後、ApoB-100と43kDaのタンパク質は図8に見られるように減少し、LDL中のタンパク質量の減少(図6)と一致していた。さらに、このLDL中のApoB-100についてデンストメータにより測定する(図9)と、明らかに投与牛では、全頭がApoB-100の減少を示した。また、SDS-PAGEによる解析よりも、さらに定量性のあるSRID法でエチオニン投与後の血清



ApoB-100濃度をSRID法にて測定すると、対照は減少することなく、むしろやや増加する傾向を示した。しかし、実験牛では個体により期間中増減は認められたものの、投与前値に復帰することなく減少した（図10）。このように明らかにエチオニン投与後、血中ApoB-100濃度は減少することが確認された。

分子サイズ約24kDaのタンパク質が、HDL中に最も多く認められた（図11）。このタンパク質は、HDL中に多く存在することと分子サイズからApoA-Iと推定した。この他に、図11に認めるとおり、43kDaのタンパク質も僅かながら認められた。しかしながら、VLDL、LDLで認めたApoB-100は認められなかった。ApoA-IについてもLDLと同様デンストメータで測定したところ、エチオニン投与後、LDLのApoB-100程明瞭ではなかったが、HDL中のApoA-Iも減少していた（図12）。

#### 4 血清および各リポタンパク質中のTG、TCおよびPLの変化

それぞれのリポタンパク質中の脂質成分は、他の報告[49]のとおりであった。TGは通常ヒトでは、CM、VLDLに多く含まれるとされているが、ウシの場合は、LDL中に多く含まれると言われ[49]、今回の例でも同様な結果であった。TCおよびPLは、HDL中に最も多く、次いでLDL、VLDL、CMの順に含有量が減少した（表2）。

血清および各リポタンパク質中のTG量は、TCやPLに比べて変動が一定ではなかった（表3、図13、14）。この変動は、実験牛だけではなく、対照牛も同様な傾向が認められた。TGの変化は、比較的多く含むLDL中の変動で検討した。E1、E2共に投与後8日目に有意に減少し、ApoB-100についても8ないし10日目以降に著明に減少した。肝TG量について見ると投与後14日目に著しい増加を示した。これに対して、E3ではLDLのTGは投与後2日目に減少したが、VLDL中のTGは反対に増加を示した。E3のApoB-100は、投与後2日目に減少



をし、また、肝TG量は投与後7日目に増加を示した。この実験牛での結果は、ApoB-100の減少とLDL中のTG量減少とは関連を示し、さらに肝TG量の増加とも関連していることを予想させた。

血清、LDLおよびHDL中のTCは、全ての投与牛で減少した(図13)。このTCの減少は、E-choの減少と連動しているが、F-choは変動を示さず、この結果F-choとE-choの比(F/E比)は、増加することが示された(図15)。

血清、LDLおよびHDL中のPLは、TCと同様な変化を示し(図14)、投与後減少した。

#### 5 脂肪肝牛でのエチオニン投与試験

実験開始前から元気・食欲低下等の臨床症状を伴う重度の脂肪肝と診断されたウシを使って、同様にエチオニン投与を試みた(E4、図16)。肝TG量は、投与前119mg/gから投与後7日目には238mg/gと著明に増加した。E4は他の実験牛と比べて、血清および各リポタンパク質中のTGが、明らかに減少することが認められた。血清(図10)およびLDL中のApoB-100の変動は、LDLまたVLDL中のTG量とよく相関していた。TC、PLに関してもTGと同様、他の実験牛に比べて著明な減少を示した。F/E比についても、投与前0.41から投与後11日目には1.61と増加をした。ところで、TC、PLは投与後2日目に減少を示したが、ApoA-Iは投与後6日目に初めて減少を示した。このように、HDL中のApoA-IとTC、PLの関連については、認めることはできなかった。

#### 6 血清中のNEFA、AST、ALPおよびビリルビンの変化

血清中の各種生化学検査の結果は表4に示すとおりである。AST、ALPおよびビリルビンは投与牛で著しく増加するという変化を示し、野外例と同じ結果となった[42]。これら変動の起点は、E1およびE2では2回目の投与後に



認められたが、E3では1回目の投与からであった。野外の脂肪肝発症時には、持続的なNEFAの上昇が認められるとの報告[41, 42, 63]があるが、今回の実験ではこのような持続的なNEFAの増加傾向は認められず、NEFAは対照を含め全ての実験牛で検査日により増減が認められた。





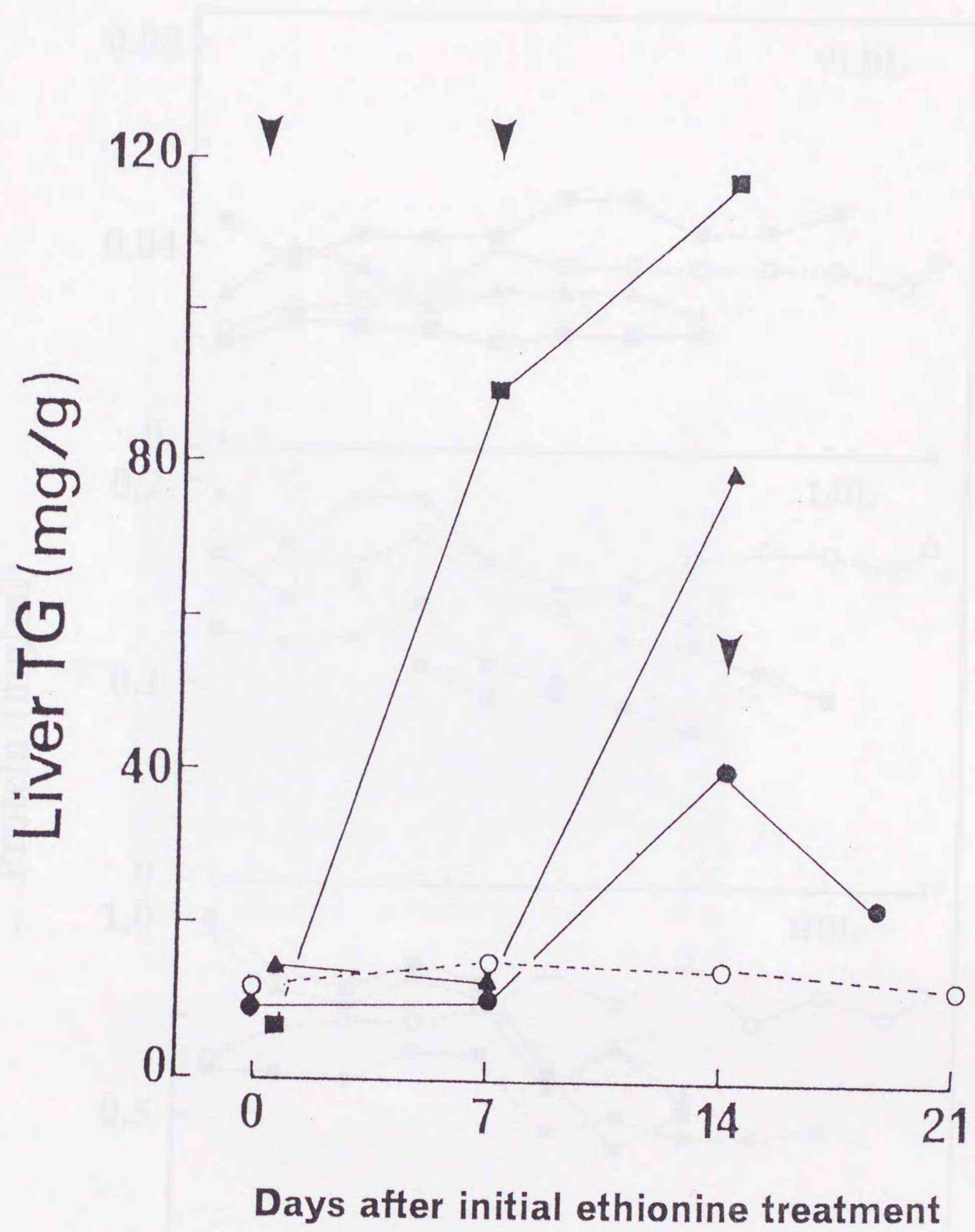


図5 エチオニン投与後の肝 TG 量の変化  
エチオニン投与は、0、7日目 (E1、E2、E3) と 14日  
目 (E1) で、図の矢印で示す。  
○ = C、● = E1、▲ = E2、■ = E3



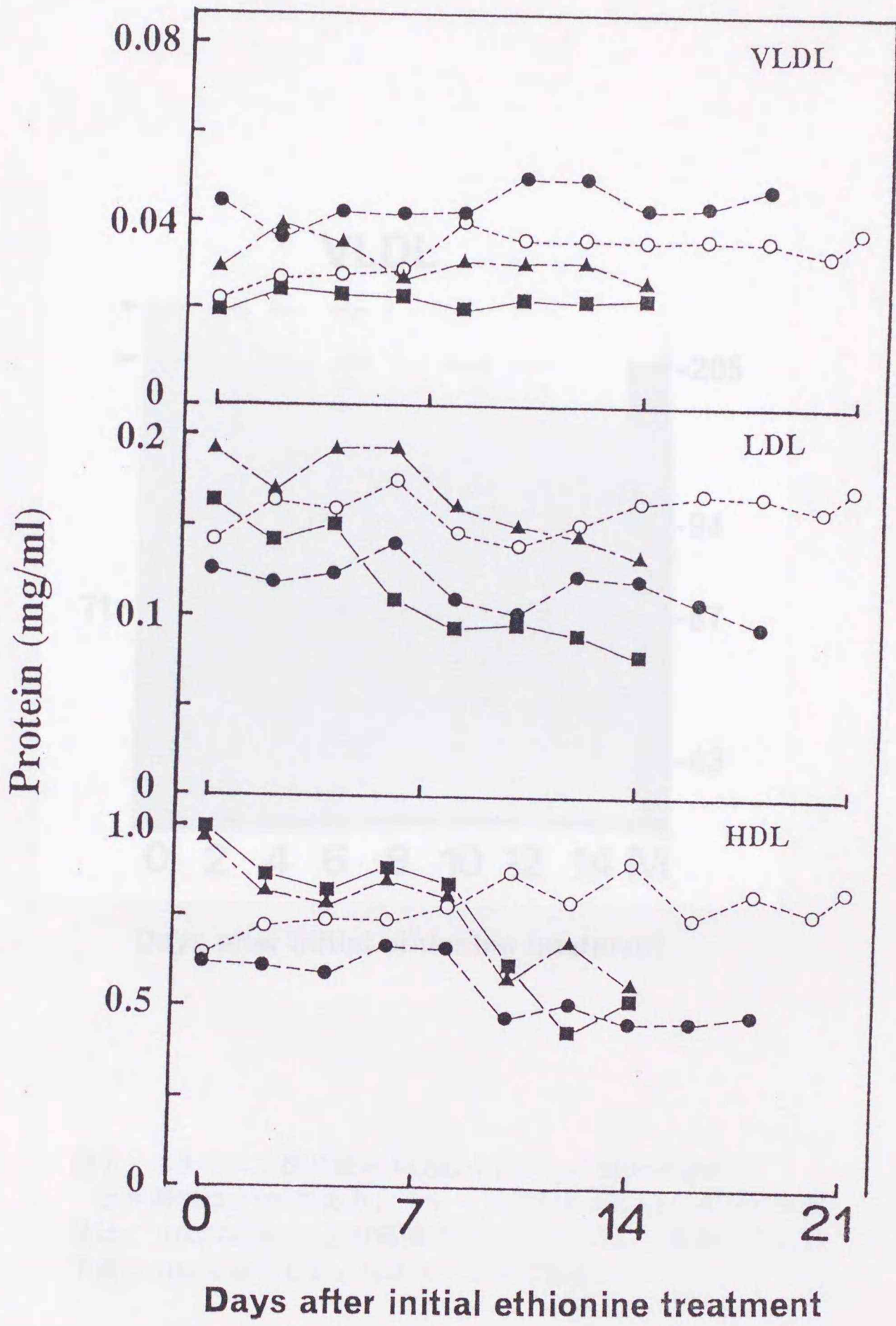
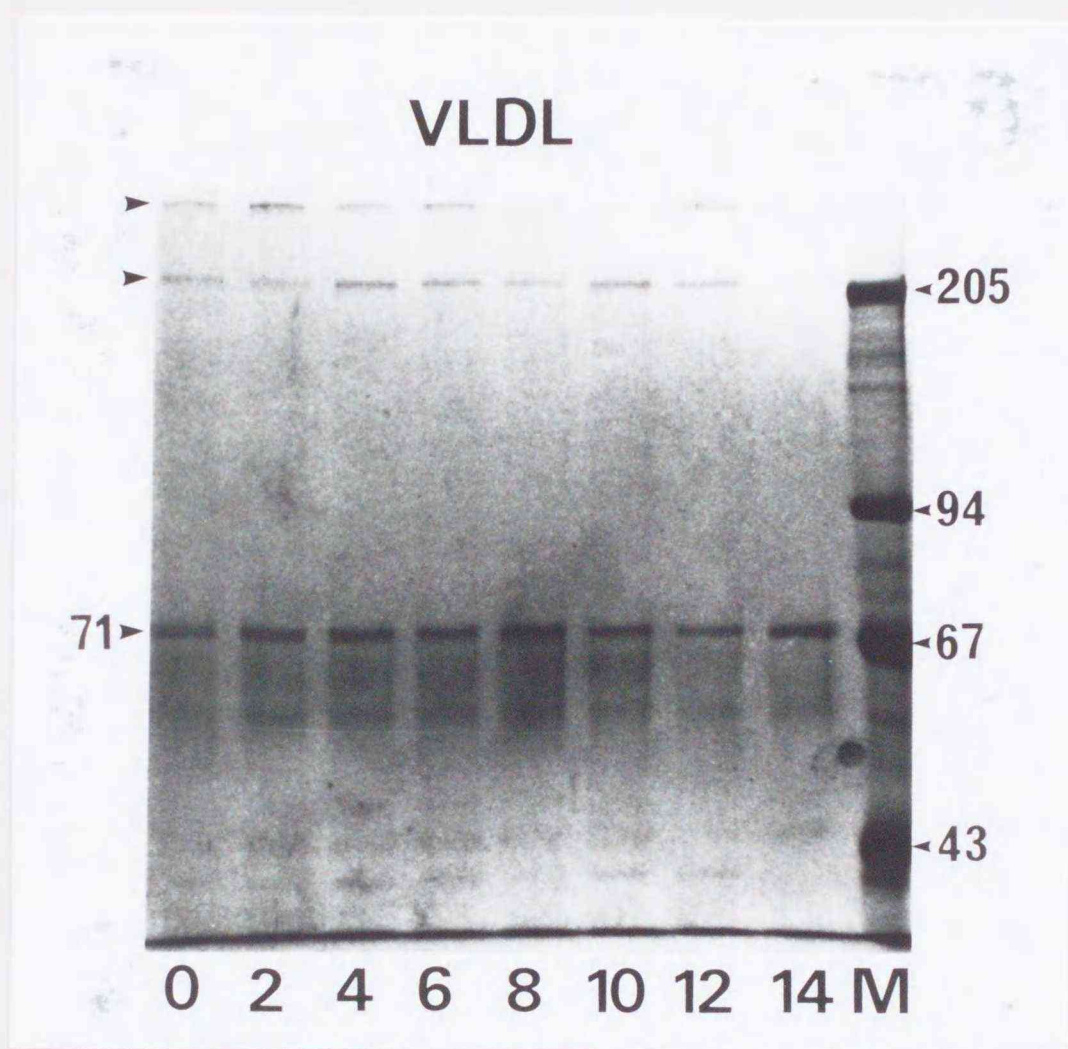


図6 エチオニン投与後の VLDL、LDL および HDL 中のタンパク質変化  
○ = C、● = E1、▲ = E2、■ = E3





Days after initial ethionine treatment

図7 エチオニン投与後の VLDL (E2) の SDS-PAGE

ゲル濃度は 7.5% であり、1 レーン当たり 100  $\mu$ l (タンパク質量は、0.0027-0.0039mg の範囲に含まれている。) 添加した。分子量は kDa で表示した。M はマーカーである。



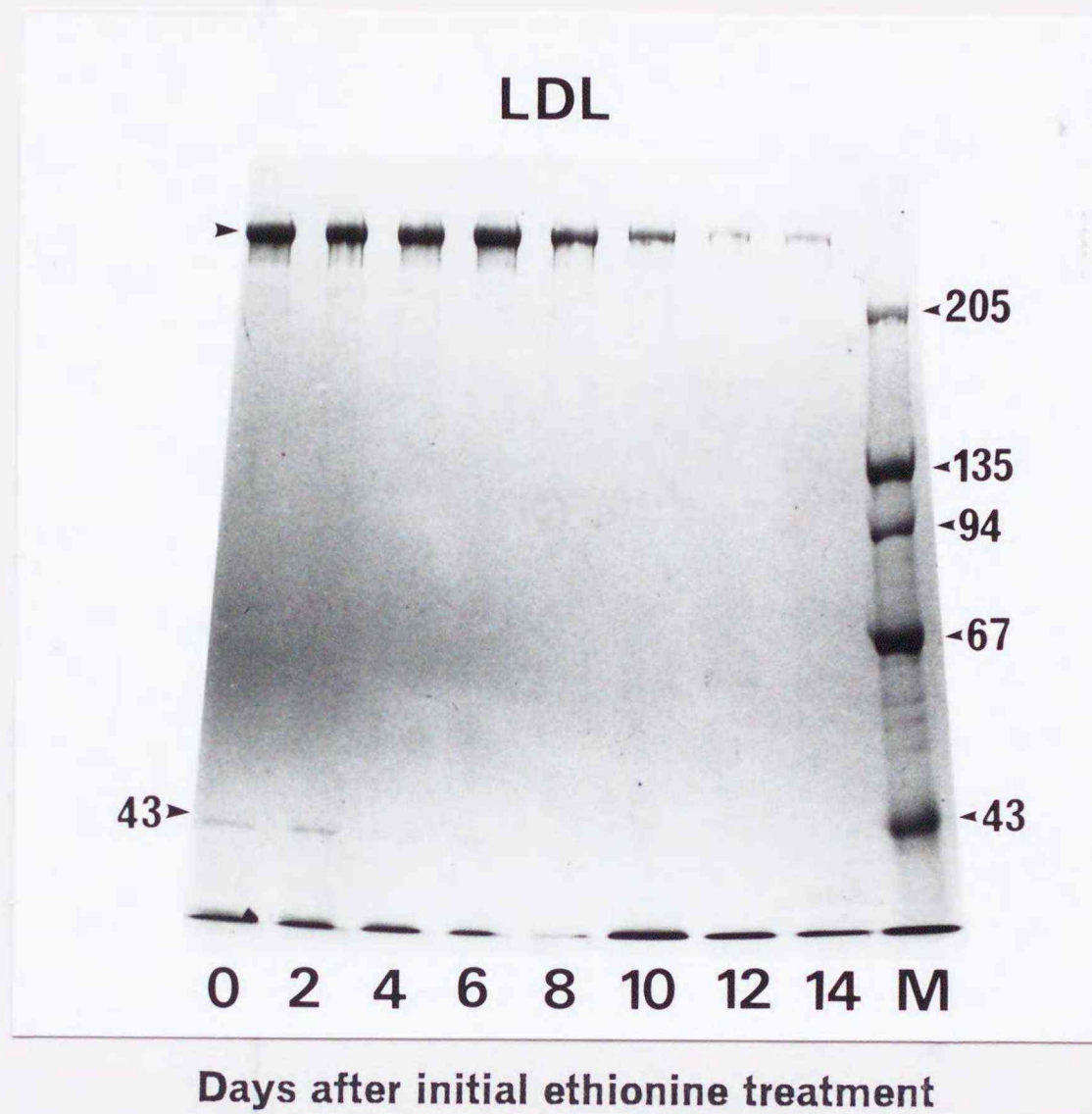


図8 エチオニン投与後の LDL ( E 2 ) の SDS-PAGE  
ゲル濃度は 7.5% であり、1 レーン当たり 100  $\mu$ l (タンパク質量は、0.0135-0.0195mg の範囲に含まれている。) 添加した。分子量は kDa で表示した。M はマーカーである。



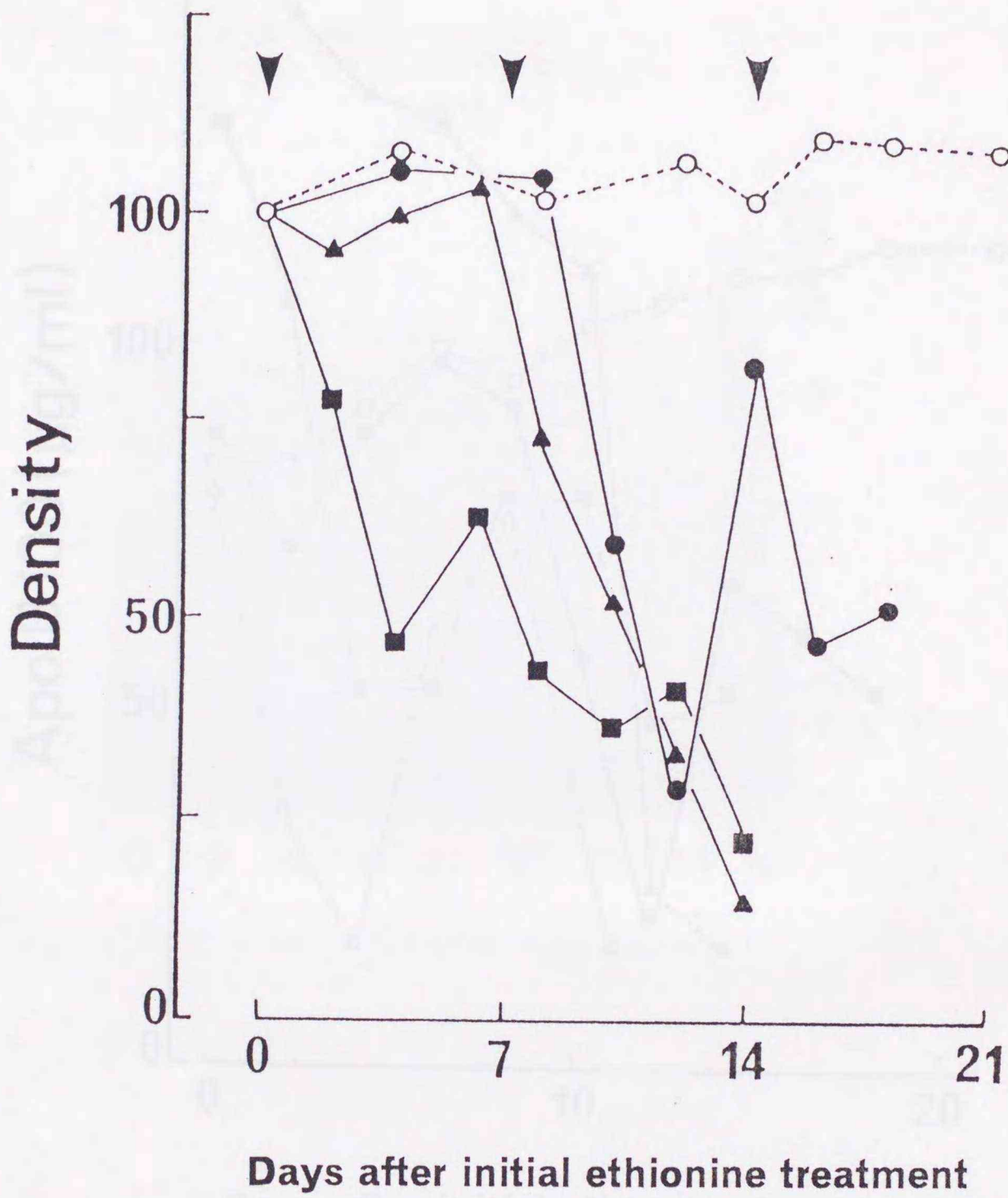


図9 エチオニン投与後の LDL 中の ApoB-100 の変化  
エチオニン投与後の LDL 中の ApoB-100 濃度の変化を、デ  
ンシトメーターにより測定した結果である。投与前値を 100 とし  
て、その後の変化を指数として表示した。矢印は、エチオニン投  
与を示す。  
○ = C、● = E1、▲ = E2、■ = E3



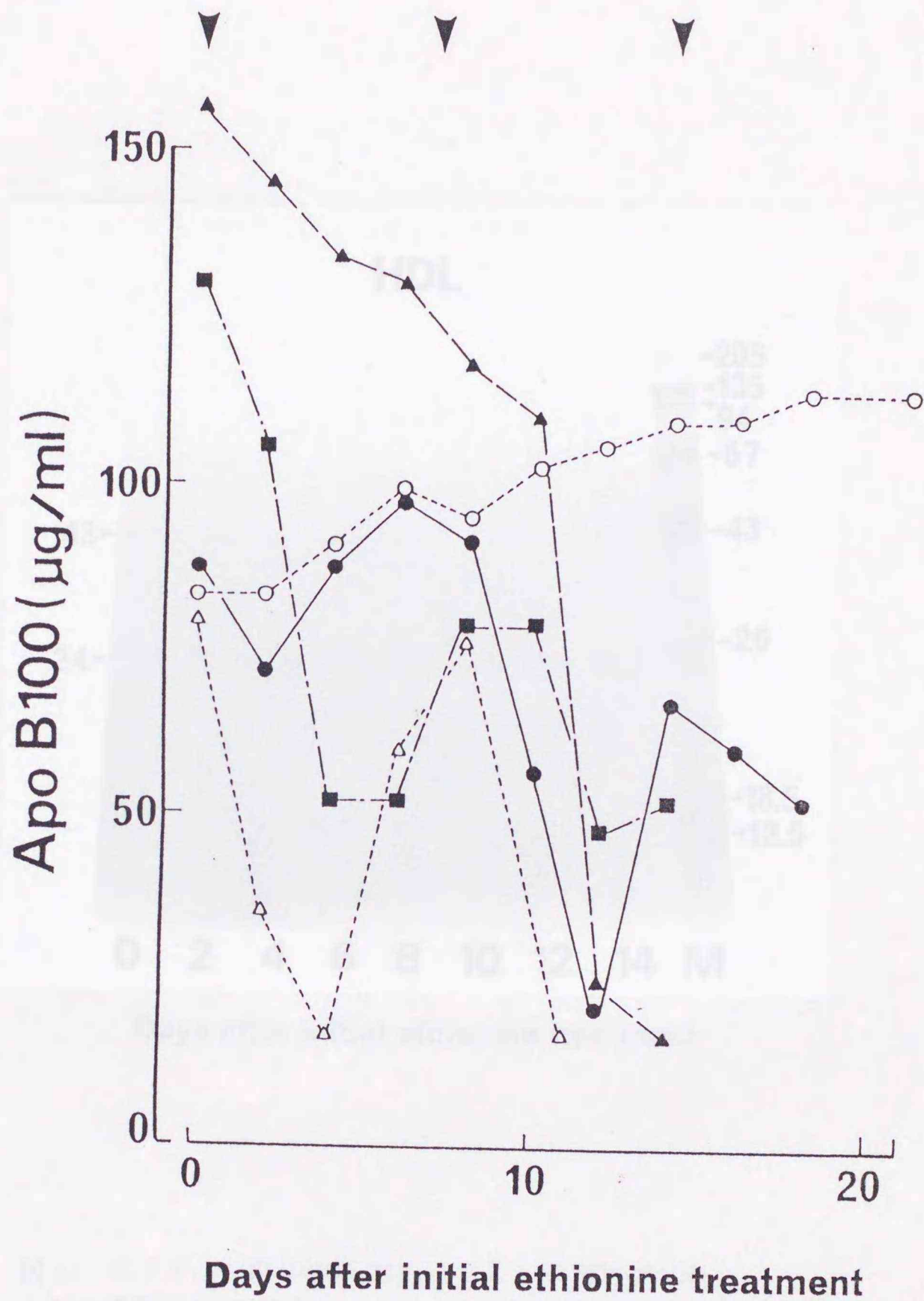


図 10 エチオニン投与後の血清 ApoB-100 濃度の変化  
エチオニン投与後の対照および試験牛の血清 ApoB-100 濃度を SRID 法にて測定した。矢印は、エチオニン投与を示す。  
○ = C、● = E1、▲ = E2、■ = E3、△ = E4



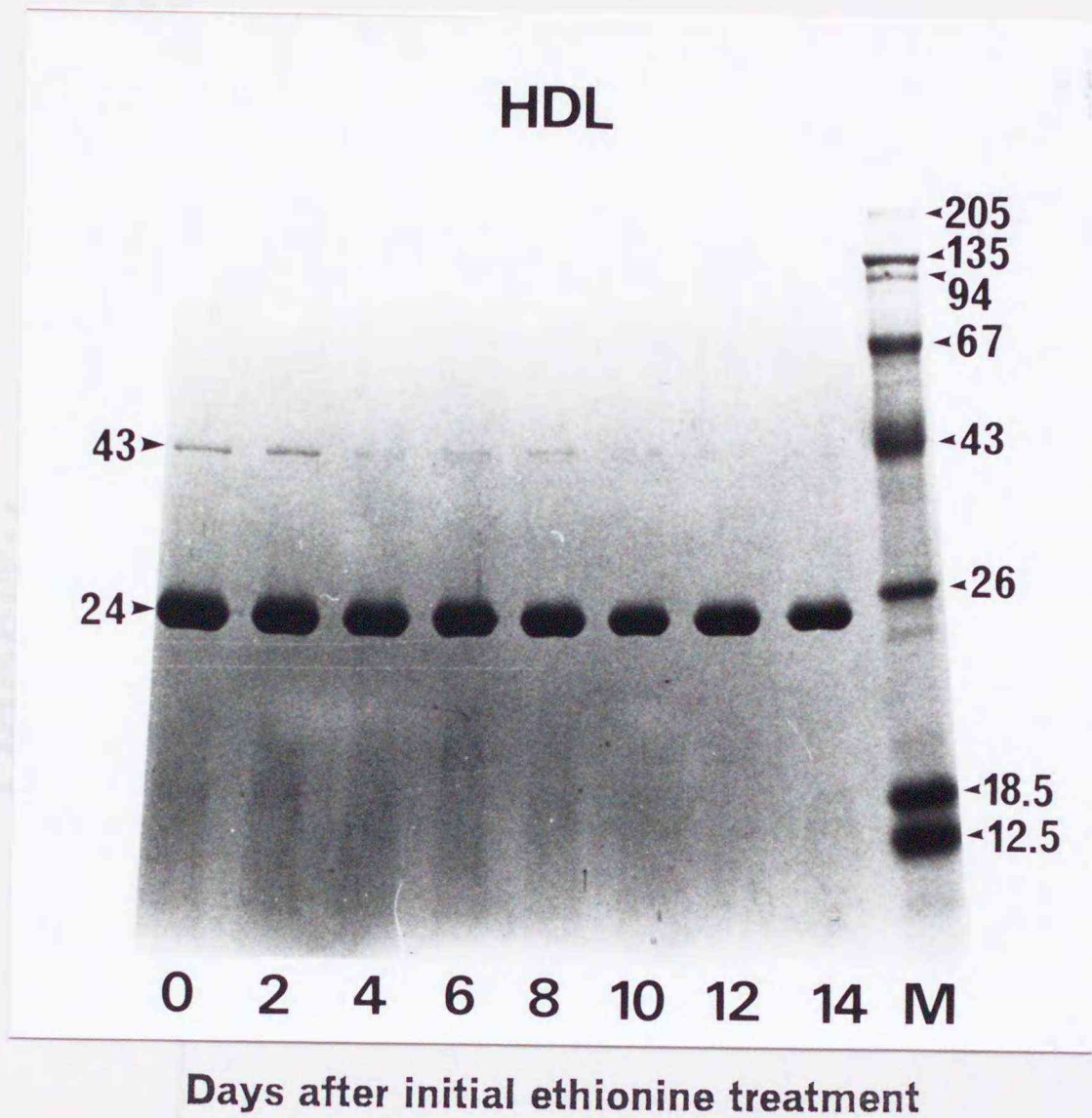


図 11 エチオニン投与後の HDL (E2) の SDS-PAGE  
ゲル濃度は 7.5% であり、1 レーン当たり 100  $\mu$ l (タンパク質量は、0.0569-0.0967mg の範囲に含まれている。) 添加した。分子量は kDa で表示した。M はマーカーである。



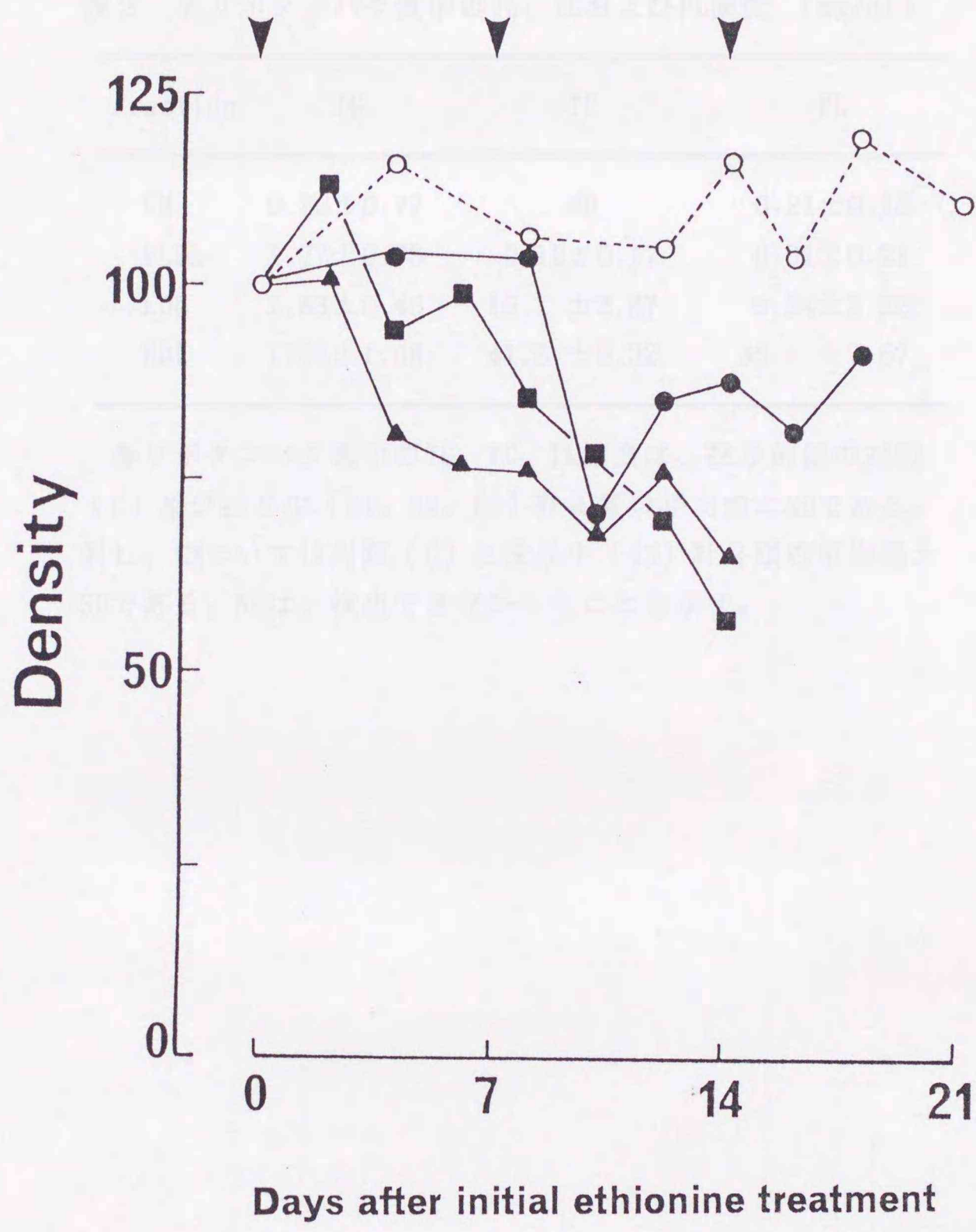


図 12 エチオニン投与後の HDL 中の ApoA- I の変化  
エチオニン投与後の HDL 中の ApoA- I 濃度の変化を、デインシトメーターにより測定した結果である。投与前値を 100 として、その後の変化を指数として表示した。矢印は、エチオニン投与を示す。  
○ = C、● = E 1、▲ = E 2、■ = E 3



表2 各リポタンパク質中のTG、TCおよびPL濃度 (mg/dl)

Fraction	TG	TC	PL
CM	0.83±0.72	ND	0.21±0.16
VLDL	1.77±0.78	0.12±0.17	0.81±0.21
LDL	2.83±0.46	15.1 ±3.87	9.34±2.22
HDL	1.13±1.06	41.5 ±9.32	36.1 ±7.67

各リポタンパク質中のTG、TC、PL濃度は、投与前値の対照 (C) 及び投与牛 (E1、E2、E3) 計4頭の平均値±SDである。但し、CMについては対照 (C) と投与牛 (E3) 計2頭の平均値±SDである。NDは、検出できなかったことを示す。



表3 エチオニン投与後の血清、VLDLおよびLDL中のTG量

Fraction	Cow No.	Days after initial ethionine treatment											
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	21	
Serum	C	17.7	13.0	15.5	18.6	16.8	15.8	20.6	17.3	12.6	14.1	16.2	
		11.5	11.1	12.2	12.3	6.9	9.4	15.0	14.7	8.8	9.9	---	
		17.4	12.4	16.8	14.5	12.3	17.2	21.7	10.7	---	---	---	
	E	14.2	17.6	21.7	17.9	12.7	12.7	15.0	12.1	---	---	---	
		1.78	0.94	1.07	2.53	1.25	1.10	2.07	1.67	1.76	1.78	2.01	
		0.78	0.66	1.21	1.23	0.20	0.08	1.21	0.47	0.96	0.81	---	
	VLDL	E	1.81	1.17	1.75	2.02	0.31	1.53	2.39	0.15	---	---	---
			2.69	5.57	5.49	3.44	1.90	2.45	2.29	1.35	---	---	---
			2.27	3.07	3.01	2.65	2.46	2.35	2.90	3.23	3.32	2.80	3.24
LDL	E	2.23	2.76	3.07	1.89	0.70	1.19	1.52	5.03	1.81	1.80	---	
		2.99	3.57	3.34	2.68	1.55	1.95	2.51	3.14	---	---	---	
		3.32	1.81	2.23	3.38	3.14	2.93	3.99	2.93	---	---	---	

TG量の単位はmg/dlである。  
 ---- = 測定せず。



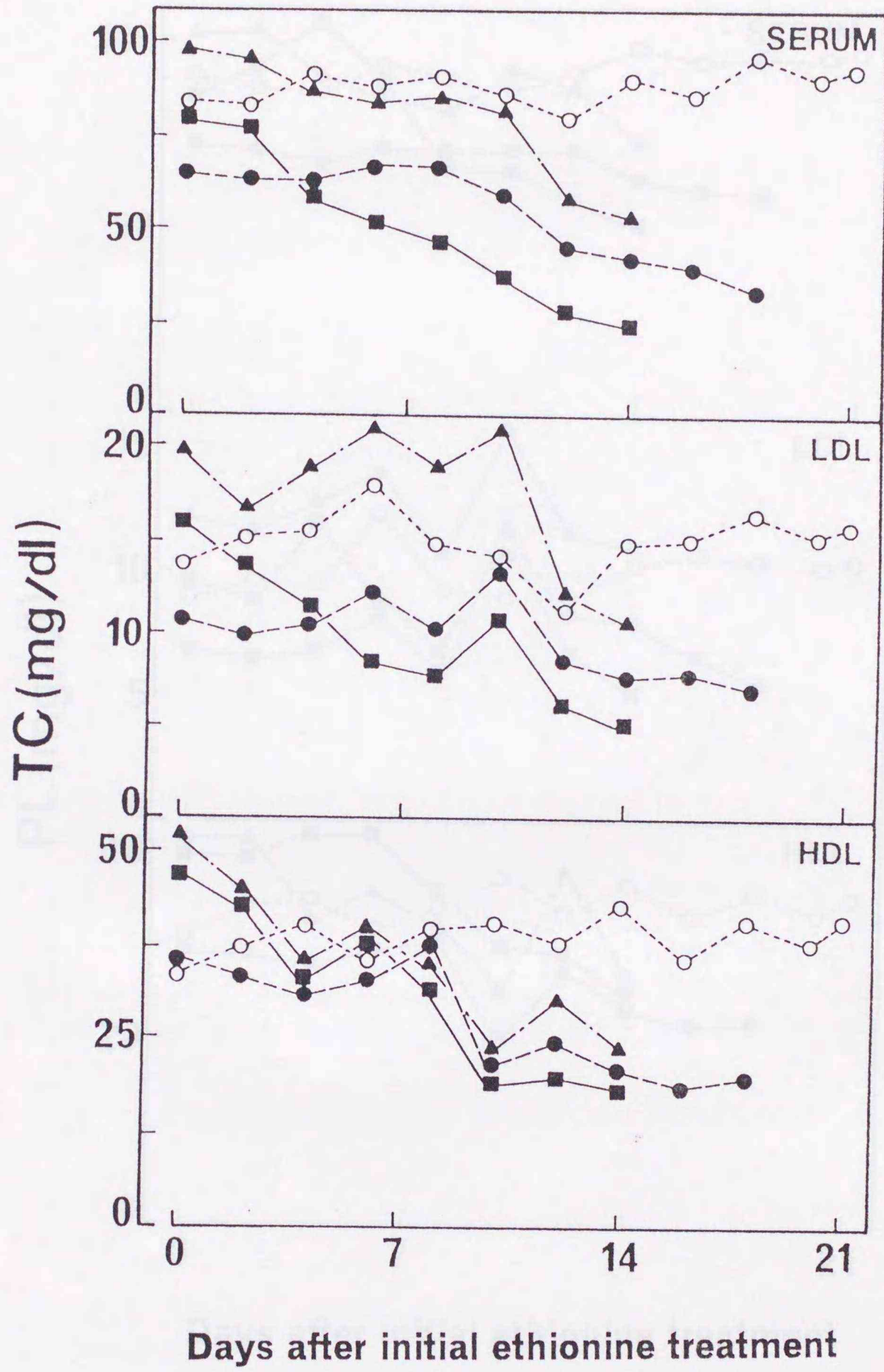


図 13 エチオニン投与後の血清、LDL および HDL 中の TC 変化  
○ = C、● = E1、▲ = E2、■ = E3



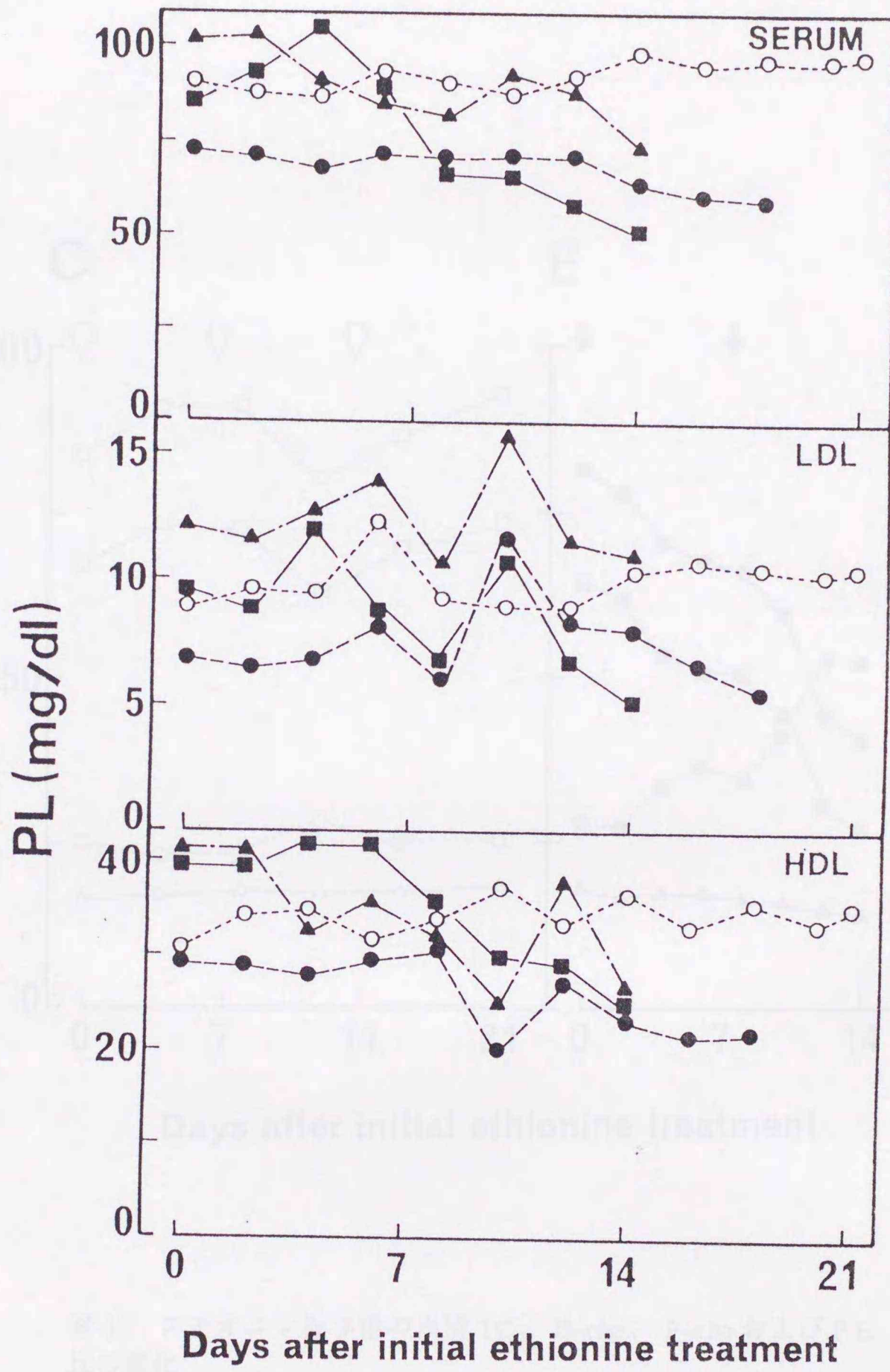


図14 エチオニン投与後の血清、LDLおよびHDL中のPL変化  
○ = C、● = E1、▲ = E2、■ = E3



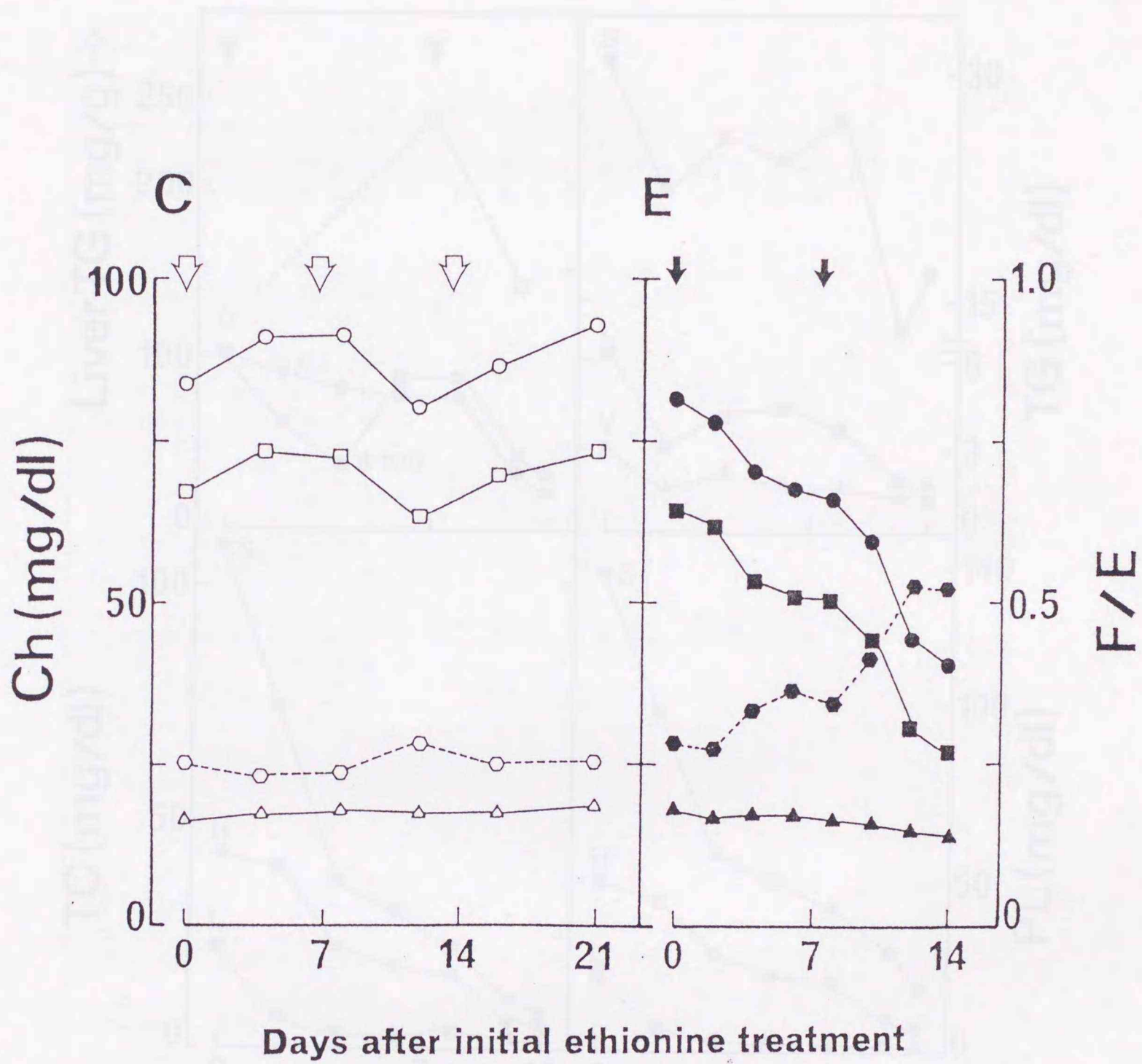


図 15 エチオニン投与後の血清 TC、E-cho、F-cho および F/E 比の変化

Cは対照を、EはE2を示し、矢印▽は対照として生理的食塩水を、↓はエチオニン投与を示す。

○● = TC、△▲ = F-cho、□■ = E-cho、○● = F-choとE-choの比 (F/E比)



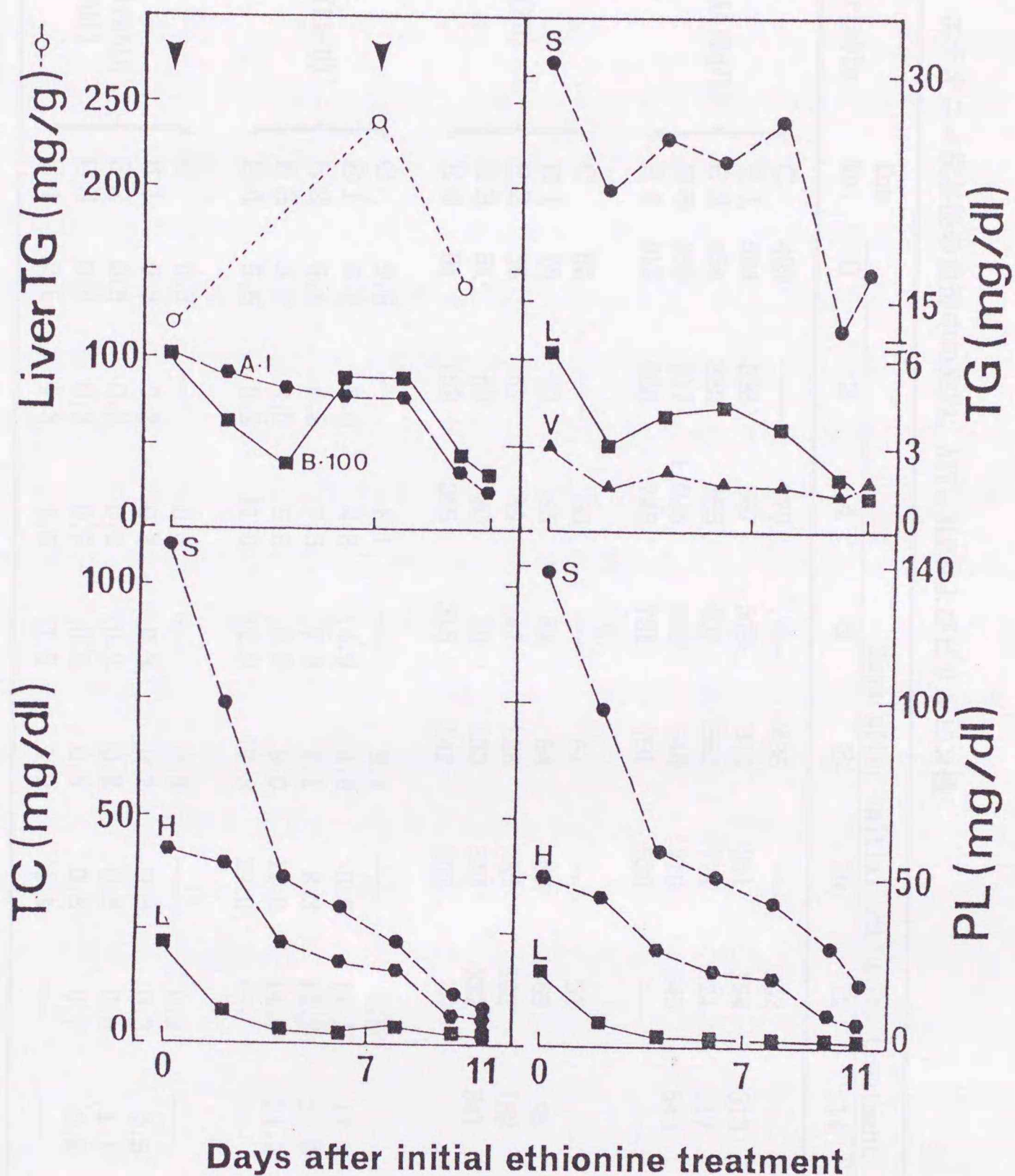


図 16 エチオニン投与後のE4における各種検査成績  
 エチオニン投与後のE4における肝TG量、ApoB-100、  
 ApoA- I、血清および各リポタンパク質におけるTG、TC、  
 PLの変化を示した。矢印はエチオニン投与を示す。  
 B-100 = LDL中のApoB-100、A- I = HDL中のApoA- I、S  
 = 血清、V = VLDL、L = LDL、H = HDL。



表4 エチオニン投与後の血清中のNEFA、AST、ALPおよびビリルビン値

Variable	Cow No.	Days after initial ethionine treatment										
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	21
NEFA (μEq/L)	C	409	---	779	---	486	---	302	---	338	---	528
	E 1	594	538	367	379	314	351	154	313	380	278	---
	E 2	454	380	385	407	562	772	924	917	---	---	---
	E 3	359	317	1,035	540	548	710	540	543	---	---	---
	E 4	912	968	748	721	701	530	---	---	---	---	
AST (KU)	C	62	---	60	---	61	---	51	---	54	---	52
	E 1	26	73	65	64	64	60	69	95	77	76	---
	E 2	56	51	49	47	128	83	102	162	---	---	---
	E 3	51	66	80	79	133	349	327	341	---	---	---
	E 4	91	152	286	315	242	203	---	---	---	---	
ALP (KA-U)	C	9.6	---	8.1	---	8.4	---	9.5	---	7.7	---	8.2
	E 1	5.2	6.0	4.8	4.9	4.8	5.5	11.1	17.6	18.7	17.2	---
	E 2	6.4	6.2	7.3	7.3	7.1	8.3	12.7	22.9	---	---	---
	E 3	3.7	4.5	5.6	6.7	9.0	11.0	14.0	14.2	---	---	---
	E 4	5.6	9.2	11.0	12.9	17.3	29.0	---	---	---	---	
Bilirubin (mg/dl)	C	0.3	---	0.4	---	0.3	---	0.2	---	0.3	---	0.3
	E 1	0.3	0.2	0.2	0.3	0.2	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3	---
	E 2	0.3	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3	0.6	1.1	---	---	---
	E 3	0.2	0.3	0.7	0.5	0.5	0.8	0.7	0.8	---	---	---
	E 4	0.6	1.3	1.5	1.5	1.9	1.1	---	---	---	---	

--- = 測定せず。



#### IV 考察

血清リポタンパク質分離のため、本来ヒト血清を分離するために開発された方法 [18] を用いた。その結果、密度によりキロミクロン (CM)、超低密度リポタンパク質 (VLDL)、低密度リポタンパク質 (LDL) および高密度リポタンパク質 (HDL) を分離した。この分離した各画分が従来言われているリポタンパク質であるかどうかを確認するために、各画分中に含まれるアポリポタンパク質と脂質成分について検討した。

CMでは、含有するタンパク質量が少ないため全ての例について検討することはできなかったが、アポリポタンパク質 B-48 (ApoB-48、分子サイズ約 245kDa) を主体とする画分であった。VLDLと LDLではアポリポタンパク質 B-100 (ApoB-100、分子サイズ約 550kDa) を確認したが、HDLには認められなかった。さらに、HDLではアポリポタンパク質 A-I (ApoA-I、分子サイズ約 24kDa) が確認された。その他、ApoB-48と分子サイズ約 71kDaのタンパク質が VLDLに認められたが、LDLと HDL中には認められなかった。このことは VLDLと LDLとの分離が正確であったことを示している。分子サイズ 43kDaのタンパク質は、LDLと HDL中にのみ認められたことおよびその分子サイズからアポリポタンパク質 A-N (ApoA-N) と予想されるがウシにおける報告がなく推定するには至らなかった。この様に、CMでは ApoB-48が、また VLDLと LDLは ApoB-100が、さらに HDLは ApoA-I が主要なタンパク質として検出され、従来から報告のあるアポリポタンパク質の分子サイズとその局在性 [10, 22] とほぼ一致し、リポタンパク質の分離が正確であったことが確認された。

リポタンパク質中の脂質成分の検討では、VLDLには TGが、HDLには TCと PLが主に確認された。その中間の LDL中には、TG、TCおよび PLが含まれていた。TGは通常ヒトでは、CM、VLDLに多く含まれるとされているが、ウシの場合は、LDL中に多く含まれると言われ [49]、今回の例でも同様な結果であった。



この様に、リポタンパク質中の脂質成分の割合は、従来の報告 [10, 22] のとおりであった。

以上のように、今回用いたリポタンパク質の分離方法は、各リポタンパク質分離後の構成アポリポタンパク質および脂質成分などからヒトだけではなくウシについても応用が可能であった。

エチオニン投与によるウシ脂肪肝の誘導を試みたところ、肝TG量は投与前8.58-12.7ml/gであったものが増加を示し、特に2回目の投与後には、4-14倍量へと増加することが認められた。この様に実験群での肝TG量は、野外例の肝TG量 [36, 66] と同じかそれ以上の蓄積が認められた。また投与後のリポタンパク質について検討した結果、アポリポタンパク質では、VLDLおよびLDL中のApoB-100の減少、またHDL中のApoA-Iの減少が特徴的に認められた。一方、脂質成分については、投与後TCおよびPLは各リポタンパク質あるいは血清中においても減少することが明瞭であった。しかし、TGについては、対照牛を含め全例で一定の変動傾向を示さなかった。このアポリポタンパク質、特にApoB-100やApoA-Iの減少は、他の野外の脂肪肝発症例でのApoB-100やApoA-Iが減少していたとの報告 [36, 38] や、肝TG量と血清ApoB-100との関連では、肝TG量が増加すると血清ApoB-100が減少するとの報告 [35] と一致した結果となった。アポリポタンパク質の減少は、エチオニンが肝におけるタンパク質合成の阻害作用として働いているため、肝臓を起源とするApoB-100やApoA-Iの減少が起こったと思われる。エチオニンが脂肪肝を誘導するのは、肝細胞内のATP濃度の低下が引き金とされている。エチオニンは、メチオニンと競合的にATP中のadenosineと結合し、S-adenosylethionineとなる。S-adenosylethionineは、物質代謝系の中で利用されず、結果的にATP中のadenosine濃度の低下が促進されることになる。ATPの低下、即ちS-adenosylmethionine減少によるメチル基転移能低下が、肝におけるタンパク質合成を含めた種々の代謝



系障害の一要因となり、肝の脂肪化を起こすと考えられている [10, 24, 27, 65]。

今回の実験では、血清中のApoB-100とTGが一致して減少することを明確にすることはできなかった。LDL中のTGとApoB-100の変動は、エチオニン投与直後に相関が認められたに過ぎず、ApoB-100の減少が起こっているにも関わらず、血清TG量は元の値に復帰することが観察された。TGは、肝臓中でApoB-100と結合して血液中に分泌され各組織で利用される [46]。エチオニンは、このリポタンパク質中のTGを各末梢組織で利用する時に必要となるリポタンパク質リパーゼ等のリポタンパク質分解酵素に対して阻害作用を有する可能性があり、その結果中間代謝物質であるレムナント形成 [47] に影響を及ぼしているかもしれない。そのためTGの代謝経路が不調となり、ApoB-100の減少と一致した変動が必ずしも認められなかったと思われた。このApoB-100と血清TGとの関連をより明確にするために、実験開始前から臨床症状を伴う脂肪肝であったE 4について他の3頭と同様なエチオニン投与を試みた。この結果、エチオニン投与後の血清TG量は、ApoB-100の減少と一致して減少することが観察された。元々脂肪肝であったE 4は、他の実験牛 (E 1、2、3) の様に血清TGの変化に対して生体が持つ恒常性の維持機能に支障があることが窺われ、このためApoB-100の減少に伴って血清TG量の減少が認められたと思われる。野外の発症例におけるリポタンパク質中のTGは、減少していた [19, 49]、あるいは減少していなかった [49] 等様々な報告がある。この様にリポタンパク質とTGの変動については、様々な報告があり今後の検討課題の一つと思われる。しかしながら、今回認められたような血清TGの持続的あるいは一時的な減少は、肝TG量の差異、即ち脂肪肝としての程度や病状の進行などの違いによって起きているのではないかと推察する。

原始HDLは、肝臓から血液中に分泌され循環中に成熟したHDLとなる [47]。この循環中に、末梢組織から受け取った遊離コレステロール (F-cho)を



Lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT)によりエステル型コレステロール(E-cho)に変換する[15]。投与後、血清TC量の減少とF-cho/E-cho (F/E)比の増加が認められたのは、肝におけるLCAT合成の阻害あるいはHDLにおけるLCAT活性の低下をエチオニンが引き起こしていることが考えられる。またHDL中のApoA-Iは、LCATの活性因子として重要なタンパク質の一つである[11]ので、エチオニン投与後にApoA-Iが減少したことが、LCAT活性の低下を招き、結果としてコレステロール代謝に変化をもたらしたと思われた。

ウシ脂肪肝に関して通常実施される血清中の各種生化学検査を実施したところ、AST、ALPおよびビリルビンは投与牛で著しく増加するという変化を示し、野外例と同じ結果となった[42]。これら変動の起点は、E1およびE2では2回目の投与後に認めたが、E3では1回目の投与からであった。このことは、肝TG量が増加してくる時期との関連を窺わせ、これら血清生化学的成績は肝TGの蓄積と関係していると思われた。野外の脂肪肝発症時前には、持続的なNEFAの上昇が認められるとの報告[41, 42, 63]があるが、今回の実験ではこの様な一定の傾向は認められず、NEFAは対照を含め全ての実験牛で日によって増減が認められた。このことは、今回誘導した脂肪肝が、過剰な脂肪酸の肝への動員を伴った脂肪肝発生とは異なり、肝からのTG分泌障害によって起きた脂肪肝であることを示唆するものと思われる。

以上のことから、野外の発症例で認められる肝TG量の増加、ApoB-100やApoA-Iの減少および血清生化学的変化等をエチオニン投与による実験群で確認することが出来た。このことは、体重1kg当りエチオニンを25mg、1週間隔で腹腔内に投与する方法が、ウシに対して脂肪肝を誘導する実験モデルの一つであることを実証し、ウシ脂肪肝の今後の研究に寄与できるものと思われた。



## V 小括

ウシ脂肪肝に関する研究は、自然発症例に関連した報告が主としてされており、薬物投与による実験的脂肪肝に関する報告はない。そこで、ラットに脂肪肝を起こすとされているエチオニンを用いて、ウシ脂肪肝の誘導を試みた。

- 1 体重 1 kg 当りエチオニンを 25mg、1 週間隔で腹腔内に投与すると、肝 TG 量は明らかに増加した。
- 2 血中リポタンパク質の分析では、VLDL および LDL に認められたアポリポタンパク質 (Apo) B-100 は投与後減少した。HDL 中の ApoA-I もまた、ApoB-100 程明確ではなかったが投与後に減少をした。
- 3 ApoB-100 の減少と VLDL および LDL 中の TG 減少は、エチオニン投与直後には、関連が認められた。
- 4 LDL および HDL 中のコレステロールとリン脂質は、投与後に減少をした。コレステロールの減少は、コレステロールエステルの減少によるものであった。
- 5 肝 TG 量の増加に伴って、AST、ALP およびビリルビンの増加が認められた。
- 6 野外の発症例で認められる肝 TG 量の増加、ApoB-100 や ApoA-I の減少および血清生化学的変化等をエチオニン投与による実験群で確認することができ、今回の方法がウシ脂肪肝を誘導する実験モデルの一つとして有用であることを実証した。



## 第2章 エチオニン投与によるウシ血清ハプトグロビンの誘導

### I 目的

ハプトグロビンは、肝を起源とするヘモグロビン結合タンパク質として知られており、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖からなるタンパク質である。ヒトでは、この両鎖の化学構造が解明され[2, 4]、生理的機能についても、ヘモグロビン結合に関する機能と急性期反応タンパク質に関する機能の2つに大別されている。現在ウシのHpについては、ヒトのHpと分子量、免疫反応性、重合体形成等に違いが確認されている[9, 40]。ウシの血清Hpは、通常健康な状態で検出されることはなく、急性の炎症反応によって増加するとされている[5, 33, 40, 60]。しかし、炎症反応時以外にも、輸送などによる消耗やストレス、飢餓、デキサメサゾン投与と絶食の組み合わせ等により、Hpが認められる[39, 66, 67]との報告もあり、ヒト同様、ウシ血清Hpの合成系や生理的意義についてはさらに検討が必要と思われる。

最近、肝TG量が増加した野外のウシ血清中に新たに出現する35kDaと23kDaのタンパク質が報告された。このタンパク質は、同定の結果、ハプトグロビンと確認された。このように肝TG量増加時にHpが有意に認められることから、Hpがウシ脂肪肝の新たなマーカーとして利用できるのではと報告されている[55, 66]。

第1章でエチオニン投与による実験的脂肪肝の誘導に成功したことを述べてきた。そこで、この脂肪肝の誘導時に、野外におけるウシ脂肪肝の報告と同様にHpが認められるか否かを検討した。併せて、Hpの出現の要因を知るために、Hpと同様肝で合成され炎症性疾患時に増加すると報告のある $\alpha$ 1-酸性糖タン



パク ( $\alpha 1$ -AGP) [20, 21, 62] およびウシ脂肪肝と関連があるのではないかとされているコルチゾール [42] の血中レベルについても検討した。

## II 材料

試験に供した動物、エチオニン投与方法および採材については、第1章に記載したとおりである。

## III 結果

### 1 血清のSDS-PAGE

ウシ血清中のHpについてSDS-PAGEを用いて検討した。ウシのHpは、血清中において200-2,000kDaとその分子サイズは、一定していない [40]。これは、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖からなるHpの構成単位がさらに多数S-Sブリッジで結合し、重合体を形成するためである。そこで還元剤である2MEを使用してS-Sブリッジを切断した状態で泳動を実施した。図17に示すように、精製したHpは23kDaの $\alpha$ 鎖と35kDaの $\beta$ 鎖の2本のバンドとして泳動される。実験開始前から脂肪肝であったE4の血清を泳動したところ、同様の2本のバンドがエチオニン投与後0-4日目までは確認されたが、6日目以降では検出されなくなった。これは通常Hpの含有量が少ないこと、数多くの蛋白質が存在すること、或いはSDS-PAGEの持つ検出感度が関係していると思われ、ウシ血清中のHpをSDS-PAGEによって定量することは不適當であった。

### 2 SRIDによるハプトグロビンの測定 (表5、図18)

対照 (C) は、実験期間中血清Hpは検出できなかった。しかし、E1、2



および3ではエチオニン投与前には検出されなかったHpが、投与後検出された。E1では投与後8日目以降に、E2では投与後2日目以降（但し、投与後6、10、12日目には検出されず）に、E3では投与後6日目以降に検出された。また、投与前から肝TG量が119mg/gと明らかに脂肪肝と認められたE4は、SDS-PAGEによる検討で、投与後6日目以降にHpが確認でなかったが、SRIDによる測定では、投与前からHpが検出され期間中持続して検出された。これは、Hpの検出精度がSRIDの方がSDS-PAGEより良かったためと思われた。

検出されたHp濃度のそれぞれの最高値は、E4が最も高く、次いでE3、E2、E1の順であり、第1章で示した肝TG量の最高値の順位と同じ結果であった。

### 3 血清コルチゾール（表5）

E1はエチオニン投与後12と18日目に、E2は投与後12と14日目に、E3は投与後4から10日目に投与前に比べて増加を示した。E4は、他の投与牛に比べて投与前から高い値を示し、投与後2日目以降実験期間中全ての時点で投与前値に比べて高い値を示した。対照牛もまた、実験開始後6から12日目と18日目に投与前に比べて増加していた。

### 4 血清 $\alpha$ 1-AGP（表5）

対照、E1、2の3例は、期間中大きな変動は認められなかった。しかし、E3はエチオニン投与後12日目以降に、E4は投与後2日目以降に投与前値より増加した。



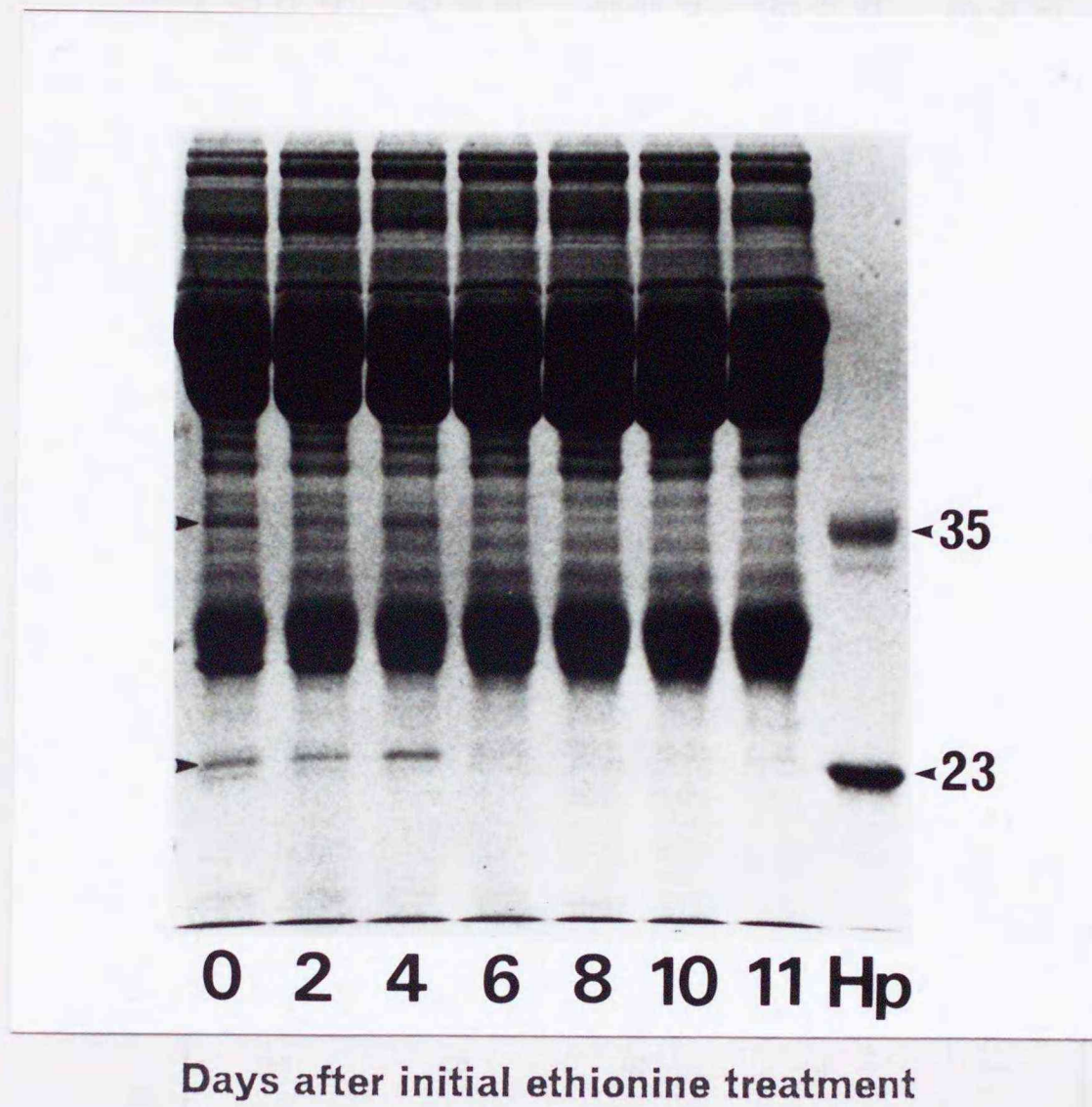


図 17 ウシ血清 (E 4) の SDS-PAGE

エチオニン投与後の血清 SDS-PAGE である。

各レーンの添加量は、 $50 \mu\text{l}$  (0.1mg のタンパク質を含む) であり、ゲル濃度は 13% とした。Hp の 23kDa と 35kDa は、それぞれ  $\alpha$  鎖と  $\beta$  鎖を示す。矢印は血清中の Hp を示す。



表5 エチオニン投与後の血清Hp、コルチゾールおよびα1-AGP濃度

Cow No.	Variable	Days after initial ethionine treatment													
		0	2	4	6	8	10	12	14	16	18	21			
Control	Hp <sup>a)</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	Cortisol <sup>b)</sup>	2.5	---	3.0	7.0	13.9	8.1	10.3	2.6	2.5	7.4	---	---		
	AGP <sup>c)</sup>	470	---	430	---	385	---	410	---	385	---	---	385		
E 1	Hp	ND	ND	ND	ND	35	<25 <sup>d)</sup>	<25 <sup>d)</sup>	<25 <sup>d)</sup>	45	<25 <sup>d)</sup>	---	---		
	Cortisol	7.4	3.4	1.5	2.2	1.5	0.7	12.3	5.6	3.7	8.8	---	---		
	AGP	300	360	360	360	350	300	270	270	410	385	---	---		
E 2	Hp	ND	169	120	ND	35	ND	ND	58	---	---	---	---		
	Cortisol	2.1	2.6	1.0	2.3	0.9	0.9	17.8	22.6	---	---	---	---		
	AGP	290	270	280	230	210	200	150	150	---	---	---	---		
E 3	Hp	ND	ND	ND	120	194	207	157	108	---	---	---	---		
	Cortisol	2.7	2.6	15.1	6.5	8.7	6.0	0.9	1.1	---	---	---	---		
	AGP	300	290	250	270	385	430	630	780	---	---	---	---		
E 4	Hp	364	414	512	240	35	240	---	---	---	---	---	---		
	Cortisol	8.9	16.9	13.6	29.0	34.1	57.1	---	---	---	---	---	---		
	AGP	610	760	520	650	1,245	1,280	---	---	---	---	---	---		

ND = 検出できず。--- = 測定せず。a) = μg/ml、b) = ng/ml、c) = μg/ml、d) = 沈降線は認められたが、測定範囲25 μg/ml以下であった。



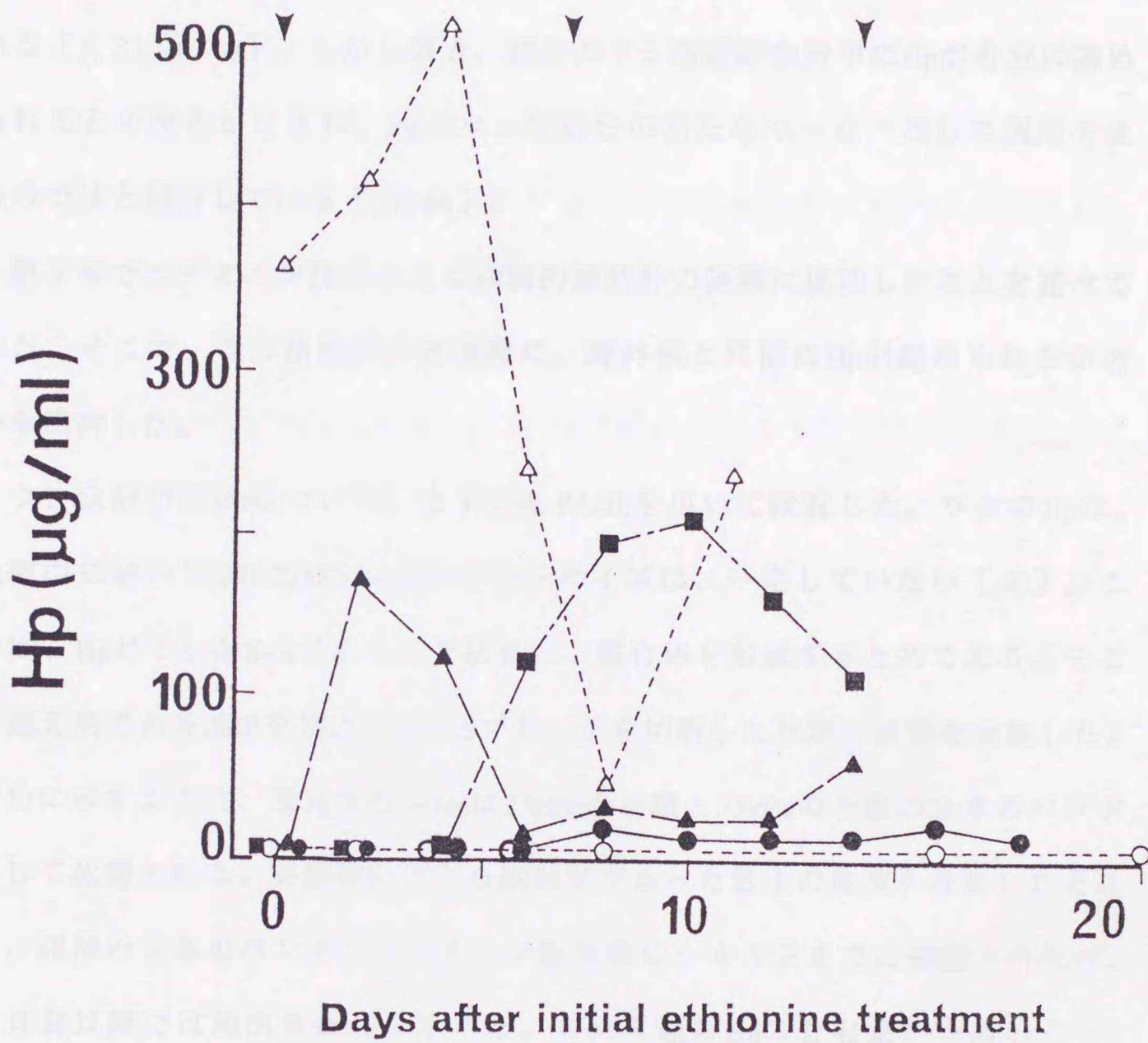


図 18 エチオニン投与後の血清 Hp 濃度の変化  
エチオニン投与後の対照及び試験牛の血清 Hp 濃度を SRID 法にて測定した。  
○ = C、● = E1、▲ = E2、■ = E3、△ = E4



#### IV 考察

ハプトグロビンは、肝を起源とするヘモグロビン結合タンパク質として知られており、 $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖からなるタンパク質である。ウシの血清Hpは、通常健康な状態で検出されることはなく、急性の炎症反応によって増加するとされている[5, 33, 40, 60]。しかし最近、野外のウシ脂肪肝血清中にHpが有意に認められるとの報告がなされ、Hpがウシ脂肪肝の新たなマーカーとして利用できるのではと報告している[55, 66]。

第1章でエチオニン投与による実験的脂肪肝の誘導に成功したことを述べてきた。そこで、この脂肪肝の誘導時に、野外例と同様にHpが認められるか否かを検討した。

ウシ血清中のHpについて、まずSDS-PAGEを用いて検討した。ウシのHpは、血清中において200-2,000kDaとその分子サイズは、一定していない[40]。これは、HpどうしがS-Sブリッジで結合し、重合体を形成するためである。そこで還元剤である2MEを使用してS-Sブリッジを切断した状態で泳動を実施した。図17に示すように、還元状態のHpは23kDaの $\alpha$ 鎖と35kDaの $\beta$ 鎖の2本のバンドとして泳動される。実験開始前から脂肪肝であったE4の血清を泳動したところ、同様の2本のバンドがエチオニン投与後0-4日目までは確認されたが、6日目以降では検出されなくなった。これは通常Hpの含有量が少ないこと、数多くの蛋白質が存在すること、或いはSDS-PAGEの持つ検出感度が関係していると思われ、ウシ血清中のHpをSDS-PAGEによって定量することは不適當であると結論した。

そこで、Yoshinoらが報告した簡便に測定が可能なSRID法[67]を用いて測定を実施した。対照では全試験期間Hpが検出されることはなかった。このことは、試験期間中に行ったエチオニン投与時の注射針の刺入、隔日に実施した血液の採材および肝生検時の組織損傷などの非特異的要因が、Hpを惹起しな



かったことを示している。一方、エチオニンを投与した実験群（E 1、2および3）では、投与前には検出されなかったHpが、投与後全例で検出された。また、実験開始前から臨床症状を伴う脂肪肝であったE 4は、投与前からHpが検出され、試験終了時まで持続してHpが検出された。このE 4でのHpの出現は、先の報告〔55, 66〕と同じ結果であった。しかし、E 4を含め試験群のHpの変動は、一定した増加傾向ではなく、全例で増減を示す結果となった。このHpの増減の理由は、今回明確にすることはできなかったが、検出されたHp濃度のそれぞれの最高値は、E 4が最も高く、次いでE 3、E 2、E 1の順であり、第1章で示した肝TG量の最高値の順位と同じ結果であった。このことは、肝TG量の増加と血中Hp出現とは関連があることを示唆している。

ラットの肝細胞を用いた実験で、Hpの合成・分泌がグルココルチコイドによって調節され、これはHp遺伝子の中にグルココルチコイド応答エレメントがあるためと報告されている〔37〕。またウシ脂肪肝発症時には、血液中のグルココルチコイドが増加していると報告されている〔42〕。さらに、ウシにデキサメサゾン投与と投与中止と同時の絶食により、Hpが検出されるとの報告がある〔67〕。そこで、エチオニン投与牛においてHpの出現が、グルココルチコイドとの関連があるかどうかを評価するために血清中のコルチゾール濃度を測定した。E 1、2および3では、コルチゾールの増加がHpの出現と部分的に関連があると思われた（表5）。例えば、E 1では投与後12日目にコルチゾールが上昇し、Hpはその4日後の16日目に増加をした。同様に、E 2では投与後12日目にコルチゾールが上昇し、Hpはその2日後の14日目に増加をした。また、E 3では投与後4日目にコルチゾールが上昇し、Hpはその2日後の6日目に増加をした。しかしながら、対照ではコルチゾールが増加を示したにも関わらず、Hpは期間中検出されることはなかった。この理由については、今回明らかにすることはできなかった。エチオニンを投与したウシでHpが検



出されたことに対して、グルココルチコイドがどのように関わっていたかは、今後の検討課題であると思われる。

Hpと同様肝で合成され炎症性疾患時に増加すると報告のある $\alpha$ 1-酸性糖タンパク ( $\alpha$ 1-AGP) [20, 21, 62] についても測定をした。その結果、E1、E2および対照では、期間中特に変動は認めなかった。しかし、E3では投与後12と14日目に、E4では8と10日目に増加した。ところで、E3での肝TG量の増加やHpの検出は、 $\alpha$ 1-AGP増加に先行して起こっており、またE4の投与前の $\alpha$ 1-AGPは、他の実験牛（対照を含めて）の投与前値に比較して高い値を示していた。従って、 $\alpha$ 1-AGPの増加は肝にTGが蓄積した後に起きたと思われ、Hpと同様 $\alpha$ 1-AGPも炎症反応とは別に脂肪肝でも増加する可能性を示唆しているので、今後の検討課題と思われる。

エチオニン投与によってウシ脂肪肝の誘導をしたところ、血清Hpの出現が確認された。このHpの出現は、エチオニンが直接肝細胞を刺激して誘導したものか、コルチゾールが誘導したものか、或いはエチオニンとコルチゾールの両方の作用によって誘導されたものかは特定することはできなかった。また、Hpの出現が肝TG量の増加以前に認められるのか、それとも増加後に認められるのか、今回の実験からだけでは特定することはできない。しかしながら、脂肪肝の野外例からHpが検出されること [55, 66]、またハプトグロビンは免疫抑制を持つと言われ [3, 6, 43]、ウシ脂肪肝で免疫力が低下する [13] ことなどから、Hpの出現とウシ脂肪肝とは何らかの関連があると示唆する現象であると考えられる。

以上のように、Hpの出現に関する側面からもエチオニン投与によるウシ脂肪肝の誘導は、ウシ脂肪肝の野外例と同じ様な病態を示す実験モデルであることが確かめられた。



## V 小括

エチオニン投与により実験的に起こしたウシ脂肪肝の血清中にハプトグロビンが誘導されるかを検討した。

- 1 血中ハプトグロビンをSRID法により測定をしたところ、エチオニン投与により作出した脂肪肝牛全例の血清中にハプトグロビンが出現した。
- 2 エチオニン投与により作出した脂肪肝牛で、血清コルチゾールの増加が認められた。
- 3 エチオニン投与により作出した脂肪肝牛の1例で、 $\alpha 1$ -AGPの増加が認められた。
- 4 ハプトグロビンの誘導と血清コルチゾールの増加は、脂肪肝の発生と関連していることを示唆した。



### 第3章 周産期におけるウシ血清ApoB-100濃度とハプトグロビン

#### I 目的

脂肪肝発症は、分娩を契機とすることが多い。この時期に多く発生する理由として、エストラジオールなどの性ホルモンやグルココルチコイドが大きく変化することが考えられる。事実、血中エストラジオールや肝臓中のエストラジオールレセプターはVLDLの合成に重要であると、ニワトリ [58] やラット [64] で報告されている。また、エチオニン投与によって、ラットの肝臓中のエストラジオールレセプターが著しく減少し、肝TG量の増加を認めたとの報告もある [27]。さらに、エストラジオール投与によるウシ脂肪肝の誘導が示されている [16, 26, 29]。また、ウシ脂肪肝発症時には、血液中のグルココルチコイドが増加するとの報告もある [42]。これらの知見は、いずれも分娩時のエストラジオールやグルココルチコイドの急激な変動が、脂肪肝発症と深い繋がりがあることを示唆している。

前章までに、ウシ脂肪肝を実験的に誘導して検討してきた。その結果、肝TG量の増加時には、血清中のApoB-100やApoA-I濃度が減少していることが示され、またエチオニン投与後には、血清中にハプトグロビンが出現してくることやコルチゾールが増加していることなどが確認された。

そこで本章では、ウシ脂肪肝と関連が窺われたApoB-100とハプトグロビンについて、その周産期における血中動態について検討をした。



## II 材料

### 1 供試動物

分娩前後の検査に使用した動物は、酪農学園大学付属農場で飼養されている年齢3歳以上のホルスタイン牛である。これらは、分娩前後および異常分娩等の臨床的異常を認めず、また、2産以上の牛に限定した。この牛群を分娩日を0日として、1群) -44日から-30日、2群) -21日から-9日、3群) 0日から1日、4群) 7日から14日、5群) 28日から35日の5つに群分けをした。

### 2 採材

血清中のHp、ApoB-100、コルチゾールおよび $\alpha$ 1-AGP等の測定のため頸静脈から採血した。血液採取は、午前8時の給餌前とし、例外として分娩当日については、分娩後24時間以内に採材した。血液からの血清分離は、室温に2時間放置した後常法により無菌的に行った。測定まで $-20^{\circ}\text{C}$ で保存をした。

## III 結果

### 1 分娩前後のハプトグロビン(表6、図19)

分娩前後のHpをSRID法により測定したところ、図19に示すような各群の分布となった。分娩0-14日の二つの群で高値となる傾向が見られるので、各群の平均値の差の検定を実施したが、分散が大きいため有意な差は認められない結果となった(表6)。このSRID法の測定範囲は、分析方法にも述べたように25-500 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で測定することができる。しかし先にも述べてきたようにウシの場合血清中のHpは、健康な状態では種々の測定がなされてはいるが検出されることはない。従ってこの点を考慮して、今回の健康であった各牛群のHp濃度について検討するのではなく、血清中にHpが出現するか否かに焦点を



当てて検討した。即ち、SRID法を実施して僅かでも沈降線を認めた検体をHp陽性、全く沈降線を認めなかった検体をHp陰性として、血清中のHpの有無を検討した。

分娩前44日から分娩後35日までの5つの群でのHp出現率は、第1群0%(0/42)、第2群10%(4/42)、第3群74%(31/42)、第4群21%(9/42)、第5群5%(2/42)であった。このHp出現率について統計処理をすると、分娩当日の第3群は、他の分娩前後の4つの群に比べて有意に出現率が高いことが認められた(表6)。

## 2 分娩前後のApoB-100濃度(表7、図20)

1から5群の血中ApoB-100濃度の平均値は、それぞれ110、78、58、67および92 $\mu$ g/mlであり、分娩当日の第3群はその前後の4つの群に比べて最も減少していた。特に、分娩前44-30日の第1群および分娩後28-35日の第5群とは、危険率1%未満で有意差が認められた。

## 3 分娩前後の血清タンパク質、 $\alpha$ 1-AGP、TG、NEFAおよびコルチゾール濃度

分娩前後の血清タンパク質、 $\alpha$ 1-AGP、TG、NEFAおよびコルチゾール濃度を表7に一括して示した。

タンパク質と $\alpha$ 1-AGP濃度は、分娩前後に有意な変動は認められなかった。

TG量は、分娩を境として血中濃度に大きな変化が認められた。分娩後は、分娩前の約20mg/dlから、約半分に減少していた。

NEFAは、分娩当日の第3群がその他の第1、2および5群に比べて有意に増加していた。

コルチゾール濃度は、分娩当日の第3群がその他の4つの群に比べて有意に増加していた。







表6 分娩前後のウシ血清Hpの変化

Group	Days from parturition	Hp concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) (n=42)	Hp detection rate (%) (n=42)
1	-44 to -30	0 $\pm$ 0	0/42 (0)**
2	-21 to -9	13 $\pm$ 60	4/42 (10)**
3	0 to 1	274 $\pm$ 259	31/42 (74)
4	7 to 14	66 $\pm$ 141	9/42 (21)**
5	28 to 35	24 $\pm$ 109	2/42 (5)**

\*\* $P < 0.01$ , 検定は、分娩当日 (0 to 1) の群との比較。  
濃度は、平均値  $\pm$  SD で記載した。



表7 分娩前後のウシ血清Apob-100、タンパク質、 $\alpha$ 1-AGP、TG、NEFAおよびコルチゾールの変化

Group	Day from parturition	Apob-100 ( $\mu$ g/ml)	Protein (mg/ml)	$\alpha$ 1-AGP ( $\mu$ g/ml)	TG (mg/dl)	NEFA ( $\mu$ Eq/L)	Cortisol (ng/ml)
1	-44 to -30	110 $\pm$ 25**	72.2 $\pm$ 7.0	386 $\pm$ 458	20.3 $\pm$ 7.9**	222 $\pm$ 44**	2.27 $\pm$ 2.51*
2	-21 to -9	78 $\pm$ 17	72.6 $\pm$ 8.3	485 $\pm$ 271	18.2 $\pm$ 10.2*	343 $\pm$ 301*	2.72 $\pm$ 2.47*
3	0 to 1	58 $\pm$ 28	71.0 $\pm$ 8.2	397 $\pm$ 150	11.4 $\pm$ 6.4	578 $\pm$ 193	8.84 $\pm$ 9.24
4	7 to 14	67 $\pm$ 27	75.2 $\pm$ 7.5	464 $\pm$ 326	7.0 $\pm$ 3.4	479 $\pm$ 221	3.53 $\pm$ 2.48*
5	28 to 35	92 $\pm$ 27**	79.3 $\pm$ 5.7	333 $\pm$ 178	10.3 $\pm$ 6.1	295 $\pm$ 137**	3.33 $\pm$ 2.79*

\* $P$ <0.05; \*\* $P$ <0.01, 検定は、分娩当日 (0 to 1) の群との比較。数値は、平均値 $\pm$ SDで記載した。



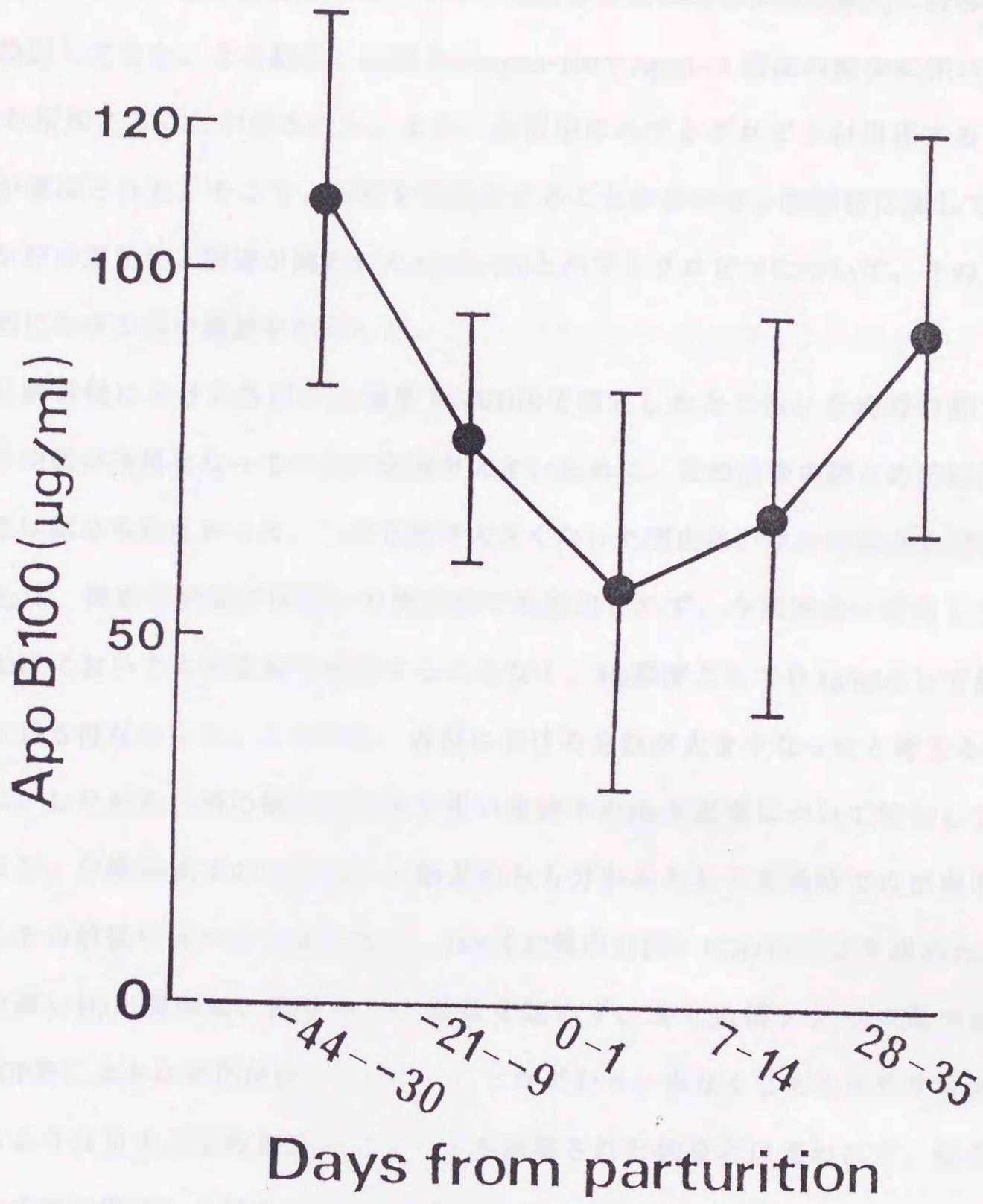


図 20 分娩前後のウシ血清 ApoB-100 濃度の変動  
分娩前後の各群における血清 ApoB-100 濃度を SRID 法にて測定した結果を示す。各群における数値は、平均値 ± SD で示した。



#### IV 考察

前章までに、ウシ脂肪肝をエチオニンを投与することにより実験的に誘導して検討してきた。その結果、血清中のApoB-100やApoA-I濃度の減少に伴い肝TGが増加することが示された。また、血清中にハプトグロビンが出現することが確認された。そこで、出産を契機とすることが多いウシ脂肪肝に関して、ウシ肝の脂肪化と関連が窺われたApoB-100とハプトグロビンについて、その周産期における血中動態を検討した。

分娩前後における各群のHp濃度をSRID法で測定したところ、分娩時の群では平均値が高値となっていたが分散が大きいため、その前後の群との間に有意差は認められなかった。この分散が大きくなった理由は、ウシの場合血清中のHpは、健康な状態では種々の測定法でも検出されず、今回測定に使用したSRID法においても沈降線を観察することなく、Hp濃度として0  $\mu\text{g/ml}$ として処理せざる得なかった。この結果、各群における分散が大きくなったと考える。

しかしながら、別の統計検定法を用い血清中のHp出現率について検討してみると、分娩前後での血清Hpは、結果からも分かるとおり分娩時での出現率は、その前後に比べて有意に高く、74% (42例中31例) にHpの出現を認めた。この高いHp出現率は、臨床的には異常を認めず、また血清タンパク質や $\alpha$ 1-AGP等に大きな変化が認められないことなどから、少なくとも生産性を阻害するような重大な急性炎症によってのみ誘導された結果とは思われず、他のHp合成系に関連した要因もあったと思われる。

そこで、第2章の検討でHpと関連を窺わせた血清コルチゾールについて、その血中濃度を測定した。その結果、分娩当日の群はその前後の群より有意に増加していることが認められた。分娩時期は、ホルモンの急激な変化が起こる時期であり [56]、この分娩期に血清コルチゾール増加と高率にHpが出現したことは、なにか関連があることを予想させる。先に述べた様に、Hpの合成



調節について十分に解明されている訳ではないが、本研究で示したウシにおける脂肪肝の誘導実験でコルチゾールとHpの出現には関連を窺わせたこと、ウシ脂肪肝発症時には、血液中のグルココルチコイドが増加していた [42] こと、ウシでのデキサメサゾン投与と投与中止と同時の絶食によりHpの誘導された [67] こと、さらにラットの肝細胞を用いた実験で、Hpの合成・分泌がグルココルチコイドによって調節されることが認められ、このHpの合成・分泌調節はHpを発現させる遺伝子の中にグルココルチコイド応答エレメントがあるためとされている [37] ことなどを考え併せると、Hpの出現は、グルココルチコイドが肝臓におけるHp発現遺伝子を刺激することによって起きた現象の一つであると考えることができよう。しかしながら、ウシでのHp濃度変化とグルココルチコイド濃度変化との相関等に関する点については今回の研究では検討しておらず、またこの点についての報告もなく、今後さらに詳しい検討が必要であると思われる。

ヒトのHp遺伝子座は第16番目の染色体上にあり、この近い部位に脂質代謝に関連した遺伝子が存在する [50] と言われている。また、血清コレステロール濃度の調節とHpアイソフォームには、どのような機序かは不明だが、数多くの臨床データから関連があるとヒトでは報告されている [54]。従来脂肪肝発生には、NEFAやTGなどの脂質代謝に異常が起こることが必須条件であるとされており [13, 41]、今回の検討でも分娩前後には、NEFAやTGの変動が認められた。また、野外例 [55, 66] あるいは今回の実験的に起こした脂肪肝にHpが認められ、分娩時にはその前後に比べて有意にHpが出現した。この様に、ヒトやウシでの脂質代謝異常は、Hpとの関連性を強く示唆する結果と思われた。

ハプトグロビンは、プロスタグランジン合成を阻害するとされている [23, 53]。また、プロスタグランジン合成の元になるアラキドン酸は、分



娩期に起きたウシ脂肪肝で明瞭に減少していたとの報告 [44]、またエチオニン投与によるラットでの脂肪肝でも同様なことが言われている [61]。これらの報告などからもどのような合成系でHpが誘導されるにせよ、Hpの出現が脂肪肝と関連していることの一つの証左と思われた。

分娩前後の血清ApoB-100の変動について検討したところ、分娩当日はその前後に比べて最も減少しており、乳期別に検討した報告 [34, 35, 48] とほぼ一致した値となった。肝TG量と血清ApoB-100との関連では、ウシ脂肪肝の野外例で血清ApoB-100の減少が認められたとの報告 [36, 38] や、肝TG量が増加すると血清ApoB-100が減少するとの報告 [35] がある。このことからすると、今回観察された分娩時でのApoB-100の減少が、何らかの理由で引き続き起こった場合に脂肪肝として発症するのではと考えられる。そのため、ウシでは脂肪肝が分娩を契機とする理由の一つと思われる。

以上のように、分娩時の血清Hpの出現およびApoB-100濃度の減少は、出産後の脂肪肝発生と関連していると思われる。



## V 小括

出産後に多く発生するウシ脂肪肝の一要因について次のような検討をした。同一牛舎のウシを5つの群（分娩時を0日としてその前後の牛群を1群：-44日から-30日、2群：-21日から-9日、3群：0日から1日、4群：7日から14日、5群：28日から35日）に分けて、周産期におけるHp、ApoB-100およびコルチゾール等の血中動態を検討した。

- 1 第3群の血清Hpは、その前後に比べて有意に検出率が高かった。
- 2 第3群の血清ApoB-100は、その前後に比べて有意に減少していた。
- 3 第3群は、血清TG濃度の低下およびNEFAの増加が認められた。
- 4 第3群の血清コルチゾールは、その前後に比べて有意に増加していた。
- 5 分娩時の血清Hpの出現およびApoB-100濃度の減少は、出産後の脂肪肝発生と関連していることが示唆された。



## 総括

ウシ脂肪肝に関する研究は、自然発生例に関連した報告が主としてされており、実験的に脂肪肝を誘導した報告はない。そこで、ラットに脂肪肝を起こすとされているエチオニンを用いて、ウシ脂肪肝の誘導を試み、血中リポタンパク質とハプトグロビンの動態を中心に生化学的検討を行った。また、出産後に多発するウシ脂肪肝の要因についても同様の検討を加え以下の結果を得た。

- 1 ホルスタイン牛に体重1kg当りエチオニンを25mg、1週間隔で腹腔に投与すると、肝TG量は明らかに増加した。
- 2 リポタンパク質の分析では、VLDL（密度0.95-1.006g/ml）およびLDL（密度1.006-1.063g/ml）に認められたApoB-100は投与後減少した。また、HDL（密度1.063-1.210g/ml）中のApoA-Iもまた、ApoB-100程明確ではなかったが投与後に減少をした。
- 3 ApoB-100の減少とVLDLおよびLDL中のTG減少は、エチオニン投与直後には、関連が認められた。
- 4 LDLおよびHDL中のコレステロールおよびリン脂質は、投与後に減少をした。コレステロールの減少は、コレステロールエステルの減少によるものであった。
- 5 血中HpをSRID法により測定をしたところ、エチオニン投与により作出した脂肪肝牛全例の血清中にHpが出現した。
- 6 エチオニン投与により作出した脂肪肝牛で、血清コルチゾールの増加が認められた。
- 7 分娩時の血清パラメータについてその前後と比べると、Hp、コルチゾール、NEFAの増加、並びにApoB-100とTGの減少が認められた。

以上の結果は、自然発症のウシ脂肪肝と類似した側面を有しており、本実験モデルの有用性を示唆すると同時に、アポリポタンパク質の減少によって肝臓



からTG分泌が障害され、肝TG量の増加が起こることを示している。また、脂肪肝と血清Hpとの関連性が確認されたので、その診断的有用性が示唆された。



## 謝 辞

本論文作成に当たり、終始御指導・御助言を賜りました北海道大学獣医学部獣医学科家畜生化学講座齊藤昌之教授を始め、同大学家畜外科学講座藤永徹教授、毒性学講座藤田正一教授、岩手大学農学部獣医学科家畜生理学講座首藤文栄教授の各位に深謝致します。

本研究に際し、研究の企画、運営、実行、取りまとめに当たり終始御指導頂きました農林水産省家畜衛生試験場総合診断部生化学研究室加藤憲夫室長に心から感謝致します。また、試験実行に当たり御尽力頂きました酪農学園大学酪農学部獣医学科獣医内科学教室高橋清志教授に深謝いたします。

また、本研究に際しまして数多くの人々に御助力を頂き、本論文が完成したことを誇りにすると共に、心から感謝の意を表します。



文献

1. Allison, A. C., and Ress, W. 1957. The binding of haemoglobin by plasma proteins. Br. Med. J. 2: 1137-1143.
2. Barnett, D. R., Lee, T. -H., and Bowman, B. H. 1972. Amino acid sequence of the human haptoglobin  $\beta$  chain. I . Amino- and carboxyl-terminal sequences. Biochemistry 11: 1189-1194.
3. Baseler, M. W., and Burrell, R. 1983. Purification of haptoglobin and its effects on lymphocyte and alveolar macrophage responses. Inflammation 7: 387-400.
4. Black, J. A., and Dixon, G. H. 1968. Amino acid sequence of alpha chains of human haptoglobins. Nature 218: 736-741.
5. Conner, J. G., Eckersall, P. D., Wiseman, A., Aitchison, T. C., and Douglas, T. A. 1988. Bovine acute phase response following turpentine injection. Res. Vet. Sci. 44: 82-88.
6. Cooperband, S. R., Bondevik, H., Schmid, K., and Mannick, J. A. 1968. Transformation of human lymphocytes : Inhibition of homologous alpha globulin. Science 159: 1243-1244
7. Cordle, S. R., Clegg, R. A., and Yeaman, S. J. 1985. Purification and characterization of bovine lipoproteins: resolution of high density and low density lipoproteins using heparin-sepharose chromatography. J. Lipid. Res. 26: 721-725.
8. Dole, V. P. 1956. A relation between non-esterified fatty acids in plasma and the metabolism of glucose. J. Clin. Invest. 35: 150-154.
9. Eckersall, P. D., and Conner, J. G. 1990. Plasma haptoglobin in cattle (Bos taurus) exists as polymers in association with albumin. Comp. Biochem. Physiol. 96B: 309-314.
10. Farber, E., Shull, K. H., Villa-Trevino, S., Lombardi, B., and Thomas, M. 1964. Bio-



- chemical pathology of acute hepatic adenosinetriphosphate deficiency. Nature (Lond.) 203: 34-40.
11. Fielding, C. J., Shore, V. G., and Fielding, P. E. 1972. A protein cofactor of lecithin:cholesterol acyltransferase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 46: 1493-1498.
12. Fronk, T. J., Schultz, L. H., and Hardie, A. R. 1980. Effect of dry period overconditioning on subsequent metabolic disorders and performance of dairy cows. J. Dairy Sci. 63: 1080-1090.
13. Gerloff, B. J., and Herdt, T. H. 1984. Hepatic lipidosis from dietary restriction in non-lactating cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 185: 223-224.
14. Gerloff, B. J., Herdt, T. H., and Emery, R. S. 1986. Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle. J. Am. Vet. Med. Assoc. 188: 845-850.
15. Glomset, J. A. 1962. The mechanism of the plasma cholesterol esterification reaction: plasma fatty acid transferase. Biochim. Biophys. Acta 65: 128-135.
16. Grummer, R. R., Bertics, S. J., Lacount, D. W., Snow, J. A., Dentine, M. R., and Stauffacher, R. H. 1990. Estrogen induction of fatty liver in dairy cattle. J. Dairy Sci. 73: 1537-1543.
17. 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.
18. Hatch, F. T., and Lees, R. S. 1968. Practical methods for plasma lipoprotein analysis. Adv. Lipid Res. 6: 1-68.
19. Herdt, T. H., Liesman, J. S., Gerloff, B. J., and Emery, R. S. 1983. Reduction of serum triacylglycerol-rich lipoprotein concentrations in cows with hepatic lipidosis. Am. J. Vet.



- Res. 44: 293-296.
20. Itoh, H., Tamura, K., Motoi, Y., Takase, K., and Nakamura, T. 1990. Serum  $\alpha$  1-acid glycoprotein in cattle with inflammatory disease and that after operation. Jpn. J. Vet. Sci. 52: 1293-1296.
21. Iwata, H., Ono, K., Hasegawa, A., and Tomoda, I. 1988. Serum  $\alpha$  1-acid glycoprotein levels in cows. Jpn. J. Vet. Sci. 50: 1119-1120.
22. Jonas, A. 1972. Physicochemical properties of bovine serum high density lipoproteins. J. Biol. Chem. 247: 7767-7772.
23. Jue, D. -M., Shim, B. -S., and Kang, Y. -S. 1983. Inhibition of prostaglandin synthase activity of sheep seminal vesicular gland by human serum haptoglobin. Mol. Cell Biochem. 51: 141-147.
24. Katoh, N. 1992. Altered protein kinase C activity and its endogenous protein phosphorylation in rat liver after administration of ethionine. Toxicol. Lett. 61: 57-65.
25. Katoh, N., and Kimura, K. 1989. Decreased protein kinase C activity in fatty liver from cattle. Am. J. Vet. Res. 50: 1489-1492.
26. Katoh, N., Minoura, S., Uchida, E., and Takahashi, K. 1993. Effect of estradiol administration and subsequent nonfeeding on liver estrogen receptor, serum apolipoprotein B-100, and serum triglycerides concentrations in steers. Am. J. Vet. Res. 54: 1476-1482.
27. Katoh, N., Shimbayashi, K., Abe, K., and Sakurada, K. 1991. Decreased estradiol receptor concentrations in ethionine-induced fatty liver of rats. Toxicol. Lett. 58: 279-285.
28. Kleppe, B. B., Aiello, R. J., Grummer, R. R., and Armentano, L. E. 1988. Triglyceride accumulation and very low density lipoprotein secretion by rat and goat hepatocytes in



- vitro. J. Dairy Sci. 71: 1813-1822.
29. Laarveld, B., DeLorme, B., and Kerr, D. E. 1982. Lipotropic effect of estradiol-17  $\beta$  in fed and fasted lactating cows. J. Dairy Sci. 65: 920-926.
30. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.
31. Laurell, C. B., and Nyman, M. 1957. Studies on the serum haptoglobin level in hemoglobinemia and its influence on renal excretion of hemoglobin. Blood 12: 493-506.
32. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.
33. Makimura, S., and Suzuki, N. 1982. Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases. Jpn. J. Vet. Sci. 44: 15-21.
34. Marcos, E., Mazur, A., Cardot, P., and Rayssiguier, Y. 1989. Quantitative determination of apolipoprotein B in serum by radial immunodiffusion. Comp. Biochem. Physiol. 94B: 171-173.
35. Marcos, E., Mazur, A., Cardot, P., and Rayssiguier, Y. 1990. The effect pregnancy and lactation on serum lipid and apolipoprotein B and A- I levels in dairy cows. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 64: 133-138.
36. Marcos, E., Mazur, A., Cardot, P., and Rayssiguier, Y. 1990. Serum apolipoproteins B and A-1 and naturally occurring fatty liver in dairy cows. Lipids 25: 575-577.
37. Marinkovic, S., and Baumann, H. 1990. Structure, hormonal regulation, and identification of the interleukin-6- and dexamethasone-responsive element of the rat haptoglobin gene. Mol. Cell Biol. 10: 1573-1583.



38. Mazur, A., Marcos, E., and Rayssinguier, Y. 1989. Plasma lipoproteins in dairy cows with naturally occurring severe fatty liver: evidence of alteration in the distribution of apo A-I -containing lipoproteins. Lipids 24: 805-811
39. Minoccheri, F. 1965. Aspetto genetico delle aptoglobine di alcune specie animali (bovino, equino, suino). Arch. Vet. Ital. 16: 433-447.
40. Morimatsu, M., Syuto, B., Shimada, N., Fujinaga, T., Yamamoto, S., Saito, M., and Naiki, M. 1991. Isolation and characterization of bovine haptoglobin from acute phase sera. J. Biol. Chem. 266: 11833-11837.
41. Morrow, D. A. 1976. Fat cow syndrome. J. Dairy Sci. 59: 1625-1629.
42. Morrow, D. A., Hillman, D., Dade, A. W., and Kitchen, H. 1979. Clinical investigation of a dairy herd with the fat cow syndrome. J. Am. Vet. Med. Assoc. 174: 161-167.
43. Oh, S. -K., Kim, S. -H., and Walker, J. E. 1990. Interference with immune response at the level of generating effector cells by tumor-associated haptoglobin. J. Natl. Cancer Inst. 82: 934-940.
44. Ono, E., Abe, T., Taguchi, K., Sato, T., and Naiki, M. 1988. Fatty acid analysis of lipid components of livers from dairy cows with high levels of serum free fatty acids. Jpn. J. Vet. Sci. 50: 900-907.
45. Pagano, M., Nicola, M. A., and Engler, R. 1982. Inhibition of cathepsin Land B by haptoglobin, the haptoglobin-hemoglobin complex, and asialohaptoglobin. " In vitro " studies in the rat. Can. J. Biochem. 60: 631-637.
46. Partin, J. S., Partin, J. C., Schubert, W.K., and McAdams, A. J. 1974. Liver ultrastructure in abetalipoproteinemia: evolution of micronodular cirrhosis. Gastroenterology 67: 107-118.



47. Puppione, D. L. 1978. Implications of unique features of blood lipid transport in the lactating cow. J. Dairy Sci. 61: 651-659.
48. Raphael, B. C., Dimick, P. S., and Puppione, D. L. 1973. Electrophoretic characterization of bovine serum lipoproteins throughout gestation and lactation. J. Dairy Sci. 56: 1411-1414.
49. Rayssinguier, Y., Mazur, A., Gueux, E., Reid, I. M., and Roberts, C. J. 1988. Plasma lipoproteins and fatty liver in dairy cows. Res. Vet. Sci. 45: 389-393.
50. Reeders, S. T., and Hildebrand, C. E. 1989. Report of the committee on the genetic constitution of chromosome 16. Cytogenet. Cell Genet. 51: 299-318.
51. Reid, I. M. 1980. Incidence and severity of fatty liver in dairy cows. Vet. Rec. 107: 281-284.
52. Reid, I. M., Harrison, R. D., and Collins, R. A. 1977. Fasting and refeeding in the lactating dairy cow. 2. The recovery of liver cell structure and function following a six-day fast. J. Comp. Pathol. 87: 253-265.
53. Saeed, S. A., McDonald-Gibson, W. J., Cuthbert, J., Copas, J. L., Schneider, C., Gerdiner, P. J., Butt, N. M., and Collier, H. O. J. 1977. Endogenous inhibitor of prostaglandin synthetase. Nature 270: 32-36.
54. Saha, N., Liu, Y., Tay, J. S. H., Basair, J., and Ho, C. H. 1992. Association of haptoglobin types with serum lipids and apolipoproteins in a Chinese population. Clin. Genet. 42: 54-61.
55. Sekiguchi, K., Katoh, N., and Motoi, Y. 1986. Specific increase of a 35K protein in the sera of cows with fatty liver. Jpn. J. Vet. Sci. 48: 745-751.
56. Smith, V. G., Edgerton, L. A., Hafs, H. D., and Convey, E. M. 1973. Bovine serum



- estrogens, progestins and glucocorticoids during late pregnancy, parturition and early lactation. J. Anim. Sci. 36: 391-396.
57. Snellman, O., and Sylven, B. 1967. Haptoglobin acting as a natural inhibitor of cathepsin B activity. Nature 216: 1033-1034.
58. Snow, L. D., Ericksson, H., Hardin, J. W., Chan, L., Jackson, R. L., Clark, J. H., and Means, A. R. 1978. Nuclear estrogen receptor in the avian liver: correlation with biologic response. J. Steroid Biochem. 9: 1017-1026.
59. Snyder, F., and Stephens, N. 1959. A simplified spectrophotometric determination of ester groups in lipids. Biochem. Biophys. Acta 34: 244-245.
60. Spooner, R. L., and Miller, J. K. 1971. The measurement of haemoglobin reactive protein in ruminants as an aid to the diagnosis of acute inflammation. Vet. Rec. 88: 2-4.
61. Sugano, M., Hori, K., and Wada, M. 1969. Hepatotoxicity and plasma cholesterol esterification by rats. Arch. Biochem. Biophys. 129: 588-596.
62. Tamura, K., Yatsu, T., Itoh, H., and Motoi, Y. 1989. Isolation, characterization, and quantitative measurement of serum  $\alpha$  1-acid glycoprotein in cattle. Jpn. J. Vet. Sci. 51: 987-994.
63. Thompson, G. E. 1988. Electrolytes and free fatty acids in milk during mammary involution in the cow. Res. Vet. Sci. 44: 175-177.
64. Thompson, C., Hudson, P. M., and Lucier, G. W. 1983. Correlation of hepatic estrogen receptor concentrations and estrogen-mediated elevation of very low density lipoproteins. Endocrinology 112: 1389-1397.
65. Villa-Trevino, S., Shull, K. H., and Farber, E. 1963. The role of adenosine triphosphate



deficiency in ethionine-induced inhibition of protein synthesis. J. Biol. Chem. 238: 1757-1763.

66. Yoshino, K., Katoh, N., Takahashi, K., and Yuasa, A. 1992. Purification of a protein from serum of cattle with hepatic lipidosis, and identification of the protein as haptoglobin. Am. J. Vet. Res. 53: 951-956.

67. Yoshino, K., Katoh, N., Takahashi, K., and Yuasa, A. 1993. Possible involvement of protein kinase C with induction of haptoglobin in cows by treatment with dexamethasone and by starvation. Am. J. Vet. Res. 54: 689-694.



## Serum Lipoproteins and Haptoglobin in Cows with Experimentally Induced Fatty Liver

by

*EIJI UCHIDA*

### SUMMARY

The previous studies of fatty liver in cows have been mainly focused on natural cases, and there have been no reports on experimentally induced fatty liver. Ethionine, an analogue of methionine, is known to induce fatty liver in rats by inhibiting the biosynthesis of some proteins such as apolipoproteins. The purpose of the study reported here is to induce fatty liver in cows by administration of ethionine, to determine the role of serum lipoproteins and haptoglobin (Hp), and to make critical commentary upon possible factors for the development of fatty liver in cows at peripartum.

The results obtained were summarized as follows :

- 1) Intraperitoneal injection of ethionine at a dose of 25mg/kg of body weight at 1 week intervals resulted in a significant increase in liver triglyceride (TG) content.
- 2) The serum level of several apolipoproteins was found to decrease, in particular, apolipoprotein B-100 (apoB-100) in very low density (0.95 to 1.006 g/ml) lipoprotein and in low density (1.006 to 1.063 g/ml) lipoprotein fractions. Decreased



concentration of apolipoprotein A- I in high density (1.063 to 1.210 g/ml) lipoprotein was also observed, although not as distinctly as with apoB-100.

3) The decrease of serum apoB-100 concentration in the two lipoprotein fractions was correlated to the decreased TG concentration in the respective fractions.

4) Serum levels of total cholesterol and phospholipid in low and high density lipoprotein fractions were decreased. The decrease in cholesterol was attributed to the reduced concentration of cholesterol esters.

5) In order to assess the possible association of serum Hp with fatty liver, serum Hp concentration was evaluated by the single radial immunodiffusion method after ethionine administration. Haptoglobin concentration was found to be increased in the sera of ethionine-administered cows.

6) Serum cortisol concentration was also increased in ethionine-treated cows.

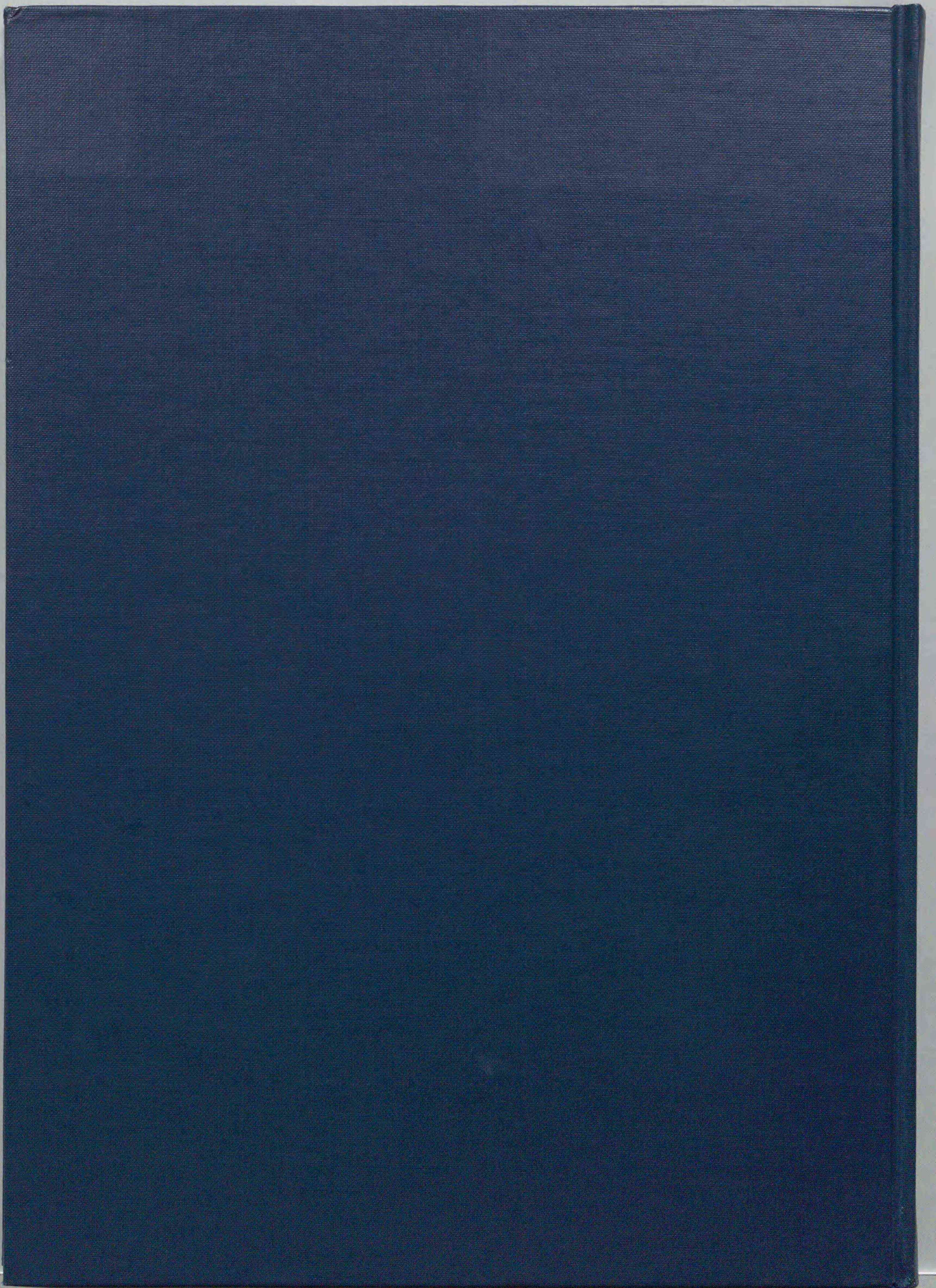
7) Among various serum parameters measured before and after parturition, Hp, cortisol and nonesterified fatty acids were increased, and apoB-100 and TG were decreased at parturition.

Thus, ethionine administration to cows can induce biochemical alterations quite similar to those seen in natural cases of fatty liver; that is, an increase in hepatic triglyceride content, a decreased level of serum apolipoprotein and a significant rise of serum Hp level. These results suggest that ethionine administration provides a useful model for the study of the pathogenesis of fatty liver in cows. It was also suggested that serum Hp is correlated with the development of fatty liver in



cows, and may be one of the markers for the diagnosis of fatty liver in cattle.



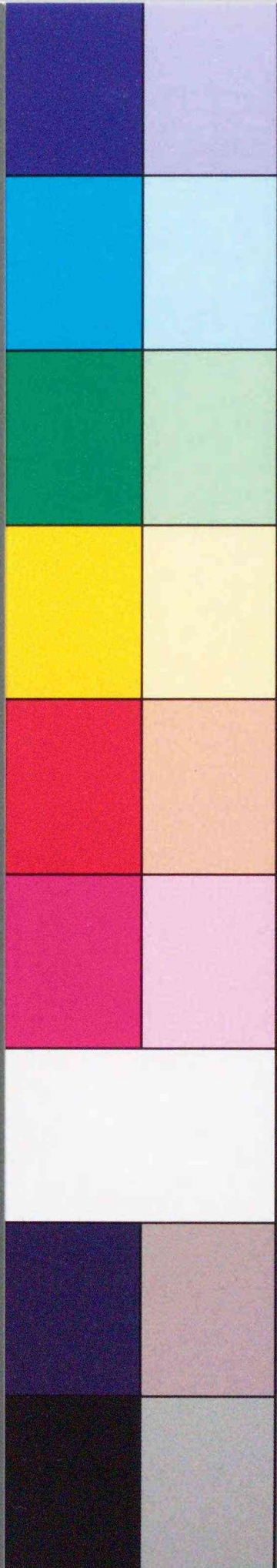




Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



# Kodak Gray Scale

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19



© Kodak, 2007 TM: Kodak