

母子牛血漿におけるビタミン A と β カロテン量, ならびにレチノール輸送タンパク質量の動態解析

吉田 豊*・原ひろみ*・半澤 恵*・渡邊誠喜**

(平成 23 年 5 月 17 日受付/平成 23 年 9 月 13 日受理)

要約: 黒毛和種牛とホルスタイン種牛の母子 21 頭を用いて, 分娩前後の母牛と出生直後の子牛 (新生子牛) の血漿に含まれるレチノール (ROH), レチニールパルミテート (RPAL), β カロテン (β -c), ならびに ROH 輸送担体である ROH 結合タンパク質 (RBP4) とトランスサイレチン (TTR) 量の動態を時系列で観察し, 母子牛におけるこれらの生理的動態と各種成分との関連を明らかにした。母牛の血漿 ROH と β -c 量は, 分娩 2 週前の値に比較して分娩時に著しく減少し, この傾向は, ホルスタイン種牛に比較して, ROH と β -c の摂取量が少ない黒毛和種牛において顕著であった。また, 血漿 RBP4 量と TTR 量の時系列は, 血漿 ROH 量の変動と均衡を保ち密接にその量が制御されていた。そして, この傾向は, β -c 等の摂取量が多いホルスタイン種母牛において顕著であった。このことから, ROH, RPAL, β -c 摂取量の多寡が, 母牛の血漿 RBP4 量と TTR 量の時系列に影響を与えていること。また, 血漿 ROH そのものが RBP4 の分泌機構を制御していることが示唆され, 母牛の妊娠後期から分娩後における VA 給与とその代謝に関わる貴重な知見を得ることが出来た。さらに, 母子間の血漿 ROH モル比は極めて近似し, 品種差に大きく影響されることなく, 母牛は子牛の 1.6~1.8 倍モルの ROH を保有していること。また, 血漿 TTR 量も品種や母子の差に殆ど影響されることなく, 血漿 RBP4 量の 1.6~1.9 倍モルを保有していることが示唆された。血中の ROH は, RBP4, TTR と 1:1:1 のモル比で結合し, 複合体を形成し標的細胞へ輸送されている。このことから, 母子牛は ROH 代謝に必要な十分な量の血漿 RBP4 と TTR を保有していることが明らかになった。

キーワード: ウシ, ROH, β カロテン, RBP4, TTR

1. 緒 言

近年, KAWAGUCHI ら¹⁾, PASUTTO ら²⁾ によって, 既知のレチノール結合タンパク質 (RBP4) 受容体とは異なる, STRA6 (stimulated by retinoic acid gene6) がウシ網膜視部色素上皮細胞膜上に発見され, 肝臓星細胞³⁻¹²⁾ が, 肝臓の線維化や肝硬変の責任細胞であること, 血液中 RBP4 量の動態が肝硬変, 肝繊維化, 脂肪肝, 甲状腺機能低下症等の病勢と関連のあることが明らかになってきた¹³⁻²⁰⁾。

一般に哺乳類はビタミン A (VA) や β カロテン (β -c) を体内で合成することができない。このため必要とされるこれらの全ては食物を介して摂取しなければならない。とりわけ, ウシは繁殖や泌乳能力の向上, 乳・肉質の改良, 強靱な生体防御能の構築等に多くの VA や β -c を必要とすると共に, 生理学的に肝機能障害や糖・ミネラル等の代謝異常の発生が極めて多い動物である。これらの理由から, VA や β -c の給与体系における人為的制御や疾病予防は, 極めて重要な管理項目の一つとなっている。しかしながら, ヒトや小動物の VA に関する知見の数に比較して, ウシ, 特に母子牛の血液中 VA の動態等に関する報告は極めて少ない。

筆者らは, 繁殖母牛とこれから出生した子牛の血漿 VA, β -c, ならびに ROH 輸送タンパク質量の時系列的変動を精査・解析し, 母子牛におけるこれらの生理的動態と成分間の関連を明らかにした。

2. 材料および方法

供試牛は, 本学富士農場 (静岡県富士宮市) で飼養されていた黒毛和種母牛 5 頭とこれらから出生した子牛 5 頭, ならびにホルスタイン種母牛 5 頭とこれらから出生した子牛 6 頭 (1 腹は双生子) の合計 21 頭を用いた。飼料給与と哺乳の概要について, 黒毛和種母子牛は Fig. 1 に, ホルスタイン種母子牛は Fig. 2 に示した。黒毛和種とホルスタイン種母牛に CP 16% 以上, DCP 13~14% 以上, TDN 70% 以上の養分含量が保証された配合飼料, ならびに当該栽培のリードキャナリーグラスから調製した乾草とサイレージを給与した。母牛の採血は, 分娩予定日の 2 週前 (以後, 分娩 2 週前), 分娩時, ならびに分娩から 2 週間隔で 12 週後まで合計 8 回実施した。子牛は, 出生直後の初乳給与前に初回採血を行い, 以後は母牛の採血に同調させた。採血はヘパリン処理された減圧採血管 (10 ml) を用い, 午前 9 時から 10 時の間に実施した。採取した血液は直ちに遠心

* 東京農業大学農学部畜産学科

** 東京農業大学名誉教授

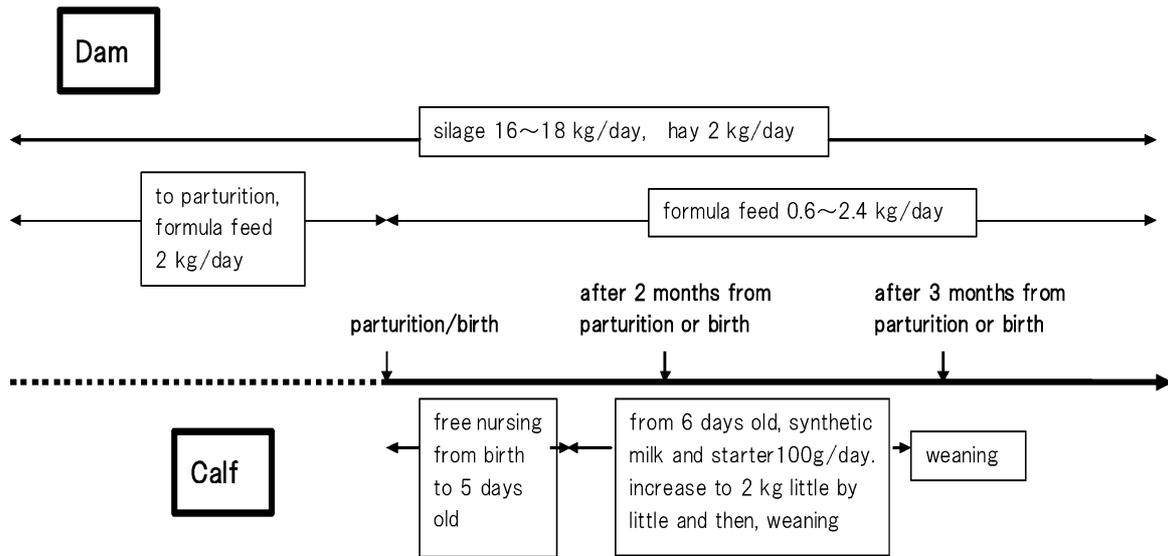


Fig. 1 Feeding form for Japanese Black dam and calf

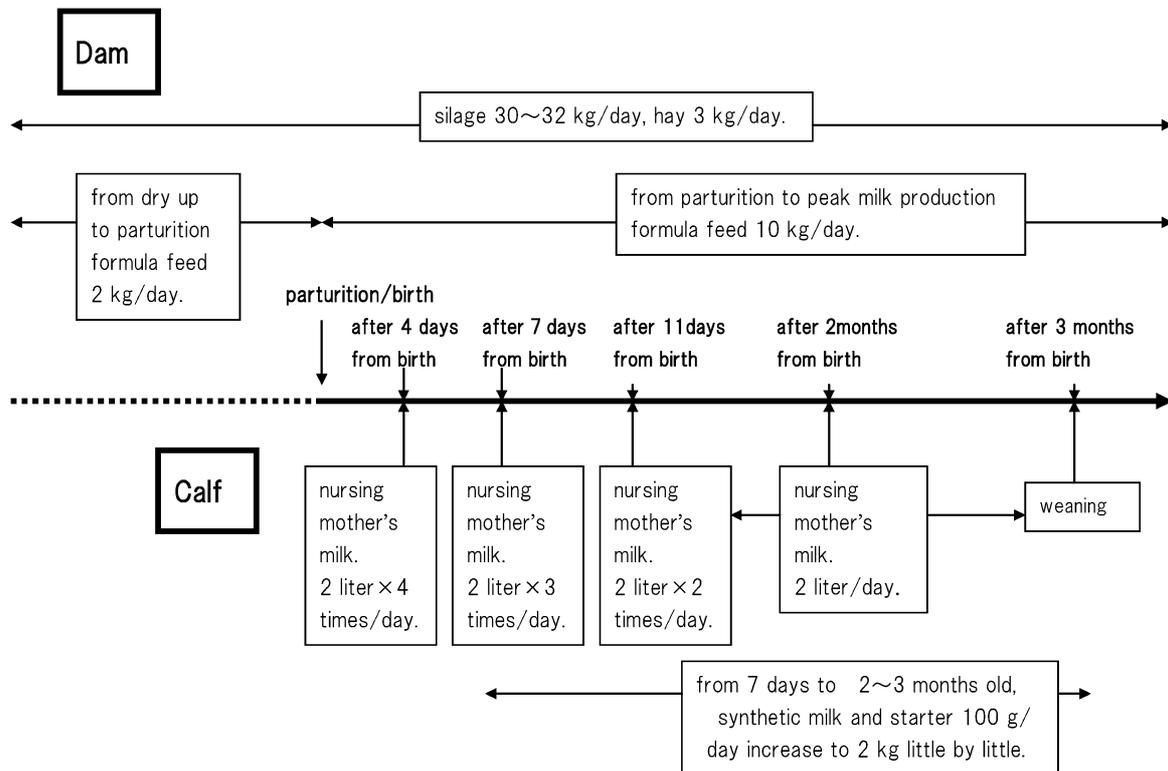


Fig. 2 Feeding form for Holstein dam and calf

分離 (3,000 rpm/15 分間) し血漿を分取した。高速液体クロマトグラフィ (HPLC) による、血漿中の ROH と β -c 量の測定は、阿部ら²¹⁾、TONPSON ら²²⁾ の方法を、飼料中の ROH, RPAL, α -c, β -c 量の測定は、「粗飼料の品質評価ガイドブック」²³⁾ に示された方法をそれぞれ応用した。血漿中の RBP4 とトランスサイレチン (TTR) 量は一元放射免疫拡散法 (SRID) を用いて測定した。

3. 結果および考察

給与飼料に含まれるレチノイドとカロテノイド量は Table 1 に、黒毛和種母子牛の摂取量は Fig. 3、ホルスタイン種母子牛のそれは Fig. 4 に示した。また、両品種母子牛の血漿 RBP4 と TTR 量の時系列的変動を Fig. 5 に、血漿 ROH と β -c 量の時系列的変動を Fig. 6 に示した。

Table 1 Content of retinoids and carotenoids in feed

| kinds of feed | breed | retinoids and carotenoids | | | |
|----------------------------|----------------------------------|---------------------------|------------------|------------|------------|
| | | retinol | retinylpalmitate | α-carotene | β-carotene |
| formula feed | Holstein dam | 1.19 | 32.78 | - | 6.26 |
| | Japanese black dam | 0.62 | 18.44 | - | 0.41 |
| | Holstein and Japanese black calf | - | 8.25 | - | 0.01 |
| silage (read canary grass) | Holstein and Japanese black dam | - | - | 0.028 | 23.48 |
| hay (read canary grass) | Japanese black dam | - | - | 0.048 | 4.74 |

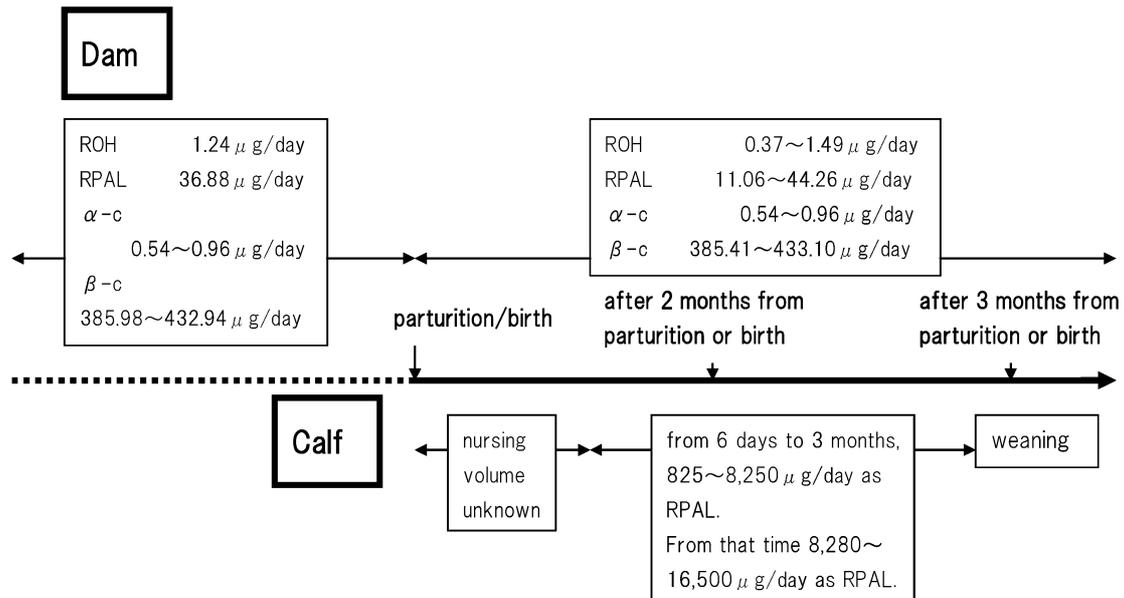


Fig. 3 Outline of retinoids and carotenoids ingestion of Japanese Black dam and calf

1) 母牛における血漿 RBP4 量の時系列的変動

黒毛和種牛の RBP4 量は、分娩 2 週前の 73.95 ± 3.76 mg/L に比較して分娩時におよそ 12% 減少した。しかしながら、分娩 2 週間になると、分娩時の値に比較しておよそ 28% 増加し、分娩 2 週前の値を上回った。以後は緩徐な増減を繰り返し分娩 2 週後の値に近似する傾向を示した。一方、ホルスタイン種牛の分娩予定 2 週前のそれは、黒毛和種牛の同時期の値と同等の 73.22 ± 5.20 mg/L を示した。しかし、分娩時の値は、分娩予定 2 週前の値に比較しておよそ 3% の減少にとどまり、黒毛和種牛の同時期の減少率に比較しておよそ 1/4 であった。また、分娩 2 週間には、分娩時の値に近似したが、この時期から分娩 8 週間にかけて顕著な増加を示し、分娩時の値に比較しておよそ 66% 増加した。これ以後は、この値に近似する傾向を示し、分娩 12 週間には 112.40 ± 8.69 mg/L を認めた。両品種母牛の RBP4 量の時系列的変動は、分娩前から分娩時にかけて減少し、それ以後は、黒毛和種牛の分娩 4, 6 週後に認めた僅かな減少を除き、増加する傾向を示した。ホルスタイン種牛の分娩 12 週後の値は、同時期の黒毛和種牛の値に比較しておよそ 1.3 倍量を示した。両品種母牛間における RBP4 量の分散分析の結果と相関々係 ($r=0.7270$) に有意

な差 ($P < 0.05$) を認めた。これらのことから、両品種母牛の RBP4 量は、分娩前に極めて近似する値を示した。さらに、分娩後の RBP4 値は増加したが、黒毛和種牛の値に比較してホルスタイン種牛のそれは有意に高い値であった。

2) 子牛における血漿 RBP4 量の時系列的変動

両品種子牛の RBP4 量の時系列的変動は極めて類似する傾向を示した。すなわち、出生直後から 2 週齢、ならびに 8 週齢から 10 週齢の期間において、RBP4 量の増加を認める小さな二峰性の時系列的変動を示すと共に、各週齢における両者の RBP4 量も極めて近似していた。

黒毛和種子牛の RBP4 量は、出生直後の 45.58 ± 1.21 mg/L に比較して 2 週齢でおよそ 35%、10 週齢でおよそ 55% 増加し、12 週齢では僅かに減少して 62.91 ± 0.65 mg/L を示した。一方、ホルスタイン種子牛のそれは、出生直後の 51.34 ± 3.12 mg/L に比較して 2 週齢ではおよそ 10% の増加にとどまり、その増加率は黒毛和種牛の同時期の値に比較しておよそ 1/3 であった。10 週齢でおよそ 28% 増加し、12 週齢では若干の減少を示した。出生直後から 2 週齢までの RBP4 増加率は、ホルスタイン種牛に比較して黒毛和種牛で高い値が認められ、これは母牛の分娩時

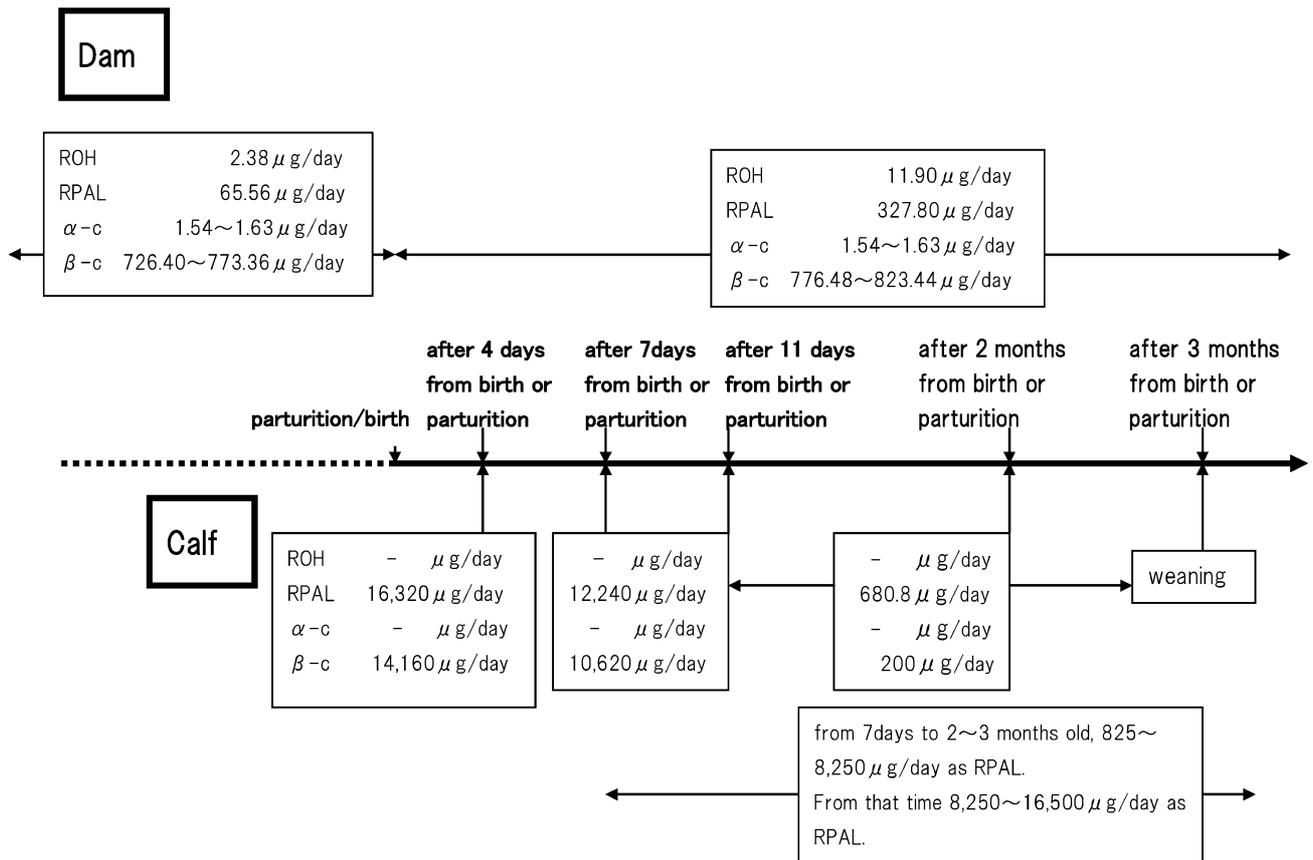


Fig. 4 Outline of retinoids and carotenoids ingestion of Holstein dam and calf

から分娩2週後におけるRBP4量の時系列と同様の傾向であった。両品種子牛のRBP4量は有意な相関 ($r = 0.8581$, $P < 0.01$) を示したが、分散分析の結果に有意差 ($P > 0.05$) は認められなかった。

すなわち、子牛のRBP4量は、品種差の影響が少なく、極めて近似な値を保ちながら時系列で緩徐に増加する傾向が示唆された。さらに、品種別母子間の時系列にそれぞれ有意 ($P < 0.05$) な相関 (黒毛和種母子牛は $r = 0.7931$, ホルスタイン種母子牛は $r = 0.7889$) を認め、分娩や出生後におけるRBP4量の時系列が、母子間において類似した傾向で推移することが示唆された。

3) 母牛における血漿TTR量の時系列的変動

両品種母牛のTTR量は、RBP4量の時系列とほぼ同様の傾向を示し、分娩2週前から分娩時にかけて顕著に減少し、その後は時系列に増加した。黒毛和種牛のTTR量は、分娩2週前の $364.09 \pm 31.07 \text{ mg/L}$ に比較して分娩時はおおよそ19%の減少を示した。しかし、分娩2週間になると、それは顕著に増加し、分娩2週前の値に比較しておおよそ8%、分娩時のそれに比較しておおよそ33%の増加を示した。それ以後は、僅かな増減を繰り返しながら緩徐に増加し、分娩12週後に $437.48 \pm 45.74 \text{ mg/L}$ を示した。この値は、分娩時に比較しておおよそ48%の増加に相当する高い値であった。一方、ホルスタイン種牛のそれは、分娩2週

前の $324.57 \pm 38.72 \text{ mg/L}$ に比較して分娩時はおおよそ12%減少した。分娩2週後では、分娩時のそれに比較して、黒毛和種牛がおおよそ33%に相当する顕著な増加を示したのに対し、ホルスタイン種牛のそれはおおよそ2%の増加にとどまった。しかしながら、これ以降の値は顕著な増加を示し、分娩4週後では、分娩時のそれに比較しておおよそ38%の増加を示し、黒毛和種牛の同時期の値を超過した。分娩4週以降の値は、黒毛和種牛の値を常に上回り、分娩12週後には分娩時の値に比較しておおよそ71%の増加を示した。両品種母牛のTTR量は、有意な相関 ($r = 0.8017$, $P < 0.01$) を示したが、分散分析の結果に有意差 ($P > 0.05$) は認めなかった。このことから、両品種母牛の分娩後TTR量の時系列は、品種差の影響が少なく、極めて近似した値で推移することが示唆された。

4) 子牛における血漿TTR量の時系列的変動

両品種子牛の出生時におけるTTR量は、母牛の分娩時の値に近似したが、時系列の傾向は両品種間に若干の差異を認めた。黒毛和種子牛のTTR量は出生時に $266.19 \pm 25.59 \text{ mg/L}$ を示し、2週齢では出生時のそれに比較しておおよそ16%増加した。6週齢から10週齢にかけては $290 \sim 280 \text{ mg/L}$ 前後の値で比較的安定した推移を示したが、12週齢にかけて著しく増加し、出生時の値に比較しておおよそ38%の増加を示した。一方、ホルスタイン種子牛のそれ

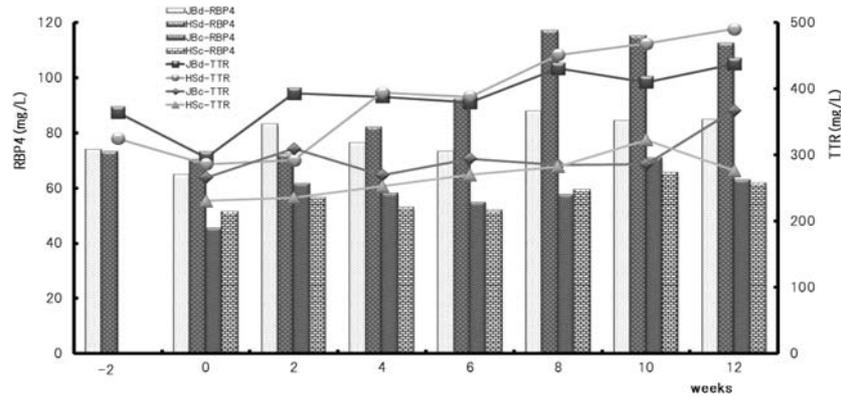


Fig. 5 Kinetics of RBP4 and TTR volume in plasma of dams and calves of Japanese Black, Holstein breed of dams and calves

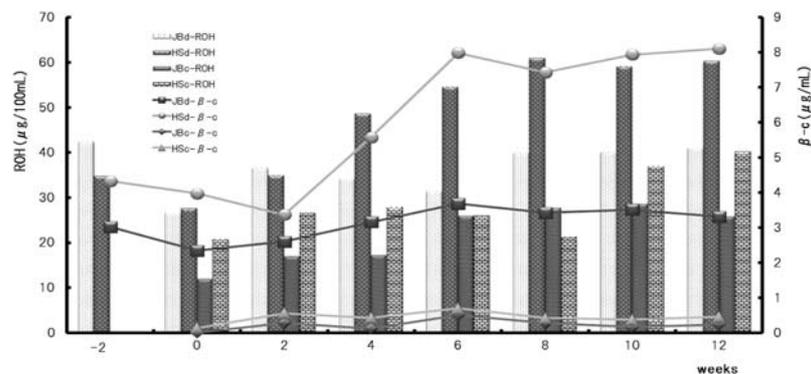


Fig. 6 Kinetics of ROH and β -c volume in plasma of dams and calves of Japanese Black, Holstein breed of dams and calves

は、出生時に黒毛和種牛より若干低い値の 230.76 ± 12.25 mg/L を示し、以降は 10 週齢まで緩徐ながら一回帰的に増加し、出生時のそれに比較しておよそ 40% の増加を示した。また、品種別母子間の TTR 量の相関は、黒毛和種牛が $r=0.5473$ 、ホルスタイン種牛が $r=0.7798$ を示し、ホルスタイン種母子間に有意な差 ($P < 0.05$) を認めた。

5) 母牛における血漿 ROH, β -c, RBP4, ならびに TTR の相互関係

分娩 2 週前から分娩時において、両品種母牛の ROH 量は、黒毛和種牛でおよそ 37%、ホルスタイン種牛でおよそ 21%、同順で β -c 量は、およそ 23%、および 8% 減少（分娩 2 週後でおよそ 22% の減少）し、分娩前から分娩時、あるいは分娩後にかけて ROH と β -c 量が著しく減少することが明らかになった。ウシ胎子は結合織絨毛膜性胎盤を形成しているため、母胎子間で VA や免疫グロブリン (Ig) を効率良く授受することができない。このため、新生子は母牛が分娩直後に分泌する乳汁からこれらを摂取しなければならず、母牛は自らが産生する乳汁に血液中の VA や β -c の多くを移行させていることが示唆された。一方、分娩後の血漿 ROH 量は増加の傾向を示し、これにともない RBP4 量と TTR 量も増加し、ROH 量と RBP4 量、ならびに ROH 量と TTR 量のそれぞれの時系列変動に有意な相

関を認めた。特に、ROH と β -c 量の双方に顕著な増加を示したホルスタイン種母牛は、ROH 量と RBP4 量が $r=0.8823$ ($P < 0.01$)、ROH 量と TTR 量が $r=0.9496$ ($P < 0.01$) を示し、同順で、黒毛和種母牛の $r=0.7638$ ($P < 0.05$)、 $r=0.7424$ ($P < 0.05$) に比較していずれも高い相関を示した。 β -c 量との相関においても、ホルスタイン種牛は、 β -c 量と RBP4 量が $r=0.8314$ ($P < 0.01$)、 β -c 量と TTR 量が $r=0.9139$ ($P < 0.01$) を示し、同順で、黒毛和種牛は $r=0.5220$ ($P > 0.05$)、 $r=0.7147$ ($P < 0.05$) を示した。Fig. 3 と Fig. 4 に示したようにホルスタイン種母牛は、泌乳量の増加を維持する目的から、飼料摂取量は分娩前のそれに比較して分娩後はおよそ 5 倍に増量されている。一方、黒毛和種母牛は子牛の離乳と共に給餌量は減少する。このことから、両品種間、ならびにそれぞれの母牛の分娩前後において、ROH, RPAL, ならびに β -c の摂取量の多寡が、母牛の RBP4 と TTR 量の時系列に影響することが示唆された。

6) 牛群における血漿 ROH, RBP4, ならびに TTR 量の相互関係

黒毛和種母牛と同子牛、ならびにホルスタイン種母牛と同子牛における各牛群の RBP4 量と TTR 量の相関は、黒毛和種母牛が $r=0.9376$ 、同子牛で $r=0.6157$ 、ホルスタイン種母牛が $r=0.8884$ 、同子牛が $r=0.8032$ を示し、黒毛

Table 2 Comparison between the means molar volume and molar ratio of RBP4, TTR and ROH in plasma of dams and calves

| | dams | | | | | | calves | | | | | | dams/calves | | |
|-----|---------------|---------------|---------------|-------------|---------|----------|---------------|---------------|---------------|-------------|---------|----------|-------------|------|------|
| | μmol /L | | | molar ratio | | | μmol /L | | | molar ratio | | | RBP4 | TTR | ROH |
| | RBP4 | TTR | ROH | TTR/RBP4 | TTR/ROH | RBP4/ROH | RBP4 | TTR | ROH | TTR/RBP4 | TTR/ROH | RBP4/ROH | | | |
| JB | 3.73 ±0.37 | 7.05 ±0.93 | 1.24 ±0.08 | 1.89 | 5.69 | 3.01 | 2.79 ±0.14 | 5.25 ±0.30 | 0.77 ±0.09 | 1.88 | 6.82 | 3.62 | 1.34 | 1.34 | 1.61 |
| Hol | 4.29 ±0.29 | 7.03 ±0.51 | 1.67 ±0.16 | 1.64 | 4.21 | 2.57 | 2.56 ±0.10 | 4.86 ±0.22 | 0.95 ±0.11 | 1.90 | 5.12 | 2.69 | 1.67 | 1.45 | 1.76 |

note : RBP4, TTR and ROH show retinol binding protein4, transthyretin and retinol. JB and Hol is Japanese Black, Holstein breed, and a numerical value show means ±S.E.

Table 3 Comparison between correlation coefficient of RBP4, TTR, ROH and β-c volume in plasma of Japanese Black, Holstein breed dams and calves

| Japanese Black dams | | | | Japanese Black calves | | | |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------------------|----------|----------|----------|
| | TTR | ROH | β-c | | TTR | ROH | β-c |
| RBP4 | 0.9376 ** | 0.7638 * | 0.5220 | RBP4 | 0.6157 | 0.6957 | 0.1510 |
| TTR | | 0.7424 * | 0.7147 * | TTR | | 0.7502 * | 0.4941 |
| Holstein dams | | | | Holstein calves | | | |
| | TTR | ROH | β-c | | TTR | ROH | β-c |
| RBP4 | 0.8884 ** | 0.8823 ** | 0.8314 ** | RBP4 | 0.8032 * | 0.7041 * | 0.7041 * |
| TTR | | 0.9496 ** | 0.9139 ** | TTR | | 0.5612 | 0.0470 |

* : P<0.05, ** : P<0.01

和種子牛を除く他の全ての牛群に有意な差 (P<0.01~0.05) を認めた。

RBP4量とROH量の相関は、黒毛和種母牛がr=0.7638, 同子牛がr=0.6957, ホルスタイン種母牛でr=0.8823, 同子牛がr=0.7041を示し、黒毛和種子牛を除く他の全ての牛群に有意な差 (P<0.01~0.05) を認めた。黒毛和種子牛のRBP4とTTR, ならびにRBP4とROHの相関に有意な差が認められなかったのは、他の牛群に比較して血漿ROHとβ-cが低値で推移したことが原因であると推察した。

TTR量とROH量の相関は、黒毛和種母牛がr=0.7424, 同子牛がr=0.7502, ホルスタイン種母牛がr=0.9496, 同子牛がr=0.5612を示し、ホルスタイン種子牛を除く他の全ての牛群に有意な差 (P<0.01~0.05) を認めた。ホルスタイン種子牛の結果について、その原因は明らかに出来なかったが、母牛のRBP4とTTR量は、ROH量の変動と均衡を保ちながら、その量が制御されていることが示唆された。

7) 母子牛における血漿 ROH, RBP4, TTR モル量の解析

血液中において、ROH, RBP4, TTR は、1:1:1のモル比で結合し複合体を形成する。そこで、Table 2に示したように、両品種母子牛のROH, RBP4, ならびにTTR量をモル値に換算し、これらと比較すると共に、TTR/RBP4, TTR/ROH, RBP4/ROHのモル比を求め、ROH量の変動にともなうRBP4量, ならびにTTR量の関係を解析した。

RBP4の平均モル値は、黒毛和種母牛が3.73±0.37 μmol/L, ホルスタイン種母牛が4.29±0.29 μmol/Lであっ

た。同順で、TTRの平均モル値は、7.05±0.93 μmol/L, 7.03±0.51 μmol/L, ROHの平均モル値は、1.24±0.08 μmol/L, 1.67±0.16 μmol/Lであった。子牛のRBP4の平均モル値は、黒毛和種子牛が2.79±0.14 μmol/L, ホルスタイン種子牛が2.56±0.10 μmol/Lであった。同順で、TTRの平均モル値は、5.25±0.30 μmol/L, および4.86±0.22 μmol/L, ROHの平均モル値は、0.77±0.09 μmol/L, および0.95±0.11 μmol/Lであった。

TTR/RBP4モル比は、黒毛和種母牛が1.89, 同子牛が1.88, ホルスタイン種母牛が1.64, 同子牛が1.90であった。黒毛和種牛ではRBP4の1モルに対しておよそ1.8倍モルのTTRを保有していること。さらに、ホルスタイン種母子牛においても、黒毛和種牛と大差のない、1.6倍モルのTTRを保有していた。このことから、TTR量は、品種や母子の差に因る影響が少なく、RBP4量の1.6~1.8倍モル存在していることが示唆された。

TTR/ROHモル比は、黒毛和種母牛が5.69, 同子牛が6.82, ホルスタイン種母牛が4.21, 同子牛が5.12を示した。

ROH 1モルに対して、TTRは黒毛和種母牛でおよそ6倍モル, 同子牛でおよそ7倍モル, ホルスタイン種母牛でおよそ4倍モル, 同子牛で5倍モルの存在を認めた。黒毛和種母子牛のモル比は、ホルスタイン種のそれに比較して高く、母牛間の比較でおよそ1.4倍モル, 子牛間でおよそ1.3倍モルとなった。品種ごとの母子間比較では、黒毛和種とホルスタイン種子牛は、母牛のおよそ1.2倍に相当するモル比を認めた。また、すべての牛群において、TTR量はRBP4量やROH量よりも多く存在し、特に、出生直後の子牛(新生子牛)のTTR/ROHモル比は、母牛のそれに比較して高値の傾向を示し、ROH輸送担体としての必要量を超過するTTRの存在が明らかになった。

TTR は RBP4 受容体と T_4 受容体を併せ持ち、甲状腺ホルモンの輸送担体としても機能している。このことから、子牛は胎生期から甲状腺を活発に機能させ、甲状腺ホルモンを旺盛に分泌していることが示唆された。

RBP4/ROH モル比は、黒毛和種母牛が 3.01、同子牛が 3.62、ホルスタイン種母牛が 2.57、同子牛が 2.69 であり、両品種母牛間に近似するモル比が認められた。子牛の時系列では、出生時のモル比が最も高く、ROH 1 モルに対する RBP4 モルは、黒毛和種子牛でおよそ 5.14 倍、ホルスタイン種子牛でおよそ 3.34 倍となり、ROH 1 モルに対して 3~5 倍モルの RBP4 が認められた。

子牛は、出生直後から母乳や人工乳を介して多量の RPAL 等を摂取するにもかかわらず、血漿 ROH 量は低値で推移することが確認されている²⁴⁾。そして、この原因の一つとして RBP4 や TTR の肝臓における産生不全、あるいは血液中における量的不足が推察された。しかしながら、筆者らの実験(未発表)^{25,26)} から、母牛が分娩直後に分泌する乳汁の摂取の有無が、新生子牛の血液中 ROH 量の多寡に影響することが認められており、本研究の結果を合わせて、子牛、特に新生子牛の血漿には、ROH 代謝に必要な量の TTR と RBP4 の存在していることが示唆された。

母子間の RBP4、TTR、ROH の平均モル比の比較では、黒毛和種母牛の RBP4 モル比が 1.34、TTR モル比が 1.34、ROH モル比が 1.64、同順でホルスタイン種母牛は、1.67、1.45、および 1.76 を示した。すなわち、母子間の RBP4 と TTR 量の平均モル比は、品種ごとに双方の値が極めて近似し、黒毛和種母牛が同子牛のおよそ 1.3 倍、ホルスタイン種母牛が同子牛のおよそ 1.7 倍を示した。また、ROH 平均モル比では、母牛は子牛のおよそ 1.6~1.7 倍の ROH を血液中に保有していた。

8) 母子牛の血漿 ROH、 β -c 量に対する RBP4、TTR 量の解析

次いで、ROH 量、 β -c 量、RBP4 量、ならびに TTR 量の相関を求め、その結果を Table 3 に示した。

ROH と RBP4 の相関は、黒毛和種母牛が $r = 0.7638$ ($P < 0.05$)、同子牛が $r = 0.6957$ ($P > 0.05$) を示した。ホルスタイン種母牛は $r = 0.8823$ ($P < 0.01$)、同子牛は $r = 0.7041$ ($P < 0.05$) を示し、両品種母牛とホルスタイン種子牛に有意な差を認めた。Fig. 3 と 4 に示したように、分娩後の黒毛和種母牛の ROH と RPAL の摂取量は、分娩前の摂取量に比較しておよそ 20% 増量しているのに対し、分娩後のホルスタイン種母牛は同様の比較で、およそ 50% 増量している。ROH と RPAL 摂取量の増加にともない、黒毛和種母牛の ROH 量は、分娩時の $26.70 \pm 4.77 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ に比較して、分娩 4 週後ではおよそ 28% 増加し、分娩 8 週後には $39.83 \pm 6.43 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ を示した。一方、黒毛和種母牛に比較して、ROH と RPAL 摂取量が顕著に増加したホルスタイン種母牛の ROH 量は、分娩時の $27.36 \pm 4.21 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ に比較して分娩 4 週後ではおよそ 76% 増加し、また、分娩 8 週後にはおよそ 120% の増加を示した。このことから、前述したように、ROH と RPAL 摂取量の

多寡が、血漿 ROH 量の変動に大きく影響していることが明らかになった。また、RBP4 量において、黒毛和種母牛は分娩時の $64.79 \pm 2.92 \text{ mg/L}$ に比較して、分娩 4 週後では 18% の増加、分娩 8 週後では 35% の増加を示した。一方、ホルスタイン種母牛は、分娩時の $70.42 \pm 4.82 \text{ mg/L}$ に比較して、分娩 4 週後では 17%、分娩 8 週後では 31% の増加を示した。RBP4 量の増加率では黒毛和種母牛がホルスタイン種母牛を僅かに上回っていたが、絶対量の比較では、後者が前者のそれを大きく超過する結果であった。すなわち、分娩、泌乳、妊娠等による生理的な VA 要求量の高まりに因るこれらの摂取量の増加は、血漿 ROH 量の増加を招き、それによって RBP4 量も増えていることが示唆された。このことは、ROH 自身が RBP4 の分泌機構を制御することを示唆した SUHARA²⁷⁾ の報告を裏付ける結果となった。

ROH 量と TTR 量の相関は、黒毛和種母牛が $r = 0.7424$ ($P < 0.05$) を、同子牛が $r = 0.3706$ ($P > 0.05$) を示した。ホルスタイン種母牛は $r = 0.9496$ ($P < 0.01$) を、同子牛は $r = 0.5612$ ($P > 0.05$) を示した。両品種母牛に有意な差が示されたことから、前述の RBP4 の解析と同様、分娩後の ROH 量の増加が、肝臓におけるこれら輸送担体の産生を促していることが示された。さらに、黒毛和種母牛に比較して、分娩後に VA 摂取量の多いホルスタイン種母牛において、その傾向が顕著であることを認めた。

9) 母牛の血漿 β -c 量に対する RBP4、TTR 量の解析

β -c 量と RBP4 量の相関は、黒毛和種母牛が $r = 0.5220$ ($P > 0.05$)、同子牛が $r = 0.1510$ ($P > 0.05$)、ホルスタイン種母牛が $r = 0.8314$ ($P < 0.01$)、同子牛が $r = 0.7041$ ($P < 0.05$) を示した。また、 β -c 量と TTR 量の相関は、黒毛和種母牛が $r = 0.7147$ ($P < 0.05$)、同子牛が $r = 0.4941$ ($P > 0.05$)、ホルスタイン種母牛が $r = 0.9139$ ($P < 0.01$)、同子牛が $r = 0.0470$ ($P > 0.05$) を示した。 β -c 量と RBP4 量の相関は、ROH 量と RBP4 量の結果と同様にホルスタイン種母牛に、 β -c 量と TTR 量の相関は、両品種母牛にそれぞれ有意な差が認められた。このことから、黒毛和種母牛に比較し、分娩の前後において、多くの β -c を摂取するホルスタイン種母牛は、血漿中 β -c 量を増加させると共に、これを旺盛に ROH に転換していることが示唆された。

4. まとめ

母牛の ROH と β -c 量は、分娩 2 週前に比較して分娩時に著しく減少し、特に、黒毛和種牛においてこの傾向が顕著であった。また、RBP4 量と TTR 量の時系列変動は、ROH 量の変動と均衡を保ちその量が制御されていた。そして、この傾向は、VA 摂取量の多いホルスタイン種母牛において顕著であった。このことから、分娩前後の ROH、RPAL、 β -c 摂取量の多寡が、母牛の RBP4 量と TTR 量の変動に影響すること、さらに、ROH そのものが RBP4 の分泌機構を制御していることが示唆され、母牛の妊娠後期から分娩後における VA 給与とその代謝に関わる貴重な知見を得ることができた。

また、両品種母子間の ROH モル比は近似し、品種差に影響されることは少なく、母牛は子牛のおよそ 1.6~1.8 倍モルの ROH を保有していること。さらに、TTR 量は、品種や母子の差を問わず、RBP4 量の 1.6~1.9 倍モルを保有していることが示唆された。そして、これらの解析から、母子牛は ROH 代謝に必要な量の RBP4 と TTR を血液中に保有していることが明らかになった。

謝辞：本研究の遂行にあたり、供試牛の提供等にご尽力をいただいた本学富士農場の職員に心より深謝申し上げます。

引用文献

- 1) KAWAGUCHI R., YU J., HONDA J., HU J., WHITELEGGE J., PING P., WIITA P., BOK D., SUN H., 2007, A membrane receptor for retinol binding protein mediates cellular uptake of vitamin A., *Science*, **315**, 820-825.
- 2) PASUTTO F., STICHT H., HAMMERSEN G., GILLESSEN-KAESBACH G., FITZPATRICK DR., NURNBERG G., BRASCH F., SCHIRMER-ZIMMERMANN H., TOLMIE JL., CHTAYAT D., HOUGE G., FERNANDEZ-MARTNEZ L., KEATING S., MORTIER G., HENNEKAM RCM., von der WENSE A., SLAVOTINEK A., MEINECKE P., BITOUN P., BECKER C., NURNBERG P., REIS A., RAUCH A., 2007, Mutation in STRA6 cause a broad apectrum of malformations including anophthalmia, congenital heart defects, diaphragmatic hernia, alveolar capillary dysplasia, lung hyoplasia, and mental retardation., *Am J Human Genetics*, **80**, 550-560.
- 3) WAKE K., 1971, "Sternzellen" in the liver: perisinusoidal cells with special reference to storage of vitamin A., *Am J Anat*, **132**, 429-462.
- 4) WAKE K., 1980, Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs., *Int Rev Cytol*, **66**, 303-353.
- 5) BLOMHOFF R., 1994, Vitamin A in Health and Disease., Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong, 1-275.
- 6) SATO M., SUZUKI S., SENOO H., 2003, Hepatic stellate cells: Unique characteristics in cell biology and phenotype., *Cell Struct Func*, **28**, 105-112.
- 7) SENOO H., 2004, Structure and function of hepatic stellate cells., *Med Electron Microsc*, **37**, 3-15.
- 8) SENOO H., 2007, Vitamin A-storing cell (stellate cell) system. In: Loessing IT(ed) Vitamin A: New Research., Nova Science Publishers, Cambridge, 616-619.
- 9) SENOO H., SATO M., IMAI K., 1997, Hepatic stellate cells -From the viewpoint of retinoid handling and function of the extracellular matrix-., *Acta Anat Nippon*, **72**, 79-94.
- 10) 妹尾春樹, 畑隆一郎, 1994, 星細胞 (ビタミン A 貯蔵細胞) の細胞生物学—レチノイド代謝と細胞外マトリックスの機能の視点から—, *ビタミン*, **68**, 501-513.
- 11) 妹尾春樹, 2006, ビタミン A 貯蔵細胞 (星細胞) 系の研究—分子から北極圏まで—, *ビタミン*, **80**, 105-113.
- 12) BLOMHOFF R., BLOMHOFF HK., 2006, Overview of retinoid metabolism and function., *J Neurobiol*, **66**, 606-630.
- 13) YANG Q., GRAHAM TE., MODY N., PREITNER F., PERONI OD., ZABOLOTNY JM., KOTANI K., QUADRO L., KAHN BB., 2005, Serum retinol binding protein 4 contributes to insulin resistance in obesity and type 2 diabetes., *Nature*, **436**, 356-362.
- 14) CHO YM., YOUN B-S., LEE H., MIN S-S., KWAK SH., LEE HK., PARK KS., 2006, Plasma retinol-binding protein-4 concentrations are elevated in human subjects with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes., *Diabetes Care*, **29**, 2457-2461.
- 15) GRAHAM TE., YANG Q., BLUHER M., HAMMARSTEDT A., CIARALDI TP., HENRY RR., WASON CJ., OBERBACH A., JANSSON P-A., SMITH U., KAHN BB., 2006, Retinol-binding protein 4 and insulin resistance in lean, obese, and diabetic subjects., *New Eng J Med*, **354**, 2552-2563.
- 16) KANAKA-GANTENBEIN C., MARGEKI A., PERVANIDOU P., SAKKA S., MASTORAKOS G., CHROUSOS GP., PAPASSOTIRIOU I., 2008, Retinol-binding protein 4 and lipocalin-2 in childhood and adolescent obesity: When children are not just "small adults"., *Clin Chem*, **54**, 1176-1182.
- 17) YAGMUR E., WEISKIRCHEN R., GREBBNER AM., TRAUTWEIN C., TACKE F., 2007, Insulin resistance in liver cirrhosis is not associated with circulating retinol-binding protein 4., *Diabetes Care*, **30**, 1168-1172.
- 18) PETTA S., CAMMA C., Di MARCO V., ALESSI N., BARBARIA F., CABIBI D., CALDARELLA R., CIMINNISI S., LICATA A., MASSENTI MF., MAZZOLA A., TARANTINO G., MARCHESINI G., CRAXI A., 2008, Retinol-binding protein 4: A new marker of virus-induced steatosis in patients infected with hepatitis C virus genotype., *Hepatology*, **48**, 28-37.
- 19) WU H., JIA W., BAO Y., LU L., ZHU J., WANG R., CHEN Y., XIANG K., 2008, Serum retinol binding protein 4 and nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus., *Diabetes Res Clin Pract*, **79**, 185-190.
- 20) CHOI SH., LEE YJ., PARK YJ., KIM KW., LEE EJ., LIM S., PARK DJ., KIM SE., PARK KS., JANG HC., CHO BY., 2008, Retinol binding protein-4 elevation is associated with serum thyroid-stimulating hormone levels in dependently of obesity in elderly subjects with normal glucose tolerance., *J Clin Endocr Metabol*, **93**, 2313-2318.
- 21) 阿部皓一, 大前雅彦, 阿部 靖, 勝井五一郎, 1979, *ビタミン*, **53**, 385.
- 22) J. N. TONPSON, G. HATINA, W. B MAXWELL, High performance liquid chromatographic determination of vitamin A in margarine, milk, partially skimmed milk and skimmed milk., 1980, *J. Assoc. off. Anal. Chem.* **63**, 4, 894-898.
- 23) 粗飼料の品質評価ガイドブック, 1994, 自給飼料品質評価研究会編, 日本草地協会, 21-23.
- 24) 吉田 豊, 古庄 律, 児玉朋子, 渡辺誠喜, 1997, 黒毛和種とホルスタイン種牛の分娩前後における乳中パルミチン酸レチノール並びにカロテノイド量の推移, 第 92 回日本畜産学会大会講演要旨, 25.
- 25) 母牛の分娩前後の血漿・乳汁中, ならびに子牛の出生後の血漿中 VA と α , ならびに β -c 量の変動と母子間におけるこれらの授受 (未発表)
- 26) 分娩直後分泌乳汁の摂取の有無が子牛の血漿中 VA と β -c 量の時系列的変動と肝臓内星細胞の分布に及ぼす影響 (未発表)
- 27) A. SUHARA, M. KATO and M. KANAI, 1990, Ultrastructural localization of plasma retinol-binding protein in rat liver., *J Lipid Res*, **31**, 1669-1681.

Analysis of the Kinetics of Vitamin A, Beta-carotene, and Retinol Transport Protein in Plasma of Calves and Their Dams

By

Yutaka YOSHIDA*, Hiromi HARA*, Kei HANZAWA* and Seiki WATANABE**

(Received May 17, 2011/Accepted September 13, 2011)

Summary : Changes in plasma levels of retinol (ROH), retinyl palmitate (RPAL), beta-carotene (β -c), and two ROH transporters, namely, ROH-binding protein 4 (RBP4) and transthyretin (TTR), were monitored over time in newborn calves and their dams to elucidate physiological kinetic properties and interrelationships. Five Japanese Black newborn calves and their five dams, and six Holstein newborns (including a pair of twins) and their five dams were examined. Plasma levels of ROH and β -c in dams were significantly lower at parturition than at two weeks before parturition. The decrease in levels at birth was greater in Japanese Black cows than in Holstein cows that consumed more ROH and β -c than Japanese Black cows. In addition, plasma levels of RBP4 and TTR closely reflected plasma ROH levels. The balance between the levels of ROH transporters and ROH was again influenced by factors such as the intake of β -c and was more prominent in Holstein cows than in Japanese Black cows. These results suggest that the consumption of ROH, RPAL, and β -c influences plasma levels of RBP4 and TTR in dams over time and that secretion of RBP4 and TTR depends on plasma ROH itself. Such findings provide valuable insight into the supply and metabolism of VA from the late stage of pregnancy to the postpartum stage. It was also shown that the molar concentrations of ROH in plasma were 1.7-fold higher in dams than in newborn calves, regardless of breed. Furthermore, the molar concentrations of plasma TTR were 1.6-1.8-fold higher than those of plasma RBP4, regardless of breed and age of the cattle. Considering that ROH in blood binds to RBP4 and TTR to form a complex (molar ratio of ROH : RBP4 : TTR = 1 : 1 : 1) before being transported to its target cells, secretion of ROH. These findings clearly demonstrate that neither impaired production of RBP4 and TTR in the liver nor insufficient amounts of these transporters in the plasma account for low plasma ROH levels in newborn calves.

Key words : cows, ROH, beta carotene, RBP4, TTR

* Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture

** Prof. Emeritus, Tokyo University of Agriculture