

# 乳牛における脂肪肝と胆汁中ステロイド ホルモン濃度との関係

種村高一      大滝忠利<sup>†</sup>      津曲茂久

日本大学生物資源科学部 (〒 252-0880 藤沢市亀井野 1866)

(2016年10月29日受付・2017年7月19日受理)

## 要 約

脂肪肝乳牛におけるステロイドホルモンの肝臓における代謝を間接的に知る目的で脂肪肝牛と正常肝牛の胆汁中エストロゲン及びコルチゾールを測定した。と殺解体されたホルスタイン種雌乳牛128頭から肝臓、胆汁を採取し、脂肪肝沈着度が10%未満のものを正常群(56例)、10%以上30%未満を軽度脂肪肝群(41例)、30%以上を重度脂肪肝群(31例)として区分した。正常肝群と脂肪肝群との比較において胆汁中エストロゲン3分画値は重度脂肪肝群で最も高濃度であり正常肝群で最も低値であった。胆汁中コルチゾール値は重度脂肪肝群で高値を示した。以上のことから、乳牛の脂肪肝の程度が胆汁中ステロイドホルモン濃度に影響することが確認できた。

——キーワード：胆汁，脂肪肝，ステロイドホルモン。

-----日獣会誌 70, 655~658 (2017)

水溶性の低いステロイドホルモンは血中では一部は非抱合型で存在するが、大部分は担体蛋白質と結合して標的細胞に到達し、間質で担体蛋白質から離れ、細胞内に入り、核内レセプターに結合して作用する。血中のステロイドホルモンは全身循環を経ておもに肝臓や腎臓でグルクロン酸や硫酸と結合した抱合体となり、生物学的活性を失って水溶性となり、一部は腎臓を経て尿中に、一部は胆汁を経て糞中に放出される [1-3]。中でもエストロゲンは、主要代謝酵素である肝UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT) によってグルクロン酸抱合することが知られている [4]。この抱合型エストロゲンは尿中あるいは糞中に排泄されるほか、一部は嫌気的細菌群の酵素類 ( $\beta$ -グルクロニダーゼ, 28 $\beta$ -グルコシダーゼ, アゾ還元酵素) により、おもに還元と加水分解を受けて非抱合型となり、再び腸管から吸収されて肝臓に戻り (腸肝循環) [5]、全身血液循環を回る [1]。この腸肝循環については、肝臓で代謝、抱合されたエストロゲンの約半分は胆汁中に排泄されるが、その約90%は腸管で再吸収され門脈から肝臓へ戻るとの報告 [6]もある。

人では、エストロン ( $E_1$ ) とエストラジオール-17 $\beta$  ( $E_2$ ) は胆汁中に23~68%、糞中に1~18%が排泄され、

エストリオール ( $E_3$ ) は胆汁中に17~42%、糞中に0~4%が排泄されると報告されている [7]。さらに、人では肝炎患時における高エストロゲン症候群の発症が報告されており [8]、肝機能障害は血中エストロゲン濃度に影響を与えることが知られている。

牛におけるエストロゲン代謝と肝機能との関係については、Onoら [9] が、4日間の絶食により軽度の脂肪肝を作出した結果、肝臓におけるステロイドホルモン代謝が低下し、 $E_2$ 濃度が末梢血中で有意に上昇し、肝門脈及び肝静脈血中においても増加する傾向であったことを報告している。また、筆者ら [10] は $E_2$ を基質として卵胞嚢腫牛の肝UGT活性を測定し、正常牛の値より有意に低値であったことを報告している。

以上のことから、乳牛の脂肪肝と卵巣機能の関係性を調べるための前段階として、本研究では胆汁中の非抱合型ステロイドホルモン濃度を測定し、胆汁へのステロイドホルモンの蓄積状況の指標として脂肪肝によるステロイドホルモン代謝への影響について検討した。

## 材料及び方法

材料は、北海道、東京都及び神奈川県においてと殺解体されたホルスタイン種雌乳牛128頭から肝臓、胆汁を

<sup>†</sup> 連絡責任者：大滝忠利 (日本大学生物資源科学部獣医臨床繁殖学研究室)

〒 252-0880 藤沢市亀井野 1866 ☎ 0466-84-3479 FAX 0466-84-3470

E-mail: ohtaki.tadatoshi@nihon-u.ac.jp

採取した。胆汁は、切除した胆嚢内から採取し、ステロイドホルモン測定まで $-20^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。脂肪肝の診断は、Tanemuraら [10] の方法に従い、肝臓組織を10% 燐酸緩衝ホルマリン液で固定し、HE、ズダンⅢ、ナイルブルー染色をし、肝実質に占める脂肪の割合から、10%未満を正常肝群、10%以上を脂肪肝とした。脂肪肝については、さらに、30%未満を軽度脂肪肝群、30%以上を重度脂肪肝群として区分した。胆汁中非抱合型エストロジェンの測定はTsumagariら [11] の報告に準じて、 $\text{E}_1$ 、 $\text{E}_2$ 及び $\text{E}_3$ をゲル濾過クロマトグラフィー (Sephadex LH-20<sup>®</sup>, GEヘルスケア・ジャパン(株), 東京) により分画した後にRIA法により測定した。非抱合型コルチゾールは牧野 [12] の方法に準じて直接RIA法により測定した。各ステロイドホルモンは $\text{E}_1$ -6CMO-BSA,  $\text{E}_2$ -6CMO-BSA,  $\text{E}_3$ -6CMO-BSA, コルチゾール-6CMO-BSAを抗原とした抗血清 (あすか製薬(株), 東京) を用いた。

また、正常肝群については、卵巣を肉眼的に黄体あり群 (直径20mm以上の黄体が存在) と黄体なし群に区分して評価を加えた。

3群の有意差の解析には統計解析ソフト (StatView 5.0, SAS Institute Japan (株), 東京) を用いて一元配置の分散分析の後、Tukey-Kramer検定を用いて分析した。正常肝群の黄体あり群と黄体なし群の2群の比較はStudentの*t*検定を行った。有意水準5%以下で有意差を判定した。

### 成 績

採取した128例の肝臓のうち、56例 (43.8%) が正常肝群、41例 (32.0%) が軽度脂肪肝群、31例 (24.2%) が重度脂肪肝群に分類された。

胆汁中 $\text{E}_1$ 濃度は正常肝群の $240 \pm 31 \text{ pg/ml}$ に比べ、軽度脂肪肝群では $660 \pm 156 \text{ pg/ml}$ 、重度脂肪肝群では $1,560 \pm 294 \text{ pg/ml}$ と有意に高い値を示した (それぞれ、 $P < 0.01$ ) (図1)。また、 $\text{E}_2$ 濃度は正常肝群の $60 \pm 9 \text{ pg/ml}$ に比べ、軽度脂肪肝群では $170 \pm 41 \text{ pg/ml}$ 、重度脂肪肝群では $230 \pm 58 \text{ pg/ml}$ と肝の脂肪化の進行に対し増加の傾向が認められ、正常肝群に比べ重度脂肪肝群が有意に高値を示した ( $P < 0.01$ ) (図2)。同様に、 $\text{E}_3$ 濃度においても正常肝群の $20 \pm 3 \text{ pg/ml}$ に比べ、軽度脂肪肝群では $30 \pm 3 \text{ pg/ml}$ 、重度脂肪肝群では $80 \pm 31 \text{ pg/ml}$ であり、正常肝群の $\text{E}_3$ 値に対し重度脂肪肝群では有意に高値を示した ( $P < 0.01$ ) (図3)。胆汁中コルチゾール濃度は、正常肝群の $12 \pm 1 \text{ ng/ml}$ に比べ、軽度脂肪肝群では $12 \pm 1 \text{ ng/ml}$ 、重度脂肪肝群では $24 \pm 7 \text{ ng/ml}$ であり、正常肝群に比べ重度脂肪肝群で有意に高値を示した ( $P < 0.01$ ) (図4)。

正常肝群56頭のうち、黄体あり群は32頭、黄体な

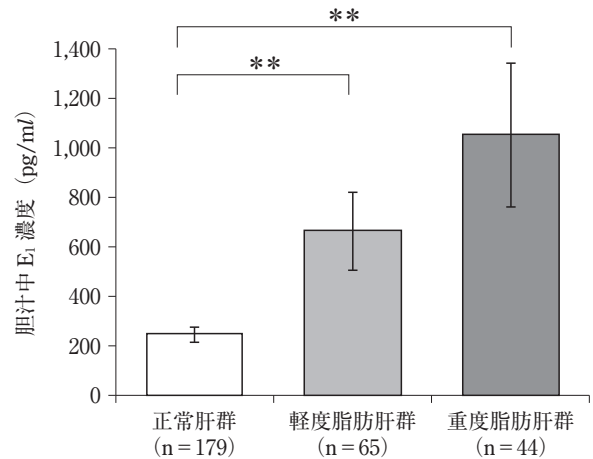


図1 正常肝牛と脂肪肝牛の胆汁中 $\text{E}_1$ 濃度の比較 (\*\* :  $P < 0.01$ )

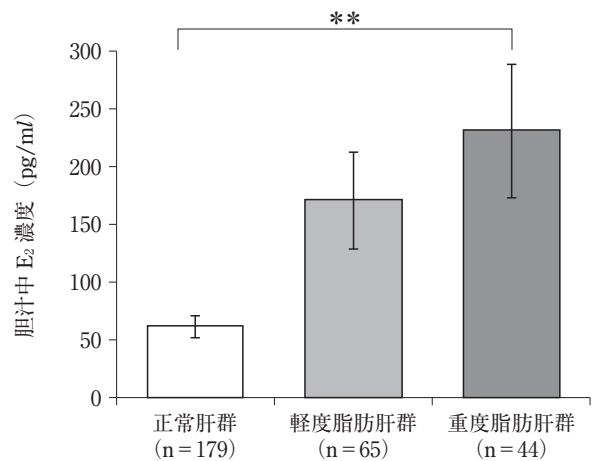


図2 正常肝牛と脂肪肝牛の胆汁中 $\text{E}_2$ 濃度の比較 (\*\* :  $P < 0.01$ )

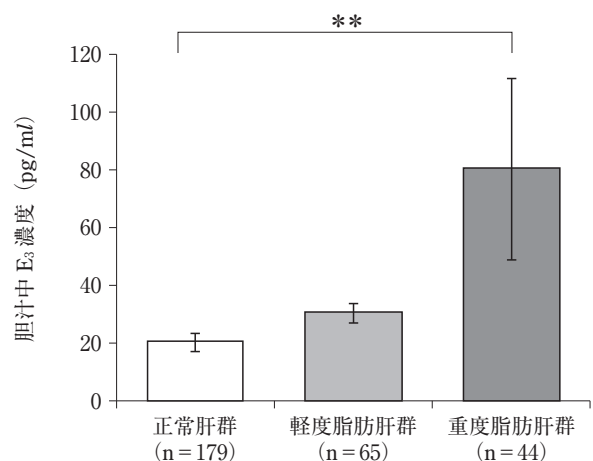


図3 正常肝牛と脂肪肝牛の胆汁中 $\text{E}_3$ 濃度の比較 (\*\* :  $P < 0.01$ )

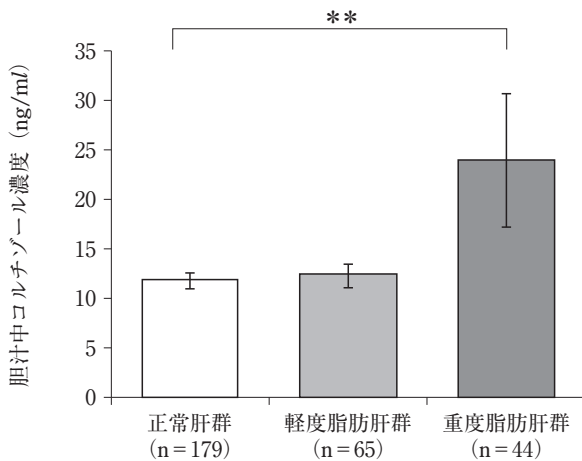


図4 正常肝牛と脂肪肝牛の胆汁中コルチゾール濃度の比較 (\*\*:  $P < 0.01$ )

し群は24頭であった。胆汁中 $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ 及びコルチゾール濃度は、黄体あり群では、それぞれ $191 \pm 30 \text{ pg/ml}$ ,  $51 \pm 8 \text{ pg/ml}$ ,  $10 \pm 1 \text{ pg/ml}$ 及び $11 \pm 1 \text{ ng/ml}$ であり、黄体なし群では、それぞれ $321 \pm 58 \text{ pg/ml}$ ,  $75 \pm 18 \text{ pg/ml}$ ,  $14 \pm 2 \text{ pg/ml}$ 及び $13 \pm 1 \text{ ng/ml}$ で両群間に有意な差は認められなかった。

## 考 察

武石ら [13] は、と畜検査により異常のみられない正常肝牛及び肝臓の半分もしくは全廃棄された重度肝障害牛の胆汁中の抱合型、非抱合型を合わせた全エストロジェン3分画について化学的分析法を用いて測定した結果、正常肝牛の $E_1$ 値が最も高値であったことを報告している。この結果は非抱合型のエストロジェン3分画を測定した本研究の結果でも一致した。武石ら [13] は肝障害牛における胆汁中の $E_2$ 及び $E_3$ が $E_1$ より高値であったとしているが、本研究では高い方から $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_3$ の順であった。この差異は測定法の違いによる抱合型の有無に由来すると考えられた。さらに、武石ら [13] は肝疾患牛の胆汁中全エストロジェン値が正常牛のそれより高いことを報告している。本研究においても重度脂肪肝牛 ( $\geq 30\%$ ) のエストロジェン3分画値が正常肝牛の3分画値と比較して有意 ( $P < 0.001$ ) に高値であった。また、重度脂肪肝群 ( $\geq 30\%$ ) の胆汁中コルチゾール値は、正常肝群及び軽度脂肪肝群よりも有意 ( $P < 0.01$ ) に高値を示し、エストロジェンと同様にコルチゾールの不活化能の低下が推察された。人では肝疾患における高エストロジェン症候群の発症 [8] や肝硬変患者のコルチゾールの肝抱合能が低下し [14]、慢性肝疾患患者のコルチコステロイド結合蛋白質が低下するために、血漿蛋白質非結合型コルチゾール値が増加することが報告されている [3] が、乳牛での報告は見当たらない。

牛にACTHを連続投与するとLHサージが抑制され

卵胞嚢腫を発症させることが知られており [15]、強いストレスにより分泌されるコルチゾールが卵胞嚢腫を発症させる可能性が指摘されている [16, 17]。本研究の重度脂肪肝において、胆汁中コルチゾール濃度が高値であったことから、これらの牛に卵胞嚢腫等の卵巣機能障害があった可能性が示唆され、今後の検討が必要である。

Wiltbankら [18] は高い乾物摂取量の泌乳牛は非泌乳牛に比べ、肝臓への血流量が多く、肝臓での $E_2$ 及びプロジェステロン代謝が約2.3倍高いことを報告している。また、Parrら [19] は末梢血中ステロイドホルモン濃度が、肝臓での代謝クリアランスの影響を大きく受けていること、卵巣摘出羊において、採食による腸から肝臓への血流量の変化が末梢血中プロジェステロン濃度の変化に直接影響することを報告している [20]。Onoら [9] は、絶食により作出した軽度脂肪肝牛において、肝機能低下と肝血流量の低下により、肝臓におけるステロイドホルモン代謝が低下し、 $E_2$ 濃度が末梢血中で有意に上昇し、肝門脈及び肝静脈血中においても増加する傾向であったことを報告している。一方、筆者ら [10] の研究においても、正常発情周期牛に比べ、卵胞嚢腫牛のUGT活性が有意に低く、肝機能低下を伴う卵胞嚢腫牛は、肝機能低下を伴わないものに比べ活性が有意に低いことを報告している。このことから、肝臓でのステロイドホルモンの代謝には、採食による肝臓への血流量の影響と肝臓における代謝酵素の活性が大きく関係していることが考えられる。本研究においても脂肪肝による食欲低下の結果として、肝血流量が低下していたこと、肝機能低下による肝UGT活性の低下により、胆汁中非抱合型ステロイドホルモン濃度が上昇したものと推察された。

以上のことから、乳牛の脂肪肝の程度が胆汁中ステロイドホルモン濃度に影響することが確認できた。また、脂肪肝は血中ステロイドホルモン濃度及び繁殖機能に影響を及ぼす可能性が示唆されたため、今後の詳細な検討が必要である。

## 引用文献

- [1] 本庄英雄：エストロゲン代謝と腸肝循環，日本臨床，37，1186-1192 (1979)
- [2] Honour JW：Biliary excretion and enterohepatic circulation, Biochemistry of steroid hormones, 2nd ed, Makin, HLJ ed, 383-404, Blackwell Scientific publications, Oxford (1984)
- [3] McCann VJ, Fulton TT：Cortisol metabolism in chronic liver disease, J Clin Endocr Metab, 40, 1038-1044 (1975)
- [4] You L：Steroid hormone biotransformation and xenobiotic induction of hepatic steroid metabolizing enzymes, ChemBiol Interact, 147, 233-246 (2004)

- [5] Norin KE, Persson AK, Saxerholt H, Midtvedt T : Establishment of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in germfree mice and their influence on some microflora-associated characteristics, *Appl Environ Microbiol*, 57, 1850-1852 (1991)
- [6] 竹内 亨, 堤 治 : 13.1 エストロゲン, ホルモンの辞典, 清野 裕, 千原和夫, 名和田 新, 平田結喜緒編, 497-508, 朝倉書店, 東京 (2004)
- [7] Adlercreutz H, Martin F, Järvenpää P, Fotsis T : Steroid absorption and enteroheptic recycling, *Contraception*, 20, 201-223 (1979)
- [8] Barr RW, Sommers SC : Endocrine abnormalities accompanying hepatic cirrhosis and hepatoma, *J Clin Endocr Metab*, 17, 1017-1029 (1957)
- [9] Ono M, Ohtaki T, Tanemura K, Ishii M, Watanabe G, Taya K, Tsumagari S : Effect of short-term fasting on hepatic steroid hormone metabolism in cows, *J Vet Med Sci*, 73, 1145-1150 (2011)
- [10] Tanemura K, Ohtaki T, Kuwahara Y, Tsumagari S : Association between liver failure and hepatic UDP-glucuronosyltransferase activity in dairy cows with follicular cysts, *J Vet Med Sci*, 79, 86-91 (2017)
- [11] Tsumagari S, Kamata K, Takagi K, Tanemura K, Yosai A, Takeishi M : Aromatase activity and oestrogen concentrations in bovine cotyledons and caruncles during gestation and parturition, *J Reprod Fertil*, 98, 631-636 (1993)
- [12] 牧野拓雄 : 性ステロイドホルモンの radioimmunoassay, *日内分泌誌*, 49, 629-645 (1973)
- [13] 武石昌敬, 永井 亨, 八反田盛近, 原田豊造, 常包 正 : 乳牛の卵胞嚢腫に関する研究 -5- 症例別による胆汁中のエストロジェンの排泄, *獣医畜産新報*, 658, 279-281 (1976)
- [14] Zumoff B, Bradlow HL, Gallagher TF, Hellman L : Cortisol metabolism in cirrhosis, *J Clin Invest* 46, 1735-1743 (1967)
- [15] Dobson H, Ribadu AY, Noble KM, Tebble JE, Ward WR : Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle, *J Reprod Fertil*, 120, 405-410 (2000)
- [16] Bosu WTK, Peter AT : Evidence for a role of intrauterine infections in the pathogenesis of cystic ovaries in postpartum dairy cows, *Theriogenology*, 28, 725-736 (1987)
- [17] Stoebel DP, Moberg GP : Effect of adrenocorticotropin and cortisol on luteinizing hormone surge and estrous behavior of cows, *J Dairy Sci*, 65, 1016-1024 (1982)
- [18] Wiltbank M, Lopez H, Sartori R, Sangsritavong S, Gümen A : Changes in reproductive physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism, *Theriogenology*, 65, 17-29 (2006)
- [19] Parr RA, Davis IF, Miles MA, Squires TJ : Feed intake affects metabolic clearance rate of progesterone in sheep, *Res Vet Sci*, 55, 306-310 (1993)
- [20] Parr RA, Davis IF, Miles MA, Squires TJ : Liver blood flow and metabolic clearance rate of progesterone in sheep, *Res Vet Sci*, 55, 311-316 (1993)

---

## Relationship Between Fatty Liver Syndrome in Dairy Cows and Steroid Hormone Concentration in Bile

Kouichi TANEMURA, Tadatoshi OHTAKI<sup>†</sup> and Shigehisa TSUMAGARI

\* College of Bioresource Sciences, Nihon University, 1866 Kameino, Fujisawa, 252-0880, Japan

### SUMMARY

In order to gain indirect insight into steroid hormone metabolism in the liver of dairy cattle with fatty liver syndrome, the concentration of estrogen and cortisol in the bile was measured from cattle with a fatty liver and cattle with a normal liver. Livers and bile were taken from 128 slaughtered Holstein dairy cows. Animals with less than a 10% deposit of fat in the liver were categorized as the normal liver group (n = 56), those with at least 10% but less than 30% were categorized as the mild fatty liver group (n = 41), and those with 30% or more were categorized as the severe fatty liver group (n = 31). Comparison of the normal liver group and fatty liver groups indicated that the values for the three estrogen fractions in the bile showed the highest concentrations in the severe fatty liver group, and that the concentrations were the lowest in the normal liver group. The severe fatty liver group showed high values for cortisol in the bile. The present study confirmed that the steroid hormone concentration in the bile was affected by the severity of fatty liver syndrome in dairy cows.

— Key words : bile, fatty liver, steroid hormone.

<sup>†</sup> Correspondence to : Tadatoshi OHTAKI (College of Bioresource Sciences, Nihon University)

1866 Kameino, Fujisawa, 252-0880, Japan

TEL 0466-84-3479 FAX 0466-84-3470 E-mail : ohtaki.tadatoshi@nihon-u.ac.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 655 ~ 658 (2017)