

ガスクロマトグラフィー質量分析による発育不良黒毛和種牛 における尿の代謝プロファイル解析

北川 均^{1)†} 鬼頭克也¹⁾ 大場恵典¹⁾ 河島孝典²⁾ 高橋 均³⁾
吉田 真⁴⁾ 張 春花⁵⁾ 松本 勇⁵⁾

- 1) 岐阜大学農学部 (〒501-1193 岐阜市柳戸1-1)
- 2) 岐阜県郡上広域連合家畜診療所 (〒501-4222 郡上郡八幡町2115)
- 3) 岐阜県飛騨農業共済組合家畜診療所 (〒506-0052 高山市上岡本島谷130-1)
- 4) 岐阜県東濃農業共済事務組合家畜診療所 (〒508-0202 恵那郡福岡町下野293-3)
- 5) ミルスインターナショナル(有) (〒921-8154 金沢市高尾南1-107-2)

(2002年9月30日受付・2003年4月8日受理)

要 約

代謝異常を検出する目的でガスクロマトグラフィー/質量分析計による尿の代謝産物解析を、発育不良の黒毛和種牛に応用した。正常牛18頭の尿には、有機酸、アミノ酸、糖質、核酸塩基などが検出され、さらにグリシン抱合体などを認めた。発育不良牛1頭において、オロット酸が多量に検出されたため、この牛をオロット酸尿症と診断した。尿細管形成不全の牛3頭では、正常牛と比較して馬尿酸、スベリン酸およびフェノール類化合物の排泄増加を認めたが、全般的なアミノ酸類の濃度は低い傾向にあった。他の発育不良牛14頭では、馬尿酸が多量に検出され、プロピオニルグリシンが少ない傾向にあった。また有機酸(4-ヒドロキシフェニル酢酸、メチルクエン酸、*cis*-アコニット酸、グリコール酸)およびアミノ酸(グリシン、ピログルタミン酸、アラニン)が少ない傾向にあった。

—キーワード: ガスクロマトグラフィー/マススペクトロメトリー, 発育不良, 黒毛和種, 尿代謝プロファイル。

日獣会誌 56, 445~449 (2003)

和牛における発育不良は、地域および種雄牛によって異なるが、経済的に大きな問題となっている。発育不良牛は、下痢などの消化器症状や発咳、膿性鼻汁および呼吸困難などの肺炎症状を示し、多くの場合はこれら消耗性の症状が発育不良の原因と考えられている。しかし、これらの症状の真の原因は不明の場合が多い。これまでに和牛では、尿細管形成不全 [10]、軟骨形成不全 [7]、甲状腺機能低下 [16] などが発育不良の原因として報告されているが、これらの疾患の背後に潜む代謝異常は不明である。

ガスクロマトグラフィー質量分析計 (GC/MS) は、尿および血液の微量成分について定性と定量の同時分析が可能であり、生体液の分析に応用すると数多くの疾患が検索でき、ヒトではすでに化学診断法として多くの先天性代謝異常、糖尿病などの検査に用いられている [1, 3, 4, 17]。この研究では、GC/MSによる尿の代謝産物プロファイル解析を発育不良の黒毛和種牛に応用した。

材料および方法

試験牛として、体格(体重および体高)が日本飼養標準 [9] 記載の同月齢の黒毛和種より明らかに劣る発育不良の黒毛和種牛(発育不良群)15頭と、遺伝子診断 [11] によりパラセリン-1/クローディン-16欠損と診断され発育不良を示す3頭(尿細管形成不全群)を用いた。対照群として、発育が正常で臨床的に異常を認めない3~15カ月齢の黒毛和種牛18頭を用いた。試験牛の概要を表1に示す。

尿は自然排泄尿を採取し、遠心分離(2000rpm, 15分)後、上清を検査時まで-30℃で凍結保存した。試料調整として、100μlの尿に30単位のウレアーゼを添加し、37℃で15分間インキュベートして尿中の尿素を除去した。内部標準物質としてn-ヘプタデカン酸20μgを加え、0.9mlの無水エタノールを加え、遠心分離して除タンパクし、上層を減圧下に濃縮乾涸した後、N, O-

† 連絡責任者: 北川 均 (岐阜大学農学部獣医学科家畜内科学教室)

〒501-1193 岐阜市柳戸1-1 ☎058-293-2950 FAX 058-293-2964

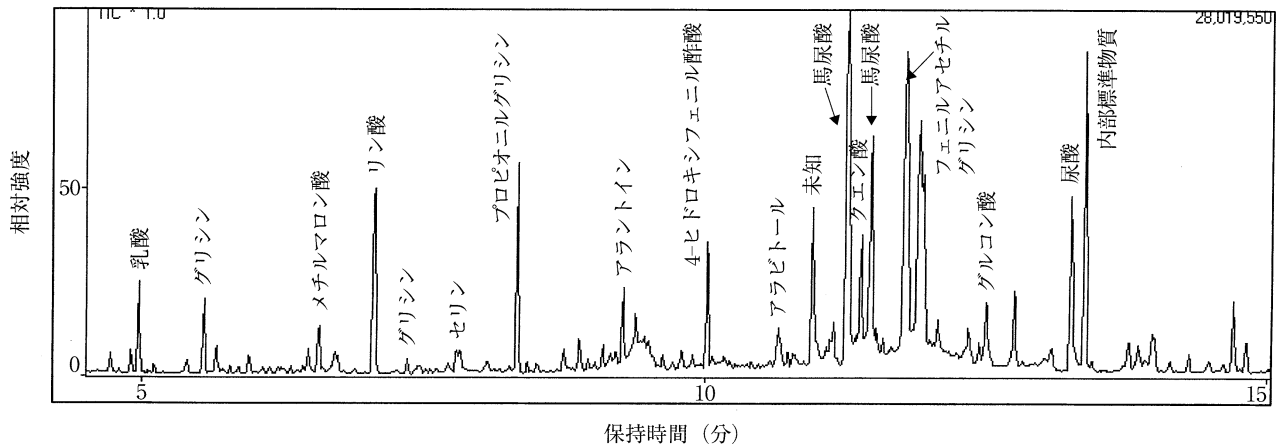


図1 正常牛 (No. 5141) の尿中代謝産物の全イオンクロマトグラム

表1 発育不良群と尿細管形成不全群の概要

| 群 | 牛番号 | 性 | 月齢 | 父牛名号 | 臨床所見 |
|---------|------|-----|------|--------|-------------|
| 発育不良 | 5154 | 雄 | 7 | FSO | 特記所見なし |
| | 5163 | 雄 | 4 | FSO | 肺炎, 下痢 |
| | 5173 | 雌 | 3 | FSO | 特記所見なし |
| | 5174 | 雌 | 4 | FSO | 特記所見なし |
| | 4898 | 雄 | 7 | MHO | 胃腸炎 |
| | 4899 | 雌 | 5.5 | MHO | 特記所見なし |
| | 5126 | 雌 | 4.5 | MHO | 肺炎, 貧血 |
| | 5124 | 雄 | 3 | HSK | 発咳 |
| | 5127 | 去勢雄 | 14.5 | HSK | 貧血 |
| | 5134 | 雌 | 10 | HSK | 特記所見なし |
| | 5125 | 雌 | 4 | MHF | 下痢 |
| | 5089 | 雄 | 4 | MHF | 下痢, オロット酸尿症 |
| | 5100 | 雄 | 11 | YIH | 肺炎 |
| | 5150 | 雌 | 6 | MJR | 特記所見なし |
| 5175 | 雄 | 8 | RDO | 特記所見なし | |
| 尿細管形成不全 | 5088 | 雄 | 6 | HSK | 腎不全, 発育不良 |
| | 5171 | 雌 | 11 | HSK | 腎不全, 発育不良 |
| | 4890 | 雌 | 15 | MF | 腎不全, 発育不良 |

父牛の名号は略記名で示す。

ビストリメチルシリルトリフオオアセタミン100 μ lとトリメチルクロロシラン10 μ lを加え, 90 $^{\circ}$ C 40分加熱し, トリメチルシリル誘導体化した。

GC/MS分析^{a)}は以下のように行った。カラムはUltra Alloy plus-5と金属キャピラリーカラム (30m \times 0.25mm, i. d., 0.25 μ m)を用い, キャリアーガスとしてヘリウムガスを用いた。試料は2 μ lを30:1スプリットモードで自動注入し, 60 $^{\circ}$ Cから325 $^{\circ}$ Cまで毎分17 $^{\circ}$ Cで昇温分析した。マススペクトルは電子衝撃法によりスキャンモードで測定した。各スペクトルはミス

生命科学研究所のデータベースと標準品のピークを参照して同定した。各群の差の検定には多重比較検定 (post-hoc test) を用い, $P < 0.05$ を有意差ありとした。

成 績

正常牛の尿中代謝産物の全イオンクロマトグラムの1例を図1に示す。検出された各物質の濃度を, 尿中クレアチニン濃度を基準とした相対濃度で表2に示す。正常牛の尿には, 有機酸, フェノール類化合物, アミノ酸, 糖質, 核酸塩基が多数検出された。また, 健常ヒトでは検出されない成分であるグリシン抱合体や未知のピークが認められた。

発育不良牛群15頭のうち1頭において, オロット酸の著しい排泄増加を認めた (No. 5089, 図2)。この牛では, 尿へのオロット酸排泄増加の原因となりうる他の異常を認めなかったため, オロット酸尿症と診断した。

他の発育不良牛 (図3, 表2) では, 馬尿酸が多量に検出され, プロピオニルグリシンが少ない傾向にあった。個体差は認められたが, 発育不良牛において正常牛より減少していた物質は, 有機酸ではメチルグアノ酸, 2-デオキシテトロ酸, *cis*-アコニット酸, グリコール酸であった。アミノ酸では, グリシン, ピログルタミン酸, アラニンおよびスレオニンであった。

尿細管形成不全群 (表2) では, 馬尿酸, 2-ヒドロキシ馬尿酸とスベリン酸濃度が高く, フェノール類化合物 (カテコール, メチルカテコール) も増加していた。アミノ酸類は, 全体的に濃度が低い傾向にあった。グリシン抱合体では, フェニルアセチルグリシンと4-ケトンペンタニルグリシンは増加していたが, プロピオニルグリシンは減少傾向にあった。

考 察

正常発育の黒毛和種牛の尿には, グリシンの排泄がヒトよりも多く, 健常ヒトでは検出されないグリシン抱合

a) GC/MS QP5050, 株式会社島津製作所, 京都。

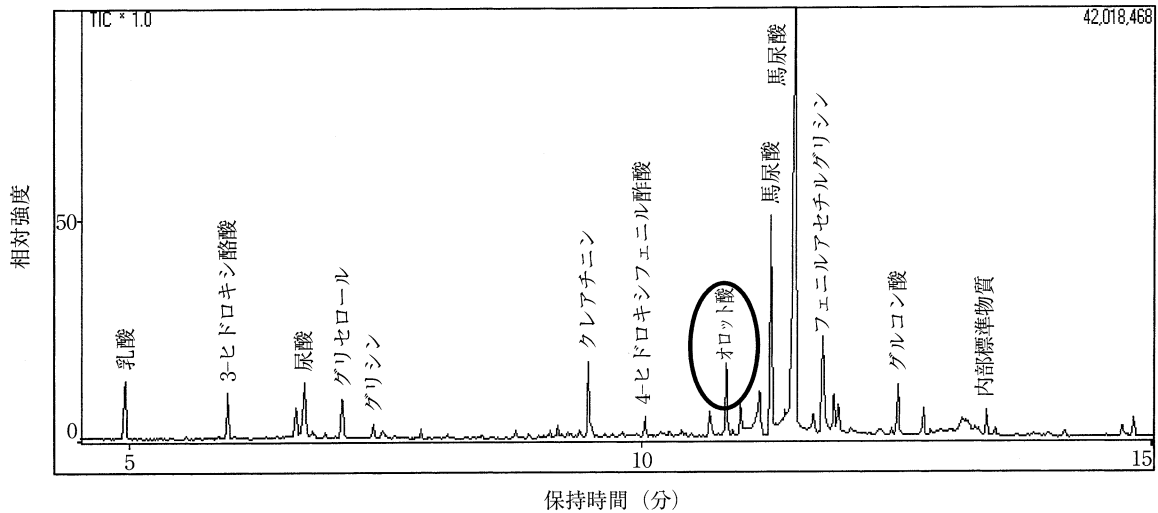


図2 オロト酸尿症牛 (No. 5089) の尿中代謝産物の全イオンクロマトグラム. 明瞭なオロト酸のピーク (○印) が認められる.

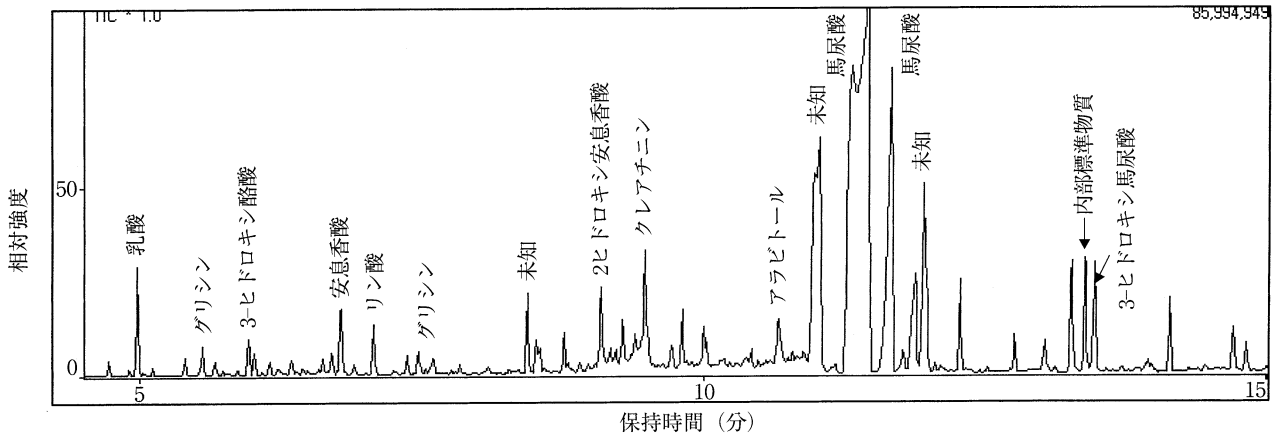


図3 発育不良牛 (No. 4898) の尿中代謝産物の全イオンクロマトグラム.
この発育不良牛では馬尿酸が多く検出されたが、プロピオニルグリシンやイソバレリルグリシンが検出されなかった.

体が検出され、尿の代謝産物プロフィールにグリシン抱合反応が強く反映されていることが明らかとなった。反芻動物の血漿アミノ酸はグリシンが多いとされている [5]。尿へのグリシンおよびグリシン代謝化合物の排泄増加は、ウシにおいて種々の代謝および解毒反応にグリシン抱合が多用されており、その結果として正常ヒトでは尿に排泄されないグリシン抱合体が排泄されると考えられた。また、反芻動物では、馬尿酸が尿中に多量に排泄されることはすでに報告されている [5]。馬尿酸は安息香酸とグリシンの抱合体であり、植物体リグニン由来のフェノール類の代謝産物であることが示唆されている [6]。ウシの食性が、多量の馬尿酸排泄と関係すると考えられた。

オロト酸尿症は、ピリミジン代謝に関わる酵素である uridine monophosphate synthase の欠損 (DUMPS) として知られ、ヒトでは他にいくつかの遺伝子異常が関わりとされている [15]。ウシの DUMPS は、常染色体性劣性の遺伝性疾患であり、ホルスタイン種において報告がある [12, 13]。ホルスタイン種のオロト酸尿症

(DUMPS) では、異常遺伝子をホモで持つ個体は胎児死となるが、ヘテロである個体は、臨床的には異常が認められず、むしろ産乳能力が優れている [12, 13]。今回の黒毛和種の症例では、発育不良の他に小球性貧血、下痢を認めたが、他の臨床的異常は認められなかった。

発育不良牛では、正常牛よりも馬尿酸が尿中に多く検出された。前記のように馬尿酸は安息香酸のグリシン抱合体であり、その尿への排泄量はグリシンの解毒作用を反映する。発育不良牛では、何らかの原因で芳香族アミノ酸のフェニルアラニンとチロシンの代謝過程に生成される安息香酸が蓄積し、これがグリシンと抱合し、馬尿酸として大量に尿中に排泄されたと考える。いっぽう、発育不良牛において低濃度の傾向にあったプロピオニルグリシンは、分枝鎖アミノ酸のパリン、ロイシン、イソロイシンの代謝過程で生成されるプロピオニル CoA のグリシン抱合体である [8]。発育不良牛では、なぜ安息香酸のグリシン抱合が強く、プロピオニル CoA のグリシン抱合が弱いのかという理由については不明である

表2 主要な検出物質の濃度

| 区分 | 物質名 | 正常群(n=18) | 発育不良群(n=14) | 正常との | 尿細管形成不全群(n=3) | 正常との | 発育不良と |
|-----------|----------------|-------------|-------------|-------------|---------------|--------|---------|
| | | 平均値±標準偏差 | 平均値±標準偏差 | 差 (P値) | 平均値±標準偏差 | 差 (P値) | の差 (P値) |
| 有機酸 | 馬尿酸 | 7.65±6.52 | 34.5±64.7 | <0.1 | 67.8±43.5 | <0.01 | <0.05 |
| | 乳酸 | 2.50±3.73 | 0.808±0.941 | NS | 0.717±0.869 | NS | NS |
| | 3-OH馬尿酸 | 0.909±1.65 | 0.585±1.10 | NS | 2.70±2.18 | NS | NS |
| | クエン酸 | 0.717±0.859 | 0.290±0.494 | NS | 0.356±0.300 | NS | NS |
| | リンゴ酸 | 0.190±0.410 | 0.029±0.068 | NS | 0.157±0.263 | NS | NS |
| | 3-OH酪酸 | 0.177±0.363 | 0.171±0.260 | NS | 0.064±0.083 | NS | NS |
| | 3-OHプロピオン酸 | 0.096±0.130 | 0.189±0.267 | NS | 0.254±0.266 | NS | NS |
| | フェニル酢酸 | 0.092±0.167 | 0.036±0.066 | NS | 0.022±0.025 | NS | NS |
| | メチルクエン酸 | 0.088±0.112 | 0.018±0.023 | <0.05 | 0.022±0.025 | NS | NS |
| | 2-デオキシテトロ酸 | 0.081±0.057 | 0.048±0.037 | <0.1 | 0.042±0.039 | NS | NS |
| | フマル酸 | 0.079±0.164 | 0.022±0.039 | NS | 0.149±0.242 | NS | NS |
| | cis-アコニット酸 | 0.078±0.069 | 0.030±0.021 | <0.05 | 0.038±0.047 | NS | NS |
| | 2-OH馬尿酸 | 0.075±0.169 | 0.507±1.09 | NS | 1.748±2.512 | <0.01 | <0.05 |
| | グリセリン酸 | 0.064±0.055 | 0.055±0.055 | NS | 0.036±0.033 | NS | NS |
| | グリコール酸 | 0.040±0.037 | 0.012±0.008 | <0.01 | 0.016±0.016 | NS | NS |
| スバリン酸 | 0.015±0.015 | 0.024±0.034 | NS | 0.069±0.047 | <0.01 | <0.05 | |
| フェノール類化合物 | 2-OH安息香酸 | 0.055±0.120 | 0.647±1.11 | <0.05 | 0.794±1.19 | NS | NS |
| | カテコール | 0.034±0.026 | 0.066±0.072 | NS | 0.518±0.547 | <0.01 | <0.01 |
| | メチルカテコール | 0.016±0.020 | 0.019±0.020 | NS | 0.148±0.183 | <0.01 | <0.01 |
| | 安息香酸 | 0.617±1.19 | 0.357±0.640 | NS | 0.848±1.32 | NS | NS |
| | クレソール | 0.263±0.263 | 0.260±0.324 | NS | 0.770±0.910 | <0.05 | <0.05 |
| アミノ酸 | グリシン | 4.62±4.55 | 1.45±1.88 | <0.05 | 1.16±1.77 | NS | NS |
| | ピログルタミン酸 | 1.76±1.40 | 0.720±0.537 | <0.05 | 0.533±0.070 | NS | NS |
| | アラニン | 1.44±1.34 | 0.579±0.644 | <0.05 | 0.257±0.297 | NS | NS |
| | セリン | 0.633±0.598 | 0.419±0.451 | NS | 0.106±0.112 | NS | NS |
| | スレオニン | 0.227±0.332 | 0.064±0.056 | <0.1 | 0.023±0.012 | NS | NS |
| | バリン | 0.167±0.174 | 0.079±0.107 | NS | 0.024±0.014 | NS | NS |
| | ロイシン | 0.132±0.264 | 0.053±0.083 | NS | 0.013±0.005 | NS | NS |
| | プロリン | 0.080±0.051 | 0.104±0.207 | NS | 0.023±0.021 | NS | NS |
| フェニルアラニン | 0.080±0.184 | 0.022±0.025 | NS | 0.013±0.007 | NS | NS | |
| 糖質 | グルコース | 1.81±3.26 | 1.55±2.90 | NS | 0.449±0.380 | NS | NS |
| | アラビトール | 0.805±0.447 | 0.612±0.309 | NS | 0.332±0.354 | <0.1 | NS |
| | エリスリトール | 0.608±0.268 | 0.411±0.227 | <0.05 | 0.296±0.229 | <0.1 | NS |
| | キシロース | 0.124±0.139 | 0.070±0.115 | NS | 0.035±0.018 | NS | NS |
| | ミオイノシトール | 0.023±0.027 | 0.083±0.151 | <0.1 | 0.010±0.011 | NS | NS |
| 核酸塩基 | 尿酸 | 2.12±1.62 | 1.96±1.51 | NS | 1.63±1.88 | NS | NS |
| | アラントイン | 0.906±0.810 | 0.366±0.232 | <0.05 | 0.398±0.260 | NS | NS |
| | キシリン酸 | 0.476±0.243 | 0.843±1.248 | NS | 1.13±1.01 | NS | NS |
| | ウラシル | 0.093±0.107 | 0.041±0.027 | 0.1 | 0.020±0.010 | NS | NS |
| | オロト酸 | 0.024±0.017 | 0.019±0.018 | NS | 0.017±0.019 | NS | NS |
| グリシン抱合体 | フェニルアセチルグリシン | 8.27±8.20 | 12.3±18.7 | NS | 23.2±14.1 | <0.1 | NS |
| | プロピオニルグリシン | 2.93±4.90 | 0.167±0.278 | <0.05 | 0.036±0.026 | <0.1 | NS |
| | 4-ケトンペンタニルグリシン | 1.00±1.31 | 3.49±4.98 | NS | 18.4±14.4 | <0.01 | <0.01 |
| | イソバレリルグリシン | 0.597±1.06 | 0.245±0.298 | NS | 0.449±0.274 | NS | NS |
| | 3-メチルクロトニルグリシン | 0.043±0.055 | 0.022±0.039 | NS | 0.012±0.013 | NS | NS |

各物質の濃度は尿中クレアチニン濃度を1.000とした相対濃度で示す。オロト酸尿症の牛は発育不良牛群のデータに含まれない、NS：有意差なし、OH：ヒドロキシ。

が、この原因として、1) 安息香酸の貯留、2) プロピオニルCoAの生成不足、3) グリシン不足などが考えられる。また、グリシンの合成過程、プロピオニルCoAの生成過程においてビタミンB6が補酵素として作用している [2] ので、発育不良牛の一部にビタミンB6欠乏が

存在する可能性も考えられる。いっぽう、発育不良群におけるアラントインの低下については統計的に有意差は認められたが臨床的意味は不明であった。

尿細管形成不全牛では、尿中のフェノール類 (2-ヒドロキシ安息香酸、カテコール、メチルカテコール) の排泄

が増加していた。尿中フェノール類の排泄増加は、人の慢性腎不全患者でも認められる所見であり [14]、腎機能低下に伴う所見である可能性がある。フェノール類は毒性が高く、貧血の原因あるいは尿毒症物質の一つと考えられている [14]。尿中へのフェノール類化合物の排泄増加は、身体におけるフェノール類化合物の増加を示唆し、これらは造血や細胞増殖の過程に影響を及ぼすことが考えられ、尿細管形成不全牛において普遍的に見られる貧血や発育不良の原因の一つとなることが示唆された。しかし、スベリン酸の増加については意義が不明であった。

発育不良の黒毛和種牛を用いて尿の代謝プロファイルを検討したところ、グリシン抱合の変化、ピリミジン代謝異常（オロト酸尿症）、フェノール類化合物の排泄増加を確認した。発育不良、虚弱あるいは奇形のウシにGC/MSを応用し、代謝異常を明らかにすることを通じて、さらに多くの疾患を検出できる可能性がある。また、直接的な原因は特定できなくても、「原因不明」の疾患を解明するための手がかりを得られる可能性がある。ウシにおいても発育不良牛あるいは虚弱牛を対象にした代謝異常検出システムをつくり、異常の早期検出と的確な対応をすることは、経済的損失を防ぐためにも重要であると考えられる。

引用文献

- [1] 久原とみ子：臨床検査，44，57-67（2000）
 [2] 古泉 巖，鈴木嘉彦：獣医生化学，67-86，大木与志雄他編，文永堂出版，東京（1995）
 [3] 松本 勇：臨床化学診断学，3-14，松本他監，ソフトサイエンス社，東京（1995）
 [4] 松本 勇，張 春花：臨床検査，44，27-35（2000）
 [5] 松本光人：反芻動物の栄養生理学，211-219，小原嘉昭編，農文協，東京（1998）
 [6] Mayes RW, Dove H, Chen XB, Guada JA : Recent developments in the nutrition of herbivores. Proceedings of the IVth International Symposium on the Nutrition of Herbivores, 381-406, INRA Editions, Paris (1995)
 [7] 森友靖生，石橋武彦，芦沢広三，芝田 猛：日獣会誌，42，173-177（1989）
 [8] 日本生化学会：代謝マップ 一経路と調節一，東京化学同人，東京（1987）
 [9] 農林水産省農林水産技術会議事務局：日本飼養標準・肉用牛（2000年版），中央畜産会，東京（2000）
 [10] Ohba Y, Kitagawa H, Okura Y, Kitoh K, Sasaki Y : Vet Rec 149, 115-118 (2001)
 [11] Ohba Y, Kitagawa H, Kitch K, Sasaki Y, Takami M, Shinkai Y, Kunieda T : Genomics, 68, 229-236 (2000)
 [12] Robinson JL, Drabik MR, Dombrowski DB, Clark JH : Proc Natl Acad Sci USA, 80, 321-323 (1983)
 [13] Shanks RD, Greiner MM : J Dairy Sci, 75, 2023-2029 (1992)
 [14] Wardle EN, Wilkinson K : Clin. Nephrol, 6, 361-364 (1976)
 [15] Webster DR, Becroft DMO, Suttle DP : The metabolic and molecular bases of inherited disease. Scriber CR, et al eds, 7th ed, 1799-1837, McGraw-Hill Inc, New York (1995)
 [16] 矢口直安，山科 淳，伴顕，星昌 孝，酒井淳一，渡辺大作，曳沼 徹，大室賢二：家畜診療，382，15-21（1995）
 [17] 張 春花，松本 勇，久原とみ子：金医大誌，21，399-410（1996）

Urinary Metabolic Profiles of Growth-retarded Japanese Black Cattle by Gas Chromatography/Mass Spectrometry Analysis

Hitoshi KITAGAWA*†, Katsuya KITOH, Yasunori OHBA, Takanori KAWASHIMA, Hitoshi TAKAHASHI, Makoto YOSHIDA, Chunhua ZHANG and Isamu MATSUMOTO

* Faculty of Agriculture, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan

SUMMARY

To detect metabolic abnormalities, we performed gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) on growth-retarded Japanese Black cattle. Many organic acids, amino acids, sugars, nucleic-acid bases, and glycine conjugates were detected in urine from 18 normal, cattle. Increased excretion of orotic acid was observed in one growth-retarded calf. In 3 calves with renal tubular dysplasia, concentrations of hippurate, suberate, and phenols tended to be higher and concentrations of propionylglycine lower than in normal calves. In 14 other growth-retarded calves, concentration of hippurate was higher and concentration of propionylglycine tended to be lower than in normal calves. Concentrations of organic acids (4-hydroxyphenylacetate, methylcitrate, *cis*-aconite, and glycolate) and amino acids tended to be lower. — Key words : gas chromatography/mass spectrometry, growth retardation, Japanese black cattle, urinary metabolic profile.

† Correspondence to : Hitoshi KITAGAWA (Faculty of Agriculture, Gifu University)

1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan TEL 058-293-2950 FAX 058-293-2964

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 56, 445 ~ 449 (2003)