

令和元年6月19日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07981

研究課題名(和文)グリセロールによる第一胃機能の異なる反芻家畜のエネルギー・窒素代謝の制御

研究課題名(英文) Regulation of energy and nitrogen metabolism by glycerol in ruminants with different ruminal functions

研究代表者

佐野 宏明 (SANO, Hiroaki)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：20196306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：グリセロールが有するエネルギーと反芻家畜の第一胃における特徴的な代謝経路に注目し、第一胃機能確立前後のウシとヒツジを用い、グリセロール添加時の第一胃発酵性状および糖・アミノ酸代謝動態を測定した。暑熱暴露の影響についても検討した。給与飼料中のグリセロール添加割合が高い場合(7%)、ヒツジの第一胃発酵が変化し、動物に悪影響を及ぼすことなく血液グルコース代謝を更新することが示された。しかし、グリセロール添加割合が低い場合(2-5%)、グリセロール添加効果は明確ではなかった。また、第一胃発酵機能の発達に伴って血液グルコース代謝動態は明らかに低下する一方、アミノ酸代謝の変化は限定的であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

第一胃機能の発達段階の異なる反芻家畜におけるグリセロールのエネルギー・N代謝制御に関する詳細な基礎的知見が得られ、反芻家畜用の新規飼料開発に技術的に貢献できる。

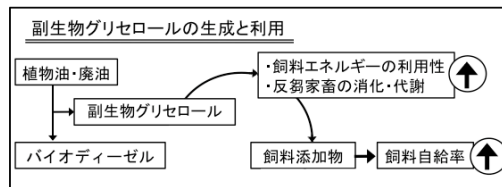
研究成果の概要(英文)：Focusing on energy possessed in glycerol and its characteristic pathway in the rumen of ruminants, the effects of supplemental glycerol on rumen fermentation characteristics and blood glucose and amino acid metabolism were measured in cows and sheep both before and after establishment of rumen functions. Effect of heat exposure was also determined in mature sheep. Rumen fermentation characteristics were influenced and blood glucose metabolism were enhanced when the higher level of glycerol supplementation (7%). However, the impacts were limited, when lower levels of glycerol were supplemented (2-5%).

研究分野：家畜栄養生理学

キーワード：グリセロール 第一胃発酵 グルコース代謝 アミノ酸代謝 反芻家畜 暑熱暴露

1. 研究開始当初の背景

反芻家畜は第一胃(ルーメン)という特異な消化・吸収器官を有し、飼料炭水化物はルーメン発酵により揮発性脂肪酸 (VFA) に変換され、ルーメンから吸収されて、宿主である反芻家畜の主要なエネルギー源として利用される。そのため、グルコースは下部消化管からほとんど吸収されず、必要なグルコースはプロピオン酸などからの糖新生によってまかなわれている。また、飼料タンパク質の大部分は、一旦ルーメン内微生物によってアンモニアまで分解された後、微生物態タンパク質が合成される。微生物態タンパク質は下部消化管で消化・吸収され、反芻家畜の主要なアミノ酸供給源となる。このように、反芻家畜における炭水化物・タンパク質の消化・吸収過程はルーメン発酵と関連して単胃動物よりも複雑である。



我が国の肉牛・酪農経営では飼料費が生産コストの約45%を占め、安価かつ安定的な飼料の供給は経営を左右する極めて重大な課題である。しかし、我が国の飼料自給率はわずか26%にすぎず、輸入飼料に依存した状況が続いており、飼料自給率向上は喫緊の課題である。政府は平成32年度までに飼料自給率を38%まで引き上げることを目標としている（平成24年度食料・農林・農村基本計画）。未活用資源の有効利用（エコフィード）は、飼料イネの利用促進、大規模飼料栽培・供給体制の組織化とともに、この目標を達成するための大きな柱にあげられている。また、東日本大震災後のエネルギー供給状況の変化から国産バイオ燃料の利用が推進されている。植物油や廃油から生成されるバイオディーゼルは、未活用資源の有効利用、安定的供給の観点から有望視されており、再資源化にあたって飼料化は優先的に実施すべき事項とされている（食品リサイクル法）。バイオディーゼル生成の際にグリセロールが副生物として生じ、その量は原材料の約10%にも達する。一部はボイラー燃料、堆肥発酵促進剤、工業用洗浄剤などに利用されているものの、大部分は産業廃棄物として処理されている。副生物グリセロールを飼料添加物として有効利用できれば、国産バイオ燃料残さの有効利用、飼料コストの削減、飼料自給率の向上につながる(上図参照)。しかしながら、反芻家畜用飼料への副生物グリセロールの添加効果に焦点を当てた研究報告はごくわずかであり、in vivoにおける栄養素代謝に及ぼすグリセロール添加効果に関する研究結果は、これまでに報告されていない。

我が国の肉牛・酪農経営では飼料費が生産コストの約45%を占め、安価かつ安定的な飼料の供給は経営を左右する極めて重大な課題である。しかし、我が国の飼料自給率はわずか26%にすぎず、輸入飼料に依存した状況が続いており、飼料自給率向上は喫緊の課題である。政府は平成32年度までに飼料自給率を38%まで引き上げることを目標としている（平成24年度食料・農林・農村基本計画）。未活用資源の有効利用（エコフィード）は、飼料イネの利用促進、大規模飼料栽培・供給体制の組織化とともに、この目標を達成するための大きな柱にあげられている。また、東日本大震災後のエネルギー供給状況の変化から国産バイオ燃料の利用が推進されている。植物油や廃油から生成されるバイオディーゼルは、未活用資源の有効利用、安定的供給の観点から有望視されており、再資源化にあたって飼料化は優先的に実施すべき事項とされている（食品リサイクル法）。バイオディーゼル生成の際にグリセロールが副生物として生じ、その量は原材料の約10%にも達する。一部はボイラー燃料、堆肥発酵促進剤、工業用洗浄剤などに利用されているものの、大部分は産業廃棄物として処理されている。副生物グリセロールを飼料添加物として有効利用できれば、国産バイオ燃料残さの有効利用、飼料コストの削減、飼料自給率の向上につながる(上図参照)。しかしながら、反芻家畜用飼料への副生物グリセロールの添加効果に焦点を当てた研究報告はごくわずかであり、in vivoにおける栄養素代謝に及ぼすグリセロール添加効果に関する研究結果は、これまでに報告されていない。

2. 研究の目的

バイオディーゼル生成の過程で生じる副生物グリセロールが有するエネルギーとその特徴的な代謝経路に注目し、反芻家畜の飼料原料として有効利用するため、第一胃機能確立前後のウシとヒツジを用い、グリセロール添加時の第一胃発酵性状、飼料エネルギーの利用性、グルコースおよびタンパク質（アミノ酸）の代謝動態を測定する。これにより、第一胃機能の発達段階が異なる反芻家畜におけるエネルギー・窒素（N）代謝に及ぼすグリセロール添加の影響を解明し、副生物グリセロールの有効利用のための基礎的知見を得ようとした。

近年、家畜生産現場において地球温暖化による夏の猛暑が問題となっている。家畜は生産のため多くのエネルギーを必要とするが、暑熱ストレスを受けると食欲が減退し、エネルギー不足の状態となり、病気や生産性の低下を引き起こす。この不足したエネルギーを補うため、暑熱環境下において糖の前駆物質となる添加物の給与は効果的であると考えられる。反芻家畜においてグリセロールはグルコースの前駆物質となることが知られており、暑熱環境下におけるグリセロールの代替給与技術も開発されている。しかし、暑熱環境下における血液グルコース代謝動態に及ぼすグリセロール添加の効果はこれまで解明されていない。そこで本研究では、この点を明らかにするため実験4として暑熱暴露ヒツジの第一胃発酵性状および血液グルコース代謝動態に及ぼすグリセロール添加の影響についても検討した。

3. 研究の方法

実験1：人工第一胃法による第一胃発酵性状に及ぼすグリセロール添加の用量反応

本実験はサンプリング途中で、重要な測定機器（メタン濃度測定のためのガスクロマトグラフィー）が修理不能の故障し、廃棄処分になったため、実験1は中止した。（代わりに当初計画になかった実験4を加えた。）

実験2：第一胃機能の発達段階の異なるウシにおける第一胃発酵性状、エネルギーおよび窒素代謝に及ぼすグリセロール添加の影響

(1) 実験動物および飼料区

動物実験は平成28年7～9月および平成29年10～11月に本学附属御明神牧場で実施した。実験にはホルスタイン種雄子牛（1ヶ月齢、平均体重47kg）4頭、去勢育成牛（9ヶ月齢、平均体重227kg）5頭を供試した。それぞれ、グリセロール添加の有無によるの2飼料

区を設定し、1期2週間のクロスオーバー法にしたがいサンプリングを実施した。子牛の実験では離乳直後のため濃厚飼料主体の飼料とし、育成牛では粗飼料主体（粗濃比2:1）の飼料とした。飼料へのグリセロール添加量は給与飼料重量の2%とした。2週目に第一胃発酵性状および血漿グルコース・アミノ酸代謝動態を測定した。

(2) 実験方法

第一胃発酵性状として pH、VFA、アンモニア濃度を測定した。血漿グルコース・アミノ酸代謝動態は、子牛では血漿グルコース、Phe、Tyr の代謝回転速度は同位元素希釈法（[U-¹³C]グルコース、[²H₅]Phe、[²H₄]Phe、[²H₂]Tyr）の同位元素希釈法の primed-continuous infusion 法を用いて同時に測定した。育成牛では血漿グルコース代謝回転速度に加え、血漿ロイシン(Leu)代謝回転速度を測定した。

血漿グルコース代謝回転速度は血漿からグルコースを単離して誘導体化し、ガスクロマトグラフィー質量分析装置(GC/MS、QP-2010、島津製作所製)を用いた選択イオン検出(SIM)分析で得られる[U-¹³C]グルコースの同位体比から算出した(Tsermg と Calhan 1983)。血漿グルコース濃度は酵素法(Huggett と Nixon 1957)により測定した。血漿 Phe、Tyr、Leu 代謝回転速度および濃度はグルコース分析と同時に血漿からアミノ酸を単離して誘導体化し、GC/MS の SIM 分析により得られる[²H₅]Phe、[²H₂]Tyr、[1-¹³C]Leu、Phe、Tyr、Leu のピーク面積比および同位体比から算出した(Calder と Smith 1988)。

実験3：第一胃機能の発達段階の異なるヒツジにおける第一胃発酵性状、エネルギーおよび窒素代謝に及ぼすグリセロール添加の影響

(1) 実験動物および飼料区

動物実験は平成29年10～11月と平成30年7～8月に実施した。それぞれ3ヶ月令サフォーク種雌ヒツジ4頭（平均体重19.7kg）、去勢雑種成ヒツジ4頭（7才、平均体重50kg）を用い、実験2と同様にグリセロール添加の有無による粗飼料主体の2飼料区を設定し、1期2週間のクロスオーバー法にしたがってサンプリングを実施した。飼料へのグリセロール添加量はそれぞれ給与飼料の2.5、5%とした。

(2) 実験方法

2週目に実験2の測定項目に加え、メタン放出量およびエネルギー消化率を測定した。メタン放出量は開放型ガス交換法により、メタン分析計(VA-3001、堀場製作所製)を用いて24時間にわたり連続的に測定した。エネルギー消化率はボンブカロリメーターを用いて飼料および糞の総エネルギーを測定して算出した。

実験4：ヒツジにおけるルーメン発酵性状および血漿グルコース代謝に及ぼすグリセロール添加および暑熱暴露の影響

(1) 実験動物および実験区

動物実験は平成30年8～9月に実施した。サフォーク種雌成ヒツジ4頭（平均体重47kg）を供試し、グリセロール添加（飼料重量の7%）の有無による2飼料区を設定し、1期24日間のクロスオーバー法に従ってサンプリングを実施した。14日間の飼料馴致期間を経た後、常温環境（20℃）で5日間、暑熱環境（28～30℃）で5日間、実験を実施した。

(2) 実験方法

試験期間に一般生理反応（呼吸数、心拍数、直腸温）、乾物消化率、第一胃発酵性状（pH、VFA、アンモニア濃度）および血漿グルコース代謝回転速度を測定した。血漿グルコース代謝回転速度の測定は[U-¹³C]グルコースを用いた primed-continuous infusion 法を用いた。

4. 研究成果

実験2

子牛において第一胃内酢酸およびプロピオン酸濃度は採食開始2時間後に増加し(P < 0.05)、4時間後に最高値よりも低下した(P < 0.05) (図1A)。総VFA、酪酸濃度は採食開始2時間後に増加し(P < 0.05)、また、pHは採食開始2時間後に低下した(P < 0.05)。育成牛では採食開始に伴い、ほぼ同様の変化が認められたが、総VFAおよび酢酸濃度は有意な上昇ではなく、アンモニア濃度は採食開始4時間後に低下した(P < 0.05)。血漿グルコース、フェニルアラニン、チロシン、ロイシン代謝回転速度および濃度は子牛、育成牛ともにグリセロール添加効果は認められなかった(表1、2)。子牛の血漿グルコース代謝回転速度は育成牛よりも高いことが示唆された。

以上の結果より、本実験で用いたグリセロール添加量では牛の成長段階に関わりなく第一胃発酵性状、血漿グルコースおよびアミノ酸代謝に影響を及ぼさないことが示唆された。

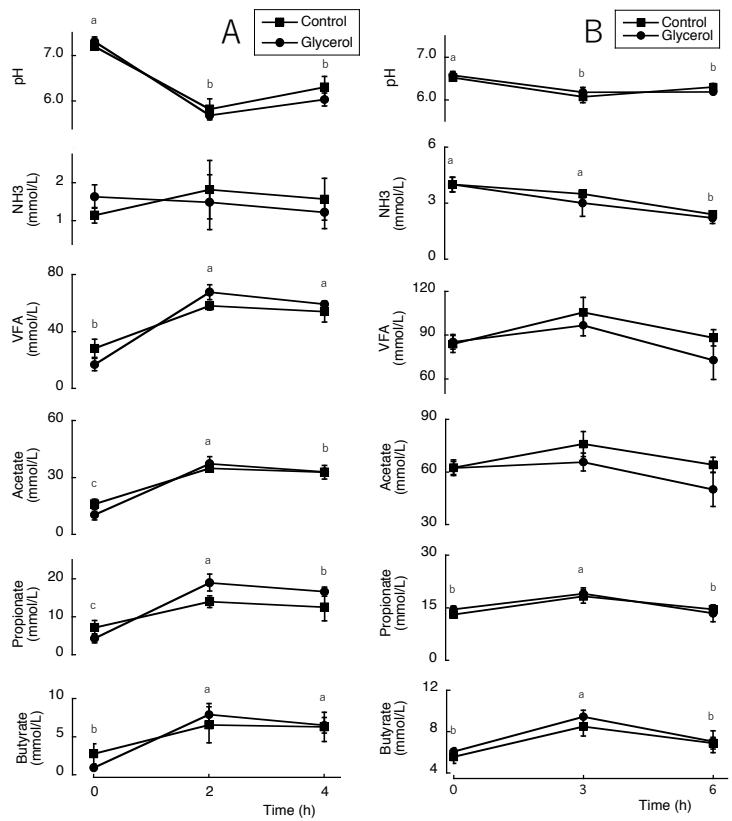


図1. 子牛(A)および育成牛(B)における第一胃発酵性状に及ぼすグリセロール添加の影響
a, b: 異符号間に有意差あり (P<0.05)

表1. 子牛における血液グルコースおよびフェニルアラニン、チロシン代謝動態に及ぼすグリセロール添加の影響

	対照区	グリセロール区	SEM	P値
グルコース濃度 (mmol/L)	4.7	5.1	0.2	0.32
グルコース代謝回転速度 (mmol/MBS/h)	4.2	4.3	0.6	0.29
フェニルアラニン濃度 (μ mol/L)	59	58	4	0.60
チロシン濃度 (μ mol/L)	64	55	5	0.68
フェニルアラニン代謝回転速度 (μ mol/MBS/h)	320	371	34	0.22
チロシン代謝回転速度 (μ mol/MBS/h)	314	420	44	0.53

MBS: 代謝体重

表2. 育成牛における血液グルコースおよびロイシン代謝動態に及ぼすグリセロール添加の影響

	対照区	グリセロール区	SEM	P値
グルコース濃度 (mmol/L)	3.9	3.9	0.1	0.84
グルコース代謝回転速度 (mmol/MBS/h)	2.0	2.2	0.1	0.21
ロイシン濃度 (μ mol/L)	220	231	7	0.96
ロイシン代謝回転速度 (μ mol/MBS/h)	395	508	29	0.11

実験3

子ヒツジでは、第一胃内酢酸、プロピオン酸、酪酸濃度は採食開始2時間後に増加し(P<0.05)、pHは採食開始2時間後に低下した(P<0.05) (図2)。エネルギー消化率およびメタン放出量はグリセロール添加の影響は認められなかった(表3)。子ヒツジにおいて血漿グルコース、フェニルアラニン、チロシン代謝回転速度はグリセロール添加による影響は認められなかった(表4)。成ヒツジにおいても血漿グルコース、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン代謝回転速度はグリセロール添加による影響は認められなかった(表5)。子ヒツジと成ヒツジを比較すると、血漿グルコース代謝回転速度は子ヒツジが成ヒツジよりも高く、血漿アミノ酸代謝回転速度は類似した値であった。

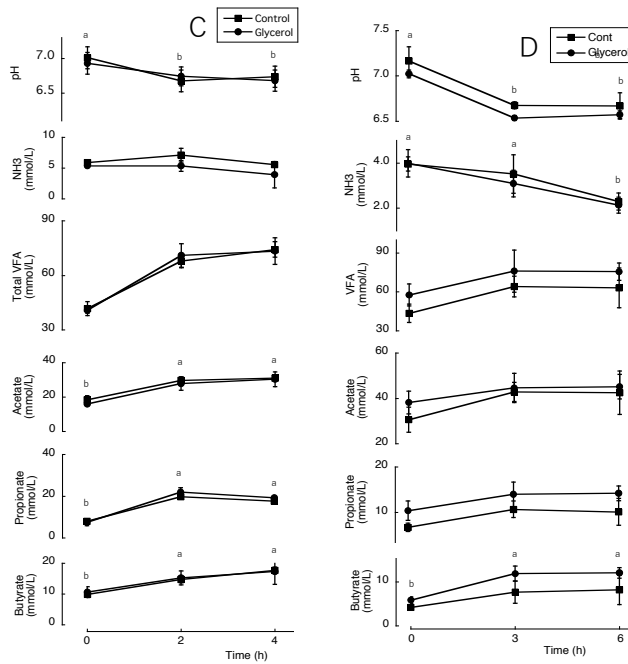


図2. 子ヒツジ(C)および成ヒツジ(D)における第一胃発酵性状に及ぼすグリセロール添加の影響
a, b : 異符号間に有意差あり (P<0.05)

表3. 子ヒツジにおけるエネルギー消化率およびメタン放出量に及ぼすグリセロール添加の影響

	対照区	グリセロール区	SEM	P値
エネルギー消化率 (%)	78	80	2	0.50
メタン放出量(L/MBS/d)	1.51	1.54	0.02	0.96

MBS: 代謝体重

表4. 子ヒツジにおける血液グルコースおよびアミノ酸代謝動態に及ぼすグリセロール添加の影響

	対照区	グリセロール区	SEM	P値
グルコース代謝回転速度 (mmol/MBS/h)	2.0	2.0	0.1	0.59
フェニルアラニン濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	55	42	2	0.18
フェニルアラニン代謝回転速度 ($\mu\text{mol/MBS/h}$)	81	105	7	0.43
チロシン濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	105	108	6	0.83
チロシン代謝回転速度 ($\mu\text{mol/MBS/h}$)	111	144	13	0.69

MBS: 代謝体重

表5. 成ヒツジにおける血液グルコースおよびアミノ酸代謝動態に及ぼすグリセロール添加の影響

	対照区	グリセロール区	SEM	P値
グルコース (mmol/L)	3.9	3.9	0.1	0.58
グルコース代謝回転速度 (mmol/MBS/h)	0.92	1.02	0.04	0.27
ロイシン濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	55	52	4	0.52
ロイシン代謝回転速度 ($\mu\text{mol/MBS/h}$)	254	263	15	0.75
フェニルアラニン濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	35	35	0.1	0.70
フェニルアラニン代謝回転速度 ($\mu\text{mol/MBS/h}$)	76	76	3	0.75
チロシン濃度 ($\mu\text{mol/L}$)	46	45	1	0.75
チロシン代謝回転速度 ($\mu\text{mol/MBS/h}$)	124	114	14	0.75

MBS: 代謝体重

実験4

呼吸数は暑熱区で高かったが(P<0.05)、体温、心拍数は常温区との間に差が認められなかった。第一胃内総VFA、酢酸、プロピオン酸、酪酸濃度は採食開始1.5時間後に上昇し(P<0.05)、プロピオン酸濃度はグリセロール添加区が対照区よりも高かった(P<0.05) (図3)。血漿NEFA濃度はグリセロール添加区で低く(P<0.01)、暑熱暴露によっても低下したが(P<0.05)、交互作用は有意ではなかった(表6)。同位元素希釈法実験時において血漿グルコース濃度は経時的にほと

んど変化せず、血漿グルコース代謝回転速度はグリセロール添加区で高く(P<0.01)、常温区と暑熱区の間には差は認められなかった。

以上の結果より、グリセロール7%添加給与では第一胃内でグリセロールからプロピオン酸が生成、吸収され、糖新生によってグルコースに変換されるため血漿グルコース代謝が亢進すること、また血漿グルコース代謝の亢進は暑熱環境でも同様に起こることが示唆された。

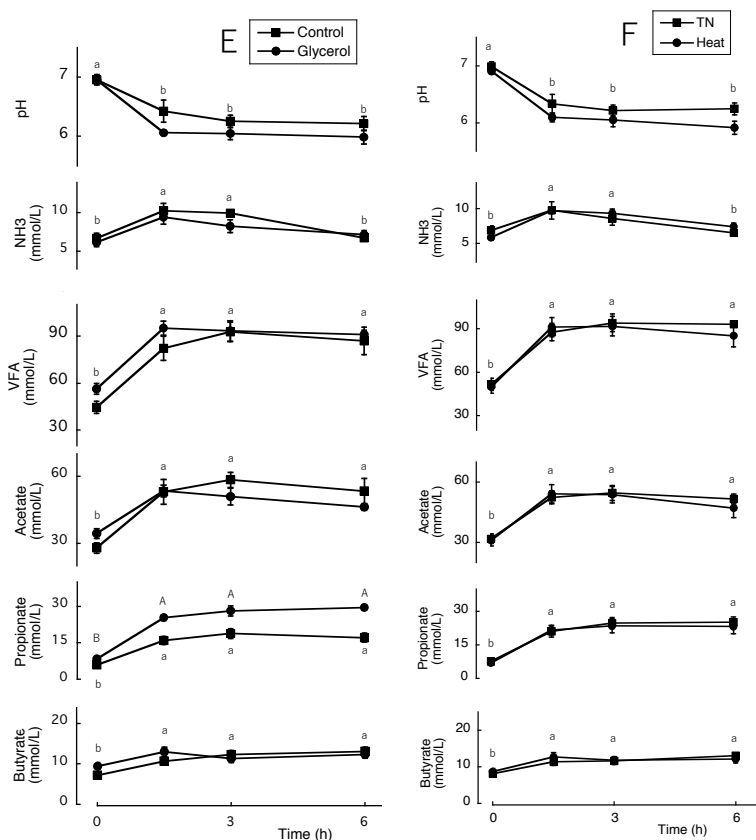


図3. ヒツジにおける第一胃発酵性状に及ぼすグリセロール添加(E)および暑熱暴露(F)の影響

a, b; A, B : 異符号間に有意差あり (P<0.05)

表6. ヒツジにおける血漿成分および血漿グルコース代謝回転速度に及ぼすグリセロール添加および暑熱暴露の影響

	対照区		グリセロール区		SEM	P値		
	常温	暑熱	常温	暑熱		飼料	環境	飼料X環境
NEFA (μ Eq/L)	146	64	61	53	14	<0.01	0.03	0.08
BUN (mg/dL)	19.0	18.4	17.5	18	0.5	0.29	0.96	0.51
BHBA (μ mol/L)	488	499	468	542	16	0.51	0.13	0.15
グルコース (mmol/L)	4.2	4.4	4.2	4.4	0.04	0.15	0.19	0.79
グルコース代謝回転速度 (mmol/MBS/h)	1.98	1.83	2.44	2.33	0.1	<0.01	0.19	0.62

MRS: 代謝体重

結論

給与飼料中グリセロール添加割合が7%の場合、ヒツジの第一胃発酵性状が変化し、動物に悪影響を及ぼすことなく血液グルコース代謝を更新することが示された。これに対し、グリセロール添加割合が2~5%の場合、グリセロールの効果は明確ではなかった。一方、子ウシおよび子ヒツジの第一胃発酵機能の発達に伴って血漿グルコース代謝動態は低下が顕著である一方、血漿アミノ酸代謝動態の変化は限定的であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

- 小椋千早、相川 亮、五位淵弘樹、原田裕大、吉武可那子、佐野宏明 (2019) 成長段階の異なるヒツジにおける第一胃発酵性状および血漿グルコース・アミノ酸代謝に及ぼすグリセロール添加の影響 第126回日本畜産学会大会 2019. 9. (岩手大学)
- 小椋千早、佐野宏明、相川 亮、五位淵弘樹、原田裕大 (2018) ヒツジにおける第一胃発酵性状および血漿栄養素代謝に及ぼすグリセロール添加の影響 東北畜産学会報 68(2) : 27. 2018. 8. (秋田市)