

平成30年 6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15024

研究課題名(和文)フォアグラを廃鶏につくらせる-ニワトリにおける肝臓中脂質代謝改変-

研究課題名(英文) Production of fatty liver in culled layer-chicken-manipulation of hepatic lipid metabolism in chicken

研究代表者

松井 徹 (Matsui, Tohru)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号：40181680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリで偶発的に発生する脂肪肝(白肝)は珍重されている。廃鶏に対する栄養制御による脂肪肝生産を検討した。メチオニン・コリン制限は肝臓中脂肪含量および血漿中メチオニン・コリン濃度に影響しなかったことから、廃鶏のメチオニン・コリン要求量は低く、制限飼料ではメチオニン・コリンは不足しないことが示唆された。高フルクトース飼料は肝臓中脂肪含量に影響を及ぼさなかった。一方、肝臓中マンニトール濃度が上昇したことから、消化管細菌によってフルクトースから産生されたマンニトールが肝臓で蓄積したことが示唆された。廃鶏の肝臓では著しい炎症が認められたので、ビタミンE添加を行ったが炎症は改善されなかった。

研究成果の概要(英文)：Fatty liver is incidentally induced in chicken, which is much-prized delicacy. We investigated the effect of nutritional manipulation on lipid content in the liver of culled layer-chicken.

Low methionine and low choline diet did not affect free methionine and choline concentrations in plasma, and hepatic lipid content, suggesting that the low methionine and low choline diet did not induce methionine and choline shortage in culled layer-chicken. High fructose diet did not affect hepatic lipid content. However, this diet increased mannitol content in the liver, suggesting that intestinal microbes produce mannitol from fructose and the absorbed mannitol accumulates in the liver. Because severe inflammation is frequently observed in the liver, we also investigated the effect of vitamin E supplementation on the induction of hepatic inflammation. However, vitamin E supplementation did not affect hepatic inflammation.

研究分野：動物栄養学

キーワード：ニワトリ 脂肪肝 メチオニン コリン フルクトース ビタミンE

1. 研究開始当初の背景

廃鶏の肉は、硬く正肉利用には適さないため、加工食品の安価な原料になっている。ガチョウなどの高度脂肪肝はフォアグラとして食されている。ニワトリにおいても偶発的に発生する脂肪肝を「白肝」として珍重している。肝臓で生合成された脂肪酸は、脂肪組織から動員され、肝臓に取り込まれた脂肪酸とともに、トリアシルグリセロールを形成する。トリアシルグリセロールはホスファチジルコリンと超低密度リポタンパク質を形成し、肝臓外へ放出され、脂肪組織などに運ばれる。家畜や家禽ではコリンはビタミンであると考えられており、飼料添加物として利用されている。ホスファチジルコリンを構成するコリン源としては、飼料由来のコリンならびにメチオニンのメチル基転移により体内で産生されるコリンがある。コリン欠乏飼料を給与した成鶏では、典型的な脂肪肝を発症しない(Ruiz et al., 1983)。これは、メチオニンからの体内合成によりコリンが充足したためと考えられている。一方、実験動物では、コリンとメチオニン含量が低い飼料を給与すると、脂肪肝が発生する(Macfarlane et al., 2011)。この場合は、コリンの摂取不足に加え、体内でコリン合成に用いられるメチオニン不足によってコリン欠乏が生じ、コリン欠乏を介した超低密度リポタンパク質の形成不全によって、肝臓からのトリアシルグリセロール放出が低減するためであると考えられている。

脂肪酸合成の主な基質はグルコースである。哺乳動物にグルコースを多給すると、グルコースが中枢内に流入するため採食抑制が生じる。一方、フルクトースは脳血管閉門を通過しにくいので採食抑制が生じにくい。肝臓において、フルクトースはグルコースよりも速やかに脂肪酸合成に用いられる。その結果、フルクトース多給により脂肪酸合成が増加し、血漿中トリアシルグリセロール濃度は増加する。ニワトリでは肝臓が脂肪酸合成の主要な部位であり、フルクトース多給により、ニワトリでも採食抑制を生じず、肝臓での脂肪酸合成が増える可能性がある。しかし、ニワトリがフルクトースをエネルギー源として利用できることを示した論文は一報(Griminger & Fisher, 1963)あるのみであり、ニワトリにおけるフルクトース代謝に関する詳細な研究は皆無である。高脂肪飼料を給与した産卵鶏で脂肪肝が発生することが報告されているが(Martin-Castillo et al., 2010)、3ヶ月間にわたる長期の給与が必要である。

2. 研究の目的

本課題では、成長抑制を考慮する必要がない廃鶏に対して短期間の栄養制御を行い、栄養制御が肝臓における脂質代謝に及ぼす影響を解明し、肝臓でのトリアシルグリセロール産生を増加させる、または、産生されたト

リアシルグリセロールを肝臓内に封じ込め、体脂肪を増加させることなく効率的に短期間でフォアグラに匹敵する高度脂肪肝を生産させる技術開発を目的とした。

3. 研究の方法

1) メチオニンとコリン制限の影響

肝臓で合成されたトリアシルグリセロールの肝臓外への輸送を抑制するため、メチオニンとコリンの摂取制限を試みた。民間の採卵鶏農場から導入した24羽の白色レグホン種の廃鶏を3群(n = 8)に割り当て、トウモロコシ、コーンスターチ、フスマを主体とし、メチオニン以外の必須アミノ酸、コリンを除くビタミンとミネラルが充足しているCP4%の基礎飼料(メチオニン含量とコリン含量がそれぞれ0.16%と18.7 mg/100 g)、基礎飼料のコーンスターチの一部をコーングルテンミールで代替して、メチオニン含量とコリン含量がそれぞれ0.22%と18.7 mg/100 g、0.28%と21.0 mg/100 gとした飼料を5週間にわたり給与した。給与試験終了時に、採血を行うとともに、腹腔内脂肪と肝臓を採取した。腹腔内脂肪重量と肝臓重量、肝臓中総脂質含量、コレステロール含量ならびにトリアシルグリセロール含量を測定した。加えて、肝臓試料をホルマリン固定の後に、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織学的検討を行った。血液は血漿とし、トリアシルグリセロール濃度、総コレステロール濃度、遊離脂肪酸濃度、遊離コリン濃度および遊離メチオニン濃度を測定した。

2) フルクトース給与の影響

フルクトースを給与することによる、肝臓での脂質代謝改変を介したトリアシルグリセロール蓄積の増加を試みた。民間の採卵鶏農場から導入した18羽の白色レグホン種の廃鶏を3群(n = 6)に割り当て、トウモロコシ、コーンスターチ、大豆粕が主体であり、ビタミンとミネラルが充足している基礎飼料(フルクトース無添加)、コーンスターチの10%および20%をフルクトースで代替した飼料を3週間給与した。給与試験終了時に、採血を行うとともに、腹腔内脂肪と肝臓を採取した。腹腔内脂肪重量、肝臓重量、肝臓中総脂質含量、コレステロール含量ならびにトリアシルグリセロール含量を測定した。また、肝臓サンプルをメトキシム-トリメチルシリル誘導体化した後にガスクロマトグラフ-質量分析計を用いた網羅的半定量分析によって、親水性低分子代謝物質濃度の変化を検討するとともに、脂肪酸合成に関連する脂肪酸合成酵素とアセチル CoA カルボキシラーゼ、肝臓からのトリアシルグリセロール輸送に関連するアポリポタンパク質Bとミクロソームトリアシルグリセロール輸送タンパク質サブユニット、脂肪酸燃焼に関連するカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1の遺伝子発現を定量 RT-PCR によって測定した。

血液は血漿とし、トリアシルグリセロール濃度、総コレステロール濃度、遊離脂肪酸濃度を測定した。

後述するように、廃鶏の肝臓には多くの炎症像が認められたため、飼料にビタミンEを要求量の2倍の60 mg/kg添加する群(n = 6)も設け、同時に飼育した。肝臓試料をホルマリン固定の後に、薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、組織学的検討を行った。また、血液は血漿とし、肝逸脱酵素であるアラニンアミノトランスフェラーゼ活性、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性、 γ -グルタミルトランスペプチダーゼ活性を測定した。併せて、肝臓中の炎症関連遺伝子であるニワトリ TNF、インターロイキン-1、誘導型一酸化窒素合成酵素、ニワトリインターフェロン発現を定量 RT-PCR によって測定した。

4. 研究成果

1) メチオニンとコリン制限の影響

どの群においても試験期間中に体重は減少したが、体重変化に用量反応は認められなかった。したがって、この体重減少はメチオニンならびにコリン不足によるものではないと考えられた。肝臓重量、肝臓中総脂質含量、コレステロール含量ならびにトリアシルグリセロール含量は各群間で差が認められなかった。腹腔内脂肪重量にも各群間で差は認められなかった。血漿中トリアシルグリセロール濃度、総コレステロール濃度、遊離脂肪酸濃度にも差は認められなかった。また、どの群の個体の肝臓でも脂肪滴など脂肪肝を示す組織像は認められなかった。これらの結果から、本試験で用いたメチオニンおよびコリン制限では、トリアシルグリセロールを肝臓内に封じ込め、肝臓中トリアシルグリセロール含量を増加させることができないことが明らかになった。

血漿中遊離コリン濃度および遊離メチオニン濃度はすべての群間で有意な差は認められなかったことから、メチオニンとコリン摂取制限にもかかわらず、コリン不足は生じていなかったことが示唆された。日本飼養標準 - 家禽 (2011) においては大雛のメチオニンおよびコリン要求量が最も低く、それぞれ、0.19%、50 mg/100 g であり、本試験のメチオニンとコリン制限飼料はこれらの含量を大きく下回っていた。以上の結果から、廃鶏のメチオニン及びコリンの要求量は著しく低く、本試験で用いた飼料のメチオニンおよびコリン含量では、コリン欠乏は生じなかったことが示された。

各群で肝臓の門脈域や実質域に散在性の巣状壊死がある個体が多く認められた。産卵鶏においては肝臓における炎症として脂肪肝出血症候群が知られているが、本試験では肝臓での出血傾向および脂肪肝は認められていないので典型的な脂肪肝出血症候群ではないことは明らかである。本試験で認めら

れた肝臓での炎症の原因は明らかではないが、産卵期に発生した肝臓における炎症が、5 週間にわたる試験では回復していないことが示唆され、廃鶏の肝臓の利用に際しては、大きな問題となる。そこで、なんらかの処置によって肝臓での炎症を治癒することが望まれる。

2) フルクトース給与の影響

フルクトース給与は飼料摂取量に影響を及ぼさなかった。一方、フルクトース給与量の増加に伴って用量依存的に体重は低下した。この結果から、フルクトース過剰は飼料の利用性を抑制することが示された。加えて、フルクトース給与は腹腔内脂肪重量に影響を及ぼさなかったことから、体タンパク質量を減少させることが示唆された。

フルクトース給与は肝臓重量、肝臓中総脂質含量、トリアシルグリセロール含量ならびにコレステロール含量にも影響を及ぼさなかった。また、血漿中トリアシルグリセロール濃度、コレステロール濃度、遊離脂肪酸濃度にも差は認められなかった。これらの結果から、フルクトース給与は脂質代謝に影響を及ぼさない可能性が示された。脂肪酸合成酵素の遺伝子発現はフルクトース給与量の増加に伴い低下傾向を示したが、アセチル CoA カルボキシラーゼ、アポリポタンパク質 B、ミクロソームトリアシルグリセロール輸送タンパク質サブユニット、カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ1など脂質代謝に関連する遺伝子発現は変化しなかった。ラットではフルクトース多給により脂肪酸合成酵素発現が増加することが報告されている (Song et al., 2012)。したがって、フルクトース多給に対する脂肪酸合成酵素発現の応答性には種差があり、これが、ラットではフルクトース多給によって肝臓中脂肪含量が高まるが、廃鶏では肝臓中脂肪含量が増加しなかった原因であることが示唆された。

網羅的半定量分析によって、肝臓中で 79 種の親水性低分子代謝物質が同定された。この 79 種の中でフルクトース給与により変化した親水性低分子代謝物質は、マンニトール、ガラクトキノール、 γ -アラニンおよび尿酸であり、肝臓中マンニトール濃度、ガラクトキノール濃度と γ -アラニン濃度はフルクトース用量依存的に増加し、肝臓中尿酸濃度はフルクトース用量依存的に減少した。マンニトールは糖アルコールの一種であり、その代謝は動物体内では生じないと考えられているが、乳酸菌などの細菌はフルクトースからマンニトールを産生することが知られている。したがって、フルクトースを給与したニワトリの腸管内で微生物によって産生されたマンニトールが吸収され、肝臓に蓄積した可能性が示唆された。マンニトールを体内に投与すると、血管内皮細胞が一時的に収縮し、そのバリア機能を低下させることが知られており、その有害影響としては、代謝性アシドー

シス、高カリウム血症、低ナトリウム血症などの電解質異常が知られている。今後は、ニワトリにフルクトースを給与した際の消化管内容物中マンニトール濃度を測定するとともに、マンニトールの有害影響が生じているかを検討する必要がある。ガラクトノールは myo-イノシトールのガラクトース配糖体であり、植物が産生する物質として知られているが、ラット乳腺でも β -ガラクトシダーゼにより産生され、イノシトール給与量が増加するにつれて、ラット母乳中のガラクトノール濃度は増加することが報告されている (Burton & Wells, 1976)。ニワトリ肝臓においても β -ガラクトシダーゼが発現しており、この酵素によってガラクトノールが産生されている可能性がある。一方、フルクトース給与が肝臓中ガラクトノール濃度を上昇させる機作は明らかにはならなかった。糖尿病モデルマウスでは、尿中ガラクトノール排泄が増加することが報告されている (Zhao et al, 2018)。ガラクトノールの生理作用に関しては明らかになっておらず、フルクトース過剰による影響との関連は、今後の検討課題である。フルクトース給与は肝臓中尿酸濃度を低下させた。尿酸は鳥類の肝臓におけるタンパク質およびプリン塩基など窒素化合物の最終代謝産物であり、タンパク質摂取低下に伴い肝臓中濃度が減少する。しかし、本試験では、各試験飼料のタンパク質含量は同一であり、フルクトース給与は飼料摂取量に影響を及ぼさなかったため、本試験で認められたフルクトース給与による肝臓中尿酸濃度の低下の原因は明らかにはならなかった。先に述べたように、フルクトース給与は体タンパク質量を減少させる可能性がある。体タンパク質量減少時にはタンパク質の異化が亢進するので、尿酸産生が増加する。本試験で認められた体重の減少と肝臓中尿酸濃度減少の関連は、今後の検討課題である。 β -アラニンカルノシンやアンセリンなどのイミダゾールジペプチド構成成分であり、これらの分解によって生じる。フルクトース給与が肝臓中 β -アラニン濃度を上昇させる機作として、カルノシンやアンセリンの分解を促進した可能性またはフルクトース給与がカルノシンやアンセリンの合成を抑制した可能性がある。本試験で用いた親水性低分子代謝物質濃度の網羅的半定量分析ではカルノシンやアンセリンは検出されなかったが、肝臓におけるこれらイミダゾールジペプチド濃度が減少した可能性は否定できない。カルノシンおよびアンセリンは抗酸化能を有する。実験動物では、フルクトース過剰によって肝臓で酸化ストレスが生じることが知られている (Castro et al., 2015)。フルクトース過剰で生じる肝臓での酸化ストレスの一因として、カルノシンやアンセリン濃度の低下があるのかもしれない。

ビタミン E 添加は、肝臓では壊死巣を含む炎症の発生に影響を及ぼさなかった。また、

血漿中アラニンアミノトランスフェラーゼ、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、 β -グルタミルトランスペプチダーゼ活性もビタミン E 添加の影響を受けなかった。さらに肝臓中の炎症関連遺伝子であるニワトリ TNF、インターロイキン-1、誘導型一酸化窒素合成酵素、ニワトリインターフェロンの発現もビタミン E 添加の影響を受けなかった。これらの結果から、要求量を大きく上回るビタミン E の給与では、本試験で認められた肝臓の炎症を低減できないことは明らかである。廃鶏の肝臓を食品として用いる際には、ビタミン E 以外の補給によって、炎症を改善させる必要があることが示唆された。

<引用文献>

- Burton LE and Wells WW (1976) myo-Inositol metabolism during lactation and development in the rat. The prevention of lactation-induced fatty liver by dietary myo-inositol. *Journal of Nutrition* 106: 1617-28.
- Castro MC, Massa ML, Arbeláez LG, Schinella G, Gagliardino JJ and Francini F (2015) Fructose-induced inflammation, insulin resistance and oxidative stress: A liver pathological triad effectively disrupted by lipoic acid. *Life Science* 15; 137:1-6.
- Griminger P and Fisher H (1963) Fructose utilization in the growing chicken. *Poultry Science* 24: 191-2.
- Macfarlane DP, Zou X, Andrew R, Morton NM, Livingstone DE, Aucott RL, Nyirenda MJ, Iredale JP and Walker BR (2011) Metabolic pathways promoting intrahepatic fatty acid accumulation in methionine and choline deficiency: implications for the pathogenesis of steatohepatitis. *American Journal of Physiology -Endocrinology and Metabolism* 300: E402-9.
- Martín-Castillo A, Castells MT, Adánez G, Polo MT, Pérez BG, Ayala I (2010) Effect of atorvastatin and diet on non-alcoholic fatty liver disease activity score in hyperlipidemic chickens. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 64: 275-81.
- Ruiz N, Miles RD and Harms RH (1983) Choline, methionine and sulphate interrelationships in poultry nutrition - A review. *World's Poultry Science Journal* 39: 185-98.
- Song M, Schuschke DA, Zhou Z, Chen T, Pierce WM Jr, Wang R, Johnson WT, McClain CJ (2012) High fructose feeding induces copper deficiency in Sprague-Dawley rats: A novel mechanism for obesity related fatty liver. *Journal of Hepatology* 56: 433-40.
- Zhao G, Hou X, Li X, Qu M, Tong C, Li W

(2018) Metabolomics analysis of alloxan-induced diabetes in mice using UPLC-Q-TOF-MS after *Crassostrea gigas* polysaccharide treatment. International Journal of Biological Macromolecules 108: 550-7.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松井 徹 (MATSUI, Tohru)

京都大学・農学研究科・教授

研究者番号: 4 0 1 8 1 6 8 0

(2) 研究分担者

友永 省三 (TOMONAGA, Shozo)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号: 0 0 5 5 2 3 2 4

白石 純一 (SHIRAIISHI Jun-ichi)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・

助教

研究者番号: 5 0 6 3 2 3 4 5