

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20780207

研究課題名（和文）水牛における脂質代謝に関する研究

研究課題名（英文） Studies on fat metabolism in water buffalos

研究代表者

伴 智美 (BAN TOMOMI)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：90378323

研究成果の概要（和文）：

本試験では牛と水牛の脂質代謝の違いを調査するため、肥育試験を 16 週間行った。その結果、血漿中のコレステロール濃度および胸最長筋とその周囲脂肪のコレステロール含量は牛に比べて水牛が有意に低い値を示した。飼料摂取量に両動物種間で差は認められず、飼料中から摂取するコレステロール含量に違いはないと考えられ、コレステロールの体内での合成量が牛に比べて水牛は少ないことが示唆された。また胸最長筋の脂肪酸組成において、水牛の方が牛と比べて不飽和脂肪酸の割合が高いことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：

In present study, fattening experiment was conducted in cattle and water buffalo fed same feed during 16 weeks. As a result, plasma cholesterol concentration and cholesterol contents of *longissimus* muscle and fat around *longissimus* muscle in water buffalo were lower than in cattle. Feed intake (per metabolic body weight) was not different between cattle and water buffalo, therefore cholesterol intake from feed also could not be different between cattle and water buffalo. Syntheses of cholesterol in body of cattle could be greater than in that of water buffalo. Additionally, unsaturated fatty acids ratio was higher in water buffalo than in cattle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：動物栄養生理

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：水牛・牛・レプチン・コレステロール・脂肪酸・消化管微生物

1. 研究開始当初の背景

東南アジアなどで飼育されている牛がやせているのに対し、同じように飼育されているにもかかわらず同じウシ科の水牛は丸々と肥っていることが多い。このように水牛が特に乾季の熱帯地域の飼料中の栄養価の低い条件の下で、ウシよりも病気に強く肥ることができる理由はこれまでわかっていなかったが、水牛のほうが飼料のルーメン（第一胃）内での滞留時間が短く、摂取した飼料の下部消化管への通過速度が速いこと¹⁾、フィリピンで行った水牛とウシの比較飼養試験により水牛は粗たんぱく質の消化率がウシよりも優れていることから、水牛は牛と比べて効率的に飼料を消化吸収する機能を持つことがわかっている。

肥育に伴う血液中のホルモン（インスリン、レプチン）や代謝性物質（グルコース、コレステロール、トリグリセライド）を測定した結果、水牛はウシに比べて血液中のインスリン、レプチン、コレステロールがかなり低いことが明らかとなった。脂肪細胞から分泌されるレプチンは食欲やエネルギー代謝を調節し、脂質代謝に重要な役割を持つホルモンである。インスリンもレプチンと同様に血液中のグルコース濃度の抑制、脂肪合成の促進などの作用を持ち、脂質代謝に重要な役割を持つホルモンである。水牛肉は牛肉に比べて、コレステロール含量が低いこと、水牛の乳中の脂肪分が高いことが以前から言われており、血液中のホルモンと代謝性物質の濃度から水牛とウシでは脂質代謝、おそらく脂質の輸送系が異なっている可能性が示唆されており、今後この2種間の脂質代謝の違いを調べることは脂肪分の少ないヘルシーな肉を作るといった肉質の改善という意味でも意義のあることだと考えられる。

現在、水牛に関する研究はインドやイタリアを中心に乳利用を目的としての研究が行われている。特にイタリアではモツアレチーズの生産のために水牛のミルクが利用されており、ナポリ大学を中心に栄養および繁殖生理に関する研究が実施されつつある。平成15年度からフィリピンにおいて、科学研究費補助金（基盤研究B：水牛の特性評価と高度利用に関する実証的研究 筑波大学 金井幸雄 代表）によって、これまでほとんど研究されていなかった水牛の産肉特性や産乳特性についての基礎的研究が進められた。本研究はこ

の研究から得られた結果をさらに発展させるものである。

2. 研究の目的

これまでの水牛に関する試験結果から、水牛はウシに比べて皮下脂肪が厚いが、血液中のコレステロール、レプチン、インスリン濃度が低く、脂質の輸送系が異なっている可能性が示唆されている。また、ウシと水牛では肉質や乳成分も異なり、水牛肉はウシと比べて脂肪分が少なく赤身が多いことや、水牛のミルクは、乳量は低い乳脂率やタンパク質が高いことが報告されている。しかし、水牛についてはまだほとんど研究が進んでおらず、ウシに比べて未解明な部分が多い。本試験では水牛の特異的な脂質代謝の機構を解明することを目的として研究を行った。

脂肪組織はエネルギー貯蔵器官であるばかりでなく、エストロジェン、レプチンなどのホルモンを発現、産生しており、特にレプチンは脂質代謝に大きく関わっているホルモンとして注目されている。脂質代謝は種々のホルモンによって調節されているため、血液中の脂質代謝に関係するとされているホルモンや代謝性物質はウシと水牛間で異なることはこれまでの研究から明らかになったが、その原因を解明するために、血液中のホルモンや代謝性物質濃度について、脂肪細胞の大きさなどの形状の違い、部位による脂肪のつき方の違いなどの脂肪組織との関連を調査した。血中のホルモンや代謝性物質の中でもレプチンやコレステロール濃度はウシと水牛で大きく異なることが分かっていることから、脂質合成の調節機能について調べるために肝臓や脂肪組織のコレステロール合成酵素や脂質合成に関わる酵素についても研究を行った。また、最近のヒトやげっ歯類における研究から痩せた動物と太った動物では消化管の微生物叢が異なることが報告されており、細菌の割合違いが体脂肪量と関わっていることが示唆されている。ウシなどの反芻動物での報告はないため、ウシと水牛の脂質代謝の違いを微生物から見るための基礎的なデータの集めるため、肥育試験中に消化試験を行い牛と水牛のルーメン内の性状や繊維分解菌についても調査した。

3. 研究の方法

試験 1. (投与試験)

これまでの試験から水牛のレプチン、インスリンおよびコレステロール濃度が牛の 1/2 から 1/3 程度であることがわかっており、牛と水牛の脂質代謝の違いが示唆された。本試験では牛と水牛の糖質・脂質代謝の違いを明らかにするため、インスリン分泌能、インスリンへの感受性およびカテコールアミン刺激時の脂肪分解—合成の動物種間での違いについて検討した。実験動物として、牛及び水牛を 5 頭ずつ供試した。牛と水牛は 2 週間同じ飼料で馴致させた後、グルコース (0.2g/kg BW)、インスリン (0.1U/kg BW) およびノルアドレナリン (0.01mg/kg BW) をそれぞれ投与した。全ての物質の投与において、投与直前に採血を行い、グルコースは投与後 120 分間、インスリンは投与後 180 分間およびノルアドレナリンは投与後 90 分間経時的に採血を行った。そして、グルコースとインスリン投与についてはグルコースとインスリン濃度を測定し、ノルアドレナリン投与についてはトリグリセリド (TG) および NEFA (遊離脂肪酸) 濃度を市販のキットを用いて測定した。負荷試験中は採食を中止させた。それぞれの投与物質はその影響をなくすため少なくとも 5 日以上間隔をあけて投与した。

試験 2. (肥育試験)

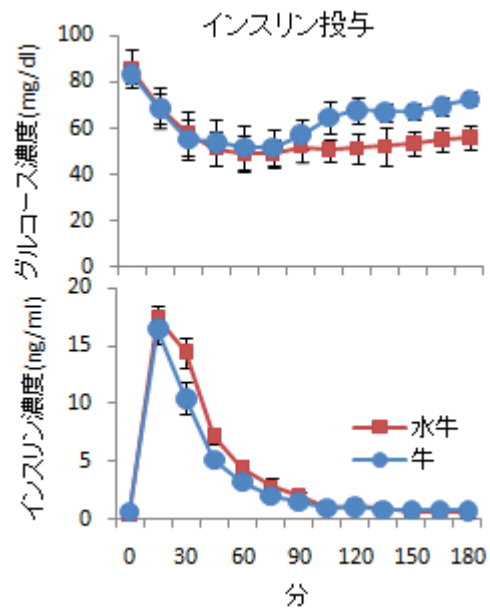
供試動物は 22 か月齢の交雑雄牛および交雑雄水牛をそれぞれ 5 頭ずつ用い、供試飼料は粗飼料としてネピアグラスを濃厚飼料としてココナッツミール主体の配合飼料を 1 日 2 回給与した。飼料給与量は日増体量 0.75kg/day を満たすように算出し、給与した。水とミネラルブロックは自由摂取とした。4 週間の馴致試験の後、16 週間の肥育試験を行い、試験終了後、すべての動物は屠殺した。試験期間中、飼料摂取量および体重は 4 週間ごとに測定し、血液採取も 4 週間ごとに行った。また、試験開始 8 週目に 6 日間の全糞採取による消化試験を行った。消化試験の最終日の午前の飼料給与前と給与後 3 時間及び 6 時間後に経口カテーテルを用いて牛と水牛のルーメン液を採取し、pH、有機酸、微生物の解析などに用いた。微生物の解析では、ルーメン液から DNA を市販のキットを用いて抽出し、繊維分解菌である *Fibrobacter Succinogenes* のクローンライブラリーを構築し、多様性解析を行った。試験終了後の屠殺時に、皮下脂肪、腎周囲脂肪、腹腔内脂肪、胸最長筋、ルーメン壁および肝臓を採取した。皮下、腎周囲および腹腔内脂肪、ルーメン壁および肝臓については mRNA を抽出し、脂質代謝に関わる遺伝子の mRNA 発現量の解析をリアルタイム PCR 法を用いて試みた。また、3 つの部位の脂肪についてはオスミウム固定法を用いて脂肪細胞の直径を顕微鏡下で測

定した。胸最長筋については、水分、粗タンパク質および粗脂肪の一般成分、ガスクロマトグラフィーによって脂肪酸組成、および市販のキットを用いてコレステロール含量を測定した。4 週間ごとに採取した血漿は市販のキットを用いて血漿中グルコース、トリグリセリド、コレステロール濃度を測定した。

4. 研究成果

試験 1. (投与試験)

静脈内へのグルコース負荷後のグルコース濃度およびインスリン濃度には動物種による差は認められなかった。



インスリン投与では、投与したインスリン濃度に動物種間の違いは見られなかった。投与前のグルコース濃度に差は見られず、投与後両動物種ともほとんど同じ濃度まで低下した。しかし、投与後 75 分以降、牛は徐々に元の濃度に回復していったが、水牛は投与後 180 分まで、75 分以降ほとんど濃度は変化しなかった。牛と比べて水牛の方が、長くインスリンの効果が残っており、インスリン感受性が高いといえるかもしれない。脂肪細胞からはレプチン、アディポネクチン、TNF- α など様々な物質が分泌される。これらの物質はインスリン抵抗性に関与すると考えられており、これまでの試験から水牛のレプチン濃度は牛の約 1/2 程度であることがわかっている。脂肪細胞から分泌されるレプチン以外の物質の分泌量も牛と水牛で異なっており、血中のインスリン濃度に影響している可能性が考えられる。また、ノルアドレナリン投与により、血漿中 TG および NEFA 濃度に動物種間差は認められなかった。

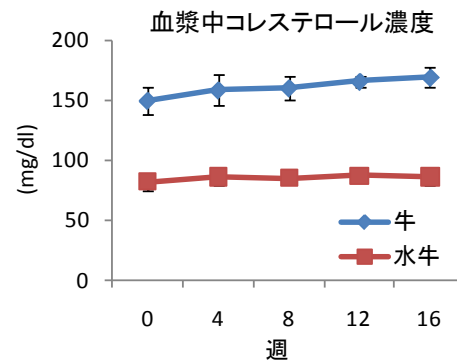
試験 2. (肥育試験)

16週間の肥育試験において、代謝体重当たりの乾物飼料摂取量は動物種間で有意差は見られず、試験開始0~4週目と12~16週目で他の週と比べて有意に高い値を示した。体重は試験開始体重は牛が $268.8 \pm 8.06\text{kg}$ 、水牛が $325.9 \pm 17.22\text{kg}$ で試験開始時から水牛の方が牛と比べて有意に高い値を示し、両動物種ともに試験期間中徐々に増加した。日増体量は両動物種間に差は認められず、12~16週目で高い飼料摂取量を示したが、増体量も高い値を示した。試験開始8週目に行った消化試験では乾物、有機物および粗タンパク質の消化率は牛と比べて水牛において高く、牛よりも水牛の方が飼料の消化能力が高いことが示唆された。

動物種間の消化率に違いがみられたことから、牛と水牛の消化能力の違いについて新しい知見を得るため、消化試験最終日に採取したルーメン液において、DNAを抽出し、繊維分解菌である *Fibrobacter Succinogenes* のクローンライブラリーを構築し、多様性解析を行った。それぞれ50クローンの塩基配列を解読し、アミノ酸配列の進化距離に基づき OTU に分類し、LIBSHUFF 解析を行った結果、これらのライブラリーは動物種間で有意に異なっていることが示された。牛と水牛の消化管の微生物叢の違いについて今後さらに詳細に調べる必要があるが、微生物叢の違いが牛と比べて水牛の高い消化率に影響している可能性が示唆された。

血漿中のグルコース濃度および TG 濃度は動物種間において有意な差は認められなかった。血漿中グルコース濃度は試験開始時と比べて、4、8、12 および 16 週目で有意に高い値を示した。血漿中のコレステロール濃度は以前の結果と同様に牛に比べて水牛は 1/2 倍低い値を示した。胸最長筋のコレステロール含量は、血漿中の濃度と同様に、牛に比べて水牛は有意に低い値となった ($P < 0.05$)。また、胸最長筋周囲の脂肪についても同様に牛に比べて水牛が低い値を示した。水牛のコレステロールは血漿中、胸最長筋中および脂肪中の全てで牛に比べて低かった。飼料摂取量に牛と水牛で差がなかったことから、コレステロール摂取量もほとんど差がないと考えられる。そのため、おそらく牛と水牛で脂質の輸送系が異なり、体内での合成系に違いが生じていると考えられる。コレステロールはアセチル CoA からメバロン酸およびスクワレンを経て主に肝臓で合成される。コレステロール合成系では 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Co enzyme A synthetase (HMG-CS) や HMG-CoA reductase (HMG-CR) が酵素として働いている。これらの酵素の酵素活性や mRNA の発現量を調べることで牛と水牛でのコレステロール含量

の違いについて説明できるのではないかと考えられる。



胸最長筋の水分、粗タンパク質および粗脂肪含量は粗タンパク質含量は有意な差は認められなかったが、水分含量では牛と比べて水牛の方が高く、粗脂肪含量では牛と比べて水牛は有意に低かった。また、胸最長筋の脂肪酸組成はミリスチン酸 (C14:0)、ミリストレイン酸 (C14:1)、ペンタデカン酸 (C15:0) およびパルミチン酸 (C16:0) は牛に比べて水牛で有意に低い割合となり、リノール酸 (C18:2)、リノレイン酸 (C18:3) は牛に比べて水牛は有意に高い割合となった ($P < 0.05$)。脂肪酸の割合を全体的にみると不飽和脂肪酸の割合は牛に比べて水牛で有意に高い割合を示した。不飽和脂肪酸は飽和脂肪酸と比べ融点が低いため食肉としてやわらかく、風味が良くなり、特に不飽和脂肪酸であるオレイン酸やリノール酸の割合が多くなると食肉としての嗜好性が良くなるといわれている。今回パネルテストは行っていないが、本試験においてもオレイン酸とリノール酸の割合が牛に比べて水牛で高かったことから、牛よりも水牛の方が食肉の嗜好性が良い可能性が考えられる。本試験では調べられなかったが、脂肪酸不飽和化酵素 (SCD) は一価不飽和脂肪酸の合成を触媒する酵素で、この SCD の mRNA の発現量が増えるほど一価不飽和脂肪酸の割合が高くなることが報告されている。このことから、この酵素の発現量によって脂肪酸組成が変化している可能性が高いと考えられる。

レプチンは脂肪細胞から分泌されるホルモンであるが、脂肪細胞の大きさによってその分泌量が異なることが報告されている。今回、脂肪細胞のサイズについて測定したところ、牛と水牛で有意な差は認められなかった。

今回の試験から牛と水牛でコレステロール血漿中濃度や胸最長筋の含量、胸最長筋の不飽和脂肪酸の割合や粗脂肪含量が異なることがわかり、牛と水牛で何らかの脂質代謝が異なっていることが分かった。そのため、それらに関連する酵素 (SCD, HMG-CS, HMG-CR) やレプチンの mRNA の発現量の解析を試みたが、本試験では測定することが出来なかった。

本試験の結果から、牛と比べて水牛の方が消化率が高く、それに微生物叢の違いが影響している可能性があること、これまでの試験から水牛は血漿中のコレステロールが牛と比べて低いことが示されていたが、本試験でも確認され、胸最長筋やその周囲脂肪のコレステロール含量も低いことが示唆された。また、胸最長筋の脂肪酸組成において、水牛の方が牛と比べて不飽和脂肪酸の割合が高いことが明らかとなった。ヒトやげっ歯類の研究から消化管の微生物叢の違いが体脂肪の蓄積に影響することも報告されており、今後これらの牛や水牛の違いについて、消化管内微生物や脂質代謝の違いに着目してさらに詳細に調査する必要がある。

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 1 件)

- ① Tomomi BAN-TOKUDA, Carole DELAUAUD, Yves CHILLIARD and Tsutomu FUJIHARA
Comparative study of plasma leptin concentration between solid ruminal and liquid abomasal feeding in weaned adult sheep 81, 648-656 査読有 2010

[学会発表] (計 1 件)

- ① Khin Ohnmar Lwin・近藤 誠・伴 智美・Rosalina M. Lapitan・Arnel N. Del Barrio・藤原 勉・松井 宏樹
Comparison of fermentation profiles and diversity of *Fibrobacter succinogenes* in the rumen of buffalo and cattle fed same diets 日本畜産学会第113大会 東京農業大学 平成23年3月29日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伴 智美 (BAN TOMOMI)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：90378323