

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26292138

研究課題名(和文)クロロフィルから生じるフィタン酸による反芻家畜の代謝調節と生産物の機能性強化

研究課題名(英文)The role of phytanic acid in nutrient metabolism and products of ruminants

研究代表者

小櫃 剛人(Obitsu, Taketo)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：30194632

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：クロロフィルの一部をなすフィトールから反芻胃内で生じるフィタン酸は、反芻家畜の乳・肉に特異的に含まれ、生活習慣病に対する改善効果をもつ。本研究では、飼料や反芻胃内代謝を介したフィタン酸生成の変動やその栄養素代謝に対する影響について検討した。その結果、種々の粗飼料中のクロロフィル(フィトール)含量が施肥や刈取り時期で変動すること、サイレージではフィトールがよく保存されること、反芻胃内でのフィタン酸の生成程度に限界があること、牛乳中フィタン酸含量が飼料の影響を受けることなどを明らかにした。さらに、フィトールまたはフィタン酸が反芻家畜の脂質代謝に影響することも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Phytanic acid, which has beneficial effects on human health, is produced from phytol moiety of chlorophyll through the action of ruminal microbes, and appears in milk and meat of ruminants. In this study, we found the variation in chlorophyll or phytol contents in various forages, which affected phytanic acid production in the rumen, and variation in phytanic acid content in milk of cows fed various diets. We further found that phytanic acid affected lipid metabolism in ruminants.

研究分野：家畜栄養学

キーワード：クロロフィル 反芻胃 フィタン酸 フィトール 牛乳 脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

反芻家畜の主要な飼料である粗飼料には、植物光合成色素であるクロロフィルあるいはその代謝物が少なからず含まれている。飼料中クロロフィルの一部をなすフィチル基(フィトール部分)は、反芻家畜に摂取された後、ルーメン内微生物の作用によってフィトールを経てフィタン酸に変換される。このフィタン酸は腸から吸収されて乳や肉に移行する。そのため、反芻家畜由来の乳・肉製品には特異的にフィタン酸が含まれている。フィタン酸は、細胞の核内受容体 PPAR のリガンドとして、肝臓での脂肪酸酸化や筋肉へのグルコース取り込みを高め、ヒトの脂肪肝や糖尿病を予防・軽減する効果のあることが知られている。このような生理機能のあるフィタン酸の乳・肉中の含量を高めることが可能となれば、生産物としての牛乳や牛肉の付加価値を高めることにつながると考えられる。フィタン酸は飼料中のフィトールに由来することから、飼料中のフィトール含量や反芻胃内でのフィタン酸への変換程度が、乳・肉中のフィタン酸含量に影響することが予想される。

前述したように、フィタン酸には抗脂肪肝効果のあることがヒトにおいて報告されている。乳牛においても、分娩後に脂肪肝を生じやすく、脂肪肝に伴う代謝障害や乳量低下によって生じる経済的損失が大きな問題になっている。乳牛における肝臓での脂肪酸酸化を強化する因子として、反芻胃内で生じるフィタン酸を活用できる可能性がある。

反芻家畜の主な食物である粗飼料に由来する物質に、家畜の代謝障害を予防し、効率的な家畜生産をもたらすような生理活性があり、しかもそれが生産物に含まれて人の健康にも有用であるとすれば、非常に魅力的である。しかし、フィトールからフィタン酸への変換の定量的な関係や、フィタン酸のウシ自体の代謝への影響については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、反芻家畜の生産物中のフィタン酸含量に影響する要因ならびに、反芻家畜におけるフィタン酸による脂質および糖代謝への影響を明らかにすることを目的とした。具体的には、以下の点を検討した。

- (1) 飼料中のクロロフィル含量およびフィトール含量に及ぼす、牧草の栽培・調製条件の影響
- (2) 反芻胃内でのフィタン酸の生成程度
- (3) 乳中のフィタン酸含量に及ぼす粗飼料源の影響
- (4) 反芻家畜におけるフィトール・フィタン酸の糖・脂質代謝への影響

3. 研究の方法

- (1) 飼料中のクロロフィル含量およびフィトール含量に及ぼす、牧草の栽培・調製条件の

影響

フィトールはクロロフィルの構成部分であることから、牧草中クロロフィル含量に及ぼす要因として、牧草の生育ステージならびに施肥条件に着目した。また粗飼料の調製・保存中におけるフィトールの変化についても着目し、以下の試験を3年間にわたり行った。

広島大学の瀬戸内生物圏フィールド科学教育研究センター西条ステーションのイタリアンライグラス栽培圃場3地点において、窒素追肥量を0, 60, 120 kgN/haとする3処理区を設けイタリアンライグラスを栽培した。4月下旬(穂ばらみ期)から5月上旬(出穂期)にかけて牧草を収穫し、それらの生草、予乾草(1日予乾)および乾草(7日乾燥)ならびにサイレージ調製(小バック法、60日間保存)した試料についてクロロフィルならびにその代謝物、フィトール、一般成分等を測定し、牧草の栽培方法ならびに調製方法がフィトール含量に及ぼす影響について検討した。クロロフィル含量はアセトン抽出物からHPLC法で測定した。フィトール含量については、アセトン抽出物のけん化によって生じた遊離フィトールをガスクロマトグラフィーで測定した。

(2) 反芻胃内でのフィタン酸の生成程度

反芻胃内でのフィトールからフィタン酸の生成について明らかにするために、以下のような定量的な解析を行った。

in vitro 試験

ヒツジから採取した第一胃液を用い、in vitro 培養試験によって、培養液に添加したフィトール試薬からのフィタン酸生成量、ならびに(1)で調製した生草およびサイレージ飼料を培養した際のフィタン酸生成量を測定した。いずれも48時間培養後での、培養液のVFA濃度等を測定するとともに、培養液凍結乾燥物中のフィトールおよびフィタン酸含量を測定し、培養後でのフィトールの残存量とフィタン酸生成量を求めた。フィタン酸含量はメチルエステル化後にGC-MSを用いて測定した。

in vivo 試験

オーツ乾草と大麦を給与したヒツジ(第一胃および十二指腸カニューレ装着)の第一胃内へ、飼料乾物あたり0, 0.4, 0.8 および1.2%の市販フィトール試薬を飼料給飼時に投与した。10日間の予備飼育後、4日間、十二指腸内容物と糞を採取した。十二指腸および糞へのフィトールならびにフィタン酸の移行量を、第一胃内に同時に投与した酸化クロムを指標物質として測定した。試料中のフィトールおよびフィタン酸含量は、ガスクロマトグラフィーで測定した。

- (3) 乳中のフィタン酸含量に及ぼす粗飼料源の影響

広島大学瀬戸内生物圏フィールド科学教

育研究センター西条ステーションの搾乳口ポット牛舎で飼育している乳牛 17 頭を用い、3 週間を 1 期として 3 期からなる飼養試験を行った。供試牛には、主な粗飼料源としてトウモロコシサイレージ(1, 3 期)およびグラスサイレージ(2 期)を含む混合飼料(TDN 70%、CP13%)を日本飼養標準における栄養必要量に基づいて給与した。乳生産成績を評価するとともに、乳中のフィタン酸含量を測定した。乳中のフィタン酸含量はメチルエステル化後に GC-MS で測定した。

(4) 反芻家畜におけるフィトール・フィタン酸の糖・脂質代謝への影響

維持エネルギー相当量のオーツ乾草と大麦を給与したヒツジ(第一胃および十二指腸カニューレ装着)の第一胃内へ、飼料乾物あたり 0、0.4、0.8 および 1.2%のフィトールを飼料給与時に投与する処理区を設け、1 期 14 日間とする 4×4 ラテン方格法で試験を実施した。10 - 13 日目に、十二指腸内容物と糞を採取し、乾物の胃、腸および全消化管消化率を測定した。13 日目には第一胃液および頸静脈血を採取し、第一胃内 VFA 濃度および血漿中代謝物濃度を測定した。14 日目にはグルコースを頸静脈内へ 1 回投与する耐糖試験を行い、投与後のグルコースおよびインスリン濃度の変化を測定した。

4. 研究成果

(1) 飼料中のクロロフィル含量およびフィトール含量に及ぼす、牧草の栽培・調製条件の影響

牧草サイレージ中のフィトール含量に及ぼす窒素追肥および収穫時期の影響

窒素施肥量の増加に伴い、穂ばらみ期および出穂期ともに、材料草(刈り取後 1 日予乾)およびサイレージの粗タンパク質(CP)含量および繊維(NDF)含量が増加し、非繊維炭水化物(NFC)含量が低下した。窒素施肥量の増加に伴い、いずれの収穫時期においても、材料草のクロロフィル含量およびフィトール含量は増加し、サイレージのフィトール含量も増加した。

穂ばらみ期の材料草は、出穂期のそれらに比べて CP 含量およびクロロフィル含量が高く、サイレージのフィトール含量も穂ばらみ期の方が出穂期に比べて高かった。

サイレージの CP 含量とフィトール含量には有意な正の相関が認められた。サイレージ調製保存中に、クロロフィル含量は低下し、フェオフィチンおよびフェオフォルバイドが生じたが、フィトールの損失はほとんど認められず、大部分のフィトールは非遊離体(おそらくエステル体)として存在していた。またモルベースでは、材料草のクロロフィル含量に比べてフィトール含量の方が 10%程高く、クロロフィル由来以外のフィトールが牧草茎葉中に存在することが示唆された。

乳酸菌添加の影響

サイレージ調製後の経日変化を調査した結果、原料草中のクロロフィルがフェオフィチンを経てフェオフォルバイドとなる過程で、フィトールが遊離することを明らかにした。フェオフィチンへの変換は pH の低下に伴うマグネシウムの解離によることから、フィトールの遊離にはサイレージ調製過程での有機酸生成に伴う pH 変化が関連することが予想された。一方、水分含量の低い予乾牧草サイレージでは、発酵の程度が小さく、pH が低くなりにくい。そこで、乳酸菌製剤を添加して pH を低下させた場合でのサイレージ中フィトール含量を調査した。出穂期のイタリアンライグラスに乳酸菌製剤を添加する区と無添加区の 2 処理区を設け、サイレージを小バッグ法で調製し、2 か月後に開封し、クロロフィル関連物質含量とフィトール含量を測定した。乳酸菌製剤の添加でサイレージ pH は低下したが、フィトール含量には処理区間で違いはなく、無添加区と添加区いずれもサイレージのフィトール含量は原料草と同程度であった。これらのことから、サイレージの pH に関わらず、原料草のフィトールはよく保存されることが確認された。

乾草調製に伴う変化

追肥水準の異なる出穂期のイタリアンライグラスについて、1 日の予乾はフィトール含量に影響しなかったが、7 日間の天日乾燥によって乾草調製した場合、フィトール含量は原料草のそれに比べて 55-75%程度に低下した。天日による長期間の乾草調製あるいは乾草としての貯蔵方法は、サイレージ調製に比べてフィトール含量を大きく低下させることが示された。

(2) 反芻胃内でのフィタン酸の生成程度

in vitro 試験

最初に、cis および trans 体を含む市販のフィトール試薬を用いて反芻胃内フィタン酸生成率に及ぼす培養基質の影響について検討した。オーツ乾草:大麦の混合比を 100:0、75:25、50:50、25:75、0:100 とする 5 種類の基質(0.3 g)を用い、それぞれにフィトール(W502200、Sigma-Aldrich)を 2.4 mg 添加する区と添加しない区を設けた。ヒツジから採取したルーメン液と緩衝液の混合液を加え、48 時間培養した。フィトール添加によって、培養後の VFA 濃度が低下した($P<0.05$)が、ガス産生量には有意な影響は認められなかった。フィトール添加量に対するフィタン酸生成量の割合は、8-10%程度と低く、乾草割合の増加に伴い直線的に増加した($P<0.05$)。また、添加したフィトールのうち 66-80%程度が培養後でも残存し、13-25%程度がフィタン酸以外の経路で消失した。これらのことから、反芻胃内でのフィトールからフィタン酸への変換は 10%程度とそれほど高くなく、飼料として摂取したフィトールの

かなりの部分がそのまま反芻胃以降へ流出する可能性が示唆された。

次いで、(1)で調製した追肥水準および生育時期の異なるイタリアンライグラス牧草の1日予乾草(サイレージ材料草)およびサイレージの凍結乾燥物を基質(0.3 g)に用いて同様の *invitro* 培養(48時間)を行った。材料草およびサイレージともに、フィトール含量の高い高追肥水準の基質で培養した方が、培養後のフィタン酸生成量は多かった($P<0.05$)。基質に含まれるフィトールからフィタン酸への変換率は、材料草を基質にした場合で12-17%、サイレージの場合で17-38%となった。フィトール含量の高い基質で培養した方が、相対的にフィタン酸への変換率が低下したこと、フィタン酸に変換されずに培養後に残存するフィトールも材料草で66-74%、サイレージで40-60%存在したことから、ルーメン内でのフィタン酸の生成には限界があることが示唆された。また、原料草に比べサイレージの方がフィトールからフィタン酸への変換率が高かったことから、サイレージ化の過程でクロロフィルからフィトールが遊離することが、フィタン酸への変換に影響する可能性が示唆された。

in vivo 試験

ヒツジ第一胃内へのフィトール投与量の増加に伴い、十二指腸へのフィトールおよびフィタン酸の移行量は直線的に増加した($P<0.05$)。フィトール投与量と十二指腸へのフィトールおよびフィタン酸移行量との回帰式から、投与したフィトールのうち、30%がフィトールとしてそのまま十二指腸に移行し、30%がフィタン酸として移行することがわかった。残りの40%は、フィトールとして反芻胃から吸収されたか、未同定の代謝物に変換されたと考えられた。

フィトールおよびフィタン酸の糞中排泄量も、フィトール投与量の増加に伴い直線的に増加した($P<0.05$)。十二指腸移行量とそれらの糞中排泄量との回帰式から、フィトールおよびフィタン酸の腸内吸収率は80%程度と推定された。これらのことから、飼料中フィトールのうち反芻胃内でフィタン酸に変換されるのは3分の1程度であり、フィトールの一部はそのまま腸から吸収されることが明らかとなった。

(3)乳中のフィタン酸含量に及ぼす粗飼料源の影響

トウモロコシサイレージおよびイタリアンライグラスサイレージを混合飼料中粗飼料源とした場合、乾物摂取量、乳生産量および乳成分率には粗飼料源による違いはなかった。血漿中の生化学成分のうち、尿素態窒素以外は飼料の影響が認められなかった。トウモロコシサイレージ主体の混合飼料に比べ、イタリアンライグラス主体混合飼料の方が飼料中フィトール含量が高かったことを反

映して、乳中のフィタン酸含量は、イタリアンライグラス主体の方(13.9 mg/kg)がトウモロコシサイレージ主体(9.3 および 8.8 mg/kg)に比べ高かった($P<0.05$)。飼料のフィトールから乳中のフィタン酸への変換率は飼料に関わらず3%程度と推定され、かなり低いことがわかった。

(4)反芻家畜におけるフィトール・フィタン酸の糖・脂質代謝への影響

ヒツジ第一内へのフィトール投与量を段階的に増加させた場合、第一胃内VFA濃度および組成、乾物の胃内および腸内消化率には影響を及ぼさなかった。血漿中グルコース、NEFA、ケトン体濃度、ならびにインスリン濃度はフィトール投与の影響を受けなかった。しかし、フィトール投与量の増加に伴い、血漿トリグリセリド濃度の増加($P<0.05$)と、コレステロール濃度の低下($P<0.05$)が認められ、脂肪肝でみられる高脂血症様の代謝像が得られた。

耐糖試験において、グルコース投与後の血漿グルコースおよびインスリン濃度の経時変化には、フィトール投与量の影響は認められなかった。しかし、インスリン抵抗性の指標であるRQUICKI値やNEFA濃度の変化から、フィトール投与量の高い区では、インスリン抵抗性が高まっている可能性が示唆された。

これらの反応は、PPARリガンドとしてのフィトール・フィタン酸に期待される脂肪酸酸化促進作用とは逆の反応となった。今回の試験では、フィトールの効果を明確にすることを意図して、生草やサイレージを摂取した場合に想定されるフィトール摂取量に比べて、最大で約10倍量を投与した。1960年代でのラットを用いたフィトールの高負荷試験においても、フィトール給与に伴う脂肪肝の発症が報告されていることから、反芻家畜においても、過剰なフィトールあるいはフィタン酸の供給は、脂質代謝異常を招く可能性が示唆された。

(5)総合考察

牧草中のフィトール含量は、茎葉比や葉中のクロロフィル含量を反映する。早期収穫をしたり窒素施肥量を高めると、牧草の窒素含量とクロロフィル含量が高まり、フィトール含量も高まることから、牧草の窒素含量からフィトール含量を推定することが可能であった。牧草のサイレージ貯蔵は、フィトールの損失が少ないことも明らかとなった。これらのことから、適切な肥培管理した牧草を早期に収穫してサイレージとして給与することで、フィトール含量の高い粗飼料給与を達成できるといえる。

一方、反芻胃内でのフィトールからフィタン酸の変換率は30%程度と必ずしも高くなく、フィトールの一部はフィタン酸となるが、一部はそのまま吸収されていることも明らかとなった。飼料中のフィトール含量が増加す

ると、反芻胃内でのフィタン酸生成量が増加する。そのため、飼料中のフィトール含量の差異が乳中のフィタン酸含量に影響する。飼料フィトールから牛乳フィタン酸への変換率は3%程度とかなり低いが、飼料によって、フィタン酸含量の高い牛乳を生産することは可能と考えられる。

フィタン酸のPPARリガンドとしての生理機能から、フィトールやフィタン酸の供給量増加によって、肝臓での脂肪酸酸化が促進されることが、当初期待された。しかし、フィトール・フィタン酸の供給量が多い場合には、逆に脂質合成を高め、脂肪肝を促進するような結果となった。その原因については残念ながら明らかにすることはできなかった。そのため、今後は動物の栄養状態やフィタン酸の供給レベルと脂質代謝との関連をさらに検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Fan, X., Kawamura, K., Guo, W., Xuan, T.D., Lim, J., Yuba, N., Kurokawa, Y., Obitsu, T., Lv, R., Tsumiyama, Y., Yasuda, T. and Wang, Z. (2018) A simple visible and near-infrared (V-NIR) camera system for monitoring the leaf area index and growth stage of Italian ryegrass. *Computers and Electronics in Agriculture*, 144: 314-323. (査読有)
<https://doi.org/10.1016/j.compag.2017.11.025>

Lv, R., EL-Sabagh, M., Obitsu, T., Sugino, T., Kurokawa, Y. and Kawamura, K. (2017) Effects of nitrogen fertilizer and harvesting stage on photosynthetic pigments and phytol contents of Italian ryegrass silage. *Animal Science Journal*, 88: 1513-1522. (査読有)
doi: 10.1111/asj.12810

〔学会発表〕(計9件)

松村 優, 山本祐実, 杉野利久, 小櫃剛人. 第一胃内へのフィトール投与がヒツジの糖脂質代謝に及ぼす影響. 日本畜産学会第124回大会. 2018年3月29日. 東京大学, 東京.

呂 仁龍, 小櫃剛人, 黒川勇三, 杉野利久. 飼料中粗飼料源の違いが乳中フィタン酸含量に及ぼす影響. 日本畜産学会第122回大会. 2017年3月29日. 神戸大学, 神戸市.

Lv, R., Dang, H.L., Obitsu, T., Sugino, T., and Kurokawa, Y. Effect of adding lactic acid bacteria and formic acid on functional component in ensiled Italian ryegrass with different fertilizer levels. 17th AAAP Congress, 2016年8月22日. Fukuoka, Japan.

呂 仁龍, El-Sabagh M, 小櫃剛人, 杉野利久. 牧草の施肥水準と生育期がルーメン内での

フィタン酸生成に及ぼす影響. 日本草地学会石川大会. 2016年3月30日. 石川県立大学. 野々市市.

佐藤美月, 呂 仁龍, 小櫃剛人, 杉野利久. 飼料粗濃比が反芻胃内におけるフィタン酸生成に及ぼす影響. 第120回日本畜産学会, 2015年9月12日. 酪農学園大学. 江別市.

Lv, R., Sato, M., El-Sabagh, M., Obitsu, T. and Sugino, T. Effect of fertilization levels and harvesting stages of grass silages on ruminal phytanic acid production in vitro. 10th Korea, Japan, China Joint Symposium on Ruminant Metabolism and Physiology, 2015年8月3日, Suncheon, Korea.

呂 仁龍, EL-Sabagh M, 小櫃剛人, 谷口幸三, 杉野利久, 黒川勇三, 川村健介. 牧草サイレージのクロロフィル関連物質含量に及ぼす施肥と生育時期の影響. 日本畜産学会第119回大会, 2015年3月29日. 宇都宮大学. 宇都宮市.

呂 仁龍, EL-Sabagh M, 小櫃剛人, 谷口幸三, 杉野利久, 黒川勇三, 川村健介. 牧草中カロテノイドおよびクロロフィルのサイレージ調製に伴う変化. 2015年度日本草地学会信州大会, 2015年3月26日. 信州大学. 南箕輪村.

呂 仁龍, EL-Sabagh M, 小櫃剛人, 谷口幸三, 杉野利久, 黒川勇三, 川村健介. イタリアンライグラスのクロロフィルおよびカロテノイド含量に及ぼす窒素施肥量および予乾時間の影響. 関西畜産学会第64回大会, 2014年9月9日. 広島市.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小櫃 剛人 (OBITSU, Taketo)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授
研究者番号: 30194632

(2) 研究分担者

杉野 利久 (SUGINO, Toshihisa)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授
研究者番号: 90363035

黒川 勇三 (KUROKAWA, Yuzo)
広島大学・大学院生物圏科学研究科・准教授
研究者番号: 00234592

川村 健介 (KAWAMURA, Kensuke)
(2015年度まで)
広島大学・大学院国際協力研究科・准教授
研究者番号: 90523746