

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580310

研究課題名（和文）反芻動物の脂肪肝促進要因としてのアルコールの代謝と作用

研究課題名（英文）Alcohol metabolism and its potential role of causing fatty liver in ruminants

研究代表者

谷口 幸三 (TANIGUCHI KOHZO)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：30093777

研究成果の概要（和文）：

アルコールが反芻家畜の糖・脂質代謝に及ぼす影響について、アルコール給与時における血中代謝物濃度や消化器官組織での正味代謝量をもとに検討し、アルコールが反芻家畜における脂肪肝進行の促進要因となる可能性を追求した。ヒツジの第一胃内へのエタノール注入によって、血漿グルコース濃度の低下、トリグリセリド濃度の上昇、肝臓からのトリグリセリドの放出増加などが認められ、エタノールが肝臓での脂肪合成を促進することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Effects of alcohol consumption on carbohydrate and lipid metabolism in ruminants were investigated by determining the changes of plasma concentrations and net fluxes by splanchnic tissues of metabolites with ruminal ethanol infusion in sheep. Ruminal ethanol infusion decreased plasma glucose concentration, increased plasma triglyceride concentration and net hepatic release of triglyceride in sheep. These results indicate that ethanol has a potential role of facilitating hepatic lipid synthesis in ruminants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，畜産学・草地学

キーワード：反芻家畜、脂肪肝、エタノール、肝臓、脂質代謝

1. 研究開始当初の背景

飼料自給率向上のために飼料用イネサイレージや発酵 TMR などの自給飼料の普及が進んでいる。こうした発酵飼料の中には、比較的高い濃度のアルコール類が含まれている。そのため、これらの発酵飼料を給与した乳・肉牛では、多量のアルコール類を摂取す

る可能性がある。

エタノールは反芻胃内での微生物発酵に影響を及ぼし、揮発性脂肪酸(VFA)産生量の変化、反芻胃内での飼料タンパク質分解の低下、不飽和脂肪酸水素添加の抑制などが生じることが知られている。また、消化管から吸収されたエタノールは、肝臓でアセトアルデ

ヒドを経て酢酸に代謝され、その際に糖新生の低下や脂肪酸酸化の低下を引き起こす可能性がある。実際、ヒトではこのようなアルコールの作用によって生じる脂肪肝が健康上の問題となっている。したがって、乳牛においても、アルコールの摂取が乳牛の周産期に生じやすいケトン体の増加や脂肪肝を助長することが予想された。

分娩後の乳牛では、急激に乳量が増加するのに対し、飼料摂取量の増加が緩慢なため、負のエネルギーバランスの状態になりやすい。特に、泌乳後期から乾乳期にかけて過剰な脂肪が蓄積している肥満牛では、分娩前後において飼料摂取量が低下しやすい。こうした場合、体組織の脂肪が分解・動員され、血中の遊離脂肪酸(NEFA)濃度が高まり、肝臓に多くの脂肪酸が流入する。肝臓への脂肪酸の流入が、そこでの脂肪酸の酸化能や脂肪輸送能を上回ると、脂肪が肝臓に蓄積して脂肪肝となり、摂取量の低下に伴うケトosisや第四胃変位など種々の周産期障害が発症しやすくなる。

したがって、エネルギーバランスの異なる条件下の反芻家畜において、アルコールの摂取が体内で糖・脂質の代謝、特に肝臓を含む消化器組織での代謝に及ぼす影響を明らかにすることは、乳牛を健康に飼育する上で大きな意義あると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒツジをモデル動物として用い、アルコール摂取が反芻家畜の内臓組織での栄養代謝に及ぼす影響を検討することで、脂肪肝とアルコール摂取との関連を明らかにすることを目的とし、以下の実験を行った。

実験1では、分娩後の負のエネルギーバランスのモデルとして、高栄養状態のヒツジを急激に低栄養にさせた場合において、エタノールの第一胃内投与が血漿中の代謝物濃度に及ぼす影響を検討した。

実験2では、内臓の血管にカテーテルを装着することによって、消化器組織と肝臓での栄養素の正味流量(net flux)を測定可能なヒツジを作出し、第一胃内への短期的なエタノール注入量の違いがヒツジの消化器組織での糖・脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

実験3では、第一胃内への長期的なエタノール注入および栄養水準の違いがヒツジの消化器組織での糖・脂質代謝に及ぼす影響を検討した。

実験4では、周産期のモデルとして妊娠および非妊娠のヒツジを用いて、エタノールの経口投与が血中代謝物濃度に及ぼす影響を検討した。

3. 研究の方法

(1) 栄養水準を低下させたヒツジにおける

エタノール給与の影響 (実験1)

第一胃にカニューレを装着したサフォーク種雌羊4頭(開始時体重88kg)を用いた。粗濃比3:7の飼料(CP12%)を維持エネルギーの1.7倍相当量で2週間給与(高栄養期)した後、維持の0.5倍のレベルで8日間飼育した(低栄養期)。低栄養期にエタノールを注入する区(E区)と、無注入区(C区)に2頭ずつ分けた。エタノール(20%溶液)は1日量(96g/日、高栄養期乾物給与量の5%相当)を等分し、給飼(9:00、21:00)と同時に第一胃カニューレから約1分かけて毎日注入した。その後高栄養レベルに戻し処理を反転した。高栄養期最終日と低栄養期5日目に頸静脈から12時間経時的に採血し、血漿中のエタノールおよび糖・脂質代謝関連物質の濃度を測定した。

(2) エタノール給与量の影響 (実験2)

第一胃カニューレと腸管膜動静脈、肝門脈、肝静脈カテーテルを装着した成ヒツジ4頭(平均体重48kg)を供試し、維持要求量の1.2倍相当量の飼料を2時間間隔で給与した。1週間おきに飼料摂取量の0(C区)、3.7(E1区)、7.4(E2区)、11.0(E3区)%のエタノールを注入した。注入試験日にはそれぞれ0、25、50、75gのエタノールを第一胃内へ1回投与後、0、2.5、5.0、7.5g/hの速度で5時間定速注入した。パラアミノ馬尿酸を腸管膜静脈に定速注入しながら、エタノール注入開始2時間後から30分間隔で5回、各血液を採取し、代謝物の動静脈濃度差と血流量を測定し、さらに代謝物の消化管からの正味吸収量と肝臓での正味代謝量を求めた。

(3) 異なる栄養水準におけるエタノールの影響 (実験3)

第一胃カニューレと内臓血管カテーテルを装着したヒツジ6頭(平均体重50kg)を用いた。高栄養(維持エネルギーの1.7倍)と低栄養(同0.7倍)の栄養水準それぞれに、体重あたり1.5g/日のエタノールを第一胃内へ注入する区およびエタノール無注入の区を設け、1期7日間とする4期の反転法で試験を行った。飼料(粗濃比4:6、粗タンパク質含量12%)は6時間ごとに等分給与し、エタノールは飼料給与直後に毎回、1/4日量を投与した。各区とも7日目に採血を行い、各種代謝物およびホルモン(インスリン、グルカゴン)の濃度と消化器組織での正味流量を測定した。

(4) 妊娠ヒツジにおけるエタノール給与の影響 (実験4)

妊娠ヒツジ(分娩2-1週前)3頭、非妊娠雌ヒツジ5頭を用いた。16時間絶食の後、混合飼料(乾物含量50%)を500g給与する際に、エタノールを経口投与する区としない区を設

け、1日において反転させた。エタノールはストマックチューブを用いて25g(25%液)を経口給与した。給与前と給与2および6時間後に頸静脈血を採取して、血漿中の生化学成分を測定した。

4. 研究成果

(1) 栄養水準を低下させたヒツジにおけるエタノール給与の影響 (実験1)

高栄養期に比べて、低栄養期では NEFA 濃度が上昇し、体脂肪が動員されている状況が確認できた。エタノールを注入した E 区では、血漿エタノール濃度が注入後2時間目でピーク(12.5 mmol/L)に達した。低栄養期5日目においてE区ではC区に比べて血漿グルコースおよびNEFA濃度が低く、ケトン体、乳酸、トリグリセリド、HDL-コレステロール濃度は高値を示した(図1)。以上のことから、低栄養時にエタノールを摂取すると糖および脂質代謝に影響を及ぼすことが確認できた。

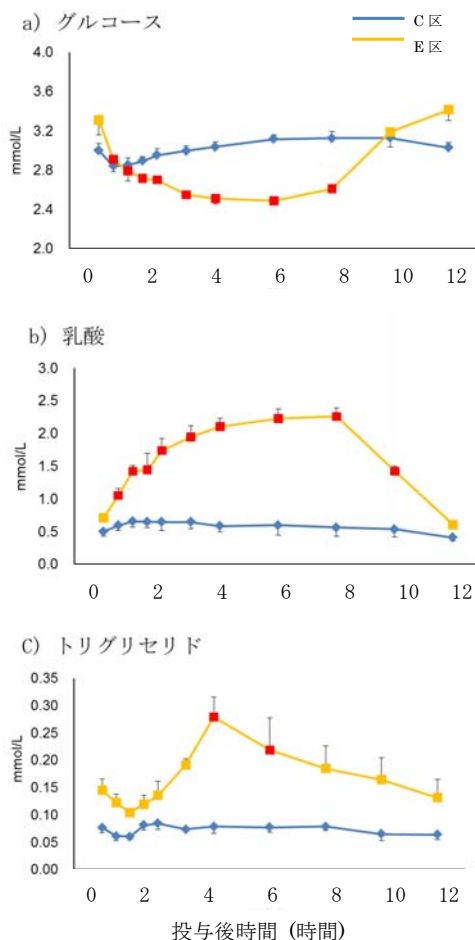


図1. エタノール第一胃内投与後の a) グルコース、b) 乳酸、c) トリグリセリドの血漿濃度変化。

C 区：無注入、E 区：エタノール投与。

■ 注入前に比べて有意差(P<0.05)。

(2) エタノール給与量の影響 (実験2)

実験2では、門脈と肝静脈の血流量、ならびに動脈、門脈、肝静脈の血漿濃度を測定し、門脈と動脈の濃度差、肝静脈と門脈の濃度差、肝静脈と動脈の濃度差、またそれらに血流量を乗じて得られる正味流量値によって、エタノール注入量の増加に伴う消化管からの吸収や肝臓での代謝状況の変化を評価した。

エタノールの動脈血漿濃度は、0 mmol/L(未検出, C 区)から 40 mmol/L(E3 区)まで増加した。エタノール注入量が高くなると、エタノールの正味吸収量が直線的に増加したが、エタノール注入区間での肝臓での正味取り込み量は変わらず、肝静脈と動脈の濃度差は直線的に増加した。

エタノール注入によって、動脈血漿中のグルコース濃度は低下し、乳酸濃度は E1 区をピークに二次曲線的に低下したが、ケトン体への影響は認められなかった。

エタノール注入量の増加に伴って、門脈と動脈の濃度差は、グルコースとケトン体が直線的に低下、乳酸とトリグリセリドは E2 区が最大となる二次曲線的な変化を示した。また、肝静脈と門脈での NEFA 濃度差は直線的に低下した(図2)のに対し、肝静脈と動脈でのトリグリセリドの濃度差はほとんど変化しなかった(図3)。

エタノール注入量の増加と共に、グルコースとケトン体の正味吸収量は低下、乳酸の正味吸収量は E2 区で最大となる2次曲線的な変化を示した。しかし、肝臓での糖新生量は影響を受けなかった。また、肝臓での NEFA の取り込み量は E3 区で、トリグリセリドの取り込み量は E2 区で最も高くなる傾向にあった。

肝臓でのエタノールの取り込みは、0.1 g/kg/h 程度の注入量(E2 区相当)で飽和し、それ以上では血中エタノール濃度が大きく上昇するとみられた。反芻動物でもエタノールの摂取が肝臓での脂肪蓄積を促進する可能性が示唆されたが、必ずしもエタノール摂取量と相関があるとは限らないことが示唆された。

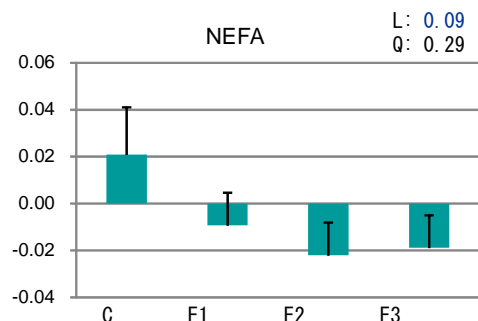


図2. エタノール注入量の増加(C:0, E1:2.5 g/h, E2:5 g/h, E3:7.5 g/h)に伴う NEFA の肝静脈-門脈の濃度差 (mmol/L)。L:直線的効果、Q:二次曲線的効果。負の値は消化器官組織(主に肝臓)での取り込みを表す。

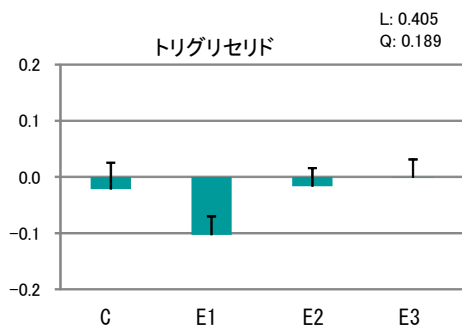


図 3. エタノール注入量の増加(C:0, E1:2.5 g/h, E2:5 g/h, E3: 7.5 g/h)に伴うトリグリセリドの肝静脈-動脈の濃度差 (mmol/L). L:直線的効果, Q:二次曲線の効果. 肝臓からの正味放出はみられなかった。

(3) 異なる栄養水準におけるエタノールの影響 (実験 3)

エタノール区での血漿エタノールのピーク値は、栄養水準にかかわらず 4 mmol/L 程度であったが、ピークからの濃度減少速度は高栄養区の方が高い傾向にあった(図 4)。

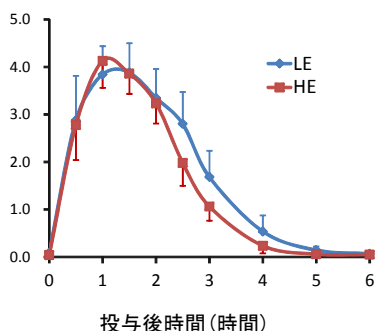


図 4. エタノール投与後の動脈血漿得エタノール濃度 (mmol/L) の変化. LE: 低栄養区, HE: 高栄養区.

酢酸の正味吸収量は高栄養区で高く、エタノール区で低下した。酢酸の内臓組織全体からの正味放出量は、高栄養区ではエタノール注入に伴い低下したが、低栄養区では増加した。グルコースの正味吸収量と糖新生量にはエタノール注入の影響はなかった。乳酸の正味吸収量はエタノール区で低下したが、内臓組織全体からの正味放出量はエタノール区で数値的に増加した。アラニンは逆に、エタノール区で正味吸収量が増加し内臓組織からの正味放出量は低下した(表 1)。トリグリセリドの動脈濃度と内臓組織からの正味放出量は、エタノール区で高い傾向を示した。インスリンとグルカゴンの内臓組織での正味流量にはエタノールの影響は認められなかった。

以上の結果から、エタノール摂取による糖・脂質・アミノ酸代謝の変動は、酢酸を除いて栄養水準による影響を受けないことが示唆された。また長期のエタノール摂取によって、消化管-肝臓間でのアラニンと乳酸の変換が促進されること、さらに肝臓での脂肪合成が増加することが示唆された。

表 1. 栄養水準の異なるヒツジへのエタノール注入が消化器官組織での栄養素の正味流量の及ぼす影響

エタノール	高栄養		低栄養	
	-	+	-	+
血漿流量, L/hr				
門脈 ¹	116	110	68	72
肝静脈 ²	133	120	86	75
動脈血漿濃度 ¹ , mmol/L				
酢酸	0.93	1.56	1.11	1.57
グルコース	3.90	3.84	3.36	3.47
乳酸	0.69	1.36	1.01	1.46
アラニン	0.15	0.15	0.21	0.16
正味吸収量 ¹ , mmol/h				
酢酸	121.7	80.0	53.9	36.8
グルコース	2.3	3.2	-1.3	-1.8
乳酸	8.2	3.8	6.3	2.6
アラニン	3.2	4.7	1.0	1.6
内臓組織からの正味放出量 ² , mmol/h				
酢酸	183.9	112.8	67.5	97.7
グルコース	57.9	35.0	14.9	16.9
乳酸	13.0	20.3	1.7	3.9
アラニン	-0.6	-3.6	-1.6	-2.3

高栄養: 維持量の 1.7 倍. 低栄養: 維持量の 0.7 倍.

¹ n=5 または 6. ² n=3 または 2

(4) 妊娠ヒツジにおけるエタノール給与の影響 (実験 4)

妊娠ヒツジおよび非妊娠ヒツジともに、エタノールの経口投与によって、血漿グルコース濃度が低下し、血漿トリグリセリド濃度が上昇した。妊娠ヒツジの方が非妊娠ヒツジにくらべて血漿 NEFA 濃度が高く、アルコール給与前値に対する給与 6 時間後の血漿トリグリセリド濃度の上昇割合が高かった(147 vs 122%)。

(5) まとめ

乳牛では、泌乳後期から乾乳期にかけて肥満になり体脂肪が過剰に蓄積すると、分娩前後での飼料摂取量が低下しやすく、負のエネルギーバランスに陥り、その際に体組織から多量の脂肪酸が動員され、それが肝臓に取り込まれて脂肪肝を発症しやすい。そのような状況におけるエタノールの摂取は、脂肪肝の発症を助長するのではないかという仮説のもとで本研究を行った。

ヒツジのエネルギー摂取を高栄養から急激に低下させ、体脂肪の動員を高めた状態でエタノールを摂取させると、血漿グルコース

濃度の低下とトリグリセリドの上昇がみられ、エタノールに摂取に伴って肝臓での糖新生の低下と脂肪合成の増加が引き起こされる可能性が示唆された。

しかし、エタノールを短期にあるいは長期間投与した場合のいずれも、肝臓での糖新生量には影響がみられなかったことから、エタノール摂取に伴う血漿グルコース濃度の変化には末梢組織でのグルコースの取り込みと利用の変化が関与していると考えられた。

エタノールの摂取に伴い、乳酸やケトン体の濃度上昇がみられたことから、アルコールデヒドロゲナーゼやアルデヒドデヒドロゲナーゼによってエタノールが代謝される際に消費されるNADの減少がこれらの代謝物濃度に影響していると考えられた。

長期のアルコールの給与によって、肝臓からのトリグリセリド放出量が増加したことから、ヒツジにおけるアルコール摂取は肝臓での脂肪合成を高める可能性がある結論した。この脂肪合成の増加は、血糖値の低下にともなう肝臓での糖代謝量の低下によって、脂肪酸の酸化が低下することで引き起こされるのかもしれない。したがって、アルコール摂取時の脂肪合成増加を抑制するためには、糖源となりやすい飼料や栄養素を添加することが有効となると考えられた。

今後は、実際の肝臓内脂肪蓄積量への影響を明らかにするとともに、周産期乳牛でのアルコールの影響についても検討する必要がある。

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0件)

[学会発表] (計5件)

1. Obitsu T, Nishimura K, Udaka Y, Sugino T, Taniguchi K. Effects of ethanol and feeding levels on splanchnic nutrient metabolism in sheep. ISEP. 9-12 Sep. 2013. California, USA. (予定)
2. 小櫃剛人, 西村加奈子, 宇高優美, 杉野利久, 谷口幸三. 栄養水準の違いがヒツジのアルコール代謝に及ぼす影響. 第62回関西畜産学会. 9月14日. 2012. 和歌山.
3. 杉野利久, 宇高優美, 西村加奈子, 福森理加, 小櫃剛人, 谷口幸三. ヒツジの消化管組織におけるインスリン・グルカゴン流量に及ぼすエタノール注入の影響. 日本畜産学会第115回大会. 3月29日. 2012. 名古屋.
4. 西村加奈子, 宇高優美, 小櫃剛人, 谷口幸三, 杉野利久. ヒツジの第一胃内へのエ

タノール注入が血漿中の酵素活性と代謝物濃度に及ぼす影響. 第61回関西畜産学会. 9月13日. 2011. 岡山.

5. 宇高優美, 西村加奈子, 福森理加, 杉野利久, 小櫃剛人, 谷口幸三. 第一胃内アルコール投与がヒツジのインスリン感受性に及ぼす影響. 第61回関西畜産学会, 9月13日. 2011. 岡山.

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/shiyou/index.shtml>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 幸三 (TANIGUCHI KOHZO)
広島大学・生物圏科学研究科・教授
研究者番号：30093777

(2) 研究分担者

小櫃 剛人 (OBITSU TAKETO)
広島大学・生物圏科学研究科・准教授
研究者番号：30194632

(3) 連携研究者

()

研究者番号：