

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580385

研究課題名(和文) ニンニク茎葉給与ヒツジにおけるタンパク質合成の消化・内分泌機能制御

研究課題名(英文) Digestive and endocrine regulation of protein metabolism in sheep fed garlic leaves

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) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、抗生物質に代わる天然由来の機能性を有する物質が探索されている。本実験ではニンニク茎葉を飼料として有効利用することを目的とし、ヒツジを用いて実験を行った。乾草給与の対照区と給与量の10%をニンニク茎葉で代替した実験区を設定し、消化・内分泌機能を測定した。第一胃内pH、アンモニアおよび揮発性脂肪酸濃度は飼料間に差がなかったが、下部消化管への微生物態窒素供給量、血漿ロイシン代謝回転速度およびタンパク質合成速度は実験区が高かった( $P < 0.05$ )。インスリン作用は飼料間に差がなかった。以上の結果より、ニンニク茎葉は消化・内分泌機能を損なうことなくタンパク質代謝を亢進することが示された。

研究成果の概要(英文)：The increased public concern about residual effects of antibiotics led to ban in antibiotics usage as feed additives. Thus, research for natural alternatives to antibiotics is deemed important. The objectives of this experiment are to use garlic leaves as an animal feed stuff and to see its effects on rumen and body metabolism. Six animals were offered mixed hay (MH) diet or garlic leaves (GL) diet (MH 10% replaced by garlic leaves). Digestive and endocrine functions were determined. Rumen pH, ammonia, and total volatile fatty acids were found similar between two diets. Microbial nitrogen supply, plasma leucine turnover rate and whole body protein synthesis were higher ( $P < 0.05$ ) in garlic diet, but plasma leucine turnover rate decreased during a hyperinsulinemic euglycemic clamp in both diets. Thus, it was concluded that in sheep garlic leaves enhanced protein metabolism without affect on digestive and endocrine functions.

研究分野：家畜栄養生理学

キーワード：タンパク質代謝 ニンニク茎葉 同位元素希釈法 グルコースクランプ法 微生物態タンパク質 第一胃発酵 ヒツジ 飼料開発

## 1. 研究開始当初の背景

牛海綿状脳症(BSE)の発生を契機とし、消費者は食の安全を強く求めている。抗生物質は抗病性、抗菌性、成長促進などの利点があるが、残留性や耐性菌に対する懸念から欧州では2006年に飼料添加物としての使用が禁止された。そのため、抗生物質の代替となり得る機能性物質の開発が重要な課題になっている。ハーブは生薬、香料、呈味料として利用される植物の総称である。家畜・家禽への飼料ハーブ給与は、抗生物質や動物用医薬品の使用を削減できるばかりでなく、飼料ハーブの機能を備えた健康な家畜・家禽を生産し、消費者が求める安心・安全な畜産物を供給できることが期待されている。申請者は、飼料ハーブに注目し、ヘラオオバコ、ホップ曼葉の機能性成分、ヒツジの飼養試験および栄養素代謝に関する研究を実施してきた。

ニンニクは、ネギ科多年草のハーブであり、古くから球根が食用、生薬として利用されてきた。近年、腸管出血性大腸菌 O-157 に対する強力な殺菌作用、癌のリスク軽減などの薬理作用を有することが明らかにされ、これらの機能は含硫有機化合物であるアリシンのほたらきによると考えられている。最近、ニンニク茎葉がニンニク球根の25~40%ものアリシンを含有していることが明らかにされている。しかしながら、ニンニク茎葉は収穫時に畑に放置されるか、産業廃棄物として廃棄されてまったく利用されていないのが現状である。

一方、反芻家畜は第一胃を有するため、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の合成に利用される。微生物態タンパク質は下部消化管で消化・吸収され、宿主の主要なアミノ酸供給源となる。このように、反芻家畜におけるタンパク質の消化・吸収過程はルーメン発酵と関連して複雑であり、飼料タンパク質の給与管理が難しいと考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究では、ニンニク茎葉を反芻家畜の飼料として利用することを目的とし、ヒツジにニンニク茎葉を給与して、その時の第一胃発酵性状、安定同位体化合物の同位元素希釈法

を用いた血漿ロイシン代謝およびタンパク質合成/分解速度を測定するとともに、グルコースクランプ法の Hyperinsulinemic Euglycemic Clamp 法 (HEC 法) を用いて全身のタンパク質合成速度に対するインスリン作用についても検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) 供試動物および飼料

動物の飼養管理およびサンプル採取は岩手大学動物実験委員会承認され、同委員会の指示に従って実施した。実験は交雑種ヒツジ6頭(平均体重  $46 \pm 4$ kg)を用い、1期21日間のクロスオーバー法に従って実施した。動物飼育舎内の単飼ペンで14日間飼料に馴致した後、生物環境制御室(温度  $23 \pm 1$ 、湿度70%、8:00~22:00点灯)に移し、7日間にわたり個別代謝ケージで実験を行った。

飼料として岩手県産の混播牧草(オーチャードグラスとリードカナリーグラス、小岩井農牧、2番草)および青森県田子町の協力農家から譲受けたニンニク茎葉を使用した。ニンニク茎葉は刈取り後に冷凍保存し(-15)給与前に解凍して使用した。実験の処理区として2飼料区を設定した。混播乾草(ME 1.79 kcal/g、CP 12.5%)のみを給与するMH区は維持エネルギーの120%を給与した。実験区はGL区とし、混播乾草の乾物給与量の10%をニンニク茎葉で代替して給与した(CP 12.7%)。表1にニンニク球根および茎葉のアリシン含量を示した。飼料は1日2回8:00と20:00に給与し、飲水は自由とした。同位元素希釈法実験の実施後に飼料条件を入れ替え、同様の実験を繰り返した。

表1 ニンニクのアリシン含量

(mg/g 原物)	球根	茎葉
アリシン	3.7	2.8

### (2) 実験方法

窒素(N)出納試験を実施するため、乾草およびニンニク茎葉は1週間毎に数か所から少量ずつランダムに採取した。採取した飼料は60の乾燥器内で48時間乾燥し、室温で5日間以上風乾した後、秤量した。サンプルの一部を粉砕し、分析までプラスチック製のサンプル瓶に入れ常温で保存した。動物が排泄した糞を全量採取するために糞受けを代謝ケ-

ジの下にセットし、5日間連続して糞を採取した。採取した糞および残飼は飼料と同様に処理して保存した。

尿採取の前日にプラスチック製瓶に6N硫酸を50mL入れて代謝ケージの下にセットし、5日間連続して尿を採取した。採取した尿量を測定し、よく攪拌してサンプル瓶に採取し、分析まで冷凍保存した(-30℃)。ChenとGomes(1992)の方法に従って尿中のプリン代謝物(PD)であるアラントイン、尿酸、キサンチン、ヒポキサンチンを測定し、下部消化管への微生物態窒素供給量を推定した。

実験20日目の採食前、採食開始3および6時間後に胃汁採取器を用いて経口的に第一胃内容液を採取した。直ちに第一胃内pHを測定し、遠心分離(4℃、8000xg、10分間)して上清約50mLをサンプル瓶に取り、冷凍保存した(-30℃)。

実験21日目に[1-<sup>13</sup>C]ロイシンの同位元素希釈法実験を実施した。実験当日の朝、両頸静脈に注入および採血用のカテーテルを装着し、血液凝固防止のために滅菌した3.8%クエン酸ナトリウム溶液でカテーテル内を満たした。生理食塩水に溶解した7.2 μmol/kg<sup>0.75</sup>の[1-<sup>13</sup>C]ロイシンを注入用頸静脈カテーテルから注射した後、直ちに同カテーテルからペリスタポンプを用いて7.2 μmol/kg<sup>0.75</sup>/時で6時間にわたり連続定速注入した。血液は採血用カテーテルから注入開始直前と注入開始2時間後から6時間後まで経時的に採取した。

実験後半の2時間、インスリンに対するタンパク質代謝の反応を測定するため、[1-<sup>13</sup>C]ロイシンの同位元素希釈法に加え、グルコースクランプ法の連続定速注入を実施した。すなわち、[1-<sup>13</sup>C]ロイシンの連続定速注入に加え、インスリン360 mU/kg<sup>0.75</sup>/時の注入速度で連続定速注入した。その間、5分毎に約1 mLを採血して直ちに血糖値を測定し、20%グルコース溶液を可變的に注入して注入前の血糖値を維持した。採取した血液は直ちにヘパリン処理した遠沈管に移して氷冷し、サンプリング終了後、遠心分離(4℃、8000xg、10分間)して血漿を分離し、分析まで-30℃で冷凍保存した。

### (3)分析方法

ニンニク球根および茎葉のアリイン含量は

超高速液体クロマトグラフィー質量分析計(LCMS-8030, 島津製作所, 京都)を用いて測定した。

飼料、残飼、糞および尿中N含量はケルダール法による自動分解装置(Tecator Digestor System, Foss Teactor, Sweden)と自動蒸留滴定装置(Kjeltec 2300, Foss Teactor, Sweden)を用いて測定した。飼料中中性デタージェト繊維(NDF)はvan Soestら(1991)の方法によるファイバーキャップ(FiberCap 2021, Foss Analytical, Sweden)を用いて測定した。尿中プリン代謝物排泄量(アラントイン, 尿酸, キサンチン, ヒポキサンチン)はChenとGomes(1992)の方法にしたがって測定し、下部消化管への微生物態N供給量を推定した。

第一胃内アンモニア濃度はインドフェノール法を用いて測定した(Weatherburn, 1967)。第一胃内VFA濃度は第一胃内容液を水蒸気蒸留した後、ガスクロマトグラフィー(5890, Hewlett Packard, USA)を用いて測定した。血漿遊離アミノ酸、尿素およびアンモニア濃度は全自動アミノ酸分析器(JLC-500/V, 日本電子, 東京)を用いて測定した。血漿乳酸濃度は酵素法(デタミナ-LA, 協和メデックス, 東京)による自動分析装置(TBA-40FR, 東芝メディカルシステムズ, 東京)を用いて測定した。血漿遊離脂肪酸(NEFA)濃度は酵素法を用いて測定した(NEFA C-テスト, 和光純薬, 大阪)。血漿グルコース濃度はグルコースオキシダーゼ法を用いて測定した。血漿β-ケトイソカプロン酸(α-KIC)濃度およびα-[1-<sup>13</sup>C]KICエンリッチメントはRocchiccioliら(1981)およびCalderとSmith(1988)の方法に従って前処理を行い、ガスクロマトグラフィー質量分析計(QP-2010, 島津製作所, 京都)を用いて測定した。

### (4)計算方法

処理区および実験順を要因とする二元配置分散分析を行い、 $P < 0.05$ のときに有意差ありとみなした。また、経時的变化のあるデータは処理区および時間を要因とする反復測定の二元配置分散分析を行った。有意差があったものはさらにTukey-Kramerの多重比較検定を行った。 $P < 0.05$ のときに有意差ありとみなした。

#### 4. 研究成果

##### (1) 消化機能

N 出納試験および N 消化率の結果を表 2 に示した。N 摂取量、糞中 N 排出量および N 消化率、可消化 N 量は飼料間に差がなかった。しかし、尿中 N 排出量は GL 区が高く ( $P < 0.01$ )、N 保持量は GL 区で低かった ( $P = 0.02$ )。

(g/kg <sup>0.75</sup> /日)	MH <sup>1</sup>	GL	SEM	P 値
N 摂取量	1.34	1.34	-	-
糞中 N 量	0.51	0.52	0.01	0.56
尿中 N 量	0.47	0.57	0.02	<0.01
可消化量 N 量	0.85	0.83	0.01	0.68
N 保持量	0.36	0.25	0.02	0.02
N 消化率	62	61	1	0.69

<sup>1</sup>MH 区 = 混播牧草  
GL 区 = 混播牧草 : ニンニク茎葉 (9:1)

尿中プリン代謝物排出量の結果を表 3 に示した。尿中アラントイン、キサンチン・ヒポキサンチン排出量は飼料間に差がなかったが、尿酸、総プリン代謝物 N 排出量は GL 区で高かった ( $P = 0.01$ )。可消化 N 量は飼料間に差がなかったが、可消化 N 量に占める微生物態 N 供給量の割合 (MNS/可消化 N 量) は GL 区が高かった ( $P = 0.01$ )。

(mmol/kg <sup>0.75</sup> /日)	MH <sup>1</sup>	GL	SEM	P 値
アラントイン	0.30	0.35	0.02	0.06
尿酸	0.04	0.07	0.01	0.01
ヒポキサンチン + キサンチン	0.05	0.06	0.01	0.12
総プリン代謝物 N	0.38	0.46	0.02	0.01
MNS	0.44	0.55	0.02	0.01
MNS/可消化 N 量	53	66	5	0.01

<sup>1</sup>MH 区 = 混播牧草  
GL 区 = 混播牧草 : ニンニク茎葉 (9:1)

##### (2) 第一胃内発酵性状

採食に伴う第一胃内 pH、アンモニアおよび VFA 濃度を表 4 に示した。第一胃内 pH、アン

	MH 区 <sup>1</sup>	GL 区	SEM	P 値
pH	6.7	6.7	0.2	0.59
アンモニア	11.8	11.3	0.5	0.34
総 VFA (mmol/L)	79.7	82.7	2.7	0.32
酢酸	61.4	63.7	2.1	0.32
プロピオン酸	12.9	12.8	0.5	0.90
酪酸	3.8	4.3	0.1	0.01
吉草酸	0.3	0.3	0.01	0.03
イソ酪酸	0.6	0.6	0.04	0.85
イソ吉草酸	0.6	0.6	0.05	0.43

<sup>1</sup>MH 区 = 混播牧草  
GL 区 = 混播牧草 : ニンニク茎葉 (9:1)

モニア、総 VFA、酢酸、プロピオン酸、イソ酪酸およびイソ吉草酸濃度は飼料間で差がなかった。一方、第一胃内酪酸および吉草酸濃度は GL 区が高かった ( $P < 0.05$ )。

##### (3) 血漿代謝産物

血漿代謝産物濃度の結果を表 5 に示した。血漿グルコース濃度は GL 区が高かった ( $P = 0.03$ )。血漿フェニルアラニンおよびアルギニン濃度は GL 区で高かった ( $P < 0.05$ )。他の血漿アミノ酸、尿素およびアンモニア濃度は飼料間に差がなかった。

表 5 血漿成分

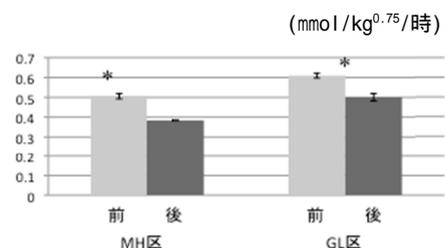
	MH 区 <sup>1</sup>	GL 区	SEM	P 値
グルコース (mg/dL)	59	61	1	0.03
アミノ酸 (μmol/L)				
スレオニン	218	210	35	0.84
バリン	264	263	35	0.97
メチオニン	14	14	2	0.82
イソロイシン	114	93	10	0.09
ロイシン	144	151	18	0.70
フェニルアラニン	47	64	5	0.02
ヒスチジン	41	40	4	0.92
リジン	95	103	18	0.70
トリプトファン	147	196	19	0.05
アスパラギン酸	3.9	5.2	0.04	-
セリン	173	201	21	0.20
アスパラギン	86	92	7	0.45
グルタミン酸	59	56	7	0.68
グルタミン	322	332	30	0.76
グリシン	681	663	84	0.84
アラニン	162	176	12	0.30
チロシン	59	67	4	0.12
アルギニン	119	151	9	0.02
プロリン	91	100	12	0.48
尿素 (mmol/L)	6.0	5.6	0.4	0.32
アンモニア (μmol/L)	88	80	7	0.35

<sup>1</sup>MH 区 = 混播牧草  
GL 区 = 混播牧草 : ニンニク茎葉 (9:1)

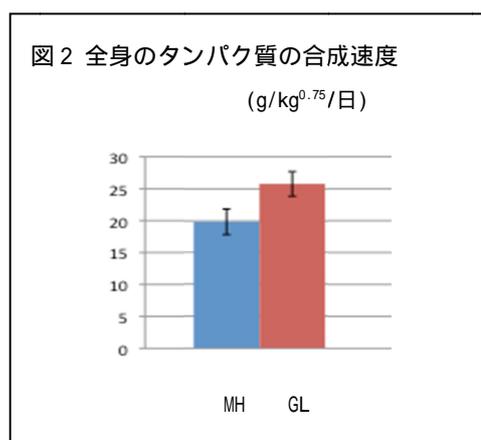
##### (4) 血漿ロイシンおよびタンパク質の代謝

同位元素希釈法実験時において、血漿 -KIC 濃度および血漿  $-[1-^{13}C]KIC$  エンリッチメントは実験の後半、ともにほぼ一定の値が維持された。血漿  $-[1-^{13}C]KIC$  エンリッチメントと  $[1-^{13}C]$ ロイシン注入速度から血漿ロ

図 1 HEC 前後の血漿ロイシン代謝回転速度



イシン代謝回転速度を算出し、図 1 に示した。血漿ロイシン代謝回転速度は GL 区が高かった ( $P < 0.05$ )。血漿ロイシン代謝回転速度と N 出納試験の結果から全身のタンパク質合成速度を算出し、結果を図 2 に示した。タンパク質合成速度は GL 区が高かった ( $P < 0.05$ )。



(5) インスリンに対するタンパク質代謝反応  
インスリン注入の間、[1-<sup>13</sup>C]ロイシンの同位元素希釈法を継続した。インスリン注入開始前、血漿グルコース濃度はほぼ一定の値であったが、インスリン注入後には徐々に低下した。HEC 法の開始に伴って外因性のグルコース注入速度は増加したが、後半の 1 時間にはほぼ一定の値になった。その時の血漿ロイシン代謝回転速度は両飼料区ともにインスリン注入に伴って低下し ( $P < 0.05$ ; 図 1)、飼料間に差はなかった。

#### (6) 結 論

以上の結果より、ニンニク茎葉は消化・内分泌機能を損なうことなくタンパク質代謝を亢進することが示された。

#### < 引用文献 >

Chen, X.B., & Gomes, M.J. (1995) Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives-an overview of the technical details. *International Feed Resources Unit*.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B., & Lewis, B.A. (1991) Methods for dietary fibre, neutral detergent fibre and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, **74**: 3583-3597.

Weatherburn, M.W. (1967) Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Analytical chemistry*, **39**: 971-974.

Rocchiccioli, F., Leroux, J.P., & Cartier, P. (1981) Quantization of 2-ketoacids in biological fluids by gas chromatography chemical ionization mass spectrometry of o-trimethylsilyl-quinoxalinol derivatives. *Biomedical Mass Spectrometry*, **8**: 160-164.

Calder A.G., & Smith A. (1988) Stable isotope ratio analysis of leucine and ketoisocaproic acid in blood plasma by gas chromatography/mass spectrometry. Use of tertiary butyldimethylsilyl derivatives. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, **2**: 14-16.

#### 5 . 主な発表論文等

[学会発表](計 1 件)

Panthee, A., 渡辺ちとせ, V. Paramintra, 畢 雪, M.M. Rahman, X. Liang, & 佐野宏明 (2014) Effect of replacing mix-hay diet with garlic leaves on ruminal characteristics and glucose metabolism in sheep 日本畜産学会第 118 回大会講演要旨 p131. つくば

#### 6 . 研究組織

(1) 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