

氏 名(本籍) おし 押 べ 部 あき 明 のり 徳

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 第 583 号

学位授与年月日 平 成 9 年 11 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学位論文題目 消化管内栄養素投与による反芻家畜の成長ホルモン分泌調節

論文審査委員 (主査) 教 授 佐々木 康 之
教 授 佐 藤 英 明
教 授 太 田 実

論文内容要旨

1. 緒論

世界人口の増加、経済生産の拡大に伴い、畜産物需給は現在以上に逼迫すると予想される。しかし、今後、飼料供給の大きな伸びは期待できず、供給された栄養やエネルギーを効率良く生産物に変換する方法が従来以上に重要になる。

反芻動物において、成長ホルモン（GH）は消化管から吸収された栄養素を泌乳に優先的に分配する事により乳生産の効率を向上させる効果を有している。飼料不足が予測される中、畜産物の効率的な生産には、GHが重要な要素の一つとなる事が報告されている。反芻家畜にGHを投与した際の生産物の量的変化については既に数多くの報告がなされている。しかし、消化管から吸収された栄養素がGH分泌に影響を与えるか否か、また、GHが乳腺血流量（MBF）を介する乳前駆物質の分配に関与しているか否かについては十分に確認されておらず、そのメカニズム解明は行われていない。一方、インスリンは飼料からのエネルギー分配に関しては、GHの作用とは反対に、体組織成分として蓄積する方向に働く。これらの栄養素とGHおよびインスリン分泌の関係、更に、GHによるMBFの変化を介する乳前駆物質の物理的な分配に関する知見は、供給された栄養やエネルギーを効率良く畜産物に変換するためには不可欠な情報である。

そこで本研究は、消化管から吸収された栄養素によってGH分泌がどのような影響を受けるか、また、GHがMBFにどのような影響を及ぼすかを明らかにし、更に、それぞれのメカニズムを解明する事を目的に一連の実験を行った。

2. 消化管内への栄養素投与がGH分泌に及ぼす影響

(1) 第一胃内へのVFAの投与がGH分泌に及ぼす影響

第一胃内において、飼料中の炭水化物および脂質から生産される揮発性脂肪酸（VFA）は反芻動物の最も重要なエネルギー基質になっている。しかし、ウシにおいて、VFAの第一胃内或いは血液中の増加が、GHの分泌にどのような影響を及ぼすかについての研究はなされていない。そこで、第一胃内で生産される主要なVFAである、酢酸、プロピオン酸およびn-酪酸を投与量或いは投与速度を

変えてウシの第一胃内へ投与し、GH分泌に及ぼす影響を検討した。

その結果、第一胃内への酢酸の投与はGH分泌に顕著な影響を及ぼさなかった。しかし、プロピオン酸およびn-酪酸の第一胃内投与はGH分泌を抑制した。更に、このGH分泌抑制の程度は、投与量の増加に伴って増強されるが、GH分泌抑制は血中VFA増加パターンとは無関係であった(図1、図2、図3)。

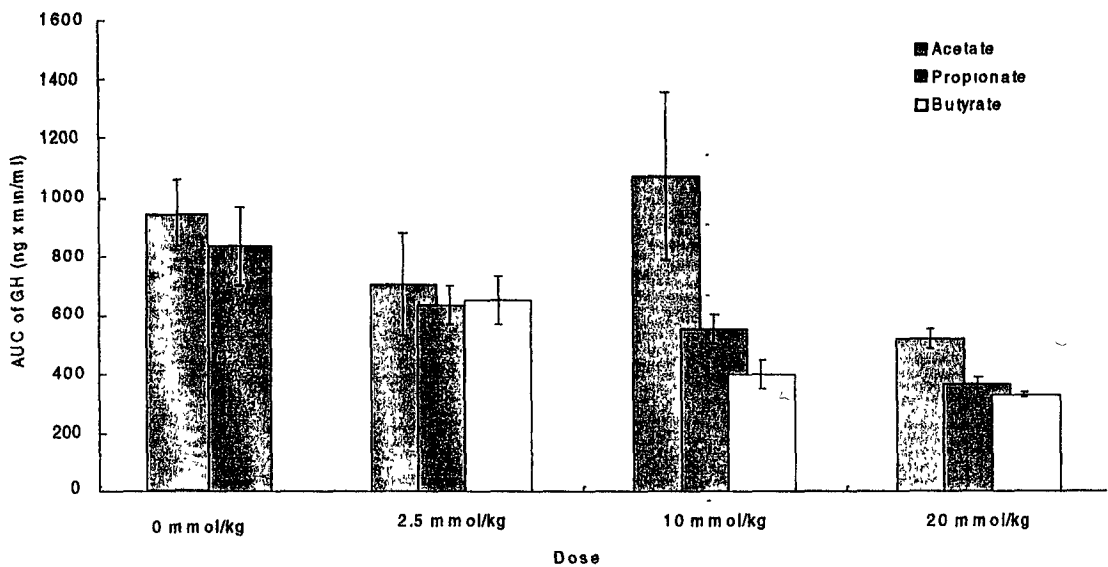


図1. 第一胃内へのVFA投与量とGH分泌量の関係
3頭の子ウシの平均値
星印は対照との間に有意差($P < 0.05$)のある事を示す(Duncan's Multiple range test)。

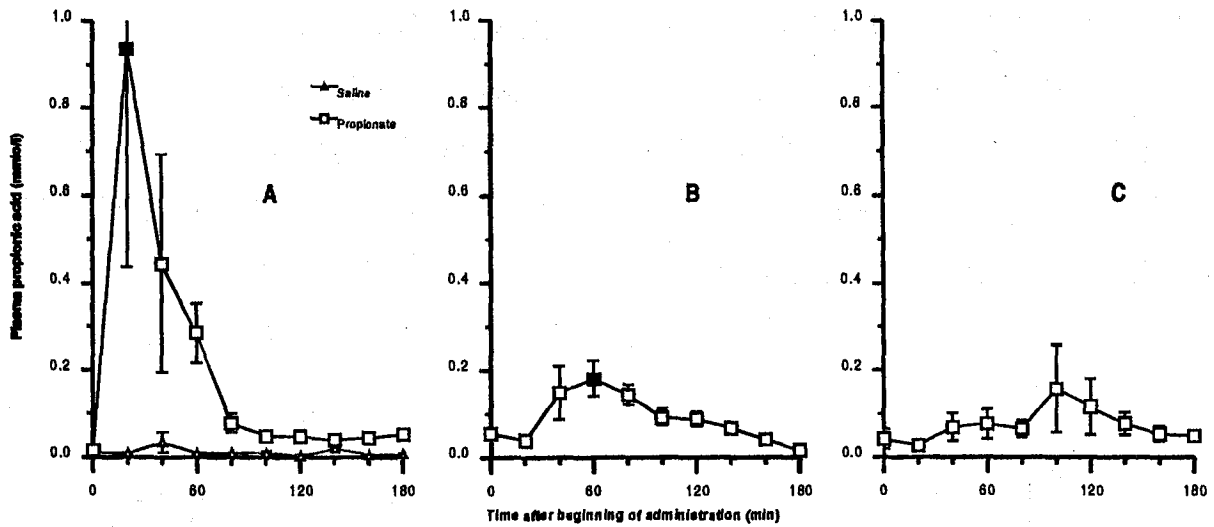


図2. 第一胃内への生理食塩水(A;△)あるいはプロピオン酸 10mmol/kg BW/1min (A;□)、10mmol/kg BW/60min(B)および 10mmol/kg BW/120min(C)投与後の血漿プロピオン酸濃度

3頭の乳牛の平均値および標準誤差

塗りつぶされたシンボルは0分との間に有意差(P<0.05)のある事を示す(Duncan's Multiple range test)。

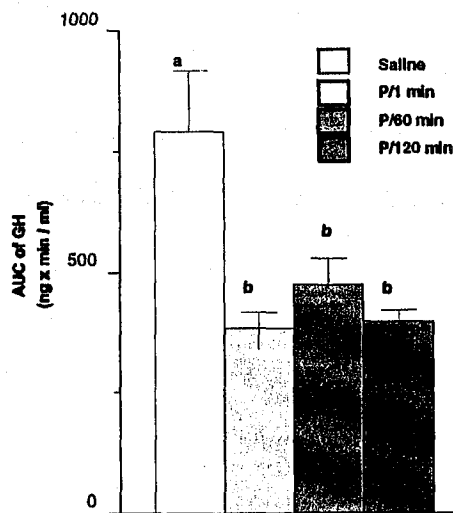


図3. 第一胃内への生理食塩水あるいはプロピオン酸 10mmol/kg BW/1min、10mmol/kg BW/60min および 10mmol/kg BW/120min 投与後180分間のGH分泌量

3頭の乳牛の平均値および標準誤差

異なる符号間には有意差(P<0.05)のある事を示す(Duncan's Multiple range test)。

これらの結果より、血中プロピオン酸および *n*-酪酸の増加は、間接的にGH分泌を抑制する事が示唆された。更に、このGH分泌抑制には血漿インスリンレベルの上昇が関与している可能性が示唆された（図4）。

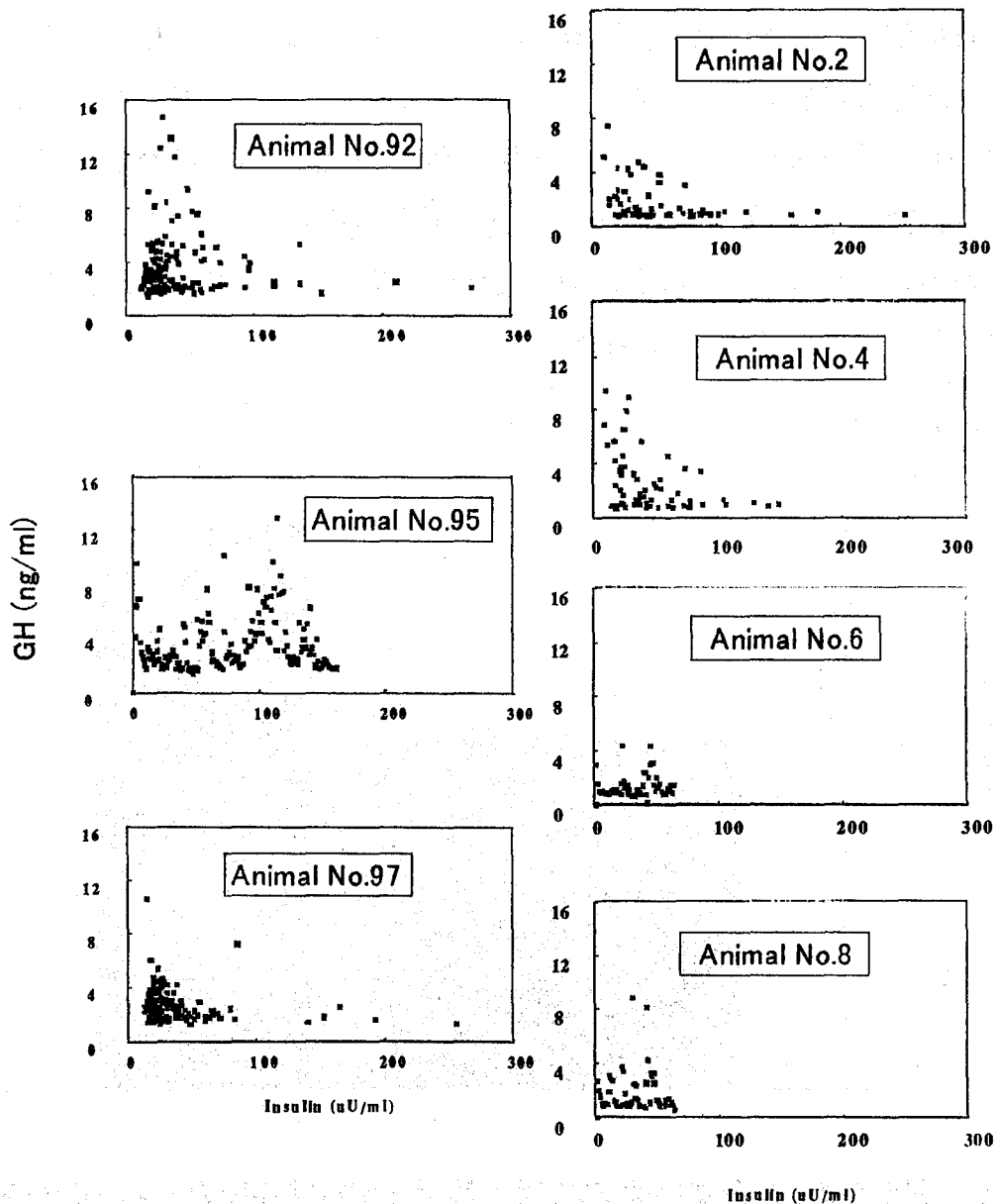


図4. 各個体における第一胃内へのVFA投与前後或いはVFA添加飼料給与前後の血漿GH濃度と血漿インスリン濃度の関係

(2) V F A 添加飼料の給与が成長ホルモン分泌に及ぼす影響

ウシの第一胃内への酢酸を除く V F A の投与は G H 分泌を抑制する事が明らかにされた。しかし、給与飼料と G H 分泌の関係を探る為には、飼料に V F A を添加して給与した場合にも同様の変化が起こる事を確認する必要がある。そこで、酢酸或いはプロピオン酸を添加した飼料をウシに給与し、その際のホルモン分泌の変化を観察した。その結果、酢酸を添加した飼料の給与は G H およびインスリン分泌に顕著な影響を及ぼさなかった。しかし、プロピオン酸を添加した飼料の給与により、インスリン分泌が促進され、同時に血漿 G H 濃度が低い値で推移した (図 5、図 6)。これらの結果から、第一胃内への投与に比べて変化の度合いは小さくなるが、プロピオン酸を添加した飼料の給与によっても、同様のホルモン分泌の変化が起こる事が確認された。

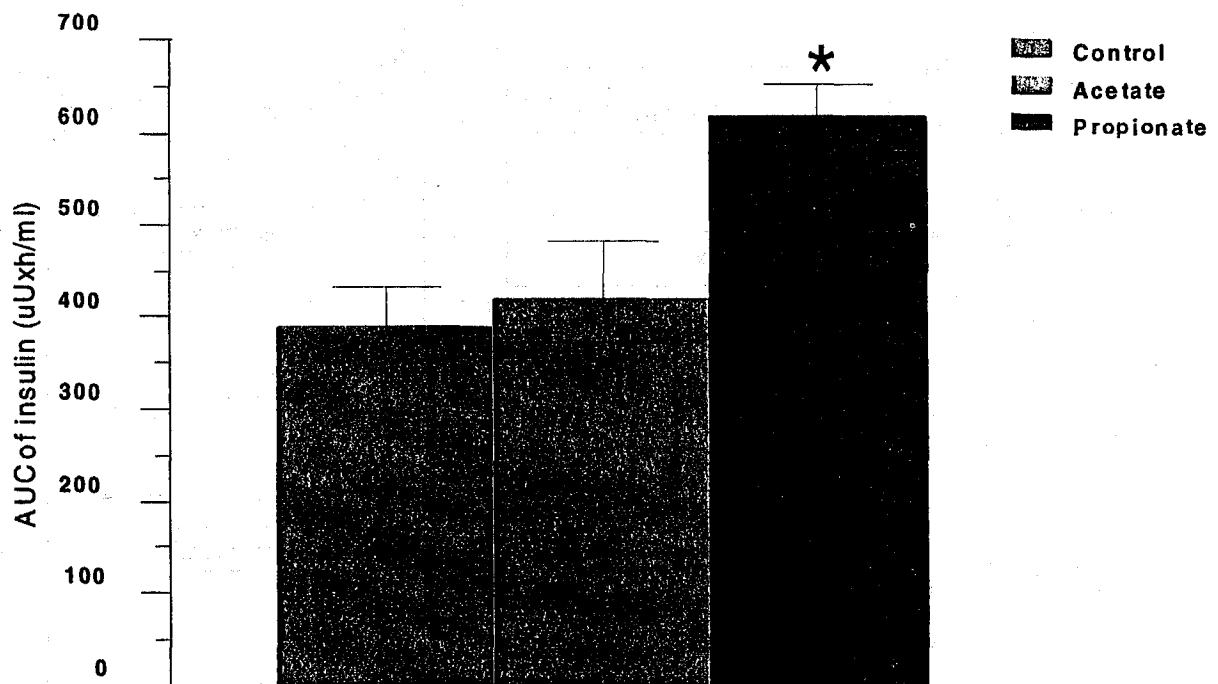


図5. 対照飼料、酢酸或いはプロピオン酸添加飼料給与後のインスリン分泌量
4頭の子ウシの平均値および標準誤差
星印は対照との間に有意差($P < 0.05$)のある事を示す(Duncan's Multiple range test)。

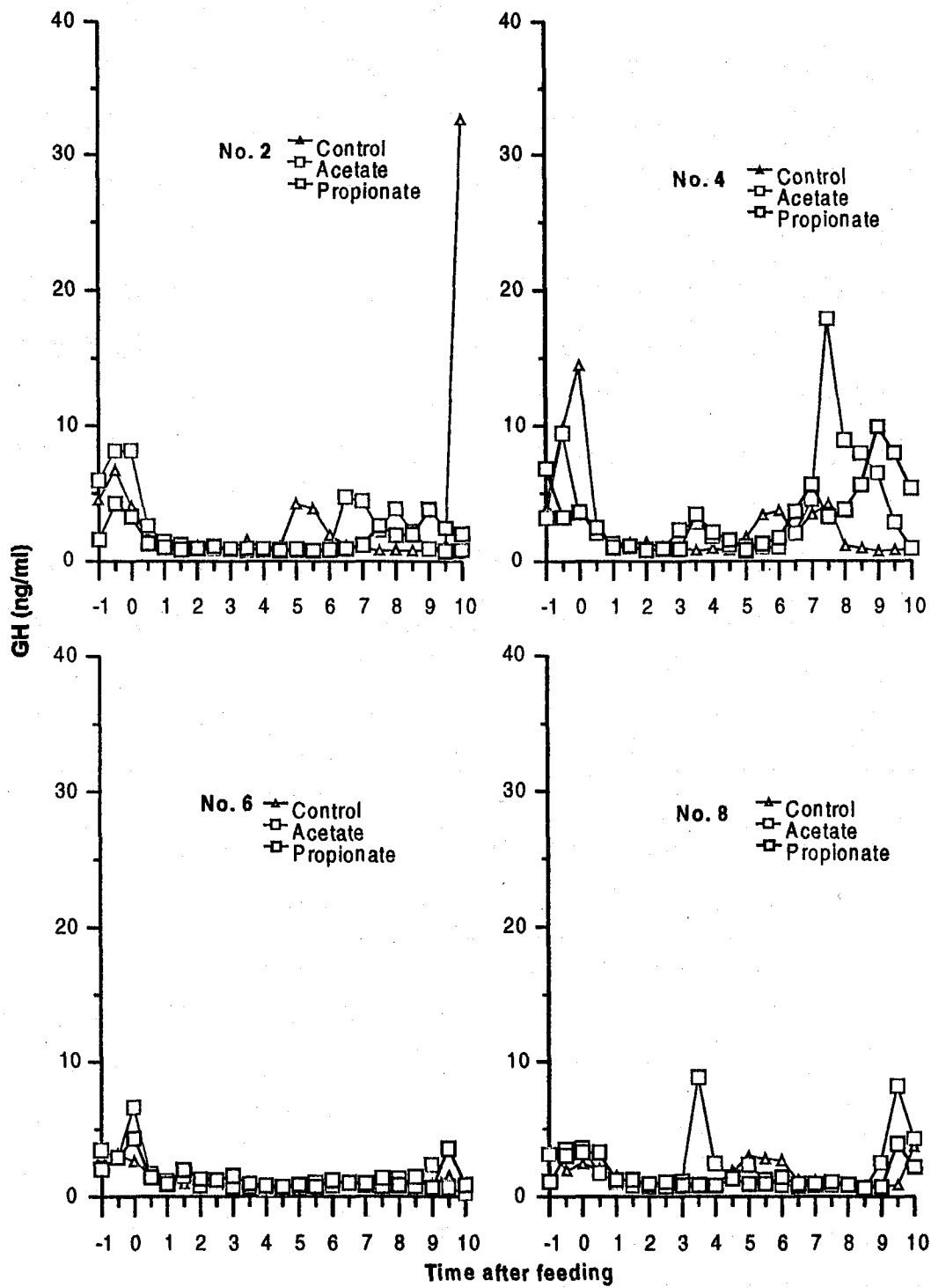


図6. 各個体における対照飼料、酢酸或いはプロピオン酸添加飼料給与前後の血漿GH濃度

(3) 十二指腸内へのアミノ酸注入が成長ホルモン分泌に及ぼす影響

三大栄養素の内、炭水化物および脂質の代謝産物であるVFAをその吸収部位である第一胃内へ大量に投与した場合、プロピオン酸およびn-酪酸がGH分泌を抑制する事が明らかにされた。しかし、蛋白質の代謝産物であるアミノ酸が、その吸収部位である小腸から大量に投与された際に、GHおよびインスリン分泌がどのような影響を受けるかは明らかにされていない。そこで、特徴的な化学構造を持つアミノ酸を、ウシの十二指腸内へ投与し、その際の血中アミノ酸組成、GHおよびインスリン分泌の変化を観察した。投与したアミノ酸とそれにより変化した血漿中遊離アミノ酸の種類と増減およびその時期は表1および図7の通りであった。

表1. 十二指腸内へ投与したアミノ酸および血漿中遊離アミノ酸濃度の変化

注入したアミノ酸	変化した血漿中遊離アミノ酸の種類とその時期	
	注入中	注入後
Arg	Orn△	Orn△
Orn	Orn△	Orn△
Glu	Glu△, Ala△, Orn△	Glu△, Ala△, Orn△ Ile▼
Asp	Asp△	Asp△, Glu△ Cys▼, Ile▼, Leu▼, Phe▼
Leu	Leu△, Glu△, Orn△	Leu△, Glu△, Orn△
Phe	Phe△	Phe△ Asp▼, Glu▼, Ala▼, Val▼, Ile▼

△：注入開始前に比べて有意 (p<0.05) に増加

▼：注入開始前に比べて有意 (p<0.05) に減少

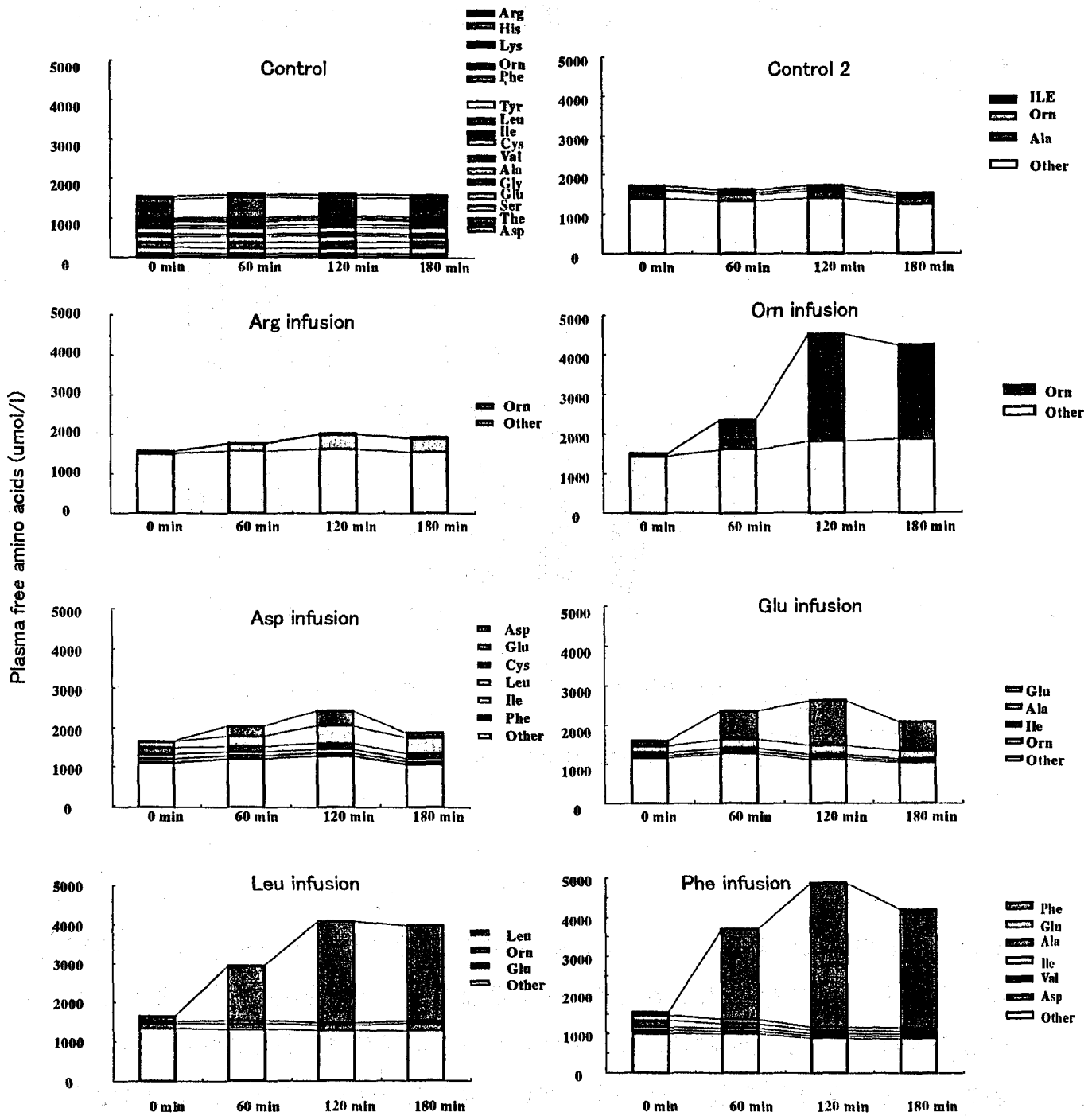


図7. 十二指腸内への生理食塩水或いはアミノ酸溶液注入後の血漿遊離アミノ酸濃度3頭の子ウシの平均値
 対照を除くグラフの凡例に示すアミノ酸は注入開始前の値との間に有意差($P < 0.05$)のある事を示す(Duncan's Multiple range test)。

更に、ウシの十二指腸内への Leu および Phe 注入による GH 分泌の増加が観察された (図 8)。

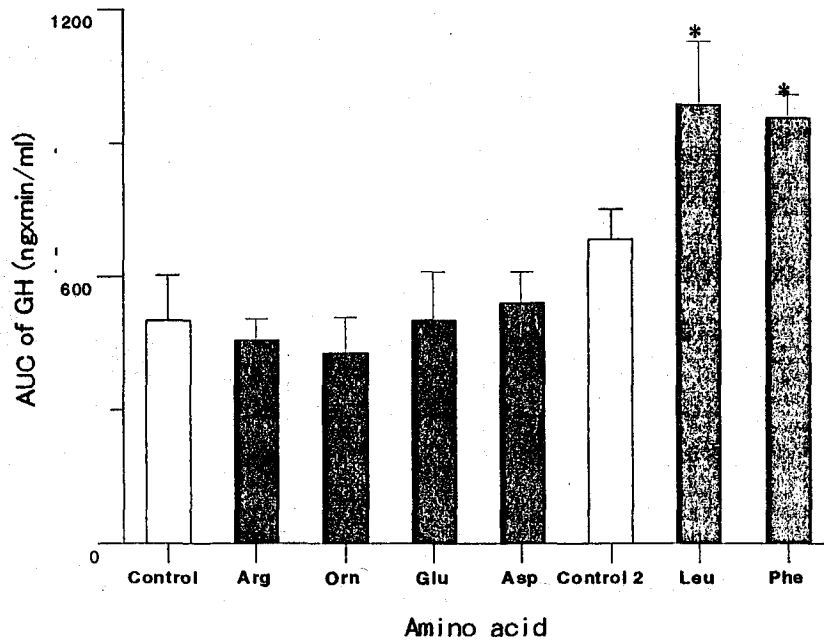


図8. 十二指腸内への生理食塩水(Control1; pH5.2、Control2; pH2.2)或いはアミノ酸溶液注入開始後のGH分泌量
3頭の子ウシの平均値
星印は対照との間に有意差($P < 0.05$)のある事を示す(Duncan's Multiple range test)。

また、Orn の注入によるインスリン分泌の増加も観察された (図 9)。これらの結果から、十二指腸内へ投与されたアミノ酸が血中アミノ酸濃度の増加に反映されるか否かは、アミノ酸の種類によって大きく異なる事が明らかにされた。更に、特定のアミノ酸の十二指腸内への投与が GH 分泌或いはインスリン分泌を刺激する事が明らかにされた。

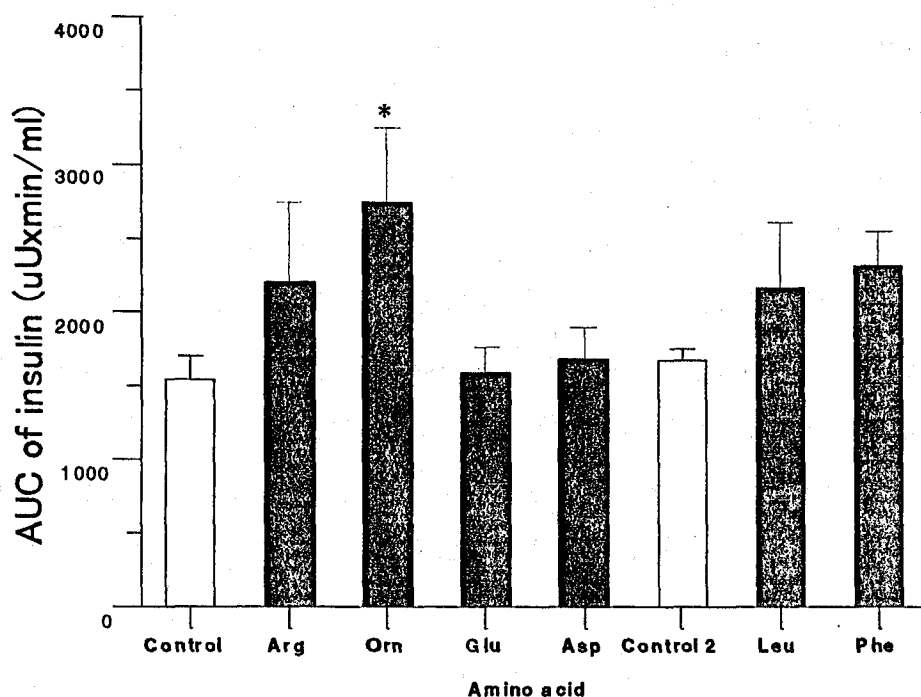


図9. 十二指腸内への生理食塩水(Control1; pH5.2、Control2; pH2.2)或いはアミノ酸溶液注入開始後のインスリン分泌量
3頭の子ウシの平均値
星印は対照との間に有意差($P < 0.05$)のある事を示す(Duncan's Multiple range test)。

3. 血液中インスリンレベルの変化がGH分泌に及ぼす影響

前述の実験結果から、消化管から吸収された栄養素によってGH分泌が変化する事が明らかにされた。更に、GH分泌の抑制には血中インスリンレベルの変化が関与している事が示唆された。そこで、ウシにおける血中インスリンレベルの変化がGH分泌に及ぼす影響を明らかにする事を目的に一連の実験を行った。

(1) アロキサンの投与による膵β細胞破壊が成長ホルモン分泌に及ぼす影響

アロキサンはラット等で膵臓β細胞に壊死を起こさせる事から、低インスリン状態の発現に用いられている。しかし、ウシにおけるその効果についてはほとんど報告されておらず、ウシにおいても同様の効果が得られるか否かを確認する必要がある。そこで、ウシにおけるアロキサンの効果を検討し、更に、アロキサンにより膵臓β細胞を破壊し、インスリン分泌を低く抑えた場合にGH分泌がどの

ように変化するかを検討した。

まず、アロキササン投与前に、第一胃内へプロピオン酸を投与（第1回投与）して、その際の血漿GHおよびインスリン濃度の変化を観察し、10日後に100mg/kg BWのアロキササンを頸静脈内投与した。アロキササン投与後は、臨床症状の有無を観察し、アロキササン投与2日後に、再度、同量のプロピオン酸を第一胃内投与（第2回投与）して血漿GHおよびインスリン濃度の変化を観察した。アロキササンを投与した4頭の内、1頭は投与直後に重篤な症状が観察されたため、第2回投与は行わなかった。残りの3頭の内、1頭における第2回投与後のインスリン分泌量はアロキササン投与前の約80%の減少に留まった。しかし、他の2頭の第2回投与後のインスリン分泌量はアロキササン投与前の10%以下に減少した（図10、図11）。

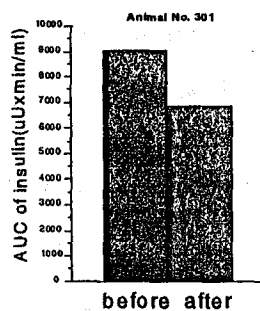


図10. 個体 No.301 におけるアロキササン静脈内投与(100mg/kgBW)前後の第一胃内へのプロピオン酸投与(20mmol/kgBW)後の180分間のインスリン分泌量

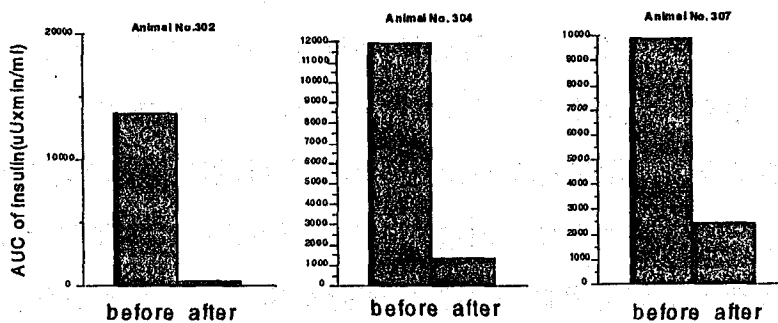


図11. 個体 No.302、No.304、および No.307 におけるアロキササン静脈内投与(100mg/kgBW)前後の第一胃内へのプロピオン酸投与(20mmol/kgBW)後の180分間のインスリン分泌量
* 個体 No.307はアロキササン投与後のプロピオン酸投与は行わなかった。

アロキササン投与によるインスリン分泌の減少が小さかった個体における第1回および第2回投与後の血漿GH濃度の推移に顕著な差は認められなかった（図12）。

しかし、アロキサンの投与によりインスリン分泌の顕著な減少が認められた個体における第2回投与後の血漿GH濃度にはアロキサン投与前には見られなかったスパイク状の上昇が観察された(図13)。これらの結果から、ウシにおけるアロキサンの効果には大きな個体差が存在する事が示唆され、また、インスリン分泌の減少はプロピオン酸の第一胃内投与によるGH分泌抑制を解除する方向に作用する事が示唆された。

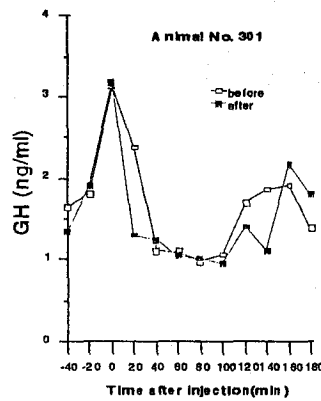


図12. 個体 No.301 におけるアロキサン静脈内投与(100mg/kgBW)前後の第一胃内へのプロピオン酸投与(20mmol/kgBW)前後の血漿GH濃度

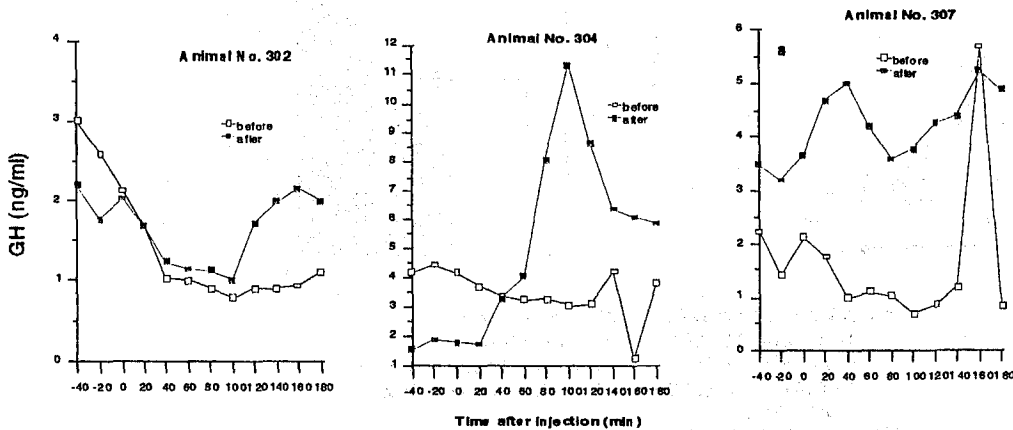


図13. 個体 No.302、No.304、および No.307 におけるアロキサン静脈内投与(100mg/kgBW)前後の第一胃内へのプロピオン酸投与(20mmol/kgBW)前後の血漿GH濃度

* 個体 No.307はアロキサン投与後のプロピオン酸投与は行わなかった。

(2) 静脈内へのインスリンの連続注入がG R F 刺激による成長ホルモン分泌に及ぼす影響

第一胃内へのプロピオン酸或いはn-酪酸投与によって末梢血液中のインスリン濃度が著しく増加した場合に、GH分泌の抑制が観察され、また、また前述の実験においてインスリン分泌が阻害された場合には、この抑制が解除される事が示唆された。血中インスリンレベルの上昇が直接GH分泌に影響するか否かを確認するために、ウシの静脈内へ、インスリン単独、或いはインスリンとグルコースを混合注入しつつ、ウシGH放出因子(GRF)を投与し、GRF刺激によるGH分泌反応の比較を行った。その結果、インスリン注入によって、血漿GH濃度がピーク値に達するまでの時間が短縮されたが、bGRF投与後のGH分泌量に差は認められなかった(図14)。

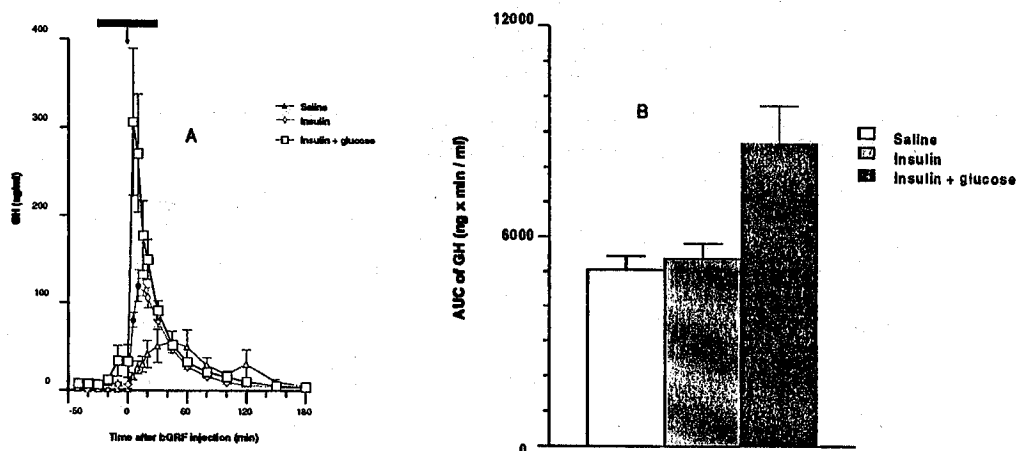


図14. 静脈内への生理食塩水、インスリン(10mU/kgBW plus 42mU/kgBW/h)およびインスリン(10mU/kgBW plus 42mU/kgBW/h)とグルコース(18mg/kgBW/h)混合注入時のbGRF(0.25uU/kgBW)投与前後の血漿GH濃度(A)および投与後のGH分泌量(B)

4頭の子ウシの平均値と標準誤差

A: 横棒(-30~30)は溶液の注入期間を示す。矢印はbGRFの投与時期を示す。塗りつぶされたシンボルは注入開始前の値との間に有意差(P<0.05)のある事を示す(Student's t-test)。

これらの結果から、血漿インスリン濃度の変化がGH分泌に直接的な影響を及ぼす事が明らかにされた。更に、2-(1)および2-(2)における実験の様に、第一胃内のVFA濃度と血中インスリン濃度の両方が上昇する場合と、血中インスリン濃度のみが上昇する場合には、増加した血中インスリンがGH分泌に対して異なる経路で影響を及ぼしている可能性が示唆された。

(3) 静脈内へのインスリンの連続注入が飼料給与前後の成長ホルモン分泌に及ぼす影響

2-(1)および2-(2)の実験において血中インスリンレベルの上昇がGH分泌に対して抑制的に働く事が示唆された。血中インスリンレベルの上昇が生理的に起こる採食後のGH分泌抑制にどのような影響を及ぼすかを検討する目的で、ウシの静脈内へ飼料給与5時間前から給与5時間後までの間、インスリン単独、インスリンとグルコース或いは生理食塩水(対照)を連続注入しGHの基礎分泌量およびパルス状分泌量の比較を行った。

その結果、インスリン単独および混合注入による血中インスリンレベルの上昇は飼料給与後のGHパルス状分泌量を有意に減少させた(図15)。

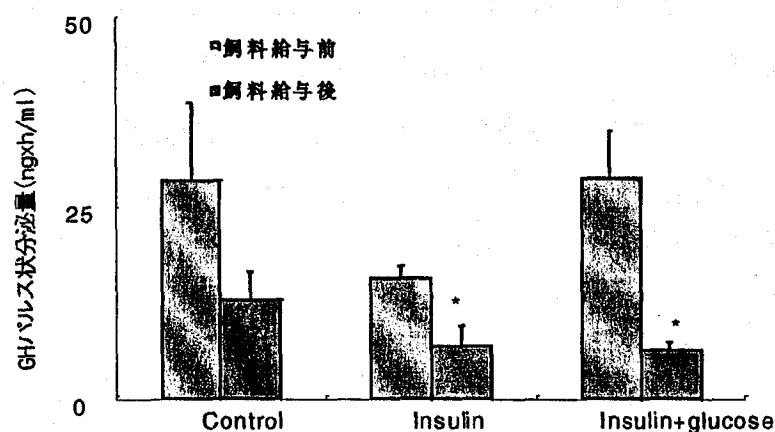


図15. 静脈内への生理食塩水、インスリン(10mU/kgBW/h)およびインスリン(10mU/kgBW/h)とグルコース(75mg/kgBW/h)混合注入開始後におけるGHパルス状分泌量
4頭の子ウシの平均値と標準誤差
星印は飼料給与前の値との間に有意差(P<0.05)のある事を示す(Duncan's Multiple range test)。

この結果からインスリン濃度の上昇はGHのパルス状分泌のピーク値の高さ或いは持続時間を減少させる方向に作用する事が示唆された。

4. 血液中ホルモン濃度と乳腺血流量および泌乳量の関係

前述の一連の実験により、GH分泌は、消化管内に投与された栄養素によって影響を受ける事が明らかにされた。また、GH分泌抑制には、血中インスリン濃度の上昇が関与している事が示唆された。泌乳の開始と維持の為のホメオレシスには、MBFの変化も重要な役割を演じていると考えられている。GHをはじめとする泌乳に関与するホルモンもMBFに影響を及ぼす事が示唆されており、これらのホルモンの血中濃度の変化とMBFの変化の関係を見出す事は、効率的な乳生産を目指す際に重要である。そこでGHおよびインスリン様成長因子I (IGF-I)の血中濃度の変化、MBFおよび泌乳量の変化の関係を見出す事を目的として実験を行った。超音波血流量測定プローブを外腸骨動脈周囲に固定した泌乳ヒツジに、生理食塩水或いは合成ウシ成長ホルモン (rbST) を104時間注入し、泌乳量、MBF、血漿GHおよびIGF-I濃度の変化を観察した。その結果、rbSTの注入により血漿GH濃度は速やかに上昇したが、血漿IGF-I濃度は血漿GH濃度の上昇よりも遅れて上昇し、rbST注入終了後も高い値を維持した(図16)。また、MBFの上昇と下降は、それぞれ泌乳量の上昇と下降より遅れて起こる事が観察された。(図17)。これらの結果から、rbST投与時に観察されるMBFの増加は、乳腺活性増加の原因ではなく、IGF-Iの増加により引き起こされた乳腺活性増加の結果である事が明らかにされた。

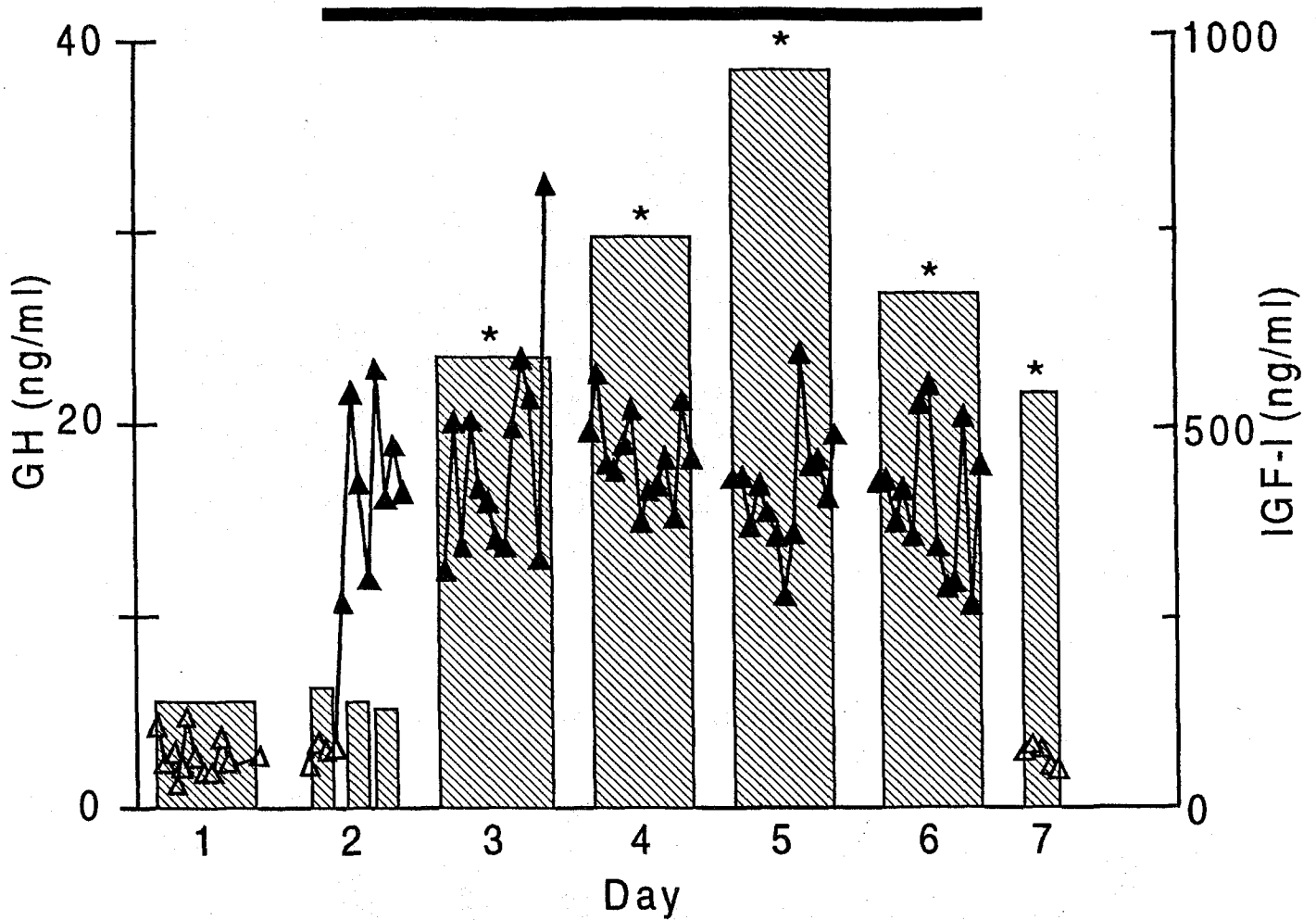


図16. 静脈内へのrbST(20nmol/h)注入に対する血漿GHおよびIGF-I濃度の反応
3頭のヒツジの平均値

折れ線グラフは血漿GH濃度、棒グラフは血漿IGF-I濃度を示す。

横棒はrbST注入期間を示す。

塗りつぶされたシンボルは注入開始前の値との間に有意差($P < 0.05$)のある事を示す(Student's t-test)

星印はの注入開始前の値との間に有意差($P < 0.05$)のある事を示す(Student's t-test)。

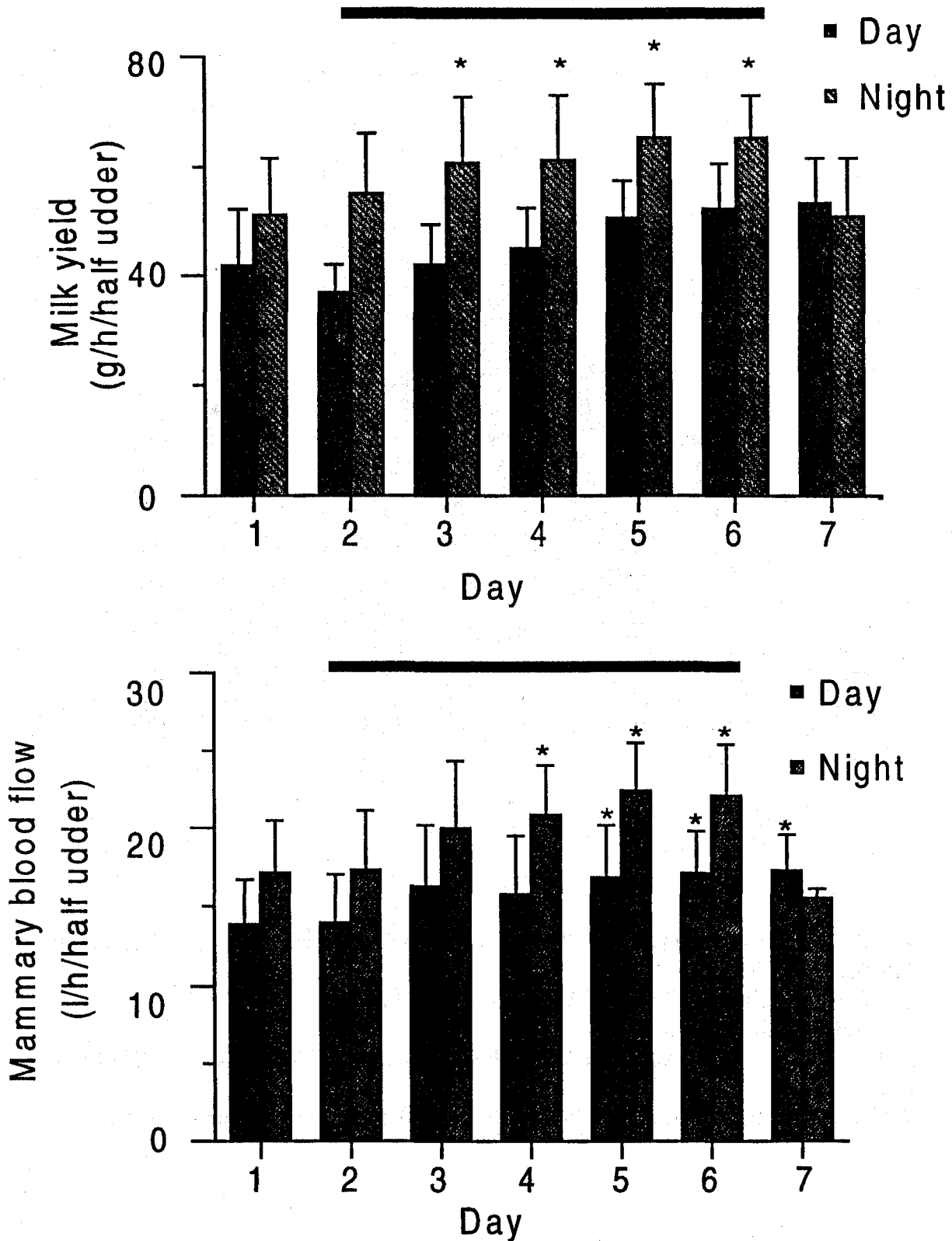


図17. 静脈内へのrbST(20nmol/h)注入に対する泌乳量(A)および乳腺血流量(B)の反応

3頭のヒツジの平均値と標準誤差

横棒はrbST注入期間を示す。

青のカラムは昼間(6:00~17:00までの11時間)を、赤のカラムは夜間(17:00~6:00までの13時間)を示す。

星印はの注入開始前の値との間に有意差(P<0.05)のある事を示す(Paired t-test)。

5. 結論

一連の実験結果から、第一胃内のプロピオン酸および n-酪酸の増加はGH分泌を抑制する事が明らかにされた。更に、抹消血液中のインスリン濃度の増加は、本来存在するGH分泌抑制或いは放出促進機構の作用を増強する可能性が示唆された。また、GH分泌は十二指腸から特定のアミノ酸を投与することによりその分泌が刺激される事が明らかにされた。一方、GHは乳腺血流量の変化を介する乳前駆物質の物理的な分配には直接的効果を及ぼさない事が示唆された。

論文審査結果要旨

反芻家畜において成長ホルモン（GH）は、泌乳の維持に不可欠のホルモンであるばかりでなく、GHの投与は、著しく乳量を増加する。本論文は、反芻家畜の消化管内に存在する各種の栄養素がGH分泌を調節する作用について検討したものである。

はじめに、反芻家畜栄養の特徴的物質である第一胃内において生産される揮発性脂肪酸（VFA）のGH分泌調節作用をウシを供試して検討した。その結果、第一胃内へのVFA投与が著しいGH分泌抑制作用をもつことを見出した。すなわち、プロピオン酸及び酪酸投与は、用量依存的にGH分泌を抑制した。GH分泌に及ぼす酢酸の効果は認められなかった。これらの効果は、VFAを添加した飼料を摂取した場合にも認められた。第一胃内へVFAを投与することによってGH分泌が抑制されるときに、血漿インスリン濃度が上昇することから、GH分泌抑制にインスリンの関与する可能性を示唆した。

次いで、十二指腸内に投与した各種アミノ酸のGH分泌調節作用について検討した。その結果、Arg, Orn, Glu, Aspの十二指腸内投与は、GH分泌を変化させないが、Leu及びPheは明らかにGH分泌を促進する効果をもつ知見を得た。

更に、VFAのGH分泌抑制作用機構についてインスリンとの関係から検討し、膵β細胞の壊死を生ずるアロキサンをウシに投与することによってインスリン分泌を減少させると、プロピオン酸の第一胃内投与によって生ずるGH分泌抑制が緩和されることを見出した。

反芻家畜のGH分泌変動の特徴は、摂食後に生ずるGH分泌の抑制である。この抑制に対するインスリンの効果を検討した結果、血中インスリンレベルの上昇は、飼料給与後のGHのパルス状分泌を有意に減少させることがわかった。

消化管内栄養素によって分泌調節されたGHは、反芻家畜において泌乳量を左右する要因を成す。そこで、増乳時に認められる乳腺血流量の増加とGHの関係を精査したところ、GH投与時に生ずる血流量増加は、IGF-I分泌増加を介した乳腺活性増大によるものであることを解明した。

反芻家畜の主要なエネルギー生成基質であるVFAが、家畜の生産性を向上させる重要なホルモンであるGHの分泌を抑制することを明らかにしたことは、反芻動物生理学の発展に多大の貢献をなすものである。よって、審査員一同、本論文提出者に博士（農学）の学位を授与するに値するものと判定した。