総説

安定同位体利用技術

反芻家畜の栄養生理学研究への安定同位体の利用

小原嘉昭

Reprinted from RADIOISOTOPES, Vol.56, No.7 July 2007



Japan Radioisotope Association

http://www.jrias.or.jp/

総説

安定同位体利用技術

反芻家畜の栄養生理学研究への安定同位体の利用す

小原嘉昭††

東北大学大学院農学研究科 981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1

Key Words: isotope dilution method, domestic ruminant, dairy cow, stable isotope, nitrogen (urea) metabolism, carbohydrate (glucose) metabolism, rumen, hormonal regulation, insulin clamp method, urea recycle, deuterium, carbon-13, nitrogen-15

1. はじめに

ウシ,ヒツジ,ヤギなどの家畜は,第一胃,第二胃,第三胃,第四胃の四つの胃を持っており,反芻家畜と呼ばれている。第一胃は塩酸を分泌する腺胃である第四胃の前に存在し,体重600kgのウシで約180Lの大きさであると言われており,その中に細菌,プロトゾア,真菌などの多数の微生物が存在し,巨大発酵槽を形成している。反芻家畜の飼料は,草類が主体であり,反芻家畜は人類が利用できないセルロスなどの繊維を第一胃内に使息する微生物の作用により分解して酢酸,プロピオン酸,酪酸などの揮発性脂肪酸(VFA)を産生させ,これをエネルギー源として利用できるという特徴を持っている。驚くべきことに反芻家畜はエネルギー消費量の60~70%を

哺乳類において、生体に対して非破壊で無侵 襲の状態で、栄養素の体内での利用を動的に捉 えることができれば、栄養生理学の研究分野に 新たなる情報を提供できると思われる。この場 合, 生体内における単位時間あたりの栄養素の 産生量や消費量を測定する必要があるが、この 測定手技としては,同位体希釈法(体内に同位 体を注入して,同位体の単位時間における希釈 の度合いから代謝量を求める方法) と言う技術 的に複雑な手法を使わなければならない。この 手法を動物の栄養生理学研究に用い始めたころ は、放射性同位元素の使用の規制が比較的緩や かなカナダやオーストラリアにおいて、³Hや ¹⁴C などの放射線同位元素でラベルした VFA, グルコースを用いて動物実験が行われてい た1),4)。しかし、放射性同位元素の使用にあた って制約が厳しい日本において、大・中動物に おいて放射性同位元素を用いての in vivo の動 物実験を行うことは困難であり, この種の研究

Yoshiaki OBARA: Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, 1-1, Amamiya-machi, Tsutsumidori, Aoba-ku, Sendai-shi, Miyagi Pref. 981-8555, Japan. (Present Address: Mito Research Center, Meiji Feed Co., Ltd., 870, Wakamiya, Ibaraki-machi, Higashiibaraki-gun Ibaraki Pref. 311-3123, Japan.)

††現在:明治飼糧株式会社水戸研究牧場 311-3123 茨城県東茨城郡茨城町若宮 870

VFAで賄っている。同時に、反芻家畜は、第一胃内で微生物蛋白質を合成してそれを窒素源として利用できるという、栄養生理学的特徴を持っている。

^{* &}quot;Applications of Stable Isotopes in Life Sciences". Utilization of Stable Isotopes in Nutritional Physiology of Domestic Ruminant.

は、ほとんどが進んでいなかった。動物実験を 行うのに問題のない安定同位体の使用は質量分析計の感度と同位体のコストからして¹⁵Nを除 いて困難であった。

1990 年代から安定同位体の安定供給による価格の低下と質量分析計,あるいは,ガスクロマトグラフィ・マススペクトロメータ(GCMS)機能の目覚しい発達により,測定感度が大幅に改善され,測定の複雑さも解消されてから,¹³C,²H などの安定同位体の使用が拡大した。このことから大動物,中動物を用いての同位体希釈法による実験が可能となった。もちろん,¹⁵Nの利用も以前とは比較にならないほど容易に行うことができるようになった。このような測定技術の進歩と相まって,安定同位体を動物実験に利用できるようになり,かって,不可能であったウシなどの反芻家畜の栄養生理学的特長を明らかにするため,体全体の栄養素の利用を実験的に確かめることが可能となった。

本総説では、最初に、オーストラリアにおいて行われた放射性同位元素に用いた同位元素希釈法による反芻家畜の炭水化物代謝と、安定同位体である¹⁵Nを用いて行ったヒツジの窒素代謝のカイネティクス研究成果について記述する。更に、筆者らがこれまで行ってきた¹⁵N-尿素、アンモニア、¹³C-尿素、プロピオン酸、グルコース、²H-グルコースなどの安定同位体を利用したトレーサ実験と同位元素希釈法を用いて行ってきた反芻家畜の栄養生理研究と泌乳生理研究の成果について紹介する。

2. 放射線同位元素を用いた同位元素希釈法 による反芻家畜の炭水化物代謝の動態解明

反芻家畜体内の栄養素の動態を動力学的(単位時間あたりの栄養素の動き)に解明するための研究手法は、同位元素希釈法である。¹⁴C や ³H などの放射性同位元素はシンチレーションカウンタにより容易に測定できることから利用価値が高い。しかし、多くの国では、これらの放射性同位元素を大、中動物に用いるのには、

放射性同位元素の使用にあたり大掛かりな実験 装置を必要とし、莫大な費用がかかるため研究 を行うのが困難であった。この種の研究は、当 時規制が比較的緩やかであったオーストラリア において活発に行われた。Lengらは4,ヒツ ジを実験動物に用い飼料としてルーサンチャフ 1日800gを自動給餌装置で24等分して1時 間ごとに給与して,動物の栄養摂取を定常状態 にして, 放射性同位元素を用いて同位元素希釈 法による実験を行った。用いた放射性同位元素 は, ¹⁴C-酢酸, プロピオン酸, 酪酸, 乳酸, グ ルコース、³H-グルコースなどである。Leng らは5,これらの一連の研究を行うことにより, 第一胃内における低級脂肪酸の産生速度,吸収 量,体内における低級脂肪酸の利用能,プロピ オン酸からの糖の新生量などを定量的に測定し, 反芻家畜の栄養生理機能の特異性を明らかにし た。また、Annison らは¹⁾ 泌乳牛におけるグル コースと酢酸の体内での利用と乳腺への取り込 みについて、¹⁴C-酢酸と³H-グルコースを用い た同位元素希釈法により実験を行い, 乳牛はグ ルコースと酢酸のほぼ同じ量を体内で利用し, ミルクの乳糖、脂肪合成を活発に行っているこ とを定量的に明らかにした。この時期は、反芻 動物の栄養生理学研究が種々の生理学的手法を 用いて活発に行われ、多くの貴重な発見がなさ れ本研究分野が著しく進展した時代である。

3. ¹⁵N によるヒツジの消化管と体全体にお ける窒素代謝動態解明

反芻家畜における窒素代謝の in vivo における栄養生理学的特長は Nolan らの精力的な研究^{6),7)}により明らかになった。彼らもまたルーサンチャフ1日 800 g を自動給餌装置にて給与するシステムにおいて、¹⁵N-アミノ酸、アンモニア、尿素などを用い同位元素希釈法により実験を行った。一連の研究では、第一胃内でのアンモニア産生、微生物蛋白質合成、下部消化管への移行、窒素の消化管からの吸収量、体内での蛋白質合成量、尿素の合成量など、ヒツジの

窒素代謝を同位元素希釈法とコンピュータ解析を用いて解明した。Nolan らの研究は反芻家畜の体内で起こる窒素代謝を詳細に捉えた優れた研究である。彼らの研究は動物が摂取する窒素量を限定して行っている。

筆者らは、この研究を参考にして、彼らが行わなかった窒素の摂取レベルを変える、濃厚飼料と粗飼料の両方を給与する、窒素代謝と炭水化物代謝の関連性を見るという視点に立って研究を行い新しい知見を得、反芻家畜における代謝のカイネティクス研究を発展させた。

4. in vitro における第一胃内窒素代謝の動態

反芻家畜は,第一胃内に棲息する細菌,プロ トゾア,真菌などの微生物により,飼料中の非 蛋白態窒素を微生物蛋白質に変え、この蛋白質 を体内で利用している。そこで、筆者らは第一 胃内での窒素の代謝動態を明らかにするために, 非蛋白態窒素の一つである¹⁵N-尿素を用いて in vitro において、人工ルーメン発酵試験を行っ た20)。第一胃フィステルを装着したヒツジより ルーメン液を採取し、直ちに2重ガーゼ濾過を 行い、CO2 ガスを十分に吹き込み、これを実験 に供試した。人工唾液 20 mL, 粉末濃厚飼料 480 mg, 粉末乾草 300 mg, 90 atom%の¹⁵N₂-尿 素 24 mg を含む 100 mL の三角コルベンに第一 胃液を 20 mL 加えた。直ちに CO₂ ガスを吹き 込みながら、発酵ガスを逃し外部から酸素が進 入できない特殊な栓を施した。三角コルベンは 38℃, 1秒, 1往復の振盪を行い, 1, 3, 6, 12,24 時間培養した。アンモニア,細菌-N, プロトゾア-N の¹⁵N の測定は日本分光 NIA N-15 アナライザで行った。アミノ酸は日立 KLA-3B型アミノ酸分析計で分析し、同時にフラク ションコレクターでアミノ酸の分画を行い. 15N 用の試料を作成した。

尿素は、培養後、第一胃内のウレアーゼによって速やかに分解し、それに伴ってアンモニアが著しく増加した。¹⁵N−尿素は、図1に示すようにアンモニア、細菌、プロトゾアの区分へ経

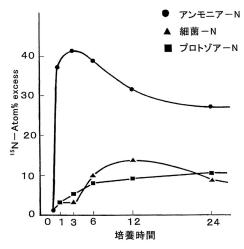


図 1 in vitro 第一胃発酵における NH₃-N, 細菌-N, プロトゾア-N 中の¹⁵N 濃度の経時的変化

時的変化を伴ってスムースに移行した。ピーク はアンモニアで、培養開始後3時間目、細菌蛋 白質で12時間目であった。プロトゾア分画へ の¹⁵Nの取り込みは12時間目まで徐々に増加 したが、1~3時間目での増加が特に大きかっ た。このように、第一胃内微生物は、効果的に 非蛋白態窒素を良質の微生物蛋白質に変換して いることが証明できた。微生物の加水分解物中 の各アミノ酸の¹⁵N 含有率を測定した結果,ア ラニン,グリシン,グルタミン酸,アスパラギ ン酸が高く, シスチンやメチオニンが非常に低 かった。このように TCA サイクルから生成し やすいアミノ酸は¹⁵N 含有率が高い傾向にあっ た。¹⁵Nトレーサ実験により、第一胃内におけ る窒素代謝の動態が in vitro 実験により明らか にされた。

5. ¹⁵N-尿素と¹⁵N-アンモニウム塩を用いた 反芻動物の尿素再循環の解析

反芻家畜は,摂取する窒素が不足する場合, 尿中への尿素の排泄を抑制して,血液尿素を消 化管に移行させ,これを微生物蛋白質の合成に 再利用するという尿素再循環機構を持っている。 反芻家畜を飼養する場合に,尿素再循環機構を 有効に活用することが重要である。しかし,尿

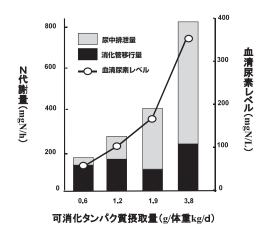


図 2 反芻家畜における血清尿素レベル,尿中尿素 排泄量,消化管尿素移行量に対する窒素摂取 量の影響

素再循環機構を定量的に解明するという試みに ついては、十分な研究がなされていなかった。

筆者ら9),10)は、ヤギを用いて低蛋白質、適蛋 白質、高蛋白質の飼料を給与して、血液尿素レ ベル, 体内の尿素の代謝回転速度, 消化管への 尿素の移行量を求めた。尿素カイネティクスの パラメータは、¹⁵N-尿素の血液注入、¹⁵N-アン モニウム塩の第一胃内注入を行い. 血液と第一 胃内容の15Nの経時変化から Nolan ら6)の方法 によりコンピュータで解析することにより求め た。その結果をまとめて図2に示した。血液尿 素レベルは、飼料中の摂取エネルギーが一定で あれば, 摂取する窒素量に比例して増加するこ とを示し、血液尿素が摂取する窒素量を推定で きる指標となることを明らかにした⁸⁾。体内の 尿素の代謝回転速度も, 摂取窒素量すなわち血 液尿素量に応じて、増加することが観察され た90,100。また、消化管に再循環する尿素量は、 低蛋白質飼料給与では, 尿素代謝量のうちの 80%以上が消化管に再循環され、尿素が消化 管で再利用される機能が活発になることを明ら かにした110。しかし、高蛋白質飼料給与では、 70%以上が尿中に排泄され、Nが無駄に使わ れていることが示された。反芻家畜を飼育する 際には、反芻家畜が持つ生理機能である尿素再 循環機能を活用した窒素の節約を図る飼養技術 開発の可能性が示唆できた。

6. 安定同位体(15N, 13C, 2H)を用いた同位 元素希釈法による子ウシのグルコースと 尿素代謝動態の解析

哺乳期の反芻家畜は、単胃動物と同様にミル クを栄養源としているが、離乳後(生後6週間 で離乳),第一胃の発達に伴い反芻家畜独特の 栄養吸収機構を持つようになる。反芻家畜にお いては、第一胃機能の発達に伴って糖代謝や窒 素代謝が離乳を境にして大きく変化することが 予測される。しかしながら、これまで反芻家畜 の離乳に伴う代謝を動的に捉えた研究はほとん ど報告されていない。筆者らは離乳前3週齢の 哺乳子ウシと離乳後の13週齢,24週齢の子ウ シを用いて D- $[6-^{2}H_{2}]$ -グルコース, D- $[U-^{13}C]$ -グルコース, ¹⁵N₂-尿素, ¹³C-尿素の経静脈内単 一注入による同位元素希釈法により、グルコー スと尿素の代謝回転速度(単位時間あたりの栄 養素の代謝量)と再循環量を求める実験を行っ た3)。

子ウシは、日本飼養標準に従い飼料給与を行 い、栄養素の代謝を定常状態にするため1日分 の飼料を4週齢では6回,13週齢,24週齢で は12回に分けて自動給餌装置で給与した。2H-グルコース用試料の処理は、Wieckoら²²⁾及び Rose ら¹⁵⁾の方法に基づいて行い、ガスクロマ トグラフィ・マススペクトロメータ:GCMS (5890series II. Hewlett Packard, Washington, DC: JMS-SX 102A, Nihon Denshi, 日本) によ り測定した。¹³C-グルコースの試料の処理は, Sano ら¹⁹⁾の方法に基づいて行い, GCMS (DEL-TAPLUS, ThermoQuest, Germany) を用いて同位 体比を測定した。¹⁵Nと¹³C 尿素試料の処理は、 Sutoh ら²¹⁾の方法に基づいて行い, EA/IR-MS (DELTAPLUS, Finnigan MAT, ThermoQuest, USA)により同位体比の測定を行った。グル コースと尿素の代謝回転のパラメータは,同位 体比の経時的変化から White ら²³⁾と Nolan ら⁶⁾

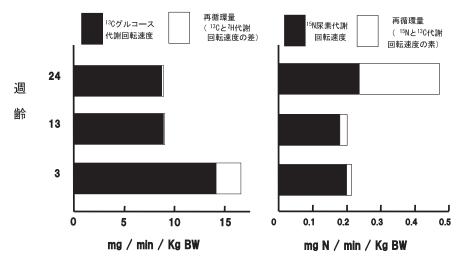


図3 子ウシにおけるグルコース及び尿素の代謝回転速度の離乳に伴う変動

の方法に従いコンピューター解析により求めた。 本実験で得られた子ウシの離乳前後における 加齢に伴うグルコースと尿素代謝のカイネティ クスの変動をまとめて図3に示した。血漿グル コース濃度は13週齢で増加し24週齢で有意に 低下した。¹³C及び²Hによるグルコースのイ リバーシブル・ロス(代謝回転速度を表すもの で、例えば、グルコースのプールから一定の速 度で消失して2度とそのプールに戻ってこない ものを言う) は両者ともに離乳に伴って有意に 低下した。グルコースの再循環量(グルコース のプールから一定の速度で消失して, 再びその プールに戻って来る単位時間あたりの量を示す もので.13C と2H-グルコースのイリバーシブル ・ロスの差から求める)は、離乳前の 2.46 mg/ 分・体重 kg から 24 週齢の 0.21 mg/分・体重 kgへと著しく低下した。離乳前では乳酸から のグルコースの合成が盛んに行われていること

血液尿素レベルは、離乳に伴って有意に増加した。¹⁵N-尿素のイリバーシブル・ロスは離乳に伴ってほとんど変化しなかったが、¹³C-尿素のイリバーシブル・ロスと尿素の再循環量(¹³Cと¹⁵N-尿素のイリバーシブル・ロスの差)は24週齢で明らかに増加した。尿素の消化管へ

が窺われた。

の再循環が、24週齢で活発に行われるようになることを示している(図3)。

7. 安定同位体(¹⁵N, ¹³C)を用いた同位元素希釈法による反芻家畜の窒素代謝と炭水化物代謝の関連性

筆者らは, 摂取する飼料中の窒素量を一定に して炭水化物、特に易発酵性炭水化物を給与し た場合, 反芻家畜の窒素代謝の動態にどう影響 するかについて研究を行った^{12),13)}。この研究で は, 易発酵性炭水化物としてショ糖を添加した 場合の第一胃内アンモニア-N 及びバクテリア-N, 血液尿素-N, 並びに第一胃内プロピオン 酸,血液グルコースの代謝動態を[U-13C]D-グ ルコースと¹⁵N₂-尿素の頸静脈内注入, [2-¹³C] プロピオン酸ソーダ、¹⁵N-アンモニアの第一胃 内注入による同位元素希釈法によって測定した。 実験結果をまとめて図4に示した。易発酵性炭 水化物の添加によって第一胃内の微生物の代謝 が活発になり、第一胃における総 VFA の産生 速度が上昇し、プロピオン酸の産生速度が大き く上昇した。第一胃内の細菌による蛋白質合成 速度, 特にアンモニアの同化による合成速度が 上昇し、第一胃内アンモニア濃度が低下した。 第一胃粘膜からのアンモニア吸収速度が低下し,

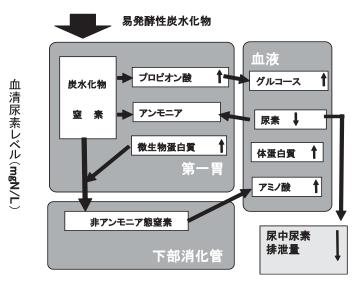


図4 易発酵性炭水化物の添加が反芻家畜の窒素代謝に及ぼす影響

アンモニア由来の尿素生成速度が低下した。微 生物態蛋白質又は未分解の飼料蛋白質及びペプ チドとしての下部消化管への流下速度が上昇し 体内へのアミノ酸吸収量が増加した。第一胃内 におけるプロピオン酸の産生速度の上昇は、糖 新生によるグルコースの合成速度の上昇とイン スリンの分泌亢進をもたらした。この変化によ って,消化管から吸収されたアミノ酸からのグ ルコース合成への利用量が節約され、抹消組織 へのアミノ酸供給が増加した。VFA 及びグル コースとしてのエネルギー供給速度や, アミノ 酸の供給速度が増加することにより体内での蛋 白質合成速度が上昇した。第一胃内での微生物 代謝の変化は、第一胃粘膜を介しての血液尿素 窒素の第一胃内移行速度を上昇させる。血中尿 素の第一胃内移行速度上昇の直接的な要因は明 らかではないが、易発酵性炭水化物の給与は、 尿中への尿素の排泄を抑制し尿素再循環機構を 介して窒素利用を効率的に利用することが明ら かになった (図4)。

これらの実験結果は、反芻動物が持つ生理学的特徴である尿素再循環機構を有効に利用することにより、蛋白質飼料の節約と糞尿中への N 排泄量を低減化する新たな飼養法の開発の可能

性も示唆しており、今後の環境問題を考える上で画期的な研究成果と言える。以上のように、トレーサを用いた同位元素希釈法による代謝速度の測定によって、飼料への易発酵性炭水化物の添加が動物体へのアミノ酸供給速度を上昇させるだけでなく第一胃及び体内の炭水化物代謝を介して、体内のN代謝動態に大きく寄与していることが明らかになった。

8. ²H-グルコースを用いた同位元素希釈法 とユーグリセミック・インスリンクラン プ法による泌乳牛の糖代謝の内分泌制御

ウシの泌乳を制御するホルモンの中で成長ホルモン(GH)が最も重要な生理活性物質であることが明らかにされ、バイオテクノロジーの技術革新と相まって、GHの酪農分野における応用研究がアメリカを中心にして数多くなされてきた²⁾。反芻家畜におけるGHによる増乳効果には、視床下部から分泌される成長ホルモン放出ホルモン(GHRH)、成長ホルモン抑制因子(GIF;ソマトスタチン)、下垂体前葉から分泌されるGH、肝臓などで作られるインスリン様成長因子-I(IGF-I)から乳腺に至るソマトトロピン軸が関与していることが想定されて

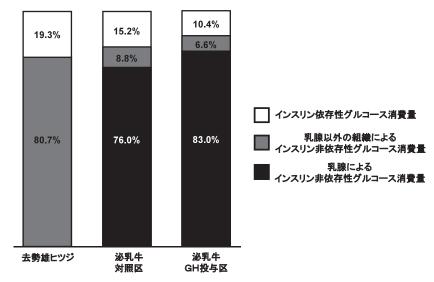


図5 成長ホルモン投与による泌乳牛の体内におけるグルコースの消費割合

いる。筆者らは泌乳牛を用いてソマトトロピン 軸と泌乳の関連性を明らかにするために興味あ る研究を行ったので、それらの結果について述 べる。

筆者らは泌乳牛におけるグルコース代謝とその内分泌制御機構を明らかにするために、乳糖合成の前駆物質として重要な役割を果たすグルコース代謝のカイネティクスとインスリン、GHなどの代謝性ホルモンとの関連性を明らかにするために研究を行った¹⁵⁾⁻¹⁸⁾。

実験には、泌乳牛を用い GHRH, GIF, GHの 頸静脈内連続投与、ユーグリセミック・インス リンクランプ法 (インスリン注入によって低下した血液グルコースを外因性のグルコースを注入することにより実験期間一定に保ち生理実験を行う手法)、安定同位体で標識した D-[6-2H2] -グルコースの定速連続注入による同位元素希釈法などの手法を用いた。この実験から乳牛の乳生産におけるソマトトロピン軸の制御、インスリン抵抗性 (インスリン感受性のある筋肉や脂肪組織でのインスリンによるグルコースの取り込みを抑える作用)、グルコースの生産量と代謝量の関連性について、いくつかの新しい知見を得た。

泌乳中・後期の乳牛におけるインスリン抵抗 性は GHRH や GH の注入で増加したが、泌乳 前期ではその効果は観察できなかった。泌乳中 ・後期のインスリン抵抗性の増加には血液中 GH, IGF-I 濃度の上昇が関連していた。泌乳 前期の泌乳最盛期には、グルコースの乳腺への 配分が最もダイナミックに働いているため GH の効果が観察されなかったものと思われる。泌 乳中・後期において、インスリン依存性のグル コース消費量は、体内で消費される全グルコー スのわずか15%前後で、同じ反芻家畜である ヒツジと比較しても少なかった(図5)。この コース消費を行う代表的な組織である乳腺にお いて、多くのグルコースが使われていることを 示唆する。泌乳牛に GH を投与すると筋肉や脂 肪などの組織へのインスリン依存性グルコース の取り込みが抑制され、乳腺に配分されるグル コース量が増加した。GH 投与は泌乳基質確保 のために、インスリン非依存性のグルコースの 取り込みも増強する可能性を示唆している。

以上のことをまとめると、泌乳中の乳牛は視床下部から乳腺に至る GH の制御系であるソマトトロピン軸を介して筋肉や脂肪などのインス

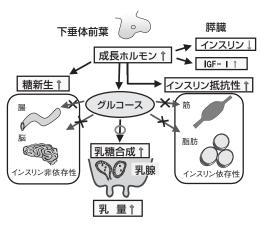


図6 泌乳牛のグルコース代謝と内分泌制御機構

リン感受性組織におけるグルコースの取り込みを抑制して、グルコースを優先的に乳腺に配分して乳量を増加させる(図6)。しかし、この作用は泌乳中・後期のみに見られる作用であり泌乳最盛期では外因性 GH の効果は見られなかった。

9. 終わりに

筆者らは、安定同位体である¹⁵N を用いて第一胃内の窒素の動態を追跡するトレーサ実験を行い、反芻家畜の第一胃内における微生物の蛋白質合成の様相を明らかにし、更に蛋白質を構成しているアミノ酸への¹⁵N の取り込みについて世界に先駆けて明らかにした。

更に、ヤギ、子ウシ、泌乳牛などの家畜を用いて¹⁵N-尿素、アンモニウム塩、¹³C-グルコース、プロピオン酸、尿素、²H-グルコースを用いた同位体希釈法により、反芻家畜の栄養生理学的特徴、特に炭水化物と窒素代謝について定量的に解明した。本研究成果は、動物体の栄養素の動的代謝を非破壊的に、非侵襲的に捉えた貴重な成果である。これらの研究成果は、世界の反芻家畜生理学の分野において高く評価を受けている。今後は、各種臓器における栄養素の利用動態などの解明を血管のカニュレーションによる動静脈差法と同位元素希釈法を用いて行えば、更に反芻家畜の臓器特異性など栄養生理学的特徴が明らかにできると思われる。この分

野の今後益々の研究の発展を期待してやまない。

文 献

- Annison, E. F., Bicherstaffe, R. and Linzell, J. L., Glucose and fatty acid in cows producing milk of low fat content, *J. Agric. Sci.* (*Camb.*), 82, 87-95 (1974)
- Burton, J. L., McBride, B. W., Block, E., Glimm, D. R. and Kenedy, J. J., A review of bovine growth hormone, *Can. J. Anim. Sci.*, 74, 167-201 (1994)
- Hayashi, H., Kawai, M., Nonaka, I., Terada, F., Katoh, K. and Obara, Y., Developmental changes in the kinetics of glucose and urea in Holstein calves, J. Dairy Sci., 89, 1654-1661 (2006)
- 4) Leng, R. A., Formation and production of volatile fatty acid in the rumen. In: Philipson A. T. (Ed.), Physiology of Digestion and Metabolism in the Ruminant, pp. 406-421, Oriel Press Ltd., Newcastle upon Tyne, England (1970)
- Leng, R. A. J., Steel, W. and Luick, J. R., Contribution of propionate to glucose synthesis in sheep, *Biochem. J.*, 103, 785-790 (1967)
- Nolan, J. V. and Leng, R. A., Dynmic aspects of ammonia and urea metabolism in sheep, *Br. J. Nutr.*, 27, 177-194 (1972)
- Nolan, J. V. and Leng, R. A., Isotope techniques for studying the dynamics of nitrogen metabolism in ruminant. *Proc. Nutri. Soc.*, 33, 1-8 (1976)
- 8) 小原嘉昭,新林恒一,米村寿男,尿素飼料給与 時のめん羊の第一胃内性状の変動,日本畜産学 会報,46,140-145(1975)
- Obara, Y. and Shimbayashi, K., The appearance of re-cycled urea in the digestive tract of goats during the final third of a once daily feeding of a low-protein ration, *Br. J. Nutr.*, 44, 295-305 (1980)
- Obara, Y. and Shimbayashi, K., The appearance of recycled urea in the digestive tract of goats fed high-protein ration, *Jpn. J. Zootech. Sci.*, 58, 611-617 (1987)
- Obara, Y. and Shimbayashi, K., Quantitative aspects of appearance of re-cycled urea in the digestive tract of goats, *Jap. Agri. Res. Quart.*, 21, 284-290 (1987)
- 12) Obara, Y., Dellow, D. W. and Nolan, J. V., The influence of energy-rich supplementation nitrogen

- kinetics in ruminants. In Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminant (Eds., Tsuda, T., Sasaki, Y. and Kawashima, R.), pp.515-539, Academic Press, San Diego (1989)
- 13) Obara, Y. and Dellow, D. W., Effects of intraruminal infusions of urea, sucrose or urea plus sucrose on plasma urea and glucose kinetics in sheep fed chopped lucerne hay, J. Agric. Sci. (Camb.), 121, 125-130 (1993)
- 14) Obara, Y., Fuse, H., Terada, F., Shibata, M., Kawabata, A., Sutoh, M., Hodate, K. and Matsumoto, M., Influence of sucrose supplementation on nitrogen kinetics and energy metabolism in sheep fed with lucerne hay cubes, *J. Agric. Sci.* (Camb.), 123, 121-127 (1994)
- 15) Rose, M. T., Obara, Y., Itoh, F., Hashimoto, H., Takahashi, Y. and Hodate, K., Non-insulin and insulin mediated glucose uptake in dairy cows, J. Dairy Res., 64, 341-353 (1997)
- 16) Rose, M. T., Obara, Y., Itoh, F., Hashimoto, H., Takahashi, Y. and Hodate, K., Growth hormone does not affect non-insulin independent glucose uptake, Exp. Physiol., 82, 749-760 (1997)
- 17) Rose, M. T., Obara, Y., Fuse, H., Itoh, F., Ozawa, A., Takahashi, Y., Hodate, K. and Ohashi, S., Effect of growth hormone-releasing factor on the response to insulin of cows during early and late

- lactation, J. Dairy Sci., 79, 1734-1745 (1996)
- 18) Rose, M. T., Itoh, F., Matsumoto, M., Takahashi, Y. and Obara, Y., Effect of growth hormone on insulin independent glucose uptake in dairy cows, J. Dairy Res., 65, 423-431 (1998)
- 19) Sano, H., Fujita, T., Murakami, M. and Shiga, A., Stimulative effect of epinephrine on glucose production and utilization rates in sheep using a stable isotope, *Anim. Endocrinol.*, 13, 445-451 (1996)
- 20) 新林恒一, 小原嘉昭, 米村寿男, in vitro 第一胃 発酵による遊離アミノ酸の変動と尿素―¹⁵Nの 微生物体への取り込み, 日本畜産学会報, **46**, 243-250(1975)
- 21) Sutoh, M., Obara, Y. and Miyamoto, S., The effect of sucrose supplementation on kinetics of nitrogen, ruminal propionate and plasma glucose in sheep, J. Agr. Sci. (Camb.), 126, 99-105 (1996)
- 22) Wiecko, J. and Sherman, W. R., Boroacetylation of carbohydrates. Correlations between structure and mass spectral behavior in monoacetylhexose cyclic boronic esters, J. Am. Chem. Soc., 98, 7631 (1976)
- 23) White, R. G., Steel, J. W., Leng, R. A. and Luick, J. R., Evalution of three isotope-dilution techniques for studying the kinetics of glucose metabolism in sheep, *Biochem. J.*, **114**, 203-214 (1969)