

安定同位体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

東北大学大学院農学研究科
動物生理科学分野 小原嘉昭・林 英明

背景と目的

ウシなどの反芻動物は、第一胃、第二胃、第三胃、第四胃の4つの胃を持っており、第一胃と第二胃はあわせて反芻胃と言われ体重 600 kg のウシでその容積は 180 l と大きく、その中に多くの微生物が生息し連続発酵槽を形成している。また第四胃は単胃動物の胃に相当し胃塩酸を分泌する。ウシはセルロースを多く含む草類などの粗飼料を第一胃内の微生物発酵によって分解し短鎖脂肪酸(SCFAs)を産生しそれを主なエネルギー源としており、さらに微生物態蛋白質などを消化吸収するという単胃動物には見られない独特の栄養摂取機能を持っている。我々は、反芻動物の栄養生理学的特徴を明らかにするために安定同位体を用いた同位元素希釈法により代謝を定量的に捉え、単位時間当たりの栄養素の移行量として生体内での代謝を観察するカイネティクス実験を行ってきた。すなわち ^{15}N -尿素、 ^{15}N -アンモニア塩を用いた実験では、消化管と血液での尿素の動態と第一胃内でのアンモニアからの微生物合成速度の測定(Obara and Shimbayashi, 1980)、 ^{15}N -尿素、 ^{13}C -グルコース、 ^{13}C -プロピオン酸を用いた実験では尿素再循環量、プロピオン酸産生量、糖新生量の測定(Sutoh et al. 1996)、 ^2H グルコースを用いた実験では、乳牛におけるグルコース代謝を動的に捉える実験を行ってきた(Rose et al. 1998)。このように安定同位体を用いて、第一胃と体内における糖代謝および窒素代謝やホルモンの変動、栄養素のカイネティクスについての研究を盛んに行ってきた。

反芻動物も、生後間もない頃はミルクを摂取しており第一胃の機能が発達しておらず、4~6 週齢で粗飼料を摂取するようになると第一胃が急激に発達し徐々に成反芻動物のレベルに達することが知られている。しかし哺乳期や離乳後の第一胃の発達に伴う代謝や内分泌の変動、特に哺乳期における栄養素のカイネティクスに関する研究はほとんど行われていない。

そこで、子ウシを用いて反芻動物における代謝ホルモンの変動、グルコース代謝動態および尿素代謝動態の成長に伴う変化を観察する実験を行った。

方法

実験動物：実験には、4 週齢 (n=4)、13 週齢 (n=5) 及び 24 週齢 (n=6) のホルスタイン種仔ウシ 15 頭を用いた。仔ウシは 2 週齢時に導入し、6 週齢で離乳を行い、24 週齢まで飼育した。実験動物を定常状態におくために、1 日分の飼料を 4 週齢では 6 回(9:00 から 4 時間間隔)、13 週および 24 週齢では 12 回(9:00 から 2 時間間隔)に分けて 2 週間前にわたって給与した。給与飼料は日本飼養標準に基づいてエネルギーおよび粗蛋白質を充足するように設計した。これらの子ウシを用いて ^{13}C および ^2H グルコース、 ^{13}C および ^{15}N 尿素的安定同位体の単一注入による安定同位体元素のグルコース及び尿素カイネティクスの成長に伴う変化を観察した。同様に血漿中グルコース濃度、尿素濃度、成長ホルモン(GH)、インスリン、IGF-1 についても観察した。

実験行程：4, 13, 24 週齢時に ^{13}C および ^2H グルコースを頸静脈より単一注入する安定同位体元素希釈法を実施した。採血前日に試験牛の両側の頸静脈にカテーテルを装着し一側から安定同位体を注入し他側から採血を行った。採血は、注入時刻(10:00)の-10, -5, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 300 分後に行った。注入するグルコースの安定同位体溶液は $[\text{U-}^{13}\text{C}]\text{D}$ -グルコース (98.5 atom%; Shoko, Tokyo, Japan) および $[\text{6,6-}^2\text{H}]\text{D}$ -グルコ

ース (99 atom%; Cambridge Isotope Laboratories, MA, USA) を 15ml 生理食塩水に溶かしたものを用いた。また、グルコース同位体注入実験終了 2 日後に同様にして尿素同位体注入実験を行った。採血は注入時刻 (10:00) の -10, -5, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 480, 600 分後に行った。注入する尿素溶液は [¹³C]尿素 (99 atom%; Phenome Sciences, MA, USA) および [¹⁵N, ¹⁵N]尿素 (99.6 atom%; Shoko) を 15ml 生理食塩水に溶かしたものを用いた。

分析 代謝ホルモン、代謝産物の測定：血漿 GH、インスリン、IGF-1 の測定はラジオイムノアッセイ法 (RIA)、血漿グルコース、尿素は和光のキット比色法で測定した。

[6, 6-²H₂]D-グルコース：安定同位体比の測定は、Wiecko ら (1976) および Rose ら (1996) の方法に基づいて行った。血漿サンプルは徐蛋白後上清と同量のレジン (Duolite MB 5113 mixed resin) を加え、グルコース画分を得、凍結乾燥し、デシケーターで分析まで保存した。測定時、Pyrd/BBA 溶液 1ml を加え、40°C のウォーターバスに入れ、2 時間放置後無水酢酸を加えて混和し、1 時間後ウォーターバス上で窒素ガスとともにピリジンを蒸発除去した。さらに酢酸エチルを加え、ガスクロマトグラフ質量分析計/GCMS (5890 series II, Hewlett Packard, Washington, DC; JMS-SX 102A, Nihon Denshi, 日本) を用いて同位体比を測定した。

[U-¹³C]D-グルコース：安定同位体比の測定は、Sano ら (1996) の方法に基づいて行った。前処理において乾固させたサンプルに TMSI-C (ジーエル サイエンス) を 100 μl 加え、シリル化して GCMS (DELTA^{plus}, ThermoQuest, Germany) を用いて安定同位体比の測定を行った。

[¹³C]尿素および [¹⁵N]尿素：安定同位体比の測定は、Sutoh ら (1996) の方法に基づいて行った。血漿を徐蛋白後上清を採取し、カラムに通して、尿素画分を得た。カラムには陽イオン交換樹脂 (AG 50W-X8 100-200mesh H⁺ form, Bio-Rad Laboratories) を用いた。凍結乾燥機を行い、 [¹³C]尿素用に 0.05mg、 [¹⁵N]尿素用に 0.1mg のサンプルを秤量し、EA/IR-MS (DELTA^{plus}, Finnigan MAT, ThermoQuest, USA) を用いて安定同位体比の測定を行った。

計算：本実験におけるグルコースカイネティクスに関する数学的処理は Nolan ら (1974) の方法を用いて行った。頸静脈に安定同位体を単一注入して経時的に安定同位体の Atom% excess の変動を観察して、その直線解析を行うと、その直線は以下に示す 2 つの指数関数の和で表せる。

$$E = A_1 e^{-m_1 t} + A_2 e^{-m_2 t}$$

この時 t=時間、E は ¹³C もしくは ²H グルコース、¹⁵N もしくは ¹³C 尿素的の Atom % excess、A₁、A₂ は指数関数 1 式、指数関数 2 式における Y 軸切片となる。m₁、m₂= 指数関数 1, 2 式における速度定数 (時間⁻¹) を示す。

グルコース、尿素のプールサイズは次式で表される。

$$Q = N / (A_1 + A_2)$$

この時、N は注入した同位体原子数を表す。

イリバーシブルロス (IL) は次のように計算される。

$$IL = Q / A'$$

$$\text{但し } A' = \frac{A'_1}{m_1} + \frac{A'_2}{m_2}$$

A' 1、A' 2 は各構成指数関数の t=0 の時の Y 軸切片の総和に対する一構成指数関数の Y 軸切片値の割合である。

本実験において得られた ¹³C もしくは ²H グルコースの Atom% excess は図 11 のように表すことができ、上記の計算式よりグルコースのプールサイズ、代謝回転速度およびリサイ

クル速度を求めた。また図には示さなかったが、 ^{13}C もしくは ^{15}N 尿素の Atom% excess の指数関数から上記の計算式より尿素のプールサイズ、代謝回転速度およびリサイクル速度を同様に求めた。

統計: データは平均値±S.E. で示した。各週齢間の変動について、一元配置の分散分析を行い、有意差が検出された場合にはダンカンの多重比較検定で解析した。

結果

血漿 GH は週齢に従って減少し、血漿インスリンと IGF-1 は週齢と共に著しく上昇した(表 1)。グルコースのプールサイズは加齢に伴って有意に増加した(表 1)。グルコース代謝回転速度は ^{13}C および ^2H グルコースともに 4 週齢から 13 週齢にかけて、すなわち離乳後に有意に減少したが、13 週齢と 24 週齢の間には有意な変化は認められなかった。グルコースリサイクル速度も同様に、離乳によって激減し、その後の加齢による変化も認められなかった。これらの結果より、離乳に伴ってウシのグルコース代謝回転速度およびリサイクル速度が大きく変化することが明らかとなった。

尿素のプールサイズは、離乳(6 週齢)に伴う有意な変化は見られず、その後の加齢に伴って漸増し、24 週齢時では $3.89 \pm 0.15\text{gN}$ と有意に高い値を示した(表 2)。 ^{15}N 尿素の代謝回転速度には、加齢による有意な変化は認められなかった。一方、 ^{13}C 尿素の代謝回転速度は、プールサイズの変化と類似して、離乳前後では有意な変化は見られなかったが、24 週齢では有意に増加していた。さらに、尿素のリサイクル速度も、離乳前後では有意な変化は見られず、24 週齢に有意に増加するという結果が得られた。これらの結果より、尿素代謝カイネティクスは、離乳では変化せず、その後の成長に伴って変化することが明らかとなった。

考察

哺乳期においては、子ウシは栄養素の消化吸収能は非常に高く、グルコースの代謝回転速度やリサイクル速度も高く、コリサイクルなどを介して盛んにグルコースの再利用が行われていると考えられる。離乳によるグルコース再利用の減少は、SCFAs からのグルコース産生が増加することによって起こっているのかもしれない。ウシの第一胃の発達はヒツジなどと比べて遅く、13 週齢では第一胃の発達が十分でないため、第一胃で分解されずに下部消化管へ流入する栄養素も多く、尿素再循環機構が十分に働いていないために尿素代謝回転速度やリサイクル速度も変化していない可能性がある。その後の第一胃の発達により、尿素代謝回転速度やリサイクリング速度は増加し、血漿中窒素速度も増加していることが示唆される。

文献

- Nolan J.V., Leng R.A. (1974) Proc. Nutr. Soc. 33, 1-8.
Obara Y. and Shimbayashi K. (1980) Br. J. Nutri. 44:295-305
Rose M.T., Itoh F., Matsumoto, M., Takahashi, Y., Obara Y. (1998) J.dairy Res 65:423-431.
Rose M.T., Obara Y., Fuse H., Itoh F., Ozawa A., Takahashi Y., Hodate K., Ohashi S. (1996) J. Dairy Sci. 79, 1734-1745.
Sano H., Fujita T., Murakami M., Shiga A. (1996) Domest. Anim. Endocrinol. 13, 445-451.
Sutoh M. Obara Y., Miyamoto, S. (1996) J. Agric. Sci. (Camb) 126:99-105.
Wiecko J., Sherman WR. (1976) J. Am. Chem. Soc. 98, 7631.

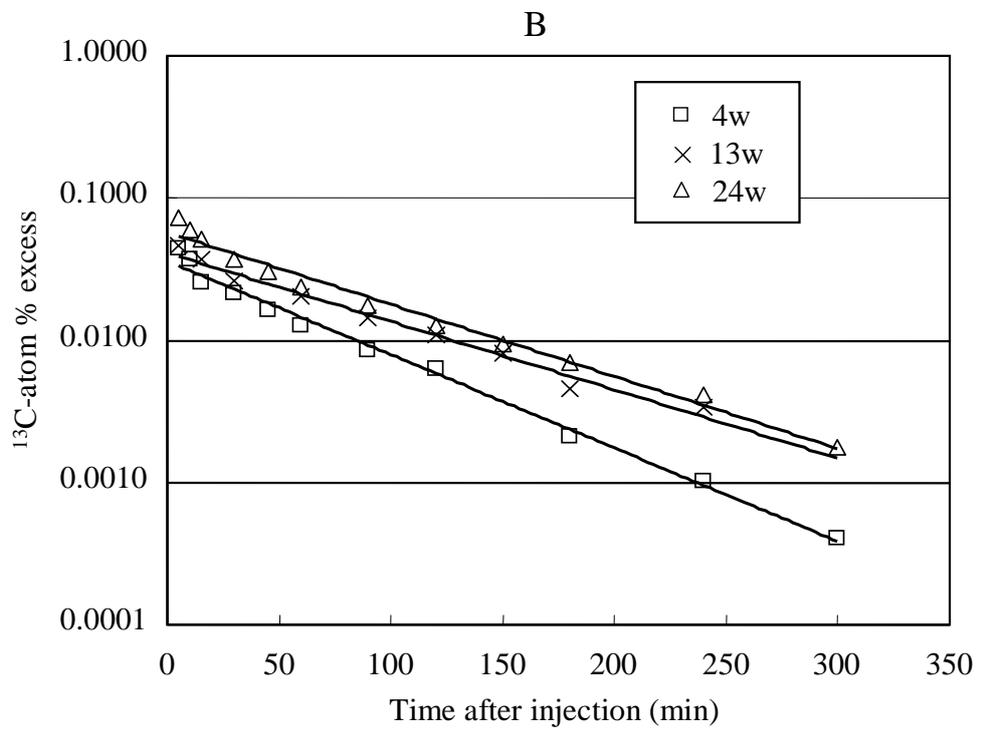
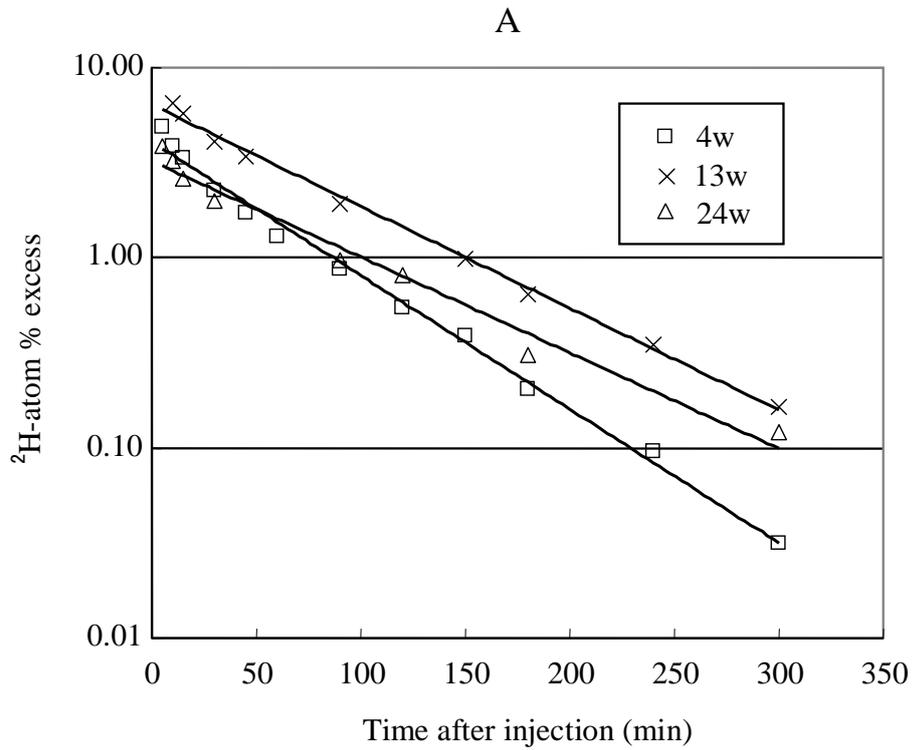


図 11. ^2H , ^{13}C グルコース単一注入による atom% excess の推移
 Aは ^2H グルコース、Bは ^{13}C グルコースの週齢ごとの推移を示す

表 1. ウシの加齢に伴うグルコース及びカイネティクスの変化

| | 4w | 13w | 24w |
|---|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| GH(mg/ml) | 9.06±1.53 ^a | 8.08±0.85 ^b | 5.25±0.68 ^b |
| Insulin(μU/ml) | 1.2±0.3 ^b | 18.7±1.7 ^b | 62.7±14.3 ^a |
| IGF- I (mg/ml) | 28.8±6.7 ^c | 84.7±10.9 ^b | 106.3±11.5 ^a |
| Body weight(kg) | 48.1±1.3 ^c | 105.6±3.1 ^b | 190.0±4.6 ^a |
| Plasma glucose (mg/dl) | 103.1±7.5 ^b | 115.4±3.9 ^a | 91.6±2.2 ^c |
| Glucose pool size(g) | 22.78±1.08 ^c | 37.15±3.11 ^b | 59.93±3.48 ^a |
| Glucose irreversible loss (mg/min · kg BW) | | | |
| U- ¹³ C-glucose | 14.18±2.40 ^a | 8.94±0.81 ^b | 8.73±0.48 ^b |
| 6,6- ² H ₂ -glucose | 16.64±3.14 ^a | 9.01±0.99 ^b | 8.93±0.47 ^b |
| Glucose recycle rate (mg/min · kg BW) | 2.46±1.74 ^{1a} | 0.07±0.39 ^b | 0.21±0.24 ^b |

mean±S.E.

a,b,c:異なる文字間に有意差あり(P<0.05;Duncan's test)

表 2. ウシの加齢に伴う尿素カイネティクスの変化

| | 4w | 13w | 24w |
|---|------------------------|------------------------|------------------------|
| Plasma Urea-N (mg/Ndl) | 3.86±0.45 ^c | 4.77±0.28 ^b | 7.79±0.29 ^a |
| Urea pool size (gN) | 1.49±0.32 ^b | 1.32±0.30 ^b | 3.89±0.15 ^a |
| Urea irreversible loss (mgN/min · kg Bw) | | | |
| ¹⁵ N-Urea | 0.20±0.03 | 0.18±0.04 | 0.24±0.02 |
| ¹³ C-Urea | 0.21±0.07 ^b | 0.20±0.05 ^b | 0.47±0.07 ^a |
| Urea recycle rate (mgN/min · kg BW) | 0.01±0.04 ^b | 0.02±0.02 ^b | 0.24±0.07 ^a |

mean±S.E.

a,b,c:異なる文字間に有意差あり(P<0.05;Duncan's test)