
反芻動物の下部消化管における栄養素吸収に関する
安定同位体元素の応用

(研究課題番号 07660354)

平成7年度～平成8年度科学研究費補助金（基盤研究C）

研究成果報告書

平成9年3月

研究代表者 小田伸一
(岩手大学農学部助教授)

は し が き

反芻家畜は、本来ヒトをはじめとする単胃動物がほとんど養分として利用出来ない構造性炭水化物、すなわち飼料に含まれるセルロースやヘミセルロースなどの炭水化物をルーメン内微生物の発酵作用により揮発性脂肪酸（VFA）などに変換し、動物体の維持や種々の生産活動のエネルギーに利用している。また、飼料に含まれる栄養分のうち、単胃動物が自ら消化吸収することのできるような良質な炭水化物やタンパク質にいたっては易発酵性であり、その大半がルーメン微生物によって発酵されVFAなどに変換されてしまう。そのため、十二指腸以降に流入する糖質はほとんどないとされてきた。しかし、濃厚飼料を多給した場合には、かなりの量の糖基質が第一胃内発酵を逃れて腸管へ流入するとの報告もある。

このように反芻動物にとって、飼料に含まれる良質なタンパク質やデンプンをルーメンバイパスさせることは生産の上からも有利であり、重要な点である。そのため、多くの研究がルーメンバイパス技術の開発に費やされてきた。しかしながら、反芻家畜の下部消化管における栄養素の吸収に関する量的研究は、放射性同位体元素の利用に関わる制限のためか、Bergmanらの報告以来わずかにHuntingtonらやJanesらが行っているのみである。そこで我々は、放射性同位体元素の代替として近年注目を集めている安定同位体元素（ ^{13}C 、 ^{15}N 、Dなど）に着目し、安定同位体元素標識化合物をトレーサーとして、下部消化管からの各栄養素の正味吸収量並びにその吸収メカニズムの一端を反芻家畜で調査しようと考えた。

まず、粗飼料給与区および濃厚飼料給与区を設け、腸管に流入する消化内容物に含まれる糖基質量を測定し、次いで肝門脈カテーテルを装着したヒツジを供試し、採食後の血漿グルコース濃度変動と門脈へのグルコース吸収量を求めた。さらに安定同位体トレーサーを反芻家畜のグルコース吸収に関する研究に応用する可能性についても検討を加えたので報告する。

研究組織

研究代表者： 小田伸一 （岩手大学農学部助教授）

研究分担者： 中嶋芳也 （岩手大学農学部教授）

研究経費

平成7年度 2、100千円

平成8年度 500千円

計 2、600千円

研究発表

1) 口頭発表

武田利枝、飯倉豪、阿部のぞみ、軽石志津子、佐藤美緒、中川翠、
小田伸一、中嶋芳也

ヒツジの門脈血流量とグルコース吸収量

第46回東北畜産学会大会、平成8年8月29・30日

目次

緒論	-----	1
第1章	グルコースおよびデンプンの	
	下部消化管への流入量 -----	4
	材料および方法 -----	4
	結果 -----	5
第2章	ヒツジの肝門脈へのグルコース吸収動態と	
	安定同位体元素の応用 -----	11
	材料および方法 -----	11
	結果 -----	19
	考察 -----	22
第3章	摘出腸管によるグルコース吸収に関する	
	予備的検討 -----	35
謝辞	-----	37
参考文献		

緒 論

1) 反芻家畜の下部消化管におけるグルコース吸収

反芻家畜は、本来ヒトをはじめとする単胃動物がほとんど養分として利用出来ない構造的炭水化物、すなわち飼料に含まれるセルロースやヘミセルロースなどの炭水化物をルーメン内微生物の作用により揮発性脂肪酸 (VFA) に変換し、これを動物体の維持や生産に利用している。また、飼料に含まれる栄養分のうち、単胃動物が自ら消化吸収することのできるような良質な炭水化物やタンパク質にいたっては易発酵性であり、ルーメン内で大半が発酵されてしまう。しかし、濃厚飼料を多給した反芻動物においてはかなりの量のグルコースポリマーがルーメン発酵を逃れ、下部消化管に流入し消化されることも知られている。Gaillardら(13)は、生草と濃厚飼料を与えた牛における α -グルコースポリマーの小腸での消化量が生草のみの場合に約10g/dayであったのに対し、濃厚飼料を与えたときには、約330g/dayに増加したことを報告している。また濃厚飼料といっても、グルコースポリマーの小腸での消化量は穀実の種類や処理方法などによって相違する。例えば、トウモロコシやソルガムのデンプンは、大麦に比べルーメン内における分解性が低く、多量のデンプンが小腸内に流入し消化される量が明らかに多いと報告されている(2,34,35)。

Ørskov(28)は、濃厚飼料給与ヒツジにおいて飼料中デンプンのルーメンバイパス割合は、動物によって5～40%の変動がみられると報告している。Owensら(29)は、給与したトウモロコシ、ソルガム、穀実デンプンの18～42%がウシの小腸内に流入し、その約47～88%が小腸で消化され、さらに33～62%が大腸内で消化されるというように飼料に含まれるデンプンのルーメンバイパス割合ならびに下部消化管での消化割合は実験条件によってあるいは動物によって変動が大きいことを述べている。

一般にデンプンの下部消化管における消化吸収過程は、反芻動物においても単胃動物と同様にグルコースにまで消化された後体内に吸収される。Huntington(20,22)は、門脈血-動脈血濃度差法によって乳牛のグルコース吸収量を測定したが、その吸収は見かけ上マイナスであった。このことはBairdら(3)も報告しており、一般に門脈-動脈濃度差法から算出したグルコース吸収量は、見かけ上マイナスである報告が多い。このことは消化管からグルコースが吸収される際、消化管組織でグルコースがエネルギーとして大量に消費されること、また腸内微生物の活性も腸管内デンプン消失に影響を与えることに起因していると考えられることから(15)、反芻動物において下部消化管からのグルコース吸収は少ないとされている。

しかし、Janesら(24)は、ヒツジの腸間膜静脈-動脈濃度差の測定とラジオアイソトープをトレーサーとして用いた実験から、穀実を多給した場合、グルコースの吸収量は、1日当たり約101gにもなることを報告した。

このように、栄養素の門脈血中への真の吸収量あるいは飼料由来の吸収量を求めるためには、より精度の高い測定系、つまり各栄養素の門脈血での濃度変動に加えて吸収される際に消化管で利用される各栄養素の動態を量的に高精度に把握することが必要になってくる。

2) Net Glucose AbsorptionとPortal Glucose Absorption

消化管から吸収されるグルコースを量的に把握するためには、グルコースが消化管組織を経て体内に取り込まれる際、どれほど代謝されたかを知ることが必要である。門脈-動脈濃度差から算出できる正味グルコース吸収量はNet Portal Absorptionと表され、消化管組織での利用量(Portal Blood Glucose Utilization)の分を過小評価することになる。そこでBergmanら(8)は放射性同位元素希釈法をヒツジに応用して、消化管組織での利用量をグルコーストレーサーの消失割合から算出し、正味グルコース吸収量にこの利用量を加算することによってグルコース吸収量(Portal Glucose Absorption)を求めた。後にHuntingtonらは、Bergmanらの報告に基づいてヒツジ(18)とウシ(19)でPortal Absorptionを求め報告した。また、Janesら(24)は、前腸間膜静脈より採血し、グルコースから乳酸への代謝量を求めることで、腸管組織に取り込まれたグルコース量(Total Glucose Absorbed)を求めている。

このようにグルコース吸収量を求めるには、少なくとも消化管組織でのグルコース利用量を把握する必要がある。この種の研究に使われてきたグルコーストレーサーは、 ^{14}C や ^3H の放射性同位元素でラベルしたものがほとんどであった。放射性同位元素を用いることは、測定精度や予算の上からも適している。しかしながら、放射性同位元素の取り扱いに関する規制をはじめ実験施設などヒツジやウシのような中、大動物を供試して代謝実験を行うことは難しくなっている。そこで、近年では放射性同位元素に代わり放射活性を全く有さない安定同位体元素が改めて注目されるようになった。

3) 本研究の目的

一般に粗飼料を主体とした飼養条件下の反芻動物において、十二指腸に流入する飼料由来のグルコースは極めて少量である。しかし、圧片トウモロコシを主体とした濃厚飼料を多給した場合、その量は高くなる(33)。Weekes(39)は、ルーメンから下部消化管に逃れてくるデ

ンブ消化物が増加すれば、理論的に生産エネルギー効率を増加させることが出来るだろうと述べている。実際トウモロコシまたはソルガム主体の飼料を与えた成育期の牛での生産に関する実験において、小腸で消化されるデンプンは、ルーメンで消化されたデンプンより42%以上ものエネルギーを供給したとの報告もある(29)。しかしながら、どの程度十二指腸に流入したグルコースやデンプンが体内に吸収されるのかという量的研究は、消化管内容からの消失量を吸収量とみなしたり、血液の動静脈差法などにより見掛け上の測定が多い。これに対し、放射性同位元素を標識物質に用いた研究はBergmanら(8)の研究など数少ない(18,19,24)。

そこで、本研究では放射性同位元素の代替として安定同位元素 (^{13}C) を用いて合成したグルコースをトレーサー($[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose)として、Bergmanら(8)の報告に沿って、門脈に現れる消化管由来のグルコース吸収量を知ることを目的とした。

まず、十二指腸リエントラントカニューレ装着ヒツジを供試し、十二指腸に流入するグルコースおよびデンプン量を把握し、次いで肝門脈カテーテルを装着したヒツジを供試し、採食後の血漿グルコース濃度変動と門脈へのグルコース吸収量を求めた。また、安定同位体トレーサーを反芻家畜のグルコース吸収に関する研究に応用する可能性についても検討した。最後に摘出腸管におけるグルコース吸収についても若干のデータが得られたので報告する。

第1章 グルコースおよびデンプンの下部消化管への流入量

緒論でも述べたように、反芻動物では飼養条件の違いによってルーメン発酵を逃れる炭水化物の量は変動する。そのため粗飼料区と濃厚飼料区を設け、その飼養条件において、十二指腸に流入する炭水化物、とりわけグルコースの量とデンプン量を知ることによってバイパスされる糖基質量を把握する必要がある。

そこで、まず、十二指腸にリエントラントカニユーレを装着したヒツジを供試して、粗飼料および濃厚飼料給与によって下部消化管へ流入するグルコースおよびデンプン量について調べてみた。

材料および方法

1 供試動物および飼料

供試動物には予め外科的手術によって、十二指腸リエントラントカニユーレを装着した去勢雄メン羊3頭（コリデール種、体重35.5~45.6kg）を用いた。供試飼料には、粗飼料としてオーチャード・チモシー混合乾草、濃厚飼料として市販肉用牛配合飼料（ α -ビーフ後期、中部飼料）を用いた。

2 試験区および飼養管理

1) 粗飼料区

体重の2%量の乾草を1日に1回、9時に給与した。またビタミンとミネラルを補足し、水は自由摂取とした。

2) 濃厚飼料区

粗飼料と濃厚飼料の割合を2：8の割合で混合し、給与量は粗飼料区における給与TDN量と見合う量とした。給与時間をはじめその他の管理は粗飼料区と同様にした。

3 試料採取および保存

粗飼料区では、最初の9日間を馴致期間とし、その後10日目から5日間、糞採取を行った。また、15、19、23日目の3日間にわたって、腸管流入内容物の採取を行った。粗飼料区の試験終了後、翌日から14日間を濃厚飼料区への移行期および馴致期間として、15日目から5日

間糞採取を行った。また、20、24、28日目の計3日間にわたって、腸管流入内容物の採取を行った。

腸管内流入内容物の採取はリエントラントカニューレを介して行った。給餌1時間前の朝8時に採取を開始して、その後1時間ごとに13時間にわたって、流入した内容物量を測定し、それぞれから約200 mlを分析試料として分取した。また乾物測定用として約5 mlの内容物試料を試験管に分取し、直ちに測定した。残りの内容物はその都度ペリスタポンプを用いてほぼ1時間かけて十二指腸内に戻した。グルコース測定用試料は内容物約2 mlに10% (v/v) HClO₄を9倍量添加後、遠心分離(10000 rpm、10 min)し上清を除タンパク液として-20℃で凍結保存した。その他の内容物試料は採取後直ちに-20℃で凍結保存した。

4 測定項目および方法

乾物 (OM) : 常法

グルコース濃度 : 酵素法 (17)

デンプン : 阿部 (1) のHClO₄抽出によった。

グルコース+デンプン測定 : デンプンはグルコースとして定量し、0.9を乗じてデンプン量とした。これをグルコース量に加算してグルコース+デンプン量とした。

結果

粗飼料あるいは濃厚飼料に十分馴致させたヒツジを供試し、本飼養条件で、給餌後十二指腸以降に流入する糖基質量を知るために、腸管に流入する内容物、グルコースおよびデンプンを給餌後12時間に渡って測定した。各測定項目について、給餌後の経時的変動をそれぞれ図1、2、3、4に示した。また、これらから求めた給餌後12時間の流入量を表1に示した。

粗飼料区、濃厚飼料区どちらも給餌後1時間以内にほとんど全量を摂取したが、粗飼料区では濃厚区に比べ採食時間が長くなる傾向にあった。

摂取したグルコース+デンプン量は粗飼料区で34.8g、濃厚区で230.3gであったのに対し、腸管に流入した量はそれぞれ4.3gと10.2gであり、これは摂取量に対して12.4%と4.4%であった(表1)。

第2章の実験に合わせて、給餌後6時間の値として計算すると、粗飼料区で2.1g/6h、濃厚飼料区で6.6g/6hの糖質が給餌後6時間に十二指腸に流入することになる(表1)。

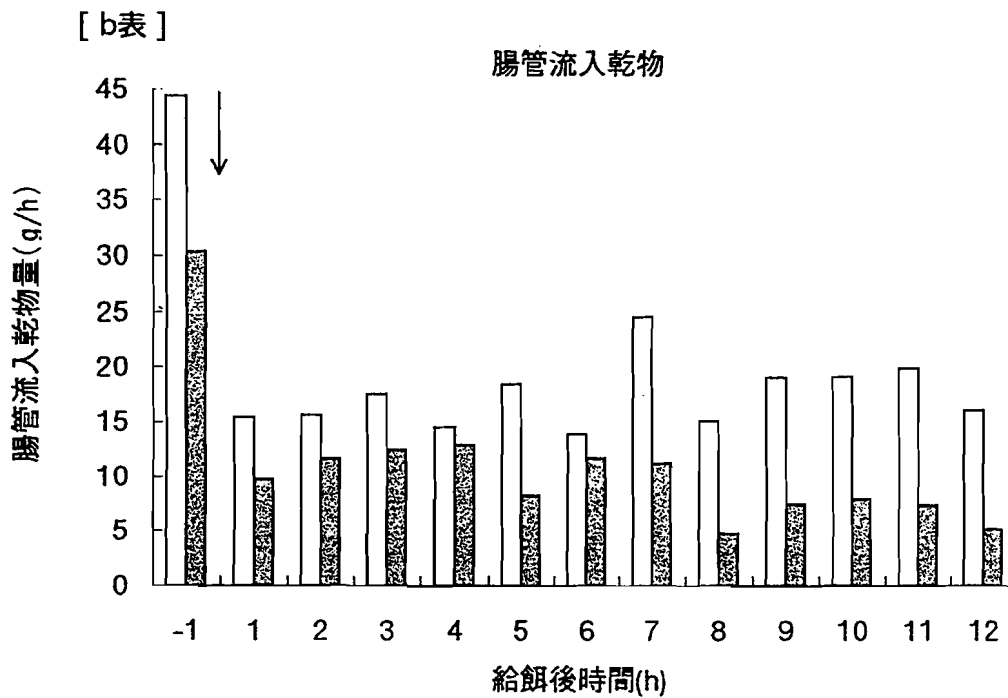
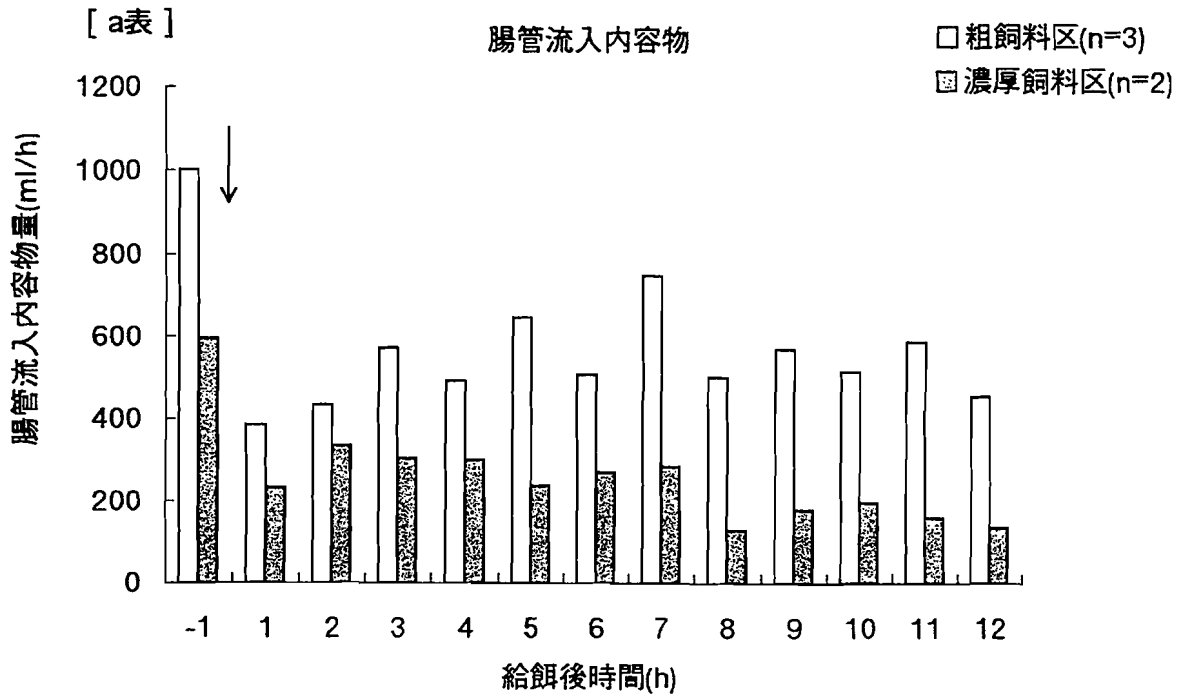


図1 ヒツジの腸管流入内容物量 (a) および乾物量 (b) の経時的変動

↓ ; 給餌

粗飼料区 ; 乾草のみ

濃厚飼料区 ; 粗飼料 : 濃厚飼料 = 2 : 8

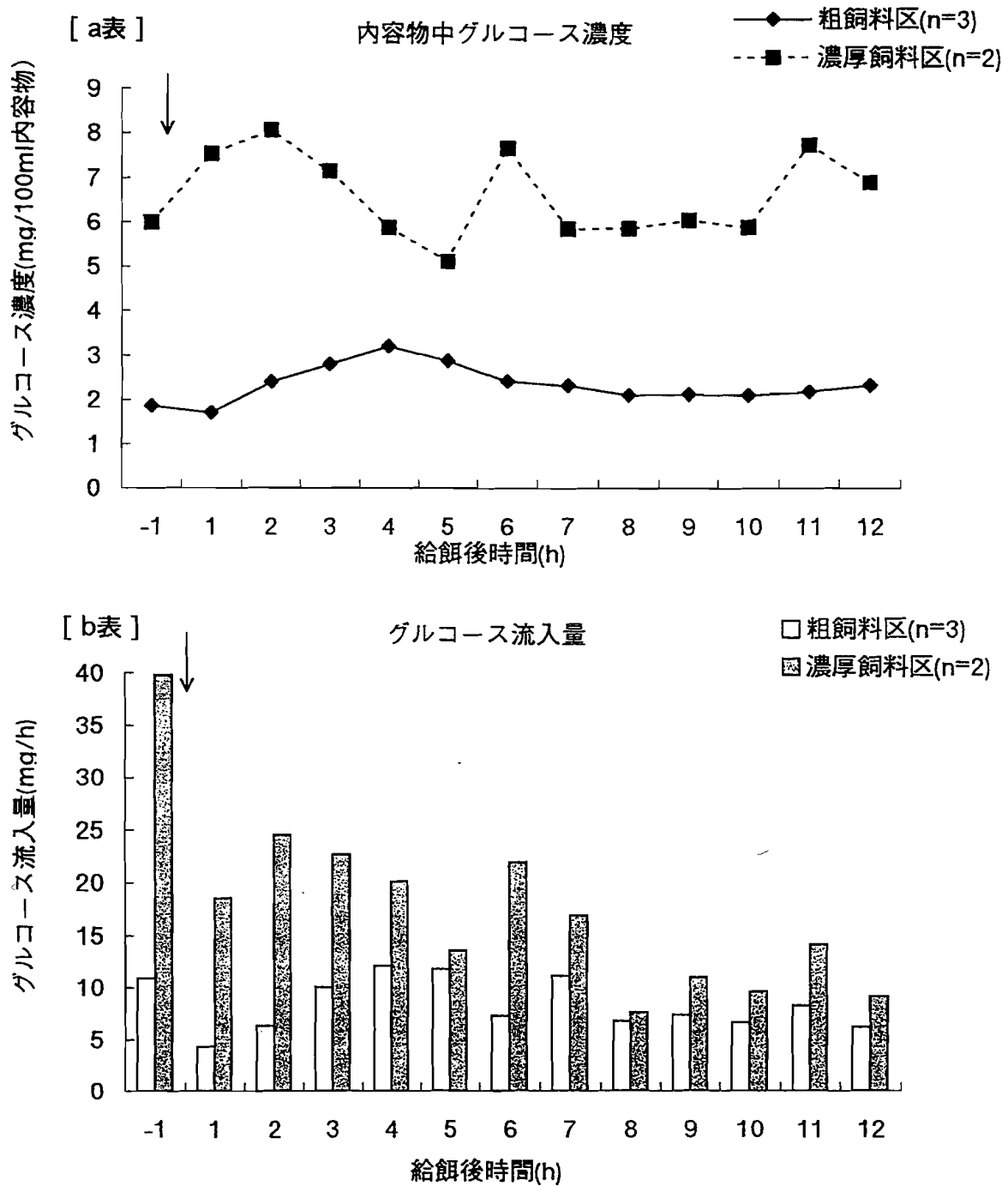


図2 ヒツジの腸管流入内容物中グルコース濃度 (a) およびグルコース流入量 (b) の経時的変動

↓ ; 給餌

粗飼料区 ; 乾草のみ

濃厚飼料区 ; 粗飼料 : 濃厚飼料 = 2 : 8

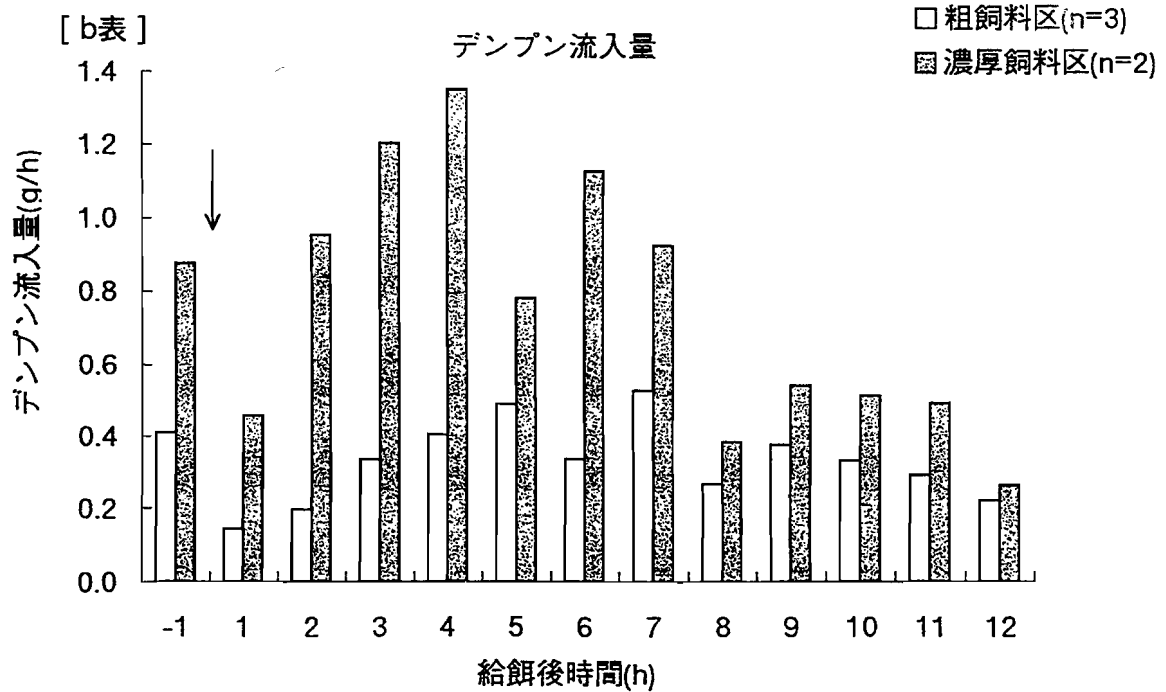
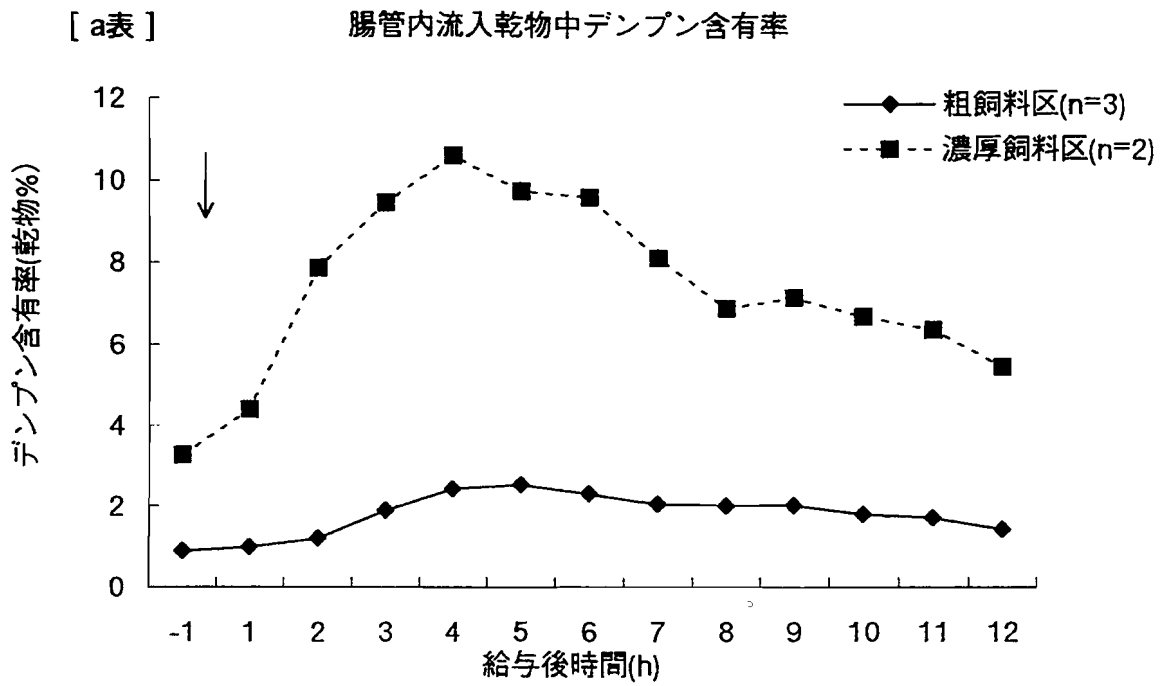


図3 ヒツジの腸管流入乾物中デンプン含有率 (a) とデンプン流入量 (b) の経時的変動

↓ ; 給餌

粗飼料区 ; 乾草のみ

濃厚飼料区 ; 粗飼料 : 濃厚飼料 = 2 : 8

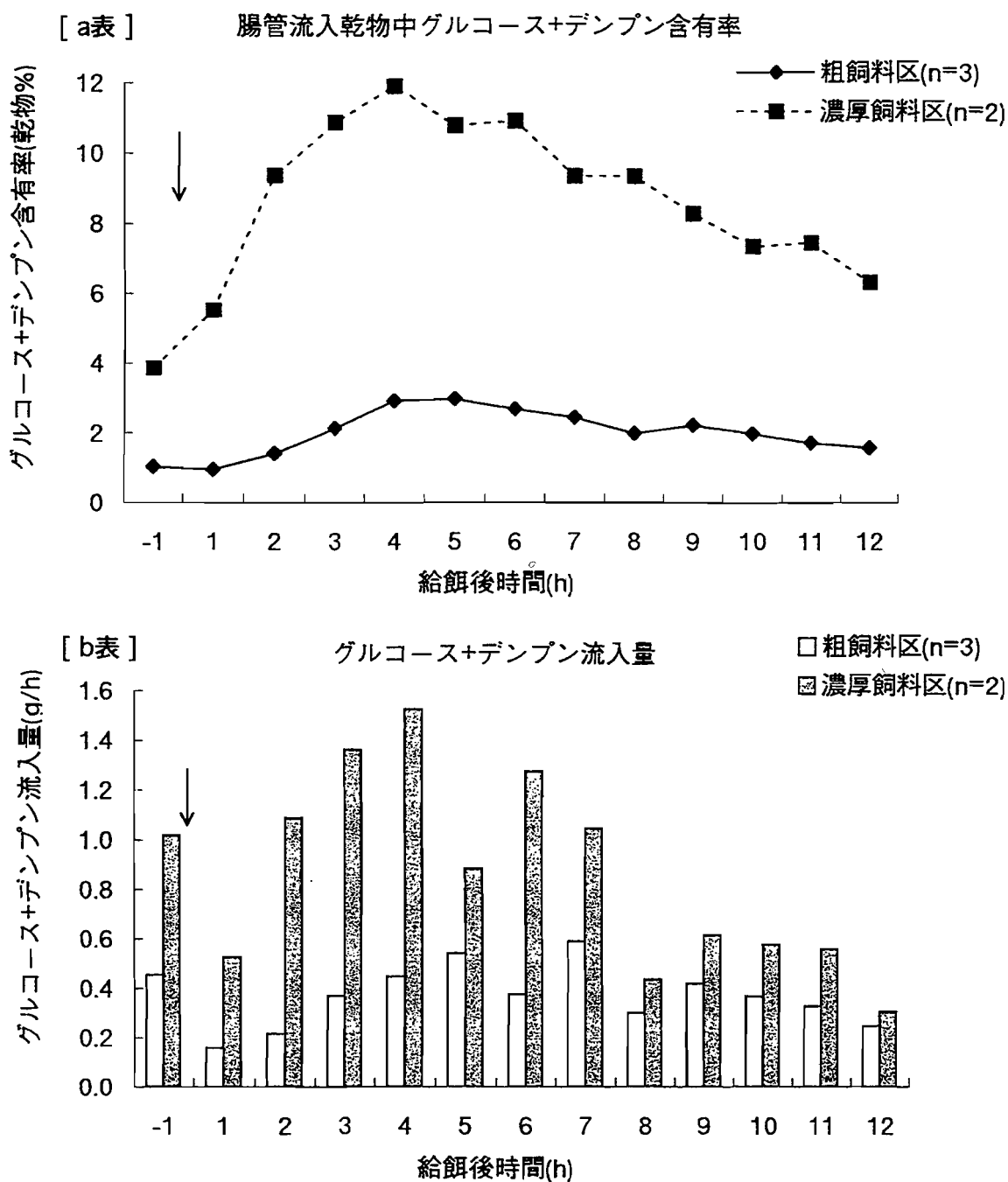


図4 ヒツジの腸管流入乾物中グルコース+デンプン含有率 (a)とグルコース+デンプン流入量 (b) の経時的変動

↓ ; 給餌

粗飼料区 ; 乾草のみ

濃厚飼料区 ; 粗飼料 : 濃厚飼料 = 2 : 8

表1 十二指腸に流入する消化管内容物、グルコースおよびデンプン量

	粗飼料区 (n=3)	濃厚飼料区 (n=2)
DM摂取量 (g)	754	503
十二指腸流入内容物量 (g/12h)	6.4	2.8
十二指腸流入DM量 (g/12h)	209	110
グルコース摂取量 (g)	14.7	3.7
十二指腸流入量 (g/12h)	0.1	0.2
デンプン摂取量 (g)	18.1	204.0
十二指腸流入量 (g/12h)	3.9	9.0
グルコース+デンプン 摂取量 (g)	34.8	230.3
十二指腸流入量 (g/12h)	4.3	10.2
グルコース+デンプン 給餌後6時間の十二指腸流入量 (g/6h)	2.1	6.6

粗飼料区；乾草100%

濃厚飼料区；粗飼料：濃厚飼料 = 2：8

給与TDN量は両区で等量（粗飼料区に見合う量）とした。

第2章 ヒツジの肝門脈へのグルコース吸収動態と安定同位体元素の応用

1、材料および方法

1) 供試動物

供試動物には頸動脈ループを装着した雌ヒツジ1頭および去勢雄ヒツジ4頭（コリデール×サフォークおよびサフォーク種、体重35.6～63kg）を用いた。

2) 飼養管理

給餌時間を12時にした他は第1章と同じにした。

3) カテーテル装着（図5）

ヒツジにセラクター（バイエル（株））を筋注投与(1ml/頭)し、前麻酔をかけた後、経口的に気管チューブ(クリアー・ロープロ気管内チューブ、マリノクロットメディカル社)を挿入し、直ちにハロタン（フローセン,武田薬品工業）によるガス麻酔（導入4.0%～維持0.5%、酸素2.5%）に移行して、カテーテル挿入手術を行った。なお、ガス麻酔移行後にトラゾリン（Sigma社）10mg/頭を生理食塩水（以下生食）に溶解し、頸静脈より投与して、セラクターから覚醒させた。動物の右腹側を開腹して門脈を確認後、ヘパリンコーティング・アンスロンカテーテル（14G、TORAY）あるいは、アトム静脈カテーテル(Fr.7、アトム(株))を門脈内に約4cm挿入し、巾着縫合により固定した。前腸間膜静脈カテーテルは、アンスロンカテーテル(16G)あるいはアトム静脈カテーテル(Fr.5ないし Fr.4)を装着した。

門脈および前腸間膜静脈カテーテルの維持には、ヘパリン（50U/ml）ならびに抗生物質（アンピシリンナトリウム、富士製薬工業株）4mg/mlを添加した生理食塩水(以下生食)でカテーテル内を適宜洗浄したのち、同液を満たして維持した。動物の術後回復には少なくとも7日間を要し、さらに採食量の回復を確認した後、実験に供した。血液試料採取日には、採血開始の少なくとも1時間以上前に、頸動脈に採血用カテーテル(サーフロー留置針, 18G, TERUMO)、頸静脈に¹³C-glucose注入用カテーテル(サーフロー留置針, 18G)を装着した。

カテーテルの装着位置の概略を図5に示した。

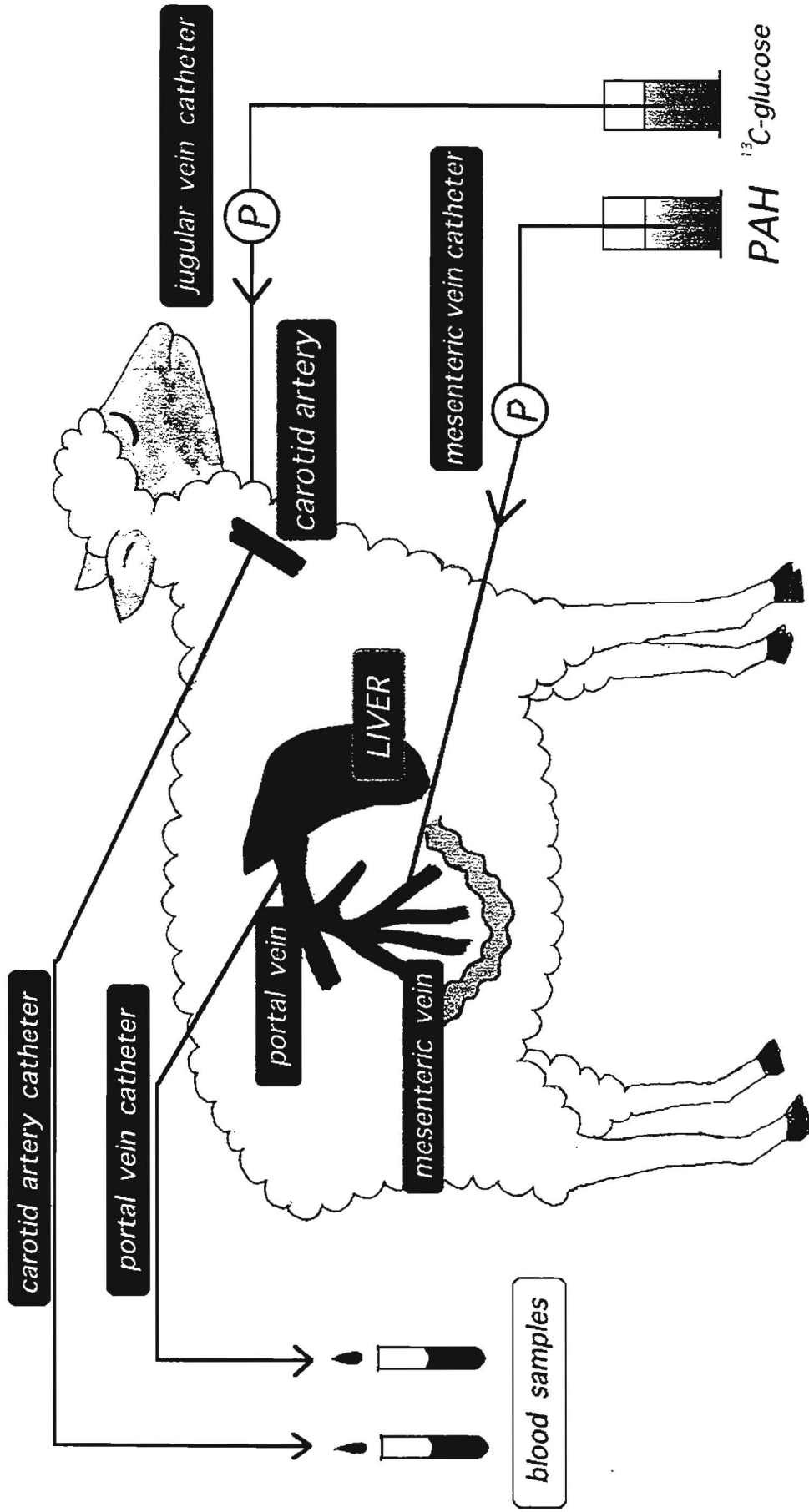


图 5 Schematic view of catheters for infusion and blood sampling

4) 色素注入法および血液採取

ヒツジの採食量が回復した後、最初の7日間を粗飼料区の馴致期間とし、8日目にサンプリングを行った。続いて9日目より段階的に濃厚飼料を増やし、16日目から22日目の1週間を濃厚飼料区の馴致期間とした。次いで23日目に濃厚飼料区のサンプリングを行った。肝門脈血流量は、Katzら(26)の方法に従い、パラアミノ馬尿酸(p-Amino Hippuric Acid Na, Sigma、以下PAH)を用いた色素希釈法で測定した。すなわち採血開始の1時間前に前腸間膜静脈の注入用カテーテルより、2%(w/v)PAH溶液10mlを1分間で初期注入した後、続いてペリスタポンプを用いて、2%PAH溶液を0.5ml/minの速度で9時間、定速連続注入を行った。また、門脈におけるグルコースの吸収量を求めるため、安定同位体元素である¹³Cで標識したグルコースをトレーサーに使用した。標識グルコース溶液の投与量は藤田(12)の報告を参考に次のように行った。まず、[U-¹³C]グルコース(99 atom% ¹³C、Isotec社、日本酸素)を300 μg/kg・体重の用量で10mlの生食に溶解したものを頸静脈カテーテルより1分間で注入した。続いて、ペリスタポンプを用いて、3 μg/kg/minの用量で9時間定速連続注入した。

血液試料採取は、8時間にわたり経時的に行った。飼料給与前120分から採血し、飼料給与後240分までは30分間隔で、それ以降は60分間隔で300分と360分の2回採血し、計15回の血液試料採取を行った。

血液は、ヘパリン処理した注射筒を用いて、頸動脈カテーテルと門脈カテーテルから同時に、各8mlを1分間で採取した。採取後は直ちにヘマトクリット毛細管に血液を分取し、その他はヘパリン処理した遠心管に速やかに移し、氷冷保存した。血液採取が終了した後、遠心分離(12000rpm、10min、4℃)により血漿を取り分けた。血漿グルコースとPAH濃度定量用として、血漿0.5mlに5%(w/v)トリクロロ酢酸(Wako、以下TCA)溶液4.5mlを混和し除タンパクを行い、30分間室温に放置後、遠心分離(5000rpm、5min)をして上清をグルコースおよびPAHの分析に供した。残りの血漿サンプルは、各測定項目を測定するまで-20℃で凍結保存した。

5) 測定方法

(1) 血漿PAH濃度

血漿PAH濃度をSmithら(32)の方法を一部修正して測定した。

除タンパクしたサンプルおよびスタンダード溶液を各2.5mlずつ試験管に取り、1.2N-HCl溶液を0.5ml加え、よく攪拌した。ついで亜硝酸ナトリウム溶液 NaNO_2 (1mg/ml) を0.25ml添加し、攪拌後3分から5分の間にスルファミン酸アンモニウム溶液 ($\text{H}_4\text{OSO}_2\text{NH}_2$, 5mg/ml) を0.25ml添加した。攪拌後、再び3分から5分以内にN-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩溶液 ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot \text{Cl}$) (0.1%(w/v)) を0.25ml添加し、攪拌した。これを10分間室温で静置した後、分光光度計により540nmの波長で吸光度を測定した。

(2) 血漿グルコース濃度

除タンパクした血漿サンプルをHuggett & Nixon (17)の方法によって測定した。

(3) 血漿インスリン濃度

門脈および動脈の血漿インスリン濃度は、デキストラン・チャコール法によるラジオイムノアッセイ(RIA)で測定した。第一抗体は、抗ウシインスリン血清(guinea pig, 生化学工業, Lot; GP-61651)を用い、 ^{125}I -Insulin (porcine)はNENより購入した。またウシインスリン(Sigma, Lot; 28C-0136)を標準に使用した。すべての試料を1回のアッセイで測定した。アッセイ内変動係数は2.5%、最小検出限界は $0.9 \mu\text{U/ml}$ と良好であった。

(4) ヘマトクリット(Ht) 値

Ht値はヘマトクリット毛細管(ヘパリン処理、テルモ)に血液を分取し、遠心分離(10000rpm, 5min)して測定した。

(5) $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ glucose の Isotope Enrichment

TserngとKalhan (38)の方法を藤田(12)が一部改変した方法にしたがった。すなわち、図6に示すように、サンプルに含まれるaldononitoril pentacetateに誘導体化してgaschromatography-massspectrometer (GC-MS)で分析を行った。

まず、血漿0.5mlにメタノール5mlを加え、12000rpmで10分間遠心して除タンパクし、上清をキャップ付きねじ口試験管に全量採取した。これを50℃に加温しつつ窒素ガスを吹き付けて乾固したのち、さらに真空デシケーター内に一晚放置して充分乾固した。乾固したサンプルに塩酸ヒドロキシルアミン-ピリジン溶液(ピリジン100 μl 中に塩酸ヒドロキシルアミン2.1mgを含む)を0.5ml加え、90℃で60分間加熱し、加熱終了後、無水酢酸0.5mlを加え、さらに90℃で60分間加熱した。加熱終了後、アイスバス中で放冷し、水2mlを加え、過剰の無水酢酸を分解した後クロロホルム1mlを加え激しく攪拌して誘導体をクロロホルム層に抽

出し、水層を吸引除去した。次いで水2mlを加え、攪拌し、水層を除去する操作を2回繰り返したのち、クロロホルム層をパスツールピペットで小バイアルに移し、真空デシケター内で乾固させ、分析時まで-20℃で保存した。GC-MSによる分析時に、クロロホルム20μlで再溶解してその1μlをマイクロシリンジでGC-MS (Hitachi M-2000、日立製作所) に注入した。GC-MSでの測定条件は表2に示した。分析には Selected Ion Monitoring (SIM) 法を用いて、分子イオン (M+ ¹³C-グルコース m/z 387、¹²C-グルコース m/z 381) から -OOCCH₃ (-OAc) が脱離したフラグメントイオンである m/z 334 および m/z 328 をモニタリングした。得られたクロマトグラムより得られる m/z 334 と m/z 328 の面積より ¹³C-グルコースの面積% (m/z 334 / (m/z 334 + m/z 328) × 100) を求め、これを Isotope peak area abundance とし、これを ¹³C-グルコースの Isotope enrichment (mol % excess) が既知の標準液 (¹²C-グルコースと [U-¹³C]グルコースを秤量し、混合して調製、0.025 - 0.5 mole % excess) を用いて、上記と同様の操作で Isotope enrichment を測定した検量線にあてはめて試料の Isotope enrichment を求めた。

表2 GC-MS 測定条件 (藤田) (12)

GC-MS	Hitachi M-2000(Hitachi)
Column	5%phenyl methyl silicon cross linked phase(HP-5:Hewlett Packard)
Column	temperature
	100°C for 1 min
	100~220°C at 30°C/min
	220~250°C at 5°C/min
	250~280°C at 30°C/min
	280°C for 5°C/min
Carrier gas	He
Injector temperature	280°C
Interface temperature	280°C
Ionization voltage	70eV
Data collection	Selected ion monitoring(SIM)

グルコースの誘導体化(aldononitoril pentacetate)

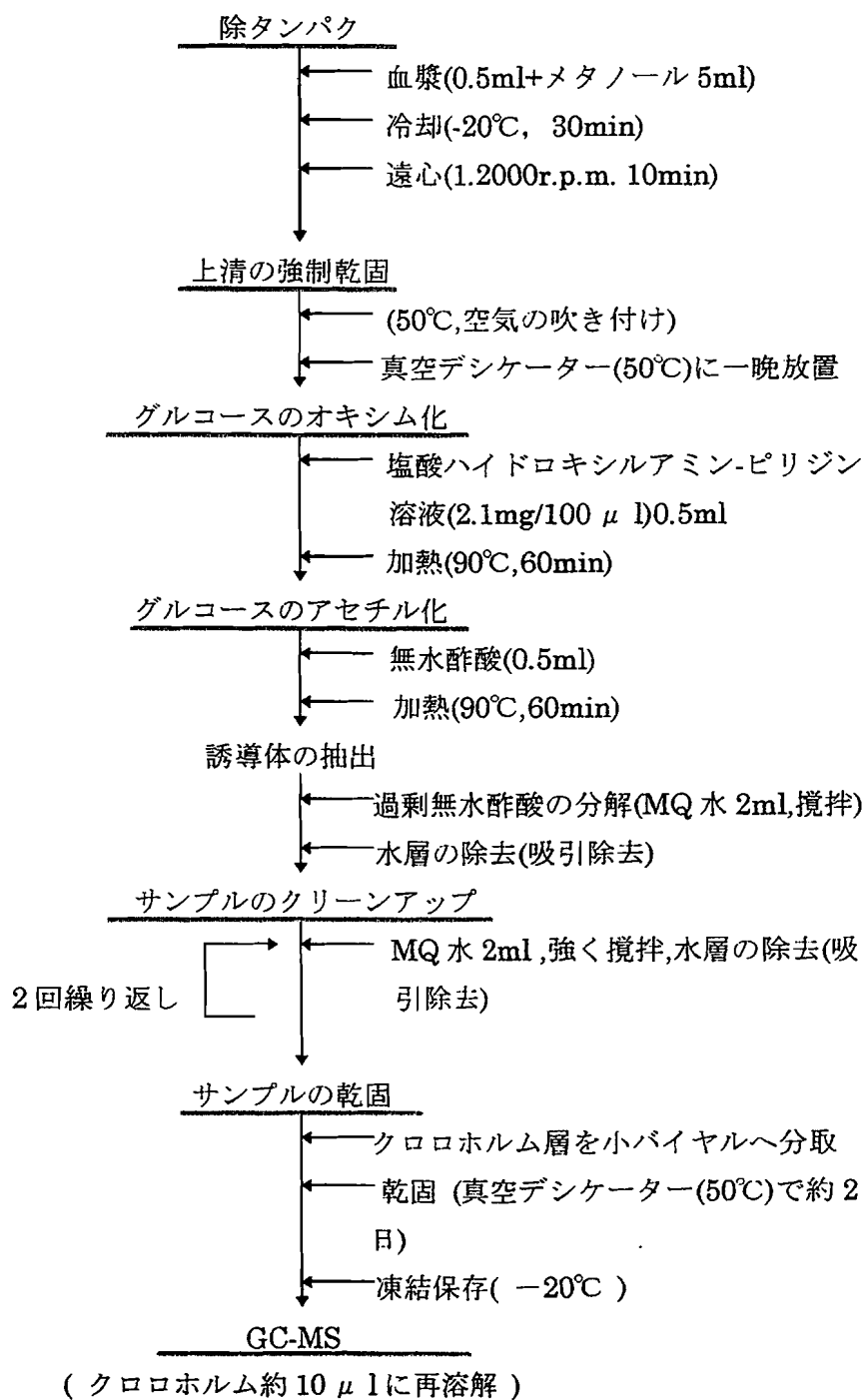


図6 グルコース誘導体化操作のフローチャート

6) 計算

肝門脈血流量は、KatzとBergman(26)の方法に従い求めた。すなわち門脈血と頸動脈血のPAHの濃度差とその時点でのPAH注入速度から[1]式により、門脈血漿流量を求めこれをHt値により補正して門脈血流量を求めた。

$$\text{Portal Plasma Flow (}\ell/\text{min)} = \frac{\text{PAH infusion rate (mg/min)}}{(C_{pv} - C_a) \text{ (mg/}\ell\text{)}} \quad [1]$$

$$\text{Portal Blood Flow (}\ell/\text{min)} = \frac{\text{Portal Plasma Flow (}\ell/\text{min)}}{(100 - \text{Ht} (\%))} \times 100 \quad [2]$$

C_{pv}、C_aは、各測定項目の門脈および頸動脈血漿濃度を示す。またグルコース、α-アミノ酸の正味門脈吸収量は、[3]式に示すように血漿濃度の動静脈差に門脈血漿流量を乗じて求めた。

$$\text{Net Absorption} = \text{PPF} \times (C_{pv} - C_a) \quad [3]$$

PPFは門脈血漿流量(ℓ/min)を示す。さらにBergmanら(8)によれば、[U-¹³C] glucoseを注入することにより正味吸収量とは別に腸間膜組織で利用されるグルコース量(式[4])と腸管から実際に門脈へ流入するグルコース量(式[5])を求めることができる。

$$\text{Portal Glucose Utilization} = \frac{{}^{13}\text{Ca-glucose} - {}^{13}\text{Cp-glucose}}{{}^{13}\text{Ca-glucose}} \times C_a \times \text{PPF} \quad [4]$$

$$\text{Portal Absorption} = \text{Net Glucose Absorption [3]} + \text{Portal Glucose Utilization [4]} \quad [5]$$

¹³Ca-glucoseと¹³Cp-glucoseは、それぞれ動脈と肝門脈血漿中のグルコーストレーサー、つまり[U-¹³C] glucose量を示すが、GC-MSやGC-IR-MS(GC-アイソトープ比-MS)での測定から得られる値は、¹³Cと¹²Cの存在比であるので、¹³Ca-glucoseと¹³Cp-glucoseの値を次のように求めた。

$$^{13}\text{C-glucose} = \text{Glucose concentration} \times ^{13}\text{C-glucose mol \% excess} \quad [6]$$

また、体全体の血液グルコース代謝回転速度をTserngら(38)の式により次のように求めた。

$$P = I \times ((100/E) - 1)$$

P : 血液グルコース代謝回転速度 (mg / kg^{0.75} / min)

I : トレーサーの注入速度 (mg / kg^{0.75} / min)

E : 飼料の Isotope enrichment (mol % excess)

7) 統計

各飼料区の給餌前後について5頭の平均値を求め、SASプログラムパッケージのGLMを用いて二元配置の分散分析および t 検定を行った。また、経時的変動については分散分析を行い、有意なものについては *Duncan* の多重検定を行った。

安定同位体の分析については4頭の結果を示した。

2、結果

1) 門脈血漿流量および血流量の採食に伴う経時変化

門脈血漿流量および血流量(ℓ /min)の採食に伴う経時変化を図7に示した。門脈血漿流量は、粗飼料区の給餌前平均値で 1.06 ± 0.12 という値から給餌後ゆるやかに増加し、150分値で 1.36 ± 0.09 となり、300分までこのレベルを維持した後、360分には低下して 1.09 ± 0.05 ℓ /minと、ほぼ給餌前の値に回復した。

濃厚飼料区では、給餌前の平均で 0.81 ± 0.09 ℓ /minから給餌後徐々に増加し、240分に 1.64 ± 0.22 と有意に高く($P < 0.01$)、給餌前のおよそ2倍の値を示した。給餌後360分には 1.41 ± 0.23 となり、ゆるやかに低下する傾向が見られた。

門脈血流量は、粗飼料区の給餌前平均値で 1.36 ± 0.14 から150分では 1.77 ± 0.09 と有意に高い値を示した($P < 0.05$)。濃厚飼料区では、給餌前平均値の 1.12 ± 0.13 から徐々に増加し、240分に 2.08 ± 0.27 と最高値を示した($P < 0.05$)。門脈血流量の変動傾向は、門脈血漿流量と類似したものであった。

2) 門脈および動脈血漿グルコース濃度の変動と正味吸収量

門脈および動脈血漿のグルコース濃度変動を図8に示した。粗飼料区の門脈血漿グルコース濃度(mg/100ml)は、給餌前平均で 66.9 ± 3.2 であったが、給餌後すみやかに減少し120分で最低値の 49.4 ± 3.2 ($P < 0.01$)を示したのち、360分まで約50mg/100mlと有意に低い値を維持した。動脈血漿グルコース濃度は、門脈とほぼ類似した変動を示したが、およそ1mg/100ml動脈血漿グルコースの方が高い値であった。門脈—動脈グルコース濃度差は、給餌前60分に0.4mg/100mlの正の値を示したほかは、すべて負の値であった。

一方、濃厚飼料区では、門脈血漿中グルコース濃度は、給餌前平均値で 69.3 ± 5.5 から給餌後30分で 62.2 ± 5.8 まで一過性に低下し、その後徐々に回復して採血終了までおよそ70mg/100ml前後の値を維持した。門脈—動脈グルコース濃度差は、給餌後90分に 0.56 ± 0.47 mg/100mlと正に転じ、以降360分まで正の値を示した。

この門脈—動脈グルコース濃度差にその時点での門脈血漿流量を乗じることで、グルコー

スの正味吸収量(mg/min)を求め、図9に示した。粗飼料区では、給餌前60分で 9.4 ± 14.1 の正の値が見られたほかは、すべて負の値を示した。給餌後から徐々に負の値が大きくなり、120分で -29.7 ± 14.7 を示したのち一旦小さくなり、再び300分で -30.8 ± 32.4 の値を示した。濃厚飼料区では、はじめに負の値を示していたが給餌後90分から 8.1 ± 7.7 の正の値に転じ、その後増減を繰り返し推移したが、実験終了まで正の吸収が認められた。

門脈および動脈血漿グルコース濃度とグルコース正味吸収量の給餌前後の平均値を表3に示した。粗飼料区では、門脈、動脈の給餌前平均値でそれぞれ 66.9 ± 3.2 、 67.7 ± 3.0 mg/100mlから給餌後に 55.6 ± 4.5 、 53.1 ± 4.9 mg/100mlと有意に低下した($P < 0.05$)。

また、粗飼料区と濃厚飼料区を比較すると、給餌前に有意差は認められなかったが、給餌後には門脈、動脈ともに粗飼料区の方が濃厚飼料区よりも有意に低い結果が得られた($P < 0.05$)。

正味グルコース吸収量は濃厚飼料区の給餌後に 11.4 ± 6.3 mg/minの正の吸収量を示したが、他は負の値であった。

3) 門脈および動脈血漿インスリン濃度の変動と分泌量

門脈および動脈血漿インスリン濃度の経時的変動を図10に示した。

粗飼料区において給餌前の門脈血漿インスリン濃度は 15.7 ± 0.7 μ U/mlであり、給餌後に顕著な変動は認められなかった。動脈血漿濃度についても門脈にくらべ約4 μ U/ml低い濃度で推移し、門脈同様目立った変動はみられなかった。

一方、濃厚飼料区では、給餌前の門脈血漿インスリン濃度は、 13.5 ± 2.2 μ U/mlであったが、給餌後に増加し、給餌後60分で $25.3 \mu \pm 9.1 \mu$ U/mlを示した。その後実験終了までおよそ20~25 μ U/ml前後の高い値を維持した。動脈血漿インスリン濃度は、給餌前に 10.6 ± 1.4 μ U/mlから給餌後は120分で 20.8 ± 5.7 μ U/ml ($P < 0.05$)を示し、門脈血より5~8 μ U/ml低い濃度を示しながら門脈血の変動と同様に推移した。

門脈—動脈血漿濃度差に血漿流量を乗じて、1分当りのインスリン分泌量を求め、その経時的変動を図11に示した。粗飼料区では、給餌前に 4.4 ± 0.4 mU/min、給餌後の平均では 5.2 ± 0.9 mU/minであったのに対し、濃厚飼料区ではそれぞれ 3.2 ± 0.9 mU/min、 6.5 ± 1.9 mU/minとなり、濃厚飼料区の給餌後、特に180分以降にインスリン分泌量が増す傾向がみられた。

4) [U-¹³C]-glucoseの血漿濃度

[U-¹³C]-glucoseの血漿濃度の経時的変化を図12に示した。動脈血漿中[U-¹³C]-glucose濃度は、粗飼料区で0.1389~0.1887 mg/100ml、濃厚飼料区では、0.1074~0.1554 mg/100mlの範囲で変動し、粗飼料区、濃厚飼料区ともに給餌後わずかに減少したものの、0.0119~0.0469 mg/100mlの範囲の減少であり、給餌後の[U-¹³C]-glucose濃度は安定していた。

5) 消化管組織におけるグルコース利用量 (Portal Glucose Utilization)

消化管組織におけるグルコース利用量の経時的変動を図13に示した。粗飼料区においては、給餌前60分では、平均で -2.82 ± 3.32 mg/min/kg^{0.75}と負の値を示した。グルコース利用量は、個体差やデータの振幅が特に大きく、ところどころに大きな負の値が得られていて、これが平均値に大きな影響を与える結果となった。

濃厚飼料区においても、粗飼料区と同様にグルコース利用量には、負の値が多く得られたので、他の測定項目とは異なり、給餌後の平均値を求め、飼料間での比較を行うにとどめた(表4)。消化管でのグルコース利用量は、両区ともに給餌後高くなる傾向を示した。給餌後の平均は、粗飼料区で 2.38 ± 0.99 、濃厚飼料区で 0.97 ± 0.51 mg/min/kg^{0.75}となり、粗飼料区に比べ濃厚飼料区で低い値を示したものの有意差はなかった。

6) 門脈におけるグルコース吸収量 (Portal Glucose Absorption)

門脈におけるグルコース吸収量の経時的変動を図14に示した。

門脈でのグルコース吸収量(Portal Glucose Absorption)は、正味グルコース吸収量(Net Portal Absorption)に消化管組織のグルコース利用量(Portal Glucose Utilization)を加算して求めた。門脈でのグルコース吸収量の結果には、グルコース利用量の寄与するところが大きいため、グルコース吸収量についても利用量同様、給餌後の平均値を飼料区間で比較した。

粗飼料区と濃厚飼料区での給餌前後の平均を表4に示した。グルコース吸収量は、給餌前の粗飼料区、濃厚飼料区でそれぞれ -0.42 ± 1.48 、 -0.13 ± 0.71 mg/min/kg^{0.75}であり、両区ともに負の値であった。また給餌後は、粗飼料区で 1.34 ± 0.55 、濃厚飼料区で 0.89 ± 0.66 mg/min/kg^{0.75}と粗飼料区の方が高い値を示したが有意差は見られなかった。

7) グルコース代謝回転速度

粗飼料区、濃厚飼料区のグルコース代謝回転速度を表4に示した。

粗飼料区では 3.10 ± 0.17 、濃厚飼料区では $4.32 \pm 0.29 \text{ mg/min/kg}^{0.75}$ となり、濃厚区の方が有意に高い値であった($P < 0.05$)。

3、考察

門脈血流量は、粗飼料区で $1.22 \sim 1.77 \text{ l/min}$ 、濃厚飼料区では、 $0.97 \sim 2.08 \text{ l/min}$ の範囲で変動が見られた(図7)。門脈血流量はヒツジを供試した実験において、粗飼料区で $43 \sim 47 \text{ ml/min/kg}$ (18,26)、濃厚飼料区で $44 \sim 58 \text{ ml/min/kg}$ (9,14,30)との報告がある。本実験の値を換算してみるとそれぞれ $27 \sim 39 \text{ ml/min/kg}$ 、 $22 \sim 46 \text{ ml/min/kg}$ となり、やや低めではあるがほぼ近似した値の変動であった。粗飼料区と濃厚飼料区の肝門脈血流量は給餌前では、両区ともに平均でおよそ 1.0 l/min の値を示したが、給餌後はそれぞれ 1.59 、 1.73 l/min と有意に高くなった。また、粗飼料区に比べ濃厚飼料区の方が有意差はないものの高くなる傾向がみられた。これは、濃厚飼料区の方が高くなるという報告(8,18,19,24)と同様であった。しかしながら、本実験では粗飼料区、濃厚飼料区ともに給与TDN量を等しく設定したことから両区の間には顕著な差が認められなかったものと思われる。給餌後血流量が増加する要因は、主にルーメンに流入する血流量が増加するため(9)とされ、さらにルーメン系からの血液流入量は、門脈血流量の約3分の1を占める(14)と考えられている。血液量が増加する因子としては、ルーメン内炭酸ガス分圧の上昇(9)、血中VFA濃度の上昇(26)などが知られている。本実験の給餌後における血流量の変化を見ると、粗飼料区で給餌後150分に、濃厚飼料区で240分にそれぞれ最高値を示した。これは、ヒツジの場合、給餌後約3時間以降で血流量は最も高くなるというKatzら(26)の報告と同様の結果であった。

血漿中グルコースは、粗飼料区において給餌後に有意な低下を示したのに対し、濃厚飼料区では給餌後に一過性の低下がみられ、続いて給餌前のレベルに回復したため、給餌前後に有意な差は認められなかった。このことは、濃厚飼料給与により採食後に血中プロピオン酸濃度が高くなるという報告(21,23,33)や、反芻家畜では採食後に消化産物である糖前駆物質が多く体内に取り込まれ、採食後に糖新生が盛んに行わ

れたために血糖値の低下が見られなかったものと思われる。

インスリンは、三大栄養素のいずれに対しても強力な同化作用を有し、家畜の生産にとって非常に重要なホルモンと考えられている。グルコース代謝に関してインスリンは、肝グリコーゲン合成を促進する一方で、分解を抑制する。また筋肉、脂肪組織などの標的器官に作用し、グルコースやアミノ酸の取り込みを促進する。反芻動物においても採食に伴ってインスリン分泌が促進され、その血中濃度が増加することが知られており、ウシ(16,27)やヒツジ(5,6,7,37)などで報告されている。肝門脈血漿インスリン濃度は、粗飼料区では採食に伴う顕著な濃度変動が認められず、給餌前とほぼ同じ値を示した。粗飼料区では、採食後のグルコースや糖新生基質の取り込みが少なかったために、インスリン分泌もさほど促進されなかったものと考えられる。一方、濃厚飼料区においては、給餌直前の $11.9 \mu\text{U}/\text{ml}$ からすみやかに上昇し、給餌後360分まで $20 \mu\text{U}/\text{ml}$ 前後の高い値を維持した。濃厚飼料区では、グルコースが粗飼料区より多く吸収されていることが示唆されたことから、本実験においても採食に伴うインスリン分泌の増加が濃厚飼料区において顕著に見られたものと思われる。

インスリンの門脈-動脈濃度差がその時点のインスリン分泌量を示すが、このインスリン分泌量が濃厚飼料区において増加する傾向にあった。Janesら(25)も濃厚飼料区においてインスリン分泌が増加することを報告している。Bodaら(10)は、酪酸やプロピオン酸をヒツジの血中に投与した結果より、VFAがインスリン分泌を刺激することを報告した。酢酸を投与した際は、インスリン分泌にさほど影響を及ぼさないことから、反芻動物においてはVFA、特にプロピオン酸と酪酸がインスリン分泌に強く影響を与えることが確かめられた。

次に消化管でエネルギーとして代謝される量を加えた門脈でのグルコース吸収量を把握するため、安定同位体でラベルしたグルコーストレーサーを用い、門脈へのグルコース吸収量を測定することを試みた。

消化管組織におけるグルコース利用量(Portal glucose utilization)は、粗飼料区で $-2.82 \sim 3.14 \text{mg}/\text{min}/\text{kg}^{0.75}$ の範囲を示し、その経時的な変動はゆるやかなものであった。一方、濃厚飼料区では個体変動が大きいものの、 $-0.16 \sim 1.43 \text{mg}/\text{min}/\text{kg}^{0.75}$ の間で変動が見られた(図9)。これらの値は、絶食や泌乳などのヒツジで $0.50 \sim 1.33 \text{mg}/\text{min}/\text{kg}^{0.75}$ の値を示すというBergmanら(8)の報告と比べても変動が大きかった。また、Huntington(18)やJanesら(24)によれば、維持量の乾草または濃厚飼料約85%をヒツジに与えた実験で、消化管組織におけるグルコース利用量は、粗飼料区でそれぞれ 0.45 、 $0.57 \text{mg}/\text{min}/\text{kg}^{0.75}$ 、濃厚飼料区で 1.20 、 $0.61 \text{mg}/\text{min}/\text{kg}^{0.75}$ になると報告している。これらの値と比較し

ても、今回の結果は、両区ともに高い値であった。このように違いが生ずる原因としては、給餌方法、飼料の違い、給餌量や測定方法の違いなどが挙げられる。まず、給餌方法と飼料の違いについてであるが、彼らはオートフィーダーで等量給与することで給餌による影響を小さくしているため、給餌後に見られるような血流量の増加などもなく、組織での代謝も安定していることが考えられる。本実験では1日1回給餌で給餌後の変動もあわせて見ているため、彼らのデータとは直接には比較できないものと思われる。EssiとBuchanana (11)によれば、グルコース代謝について、維持量のエネルギー給与のもとでは飼料の影響は少ないが、維持以上のエネルギー摂取（彼らは維持の2倍与えている）のもとでは、飼料の影響が強く反映されると報告している。また、Balcellsら(4)の報告によれば、静脈血にグルコースを段階的に多く注入していった場合、消化管組織でのグルコース利用量は直線的に増加したとし、グルコースの利用量は、おもに血液由来のグルコース供給によってかなりの影響を受けることを報告した。一方、Sealら(31)は、プロピオン酸をウシのルーメン内に注入した結果、動脈血のグルコース濃度が有意に増加したが、同時に消化管組織でのグルコース利用量も低下したと報告している。この原因として、プロピオン酸注入によって血液のグルコース供給が増加したものの、乾草のみを与えたため腸管に供給されるグルコース量が少なかったためではないかと述べている。本研究においても同じような現象が見られた。結果は示していないが濃厚飼料区では血液グルコース供給量が採食後に粗飼料区より高かったのに対し、消化管組織で利用されるグルコース利用量は逆に粗飼料区の方が高い値を示した。第1章の結果から、この飼養条件におけるグルコースとデンプンの腸管への流入量は給餌6時間で粗飼料区 2.1g および濃厚区 6.6gと僅かであった。以上のことから本実験において、給与TDN量が等しかったことに加えて採食に伴い濃厚飼料区では内因性のグルコース供給量が増加したにもかかわらず、飼料由来のグルコース流入量が少なかったため、腸管組織でのグルコース利用量が押さえられたのではないかとと思われる。

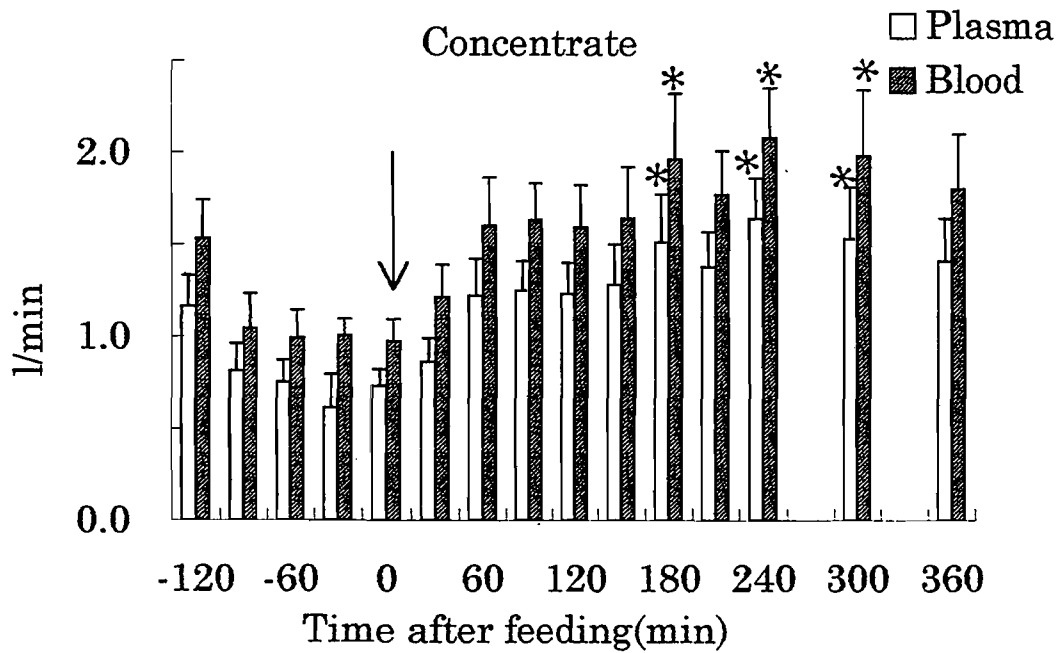
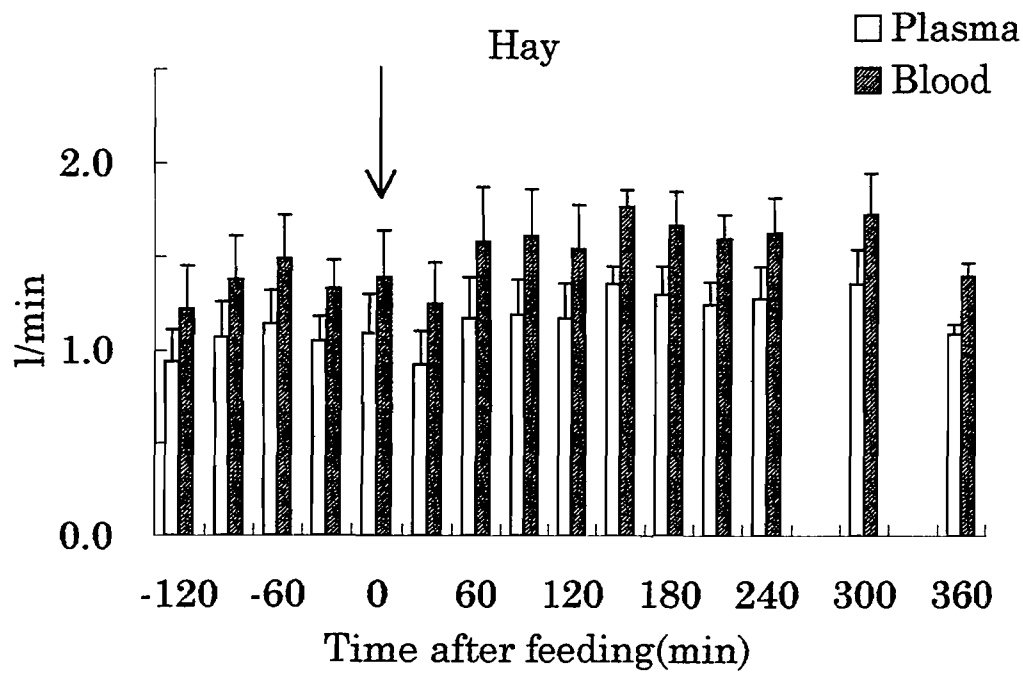
門脈におけるグルコース吸収量(Portal glucose absorption)は、両飼料区ともに給餌前に比べ給餌後に高くなる傾向があった。粗飼料区では、給餌前から $0.24\sim 4.57\text{mg}/\text{min}/\text{kg}^{0.75}$ と比較的高い値が多くみられ、給餌後さらに高くなる傾向が見られたがその変動は、ゆるやかなものであった。粗飼料区と濃厚飼料区のグルコース吸収量を比較してみると、給餌後60分までは粗飼料区の方が高く、給餌120分以降は逆に濃厚飼料区の方が高い傾向がみられた。本実験での採血時間帯が給餌後60分にかけて集中したために、粗飼料区の吸収量の平均が高くなったものと思われる。このことから、飼料の違いによって腸管でのグルコース吸収量の経時的変動は異なり、本実験のような1日1回給餌においてグルコース吸収量を測定する場

合は、採血回数を多くすることが必要であると思われた。また、肝門脈へのグルコース吸収量は、維持量の飼料を給与した場合、飼料区間に大きな違いが認められないことが分かった。しかし、維持量以上の給与量で、飼料区間にどのような違いが現れるのかが、今後の課題の一つと思われる。

体全体のグルコース代謝回転速度を算出した結果、粗飼料区と濃厚飼料区でそれぞれ3.10、4.32 mg/min/kg^{0.75}を示した(表4)。この値は、放射性同位元素を用いたBergmanら(8)の結果(4~5 mg/min/kg^{0.75})とほぼ近似した値であり、代謝速度などの研究には¹³C-glucoseの応用が充分可能であろうと判断された。

以上のように、本実験で用いたトレーサー注入により、門脈へのグルコース吸収量を測定するには、検討すべき点が多々残されていることが分かった。言い換えれば、グルコース代謝回転を測定するには適切な投与量であっても、門脈-動脈濃度差を正確に把握するには適当かどうか、今後更なる検討が必要と思われた。

Tissotら(36)は、近年開発されたGC-IR-MSを用いてヒトでのグルコース代謝を測定した結果、10⁻⁹Mレベルでのグルコーストレーサーの測定が可能であると述べている。我々の実験からも、検討すべき点はあるが、安定同位体の応用によって門脈へのグルコース吸収に関する研究が新たに展開可能であると推測される。



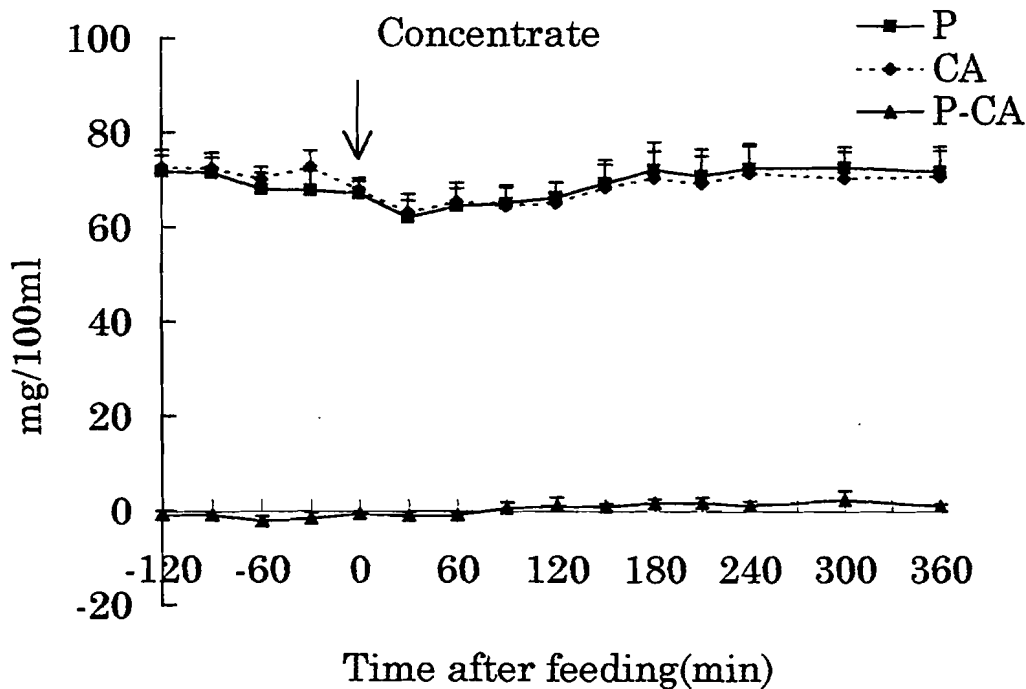
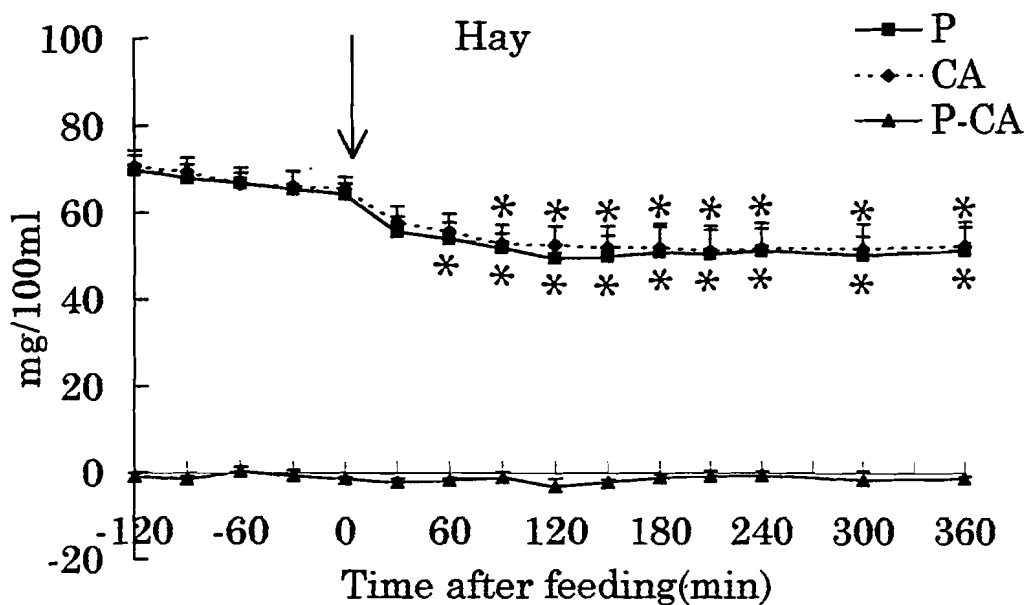
☒ 7 Portal plasma and blood flow before and after feeding in sheep fed hay or concentrate diet.

Mean values for 5 sheep are shown ; the vertical bars represent the S.E.
Hay;hay only

Concentrate diet;concentrate:hay=8:2

↓ ;initiation of feeding

* $P < 0.05$



☒ 8 The concentration of plasma glucose before and after feeding in sheep fed hay or concentrate diet.

Mean values for 5 sheep are shown ; the vertical bars represent the S.E.

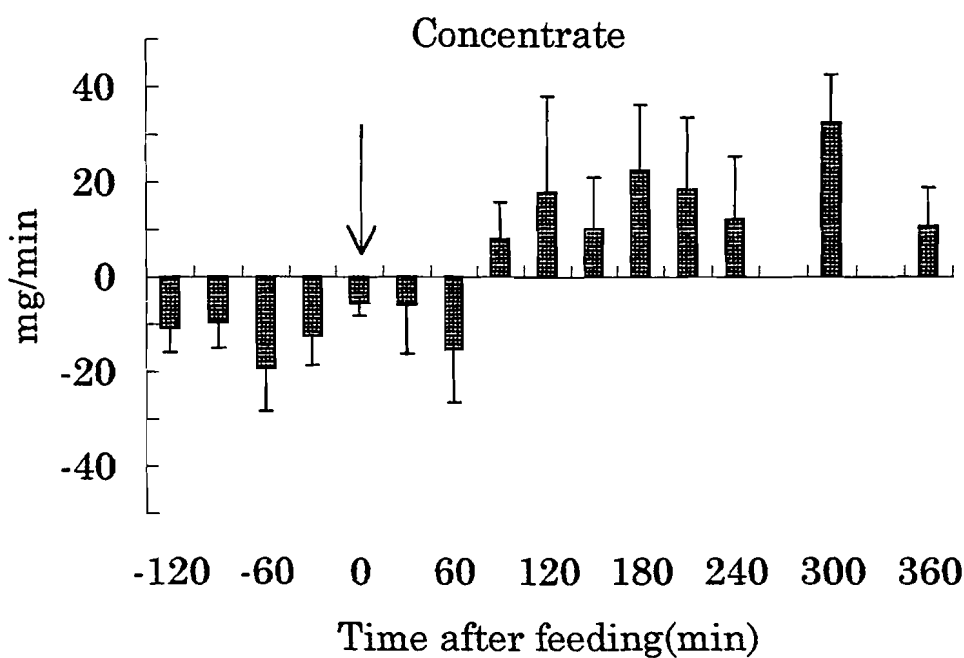
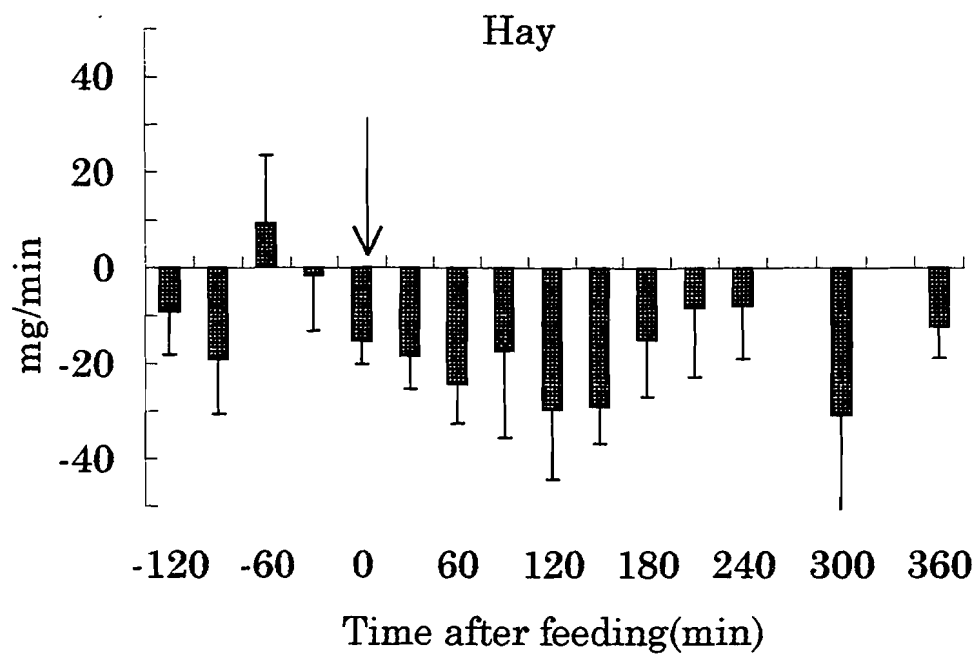
CA;carotid arterial concentration P;Portal concentration

Hay;hay only

Concentrate diet;concentrate:hay=8:2

↓ ;initiation of feeding

* $P < 0.05$



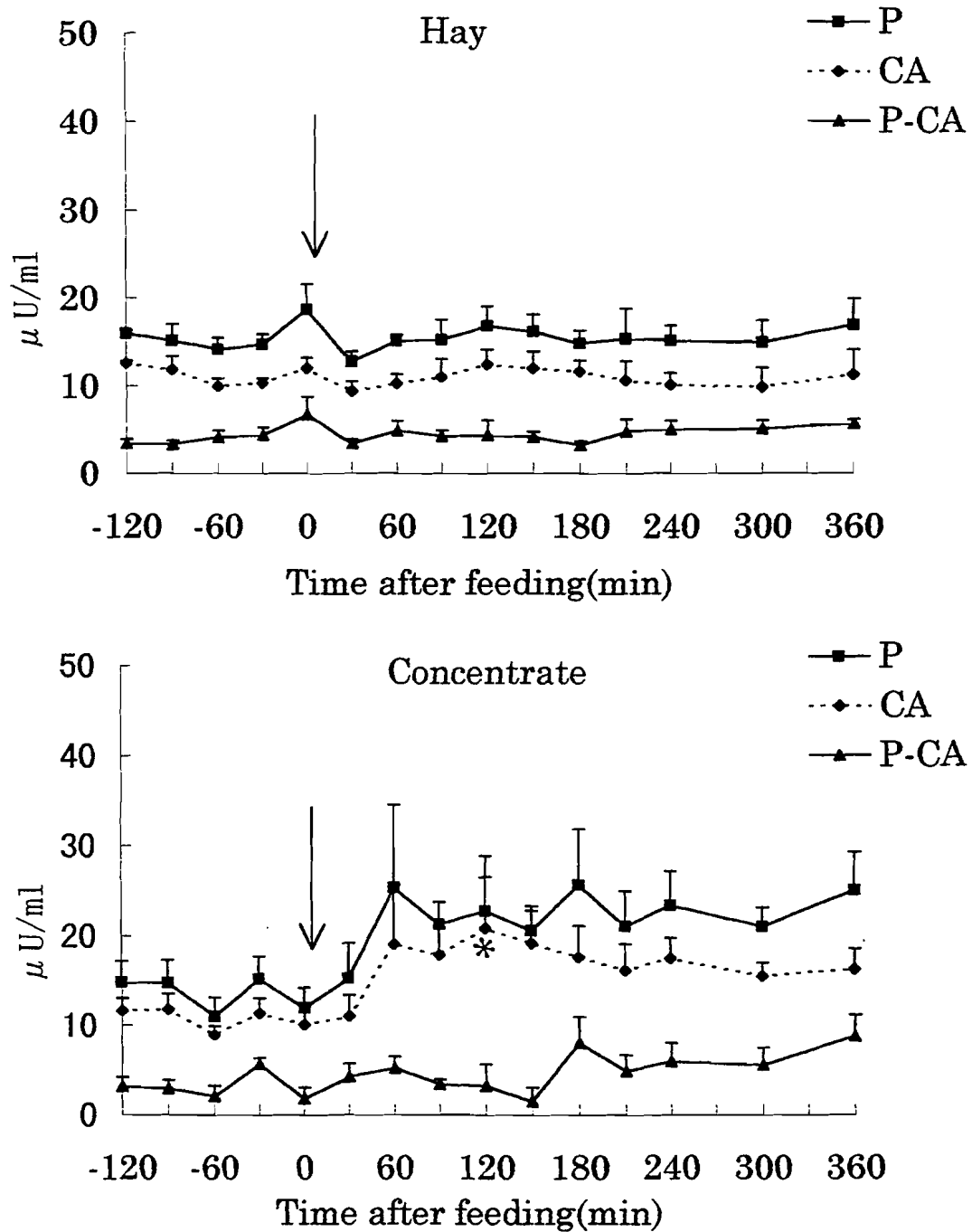
☒ 9 Net glucose absorption before and after feeding in sheep fed hay or concentrate diet.

Mean values for 5 sheep are shown ; the vertical bars represent the S.E.

Hay;hay only

Concentrate diet;concentrate:hay=8:2

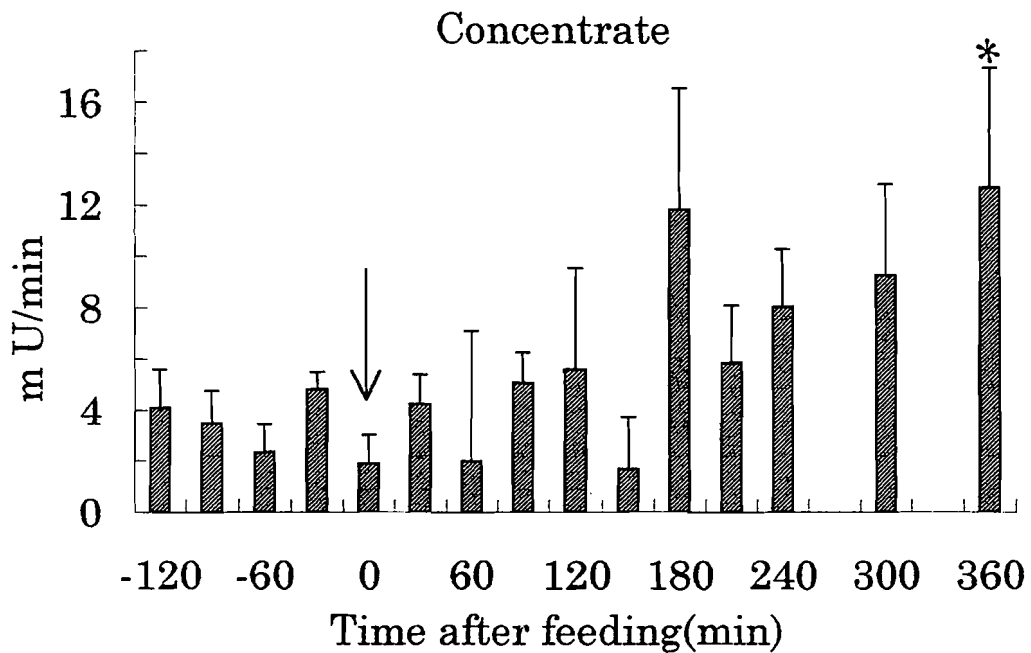
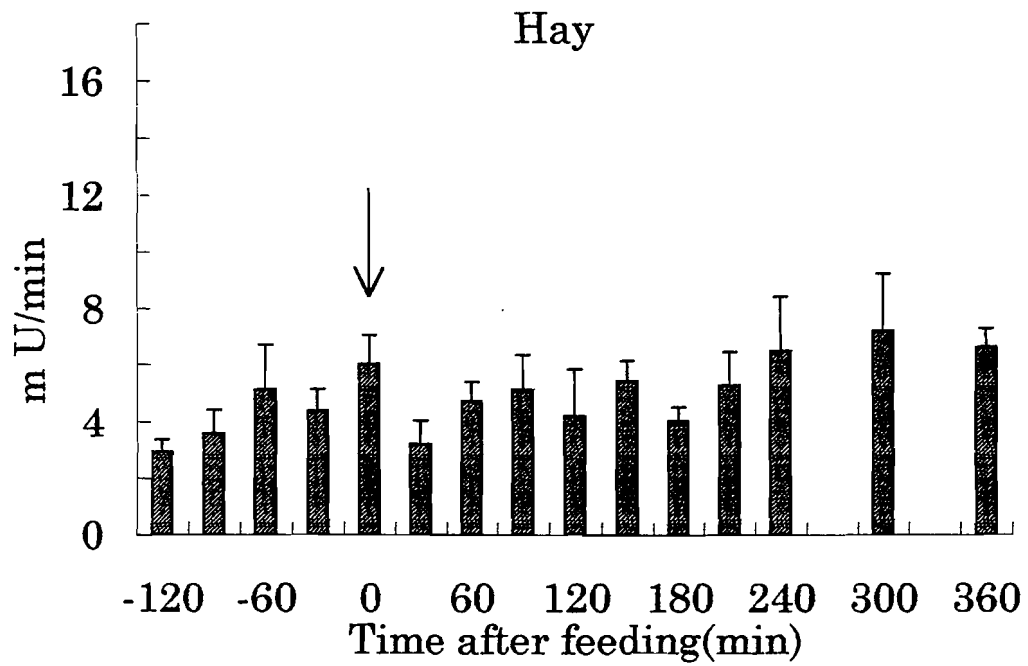
↓ ;initiation of feeding



☒10 The concentration of plasma insulin before and after feeding in sheep fed hay or concentrate diet.

Mean values for 5 sheep are shown ; the vertical bars represent the S.E.
 CA;carotid arterial concentration P;Portal concentration
 Hay;hay only
 Concentrate diet;concentrate:hay=8:2
 ↓ ;initiation of feeding

* $P < 0.05$



☒11 The insulin secretion rate before and after feeding in sheep fed hay or concentrate diet.

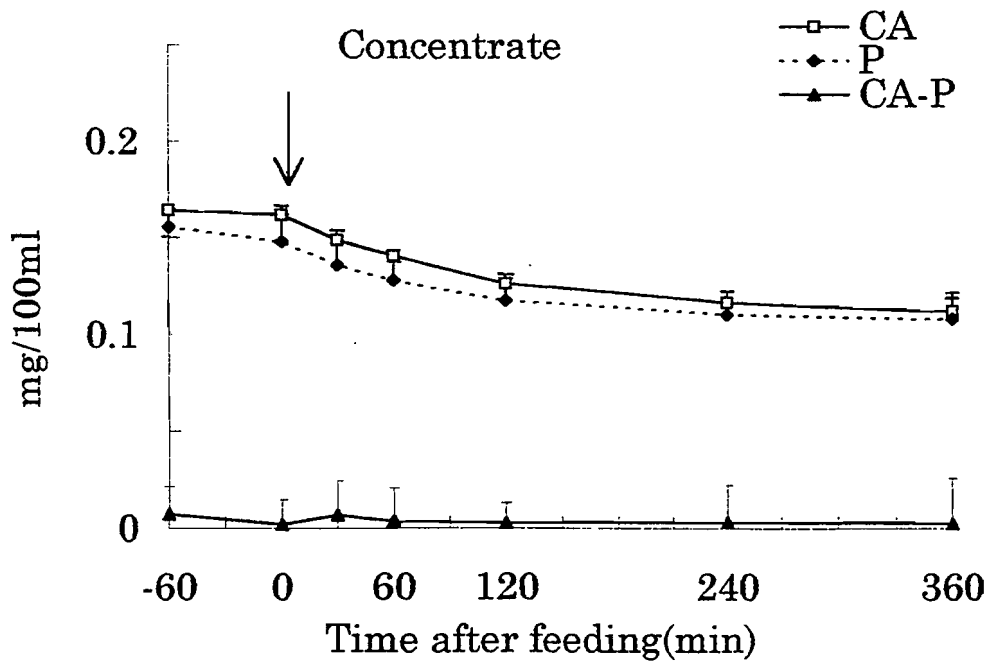
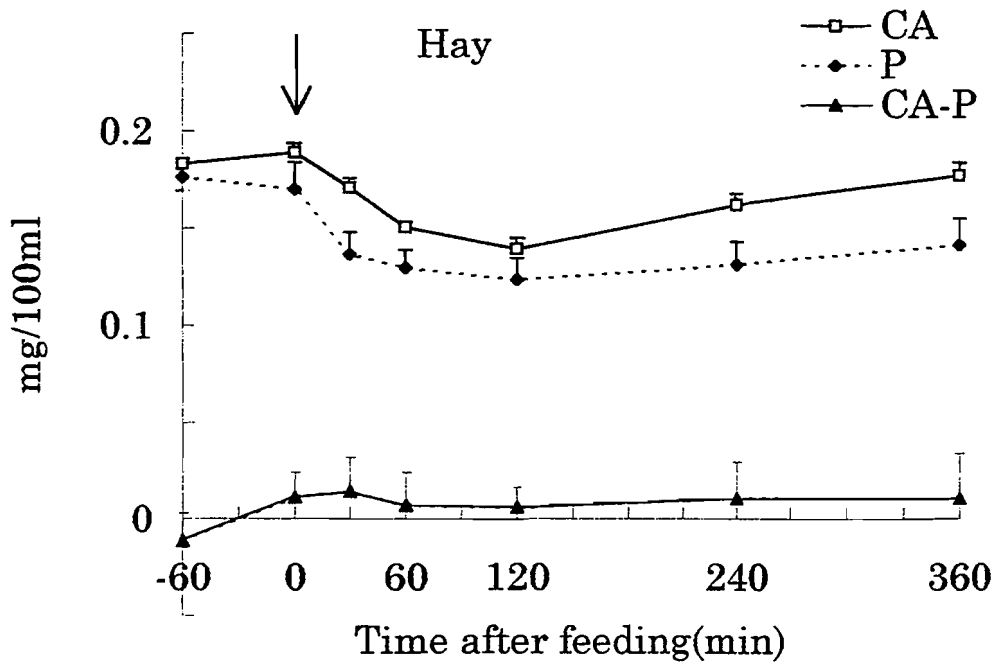
Mean values for 5 sheep are shown ; the vertical bars represent the S.E.

Hay;hay only

Concentrate diet;concentrate:hay=8:2

↓ ;initiation of feeding

* $P < 0.05$



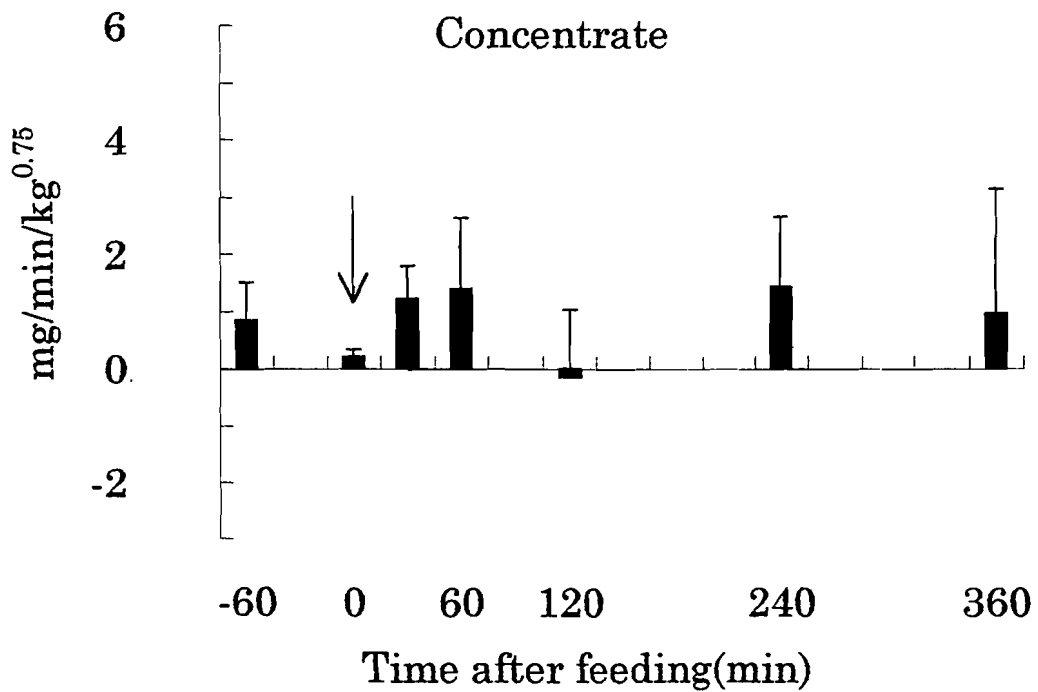
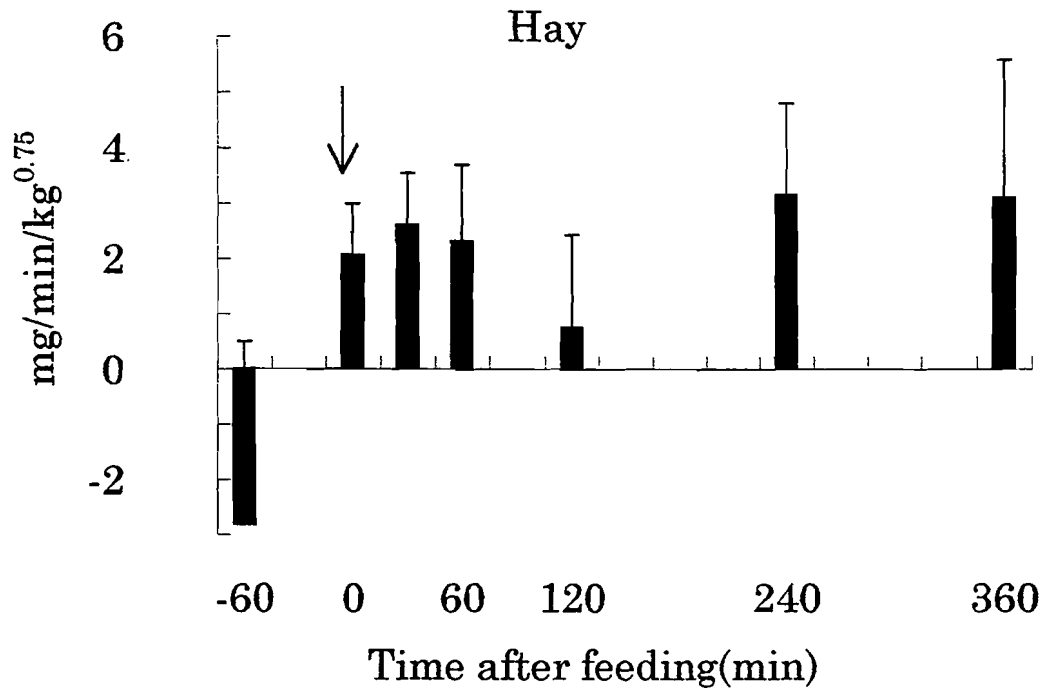
☒12 The concentration of plasma ^{13}C -glucose before and after feeding in sheep fed hay or concentrate diet.

Mean values for 4 sheep are shown ; the vertical bars represent the S.E.

CA;carotid arterial concentration P;portal concentration

Hay;hay only Concentrate diet;concentrate:hay=8:2

↓ ;initiation of feeding



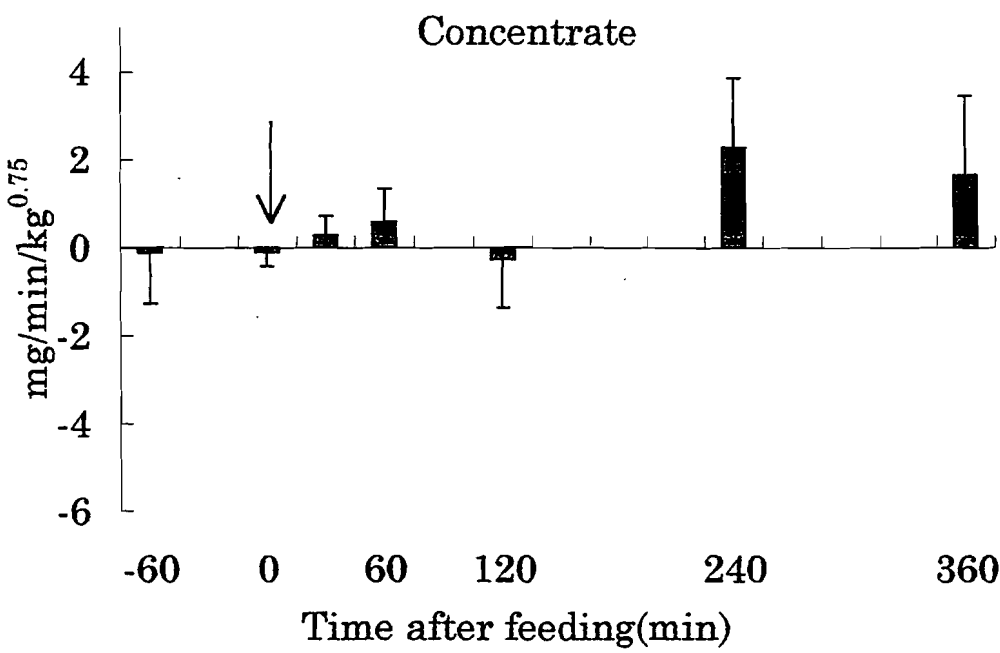
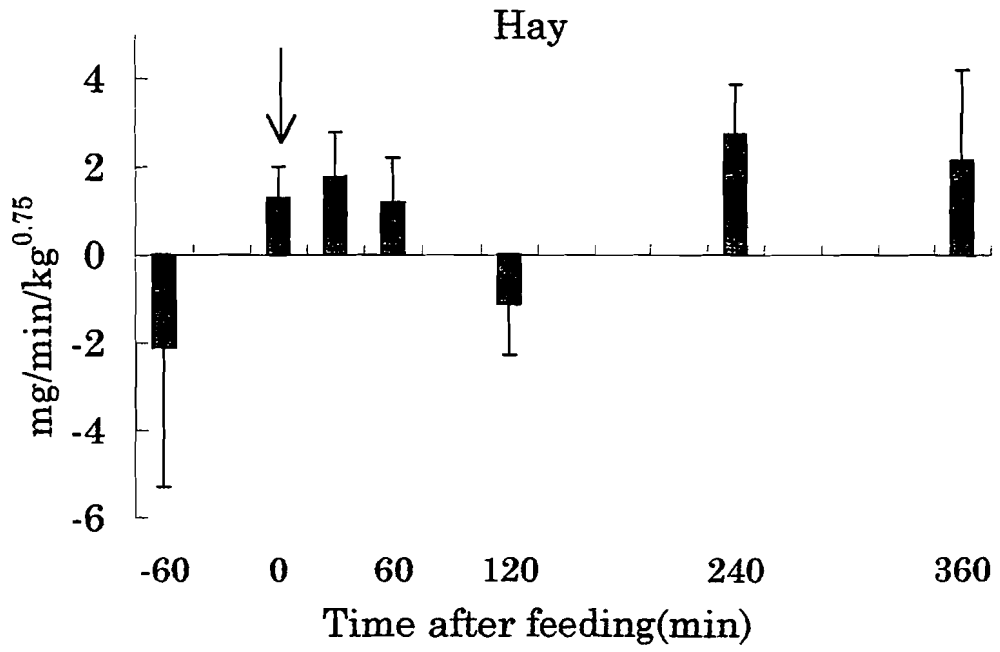
☒13 Portal glucose utilization before and after feeding in sheep fed hay or concentrate diet.

Mean values for 4 sheep are shown ; the vertical bars represent the S.E.

Hay;hay only

Concentrate diet;concentrate:hay=8:2

↓ ;initiation of feeding



☒14 Portal glucose absorption before and after feeding in sheep fed hay or concentrate diet.

Mean values for 4 sheep are shown ; the vertical bars represent the S.E.

Hay; hay only

Concentrate diet; concentrate: hay=8:2

↓ ; initiation of feeding

表3 Plasma glucose concentration and net glucose absorption rate before and after feeding in sheep fed on hay or concentrate diet

Diet	Hay		Concentrate		
	MEAN	±S.E.	MEAN	±S.E.	
Portal plasma concentration(mg/100ml)					
before feeding	66.9	±3.2	69.3	±5.5	NS
after feeding	55.6 *	±4.5	68.8 NS	±5.4	*
Arterial plasma concentration(mg/100ml)					
before feeding	67.7	±3.0	70.6	±5.4	NS
after feeding	53.1 *	±4.9	67.9 NS	±5.2	*
Net glucose absorption rate(mg/min)					
before feeding	-7.2	±3.3	-11.9	±3.7	NS
after feeding	-19.4 NS	±7.0	11.4 *	±6.3	*

Mean values±S.E. of five sheep

Hay ; hay only , Concentrate ; concentrate:hay=8:2

* ; $P < 0.05$, NS ; Not significant

表4 Net glucose absorption,portal utilization and absorption before and after feeding in sheep fed on hay or concentrate diet

Diet	Hay		Concentrate		
	MEAN	±S.E.	MEAN	±S.E.	
Net glucose absorption (mg/min/kg ^{0.75})					
before feeding	0.02	±0.40	-0.66	±0.39	
after feeding	-1.00	±0.48	-0.01	±0.24	NS
Portal glucose utilization (mg/min/kg ^{0.75})					
before feeding	-0.39	±1.33	0.53	±0.39	
after feeding	2.38	±0.99	0.97	±0.51	NS
Portal glucose absorption (mg/min/kg ^{0.75})					
before feeding	-0.42	±1.48	-0.13	±0.71	
after feeding	1.34	±0.55	0.89	±0.66	NS
Glucose turnover rate in whole (mg/min/kg ^{0.75})	3.10	±0.17	4.32	±0.29	*

Mean values±S.E. of four sheep

Hay ; hay only , Concentrate ; concentrate:hay=8:2

* ; $P < 0.05$, NS ; Not significant

第3章 摘出腸管によるグルコース吸収に関する予備的検討

材料および方法

動物はラット7頭を供試した。反転腸管作製は、生理学実習マニュアル（獣医生理学・生理化学教育懇談会編／学窓社）にしたがって行った。試験ではHEPESを添加したKRBバッファーにグルコースを各10、20、30、40、50mM添加し、反転腸管の内外液濃度差の拡散による影響を除くために、内液と外液のグルコース濃度はそれぞれ等しくした。

反転腸管を三角フラスコにいれ、酸素ガスを通じながら37℃で1時間インキュベートした。インキュベート前のKRBをA液、インキュベート後のKRBをB液および腸管内液をそれぞれ試験管に移しとり、そのグルコース濃度を測定した。

A液；粘膜側液（管腔側）、インキュベート前

B液； " （ " ）、インキュベート後

内液；漿膜側液

結果および考察

結果は図15に示すように、外液（管腔側）のグルコース濃度を100として内液のグルコース濃度比を求め、7頭の平均値と標準誤差で示した。グルコース濃度が10mMの試験区で 157 ± 31 、20mMで 127 ± 18 、30mMで 107 ± 4 であり、10mMで取り込みが最も高いように思われた。30、40、50mMの試験区では外液と内液の濃度差がほとんど認められなかった。

これらの結果を踏まえて、ヤギ2頭を供試して同様の実験を行ってみた。しかしながら、得られた結果に明瞭な傾向が得られなかった。このことから、反芻動物を供試する場合の実験方法について検討する必要があるものと思われた。

たとえば、バッファーのグルコース濃度が高い場合は、吸収によって生じる外液と内液のわずかなグルコース濃度差を正確に把握することが難しくなること。さらに腸の部位によっても吸収量に差が生じることも考慮しなければならず、ラットを用いる場合、特に採材の場所をより厳密に決めておかななくてはならないであろう。

今後は、これらの実験方法の検討を行うのと同時に、摘出腸管を供する場合でも第2章の実験と同様にトレーサーを用いるか、腸管粘膜の部位別膜消化活性やグルコース吸収に関わるNa⁺共輸送担体（SGLT-1）の定量などを行うことによって、グルコース吸収能を比較検討する予定である。

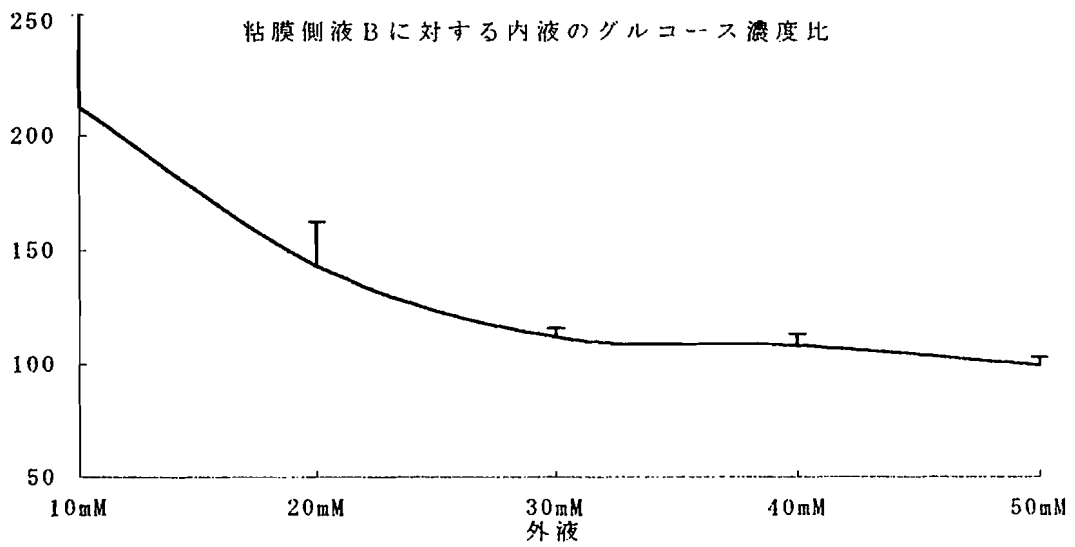
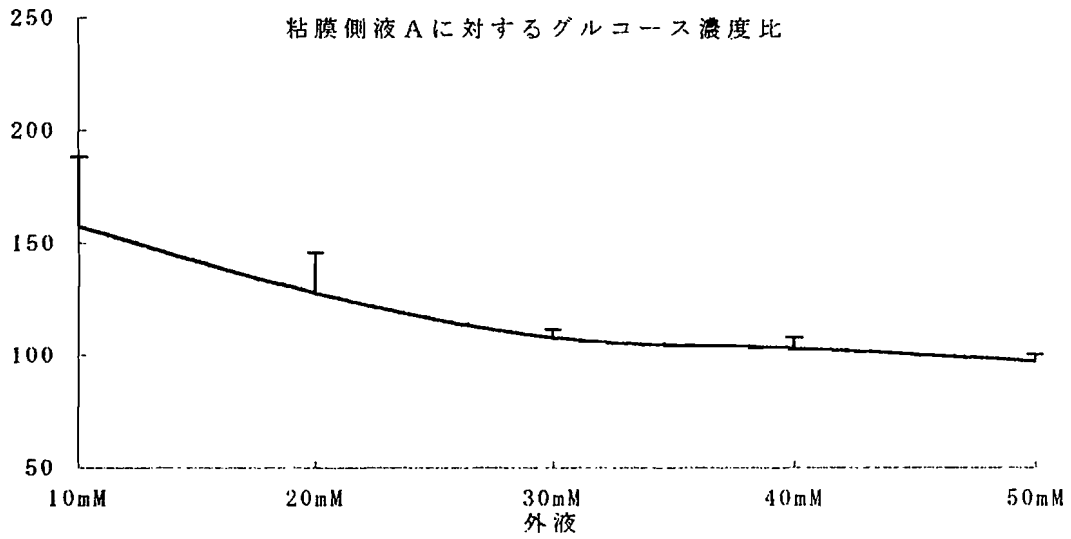


図 15 ラット反転腸管によるグルコース吸収

謝 辞

本報告書に記載した実験は、岩手大学大学院農学研究科の専攻生である飯倉豪、武田利枝ならびに4年生の佐藤美緒各氏をはじめ応用生物学科動物栄養学講座の学生諸氏の協力によって行ったものである。記して謝意を表す。

また、インスリン定量をはじめ研究の遂行にあたって多大なご協力を賜わった東北大学農学部動物生理科学講座、佐々木康之教授、萩野顕彦博士に深謝申し上げる。

文 献

1. 阿部亮 (1988) 炭水化物成分を中心とした飼料分析とその飼料栄養価評価法への応用
農林水産省畜産試験場研究資料 第2号、6～.
2. Armstrong, D.G. & R.R. Smithard (1979) The fate of carbohydrate in the small intestines of ruminant. *Proc. Nutr. Soc.* 38 : 283-294.
3. Baird, G. D., H. W. Symond & R. Ash (1975) Some observation metabolite production and utilization in vivo by the gut and liver of adult dairy cows. *J. Agric. Sci.* 85 : 281-296
4. Balcells, J., C. J. Seal & D. S. Parker (1995) Effect of intravenous glucose infusion on metabolism of portal drained viscera in sheep fed a cereal/straw-based diet. *J. Anim. Sci.* 75 : 2146- 2155
5. Bassett, J. M., R. H. Weston & J. P. Hogan. (1971) Dietary regulation of plasma insulin and growth hormone concentrations in sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 24 : 321
6. Bassett, J. M. (1974) Diurnal patterns of plasma insulin, growth hormone, corticosteroid and metabolite concentrations in fed and fasted sheep. *Aust. J. Biol. Sci.* 27 : 167
7. Bassett, J. M. (1974) Early changes in plasma insulin and growth hormone. *Aust. J. Biol. Sci.* 27 : 157
8. Bergman, E.N., M.L.Katz & C.F.Kaufman (1970) Quantitative aspects of hepatic and portal glucose metabolism and turnover in sheep. *Am. J. Physiol.* 219 (3) : 785-793
9. Bernes, R. J., Comline, R. S. & Dobson, A. (1983) Change in blood flow to the digestive organs of sheep induced by feeding. *Quarterly J. Experimental Physiol.* 68 : 77-88
10. Boda, J. M. & Manns, J. G. (1967) Insulin release by acetate, propionate, butyrate, and glucose in lambs and adult sheep. *Am. J. Physiol.* 212 :747-755
11. Essi, E.& J. B. Buchanan-Smith, (1974)Effect upon glucose metabolism in cows fed low- and high-roughage diets at two levels of intake to sheep. *Brit. J. Nutr.* 33 : 33-44
12. 藤田 忠久 (1995) メン羊における血液グルコース代謝ならびにインスリン分泌能・作用におよぼすサリノマイシン添加給与の影響、修士論文、岩手大学
13. Gaillard, B.D.E. & A.T.Vant Klooster (1973)Observations on the fermentation of carbohydrate along the gastrointestinal tract of fistulated cow . *Neth.J.Agric.Sci.* 21 : 217
14. Hales, J.R. (1973) Radioactive microsphere measurements of cardiac output and regional tissue blood flow in sheep. *Pflugers Archiv* 344 : 119-132

15. Harmon, D.L. (1992) Dietary influence on carbohydrates and small intestinal starch hydrolysis capacity in ruminants. *J. Nutr.* 122 : 203-210
16. Hart, I. C. & J. A. Bines (1975) Hormone and metabolite differences between lactating beef and dairy cattle. *Life Sci.* 16 : 1285-1291
17. Huggett, A. St. G. & Nixon, D. A. (1975) Enzymic determination of blood glucose. *Biochem. J.* 66 : 12
18. Huntington, G.B., R.L.Prior & R.A.Britton (1980) Glucose and lactate absorption and metabolic interrelationship in lambs switched from low to high concentrate diets. *J. Nutr.* 110 : 1904- 1913
19. Huntington, G.B., R.L. Prior & R.A.Britton (1981) Glucose and lactate absorption and metabolic interrelationship in steers switched from low to high concentrate diets. *J. Nutr.* 111 : 1164-1172
20. Huntington, G. B. (1982) Portal blood flow and net absorption of ammonia, urea-N and glucose in non-lactating Holstein Cows. *J. Dairy Sci.* 65 : 1155-1162
21. Huntington, G. B. (1983) Net absorption in beef steers fed silage or high concentrate diets containing four of limestone. *J. Nutr.* 113 : 1175-1164
22. Huntington, G. B. (1984) Net absorption of glucose and nitrogenous compounds by lactating Holstein Cows. *J. Dairy. Sci.* 67 : 1919-1927
23. Janes, A.N. , D. S. Parker, T.E.C. Weekes & D. G. Armstrong (1984) Mesenteric venous blood flow and the net absorption of glucose in sheep fed dried grass or ground maize -based diets. *J. Agric. Sci.,(Camb)* 103 : 549-553
24. Janes,A.N. , T.E.C. Weekes & D.G.Armstrong (1985) Absorption and metabolism of glucose by the mesenteric-drain viscera of sheep fed on dried-grass or ground, maize - based diets. *Brit. J. Nutr.* 54 : 449-458
25. Janes, A.N., T.E.C. Weekes & D.G. Armstrong (1985)Insulin action metabolism in sheep fed on dried-grass or ground, maize-based diets. *Brit. J. Nutr* 54: 459-471
26. Katz, M.L. & E.N. Bergman (1969) Simultaneous measurements of hepatic and portal venous blood flow in the sheep and dog. *Am. J. Physiol.* 216 : 946-952
27. McAtee, J. W. & A. Trenkle. (1971) Metabolic regulation of plasma insulin levels in cattle. *J. Anim. Sci.* 33 : 438-442
28. Ørskov, E.R. (1986)Starch digestion and utilization in ruminants. *J.Anim.Sci.* 63 : 1624-1633

29. Owens, F.N. , R.A.Zinn & Y.K. Kim (1986) Limits of starch digestion in the ruminant small intestine. *J.Anim.Sci* 63 : 1634-1648
30. Roe, W. E., E.N. Bergman & K. Kon (1966) Absorption of ketone bodies and other metabolites via the portal blood of sheep. *Am. J. Vet. Res.* 27 : 279-736
31. Seal, C. J. & D. S. Parker (1994) Effect of intraruminal propionic acid infusion on metabolism of mesenteric- and portal-drained viscera in growing steers fed a roughage diet .⁴T. Volatile fatty acids, glucose and lactate. *J. Anim. Sci.* 72 : 1325-1334
32. Smith, H.W., N.Finkelstein, L.Aliminosa, B.CrawFord & M.Grabber (1945) The renal clearance of substituted hippuric acid derivatives and other aromatic acids in dog and man. *J. Clin. Invest.* 24 : 388-403
33. Sutton, J. D.,I.C. Hart & W. T. Broster (1986) Feeding frequency for lactating cows : effect on rumen fermentation and blood metabolites and hormones. *Brit. J. Nutr.* 56 : 181-192
34. 谷口幸三(1993) 去勢牛におけるデンプンとタンパク質の消化管部位別消化 栄養生理研究会報 37(1) : 65-85
35. Theurer, C.B. (1986) Grain processing effects on starch utilization by ruminants. *J.Anim.Sci.* 63 : 1649- 1662
36. Tissot, S., S. Normand, R. Guilly et al (1990) Use of a new gas chromatograph isotope ratio mass spectrometer to trace exogenous at a very low level of enrichment in man. *Diabetologia* May 34(5) : 372
37. Trenkle, A. (1970) Effects of short-chain fatty acids, feeding and type of diet on plasma insulin levels in sheep. *J. Nutr.* 100 : 1323-1330
38. Tserng K-Y. & S. C. Kalhan, (1983) Calculation of substrate turnover rate in stable isotope tracer studies. *Am.J.Physiol.*245: E308-E311
39. Weekes T.E.C. (1991) Hormonal control of glucose metabolism. In: *Physiological Aspects of Digestion and Metabolism in Ruminants*, eds. T.Tsuda *et al.*, Academic Press Inc. : 183-200