

氏名	リャン シ 梁 曦
本籍（国籍）	中国
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 603 号
学位授与年月日	平成 26 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
学位論文題目	Responses of nutrients and energy metabolism to Chinese herbal medicines in sheep（ヒツジにおける漢方薬に対する栄養素およびエネルギー代謝の反応）
学位審査委員	主査 教授 佐野 宏明 副査 教授 喜多 一美 副査 教授 堀口 健一 副査 教授 松崎 正敏

論文の内容の要旨

Background: The use of antibiotics in animal diets is facing negative feedback due to the hidden danger of drug residues to human health. Traditional Chinese herbal medicine has been used to replace antibiotics in the past two decades and played an increasingly important role in livestock production. The present study was carried out to assess the feeding effects of a traditional nourishing mixture of Chinese herbal medicines (Astragalus root, Angelica root and Atractylodes rhizome) on kinetics of intermediate nutrients and energy metabolism in sheep.

Experiment 1: As a basic investigation, the first experiment was conducted to assess the feeding effects of the mixture of Chinese herbal medicines as feed additive on kinetics of plasma glucose, protein and energy metabolism in sheep. Ruminal fermentation characteristics were also determined. Four sheep were fed either mixed hay (MH-diet) or MH-diet plus 2% of Chinese herbal medicines (CHM-diet) over two 35-day periods using a crossover design. The turnover rate of plasma glucose was measured with an isotope dilution method using [U-¹³C]glucose. The turnover and oxidation rates of plasma leucine, whole body protein synthesis (WBPS) and metabolic heat production were measured using the [1-¹³C]leucine dilution and open circuit calorimetry. Body weight gain of sheep was higher ($P=0.03$) for CHM-diet than MH-diet. Rumen pH was lower ($P=0.02$), concentrations of rumen total volatile fatty acid tended to be higher ($P=0.05$) and acetate were higher ($P=0.04$) for CHM-diet compared with MH-diet. Turnover rates of plasma glucose and leucine did not differ between diets. Oxidation rates of plasma leucine tended to be higher ($P=0.06$) for CHM-diet than MH-diet, but the WBPS did not differ between diets. Metabolic heat production tended to be greater ($P=0.05$) for CHM-diet compared with MH-diet.

Experiment 2: Livestock animals exposed to cold causes a variety of hormonal and physiological changes, which result in negative effects on growth and production. Based on the findings of the first experiment, the second experiment was conducted to assess the feeding effects of Chinese herbal medicines on kinetics of plasma glucose, protein and energy metabolism in sheep kept at thermoneutral environment (23°C) or cold environment (2-4°C). Four sheep were subjected to either MH-diet or CHM-diet over two 23-day periods using a crossover design. Cold exposure was conducted for 5 days. The dilution of [U-¹³C]glucose with open-circuit calorimetry was used to determine the turnover and oxidation rates of plasma glucose and metabolic heat production. The dilution of [1-¹³C]leucine and N balance test were used to determine the turnover rates of plasma leucine, whole body protein synthesis (WBPS) and degradation (WBPD). N intake was higher ($P<0.01$), N excretion through feces was lower ($P=0.04$) and N digestibility was higher ($P=0.02$) for CHM-diet than MH-diet. Rumen pH was lower ($P=0.03$), concentrations of rumen NH₃ were higher ($P=0.04$), concentrations of rumen total VFA and acetate tended to be higher ($P<0.10$) and those of propionate were higher ($P=0.04$) for CHM-diet compared MH-diet. Turnover rates of plasma glucose were higher ($P=0.02$) for CHM-diet than MH-diet, and increased ($P<0.01$) during cold exposure. Oxidation rates of plasma glucose did not differ between diets and also between environments. Turnover rates of plasma leucine, WBPS and WBPD were higher ($P<0.05$) for CHM-diet than MH-diet but remained similar between environmental temperatures. Metabolic heat production were greater ($P=0.03$) for CHM-diet compared with MH-diet, and increased ($P<0.01$) during cold exposure. No significant interaction was detected in diet and environment.

Experiment 3: It was expected that the processing of Chinese herbal medicines might also be an important factor to enhance the feeding effect due to considering about its importance in human treatment. Therefore, the third experiment was conducted to assess the feeding effects of the extracts of Chinese herbal medicines on kinetics of plasma glucose and protein metabolism in sheep. Six sheep were subjected to either MH-diet or CHM-diet (MH-diet plus 2% of extracts of Chinese herbal medicines) over two 21-day periods using a crossover design. The dilution of [U-¹³C]glucose was used to determine the plasma glucose turnover rate. The dilution of [²H₅]phenylalanine and [²H₂]tyrosine was used to determine the turnover rates of plasma phenylalanine and tyrosine, the rate of phenylalanine to tyrosine as well as calculating the WBPS. Rumen pH was lower ($P=0.04$), concentrations of rumen total VFA, acetate and propionate tended to be higher ($P<0.10$) for CHM-diet than MH-diet. Turnover rates of plasma glucose were higher ($P=0.04$) for CHM-diet compared with MH-diet. Turnover rates of plasma phenylalanine and tyrosine tended to be higher ($P<0.10$), and rates of phenylalanine to tyrosine were higher ($P=0.02$) for CHM-diet than MH-diet. The WBPS were also higher ($P=0.04$) for CHM-diet compared with MH-diet.

Experiment 4: Microbial protein is the most important source of amino acids for ruminants because it provides 50 to 80% of total absorbable protein to the small intestine. Enhancing microbial protein synthesis in the rumen will be beneficial to protein metabolism in ruminants. It was expected that the Chinese herbal medicines would also enhance microbial protein synthesis as well as improve intestinal amino acid absorption. Therefore, the fourth experiment was conducted to assess the feeding effects of the extracts of Chinese herbal medicines on microbial protein

synthesis and plasma leucine kinetics in sheep. Six sheep were subjected to either MH-diet or CHM-diet over two 21-day periods using a crossover design. The dilution of [1-¹³C]leucine was used to determine the plasma leucine kinetics. Concentrations of rumen NH₃ tended to be higher ($P=0.08$) for CHM-diet than MH-diet. Concentrations of plasma threonine and glycine were lower ($P<0.05$), and concentrations of plasma iso-leucine, leucine, serine and total amino acid tended to be lower ($P<0.10$) for CHM-diet compared with MH-diet. Turnover rates of plasma leucine tended to be higher ($P=0.06$) for CHM-diet than MH-diet.

Conclusions: From the present findings, it could be concluded that the supplementation of the mixture of Chinese herbal medicines to mixed hay diet could increase rumen VFA concentration as well as enhance plasma glucose, protein and energy metabolism in sheep. However, the responses of these nutrients and energy metabolism to cold exposure were not modified by Chinese herbal medicines. In addition, the extracts of Chinese herbal medicines were considered to be more suitable and safer for animals due to the reduced foreign substances and toxic contents. Therefore, these results suggested that the mixture of Chinese herbal medicines should be considered as a potential feed additive for sheep.

【背景】飼料添加物としての抗生物質の使用はその残留性から人の健康に悪影響を及ぼす危険性が懸念されている。近年、漢方薬は抗生物質の代替として使用されており、家畜生産でもその重要性が増している。本研究はヒツジにおける栄養素代謝に及ぼす漢方薬添加の影響を評価するために実施した。

【実験 I】ヒツジにおいて血漿グルコース、タンパク質、エネルギー代謝に及ぼす飼料添加物としての漢方薬(黄耆 55%、当帰 27%、蒼朮 18%) 給与の影響を検討した。ルーメン性状も併せて測定した。混播牧草(MH 飼料)と混播牧草に 2%の漢方薬を添加した CHM 飼料の 2 飼料区を設定した。実験は 1 期 35 日間のクロスオーバー法に従って実施した。血漿グルコース代謝は[U-¹³C]グルコースの同位元素希釈法を用いて測定した。血漿ロイシン代謝回転速度(LeuTR)、酸化率(LeuOX)、全身のタンパク質合成速度(WBPS)、熱生産量は[1-¹³C]ロイシン(Leu)の同位元素希釈法および呼吸試験装置を用いて測定した。日増体量は CHM 飼料が MH 飼料よりも高かった($P = 0.03$)。CHM 飼料のルーメン pH は低く($P = 0.02$)、揮発性脂肪酸(VFA)は高い傾向を示し($P = 0.05$)、酢酸濃度は高かった($P = 0.04$)。血漿グルコース代謝回転速度(GluTR)、LeuTR は両飼料区に差がなかった。LeuOX は CHM 飼料が高い傾向を示したが($P = 0.06$)、WBPS に差はなかった。熱生産量は CHM 飼料が高い傾向を示した($P = 0.05$)。

【実験 2】家畜が寒冷環境に暴露されると様々な生理、内分泌機能に変化し、結果として成長や生産に負の影響を及ぼす。実験 2 では常温(23°C)および寒冷環境(2-4°C)に暴露したヒツジにおける血漿グルコース、タンパク質、エネルギー代謝に及ぼす漢方薬給与の影響を検討した。ヒツジ 4 頭を 1 期 23 日間のクロスオーバー法に従い、MH 飼料と CHM 飼料に振り分けた。血漿 GluTR、グルコース酸化率(GluOX)、熱生産量は[U-¹³C]グルコースの

同位元素希釈法および呼吸試験装置を用いて測定した。血漿 LeuTR、WBPS、全身のタンパク質分解速度(WBPD)は $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}$ の同位元素希釈法、窒素出納試験、呼吸試験装置を用いて測定した。MH 飼料と比較して CHM 飼料の N 摂取量は多く ($P < 0.01$)、N 排泄量は低く ($P = 0.04$)、N 消化率は高かった ($P = 0.02$)。CHM 飼料のルーメン pH は低く ($P = 0.03$)、アンモニア (NH_3) 濃度は高く ($P = 0.04$)、総 VFA、酢酸は高い傾向を示し ($P < 0.10$)、プロピオン酸濃度は高かった ($P = 0.04$)。血漿 GluTR は CHM 飼料が高く ($P = 0.02$)、寒冷暴露時に増加した ($P < 0.01$)。GluOX は飼料間および環境温度間で差がなかった。血漿 LeuTR、WBPS、WBPD は CHM 飼料が高かったが ($P < 0.05$)、環境温度では差がなかった。熱生産量は CHM 飼料が MH 飼料よりも高く ($P = 0.03$)、寒冷暴露時に増加した ($P < 0.01$)。飼料と環境温度の交互作用は認められなかった。

【実験 3】漢方薬は一般的に煎じて服用することから、漢方薬の服用法も重要であると考えられる。そこで、実験 3 ではヒツジにおける血漿グルコース、タンパク質代謝に及ぼす漢方薬の煎じ液投与の影響を検討した。ヒツジ 6 頭を 1 期 23 日間のクロスオーバー法に従って MH 飼料と CHM 飼料に振り分けた。血漿グルコース代謝は $[\text{U}-^{13}\text{C}]\text{グルコース}$ の同位元素希釈法を用いて測定した。血漿フェニルアラニン(Phe)、チロシン(Tyr)代謝回転速度(PheTR、TyrTR)および Phe から Tyr への酸化(PheOX)は $[\text{H}_5]\text{Phe}$ と $[\text{H}_2]\text{Tyr}$ の同位元素希釈法を用いて測定した。MH 飼料と比較して CHM 飼料のルーメン pH は低く ($P = 0.04$)、ルーメン総 VFA、酢酸およびプロピオン酸濃度は高い傾向を示した ($P < 0.10$)。血漿 GluTR は CHM 飼料が高く ($P = 0.04$)、血漿 PheTR、TyrTR は CHM 飼料が高い傾向にあり ($P < 0.10$)、PheOX は高かった ($P = 0.02$)。WBPS もまた CHM 飼料が高かった ($P = 0.04$)。

【実験 4】微生物態タンパク質は、小腸に達する吸収可能なタンパク質の 50 から 80% を供給するので、反芻動物にとって最も重要なアミノ酸源である。ルーメン内における微生物タンパク質合成の増加はタンパク質代謝にとって有益である。漢方薬は微生物態タンパク質合成を促進すると同時に小腸でのアミノ酸吸収を改善するかもしれない。実験 4 はヒツジにおける微生物態タンパク質合成および血漿 Leu 代謝に及ぼす漢方薬の煎じ液投与の影響について検討した。ヒツジ 6 頭を用い、1 期 23 日間のクロスオーバー法に従って MH 飼料と CHM 飼料に振り分けた。血漿 Leu 代謝は $[1-^{13}\text{C}]\text{Leu}$ の同位元素希釈法を用いて測定した。ルーメン NH_3 濃度は MH 飼料より CHM 飼料が高い傾向を示した ($P = 0.08$)。血漿 threonine および glycine 濃度は低く ($P < 0.05$)、血漿 isoleucine、Leu、serine および総アミノ酸濃度は低い傾向を示した ($P < 0.10$)。血漿 LeuTR は CHM 飼料が高い傾向を示した ($P = 0.06$)。

【結論】本研究で得られた知見から、漢方薬はルーメン VFA 産生を増加させ、血漿グルコース、タンパク質、エネルギー代謝を増加させると結論される。さらに、漢方薬の煎じ液の投与は効果的であると考えられる。以上の結果から、漢方薬はヒツジにとって有力な飼料添加物になり得ることが示された。

論文審査の結果の要旨

抗生物質はその残留性から人の健康に悪影響を及ぼす危険性が指摘されている。近年、漢方薬は抗生物質の代替として使用されており、家畜生産でも重要性が増している。本研究はヒツジにおける漢方薬に対する栄養素、エネルギー代謝の反応を評価するために実施した。

ヒツジのルーメン発酵性状、血漿グルコース、タンパク質、エネルギー代謝に及ぼす漢方薬(黄耆 55%、当帰 27%、蒼朮 18%)添加の影響を検討した。牧草(MH 区)と牧草の2%の漢方薬を添加した CHM 区の2飼料区を設定し、クロスオーバー法に従い血漿グルコース代謝回転速度(GluTR)、ロイシン代謝回転速度(LeuTR)、ロイシン酸化率(LeuOX)、全身のタンパク質合成速度(WBPS)、熱生産量を測定した。ルーメン pH は CHM 区で低く、揮発性脂肪酸(VFA)は高い傾向を示し、酢酸濃度は高かった。血漿 GluTR、LeuTR は差がなかった。熱生産量、LeuOX は CHM 区で高い傾向を示したが、WBPS に差はなかった(第1章)。家畜が寒冷環境に暴露されると様々の生理、内分泌機能に変化する。そこで、MH 区と CHM 区を設定し、常温(23℃)および寒冷環境(2-4℃)に暴露したヒツジの窒素(N)出納、ルーメン発酵性状、血漿グルコース、タンパク質、エネルギー代謝に及ぼす漢方薬添加の影響を検討した。N 消化率は CHM 区で高かった。ルーメン pH は CHM 区で低く、アンモニア、プロピオン酸濃度は高かった。血漿 GluTR は CHM 区で高く、寒冷暴露時に増加した。血漿 LeuTR、WBPS、全身のタンパク質分解速度は CHM 区で高かった。熱生産量は CHM 区で高く、寒冷暴露時に増加した(第2章)。一般に漢方薬は煎じて服用されることから、服用法は重要である。そこで、MH 区と漢方薬抽出液を経口投与する ECHM 区を設定し、ヒツジの血漿グルコース、タンパク質代謝に及ぼす漢方薬抽出液経口投与の影響を検討した。ルーメン pH は ECHM 区で低く、総 VFA、酢酸、プロピオン酸濃度は高い傾向を示した。血漿 GluTR は ECHM 区で高く、血漿フェニルアラニン(Phe)、チロシン(Tyr)代謝回転速度は高い傾向を示し、Phe から Tyr への酸化速度、WBPS は高かった(第3章)。ルーメン内微生物態タンパク質(MCP)は反芻動物にとって最も重要なアミノ酸源あり、漢方薬は MCP 合成、アミノ酸吸収を促進するかもしれない。そこで、MH 区と ECHM 区を設定し、ヒツジの下部消化管への微生物態 N 供給量(MNS)、血漿 Leu 代謝に及ぼす漢方薬抽出液経口投与の影響を検討した。MNS は ECHM 区で高く、血漿 LeuTR は高い傾向を示した(第4章)。

本研究では、漢方薬はヒツジのルーメン内 VFA 産生、MCP 合成、血漿グルコース、タンパク質、エネルギー代謝を亢進することを明らかにした。これらの結果から、漢方薬は飼料添加物として反芻家畜の飼養技術向上に貢献できるものと期待される。よって、本審査委員会は本論文が博士(農学)の学位を授与するに十分な価値を有する

ものと判断した。

学位論文の基礎となる学術論文

Liang, X., K. Yamazaki, M. Kamruzzaman, X. Bi, A. Panthee and H. Sano (2013) Effects of Chinese herbal medicines as feed additives on plasma glucose, protein and energy metabolism in sheep. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **4** : Article No.51.

参考論文

Kamruzzaman, M., **X. Liang**, N. Sekiguchi and H. Sano (2014) Effect of feeding garlic leaf on microbial nitrogen supply, kinetics of plasma phenylalanine, tyrosine and protein synthesis in sheep. *Anim. Sci. J.* (In press)