

	イسلام シルピ
<b>氏 名</b>	<b>ISLAM, Shilpi</b>
本籍（国籍）	バングラデシュ
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 622 号
学位授与年月日	平成 26 年 9 月 25 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
<b>学位論文題目</b>	Effect of ethanol contained in apple pomace silage on postprandial metabolism of Suffolk sheep (リンゴ粕サイレージに含まれるエタノールがサフォーク種めん羊の食餌後代謝に及ぼす影響について)
学位審査委員	主査 教授 松崎 正敏 副査 教授 鈴木 裕之 副査 教授 堀口 健一 副査 客員教授 河本 英憲

## 論文の内容の要旨

Ethanol is a common constituent of fermented feeds for ruminant livestock. Apple pomace contains high amounts of moisture, fermentable carbohydrate and organic acids which are responsible for prominent production of ethanol in apple pomace silage (APS). Excess alcohol intake lead to an increased alcohol load into liver and followed by a period of elevated peripheral concentrations of alcohol, causing changes in ruminal fermentation pattern and metabolite concentrations in blood, and may influence the postprandial metabolism. Thus, this study was undertaken to investigate the effect of feeding APS which is rich in ethanol on blood parameters, liver glycogen and some regulatory enzymes for hepatic gluconeogenesis. Nutritive values of APS containing different amounts of ethanol were also evaluated in Suffolk sheep.

### 1. Effect of feeding APS ethanol on response of blood parameters in Suffolk ewes

Two experiments were conducted. In experiment 1, four ewes were fed alfalfa hay cube and either rice straw APS (RS-APS, 33.4 g of ethanol/kg DM) or concentrate (control) in a 2×2 crossover design over two 35-day periods. Alfalfa hay cube and either the RS-APS or concentrate were provided at a ratio of 30:70 of TDN requirement for maintenance and daily 100g gain. On the last day of each 35 days period, blood samples were collected during 8 hours before and after morning feed, and plasma levels of ethanol, lactate, β-hydroxybutyrate (BHBA), insulin, metabolites and glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) and glutamate pyruvate transaminase (GPT) were assayed. The area upper or under the curve (AUC) of blood parameters for 2 and 8 hours were calculated and assessed correlations among the AUCs. Plasma concentrations of ethanol, lactate and BHBA were elevated after feeding of RS-APS and peaked at 2, 1 and 4 hours, respectively. Plasma

insulin level tended to increase after RS-APS feeding but the magnitude of postprandial glucose decline was not different between the treatments. After feeding of RS-APS, plasma F-Cho, HDL-Cho and phospholipid were increased and plasma urea nitrogen (UN) was decreased. The AUCs of plasma ethanol and lactate were positively correlated with that of BHBA. Insulin AUC was positively correlated with AUCs of ethanol and BHBA.

In experiment 2, effects of feeding low and high levels of ethanol (44.1g vs. 66.9 g of ethanol/kg DM) contained in two APS (L- and H-APS) on blood parameters were compared. Animals, design, feeding level, duration, sampling procedure and parameters tested were same as in experiment 1. The changes in blood parameters showed similar trends after feeding of two APSs, which correspond to the changes after APS feeding in experiment 1, however no significant treatment effect was detected. The AUC of lactate was positively correlated with those of BHBA and triglyceride. The BHBA AUC was also positively correlated with that of triglyceride. The glucose AUC was negatively correlated with AUCs of lactate and BHBA.

Simultaneous increases in plasma ethanol, lactate and BHBA, and the correlations between these AUCs would indicate that higher priority of ethanol metabolism are given over glucose metabolism in the liver after APS ethanol consumption.

## **2. Nutritive values of APSs containing different amounts of ethanol**

Ethanol production during ensiling leads to larger DM loses compared to common lactic acid fermentation. Therefore ethanol content may affect nutritive values of APS containing different amounts of ethanol. In this experiment, 3 ewes were used in a 3×3 Latin square design over three period assigned with three dietary treatments: hay diet, L-APS (48.7 g of ethanol/kg DM) diet and H-APS (87.2 g of ethanol/kg DM) diet. Alfalfa hay cube and either the L-APS or H-APS provided half of 110% TDN requirement for maintenance in L- or H-APS diet and control group fulfil 110% TDN requirement from alfalfa hay cube. During the last 7 days of each 21 day period, faeces, urine and feed refusal were collected, and blood samples were collected after 3 hours of morning feed on the last day of each period. Apparent digestibility of all nutrients were higher in APS diets and CP digestibility was lower in L-APS diet. There was no significant difference in nutrient digestibility of all items and TDN content between the L-APS and H-APS. Nitrogen intake, faecal nitrogen excretion and total nitrogen excretion were higher in ewes fed hay diet and there was no significant different between the both APS diets. Higher ethanol intake produced higher plasma ethanol concentration in the H-APS than L-APS treatment. Postprandial changes in plasma parameters after feeding of two APSs followed similar trends in the experiment 1 and 2, and the magnitude of response was not different between L- and H-APS treatments.

## **3. Effect of ethanol contained in apple pomace silage on hepatic metabolism of Suffolk sheep**

Four each of ewes and wethers were fed alfalfa hay cube and either APS (109.4 g of ethanol/kg DM) or concentrate (control) in a 2×2 factorial design over 28 day periods. Alfalfa hay cube and either APS or concentrate were provided at a ratio of 30:70 of TDN

requirement for 110% of maintenance. Blood samples were collected weekly immediately before morning feed, and at exactly after 3 hours of morning feed immediately before slaughtering on the last day of 28 day period. All plasma samples were assayed for ethanol, lactate, BHBA, insulin, plasma metabolites, GOT and GPT. The animal was slaughtered after 3 hours of morning feed, and liver sample was collected for measurements for glycogen content and mRNA expression for the genes related gluconeogenesis; pyruvate carboxylase (PC), phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK), fructose 1,6-bisphosphatase (FBP1), glucose-6-phosphatase (G6Pase), glycogen synthase (GS). In APS group, pre-feeding plasma levels of ethanol, glucose, T-Cho, F-Cho, HDL-Cho, and phospholipid were increased and that of BHBA was declined. Postprandial plasma ethanol, BHBA, T-Cho, F-Cho, HDL-Cho, phospholipid and triglyceride concentrations were increased in APS group and postprandial glucose concentration was not affected by treatment however hypoglycemic tendency occurred in ewes. APS group had significant heavier liver. The mRNA expression of PEPCK tended to greater and G6Pase was significantly greater in the liver from H-APS sheep, presumably because of compensatory over expression of these gluconeogenic enzymes under a condition of suppressed gluconeogenesis generated by ethanol consumption from APS.

### **Conclusion**

In this study, it is confirmed that apple pomace can be well preserved by ethanol fermentation and nutritionally balanced APS can be used as a replacer of concentrate feed for ruminants. Suffolk sheep are capable to utilize 50 g/d ethanol intake without any clinical sign of adverse effect. Examination of responses in blood parameters after feeding of APS ethanol revealed increased plasma ethanol, BHBA and lipid components. Heavier liver and higher mRNA expression for PEPCK and G6Pase were observed after APS ethanol ingestion. These results indicate that APS ethanol consumption induce postprandial transient hyperketonemia through suppression of hepatic gluconeogenesis while the liver has to be giving priority to metabolize ethanol over other hepatic metabolism. Therefore, farmers need to be cautious when they feed alcoholic fermented feeds to ruminant livestock.

エタノールは反芻動物に給与する高水分発酵飼料に通常認められる発酵産物である。特に、リンゴジュース搾り粕（リンゴ粕）のように、高水分で、易発酵性炭水化物と有機酸の含有量の多い原料のサイレージ発酵過程においてはエタノール生成量の著しい上昇が認められている。過剰なアルコール摂取は腸管を經由して直接肝臓に流入し、摂取後数時間にわたる末梢血中アルコール濃度の上昇を引き起こす。加えて、ルーメン発酵パターンの変化や食餌後の血糖値の低下、さらには頭新生の抑制が懸念される。そこで、本研究ではサフォーク種めん羊を用いて、エタノール含量の高いリンゴ粕サイレージ（APS）が血液成分、肝臓のグリコーゲン含量や頭新生関連酵素、ならびに栄養価に及ぼす影響を調べた。

#### **1. エタノール含有のAPS給与が血液成分に及ぼす影響**

4頭の育成雌めん羊を用いて、アルファルファヘイキューブとAPS、ないし配合飼料（対照）をTDN給与比率30：70となるように給与して、1期35日間のクロスオーバー法によ

る飼養試験を行い、最終の 35 日目に給餌前後 8 時間にわたって採血を行って血液成分濃度への影響を調べた。APS の TDN 含量は配合飼料と同程度となるように、大豆粕、フスマ、トウモロコシおよび稲ワラを配合して調整した。APS 給与群では増体が若干劣り、血漿中のエタノール、乳酸および  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 (BHBA) 濃度が給餌後に上昇を示した。APS 給与後には血漿中脂質成分の上昇も観察された。APS 給与に伴う血漿中エタノールと BHBA 濃度上昇の反応面積 (AUC) が有意な上昇を示し、血漿中エタノールと乳酸の AUC と BHBA のそれとの間に正の相関が、また、インスリンの AUC とエタノールならびに BHBA の AUC との間で正の相関が認められ、APS 給与に伴う血漿中エタノール濃度上昇が様々な血中代謝成分の濃度変化を引き起こすことが明らかとなった。

## 2. エタノール含量の異なる APS の栄養価および給与後の血液成分に及ぼす影響

リンゴ粕単独で密閉貯蔵すると高濃度のエタノールが生成されることに着目して、リンゴ粕と大豆粕、フスマおよびビートパルプの配合割合を変化させることなく、リンゴ粕単独での貯蔵期間を変化させて APS を詰め込み調製し、エタノール含量の異なる APS を調製した。リンゴ粕産出直後に APS 調製した場合のエタノール含量は 48.7g/kgDM であった (L-APS) のに対し、リンゴ粕単独で 2 ヶ月間貯蔵した後に詰め込み調製した場合にはエタノール含量が 87.2g/kgDM と高くなった (H-APS)。アルファルファヘイキューブ単独の基礎飼料区に加えて、半量を L-APS ないし H-APS で置き換えた 3 試験区を、3 頭の雌めん羊を用いて、1 期 21 日間の 3×3 のラテン方格法で全糞尿採取法による出納試験を実施し、各期の最終日に給餌前後の血液サンプルを採取した。エタノール含量の異なる L-APS と H-APS との間で、飼料成分の消化率や窒素出納に差は認められなかった。H-APS 区ではエタノール摂取量が L-APS 区よりも大きくなり、血中エタノール含量も高くなった。いずれの APS 給与区においても、給餌後のエタノール、乳酸、BHBA および総コレステロールの血漿中濃度が有意に上昇し、遊離コレステロールとリン脂質の上昇ならびに血糖値減少の傾向が認められた。APS 給与区では血漿中のエタノールと BHBA の AUC が有意な上昇を示したが、エタノールの AUC は、L-APS 区で H-APS 区よりも小さな値を示した。血しょう中のエタノールの AUC と乳酸、中性脂肪および GOT の AUC との間で正の、血しょう中尿素態窒素の AUC との間では負の相関が見られた。血しょう中乳酸の給餌後の AUC は遊離コレステロール、中性脂肪および GOT のそれとは正の、尿素態窒素のそれとは負の相関が認められた。血しょう中の BHBA とグルコースの AUC との間には負の相関が認められ、APS 中のエタノール含量の多少に関わらず、エタノール摂取に伴う血中濃度の上昇に対応した乳酸や BHBA の血漿中濃度の上昇が再現された。さらに、エタノール含量の異なる L-APS と H-APS の給与量を増加させてクロスオーバー法による飼養試験を行い、給餌後の血液成分濃度の変化を比較した。L-APS あるいは H-APS の増量給与後には血液成分濃度の変化にほとんど差はみられなかったが、APS 給与後の血液成分濃度の増減の指標として産出した AUC 間の相関解析の結果からは、乳酸と BHBA、あるいはグルコースと乳酸や BHBA の関連が明らかとなった。

## 3. APS 給与によるアルコール摂取が糖新生関連酵素の遺伝子発現に及ぼす影響

去勢雄と雌各 4 頭のサフォーク種めん羊に、アルファルファヘイキューブに加えて、配合飼料あるいは APS を TDN 給与比率 30:70 で維持量給与して、28 日間の飼養試験を実施した。毎週、朝の給餌前に頸静脈血を採血するとともに、最終日の給餌後 3 時間のと畜直前にも採血を行い代謝成分等の血液成分の測定を行った。と畜は当日朝の給餌後 3 時間経過後に行い、

肝臓の新鮮試料を採取して、グリコーゲン含量と糖新生関連酵素のmRNAレベルを測定した。APS給与区では朝の給餌前のエタノール、グルコースおよびコレステロール類とリン脂質の血漿中濃度の上昇とBHBA濃度の低下が認められた。最終日の飼料給与3時間後には、APS給与による血しょう中のエタノール、BHBAおよび脂質成分の濃度上昇が再現されたのに加えて、雌めん羊では低血糖も観察された。APS給与により肝臓重量の増大とともに、ホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ（PEPCK）のmRNAレベルの上昇傾向とグルコース6フォスファターゼ（GPase）のmRNAの有意な上昇が観察され、エタノール代謝の負担や糖新生の抑制に対する代償的な反応が生じているものと考えられた。

以上のように、様々なエタノール含量のAPS給与後に臨床的な病的症状は認められないものの、血漿中エタノール、乳酸ならびにケトン体（BHBA）濃度の一貫した上昇や糖新生関連酵素のmRNAレベルの上昇など、APS給与後の一過性の糖新生の抑制に伴う遺伝子発現レベルの変化や高ケトン血漿などがみられることが明らかとなった。本研究の結果から、アルコール発酵型飼料給与時には当該飼料への馴致と注意深い給与家畜の観察が必要なことが示唆される。

## 論文審査の結果の要旨

リンゴジュース搾り粕（リンゴ粕）は高水分で可溶性糖類含量が高く、産出後すみやかにエタノールが生成される。リンゴ粕に不足するタンパク質その他の栄養素を添加材料の混合で補充し水分含量を調整してサイレージ化すると、低pHで貯蔵性が高く、原物あたり1～3%ものエタノールの含まれるサイレージとなる。近年、利用が拡大している発酵TMRやイアコーンサイレージ、生粗のソフトグレインサイレージなどでも少なくないエタノールの生成が認められており、発酵飼料中のエタノール摂取による栄養生理面での影響解明が求められている。本研究は、配合飼料の代替利用を想定して栄養バランスを調整したリンゴ粕混合サイレージ（APS）給与によるエタノール摂取が、サフォーク種めん羊の食餌後代謝に及ぼす影響を検討したものである。

本研究では、はじめに配合飼料とAPS給与時の血中代謝成分濃度の変化を比較した。APS給与後に血中エタノール濃度が有意に上昇したのに対応して、乳酸と $\beta$ -ヒドロキシ酪酸（BHBA）の血中濃度の上昇、ならびに一過性のインスリン濃度の上昇を観察した。また、APS摂取後の血中成分濃度の変化の大きさを反応下面積（AUC）として数値化して解析した結果、その大きさには正の相関を認めた。これらの結果から、APS中のエタノール摂取後の肝臓においてはエタノールの代謝が優先され、糖新生経路の停滞と高ケトン血症が一時的に引き起こされている可能性が示された。次に、エタノール含量の異なるAPSを給与した際の食餌後代謝への影響を検討した。その結果、乾物中のエタノール含量が10%程度までであれば、エタノール摂取後の一過性の高乳酸および高ケトン血症の程度はエタノール含量の違いによる差はなく、飼養成績にも影響がなく臨床的に病的な症状も認められないことを明らかにした。また、乾物損出の大きいエタノール発酵がAPSの栄養価に及ぼす影響が懸念されたが、エタノール含量の異なる（乾物中4.9%あるいは8.7%）APSの消化率に大きな差はなかった。

さらに、APSあるいは配合飼料の給与3時間後に肝臓の組織サンプルを採取して、糖新生経路の酵素群のmRNAレベルを調べたところ、APS給与後には糖新生の律速酵素であるグ

ルコース 6 フォスファターゼと P E P C K の発現レベルの上昇を示唆する結果が得られた。本研究の結果から、反芻家畜へのエタノール含有飼料の給与は臨床的な障害や生産性への悪影響を引き起こさないまでも、食餌後代謝に影響しうることが明らかとなった。以上の結果は、様々な新規飼料資源を活用した発酵飼料の開発利用を進める上での留意点を提示したものと高く評価される。

本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士(農学)の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. Islam, S., Fang, J., Suzuki, H. and Matsuzaki, M. 2014. Postprandial hyperketonemia after feeding of alcoholic fermented apple pomace silage in Suffolk ewes. *Journal of Animal Science Advances*, 4: 845-854.