

	ウイニチャイクル パラミンタ
氏 名	VINITCHAIKUL, Paramintra
本籍（国籍）	タイ
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第 645 号
学位授与年月日	平成 27 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	生物生産科学 動物生産学
学位論文題目	Studies on the Effects of Dietary Urea and Negative Energy Balance on Metabolisms of Urea and Glucose in Sheep (ヒツジにおける血漿グルコースおよび尿素代謝に及ぼす尿素添加および負のエネルギーバランスの影響に関する研究)
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 日高 智 副査 教授 堀口 健一

論文の内容の要旨

For economical reason, urea could be substituted for rumen degradable protein in ruminant diet because ammonia from urea can be utilized by rumen microbes to form microbial protein. Rumen ammonia, blood ammonia and blood urea concentrations were elevated when urea was hydrolyzed by rumen microbes. High blood ammonia concentration was negative relation with hepatic gluconeogenesis. Moreover, negative energy balance (NEB) situation in ruminant production cycle, early lactation period in dairy cow or late gestation in ewe, was associated with depressed gluconeogenesis and also decreased capacity of ureagenesis. Therefore, urea usage during NEB may be argued as it compromises the hepatic gluconeogenesis and ureagenesis under practical feeding condition. It was hypothesized that the urea usage during NEB condition in practical feeding would be more depress rate of gluconeogenesis and ureagenesis.

The first experiment, the objective was to determine effects of isonitrogenous replacing soybean meal by urea and NEB on nitrogen balance, ruminal fermentations, plasma glucose and urea kinetics in sheep. A crossover design with two different types of isonitrogenous source, either soybean meal or replaced with urea, was assigned to six sheep. High energy diet following with low energy diet treatment was nested in each isonitrogenous source for NEB induction. Plasma glucose and urea turnover rates were determined by the primed continuous infusion. NEB induction was modest damage with indication by increased ($P<0.01$) of serum non-esterified fatty acid (NEFA) concentration, while triglyceride and β -hydroxybutyric acid (BHBA) concentrations did not change.

Nitrogen retention was lower ($P<0.01$) in low energy. Rumen pH and ammonia concentration were higher with urea replacement ($P=0.04$) and low energy ($P<0.01$). Almost all rumen volatile fatty acid (VFA) concentrations and plasma free amino acid concentrations were lower ($P<0.01$ and $P<0.05$) in low energy. Plasma glucose and ammonia concentrations were not influenced by urea replacement and low energy. The glucose turnover rate was lower ($P<0.01$) in low energy. However, plasma urea concentration and turnover rate were higher ($P<0.01$) in low energy while had no ($P>0.05$) effects of urea replacement. These findings suggest that NEB has strong influence on both of glucose and urea kinetics without urea replacement effect and interaction of urea x energy.

The result from first experiment does not accord with hypothesis that the isonitrogenous replacement of soybean meal by urea could effect on plasma glucose turnover rate. The reason may be caused by lower plasma ammonia concentration when compared with other studies that successfully decrease the glucose production. For achieved the hypothesis, urea treatment was increased in second experiment. Moreover, a contrary result from first experiment was showed that plasma urea turnover rate was higher during NEB induction. The primary possible might be due to lack of severe NEB induction and lack of high lipid accumulation in liver cells to impair liver functions. Therefore, NEB induction in second experiment was intended to lower than first experiment.

The second experiment, the objective was to clarify effects of high urea supplementation and negative energy level on nitrogen balance, ruminal fermentations, microbial protein supply, plasma glucose and urea kinetics in sheep. The experiment was carried out by using 6 x 5 incomplete Latin square designs. The six dietary treatments composed of two levels of urea (low and high) and three levels of energy (low, middle and high) were randomly introduced to six sheep. Plasma glucose and urea turnover rates were determined by using as same as previous method. NEB induction was mild damage with indicate by increase ($P<0.01$) of serum NEFA concentration according with lower energy levels, while serum BHBA concentration kept in normal range in sheep. Serum total protein, albumin and globulin concentrations did not change. Nitrogen retention was higher ($P=0.01$) in high energy than lower energy treatment and was also higher ($P<0.01$) in high urea level than low urea level. The interaction effect of urea x energy with different responding of dietary treatments in rumen pH was identified ($P=0.02$). Rumen ammonia concentration was higher ($P<0.01$) in low energy than high energy treatment and was higher ($P<0.01$) in high urea level than low urea level as well. Total rumen VFA, acetate and propionate concentrations were higher ($P<0.01$) according with energy levels. Almost of free amino acid concentrations were lower ($P<0.05$) in high urea level than low urea level treatment and were also lower ($P<0.05$) during low energy, except arginine concentration was higher ($P<0.01$). Plasma glucose concentration was not influenced by any dietary treatments. Plasma ammonia and urea concentrations were higher ($P<0.01$) in high urea level than low urea level while plasma urea concentration was lower ($P<0.01$) in high energy than lower energy levels. Total microbial nitrogen supply increased ($P<0.01$)

related with increasing of energy levels. The plasma glucose turnover rate was positive related ($P=0.03$) according with energy levels, but the plasma urea turnover rate was negative related ($P<0.01$) with energy levels and was higher ($P<0.01$) with high urea level treatment. These findings conclude that NEB crucially influences on both glucose and urea kinetics independently without interactions of urea x energy. Urea level supplementation was positive related with ureagenesis.

Finally, the results of this study contrasted with the hypothesis. The major reason is insufficient NEB due to physiological status of the experimental animals. Even NEB was induced by feeding half or one-third of maintenance energy level, the animals can recover in energy homeostasis. However, the natural NEB by increase energy demands, lactating in dairy or high fetal growth rate in ewe, may influence on glucose and urea metabolisms following in this hypothesis.

Soybean meal replaces with urea or high level of urea supplementation in the ration did not affect on glucose turnover rate. However, low energy treatment seriously decreases glucose turnover while increases urea turnover rate independently without interaction effects of urea and energy. The implication of this study revealed that urea replacement or low urea level supplementation was suggested in dietary ration due to limited effects on glucose and urea metabolisms. Unfortunately, NEB is the major inescapable situation with influences on both glucose and urea metabolisms in sheep. Further investigations need to find on the compromising ways between glucose and urea metabolisms during NEB.

反芻家畜において第一胃内微生物のはたらきによって第一胃内の尿素はアンモニアに分解されて微生物態タンパク質合成に利用されるため、第一胃内分解性タンパク質の代替として利用される。第一胃で尿素が分解されると、第一胃内アンモニア、血中アンモニアおよび血中尿素濃度が上昇する。血中アンモニア濃度の上昇は肝臓における糖新生を抑制することが知られている。さらに、泌乳最盛期の乳牛や妊娠末期のヒツジなどの負のエネルギーバランス(NEB)時に尿素生成が抑制される。したがって、NEBにおける飼料への尿素添加は肝臓の糖新生や尿素生成を抑制するかもしれない。そこで、本研究の目的はヒツジにおける N 出納、第一胃発酵性状、血漿グルコースおよび尿素代謝に及ぼす尿素および飼料エネルギー給与量の影響を明らかにすることとした。

実験 1 では、主なタンパク質源として大豆粕あるいは尿素を用いた N 給与量が等しい 2 飼料区を設定し、クロスオーバー法により 6 頭のヒツジを配置した。エネルギー供給量を $669 \text{ kJ}/(\text{kg}^{0.75} \cdot \text{日})$ とし、その後 $222 \text{ kJ}/(\text{kg}^{0.75} \cdot \text{日})$ まで下げて NEB を引き起こした。各飼料区の 2 エネルギー水準において $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ グルコースおよび $[\text{}^{15}\text{N}_2]$ 尿素の同位元素希釈法により血漿グルコースおよび尿素の代謝回転速度を測定した。NEB によって血清遊離脂肪酸(NEFA)濃度は上昇したが ($P < 0.01$)、血清トリグリセリドおよび β -ヒドロキシ酪酸(BHBA)濃度は変化せず、比較的穏やかな NEB であった。N 保持量は NEB で低かった ($P < 0.01$)。第一胃 pH およびアンモニア濃度は尿素 ($P = 0.04$) および NEB ($P < 0.01$) で上昇した。第一胃内揮発性脂肪酸(VFA)濃度および血漿遊離アミノ酸濃度は NEB で低かった(それぞれ、 $P < 0.01$ および $P < 0.05$)。血漿グルコースおよびアンモニア濃度は飼料の

影響を受けなかった。血漿グルコース代謝回転速度は NEB で低かったが($P < 0.01$)、血漿尿素濃度および代謝回転速度は高かった($P < 0.01$)。これらの知見は、尿素による代替に関わりなく、NEB は血漿グルコースおよび尿素代謝に影響を及ぼすことを示している。

実験 1 の結果は、尿素による大豆粕の代替が血漿グルコース代謝回転速度に影響を与えるという仮説と一致しなかった。この理由は、尿素態 N 給与量が少なかったことによるのかもしれない。そこで、実験 2 では尿素給与量を $0.8 \text{ g}/(\text{kg}^{0.75} \cdot \text{日})$ から $1.1 \text{ g}/(\text{kg}^{0.75} \cdot \text{日})$ に増量した。さらに、実験 1 では血漿尿素代謝回転速度は NEB に増加し、実験仮説と異なる結果が得られた。主な可能性としては NEB が緩やかであり、肝臓の機能を損なうほど脂質が肝細胞に蓄積されなかったためかもしれない。そこで、実験 2 では実験 1 より厳しい NEB を設定して実験を行った。

実験 2 は 6×5 不完全ラテン方格法に従って実施した。尿素給与量は 0.5 および $1.1 \text{ g}/(\text{kg}^{0.75} \cdot \text{日})$ の 2 水準、エネルギー給与量は 167 、 335 、 $502 \text{ kJ}/(\text{kg}^{0.75} \cdot \text{日})$ の 3 水準とし、合計 6 飼料区に 6 頭のヒツジを無作為に配置した。NEB によって血清 NEFA 濃度は増加したが($P < 0.01$)、血清 BHBA 濃度は正常範囲に保たれた。血清タンパク質、アルブミンおよびグロブリン濃度は変化しなかった。N 保持量は高エネルギー区が低エネルギー区よりも高く($P = 0.01$)、高尿素区が低尿素区よりも高かった($P < 0.01$)。pH には交互作用が認められ($P = 0.02$)、高尿素低エネルギー区が最も高く(pH7.00; $P < 0.05$)、低尿素高エネルギー区が最も低かった(pH6.36; $P < 0.05$)。第一胃内アンモニア濃度は低エネルギー区が高エネルギー区よりも高く、高尿素区が低尿素区よりも高かった($P < 0.01$)。総 VFA、酢酸およびプロピオン酸濃度はエネルギー給与量が増加するに従って高かった($P < 0.01$)。ほとんどの必須アミノ酸濃度は高尿素区が低尿素区よりも低かった。さらに、アルギニンを除きほとんどの遊離アミノ酸濃度は NEB で低かった($P < 0.05$)。血漿グルコース濃度は給与飼料によって影響を受けなかった。血漿アンモニアおよび尿素は高尿素区が低尿素区よりも高かった($P < 0.01$)。高エネルギー区の血漿尿素濃度は他の区より低かった($P < 0.01$)。MNS はエネルギー給与量が増加するに従い増加した($P < 0.01$)。血漿グルコース代謝回転速度はエネルギー給与量と正の相関があったが($P = 0.03$)、血漿尿素代謝回転速度は負の相関があった($P < 0.01$)。しかし、尿素添加は血漿グルコース代謝回転速度に影響を与えず、血漿尿素代謝回転速度は高尿素区が低尿素区よりも高かった($P < 0.01$)。

血漿グルコースおよび尿素代謝回転速度の一部は実験仮説と一致しなかった。この点について、実際の泌乳牛や妊娠ヒツジにおける負のエネルギーバランスの程度は本研究で設定した栄養条件を著しく上回っているためと考えられた。

論文審査の結果の要旨

反芻家畜において第一胃内の尿素は、微生物のはたらきでアンモニアに分解されて微生物態タンパク質合成に利用されるため、第一胃内分解性タンパク質の代替として利用されている。アンモニアが吸収されて血中アンモニア濃度が上昇すると、肝臓における糖新生を抑制する。さらに、負のエネルギーバランス(NEB)における飼料への尿素添加は肝臓の糖新生や尿素生成に影響を及ぼすかもしれない。そこで、本研究ではヒツジにおける N 出納、第一胃発酵性状、血漿グルコースおよび尿素代謝に及ぼす尿素添加および NEB の

影響を明らかにすることを目的とした。

実験 1 では、ヒツジ 6 頭を用い、主なタンパク質源として大豆粕あるいは尿素を用いた N 給与量が等しい 2 飼料区を設定した。エネルギー供給量は $669 \text{ kJ}/(\text{kg}^{0.75} \cdot \text{日})$ とし、その後 $222 \text{ kJ}/(\text{kg}^{0.75} \cdot \text{日})$ まで下げて NEB を引き起こした。各飼料区の NEB の前後に $[\text{U-}^{13}\text{C}]$ グルコースおよび $[\text{}^{15}\text{N}_2]$ 尿素の同位元素希釈法により血漿グルコースおよび尿素的代謝回転速度を測定した。NEB によって血清遊離脂肪酸(NEFA)濃度は上昇したが ($P < 0.01$)、血清トリグリセリドおよび β -ヒドロキシ酪酸(BHBA)濃度は変化せず、比較的穏やかな NEB であった。N 保持量、第一胃内揮発性脂肪酸(VFA)濃度および血漿遊離アミノ酸濃度は NEB で低かった ($P < 0.01$ 、 $P < 0.01$ および $P < 0.05$)。第一胃内 pH およびアンモニア濃度は尿素区 ($P = 0.04$) および NEB ($P < 0.01$) で上昇した。血漿グルコースおよび尿素的代謝回転速度は尿素的代替効果は認められなかった。血漿グルコース代謝回転速度は NEB で低かったが ($P < 0.01$)、血漿尿素的代謝回転速度は高かった ($P < 0.01$)。これらの知見は、尿素的による代替に関わりなく、NEB は血漿グルコースおよび尿素的代謝に影響を及ぼすことを示している。

実験 1 において尿素的給与は血漿グルコース代謝回転速度に影響を与えなかった。そこで、実験 2 では尿素的給与量を増やすとともに、より厳しい NEB 状態を設定して実験を行った。実験 2 ではヒツジ 6 頭を供試し、尿素的給与量を 0.5 および $1.1 \text{ g}/(\text{kg}^{0.75} \cdot \text{日})$ の 2 水準、エネルギー供給量を 167 、 335 、 $502 \text{ kJ}/(\text{kg}^{0.75} \cdot \text{日})$ の 3 水準として合計 6 飼料区とした。実験は 1 期 19 日間とし、 6×5 不完全ラテン方格法に従って実施した。NEB によって血清 NEFA 濃度は増加したが ($P < 0.01$)、血清 BHBA 濃度は正常範囲に保たれた。N 保持量は高エネルギー区が低エネルギー区よりも高く ($P = 0.01$)、高尿素的区が低尿素的区よりも高かった ($P < 0.01$)。第一胃内 pH には交互作用が認められ ($P = 0.02$)、高尿素的低エネルギー区が最も高く、低尿素的高エネルギー区が最も低かった。第一胃内アンモニア濃度は低エネルギー区が高エネルギー区よりも高く、高尿素的区が低尿素的区よりも高かった ($P < 0.01$)。総 VFA、酢酸およびプロピオン酸濃度はエネルギー給与量が増加するに従って高くなった ($P < 0.01$)。血漿アンモニアおよび尿素的濃度は高尿素的区が低尿素的区よりも高かった ($P < 0.01$)。高エネルギー区の血漿尿素的濃度は他の区より低かった ($P < 0.01$)。微生物態 N 供給量はエネルギー給与量が増加するに従い増加した ($P < 0.01$)。血漿グルコース代謝回転速度はエネルギー給与量と正の相関があり ($P = 0.03$)、血漿尿素的代謝回転速度は負の相関があった ($P < 0.01$)。しかし、尿素的添加は血漿グルコース代謝回転速度に影響を与えず、血漿尿素的代謝回転速度は高尿素的区が低尿素的区よりも高かった ($P < 0.01$)。

以上の結果から、ヒツジにおいて尿素的の血漿グルコースおよび尿素的代謝に及ぼす影響は限定的であるが、負のエネルギーバランスはそれぞれに影響を及ぼすことが明らかにされた。

以上、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あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

Vinitchaikul, P., M. M. Rahman, A. Panthee, X. Liang, X. Bi and H. Sano (2015) Effects of replacing soybean meal with urea and negative energy balance on ruminal fermentation characteristics, kinetics of plasma glucose and urea in sheep. *Research Opinions in Animal Veterinary Sciences* **5** : 247-255.