



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

豚における葉酸の生体内利用に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 水野, 安晴 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2116

氏名（本籍）	水野安晴（高知県）
学位の種類	博士（獣医学）
学位記番号	獣医博甲第62号
学位授与年月日	平成11年3月15日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	東京農工大学
学位論文題目	豚における葉酸の生体内利用に関する研究
審査委員	主査 東京農工大学 教授 小久江 栄 一 副査 帯広畜産大学 教授 齊 藤 篤 志 副査 岩手大学 教授 小 林 晴 男 副査 東京農工大学 教授 田 谷 一 善 副査 岐阜大学 教授 武 脇 義

論 文 の 内 容 の 要 旨

家畜の飼料には合成葉酸（プテロイルグルタミン酸；以下 FA）が添加されている。妊娠豚にこの FA を投与すると、妊娠期間中の葉酸代謝が改善され、繁殖成績も良くなるという報告が多数ある。しかし、一方では効果がないという報告もある。これらの矛盾した報告から、葉酸補給という目的で与えている FA を豚が利用しているのかどうか疑問が残る。これまでの報告は豚の血清中総葉酸濃度の点から検討を行ったが、生体内の様々な反応において必要とされるのは還元型葉酸であり、FA 自体や酸化型葉酸は生体内反応においては機能しない。したがって本研究では、豚での FA の利用性について還元型葉酸の観点から検討を行った。

まず、豚での FA の利用性を検討するため、FA の経口投与後の豚血漿中還元型葉酸（四水素葉酸： $H_4PteGlu$ と N^5 -メチル四水素葉酸： $5-CH_3-H_4PteGlu$ ）を電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC-ECD 法）によって測定した。FA を単回投与した場合も長期投与した場合においても、血漿中還元型葉酸濃度に減少を認めた。このことから、豚では FA の利用性が低いことを示唆した。

FA 経口投与後に血漿中還元型葉酸濃度が減少した原因について検討した。血漿中還元型葉酸濃度を増加させる作用が弱い原因として、1)FA が腸管吸収されにくい、2)吸収した FA が体内で還元されないの二点を考えた。また、減少させる作用の原因として、FA による腸肝循環中の内因性葉酸の再吸収阻害を考えた。

豚の腸管での FA の吸収について、microbiological assay 法を用いて FA 投与後の豚血漿中総葉酸濃度を測定し、著しい葉酸濃度の増加を認めたことから、FA の吸収

を確認した。また、この実験に先駆けて、microbiological assay 法の問題点を改良し、豚血漿中葉酸を測定する測定条件を確立した。

体内において、FA は二水素葉酸還元酵素によって二水素葉酸 (DHF) へ還元され、さらに $H_4PteGlu$ へと還元されると考えられている。ラットを対照動物として、豚の FA に対する還元能力を検討した。FA の静脈内投与後の血漿中還元型葉酸濃度の増加の程度を動物間で比較したところ、豚の FA に対する還元能力はラットより低いことを示唆した。また、DHF の静脈内投与実験の結果から、豚においては FA から DHF への還元過程が FA の還元を律速していることを明らかにした。

体内の葉酸の恒常性に腸肝循環が大変重要であることが知られている。投与した FA によって腸肝循環中の内因性葉酸の再吸収が阻害され、その結果として血漿中還元型葉酸濃度が減少したのではないかと考え、これについて検討した。豚の胆汁を体外に排出し続けて腸肝循環を阻害したところ、血漿中還元型葉酸濃度に減少は認められなかった。よって、豚体内の葉酸の恒常性には腸肝循環はさほど重要ではなく、FA が腸肝循環を阻害した結果として血漿中還元型葉酸濃度が減少したのではないことを示唆した。

豚への FA の投与は葉酸補給の目的では効果が低いが、豚への葉酸補給は必要であると考え、FA の代わりに飼料添加する葉酸素材を検討した。FA は酸化型葉酸であるので、還元型葉酸の利用性について調べた。被検物質として還元型葉酸及び還元型葉酸を多量に含む物質を用いて調べたところ、いずれの被検物質を投与した場合も豚血漿中還元型葉酸濃度に著しい増加を認めたことから、豚では還元型葉酸に対して高い利用性を示すこと、さらに還元型葉酸を含む物質が FA の代替え素材として適していることを示唆した。

さらに豚の腸管における葉酸の最大吸収量について検討した。葉酸は腸管で能動輸送系によって吸収されるため、飼料に葉酸素材を過剰に添加しても吸収されない無駄な部分が出る。20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の N^5 -ホルミル四水素葉酸 ($5\text{-HCO-H}_4\text{PteGlu}$) と 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の FA を同時経口投与したところ、投与後の血漿中還元型葉酸濃度の増加の程度が $5\text{-HCO-H}_4\text{PteGlu}$ (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) を単独投与したときの増加の程度に匹敵した。しかし、FA の用量を 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以上に増加させると、その還元型葉酸濃度の増加は抑制された。よって、葉酸を吸収できる限界量は 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ までであることを示唆した。

豚の血漿中葉酸濃度が HPLC-ECD 法と microbiological assay 法の測定において有意に差があることから、血漿中に $H_4PteGlu$ と $5\text{-CH}_3\text{-H}_4\text{PteGlu}$ 以外に葉酸誘導体が存在すると考え、その誘導体の同定を試みた。HPLC 法と microbiological assay 法を組み合わせた同定法によって、 $H_4PteGlu$ と $5\text{-CH}_3\text{-H}_4\text{PteGlu}$ 以外に N^{10} -ホルミル四水素葉酸を同定した。またその濃度は、豚の血漿中の主要な葉酸誘導体である $H_4PteGlu$ に匹敵する濃度であることを示唆した。

以上のように、本研究は豚での FA の利用性は低く、このことは豚では他の動物と違って FA の還元能力が低いことに起因していることを明らかにした。さらに、豚の還元型葉酸に対する利用性は高く、腸管における葉酸の最大吸収量が体重 1 kg 当た

り 40 μg であることを示した。また、豚の血漿中に新たに多量の N^{10} -ホルミル四水素葉酸が存在することを発見した。

審 査 結 果 の 要 旨

家畜の飼料には合成葉酸（酸化型葉酸；以下 FA）が添加されている。妊娠豚にこの FA を通常より多く投与すると、葉酸代謝の改善により繁殖成績も向上するという報告が多数あるが、一方では効果がないという報告もあり、世界的な論争となっていた。学位申請者はこの対立した論争に注目し、豚に与えた FA が本当に豚に利用されるのかを本研究科での最初の研究テーマとした。

研究科在籍中研究は進み、FA の豚における利用性について、豚に飼料添加する FA 代替素材の探索、適切な葉酸の飼料添加量の検討、また研究の過程で発見された豚血漿中に存在する新たな葉酸誘導体の同定を含め、合わせて6つの章で学位申請論文を構成した。

まず第 I 章で研究の背景と目的を述べた後、第 II 章では豚での FA 利用性の検討を行った。FA の経口投与後の豚血漿中還元型葉酸（四水素葉酸と N^5 -メチル四水素葉酸）を電気化学検出器を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC-ECD 法）によって測定した。その結果、FA を単回投与した場合も長期投与した場合においても、還元型葉酸濃度は増加せずに減少した。豚は FA を利用する能力が低い事を明らかにした。

第 III 章では II 章の結論を受けて、FA を投与しても血漿中の還元型葉酸濃度が上昇せずに減少する原因について検討した。上昇しない原因として、①FA が腸管吸収されにくい、②吸収した FA が体内で還元されないか、を考えた。腸管での FA 吸収については、申請者自身が本研究用に改良した microbiological assay 法を用いて、FA 投与後の豚血漿中総葉酸濃度を測定したところ、著しい増加を認めたことから、豚は経口投与した FA を吸収出来ることは確認した。次に還元能について、FA 静脈内投与後の血漿中還元型葉酸濃度の増加の程度を調べ、豚は FA を四水素葉酸に還元する能力はラットと比較して著しく低いこと、そしてこれは FA から二水素葉酸への還元過程が律速していることを明らかにした。

FA 投与後血漿中の還元型葉酸濃度が減少する原因については、FA による腸肝循環中の内因性葉酸の再吸収阻害をその原因と考え、慢性胆管カテーテルを装着した豚を用いて試験した。予期した結果は得られなかったが、本実験により豚の葉酸の腸肝循環のサイズが、他の動物と比べてかなり小さいことを明らかにした。

FA の利用性が低いことが明らかになったので、第 IV 章では FA の代わりに飼料添加する葉酸素材を探索した。酸化型葉酸である FA の代わりに還元型葉酸を多量に含む素材を探し、豚での利用性を検討した。その結果いずれの被検物質も豚の血漿中還元型葉酸濃度を著しく増加させた。そして被検物質の中から、養豚産業に使える安価な素材としてある種の菌体（グルタミン酸ソーダの発酵生産菌）成分を FA の代替物質として提案することが出来た。

さらにこの章の研究では、豚腸管の最大葉酸吸収可能量について検討した。葉酸は腸管粘膜の能動輸送系によって吸収されるため、飼料中に葉酸素材を過剰投与しても無駄な部分が出る。還元型葉酸と FA を同時経口投与する実験で、最大吸収量は 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ であるという結論を出した。

第 V 章では新たな豚血漿中の還元型葉酸の発見について述べている。本研究の過程で申請者は、豚の同一血漿サンプルの還元型葉酸濃度を HPLC-ECD 法と microbiological assay 法で測定し、両者の結果に有意な差があることに気付いた。これは豚の血漿中には、従来から知られてきた四水素葉酸と N^5 -メチル四水素葉酸以外に、別の葉酸誘導体が存在する可能性を示唆しており、その誘導体の同定を試みた。HPLC 法と microbiological assay 法を組

み合わせた同定法を駆使し、新たに N^{10} -ホルミル四水素葉酸が豚の血漿中に存在することを証明した。またその濃度は、豚の血漿中主要葉酸誘導体である四水素葉酸に匹敵する濃度であることを明らかにした。この申請者が新たに発見した N^{10} -ホルミル四水素葉酸の生理学的意義については、本研究期間中には明らかにする事は出来なかった。

第VI章では以上の研究結果について、総合討論を行った。

以上が学位申請論文に対する審査結果の要旨であるが、審査委員は本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あることを、全員一致で認めた。

以下に基礎となる学術論文の発表雑誌名（学会など）、既発表学術論文（相曾、田村との共著など）の発表雑誌名を記入する。

基礎となる学術論文

- 1) 題目 : Effect of oral administration of folate sources on plasma folate levels in pigs:
Comparison between reduced and oxidized forms of folate
著者名 : Y. Mizuno, E. Kokue, N. Ohnishi, and Y. Toride
雑誌名 : Canadian Journal of Animal Science 77(3): 497-502, 1997

既発表学術論文

- 1) 題目 : Food folate assay with protease, α -amylase, and folate conjugase treatments
著者名 : T. Tamura, Y. Mizuno, K. E. Johnston, and R. A. Jacob
雑誌名 : Journal of Agricultural and Food Chemistry 45(1): 135-139, 1997
- 2) 題目 : 食品中の葉酸の定量法 : Trienzyme 処理を中心として
著者名 : 相曾健二、水野安晴、K. E. Johnston、田村庸信
雑誌名 : ビタミン 72(9): 429-436, 1998