



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

鶏雛における肝臓への脂肪過剰蓄積がグリセロールからの糖新生に及ぼす影響

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2022-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 大谷, 滋, 田中, 桂一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/5694

鶏雛における肝臓への脂肪過剰蓄積が
グリセロールからの糖新生に及ぼす影響

大谷 滋・田中 桂一

動物生産学講座

(1992年7月20日受理)

Effects of Hepatic Lipid Accumulation on
Gluconeogenesis from Glycerol in Growing Chicks

Shigeru OHTANI and Keiichi TANAKA

Department of Animal Science and Technology

(Received July 20, 1992)

SUMMARY

All avian species maintained a high plasma glucose concentration under all physiological conditions. However, hypoglycemia was observed in the chicks affected by fatty liver and kidney syndrome, and it was suggested that excessive hepatic lipid accumulation depressed gluconeogenesis in liver. Therefore, such chicks could not maintain their plasma glucose concentration at a normal level during starvation for a long period.

Glycerol derived from triacylglycerol during starvation is one of the major gluconeogenic substrates. In this experiment, the effects of excessive lipid accumulation in the liver on gluconeogenesis from glycerol were investigated with fed or fasted experimental fatty liver chicks.

White Leghorn male chicks were reared under the standard management practice until they reached the age of 28 days, and they were divided into two groups. The first group served as control wherein the chicks were given commercial feed, while the second group were given the same feed added with 0.08% diesterol diacetate and 0.025% propylthiouracil for 12 days (fatty liver chicks). Thereafter, chicks of each group were subdivided into three subgroups, respectively. Blood of chicks of the one subgroup immediately and of the other two subgroups after starvation for 24 or 72 hours, was sampled from the wing vein and injected with glycerol (2.4mg/100g body weight), blood samples were also obtained at 0.5, 1, 3 and 5 hours after glycerol injection. The concentrations of glucose and free fatty acids in plasma and glycerol in whole blood were determined. After the blood sampling, chicks were killed and the liver tissues were for determination of triacylglycerol contents.

In the chicks fed diesterol diacetate and propyl thiouracil (fatty liver chicks) before fasting, the liver obviously had become hypertrophic and pale. The triacylglycerol contents before fasting in the liver tissues of the fatty liver chicks were significantly up to 10 times higher than in the control chicks, and fell rapidly after starvation for 24hours. The fasting treatment reduced liver weight of the fatty liver chicks, but did not affect those of the control chicks. No statistically significant differences between the control and fatty liver chicks were observed for the concentrations of plasma glucose before fasting. However, in the fatty liver chicks after 24 or 72 hours fasting, plasma glucose levels were significantly lower than in the control chicks. The glycerol concentrations in whole blood and

the concentrations of free fatty acids in plasma increased with the fasting period in the control chicks, but changed little in the fatty liver chicks. The increases of plasma glucose concentrations after glycerol injection were more rapid in the control chicks fasted 24 or 72 hours than the fatty liver chicks.

The results in this experiment showed that glycerol cannot be an effective precursor of glucose production in the fatty liver chicks, and suggested that the excess lipid accumulation in liver depresses gluconeogenesis from glycerol.

Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ.(57)45-51, 1992.

要 約

糖新生物質の一つであるグリセロールからの糖新生について、実験的に作成した脂肪肝症雛で検討した。28日齢の雛を2群に分け、1群は対照区として市販配合飼料を給与し、他の1群には同飼料に dienestrol-diacetate および propylthiouracil を添加した飼料を12日間給与して脂肪肝症雛を作成し脂肪肝症区とした。処理終了後、両区の雛にグリセロールを投与し、投与前、投与0.5, 1, 3および5時間後に翼下静脈より採血して全血中グリセロール濃度および血漿中のグルコースと遊離脂肪酸濃度を測定した。採血後、肝臓を採取し、肝臓組織中のトリアシルグリセロール含量を測定した。また、処理終了後の両区の雛を24時間あるいは72時間絶食した後、同様の測定を行なった。絶食前の脂肪肝症区の肝臓は対照区雛に比べ明らかに肥大し、明色化した。また、肝臓組織中のトリアシルグリセロール含量は脂肪肝症区で高く、対照区の10倍の値を示した。体重100g当りの肝臓重量は脂肪肝症区では絶食日数を延長するに伴い低下したが、対照区ではほとんど変化しなかった。グリセロール投与前の血漿中グルコース濃度は絶食前では両区に差は認められなかったが、絶食24時間および72時間では脂肪肝症区の方が低い値を示した。対照区では、全血中グリセロール濃度および血漿中遊離脂肪酸濃度は絶食により増加したが、脂肪肝症区ではほとんど変化は認められなかった。グリセロール投与後の血漿中グルコース濃度は脂肪肝症区よりも対照区の方が上昇が速かった。脂肪肝症の鶏では肝臓からのグリセロール放出およびグリセロールからの糖新生は抑制されていると推察される。

結 論

グルコースは生命活動のためのエネルギー源であり活動時にはもちろん、例えば安静休息時においても生命維持のためには欠くことができない。食餌の消化分解により吸収されたグルコースは直ちにエネルギー源として利用されるとともに、余剰のグルコースはグリコーゲンや脂肪として貯蔵される。しかし、活動の程度あるいは絶食などによって貯蔵されたグリコーゲンがほとんど使い尽くされる場合も少なくない。このような条件下でも生活するために、生体は糖質以外の栄養素からグルコースを作り出す機構、すなわち糖新生の機能を備えており、グルコースを絶え間なく供給することができる。また、組織内で生じそこでは利用できない代謝産物、例えば、筋肉や赤血球の乳酸、脂肪組織のグリセロールなどは、グルコースに転化されることによって再利用されるが、このときも糖新生機構が役立つ。糖新生は、哺乳類では主に肝臓において、鳥類では肝臓および腎臓においてそのほとんどが行われており^{1,2)}、肝臓組織は生体の糖新生にとって重要な役割を果たしている。

血漿中グルコース濃度はヒトでは通常60~70mg/100ml plasma であるが³⁾、鶏の血糖値は、190~220 mg/100ml plasma と他の多くの哺乳動物に比べ2~3倍高い値を示す⁴⁾。また、Sarkar⁵⁾は、ラットやモルモットの血液中グルコース濃度は48時間絶食させることによって絶食前に比べて25~30%低下するが、鶏では3~4%の低下にとどまり、更に112時間絶食させても、絶食前のおよそ20%しか低下しないことを報告し、Beloら⁶⁾およびLangslow⁷⁾も鶏では長時間の絶食でも血糖値には大きな変化が観察されないと報告している。一方、鶏の肝臓中のグリコーゲン含量はラットやモルモットに比べて非常に少なく⁵⁾、肝臓に貯蔵されているグリコーゲンは鳥類では12時間の絶食によりほとんど消費される⁸⁾。そのため、鶏において長時間の絶食後でもその高い血糖値が維持されるのは、哺乳類に比べてより活発な糖新生機構を有している

か、あるいはその機構自体が異なっていると推察されている。しかし、近年多発している脂肪肝症⁹⁾のように、糖新生に大きな役割を果たしている肝臓において甚だしくトリアシルグリセロールの蓄積が起これるとその機構が損なわれ糖新生にも影響が及ぼされることがあり、脂肪肝症の鶏では血糖値が正常鶏に比べて半分以下になると報告¹⁰⁾がある。脂肪酸とグリセロールのエステル結合物質であるトリアシルグリセロールを肝臓中に蓄積している脂肪肝症鶏の血糖値が低いことを解明するには肝臓からのグリセロール放出とグリセロールの糖新生への利用について検討することが必要であろう。

そこで本研究は、まず脂肪肝症鶏における血中グリセロール濃度の絶食期間の延長に伴う変化を正常鶏と比較し、更に種々の期間絶食させた鶏にグリセロールを投与し、血中グルコース濃度にどのような影響を与えるか正常鶏と比較した。

材 料 と 方 法

実験には卵用種初生雄雛（後藤孵卵場）を岐阜大学農学部動物環境制御飼育施設で育成して用いた。2週齢までは環境温度を37℃から低下させながら飼育し、それ以降は環境温度を20±2℃とした。照明は午前5時～午後7時の間点灯した。給与飼料は4週齢までは市販の幼雛育成用配合飼料（杉治商会）を、5週齢以降は市販の中雛育成用配合飼料（杉治商会）を用いた。また、飼料は絶食時以外は自由摂取とし、水は常に自由飲水とした。

以上のように飼育した卵用種雄ヒナを、28日齢に体重を測定し平均体重がほぼ同一になるように18羽ずつ対照区と脂肪肝症区の2群に分けた。対照区には飼料のみを、脂肪肝症区には飼料にエストロジェン（dienestrol diacetate; DD, Sigma Chemical Company, USA）0.08%と抗甲状腺物質（propylthio-uracil; PTU, Sigma Chemical Company, USA）0.025%を添加した飼料を給与して12日間40日齢まで飼育した。その後、各群をさらに6羽ずつ3区に分け、それぞれ絶食せずに（0時間絶食鶏）、24時間絶食（24時間絶食鶏）あるいは72時間絶食（72時間絶食鶏）して体重を測定し、ヘパリン処理した注射筒を用いて翼下静脈より血液を採取した。その後直ちに、生理食塩水に溶解したグリセロール溶液（72mg/ml）を体重100g当り0.033ml（体重100g当りグリセロール2.4mg）を翼下静脈に投与し、投与0.5時間、1時間、3時間および5時間後に翼下静脈より血液を採取した。採取した血液は全血中グリセロール含量、血漿中グルコースおよび血漿中遊離脂肪酸含量について測定を行った。全血中グリセロール含量は Wieland¹¹⁾の方法、血漿中グルコース含量は Bergmeyer と Bernt¹²⁾による ABTS 法、血漿中遊離脂肪酸含量は Itaya-Ui 改良法¹³⁾によって測定した。また、血液採取後、各区の供試鶏を断頭放血により屠殺し、肝臓を剔出して、その重量を測定した。肝臓の色調を、カラーナンバー分類（全国農業協同組合作成）によって0.5単位の10段階評点で分類した。採取した肝臓は5倍量の脱イオン水と共にホモジネートし、Folch 溶液で抽出した後、TLC/FID analyser（イヤトロスキャン、(株)ヤترون）を用いて、組織中のトリアシルグリセロール含量を測定した。

各測定項目から得られた値を各々比較検討には、対照区と脂肪肝症区との間でF-検定およびt-検定を用い、グリセロール投与後の測定値の比較には Duncan の多重検定を用いた¹⁴⁾。

結 果

体重、肝臓重量、肝臓の色調および肝臓中のトリアシルグリセロール含量

供試時の体重、体重100g当たりの肝臓重量、肝臓の色調およびトリアシルグリセロール含量を表1に示した。

供試時の体重は0時間絶食鶏では、体重では対照区と脂肪肝症区との間に統計的に有意な差が認められなかったが、24時間絶食鶏および72時間絶食鶏では脂肪肝症区が対照区よりも明らかに高い値を示した。肝臓重量は0時間絶食鶏および24時間絶食鶏では脂肪肝症区が対照区よりも明らかに高い値を示したが、絶食72時間鶏では差は認められなかった。また、対照区では肝臓重量に絶食時間による差は認められなかったが、脂肪肝症区では絶食時間の延長に伴い明らかに低下した。肝臓の色調は脂肪肝症区の方が対照区より0時間および72時間鶏では有意に高く、24時間絶食鶏では有意差は認められないが高い傾向を示した。

Table 1. Effects of the fatty liver and the fasting on body weights, liver weights, color of livers and triacylglycerol contents in liver tissue.

		Fasting period (hours)		
		0	24	72
Body weight	Control	483 ± 17 ^{1) b 2)}	428 ± 7 ^a	393 ± 12 ^a
	Fatty liver	492 ± 29 ^a	497 ± 15 ^a	474 ± 19 ^a
	P ³⁾	NS	**	***
Liver weight	Control	2.67 ± 0.07 ^a	2.65 ± 0.08 ^a	2.51 ± 0.15 ^a
	Fatty liver	4.55 ± 0.19 ^c	3.47 ± 0.12 ^b	2.76 ± 0.04 ^a
	P	***	***	NS
Color of liver	Control	2.2 ± 0.2 ^{a b}	2.3 ± 0.1 ^b	1.8 ± 0.3 ^a
	Fatty liver	3.7 ± 0.4 ^b	2.6 ± 0.2 ^a	3.4 ± 0.2 ^b
	P	**	NS	**
Triacylglycerol content in liver tissue	Control	3.47 ± 0.75 ^a	2.99 ± 0.48 ^a	1.00 ± 0.06 ^a
	Fatty liver	35.49 ± 10.16 ^b	6.85 ± 1.04 ^a	5.59 ± 1.50 ^a
	P	*	**	*

1) Values are mean ± SE for six birds.

2) Means in the same row with different superscripts are significantly different (P < 0.05).

3) *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; NS not significant.

肝臓中のトリアシルグリセロール含量は両区とも絶食時間の延長に伴い低下したが、どの絶食時間でも脂肪肝症区が対照区より統計的に有意に高い値を示した。脂肪肝症区の絶食0時間鶏のトリアシルグリセロールの含量は特に高く、肝臓中への過剰蓄積が認められた。

全血中グリセロール、血漿中グルコースおよび遊離脂肪酸濃度に及ぼす絶食時間の影響

グリセロール投与前の全血中グリセロール、血漿中グルコースおよび遊離脂肪酸の濃度の絶食時間の延長に伴う変化を表2に示した。

絶食前における全血中グリセロール濃度は、対照区より脂肪肝症区の方が、やや低い値であったが有意な差は認められなかった。絶食時間の延長に伴い全血中グリセロール濃度は、対照区では明らかに上昇し、絶食0時間鶏と絶食24時間鶏および72時間鶏の間に統計的に有意な差が認められた。しかし、脂肪肝症区では、絶食時間を延長しても上昇はほとんど認められなかった。また、絶食24時間鶏および絶食72時間鶏では、全血中グリセロール濃度はそれぞれ対照区の方が脂肪肝症区よりも明らかに高い値を示した。

血漿中グルコース濃度は絶食時間を通して対照区より脂肪肝症区の方が低い値で推移し、24時間絶食鶏および72時間絶食鶏では脂肪肝症区が対照区よりも統計的に有意に低い値であった。

血漿中の遊離脂肪酸濃度は、絶食0時間鶏で対照区よりも脂肪肝症区が、また、絶食24時間および72時間鶏では脂肪肝症区が対照区よりもやや低い傾向であったが統計的な有意差は認められなかった。対照区では絶食すると血漿中遊離脂肪酸濃度は上昇したが、脂肪肝症区では絶食時間の影響は認められなかった。

グリセロール投与後の血漿中グルコース濃度の経時的变化

グリセロール投与後の血漿中グルコース濃度の経時的变化を表3に示した。

絶食0時間鶏では対照区、脂肪肝症区とも投与後0.5時間および1時間でやや高くなる傾向が認められたが統計的に有意な差は認められなかった。

Table 2. Effects of the fatty liver and the fasting on glycerol concentrations in whole blood, and glucose and free fatty acids concentrations in plasma.

		Fasting period (hours)		
		0	24	72
Glycerol	Control	(mg/100ml blood)		
	Fatty liver	0.40 ± 0.06 ^{1) * 2)}	1.02 ± 0.12 ^b	1.16 ± 0.09 ^b
	P ³⁾	NS	**	***
Glucose	Control	(mg/100ml plasma)		
	Fatty liver	252.0 ± 1.6 ^b	204.9 ± 5.5 ^a	199.8 ± 4.7 ^a
	P	NS	**	**
Free fatty acid	Control	11.7 ± 0.9 ^a	19.9 ± 0.7 ^b	17.2 ± 1.2 ^b
	Fatty liver	23.3 ± 7.4 ^a	17.3 ± 2.8 ^a	14.7 ± 0.7 ^a
	P	NS	NS	NS

1) Values are mean ± SE for six birds.

2) Means in the same row with different superscripts are significantly different (P < 0.05).

3) *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; NS not significant.

Table 3. Effects of the fatty liver and the fasting on plasma glucose concentrations after glycerol injection.

		Time after glycerol injection (hours)				
		0	0.5	1	3	5
		(mg/100ml plasma)				
Before fasting	Control	252.0 ± 1.6 ^{1) * 2)}	262.5 ± 5.2 ^a	260.9 ± 12.7 ^a	244.8 ± 9.8 ^a	247.2 ± 7.1 ^a
	Fatty liver	244.3 ± 19.5 ^a	285.6 ± 13.3 ^a	290.7 ± 26.7 ^a	256.9 ± 19.8 ^a	267.6 ± 25.4 ^a
	P ³⁾	NS	NS	NS	NS	NS
24 hours fasting	Control	204.9 ± 5.5 ^a	216.8 ± 4.4 ^{a b}	215.9 ± 5.8 ^{a b}	234.5 ± 6.1 ^{b c}	247.5 ± 7.9 ^c
	Fatty liver	180.5 ± 4.5 ^a	196.9 ± 9.2 ^a	199.5 ± 7.9 ^a	192.0 ± 7.2 ^a	185.8 ± 18.7 ^a
	P	**	NS	NS	**	NS
72 hours fasting	Control	199.8 ± 4.7 ^a	224.1 ± 7.4 ^{a b}	251.1 ± 13.8 ^b	241.4 ± 8.6 ^b	249.4 ± 7.9 ^b
	Fatty liver	174.9 ± 4.8 ^a	188.6 ± 7.2 ^{a b}	192.1 ± 8.3 ^{a b}	195.1 ± 10.5 ^{a b}	217.7 ± 11.6 ^b
	P	**	**	**	*	NS

1) Values are mean ± SE for six birds.

2) Means in the same row with different superscripts are significantly different (P < 0.05).

3) *P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001; NS not significant.

絶食24時間鶏および絶食72時間鶏では両区ともに血漿中グルコース濃度は絶食0時間鶏に比べて明らかに低い値で推移した。対照区では、絶食24時間鶏において血漿中グルコース濃度はグリセロール投与後3時間で、絶食72時間鶏において投与後1時間で投与前より統計的に有意な増加を示した。しかし、脂肪肝症区では、絶食24時間鶏ではグリセロール投与後の血漿中グルコース濃度には経時的変化は認められず、絶食72時間鶏においてグリセロール投与後5時間で血漿中グルコース濃度が上昇したのみであった。

考 察

本研究は、脂肪肝症鶏における糖代謝を正常鶏と比較検討することを目的として行った。そのための実験的脂肪肝症鶏をDDおよびPTUを飼料に混合し給与することによって作成した。本実験において、市販の配合飼料にDDおよびPTUを添加し給与した区（脂肪肝症区）は無添加区（対照区）と比べて体重100g当りの肝臓重量が、絶食を行う前ではほぼ70%大きい値を示し組織重量の増加が認められた（表1）。絶食時間を延長するに伴い両区とも組織重量は減少したが、絶食24時間および絶食72時間でも脂肪肝症区では肝臓の肥大、色調の黄褐色化が進んでおり、明らかに脂肪肝症の症状を示していた。Couchら¹⁵⁾が報告しているように、脂肪肝症鶏では肝臓組織中の脂質含量が増加するが、本実験においてもDDおよびPTUを添加した区ではトリアシルグリセロール含量が正常鶏に比べて高い値を示し、0時間絶食鶏においては正常鶏の約10倍の値であった。

脂質はトリアシルグリセロールの形で肝臓あるいは脂肪細胞に蓄積され、絶食などのエネルギー供給不足状態となるとグリセロールと遊離脂肪酸に分解され動員される。本実験において全血中グリセロール濃度は、対照区では絶食24時間および72時間鶏で統計的に有意に増加し、DavisonとLangslow⁸⁾の報告とほぼ同様の傾向を示した（表2）。しかし、脂肪肝症区では、絶食時間が延長するに伴い全血中グリセロール濃度はやや増加する傾向を示したが、正常鶏に見られたような明らかな上昇は認められず、いずれの絶食時間でも脂肪肝症区は対照区よりも低い値であった。また、血漿中遊離脂肪酸濃度は、対照区においては絶食24時間および72時間で絶食前より明らかに増加した。しかし、脂肪肝症区では対照区よりもやや高い値であったが、絶食時間を延長しても増加は認められなかった。正常鶏では絶食によりトリアシルグリセロールが分解され、血液中へのグリセロール放出が増大したと考えられるが、脂肪肝症区では絶食中でもその放出は抑制されるのではないかと考えられる。

血漿中グルコース濃度は絶食前の鶏でも対照区より脂肪肝症区の方がやや低い値を示し、絶食24時間および72時間の鶏では対照区より脂肪肝症区の方が明らかに低い値であり、低血糖が認められた（表3）。絶食中の鶏に糖原性物質が供給されると血漿中グルコース含量が上昇すると考えられるので、本実験では、糖原性物質であるグリセロールを絶食中の鶏に投与した。その結果、血漿中グルコース濃度は対照区では絶食24時間鶏でグリセロール投与後3時間から、また絶食72時間鶏では投与後1時間から統計的に有意な上昇を示した。しかし、脂肪肝症区においては絶食72時間鶏でグリセロール投与後5時間において上昇を示したのみで、絶食24時間鶏あるいは絶食72時間鶏の投与後3時間までは変化は認められなかった。脂肪肝症鶏は脂肪酸合成の律速酵素であるピオチン依存性アセチル-CoAカルボキシラーゼ（EC6.2.1.3）の活性が著しく高くなり、同じくピオチン依存性酵素で糖新生系酵素であるピルビン酸カルボキシラーゼ（EC6.4.1.1）の活性が低下することが報告されている¹⁶⁾。グリセロールはグリセロキナーゼ（EC2.7.1.31）およびグリセロール-3-リン酸デヒドロゲナーゼ（EC1.1.1.8）の触媒作用によってジヒドロキシアセトンリン酸を経て糖新生に利用される。そのため、絶食した脂肪肝症鶏にグリセロールを投与しても血漿中グルコース濃度が上昇しないのは、オキザロ酢酸の供給が抑制されるためか、またはグリセロールのジヒドロキシアセトンリン酸への変換が阻害されるためか、あるいはその両方により、糖新生が抑制されて血漿中グルコース濃度の低下がおきると推察される。

以上のことから、脂肪肝症鶏では絶食時のような消化管からのグルコース供給がとだえた状態でも糖原性物質であるグリセロールの肝臓からの放出は促進されず、また、グリセロールの糖新生への利用も昂進しないと考えられる。

文 献

- 1) Evans, R. M., Scholz, R. W. & Mongin, P.: Effects of a high protein, "carbohydrate-free" diet on liver and kidney constituents and kidney function in chicks. *Comp. Biochem. Physiol.* **40A**: 1029, 1971.
- 2) Shen, C. S. & Misty, S. P.: Intracellular distribution of hepatic and renal gluconeogenic enzyme in embryonic and growing chicks. *Poult.Sci.* **58** : 1239, 1979.
- 3) 山本 清：“ホルモンと糖質の代謝”，東京：共立出版，1979.
- 4) Hazelwood, R. L.: 'Carbohydrate Metabolism' in "Avian Physiology", Sturkie, P. D. ed. New York・Berlin・Heidelberg・Tokyo: Springer-Verlag, 303-325, 1986.
- 5) Sarkar, N. K.: Gluconeogenesis and the factors that control the process in chickens. *Life Sci.* **10** : 293-300, 1971.
- 6) Belo, P. S., Romsos, D. R. & Leveille, G. A.: Blood metabolites and glucose metabolism in the fed and fasted chicken. *J. Nutr.* **106** : 1135, 1976.
- 7) Langslow, D. R.: Gluconeogenesis in birds. *Biochem. Soc. Trans.* **6** : 1148-1152, 1978.
- 8) Davison, T. F. & Langslow, D. R.: Changes in plasma glucose and liver glycogen following the administration of gluconeogenic precursors to the starving fowl. *Comp. Biochem. physiol.* **52A**: 645, 1975.
- 9) Meijering, A.: Fatty liver syndrome in laying hens-An attempt to review. *World Poult. Sci. J.*, **35** : 79-94, 1979.
- 10) Bannister, L. A., Evans, A. J., & Whitehead, C. C.: Carbohydrate absorption by chickens affected with the fatty liver and kidney syndrome. *Res. Vet. Sci.* **19** : 90-92, 1975.
- 11) Wieland, O. H. : 'Glycerol : UV-method', in "Methods of enzymatic analysis, 3rd ed., vol.6" Bergmeyer, H. U. ed. New York・San Francisco・London: Academic Press, 504-518, 1984.
- 12) Bergmeyer, H. U. & Bernt, E.: 'Determination with glucose oxidase and peroxidase : method with 2, 2-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline)-6-sulphate (ABTS)', in "Methods of enzymatic analysis, 2nd ed., vol. 3" Bergmeyer, H. U. ed. New York・San Francisco・London: Academic Press, 1212-1214, 1974.
- 13) 久城英人, 高野圭以, 曾山浩吉, 福井巖：血清遊離脂肪酸比色定量法に関する検討（第7報）-Itaya-Ui改良法について-，*臨床獣医*，**18** : 833-839, 1970.
- 14) 吉田 実：“畜産を中心とする実験計画法”，東京：養賢堂，1975.
- 15) Couch, J. R.: Fatty livers in laying hens-a condition which may occur as a result of increased strain. *Feedstuffs*, **28** : 46-54, 1956.
- 16) Bannister, D. W., Evans, A. J. & Whitehead, C. C.: Evidence for a lesion in carbohydrate metabolism in fatty liver and kidney syndrome in chicks. *Res. Vet. Sci.* **18** : 149-156, 1975.