



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

エチオニン投与により誘発した日本在来種ヤギの脂肪肝に対するパンテチンの糖新生及び脂肪酸合成関連酵素の活性への影響

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 田中, 桂一, 森本, 英司, 牧野, 幸弘, 大谷, 滋 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/5509

エチオニン投与により誘発した日本在来種ヤギの脂肪肝に対するパンテチンの糖新生及び脂肪酸合成関連酵素の活性への影響

田中桂一・森本英司¹⁾・牧野幸弘²⁾・大谷 滋

動物生産学講座

(1992年7月20日受理)

Effects of Pantethine on Gluconeogenesis and Fatty Acid Synthesis in Japanese Native Goats Induced Fatty Liver by Ethionine Administration

Keiichi TANAKA, Eiji MORIMOTO, Yukihiro MAKINO and Shigeru OHTANI

Department of Animal Science and Technology

(Received July 20, 1992)

SUMMARY

Effects of pantethine on gluconeogenesis in the liver and fatty acid synthesis in the subcutaneous adipose tissue were investigated in Japanese native goats (castrated) and found to induce fatty liver after ethionine administration. DL-Ethionine (25mg/kg of body weight) was administered to five goats (2 to 3 years old). On the 5th day after ethionine treatment, the five goats were subdivided into two groups, the control (2 goats) and the pantethine administered (3 goats) group. The pantethine administered group were given pantethine (2.5mg/kg of body weight) intravenously for four days. The liver and subcutaneous adipose tissue were biopsied immediately before and on the 5th, 12th and 20th day after ethionine treatment.

The triglyceride content in the liver was markedly increased by ethionine treatment. Thereafter, it reduced gradually with time. The triglyceride content in the liver slightly decreased in the control group, whereas in the pantethine administered group it returned to the original level at the 7th day after pantethine administration (12th day after ethionine treatment). Ethionine treatment caused a decrease in the plasma triglyceride concentration, which recovered gradually with time. Activities of hepatic phosphoenolpyruvate carboxykinase and fructose-1,6-diphosphatase, which is a rate-limiting enzyme of gluconeogenesis, decreased markedly at the 5th day after ethionine treatment. Thereafter, these enzyme activities in the control group remained low till the end of the experiment. In the pantethine administered group, the activities gradually recovered to the level before ethionine treatment at the 20th day of the experiment. Pantethine administration had no influence on activities of lipogenic-related enzymes in the subcutaneous adipose tissue. From the above results, it can be considered that pantethine has the effect of prevention and treatment of fatty liver in ruminants.

Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. (57) : 53—63, 1992.

注. 1) 岐阜大学農学部附属農場
2) 協同飼料株式会社

要 約

DL-エチオニン処理をして脂肪肝を誘発させたヤギにパンテチンを投与することによって、肝臓に脂肪が蓄積することによる肝臓での糖新生障害にパンテチンが効果あるかを検討した。日本在来種去勢ヤギをエチオニン処理によって実験的に脂肪肝を誘発させ、その後、パンテチンを静脈内に投与し、エチオニン処理前、処理後に肝臓と皮下脂肪組織を生検によって採取した。

肝臓中トリグリセリド含量は、エチオニン処理後5日後、いずれのヤギも著しく増加した。その後、徐々に減少したが、対照群の減少は僅かであり、パンテチン投与群ではパンテチン投与7日目(エチオニン処理12日目)でエチオニン処理前の値に戻った。血漿中トリグリセリド濃度は、エチオニン処理によって減少し、その後回復したが、その程度はパンテチン投与群の方が大きかった。糖新生の律速酵素である肝臓中のPEPCKとFDPaseの活性は、エチオニン処理によって、5日目で著しく低下した。その後、対照群では20日目でも回復せず低い活性で推移した。パンテチン投与群では、それらの活性は徐々に回復し、20日目では処理前の値に近づいた。皮下脂肪組織における脂肪酸合成関連酵素の活性は、実験期間を通して大きな変化は観察されなかった。以上の結果から、パンテチン投与は、反芻動物で発生する脂肪肝の予防あるいは治療に効果のあることが期待できる。

緒 言

近年、家畜の飼養管理の省力化による運動不足や濃厚飼料多給などによるエネルギーの過剰摂取などによって、牛の過肥症候群の一つである脂肪壊死症や脂肪肝の発生が増加している。脂肪肝症の発生機序は、(1)肝外から肝臓への脂肪酸の供給過剰、すなわち、脂肪組織などからの脂肪の動員などによって、血漿中の非エステル型脂肪酸が上昇し、肝臓への取り込みが多くなり、トリグリセリド合成がリポタンパク質の産生より高くなったとき、(2)肝臓内の代謝障害、一般的には血漿リポタンパク質の産生が阻害されたり、リポタンパク質の肝臓からの分泌が障害を受けたとき、(3)肝臓内における脂肪酸酸化の抑制の何れか一つ、または(1)から(3)の二つ以上が合併して生じる。

牛の脂肪肝発生の多くの場合は、牛が過肥状態にあり、脂肪細胞は肥大し、インシュリン感受性が低下しており、そのためグルコースの利用性も低下している¹⁾。このような生理状態の時には、糖に代わって必要エネルギーを脂肪組織に蓄積した脂肪に依存するようになるために、蓄積脂肪が分解し、グリセロールと脂肪酸が血流中に大量に放出される。いわゆる脂肪組織からの脂肪の動員が亢進され、血流中の非エステル型脂肪酸レベルが高くなり、肝臓への供給が増加し、大部分はトリグリセリドとして蓄積する。妊娠末期牛ではエネルギー要求量も多くなるため、過肥の場合は脂肪肝の発生が高くなる傾向にある。

ラット、ヒト、ニワトリにおいて、パントテン酸誘導体であるパンテチンが肝臓への脂質の蓄積やコレステロール代謝に関与し、肝臓機能障害の改善に有効であることが報告されている²⁻⁷⁾。パンテチンは還元されると、その末端が-SH基を持つパンテテインとなり、パンテチンはパントテン酸からCoAが合成される際の中間物質である。そのためパンテチンは、パントテン酸と同様、生体内においてCoAの前駆物質となり、糖質、脂質、アミノ酸などの種々の代謝に関与し、重要な役割を果たしている。本研究は、牛のモデルとしてヤギを供試し、DL-エチオニンを投与して実験的に脂肪肝を誘発させた。そしてこの実験的脂肪肝ヤギにパンテチン製剤を投与することによって、肝臓に脂肪が蓄積することによる肝障害にパンテチン製剤の治療効果を検討した。

実験材料および方法

1. 実験動物とその管理

去勢した日本在来種ヤギ5頭(2~3歳、体重17~22kg)を供試した。ヤギは、実験予備期間および実験処理期間を通して、単飼ケージで個別に飼育した。各々のヤギは粗飼料としてイタリアンライグラス乾草(CP:11.9%, TDN:56.3%)と濃厚飼料を1日当たり体重1kgに対して、それぞれ9gと16g給与した。濃厚飼料(CP:16.3%, TDN:79.7%)の配合割合は大麦29.9%, トウモロコシ29.9%, フスマ26.9%,

大豆粕8.9%，第二磷酸カルシウム2.2%，食塩1.5%およびビタミン剤0.7%とした。飼料の給与は、毎日9：00～10：00と16：00～17：00に1日の給与量の半分をそれぞれに給与した。飲水は自由にした。

2. 実験計画

DL-エチオニン（和光純薬工業製）を体重1kg当り25mg，滅菌処理した生理食塩水に溶解し，前述のような管理のもとで飼育された5頭のヤギの腹腔内に注入して実験的に脂肪肝を誘発させた。エチオニン処理前と処理5日後に，午前の飼料給与直前に頸静脈から採血した後，生検によって皮下脂肪組織と肝臓を摘出した。その後，5頭のヤギを2頭と3頭の2群に分けた。3頭の群はパンテチン投与区とし，パンテチン（第一製薬製）をエチオニン処理後5日目から1日に1回，体重1kg当り2.5mgを4日間連続して頸静脈内に注射投与した。2頭の群は対照区として，パンテチンの代わりに，注射用蒸留水（12.5 μ l/kg体重）を同様に注射した。残飼量は毎日午前中の飼料給与前に測定した。

3. 試料の採取

エチオニン処理前日，エチオニン処理後5，12および20日目に全てのヤギの頸静脈から血液を採取し，遠心分離（1,000xg，10分間）によって血漿を分離して，分析に使用するまで-30℃以下で凍結保存した。肝臓と皮下脂肪組織は，エチオニン処理前，エチオニン処理後5，12および20日目にTanakaら⁸⁾の報告に基づいて生検によって採取し，冷生理食塩水で洗浄し，各種酵素の活性の測定を行なった。

4. 脂肪酸合成および糖新生関連酵素の活性と脂質画分含量の測定

皮下脂肪組織における脂肪酸合成関連酵素として acetyl-CoA carboxylase (EC 6.2.1.3; ACC), fatty acid synthetase (FAS), NADP-isocitrate dehydrogenase (EC 1.1.1.43; NADP-ICDH) および glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49; G6PDH) の活性を，肝臓における糖新生関連酵素として phosphoenolpyruvate carboxykinase (EC 4.1.1.32; PEPCK), fructose-1,6-diphosphatase (EC 3.1.3.11; FDPase), alanine aminotransferase (EC 2.6.1.2; ALAT) および aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1; ASAT) の活性を測定した。脂肪組織中における ACC, FAS, NADP-ICDH および G6PDH 活性の測定は，それぞれ Qureshiら⁹⁾, Hsuら¹⁰⁾, Berntと Bergmeyer¹¹⁾ および Lohrと Waller¹²⁾ の方法に基づいて行なった。また肝臓における PEPCK, FDPase, ALAT および ASAT 活性の測定は，Meyuhara¹³⁾, Opieと Newsholme¹⁴⁾, Bergmeyerと Bernt¹⁵⁾ および Bergmeyerと Bernt¹⁶⁾ の方法に基づいて行なった。酵素溶液中のタンパク質含量は標準品として牛血清アルブミンを使用し，Lowryら¹⁷⁾の方法によって測定した。

血漿および肝臓中の各脂質画分含量の測定は，薄層クロマトグラフ法によって分離同定した各脂質画分を，水素炎イオン化検出器によって行なった⁶⁾。血漿中の ALAT と ASAT の活性は UV 発色法による GPT-と GOT-UV Test Wako（和光純薬株式会社製）Kit を用いて測定した。

結 果

体重および飼料摂取量

パンテチン投与区，対照区ともに実験期間中，体重はいずれのヤギも大きな変化は観察されなかった。肝臓を生検した後，1～2日間は食欲が低下し，残飼した個体もいたが，3日目以後は正常に戻った。エチオニン処理による食欲への影響は観察されなかった。

肝臓および血漿中の各脂質画分含量

実験期間中の肝臓および血漿中のトリグリセリド含量の変化を図1に示した。肝臓中トリグリセリド含量は，エチオニン処理5日後には，いずれのヤギも著しく増加した。その後，対照群のヤギは徐々に減少したが，エチオニン処理後20日目でもエチオニン処理前より高い値を示した。一方，パンテチン投与群のヤギは，2頭のヤギはパンテチン投与7日目（エチオニン処理12日目）で，1頭は20日目でエチオニン処理前の値に戻った。血漿中のトリグリセリド濃度は，エチオニン処理によって5日目までいずれのヤギも減少した。その後，いずれのヤギも処理前の値に回復したが，その程度はパンテチン投与群のヤギの方が大きかった。肝臓及び血漿中のトリグリセリド以外の脂質画分（遊離型とエステル型コレステロールおよびリン脂質）含量に関しては，血漿中において，エチオニン処理により減少し，12日目以後回復する傾向

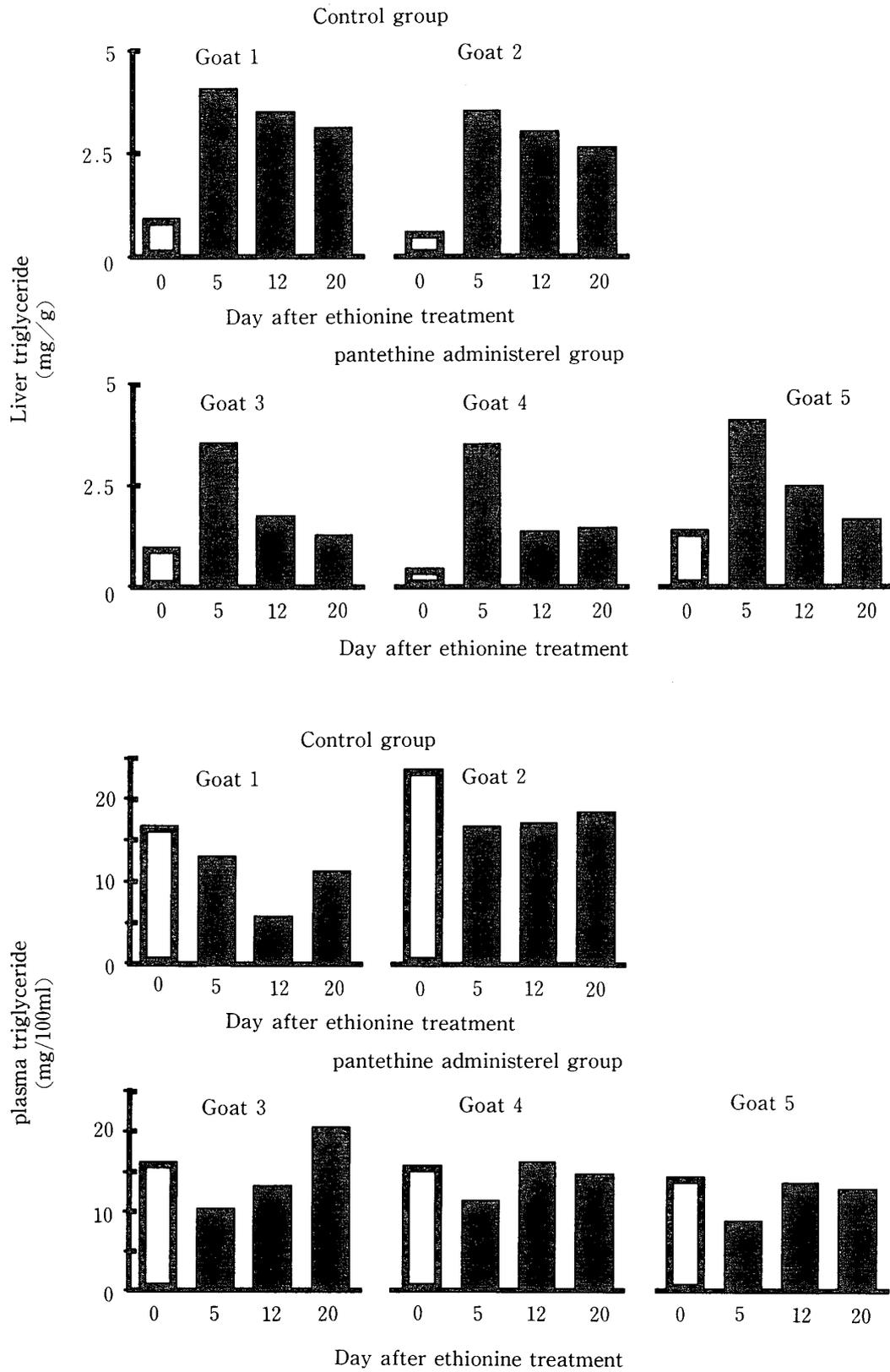


Fig. 1. Effects of pantethine administration on triglyceride contents of the liver and plasma in goats induced fatty liver by ethionine treatment.

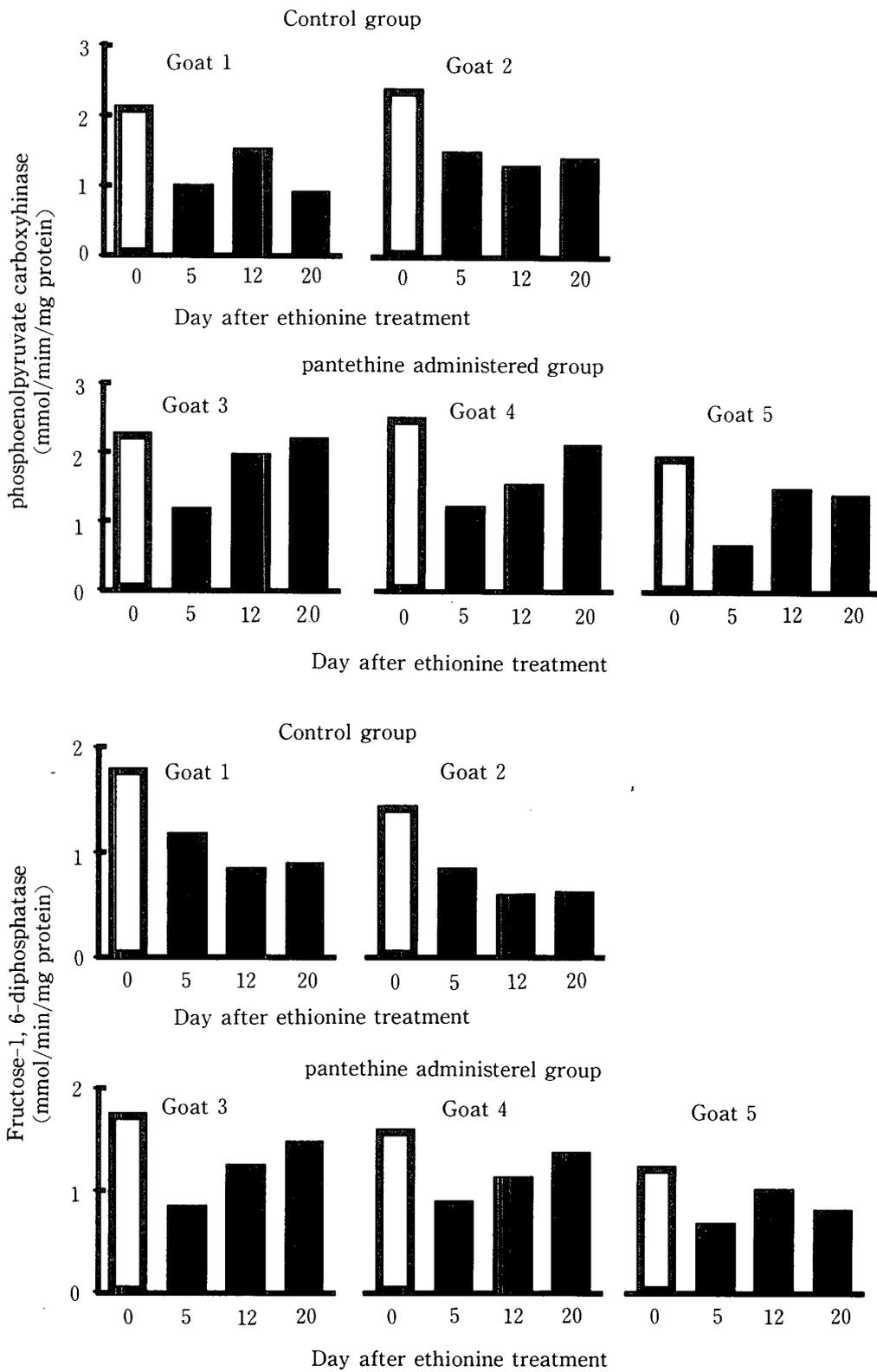


Fig. 2. Effects of pantethine administration on activities of phosphoenolpyruvate carboxykinase and fructose-1,6-diphosphatase of the liver in goats induced fatty liver by ethionine treatment.

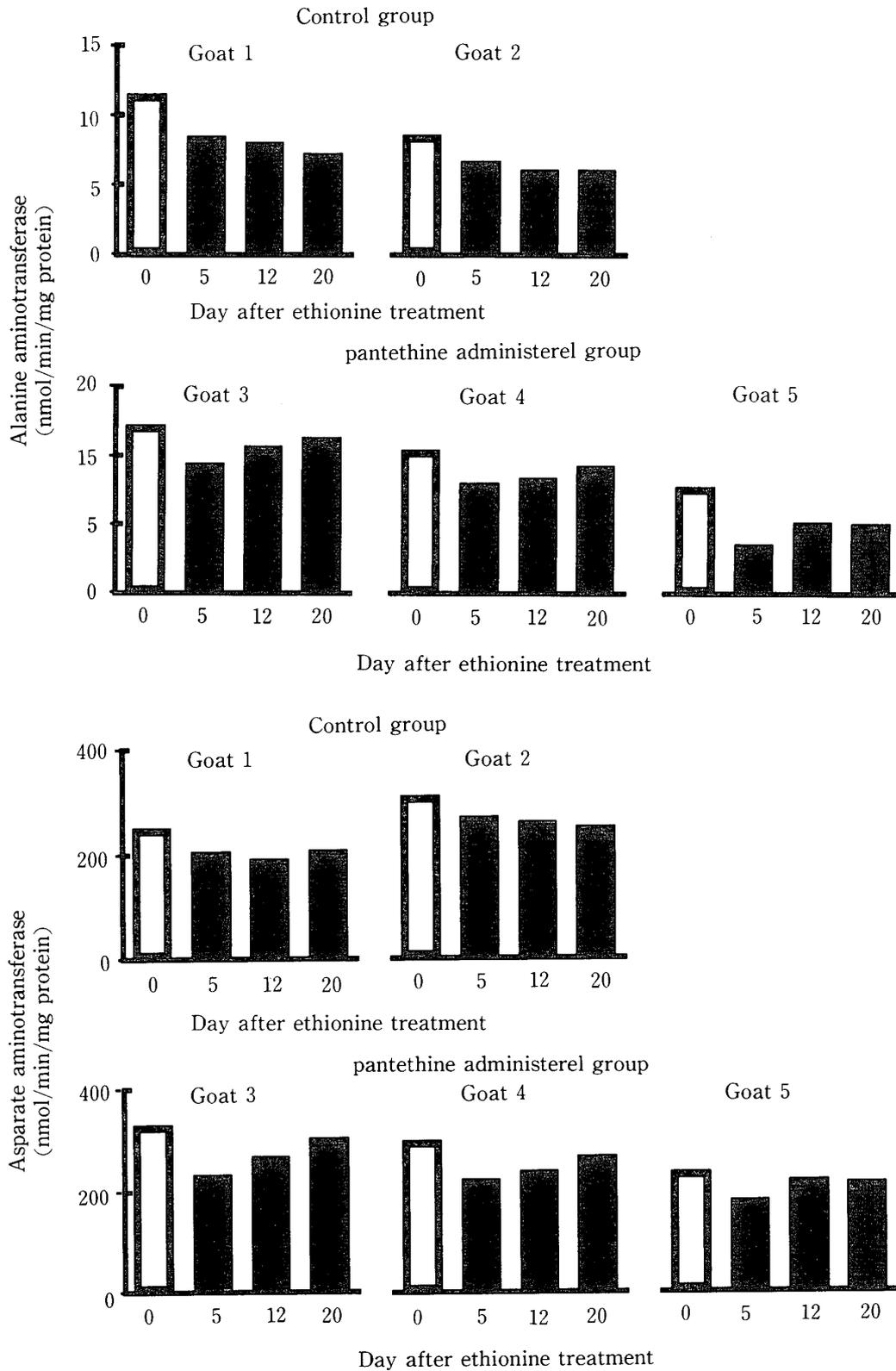


Fig. 3. Effects of pantethine administration on activities of alanine and aspartate aminotransferases of the plasma in goats induced fatty liver by ethionine treatment.

Table 1. Effects of pantethine administration on activities of lipogenic-related enzymes of the subcutaneous adipose tissue in goats induced fatty liver by ethionine treatment

Goat No.		ACC ¹⁾	FAS ²⁾	G6PDH ³⁾	NADP-ICDH ⁴⁾
		nmol/min/mg protein ⁵⁾			
Control group					
1	Before treatment	6.37	7.86	110.5	76.6
	After treatment				
	5th day	5.51	5.93	103.2	66.4
	12th day	5.70	6.65	99.5	73.2
	20th day	5.03	5.53	102.3	63.0
2	Before treatment	4.50	6.53	89.3	83.3
	After treatment				
	5th day	4.38	6.04	92.7	73.4
	12th day	3.92	5.51	77.3	74.8
	20th day	3.74	4.93	91.4	73.7
Pantethine administered group					
3	Before treatment	5.94	6.77	90.0	65.0
	After treatment				
	5th day	5.31	6.34	93.2	64.6
	12th day	5.23	5.51	74.7	61.3
	20th day	5.65	5.43	60.9	56.7
4	Before treatment	4.51	7.13	89.0	56.5
	After treatment				
	5th day	3.50	6.09	92.7	55.6
	12th day	3.78	5.56	61.2	57.3
	20th day	3.72	6.32	62.6	45.3
5	Before treatment	5.92	8.05	65.6	126.3
	After treatment				
	5th day	5.13	7.66	67.9	110.6
	12th day	5.31	6.85	54.3	106.7
	20th day	4.91	7.03	51.3	98.3

¹⁾ acetyl-CoA carboxylase, ²⁾ fatty acid synthetase, ³⁾ glucose-6-phosphate dehydrogenase, ⁴⁾ NADP-isocitrate dehydrogenase. ⁵⁾ Activities expressed as substrate converted to product per mg protein at 25 or 38°C.

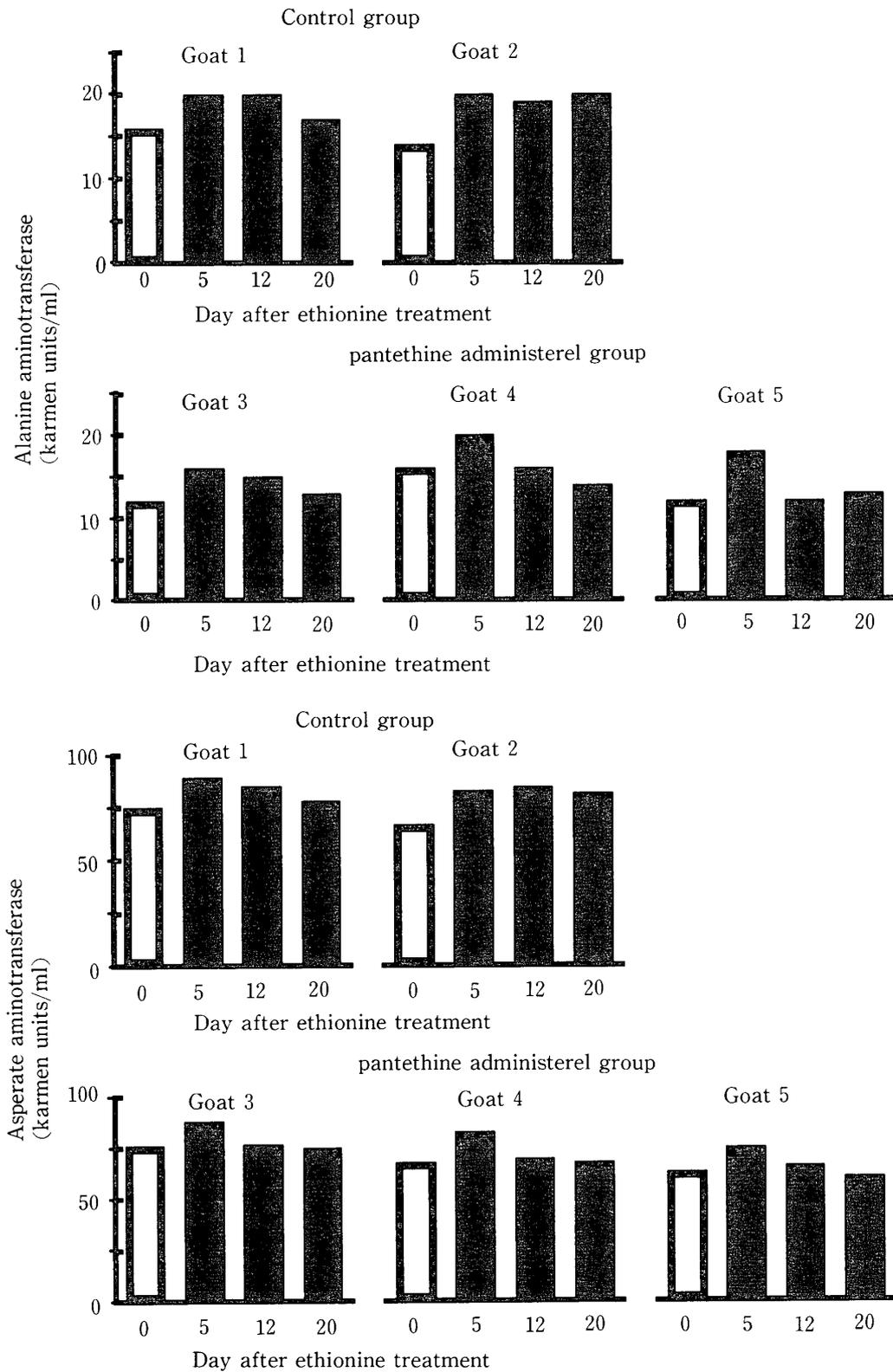


Fig. 4. Effects of pantethine administration on activities of alanine and aspartate aminotransferases of the liver in goats induced fatty liver by ethionine treatment

が見られたが、実験期間を通して大きな変化は観察されなかった。

肝臓における糖新生関連酵素の活性

肝臓での糖新生に関連している酵素の活性を図2と3に示した。糖新生の律速酵素とされているPEPCKとFDPaseの活性は、エチオニン処理によっていずれのヤギにおいても、5日目で著しく低下した。その後、対照群のヤギは20日目でも回復せず、低い活性で推移したが、エチオニン処理後、パンテチンを投与したヤギ（パンテチン投与群）ではそれらの活性は回復し、処理後20日目ではエチオニン処理前の値に近づいた。

アラニンやアスパラギン酸が糖新生に利用されるさい関与しているALATおよびASATの肝臓における活性は、PEPCKやFDPaseと同様、エチオニン処理5日目で低下し、その後、対照群のヤギは低い値のままだったのに対して、パンテチン投与群のヤギは徐々に回復した。

皮下脂肪組織における脂肪酸合成関連酵素の活性

脂肪組織での脂肪酸合成に関与している酵素の活性を表1に示した。脂肪酸合成の律速酵素であるACCおよび脂肪酸合成に直接関与しているFASの活性は、エチオニン処理によって、いずれのヤギも低下する傾向を示した。その後、対照群、パンテチン投与群ともに、大きな変化は観察されなかった。脂肪酸合成に必要な還元物質であるNADPHを供給する反応を触媒しているG6PDHとNADP-ICDHの活性も、ACCやFASと同様の傾向を示した。

血漿中アミノ基転移酵素 (ALAT, ASAT) の活性

血漿中の肝細胞逸脱性酵素であるALATとASATの活性を図4に示した。血漿中のGPTとGOT活性は、エチオニン処理によっていずれのヤギも僅か上昇した。対照群ではエチオニン処理後20日目で1頭のヤギは処理前の値に戻ったが、もう1頭のヤギは高いままだった。一方、パンテチン投与群のヤギはいずれも処理後12日目には処理前の値に戻った。

考 察

エチオニンの腹腔内投与によって脂肪肝が発生することは、よく知られている。その発生機序は、エチオニンによって肝臓でのタンパク質合成が阻害され、リポタンパク質（主に超低密度リポタンパク質、VLDL）が産生されず、肝臓から血流中への脂質の分泌が障害を受けるためである^{18,19}。本実験においても、エチオニン処理によって、いずれのヤギも肝臓中のトリグリセリド含量は著しく高くなり、それに伴って血漿中トリグリセリド濃度が低下した（図1）。エチオニン処理によって、肝臓から血流中へのトリグリセリド放出が阻害されるため肝臓中への脂質、特にトリグリセリド蓄積が大きくなったものと推察される。この時、パンテチン投与によって肝臓から血流中への脂質の放出が回復するために、肝臓中トリグリセリド含量はエチオニン処理前の値にまで低下し、それに伴って血漿中トリグリセリド濃度も回復したのであろう。また、エチオニン処理によって肝臓への脂肪蓄積が観察されたヤギでは糖新生系の酵素(PEPCK, FDPase, ASAT および ALAT)の活性が低下し（図2と3）、肝臓での糖新生の低下が推察された。対照群のヤギは処理後20日目でもほとんど回復が見られなかった。しかし、このように実験的に肝臓に脂肪を蓄積させたヤギにパンテチンを投与することによって、肝臓中のトリグリセリド含量は減少し、エチオニン処理前のレベルに回復し、それに伴って糖新生系の酵素活性もエチオニン処理前の値に近づき、糖新生も対照群のヤギより回復した。このことは、パンテチンが肝臓における糖新生系の酵素に直接関与しているというより、肝臓に蓄積していた脂質が減少し、肝臓の機能が回復したためであろうと推察される。

血漿中のALATとASAT活性は、エチオニン処理によって僅かに高くなる傾向が観察された程度であった。このことは、エチオニンの投与量が少量だったため、肝臓への障害も小さく肝細胞から大量のGOT、GPTが流出するには至らなかったものと思われる。

皮下脂肪組織における脂肪酸合成関連酵素の活性は、エチオニン処理によっていずれのヤギも低下する傾向を示したが、その後、パンテチン投与区と対照区とは大きな違いが見られなかった。ニワトリにパンテチンを投与することによって肝臓における脂肪酸合成が低下^{5,6,7}、あるいはニワトリの単離肝細胞を用いた実験では、培養液中にパンテチンを添加すると脂肪酸合成能およびACCとFASの活性が著しく

低下したとする報告²⁰⁾とは異なっていた。このことは、反芻動物と鳥類という種による違いではなく、パンテチン誘導体であるパンテチンは肝細胞に直接的に働き、脂肪細胞には影響を及ぼさないためであろう。そのため本実験では、パンテチンをヤギに投与しても皮下脂肪組織の脂肪酸合成には直接影響を与えなかったと推察される。

以上のことにより、パンテチンは、ヤギのような反芻家畜で発生する脂肪肝に対して予防あるいは治療効果が期待できる。また、肝臓での糖新生が活性化されるため糖原不足に起因する牛のケトージスの予防や治療にも効果が期待されるであろう。

文 献

- 1) Reid, I.M. : Incidence and severity of fatty liver in dairy cows. *Vet. Rec.* **20** : 218-284, 1980.
- 2) 木村修一・古川勇次・若杉潤一郎 : ラットのコレステロール代謝におよぼすパンテチンの影響。第4回パンテチン・シンポジウム : 200-206, 1980.
- 3) 石川俊次・中村治雄 : パンテチン投与による血清リポ蛋白の変化 : 第4回パンテチン・シンポジウム : 207-214, 1980.
- 4) 住吉昭信 : 実験的動脈硬化とパンテチンの効果 : 第4回パンテチン・シンポジウム : 261-266, 1980.
- 5) Hsu, J.-C., Tanaka, K., Ohtani, S. and Collado, C.M. : Effects of Pantethine Supplementation to Diets with Different Energy Cereals on Hepatic Lipogenesis of Laying Hens. *Poult. Sci.* **66** : 280-288, 1987.
- 6) Hsu, J.-C., Tanaka, K., Ohtani, S. and Collado, C.M. : Effects of Pantethine Supplementation to Diets on Hepatic Lipogenesis of Laying Hens Exposed to a High Environmental Temperature. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **59** : 1059-1072, 1988.
- 7) Tanaka, K., Hsu, J.-C., and Ohtani, S. : Effects of Dietary Pantethine on Plasma Lipid Fractions and on Hepatic Lipogenesis of growing Chicks. *Jpn. J. Zootech. Sic.* **60** : 1151-1160, 1989.
- 8) Tanaka, K., Ohtani, S. and Shigeno, K. : Effects of Diets on Lipogenic-Related Enzymes and on Lipoprotein and Hormone-Sensitive Lipases in the Adipose Tissue of Goats. *Jpn. J. Zootech. Sci.* **54** : 470-480, 1983.
- 9) Qureshi, A.A., Burger, W.C., Prentice, N., Bird, H.R. and Sunde, M.L. : Suppression of cholesterol and stimulation of fatty acid biosynthesis in chicken livers by dietary cereals supplemented with culture filtrate *trichoderma viride*. *J. Nutr.* **110** : 1014-1022, 1980.
- 10) Hsu, R., Wasson, Y.G. and Porter, J.W. : The purification and properties of the fatty acid synthetase of pigeon liver. *J. Biol. Chem.* **240** : 3736-3746, 1965.
- 11) Bernt, E. and Bergmeyer, H.U. : 'Isocitrate Dehydrogenase' in "Methods of Enzymatic Analysis, 2nd ed. Vol. 2" Bergmeyer, H.U. ed. New York • San Francisco • London: Academic Press, 624-627, 1974.
- 12) Lohr, G.W. and Waller, H.D. : 'Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase' in "Methods of Enzymatic Analysis, 2nd ed. Vol. 2" Bergmeyer, H.U. ed. New York • San Francisco • London: Academic Press, 636-641, 1974.
- 13) Meyuhas, O., Boshwitz, C.H. and Reshef, L.: Phosphoenolpyruvate carboxykinase decarboxylation catalyzed reaction in cytosol of rat adipose tissue. *Biochim. Biophys. Acta* **250** : 224-237, 1971.
- 14) Opie, L.H. and Newsholme, E.A. : The activities of fructose-1,6-diphosphatase, phospho-fructokinase and phosphoenolpyruvate carboxykinase in white muscle and red muscle. *Biochem. J.* **103** : 391-396, 1966.
- 15) Bergmeyer, H.U. and Bernt, E. : 'Glutamate-Pyruvate Transaminase' in "Methods of Enzymatic Analysis, 2nd ed. Vol.2" Bergmeyer, H.U. ed. New York • San Francisco • London: Academic Press, 752-758, 1974.
- 16) Bergmeyer, H.U. and Bernt, E. : 'Glutamate-Oxaloacetate Transaminase' in "Methods of Enzymatic Analysis, 2nd ed. Vol. 2" Bergmeyer, H.U. ed. New York • San Francisco • London: Academic Press, 727-733, 1974.
- 17) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275, 1951.
- 18) Farber, E. : Ethionine Fatty Liver. *Adv. Lipid Res.* **5** : 119-183, 1967.
- 19) Boermans, H.J. and Black, W.D.: Effect of ethionine on hematologic and serum biochemical values in fasted calves. *Am. J. Vet. Res.* **44** : 2208-2211, 1983.

- 20) Hsu, J.-C., Tanaka, K., Inayama, I. and Ohtani, S.: Effects of Pantethine on Lipogenesis and CO₂ Production in the Isolated Hepatocytes of the Chicks (*Gallus Domesticus*). *Comp. Biochem. Physiol.* **102A** : 569-572, 1992.