

乳用牛の周産期病予防に向けた酸化ストレス軽減技術の開発(第3報)

矢田桃子* 荻野武夫** 村上知之

Development of oxidation stress mitigation technique for prevention of perinatal disease of dairy cattle (Third Report)

Momoko Yata, Takeo Ogino, Tomoyuki Murakami

要 約

稲 WCS 給与による周産期の酸化ストレス軽減技術を開発するため、府内で生産された稲 WCS を給与した乳用牛の血中抗酸化成分の推移を調査。分娩 21 日前から分娩後 70 日に粗飼料の約 17% (乾物) を稲 WCS に置き換えて給与した区 (試験区) と給与しなかった区 (対照区) で比較試験を行った。

- 1 乾物摂取量や乳量、血中成分 (グルコース、カルシウム) に有意な差はなく、乾草を稲 WCS に置き換えて給与できることがわかった。
- 2 稲 WCS を給与することで、血中の抗酸化物質である α トコフェロールが有意に増加することを確認した。
- 3 活性酸素を発生させる遊離脂肪酸が減少し、酸化ストレス軽減の可能性が示唆された。
- 4 稲 WCS を利用することにより、飼料費の削減が可能となった。

キーワード: 乳用牛、酸化ストレス、 α -トコフェロール、遊離脂肪酸

結 言

近年、乳用牛は遺伝的改良により高泌乳化が進む一方で、繁殖成績の悪化や供用年数の短縮という課題がある¹⁾。乳用牛の主な除籍の理由は、分娩直後や高泌乳期に発生する周産期病等の疾病があげられるが、その原因の 1 つである「酸化ストレス」が注目されている。高泌乳牛は高水準の乳生産を維持するために体内で活発なエネルギー代謝を行う際に、大量の酸素を必要とし、体内で酸素を利用した際に生成する過剰な活性酸素が細胞機能や免疫力、生殖細胞の機能の低下を引き起こす²⁾。生涯生産性向上のためには酸化ストレスを軽減し長命連産性を向上させる必要がある。

一方、京都府内では自給飼料の利用促進のため稲ホルクロップサイレージ (WCS) 用の収穫機械の導入が進むとともに、稲 WCS の生産が拡大している。稲 WCS の特徴は、輸入乾牧草と比べ多くの抗酸化作用を有する β カロテンやビタミン E などの成分が含まれていると言われている³⁾。しかし、実際の酸化ストレス低減効果を調べた報告は少ない。

本試験では府内で生産される稲 WCS の抗酸化作用成分を把握するとともに、稲 WCS を給与することにより、泌乳牛の周産期の酸化ストレスを軽減できる飼養管理方法を検討した。

材料及び方法

1. 稲 WCS 給与時の分娩前後の酸化ストレス状況の把握

(1) 試験期間 2017 年 12 月 21 日～2019 年 7 月 9 日

* 丹後広域振興局農林商工部農商工連携・推進課

** 京都府丹後家畜保健衛生所業務課

(2) 供試牛

当センター乳用牛舎に繋養するホルスタイン種雌牛のうち、2018年1月から2019年4月に分娩予定の初産牛4頭、経産牛6頭、計10頭を供試した。

(3) 試験区分

分娩予定日の21日前から分娩後70日までの間、稲WCSを給与する試験区と非給与の対照区に分け、両区に5頭ずつ計10頭配置した。

(4) 給与飼料

分娩前は両区とも、粗飼料は輸入乾草（クレイングラス乾草、チモシー乾草、オーツ乾草、およびアルファルファヘイキューブ）を、濃厚飼料は市販の移行期用配合飼料（移行期フレペレ、JA西日本くみあい飼料株式会社）を給与した。試験区は稲WCS給与マニュアル³⁾を参考に粗飼料の約17%（乾物）を稲WCSに置き換えて給与した。

分娩直後にはグリセナージ（日産合成工業）1本およびゲンキコールCa（日産合成工業）1本を経口給与した。

分娩後は試験区に稲WCSを8kg（乾物2.4kg）、両区に、粗飼料としてクレイングラス乾草、オーツ乾草、チモシー乾草およびアルファルファヘイキューブを給与した。濃厚飼料は移行期用配合飼料から泌乳用配合飼料（エナジー18、JA西日本くみあい飼料株式会社）へと徐々に置き換え、1日最大500gを上限に増給した。また、移行期Caを試験期間中1日200g給与した。

稲WCSは、ロール開封後ビニール袋に10kg程度に小分けし、掃除機で脱気して保存したものを使用した。

(5) 調査項目と測定方法

ア 飼料成分分析

一般成分（水分、粗タンパク質、粗脂肪、粗繊維、粗灰分、可溶無窒素物）は定法⁴⁾、銅・亜鉛はICP発光分光分析法、βカロテン、αトコフェロールは高速液体クロマトグラフィー法を用いそれぞれ測定を行った。

イ 体重

分娩予定の3および1週間前、分娩日、分娩後4、10週に牛衡機で計測した。

ウ 乾物摂取量、養分充足率

残飼量を毎日秤量し、摂取量を算出した。また、乾物摂取量からTDN、CP、Ca、βカロテン、αトコフェロールの養分充足率を算出した。

エ 乳量及び乳成分

乳量は朝夕の搾乳毎にミルクメーター（Waikato Milking Systems NZ Ltd. MKV

Milk Meter）により計測した。

乳成分（乳脂率、乳タンパク質率、無脂固形分率及び体細胞数）は分娩後2週ごとに乳汁検体を採取し、生乳検査所にて赤外線分析法により定量した成績を用いた。

オ 血液の採取と成分分析

朝の飼料給与前（9時）に真空採血管（プレーン・ヘパリン入り）を用い、尾静脈から採血した。採取した血液を遠心分離（3000rpm×10分）し、血漿・血清を分析に供するまで-20℃で凍結保存した。

分析項目は、βカロテン、αトコフェロール、スーパーオキシドディスムターゼ（SOD）、インターロイキン-1β（IL-1β）、遊離脂肪酸（NEFA）、グルコース、カルシウム、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）とした。

βカロテン、αトコフェロールは、血漿0.5mlに水とピロガロール含有エタノールを加えよく混和したのち、n-ヘキサンで抽出し、βカロテンは450nm、αトコフェロール292nmでそれぞれ高速液体クロマトグラフィー法⁵⁾にて測定をおこなった。

NEFAは、ラボアッセイ™ NEFAキット（和光純薬）を用い、5μlの血漿と100μlの発色試液をリン酸緩衝液pH7.0で溶解した溶液を混合し、10分間、37℃で加温した。次に、200μlの発色試液を加え、10分間、37℃で加温した後、550nmにおける吸光度を分光光度計で測定し、基準液から算出した検量線から、血漿遊離脂肪酸濃度（mEq/L）を求めた。

SODはSOD Assay Kit - WSTキット（同仁科学）を用い、血漿20μlにworking solution 200μlとEnzyme working solutionを20μlを加え、450nmでの吸光度を分光光度計にて測定を行った。

IL-1βは、IL-1 Beta ELISA Kit（LS-Bio社）にて、血清50μlを用いELISA法にて測定した。

グルコースとカルシウム、GOTは血清を用い血液自動分析装置（富士ドライケム）でそれぞれ測定した。

カ ロール開封後抗酸化ビタミンの変化

稲WCSのロール開封後のβカロテン、αトコフェロールを経時的に調査した（開封直後、6時間後、24時間後、48時間後、72時間後、168時間後）。測定方

法はアと同様に行った。

キ 飼料費

両区の期間中にかかった粗飼料費と、各粗飼料ごとの乾物 1kg あたりの費用をそれぞれ算出した。

2. 農家実証

(1) 試験期間 2019 年 4 月～12 月

(2) 供試牛

府内酪農家乳用牛舎に繋養するホルスタイン種雌牛のうち、2019 年 5 月から 10 月に分娩予定の 8 頭を供試した。

(3) 試験区分

5 月から 7 月分娩の供試牛を稲 WCS 給与区、8 月から 10 月分娩を非給与区とし、両区に 4 頭ずつ計 8 頭配置した。

(4) 給与飼料

農家での慣行飼料を給与した。

(5) 調査項目と測定方法

ア 体重

分娩予定の 3 週間前、分娩後 1、7 週に体重推定尺で計測した。

イ 血液の採取と成分分析

午前搾乳後の 11 時 30 分頃に真空採血管（プレーン・ヘパリン入り）を用い、尾静脈から採血した。採取した血液を遠心分離（3000 rpm×10 分）し、血漿・血清を分析に供するまで -20℃ で凍結保存した。

分析項目は、β カロテン、α トコフェロール、グルコース、カルシウムとし 1. (5) オ同様の方法で行った。

結果及び考察

(1) 飼料成分

一般成分は、各飼料ともに日本標準飼料成分表⁹⁾と同程度の水準であった。また、稲 WCS には輸入乾草に比べ β カロテンが 1.5 倍以上、α トコフェロールが 4.4 倍以上含まれていた。銅については、既報⁷⁾よりやや少なめであり、土壌の影響を受けていると考えられる。また、亜鉛は既報⁷⁾と同程度であった（表 1）。

表 1. 飼料中に含まれる各成分

	水分 (%)	乾物中								
		粗タンパク質 (%)	粗脂肪 (%)	粗繊維 (%)	粗灰分 (%)	TDN (%)	β カロテン (mg/kg)	α トコフェロール (mg/kg)	銅 (mg/kg)	亜鉛 (mg/kg)
稲 WCS	70.3	7.5	3.6	33.3	8.5	56.8	31.9	134.2	3.5	16.9
クレイングラス	8.2	9.2	1.3	33.0	8.3	50.7	13.3	24.0	3.6	21.0
チモシー	12.2	7.4	1.9	36.6	6.7	51.8	9.0	20.2	4.1	18.0
オーツ	16.0	5.2	1.8	26.1	4.0	58.3	6.9	30.6	2.5	6.7
アルファルファ ヘイキューブ	13.4	17.0	2.3	25.6	14.8	54.6	20.4	22.8	9.9	27.6
移行期用配合	12.7	20.5	2.9	4.4	5.0	75.0	0.9	397.5	—	—
泌乳期用配合	12.3	18.4	4.8	4.7	6.7	76.0	0.7	87.2	—	—

(2) 体重

体重は試験区が分娩後徐々に回復したのに対し、対照区では分娩後試験終了まで減少したが、有意な差は見られなかった（図 1）。

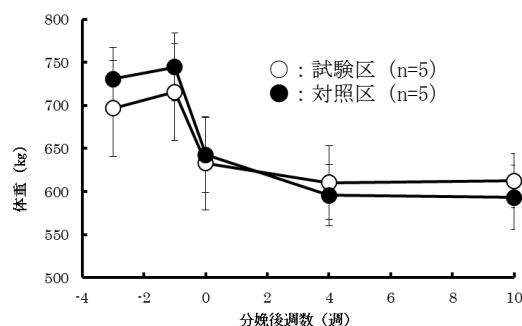


図 1. 体重の推移

(3) 乾物摂取量・養分充足率

乾物摂取量は、両区で目立った差は無く、同等で推移した。養分充足率については、分娩後の摂取量が少ない時期は、特に粗飼料が輸入乾草のみである対照区で不足が目立った（表 2）。

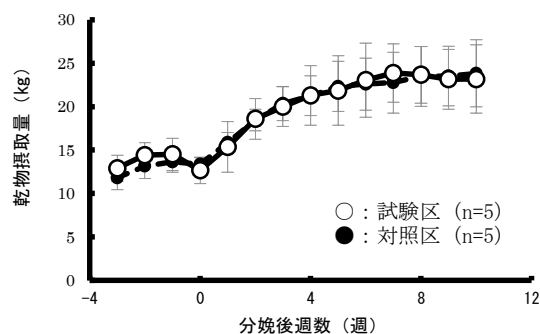


図 2. 乾物摂取量の推移

表 2. 養分充足率

(%)

試験区分		分娩後週数 (週)				
		-3~-1	0	1~3	4~6	7~10
DMI	試験区	111	109	106	106	108
	対照区	105	106	101	109	105
TDN	試験区	119	68	73	79	86
	対照区	111	66	70	79	83
CP	試験区	104	78	82	86	89
	対照区	93	74	79	89	92
Ca	試験区	234	124	125	125	143
	対照区	218	122	127	133	139
ビタミン A	試験区	314	415	394	387	403
	対照区	245	383	371	386	373
ビタミン E	試験区	166	215	183	167	173
	対照区	118	175	154	149	144

(4) 乳量・乳中成分

乳量、乳中成分（表 3）については、両区とも有意差はなかったが、対照区の乳タンパク質が低く推移し、エネルギー不足の可能性が見られた。また、両区で分娩後 2 週にて乳

脂肪が高値で、体脂肪動員があったと考えられる。

表 3. 各試験区供試牛の乳成分平均値の推移

試験区分		分娩後週数 (週)				
		2	4	6	8	10
乳量 (kg)	試験区	33.4	37.2	38.8	38.8	37.0
	対照区	33.7	39.4	38.7	39.0	37.9
乳脂率 (%)	試験区	5.84	4.54	4.15	3.95	4.23
	対照区	5.46	4.22	5.23	4.06	4.12
乳タンパク質率 (%)	試験区	3.85	3.20	3.12	3.12	3.08
	対照区	3.68	3.00	2.87	2.93	2.93
MUN (mg/dl)	試験区	13.7	12.8	13.8	14.3	14.3
	対照区	10.5	14.3	15.8	17.3	14.9
体細胞数 (万/ml)	試験区	24.0	3.7	3.7	5.2	2.9
	対照区	11.5	9.4	5.6	3.3	7.7

(5) 血液成分

β カロテンの血中濃度は、分娩前は試験区が有意に高く、分娩後は両区とも同レベルで推移した（図 3）。 α トコフェロールは試験区において、分娩前後で有意に高く推移した（図 4）。酸化ストレスの指標となる血中 SOD は、試験区が全体的に高めで推移し、一部で有意差が認められた（図 5）。インターロイキン 1 β (IL-1 β) は両区ともに低値であったが試験区が対照

区に比べ低くなる傾向が見られ、一部で有意差が認められた（図 6）。血中 NEFA 濃度については、試験区がほとんどの期間で有意に低くなった（図 7）。

血中グルコース濃度及び血中カルシウム濃度については、両区とも既存の知見のとおり推移し、有意差はなかった（図 8、9）。血中 GOT については、一部で対照区が有意に高い値となった（図 10）。

以上の結果より、牛は分娩前の乾物摂取量の減少は、脂肪組織から NEFA が血中に放出され、脂肪肝を助長する主要因であると示唆されており⁹⁾、対照区は同様な結果となった。また、NEFA の酸化から発生する ROS (活性酸素) の緩和には α トコフェロールが使われるが⁹⁾、試験区は対照区に比べ血中の α トコフェロールや、抗酸化酵素である SOD が有意に増加し、NEFA や GOT が低くなることを確認した。したがって、稲 WCS の給与は酸化ストレスを軽減する可能性が示唆された。

インターロイキン 1 β (IL-1 β) はマクロファージや血管内皮から産生される炎症性サイトカインであり、大腸菌性乳房炎に罹患した場合、急激に上昇する¹¹⁾と言われており、今回、酸化ストレスの指標として測定を行ったが、両区ともに低値で推移する結果となった。先ほど述べたように SOD が有意に増加し NEFA や GOT が低くなることから、IL-1 β についても何らかの違いが見られると考えたがこのような結果となった。この要因については解明できていない。

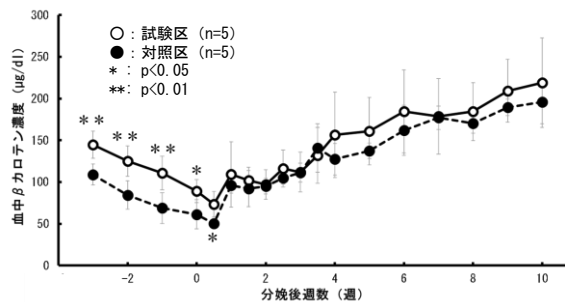


図 3. 分娩前後の血中 β カロテン濃度の推移

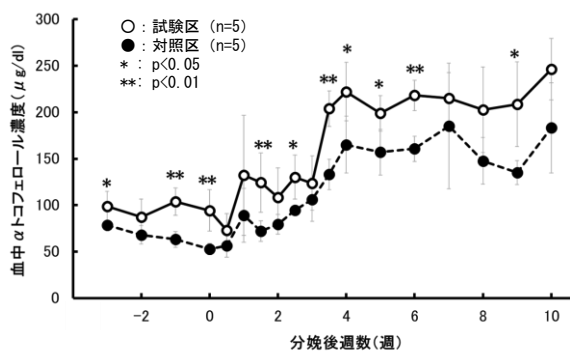


図 4. 分娩前後の血中 α -トコフェロール濃度の推移

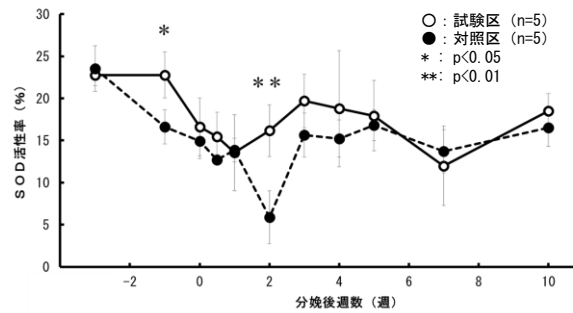


図 5. 分娩前後の血中 SOD 活性の推移

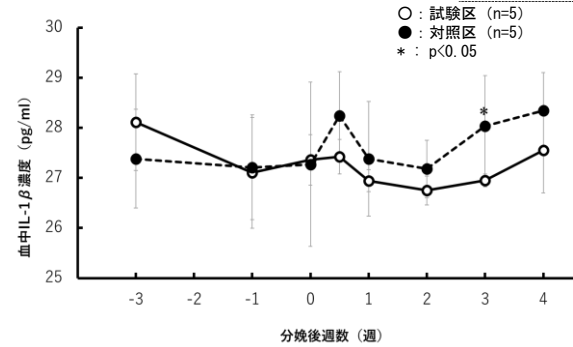


図 6. 分娩前後の血中 IL-1 β 濃度の推移

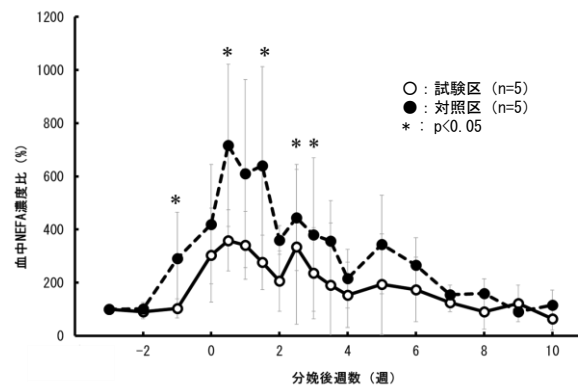


図 7. 分娩前後の血中 NEFA 濃度の推移

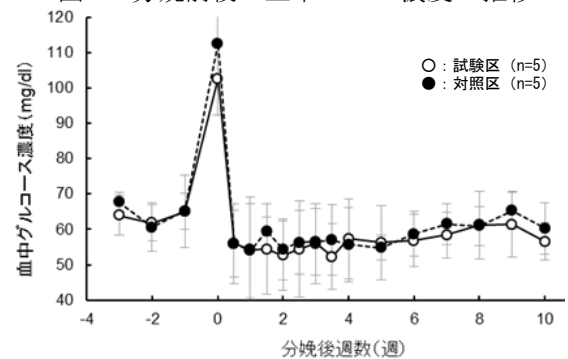


図 8. 分娩前後の血中グルコース濃度の推移

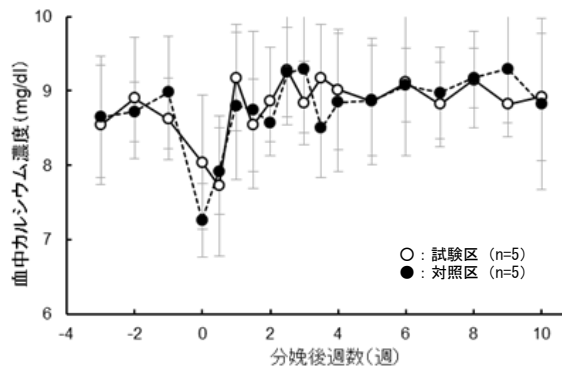


図 9. 分娩前後の血中カルシウム濃度の推移

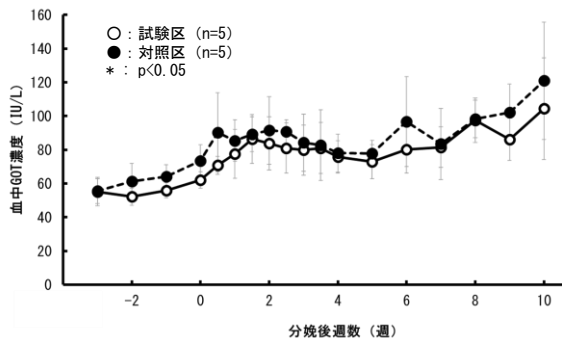


図 10 分娩前後の血中 GOT 濃度の推移

(6) ロール開封後抗酸化ビタミンの変化

稲 WCS のロールを開封後、抗酸化ビタミンである β カロテン、 α -トコフェロールともに時間経過によって減少したが、 β カロテンは特に顕著であった (図 11)。これは、 β カロテンが酸素や光により酸化分解されやすいためと考えられる。このことにより、開封後 2 日程度で給与しきることが望ましい。

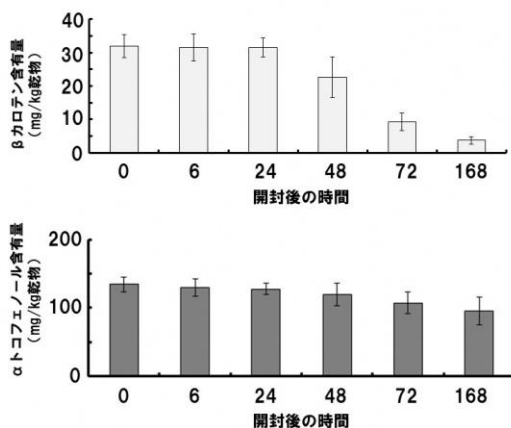


図 11. ロール開封後の抗酸化ビタミンの推移

(7) 飼料費

稲 WCS を給与した試験区の試験期間中における 1 日あたりの飼料費は、対照区に比べて平

均で 78.0 円が削減できた (図 12)。

また、粗飼料別の乾物 1kg 当たりの価格は、稲 WCS 1 ロールの価格を京都府内の一般的な価格である 1000 円としたところ、11.0 円と他の粗飼料に比べ最も低くなった (図 13)。ただし、この価格は戦略作物助成金を含む価格であり、含まない場合は 30.7 円となる。いずれの場合も、稲 WCS を利用することにより飼料費の軽減につながる事がわかった。

しかし、京都府では通年で稲 WCS を給与するほどの生産量はなく、季節給与を行っている農家が多いのが現状であるので、今後の稲 WCS の生産量増加が課題である。

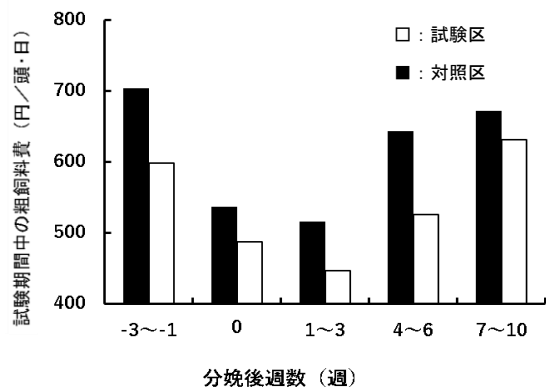


図 12 試験期間中の 1 日あたりの飼料費

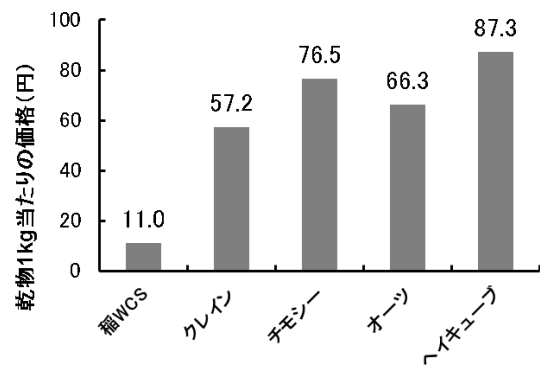


図 13 粗飼料乾物 1kg 当たりの価格

(8) 農家実証

当センターで行った試験と同様に、府内農家において稲 WCS を給与する実証を行ったところ、血中 α トコフェロール濃度が高い傾向を示したが、稲 WCS 給与の有無による有意差は見られなかった (図 14)。

これは、農家における稲 WCS 給与量が当センターでの試験よりも少ない 4~6kg(現物)/日であったため、有意差がでなかった可能性が考えられる。

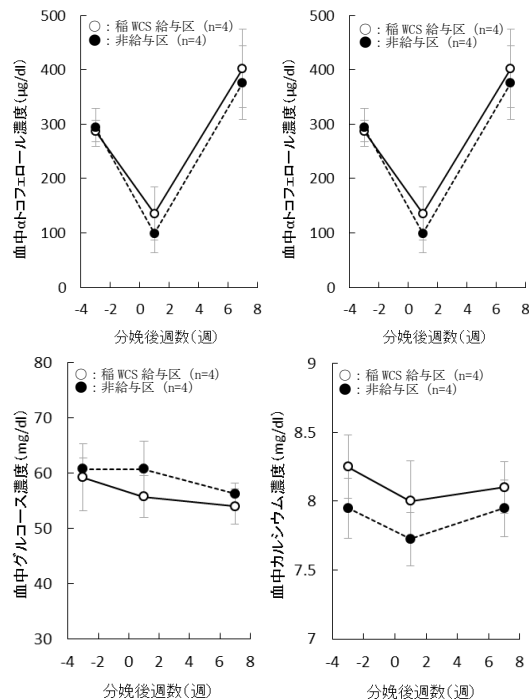


図 14 農家実証での血中成分の推移

主体とした乾乳期飼料の給与が分娩前後の乳牛に与える影響 岡山農総セ畜研報 4

- 11) 久枝啓一ら (2008) *Escherichia coli* による乳牛の甚急性乳房炎における血清中および乳清中サイトカインの動態と臨床症状 日本獣医師会雑誌 61 443-448
- 12) 久米新一ら(2011) 高泌乳牛の移行期の栄養管理と血液成分の関連性 畜産の研究 66: 1172-1180
- 13) U.Bernabucci (2002) Markers of Oxidative Status in Plasma and Erythrocytes of Transition Dairy Cows During Hot Season Journal of Dairy Science 85:2173-2179
- 14) 佐藤繁ら (2005) 乳牛における分娩前の血糖および遊離脂肪酸値と分娩後の負のエネルギーバランスの関係 家畜臨床誌 28(1): 1-6

引用及び参考文献

- 1) (一社) 家畜改良事業団「乳用牛群能力検定成績のまとめ」
- 2) 細田謙次 (2012) 畜産分野における酸化ストレス、抗酸化能の評価～アントシアニン高含有自給飼料の給与事例～ 自給飼料利用研究会
- 3) (一社) 日本草地畜産種子協会 (2015) 「稲発酵粗飼料生産・給与技術マニュアル第 6 版」
- 4) 自給飼料利用研究会編 (2009) 「粗飼料の品質評価ガイドブック三訂版」 (社) 日本草地畜産種子協会
- 5) 農研機構 (2007) 「家畜における生化学病性鑑定のための臨床生化学的検査マニュアル」
- 6) (独) 農業・食品産業技術総合研究機構編「日本標準飼料成分表 (2009 年版)」 (社) 中央畜産会
- 7) 京都大学大学院農学研究科応用生物科学専攻動物栄養科学分野 (2010) <http://www.jnutr.kais.kyoto-u.ac.jp/newpage15.html>
- 8) Bertics SJ, Effect of Prepartum Dry Matter Intake on Liver Triglyceride Concentration and Early Lactation, J Dairy Sci, 1992, 75: 1914-1922
- 9) 鈴木保宣 (2013) 乳牛の移行期の栄養管理と繁殖 日獣会誌 66: 689-695
- 10) 水上智秋・長尾伸一郎 (2014) イネ WCS を