

学位論文

乳牛の小腸における受動的なカルシウム吸収に及ぼす

オリゴ糖 Difructose anhydride III の効果研究

生物生産科学専攻

寺村 誠

## 目次

### 略語

|   |    |
|---|----|
| 第1章 緒言                                  | 1  |
| 1-1-1. 低カルシウム血症とは                       | 1  |
| 1-1-2. 乳牛のカルシウム代謝の特徴                    | 1  |
| 1-1-3. 低カルシウム血症の予防方法                    | 2  |
| 1-2-1. Difuctose anhydride (DFA) III とは | 4  |
| 1-2-2. Ca 吸収に対する DFAIII の効果 —齧歯類における知見— | 4  |
| 1-2-3. Ca 吸収に対する DFAIII の効果 —ウシにおける知見—  | 4  |
| 1-3. 研究の目的と内容                           | 4  |
| 第2章 乳牛における DFA III の Ca 吸収促進効果の確認       | 8  |
| 第1節 DFA III のウシ十二指腸への到達率                | 8  |
| 2-1-1. 目的                               | 8  |
| 2-1-2. 材料と方法                            | 8  |
| 2-1-3. 結果                               | 10 |
| 2-1-4. 考察                               | 11 |
| 2-1-5. 図および表                            | 12 |
| 第2節 DFA III によるウシ十二指腸における受動的な Ca 吸収の促進  | 14 |
| 2-2-1. 目的                               | 14 |
| 2-2-2. 材料と方法                            | 14 |
| 2-2-3. 結果                               | 15 |
| 2-2-4. 考察                               | 15 |
| 2-2-5. 図および表                            | 16 |
| 第3節 小括                                  | 18 |
| 第3章 分娩牛における DFAIII の給与効果の検討             | 19 |
| 第1節 DFAIII 給与が分娩後早期の Ca 代謝に及ぼす影響        | 19 |
| 3-1-1. 目的                               | 19 |
| 3-1-2. 材料と方法                            | 19 |

|  |    |
|--|----|
| 3-1-3. 結果  | 22 |
| 3-1-4. 考察  | 23 |
| 3-1-5. 図および表   | 25 |
| 第2節 分娩前後の DFA III 給与による低 Ca 血症予防および改善が分娩後のエネルギー充足、<br>卵巣機能回復ならびに子宮修復に及ぼす影響 | 32 |
| 3-2-1. 目的  | 32 |
| 3-2-2. 材料と方法   | 32 |
| 3-2-3. 結果  | 35 |
| 3-2-4. 考察  | 37 |
| 3-2-5. 図および表   | 39 |
| 第3節 小括   | 48 |
| 第4章 総合考察   | 49 |
| 謝辞   | 52 |
| 引用文献   | 53 |

## 略語

|                          |  |                       |
|--------------------------|--|-----------------------|
| 1,25-(OH) <sub>2</sub> D | 1,25-dihydroxyvitamin D                            | 活性型ビタミン D             |
| ADF                      | Acid detergent fiber                               | 酸性デタージェント繊維           |
| ADICP                    | Acid detergent insoluble crude protein             | 酸性デタージェント不溶蛋白質        |
| ADL                      | Acid detergent lignin                              | 酸性デタージェントリグニン         |
| BCS                      | Body condition score                               | ボディコンディションスコア         |
| BHBA                     | β-hydroxybutyrate                                  | βヒドロキシ酪酸              |
| Ca                       | Calcium  | カルシウム                 |
| CaBP9K                   | Calbindin-D9k                                      | カルシウム結合蛋白質            |
| Cl                       | Chlorine   | 塩素                    |
| Co                       | Cobalt   | コバルト                  |
| CP                       | Crude protein                                      | 粗蛋白質                  |
| DCAD                     | Dietary cation-anion difference                    | 飼料中陽イオン-陰イオン差         |
| DFA III                  | Difructose anhydride III                           | ダイフラクトースアンハイドライド III  |
| DM                       | Dry matter   | 乾物                    |
| DMI                      | Dry matter intake                                  | 乾物摂取量                 |
| EB                       | Energy balance                                     | エネルギーバランス             |
| EDTA                     | Ethylenediaminetetraacetic acid                    | エチレンジアミン四酢酸           |
| EE                       | Ether extract                                      | 粗脂肪                   |
| ELISA                    | Enzyme-linked immunosorbent assay                  | 酵素結合免疫吸着法             |
| FCM                      | Fat corrected milk                                 | 脂肪補正乳                 |
| HEPES                    | 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid | ヒドロキシエチルピペラジンエタンスルホン酸 |
| HPLC                     | High performance liquid chromatography             | 高速液体クロマトグラフィー         |
| ICP                      | Inductively Coupled Plasma                         | 誘導結合プラズマ              |
| IgG                      | Immunoglobulin G                                   | 免疫グロブリン G             |
| K                        | Potassium  | カリウム                  |
| Mg                       | Magnesium  | マグネシウム                |

|       |  |                    |
|-------|--|--------------------|
| MLCK  | Myosin light-chain kinase                  | ミオシン軽鎖キナーゼ         |
| N     | Nitrogen                                   | 窒素                 |
| Na    | Sodium                                     | ナトリウム              |
| NDF   | Neutral detergent fiber                    | 中性デタージェント繊維        |
| NDICP | Neutral detergent insoluble crude protein  | 中性デタージェント不溶蛋白質     |
| NEFA  | Nonesterified fatty acid                   | 遊離脂肪酸              |
| NEL   | Net energy for lactation                   | 正味エネルギー            |
| NFC   | Non fibrous carbohydrate                   | 非繊維性炭水化物           |
| NTX   | Type I collagen cross-linked N-telopeptide | I型コラーゲン架橋 N-テロペプチド |
| P     | Phosphorus                                 | リン                 |
| PTH   | Parathormone                               | 上皮小体ホルモン           |
| RIA   | Radioimmunoassay                           | 放射免疫測定             |
| S     | Sulfur                                     | 硫黄                 |
| SCK   | Subclinical ketosis                        | 潜在性ケトーシス           |
| TEER  | Transepithelial electrical resistance      | 経上皮電気抵抗            |
| TJ    | Tight junction                             | タイトジャンクション         |
| TMR   | Total mixed ration                         | 混合飼料               |

## 第 1 章

### 緒言

#### 1-1-1. 低カルシウム血症とは

乳牛における低カルシウム (Ca) 血症は、分娩に伴う泌乳再開による Ca 要求量の急激な増加に対し、Ca 恒常性維持機構が対応できずに血中 Ca 濃度が低下した状態である (DeGaris と Lean, 2009)。Ca は生体を維持する上で必須のミネラルであり、特に筋肉の収縮に関与することから、重度の低 Ca 血症 (乳熱) になると、骨格筋の機能障害による起立不能や循環障害、さらには意識障害を呈し死亡する場合もある。乳熱、すなわち低 Ca 血症に関する研究は 18 世紀末より 200 年以上にわたって研究され、発生メカニズムや予防方法が解明されてきたものの、起立不能など臨床症状を示さない潜在性の低 Ca 血症 (< 8.0 mg/dl) を含めると未だ経産牛の約 50 % で発生がみられる (Horst ら, 2003; Reinhardt ら, 2011)。潜在性低 Ca 血症は外見上異常なしと判断され易いが、難産や胎盤停滞、子宮炎、乳房炎、ケトーシス、第四胃変位など、血清 Ca 濃度低下による筋肉の収縮不全に起因する周産期疾病との関連も指摘されている (Curtis ら, 1983)。米国における乳熱の発生率は 5 ~ 10 % (Horst, 1986)、日本国内でも年間およそ 6 万頭が発症しており (農林水産省経営局保険課, 2015)、一症例当たりの損失は約 334 ドルと試算されているが (Horst ら, 1997)、上記の周産期疾病による間接的な経済損失を考慮すると、経営に与える影響はさらに大きいものと推察される。そのため、分娩後の低 Ca 血症をいかに予防するかが、移行期の乳牛の栄養管理における重要な課題の一つになっている。

#### 1-1-2. 乳牛のカルシウム代謝の特徴

血中 Ca 濃度低下の補填経路として、(1) 骨からの Ca 動員 (骨吸収)、(2) 飼料からの Ca 供給、(3) 尿細管からの Ca 再吸収の 3 経路存在する (NRC, 2001; Figure 1)。しかし分娩牛においては、尿 Ca 再吸収量は血中 Ca 濃度を回復させるには十分でなく (Goff, 2006)、また、骨からの Ca 動員は分娩後早期には抑制状態にあるとされ (Liesegang ら, 2000, 2007; Moreira ら, 2009; Taylor ら, 2009)、後述の陽イオン-陰イオン差 (DCAD) の低い飼料を給与した場合 (Kurosaki ら, 2007) を除き分娩後早期の Ca 恒常性維持機構は腸管からの Ca 吸収に依存するとされている (Ramberg ら, 1984)。

小腸における上皮細胞を介した Ca 吸収は経細胞経路 (Transcellular pathway) と細胞間隙経路 (Paracellular pathway) の 2 経路存在する (Bronner, 1998)。経細胞経路は代謝エネルギーを用いた能動輸送であり、Ca<sup>2+</sup>の細胞内輸送は十二指腸上部に多く存在する Ca 結合タンパク質 (CaBP9K) によるもので (Bronner ら, 1998)、それらの働きは 1,25-ジヒドロキシビタミン D [1,25-(OH)<sub>2</sub>D] に依存している。一方、年をとった牛ほど小腸上皮細胞の 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 受容体数は減少することから、加齢により経細胞吸収経路による Ca 吸

収能力は低下することが知られる (Horst ら, 1990)。また、単胃動物では CaBP9K が十二指腸や空腸、回腸だけでなく盲腸にも存在することが報告されている (Howard ら, 1993; Perret ら, 1985) が、乳牛では十二指腸のみに局在することが報告され (Yamagishi ら, 2002)、乳牛で低 Ca 血症が発生しやすい要因の一つと考えられる。一方、細胞間隙経路を介した Ca 吸収は  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度勾配を利用した受動拡散であるため (Bronner, 1987)、加齢による小腸上皮細胞のビタミン D 受容体数減少 (Horst ら, 1990) の影響を受けないと考えられる。ウシにおいては、経口的な Ca 給与を行い腸内容物のイオン化 Ca 濃度が 1 mM を超えた際に細胞間隙経路による Ca 吸収が有効となることが報告されている (Goff と Horst, 1993)。細胞間隙経路による Ca 吸収は、腸上皮細胞間隙に存在するタイトジャンクション (TJ) を介したものであり (Bronner, 1998)、TJ はタンパク質のような巨大分子に対してはきわめて厳しいバリアとして機能するが、無機イオンや水といった小分子は通しうる結合であることが知られる (Claude, 1978)。

### 1-1-3. 低カルシウム血症の予防方法

低 Ca 血症の主な予防方法として、以下の方法が提案されている (NRC, 2001)。

#### (1) 分娩前の Ca 給与量の制限

分娩前に Ca が 1 日 1 頭あたり 15 g 以下の飼料を 10 日間給与することで、分娩前から上皮小体ホルモン (PTH) の分泌を刺激し、骨からの Ca 動員および尿からの Ca 再吸収、腎臓における  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$  産生を活性化する (Boda と Cole, 1954; Goings ら, 1974; Green ら, 1981)。近年、Ca 吸着特性をもつゼオライト A (アルミノケイ酸塩) の分娩前の給与により、低 Ca 飼料給与と同等の効果が得られることも報告されている (Thilsing-Hansen ら, 2002; Thilsing ら, 2006)。

#### (2) 分娩時ならびに分娩後の経口 Ca 剤投与

消化管内の Ca 濃度を高め、細胞間隙経路を介した Ca 受動吸収を促進する (Goff と Horst, 1993; Goff, 2008)。分娩直後と分娩 24 時間後の Ca 量として 50~90 g の経口投与が最も効果的とされる (Goff, 2008, 2014)。

#### (3) 分娩前のビタミン D 給与もしくは筋肉内投与

分娩 10~14 日目のビタミン D 給与もしくは筋肉内投与による外因性ビタミン D 補給により、腸管における能動的な Ca 吸収を促進する (Hibbs と Pounden, 1955)。

#### (4) 陰イオン塩給与による DCAD 値の調節

乳牛が代謝性アルカローシスの状態になると、破骨細胞と腎臓の PTH 受容体の構造変化が起き、骨吸収と  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$  産生が減少する (Goff ら, 2014)。代謝性アルカロ

一シスの予防のための塩化物や硫酸塩など陰イオン塩の給与 (Block, 1984; Fredeen ら, 1988) は、破骨細胞と腎臓の PTH 受容体の反応性を向上させて骨からの Ca 動員および尿細管からの Ca 再吸収を活性化 (Goff ら, 1991, 2014)、血液 pH の低下によるイオン化 Ca 率の上昇をもたらす (Ching ら, 1989)。血液の pH をモニターする方法として尿 pH の測定が、飼料中の陰イオンと陽イオンのバランスの指標として DCAD 値 [meq/100 gDM:  $(\text{Na}^++\text{K}^+)-(\text{Cl}^-+\text{S}^{2-})$ ] により算出 (Ender ら, 1971)] が用いられる。乾乳後期の給与飼料の推奨 DCAD 値は  $-10\sim-15$  meq/100 gDM、尿 pH は 6.8 以下はとされてきたが (Shire と Beede, 2013)、近年  $-5\sim+5$  meq/100 gDM のマイルドな DCAD 値の調整でも有効であることが報告されている (Kurosaki ら, 2007; Penner ら, 2008)。

#### (5) Difructose anhydride (DFA) III の給与

DFA III (di-D-fructofuranose-1,2':2,3'-dianhydride; Figure 2) は、フラクトース 2 分子が結合した難消化性オリゴ糖で、ラットの小腸を用いた *in vitro* 試験において小腸の細胞間隙経路による Ca 吸収促進が確認されている (Suzuki ら, 1998; Mineo ら, 2002)。乾乳後期乳牛への DFA III 給与により、分娩時の血清 Ca 濃度の低下を予防し (佐藤ら, 2007a)、周産期疾病発症率を低減することが報告されている (佐藤ら, 2007b)。

しかし、(1)Ca 給与量の制限については効果的な低 Ca 含有飼料の調整はほとんど不可能であること (NRC, 2001)、(2) 経口 Ca 剤投与については臨床症状を呈する可能性のある症例では腸管の運動が抑制されているため Ca の吸収率が著しく低下しており、十分な効果が得られないこと (Nurmio, 1972)、(3) 外因性ビタミン D 投与については効果的な分娩前のビタミン D 投与量が中毒域に近く、軟部組織の不可逆的な石灰沈着を引き起こす危険性があること (Goff と Horst, 1990; NRC, 2001)、(4) DCAD 値調整については調整に用いる陰イオン塩の嗜好性が低く (Charbonneau ら, 2006)、個々の牛の尿 pH 確認のための採尿にも大きな労力を要するなど課題は多い。また、様々な予防方法が提案された現在においても、経産牛のおよそ 50% は分娩後に潜在性低 Ca 血症 (血清 Ca 濃度:  $<8$  mg/dl) となっており (Reinhardt ら, 2011)、より簡便で効果的な低 Ca 血症予防方法が求められている。(5) DFA III の給与については加齢による Ca 吸収能力低下の影響 (Horst ら, 1990) を受けない小腸の細胞間隙経路における Ca 吸収を促進するため、幅広い乳牛で効果が期待できる可能性があるが、ウシにおける症例報告はまだ少なく、十分に普及に至っていない (八木沢ら, 2012)。

### 1-2-1. Difructose anhydride (DFA) III とは

DFA III は、チコリなどに含まれるイヌリンをフラクトシルトランスフェラーゼ処理することにより生産される (Sakurai ら, 1997; Saito と Tomita, 2000; Kikuchi ら, 2004)。DFA III の分解には、DFA III 加水分解酵素による  $\alpha$ -(2→3)フラクトシド結合の分解が必要となるため (Sakurai ら, 1997)、ビフィズス菌や乳酸菌など主要な腸内細菌に資化されない特徴を持つ (Minamida ら, 2006)。

### 1-2-2. Ca 吸収に対する DFAIII の効果 —齧歯類における知見—

齧歯類 (ラット) の小腸を用いた *in vitro* 試験において、DFA III は TJ を介した細胞間隙経路による Ca 吸収の促進が確認されている (Suzuki ら, 1998; Mineo ら, 2002)。Caco-2 細胞を用いた試験により、DFA III は TJ 構成タンパク質であるクローデイン-1 とアクチンフィラメントの局在性を変化させ、経上皮電気伝導度 (TEER) を低減することにより (Suzuki と Hara, 2006)、細胞間吸収マーカーの運搬を高めることが報告されている (Suzuki と Hara, 2004, 2006)。しかし、DFA III による TEER の低減は、一般に知られる TEER を低減させる酵素阻害因子では効果が弱められることはなく、DFA III の効果はそれら以外の機序により発現していると考えられている (Suzuki と Hara, 2006)。

### 1-2-3. Ca 吸収に対する DFAIII の効果 —ウシにおける知見—

DFA III は、乳牛のルーメン微生物に分解されにくい (佐藤ら, 2006)。それゆえ、経口投与した DFA III は給与 1 時間後には十二指腸から DFA III として検出され (中井ら, 2007)、乾乳後期の DFA III 給与は分娩時の血清 Ca 濃度の低下を予防 (佐藤ら, 2007a)、周産期疾病の発症率を低減することが報告されている (佐藤ら, 2007b)。加えて、出生子牛に対する DFA III 給与は初乳からの免疫グロブリン G (IgG) 吸収を高め (Sato ら, 2012)、子牛の健康状態を改善すること (Matsumoto ら, 2009; Takagi ら, 2011) も報告されている。

## 1-3. 研究の目的と内容

前述のとおり、現状の低 Ca 血症予防方法は課題も多く、十分な効果が得られているとは言えない。また、DFAIII の Ca 吸収に対する効果は、これまで乳牛では積極的に活用されてこなかった Ca 吸収経路を介したものであり、新たな低 Ca 血症予防方法になる可能性が期待されるものの、乳牛における DFA III の給与効果は、ウシではなく齧歯類における知見の引用となっている部分が多く、未だ不明な点も多い。これらの背景を踏まえ本研究では乳牛に対する DFA III の給与効果を明らかにすることを目的に、1) 乳牛における DFA III の Ca 吸収促進効果の確認、2) 分娩前後における乳牛への DFAIII の給与効果の検討を行った。

第 1 の課題については、DFA III の乳牛十二指腸への到達率 (第 2 章第 1 節) およびウ

十二指腸における受動的な Ca 吸収に及ぼす影響（第 2 章第 2 節）の検討を行った。

第 2 の課題である分娩牛における DFA III の給与効果の検討については、実際に分娩牛を用いた給与試験を行い、分娩後早期の血中 Ca 濃度に及ぼす影響ならびに、血中 Ca 濃度が低下した際に機能しうる各補填経路、すなわち(1) 骨からの動員ならびに(2) 腸管からの能動的な吸収の状況を調査することで、DFAIII の腸管からの受動的な Ca 吸収促進効果について検討した（第 3 章第 1 節）。さらに低 Ca 血症の改善は、飼料採食量や乳量、エネルギーバランス、卵巣機能回復ならびに子宮修復に良い影響を及ぼすと考えられることから、それらについて検討した（第 3 章第 2 節）。

1-4. 図および表

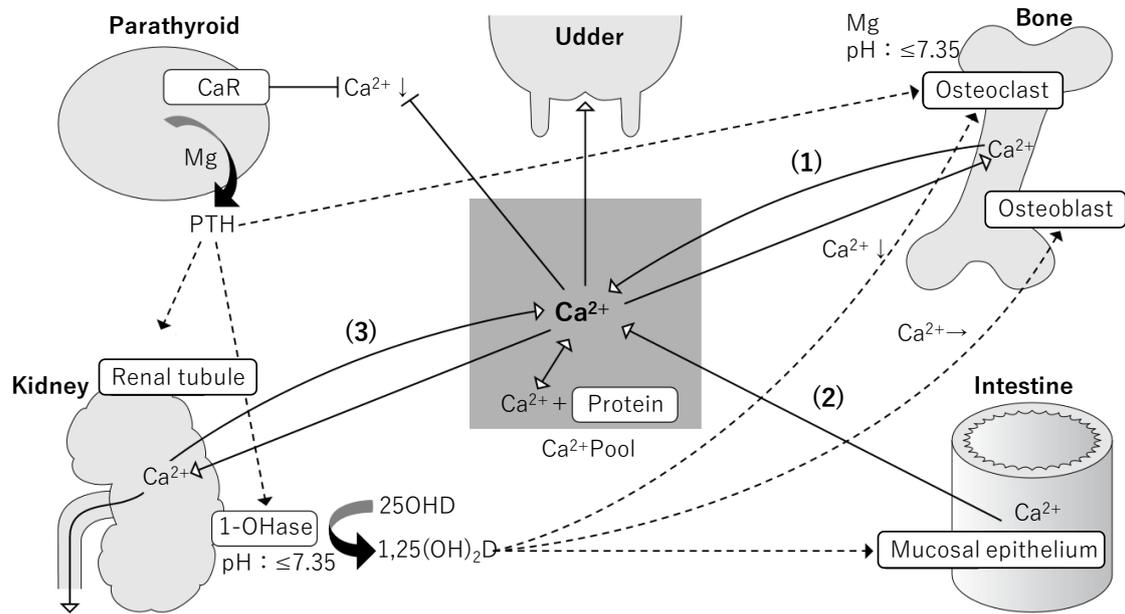


Figure 1. Schematic of Ca metabolic control in dairy cows (modified from Yamagishi, 2012).

1-OHase: 1 $\alpha$ -hydroxylase, 25OHD: 25-hydroxyvitamin D, 1,25(OH)<sub>2</sub>D: 1,25-dihydroxyvitamin D, CaR: calcium sensing receptor.

Three routes exist by which to recover reduced serum Ca levels: (1) resorption of Ca stored in bones (bone resorption), (2) dietary provision of Ca, and (3) reabsorption by the renal tubules (NRC, 2001). However, in parturient cows, the total amount of Ca that can be recovered and the extent of urinary Ca excretion are relatively small (Goff, 2006), and Ca homeostasis has been reported to depend on intestinal Ca absorption immediately after calving because bone resorption is delayed for 1 wk or more following calving (Ramberg et al., 1984) unless cows are fed a low-DCAD diet (Kurosaki et al., 2007).

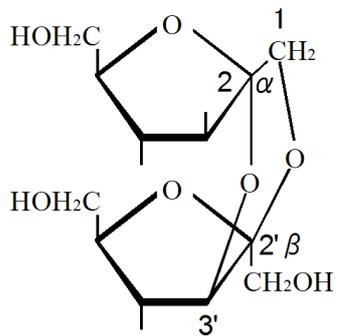


Figure 2. Structural formula of difructose anhydride III produced from inulin with *Arthrobacter* sp. H65-7 inulin fructotransferase (EC 2.4.1.93).

## 第2章

### 乳牛における DFA III の Ca 吸収促進効果の確認

#### 第1節

##### DFA III のウシ十二指腸への到達率

###### 2-1-1. 目的

DFA III は、齧歯類において小腸の細胞間隙経路による濃度勾配を利用した Ca 吸収を促進することが報告されている (Suzuki ら, 1998; Mineo ら, 2002)。また、ウシにおいて DFA III はルーメン内微生物に分解されにくく (佐藤ら, 2006)、経口投与した DFA III は速やかに Ca の主要な吸収部位である十二指腸に DFA III のまま到達すること (中井ら, 2007) が報告されている。これらの報告から、DFA III は反芻動物であるウシにおいても、ラット同様に十二指腸に到達し、細胞間隙経路からの Ca 吸収を促進する可能性がある。しかし、実際にウシに給与した DFA III がどの程度の割合で十二指腸に到達しているのかは明らかでない。そこで、十二指腸カニューレ装着牛を用いた *in vivo* 試験により、DFA III の十二指腸到達率を明らかにすることを目的とした。

###### 2-1-2. 材料と方法

###### 1) 試験方法

ルーメンフィステルおよび十二指腸カニューレを装着したホルスタイン種乾乳牛 3 頭 (7.2±1.2 歳齢、673±15 kg) を用い、1 期 7 日間 (試料採取期間 3 日間、ウォッシュアウト期間 4 日間) の 3×3 ラテン方格法で行った。

供試牛は個別のタイストール牛舎に係留し、コーンサイレージ 6.5 kgDM、乾草 4.5 kgDM、市販配合飼料 1.7 kgDM を毎日 10:00 に給与した。DFA III (日本甜菜製糖株式会社, 東京) は、蒸留水 500 ml にスクロース 100 g (DFA0)、DFA III 50 g とスクロース 50 g (DFA50)、DFA III 100 g (DFA100) をそれぞれ溶解し、各試験期 1 日目の 10:00 にルーメンフィステルから投与した。また、同時に液相マーカーとしてコバルト EDTA (Co-EDTA·4H<sub>2</sub>O; Udén ら, 1980) を 16 g (Co として 2 g) 添加した。ルーメン内溶液および十二指腸内容液、直腸糞は各試験期 1 日目の飼料給与前 (0 時間後) および 1、2、4、6、8、10、12、18、24、36、48、54、60、72 時間後に採取した。ルーメン内溶液は 4 重ガーゼでろ過した後、6 M 塩酸をサンプル 100 ml につき 1 ml 添加し -20℃ で Co 含量の分析まで凍結保存した。十二指腸内溶液および直腸糞はそのまま Co および DFA III の分析まで -20℃ で凍結保存した。

## 2) 分析方法

DFA III 濃度の分析は Minamida ら (2006) および中井ら (2007) の方法に準じ HPLC により行なった。本測定方法における DFA III の検出限界は 10 µg/ml であった。Co 濃度の分析は、ICP 発光分光分析装置 (ICPE-9000; 島津製作所, 京都) を用いて行った。サンプルの前処理は、十二指腸内溶液は原物のまま、糞は 60°C で 72 時間通風乾燥し、目開き 1 mm のカッティングミル (SM2000; Retsch GmbH, ドイツ) で粉碎したものをを用いた。

## 3) 計算方法

ルーメンからの液相流出率は Yang ら (2001) の式に則り算出した。ルーメン内容液量はルーメン内容液 Co 濃度の推移による近似式の切片 (C0) から逆算し、ルーメン内容液の流出速度を求めた (Koeing ら, 2002)。DFA III の十二指腸および糞到達率は、下記の式により算出した [Ray ら (2013) の式を改変]。

- DFA III の十二指腸(糞)到達率(%)

$$= \left[ \frac{\text{Co 給与量(g)}}{\text{十二指腸内容液(糞)Co 回収量(g)}} \times \frac{\text{十二指腸内容液(糞)DFA III 回収量(g)}}{\text{DFA III 給与量(g)}} \right] \times 100$$

- 十二指腸内容液 DFA III(Co)回収量(g)

$$= \left( \frac{1}{1,000} \right) \times \sum [\text{十二指腸内容液採取量(ml)} \times \text{十二指腸内容液 DFA III(Co)濃度(mM} \\ \text{/分子量/1,000)}]$$

- 糞 DFA III(Co)回収量(g)

$$= \sum [\text{糞採取量(g)} \times \text{糞 DFA III(Co)濃度(mmol/g/分子量/1000)}]$$

## 2) 統計処理

すべてのデータは R 3.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いて統計処理した。ルーメン内容液量およびルーメン流出量、液相流出速度、DFA III の十二指腸ならびに糞への到達率は、固定効果を処理区、ランダム効果を供試牛および試験期とした線形混合効果モデル (lmarTest package) で近似し、平均値の比較を Tukey test で行った。十二指腸内溶液および糞の DFA III 濃度と Co 濃度は Pearson の相関係数により相関性を検討した。危険率 5%未満を有意差ありとした。

### 2-1-3. 結果

DFA III は、DFA50、DFA100 とともに投与 1 時間後に十二指腸内溶液から検出され、投与 4 時間後に最も高い DFA III 濃度となり、その濃度は容量依存的であった (Figure 3-c)。また、十二指腸内溶液の DFA III 濃度と液相マーカーとして投与した Co の十二指腸内容液濃度は非常に強い正の相関関係 (DFA50 :  $r = 0.91$ ,  $P < 0.01$ 、DFA100 :  $r = 0.93$ ,  $P < 0.01$ ) にあった。

糞中の DFA III は、DFA50、DFA100 とともに投与 10 時間後から検出された。その後、両区とも投与 18 時間後に最大濃度となり、投与後 36 時間後にはすべての牛で検出限界以下となった (Figure 2-e)。同様に Co も投与 10 時間後から糞中 Co 濃度が増加し、投与 18 時間後に最大となり、投与 72 時間後に投与前と同程度となった (Figure 3-d)。糞中の DFA III 濃度 Co 濃度の関係は、DFA50 ( $r = 0.65$ ,  $P < 0.01$ )、DFA100 ( $r = 0.78$ ,  $P < 0.01$ ) とともに正の相関関係にあった。投与した DFA III の十二指腸到達率は、DFA50 で  $69.1 \pm 7.0\%$ 、DFA100 で  $67.9 \pm 5.6\%$  であった (Table 1)。また、DFA III の糞中排出率は DFA50 で  $8.7 \pm 2.2\%$ 、DFA100 で  $15.3 \pm 4.5\%$  であった (Table 1)。

#### 2-1-4. 考察

齧歯類において、DFA III やフラクトオリゴ糖、ラフィノースなどの難消化性オリゴ糖は、腸管での Ca 吸収を促進する効果が報告されている (Suzuki ら, 1998)。この効果は、オリゴ糖が腸管上皮細胞間隙に存在する TJ を構成するタンパク質クローディン-1 に作用し (Suzuki と Hara, 2006)、TEER を低下させることによるとされ (Suzuki と Hara, 2004)、特に DFA III で効果が高いことが報告されている (Suzuki と Hara, 2004)。一方、ウシは活発な微生物発酵が行なわれる反芻胃をもつため、単胃動物で有効な物質であっても同様の効果が得られないことが多い (佐藤ら, 2006)。DFA III が齧歯類同様に腸管における Ca 吸収促進効果を持つためには、反芻胃内微生物に分解されずに主要な Ca 吸収部位である十二指腸に DFA III のまま到達することが必要不可欠と考えられる。

反芻胃に投与した DFA III は投与後 1 時間後より DFA III の状態で十二指腸内溶液から検出され、この結果は中井ら (2007) の報告と一致した。また、十二指腸内溶液の DFA III 濃度の推移が、液相マーカーとして投与した Co の推移と非常に高い相関関係がみられたことから、反芻胃内に給与した DFA III は速やかに液相に溶解し、Seo ら (2007) の示した液相のルーメン流出速度 11~20%/時間と同様、非常に速い通過速度でルーメンから十二指腸へ流出したと考えられた。今回、DFA50、DFA100 とともに、投与した DFA III の約 70% が主要な Ca 吸収部位である十二指腸に到達する結果が得られたが、DFA III のルーメン内微生物に非常に分解されにくい (Sakurai ら, 1997; 佐藤ら, 2006) 特徴に加え、ルーメンからの流出速度の速さが DFA III の高い十二指腸到達率をもたらしている可能性が高いと考えられた。以上のことから、ウシにおいても齧歯類同様に DFA III による十二指腸上皮細胞間隙における細胞間隙経路からの Ca 吸収促進が期待された。

一方、DFA III の糞中排出率は DFA50、DFA100 とともに約 10% と非常に低く、十二指腸を通過した DFA III は十二指腸以降の消化管において何らかの微生物による分解を受けたと考えられた。齧歯類において、DFA III は腸内細菌 *Ruminococcus productus* により分解され (Minamida ら, 2005)、分解で生じた有機酸がミネラルのイオン化率を高めることで、大腸におけるミネラル吸収を促進することが報告されている (Suzuki ら, 1998)。本試験においては、十二指腸以降における DFA III 分解菌の特定およびミネラル吸収促進効果についての調査は行なっておらず、今後検討が必要である。また、長期間のウシへの DFA III 給与により、反芻胃内微生物が DFA III 分解能を獲得するのかについても、今後検討が必要と考えられる。

以上の結果より、本節では、乳牛における DFA III の十二指腸への到達率の検討を行った。その結果、乳牛に投与した DFA III は DFA III のまま十二指腸に到達し、その到達率は約 70% であることを確認した。

2-1-5. 図および表

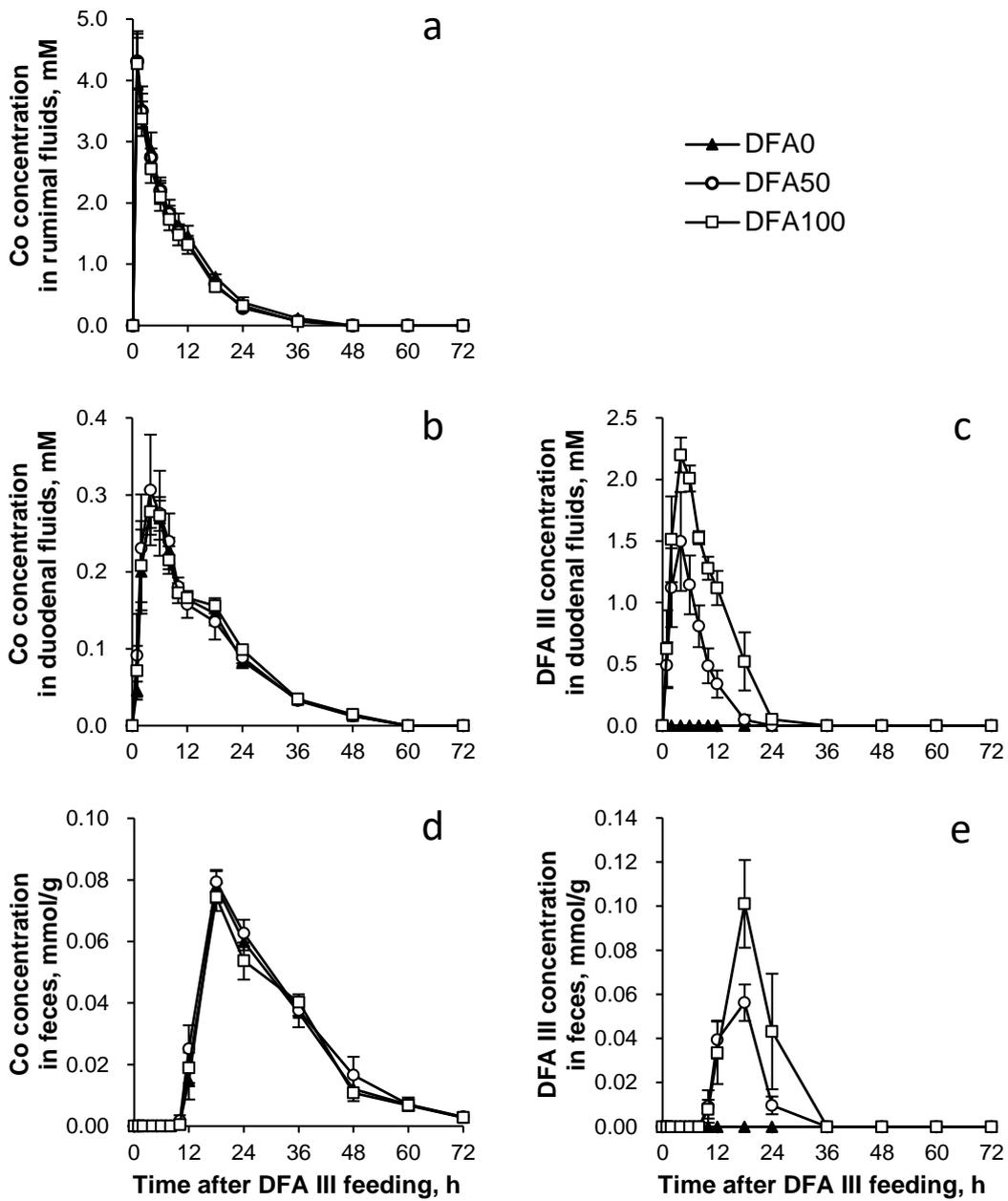


Figure 3. Difructose anhydride (DFA) III and cobalt (Co) concentrations in ruminal and duodenal fluid and feces of cows after being fed 0 g (DFA0, ▲; n = 3), 50 g (DFA50, ○; n = 3), or 100 g (DFA100, □; n = 3) of DFA III. (a) Co concentration in ruminal fluid; (b) DFA III concentration in duodenal fluid; (c) Co concentration in duodenal fluid; (d) DFA III concentration in feces; (e) Co concentration in feces. The vertical bars represent standard errors of the means.

Table 1. Ruminal passage and percentage of difructose anhydride III (DFA III) in cows

| Item                                  | Treatment <sup>1</sup> |                         |                         |
|---------------------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                                       | DFA0                   | DFA50                   | DFA100                  |
| <b>Intake</b>                         |                        |                         |                         |
| Co, g                                 | 2.0 ± 0.0              | 2.0 ± 0.0               | 2.0 ± 0.0               |
| DFA III, g                            | 0.0 ± 0.0              | 50.0 ± 0.0              | 100.0 ± 0.0             |
| <b>Rumen</b>                          |                        |                         |                         |
| C0 <sup>2</sup> , mM                  | 4.4 ± 0.5              | 4.4 ± 0.4               | 4.2 ± 0.4               |
| Ruminal fluid volume <sup>3</sup> , L | 80.5 ± 10.7            | 78.1 ± 7.8              | 81.7 ± 8.0              |
| Ruminal flow rate <sup>4</sup> , L/h  | 7.6 ± 0.8              | 8.1 ± 0.6               | 8.4 ± 1.0               |
| <b>Rate of passage from the rumen</b> |                        |                         |                         |
| Liquid passage <sup>4</sup> , %/h     | 9.6 ± 0.7              | 10.4 ± 0.2              | 10.2 ± 0.3              |
| <b>Duodenum</b>                       |                        |                         |                         |
| Co recovery, mg                       | 10.0 ± 0.9             | 10.7 ± 1.8              | 10.4 ± 1.1              |
| DFA III recovery, mg                  | 0.0 ± 0.0              | 192.5 ± 45.9            | 351.7 ± 25.4            |
| DFA III appearance <sup>5</sup> , %   | 0.0 ± 0.0 <sup>a</sup> | 69.1 ± 7.0 <sup>b</sup> | 67.9 ± 5.6 <sup>b</sup> |
| <b>Feces</b>                          |                        |                         |                         |
| Co recovery, mg                       | 160.8 ± 2.6            | 175.5 ± 8.3             | 158.9 ± 7.9             |
| DFA III recovery, mg                  | 0.0 ± 0.0              | 370.7 ± 77.4            | 601.6 ± 170.7           |
| DFA III appearance <sup>5</sup> , %   | 0.0 ± 0.0 <sup>a</sup> | 8.7 ± 2.2 <sup>ab</sup> | 15.3 ± 4.5 <sup>b</sup> |

<sup>a,b</sup> Means within a row with different superscripts differ significantly (P < 0.05).

<sup>1</sup> Cows were fed DFA III (Nippon Beet Sugar Mfg. Co. Ltd., Tokyo, Japan) via the ruminal cannula as 100 g of sucrose dissolved in 500 mL of water (DFA0; control), 50 g of DFA III and 50 g of sucrose dissolved in 500 mL of water (DFA50), or 100 g of DFA III dissolved in 500 mL of water (DFA100) at 1000 h on the first day of each experimental period.

<sup>2</sup> C0 = Co concentration in the rumen at 0 h after Co feeding (Yang et al., 2001).

<sup>3</sup> Calculated by dividing the Co dose by C0 (Koenig et al., 2002).

<sup>4</sup> Estimated by multiplying by the rate of passage of liquid from the rumen and the ruminal fluid volume (Koenig et al., 2002).

<sup>5</sup> Calculated using a formula modified from Ray et al. (2013).

## 第 2 節

### DFA III によるウシ十二指腸における受動的な Ca 吸収の促進

#### 2-2-1. 目的

DFA III の十二指腸への到達率を検討した前節の結果から、乳牛に投与した DFA III の約 70 %が主要な Ca 吸収部位である十二指腸に到達していることが示唆された。乳牛における DFAIII の Ca 吸収促進効果を確認するためには、さらにウシの十二指腸に到達した DFA III が齧歯類同様に細胞間隙経路からの Ca 吸収を促進するのかを明らかにする必要がある。そこで本節では、十二指腸に到達した DFA III の動態を検討するモデルとして、ウシの十二指腸標本を用いた *in vitro* 試験を実施した。そして、十二指腸における DFA III の Ca 吸収促進効果を検討した。

#### 2-2-2. 材料と方法

##### 1) 試験方法

ウシの十二指腸標本を用いた *in vitro* 試験は、Kozakai ら (1999) の方法に準じて行った。

と殺直後のウシ 7 頭 (ホルスタイン種 6 頭、黒毛和種 1 頭、30±14 ヶ月齢) の十二指腸を 1 本 10 cm の長さで 2 本採取し、脂肪を除去した後、反転腸管を作製した。漿膜側に緩衝液 (pH 7.4、20 mM HEPES、125 mM NaCl、4 mM KCl、10 mM グルコース) を 10 ml 注入し、両端を木綿糸で結紮して袋状にした。それらを粘膜側緩衝液 (pH 7.4、20 mM HEPES、125 mM NaCl、4 mM KCl、10 mM グルコース、10 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O) に浸漬し、100 %酸素を通気し 37°C で 60 分培養した (対照区)。DFA 区の粘膜側緩衝液には DFA III を 1 mM 添加し、同様に培養した。

培養後、漿膜側緩衝液中の Ca 濃度を分析し (Calcium-E test; 和光純薬工業株式会社、大阪)、漿膜側緩衝液の Ca 濃度を測定した。測定間および測定内の変動係数はそれぞれ 1.04、0.35 %であった。

##### 2) 統計処理

すべてのデータは R 3.1.2 (R Foundation for Statistical Computing, Austria) を用いて統計処理した。漿膜側緩衝液の Ca 濃度を十二指腸における Ca 吸収量とし、処理間で Paired t-test により比較した。危険率 5 %未満を有意差ありとした。

### 2-2-3. 結果

十二指腸における Ca 吸収量を Figure 4 に示した。DFA 区の Ca 吸収量は、対照区に比べ有意に増加した (DFA 区:  $803 \pm 161$  nmol/cm, 対照区:  $456 \pm 74$  nmol/cm;  $P < 0.05$ ; Figure 4)。

### 2-2-4. 考察

小腸における Ca 吸収は経細胞経路と細胞間隙経路の 2 経路存在する (Bronner, 1998)。それぞれの吸収経路の特徴として、細胞間隙経路は  $\text{Ca}^{2+}$  の濃度勾配を利用した受動拡散であるため (Bronner, 1987)、腸管内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度が高いほど Ca 吸収量は直線的に増加するのに対し、経細胞経路は血清 Ca 濃度の低下に対応するため、腸管内の  $\text{Ca}^{2+}$  濃度の高まりの中で一定となる (Pansu ら, 1981; Figure 5)。本試験における粘膜側 Ca 濃度は 10 mM で、標準的なウシの血中 Ca 濃度 (2.2~2.5 mM; NRC, 2001) や反転腸管法における Ca 吸収のミカエリス定数 (0.35 mM; Bronner, 1987) に比べ非常に高濃度であったことから、経細胞経路からの Ca 吸収は一定であったと考えられた (Kishi ら, 1996; Suzuki ら, 1998)。つまり、本試験条件においては細胞間隙経路が主要な Ca 吸収経路であったと考えられ、今回得られた結果は、DFA III はウシにおいてもヒトやラットでの報告と同様、細胞間隙経路からの Ca 吸収を促進する効果を持つことを示唆している。

本節では、DFA III のウシ十二指腸における Ca 吸収促進効果を明らかにするため検討を行った。その結果、粘膜側溶液に DFA III 1 mM を添加した条件下における Ca 吸収量の有意な増加を確認した。

2-2-5. 図および表

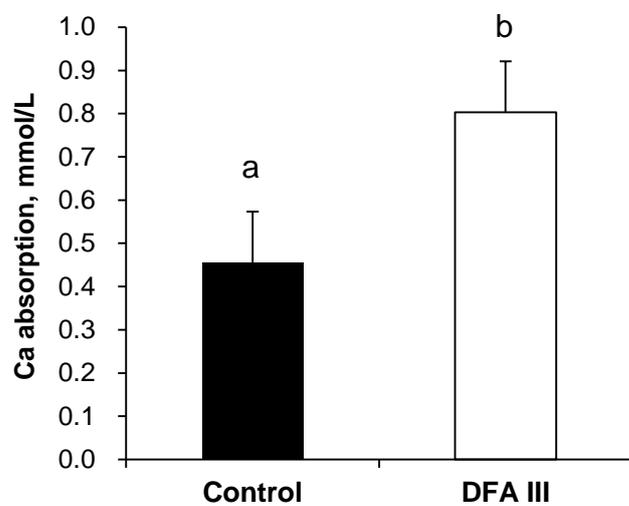


Figure 4. Calcium absorption by everted sacs made from the duodenum (means  $\pm$  SEM; nmol/L). DFA III = 1 mM of difructose anhydride III in artificial mucosal fluid. Letters a and b indicate statistically significant differences ( $P < 0.05$ ) between the results of the treatments.

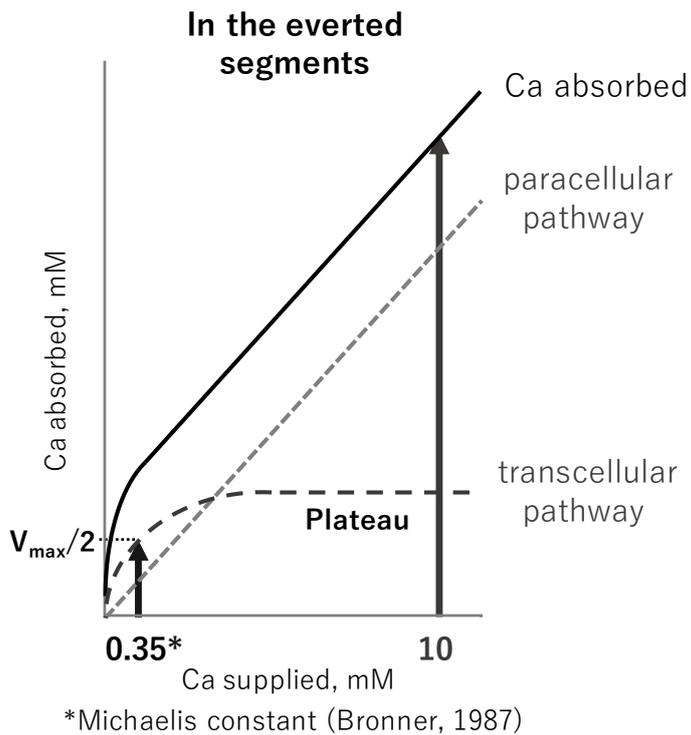


Figure 5. The details of Ca absorption in the everted segments (modified from Pansu, 1981). In this study, the differences in Ca absorption via the transcellular pathway in both treatments were not considered. Because the Ca concentration in the artificial mucosal fluid used in this experiment was 10 mM, which is higher than the Michaelis constant for the saturable transfer of Ca in the everted segments (0.35 mM; Bronner, 1987), the increases in Ca absorption found in this study likely involved changes in the passive paracellular diffusion of Ca in the intestinal mucosa (Kishi et al., 1996).

### 第3節

#### 小括

本章では、乳牛における DFA III の Ca 吸収促進効果を確認するため、乳牛に投与した DFA III の約 70%が DFA III のまま十二指腸に到達すること、十二指腸に到達した DFA III はウシにおいても齧歯類同様に十二指腸上皮細胞間隙における細胞間隙経路からの受動的な Ca 吸収を促進する可能性があることを示唆した。

## 第3章

### 分娩前後における乳牛への DFA III の給与効果の検討

#### 第1節

#### DFA III 給与が分娩後早期の Ca 代謝に及ぼす影響

##### 3-1-1. 目的

第2章において、乳牛に投与した DFA III の約 70 %が DFA III のまま十二指腸に到達し、ウシ十二指腸においても齧歯類同様 Ca 吸収を促進することが示唆された。このことから、分娩前後の乳牛への DFA III 給与は、加齢による小腸上皮細胞の 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 受容体数の減少 (Horst ら, 1990)、すなわち小腸における Ca 能動吸収能力の低下の影響を受けない Ca 吸収経路である細胞間隙経路における Ca 受動吸収を促進する可能性が高い。しかし、分娩前後の乳牛において DFA III の腸管からの Ca 受動吸収の促進を示した報告はない。そこで本節では、分娩前後の血中ミネラル濃度および Ca 代謝に関わるホルモン、骨からの Ca 動員を示す骨代謝マーカーの調査により、分娩牛への DFA III 給与が Ca 代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

##### 3-1-2. 材料と方法

試験は、2012年10月から2014年4月にわたり帯広畜産大学畜産フィールド科学センターにおいて実施した。試験方法は帯広畜産大学動物実験等に関する規定に則り、帯広畜産大学動物実験委員会の承認の下実施した (承認番号: 25-20, 26-9)。

##### 1) 供試動物

分娩予定 21 日目のホルスタイン種経産乾乳牛 74 頭を産次数および体重が等しくなるように対照群と DFA 群の 2 群 (各 37 頭) に分けた。対照群と DFA 群の各種条件は以下の通りである [分娩後産次数:  $3.7 \pm 0.3$ 、 $3.7 \pm 0.3$ 、分娩予定 21 日目の体重:  $771 \pm 12$  kg、 $768 \pm 10$  kg、分娩予定 21 日目のボディコンディションスコア (BCS; Edmonson ら, 1989):  $3.51 \pm 0.02$ 、 $3.54 \pm 0.02$ 、前泌乳期の 305 日乳量:  $9,465 \pm 228$  kg、 $9,690 \pm 270$  kg]。試験牛は分娩予定 21 日前から分娩までセンター内のドアフィーダー設置フリーストール試験牛舎、分娩後 1 週間は分娩房およびセンター内のタイストール牛舎で飼養し、水とミネラルブロック (KNZ salt licks; Hengelo, オランダ) は自由に摂取できるようにした。給与飼料は、分娩まで乾乳牛用 TMR を乾物で  $10.9 \pm 0.1$  kg/日とイネ科乾草の飽食とした (Table 2)。分娩後は、乳量 35 kg 設計 (NRC, 2001) の泌乳牛用 TMR とイネ科乾草の飽食とした (Table 2)。分娩予定 14 日前から分娩 6 日後まで DFA 群には DFA III (日本甜菜製糖株式会社, 東京) を 20 %含むペレットを 200 g/日、対照群には DFA III を含まないペレットを 160 g/日給与した (Table 2)。すなわち、DFA 群にのみ 40 g/日の DFA III を給与した。分娩直後と

分娩 12 時間後に、Ca 補給を目的にリン酸 Ca を 200 g (Ca として 46 g) 経口投与し、分娩後 6 日間はリン酸 Ca を 100 g/日 (Ca として 23 g) をトップドレスで給与した。

## 2) データおよびサンプル採取

飼料給与量と残飼量は分娩 14 日前から分娩 6 日後まで毎日計測した。飼料サンプルは月 1 回採取した。残飼は毎日採取し、成分分析は週毎に行った。飼料サンプルは通風乾燥器で 60°C・24 時間乾燥し、1 mm の目を通るように粉碎し (SM2000; Retsch, ドイツ)、乾物 (DM)、粗蛋白質 (CP)、中性デタージェント繊維 (NDF)、酸性デタージェント繊維 (ADF)、中性デタージェント不溶蛋白質 (NDICP)、酸性デタージェント不溶蛋白質 (ADICP)、酸性デタージェントリグニン (ADL)、粗脂肪 (EE)、灰分、Ca、リン (P)、マグネシウム (Mg)、カリウム (K)、ナトリウム (Na)、硫黄 (S)、塩素 (Cl) の分析を行った (Table 3)。N 含量はケルダール法によって定量し、6.25 を乗じて CP とした (AOAC, 2003; 984.13)。NDF は Van Soest ら (1991) の方法に準じ、 $\alpha$  アミラーゼと亜硫酸ナトリウムを用いて分析した。ADF は AOAC (2003; 973.18) に準じて分析した。NDICP と ADICP は Coblenz ら (2010) と同様の方法で分析した。ADL は AOAC (2003; 973.18) に準じて分析した。EE は AOAC (2003; 920.39) に準じて分析した。灰分は 600°C 2 時間灰化し分析した (AOAC, 2003; 942.05)。Ca と P、Mg、K、Na は 600°C・2 時間灰化した残渣を塩酸で再溶解し、ICP 発光分光分析法 (ICPE-9000; 島津製作所, 京都) で分析した (AOAC, 2003; 985.01)。S と Cl は蛍光 X 線分析法 (JSX-3100RII; 日本電子株式会社, 東京) を用い分析した。DCAD 値 (meq/100gDM) は  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + \text{S}^{2-})$  で求めた (Ender ら, 1971)。NE<sub>L</sub> 含量は維持要求量の 3 倍と仮定した (NRC, 2001)。1 日のミネラル摂取量は、乾物摂取量 (乾物給与量と乾物残飼料の差) と飼料中各ミネラル含量を乗じて算出した。

血液サンプルは分娩 21、14、7、3、1 日前と、分娩 0 (直後)、6、12、24、48、72 時間後、分娩 4、5、7 日後に尾静脈から採取した。採取した血液サンプルは遠心分離し (2,000 ×g, 10 分間)、血清を分析まで -30°C にて保存した。血中 Ca、P、Mg 濃度は自動生化学分析装置 (TBA120FR; 東芝メディカルシステムズ, 栃木) で分析した。血中 PTH 濃度は、市販の定量キット (Access Intact PTH; Beckman Coulter Inc., カナダ) を用い、分娩 21、7、1 日前と分娩 0、12、24、48、72 時間後、分娩 7 日後において分析した。血中 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 濃度は、市販の RIA キット (Immunodiagnostic Systems Ltd., イギリス) を用い、分娩 1 日前と分娩 0、12、24、48、72 時間後において分析した。骨吸収マーカーのひとつである血中 I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (NTX) 濃度は、市販 ELISA キット (Osteomark NTX Serum; Alere Medical Co. Ltd., 東京) を用い、分娩 21、14、7、1 日前と分娩 0、6、12、24、48、72 時間後、分娩 4、5、7 日後において分析した。血清 pH は、血液ガス分析装置 (Cobas B221; Roche Diagnostic Japan, 東京) を用い、分娩 21、14、7 日前において分析した。

搾乳は1日2回行い、分娩後6日間の乳量および乳中Ca濃度を調査した。乳中Caの分析は、乳サンプル1mlにセルロース（和光純薬工業株式会社，大阪）を0.5g加えて600°C・2時間灰化し、塩酸で再溶解したものをICP発光分光分析法（ICPE-9000；島津製作所，京都）で分析した（AOAC, 2003; 985.01）。

### 3) 統計処理

統計解析については、血清中CaおよびPTH、NTX濃度、Ca摂取量の群間比較は反復測定分散分析（JMP 8.0.2; SAS Institute Japan 株式会社，東京）により行った。ただし、ミネラル摂取量のみ分娩前後を分けて検討した。処理と時間で相互作用が認められた場合は各時点でのStudentのt検定を行った。分娩前後における血中NTX濃度の推移を、全頭で採取時ごとのPared t-testにより時間ごとの比較を行った。分娩後における血清Ca濃度の回復状況を評価するため、群および産次毎にCaの推移を3次の近似曲線をあてはめ、正常値（9.0 mg/dl; NRC, 2001）まで回復するのに要した時間を求めた。危険率5%未満を有意差あり、10%未満を傾向ありとした。

### 3-1-3. 結果

平均 DFA III 給与日数は  $16.6 \pm 1.5$  日間、最長は 26 日間、最短は 7 日であった。DFA 群の 3 頭、対照群の 1 頭で難産のため分娩介助を行った。

#### 1) 血液成分

分娩前の血清 Ca および P、Mg 濃度は群間に差はなく、分娩直後に両群ともに低下した。しかし、分娩 6 ( $P < 0.05$ )、12 ( $P < 0.01$ )、24 ( $P < 0.01$ )、48 時間後 ( $P < 0.01$ ) における血清 Ca 濃度は DFA 群が対照群に比べ有意に高かった (Figure 6a)。分娩後において血清 Ca 濃度が 9 mg/dl まで回復するのに要した時間は、DFA 群が対照群に比べ早く (DFA 群: 分娩 28 時間後, 対照群: 分娩 61 時間後)、また各産次においても早かった (Table 4)。分娩 6 ( $P < 0.05$ )、12 ( $P < 0.01$ )、24 ( $P < 0.01$ )、48 時間後 ( $P < 0.01$ ) における血清 P 濃度は DFA 群が対照群に比べ有意に高かった (Figure 6b)。分娩 72 時間後 ( $P < 0.05$ ) および分娩 4 日後 ( $P < 0.05$ ) における血清 Mg 濃度は DFA 群が対照群に比べ有意に高かった (Figure 6c)。

分娩前の血清 PTH 濃度は群間に差はなかった。分娩後においては、両群とも分娩直後に上昇したが、分娩 12 ( $P < 0.05$ ) および 24 時間後 ( $P < 0.01$ ) に DFA 群が対照群に比べ有意に低かった (Figure 7a)。

分娩前 (-1 d) の血清  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$  濃度は群間に差はなく、分娩直後および 12 時間後に両群ともに増加した。分娩 72 時間後における血清  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$  濃度は DFA 群が対照群に比べ有意に低かった ( $P < 0.01$ , Figure 7b)。

血清 NTX 濃度は分娩前後で群間に差はなかった (Figure 8a)。供試牛全頭の血清 NTX 濃度の推移は分娩 0、6、12、24、48、72 時間後が、分娩 21 日前および分娩 4、5 日後に比べて有意に低かった ( $P < 0.05$ , Figure 8b)。

分娩前の血清 pH は、群間で差がなかった (Table 5)。

#### 2) ミネラル摂取量

分娩前の Ca および K 摂取量に群間で差はなかった (Table 5)。しかし、分娩後においては、DFA 群の Ca 摂取量が対照群に比べ有意に多かった ( $P < 0.05$ , Table 5)。

#### 3) 乳 Ca 排出量

乳中 Ca 濃度は群間で差はなかった (Table 5)。DFA 群の乳量は対照群に比べ有意に多かった ( $P < 0.01$ , Table 5) ため、乳への Ca 排出量は DFA 群で有意に多くなった ( $P < 0.05$ , Table 5)。

#### 3-1-4. 考察

低 Ca 血症のリスクファクターとして、年齢や品種、飼料中 Ca および K 含量、DCAD 値、低 Mg 血症などが挙げられている (van de Braak ら, 1987; Oetzel, 1991; Goff と Horst, 1997; NRC, 2001)。なかでも、代謝性アルカローシスは乳熱発症に最も重要な要素とされる (Ender ら, 1971)。本試験では、それらのリスクファクターのうち産次数および畜種、分娩前の給与飼料、Ca および K 摂取量、血清 pH、分娩後早期の血清 Mg 濃度に群間で違いはなく、唯一異なるのは DFA III の給与の有無であった。血清 Ca 濃度が低下すると、その補填のために骨からの Ca 動員、小腸からの Ca 吸収促進、尿細管からの Ca 再吸収が働く (NRC, 2001)。それら Ca 補填経路のうち、腎臓における尿細管からの Ca 再吸収は陰イオン塩が給与される際に大きな意味を持つ (Schonewille ら, 1999)。しかし本試験では、陰イオン塩は給与しておらず、供試牛には DCAD 値の高い飼料 (+36.2 mEq/100g) が給与されていた。また今回、尿細管からの Ca 再吸収量の評価は行っていないが、群間で同一内容の飼料を給与しており尿 Ca 再吸収量に差がないと考えられること、尿からの再吸収される Ca 量は血清 Ca を回復させる量には不十分であること (Goff, 2006) から、分娩後早期においては骨からの Ca 動員と腸管からの Ca 吸収の 2 経路が主要な Ca 補填経路であったと考えられる。

骨からの Ca 動員は、分娩後早期には抑制状態にあるとされる (Liesegang ら, 2000, 2007; Moreira ら, 2009; Taylor ら, 2009)。本試験においても、分娩前後における骨吸収マーカーのひとつである血清 NTX 濃度の推移から、分娩 0 時間後から 72 時間後までの間で骨からの Ca 動員は抑制されていることを確認した。にもかかわらず、分娩 6 時間後から 48 時間後にかけて DFA 群の血清 Ca 濃度が対照群に比べ有意に高かったことから、DFA III は分娩後早期において腸管からの Ca 吸収を促進している可能性が示唆された。

血清 PTH 濃度は分娩直後に両群ともに大きく増加した。血清 Ca 濃度が低下すると、上皮小体から PTH が分泌され、骨からの Ca 動員および腸管からの経細胞経路を介した能動的な Ca 吸収を促進する 1,25-(OH)<sub>2</sub>D の合成ならびに尿細管からの Ca 再吸収を高めるように働く (NRC, 2001)。代謝性アルカローシスでは PTH 受容体の構造が変化し、分泌された PTH が受容体にうまく結合できないため、骨からの Ca 動員や腎臓における 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 合成が妨げられる (Goff ら, 1991, 2014; Phillippo ら, 1994)。本試験においては、分娩前に高 DCAD 値の飼料を給与していたため、両群の分娩前の平均血清 pH は代謝性アルカローシスの域 (>7.45; Constable ら, 1991) を上回っていた。分娩後の対照群の血清 PTH 濃度が DFA 群に比べ有意に高かったにも拘わらず血清 Ca 濃度が有意に低かったのは、代謝性アルカローシスによって骨および腎臓の PTH 受容体もしくは腸管上皮細胞の 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 受容体が機能不全になっていた、もしくはその両方が推定された。また、分娩後早期の骨からの Ca 動員が抑制されていたのは、代謝性アルカローシスの影響かもしれない (Bushinsky, 1996)。しかし、1,25-(OH)<sub>2</sub>D 合成が遅延もしくは不十分になる牛は乳熱発症牛の 10 %未

満とされ (Goff ら, 1989)、高 DCAD 値の飼料が給与されていた場合においても (Goff と Horst, 1997; Penner ら, 2008)、正常牛と同等もしくは高値であることが報告されている (Horst ら, 1978; Goff ら, 2014)。本試験においても、両群で分娩 0 および 12 時間後に血清 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 濃度の大きな増加を確認したことから、対照群の分娩後における血清 Ca 濃度の回復遅延は、分娩後早期の腎臓における 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 合成の遅延よりも、加齢による小腸上皮細胞の 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 受容体数の減少 (Horst ら, 1990) が影響を及ぼした可能性が示唆された。一方、DFA 群では対照群と同様に代謝性アルカローシスかつ小腸上皮細胞の 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 受容体数が減少していたにもかかわらず、分娩後の血清 Ca 濃度の回復が早く、血清 PTH 濃度も早期に低下した。これは、DFA 群で分娩後早期において PTH や 1,25-(OH)<sub>2</sub>D が関与しない別の経路、すなわち小腸における受動的な Ca 吸収が DFA III により促進され、血清 Ca 状態が改善したことを示唆している。さらに、DFA 群の分娩後における血清 Ca 濃度が正常値 (≥ 9 mg/dl; NRC, 2001) まで回復するのに要した時間が、産次数の高い牛においても対照群に比べ短かったことも、DFA III が加齢による影響を受けない受動的な Ca の細胞間吸収を促進することを裏付けていると考えられる。

Ca 摂取量が多いほど、小腸で吸収可能な Ca 量は増加する (Goff と Horst, 1997)。また、小腸での細胞間隙経路における Ca 吸収は濃度勾配に依存する (Bronner, 1987) ことから、DFA 群の分娩後における Ca 摂取量の有意な増加は、血清 Ca 濃度の回復をさらに後押しし、その後の血清 Ca 濃度の維持に寄与した可能性もある。

低 Ca 血症は一般に、乳により排出される Ca 量が供給 Ca 量を上回るにより起こるとされる (Goff, 2008)。本試験において、DFA 群の乳による Ca 排出量は対照群に比べ有意に多かったにもかかわらず、血清 Ca 濃度の回復に要した時間は DFA 群で短かった。これは、DFA 群で分娩後早期により多くの Ca を乳中に排出した分、DFA III による小腸における Ca 吸収が促進された結果であると推察される。

以上の結果より、分娩前後の DFA III 給与は、腸管における 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 受容体が関与しない受動的な Ca 吸収を促進し、分娩後の血清 Ca 濃度を早期回復させる可能性が示唆された。よって、DFA III は 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 受容体数が減少し (Horst ら, 1990)、能動的な Ca 吸収能力の低下する高産次牛においても簡便かつ安全に低 Ca 血症の予防および改善効果が期待できると考えられる。

## 3-1-5. 図および表

Table 2. Ingredients of the pellets and TMR fed to dry and lactating cows

| Ingredient, % of fresh matter    | Pellet  |                  | TMR              |                   |
|----------------------------------|---------|------------------|------------------|-------------------|
|                                  | Control | DFA <sup>1</sup> | Dry <sup>2</sup> | Lact <sup>3</sup> |
| Corn silage                      | —       | —                | 50.0             | 40.5              |
| Grass silage                     | —       | —                | 39.0             | 35.7              |
| Concentrate mix                  | —       | —                | 8.4 <sup>4</sup> | 9.6 <sup>5</sup>  |
| Grass hay                        | —       | —                | —                | 2.9               |
| Ear corn silage                  | —       | —                | —                | 3.6               |
| Beet pulp                        | —       | —                | —                | 2.3               |
| Rice bran                        | 24.0    | 20.0             | —                | 1.9               |
| Soybean meal                     | —       | —                | 2.4              | 1.8               |
| Rolled barley                    | —       | —                | —                | 1.4               |
| Ground corn                      | 38.0    | 30.0             | —                | —                 |
| Wheat bran                       | 38.0    | 30.0             | —                | —                 |
| Vitamin mineral mix <sup>6</sup> | —       | —                | 0.07             | 0.04              |
| Vitamin E                        | —       | —                | 0.07             | —                 |
| MgO                              | —       | —                | 0.07             | 0.03              |
| CaCO <sub>3</sub>                | —       | —                | —                | 0.1               |
| DFA III                          | —       | 20.0             | —                | —                 |

<sup>1</sup> Supplemented with difructose anhydride III.

<sup>2</sup>Prepartum period (average from -14 to -1 d relative to calving).

<sup>3</sup>Postpartum period (average from 1 to 6 d relative to calving).

<sup>4</sup>Dry Base 17 (nutrient composition on a DM basis: 20.5 % CP, 27.9 % NDF, 0.28 % Ca, 0.70 % P, 0.35 % Mg, 1.25 % K, 0.04 % Na, 0.15 % S, and 0.38 % Cl; Hokuren Kumiai Shiryo K. K., Hokkaido, Japan).

<sup>5</sup>Mo-Dairy 18 (nutrient composition on a DM basis: 21.4 % CP, 24.5 % NDF, 1.58 % Ca, 0.60 % P, 0.31 % Mg, 1.28 % K, 0.23 % Na, 0.38 % S, and 0.41 % Cl; Nippon Formula Feed Manufacturing Co. Ltd., Kanagawa, Japan).

<sup>6</sup>Contents per gram: 5,000 IU of vitamin A, 1,000 IU of vitamin D, 2 mg of vitamin E, 0.2 mg of vitamin K<sub>3</sub>, 0.5 mg of vitamin B<sub>1</sub>, 1 mg of vitamin B<sub>2</sub>, 0.1 mg of vitamin B<sub>6</sub>, 1 ng of vitamin B<sub>12</sub>, 6 mg of nicotonic acid, 2 mg of choline chloride, 10 mg of pantothenic acid, 156 µg of Mn (MnSO<sub>4</sub>), 0.7 mg of Zn (ZnCO<sub>3</sub>), 50 µg of Fe (FeSO<sub>4</sub>), 139 µg of Cu (CuSO<sub>4</sub>), 325 µg of I Ca(IO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 38 µg of Co (CoSO<sub>4</sub>), 1 mg of methionine, and 0.5 mg of lysine hydrochloride.

Table 3. Chemical composition (% of DM, unless otherwise noted) of pellets, TMR, and hay that were fed to dry and lactating cows

| Item  | Pellet  |                  | Dry <sup>1</sup> |      | Lactating <sup>2</sup> |      |
|---|---------|------------------|------------------|------|------------------------|------|
|   | Control | DFA <sup>3</sup> | TMR              | Hay  | TMR                    | Hay  |
| DM, % as fed                                  | 88.7    | 89.5             | 35.0             | 86.6 | 39.9                   | 85.5 |
| CP  | 14.4    | 11.5             | 15.0             | 14.9 | 15.4                   | 14.8 |
| NDF   | 27.5    | 19.3             | 41.6             | 60.3 | 41.3                   | 62.4 |
| ADF   | 8.6     | 6.8              | 24.6             | 36.9 | 24.3                   | 37.3 |
| Nutral detergent insoluble CP                 | 1.7     | 1.4              | 2.5              | 4.0  | 2.8                    | 5.5  |
| Acid detergent insoluble CP                   | 0.5     | 0.4              | 1.0              | 1.4  | 1.1                    | 1.3  |
| ADL   | 2.2     | 1.7              | 3.5              | 4.9  | 3.5                    | 4.5  |
| Ether extract                                 | 5.7     | 4.7              | 4.0              | 3.1  | 3.8                    | 2.9  |
| Ash   | 4.4     | 3.7              | 7.8              | 12.0 | 8.1                    | 11.5 |
| NE <sub>L</sub> , <sup>4</sup> M cal/kg of DM | 1.81    | 1.84             | 1.52             | 1.16 | 1.51                   | 1.19 |
| Ca  | 0.07    | 0.07             | 0.40             | 0.42 | 0.65                   | 0.45 |
| P   | 0.92    | 0.76             | 0.42             | 0.40 | 0.44                   | 0.41 |
| MgO   | 0.40    | 0.35             | 0.24             | 0.24 | 0.27                   | 0.24 |
| K   | 1.02    | 0.78             | 2.36             | 3.40 | 2.21                   | 3.28 |
| Na  | 0.02    | 0.02             | 0.05             | 0.05 | 0.14                   | 0.04 |
| S   | 0.16    | 0.13             | 0.21             | 0.29 | 0.23                   | 0.32 |
| Cl  | 0.10    | 0.08             | 0.48             | 0.80 | 0.48                   | 0.56 |
| DCAD, <sup>5</sup> mEq/100g of DM             | 14.1    | 10.4             | 36.2             | 44.7 | 34.8                   | 50.0 |

<sup>1</sup>Prepartum period (average from -14 to -1 d relative to calving).

<sup>2</sup>Postpartum period (average from 1 to 6 d relative to calving).

<sup>3</sup>Supplemented with difructose anhydride III.

<sup>4</sup>Calculated according to NRC (2001).

<sup>5</sup>Calculated as  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - (\text{Cl}^- + \text{S}^{2-})$  (Ender et al., 1971).

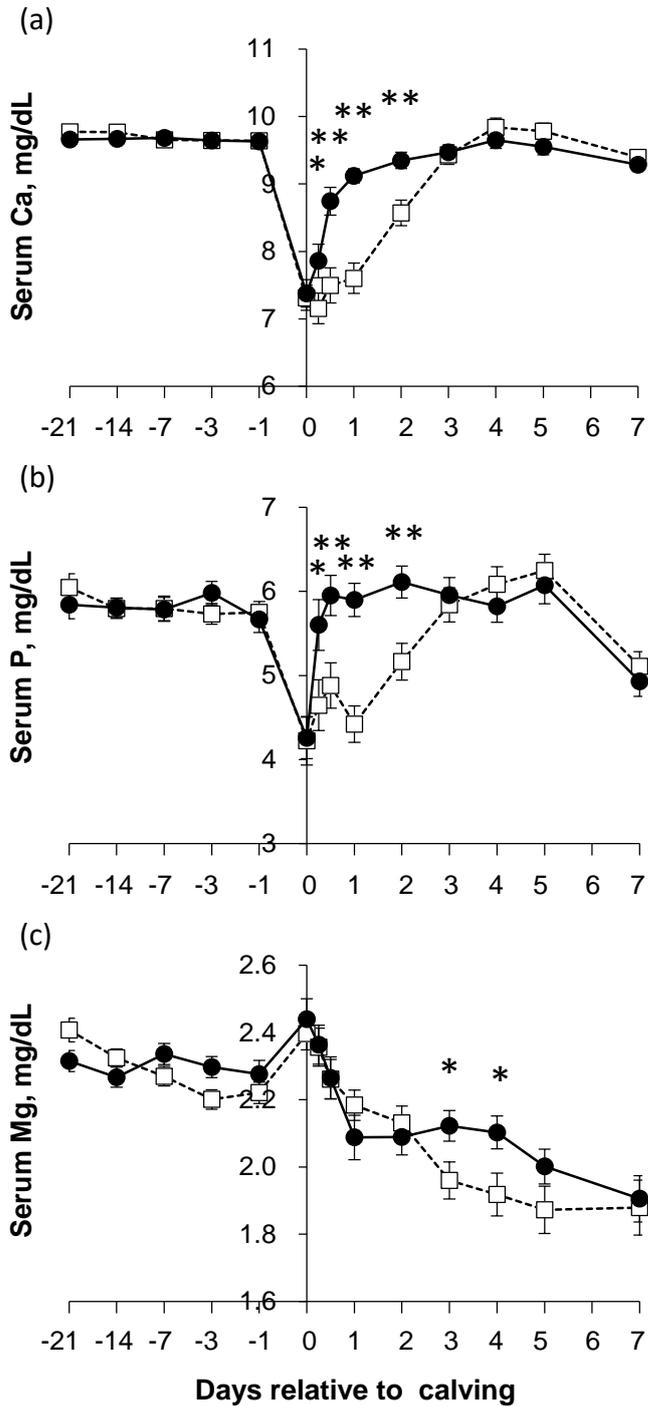


Figure 6. Serum calcium (a), phosphate (b), and magnesium (c) during the peripartum period (-21 to 7 d relative to calving; means  $\pm$  SEM) in the control group ( $\square$ ; n = 37) and the group supplemented with difructose anhydride III (DFA,  $\bullet$ ; n = 37). \* and \*\* indicate significant differences between the groups at each time point (\*\*P < 0.01; \*P < 0.05).

Table 4. The time required for the recovery of the serum calcium content to 9 mg/dL during the postpartum period<sup>1</sup>

| Parity | Serum Ca recovery time<br>(= 9 mg/dl) |                  |
|--------|---------------------------------------|------------------|
|        | Control                               | DFA <sup>2</sup> |
| ≥6     | 74 h (n = 6)                          | 50 h (n = 5)     |
| 5      | 59 h (n = 7)                          | 23 h (n = 8)     |
| 4      | 40 h (n = 4)                          | 26 h (n = 4)     |
| 3      | 60 h (n = 9)                          | 19 h (n = 8)     |
| 2      | 63 h (n = 11)                         | 28 h (n = 12)    |
| all    | 61 h (n = 37)                         | 28 h (n = 37)    |

<sup>1</sup> The postpartum serum Ca values for each parity level were fitted to a cubic function curve to calculate the time for the serum Ca concentration to recover to 9 mg/dL.

<sup>2</sup> Supplemented with difructose anhydride III.

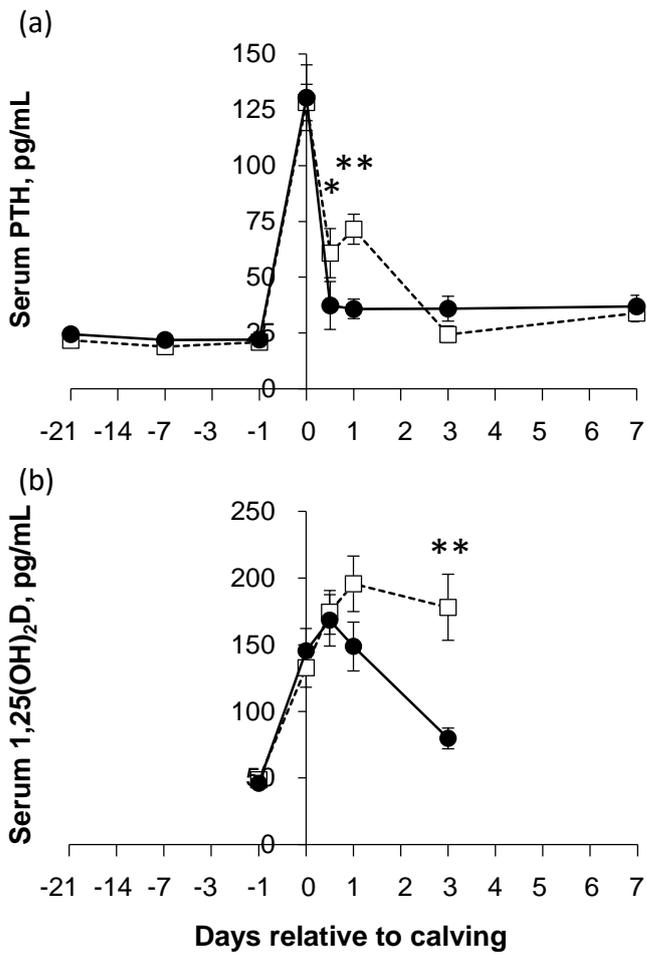


Figure 7. Serum parathyroid hormone (PTH; a) and 1,25-dihydroxyvitamin D (b) during the peripartum period (–21 to 7 d or –1 d to 72 h relative to calving; means  $\pm$  SEM) in the control group (□; n = 37) and the group supplemented with difructose anhydride III (DFA, ●; n = 37). \* and \*\* indicate significant differences between the groups at each time point (\*\*P < 0.01; \*P < 0.05).

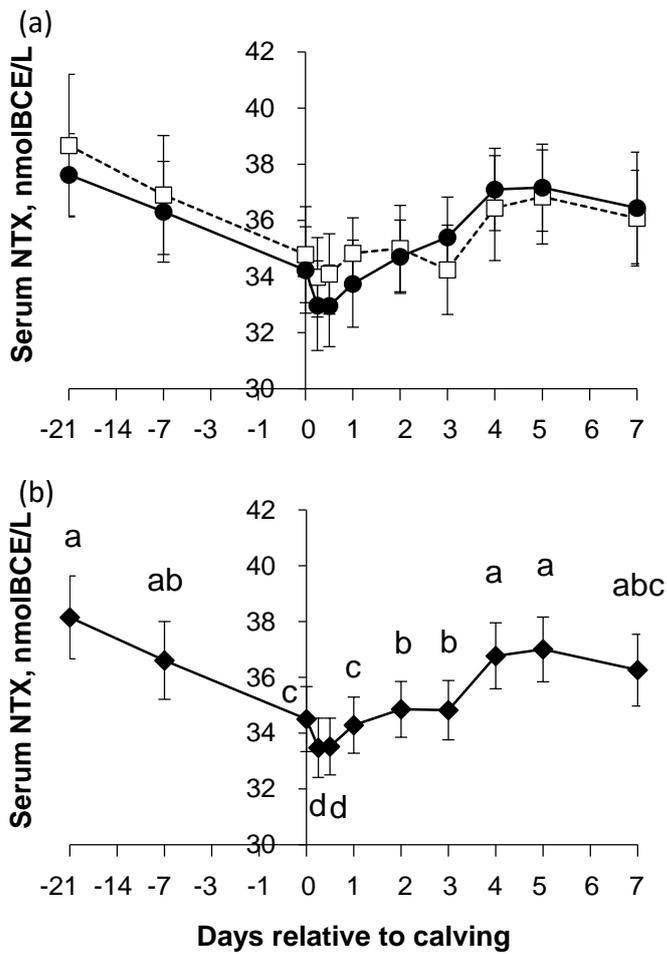


Figure 8. Serum cross-linked N-telopeptide of type I collagen (NTX; means  $\pm$  SEM) during the peripartum period (-21 to 7 d relative to calving) in the control group ( $\square$ ; n = 37) and the group supplemented with difructose anhydride III (DFA,  $\bullet$ ; n = 37) (a) and all cows ( $\blacklozenge$ ; n = 74) (b). BCE = bone collagen equivalents. Letters a, b, c, and d indicate differences at  $P < 0.05$  at each time point among all cows.

Table 5. Feed mineral intake, milk yield, and Ca outflow into the milk in the control and DFA (supplemented with difructose anhydride III) groups during the pre- and postpartum periods.

| Feed mineral intake, g/d<br>(unless otherwise noted) | Cows                   | Group   |       |      | P-value |       |                  |
|--|------------------------|---------|-------|------|---------|-------|------------------|
|  |                        | Control | DFA   | SEM  | Groups  | Time  | G×T <sup>1</sup> |
| Ca   | Dry <sup>2</sup>       | 46.7    | 47.8  | 1.0  | 0.71    | 0.12  | 0.55             |
|  | Lactating <sup>3</sup> | 130.5   | 150.9 | 4.4  | 0.02    | <0.01 | 0.74             |
| P  | Dry                    | 55.3    | 52.3  | 1.0  | 0.79    | 0.14  | 0.65             |
|  | Lactating              | 93.4    | 114.2 | 3.4  | <0.01   | <0.01 | 0.48             |
| Mg   | Dry                    | 30.1    | 28.7  | 0.5  | 0.33    | 0.06  | 0.48             |
|  | Lactating              | 42.0    | 51.4  | 1.5  | <0.01   | <0.01 | 0.23             |
| K  | Dry                    | 292.7   | 290.3 | 6.7  | 0.90    | 0.11  | 0.74             |
|  | Lactating              | 325.0   | 404.8 | 12.6 | <0.01   | <0.01 | 0.30             |
| Na   | Dry                    | 6.8     | 6.6   | 0.3  | 0.37    | 0.67  | 0.64             |
|  | Lactating              | 26.7    | 23.8  | 1.0  | 0.65    | <0.01 | 0.17             |
| Serum pH   | Dry                    | 7.46    | 7.46  | 0.00 | 0.71    | 0.93  | 0.41             |
| Milk Yield, <sup>4</sup> kg/d                        |                        | 27.2    | 31.6  | 0.8  | <0.01   | <0.01 | 0.38             |
| Ca content, <sup>4</sup> %                           |                        | 0.16    | 0.15  | 0.00 | 0.22    | <0.01 | 0.70             |
| Ca outflow, <sup>4</sup> g/d                         |                        | 41.50   | 47.40 | 1.20 | 0.02    | <0.01 | 0.16             |

<sup>1</sup>Interaction between the groups and time.

<sup>2</sup>Prepartum period (average from -14 to -1 d relative to calving).

<sup>3</sup>Postpartum period (average from 1 to 6 d relative to calving).

<sup>4</sup>Mean values at -21, -14, and -7 d relative to calving.

## 第 2 節

分娩前後の DFA III 給与による低 Ca 血症予防および改善が分娩後のエネルギー充足、卵巣機能回復ならびに子宮修復に及ぼす影響

### 3-2-1. 目的

前節において、分娩前後の乳牛に対する DFA III 給与は分娩直後の腸管からの受動的な Ca 吸収を促進し、血清 Ca 濃度の回復を早めることを示唆した。分娩直後の低 Ca 血症を発端とする様々な産後疾病の予防、さらには繁殖成績改善の可能性が期待された。そこで本節では、分娩前後乳牛への DFA III 給与による低 Ca 血症の予防および改善が分娩後の乾物摂取量およびエネルギー充足、卵巣機能回復および子宮修復に及ぼす影響を検討した。

### 3-2-2. 材料と方法

試験は、2012 年 10 月から 2014 年 8 月にわたり帯広畜産大学畜産フィールド科学センターにおいて実施した。試験方法は帯広畜産大学動物実験等に関する規定に則り、帯広畜産大学動物実験委員会の承認の下実施した（承認番号; 25-20, 26-9）。

#### 1) 動物

供試家畜および試験処理、給与飼料は第 3 章第 1 節と同様である。試験牛は分娩予定 21 日前から分娩までセンター内のドアフィーダー設置フリーストール試験牛舎、分娩後 1 週間は分娩房およびセンター内のタイストール牛舎、その後はセンター内のフリーストール牛舎で飼養し、水とミネラルブロック（KNZ salt licks; Hengelo, オランダ）は自由に摂取できるようにした。

#### 2) データおよびサンプル採取

飼料給与量と残飼量は分娩 14 日前から分娩 6 日後まで毎日計測した。飼料サンプルは月 1 回採取した。残飼は毎日採取し、成分分析は週毎に行った。飼料サンプルの分析項目および分析方法は第 3 章第 1 節と同様である。

反芻胃収縮回数は聴診器を用いて左けん部より分娩 21、14、7、3、1 日前と、分娩 0（直後）、6、12、24、48、72 時間後、分娩 4、5、7 日後に測定した。5 分間の収縮回数を記録し、1 分間あたりの収縮回数を比較した。

体重測定および BCS 調査は分娩予定 21 日前から分娩 15 週間後まで週 1 回測定した。

DMI は乾物給与量と乾物残飼料の差から求め、代謝体重（体重の 0.75 乗）で除して、代謝体重あたりの DMI を算出した。

血液サンプルは分娩 21、14、7、3、1 日前と、分娩 0（直後）、6、12、24、48、72 時間後、分娩 4、5、7 日後、その後は分娩 15 週間後まで週 2 回の頻度で尾静脈から採取し

た。採血管は、血清採血用に 10 ml プレイン真空採血管 (VP-P100K; テルモ株式会社, 東京)、血漿採血用に前述の真空採血管に 200  $\mu$ l の EDTA (0.3 M, 1%, アセチルサリチル酸, pH 7.4) を注入したものを使用した。採取した血液サンプルは遠心分離し (2,000 $\times$ g, 10 分間)、血清ならびに血漿を分析まで $-30^{\circ}\text{C}$ にて保存した。血清 Ca、遊離脂肪酸 (NEFA)、 $\beta$ ヒドロキシ酪酸 (BHBA) 濃度は自動生化学分析装置 (TBA120FR; 東芝メディカルシステムズ, 栃木) で分析した。血漿プロジェステロン濃度は、市販の定量キット (VIDAS Progesterone; シスメックス・ビオメリュー株式会社, 東京) を用い、分娩 2 週間後から 10 週間後まで週 2 回の頻度で分析した。

搾乳は 1 日 2 回行い、乳量は分娩 15 週間後まで、乳脂肪率や乳蛋白質率など乳成分については分娩 6 日後まで毎日調査した。乳成分の分析は FT-IR 乳成分測定装置 (Milko-Scan FT+; Foss Electric, デンマーク) で分析し、4%脂肪補正乳量 (FCM) と乳生産に要する正味エネルギー量 ( $\text{NE}_L$ ) を NRC (2001) の計算式を用いて算出した。

エネルギーバランス (EB) は、NRC (2001) の計算式を用いて牛毎に算出した。

メトリチェック (膈内貯留物観察) は分娩 2 週間後から 10 週間後まで週 1 回の頻度で 49 頭 (DFA 群 24 頭、対照群 25 頭) を対象に行い、膈内貯留物採取器具 (Metricheck; Sincro, ニュージーランド) によって採取した貯留物を混入物や臭いにより 5 段階で評価した [Sheldon ら (2006) の分類を改変; Table 6]。

### 3) 統計処理

すべての統計解析は、JMP 8.0.2 (SAS Institute Japan 株式会社, 東京) により行った。血清 Ca および NEFA、BHBA 濃度、代謝体重あたりの DMI、EB、反芻胃収縮回数、体重、BCS、乳量、乳成分の群間比較は反復測定分散分析により行った。ただし、DMI、EB、反芻胃収縮回数のみ分娩前後を分けて検討した。乳量および乳成分は 1 週間毎の平均値を比較に用いた。処理と時間で相互作用が認められた場合は各時点での Student の t 検定を行った。

血漿プロジェステロン濃度が分娩後初めて 1.0 ng/ml を超えた日を卵巢機能回復日 (Stevenson と Britt, 1979)、メトリチェックスコアが 1 になった分娩後週数を子宮修復完了週と定義し、Student の t 検定で群間比較を行った。

分娩 0、6、12、24 時間後の血清 Ca 濃度と分娩後 DMI、EB、子宮修復完了週数、分娩後 EB と卵巢機能回復日数の関係を Pearson の相関係数により単相関解析を行い検討した。

分娩後の疾病発症状況を比較するにあたり、分娩後血清 Ca 濃度が 5.5 mg/dl 未満に低下した牛を乳熱、7.5 mg/dl 未満に低下した牛を低 Ca 血症 (Goff と Horst, 1997)、分娩後胎盤が 12 時間以内に排出されなかった牛を胎盤停滞 [Fourichon ら, 2000; ただし双子分娩牛は胎盤停滞を発症しやすい (Echternkamp と Gregory, 1999) ため除外]、分娩後血中 BHBA 濃度が 1,400  $\mu\text{mol/L}$  以上に上昇した牛を潜在性ケトosis (SCK; Carrier ら, 2004)、

子宮修復が分娩後 3 週間以内に完了しなかった牛を子宮内膜炎 (Sheldon ら, 2006) と定義し、その発症率をカイ二乗検定で比較した。

危険率 5 %未満を有意差あり、10 %未満を傾向ありとした。

### 3-2-3. 結果

#### 1) 血液成分

分娩前の血清 Ca 濃度は群間に差はなく、分娩直後に両群ともに低下した。しかし、分娩 6 (P < 0.05)、12 (P < 0.01)、24 (P < 0.01)、48 時間後 (P < 0.01) において DFA 群が対照群に比べ有意に高かった (Figure 6a)。

分娩前後の血清 NEFA および BHBA 濃度の推移に差はなかった (Figure 9)。

#### 2) 反芻胃収縮回数

分娩前の反芻胃収縮回数は群間に差はなく、分娩直後に両群ともに減少した。しかし、分娩後の反芻胃収縮回数は DFA 群が対照群に比べ有意に増加した (P < 0.001; Figure 10)。

#### 3) 体重・BCS

分娩前後の体重および BCS の推移は両群で有意な差はなかった (Figure 11)。

#### 4) DMI

分娩前の DMI および代謝体重あたり DMI は群間に差はなかったが、分娩後において DFA 群が対照群に比べ有意に増加した (P < 0.001; Figure 12)。

#### 5) 乳量、乳成分

分娩 0 (P < 0.01)、1 (P < 0.10)、6 (P < 0.05)、7 (P < 0.10)、8 週目 (P < 0.10) の乳量は DFA 群で有意に多かった (Figure 13)。分娩 0 週目の乳蛋白質率は対照群で高い傾向がみられたが、乳脂肪および乳蛋白質生産量、4%FCM、乳生産に要する NE<sub>L</sub> は DFA 群で有意に多かった (P < 0.05; Table 8)。

#### 6) EB

EB は両群ともに分娩後に大きく負の EB となった。試験期間を通じて EB に群間で差はなかった (Figure 14)。

#### 7) 卵巣機能回復と子宮修復

卵巣機能回復日数および子宮修復完了週数に群間で差はみられなかった (Table 9)。

#### 8) 産後疾病発症状況

乳熱および低 Ca 血症の発症率は DFA 群で対照群に比べ、減少する傾向を認めた (P < 0.10; Table 9)。SCK 発症率に群間で差はなかった (Table 9)。

9) 胎盤停滞および子宮内膜炎

子宮内膜炎発症率に群間で差はなかったが、胎盤停滞発症率は DFA 群で半減した ( $P < 0.05$ ; Table 9)。

#### 3-2-4. 考察

血清中 Ca の欠乏は筋肉の弛緩・収縮運動を抑制し、結果として起立不能症などの臨床症状を引き起こす (Horst ら, 2003)。消化管を構成する平滑筋は骨格筋に比べ筋小胞体の発達が悪く、筋小胞体に貯蔵されている Ca ではなく細胞外液からの Ca への依存度が大きい (Ganong ら, 1998)。つまり、平滑筋は骨格筋よりも血清 Ca 濃度低下の影響を受けやすく、起立不能など臨床症状を示さない潜在性低 Ca 血症でも消化管運動機能は影響を受ける可能性が高い。このことは、Hansen ら (2003) の乳牛へのエチレンジアミン四酢酸ナトリウム (Na<sub>2</sub>EDTA)、Martinez ら (2014) のグリコールエーテルジアミン四酢酸 (EGTA) の静脈内投与による血清 Ca 濃度の低下が、咀嚼および採食、反芻時間の減少をもたらした報告や、Joyce ら (1997) の乾乳牛への低 DCAD 飼料 (-7 mEq/100 gDM) の給与による分娩時の血清 Ca 濃度低下予防が、分娩後の DMI の増加をもたらした報告でも示されている。本試験においても分娩に伴う血清 Ca 濃度の低下によって消化管の運動量は大きく減少し、分娩後の血清 Ca 濃度の回復が遅れた対照群で分娩後の消化管運動量および DMI の著しい減少を確認した。一方、分娩後の血清 Ca 濃度の回復が早かった DFA 群では、分娩後の消化管運動量の回復が早く、DMI も多かった。

分娩後の DMI 増加によって分娩後の EB 改善が期待されたが、有意な改善は認められなかった。Rabelo ら (2003) は、分娩後給与飼料のエネルギー濃度を高めることで、分娩後 21 日間の DMI およびエネルギー摂取量は増加したが、乳生産量も増加したために、結果として EB は改善されなかったことを報告している。本試験においても DFA 群で対照群に比べ乳量が多く、分娩後の EB、さらにはエネルギー充足の指標となる血清 NEFA および BHBA 濃度、SCK 発症率に群間で差は認められず、分娩後のエネルギー状態の影響が大きい (Beam と Butler, 1997, 1999; Butler, 2000) とされる分娩後の卵巣機能回復日数に改善は認められなかった。

また、DFA 群で胎盤停滞発症率は有意に減少した。分娩後における速やかな血清 Ca 濃度の回復は、子宮収縮を高め胎盤排出を促し (Muller と Owens, 1974; Oetzel ら, 1988)、子宮修復の促進に貢献する (大浪ら, 1994) とされる。本試験においても同様に血清 Ca 濃度の回復が早かった DFA 群で胎盤停滞発症率の有意な低減を認めたが、メトリチェックによる子宮修復完了週数ならびに子宮内膜炎発症率に群間で差は認められなかった。

本試験では、卵巣機能回復の指標として血清プロゲステロン濃度を、子宮修復の指標としてメトリチェックスコアを用いたが、それぞれにおいて異なる指標、例えば卵巣機能回復の指標としてカラードップラー超音波診断装置を用いた卵巣の血流量の調査 (Kawashima ら, 2007)、子宮修復の指標として超音波検査による子宮内の液体貯留の程度の調査 (小山, 2012) や、サイトブラシを用いた子宮内膜の多形核白血球% (PMN%; Pothmann ら, 2015) などの調査も併せて実施していれば、DFA III 給与による改善効果の糸口を掴むことができたかもしれない。しかしながら、DFA 群で対照群に比べて、分娩後

の乳量が有意に増加したにもかかわらずエネルギー充足に差が認められなかった、胎盤停滞発症率が有意に減少したという本試験の結果は、酪農経営において非常に有益なことと考えられる。

また、本試験において分娩後の血清 Ca 濃度の回復が DFA 群に比べて遅かった対照群でも、分娩 72 時間後には DFA 群同等以上に回復していた。にもかかわらず、それ以降においても対照群の反芻胃収縮回数や DMI は、DFA 群に比べて著しく少ない状況が続いたことから、分娩後早期における僅か数十時間の血清 Ca 濃度回復の遅れが、その後の乳牛の生産性に非常に大きな影響を及ぼし続ける可能性が示唆された（負のキャリーオーバー効果）が、本試験ではそのメカニズムを明らかにすることはできなかった。

以上の結果から、分娩前後の DFA III 給与による血中 Ca 濃度の早期回復によって、分娩後早期の消化管運動および DMI の有意な増加、胎盤停滞発症率の有意な減少を確認した。分娩後の DMI の増加によりエネルギー充足の改善が期待されたが、同時に乳量の有意な増加も観察されたため、分娩後の卵巣機能回復ならびに子宮修復における明確な改善効果を示すことはできなかった。

3-2-5. 図および表

Table 6. Metricheck scoring scheme<sup>1</sup>

| Score | Status of vaginal discharge                 |
|-------|---|
| 1     | Clear or translucent mucus                  |
| 2     | Mucus containing of white or off-white pus  |
| 3     | Discharge containing <50% purulent material |
| 4     | Discharge containing ≥50% purulent material |
| 5     | 4 with stench                               |

<sup>1</sup> Modified from Sheldon et al. (2006)

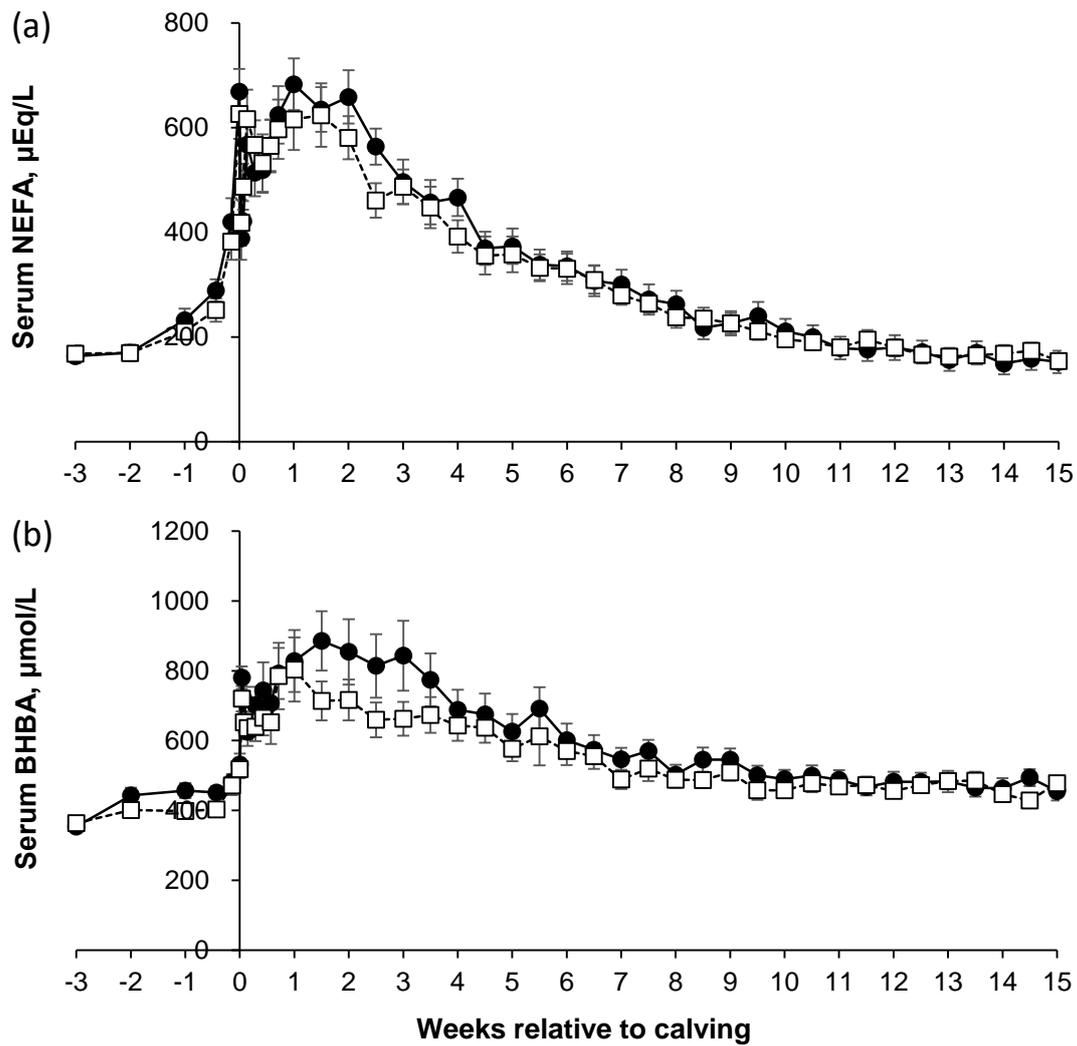


Figure 9. Serum nonesterified fatty acid (NEFA; a) and  $\beta$ -hydroxybutyric acid (BHBA; b) during the peripartum period (-3 to 15 w relative to calving; means  $\pm$  SEM) in the control group ( $\square$ ; n = 37) and the group supplemented with difructose anhydride III (DFA,  $\bullet$ ; n = 37).

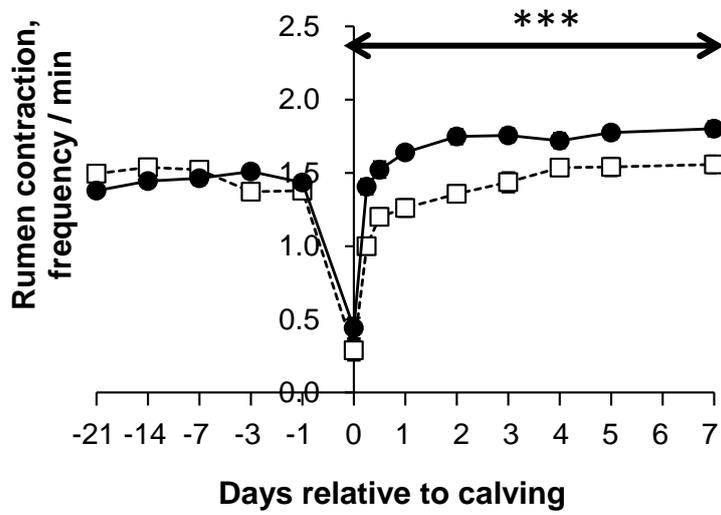


Figure 10. The frequency of rumen contractions during the peripartum period (-21 to 7 d relative to calving; means  $\pm$  SEM) in the control group ( $\square$ ; n = 37) and the group supplemented with difructose anhydride III (DFA,  $\bullet$ ; n = 37). \*\*\* indicate significant differences between the groups during the postpartum period (0 h to d 21;  $P < 0.001$ ).

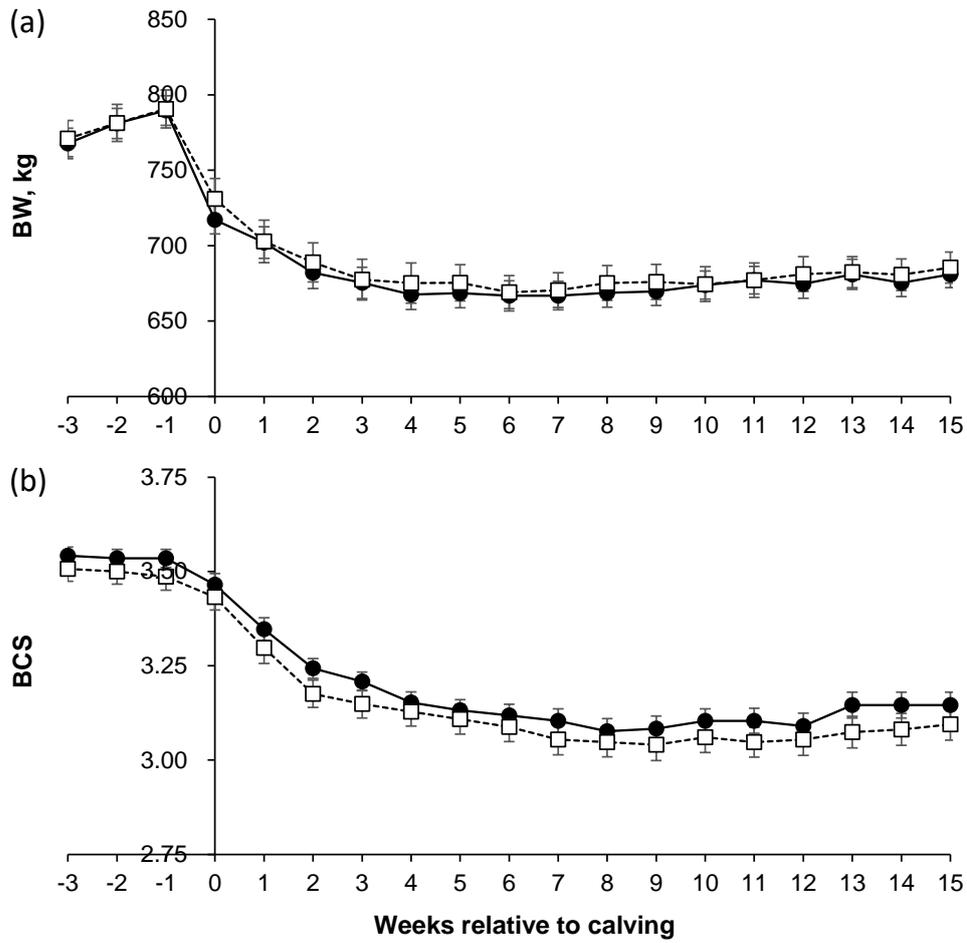


Figure 11. Body weight (BW) and body condition scores (BCS) during the peripartum period (-3 to 15 wk relative to calving; means  $\pm$  SEM) in the control group ( $\square$ ; n = 37) and the group supplemented with difructose anhydride III (DFA,  $\bullet$ ; n = 37).

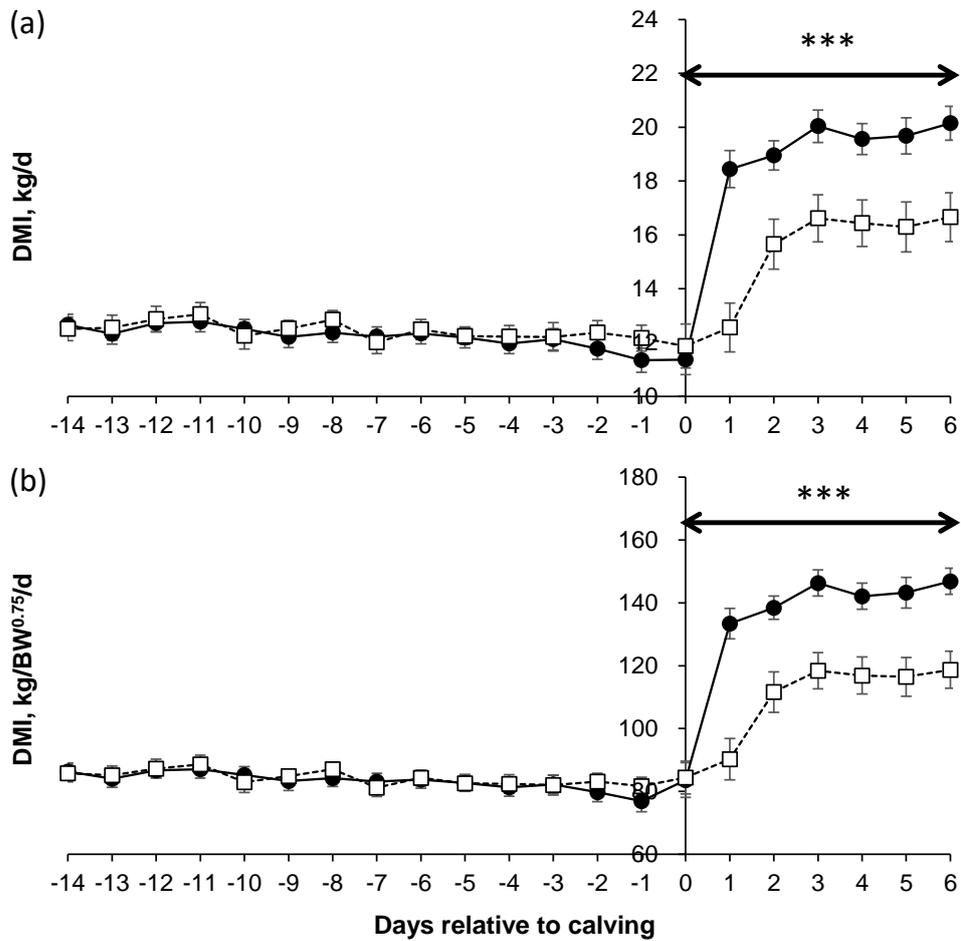


Figure 12. Dry matter intake (DMI; a) and DMI per metabolic body weight (b) during the peripartum period (−21 to 6 d relative to calving; means ± SEM) in the control group (□; n = 37) and the group supplemented with difructose anhydride III (DFA, ●; n = 37). \*\*\* indicate significant differences between the groups during the postpartum period (0 h to d 21; P < 0.001).

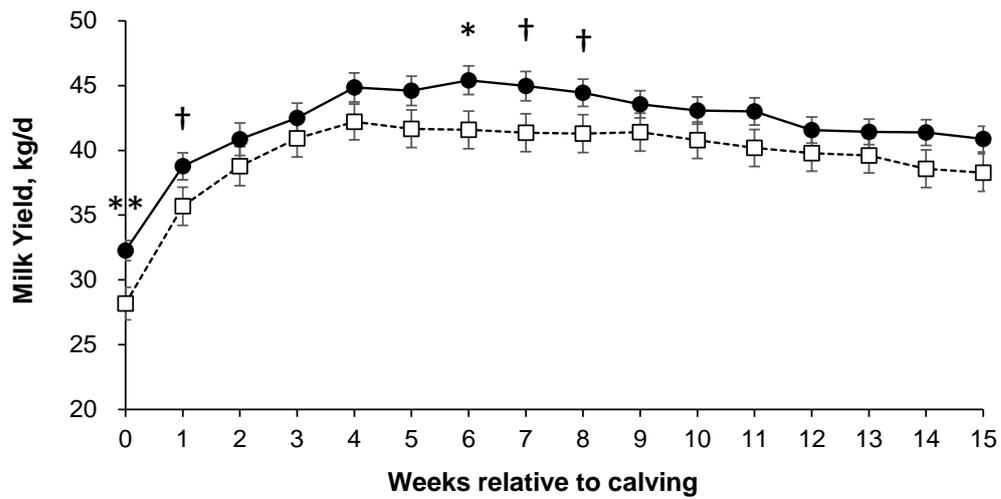


Figure 13. Milk Yield during the postpartum period (0 to 15 w relative to calving; means  $\pm$  SEM) in the control group ( $\square$ ; n = 37) and the group supplemented with difructose anhydride III (DFA,  $\bullet$ ; n = 37). \*\*, \*, and † indicate significant differences between the groups during the postpartum period (\*\*P < 0.01; \*P < 0.05; and † P < 0.10).

Table 8. Milk component yields and percentages in the control and DFA (supplemented with difructose anhydride III) groups during 1 week postpartum period.

| Item                                  | Group   |      | SEM  | P-value |       |                  |
|---------------------------------------|---------|------|------|---------|-------|------------------|
|                                       | Control | DFA  |      | Groups  | Time  | G×T <sup>1</sup> |
| Milk, kg/d                            | 27.2    | 31.6 | 0.8  | <0.01   | <0.01 | 0.38             |
| Fat, %                                | 5.25    | 5.16 | 0.09 | 0.02    | <0.01 | 0.39             |
| Fat, kg/d                             | 1.43    | 1.67 | 0.04 | 0.02    | <0.01 | 0.42             |
| Protein, %                            | 5.10    | 4.67 | 0.09 | 0.03    | <0.01 | 0.44             |
| Protein, kg/d                         | 1.28    | 1.43 | 0.04 | 0.03    | <0.01 | 0.23             |
| Lactose, %                            | 4.01    | 4.10 | 0.03 | 0.35    | <0.01 | 0.18             |
| 4% FCM, <sup>2</sup> kg/d             | 32.1    | 37.0 | 0.9  | <0.01   | <0.01 | 0.68             |
| NE <sub>L</sub> , <sup>2</sup> Mcal/d | 24.7    | 28.2 | 0.7  | 0.01    | <0.01 | 0.58             |

<sup>1</sup> Interaction between the groups and time.

<sup>2</sup> Calculated using a formula from NRC (2001).

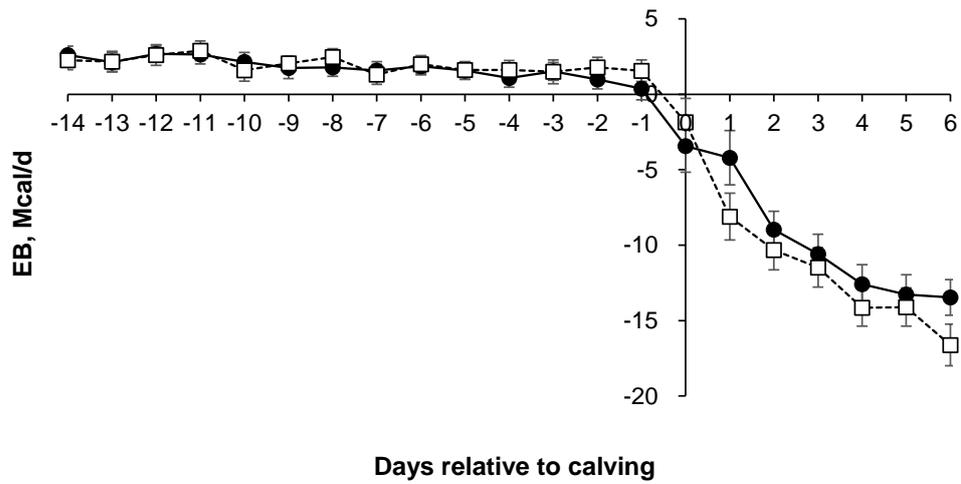


Figure 14. Energy balance (EB) during the peripartum period (-21 to 6 d relative to calving; means  $\pm$  SEM) in the control group ( $\square$ ; n = 37) and the group supplemented with difructose anhydride III (DFA,  $\bullet$ ; n = 37).

Table 9. The time required for the recovery of reproductive performances and incidences of peripartum disease.

| Item  | Treatment      |                  | P-value |
|---|----------------|------------------|---------|
|   | Control        | DFA <sup>1</sup> |         |
| Date of the recovery of reproductive performance, days postpartum |                |                  |         |
| Resumption of ovarian activity <sup>2</sup> , days postpartum     | 32.2 (n = 37)  | 33.8 (n = 37)    | 0.666   |
| Uterine involution <sup>3</sup> , weeks postpartum                | 5.6 (n = 25)   | 5.0 (n = 24)     | 0.413   |
| Incidences of peripartum disease, % (no. of cases / no. of cows)  |                |                  |         |
| Milk fever <sup>4</sup>   | 24.3 (9 / 37)  | 8.1 (3 / 37)     | 0.054   |
| Subclinical hypocalcemia <sup>5</sup>                             | 62.2 (23 / 37) | 40.5 (15 / 37)   | 0.062   |
| Retained placenta <sup>6</sup>                                    | 41.7 (15 / 36) | 20.6 (7 / 34)    | 0.042   |
| Subclinical ketosis <sup>7</sup>                                  | 13.5 (5 / 37)  | 24.3 (9 / 37)    | 0.233   |
| Endometritis <sup>8</sup>   | 80.0 (20 / 25) | 62.5 (15 / 24)   | 0.173   |

<sup>1</sup> Supplemented with difructose anhydride III.

<sup>2</sup> Serum progesterone first exceeded 1 ng/ml (Stevenson and Britt, 1979)

<sup>3</sup> Metricheck score becomes 1 (clear).

<sup>4</sup> Serum Ca <5.5 mg/dl (Goff and Horst, 1997).

<sup>5</sup> Serum Ca <7.5 mg/dl (Goff and Horst, 1997).

<sup>6</sup> Failed to release their fetal membranes >12 h postpartum (Fourichon et al., 2000), but exclude twins (Echternkamp & Gregory, 1999).

<sup>7</sup> Serum BHBA >1400 µmol/L (Carrier et al., 2004)

<sup>8</sup> Metricheck score >1 until 3 weeks postpartum (Sheldon et al., 2006).

### 第3節

#### 小括

本章では、骨からの Ca 動員ならびに腸管における能動的な Ca 吸収がうまく機能しないとされる分娩後早期において、分娩牛への DFAIII 給与が、腸管からの受動的な Ca 吸収を促進し、血清 Ca 濃度を早期回復させる可能性があること、またその血清 Ca 濃度の早期回復は分娩後における消化管運動ならびに DMI を有意に高める可能性を示唆した。

## 第4章 総合考察

低 Ca 血症は起立不能などの直接的な臨床被害をもたらすだけでなく、間接的に乳房炎や第四胃変位、胎盤停滞、ケトosisなどの疾病を誘発するため、泌乳牛の生産性を著しく低下させる疾病である (Curtis ら, 1983)。低 Ca 血症の病態が明らかになり、様々な予防方法が提案された現在においても、未だに経産牛の約半数で潜在性を含めた低 Ca 血症が発生しており (Horst ら, 2003; Reinhardt ら, 2011)、提案されてきた種々の低 Ca 血症予防方法では十分な予防効果が得られているとは言えない。また、現時点で最も効果的とされ、米国で主流となっている陰イオン塩給与による飼料の DCAD 値の低減 (Block, 1984; Fredeen ら, 1988) も、使用する陰イオン塩の嗜好性が良くないことや飼料設計が煩雑であることから、日本では普及しているとは言えず、未だに低 Ca 飼料の給与 (Boda と Cole, 1954; Goings ら, 1974; Green ら, 1981) を実施している酪農家は多い。そういったことから、より省力的かつ効果的な低 Ca 血症予防方法の提案が求められている。

DFA III はフラクトース 2 分子が結合した難消化性のオリゴ糖で、齧歯類を用いた調査によって DFA III は小腸上皮細胞間隙にある TJ タンパクの一つであるクローディン-1 に作用し、濃度勾配を利用した受動的な Ca 吸収を促進することが報告されている (Suzuki ら, 1998; Mineo ら, 2002; Suzuki と Hara, 2004, 2006)。この Ca 吸収経路は低 Ca 血症のリスクファクターの上位に位置する加齢による 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 受容体数減少 (Horst ら, 1990)、すなわち能動的な Ca 吸収能力低下の影響を受けない経路であることから、より効果的な低 Ca 血症の予防方法となる可能性が考えられる。そこで当研究グループでは、DFA III の乳牛への応用を目的に 2005 年より検討を行ってきた。これまでに DFA III は乳牛のルーメン内微生物に分解されにくく (佐藤ら, 2006)、経口投与した DFA III が十二指腸から検出されること (中井ら, 2007)、乾乳後期乳牛への DFA III 給与は分娩時の血中 Ca 濃度の低下を予防し (佐藤ら, 2007a)、周産期疾病発症率を低減することを報告している (佐藤ら, 2007b)。しかしながら、乳牛における DFA III の給与効果に関する先行研究 (佐藤ら, 2007a; 2007b) では、乳牛への DFA III の“給与”と分娩後の血清 Ca 濃度などの“結果”の検証にとどまっており、給与効果の肝である腸管における受動的な Ca 吸収促進については未検証で、齧歯類における先行研究の引用でカバーしている部分が多いことから、十分に明らかではなかった。そこで本研究では、乳牛に対する DFA III の給与効果を明確にすることを目的に種々の検討を行った。

まず、DFA III の乳牛における給与効果をより明確に示すためには、乳牛に給与した DFA III が DFA III のまま主要な Ca 吸収部位とされる十二指腸に到達すること、ならびに乳牛の十二指腸において DFA III が受動的な Ca 吸収を促進することを示す必要があると考えられる。そこで本研究では、乳牛における DFA III の十二指腸到達率および DFA III がウ

シ十二指腸における受動的な Ca 吸収に及ぼす影響を検討し、中井ら (2007) の先行研究と同様にルーメン内に投与した DFA III は速やかにルーメン内の液相に溶解し、DFA III のまま十二指腸に到達していることを確認し、さらにその到達率は約 70 %であることを初めて示した。このような DFA III の高い十二指腸到達率は、DFA III の加水分解に必要な酵素が非常に特異的である (Sakurai ら, 1997) ことによるルーメン内微生物に非常に分解されにくい特徴 (佐藤ら, 2006) に加えて、速やかにルーメン内の液相に溶解することによる非常に速いルーメン流出速度が影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに、DFA III がウシ十二指腸における受動的な Ca 吸収に及ぼす影響を、ウシ十二指腸反転腸管標本を用いて検討した結果、DFA III はラット腸管を用いた先行研究 (Suzuki ら, 1998) と同様、ウシ十二指腸においても受動的な Ca 吸収を促進する可能性があることを示唆した。

十二指腸における受動的な Ca 吸収は濃度勾配を利用した拡散である (Bronner, 1987) ため、DFA III は加齢によって十二指腸上皮細胞の  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$  受容体数が減少し (Horst ら, 1990)、能動的な Ca 吸収能力の低下した高産次牛においても効果が期待できる。しかしながら前述のとおり、乾乳後期乳牛への DFA III 給与は、分娩時の血中 Ca 濃度の低下を予防することが報告されている (佐藤ら, 2007) もの、分娩牛において DFA III が直接的に関与すると考えられる腸管からの受動的な Ca 吸収の促進を示した報告はなかった。そこで、分娩牛への DFA III 給与が腸管における受動的な Ca 吸収の促進を明らかにすることを目的に、飼養試験を行った。しかし、生体において腸管からの受動的な Ca 吸収を直接的に示す指標となるものがないことから、分娩前後における腸管からの能動的な Ca 吸収 Ca 代謝に関わるホルモン [PTH および  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ ] ならびに骨からの Ca 動員を示す骨代謝マーカー (NTX) の推移から間接的に示唆することを試みた。その結果、本試験においても多くの先行研究 (Liesegang ら, 2000, 2007; Moreira ら, 2009; Taylor ら, 2009) と同様、分娩後 72 時間において血清 NTX 濃度の有意な上昇は認められず分娩後早期の骨からの Ca 動員は抑制状態にあったこと、なおかつ血清 PTH および  $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$  濃度は分娩後早期に正常に上昇していたにもかかわらず DFA III 無給与牛で血清 Ca 濃度の回復が遅く、腸管における能動的な Ca 吸収は機能不全状態であったことが示唆された。一方、分娩前後に DFA III を給与した牛で無給与牛に比べ分娩後早期の血清 Ca 回復が有意に早かったことから、DFA III 給与が分娩後早期の腸管における受動的な Ca 吸収を促進した可能性を、実際の分娩牛を用いて初めて示した。つまり、DFA III 給与によって加齢の影響を受けない経路における Ca 吸収を促進し、低 Ca 血症発症率の高まる高産次牛 (NRC, 2001) においても効果が期待できる可能性が示された。

また、DFA III 給与により分娩後血清 Ca 濃度の早期回復が認められたことから、分娩直後の低 Ca 血症を発端とする様々な産後疾病の予防、さらには繁殖成績改善に DFA III の有効性が期待された。そこで、分娩前後乳牛への DFA III 給与による低 Ca 血症の予防および改善が分娩後の DMI およびエネルギー充足、卵巣機能回復および子宮修復に及ぼす影響を

検討した。その結果、DFA III 給与による分娩後に低下した血清 Ca 濃度の早期回復は、分娩後早期の消化管運動および DMI の増加、胎盤停滞発症率の減少をもたらしたが、同時に乳量の増加も観察されたため分娩後のエネルギー充足の改善は認められず、卵巢機能回復や子宮修復にも明らかな改善効果は認められなかった。一方、DFA III を給与した牛で無給与牛に比べて、分娩後の乳量が有意に増加したにもかかわらずエネルギー充足に差が認められなかった、胎盤停滞発症率が有意に減少したという結果は、酪農経営上非常に有益なことと考えられる。また本研究において、分娩後早期における僅か数十時間の血清 Ca 濃度回復の遅れが、その後の乳牛の生産性に非常に大きな影響を及ぼし続ける可能性が強く示唆されたが、そのメカニズムについては本研究では明らかにすることはできなかった。

以上の結果より、DFA III は齧歯類での成績と同様に、分娩後乳牛の十二指腸における受動的な Ca 吸収を促進することが実証された、とりわけ、加齢に伴って 1,25-(OH)<sub>2</sub>D 受容体数が減少し低 Ca 血症の発症リスクの高まる高産次牛において、簡便かつ安全に低 Ca 血症の予防および改善効果が期待できる可能性が示唆された。

本論文の一部は以下に公表した。

- ・ Teramura, M., T. Nakai, M. Itoh, T. Sato, M. Ohtani, C. Kawashima, and M. Hanada. 2015a. Diffructose anhydride III promotes calcium absorption from the duodenum in cattle. *Journal of Dairy Science*. 98: 2533-2538.
- ・ Teramura, M., S. Wynn, M. Reshalaitihan, W. Kyuno, T. Sato, M. Ohtani, C. Kawashima, and M. Hanada. 2015b. Supplementation with diffructose anhydride III promotes passive calcium absorption in the small intestine immediately after calving in dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 98: 8688-8697.

## 謝辞

本論文をまとめるにあたり、終始懇切なるご指導を賜りました弘前大学 農学生命科学部 畜産学教室 松崎正敏教授、鈴木裕之教授に深く感謝致します。また、本研究の遂行および本論文をまとめるにあたり、終始懇切なるご指導とご協力を賜りました帯広畜産大学 畜産生命科学研究部門 家畜生産科学分野 花田正明准教授、同畜産フィールド科学センター 川島千帆准教授に深謝致します。さらに、本研究の遂行にあたり、終始多大なるご協力をいただきました帯広畜産大学 畜産フィールド科学センター 木田克弥教授、同基礎獣医学研究部門 病態予防学分野 古岡秀文教授、同臨床獣医学部門 産業動物獣医療学分野 伊藤めぐみ助教、同畜産フィールド科学センター職員の皆様、北海道総合研究機構 畜産試験場 職員の皆様、岩手大学大学院 連合農学研究科 寒冷圏生命システム学専攻 Syaw Wynn さん、Reshalaitihan Maimaiti さん、Aung Htun さん、本田利彦さん、花田正明研究室の学生諸氏に深謝致します。また、本研究の機会を与えていただき、ご指導ご鞭撻を賜りました日本甜菜製糖株式会社 総合研究所ならびに飼料事業部の皆様に心より深謝申し上げます。

## 引用文献

- Association of Official Analytical Chemists. 2003. *Official Methods of Analysis*. 17th ed. AOAC, Arlington, VA.
- Beam, S. W., and W. R. Butler. 1997. Energy balance and ovarian follicle development prior to the first ovulation postpartum in dairy cows receiving three levels of dietary fat. *Biol Reprod.* 56:133-142.
- Beam, S. W., and W. R. Butler. 1999. Effect of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cow. *J. Reprod Fertil Suppl.* 54:411-424.
- Block, E. 1984. Manipulating dietary anions and cations for prepartum dairy cows to reduce incidence of milk fever. *J. Dairy Sci.* 67:2939-2948.
- Boda, J. M., and H. H. Cole. 1954. The influence of dietary Calcium and phosphorus on the incidence of milk fever in dairy cattle. *J Dairy sci.* 37:360-372.
- Bronner, F. 1987. *Physiology of the gastrointestinal tract*. L. R. Johnson (Ed), Second Edition, 1419-1435, Raven, New York.
- Bronner, F. 1998. Calcium absorption—A paradigm for mineral absorption. *J. Nutr.* 128:917–920.
- Bushinsky, D. A. 1996. Metabolic alkalosis decreases bone calcium efflux by suppressing osteoclasts and stimulating osteoblasts. *Am J Physiol.* 271: F216-222.
- Butler, W. R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci.* 60-61:449-457.
- Carrier, J., S. Stewart, S. Godden, J. Fetrow, and P. Rapnicki. 2004. Evaluation and use of three cow-side tests for detection of subclinical ketosis in early postpartum cows. *J. Dairy Sci.* 87:3725-3735.
- Charbonneau, E., D. Pellerin, and G. R. Oetzel. 2006. Impact of lowering dietary cation-anion difference in nonlactating dairy cows: a meta-analysis. *J. Dairy Sci.* 89:537–548.
- Ching, S. V., M. J. Fettman, D. W. Hamar, L. A. Nagode, and K. R. Smith. 1989. The effect of chronic dietary acidification using ammonium chloride on acid-base and mineral metabolism in the adult cat. *J. Nutr.* 119:902-915.
- Claude, P. 1978. Morphological factors influencing transepithelial permeability: A model for the resistance of the Zonula Occludens. *J. Memb. Biol.* 39:219-232.
- Coblentz, W. K., P. C. Hoffman, and N. P. Martin. 2010. Effects of spontaneous heating on forage protein fractions and in situ disappearance kinetics of crude protein for alfalfa-orchardgrass hays packaged in large round bales. *J. Dairy Sci.* 93:1148–1169.
- Constable, P. D., G. St Jean, B. L. Hull, D. M. Rings, and G. F. Hoffsis. 1991. Prognostic

- value of surgical and postoperative findings in cattle with abomasal volvulus. *J Am Vet Med Assoc.* 199:892-898.
- Curtis, C. R., H. N. Erb, C. J. Sniffen, R. D. Smith, P. A. Powers, M. C. Smith, M. E. White, R. B. Hillman, and E. J. Pearson. 1983. Association of parturient hypocalcemia with eight periparturient disorders in Holstein cows. *JAVMA* 183:559-561.
- DeGaris, P. J., and I. J. Lean. 2009. Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles. *Vet. J.* 176:58-69.
- Edmonson, A. J., I. J. Lean, L. D. Weaver, T. Farver, and G. Webster. 1989. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72:68-78.
- Ender, F., I. W. Dishington, and A. Helgebostad. 1971. Calcium balance studies in dairy cows under experimental induction and prevention of hypocalcaemic paresis puerperalis. *Z. Tierphysiol. Tierer.* 28:233-256.
- Fourichon, C., H. Seegers, and X. Malher. 2000. Effect of disease on reproduction in the dairy cow: a meta-analysis. *Theriogenology.* 53:1729-1759.
- Fredeen, A. M., E. J. DePeters, and R. L. Baldwin. 1988. Effects of acid-base disturbances caused by differences in dietary fixed ion balance on kinetics of calcium metabolism in ruminants with high calcium demand. *J. Anim. Sci.* 66:159-173.
- Ganong, W. F. 1998. Review of medical physiology 18th ed. Appletton & Lange, U.S.
- Goff, J. P., T. A. Reinhardt, and R. L. Horst. 1989. Recurring hypocalcemia of bovine parturient paresis is associated with failure to produce 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology.* 125: 49-53.
- Goff, J. P., and R. L. Horst. 1990. Effect of subcutaneously released 24F-1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on incidence of parturient paresis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73:406-412.
- Goff, J. P., R. L. Horst, F. J. Mueller, J. K. Miller, G. A. Kiess, and H. H. Dowlen. 1991. Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25-dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever. *J. Dairy Sci* 74: 3863-3871.
- Goff, J. P., and R. L. Horst. 1993. Oral administration of calcium salts for treatment of hypocalcemia in cattle. *J. Dairy Sci.* 76:101-108.
- Goff, J. P., R. L. Horst, P. W. Jardon, C. Borelli, and J. Wedam. 1996. Field trials of an oral calcium propionate paste as an aid to prevent milk fever in periparturient dairy cows. *J Dairy Sci.* 79:378-383.
- Goff, J. P., and R. L. Horst. 1997. Effects of the addition of potassium or sodium, but not

- calcium, to prepartum ratios on milk fever in dairy cows. *J Dairy Sci.* 80: 176-186.
- Goff, J. P., 2006. Macromineral physiology and application to the feeding of the dairy cow for prevention of milk fever and other periparturient mineral disorders. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126:237-257.
- Goff, J. P. 2008. The monitoring, prevention, and treatment of milk fever and subclinical hypocalcemia in dairy cows. *Vet. J.* 176:50–57.
- Goff, J. P., A. Liesegang, and R. L. Horst. 2014. Diet-induced pseudohypoparathyroidism: A hypocalcemia and milk fever risk factor. *J. Dairy Sci.* 97:1520-1528.
- Goff, J. P. 2014. Calcium and magnesium disorders. *Vet Clin Food Anim* 30:359–381.
- Goings, R. L., N. L. Jacobson, D. C. Beitz, E. T. Littledike, and K. D. Wiggers. 1974. Prevention of parturient paresis by a prepartum, calcium-deficient diet. *J. Dairy Sci.* 57:1184-1188.
- Green, H. B. R. L. Horst, and D. C. Beiz. Vitamin D metabolites in plasma of cows fed a prepartum low-calcium diet for prevention of parturient hypocalcemia. 1981. *J. Dairy Sci.* 64:217-226.
- Hansen, S. S., P. Norgaard, C. Pederson, R. J. Jorgensen, L. S. B. Mellau, and J. D. Enemark. 2003. The Effect of Subclinical Hypocalcaemia Induced by Na<sub>2</sub>EDTA on the Feed Intake and Chewing Activity of Dairy Cows. *Vet. Res. Commun.* 27:193-205.
- Hibbs, J. W., and W. D. Pounden, 1955. Studies on milk fever in dairy cows. IV. Prevention by short-time, prepartum feeding of massive doses of Vitamin D. *J. Dairy Sci.* 38:65-72.
- Horst, R. L., N. A. Jorgensen, and H. F. DeLuca. 1978. Plasma 1,25-dihydroxyvitamin D and parathyroid hormone levels in parturient dairy cows. *Am J Physiol.* 235: E634-637.
- Horst, R. L. 1986. Regulation of calcium and phosphorus homeostasis in the dairy cow. *J. Dairy Sci.* 69:604-616.
- Horst, R. L., J. P. Goff, and T. A. Reinhardt. 1990. Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor. *Endocrinology.* 126:1053-1057.
- Horst, R. L., J. P. Goff, and B. J. McClusky. 2003. Prevalence of subclinical hypocalcemia in US dairy operations. *J. Dairy Sci.* 86 (suppl. 1):247.
- Horst, R. L., J. P. Goff, T. A. Reinhardt, and D. R. Buxton. 1997. Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 80:1269-1280.
- Howard, A., S. Legon, and J. R. F. Walters, 1993. Human and rat intestinal plasma membrane calcium pump isoforms. *Am. J. Physiol.* 265:G917-925.

- Joyce, P. W., W. K. Sanchez, and J. P. Goff. 1997. Effect of Anionic Salts in Prepartum Diets Based on Alfalfa. *J. Dairy Sci.* 80:2866–2875.
- Kawashima, C., S. Fukihara, M. Maeda, E. Kaneko, CA. Montoya, M. Matsui, T. Shimizu, N. Matsunaga, K. Kida, Y. Miyake, D. Schams, and A. Miyamoto. 2007. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction.* 133:155-163.
- Kikuchi, H., T. Nagura, M. Inoue, T. Kishida, H. Sakurai, A. Yokota, K. Asano, F. Tomita, K. Sayama, and Y. Senba. 2004. Physical, chemical and physiological properties of difructose anhydride III produced from inulin by enzymatic reaction. *J. Appl. Glycosci.* 51:291–296.
- Kishi, K., T. Goda, and S. Takase. 1996. Maltitol increase transepithelial diffusional transfer of calcium in rat ileum. *Life Science.* 59:1133-1140.
- Koenig, K. M., L. M. Rode, C. D. Knight, and M. Vázquez-Añón. 2002. Rumen degradation and availability of various amounts of liquid methionine hydroxy analog in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 85:930-938.
- 小山毅. 2012. 超音波画像診断による牛の子宮修復評価の試み. *北海道獣医師会雑誌.* 56:10-15.
- Kozakai, T., K. Katoh, and Y. Sasaki. 1999. Effect of mucosal ions on calcium absorption in the jejunum-ileum of the goat in vitro. *Anim. Sci. J.* 70:526-534.
- Kurosaki, N., O. Yamato, F. Mori, S. Imoto, and Y. Maede. 2007. Preventive effect of mildly altering dietary cation-anion difference on milk fever in dairy cows. *J. Vet Med Sci.* 69:185-192.
- Liesegang, A., R. Eicher, M. L. Sassi, J. Risteli, M. Kraenzlin, J. L. Riond, and M. Wanner. 2000. Biochemical markers of bone formation and resorption around parturition and during lactation in dairy cows with high and low standard milk yields. *J. Dairy Sci.* 83:1773–1781.
- Liesegang, A., C. Chiappi, J. Risteli, J. Kessler, and H. D. Hess. 2007. Influence of different calcium contents in diets supplemented with anionic salts on bone metabolism in periparturient dairy cows. *J. Anim Physiol and Anim Nutri.* 91:120-129.
- Martinez, N., L. D. P. Sinedino, R. S. Bisinotto, E. S. Ribeiro, G. C. Gomes, F. S. Lima, L. F. Greco, C. A. Risco, K. N. Galvão, D. Taylor-Rodriguez, J. P. Driver, W. W. Thatcher, and J. E. P. Santos. 2014. Effect of induced subclinical hypocalcemia on physiological responses and neutrophil function in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97:874–887.

- Matsumoto, D., M. Takagi, H. Hasunuma, Y. Fushimi, M. Ohtani, T. Sato, K. Okamoto, F. Shahada, T. Tanaka, and E. Deguchi. 2009. Effects of oral administration of difructose anhydride III on selected health and blood parameters of group-housed Japanese black calves during the preweaning period. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22:1640-1647.
- Minamida, K., M. Kaneko, M. Ohashi, I. N. Sujaya, T. Sone, M. Wada, A. Yokota, H. Hara, K. Asano, and F. Tomita. 2005. Effect of difructose anhydride III (DFA III) administration on bile acid and growth of DFA III-assimilating bacterium *Ruminococcus productus* on rat intestine. *J. Biosci. Bioeng.* 99:548-554.
- Minamida, K., C. Asakawa, I. N. Sujaya, M. Kaneko, A. Abe, T. Sone, H. Hara, K. Asano, and F. Tomita. 2006. Effects of long-term ingestion of difructose anhydride III (DFA III) on intestinal bacteria and bile acid metabolism in humans. *J. Biosci. Bioeng.* 101:149-156.
- Mineo, H., H. Hara, N. Shigematsu, Y. Okuhara, F. Tomita. 2002. Melibiose, Difructose anhydride III and difructose Anhydride IV enhance net calcium absorption in rat small and large intestinal epithelium by increasing the passage of tight junctions in vitro. *J. Nutri.* 131:3243-3246.
- Moreira, V. R., L. K. Zeringue, C. C. Williams, C. Leonardi, and M. E. McCormick. 2009. Influence of calcium and phosphorus feeding on markers of bone metabolism in transition cows. *J. Dairy Sci.* 92:5189-5198.
- Muller, L. D., and M. J. Owens. 1974. Factors Associated with the Incidence of Retained Placentas. *J. Dairy Sci.* 57:725-728.
- 中井朋一, 村田暁, 菊地裕人, 佐藤忠, 佐渡谷裕朗, 大谷昌之, 花田正明, 岡本明治. 2007. 去勢牛に給与した Difructose Anhydride III の十二指腸内容物中における検出. *日本畜産学会報.* 78:57-61.
- National Research Council. 2001. *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th rev. ed. Natl. Acad. Sci., Washington, DC.
- 農林水産省経営局保険課. 2015. 平成 27 年度家畜共済統計表. 農林水産省経営局, 東京.
- Nurmio, P. 1972. Oral administration of calcium salts as an adjunct to parenteral therapy of milk fever, *Nord Vet Med*, 24, 544-552.
- Oetzel, G. R., J. D. Olson, C. R. Curtis, and M. J. Fettman. 1988. Ammonium chloride and ammonium sulfate for prevention of parturient paresis in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 71:3302-3309.
- Oetzel, G. R. 1991. Meta-analysis of nutritional risk factors for milk fever in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 74:3900-3912.

- 大浪洋二, 大野みつ江, 村上ちか子, 菊池元宏, 大沼秀男. 1994. 乳牛における分娩後の Ca 剤静脈注射が子宮修復に及ぼす影響. 東北家畜臨床研究会誌. 17:86-91.
- Pansu, D., C. Bellaton, and F. Bronner. 1981. Effect of Ca intake on saturable and nonsaturable components of duodenal Ca transport. *Am J Physiol.* 240:G32-7.
- Perret, C., C. Desplan, and M. Thomasset. 1985. Cholecalciferol (a 9-Da cholecalciferol-induced calcium-binding protein) messenger RNA: distribution and induction by calcitriol in the rat digestive tract. *Eur. J. Biochem.* 150:211-217.
- Penner, G. B., G. F. Tremblay, T. Dow, and M. Oba. 2008. Timothy hay with a low dietary cation-anion difference improves calcium homeostasis in periparturient Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 91: 1959–1968.
- Phillippo, M. G., W. Reid, and I. M. Nevison. 1994. Parturient hypocalcaemia in dairy cows: effects of dietary acidity on plasma minerals and calciotropic hormones. *Res Vet Sci.* 56: 303–309.
- Pothmann, H., I. Prunner, K. Wagener, M. Jaureguiberry, RL. de la Sota, R. Erber, Aurich, M. Ehling-Schulz, M. Drillich. 2015. The prevalence of subclinical endometritis and intrauterine infections in repeat breeder cows. *Theriogenology.* 8. 1249-1253.
- Rabelo, E., R. L. Rezende, S. J. Bertics, and R. R. Grummer. 2003. Effects of transition diets varying in dietary energy density on lactation performance and ruminal parameters of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 86:916–925.
- Ramberg C.F. Jr., E. K. Jhomson, R. D. Fargo, and D. S. Kronfeld. 1984. Calcium homeostasis in cows, with special reference to parturient hypocalcemia. *Am J Physiol.* 246:R698-704.
- Reinhardt, T. A., J. D. Lippolis, B. J. McCluskey, J. P. Goff, and R. L. Horst. 2011. Prevalence of subclinical hypocalcemia in dairy herds. *Vet. J.* 188:122-124.
- Ray, P. P., J. Jarrett, and K. F. Knowlton. 2013. Effect of dietary phytate on phosphorus digestibility in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:1156-1163.
- Sakurai, H., A. Yokota, Y. Sumita, Y. Mori, H. Matsui, and F. Tomita. 1997. Metabolism of DFA III by *Arthrobacter* sp. H65-7: purification and properties of a DFA III hydrolysis enzyme (DFA IIIase). *Biosci. Biotech. Biochem.* 61:989-993.
- Saito, K., and F. Tomita. 2000. Diffructose anhydrides: Their mass-production and physiological function. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64:1321-1327.
- 佐藤忠, 菊地裕人, 中井朋一, 佐渡谷裕朗, 花田正明, 岡本明治. 2006. 第一胃微生物による Diffructose Anhydride III の分解性. *日本畜産学会報.* 77:395-399.
- 佐藤忠, 中井朋一, 佐渡谷裕朗, 大谷昌之, 花田正明, 岡本明治. 2007a. 乳牛の分娩時低カルシウム血症に及ぼす Diffructose Anhydride III の効果. *日本畜産学会報.* 78: 37-43.

- 佐藤忠, 大谷昌之, 中井朋一, 佐渡谷裕朗, 花田正明, 岡本明治. 2007b. 乳牛の分娩前後へのカルシウムと Difructose Anhydride III (DFA III) 給与が血中カルシウム濃度と周産期疾病の発生に与える影響. 日本家畜臨床学会誌. 30:31-38.
- Sato, T., M. Hanada, M. Ohtani, T. Nakai, M. Teramura, H. Sadoya, T. Takahashi, and A. Hongo. 2012. Effect of difructose anhydride III on serum immunoglobulin G concentration in newborn calves. *J. Dairy Sci.* 95:5336-5339.
- Schonewille, T., A. T. Van't Klooster, H. Wouterse, and A. C. Beynen. 1999. Hypocalcemia Induced by Intravenous Administration of Disodium Ethylenediaminetetraacetate and its Effects on Excretion of Calcium in Urine of Cows Fed a High Chloride Diet. *J Dairy Sci* 82: 1317–1324
- Seo, S., C. Lanzas, L. O. Tedeschi, and D. G. Fox. 2007. Development of a Mechanistic Model to Represent the Dynamics of Liquid Flow Out of the Rumen and to Predict the Rate of Passage of Liquid in Dairy Cattle. *J. Dairy Sci.* 90:840-855
- Sheldon, I. M., G. S. Lewis, S. LeBlanc, and R. O. Gilbert. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology.* 65:1516-1530.
- Shire, J. A., and D. K. Beede. 2013. DCAD revisited: Prepartum use to optimize health and lactational performance. Southwest Dairy Nutrition and Management Conf., Tempe, AZ:1-11.
- Stevenson, J. S., and J. H. Britt. 1979. Relationship between ovarian activity and estradiol, progesterone, glucocorticoids, milk yield, body weight and postpartum ovarian activity in Holstein cows. *J. Anim Sci.* 48:570-577.
- Suzuki, T., H. Hara, T. Kasai, and F. Tomita. 1998. Effects of difructose anhydride III on calcium absorption in small and large intestines of rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 62:837-841.
- Suzuki, T., and H. Hara. 2004. Various nondigestible saccharides open a paracellular calcium transport pathway with the induction of intracellular calcium signaling in human intestinal Caco-2 cells. *J. Nutr.* 134:1935-1941.
- Suzuki, T., and H. Hara. 2006. Difructose anhydride III and sodium caprate activate paracellular transport via different intracellular events in Caco-2 cells. *Life Science.* 79:401-410.
- Takagi, M., H. Hasunuma, D. Matsumoto, T. Obi, K. Takase, M. Ohtani, T. Sato, U. Watanabe, K. Okamoto, T. Tanaka, C. Tshering, and E. Deguchi. 2011. Effect of daily oral administration of difructose anhydride III on health status, blood parameters and faecal shedding of coliform bacteria of Japanese black calves during the pre-weaning period. *Animal Nutrition and Feed Technology* 11:147–158.

- Taylor, M. S., K. F. Knowlton, M. L. McGilliard, W. S. Swecker, J. D. Ferguson, Z. Wu, and M. D. Hanigan. 2009. Dietary calcium has little effect on mineral balance and bone mineral metabolism through twenty weeks of lactation in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 92:223–237.
- Thilsing, T., R. J. Jørgensen, and H. D. Poulsen. 2006. In vitro binding capacity of zeolite A to calcium, phosphorus and magnesium in rumen fluid as influenced by changes in pH. *J. Vet. Med.* 53:57–64.
- Thilsing-Hansen, T., R. J. Jørgensen, M. D. Enemark, and T. Larsen. 2002. The effect of zeolite A supplementation in the dry period on periparturient calcium, phosphorus, and magnesium homeostasis. *J. Dairy Sci.* 85:1855-1862.
- Udén, P., P. E. Colucci, and P. J. Van Soest. 1980. Investigation of chromium, cecum and cobalt as markers in digesta. Rate of passage studies. *J. Sci. Food. Agric.* 31:625 – 632.
- 八木沢拓也, 福田卓巳, 大倉徳太. 2012. 北海道上川管内の酪農家および獣医師を対象とした乳熱予防に関するアンケート調査. *産業動物臨床医誌.* 3: 181-186.
- Van de Braak, A. E., A. T. van't Klooster, and A. Malestein. 1987. Influence of a deficient supply of magnesium during the dry period on the rate of calcium mobilisation by dairy cows at parturition. *Res Vet Sci.* 42: 101-108.
- Van Soest, P. J., J. B. Robertson, and B. A. Lewis. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharide in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 74:3583–3597.
- Yamagishi, N., A. Yukawa, N. Ishiguro, S. Soeta, I. H. Lee, K. Obishi, and H. Yamada. 2002. Expression of calbindin-D9k messenger ribonucleic acid in the gastrointestinal tract of dairy cattle. *J. Vet. Med.* A49:461-465.
- 山岸則夫. 2012. 乳熱の病態. *日本獣医師会雑誌.* 65: 857-863.
- Yang, W. Z., K. A. Beauchemin, and L. M. Rode. 2001. Barley processing, forage: concentrate, and forage length effects on chewing and digesta passage in lactating cows. *J. Dairy Sci.* 84:2709-2720.
- Yoshimoto, S., T. M. Loo, K. Atarashi, H. Kanda, S. Sato, S. Oyadomari, Y. Iwakura, K. Oshima, H. Morita, M. Hattori, K. Honda, Y. Ishikawa, E. Hara, and N. Ohtani. 2013. Obesity-induced gut microbial metabolite promotes liver cancer through senescence secretome. *Nature.* 499:97-101.