

黒毛和種子牛の母乳性白痢に関する研究

(課題番号 10839002)

平成 10 年度～平成 11 年度文部省科学研究費補助金

基盤研究 (C) (2)

研究成果報告書

平成 12 年 3 月

研究代表者 岡田啓司

(岩手大学農学部助手)

平成 10 年度～平成 11 年度文部省科学研究費補助金

基盤研究 (C) (2)

課題番号 10839002

研究組織

岡田啓司 岩手大学農学部附属家畜病院 助手

志賀瓏郎 岩手大学農学部応用生物学科 教授

研究経費

平成 10 年度 2,600 千円

平成 11 年度 600 千円

合計 3,200 千円

目 次

第1章 緒論	1	3 デントコーンサイレージ給与後の子牛の検査成績	12
1 子牛の白痢	1	1) 子牛の糞便中腸内細菌数の変化	12
2 下痢発症子牛からの病原微生物の検出率	1	2) 子牛の血液の変化	13
3 感染性白痢の証明	2	考察	13
4 病原微生物の検出率と白痢発症との関係	2	母牛個体のMPT	17
5 非感染性要因による子牛白痢発症の可能性	3	子牛個体のMPT	18
		まとめ	19
第2章 黒毛和種子牛の母乳性白痢発症試験	4	第3章 長鎖脂肪酸投与によるホルスタイン種子牛の糞便および血液性状の変化	21
緒言	4	緒言	21
材料および方法	4	材料および方法	21
1 供試牛および試験期間	4	1 供試牛	21
2 給与飼料	5	2 給与飼料および投与脂肪酸	21
1) 母牛	5	3 材料の採取、処理および保存方法	21
2) 子牛	5	1) 採血方法	21
3 搾乳	5	2) 採便方法	21
4 材料の採取、処理および保存	5	4 検査項目および測定方法	22
1) 乳汁	5	1) 血液	22
2) 血液	5	2) 糞便	22
3) ルーメン液	6	3) 代用乳	23
4) 糞便	6	5 データ処理	23
5 検査項目および方法	6	成績	23
1) 乳汁	6	1 臨床症状	23
2) 血液	7	2 代用乳中総TG量および脂肪酸組成	24
3) ルーメン液	7	3 血清生化学検査値	24
4) 糞便	7	1) TG	24
6 データ処理	7	2) β Lipo	24
成績	8	3) FFA	24
1 母牛の分娩後からデントコーンサイレージ給与開始までの飼料給与内容および泌乳量	8	4) Tcho	25
2 デントコーンサイレージ給与後の子牛の臨床経過と母牛の検査成績		5) PL	25
1) 子牛の臨床経過	8	6) TBA	25
2) 母牛の臨床経過	9	7) BUN	25
3) 飼料充足状況	9	8) Glu	26
4) 母牛のルーメン液の変化	9	4 糞便の微生物検査	26
(1) pH	9	5 糞便中総TG量および脂肪酸組成	26
(2) 原虫の運動性	9	1) 糞便中総TG量	26
(3) 総原虫数	9	2) ラウリン酸	26
(4) 生細菌数	9	3) ミリスチン酸	27
(5) アンモニア濃度	9	4) パルミチン酸	27
(6) VFA濃度	9	5) パルミトリン酸	27
5) 母牛の血液の変化	10	6) ステアリン酸	27
(1) 脂質の転送系	10	7) 9.10-ジヒドロキシステアリン酸	27
(2) 脂質HDL系	10	8) 12-ヒドロキシステアリン酸	28
(3) 総胆汁酸	10	9) オレイン酸	28
(4) 脂質逆転送系・ケトン体	10	10) リノール酸	28
(5) 血糖値	10	考察	28
(6) 蛋白代謝系	10	第4章 まとめ	32
(7) 無機成分	10	表	34
(8) 肝臓酵素	11	図	45
6) 母牛の乳汁の変化	11	謝辞	71
(1) 乳量、アルコールテスト、pH	11	引用文献	72
(2) カゼイン凝固時間	11		
(3) 乳脂肪、乳蛋白、乳糖	11		
(4) 脂肪酸組成	11		
(5) 無機成分	12		
(6) ケトン体濃度	12		

第1章 緒論

1. 子牛の白痢

子牛の下痢症のうち、糞便中に不消化脂肪を多く含み黄色～白色の下痢便を排出する症候群は白痢と呼ばれ、大腸菌、ロタウイルス、コロナウイルスが主な原因とされている。これら白痢を含む子牛の下痢の発症日齢については、Acres ら (3) は、40 頭中 32 頭 (80%) の子牛で生後 10 日以内に下痢の発症したことを認めている。DeLeeuw (12) は、子牛の下痢症を早発性下痢と遅発性下痢に分類し、毒素原性大腸菌 K99 株に起因する下痢の大部分は生後 3 日以内の早発性下痢に含まれるとしている。また、Krogh (31) は 1,814 頭の下痢症子牛あるいは死亡子牛から採材した糞便の微生物学的検索を行い、毒素原性大腸菌は 16.4% から検出され、それらの子牛の日齢はほとんどが 1 週間以内であったと報告している。Allen と White (6) は 3 年間で 793 頭の子牛を剖検しての調査で、大腸菌は生後 5 日以内、ロタウイルスは 1~4 週齢の牛から主に分離している。Shah と Jhala (54) は 1 週齢以下の下痢症子牛の糞便の 30% からロタウイルスを検出している。

このように白痢の原因となる病原微生物のうち、毒素原性大腸菌による白痢は生後 1 週齢以内に多発し、それ以降はロタウイルスによるものが主流を占めている。

2 下痢発症子牛からの病原微生物の検出率

これらの下痢を呈する子牛の糞便からの病原微生物の検出率については、多くの報告がある。

Acres ら (3) は、下痢子牛の糞便の 29.7% から大腸菌、24.1% からロタウイルスを検出し、この両者による下痢症が最も発症頻度が高かったことを報告している。さらに Acres ら (4) は、59 牛群の 222 頭の子牛の 31% から大腸菌、37% からロタウイルスを検出し、Morin ら (36) は、大腸菌とロタウイルスによる下痢の発症割合はそれぞれ 13~15% と 5~20% と報告している。恒光ら (62) は、同一牧場における 2 年間の連続調査で、それぞれの年のロタウイルスの年間検出率は 72% と 29.4%、K99 株保有大腸菌の検出率は 0% と 47.1% であったことを認めている。

この他、下痢症子牛の糞便からの毒素原性大腸菌あるいはその毒素の検出は、Krogh (31) は 16.4%、Isaacson ら (25) は 53%、Wieler ら (68) は 21.9% と報告している。

ロタウイルスについては、Shah と Jhala (54) は 8 週齢以下の下痢症子牛 116 頭の糞便の 20.6% から検出しており、コロナウイルスについては、Tsunemitsu ら (63) は下痢発症牛 180 頭中 5 頭から分離している。

さらに Snodgrass ら (57) は、子牛の下痢が発症した 32 農場の 78% からロ

タウウイルス、75%からクリプトスポリジウム、41%からコロナウイルス、13%から毒素原性大腸菌、6%からサルモネラを検出している。

このように報告によってばらつきはあるものの、下痢発症子牛の糞便の多くから病原性微生物が検出され、下痢と感染の間には密接な関連のあることがわかっている。

3 感染性白痢の証明

さらに病原微生物を子牛に経口投与することにより白痢を発症させる感染試験が行われている。ロタウイルスについては、Castrucci ら (10) および Goute ら (20)、コロナウイルスについては Goute ら (20) および Kapil ら (29)、大腸菌については Goute ら (20) および Tzipori ら (64)、大腸菌とロタウイルスの混合感染については Snodgrass ら (56) の報告がある。このように、感染を成立させることにより白痢の発症することが実証されており、また、病理学的研究 (32、35) から、感染性白痢の病態は明らかになっている。

4 病原微生物の検出率と白痢発症との関係

農林水産省の家畜共済統計表 (39、40) によると、全国における子牛の白痢による死亡頭数は 1989 年の 1,687 頭から 1995 年には 2,185 頭に増加し、感染症に対する治療や予防の知識が十分に浸透しているにも拘わらず、その効果は見えてきていない。

そこで過去の報告を見直してみると、健康子牛からも病原微生物は分離されている。Weiler ら (68) は、大腸菌由来の Shiga-like toxin を下痢発症子牛の 21.9% から検出すると同時に、健康子牛の 12.9% から検出した。Murakami ら (37) は、ある牛群の 22 頭の子牛の追跡調査を行い、子牛の下痢症は気温の較差が大きい日が続いた後に集団発症し、無症状感染や反復感染もあり、症状、ウイルス排出、抗体上昇の間には相関のないことを報告している。Acres ら (3) は、40 頭中 32 頭 (80%) で生後 10 日以内に下痢が発症したが、大腸菌およびロタウイルスの検出率は下痢子牛がそれぞれ 29.7%、24.1% であったのに対して、非発症子牛が 1.4%、21.6% でありロタウイルスの検出率には差のないことを認めている。Isaacson ら (25) は、17 日齢以下の子牛 62 頭中 34 頭で下痢が発症し、下痢子牛の 53% と非発症子牛の 15% から腸管毒素性大腸菌を分離している。Snodgrass ら (57) は、32 農場の下痢子牛 302 頭と下痢症が発症していない 14 農場の健康子牛 49 頭の微生物学的検索を行い、下痢子牛群と健康子牛群の間での各微生物の検出割合は、ロタウイルスのみで 2 群間に有意差が認められたが、コロナウイルス、クリプトスポリジウム、腸管毒素性大腸菌、サルモネラは、2 群間の検出割合に差のなかったことを報告している。

このように、臨床的に健康な子牛からも病原性微生物は検出されており、病原

性微生物の感染が直接発症に結びつくとは限らないようであり、原因不明の白痢の存在が少なくないことがうかがえる。さらに Allen と White (6) は、3 年間で 793 頭の子牛を剖検し、その 25%は腸炎であったが、そのうちの 33%は微生物学的検索から原因が不明であったことを認めている。これらの報告は感染が成立しない下痢の存在の可能性を示唆するものと考えられる。

5 非感染性要因による子牛白痢発症の可能性

現在の子牛の白痢に関する考え方は、上記の実証的研究に基づいて、感染性疾患として扱われている。しかし、臨床現場では、抗生物質の投与で治癒しない症例や再発を繰り返す症例も多く、抗生物質の連用による腸炎の存在 (52) も指摘されている。

さらに子牛の感染防御の観点から、初乳中の移行抗体の摂取不足と易感染性との関連が注目され (13)、新生子期の血中コルチゾールの高値 (21) や低体重 (13) 等、子牛の生体機能の異常と下痢症との関連についても報告されている。

いっぽう、非感染性白痢としては、食餌性アレルギー (16)、乳糖不耐性 (47)、代用乳の脂肪成分の違いによる白痢 (14) などが報告されている。

母乳の異常による白痢に関しては、母乳のカゼイン凝固時間の延長 (26,27) との関連の報告がある。近年、臨床現場からは白痢を発症した子牛において胆汁分泌能の減退 (24) のあることが報告され、筆者らも、白痢発症子牛において脂質代謝や膵臓機能の異常 (44) を認めている。また、断乳療法により白痢の治癒した子牛を母牛につけると白痢が再発したり、乳牛の産後疾患に伴って生じたアルコール不安定性母乳を子牛に給与すると子牛が下痢を発症することを経験しており、母乳性状と子牛の白痢の間には何らかの関連のあることを強く感じてきた。さらに国内の臨床獣医師からアルコール不安定性母乳と子牛白痢の関連を示唆する報告が連続してなされている (18,38,65)。しかし母乳が原因となる子牛の白痢については、いまだにその病因・病態は明らかではない。

第2章 黒毛和種子牛の母乳性白痢発症試験

緒言

筆者らは白痢発症子牛の母牛を個別に検査して、低エネルギー状態と乳汁の性状の異常が子牛白痢発症に何らかの関与をしていることを認めた(42)。そこで母牛の代謝プロファイルテスト(MPT)を行い、白痢多発牛群の母牛は泌乳期にでんぷんの供給が少なくエネルギー不足に陥っていること、あるいは肝臓機能の低下とルーメンコンディションに異常のあることを認め(46)、先の試験成績(42)と一致した。そこで分娩後の同一母牛の飼料給与状況、血液性状および乳汁成分と、その子牛の糞便性状を継続的に追跡したところ、子牛の白痢は低でんぷん飼料を母牛に給与している牛群で、デントコーンサイレージの給与開始後4~5日に多発すること、およびその時には母牛の乳脂肪率および血中中性脂肪(TG)と尿素窒素(BUN)の急激な増加のあることを認めた(45)。

以上のことより、子牛の白痢発症の原因の一つとしては、母牛の低エネルギー、特に低でんぷん飼料で飼養されていたところにデントコーンサイレージを給与することが引き金となって、母牛の脂質代謝あるいはルーメンコンディションが急変して発症する可能性のあることが示唆された。

そこで今回は、母牛を分娩後低でんぷん飼料で飼養し、その後にデントコーンサイレージを給与することにより子牛の白痢が発症するか否かを明らかにすること、およびその時の母牛のルーメン液、血液、乳汁の変化と子牛の白痢発症の因果関係を究明することを目的として本試験を行った。

材料および方法

1 供試牛および試験期間

黒毛和種雌牛とその子牛5組を母牛の最終分娩日から供試した。試験は本学畜病院入院牛舎の単房に母牛を飼養して実施した。供試母牛の個体名称をA~E、それに対応する子牛の名称をAC~ECとした。供試母牛の産歴、最終分娩年月日、分娩直後の体重を表1に示した。母牛は分娩予定日の2~3週間前に家畜病院に搬入し、搬入後直ちにコクシジウム、クリプトスポリジウム等の消化管内寄生虫の感染のないことを糞便検査により確認した。牛床は敷き料を一切入れずゴムマットのみとし、随時、高圧蒸気洗浄や強酸性水、塩素系消毒剤および逆性石鹼等の薬剤による消毒を行い、清浄化を図った。子牛は出生直後から試験終了まで母牛から隔離して飼育した。子牛の飼育室入り口には踏み込み消毒槽を設置し、飼育室内の洗浄および消毒は母牛同様の方法で行った。

試験期間は、母牛の最終分娩日から子牛の白痢が発症した日までとした。

2 給与飼料

1) 母牛

分娩後は連日、オーチャード乾草を朝 9 時と夕方 6 時の 1 日 2 回、搾乳後に給与した。分娩後 10 日前後（分娩後 7～18 日）から子牛白痢発症までの間は、デントコーンサイレージを日量 3kg 追加給与した。試験牛 A は、泌乳量が極端に少なく子牛に給与する乳汁の確保が困難であったため、分娩後 4～6 日と 12～14 日にデントコーンサイレージを日量 1 kg 追加給与した。給与飼料および残飼は計量し、実際の採食量を算出した。給与飼料は近赤外線法で分析し、日本飼養標準・肉牛用（1995 年版）（41）に基づいて計算した。飲水は、水槽あるいはウォーターカップから常時自由に行わせた。

2) 子牛

出生後は、母牛から分娩後 1.5 時間に搾乳し、検査用乳汁を採取後の残りの乳汁全量を 38℃に加温して哺乳バケツで給与した。翌日からは、朝夕に母牛から搾乳し検査用乳汁を採取後の残りの乳汁全量を、38℃に加温して哺乳バケツで給与した。飲水は水槽から自由に行わせた。他の飼料は試験終了まで一切与えなかった。

3 搾乳

搾乳は、毎回、オキシトシン 50 単位（アトニン-O：帝国臓器製薬（株）、東京都）を頸静脈内に注射後、手搾りで全量を搾りきった。搾乳は初回は分娩後 1.5 時間に行い、翌日からは朝 8 時と夕方 5 時の 1 日 2 回行った。

4 材料の採取、処理および保存

1) 乳汁

毎日朝夕の搾乳時に全量を搾乳後、4 分房の合乳を速やかに 3 つの容器に 3～50ml ずつ入れ、-50℃に凍結保存した。

2) 血液

母子ともに分娩（出生）後は 1 週間に 2 回、デントコーンサイレージ給与開始日からは毎日、いずれも午後 3 時に採血を行った。採血は頸静脈から血清分離剤加、およびヘパリン加真空採血管（日本ベクトンデッキンソン（株）、東京都）を用いて行った。

血清分離剤加真空採血管は採血後直ちに 37℃10 分間加温後、毎分 3,000 回転 15 分間遠心して血清を分離し、一部は測定に供し残りは-50℃に凍結保存した。

ヘパリン加真空採血管は、採血後直ちに氷冷保存し、血球検査後、速やかに毎分 3,000 回転 15 分間遠心して血漿を分離し、-50℃に凍結保存した。

3) ルーメン液

母牛のルーメン液は、採血後に胃汁採取器（ルミナー：富士平工業（株）、東京都）を用いて採取した。また VFA およびアンモニア測定用のルーメン液は採取後直ちに二重ガーゼでろ過し、4℃、毎分 3,000 回転で 20 分間冷却遠心して上清を分離し、測定まで -20℃ に凍結保存した。原虫計数用のルーメン液は、二重ガーゼでろ過したルーメン液 1 容を、固定染色液である MHS 液（メチルグリニ 0.3g、10 倍希釈フォルマリン液 1l、NaCl 8.5g）4 容と混和し冷蔵保存した。

細菌数計数用のルーメン液は、生理食塩液に 20% フォルマリン液を加えた液と等量混和し、冷蔵保存した。

4) 糞便

子牛の糞便採取は原則として 1 週間に 2 回行い、糞便に異常が認められた場合には随時行った。

採取した子牛の糞便は 4℃ で冷蔵し、直ちに検査を行った。

5 検査項目および方法

1) 乳汁

毎日朝夕の搾乳時に、CMT 変法による乳房炎の検査とアルコールテストを行った。アルコールテストスコアは、各分房乳の凝集の程度により、0：凝集（一）、1：軽度粒子状凝集、2：粒子状凝集、3：塊状凝集、4：膜状凝集の 5 段階に区分した。搾乳終了後、直ちに 4 分房あわせた乳汁の pH をガラス電極法（Orion Research K.K., Boston）で測定し、乳量を計量した。

凍結保存した 3 容器の乳汁は、それぞれ以下の検査を行った。

①乳成分の測定：乳汁中の乳脂肪率、乳蛋白率および乳糖率を、ミルコスキャン（Foss Electric Co. Ltd., Copenhagen）により測定した。

②TG 中の脂肪酸組成：乳汁の TG 中の脂肪酸組成は、脂質を Bligh-Dyer 法（表 2）で抽出した後、TG をメチル化し、ガスクロマトグラフィー（GC-12APF、島津製作所（株）、東京都）で測定した。

③無機成分濃度：乳汁中の無機成分は、ナトリウム（Na）、カリウム（K）、カルシウム（Ca）およびマグネシウム（Mg）を原子吸光法により、またリン（P）を比色法により測定した。

④カゼイン凝固時間：乳汁 2ml を試験管にとり、37℃ に加温した状態で、あらかじめ 37℃ に加温しておいたレンニン（Sigma Chemical Company, ST.Louis）0.06U を添加し、2 回、転倒混和し 37℃ に静置した。レンニン添加後 3 分から、1 分間隔で試験管を転倒混和して、凝固までの時間を測定した。

⑤乳汁中ケトン濃度：④で凝固した乳汁を毎分 3,000 回転 15 分間遠心して乳清を分離し（レンネット・ホエー法）、乳清中のアセト酢酸および β ヒドロキシ酪酸濃度を測定した。

2) 血液

血清生化学検査の項目および方法を表 3 に示した。検査は無機成分を除いて採血の当日中に行った。無機成分は凍結血清を用いて後日測定した。

3) ルーメン液

ルーメン液は、採取後直ちに原虫の運動性を鏡検し、pH をガラス電極法 (Orion Research K.K., Boston) で測定した。

原虫数は、冷蔵保存サンプルを Fuchs-Rosenthal 計算板を用いて顕微鏡下で計数した。原虫の種類は大きさによって大型、中型、小型の 3 群に分類した。

細菌数は、冷蔵保存サンプルを吉田法の変法 (表 4) によって標本を作製し、顕微鏡下で計数した。

VFA は凍結保存サンプルを融解後、メタリン酸によって除タンパクし、ガスクロマトグラフィーで測定した。測定項目は、酢酸 (C2)、プロピオン酸 (C3)、酪酸 (C4) とした。

アンモニア (A) は、ルーメン液の上清試料 (R) 0.5ml に NaOH 0.5ml とフェノール混合液 3.0ml を加え、ついで次亜塩素酸ナトリウム溶液を 0.5ml 加えた後、よく攪拌して発色させ、20 分間放置後、分光光度計 (610nm) で測定した。ブランク (B) には水を、標準液 (S) には 0.25mM (NH₄)₂SO₄ を用い、以下の計算により算出した。

$$0.7 \text{ (mg)} \times ((R - B) / (S - B)) \times 17/14 = a \text{ (mg/100ml)}$$

$$a \times (10/17) = A \text{ (mM)}$$

4) 糞便

子牛の糞便について、ロタウイルス抗原検査、腸内生細菌数、腸内細菌同定を行った。

ロタウイルス抗原検査は、ロタレックスドライ (第一化学薬品 (株)、東京都) により行った。

腸内細菌数は、糞便 0.1g を PBS で 10 段階希釈し、5~10 倍希釈液をマッコンキー寒天培地 (日水製薬 (株)、東京都) にそれぞれ 0.1ml 塗布し、38℃、24 時間培養した後にコロニー数を数えた。

腸内細菌の同定は、腸内細菌数を確認した後、優勢コロニーをトリプトソイ寒天培地 (Difco Laboratories K.K., Detroit) に継代し、38℃、24 時間培養後、腸内細菌同定キット (API 20: 日本ビオメリユー・バイテック (株)、東京都) により行った。

6 データ処理

データはデントコーンサイレージ給与開始日を 0 日として処理した。対照は、デントコーンサイレージ給与開始前のサンプルとし、ルーメン液および血液については 0 日と給与開始 3 日前 (-3 日) の 2 サンプル、乳汁については -3 日か

ら 0 日までの朝夕の計 8 サンプルを用いた。母牛の血液、ルーメン液、乳汁は発症直前の材料を、子牛の血液および糞便は発症直後の材料を白痢発症日の材料とした。

統計処理は、デントコーンサイレージ給与開始前の平均値を 100%とした場合のその後の変動について、デントコーンサイレージ給与開始前との差を Mann-Whitney 検定で求めた。

成 績

1 母牛の分娩後からデントコーンサイレージ給与開始までの飼料給与内容および泌乳量

母牛への給与飼料の成分分析結果を表 5 に示した。この分析値と、実際の体重、給与量、残飼量、乳量および産次補正を加味した上での飼料の乾物量 (DM)、可消化養分総量 (TDN) および粗蛋白量 (CP) の充足率およびでんぷん (ST) 濃度の推移を図 1 に示した。DM および TDN の充足率はおおむね 60~120%、CP は 90~210%、ST は 3.4%前後で推移した。

分娩後デントコーンサイレージ給与開始までの母乳のアルコールテストスコアを図 2 に示した。分娩後は試験牛 A を除いて比較的高値で推移したが、デントコーンサイレージ給与開始後は試験牛 B を除いて漸次低下する傾向がみられた。

2 デントコーンサイレージ給与後の子牛の臨床経過と母牛の検査成績

1) 子牛の臨床経過

母牛にデントコーンサイレージを給与開始後の、子牛の糞便の性状および色調の変化を表 6 に示した。

試験牛 AC は給与開始前から軟便傾向であったが、給与開始後 3 日の朝に黄色水様便を排出した。これはすぐに泥状便程度に改善されたが、5 日の夕方、再度、黄色水様便を排泄し、翌日夕方まで継続した。試験牛 BC は開始翌日の夕方に黄色軟便を呈したが、すぐに回復し、6 日朝に黄色水様便を排出した。同日夕方からは症状が重篤になり、9 日朝まで水様便が継続した。試験牛 CC は、開始後 3 日の夕方に糞便に直径 1~3mm の白色粒子が混在していた。これは翌日には消失したが 7 日の夕方から 3 日間にわたって水様下痢が継続し、5 頭中最も重症となった。試験牛 DC はデントコーンサイレージ給与開始直前に黄色軟便を排出し、さらに開始後 3 日夕に粘稠便を排出したが、すぐに回復し、5 日の夕方から 2.5 日間、泥状下痢便を排出した。試験牛 EC は 3 日夕に軟便を排出後すぐに回復し、7 日夕と翌朝に白色水様便を排出した。この間いずれの個体に対しても、治療は一切行わなかった。

以上のように、子牛はデントコーンサイレージ給与開始後 1~3 日で 1 回目の糞

便の異常があり、5～7日に本格的な下痢症状を呈した。そこで、1回目の異常を前駆症状、2回目の異常を白痢発症と称することにする。

2) 母牛の臨床経過

デントコーンサイレージ給与開始後試験終了までの間、母牛に臨床的な異常は認められなかった。

3) 飼料充足状況

デントコーンサイレージ給与開始後の飼料充足状況を図3に示した。デントコーンサイレージ給与前に比べて、DM、TDN および CP はほとんど変動がなかった。しかし ST は、給与開始後に平均 170%以上の値に増加した。

4) 母牛のルーメン液の変化

母牛へのデントコーンサイレージ給与開始日と-3日におけるルーメン液の性状と成分の平均値と標準偏差を表7に示した。また、この値を100%とした場合の、前駆症状発現前日、前駆症状発現日、前駆症状発現翌日、白痢発症前日、白痢発症当日の5頭の平均値と標準偏差の変動を図4～5に示した。

(1) pH

デントコーンサイレージ給与開始後若干上昇し、白痢発症前日から低下する傾向にあったが、各個体で変動の幅に大きな差がみられた。(図4)

(2) 原虫の運動性

常時活発な運動性が認められ、個体間および経日変化に差は認められなかった。

(3) 総原虫数

総原虫数は前駆症状発現翌日から $198 \pm 77\%$ (平均±標準偏差)の高値を示し、そのままのレベルで推移した。このうち大型原虫は前駆症状発現日の前日と翌日に大きく変動し、中型原虫は前駆症状発現翌日に有意に増加した。その後、大型および中型の原虫の割合が減少傾向を示し、小型原虫が増加の傾向を示した時点で白痢が発症した。(図4)

(4) 生細菌数

生細菌数は前駆症状発現翌日に大きな個体差を示したが、開始前に比べて有意な変化は認められなかった。(図4)

(5) アンモニア濃度

ルーメン液中アンモニア濃度はデントコーンサイレージ給与開始後、若干の低下傾向を示しながらも標準偏差(S.D.)は15～27%の範囲で安定して推移したが、白痢発症日のS.D.は51%と変動が大きかった。(図5)

(6) VFA 濃度

酢酸(C2)、プロピオン酸(C3)、酪酸(C4)の合計を総VFAとし、その変化を図5に示した。S.D.は5～12%の範囲で安定して推移したが、白痢発症前日のS.D.は19%と変動が大きかった。

酢酸(C2)およびプロピオン酸(C3)は、総VFAと同様の傾向を示し、白痢

発症前日に大きく変動した。酪酸（C4）は、前駆症状発現前後に 125%前後の有意に高い値を示した。

5) 母牛の血液の変化

デントコーンサイレージ給与開始日と一3日における母牛の血液成分の平均値と標準偏差を表8に示した。また、この値を100%とした場合の、前駆症状発現前日、前駆症状発現日、前駆症状発現翌日、白痢発症前日、白痢発症当日の5頭の平均値と標準偏差の変動を図6~8に示した。

(1) 脂質の転送系

TGは前駆症状発現日に $139 \pm 8\%$ と有意に高い値を示した後、高い値で推移していたが、発症当日には $144 \pm 28\%$ とさらに増加した。いっぽうβリポ蛋白（β Lipo）はデントコーンサイレージ給与後大きく変動したが、前駆症状発現翌日には $107 \pm 10\%$ の値に収束し、その後は安定して推移した（図6）。

(2) 脂質HDL系

総コレステロール（Tcho）は、前駆症状発現日から不安定に推移したが、リン脂質（PL）は白痢発症前日および白痢発症日にそれぞれ $115 \pm 17\%$ および $116 \pm 8\%$ と有意に高い値を示し、またPL/Tchoは同様の変化を示した。

(3) 総胆汁酸

総胆汁酸（TBA）は前駆症状発現前日には $60 \pm 27\%$ と有意に低い値を示したが、その後100%前後で推移した後次第に変動幅が大きくなり、白痢発症前日には試験牛Eが330%であった他は 43 ± 12 の低値を示した。さらに発症当日には試験牛Eの119%を除くと全般的には $66 \pm 19\%$ と低値を示した（図6）。

(4) 脂質逆転送系・ケトン体

遊離脂肪酸（FFA）はデントコーンサイレージ給与開始後低下し、平均値で52~70%の有意に低い値で推移した。アセト酢酸（ACAC）は一定の傾向は認められず、βヒドロキシ酪酸（BHB）はデントコーンサイレージ給与開始後増加傾向を示し、白痢発症前日に有意に高い値を示した（図7）。

(5) 血糖値

グルコース（Glu）はデントコーンサイレージ給与開始後低下傾向を示したが、白痢発症日には $104 \pm 5\%$ と有意に高い値を示した。

(6) 蛋白代謝系

アルブミン（Alb）はデントコーンサイレージ給与開始後低下傾向にあったが個体差が大きかった。尿素窒素（BUN）はデントコーンサイレージ給与開始後低下し、前駆症状発現翌日には $85 \pm 10\%$ と有意に低い値を示した。しかし白痢発症前日には増加に転じ、発症当日には $108 \pm 15\%$ に増加した。

(7) 無機成分

前駆症状発現翌日にKが有意に高い値を示し、その後低下した。Caも同様な傾向で推移した。Mgは前駆症状発現日から増加傾向を示し、白痢発症日に最高値に

達したが、個体差が大きく、有意差は認められなかった。IP および Ca/IP には、有意な変化は認められなかった（図 8）。

(8) 肝臓酵素

AST および γ GTP の検査結果を表 9 に示した。試験牛 A の γ GTP がやや高値であった他は異常は認められなかった。

6) 母牛の乳汁の変化

母牛の乳汁成分のデントコーンサイレーシ給与開始前 4 日間 の平均値と標準偏差を表 10 に示した。また、この値を 100% とした場合の、前駆症状発現前日、前駆症状発現日、前駆症状発現翌日、白痢発症前日、白痢発症当日の 5 頭の平均値と標準偏差の変動を図 9~12 に示した。

(1) 乳量、アルコールテスト、pH

乳量の推移は図 9 に示した。前駆症状発現日の朝に増加した後、夕方の乳量が有意に低い値を示した他は、一定の傾向は認められなかった。

乳汁の CMT 変法による乳房炎の検査では、陽性牛は認められなかった。

乳汁の pH の推移は図 10 に示した。白痢発症前日に変動が大きかった。

乳汁のアルコールテスト (ALT) の成績を図 10 に示した。デントコーンサイレーシ給与開始後低下する傾向にあり、白痢との関連は認められなかった。

(2) カゼイン凝固時間

カゼイン凝固時間を図 10 に示した。前駆症状発現前日および白痢発症日の前に低下する傾向があったが、個体差が大きく、有意差は認められなかった。

(3) 乳脂肪、乳蛋白、乳糖

乳汁成分の推移を図 11 に示した。乳脂肪率は、夕の値はほぼ一定に推移したが、朝の値は前駆症状発現日には前日に比べて 17.0% 増加し、白痢発症前日には 89.1% に低下後、白痢発症当日に 6.5% 増加して 95.6% になった。

乳蛋白率は、デントコーンサイレーシ給与開始後低下し続け、白痢発症前日以降は 90.0~92.5% の有意に低い値を示した。

乳糖率は白痢発症前日に 104.4~105.4% の有意に高い値を示した。

(4) 脂肪酸組成

脂肪酸組成の推移を図 12 に示した。ラウリン酸 (C12:0) とリノール酸 (C18:2) はデントコーンサイレーシ給与開始後低下傾向を示した。ミリスチン酸 (C14:0) とオレイン酸 (C18:1) はほぼ横這い、パルミチン酸 (C16:0) とステアリン酸 (C18:0) は増加傾向を示した。このうち飽和脂肪酸であるラウリン酸 (C12:0)、ミリスチン酸 (C14:0)、パルミチン酸 (C16:0) およびステアリン酸 (C18:0) の合計の値は、図 13 に示したとおり、デントコーンサイレーシ給与開始後増加傾向を示し、白痢発症前後には軽度に低下したが、有意差は認められなかった。また、パルミチン酸 (C16:0) とステアリン酸 (C18:0) の合計は図 13 に示した通り、デントコーン給与開始後増加した。

個体別の脂肪酸組成を、図 14 に示した。全頭でパルミチン酸 (C16:0) とオレイン酸 (C18:1) の増減は対照的であった。オレイン酸 (C18:1) とパルチミン酸 (C16:0) の比率の推移において、泌乳量の多かった試験牛 B および E でオレイン酸 (C18:1) がパルミチン酸 (C16:0) より多く、試験牛 A、C および D でその逆の傾向が認められた。全頭とも前駆症状発現日あるいはその翌日から比率の変動が大きくなった。また、ミリスチン酸 (C14:0) とステアリン酸 (C18:0) の比率では泌乳量の多かった試験牛 B および E でミリスチン酸 (C14:0) がステアリン酸 (C18:0) より多く、試験牛 A、C および D でその逆の傾向がみられた。全頭とも前駆症状発現日あるいはその翌日から比率の変動が大きくなった。ラウリン酸 (C12:0) とリノール酸 (C18:2) は試験牛 A、C および D でラウリン酸 (C12:0) がリノール酸 (C18:2) より多く、試験牛 B および E でその逆の傾向が認められた。

(5) 無機成分

無機成分濃度の推移は図 15 に示した。Na は前駆症状発現日の朝に有意に高い値を示したが、翌日には朝夕とも 85% 前後の有意に低い値に低下した。白痢発症前日にはやや増加し当日には低下したが、個体差が大きかった。

K は Na と逆の増減傾向を示して推移したが、個体差が大きかった。

Mg は前駆症状発現前日に朝夕の値が大きく乖離したが、前駆症状発現翌日から朝の値が有意な低値で推移した。

Ca は前駆症状発現前日夕に有意に高い値となり、その後低下傾向を示した。

IP は有意な変動は認められなかった。

2 価の陽イオンである Ca と Mg の和は、全頭で前駆症状発現前日夕方に高値を示した。

(6) ケトン体濃度

ケトン体濃度の推移を図 16 に示した。アセト酢酸 (ACAC) は一定の傾向は認められなかった。 β ヒドロキシ酪酸 (BHB) は前駆症状発現日にデントコーンサイレージ給与開始前の倍以上に増加したが、個体差が大きく有意差は認められなかった。

3 デントコーンサイレージ給与後の子牛の検査成績

1) 子牛の糞便中腸内生細菌数の変化

母牛へのデントコーンサイレージ給与開始日と一 3 日の子牛 5 頭の糞便中の腸内生細菌数の平均値 (3.2×10^8 /g) を 100% とした場合の、前駆症状発現前日、前駆症状発現当日、前駆症状発現翌日、白痢発症前日、白痢発症日の平均値と標準偏差の推移を図 17 に示した。腸内生細菌の優勢菌は常時 E.coli であり、その数はデントコーンサイレージ給与開始後低下し、前駆症状発現日以降は有意に低い値を示した。この間の腸内細菌生菌数は $10^6 \sim 10^8$ /g であり、ロタウイルスは全ての

個体で終始検出されなかった。

2) 子牛の血液の変化

母牛へのデントコーンサイレージ給与開始日と一3日における子牛5頭の血液成分の平均値と標準偏差を表11に示した。また、この値を100%とした場合の、前駆症状発現前日、前駆症状発現当日、前駆症状発現翌日、白痢発症前日、白痢発症日の平均値と標準偏差の推移を図18に示した。

TGは前駆症状発現日に $65 \pm 15\%$ と有意に低下した。その後、変動に差がみられるものの徐々に増加する傾向が認められた。 β Lipoは前駆症状発現日に低下する傾向があったが、個体差が大きく有意差は認められなかった。TchoおよびPLは前駆症状発現前日に増加傾向を示したが、その後横這いで推移した。TBAは個体差が次第に大きくなり、前駆症状発現翌日に $145 \pm 51\%$ の有意な高値を示した。FFAは前駆症状発現日に $56 \pm 20\%$ の低値を示したが、その後増加傾向を示した。ACACは前駆症状発現翌日に大きな個体差を示した。BHBは前駆症状発現日に $34 \pm 26\%$ に有意な低下を示し、その後増加傾向を示したが、変動に大きな個体差がみられた。Gluは一定の傾向は認められなかった。BUNは前駆症状発現翌日、Albは前駆症状発現前日に最低値を示した後、漸次増加し、発症翌日にはそれぞれ $150 \pm 59\%$ および $104 \pm 4\%$ になったが、個体差が大きく、有意差は認められなかった。

考 察

筆者らのこれまでの試験結果(ABC)から考えられる子牛白痢の発症機序に関する作業仮説、すなわち母牛の給与飼料内容の変化による乳汁成分の変化が子牛の白痢の発症に関与する、いわゆる“母乳性白痢”の存在を証明するために、白痢の発症試験を行った。具体的には、低でんぷん飼料を給与していた母牛にデントコーンサイレージを追加給与した時の子牛の白痢の発症状況を調べるとともに、その前後の母牛のルーメン液、血液および乳汁の変化から、白痢発症の背景にある母牛の代謝異常を明らかにすることを試みた。また、併せて子牛の代謝プロファイルテストから、乳汁成分の変化と子牛の白痢発症との関連を検討した。

白痢の発症試験の結果、試験牛5頭の子牛全頭が白痢を発症した。子牛の糞便は、デントコーンサイレージの給与開始後1~3日に軽度の変化を示し、5~7日に明瞭な白痢が発症した。白痢の発症率は100%で、第3章における泌乳期の母牛の低でんぷん飼料と低エネルギーが認められた牛群の子牛の $49.5 \pm 15.9\%$ 、第4章におけるTDNとでんぷんの供給が不足した群の71.4%に比べて高い値を示した。

筆者らのこれまでの試験結果(ABC)から、母牛への給与飼料内容と子牛白痢の関連が示唆されたので、母牛の飼料充足率と白痢発症との関連を検討したとこ

ろ、全頭とも DM、TDN および CP との関連は認められなかった。しかしデントコーンサイレージの給与により、でんぷん濃度は著しく増加した。今回の白痢発症日はデントコーンサイレージ給与開始後 5~7 日であり、先の筆者らの報告 (C) の白痢発症日であるデントコーンサイレージ給与開始後 4~5 日とほぼ一致した。また、また筆者らの先の報告 (C) ではデントコーンサイレージ給与開始前の給与飼料中のでんぷん濃度が 7% 以下の母牛の子牛では全頭で白痢が発症したが、本試験においても、全頭ともデントコーンサイレージ給与開始まではでんぷん濃度が 7% 以下であった。これらのことから、母牛の飼料中のでんぷん濃度と子牛の白痢の発症には何らかの関連のあることが示唆された。

筆者らの先の報告 (A) の白痢自然発症例では、アルコール不安定性母乳との関連が示唆されたので、これとの関連を検討したが、本試験ではアルコールテストスコアはデントコーンサイレージ給与開始後低い値で推移し、両者の関連は特に認められなかった。しかし試験牛 B は、他の 4 頭が分娩後アルコールテストスコアが低下していったのに対してアルコールテストスコアが増加傾向にあり、増加したところでその子牛が 5 頭中最も重症な白痢となり治癒の遅れたことから、アルコール不安定性母乳は白痢の病態に何らかの影響を与えている可能性も完全には否定できないと思われた。

給与飼料とアルコール不安定性母乳の関連については、乳牛では高蛋白あるいは低カロリー飼料給与群でアルコール不安定性母乳の発生の多いことが知られている (22)。今回、飼料が低 TDN であった試験牛 B および E は、常時アルコールテストスコアが高いレベルで推移したが、高蛋白であった試験牛 C および D は、そのスコアは分娩後徐々に低下し、デントコーンサイレージ給与期間中は低い値で推移した。飼料充足率に問題のなかった試験牛 A のアルコールテストスコアはほとんど陰性で推移し、黒毛和種牛のアルコール不安定性母乳はそのエネルギー充足状況を反映していることがうかがわれた。これは母牛へのエネルギー供給が充足していない牛群で子牛白痢の発症が多いという筆者らの先の報告 (B) と一致した。すなわち、エネルギー供給の不足の結果のひとつとしてアルコール不安定性母乳、もうひとつの別の結果として子牛の白痢の発症があり、アルコール不安定性母乳と子牛の白痢の発症とは直接には結びついていないことが推定された。

子牛が摂取し、直接的に母乳性白痢の発症の原因となり得る乳汁の性状については、まず、前駆症状発現当日の朝夕の乳量の変動の大きいことが注目された。しかし母牛の血液所見からは関連する項目の変化が認められず、これは VFA の変動の影響と考えられた。乳汁 pH は筆者らの先の報告 (C) では白痢発症群で変動が激しかったが、本試験においても白痢発症前後に大きな変動が認められた。このことは乳汁中のケトン体濃度と関連はなく、ルーメン液 pH の変動とも無関係であり、原因は不明であった。

母乳に起因する白痢の原因として、カゼイン凝固時間の延長が指摘されている。カゼイン凝固時間が延長すると子牛の第四胃でのカード形成がうまくいかなくな

り、哺乳した乳汁が第四胃を短時間に通過するので白痢が発症する (26,27)。本試験においては、白痢発症前後に凝固時間が若干延長する傾向がみられたがその程度はわずかであり、他の血液や乳汁成分の変化より若干遅れて発現したことから、今回の白痢発症の原因とは言いがたいと考えられた。

今回の試験において、乳汁成分の変化のうち特徴的な所見は、前駆症状発現日および白痢発症日における乳脂肪率の前日に比べての増加であったが、第 4 章の結果ほど顕著なものではなかった。これは、第 4 章では乳汁の採取が白痢発症時であったのに対して、本試験では朝夕定期的に搾乳したものであることの差によるものと思われた。

試験牛 A および B の前駆症状発現日と、試験牛 C、D および E の前駆症状発現日と白痢発症日は、血中 TG と乳脂肪量は連動して変化した。この乳脂肪の起源については、血中 TG 由来であれば C16 以上の脂肪酸が増加し、ルーメン由来であれば C16 以下が増加する (33)。血中 TG と乳脂肪量が連動しなかった試験牛 A および B の白痢発症日の乳汁中脂肪酸は、発症 2 日前からオレイン酸 (C18:1) とパルミチン酸 (C16:0) が 10% 以上の振幅で激しくかつ相反する変動を示した。この時オレイン酸 (C18:1) はリノール酸 (C18:2) と連動し、パルミチン酸 (C16:0) はミリスチン酸 (C14:0) およびステアリン酸 (C18:0) と連動して変化した。すなわち試験牛 A および B の白痢発症日の乳汁中脂肪は、その総量は変化しなかったが、その組成のうち血中 TG 由来の成分が大きく変動し、血清 TG 中脂肪酸組成の変動した可能性が示唆された。試験牛 C はオレイン酸 (C18:1) とパルミチン酸 (C16:0) の振幅は 5% 前後と小さく、ミリスチン酸 (C14:0) とステアリン酸 (C18:0) も同様な変動を示した。いっぽう、試験牛 D と E は発症の 2~3 日前からオレイン酸 (C18:1)、ミリスチン酸 (C14:0)、ラウリン酸 (C12:0) の若干の変動は認められたが、その振幅は 5% 前後と小さかった。すなわち、試験牛 C、D および E は血中 TG 由来とルーメン由来の脂肪酸のいずれもが変動したことになる。この変動は VFA の変化と一致しない部分もあり、また、本試験では血中脂肪酸組成の測定を行っていないため、そのメカニズムは不明であるが、全頭とも血液あるいはルーメン内での脂質代謝に変化のあったことが示唆された。

乳汁の脂肪酸組成と下痢との関連では、子牛に低級脂肪酸 (C8、C10) あるいは中級脂肪酸の多い代用乳を飲ませると下痢発症が多いとの報告 (1) がある。また子牛では飽和脂肪酸のうち低級飽和脂肪酸の消化率は 100% と高いが、C16 以上の脂肪酸の消化率は、不飽和脂肪酸で 70~90%、飽和脂肪酸では 50% 以下に低下する (50)。新生児では飽和脂肪酸含量が増えると 2 価イオンと結合し、特に Ca 塩を形成すると融点が上がリ、腸管内腔に沈殿しやすくなる。そのため乳化が不十分となり、消化・吸収が低下する (23) と言われている。いっぽう、同じく新生児で C18 の脂肪酸は水分や電解質の吸収を阻害するため下痢が起こる (7)、あるいは高級不飽和脂肪酸の給与で下痢が発症し結腸へのダメージが生じる (2)

との報告もある。脂肪酸塩が形成されると脂肪が腸管内に滞留し、脂肪酸が常在細菌叢の作用で水酸化脂肪酸となり、吸収されずに Na や水分の分泌を促進して脂肪便の原因となる (8,58,61) と言われている。さらにラットにおいては、C18 : 1 で OH 基を持つリシノレイン酸を投与すると、結腸での水分および電解質分泌の増加が認められている (8)。

本試験では糞便中の脂肪酸の分析を行っていないので、これらの腸管内での脂肪酸の変化との関連は不明であった。しかし本試験では有意差は認められなかったが、デントコーンサイレージ給与開始後に乳汁中の飽和脂肪酸量の増加が認められ、また、2 価イオンである Ca および Mg が前駆症状発現前日に増加し、飽和脂肪酸との結合量が増えた可能性が考えられた。さらに C16 および C18 の飽和脂肪酸がデントコーンサイレージ給与開始後増加していることから、これら脂肪酸組成および無機成分の変動により乳汁の消化・吸収が低下して白痢の発症した可能性が示唆された。

この乳汁組成の変化の原因としては、給与飼料の変化とそれに伴うルーメンコンディションの変化が考えられる。そこで、ルーメンコンディションについて検討した。ルーメン液中微生物において、総原虫数は前駆症状発現日から増加の傾向を示した。このうち最初に前駆症状発現前日に大型原虫数が増加し、前駆症状発現翌日には中型原虫数が増加した。しかしこの日を最高値として pH の低下が始まり、白痢発症前日から大型および中型原虫数が減少した。小型原虫数は大型および中型原虫の減少と入れ替わるように増加したが、これはその栄養源となる細菌数が増加したためと思われる。しかし細菌数は牛個体によって原虫に捕食される程度に差異があったためか、一定の傾向は認められなかった。このように pH の低下とそれに呼応した大型および中型原虫の減少と小型原虫の増加という、ルーメン内の微生物叢の大きな変化が白痢発症日にむけて進行していったことが認められた。ルーメン液中アンモニア濃度の白痢発症日における変動は、これが微生物の変化に遅れて発現したことから、微生物叢が変化した結果と推定された。以上のことより、白痢発症日には母牛のルーメン環境が悪化していたこと (43) が示唆された。

ルーメンコンディションに変化が現れた場合、その結果として VFA 組成の変動が考えられる。本試験において、前駆症状発現日には酢酸 (C2) とプロピオン酸 (C3) に変化は認められなかったが、酪酸 (C4) は前駆症状発現前日に有意に増加した。VFA と乳汁成分の関係において、酢酸 (C2) は乳量と脂肪、乳糖、蛋白の増加、特に脂肪を増加させる作用が顕著であり、プロピオン酸 (C3) は乳量は増えないが蛋白が増加するいっぽう脂肪が低下する (51)。また酪酸 (C4) は、乳量は増えないが脂肪が増加する (51)。このことから、前駆症状発現日の酪酸 (C4) の増加は、乳脂肪率の増加に影響している可能性が示唆された。また白痢発症日には、いずれの VFA も前日に比べて増加しているが、乳脂肪の変化に一定の傾向はなかった。これはルーメン発酵の状態により、乳脂肪率を増加させる酢

酸 (C2)・酪酸 (C4) と、減少させるプロピオン酸 (C3) (51) の比率に差異が生じたためと考えられた。

母牛個体の MPT

以上のように、母牛の摂取飼料の変化がルーメンコンディションに変化をもたらし、それが子牛の白痢の発症の転機となる可能性の大きいことが認められた。次に、この飼料の変化が母牛の代謝にどのような影響を与えたかを検討した。

母牛について MPT を行ったところ、白痢発症日に母牛の血中 TG、PL、Glu、BUN の増加が認められたが、これは、デントコーンサイレージ給与開始後白痢発症までの間、飼料中の TDN や CP の増加がなく、飼料中脂肪濃度にも変化はなかったため、摂取飼料成分由来以外の要因と考えざるを得ない。

母牛の血中 TG の増加の要因としては、①飼料中脂質の増加 (60)、②ルーメン微生物体脂質の増加 (19、30、67)、③肝臓中脂質の放出の3つが可能性として考えられるが、①は飼料計算から否定され、③は β Lipo の白痢発症日前後の変動との相関が無いと否定されるので、②のルーメン微生物体脂質由来の可能性が高いと考えられた。

PL の増加の要因としては、PL の供給源として①飼料中脂質 (60)、②ルーメン微生物体脂質 (5,11, 30,67)、③胆汁酸 (5) および④肝臓や組織の細胞中の脂質が考えられるが、①は飼料計算から否定された。④は PL/Tcho の変動が大きかったことから、PL と Tcho がほぼ 1:1 で構成されている高密度リポ蛋白 (HDL) の増加は考えられず、FFA の増加がなかったことから組織からの供給の可能性も低かった。さらに β Lipo の変動とも連動していないので、④は要因とはなり得ないと考えられた。③の胆汁酸は、白痢発症前日に著しく増加した個体が 1 頭 (試験牛 E) あり、この個体の PL に限っては胆汁酸由来 (5) も考えられた。しかし、他の 4 頭の TBA は開始前に比べて半減しており、腸肝循環の円滑でないことが示唆され、これも共通の要因とは考えにくかった。いっぽう、牛の第四胃を通過したエステル化脂肪酸の 50% はリン脂質で、これは微生物由来のものと推定されており (66)、試験牛 E 以外の 4 頭の PL は②のルーメン微生物由来の可能性が高いと思われた。試験牛 E についても②の可能性のあることは否定できなかった。

Glu の増加の要因としては、①糖原性物質、特に VFA 中プロピオン酸 (C3) の増加、②肝臓等での糖新生の亢進、③ストレス、④ルーメン微生物体の糖が考えられる。③については、毎日同様な飼養管理と採材を行っており、子牛の白痢発症日に全頭ともにストレスを負荷したということはない。②の糖新生の亢進は、エネルギー不足時のインスリンの低下に伴って起きるが、これはホルモン感受性リパーゼ (HSL) の活性増加を伴うが、本試験ではそれによる FFA の増加は認められず、また、給与飼料内容からみてもこの可能性は低いと思われる。①については、VFA の分析から白痢発症前後にプロピオン酸 (C3) の増加が認め

られ、これが Glu の増加の原因となっている可能性もあると考えられた。また、④の可能性も考えられた。

BUN の増加の要因としては、①飼料中蛋白質の増加 (34、49)、②ルーメン内アンモニアの増加 (19)、③糖原性アミノ酸の利用による異化亢進 (55)、④ルーメン微生物の第四胃以下での消化 (48) が考えられる。これらのうち①は飼料計算から否定された。②はルーメン液の分析から認められたが、BUN の変化はルーメン内アンモニアの変化に 1 日先行していることから、これを原因とすることは困難と思われた。③は著しい飢餓の状況で起きるが、供試牛は飼料計算上からも血液の MPT から著しい飢餓の状況とは考えにくい。ゆえに、④のルーメン微生物由来の可能性が高いと考えられた。

このように、母牛の血中 TG、PL、Glu、BUN の同時増加の要因として、ルーメン微生物由来以外に起源を求めることは、Glu や一部個体の PL を除いては困難であった。このことと、白痢発症前日からの大型および中型原虫数の低下および小型原虫数の増加を考え併せると、白痢発症日にルーメン微生物が大量にルーメンから排出され、第四胃以下で消化・吸収されたものと考えられた。この微生物の大量流出は、大型および中型原虫が死滅してルーメンから流出したのか、小型原虫が増えすぎて流出したものは不明であるが、飼料、特にでんぷん濃度の増加に起因したルーメン内微生物叢の変化によるものと考えられた。

子牛個体の MPT

以上のように、母牛への給与飼料の変更により母牛の脂質代謝を中心とする種の栄養成分の代謝に変化が生じ、それによって白痢の前駆症状発症前後や白痢発症前後に乳汁の性状の変化したことがわかった。次に、それが子牛の白痢にどのように関与したかを検討した。

まず、子牛に発症した白痢が感染性のものではあったか否かが問題となる。感染性白痢の原因として最も多いのは病原性大腸菌とロタウイルス (3) である。本試験においては、いずれの時期においても子牛の腸内細菌数の増加は認められず、ロタウイルスは常時検出されず、また他の牛との接触も無かった。さらに本試験では高圧蒸気あるいは薬剤で牛舎を頻繁に洗浄・消毒しており、今回の症例が感染性下痢症である可能性は低いものと考えられた。

子牛の血液の MPT からは、白痢の前駆症状発現日を境に各種の代謝活性に変化の起こることが認められた。すなわち、前駆症状発現日前後に全頭で TG が低値を示し、それ以降は哺乳量が多く TG が著しく高かった試験牛 EC を除く 4 頭で、デントコーンサイレージ給与開始前より TG が増加した。腸管から吸収された脂質は肝臓を経由して体組織へ転送される。血中 TG は消化管からリンパ管を経て肝臓に至るカイロミクロン (60) と、肝臓から放出される β Lipo の主成分である。子牛の場合、肝臓の蓄積脂肪量は少ないので、消化管からの摂取脂質が比較的速やかに肝臓を通過して体組織に転送されると考えられる。筆者らのホルスタイン哺乳

子牛における実験（未発表）において、血中 TG は哺乳後 1～2 時間に最高値を示し、4 時間には哺乳前の値に戻ることを確認している。このことと、TG と β リポ蛋白とが連動して変化したことから、本試験においては前駆症状発現日（試験牛 DC は給与開始 3 日前あるいは給与開始日の自然発症日）前後に腸管からの脂質の吸収が一時的に低下し、その後、TG の吸収が増加したことがうかがわれた。血中 TG 増加の原因としては、母牛の乳量および乳脂肪量の増加がまず考えられるが、本試験においては子牛の血中 TG と母牛の乳量および乳脂肪量は連動していなかったもので、これは無関係と考えられた。いっぽう本試験において哺乳後採血までの時間は 6 時間であり、通常であれば哺乳後の血中 TG の一過性の増加の影響の消失している時間帯であるので、母乳の脂肪酸組成のところで考察したように乳汁の腸管内での滞留があり、それによる持続的な脂肪吸収のあったことが推定される。この乳汁の滞留はいくつかの影響を及ぼす。まず、乳糖の吸収が TG 同様に増加するため、血中 Glu は一時的に増加する可能性があるが、本試験では前駆症状発現日前後にそれが認められた。また、新生児では飽和脂肪酸塩の刺激による腸管粘膜の炎症が生じて下痢が起きやすくなる (23) と言われている。また長時間腸管に滞留した脂肪は常在細菌叢の作用で水酸化されて吸収されにくくなり、これが腸管の運動性の変化やナトリウムおよび水分の分泌を促進するとされている。さらに乳糖が長時間腸管内に滞留すると腸管内の微生物叢が変化し下痢が起きやすくなる (23)。これらのことが前駆症状発現日から進行し、母乳性状の不安定化ともからみあって白痢の発症した可能性が考えられた。TG の増加の原因として肝臓からの脂質の放出の活性化も考えなければならないが、 β Lipo は前駆症状発現日以前の値を上回ることはなく、肝臓からの脂質の放出能が亢進しているとは考え難かった。

以上のように子牛は前駆症状発現日以降、消化管内環境は不安定となり、それが徐々に悪化していった可能性が示唆された。白痢発症日には子牛の血液に著変はなく、白痢の発症は子牛の代謝異常や脂質の吸収不良によるものではなく、消化管内での消化不良によるものと推定された。

まとめ

以上のことから子牛白痢発症までの経過をまとめると、以下のようになった。デントコーンサイレージの給与開始後 1～3 日に子牛の糞便に軽度の変化が認められたので、この日を前駆症状発現日とした。前駆症状発現日の乳汁中 Mg および Ca は高値の傾向を示し、飽和脂肪酸量あるいは高級飽和脂肪酸も増加の傾向にあった。前駆症状発現日前後にはルーメン液中の大型および中型原虫数が増加したが、白痢発症前日から減少し、小型原虫が増加した。この日から母牛の血中 PL、および BUN が増加し、これは大型および中型原虫あるいは小型原虫を消化吸収することによるものと推定された。この間、乳汁の pH、脂肪酸組成およびケトン体濃度が次第に不安定になった。いっぽう子牛の血液検査結果からは、前駆症状発

現日以降、腸管での乳汁成分の滞留を示唆する所見が得られた。新生児の白痢においては、高級飽和脂肪酸は吸収が著しく悪い上、二価の陽イオンと結合して脂肪酸塩を形成して腸管に滞留しやすく、腸管内に脂肪が長時間滞留すると、常在菌が脂肪酸を水酸化することで吸収されにくいオキシ脂肪酸が形成されてナトリウムや水分の分泌を促進することが発症の原因の一つとされており、この変化が子牛の腸管内で起きていた可能性が考えられた。さらに母乳の変化が日を追って増幅され、飼料変更後5~7日の白痢発症日には、大量のルーメン微生物の消化・吸収に起因すると思われる母牛の血液成分 (PL、TG、Glu、BUN) の一過性の増加があり、それによるとと思われる乳汁成分 (乳脂肪率、脂肪酸組成、pH) の一過性の変化が起こった。子牛は前駆症状発現日以降すでに消化不良の状態であったところに、乳脂肪率、脂肪酸組成および pH 等に変化をきたした乳汁を哺乳し、これにより脂肪の消化不良が急激に進行し、脂肪消化不良便としての白痢が発症したと推定された。白痢発症時には子牛の血中 TG の低下は認められず、この時点での脂肪吸収不良はないものと推定された。これは病原微生物により腸管が損傷されて白痢が発症するという、低脂質血症を伴う感染性白痢の病態とは異なるものであった。

このように子牛の“母乳性白痢”は、デントコーンサイレージ給与後に生じる母牛のルーメンコンディションの変化に起因する乳汁の変化により引き起こされることが示唆された。しかし母牛のルーメンコンディションの変化、乳汁の生産過程での変化および子牛の消化管内環境については、さらに詳細な検討が必要と思われた。

本試験では牛舎は頻繁に洗浄・消毒を行い、微生物感染の防御には細心の注意を払った。しかし一般農家ではこのような管理は不可能であり、前駆症状発現日以降の子牛の消化管の機能が不全であれば、腸内細菌叢が変化し、感染性白痢の誘因ともなりうる。筆者らの先の報告 (B) で示したように母牛の飼養管理の改善で子牛の白痢は激減することから、感染性白痢と分類されている子牛白痢のうちの相当数の原因あるいは誘因は母乳の異常である可能性も考えられ、子牛白痢の予防および治療については母牛の飼養管理から考え直す必要があると思われた。

第3章 長鎖脂肪酸投与によるホルスタイン種子牛の糞便

および血液性状の変動

緒言

筆者らは第2章において、黒毛和種子牛の白痢は母牛のルーメンコンディションの変化に起因する乳汁脂肪酸成分の変動が大きく関与することを明らかにした。そこでそれを確認するために、第2章で問題となった長鎖脂肪酸を乳汁に添加することによる、子牛の血液および糞便性状の変化を検討することにした。当初、供試牛は黒毛和種子牛5頭を用いる予定であったが、頭数の確保等の諸般の事情により、やむを得ず、ホルスタイン子牛を用いざるを得なかった。

材料および方法

1. 供試牛

臨床的に健康な2~3週齢のホルスタイン種子牛20頭を供試した。供試牛は5頭づつ、無投与コントロール群(C1~5)、オレイン酸投与群(O1~5)、ステアリン酸投与群(S1~5)、パルミチン酸投与群(P1~5)の4群に分けた。供試牛の性別と導入時の日齢および体重は表12に示した。導入時の日齢は1~7日、体重は33.5~51.0kgであった。

飼育は戸外のカーフハッチで行い、木製のこの上にポリウレタンのマットのみを敷き、他の敷料は用いなかった。牛の入れ替えの際には、カーフハッチを移動し、カーフハッチの蒸気殺菌と地面の火炎消毒および生石灰の散布を行った。

2. 給与飼料および投与脂肪酸

朝8時と夜8時の1日2回、体重の5%に相当する量の代用乳を38℃に加熱して哺乳バケツで哺乳させた。飲水はバケツから自由に行わせた。試験日には朝夕12時間間隔で2回、代用乳の2%量の脂肪酸を添加して投与した。投与した脂肪酸は、オレイン酸(関東化学;東京)、ステアリン酸(関東化学;東京)、パルミチン酸(関東化学;東京)の3種類を用いた。他の飼料は試験終了まで一切与えなかった。

3. 材料の採取、処理および保存方法

1) 採血方法

試験日の朝の脂肪酸投与前と投与後 1、2、4、6、12、24、36 および 48 時間に採血を行った。採血と哺乳が重なった際は、採血後に哺乳した。採血は頸静脈から採血量 4ml の血清分離剤入り真空採血管（SST 管、日本ベクトンディッキンソン、東京）を用いた。採取した血液は直ちに 38℃にて 15 分間インキュベートした後、3000 回転で 15 分間遠心して血清を分離した。血清は分離後、一部は直ちに測定に供し、残りは -40℃で凍結保存した。

2) 採便方法

供試牛は、試験開始前および試験日の朝の脂肪酸投与前と投与後 6、12、24、36 および 48 時間と下痢発症時に直腸から糞便を採取した。採取した糞便は直ちにチャック付きのビニール袋に薄くのぼして入れて密閉し、-40℃で凍結保存した。

4. 検査項目および測定方法

1) 血液

血清生化学検査項目は、トリグリセリド (TG)、 β リポ蛋白 (β Lipo)、遊離脂肪酸 (FFA)、総コレステロール (Tcho)、リン脂質 (PL)、総胆汁酸 (TBA)、尿素窒素 (BUN)、グルコース (Glu) の 8 項目について行った。測定方法等は表 13 に示した。測定は TBA、PL を除いて当日中に行い、PL はその個体の試験が終了した時点で、TBA は後日まとめて測定した。測定機器は ANALYZER SUPER Z818 (エム・シー・メディカル、東京) を用いた。

2) 糞便

導入時に供試牛全頭の糞便中のロタウイルス抗原の有無、腸内生細菌数の検査、クリプトスポリジウム抗原の有無の検査を行った。試験期間中は、採取直後に色と性状を記録し、下痢発症時にはロタウイルス抗原の有無、腸内生細菌数の検査を行った。

ロタウイルス抗原の検査は、ラテックス凝集法 (ロタレックスドライ; 第一化学・ORION DIAGNOSTICA, Finland) により行った。肉眼的にテストカードの ROTA スポット上に凝集が認められ、かつ CONTROL スポット上に凝集が認められなかった場合を陽性と判定した。腸内生細菌数は、糞便 0.1g を Phosphate Buffered Saline (PBS) で 10 倍段階希釈し、5~9 倍希釈液をマッコンキー寒天培地 (日水製薬株式会社; 東京) にそれぞれ 0.1ml 塗布し、38℃、24 時間培養した後コロニー数を計測した。クリプトスポリジウムの有無の検査は、Cryptosporidium Test (TECH LAB; Blacksburg) により Monoclonal ELISA 法で行った。糞便 0.1g を検体とし、肉眼的にポジティブコントロール、ネガティブコントロールと比較して判定した。

さらに凍結糞便を用いて、糞便中脂肪酸組成の分析を行った。糞便は解凍後、Bligh-Dier の方法 (17) によって粗脂質を抽出した (表 2)。Bligh-Dier の方

法は 15ml の共栓付きスピッツグラスに 0.5g の糞便を入れ、クロロホルムとメタノールを 1 : 2 の割合で混合した溶液 3.75ml を加え、1~2 時間ときどき振とうした後、3000 回転で 5 分間遠心した。上清を別のスピッツグラスに移し、沈殿物にクロロホルムとメタノールと水とを 1 : 2 : 0.8 の割合で混合した溶液 4.75ml を加え、同様に振とう、遠心した。上清を先程のものと合わせ、2.5ml ずつのクロロホルムと水を順次加えて攪拌し遠心分離後、下層のクロロホルム層を取り出し、同量のベンゼンを加えて窒素気流中で濃縮し、粗脂質を抽出した。総 TG 量は予め重量を計量したスピッツグラスに抽出した粗脂質を入れて、恒量ができるまで乾燥、計量を繰り返し、重量法で計量した (28)。その後、抽出した粗脂質に 5% 無水メタノール塩酸 2ml を加え、50℃ で 2 時間時々振りながら加熱し、室温に冷却後、ヘキサン 2ml を加えて振とうしてヘキサン層を別のスピッツグラスに移し、この操作を 3 回繰り返した。2% KHCO_3 を 2ml で後洗し、取り出したヘキサン層に小匙 3~5 杯の硫酸ナトリウムを入れて一晩放置し、窒素気流中で溶媒を留去して、メチルエステル化した (表 14)。次いで、メタノール 5ml に溶解し、よく攪拌して 90 μl をサンプルカップに入れ、内部標準として 10 μl のヘプタデカン酸 (C17) (フナコシ、東京) を加えて攪拌して高速液体クロマトグラフィー (資生堂・NANOSPACE SI-1、東京) の試料とした。測定は、移動相は 0.1% リン酸水溶液 (MQ) : アセトニトリル=2 : 8、カラムは CAPCELL PAK C18 UG120 逆相カラム (資生堂、東京)、注入量 20 μl 、測定時間 110 分、波長 210nm、カラム温度 40℃ の条件で測定した。

3) 代用乳

代用乳中の粗脂質の抽出は、その 1g を、糞便と同様に Bligh-Dier の方法によって行い、重量法で総 TG 量を計量した後、メチルエステル化して、高速液体クロマトグラフィーで脂肪酸組成の分析を行った。

5. データ処理

データは脂肪酸投与試験日の朝の哺乳前を 0 として、その後の時間を示した。各項目については、各群 5 頭の平均値を求め、哺乳前の値を 100% とした場合のその後の変動について示した。統計処理は、脂肪酸投与前と投与後、コントロール群と脂肪酸投与群との有意差の有無を Mann-Whitney 検定で求めた。

成 績

1. 臨床症状

試験期間中は、元気、食欲に変化はみられず、体温も正常であった。試験期間における各子牛の糞便の性状および色調を表 15 に示した。糞便の性状および色調の変化は、いずれも半日から数日で回復する軽いものであった。コントロール群

では、脂肪酸投与後 12~36 時間に 1 頭で軟~粘調性軟便を認めた。オレイン酸投与群では、脂肪酸投与後 24 時間に 3 頭で色調が黄白色に変化し、5 頭全頭で 6~24 時間に軟便~水様便を呈した。ステアリン酸投与群では、脂肪酸投与後 12~48 時間に 2 頭がやや軟~水様便と軟便となり、黄白色便となった。別の 2 頭では色調のみ変化し、白~黄白色便となった。パルミチン酸投与群では、脂肪酸投与後 12~48 時間に 5 頭全頭がや軟便、泥状便、水様便などになり、色調も黄白色~灰白色便となった。また、全頭で白い顆粒の混在を認めた。

2. 代用乳中総 TG 量および脂肪酸組成

代用乳中の総 TG 量は 1g 中 0.063g で、脂肪酸組成はラウリン酸が 5.56% (0.34mg/ml)、ミリスチン酸が 36.84% (2.27mg/ml)、パルミチン酸が 6.55% (0.40mg/ml)、パルミトレイン酸が 1.88% (0.12mg/ml)、ステアリン酸が 6.42% (0.39mg/ml)、9.10 ジヒドロキシステアリン酸 (9.10-OHFA) が 12.91% (0.79mg/ml)、12 ヒドロキシステアリン酸 (12-OHFA) が 3.11% (0.19mg/ml)、オレイン酸が 18.79% (1.16mg/ml)、リノール酸が 7.93% (0.49mg/ml) であった (図 19)。

3. 血清生化学検査値

1) TG

各群の脂肪酸投与後の TG の平均値の推移を図 20 に示した。TG は、各群とも 1 回目脂肪酸投与後 1~2 時間に急激に増加し、オレイン酸投与群は投与後 1~2 時間に、ステアリン酸投与群は投与後 2 時間に、パルミチン酸投与群は投与後 1 時間に、投与前に対して有意な増加を示した。各群ともその後減少して、2 回目投与時の 12 時間にはほぼ投与前の値に戻った。ステアリン酸投与群では投与後 36 時間に、パルミチン酸投与群では投与後 24~36 時間に再び増加傾向を示したが、いずれも 48 時間には投与前の値まで減少した。同一時間での群間に有意な差は認められなかった。

2) β Lipo

各群の脂肪酸投与後の β Lipo の平均値の推移を図 20 に示した。 β Lipo は TG とほぼ同様の変動を示し、1 回目投与後 1~2 時間に増加傾向を示したが、このうち、パルミチン酸投与群は投与後 1 時間に投与前に対して有意に増加した。各群ともその後次第に減少し、2 回目投与時の 12 時間にはほぼ投与前の値に戻った。同一時間での群間に有意な差は認められなかった。

3) FFA

各群の脂肪酸投与後の FFA の平均値の推移を図 20 に示した。コントロール群は哺乳後減少傾向を示し、オレイン酸投与群は投与後 2 時間に増加した。ステアリン酸投与群とパルミチン酸投与群は投与前の値で推移したが、いずれの群も 2 回

目投与時の 12 時間には投与前の値よりやや増加傾向を示した。投与後 24 時間には、コントロール群では減少傾向を示したが、脂肪酸投与群は 24~48 時間に増加傾向を示した。このうち、コントロール群は 36~48 時間に、パルミチン酸投与群は 36 時間に投与前に比べて有意な増加を示した。同一時間での群間に有意な差は認められなかった。

4) Tcho

各群の脂肪酸投与後の Tcho の平均値の推移を図 21 に示した。いずれの群も投与後 1~2 時間に減少したが、コントロール群では 1~2 時間に、オレイン酸投与群では 1 時間に有意に減少した。2 回目投与時の 12 時間にはいずれの群もほぼ投与前の値に戻り、その後、コントロール群は 24~36 時間には有意に増加し、オレイン酸投与群は 24~48 時間に減少してコントロール群に対して有意な低値を示した。ステアリン酸投与群とパルミチン酸投与群はほぼ一定の値で推移した。

5) PL

各群の脂肪酸投与後の PL の平均値の推移を図 21 に示した。コントロール群とステアリン酸投与群は投与後 4~6 時間までほぼ一定の値で推移し、その後減少傾向を示し、ステアリン酸投与群は投与後 6~12 時間に投与前に対して有意に減少した。コントロール群は 24 時間ではほぼ投与前の値に戻り一定の値で推移した。オレイン酸投与群は投与後 1 時間に増加傾向を示し 24 時間までほぼ一定の値で推移して、その後減少して投与前の値で推移した。パルミチン酸投与群は投与後 1 時間に減少傾向を示し 12 時間までほぼ一定の値で推移して、24 時間に増加傾向を示して投与前の値に戻った後、再び減少した。同一時間の群間の有意な差は認められなかった。

6) TBA

各群の脂肪酸投与後の TBA の平均値の推移を図 21 に示した。コントロール群は哺乳後 2 時間に哺乳前に対して有意に減少し、12 時間には投与前の値に戻った。その後 24 時間では増加したが、36 時間にほぼ哺乳前の値まで減少した。オレイン酸投与群は投与後 1~2 時間に急に増加したが、4 時間にはほぼ投与前の値まで減少し、再び 6~12 時間に増加した。24 時間には投与前の値にまで減少して、その後 48 時間まで増加した。また、投与後 2、48 時間には投与前およびコントロール群に対して有意に増加した。ステアリン酸投与群はほぼ一定の値で推移した。パルミチン酸投与群は投与後 1 時間に哺乳前およびコントロール群に対して有意に増加し、2 時間に減少したがコントロール群に対しては有意な高値を示した。その後 12 時間まで投与前の値で推移し、24 時間には投与前より増加した後 36 時間には再び減少して一定の値で推移した。

7) BUN

各群の脂肪酸投与後の BUN の平均値の推移を図 22 に示した。コントロール群とオレイン酸投与群はほぼ一定の値で推移し、大きな変動はみられなかった。ステ

アリン酸投与群は投与後4時間に投与前に対して有意に減少したが12時間には投与前の値に戻った。24~48時間には投与前およびコントロール群に対して有意な低値を示した。パルミチン酸投与群は投与後12時間までは一定の値で推移したが、24時間に減少し、48時間には投与前に対して有意に減少した。

8) Glu

各群の脂肪酸投与後のGluの平均値の推移を図22に示した。Gluは各群とも投与後1~2時間に上昇し、このうち、コントロール群で哺乳後2時間に、オレイン酸投与群で投与後4時間に、ステアリン酸投与群で投与後1~4時間に、パルミチン酸投与群で投与後2時間および6時間に投与前に対して有意に増加した。各群ともその後低下して12時間にはほぼ投与前の値で推移した。またパルミチン酸投与群では投与後2時間にコントロール群に対して有意な低値を示し、投与後24時間に投与前に対して有意に減少した。

4. 糞便の微生物検査

試験開始前および下痢発症時の微生物学的検査結果を表16に示した。試験開始前の腸内生細菌数は、 $4.4 \times 10^6 \sim 7.9 \times 10^7 / \text{g}$ であり、下痢発症時は $7.6 \times 10^6 \sim 7.1 \times 10^8 / \text{g}$ であったが、多くの群で著しい変化はなかった。また、ロタウイルス抗原はすべての個体で終始検出されなかった。

5. 糞便中総TG量および脂肪酸組成

1) 糞便中総TG量

測定した脂肪酸は、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸、9,10-OHFA、12-OHFA、オレイン酸およびリノール酸であった。

各群の、糞便中総TG量の平均値の推移を図23に示した。コントロール群は哺乳後6時間に減少した後ほぼ一定の値で推移したが、哺乳後24時間と48時間には哺乳前に対して有意に減少した。オレイン酸投与群とステアリン酸投与群はほぼ一定の値で推移し大きな変動はみられなかったが、オレイン酸投与群では投与後36時間に、ステアリン酸投与群では投与後24時間にコントロール群に対して有意な高値を示した。パルミチン酸投与群は投与後36時間まで増加し、48時間に減少したが、36時間には投与前およびコントロール群に対して有意に増加し、48時間にはコントロール群に対して有意な高値を示した。

2) ラウリン酸

各群の、糞便中ラウリン酸の平均値の推移を図24に示した。コントロール群は哺乳後6時間に増加傾向を示し、12時間には哺乳前の値に戻ったが、24時間には増加傾向を示し、36時間に減少して48時間には再び増加したが、哺乳前に対して有意差は認められなかった。オレイン酸投与群はほぼ一定の値で推移し、大き

な変動は認められなかった。ステアリン酸投与群は投与後 6 時間に減少して、そのまま一定の値で推移し、24~36 時間には投与前およびコントロール群に対して有意に減少した。パルミチン酸投与群は投与後 6 時間に増加した後減少して 12 時間の 2 回目投与時には投与前の値に戻った。24 時間にはコントロール群に対して有意な低値を示したが、36 時間にはほぼ投与前の値にまで増加した。

3) ミリスチン酸

各群の、糞便中ミリスチン酸の平均値の推移を図 24 に示した。パルミチン酸投与群は投与後 6 時間に増加し、2 回目投与時の 12 時間には減少して投与前の値に戻り、2 回目投与後の 24 時間にも投与前の値に戻ったが、その後、36 時間に増加してコントロール群に対して有意な高値を示し、その後減少した。その他の群はほぼ一定の値で推移したが、コントロール群は哺乳後 36 時間に哺乳前に対して有意に減少した。

4) パルミチン酸

各群の、糞便中パルミチン酸の平均値の推移を図 24 に示した。パルミチン酸投与群は投与後 6 時間に増加傾向を示し、2 回目投与時の 12 時間には投与前と比べてやや高値を示した。2 回目投与後の 24 時間には増加し、36~48 時間に投与前およびコントロール群に対して有意な高値を示した。その他の群はほぼ一定の値で推移し、大きな変動はみられなかった。

5) パルミトレイン酸

各群の、糞便中パルミトレイン酸の平均値の推移を図 25 に示した。コントロール群とパルミチン酸投与群は投与後 12 時間に有意に減少し、2 回目投与後の 24 時間でも同じレベルであったが、36~48 時間に投与前の値に戻った。コントロール群は哺乳後 24~36 時間に、投与前に対して有意に減少した。オレイン酸投与群は投与後 12 時間まで減少傾向を示し、24~36 時間に増加傾向を示してその後減少した。ステアリン酸投与群は大きな変動はみられなかった。同一時間での群間の差は認められなかった。

6) ステアリン酸

各群の、糞便中ステアリン酸の平均値の推移を図 25 に示した。コントロール群は哺乳後 6 時間にわずかに減少し、その後ほぼ一定の値で推移したが、36 時間に哺乳前に対して有意に減少した。ステアリン酸投与群は投与後 12~36 時間に著しく増加し、24 時間でピークとなり、その後 48 時間に減少したが、12~36 時間に投与前およびコントロール群に対して有意に増加した。その他の群は大きな変動はみられなかった。

7) 9.10-ジヒドロキシステアリン酸 (9.10-OHFA)

各群の、糞便中 9.10-OHFA の平均値の推移を図 25 に示した。コントロール群とオレイン酸投与群は投与後 6~12 時間に減少し、その後増加したが、2 回目投与後の 24 時間には投与前より低値で、48 時間にほぼ投与前の値に戻った。コン

トロール群は哺乳後 6~12 時間に哺乳前に対して有意に減少した。ステアリン酸投与群は投与後 6 時間に減少し、2 回目投与時の 12 時間には投与前の値よりやや低値を示し、2 回目投与後の 24 時間にもそのままの値で、その後ほぼ一定の値で推移した。パルミチン酸投与群は投与後 6 時間に増加してコントロール群に対して有意な高値を示し、12 時間には投与前の 65%にまで減少した。その後増加する傾向を示し、24 時間には投与前の 90%まで増加した。投与後 12 時間と 36 時間には投与前に対して有意に減少した。

8) 12-ヒドロキシステアリン酸 (12-OHFA)

各群の、糞便中 12-OHFA の平均値の推移を図 26 に示した。コントロール群は哺乳後 12 時間まで減少して 24 時間に増加する傾向を示したが、哺乳後 36 時間には哺乳前に対して有意に減少した。オレイン酸投与群は投与後 12 時間で有意に減少したが、2 回目投与後の 24 時間では増加しており 36 時間にはピークとなった後、48 時間に減少してほぼ投与前の値を示した。ステアリン酸投与群は投与後次第に減少し 12、24 時間ともに減少したが、48 時間に増加した。投与後 36 時間には投与前に対して有意に減少した。パルミチン酸投与群は投与後 6 時間に増加し、12、24 時間ともに減少していたがその後増加する傾向を示した。投与後 24 時間には投与前に対して有意に減少した。

9) オレイン酸

各群の、糞便中オレイン酸の平均値の推移を図 26 に示した。コントロール群は哺乳後 6 時間に哺乳前に対して有意に減少し、その後ほぼ一定の値で推移した。オレイン酸投与群は投与後 12 時間では投与前のレベルであったが 24~36 時間では増加して 48 時間には投与前の値に戻った。ステアリン酸投与群は大きな変動はみられなかった。パルミチン酸投与群は投与後次第に増加し 12、24 時間ともに増加して 36 時間にはピークとなった後、48 時間に減少したが、投与後 36~48 時間には投与前およびコントロール群に対して有意な高値を示した。

10) リノール酸

各群の、糞便中リノール酸の平均値の推移を図 26 に示した。コントロール群は哺乳後 6 時間に減少し、その後ほぼ一定の値で推移した。オレイン酸投与群は投与後 12 時間では変動しなかったが、24~36 時間では増加して、48 時間には投与前のレベルに減少した。ステアリン酸投与群は投与後 12 時間では変動しなかったが、24 時間に増加し、その後減少してほぼ投与前の値で推移した。パルミチン酸投与群は投与後 6 時間に増加し 12 時間に減少して投与前のレベル以下になり、24 時間には投与前の値に戻った後、増加して 36 時間でコントロール群に対して有意に高値となり 48 時間には投与前のレベルに戻った。

考 察

第 2 章において黒毛和種牛の母乳性白痢において、白痢発症子牛が哺乳していた乳汁の脂肪率は 2% 程度増加しており、特定脂肪酸が増加していたことを認めた。そこで、本章では乳汁中脂肪酸組成と子牛の白痢との関連性をさらに明確にするために、人工的に特定脂肪酸を添加した代用乳をホルスタイン子牛に哺乳させ、臨床症状と糞便中脂肪酸組成の変動を観察した。

脂肪酸はその炭素数によって短鎖 (C4~C8)、中鎖 (C10~C14)、長鎖 (C16 以上) に分類される。また、二重結合を持たない脂肪酸は飽和脂肪酸、二重結合を持つ脂肪酸は不飽和脂肪酸と呼ばれる。今回の試験の脂肪酸はラウリン酸 (C12)、ミリスチン酸 (C14) が、中鎖飽和脂肪酸、パルミチン酸 (C16)、ステアリン酸 (C18) が長鎖飽和脂肪酸、パルミトレイン酸 (C16:1)、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2) が長鎖不飽和脂肪酸である。

子牛に特定脂肪酸を添加した代用乳を哺乳させると、コントロール群で 5 頭中 1 頭、オレイン酸投与群で 5 頭全頭、ステアリン酸投与群で 5 頭中 4 頭、パルミチン酸投与群で 5 頭全頭に糞便性状または色調の変化が認められた。いずれの症状も治療なしで半日から数日で回復する軽いものであった。今回の試験では、糞便性状の変化時にすべての個体で腸内生細菌数の大きな増加は認められず正常範囲内の推移であり、ロタウイルス抗原も検出されなかったため、糞便性状の変化は非感染性の原因による可能性が高いと考えられた。

血清生化学データは、脂肪酸投与前の値が群間に有意差はなかったもののばらつきが大きかったため、脂肪酸投与後の変動については脂肪酸投与前に対する変化率のグラフとして示した。

血中 TG は食餌性脂質が消化管から吸収されリンパ管を経て肝臓に至るまでのカイロミクロンと、肝臓から放出されるプレβ Lipo 蛋白およびβ Lipo の主成分である。高橋らは子牛の下痢発症時の血中 TG が低値の時は腸での脂質の消化吸收阻害などによる低エネルギー状態であり、高値の時は脂質の過剰と肝や膵機能が関連した脂質代謝異常であり、正常値は中間の病態であるとした (59)。また、筆者らは高脂肪乳給与により短時間で吸収不能に陥る個体と持続的吸収を維持する個体があり、子牛の消化吸收能力に大きな個体差があることを認めている (未発表)。今回の試験では、血中 TG は飽和脂肪酸であるステアリン酸およびパルミチン酸投与群で下痢発症時に増加傾向を示したもののコントロール群との有意な差はみられなかった。しかし、投与直後にコントロール群より高値を示す傾向があり、これは、第四胃内でのカード形成能が低下して乳汁の第四胃の通過速度が速まり、持続的吸収ができずに一過性に脂質を吸収した可能性が考えられた。

下痢発症子牛は未発症子牛に比べて BUN の上昇と血中 Tcho の低下が認められ、これは下痢の発症により体内の水分と電解質が喪失し、それに伴い腎血流量が減少して BUN が上昇し、また、消化吸收阻害に伴うエネルギー吸収の低下により Tcho が低下することによると考えられている (15)。しかし、今回の試験では BUN の増加は認められなかった。逆に高級飽和脂肪酸投与群で下痢発症時に BUN

が低下した。BUN の低下の原因は、血中 Tcho が脂肪酸投与各群ともコントロール群より低値を示したと併せて、消化吸收阻害によるものと考えられた。PL は肝で生合成され、アポ蛋白、コレステロール、糖脂質などとともにリポ蛋白を形成し、複合脂質の中で大きな割合を占めており、栄養失調で低下を示す。ステアリン酸投与群での有意な減少は、そのためであると考えられた。TBA は脂質を乳化し、脂肪の消化産物を可溶化させる機能がある。オレイン酸投与群で下痢発症後に増加していることから、脂質の消化不良を改善させるために胆汁酸分泌が亢進したのと考えられた。血中 FFA は、体脂肪からの脂肪の動員により供給されエネルギー不足の状態が増加する。また、給餌後 1.5~3.5 時間に 40% 減少する。今回の試験でも、コントロール群と飽和脂肪酸投与群で哺乳後 2~4 時間に減少傾向がみられた。血中 FFA は、子牛では体脂肪由来のものとカイロミクロン由来のものが考えられるが、オレイン酸投与群では他の群に比べ血中 TG の増加が少なかったにも関わらず血中 FFA が大きく増加した。これはエネルギーが負の状態である可能性が高いことから、オレイン酸投与群では脂肪の消化吸收が低下したのと考えられた。血中 Glu は、肝での糖新生あるいは食餌により供給され、エネルギー不足により低下するが、FFA やケトン体濃度の変化に比べるとその調節機構は強力で変化は小さい (53)。今回の試験では、6 時間まではいずれの群も投与前の値より増加したが、パルミチン酸投与群で投与後 2 時間にコントロール群に対して低値を示し、発症時にも減少した。これは、消化吸收機能の低下により糖あるいは糖原物質の吸収が低下したためと考えられた。以上のことから、長鎖脂肪酸投与により、腸管での消化吸收阻害が起こり、脂質吸収の低下が生じていると推測された。

新生子牛において腸管の脂肪酸吸収能は、短鎖脂肪酸であるカプリル酸 (C8)、カプリン酸 (C10) およびラウリン酸 (C12) は 100%、パルミトレイン酸 (C16:1)、オレイン酸 (C18:1) およびリノール酸 (C18:2) は 89、75 および 79%、パルミチン酸 (C16) は 42%、ステアリン酸 (C18) は 26% であり、長鎖飽和脂肪酸の吸収率の極端に悪いことが示されている (50)。今回の試験では、長鎖飽和脂肪酸であるステアリン酸とパルミチン酸投与群で投与脂肪酸が糞便中に増加しており、糞便中総 TG 量も増加していることから、長鎖飽和脂肪酸投与における下痢発症は、吸収率の悪い長鎖飽和脂肪酸が急激に増加したために、腸管内で吸収しきれずにそのまま排出した脂肪便であることが考えられた。また、パルミチン酸投与群では、糞便中にミリスチン酸、オレイン酸、リノール酸も増加しており、これは、腸管での脂質吸収不良により、本来吸収率のよい脂肪酸の吸収も阻害され、排出されたのと考えられた。

Abe は、脂肪源の異なる代用乳を子牛に哺乳し、長鎖不飽和植物油と下痢との関連について報告した (2)。また、新生児における脂肪便は、腸管内に長時間脂肪が滞留すると腸内常在菌が中性脂肪中の飽和脂肪酸を水酸化し、水酸化脂肪酸に変えてしまうため発症することが知られている (7、9、58、61)。この水酸化

脂肪酸は腸管の運動性を変え、ナトリウムや水分の分泌を促進する作用があるため、下痢を引き起こす因子となり、この作用はオレイン酸で最も顕著にみられる。今回の試験では、不飽和脂肪酸であるオレイン酸を投与した群で下痢発症後に糞便中水酸化脂肪酸が増加する傾向がみられたことから、オレイン酸が腸管内で水酸化脂肪酸に変化し、下痢を引き起こす原因となった可能性が考えられた。

母牛の高脂肪乳は摂取脂肪の分解吸収能の未発達な子牛において、腸管内での脂質乳化およびミセル化不良によって消化不良を引き起こすと考えられる。今回の試験では、長鎖飽和脂肪酸および長鎖不飽和脂肪酸投与によって子牛に下痢を引き起こしたが、これらは高脂肪乳による消化不良も一つの原因と考えられた。しかし、高脂肪乳においても増加した脂肪酸の種類によりその病態に差異が見られた。すなわち、長鎖飽和脂肪酸投与による発症は、吸収率の悪い長鎖飽和脂肪酸が増加したことにより、腸管内での脂質乳化およびミセル化不良の起きていた可能性がある。また、長鎖不飽和脂肪酸投与による発症は、代用乳中脂肪率の増加、腸管内での不飽和脂肪酸の水酸化による水酸化脂肪酸の増加が、脂質の吸収不良と水分、電解質の分泌促進を引き起こし下痢が発症したと考えられた。

以上のことより、長鎖飽和脂肪酸の増加は子牛の白痢と密接な関連を持つことが明らかとなった。

第4章 まとめ

子牛白痢発症の一つの要因と推定された低でんぷん飼料給与母牛へのデントコーンサイレージ追加給与後の子牛白痢の発症再現試験を行った。分娩直後の5頭の黒毛和種雌牛とその子牛を供試し、連日の飼料摂取量と泌乳量を掌握しながら、母牛の胃汁、血液および乳汁と子牛の血液および糞便について、子牛の白痢発症まで追跡した。その結果、供試牛の子牛全頭が母牛へのデントコーンサイレージ給与開始後5~7日に白痢を発症した。すなわち、デントコーンサイレージの給与開始後1~3日に子牛の糞便に軽度の変化が認められた。この日を前駆症状発現日とすると、この前後にルーメン液中の大型および中型原虫数が増加した。この日に乳汁中Mg、Caおよび高級飽和脂肪酸濃度が高値を示し、乳汁のpHおよび脂肪酸組成が不安定になった。同時に、子牛の腸管内での脂肪酸塩形成による乳成分の滞留によると思われる子牛の血中TGの増加が始まった。白痢発症前日には、母牛のルーメン原虫のうち大型および中型原虫数が減少しはじめ、小型原虫が著しく増加した。それに呼応して血中リン脂質(PL)およびBUNの増加が認められた。白痢発症日には大量のルーメン微生物の消化・吸収の一過性の亢進により母牛の血液(TG、PL、糖、BUN)および乳汁(乳脂肪率、脂肪酸組成)成分および乳汁pHに一時的に大きな変化が生じ、この乳汁を哺乳した子牛はこれを脂肪消化不良便として排出することで白痢が発症したものと推定された。

以上のことから、低でんぷん飼料を給与されていた母牛にデントコーンサイレージが追加給与されることによって生じたルーメンコンディションの変化が、母牛の血中脂質の変化を引き起こし、その乳汁を哺乳した子牛が“母乳性白痢”を発症することが明らかとなった。

そこで乳汁中脂肪酸組成の変化と子牛の白痢発症の関連を明らかにする目的で、次の試験を行った。すなわち、子牛に特定脂肪酸を添加した代用乳を哺乳させ、その臨床症状と糞便中脂肪酸組成および血液性状の変動について検討した。2~3週齢のホルスタイン子牛20頭を5頭ずつ4群に分け、無投与コントロール群(C群)、パルミチン酸投与群(P群)、ステアリン酸投与群(S群)、オレイン酸投与群(O群)とした。体重の5%量の代用乳に代用乳の2%量の脂肪酸をそれぞれ添加して、試験日の朝夕2回、12時間間隔で哺乳させた。採血および糞便の採取は試験日の朝の投与前から48時間まで経時的に行った。血液生化学検査はTG、 β Lipo、FFA、Tcho、PL、TBA、BUNおよびGluについて行った。糞便は微生物検査を行うとともに、凍結糞便を用いて糞便中TG量およびその脂肪酸組成の分析を行った。

その結果、C群の1頭、P群の5頭、S群の2頭、O群の5頭で糞

便性状または色調の変化が見られた。糞便性状の変化時に腸内細菌数の有意な変化は見られず、ロタウイルス抗原は終始陰性であった。血液成分では、P 群および S 群で TG の増加傾向、Tcho、Glu の低値、O 群で FFA、TBA の増加、Tcho の低値を示した。また、P 群および S 群では投与脂肪酸の排出増加による糞便中 TG の増加を示し、O 群では糞便中水酸化脂肪酸の増加傾向が見られた。以上の成績より、長鎖飽和脂肪酸投与（P 群、S 群）による糞便性状の変化は、吸収率の悪い長鎖飽和脂肪酸の増加により、吸収できなかつた脂質が水分の分泌を促進し、排出されたものと推定された。長鎖不飽和脂肪酸投与（O 群）による糞便性状の変化は、腸内常在菌による脂肪酸の水酸化が進行して吸収不良に陥るとともに、水分の分泌が促進されて生じたものと推定された。

表1. 供試牛

母 牛					子 牛	
試験牛	年齢 (歳)	産歴 (産)	最終分娩 年月日	分娩日 体重(kg)	試験牛	出生日 体重(kg)
A	14	12	1997.6.10	373	AC	24
B	2	1	1997.6.16	341	BC	27
C	3	2	1997.8.11	421	CC	31
D	3	2	1997.8.6	403	DC	32
E	6	4	1997.9.16	440	EC	30

表2. 乳汁中脂肪の抽出とメチル化

脂質の抽出(Bligh-Dyer 法)

1. 15ml 共栓付スピッツグラスを用い、乳汁 0.5ml に対してクロロホルム-メタノール(C-M,1:2) 2.0ml を加える。
2. その混合物を1～2時間ときどき振とうした後遠心(3000rpm/10min)する。
3. 上層(メタノール層)をピペットで別のスピッツ管に移す。
4. 残渣(クロロホルム層)にさらにクロロホルム-メタノール-水(C-M-H₂O,1:2:0.8) 2.5ml を加え、同様に振盪遠心し、上層を3のスピッツ管に加える。
5. 上層を合わせたものにクロロホルムを1.5ml 加えて50回振盪し、1.5ml の水を加えて軽く反転させ、遠心する。
6. 上層(メタノール-水層)をアスピレーターで(白い膜まで)吸い取り、下層(クロロホルム層)を十分に乾燥したネジロ試験管に移す。
7. 2ml のベンゼンを加え、30℃で窒素気流中で1～2時間濃縮し、乾固後ただちにベンゼン0.5ml に溶かす。

TGのメチル化

1. 得られた試料に1.8%濃硫酸メタノール2mlを加え、50℃で2時間ときどき振りながら加熱する。
2. 室温まで温度を下げた後、2mlのヘキサンで3回震とうして抽出する。
3. ヘキサン層をあわせ、2%KHCO₃2mlで後洗いし、とりだした上層に約20gの硫酸ナトリウムを入れて1晩放置後、窒素気流中で1～2時間溶媒を乾固する。
4. 冷暗所に保存し、ガスクロマトグラフィーで測定する直前にジエチルエーテル500μlに溶解する。

表3 血液検査項目および方法

検査項目	略号	単位	測定方法
脂質の転送系			
トリグリセライド	TG	mg/dl	遊離グリセロール消去酵素法
βリポ蛋白	β Lipo	mg/dl	β ² リンカリウム比濁法
脂質の逆転送系			
遊離脂肪酸	FFA	μEq/l	ACS-ACO酵素法
ケトン体			
アセト酢酸	ACAC	μmol/l	酵素法
βヒドロキシ酪酸	BHB	μmol/l	酵素法
HDL系			
総コレステロール	TCho	mg/dl	コレステロールキターゼ法
リン脂質	PL	mg/dl	フォスホリパーゼD法
総胆汁酸	TBA	μmol/l	酵素法
糖新生系			
グルコース	Glu	mg/dl	ヘキソキナーゼ・G6PDH法
蛋白代謝系			
アルブミン	Alb	g/dl	BCG法
尿素窒素	BUN	mg/dl	ウリアーゼ・GLDH法
肝臓酵素			
AST	AST	IU/l	MDH・UVレト法
γGTP	γGTP	IU/l	γグルタミルピントロアニリド基質法
無機成分			
ナトリウム	Na	mg/dl	原子吸光法
カリウム	K	mg/dl	原子吸光法
カルシウム	Ca	mg/dl	原子吸光法
マグネシウム	Mg	mg/dl	原子吸光法
リン	iP	mg/dl	比色法

表4. 吉田法変法によるルーメン液中の細菌計数

1. 生理食塩液 8 ml を入れた試験管によく混合した保存ルーメン液 2 ml をとる。
2. 1 分間振とう後 10 分間静置する。
3. この中層部から 0.5 ml をとり、生理食塩液 9.5 ml を入れた試験管に加える。(A液)
4. 22ゲージの針をつけたシリンジに、0.2% 寒天溶液 0.5 ml、A液 0.5 ml を吸引し混和する。
5. 最初の何滴かを捨てた後、スライドグラスに 2 滴 (0.02 ml) ずつ滴下して直径約 1 cm の円形にする。
6. 自然乾燥させ、塗布円の面積を求めためノギスで長径、短径をはかる。
7. グラム染色を行い、乾燥後封入する。
8. 20 視野についてグラム陽性菌・陰性菌にわけて計数を行う。
9. 各視野の全部を集計して百分率を求めめる。
10. 塗布円の面積と視野の面積の比より、総細菌数を算出する。

表5 給与飼料の成分分析結果

試験牛	DM	TDN	CP	ST	Fat	Ca	Mg
オーチャードラップサイレージ	A,B	87.3	48.8	13.9	3.0	3.4	0.6
	C,D,E	80.2	45.2	13.7	3.0	2.6	0.6
デントコーンサイレージ	A,B	20.4	11.5	1.5	7.0	2.1	0.3
	C,D	22.4	14.5	0.9	7.3	4.0	0.1
	E	21.5	13.2	1.3	6.8	3.8	0.3

TDN,CP,ST: 乾物中濃度 (%)

ST: でんぷん濃度

DM: 現物中濃度 (%)

表6 子牛の糞便の性状の変化

デントコーンサイレージ 給与からの日数 母牛飼料	オーチャード乾草とデントコーンサイレージ																					
	-3	-3	-2	-2	-1	-1	0	0	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7
	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕	朝	夕
AC 性状 色調	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色	泥 黄土色
BC 性状 色調 しづり	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色
CC 性状 色調	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色	粘り 黄土色
DC 性状 色調	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色	軟 黄土色
EC 性状 色調	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常	軟・正常

無記入は異常所見なし 0日夕からデントコーンサイレージ給与開始 部分的 黄色 軟・正常 水 白

C,Dは6日夜から、A,B,Eは7日夜から、母牛にメンブロン製剤を投与

表7. デントコーンサイレージ給与開始日と
3日前のルーメン液検査成績

項目	平均±標準偏差	単位
pH	6.75 ± 0.29	
生細菌数	28.8 ± 8.2	X10 ⁸ /ml
原虫数	総数 10.2 ± 1.2	X10 ⁴ /ml
	大型 6.5 ± 4.8	X10 ⁴ /ml
	中型 18.9 ± 8.4	X10 ⁴ /ml
	小型 76.5 ± 19.1	X10 ⁴ /ml
アンモニア	6.1 ± 1.5	mmol/l
総VFA	75.7 ± 9.3	mmol/l
酢酸	55.4 ± 6.6	mmol/l
プロピオン酸	13.5 ± 2.0	mmol/l
酪酸	6.8 ± 1.7	mmol/l

5頭の平均

表8. デントコーンサイレージ給与開始日と
3日前の母牛の血液検査成績

項目	平均±標準偏差	単位
TG	9.4 ± 2.8	mg/dl
BLipo	44.1 ± 19.9	mg/dl
FFA	653 ± 398	μEq/l
ACAC	28.9 ± 24.1	μmol/l
BHB	374 ± 115	μmol/l
Tcho	61.5 ± 23.2	mg/dl
PL	63.9 ± 22.8	mg/dl
TBA	52.1 ± 26.0	μmol/l
Glu	66.1 ± 3.7	mg/dl
BUN	12.5 ± 2.2	mg/dl
Alb	2.84 ± 0.22	g/dl
Na	319.0 ± 14.0	mg/dl
K	17.10 ± 1.21	mg/dl
Mg	1.51 ± 0.36	mg/dl
Ca	8.82 ± 0.07	mg/dl
iP	6.10 ± 0.53	mg/dl

5頭の平均

表9. デントコーンサイレージ給与後
試験終了時までの母牛の肝臓酵素値

試験牛	AST(U/l)		γGTP(U/l)	
A	52.8 ±	5.3	22.6 ±	1.2
B	50.1 ±	5.4	10.3 ±	0.5
C	65.8 ±	2.4	12.0 ±	1.0
D	59.7 ±	3.2	13.0 ±	0.0
E	62.5 ±	1.3	13.7 ±	0.3

5頭の平均

表10. デントコーンサイレージ給与開始前4日間の
母牛の乳汁検査成績

項目	平均±標準偏差		単位
	朝	夕	
乳量	1783 ± 581	1027 ± 405	g
pH	6.37 ± 0.10	6.42 ± 0.13	
脂肪	4.91 ± 1.43	5.53 ± 1.14	%
乳糖	4.70 ± 0.21	4.67 ± 0.22	%
蛋白	3.77 ± 0.41	3.82 ± 0.40	%
Na	66.37 ± 12.65	68.6 ± 11	mg/dl
K	140.8 ± 48.7	139.0 ± 48.4	mg/dl
Mg	12.65 ± 3.72	11.7 ± 3.5	mg/dl
Ca	139.4 ± 14.8	138.3 ± 19.5	mg/dl
P	123.1 ± 14.2	125.9 ± 24.3	mg/dl
乳汁凝固時間	6.0 ± 2.0	5.9 ± 1.3	分

5頭の平均

表1 1. デントコーンサイレージ給与開始日と
3日前の子牛の血液検査成績

項目	平均±標準偏差			単位
TG	34.2	±	25.0	mg/dl
BLipo	104.9	±	50.1	mg/dl
FFA	284	±	152	μEq/l
ACAC	13.4	±	14.0	μmol/l
BHB	124	±	132	μmol/l
Tcho	84.3	±	20.8	mg/dl
PL	89.3	±	20.7	mg/dl
TBA	31.6	±	12.5	μmol/l
Glu	99.6	±	23.9	mg/dl
BUN	8.2	±	3.1	mg/dl
Alb	2.43	±	0.23	g/dl

5頭の平均

表12. 供試牛の性別と導入時の日齢および体重、クリプトスポリジウム抗原の有無

個体番号	性	導入時の日齢 (日)	導入時の体重 (Kg)	クリプトスポリジウム抗原
C-1	雄	1	42.0	+
C-2	雄	4	46.0	+
C-3	雄	3	38.5	-
C-4	雄	3	40.0	-
C-5	雄	2	44.0	-
O-1	雄	1	42.0	+
O-2	雄	2	51.0	-
O-3	雄	1	45.5	-
O-4	雄	2	44.0	-
O-5	雄	2	44.0	-
S-1	雄	7	44.5	-
S-2	雄	4	33.5	-
S-3	雄	1	42.0	+
S-4	雄	4	46.0	+
S-5	雄	1	45.5	-
P-1	雄	4	33.5	-
P-2	雄	2	48.0	-
P-3	雄	1	42.0	+
P-4	雌	4	41.0	+
P-5	雄	3	38.5	-

C: コントロール群、O: オレイン酸投与群、S: ステアリン酸投与群、
P: パルミチン酸投与群

表13. 血清生化学検査項目および方法

検査項目	略号	単位
トリグリセライド	TG	mg/dl
β リポ蛋白	β Lipo	mg/dl
遊離脂肪酸	FFA	μ Eq/l
総コレステロール	Tcho	mg/dl
リン脂質	PL	mg/dl
総胆汁酸	TBA	μ mol/l
尿素窒素	BUN	mg/dl
グルコース	Glu	mg/dl

表14. メチルエステル化の方法

-
1. 抽出した粗脂質に5%無水メタノール塩酸2mlを加える。
 2. 時々振りながら50℃で2時間加熱する。
 3. 室温に冷却後、ヘキサン2mlを加えて振とうしヘキサン層を別のスピッツグラスに移す
 4. 3.の操作を3回繰り返す。
 5. ヘキサン層を併せ、2%KHCO₃ 2mlを加えて振とうしヘキサン層を取り出す。
 6. 取り出したヘキサン層に小匙3~5杯の硫酸ナトリウムを入れて一晩放置する。
 7. 窒素気流中で溶媒を留去する。
 8. メタノール0.5mlに溶解し、HPLCの測定に供する。
-

表15. 脂肪酸投与後の糞便性状および色調

供試牛		脂肪酸投与開始後時間 (時間)					
		0	6	12	24	36	48
C-1	便性状 便色調	正常 緑色+黄色	正常 灰緑色	正常 灰緑色	正常 灰緑色	正常 濃灰緑色	正常 灰緑色
C-2	便性状 便色調	正常 灰緑色	正常 こげ茶色	正常 灰緑色	正常 灰緑色	正常 灰緑色~黄土色	正常 灰緑色
C-3	便性状 便色調	正常 濃灰緑色	正常 濃灰緑色	正常 濃灰緑色	正常 濃灰緑色	正常 濃灰緑色	正常 濃灰緑色
C-4	便性状 便色調	正常 黄土色	正常 黄土色	軟? 黄土色	粘濁性軟 黄土色	軟 黄土色	正常 黄土色
C-5	便性状 便色調	正常 黄土色	正常 黄土色	正常 黄土色	正常 黄土色~茶色	正常 黄土色	正常 黄土色
O-1	便性状 便色調	正常 こげ茶色	正常 こげ茶色 (血液混)	正常 こげ茶色	水様 (粘液混) 黄白色~黄土色	やや軟 黄土色	正常 黄土色
O-2	便性状 便色調	正常 黄土色	正常 黄土色	正常 黄土色	粘濁性軟 黄白色	粘濁性軟 黄白色	軟 黄白色
O-3	便性状 便色調	正常 灰黄緑色	正常 灰緑色	正常 灰緑色	水様 黄白色	正常 黄土色 (粘液混)	正常 黄土色
O-4	便性状 便色調	正常 黄土色	正常~やや軟 黄土色	正常 (粘液混) 黄土色	正常 黄土色	やや軟 黄土色	正常 黄土色
O-5	便性状 便色調	正常 黄土色	正常~やや軟 黄土色	やや軟 黄土色	やや軟 黄土色	やや軟 黄土色	軟 黄土色
S-1	便性状 便色調	正常 こげ茶緑色	正常 こげ茶緑色	正常 こげ茶緑色	やや軟~水様 こげ茶緑色~灰緑色	正常 灰緑色+灰白色	正常 灰緑色
S-2	便性状 便色調	正常 黄土色	正常 黄土色~茶色	正常 黄土色~黄白色	軟 (粘液、血液混) 黄白色	正常 黄白色	正常 黄土色
S-3	便性状 便色調	正常 濃灰緑色	正常 黄土色~灰緑色	正常 茶色~灰緑色	正常 茶色~灰緑色	正常 灰緑色	正常 濃灰緑色
S-4	便性状 便色調	正常 黄土色	正常 黄土色	正常 灰緑色	正常 濃灰緑色+(茶色) 白色	正常 黄白色+淡灰緑色	正常 灰白色+茶色
S-5	便性状 便色調	正常 黄白色	正常 黄土色	正常 黄土色	正常 黄白色	正常 黄白色	正常 黄土色
P-1	便性状 便色調	正常 黄土色+緑色	正常 灰緑色	正常 黄土色+白粒	正常 灰緑色+白粒	正常 黄白色+白粒	正常 灰緑色
P-2	便性状 便色調	正常 濃灰緑色	正常 灰緑色+白粒少	正常 濃淡灰緑色+白粒少	水様 灰緑色	泥状 黄白色	正常~やや軟 灰緑色
P-3	便性状 便色調	正常 黄白色	正常 黄色~茶色	泥状 黄白色	泥状~軟 黄白色	やや軟 黄白色	正常 黄白色
P-4	便性状 便色調	正常 灰緑色	正常 灰緑色	正常 灰緑色	正常 淡灰緑色	泥状+白粒 灰白色	やや軟+白粒 灰緑色
P-5	便性状 便色調	正常 濃灰緑色	正常 灰緑色+白粒+黄土色	正常 灰緑色+白粒+黄白色	正常 灰緑色+白粒+白粘膜様物	正常 灰緑色+白粒+黄土色	正常~やや軟 灰緑色+白粒+灰白粘膜様物

糞便性状または色調の変化

表16. 試験開始前および下痢発症時の腸内生細菌数 (/g)

供試牛	試験開始前	下痢発症時	供試牛	試験開始前	下痢発症時
C-1	4.4×10^6		S-1	2.0×10^7	1.0×10^6
C-2	4.9×10^6		S-2	8.0×10^6	1.0×10^7
C-3	7.5×10^6		S-3	4.4×10^6	
C-4	2.84×10^7		S-4	4.9×10^6	
C-5	7.9×10^7		S-5	8.3×10^6	
O-1	2.7×10^7	9.8×10^6	P-1	8.0×10^6	1.0×10^7
O-2	7.3×10^6	7.1×10^8	P-2	6.0×10^6	5.0×10^7
O-3	8.3×10^6	7.6×10^6	P-3	2.7×10^7	4.3×10^6
O-4	7.9×10^7		P-4	8.0×10^6	1.0×10^7
O-5	4.1×10^7	1.61×10^7	P-5	7.5×10^6	

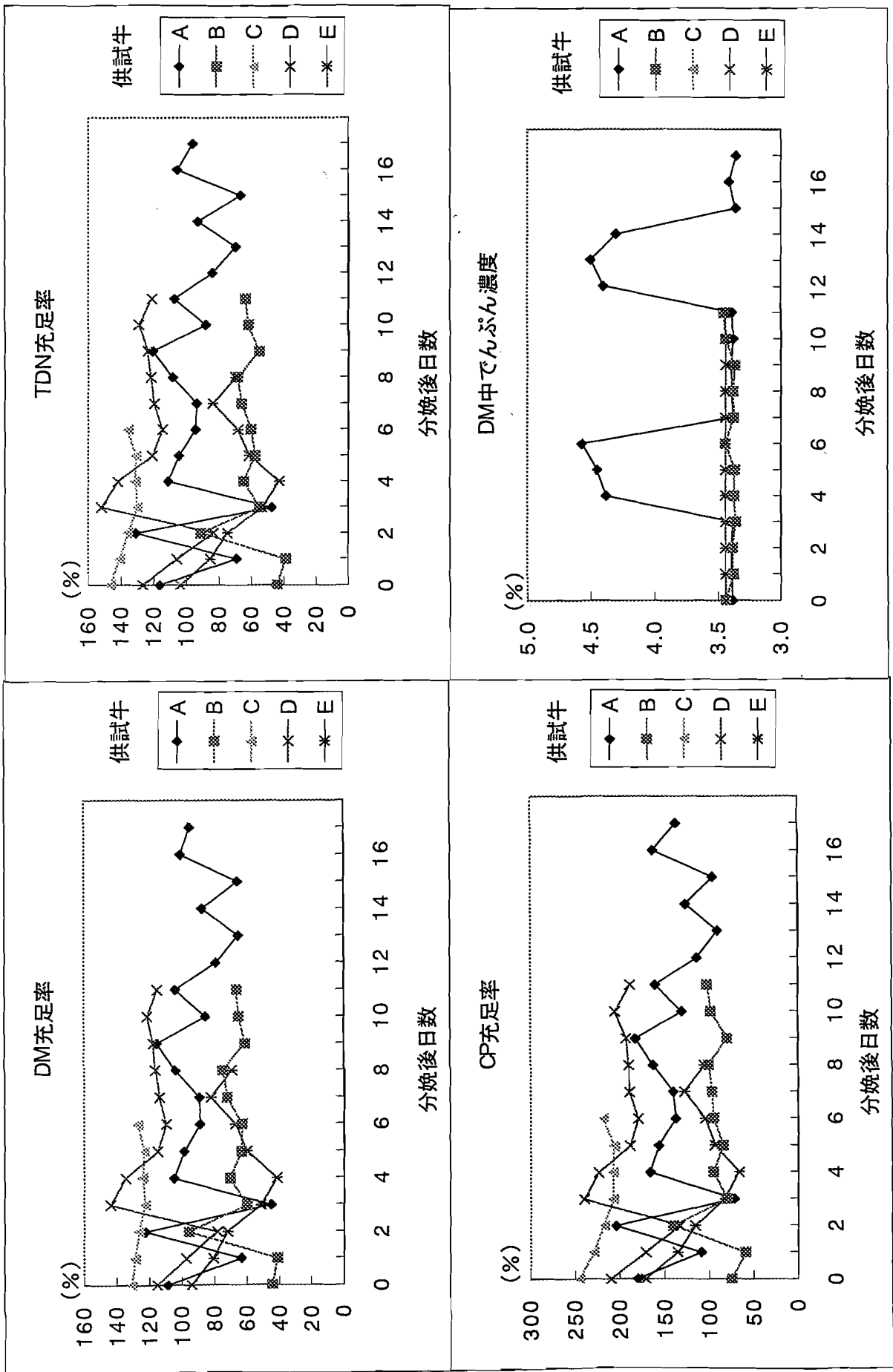


図1. 分娩後デントコーンサイレージ給与開始までの母牛の飼料充足率およびでんぷん濃度の推移

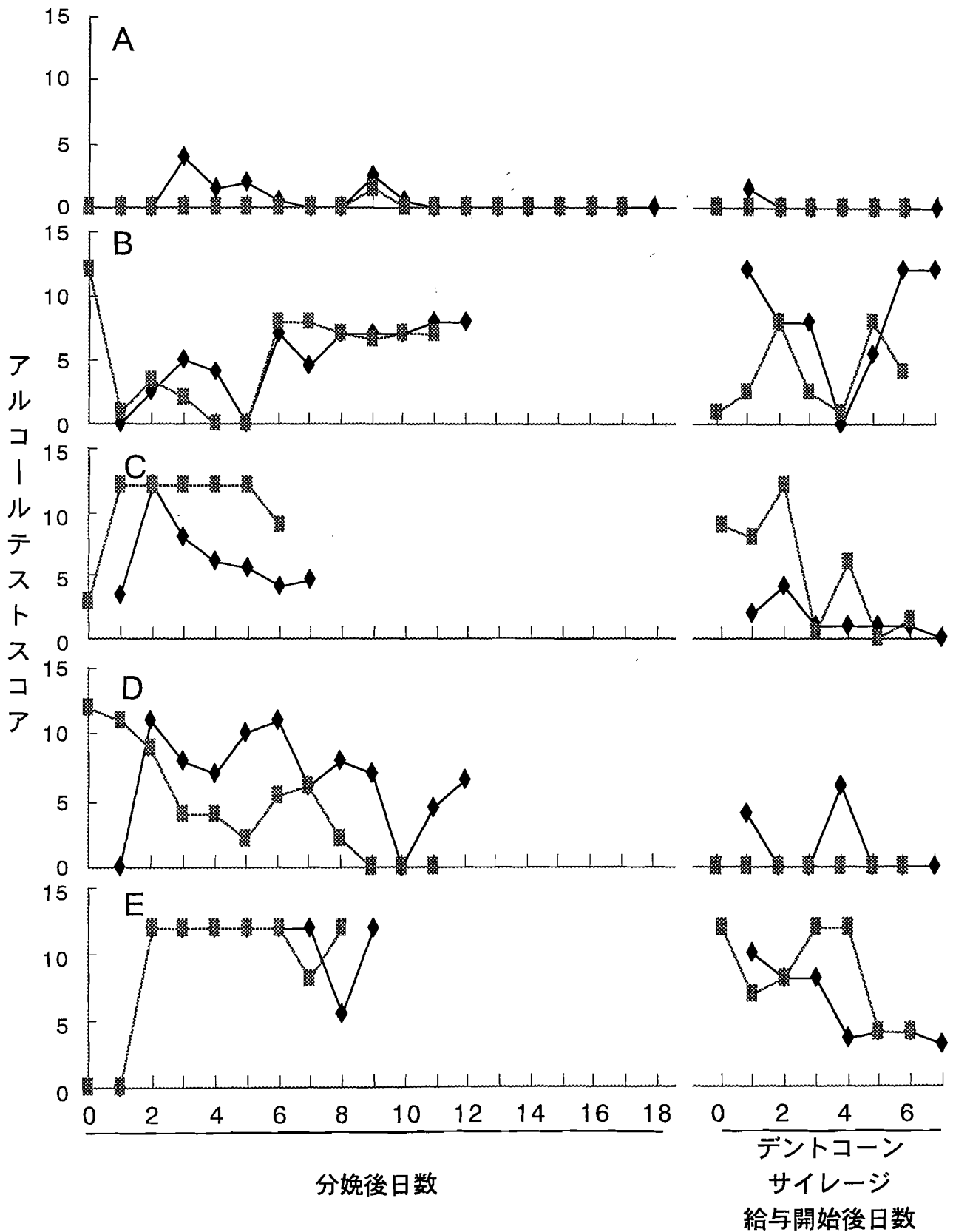


図2. 分娩後およびデントコーンサイレージ給与開始後の乳汁アルコールテスト成績

—■— 朝 —◆— 夕

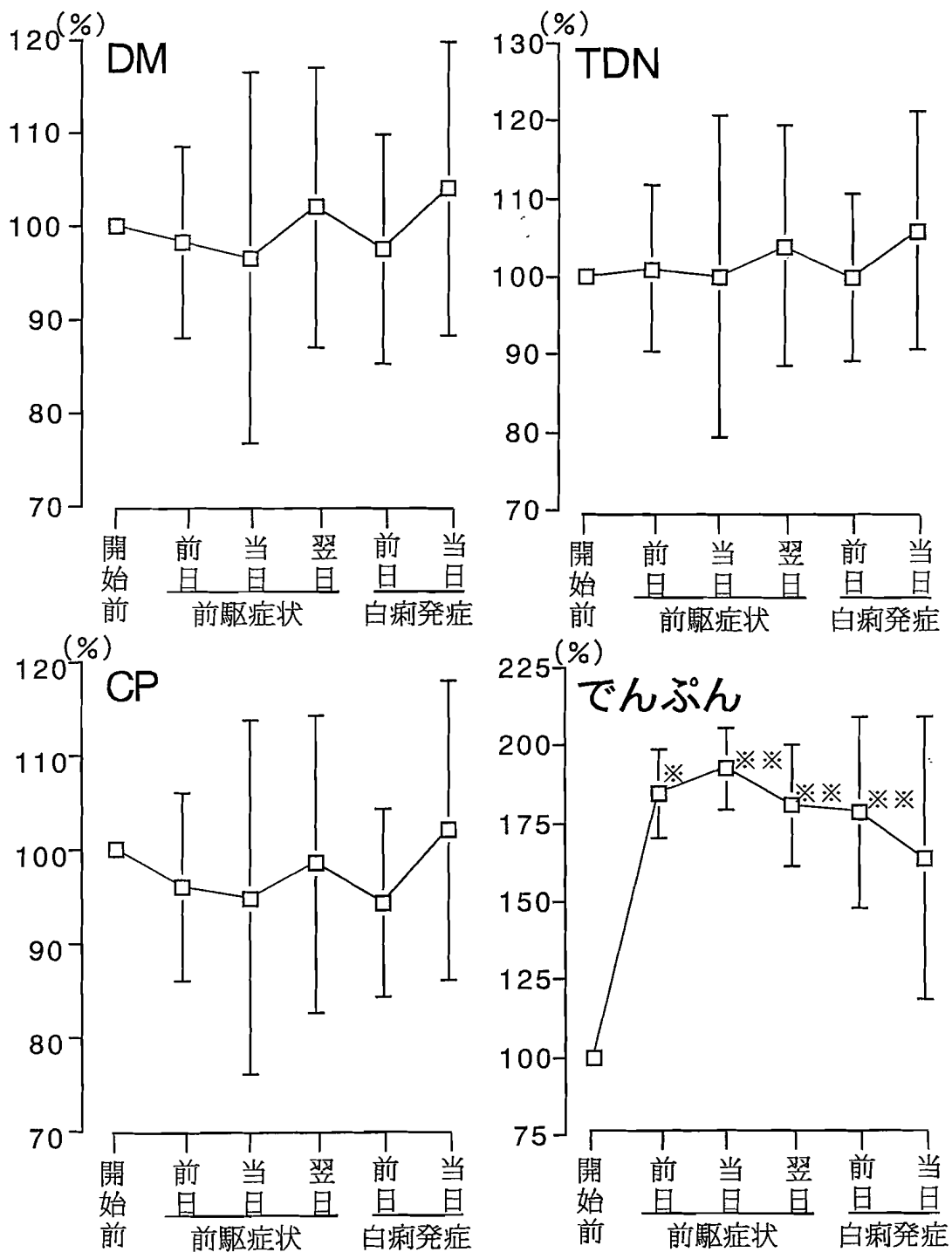


図3. 飼料成分の充足状況の推移
 開始前に対する有意差 ※: p<0.05 ※※: p<0.01

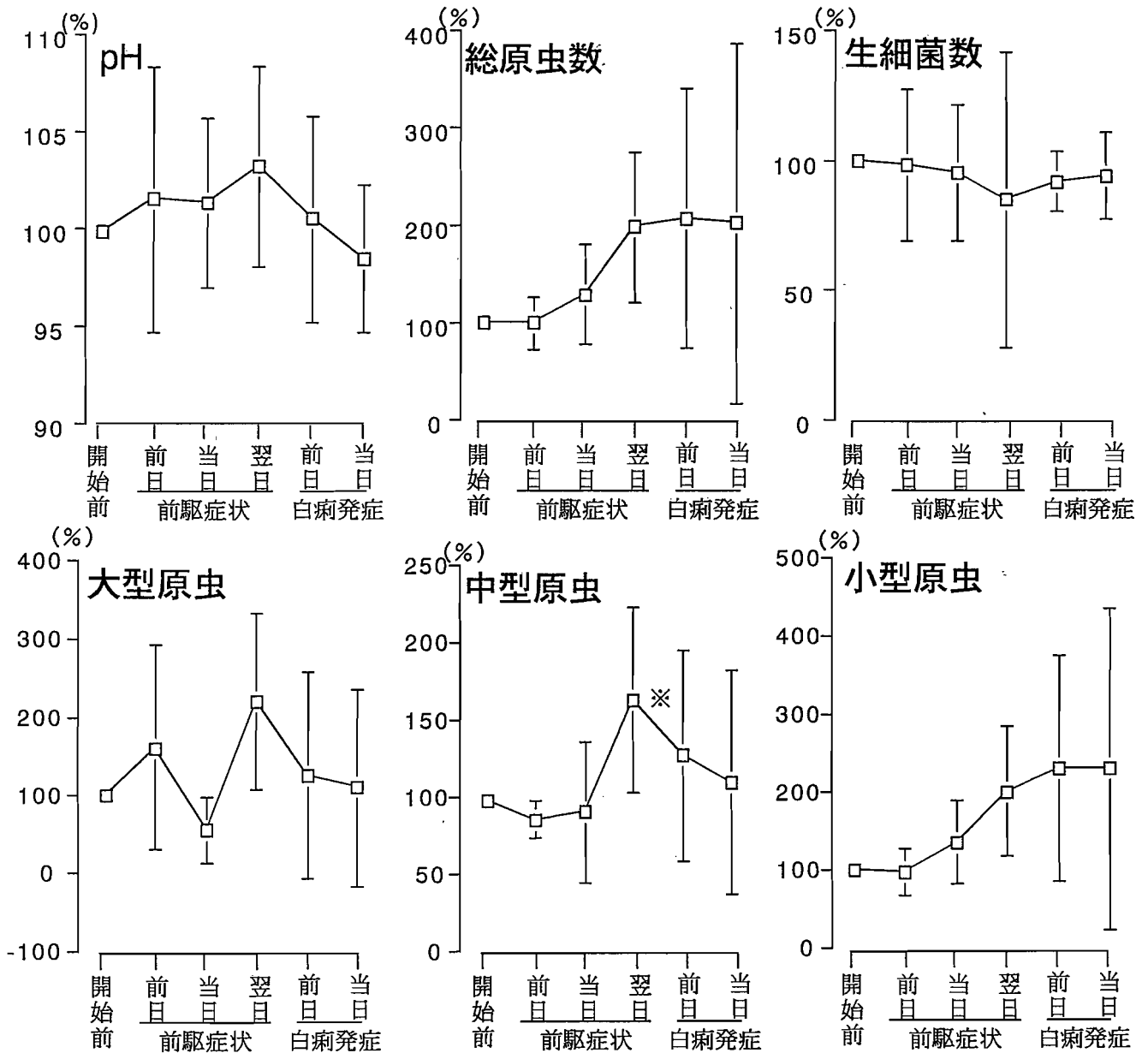


図4. ルーメン液のpHおよびルーメン液中微生物の変化

※ : $p < 0.05$ (開始前に対する有意差)

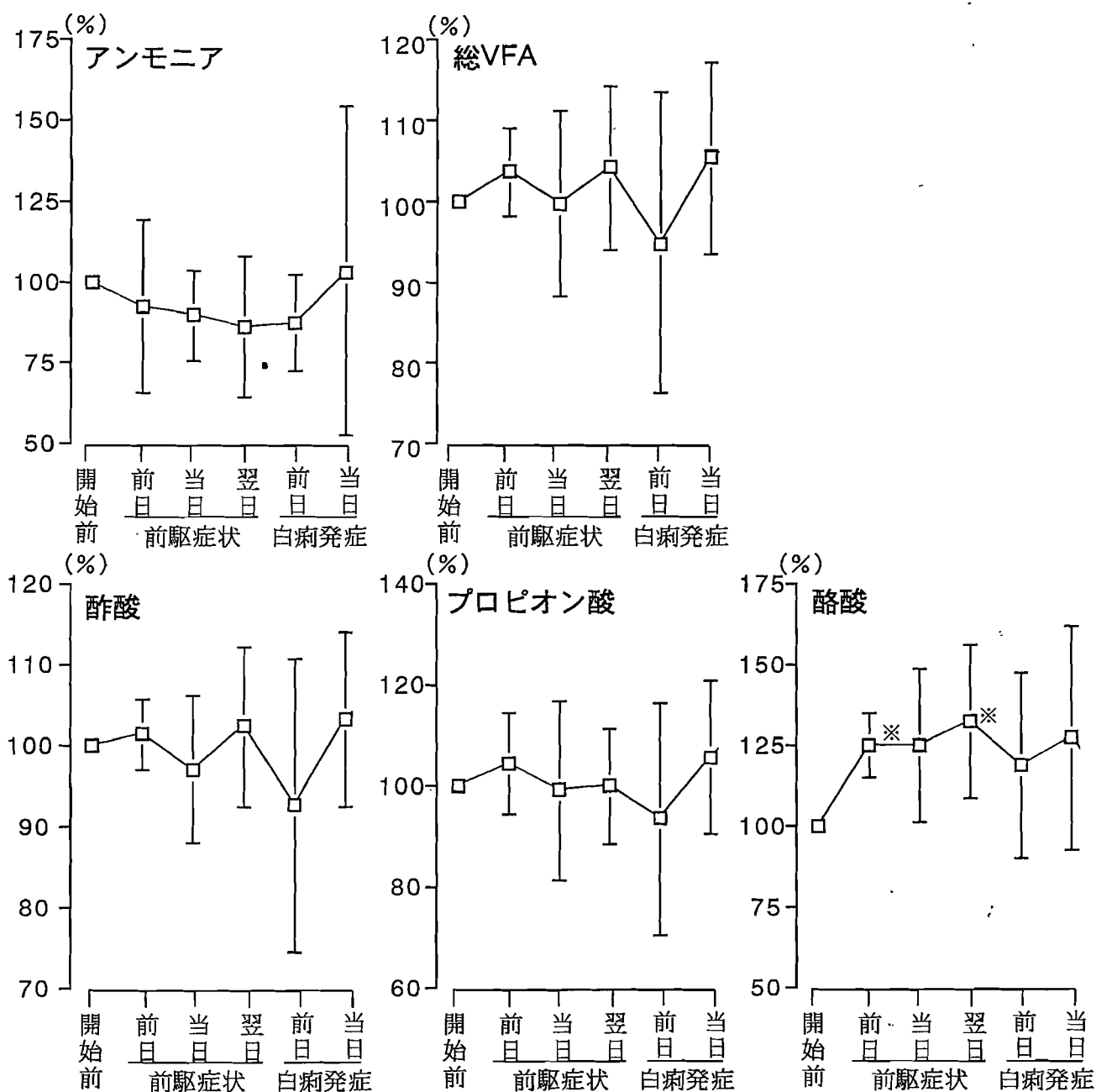


図5. ルーメン液成分の推移

開始前に対する有意差 ※: $p < 0.05$

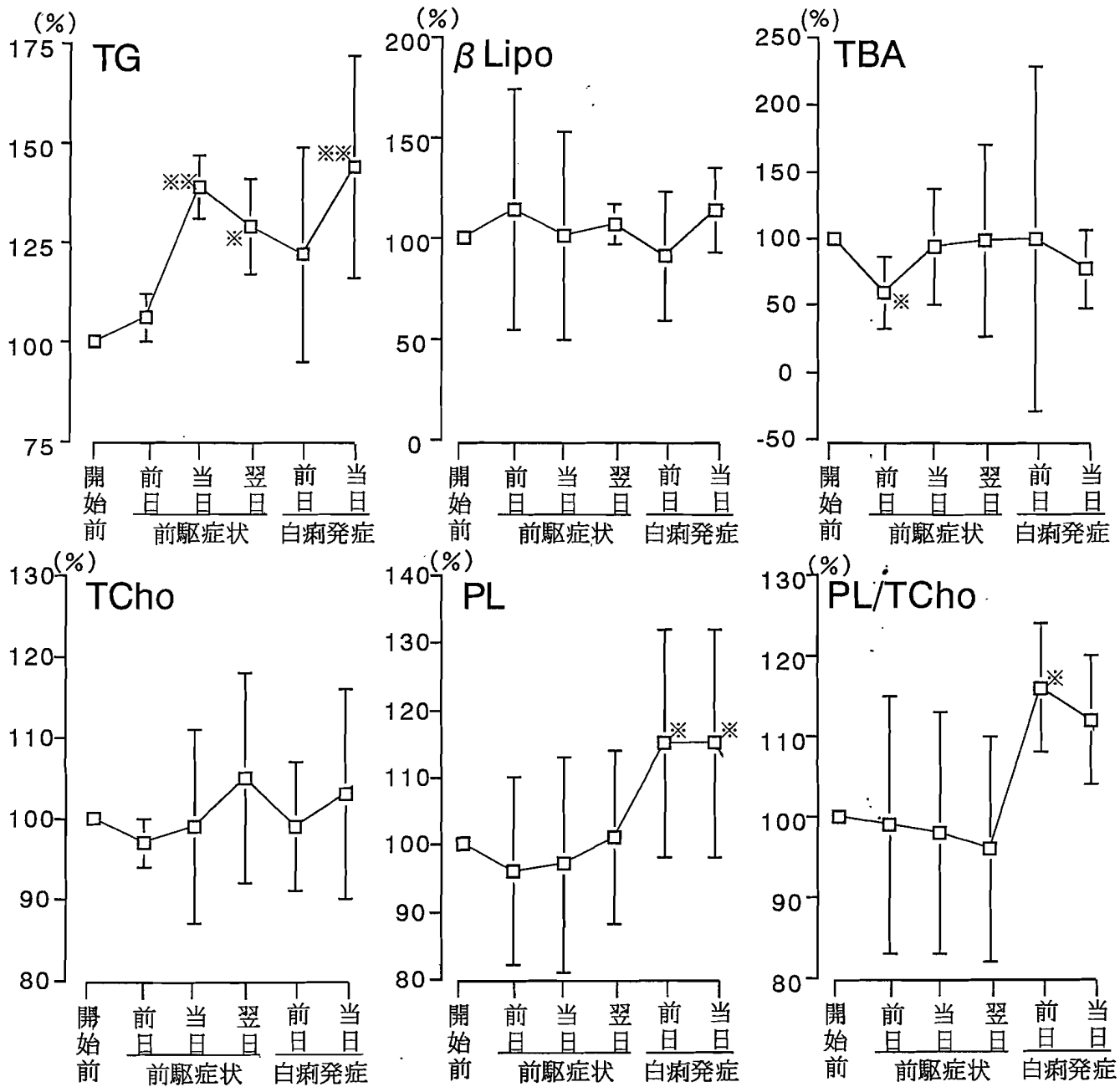


図6. 母牛の血液成分の推移 (1)

開始前に対する有意差 ※: p<0.05 ※※: p<0.01

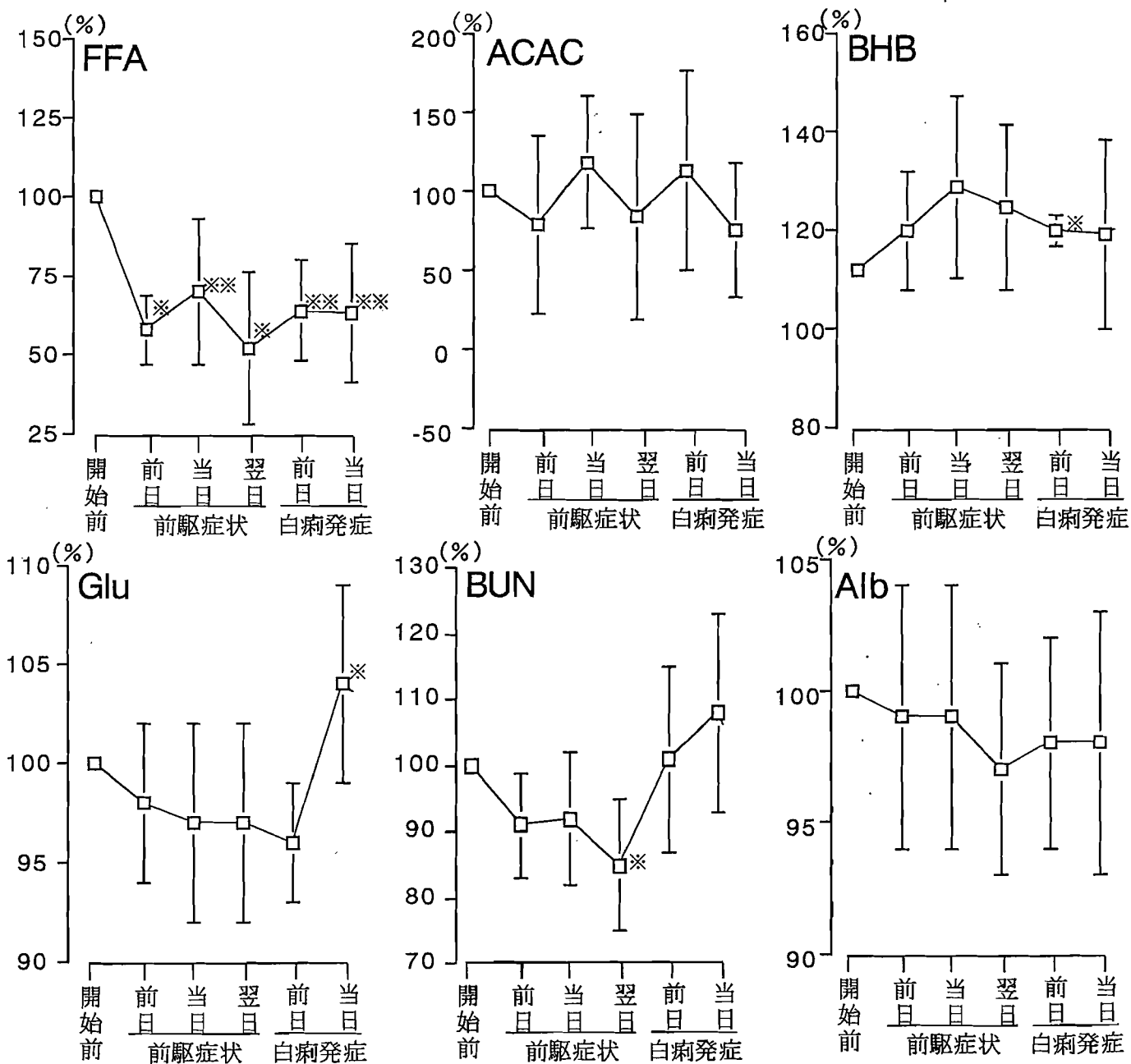


図7. 母牛の血液成分の推移 (2)

開始前に対する有意差 ※: $p < 0.05$ ※※: $p < 0.01$

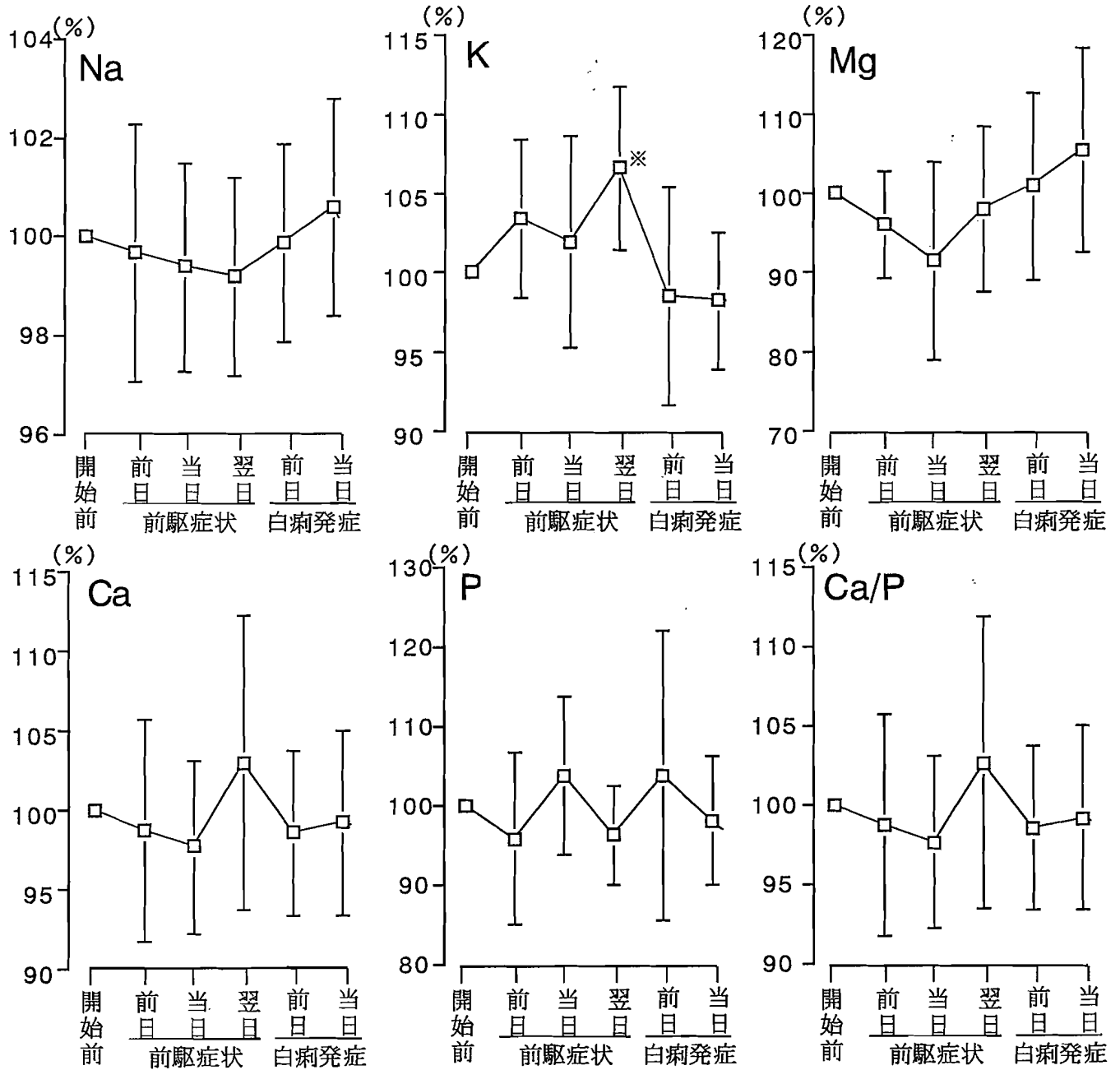


図8. 血液中無機成分濃度の推移

開始前に対する有意差 ※: $p < 0.05$

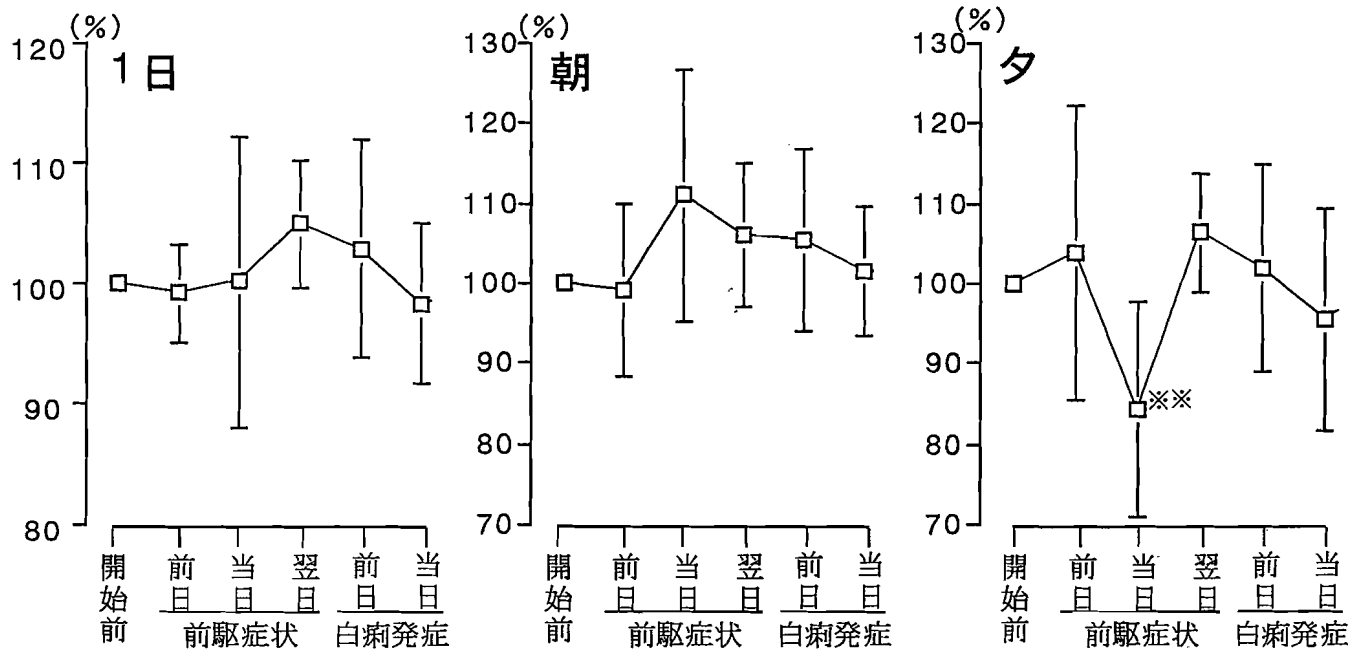


図9. 乳量の推移

開始前に対する有意差 **: $p < 0.01$

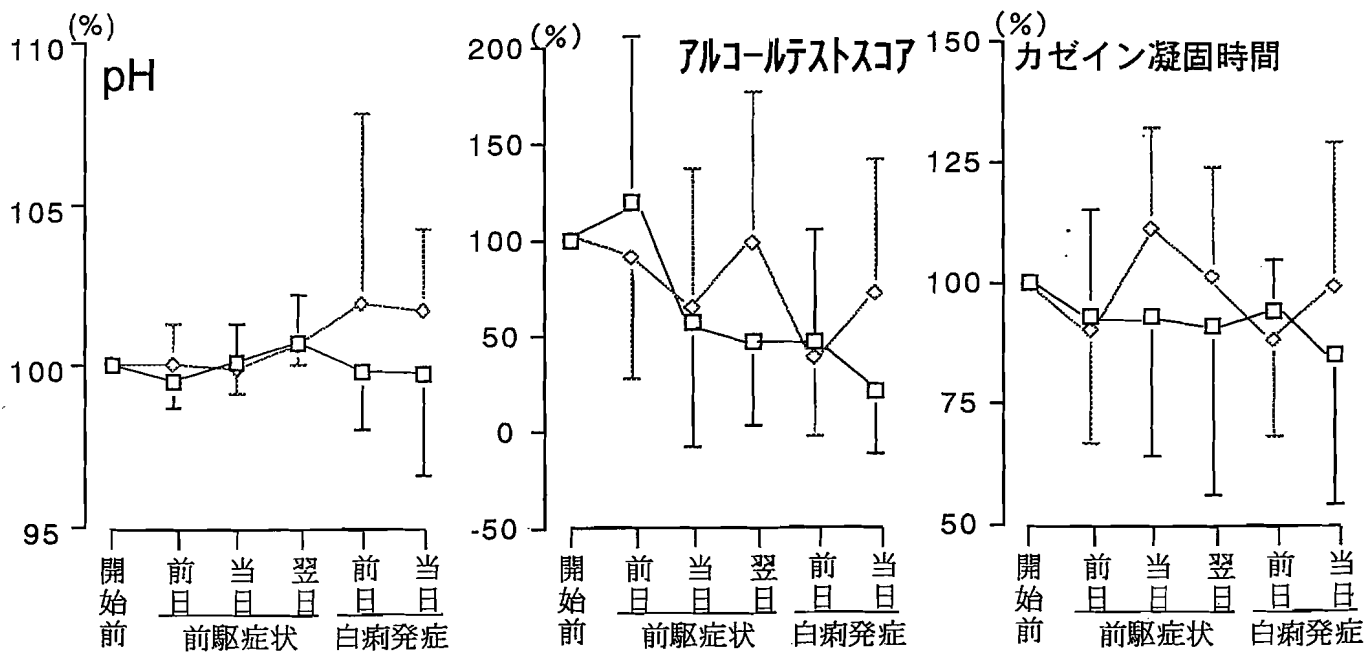


図10. 乳汁性状の推移

—□— 朝 —◇— 夕

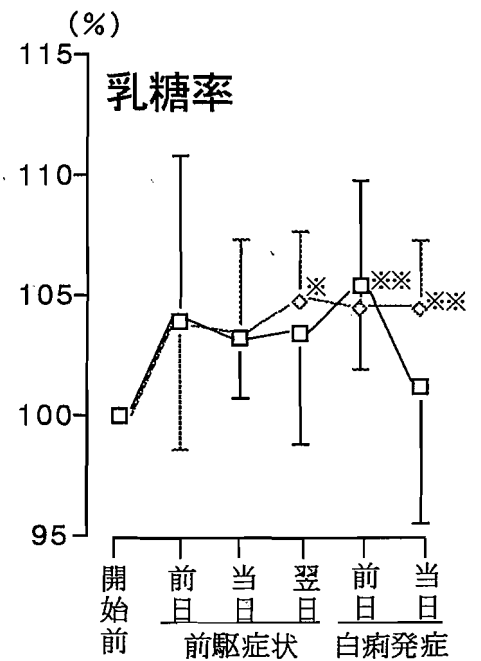
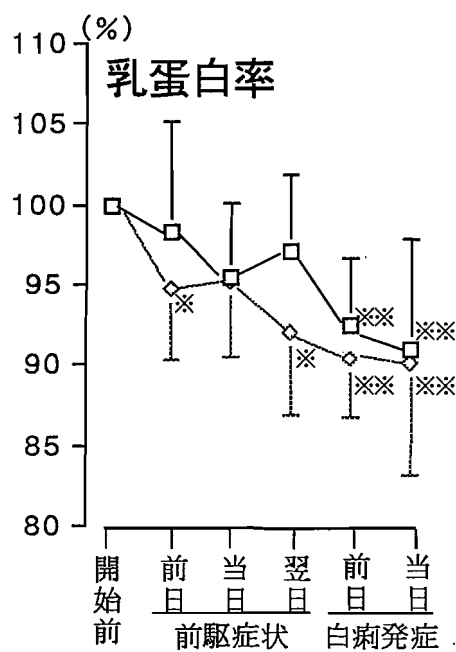
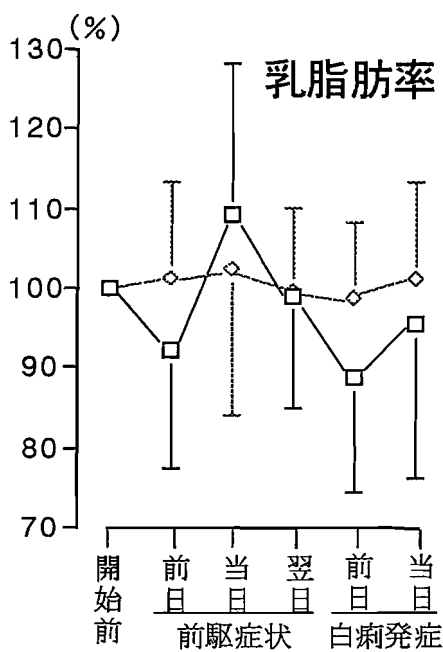


図11. 乳成分の推移

—□— 朝 —◇— 夕

開始前に対する有意差 ※: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$

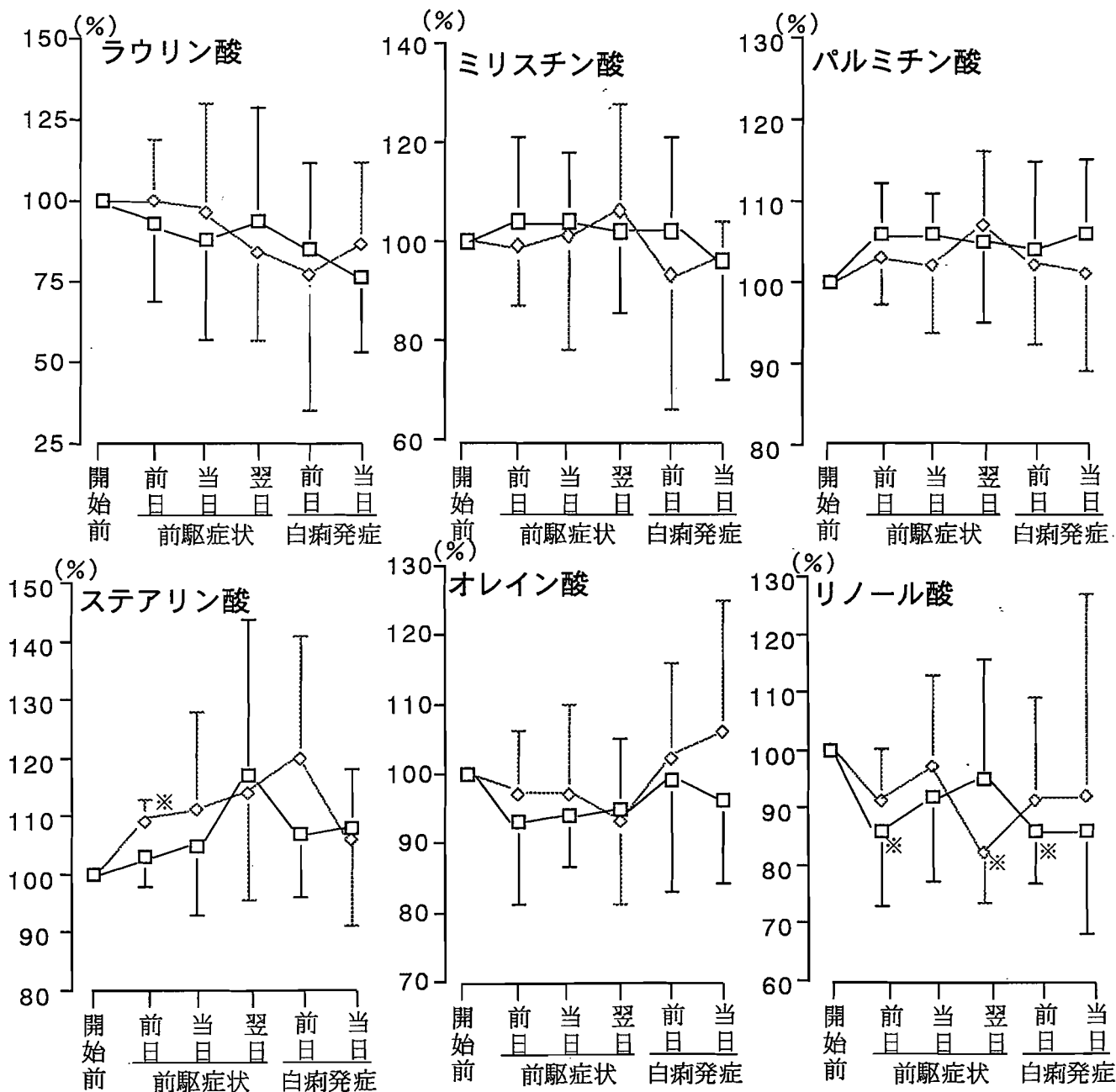


図12. 乳汁中脂肪酸組成の推移

—□— 朝 —◇— 夕 開始前に対する有意差 ※: $p < 0.05$ ※※: $p < 0.01$

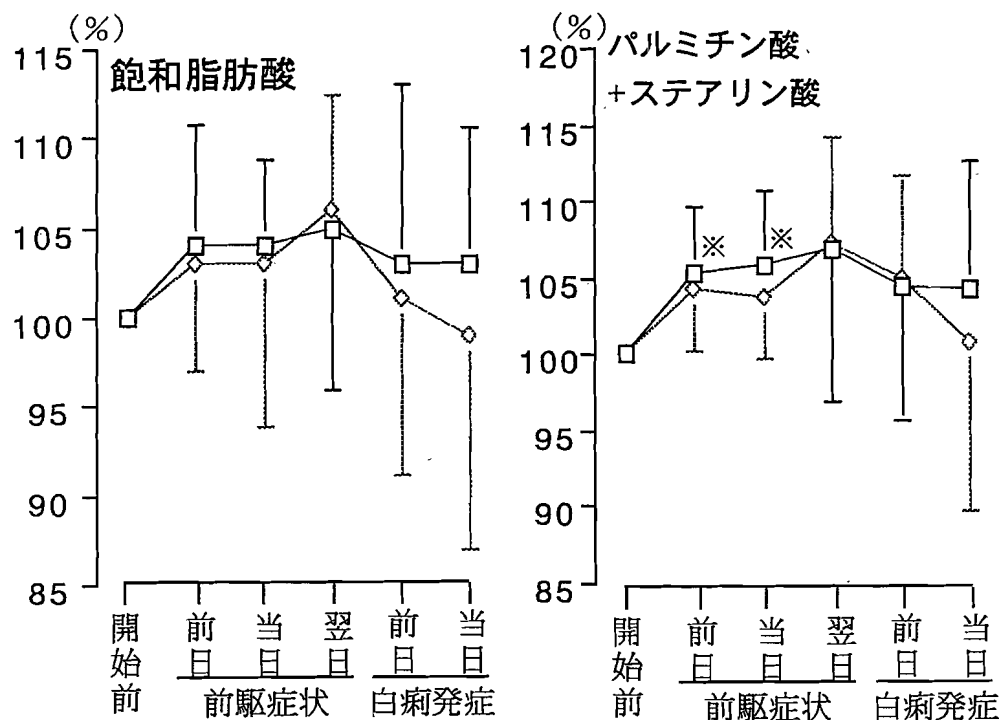


図13. 乳汁中脂肪酸組成の推移 (2)

—□— 朝 —◇— 夕

開始前に対する有意差 ※: $p < 0.05$

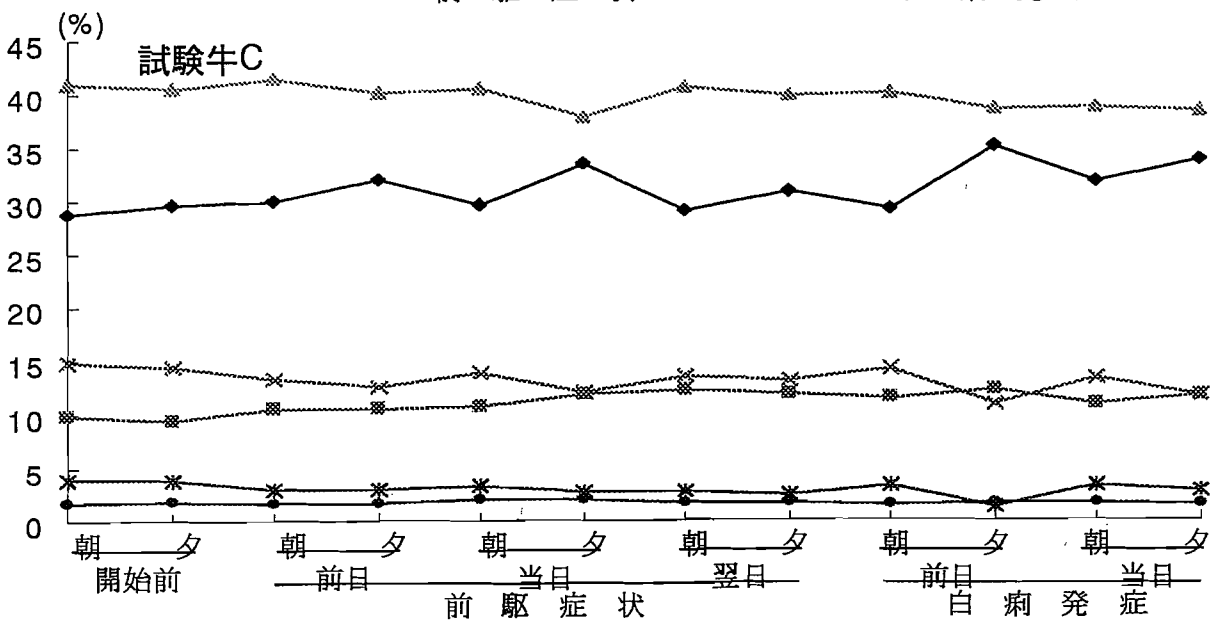
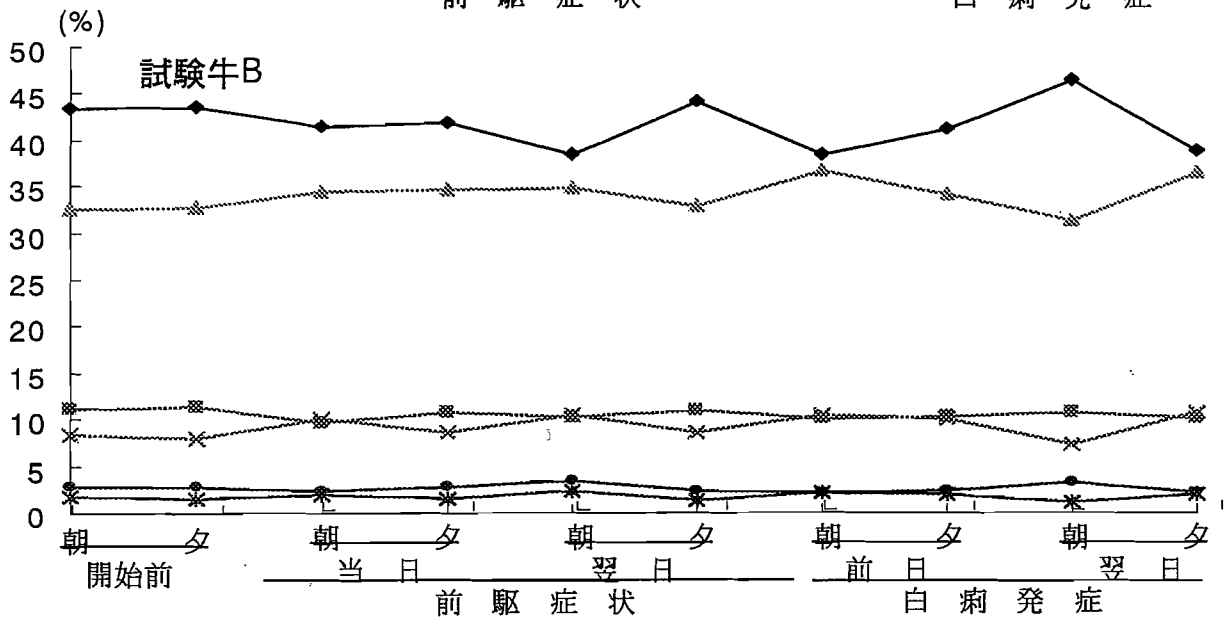
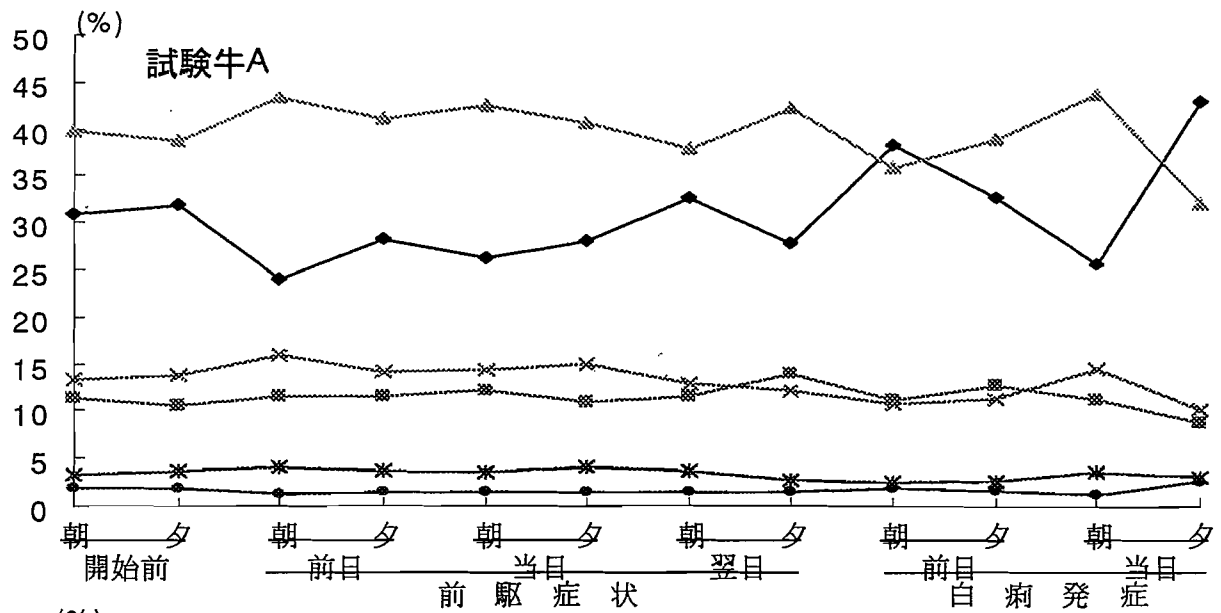


図14-1. 試験牛A、B、Cの乳汁中脂肪酸組成の推移

● オレイン酸 ■ ステアリン酸 ◆ パルミチン酸 × ミリスチン酸 * ラウリン酸 ● リノール酸

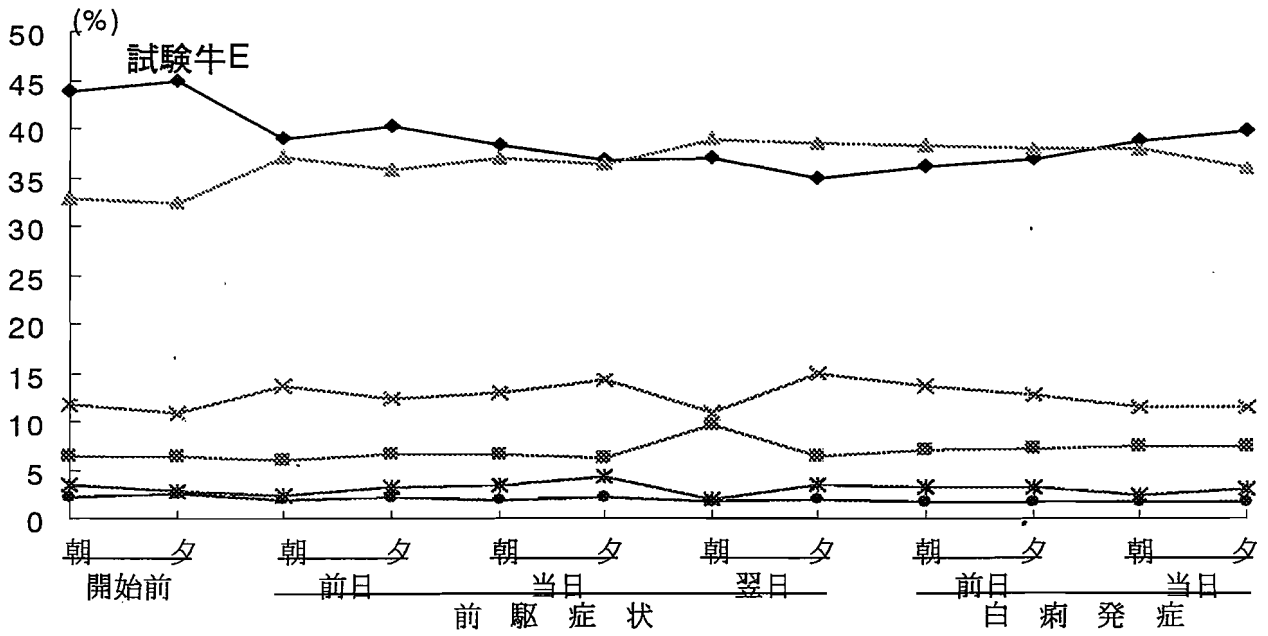
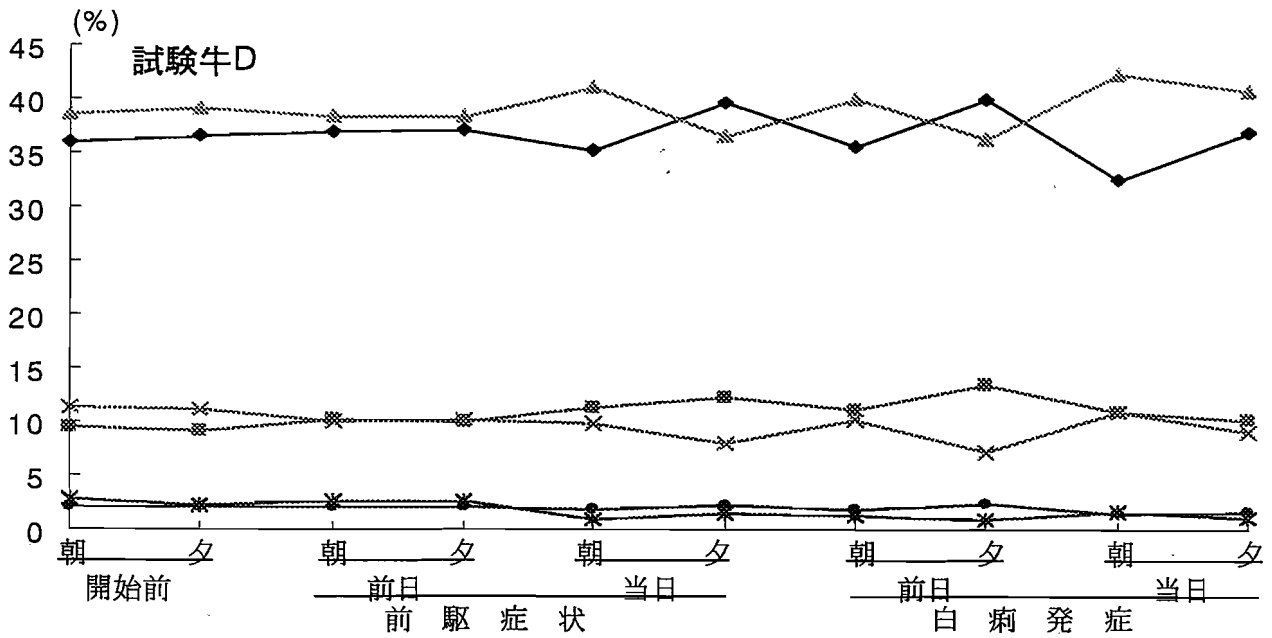


図14-2. 試験牛D、Eの乳汁中脂肪酸組成の推移

—◆— オレイン酸 —■— ステアリン酸 —▲— パルミチン酸 —×— ミリスチン酸 —*— ラウリン酸 —●— リノール酸

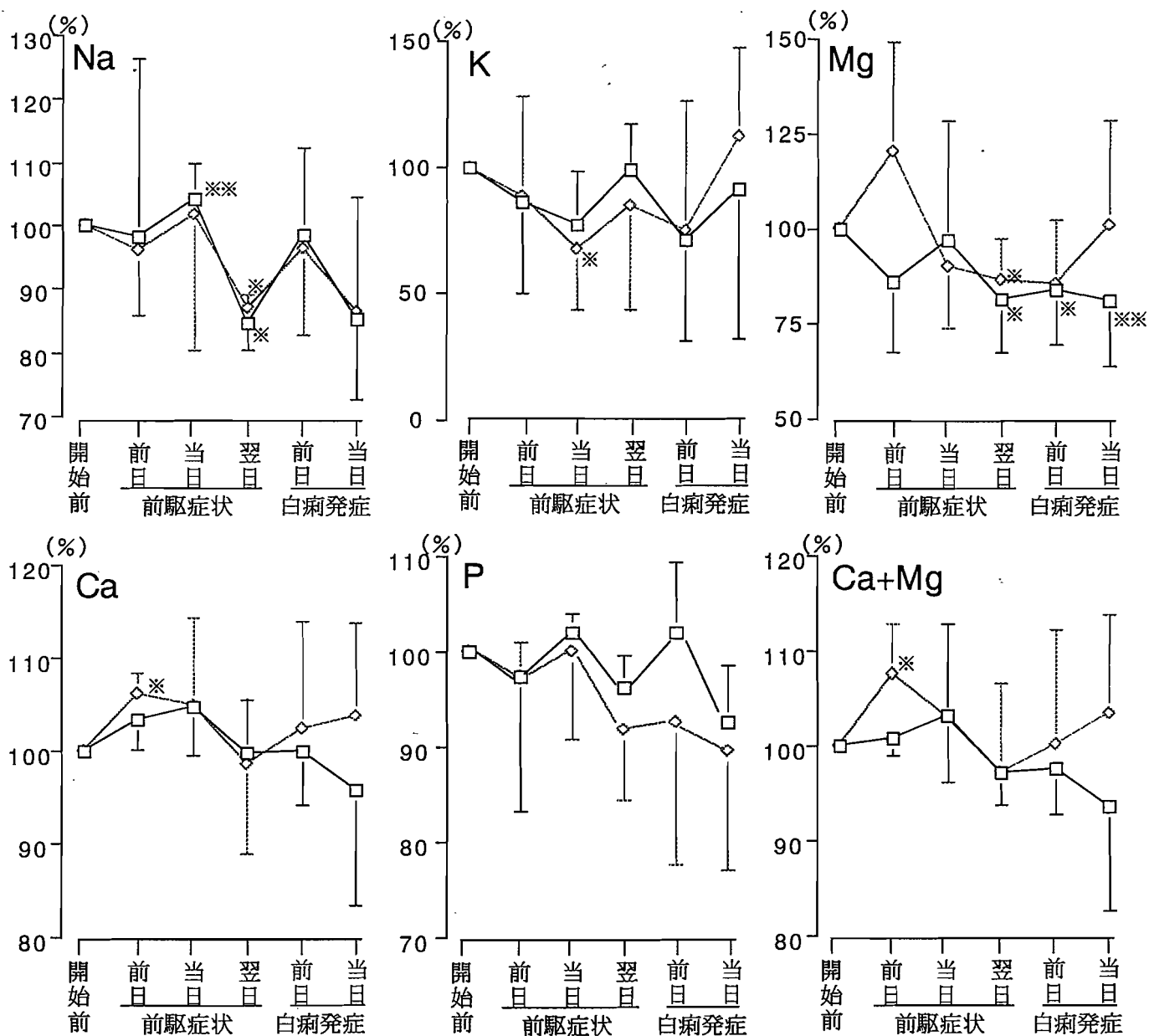


図15. 乳汁中無機成分濃度の推移

—□— 朝 —◇— 夕 開始前に対する有意差 ※: $p < 0.05$ ※※: $p < 0.01$

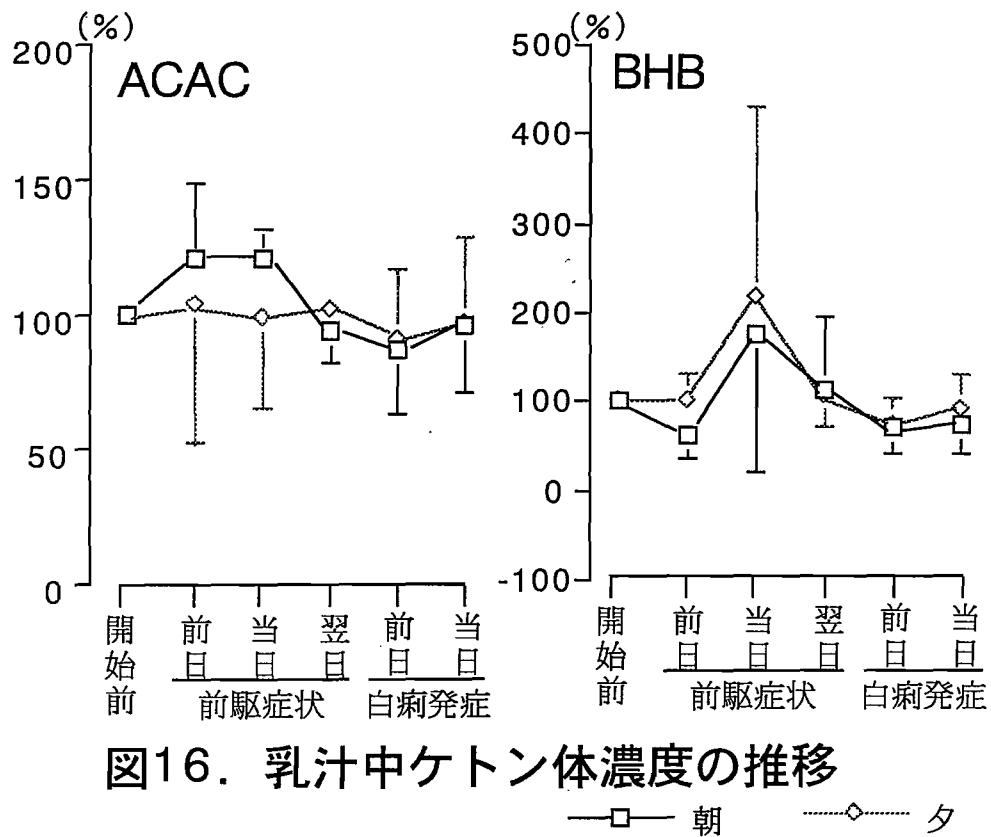


図16. 乳汁中ケトン体濃度の推移

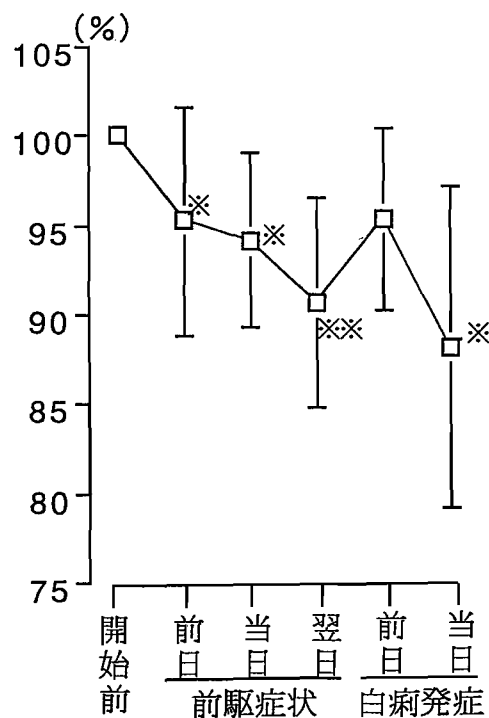


図17. 子牛の糞便中腸内生細菌数

開始前に対する有意差 * : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$

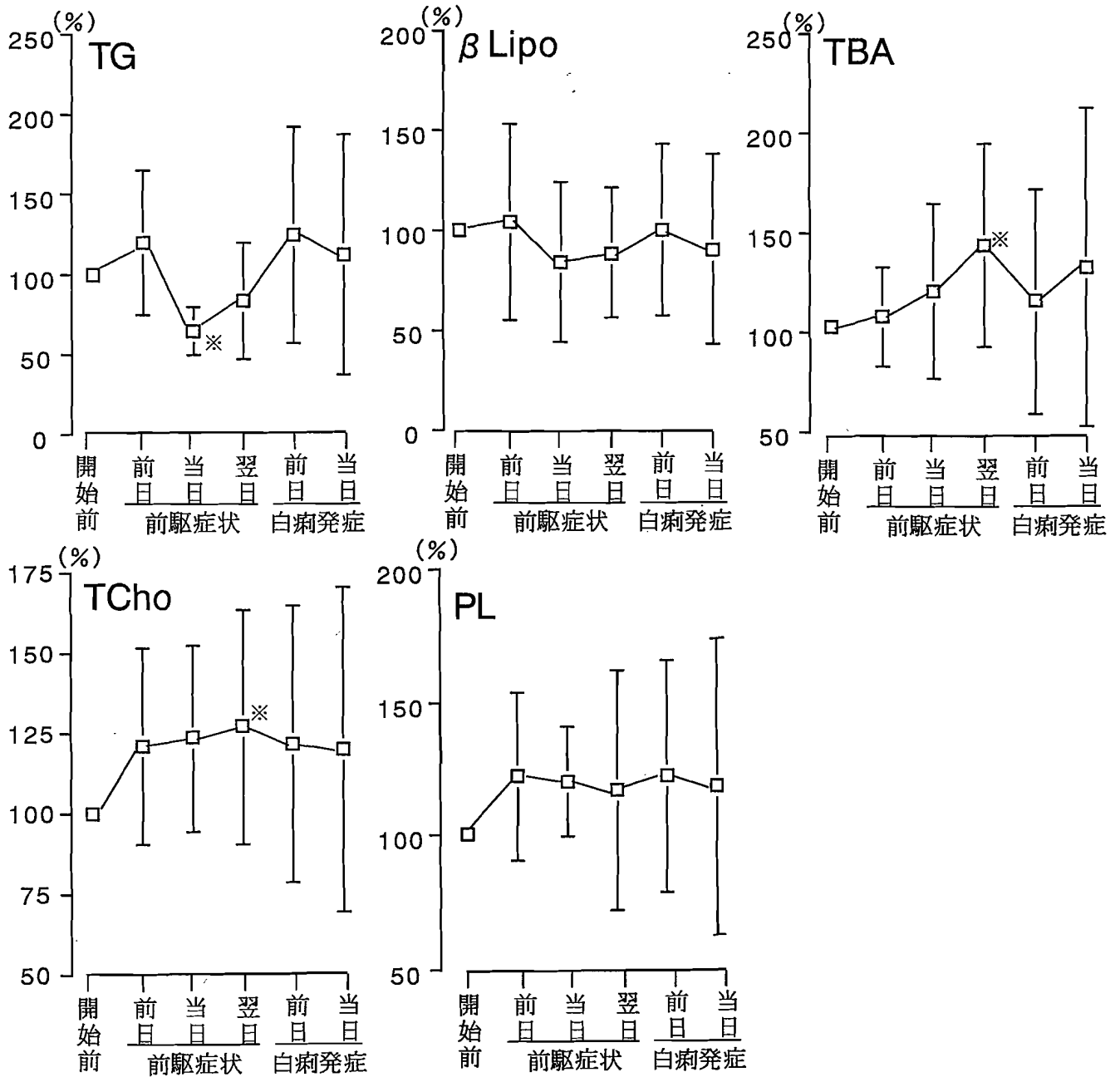


図18-1. 子牛の血液成分の推移 (1)

開始前に対する有意差 ※: $p < 0.05$

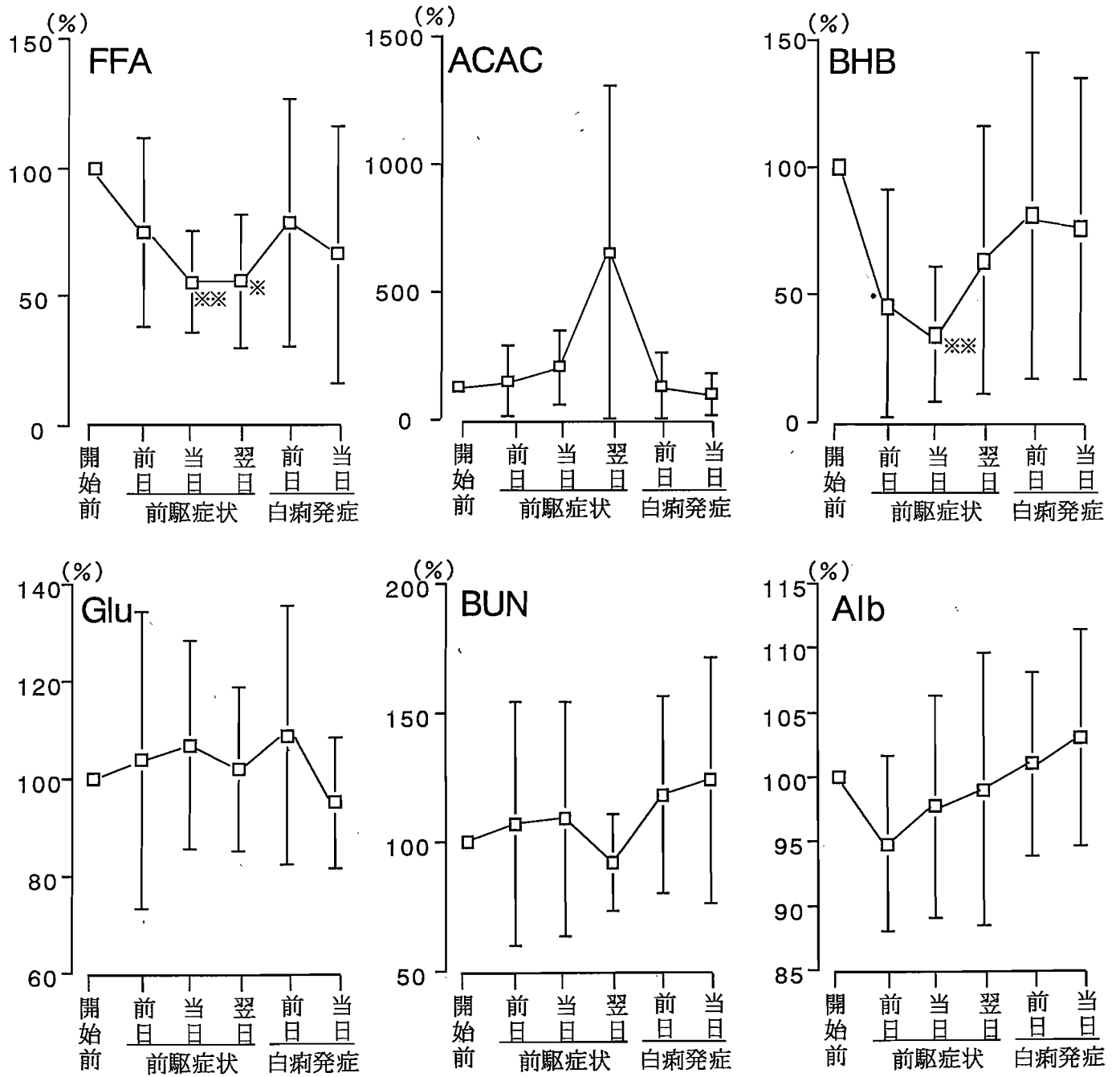


図18-2. 子牛の血液成分の推移 (2)

開始前に対する有意差 ※: $p < 0.05$ ※※: $p < 0.01$

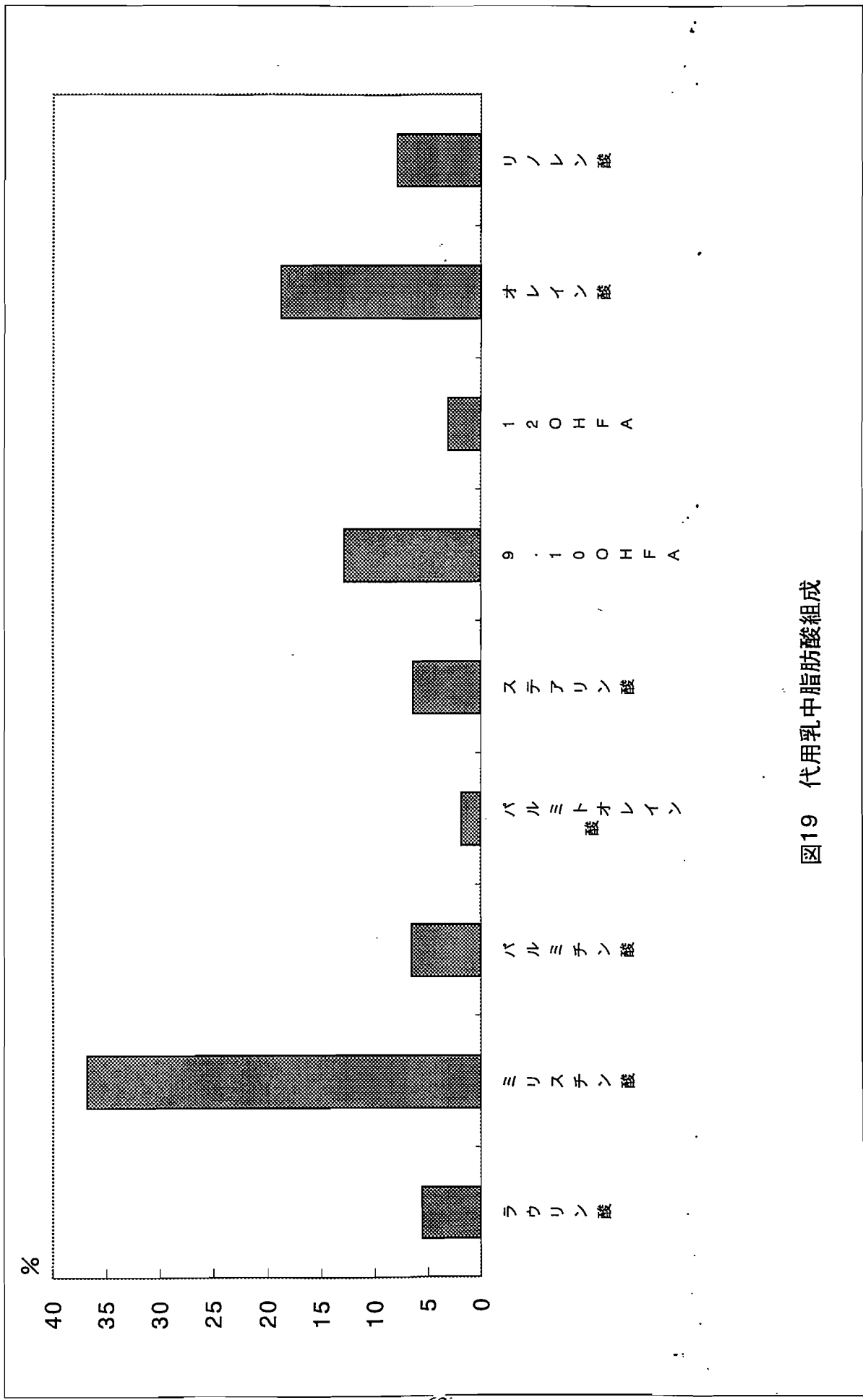


図19 代用乳中脂肪酸組成

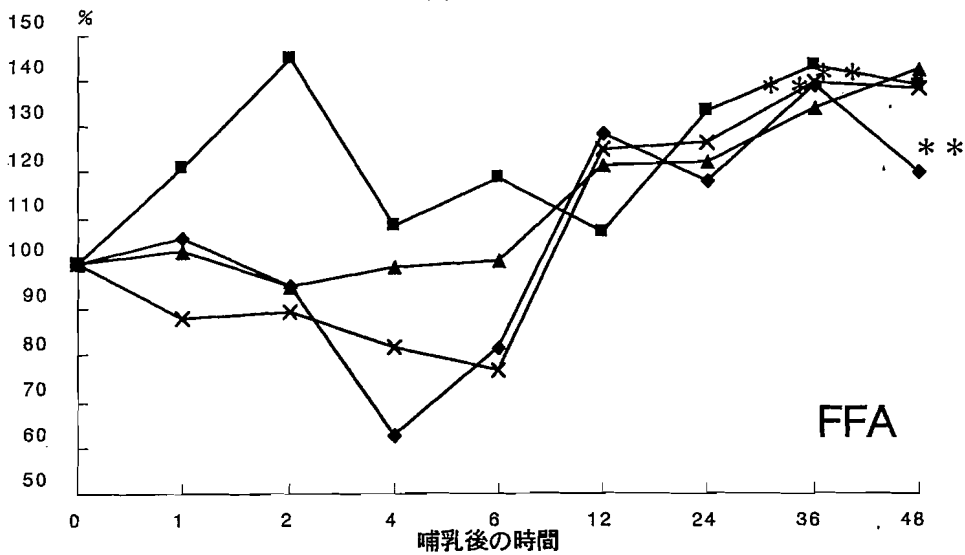
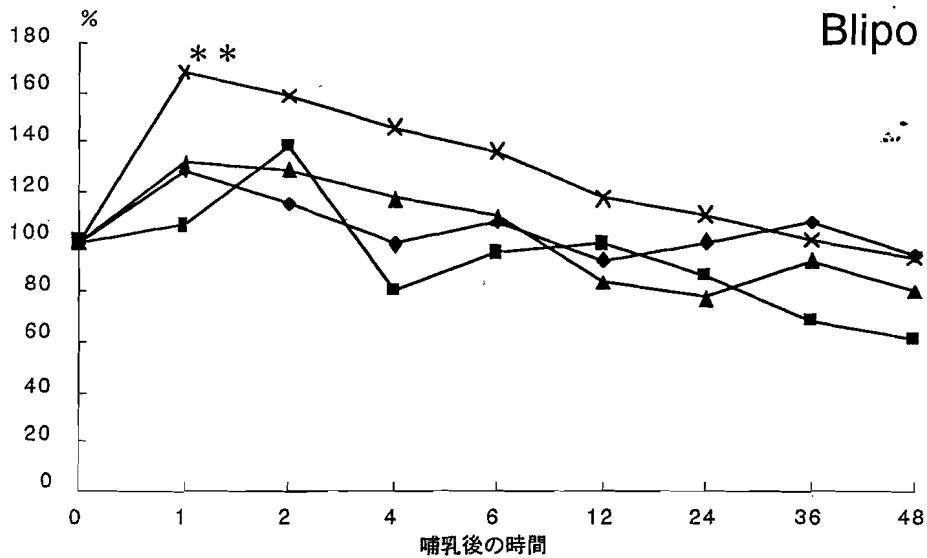
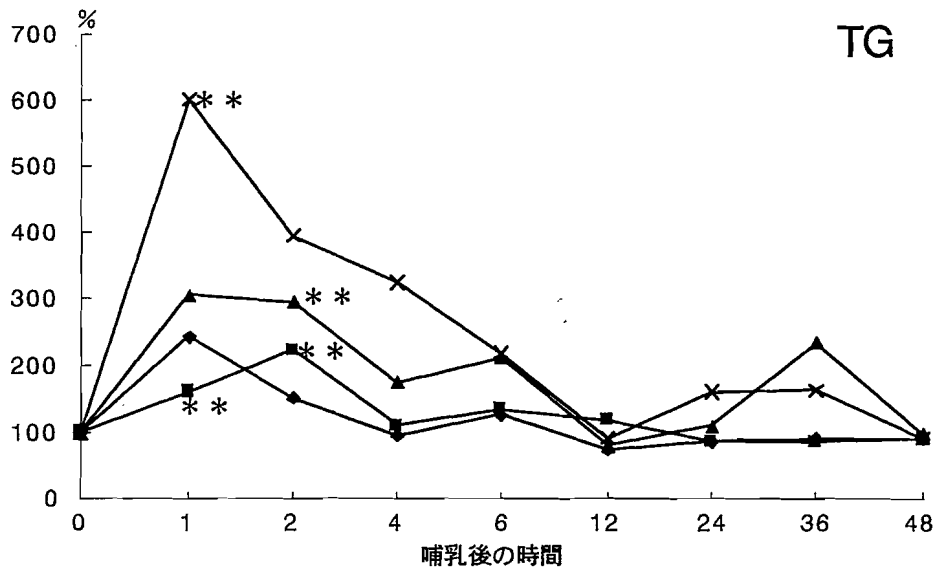


図20. 血清中TG、 β Lipo、FFAの脂肪酸投与後の平均値の推移
 ●—コントロール群 ■—オレイン酸投与群 ▲—ステアリン酸投与群 ×—パルミチン酸投与群
 投与前に対する有意差 ** : $p < 0.01$

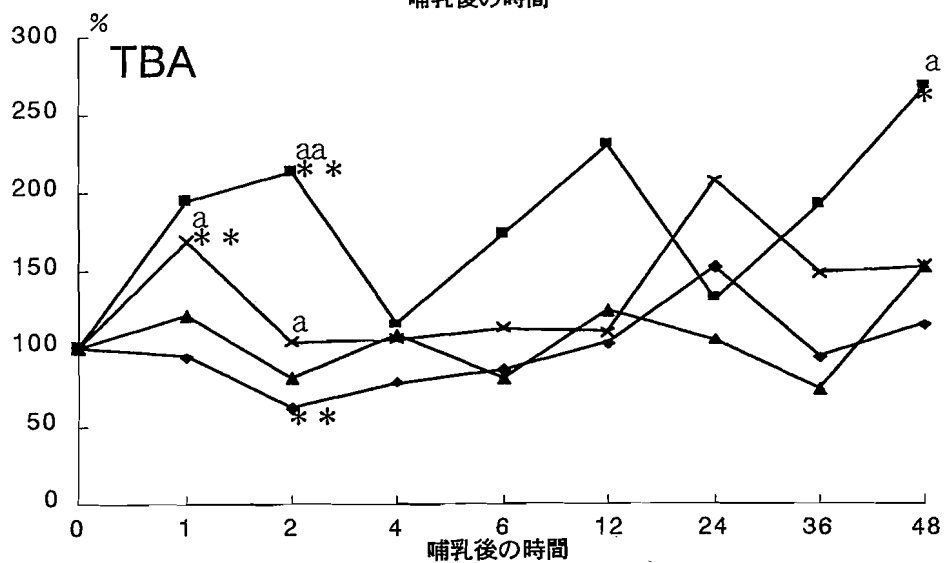
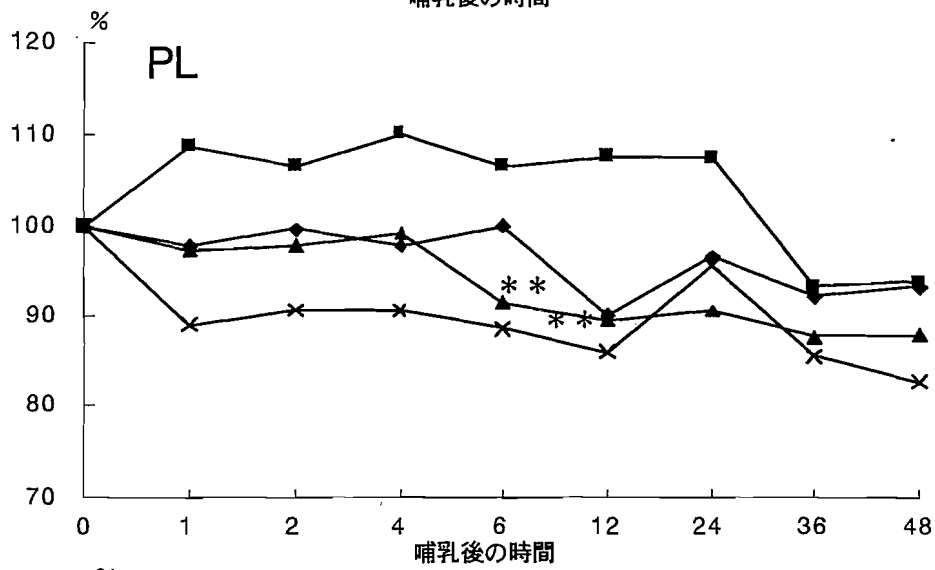
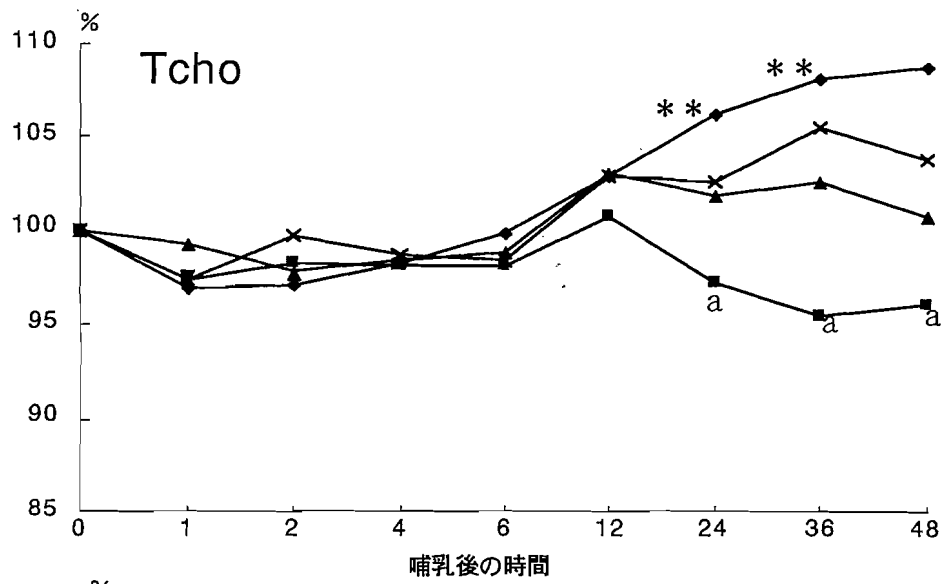


図21.血清中Tcho、PL、TBAの脂肪酸投与後の平均値の推移

◇—コントロール群 ■—オレイン酸投与群 ▲—ステアリン酸投与群 ×—パルミチン酸投与群
 投与前に対する有意差 ** : $p < 0.01$
 同一時期のコントロール群に対する有意差 aa : $p < 0.01$ a : $p < 0.05$

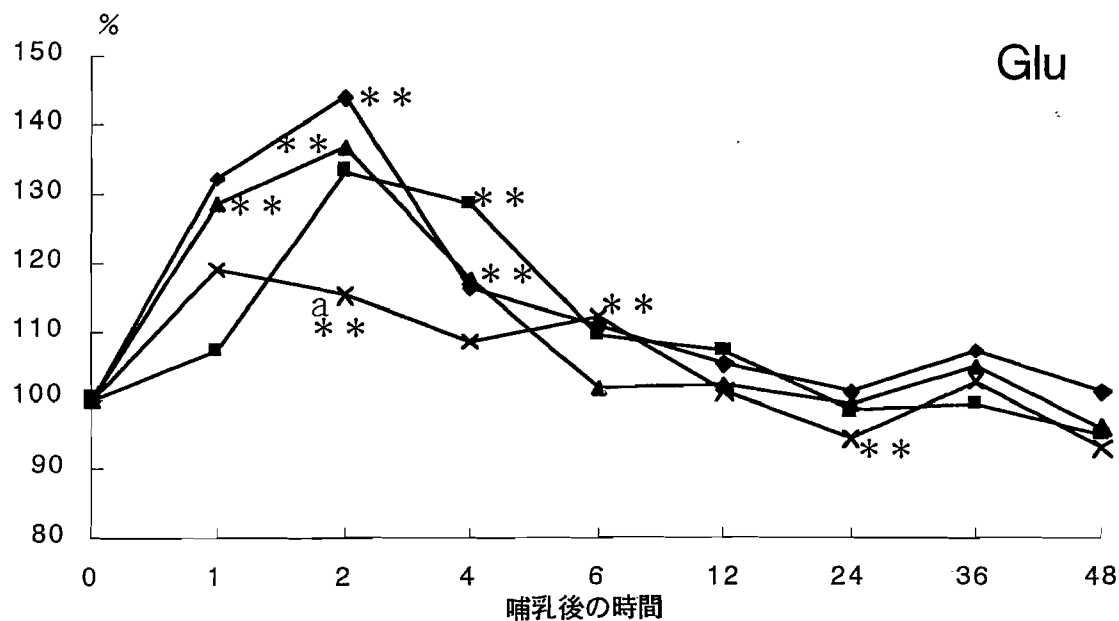
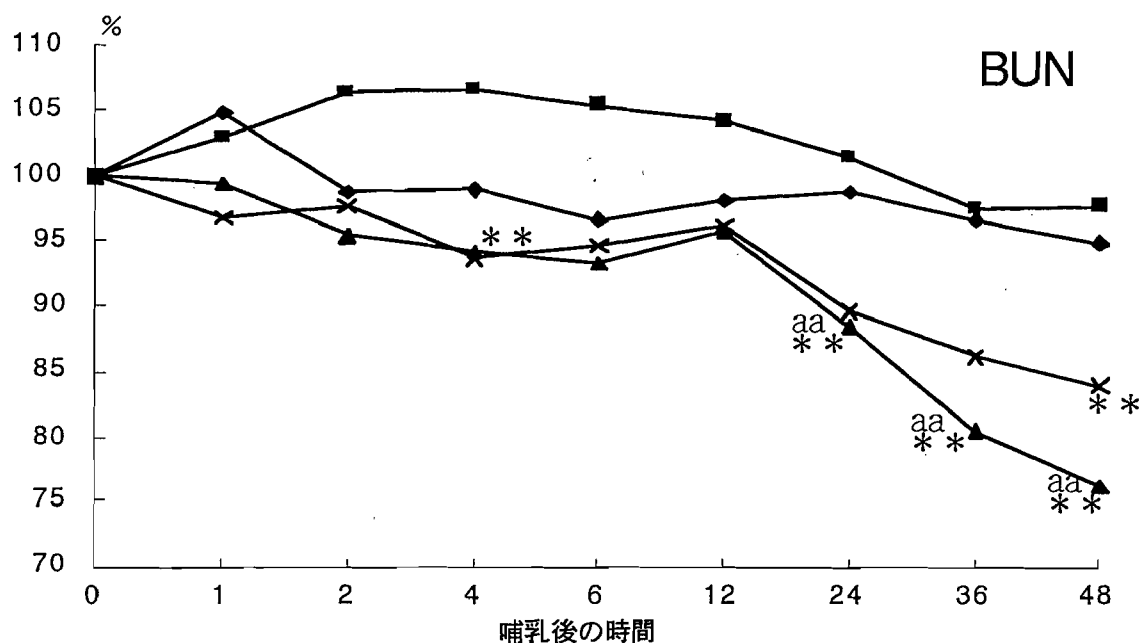


図22. 血清中BUN、Gluの脂肪酸投与後の平均値の推移

◆—コントロール群 ■—オレイン酸投与群 ▲—ステアリン酸投与群 ✕—パルミチン酸投与群
 投与前に対する有意差 ** : $p < 0.01$
 同一時期のコントロール群に対する有意差 aa : $p < 0.01$ a : $p < 0.05$

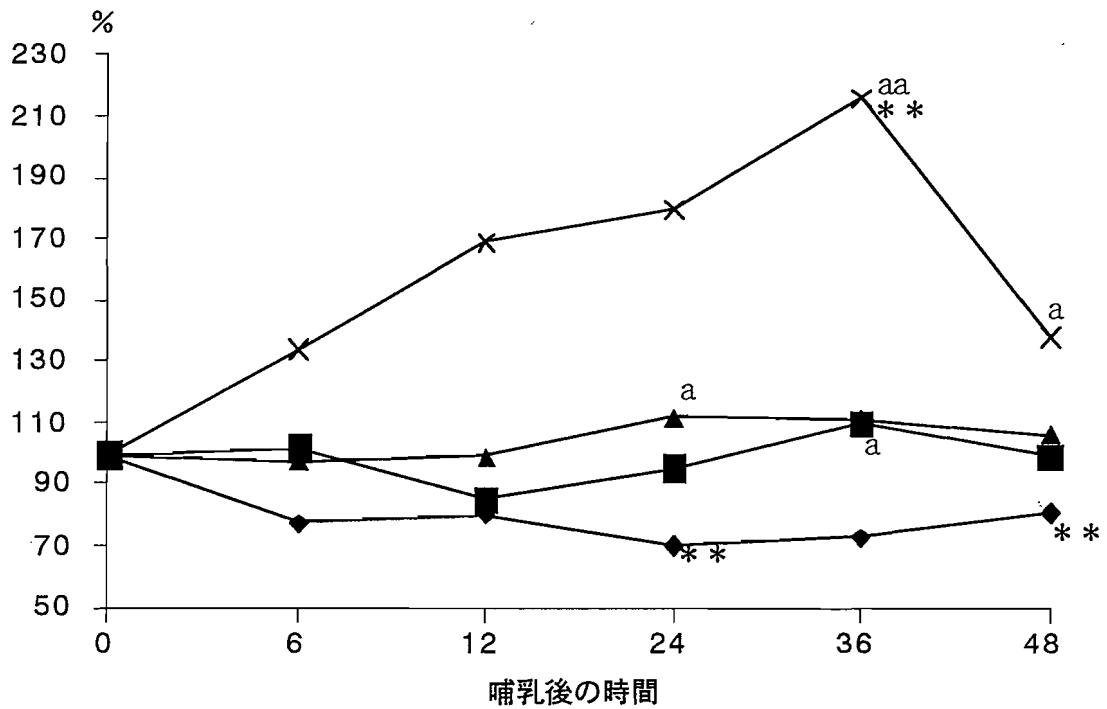


図23. 糞便TG中の脂肪酸投与後の平均値の推移

◆コントロール群 ■オレイン酸投与群 ▲ステアリン酸投与群 ✕パルミチン酸投与群
 投与前に対する有意差 ** : $p < 0.01$
 同一時期のコントロール群に対する有意差 aa : $p < 0.01$ a : $p < 0.05$

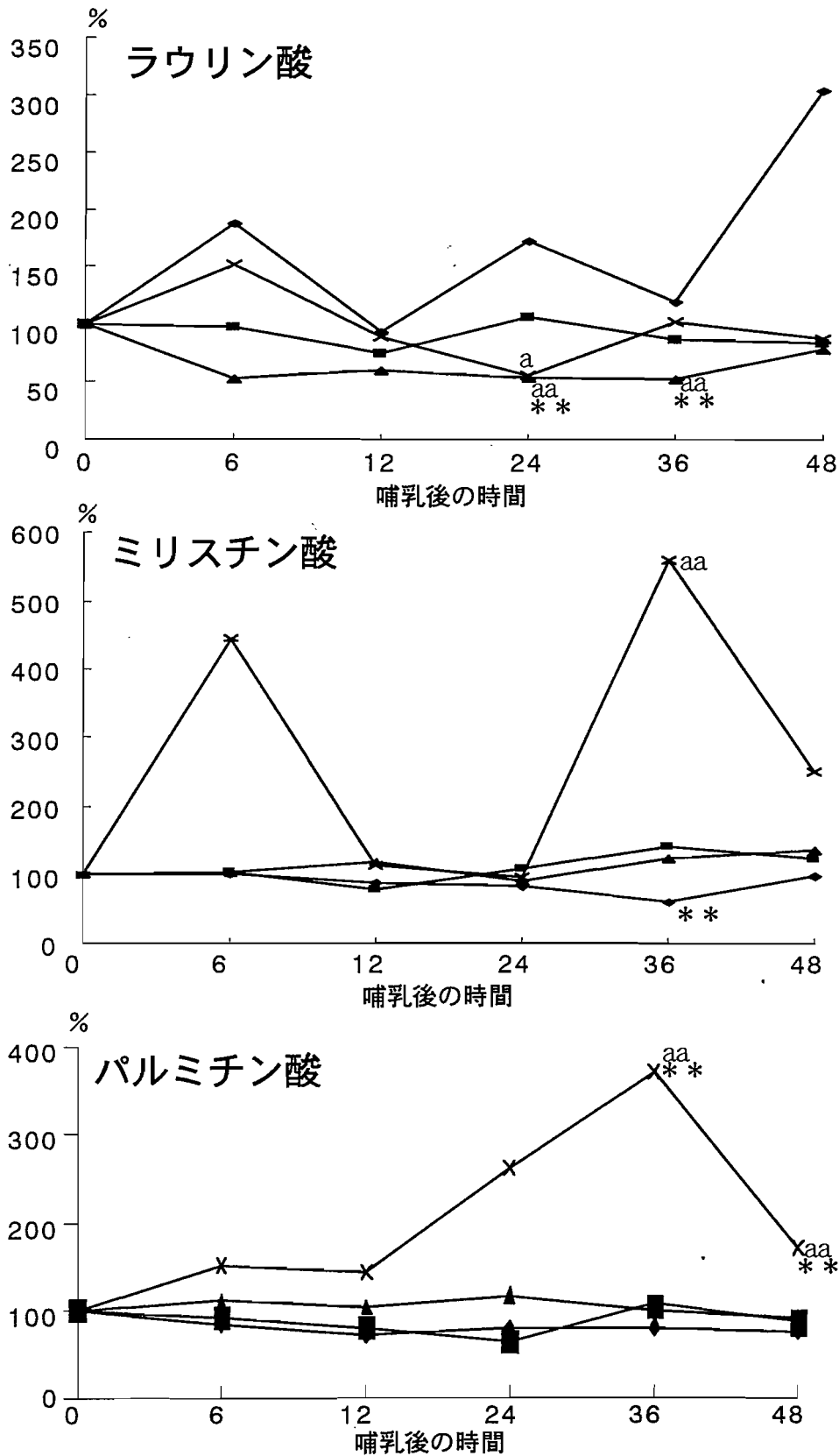


図24. 糞便中脂肪酸の脂肪酸投与後の平均値の推移 (1)

◆—コントロール群 ■—オレイン酸投与群 ▲—ステアリン酸投与群 ✕—パルミチン酸投与群
 投与前に対する有意差 ** : $p < 0.01$
 同一時期のコントロール群に対する有意差 aa : $p < 0.01$ a : $p < 0.05$

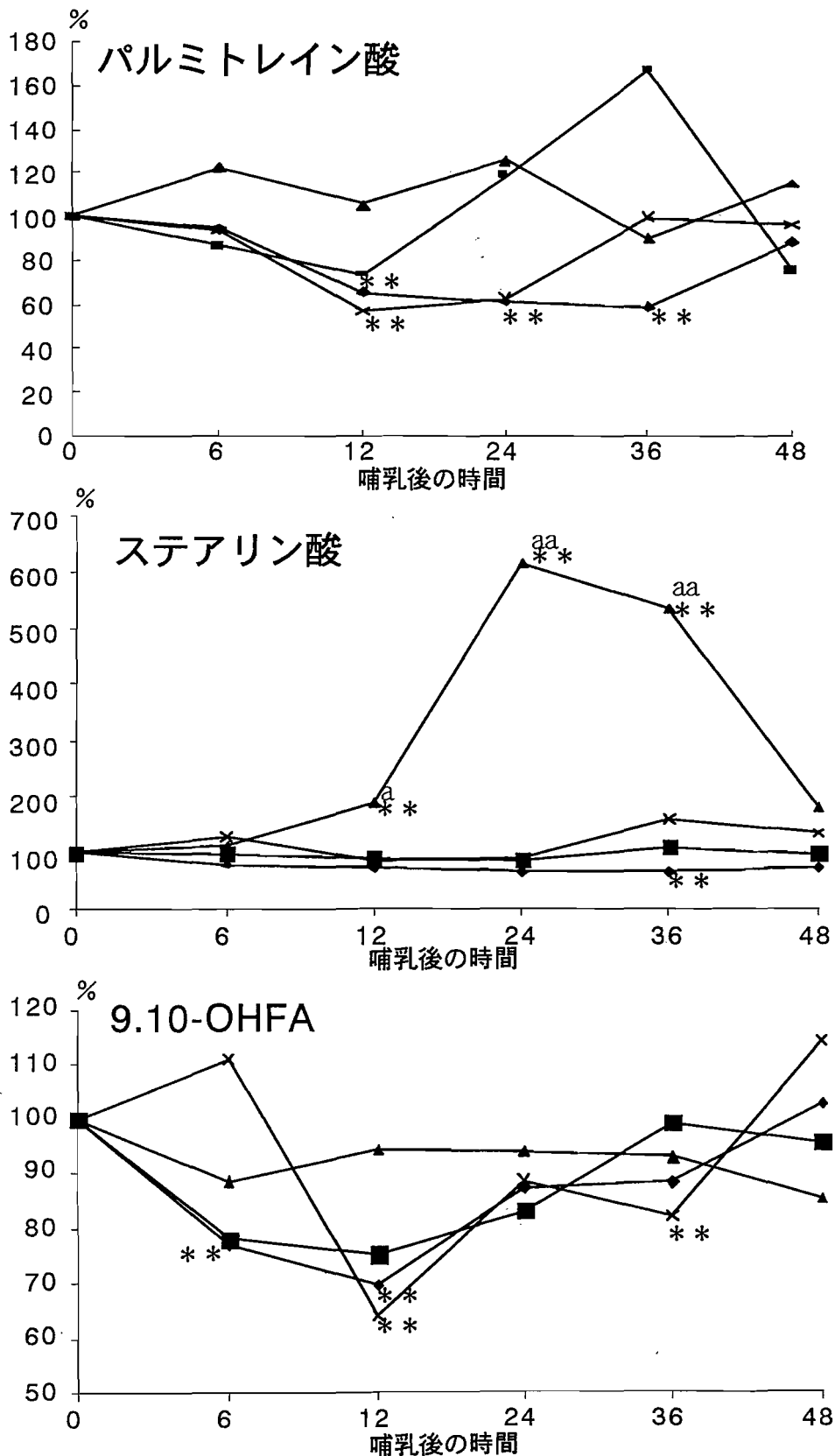


図25. 糞便中脂肪酸の脂肪酸投与後の平均値の推移 (2)

◆コントロール群 ■オレイン酸投与群 ▲ステアリン酸投与群 ✕パルミチン酸投与群
 投与前に対する有意差 **: $p < 0.01$
 同一時期のコントロール群に対する有意差 aa: $p < 0.01$ a: $p < 0.05$

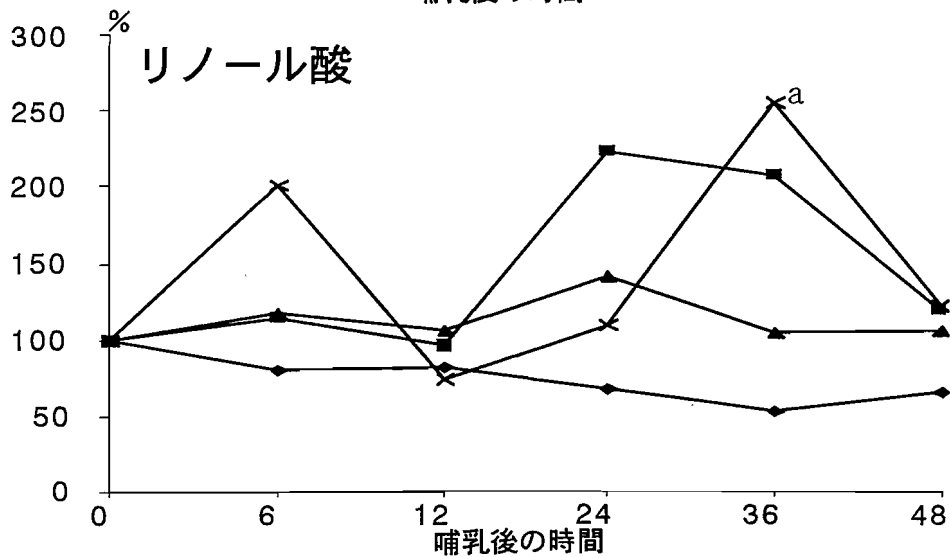
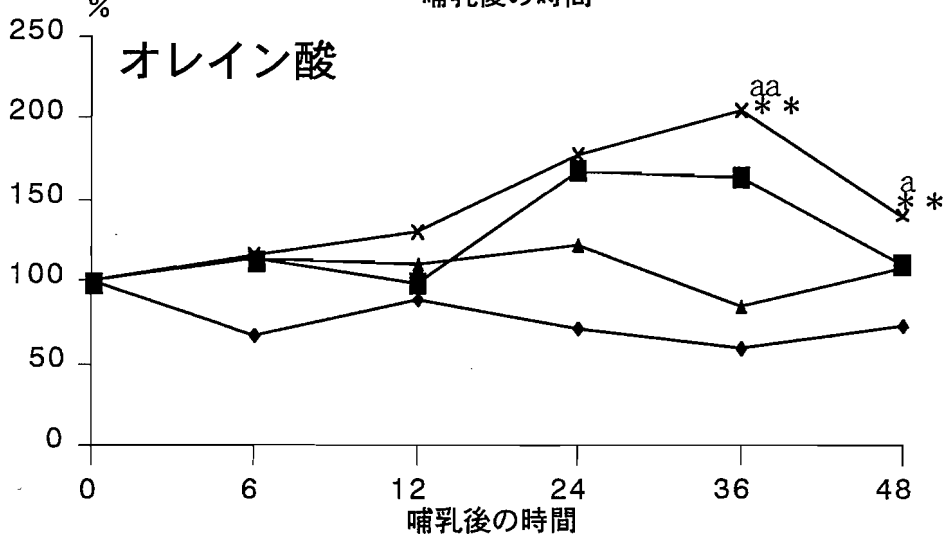
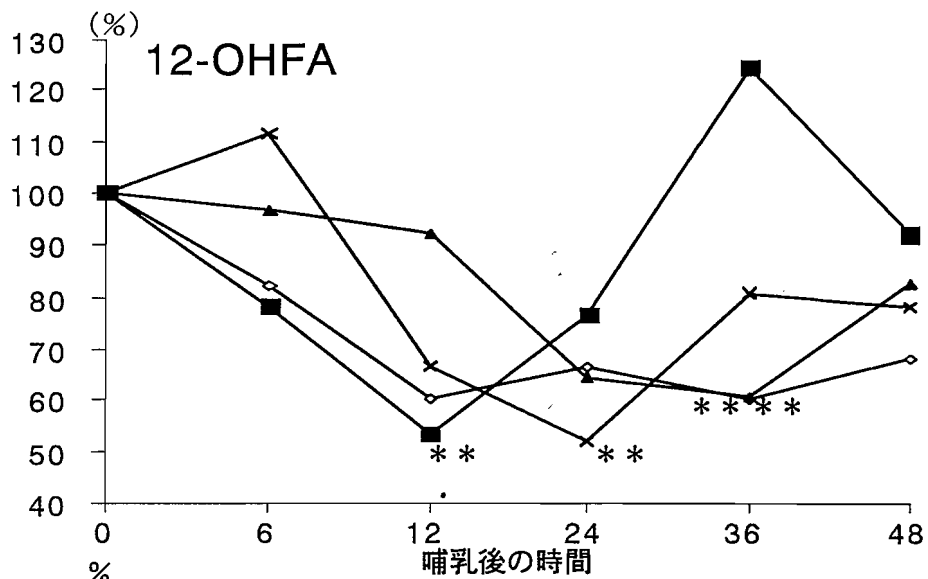


図26. 糞便中脂肪酸の脂肪酸投与後の平均値の推移 (3)

◆—コントロール群 ■—オレイン酸投与群 ▲—ステアリン酸投与群 ×—パルミチン酸投与群

投与前に対する有意差 ** : $p < 0.01$

同一時期のコントロール群に対する有意差 aa : $p < 0.01$ a : $p < 0.05$

謝 辞

本研究は以下の各位（敬称略）の御協力により遂行されましたので、ここに謝意を表します。

岩手大学農学部獣医学科家畜病院研究室学生

深谷敦子、戸川晶子、後藤芳恵、古川岳大、岡田珠子、高畑幸子

石川敦洋、西森一浩

岩手大学農学部応用生物学科動物栄養学講座学生

佐川恭一、中本孝宏

また、ご指導、ご助言を賜りました岩手大学 内藤善久教授、竹内 啓教授（現：日本大学教授）、東京農工大学 金田義宏教授に深謝いたします。

参考文献

1. Abe, M., Iriki, T., Ikeda, K. and Funaba, M. (1992). Effect of fatty acid composition of milk replacer on digestibility, incidence of diarrhoea and lipid metabolism in newborn calves. *Anim. Sci. Technol.* 63, 1014~1024.
2. Abe, M. and Takase, O. (1981). Neonatal diarrhoea in calves given milk-substitutes differing in fat source and fed by different procedures. *Br. J. Nutr.* 46, 543~548.
3. Acres, S. D., Laing, C. J., Saunders, J. R. and Radostits O. M. (1975). Acute undifferentiated neonatal diarrhea in beef calves I. Occurrence and distribution of infectious agents. *Can. J. Comp. Med.* 39, 116~132.
4. Acres, S. D., Saunders, J. R. and Radostits, O. M. (1977). Acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves: The prevalence of enterotoxigenic *E. Coli*, Reo-Like (Rota) virus and other enteropathogens in cow-calf heads. *Can. Vet. J.*, 18, 113~121.
5. Adams, E. P. and Heath, T. J. (1963). The phospholipids of ruminant bile. *Biochim. Biophys. Acta.* 70, 688~690.
6. Allen, S. D. and White R. D. (1985). Dairy calf diarrhea. *Agri. Prac.*, 6, 23~31.
7. Ammon, H. V. and Phillips, F. P. (1973). Inhibition of colonic water and electrolyte absorption by fatty acids in man. *Gastroenterology* 65, 744~749.
8. Binder, H. J. (1973) Fecal fatty acids-Mediators of diarrhea? *Gastroenterol.*, 65 : 847-850.
9. Bright-Asare, P. and Binder, H. J. (1973). Stimulation of colonic secretion of water and electrolytes by hydroxy fatty acids. *Gastroenterology* 64, 81~88.
10. Castrucci, G., Frigeri, F., Cilli, V., Gualandi, G. L. and Aldrovandi, V. (1988). Neonatal calf diarrhea induced by Rotavirus. *Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis.* 11, 71~84.
11. Dawson, R. M. C. and Kemp, P. (1967). The aminoethylphosphonate-containing lipids of rumen protozoa. *Biochem. J.* 105, 837~842.
12. DeLeeuw, R. W. (1980). Rotavirus infections in calves in dairy herds. *Res. Vet. Sci.* 29. 135~141.
13. Fallon, R. J. and Harte, F. J. (1983). The occurrence of diarrhoea in calves under different management systems. *Ann. Rech. Vet.* 14, 473~478.
14. Fettman, M. J., Brooks, P. A., Burrows, K. P. and Phillips, R. W. (1986). Evaluation of commercial oral replacement formulas in healthy neonatal calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 188, 397~401.
15. Fisher, E. W. and Martinez, A. A. (1978) Studies in neonatal calf diarrhoea. VII. The effects of milk intake. *Br. Vet. J.*, 134 : 234-242.

16. Fledderus, A., Dijk, J. E. V., Mouwen, J. M. V. M. and Holzhauer, C. (1985). Prevention of intestinal disturbances using disodium cromoglycate in veal calves. *Vet. Rec.* 117, 582~583.
17. 藤野安彦 (1978) 脂質分析法入門, 生物化学実験法 9. pp43, 学会出版センター, 東京.
18. 古川英幸, 柚之原通雄 (1997). 黒毛和種牛の分娩後の乳汁成分と子牛の下痢症との関係. *家畜診療* 405, 3~7.
19. Girard, V. and Hawke, J. C. (1978). The role of holotrichs in the metabolism of dietary linoleic acid in the rumen. *Biochem. Biophys. Acta.* 528, 17~27.
20. Goute. M., Contrepolis, M. Dubourguier, H. C. Riou, Y. Scherrer, R., Laporte, J., Vautherot, J. F., Cohen, J. and Lharidon, R. (1978). The experimental production of diarrhoea in colostrum deprived axenic and gnotoxenic calves with enteropathogenic *Escherichia coli*, Rotavirus, Coronavirus and in a combined infection of Rotavirus and *E. coli*. *Ann. Rech. Vet.* 9, 433~440.
21. Hudson, S., Mullord, M., Whittlestone, W. G. and Payne, E. (1976). Plasma corticoid levels in healthy and diarrhoeic calves from birth to 20 days of age. *Br. Vet. J.* 132, 551~556.
22. 飯塚三喜, 本間惣太, 米村寿男, 野口一郎, 須川章夫, 吉田信行 (1965). いわゆる低酸度アルコール反応陽性乳に関する研究. *獣畜新報* 397, 433~436.
23. 今泉勝巳, 窄野昌信 (1996). 脂肪の消化と吸収. *栄養学雑誌* 54, 271~283.
24. 井上 亮, 後藤浩人, 小林隆之, 小屋正人, 山科 淳, 斉藤才吉, 高橋公明, 吉田 登, 伊藤金助 (1987). 子牛の低色素便排泄の成因とその治療法について. *家畜診療* 286, 9~16.
25. Isaacson, R. E., Moon, H. W. and Schneider, R. A. (1978). Distribution and virulence of *Escherichia coli* in the small intestines of calves with and without diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* 39, 1750~1755.
26. Johnston, W. S. and Maclachlan, G. K. (1977). Digestive illness in the calf associated with non-coagulation of cow's milk. *Vet. Rec.* 101, 325~326.
27. Johnston, W. S., Maclachlan, G. K. and Hopkins, G. F. (1980). The association of non-clotting of cow's milk with scour in the single suckled beef calf. *Vet. Rec.* 106, 174~175.
28. 金子弘 (1978) 脂質, 1. 脂質の分画と調製, 生化学実験法 上巻. 三浦義彰編, pp101-126, 文光堂, 東京.
29. Kapil, S., Trent A. M. and Goyal, S. M. (1990). Excretion and persistence of bovine coronavirus in neonatal calves. *Arch. Virol.* 115, 127~132.
30. Katz, I. and Keeney, M. (1967). The lipids of some rumen holotrich protozoa. *Biochim. Biophys. Acta.* 144, 102~112.
31. Krogh, H. V. (1983). Occurrence of Enterotoxigenic *Escherichia coli* in calves with acute neonatal diarrhoea. *Nord. Vet. Med.* 35, 346~352.
32. Landsverk, T. (1981). An enzyme histochemical investigation of the

- intestinal mucosa in diarrheic calves. *Acta Vet. Scand.* 22, 449~458.
33. Linzell, J. L., Annison, E. F., Fazakerley, S. and Leng, R. A. (1967). The incorporation of acetate, stearate and D (-) - β -hydroxybutyrate into milk fat by the isorated perfused mammary gland of the goat. *Biochem. J.* 104, 34~42.
 34. Manston, R., Russell, A. M., Dew, S. M. and Payne, J. M. (1975). The influence of dietary protein upon blood composition in dairy cows. *Vet. Rec.* 96, 497~502.
 35. Moon, H. W., McClukin, A. W., Isaacson, R. E., Pohlenz, J., Skartvedt, S. M. and Baeta, A. L. (1978). Pathogenic relationships of Rotavirus, *Escherichia coli* and other agents in mixed infections in calves. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 73, 577~583.
 36. Morin, M., Lariviere, S. and Lallier, R. (1976). Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea. *Can. J. Comp. Med.* 40, 228~240.
 37. Murakami, T., Hirano, N., Chitose, K., Tsuchiya, K., Ono, K., Sato, F., Suzuki, Y. and Murakami, Y. (1987). A survey on bovine Rotavirus type 1-associated neonatal calf diarrhea in a beef herd. *Jpn. J. Vet. Sci.* 49, 23~30.
 38. 中村 修, 竹之下浩和, 下村雄二, 末之下高広 (1996). 黒毛和種における子牛下痢発症別の母牛乳成分. *家畜診療* 395, 3~6.
 39. 農林水産省経済局保険管理課編 (1989). 家畜共済統計表, 農林水産省経済局保険管理課, 東京.
 40. 農林水産省経済局保険管理課編 (1995). 家畜共済統計表, 農林水産省経済局保険管理課, 東京.
 41. 農林水産省農林水産技術会議事務局編 (1983). 日本飼養標準・肉用牛 (1975年版), 第8版. 社団法人・中央畜産会, 東京.
 42. 岡田啓司、菊地 薫、三浦 潔、佐藤利博、森田 靖、田高 恵、荻野朋子、金田義宏：黒毛和種子牛の白痢とアルコール不安定母乳の関係、*日獣会誌*, 50, 74-79 (1997)
 43. 岡田啓司、佐藤忠弘、下山茂樹、赤坂 茂、佐々木重荘、佐々木洋子、高橋 覚志、平田統一 (1997). 高蛋白・高デンプン飼料給与乳牛における血中アンモニア・乳酸濃度. *日獣会誌* 50, 705~708.
 44. 岡田啓司、高橋千賀子、渥美孝雄、菊池 薫、小島佳岳、南館君夫 (1992). 黒毛和種下痢症子牛の血清脂質および膵臓酵素に関する検討. *東北家畜臨床研究会誌* 15, 15~21.
 45. OKADA, K., TAKO, M., NAITO, Y., TAKEUCHI, A. (1999) Relationship between occurrence of white diarrhea and changes of properties and components of blood and milk in their dams after parturition in Japanese Black calves. *J. Vet. Med. Sci.*, 61, 929-934.
 46. 岡田啓司、田高 恵、佐藤忠弘、村田 修、伊藤 真、渡辺一雅、下山茂樹、佐々木重荘、金田義宏：黒毛和種繁殖母牛の栄養状態と子牛白痢の発生、*日獣会誌*, 50, 209-213 (1997)

47. Olchoway, T. W. J., Linnabary, R. D., Andrews, F. M. and Longshore, R.C. (1993). Lactose intolerance in a calf. *J. Vet. Intern. Med.* 7, 12~15.
48. 小野寺良次 (1985).ルーメン内における栄養素の代謝. 神立 誠・須藤恒二監修, ルーメンの世界, 初版 pp.171~259. 社団法人・農産漁村文化協会, 東京.
49. Parker, B. N. J. and Blowey, R. W. (1976). Investigation into the relationship of selected blood components to nutrition and fertility of the dairy cow under commercial farm conditions. *Vet. Rec.* 98, 394~404.
50. Radostits, O. M. and Bell, J. M. (1968). Nutrient digestibility by new-born calves fed milk replacer. *Can. J. Anim. Sci.* 48, 293~302.
51. Rook, J. A. F. and Balch, C. C. (1961). The effects of intraruminal infusions of acetic, propionic and butyric acids on the yield and composition of the milk of the cow. *Brit. J. Nutr.* 15, 361~369.
52. Rollin, R. E., Mero, K. N., Kozisek, P. B. and Phillips, R. W. (1986). Diarrhea and malabsorption in calves associated with therapeutic doses of antibiotics: Absorptive and clinical changes. *Am. J. Vet. Res.* 47, 987~991.
53. 佐藤博 (1986) 乳牛における血液成分とその栄養生理的意義. *日畜会報*, 57 (12) : 959-970.
54. Shah, N. M. and Jhala, V. M. (1992). Epizootiological investigations on Rotavirus infection in cases of neonatal calf diarrhoea. *Indian vet. J.* 69, 5~7.
55. Sinnott-Smith, P. A., Slee, J. and Woolliams, J. A. (1987). Biochemical and physiological responses to metabolic stimuli in friesian calves of differing genetic merit for milk production. *Anim. Prod.* 44, 11~19.
56. Snodgrass, D.R., Smith, M. L. and Krautil, F. L. (1982). Interaction of Rotavirus and enterotoxigenic *Escherichia coli* in conventionally-reared dairy calves. *Vet. Microbiol.* 7, 51~60.
57. Snodgrass, D. R., Terzolo, D., Sherwood, D. Campbell, I., Menzies, J. D. and Synge, B. A. (1986). Aetiology of diarrhea in young calves. *Vet. Rec.* 119, 31~34.
58. Soong, C. S., Thompson, J. B., Poley, J. R. and Hess, D. R. (1972). Hydroxy fatty acids in human diarrhea. *Gastroenterology* 63, 748~757.
59. 高橋千賀子, 鈴木利行, 武蔵晶文, 小野秀弥, 寺田智司, 千葉正寛 (1993) 黒毛和種子牛下痢症の病態に関する血清脂質成分を中心とした血液生化学的検討. *家畜診療*, 358 : 27-35.
60. 田中桂一, 清水良三, 崎元道男, 誉 徳芳 (1974). ヤギにおける胸管リンパ系への不飽和脂肪酸の吸収. *日畜会報* 45, 206~213.
61. Thomas, P. J. (1972). Identification of some enteric bacteria which convert oleic acid to hydroxystearic acid in vitro. *Gastroenterology* 62, 430~435.
62. 恒光 裕, 工藤卓二, 八田忠雄, 森 清一 (1986). 一肉牛牧場における子牛