

乳牛における
Difructose Anhydride (DFA) IIIの機能性に関する研究

2012. 9

岩手大学大学院
連合農学研究科
生物環境科学専攻
(帯広畜産大学)

佐藤 忠

第一章 序論	
第一節 研究目的	1
第二節 腸管からの吸収;細胞内通路と細胞間通路	6
第三節 食品としての DFA III とカルシウム吸収亢進効果	7
第二章 第一胃微生物による Difructose Anhydride III の分解性	
第一節 緒言	10
第二節 材料および方法	11
第三節 結果と考察	13
第四節 小括	17
第三章 乳牛の消化管における Difructose Anhydride III の動態と血中ミネラルの 変化	
第一節 緒言	18
第二節 材料および方法	19
第三節 結果と考察	21
第四節 小括	26
第四章 Difructose Anhydride III の給与が分娩牛の血清カルシウム濃度に及ぼす 影響	
第一節 緒言	27
第二節 材料および方法	28
第三節 結果	30
第四節 考察	35
第五章 小括	38

第五章 Difructose Anhydride III と酸化マグネシウムの給与が乳牛の分娩前後の血清カルシウムおよびマグネシウム濃度に及ぼす影響

第一節 緒言	39
第二節 材料および方法	39
第三節 結果	42
第四節 考察	45
第五章 小括	48

第六章 分娩前後の Difructose Anhydride III とカルシウムの給与が血中カルシウム濃度と周産期疾病に及ぼす影響

第一節 緒言	50
第二節 材料および方法	51
第三節 結果	54
第四節 考察	57
第五章 小括	59

第七章 Difructose anhydride III の給与が泌乳牛の乳生産、体重、血液成分、乳房炎、蹄疾患および繁殖に及ぼす影響

第一節 緒言	61
第二節 材料および方法	62
第三節 結果と考察	65
第四節 小括	78

第八章	Difructose Anhydride III の給与が出生子牛の血清免疫グロブリン G 濃度 に及ぼす影響	
第一節	緒言	79
第二節	材料および方法	80
第三節	結果と考察	82
第四節	小括	88
第九章	総合考察	90
	要約	94
	引用文献	97
	謝辞	

略表記

1,25(OH) ₂ D	1,25-dihydroxycholecalciferol, or 1,25-dihydroxyvitamin D ₃ , 活性型ビタミン D
CP	crude protein, 粗蛋白質
DFA III	difructose anhydride III, ジフルクトース無水物 III
DFA IV	difructose anhydride IV, ジフルクトース無水物 IV
DM	dry matter, 乾物
HSD	honestly significant difference, Tukey の多重比較法
IgG	immunoglobulin G, 免疫グロブリン G
IUPAC	international union of pure and applied chemistry, 国際純正・応用化学連合
NEI	net energy for lactation, 泌乳のための正味エネルギー
NDF	neutral detergent fiber, 中性デタージェント繊維
PTH	parathyroid hormone, 副甲状腺ホルモン
TI	test interval, 検定日間隔法;産乳量推定の計算法.
TMR	total mixed ration, 混合飼料

第一章 序論

第一節 研究目的

北海道の乳牛の 305 日乳量を 1985 年と 2008 年で比較すると、平均乳量は 7,114 kg から 9,053 kg に、23 年間で 1,939 kg 増加した。一方、平均産次数は 3.2 産から 2.8 産に低下し、平均年齢も 4 歳 9 ヶ月から 4 歳 2 ヶ月に 7 ヶ月も短くなった ((社)家畜改良事業団, 牛群検定事業 2011)。乳量の増加は遺伝的改良と栄養・飼養管理の進歩により達成したものであろうが、産次と年齢の低下は様々な問題を提起している。米国ペンシルバニア州の調査結果であるが (Dechow と Goodling 2008), 2005 年の 1 年間で乳牛の 27.7%が死亡あるいは淘汰された。その理由の内訳は怪我その他 26.3%, 繁殖の問題 20.1%, 死亡 16.5%, 乳房炎 14.1%, 低乳量 7.1%, 蹄疾患 6.9%, 疾病 4.1%, 乳器の問題 2.6%, 不明 2.2%である。この資料で淘汰の時期を見ると、分娩 21 日前から分娩後 60 日に淘汰の 26.2%が集中し、死亡の 35.1%, 怪我その他の 29.9%は分娩後 60 日間に発生している。分娩から 1 週間が淘汰のピークであり、分娩牛のトラブルの改善と軽減が産次数、年齢の低下を食い止める一歩になる。

分娩時、淘汰に大きく関わる疾病は低カルシウム血症である。乳牛は分娩時に血中カルシウム濃度が低下する。特に 2 産以上の分娩牛の多くは低カルシウム血症の状態にあるが (NRC 2001), 症状は起立不能を伴い死亡することもある重篤な状態から、全く外観的な変化を伴わない軽微なものまで様々である。治療を受ける牛は分娩牛の約 5%であり (佐藤と村山 2004), カルシウム剤の静脈内投与で比較的容易に回復するため、問題は軽視されがちである。しかし、低カルシウム血症は多くの周産期疾病の発症に関与しており (Goff と Horst 1997b), 分娩牛の死亡と淘汰の大きな原因になっていると予想される。低カルシウム血症予防のために、給与飼料の陰陽イオン濃度の調節, ビタミン D の投与, カルシウム給与量の制限など (Horst ら 1997) が示されているが、陰陽イオン濃度の調節に使用する陰イオン塩

は嗜好性が悪く、ビタミン D は投与時期が限られ、カルシウム給与量は制限が困難であるなどそれぞれ問題と難点がある。

DFA III はフラクトースが 2 分子結合した難消化性糖類である。Suzuki ら (1998) がラットを使い初めて DFA III のカルシウム吸収亢進効果を報告したのは 1998 年で、乳牛を対象とした研究の開始は 2002 年である。DFA III は腸内微生物に分解されにくく (Tamura ら 2004)、カルシウム吸収は上皮細胞間隙からの亢進である (Mineo ら 2004) など、これまで乳牛で検討されたことのない作用を持ち、これらの特徴は、特異的に血中カルシウム濃度が低下する乳牛の低カルシウム血症に対して効果を持つ可能性が高いと考えられた。

DFA III の「難消化性」は高等動物の消化酵素に対するもので、多くのオリゴ糖が同じ機能を持っている。消化酵素で分解されず腸に到達する難消化性糖類の多くは、プレバイオテックとしてビフィズス菌や乳酸菌など善玉と呼ばれる腸内微生物に分解利用され、これら有用菌の増殖に効果を持つ。また、微生物に分解された難消化性糖類は、揮発性脂肪酸になり、腸内を酸性化し、ミネラルをイオン化する。ミネラルはイオンの形態で吸収されるので、ミネラルのイオン化によりミネラルの吸収量が増加する (佐久間 2002)。したがって、ヒトやラットでは多くのオリゴ糖がミネラル吸収を高める効果を持つ。しかし、乳牛は食道直下に微生物が棲息する第一胃を持っている。第一胃微生物による糖の分解速度は 75 ~ 350%/h (17 ~ 80 分で分解) とされ (Sniffen ら 1992)、難消化性糖類であっても第一胃微生物に分解される可能性は極めて高い。カルシウムは小腸以降で吸収されるため、オリゴ糖は小腸に到達しないとカルシウム吸収を亢進することはできない。同様に、DFA III が分娩牛の低カルシウム血症を改善するためには、第一胃微生物の分解を免れて小腸に到達することが必須の条件になる。そこで、DFA III が反芻動物である乳牛において、ラットやヒトと同じようにカルシウム吸収を亢進する可能性があるか検討するため、第二章では、第一胃微生物による DFA III の分解性を *in vitro* により調査した。

ウシの第一胃は巨大な発酵槽であり、飼料の多くはこの中に一定時間滞留し、微

生物による分解作用を受ける。また、第一胃から下部消化管への流出は様々な要因の影響を受ける (Russell ら 1992)。このため、乳牛において、ミネラル吸収に対する DFA III の効果は、第一胃微生物に分解されるかどうかだけでなく、摂取された DFA III の消化管内での動態と消長が大きく影響すると考えられる。DFA III は水に非常に溶解やすく (Kikuchi ら 2004)、ウシ消化管での挙動は液相に準じると考えられるが、第一胃からの流出と十二指腸への到達パターンなど、乳牛の消化管内における動態についての知見は十分ではない。そこで、第三章では、第一胃にフィステルと、十二指腸にカニューレを装着した非搾乳非妊娠牛を使用し、第一胃および十二指腸内容液の DFA III 濃度変化と、糞中の DFA III 濃度を調査した。また、血液中のミネラル濃度も調査し、DFA III のミネラル吸収に対する効果を検討した。

乳牛の分娩時低カルシウム血症はほとんどの牛が経験する特異的疾患であるが、誰でも実施でき効果の高い予防方法は確立・普及していない。DFA III のカルシウム吸収亢進効果はビタミン D が作用する細胞内通路からの吸収と異なり、細胞間通路からの吸収を活性化するもので、これまで牛に使用した経験はない。作用機構が副甲状腺ホルモンやビタミン D と違うため、副甲状腺ホルモンやビタミン D の効果に DFA III の効果を新たに加えることになり、低カルシウム血症改善により大きな効果もたらすことが予想される。さらに、DFA III は砂糖の半分の甘味であるため、嗜好性を考慮することなく乳牛に給与でき、加工が容易であるため、経口投与剤、飼料添加剤、配合飼料の原料など様々な形態で利用が可能である。低カルシウム血症に対する DFA III の給与効果を検討するために、第四章では分娩後に DFA III を経口投与し、分娩牛の血中カルシウム濃度回復に対する効果を予備調査した後、乾乳期の牛に DFA III を給与し、分娩時の血中カルシウム濃度低下に対する効果を調査した。

分娩時に低カルシウム血症になった牛の中には、低マグネシウム血症を併発している牛がいる。マグネシウムはカルシウムと同様 2 価の陽イオンであり、吸収の経路も細胞内と細胞間の二つある。ラットを使った試験で DFA III はマグネシウムの

吸収を亢進することが認められており(Mineo ら 2004), 乳牛において低カルシウム血症だけでなく、低マグネシウム血症の予防効果も期待できる。また、第四章で給与した乾乳後期の配合飼料はカルシウム含量の低い、カルシウム剤無添加の配合飼料を使用した。低カルシウム血症を予防する方法のひとつに、乾乳期にカルシウム給与量を制限し、カルシウム欠乏状態にして、副甲状腺ホルモンや活性型ビタミン D の分泌を刺激する方法がある。第四章で乾乳期に給与した配合飼料はこの方法に準じ、カルシウム含量の低い配合飼料を使用した。しかし、カルシウム吸収に対する DFA III の機能は濃度勾配による細胞間通路からの吸収亢進であり、カルシウム含量の低い配合飼料よりも、適切な、カルシウム含量の高い配合飼料の方が高い効果を持つ可能性があると考えられる。そこで、第五章では乾乳期において、酸化マグネシウムと DFA III の給与をカルシウム含量の高い配合飼料給与条件下で行い、分娩前後の血清カルシウムおよびマグネシウム濃度を調査し、低カルシウム血症と低マグネシウム血症に対する DFA III の効果を検討した。

乾乳後期の栄養管理を考慮し、第四章と第五章ではカルシウム含量の異なる 2 種類の配合飼料をそれぞれの乾乳後期に使用した。しかし、一般酪農家の飼養方法は様々であり、乾乳期を前期(乾乳から分娩予定 21 日前まで)と後期(分娩予定 20 日前から分娩まで)に分けることはできず、給与飼料を替えることもできないことは多い。いろいろな飼養条件下でも、酪農の現場で最大限 DFA III の効果を機能させる方法を検討することを目的とし、第六章では乾乳前期と後期に使用する配合飼料のカルシウム含量と、DFA III の給与を分娩後の経口投与も含め検討した。また一般の酪農家で DFA III 添加配合飼料の給与試験を行い、分娩前後に発生する周産期病に対する DFA III の効果も検討した。

乳牛は産乳能力向上により、乳に移行するミネラルが増加し、泌乳初期はミネラル不足の状態が続く(NRC 2001)。亜鉛、マンガン、銅、コバルトは体蛋白質や細胞蛋白質、酵素の構成ミネラルであり、吸収率が高いといわれるアミノ酸複合体の形で給与すると、産乳、乳房炎、蹄疾患、および繁殖が改善されたとの報告がある

(Nockels ら 1993 ; Nocek ら 2000 ; Uchida ら 2001). 牛で確認された DFA III のミネラル吸収亢進効果は第四章, 第五章で述べたカルシウムとマグネシウムであるが, ラットを使った試験では亜鉛 (Mineo ら, 2004) や鉄 (Asvarujanon ら, 2005) の吸収に対する効果も報告されており, 泌乳牛のミネラル不足を改善し, 乳生産と健康向上に効果を持つ可能性が考えられる. そこで, 第七章では乳生産, 体重, 血液成分, 乳房炎, 蹄疾患, および繁殖に対して DFA III はどのように影響し, どのような効果を持つ可能性があるかを検討するために, DFA III を泌乳牛に給与し, 調査を行った.

Sasaki ら (2003) はタイトジャンクションのひも状構造であるタイトジャンクションストランドを調査し, タンパク質など高分子の物質もタイトジャンクションを通過できる可能性を指摘した. また, Pansu ら (1983) は細胞間通路からのカルシウム吸収が若いラットほど高いことを報告し, 細胞間からの吸収抑制が出生後徐々に強化されることを示した. 出生子牛の免疫物質の吸収は, これまで上皮細胞の飲作用によるエンドサイトーシスであると説明されている. しかし, このようなタイトジャンクションの作用と, 細胞間通路からの吸収特性を考えると, 免疫物質の吸収をエンドサイトーシスだけに限定するべきではないように感じた. さらに, 免疫物質の吸収が出生後 24 時間から 36 時間と短時間で終了することと, 細胞間通路からの吸収が出生後徐々に抑制されるという結果の関連が, 免疫物質の吸収が細胞間通路からの吸収であることを強く暗示すると考えられた. DFA III の機能はタイトジャンクションに対する作用であり, 細胞内通路への効果は知られていないが, 第八章では, DFA III が出生子牛の免疫物質吸収に及ぼす影響を調査し, 免疫物質の吸収経路についても考察した.

本研究の基礎的概念を説明するために, 第二節では腸管からの吸収について, 細胞内通路と細胞間通路の違いを, 第三節では DFA III 研究の元々の出発点である食品としての DFA III とカルシウム吸収亢進効果について概説する.

第二節 腸管からの吸収;細胞内通路と細胞間通路

多細胞生物の表面を覆う上皮は、外界と体内を分ける一枚のシートとして機能し、上皮細胞同士が結合して形作られる。消化管の上皮は体内の恒常性を維持するために物質移動を制限しなければならず、また生命活動を維持するためには大量の栄養素を外界から吸収しなければならない。この矛盾する機能を解決する手段として、上皮細胞の細胞膜は主としてリン脂質の二重膜で構成され、大部分の分子やイオンの通過を制限し、必要な栄養素の吸収は膜を貫通する膜タンパク質で選択的に行っている。これら上皮細胞同士は密着結合 (tight junction)、接着結合 (adherence junction)、デスモゾーム結合 (desmosome junction)、およびギャップ結合 (gap junction) の4つの構造で結合する(石崎と丸山 2010)。密着結合は細胞間からの漏れを防ぐために機能し、この構造を作るタイトジャンクションタンパク質は上皮細胞同士をジッパーのように連続的につなぎ合わせ、物質移動を制限している(古瀬 2006)。

栄養素の吸収は、上皮細胞の中を通る細胞内通路 (Transcellular pathway) と、上皮細胞と上皮細胞の間を通る細胞間通路 (Paracellular pathway) の2つの経路で行われる (Bronner 1998) (Figure 1-1)。カルシウムを例にこれらの経路からの吸収について以下に概括する。

カルシウムなどミネラルはイオン化して吸収される。腸管にあるカルシウムイオンは濃度勾配により受動的に上皮細胞の刷子縁膜 (brush border membrane) を通過し、細胞内に取り込まれる(新木 1999)。取り込まれたカルシウムイオンは漿膜 (basolateral membrane) に向かって移動するが、この移動は活性型ビタミン D に産生を依存するカルシウム結合蛋白質 (Calbindin) が関与する(新木 1999)。ビタミン D がカルシウム吸収に影響する原因はこの点にある。上皮細胞内のカルシウム濃度は 10^{-6} M、血液は 10^{-3} M で負の濃度勾配にあるため、上皮細胞から血液への移動はアデノシン三リン酸 (ATP) のエネルギーを利用したカルシウムポンプによる能動輸送になる(新木 1999)。これが、細胞内通路を介したカルシウム吸収の機

序である。

細胞間通路からのカルシウム吸収は腸管内容液と血液間の濃度勾配による受動輸送である。この細胞間からの吸収について、NRC（2001）では Bronner の報告を引用し、「粘膜上の消化液のカルシウムイオン濃度が 6 mM を越えると、あらゆる部位の上皮細胞間から受動輸送が起こる」と記載している。また、細胞間からの吸収について「単胃動物では 50%に達するが、乳牛ではどの程度か知られていない。」とも書かれ、細胞間からの吸収がウシではまだ十分に研究されていないことを示唆している。

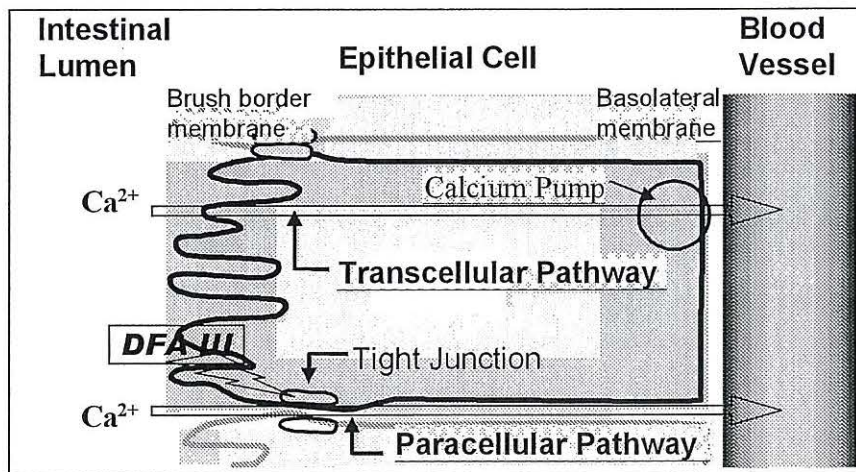


Figure 1-1 Calcium absorption via 2 pathways: the transcellular and paracellular pathways.

第三節 食品としての DFA III とカルシウム吸収亢進効果

DFA III は 1930 年代にはその存在が知られ (Jackson と McDonald 1931), 1980 年代に農林水産省 食品総合研究所 (現・独立行政法人食品総合研究所) で食品素材としてその機能性や製造方法の研究が始まった。北海道大学でチコリーの根から抽出された多糖類; イヌリンを原料に、効率よく DFA III を生産する方法 (Yokota ら 1991) が発見され、2004 年から日本甜菜製糖 (株) 清水バイオ工場で本

格的な工業生産が行われている。

DFA III の IUPAC 名は α -D-fructofuranose- β -D-fructofuranose-1,2':2,3'-dianhydride で、チコリーから抽出したイヌリンに *Arthrobacter* sp.由来のフラクトシルトランスフェラーゼを作用させ合成する (Kikuchi ら 2009)。2 個の D-フラクトースが 1,2' (β フラクトシド結合) と 2,3' (α フラクトシド結合) で環状に結合した糖類である (Figure 1-2)。多くのオリゴ糖や多糖において、糖と糖の間の結合は 1 カ所であるが、DFA III は 2 カ所で結合しており、非常に安定性が高い。DFA III の甘味度はショ糖の約半分で、ショ糖と同様良く水に溶けるものの、吸湿性は極めて低い (Kikuchi ら 2004)。酸性条件下でも熱に安定で、長期保存してもほとんど分解しない (Kikuchi ら 2004)。アミノ酸とのメイラード反応も起こりにくく、着色も生じない (Kikuchi ら 2004)。また、虫歯の原因菌であるミュータンス菌に資化されず (Kikuchi ら 2004)、DFA III を資化する腸内微生物は数種類報告されている (Minamida ら 2006) だけで、多くの微生物に対して安定である。これらの性質は食品素材として、加工や貯蔵に大きな利点を持っている。

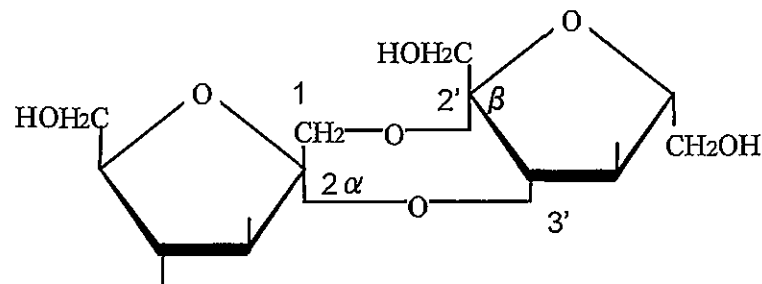


Figure 1-2 Structure of DFA III.

DFA III のカルシウム吸収亢進効果は 1998 年、Suzuki らによって初めて報告された (Suzuki ら 1998)。ラット腸管を用いた *in vitro* 試験の結果、カルシウム吸収が亢進される機構は DFA III がタイトジャンクションに作用し、細胞間通路からの吸収を活性化することによって生じ、この作用は小腸だけでなく、盲腸や結腸の上皮細

胞でも起きることが確認された (Mineo ら 2001)。DFA III は腸内微生物に分解されにくい糖類であるが、大腸内に棲息する一部の微生物によって分解される (Minamida ら 2006)。DFA III の分解により生成した短鎖脂肪酸は大腸内の pH を下げ、ミネラルのイオン化を高めるため、細胞内と細胞間、両通路からの吸収が増加する (佐久間 2002)。

タイトジャンクションに対する DFA III と同様の作用は、DFA IV、ラフィノース、フラクトオリゴ糖、マルチトール、メリビオースでも報告されている (Mineo ら 2001, 2002 ; Suzuki と Hara 2004)。また、多くの難消化性糖類は腸内微生物に分解され、腸管内の pH を低下させる (佐久間 2002)。これらの点で、DFA III だけがミネラル吸収を亢進する糖類ではない。しかし、タイトジャンクションに対する作用は強く、分解する微生物が少ないためその効果は長く持続し、ミネラル吸収により大きく作用すると考えられる。

第二章 第一胃微生物による Difructose Anhydride III の分解性

[本章の内容は日本畜産学会報, 77, 395-399 (2006)に掲載済みである]

第一節 緒言

乳牛のほとんどは分娩時に低カルシウム血症を経験する。また、分娩前後に発生する起立不能やケトーシス、第四胃変位、胎盤停滞、難産など多くの疾病に低カルシウム血症は関与しており (Correa ら 1993 ; Goff と Horst 1997b ; Shaver 1997), 乳生産の減少 (Rajala ら 1999) も含め経済的損失は大きい。このため、低カルシウム血症の改善策として、分娩前のカルシウム給与量の制限、ビタミン D の投与、飼料中の陰・陽イオン塩の調整、およびカリウム摂取量の制限などが取られている (Horst ら 1997) が、その効果は十分に上がっていない。

ヒトにおいて難消化性糖類の多くはプレバイオティクスとしてビフィズス菌や乳酸菌などの有用菌を増やし、健康改善に有効である (Gibson 1999)。さらに、最近では小腸以降でカルシウム吸収を促進していることが報告されている (Ohta ら 1998 ; Greger 1999 ; Mineo ら 2001)。この作用は主に難消化性糖類が腸内微生物により分解される際に産生される酢酸や酪酸など短鎖脂肪酸と、短鎖脂肪酸による腸管内の pH 低下が関与している (Younes ら 1996) と考えられている。しかし、Suzuki と Hara (2004) は、難消化性糖類である DFA III, DFA IV, フラクトオリゴ糖, マルチトールが腸内微生物による分解作用を受けずに直接ラットの腸上皮細胞に作用し、カルシウム吸収を促進していることを示した。

腸管におけるカルシウム吸収の経路は、上皮細胞内を通る細胞内通路と上皮細胞間隙の細胞間通路がある (Bronner 1998)。上皮細胞内を通るカルシウムの吸収は活性型ビタミン D が関与する。活性型ビタミン D はビタミン D 受容体と結合し、カルシウム結合タンパク質合成の促進により腸管からのカルシウム吸収を高めるが、加齢に伴いビタミン D 受容体は減少し、血中カルシウム濃度の維持が困難になる (Goff ら 1991)。一方、直接カルシウム吸収を促進する難消化性糖類は上皮細

胞間にあるタイトジャンクションに作用し、細胞間通路からカルシウムの吸収を高めると考えられている (Mineo ら 2002)。このような難消化性糖類が乳牛の第一胃微生物によっても分解されないならば、ビタミン D 受容体減少の影響を受けずに腸管のカルシウム吸収を促進する可能性が高い。

DFA III のカルシウム吸収亢進効果 (Mineo ら 2002 ; Mitamura ら 2002 ; Shiga ら 2003) は微生物を介さずに発現し、一般的な難消化性糖類と異なり腸内微生物には分解されにくい (Tamura ら 2004) ことから、第一胃微生物による分解を受けにくい可能性が高くウシへの応用が期待される。

本試験の目的は、第一胃微生物による DFA III の分解性を調査し、カルシウム吸収促進物質として乳牛への利用の可能性を検討することにある。そこで、*in vitro* 培養により、試験 1 では DFA III と難消化性のラフィノース、ラクツロース、および代表的な易消化性の糖であるスクロースを使用し、分解性を比較した。また、試験 2 では DFA III で馴致した泌乳牛の第一胃内容液を用い、DFA III の分解性をさらに検討した。

第二節 材料および方法

試験 1 は、試料として難消化性糖類の DFA III (日本甜菜製糖㈱, 東京)、ラフィノース (和光純薬工業㈱, 大阪) およびラクツロース (和光純薬工業㈱) と、比較のために易消化性糖類のスクロース (和光純薬工業㈱) を使用した。

第一胃内容液は 7 時と 16 時に各々 2 kg の泌乳牛用配合飼料 (イースター 18F, 日本甜菜製糖㈱; DM 88.0%, CP 21.4%, NEI 1.94 Mcal/kg, NDF 17.0%) と、チモシー乾草 (出穂期) を自由摂取している第一胃カニューレ装着ホルスタイン種去勢牛 (体重 720 kg, 6 歳) から午前 9 時に採取し、4 重ガーゼで濾過した。

培養方法は Mitchell ら (1979) の方法に準じ、0.25 M リン酸緩衝液 (0.25 M K_2PO_4 と 0.25 M $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ を約 61 : 39 の容量比で混合, pH 7.0) を使用し、この緩衝液 1 リットル当たり 1 種類の糖を 20 g 添加した。200 mL 容三角フ

ラスコに調整した第一胃内容液 30 mL, 糖を添加した緩衝液 20 mL を加え, 炭酸ガスで内部の空気を置換した後, プンゼンバルブを付けたゴム栓で栓をし, 39 °C で培養した. なお, 第一胃内容液と緩衝液を混合した培養液 1 リットル当たりの糖添加量は 8 g であり, 短鎖脂肪酸の変化を確認するために糖無添加の緩衝液を加え, 同様の方法で培養した区も設けた.

予備調査の結果に加え, DFA III は可溶性で第一胃内滞留時間は液相に準じると考えられることから培養時間は 24 時間とした. 培養開始後 1, 2, 4, 6, 8, 12 および 24 時間目に各試料フラスコを回収した. 直ちに培養液を 20 mL 分取し, 20%スルホサリチル酸溶液で除タンパクした. その後, 8,000 rpm/min で 10 分間遠心し, その上澄み液を各糖分析のために採取した. また, 残りの培養液は pH 測定後, 短鎖脂肪酸分析に供した. これらの液はいずれも 0.45 μ m 孔径の濾紙で濾過し, 分析まで -30 °C で保存した.

試験 2 は, 試験 1 と同一条件で飼養した第一胃カニューレ装着ホルスタイン種去勢牛から得た第一胃内容液の他に, DFA III を 6 時および 15 時の 1 日 2 回, 各 25 g を 10 日間給与したホルスタイン種泌乳牛 3 頭(分娩後 123 ~ 156 日, 日乳量 28 ~ 35 kg, 体重 630 ~ 654 kg, 2 ~ 3 産)から 9 時に胃汁採取器(富士平工業(株), 東京)を用いて採取した第一胃内容液により DFA III の分解性を調査した. 泌乳牛への給与飼料は乾物比でグラスサイレージ 21.1%, コーンサイレージ 18.4%, アルファルファ乾草 8.8%, 泌乳牛用配合飼料 42.6%, ビートパルプ 8.6%, ビタミン・ミネラル剤 0.5% からなる TMR (DM 46.6%, CP 16.5%, NEI 1.51 Mcal/kg, NDF 37.3%) を使用し, 自由採食とした.

DFA III の添加量は緩衝液 1 リットル当たり 10 g (培養液 1 リットル当たり 4 g) とし, その他は試験 1 の培養方法と同様に行った.

糖と短鎖脂肪酸の分析には高速液体クロマトグラフを使用した. 糖は示差屈折率検出器(昭和電工(株), 東京)により, カラム; Shodex SUGAR KS-801, カラムオーブン; 80 °C, 溶離液; 1/20000 N NaOH, 流速; 1 mL/min の条件で分析した. 短鎖脂

肪酸は pH 緩衝化ポストカラム電気伝導度検出法による有機酸分析システム(株島津製作所, 京都)により, カラム; Shim-pack SCR-102H, カラムオーブン; 45 °C, 移動相; 5 mM p-トルエンスルホン酸水溶液, 移動相流速; 0.8 mL/min, 緩衝液; 5 mM p-トルエンスルホン酸および 100 μM エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムを含む 20 mM Bis-tris 水溶液, 緩衝液流速; 0.8 mL/min の条件で分析した.

試験 1 および 2 のホルスタイン種去勢牛と泌乳牛を使用した培養試験はそれぞれ 3 回反復した. データは JMP 4.0.5J (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を使用して解析を行った. 各糖の分解率と培養時間から一次回帰式を求め, その傾きを 1 時間当たりの分解率とした. 培養液の pH および短鎖脂肪酸の値は一元配置法で有意差を検定した後, 各糖間の平均値を Tukey の方法により多重比較した. なお, 値は平均 ± 標準誤差で示した.

第三節 結果と考察

試験 1 において, 各糖の 24 時間目の分解率は DFA III 0%, ラフィノース 100%, ラクトロース 61%およびスクロース 100%であり, ラフィノースとスクロースはそれぞれ培養後 12 時間と 4 時間でほぼ全量が分解された. 培養時間と分解率の回帰式から得られた各糖の 1 時間当たりの分解率は DFA III 0.0 ± 0.0%, ラフィノース 12.6 ± 0.6%, ラクトロース 2.7 ± 0.1%およびスクロース 24.6 ± 0.8%であり (Figure 2-1), 24 時間の培養で DFA III は全く分解されなかった.

DFA III で 10 日間馴致した乳牛の第一胃内容液からは平均 0.01 g/L の DFA III が検出された. この第一胃内容液を使用した試験 2 において, 約 4 g/L 添加した DFA III のほぼ全量が 24 時間の培養後に回収され (Figure 2-2), DFA III は飼養条件の異なるウシの第一胃においても分解されにくく安定していると考えられた.

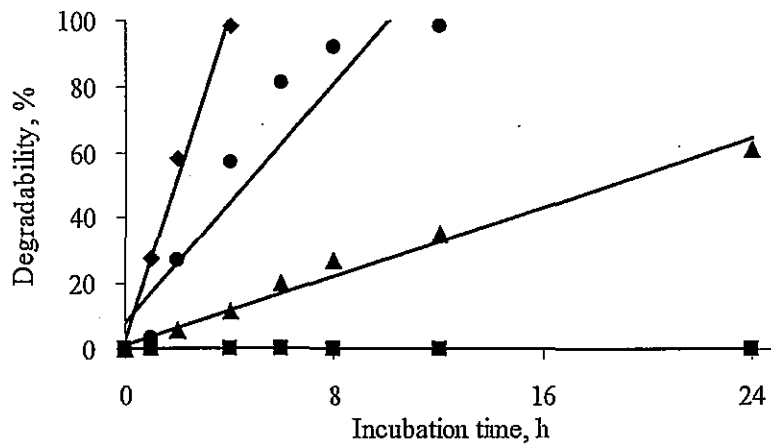


Figure 2-1 Relationships between incubation time and the degradability of DFA III (■), raffinose (●), lactulose (▲) and sucrose (◆). Regression equations of the degradability of DFA III ($Y_{DFA\ III}$), raffinose ($Y_{raffinose}$), lactulose ($Y_{lactulose}$) and sucrose ($Y_{sucrose}$) on incubation time (X) were as follows ; $Y_{DFA\ III}=0.0 (\pm 0.0) X - 0.3 (\pm 0.2)$; $Y_{raffinose}=12.6 (\pm 0.6) X - 0.7 (\pm 2.8)$; $Y_{lactulose}=2.7 (\pm 0.1) X + 1.0 (\pm 1.1)$; $Y_{sucrose}=24.6 (\pm 0.8)X + 2.9 (\pm 1.8)$.

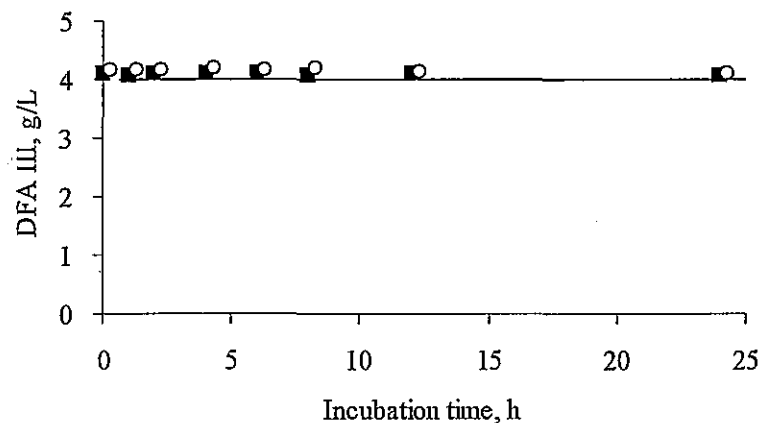


Figure 2-2 The concentration of DFA III in the culture solution using inocula from the steer (■) fed timothy hay and a concentrate and cows (○) fed a TMR including grass silage, corn silage, alfalfa hay and a concentrate.

DFA III は Figure 2-3 に示すように、2 個の D-フラクトースが 1,2' (β フラクトシド結合) と 2,3' (α フラクトシド結合) 部分で結合している。Sakurai ら (1996) は DFA

III の分解について、まず DFA III 加水分解酵素によって α フラクトシド結合が分解され、イヌロビオースに変化した後、 β フラクトフラノシダーゼにより β フラクトシド結合が分解されると述べている。このため、DFA III 加水分解酵素がなければ、 β フラクトフラノシダーゼがあっても DFA III の分解反応は進行しない。さらに、DFA III 加水分解酵素を生産する微生物は *Arthrobacter* sp. で報告されている (Sakurai ら 1996) もの、 α フラクトシド結合を持つ物質が自然界に少ないため、第一胃内の常在菌の中には DFA III を利用する菌が存在しないことも予想される。ヒトにおいて、Tamura ら (2004) は DFA III を摂取したヒトの呼気中水素濃度を測定し、DFA III は腸内微生物による発酵をうけにくいことを報告している。

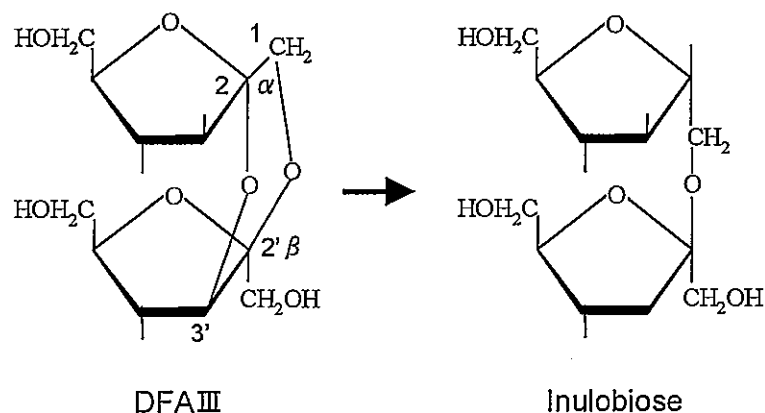


Figure 2-3 The structure of DFA III and inulobiose. Inulobiose is an intermediate product of DFA III.

試験 1 における培養後 24 時間目の各糖添加培養液の性状と、糖無添加培養液の培養前と 24 時間培養後の性状を Table 2-1 に示した。微生物による飼料の分解は、培養液に含まれる易発酵性炭水化物の影響を受ける可能性がある。糖無添加培養液において、0 時間目の培養液中短鎖脂肪酸含量は酢酸 50.8 ± 0.1 mmol/L、プロピオン酸 13.8 ± 0.0 mmol/L および酪酸 9.5 ± 0.1 mmol/L で、培養 24 時間目の値と差はなく、添加した糖の分解に影響するような易発酵性の物質が

存在した可能性はなかったものと考えられる。

DFA III の培養液は他の糖添加培養液と比較し、pH 値が 6.5 と最も高く、乳酸は検出されず、酢酸、プロピオン酸および酪酸含量は最小であった。これらの値は糖無添加の培養液とほぼ同じであり、培養液の性状からも DFA III が第一胃微生物による発酵作用を受けず安定していることが示された。一方、ラフィノースは pH 値 5.7 ± 0.0, 乳酸 29.5 ± 0.2 mmol/L, 酢酸 65.6 ± 0.5 mmol/L, プロピオン酸 25.7 ± 0.3 mmol/L および酪酸 12.5 ± 0.2 mmol/L でスクロースの培養液性状と近似しており、ラクツロースの培養液性状はこれらのほぼ中間的な値を示した。

Table 2-1 The pH and short chain fatty acids concentrations in the buffered ruminal fluid with various sugars added after 24-hr incubation and in the buffers with no sugar added before and after 24-hr incubation (trial 1)

	DFA III	Raffinose	Lactulose	Sucrose	No sugar added		SE	P
					Before incubation	After 24-h incubation		
pH	6.5 ^b	5.7 ^d	6.1 ^c	5.5 ^e	6.6 ^a	6.5 ^b	0.0	0.001
Short chain fatty acids, mmol/L								
Lactate	0.0 ^c	29.5 ^a	1.4 ^b	29.1 ^a	0.0 ^c	0.0 ^c	0.1	0.001
Acetate	50.1 ^b	65.6 ^a	65.3 ^a	65.9 ^a	50.8 ^b	49.6 ^b	0.2	0.001
Propionate	13.3 ^d	25.7 ^c	27.4 ^b	29.2 ^a	13.8 ^d	13.4 ^d	0.1	0.001
Butyrate	9.5 ^b	12.5 ^a	12.8 ^a	12.6 ^a	9.5 ^b	9.4 ^b	0.1	0.001

^{a-e} Values in a same row with different superscripts are significantly different at $P < 0.05$.

反芻動物において、飼料中の糖類のほとんどは第一胃微生物によって分解されると考えられており、Sniffen ら (1992) が示した糖・短鎖脂肪酸画分の分解速度は 75 ~ 350%/h と非常に高い値である。本試験で得られた糖の 1 時間当たり分解率はいずれもこの値より低い。スクロースは最も分解されやすく、次いでラフィノース、ラクツロースの順であり、DFA III は全く分解されず、糖の種類により大きな違いが認められた。さらに、培養液中の短鎖脂肪酸においてもラフィノースはスクロース

に類似した酸の生成を示し、特に乳酸を多量に産生したが、ラクツロース添加による乳酸生成量は僅かであった。ラフィノースやラクツロースはヒトの腸内微生物の中で主にビフィズス菌や乳酸菌などによく利用されるが、細菌の種類によって糖の利用性は異なることが光岡(2002)により示されており、この違いが本試験での糖の分解性や短鎖脂肪酸生成量の違いになったと考えられる。

以上より、DFA III は第一胃微生物による分解性が極めて低く、第一胃をバイパスし腸管まで到達する可能性が高いと考えられた。

第四節 小括

乳牛への DFA III 利用を検討するため、第一胃微生物による分解性を *in vitro* 培養により調査した。試験 1 は DFA III と他に 3 種類の糖をホルスタイン種去勢牛の第一胃内容液を用いて 24 時間培養し、分解率を測定した。試験 2 は DFA III で馴致したホルスタイン種泌乳牛の第一胃内容液により、DFA III の分解性を調査した。DFA III は試験 1 および 2 のいずれにおいても分解されなかった。試験 1 で合わせて調査したラフィノース、ラクツロースおよびスクロースの 24 時間培養後の分解率は各々 100、61 および 100%であった。DFA III を 24 時間培養した培養液の pH および短鎖脂肪酸の性状は糖無添加のものと差はなく、短鎖脂肪酸の各成分含量は他の 3 種類の糖を添加した培養液よりも低い値であった。

第三章 乳牛の消化管における Difructose Anhydride III の動態と血中ミネラルの変化

第一節 緒言

DFA III は腸管からのミネラル、特にカルシウム吸収を亢進する。この機能は DFA III が腸管に到達し、上皮細胞同士を結合しているタイトジャンクションに作用することにより生じる上皮細胞間隙からの吸収の増加である。DFA III はほ乳類の消化酵素では分解されない難消化性のオリゴ糖であり (Saito と Tomita 2000)、さらに、主要な腸内微生物にも分解されにくい (Tamura ら 2004) とうい特徴を持つ。第二章の牛の第一胃内容液を用いた *in vitro* 試験においても、DFA III は第一胃微生物に分解されにくいことが示され、十二指腸にカニューレを装着した去勢牛による *in vivo* 試験では、DFA III が十二指腸に到達していることが確認されている (中井ら 2007)。これらにより、DFA III はヒトやラットと同様、ウシの腸管からのミネラル吸収を高める可能性が示唆された。

ミネラル吸収に対する DFA III の効果は、摂取された DFA III の消化管内での消長とその動態が大きく影響すると考えられる。ウシの第一胃は巨大な発酵槽であり、飼料の多くはこの中に一定時間滞留し、微生物による分解作用を受ける。また、第一胃から下部消化管への流出量や速度は飼料の形状 (固体か液体か)、粒度 (大きさ)、飼料採食量や飲水量、微生物による分解のされやすさなど、様々な要因の影響を受ける (Russell ら 1992)。DFA III は水に非常に溶けやすく (Kikuchi ら 2004)、第一胃での挙動は液相に準じると考えられるが、第一胃からの流出と十二指腸への到達パターンなど、乳牛の消化管内における動態についての知見は十分ではない。

そこで、第一胃にフイステルと、十二指腸にカニューレを装着した非搾乳非妊娠牛を使用し、第一胃および十二指腸内容液の DFA III 濃度変化と、糞中の DFA III 濃度を調査した。また、血液中のミネラル濃度も調査し、DFA III のミネラル吸収に対

する効果を検討した。

なお、本試験には 3 頭の牛を準備したが、内 1 頭は試験直前に十二指腸カニューレを破損し、また、第一胃フィステル装着の左腹を下に横臥し、第一胃内容液を大量に流失するなど問題があった。従って、この章は基礎試験として重要なテーマであるが、その内容は参考資料として利用願いたい。

第二節 材料および方法

日本甜菜製糖株式会社総合研究所附属清川農場で使用されている第一胃フィステルおよび十二指腸カニューレを装着した非妊娠非搾乳牛を 3 頭供試したが、内 1 頭は試験直前に十二指腸カニューレを破損したため、十二指腸内容液の採取は 2 頭から行った。試験期間中の飼料は、Table 3-1 に示した TMR および乾草を使用し、試験 15 日前からそれぞれ原物で 27.6 kg および 2.5 kg を 6 : 30 と 16 : 30 に半量ずつ給与した。DFA III (日本甜菜製糖(株), 東京) 0, 50 および 100 g に、それぞれ消化管内容物液相の指標物質としてエチレンジアミン四酢酸二ナトリウムコバルト四水和物 (CoEDTA, キシダ化学(株), 大阪) を 24 g

Table 3-1 Ingredient and chemical composition of the TMR and hay

	TMR	Hay
Ingredient composition of the TMR, % of DM		
Grass silage	60.4	
Corn silage	25.6	
Flake Corn	8.6	
Soybean meal	5.4	
Chemical composition		
Dry matter, %	41.4	84.8
Crude Protein, DM%	12.2	11.0
NDF, DM%	43.4	74.1
Ash, DM%	9.0	5.8
Calcium, DM%	0.51	0.24
Phosphorus, DM%	0.31	0.29
Magnesium, DM%	0.20	0.23
Potassium, DM%	1.72	1.99
Sodium, DM%	0.12	0.10
Feed weight, kgDM	11.43	2.12

(Coとして 3.0 g) 加え、イオン交換水で全量 500 mL とした溶液を使用した。試験は 2 日間を 1 期とする 3 × 3 のラテン方格法で行った。試験 1 日目は 6 : 00 に第一胃および十二指腸内容液、直腸糞の採取と採血を行い、DFA III 投与 0 時の値と

した。6:30にDFA IIIおよびコバルト混合溶液 500 mLを第一胃フィステルから投与し、TMRと乾草を給与した。なお、消化管内容物固相の消化管内動態を調べるために、1期第一日目の6:10に指標物質として塩化イッテルビウム(III)六水和物(純正化学㈱, 東京)を20 g (Ybとして8.9 g)混合した500 gのグラスサイレージを給与し、6:30に食べ残したイッテルビウム混合グラスサイレージ全量を第一胃フィステルから投与した。第一胃および十二指腸内容液、直腸糞の採取と採血はDFA III投与後1(7:30)、3(9:30)、6(12:30)、9(15:30)、12(18:30)および24時間目(翌朝6:30)に行い、採糞だけは36時間目も行った。

第一胃内容液は第一胃の3箇所(第二胃側、腹囊、背囊)から合わせて100 mL採取し、4重のガーゼでろ過、6 M塩酸を加えて、-30℃凍結保存した。十二指腸内容液は100 mL採取し-30℃凍結保存した。これら第一胃および十二指腸内容液は融解し4℃で14,400 rpm、20分間遠心、得た上澄みをミネラル、DFA III分析試料とした。血液は尾根部から10 mL容真空採血管で採取し、30分静置後、3,500 rpmで10分間遠心した。得られた血清はミネラル、DFA III分析試料として-30℃凍結保存した。直腸糞200 gを55℃で予乾、粉碎しミネラル、DFA III分析試料とした。

ミネラル分析の前処理はグラファイトブロック酸分解システム(㈱アクタック, 東京)で酸循環分解容器を使用し、加熱温度230℃、硝酸により湿式分解した。この分解液を高周波誘導結合型プラズマ発光分析装置(ICPE-9000, ㈱島津製作所, 京都)で分析した。DFA IIIは各試料を20%スルホサリチル酸溶液で徐タンパク、8,500 rpmで遠心し、その上澄みをHPLC(示唆屈折率検出器(Shodex RI SE-61; 昭和電工㈱, 東京)、カラム(Shodex SUGAR KS-801; 昭和電工㈱)、カラムオープン80℃、溶離液1/20000 N NaOH、流速1 mL/min)で分析した。

エチレンジアミン四酢酸二ナトリウムコバルト四水和物は消化管におけるDFA IIIの挙動を検討し、第一胃からの流出速度を測定するマーカーとして投与したが、コバルト、DFA III濃度は個体間、処理間での変動が大きかったため、DFA IIIの流出

速度の推定は行わなかった。

血液成分は、本試験の後、給与飼料だけを替え同じ内容で実施した2つの試験；濃厚飼料主体とした試験（乾物でグラスサイレージ；29.1%，コーンサイレージ；12.3%，圧片トウモロコシ；49.8%および大豆粕；8.7%）と、乾草（原物で6 kg）と配合飼料（2 kg）を給与した試験のデータを加え、血液成分の変化を検討した。

第三節 結果と考察

消化管内液相の指標物質として投与したコバルトの第一胃および十二指腸内容液と糞中の濃度を Figure 3-1 に示した。第一胃内容液のコバルト濃度から求めた液相の第一胃通過速度は1時間当たり 0.193 ± 0.035 （DFA III 投与量 0 g； 0.157 ± 0.037 ，50 g； 0.293 ± 0.075 ，100 g； 0.130 ± 0.015 ）で、この値は Koenig（2002）らが報告した値；0.136 よりも速い。Koenig が使用した牛は搾乳牛で、乾物摂取量は 20 kg である。本試験の乾物給与量 13.5 kg より採食量は多く、飼料の第一胃通過速度は速いと考えられる（Sniffen ら 1992）が、液相が移動する速度は採食量の影響をあまり受けないのかもしれない。十二指腸内容液中のコバルトは1時間目に出現し、3時間目には最大になり、その後減少し、48時間目に

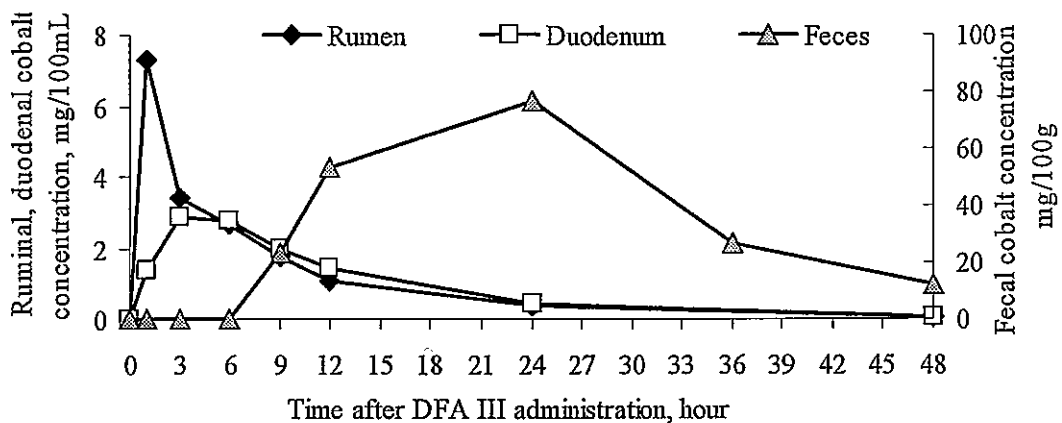


Figure 3-1 Ruminal (◆), duodenal(□), and fecal(▲) cobalt concentrations following CoEDTA administration.

はほぼすべてが十二指腸を通過した。糞中では 9 時間目に出現し、24 時間目に最大になり、48 時間目で検出される量は少なく、液相部分のほとんどは 48 時間で消化管から排泄された。

イッテルビウムは十二指腸に 1 時間後に出現し、濃度のピークは 9 時間後、54 時間後まで検出でき、糞中では 9 時間後に出現し、ピークは 24 時間後、132 時間後でも検出された。

DFA III を 100 g 投与した牛の第一胃および十二指腸内容液と糞中の DFA III 濃度を Figure 3-2 に示した。第一胃内容液中の DFA III 濃度は投与 1 時間後 135 mg/100mL で、その後漸減しながら投与 9 時間後に 2.5 mg/100mL になり、12 時間後は検出できなかった。また、十二指腸内容液中の DFA III 濃度は投与後 1 時間目に 37 mg/100mL で、3 時間目に 76 mg/100mL のピークに達した後漸減し、6 時間後 52 mg/100mL、9 時間後 15 mg/100mL で 12 時間後には検出できなかった。糞中には 9 時間後と 12 時間後にそれぞれ 9 および 18 mg/100g の DFA III を検出した。これら DFA III の各消化管部位の出現と濃度パターンはコバルトの変化に近似しており、DFA III は消化管で液相とほぼ同じく移動するものと考えられた。

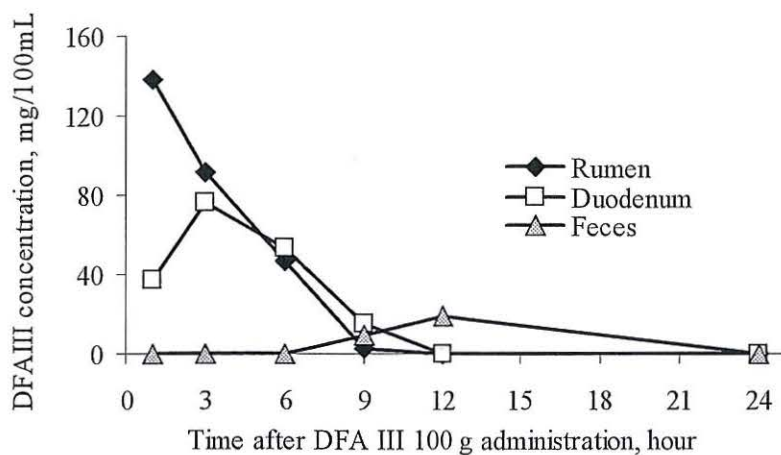


Figure 3-2 Ruminal (◆), duodenal(□), and fecal(▲) DFA III concentrations following DFA III 100 g administration.

牛が摂取した DFA III が十二指腸に出現するまでの時間は(中井ら 2007), 本試験の第一胃からの投与とほとんど違いはない. このことと, 十二指腸内容液と糞中の DFA III 出現パターンから, DFA III は摂取後, 腸管に少なくとも 12 時間程度存在したと考えられる. Mineo ら(2001)は DFA III のカルシウム吸収に対する影響を腸管の部位(空腸, 回腸, 盲腸, 結腸)別に, DFA III 濃度とカルシウム吸収の関係を示し, 部位によって DFA III のカルシウム吸収に対する効果が異なることを示した. また, DFA III の濃度は対数変換して示し, 0.1 mmol/L (\approx 3.2 mg/100mL)と比較的低い濃度であってもカルシウム吸収が亢進することを示した. これらの結果はラット腸管を使った *in vitro* 試験によるものであるが, ウシにおいても DFA III は腸管の広い範囲で作用し, 1 回の投与で約 12 時間程度その効果が持続する可能性があると考えられた.

第二章の *in vitro* 試験で, DFA III は第一胃微生物による 24 時間の培養でも分解されなかった. 一方, Minamida ら(2006)は腸内微生物の中で DFA III を分解する菌として *Ruminococcus* sp. を報告している. 本試験では糞中の DFA III 濃度がコバルト濃度と比較し大きく減少しており, 投与後 24 時間以降で検出されないことから, DFA III はウシの腸内微生物によって分解されているものと考えられる. しかし, 腸管内で分解された DFA III は揮発性脂肪酸を産生し, それによる酸性化によりミネラルをイオン化してミネラルの吸収を高める(Mineo ら 2002 ; Mitamura ら 2002). このように, DFA III はタイトジャンクションへの作用と, イオン化による作用, 二つの作用でミネラル吸収を高めると考えられる.

中井ら(2007)はホルスタイン種去勢牛に DFA III を 42 g 給与し, 2 時間目に十二指腸内容液中の濃度が最大; 20 mg/100mL になり, 6 時間目まで検出できたことを報告している. 本試験で十二指腸内容液中の DFA III 濃度のピークは 3 時間目である. 中井の試験では 4 時間目に 2 時間目より大きく DFA III 濃度が低下していることから, 本試験の結果と合わせて考えると, 実際のピークは 1 ~ 3 時間目の間にあると考えられる. Figure 3-3 に中井ら(2007)が行った 42 g にほぼ近い, DFA

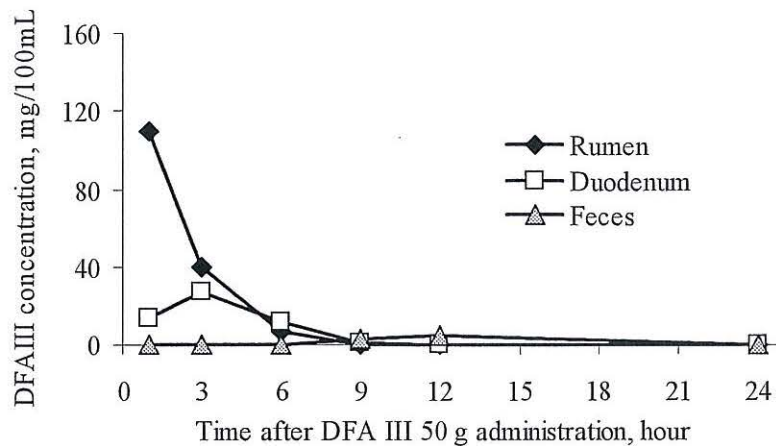


Figure 3-3 Ruminal (◆), duodenal(□), and fecal(▲) DFA III concentrations following DFA III 50 g administration.

III 50 g 投与の第一胃および十二指腸内容液と糞中の DFA III 濃度の推移を示した。十二指腸内容液中の DFA III 濃度は、3 時間目に最大; 27 mg/100mL になり、9 時間目まで検出でき、また、中井が検出できなかった糞中の DFA III も、9 および 12 時間目に検出し、これらの検出パターンは DFA III 100 g 投与と同様であった。

血液中のミネラル濃度を検討した本試験を含めた三つの試験は、供試牛をミネラル不足の状態にするため、試験飼料以外、ミネラル剤の給与を行わなかった。しかし、DFA III 投与前の血中ミネラル濃度はほぼ正常であり、DFA III 投与による影響はそれぞれの試験では明確にみられなかった。本来であれば個々の試験で結果を論じるべきであるが、DFA III の可能性と今後行われるかもしれない試験の参考のために、これら 3 つの試験の血液データを合わせて Figure 3-4 を作成した。

DFA III 投与後の時間に換算すると、飼料の給与時間は 0 時と 10 時の 2 回である。DFA III の投与は 0 時の 1 回だけであり、十二指腸への到達は 3 時間後がピークで、12 時間後までは消化管内に存在すると考えられる。しかし、2 回目の飼料給与時に存在する DFA III は直腸に近づいており、2 回目に給与した飼料のミネラル吸収に DFA III はほとんど影響しないと考えられる。

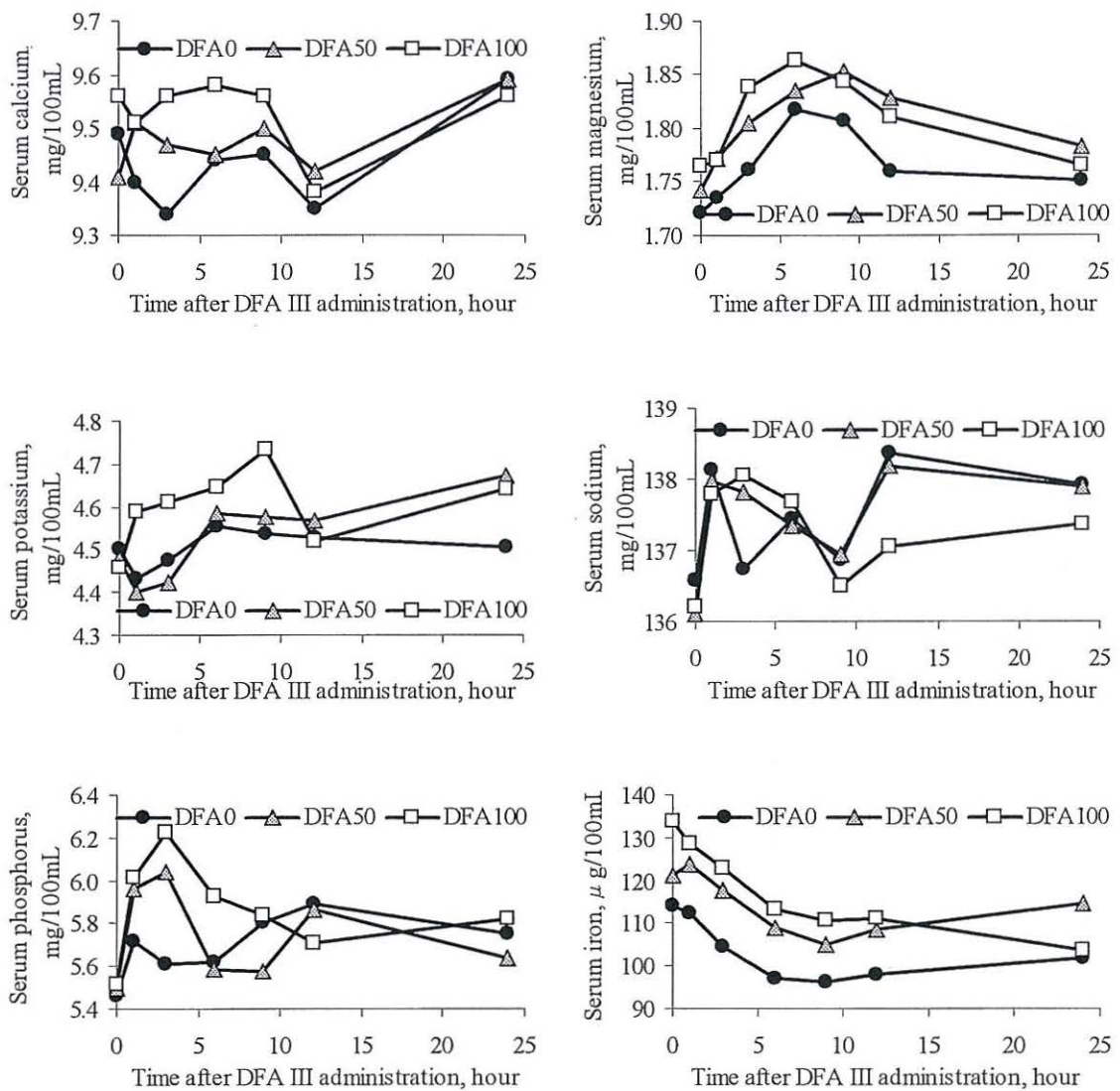


Figure 3-4 Serum calcium, magnesium, potassium, sodium, phosphorus, and iron response to 0 (●), 50 (▲), and 100 (□) g of DFA III administrations in dry cows.

血清カルシウムおよびマグネシウム濃度は DFA III 投与約 3 時間後から高くなり、DFA III 投与量が多いほど高くなる傾向がみられた。この変化は DFA III の動態にやや対応しており、DFA III がこれらのミネラルの吸収を亢進している可能性が推察された。ラットの腸管を使用した *in vitro* の試験で、カルシウムとマグネシウムは DFA III により吸収亢進されることが報告されている (Mineo ら 2004)。また、乳牛

において、乾乳期に DFA III を給与すると分娩時の血中カルシウム濃度が高く維持されること(第四章)、乾乳期に DFA III と酸化マグネシウムを合わせて給与すると分娩時に血中マグネシウム濃度の一時的な上昇がみられること(第五章)などの結果も、乳牛に対する DFA III のカルシウムおよびマグネシウム吸収効果を示唆している。これまで、リンに対する DFA III の効果は報告されていないが、ここに示した6種類のミネラルの中で、リンは最も DFA III の変化に追従し、DFA III 投与量との関係にも対応していた。乳牛での試験では、乾乳期の採血は1日1回であり、分娩後も分娩直後、6時間後、24時間後で、DFA III 投与と血液の日変化は確認していない。DFA III の効果がなくなると考えられる12および24時間後にリン濃度は各処理ほぼ同じ値になっており、DFA III 投与による血中リンに対する効果は長く続かず、そのため効果が確認できていないのかもしれない。DFA III は鉄の吸収に効果があると報告されている(Asvarujanon ら 2005)が、その効果は明確ではなかった。また、カリウムとナトリウムは血液の浸透圧に関係する重要なミネラルであるが、これらの吸収に対する効果も認められなかった。

第四節 小括

ウシの消化管内における DFA III の動態とミネラル吸収の関係を検討するために、第一胃フィステルと十二指腸カニューレを装着した乳牛を使用し、調査を行った。その結果、DFA III は消化管の液相とほぼ同じように移動し、十二指腸に投与1時間後には出現し、3時間後に十二指腸内容液中の DFA III 濃度は最大に達した。その後減少し、12時間後には検出しなかったが、糞中には9および12時間後に検出された。これらから、DFA III はウシの消化管内に12時間以上とどまり、タイトジャンクションに対する作用と、腸内微生物の発酵によるミネラルのイオン化によってミネラル吸収を亢進すると考えられた。また、DFA III の動態に関連し、吸収促進が予想されるミネラルはカルシウム、マグネシウムおよびリンであった。

第四章 Difructose Anhydride III の給与が分娩牛の血清カルシウム濃度に及ぼす影響

[本章の内容は日本畜産学会報, 78, 37-43 (2007)に掲載済みである]

第一節 緒言

乳牛の血中カルシウム濃度は通常 9 ~ 11 mg/100mL に維持されているが、分娩時は低下し低カルシウム血症を呈することが多い。低カルシウム血症はカルシウム剤の静脈内投与で多くの場合回復するが、予防としては分娩前のカルシウム給与量の制限、ビタミン D の投与、飼料中の陰・陽イオン塩の調整およびカリウム摂取量の制限など (Horst ら 1997) 種々の方法が講じられている。これらの方法は副甲状腺ホルモン (PTH) の分泌や活性型ビタミン D (1,25-(OH)₂D) の合成を刺激し、骨からのカルシウムの移行、腎臓でのカルシウムの再吸収および腸管でのカルシウム吸収を高め、血中カルシウム濃度の低下を抑制しようとするものである。しかし、分娩時は骨から血液へのカルシウム移行が遅延し (Liesegang ら 2000 ; Sato ら 2003 ; Kamiya ら 2005)、採食量の低下 (Hayirli ら 2003) や加齢によるビタミン D 受容体の減少 (Goff ら 1991) のために、低カルシウム血症を予防する有効な方法は未だに得られていない。

腸管からのカルシウム吸収は上皮細胞内を通る細胞内通路と上皮細胞間を通る細胞間通路の 2 つの経路がある (Bronner 1998)。分娩前のカルシウム給与量の制限 (Horst ら 1997) や飼料中の陰・陽イオン塩の調整 (Joyce ら 1997) などは活性型ビタミン D 合成の反応を高め、細胞内通路からのカルシウム吸収を促進する。一方、細胞間通路からのカルシウム吸収はカルシウムイオンの濃度差が影響し、カルシウム剤の経口投与などによって増加する (Goff と Horst 1993 ; Goff ら 1996)。ヒトやラットなど単胃動物では難消化性糖類による細胞間通路からのカルシウム吸収促進作用も報告されている。この作用は難消化性糖類が腸内微生物に分解されることによって発現するもの (Younes ら 1996) と、微生物の分解作用を受けずに上

皮細胞間のタイトジャンクションに直接作用し、カルシウム吸収を促進するものがある (Mineo ら 2001, 2002 ; Suzuki と Hara 2004) .

DFA III はウシの第一胃微生物に分解されにくく(第二章), 乳牛においてもカルシウム吸収に効果があると予想されるが, 反芻動物を用いた報告はない. そこで, 乳牛への DFA III 給与効果を調査するためにホルスタイン種乳牛を用い, 予備試験として分娩後に DFA III と炭酸カルシウムの経口投与を行い, 血中カルシウム濃度の変化を調査した. さらに, 乾乳期給与試験として乾乳後期に DFA III 添加配合飼料を給与し, 胎子娩出時およびその後の血中カルシウム濃度について検討した.

第二節 材料および方法

試験は日本甜菜製糖株式会社総合研究所附属清川農場で飼養している 2 産以上のホルスタイン種乳牛を用い実施した. 供試牛は分娩予定の 60 日前に乾乳し, 乾乳日から分娩予定 3 週間前(乾乳前期)と, その後分娩まで(乾乳後期)の 2 群に分けパドック付きのフリーバーンで飼養した.

全ての牛は試験期間中, チモシー主体 1 番乾草 (DM 83.7 ~ 95.5%, CP 6.2 ~ 8.1%, NDF 62.8 ~ 76.3%, Ca 0.21 ~ 0.30%, P 0.17 ~ 0.24%) を自由摂取させた. さらに, 乾乳前期は泌乳牛用配合飼料 (イースター 18F , 日本甜菜製糖(株), 東京; DM 87.9%, CP 21.4%, NDF 17.5%, Ca 0.83%, P 0.53%) を 2 kg , 乾乳後期には乾乳牛用配合飼料 (ヨーデルドライ, 日本甜菜製糖(株) DM 88.2%, CP 22.4%, NDF 18.8%, Ca 0.20%, P 0.57%, Vitamin D₃ 3000 IU/kg) を 4 kg 給与した. 分娩後 3 日間はグラスおよびコーンサイレージ主体の搾乳牛用 TMR (DM 53.2%, CP 16.5%, NDF 37.3%, Ca 0.75%, P 0.51%) を 20 kg と乾乳前期に給与した泌乳牛用配合飼料を 4 kg 給与した.

DFA III の効果は分娩後の経口投与による予備試験と, 乾乳期給与試験により検討した. 予備試験は 2002 年 7 月から 2003 年 8 月まで 26 頭の分娩牛を供し, 胎子娩出直後とその 6 時間後の採血終了後に 250 mL の水に混合した純度 97% の

DFA III (日本甜菜製糖㈱) 90 g と炭酸カルシウム (日鉄鉱業㈱, 東京) 100 g の経口投与により行った。乾乳期給与試験は予備試験終了後の 2003 年 8 月から 2004 年 7 月まで 26 頭の乾乳牛を供し, 13 頭は DFA III 給与群として乾乳後期に 1 日当たり 50 g の DFA III を乾乳牛用配合飼料 4 kg に添加して給与し, 残り 13 頭には給与せず対照群とした。なお, DFA III 給与群, 対照群とも分娩後は予備試験と同様, 胎子娩出直後とその 6 時間後に DFA III と炭酸カルシウムの経口投与を行い, 対照群の試験処置は予備試験で行った方法と同一とした。

乾乳期給与試験に使用した牛 26 頭の内 17 頭は予備試験でも供した牛で, その内訳は DFA III 給与群 10 頭と, 対照群 7 頭であった。

供試牛は分娩時にボディコンディションスコア (BCS) を Ferguson ら (1994) の方法で評価し, 前産次の 305 日乳量を社団法人北海道乳牛検定検査協会の方法 (1989) に準じ, TI 法 (Sargent ら 1968) を使用して推定した。

採血は 10 mL 真空採血管を使用し, 胎子娩出直後 (0) と 6, 24 および 72 時間後に尾根部から採取した。血液は採血後直ちに氷冷し, 実験室で 3000 rpm, 10 分遠心分離した。血清は分析まで -30 °C で保存した。血清カルシウムは O-クレゾールフタレイン-コンプレクソン (OCPC) 法により日立 7350 自動分析装置 (㈱日立製作所, 東京) を使用し分析した。なお, 低カルシウム血症の判定は Goff と Horst (1997a) に準じ血中カルシウム濃度 7.5 mg/100mL 以下とした。

データは平均 ± 標準誤差で表し, 統計処理は JMP 4.0.5J (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) で行った。予備試験では, 採血時間による血中カルシウム濃度の有意差を一元配置分散分析 (対応あり) で検定し, 平均値間の差を Tukey の HSD 検定により多重比較した。また, 採血時間と血中カルシウム濃度の関係を調べるために各採血時間による相関を求めた。乾乳期給与試験において, 産次数, 分娩時のボディコンディションスコア, 前産次の 305 日乳量および分娩後の血中カルシウム濃度は, DFA III 給与群と対照群間の差異を一元配置法で検定した。予備試験と乾乳期給与試験の両試験で供試した 17 頭の牛については, 乾乳期給与試験時の

処理群ごとに予備試験においても胎子娩出直後の血中カルシウム濃度を集計し、処理群間と試験間の有意差を一元配置法で検定した。予備試験の飼養管理は乾乳期給与試験の対照群と同じであり、産次ごとの胎子娩出直後の血中カルシウム濃度についても両者に差異はみられなかった。そこで、胎子娩出直後の血中カルシウム濃度および胎子娩出時低カルシウム血症発生数に対する産次の影響について、対照群は予備試験 26 頭を合わせ 39 頭で集計し、DFA III 給与群 13 頭と比較した。また、産次と胎子娩出直後の血中カルシウム濃度の関係は、DFA III 給与群と対照群ごとに 1 次回帰式を求め、産次による影響を検討した。

第三節 結果

予備試験で供試した牛の産次数は 2.92 ± 0.17 産で、分娩時ボディコンディションスコアは 3.44 ± 0.06 、305 日乳量は $8,997 \pm 309$ kg であった。乾乳期給与試験では予備試験と比較し、産次数、分娩時のボディコンディションスコア、305 日乳量ともやや増加したが、DFA III 給与群と対照群間に差はなかった (Table 4-1)。

Table 4-1 Means \pm SE parity, body condition score at calving and milk yield in cows of the preliminary experiment and the dry period feeding experiment in which cows were fed with or without DFA III during prepartum

	Preliminary experiment	Dry period feeding experiment		
		Control	DFA III	<i>P</i>
Number of cows, head	26	13	13	
Number of parity	2.92 ± 0.17	3.31 ± 0.33	3.15 ± 0.27	0.7219
Body condition score at calving	3.44 ± 0.06	3.50 ± 0.08	3.50 ± 0.07	0.6973
Milk yield in previous lactation period, kg/305d	$8,997 \pm 309$	$10,551 \pm 290$	$9,860 \pm 413$	0.1160

1) 予備試験

胎子娩出直後とその 6 時間後の採血後に DFA III と炭酸カルシウムを経口投与

した予備試験において、血中カルシウム濃度は胎子娩出直後が最も低く、 7.2 ± 0.3 mg/100mLであった。6 および 24 時間後の血中カルシウム濃度はいずれも 7.7 ± 0.3 mg/100mL で胎子娩出直後よりも 0.5 mg/100mL 増加し、72 時間後には正常範囲である 9.3 ± 0.2 mg/100mL に達した (Figure 4-1)。0, 6 および 24 時間後の血中カルシウム濃度間には Table 4-2 に示したようにいずれも正の相関がみられ ($P < 0.01$), 分娩直後の血中カルシウム濃度が高いほどその後の血中カルシウム濃度は高く、回復は早かった。

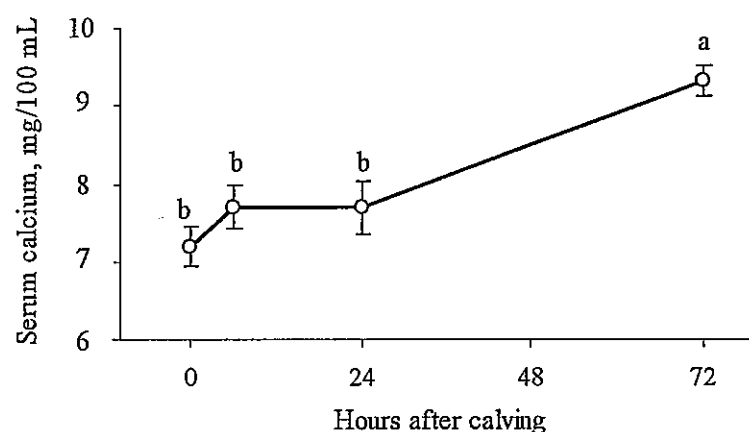


Figure 4-1 Means \pm SE serum calcium concentrations after calving in the preliminary experiment cows ($n = 26$). Values with different superscript letters are significantly different, $P < 0.05$.

Table 4-2 Correlation matrix of serum calcium concentrations after calving in the preliminary experiment cows ($n = 26$)

Hours after calving	Hours after calving		
	6	24	72
0	0.5729 **	0.6546 **	-0.3652
6		0.7927 **	-0.1670
24			-0.2455

** $P < 0.01$.

2) 乾乳期給与試験

分娩後の血中カルシウム濃度の変化を Figure 4-2 に示した。DFA III 給与群の胎子娩出直後(0時間)の血中カルシウム濃度は 8.0 ± 0.2 mg/100mL で、6時間後には正常範囲である 9.3 ± 0.3 mg/100mL に達し、その後もこの値を維持した。一方、対照群の0、6および24時間後の血中カルシウム濃度は 6.6 ± 0.3 、 7.3 ± 0.3 および 7.5 ± 0.4 mg/100mL と DFA III 給与群よりいずれも有意に低く ($P < 0.01$)、72時間後にほぼ正常範囲である 8.7 ± 0.2 mg/100mL に達したものの DFA III 給与群よりも回復は遅かった。

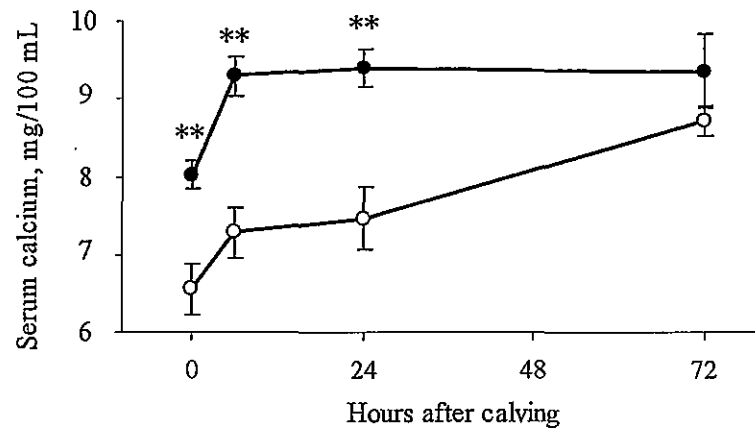


Figure 4-2 Means \pm SE serum calcium concentrations after calving in cows treated with DFA III (●, n = 13) during prepartum or in untreated control cows (○, n = 13). **Different from control at $P < 0.01$.

DFA III 給与群 13 頭の内 10 頭と、対照群 13 頭の内 7 頭は予備試験でも供試した牛である。予備試験は乾乳期給与試験の前年に行った試験であり、これら 17 頭の乾乳期給与試験時の産次は予備試験時よりもそれぞれ 1 産増えている。この 17 頭の牛の予備試験時と乾乳期給与試験時の胎子娩出直後の血中カルシウム濃度を Figure 4-3 に示した。DFA III 給与群の予備試験時の血中カルシウム濃度は 7.4 ± 0.5 mg/100mL で、1 産次増えた乾乳期給与試験時は 8.1 ± 0.2 mg/100mL と有意な差はないものの 0.7 mg/100mL の増加がみられた。一方、対照群は予備試験

時 7.1 ± 0.6 mg/100mL で、乾乳期給与試験時は 6.5 ± 0.3 mg/100mL と DFA III 給与群とは逆に 0.6 mg/100mL の低下がみられた。両群間において、予備試験時の胎子娩出時血中カルシウム濃度はほぼ同じで差はみられなかったが、乾乳期給与試験時では DFA III 給与群が対照群に比べて有意に高い値を示した。

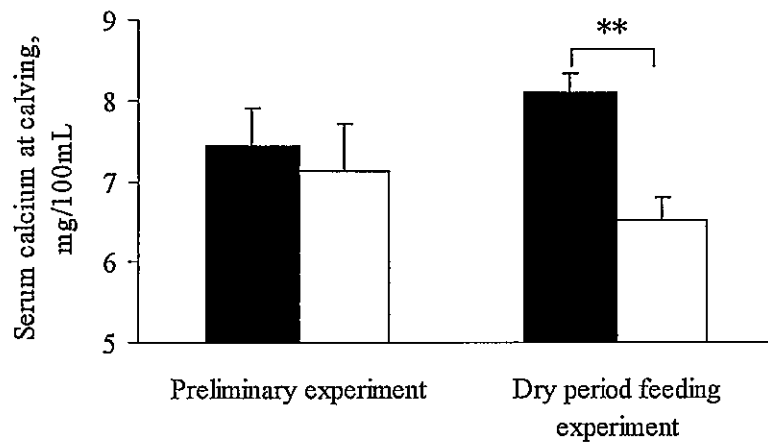


Figure 4-3 Means \pm SE serum calcium concentrations at calving of the preliminary experiment and the dry period feeding experiment in cows treated with DFA III (■, n = 10) during the prepartum of the dry period feeding experiment or in untreated control cows (□, n = 7). **Different from control at $P < 0.01$.

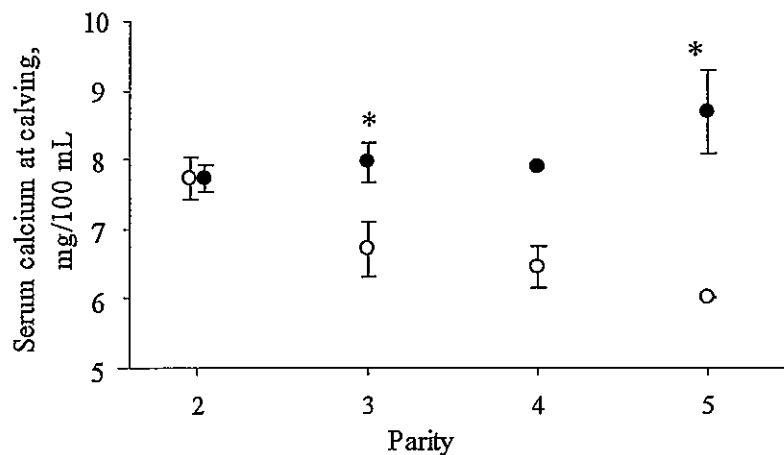


Figure 4-4 Relationship between parity and serum calcium concentrations at calving in cows treated with DFA III (●) during prepartum or in untreated control cows including the preliminary experiment cows (○). *Different from control at $P < 0.05$.

産次と胎子娩出直後の血中カルシウム濃度の関係 (Figure 4-4) と、産次と胎子娩出時低カルシウム血症の発生数 (Table 4-3) について、対照群は予備試験 26 頭を合わせ 39 頭で集計し、DFA III 給与群 13 頭と比較している。

Figure 4-4 に示したように、対照群の胎子娩出時血中カルシウム濃度は産次数の増加に伴って低下し、2産 7.7 ± 0.3 mg/100mL、3産 6.7 ± 0.4 mg/100mL、4産 6.5 ± 0.3 mg/100mL および 5産 6.0 ± 0.0 mg/100mL で、一次回帰式から求めた 1産次増加による血中カルシウム濃度の低下は 0.6 ± 0.2 mg/100mL ($P < 0.01$) であった。これに対し、DFA III 給与群は 2産 7.7 ± 0.2 mg/100mL、3産 8.0 ± 0.3 mg/100mL、4産 7.9 mg/100mL および 5産 8.7 ± 0.6 mg/100mL で、産次数の増加による胎子娩出時の血中カルシウム濃度低下は認められなかった。

Table 4-3 Effect of parity on incidence of hypocalcemia (serum calcium <7.5 mg/100 mL) at calving in cows treated with DFA III during prepartum or in untreated control cows including the preliminary experiment cows

Parity	Control		DFA III	
	no. of cows	no. of hypocalcemia	no. of cows	no. of hypocalcemia
2	15	7	3	1
3	9	7	7	2
4	13	10	1	0
5	2	2	2	0
Total	39	26	13	3

胎子娩出直後に血中カルシウム濃度が 7.5 mg/100 mL 以下の低カルシウム血症であった牛は、乾乳期に DFA III を給与しなかった対照群 39 頭中 26 頭、67%に達し、3産以上の牛では 24 頭中 19 頭、86%と高率であった (Table 4-3)。一方、DFA III 給与群において低カルシウム血症は 13 頭中 3 頭、23%で対照群よりも少ない割合であった。

第四節 考察

予備試験において胎子娩出直後とその6時間後に行った計2回のDFA IIIと炭酸カルシウムの経口投与は、6時間後に胎子娩出直後よりも血中カルシウム濃度を0.5 mg/100mL高め、24時間後においてもその濃度を維持することができた。分娩前後の血中カルシウム濃度を測定し、分娩直後よりも分娩後12～30時間に血中カルシウム濃度が最少になったとする報告(GoffとHorst 1990; GoffとStabel 1990; Tveitら1991; Yamagishiら2000)があることから、DFA IIIと炭酸カルシウムの投与は血中カルシウム濃度の回復に効果を持つ可能性が高いと考えられた。一方、胎子娩出直後の血中カルシウム濃度とその後6および24時間目の血中カルシウム濃度の間に認められた正の相関は、胎子娩出時に血中カルシウム濃度の高い牛ほどその後の回復も早いことを示唆している。Joyceら(1997)は分娩時の血中カルシウム濃度の改善は分娩後の採食量を高めることを報告している。本試験で採食量は確認していないが、胎子娩出時とその後の血中カルシウム濃度回復における相関の要因の一つとして、分娩直後の血中カルシウム濃度が高いほど採食量が向上し、その後の回復に影響した可能性がある。特に、骨から血液へのカルシウム移行機能が低下している(Liesegangら2000; Satoら2003; Kamiyaら2005)といわれる分娩時において、血中カルシウム濃度回復のために飼料からのカルシウム供給は重要であり、分娩直後の血中カルシウム濃度を高く維持する予防処置が低カルシウム血症を効率的に改善すると考えられる。

消化管の運動が正常であれば、牛に投与したDFA IIIは腸管の中に12時間程度存在すると考えられる(第三章)。また、Mineoら(2001)が示したDFA IIIによるカルシウム吸収への影響は、腸管の部位(空腸, 回腸, 盲腸, 結腸)別に、DFA III濃度とカルシウム吸収の関係を示している。DFA IIIの濃度は対数変換して示され、0.1 mmol/L(≒3.2 mg/100mL)と比較的低い濃度であってもカルシウム吸収を亢進し、腸管の広い範囲で作用すると考えられる。DFA IIIは熱に安定で、吸湿しにくく、飼料としての利用が容易である。また、乾乳期の配合飼料に添加することで分娩

という非日常的な状況に対応でき、経口投与よりも安全に給与することができる。このような点から予備試験に引き続き乾乳期給与試験を実施し、DFA III の低カルシウム血症に対する予防効果を検討した。

予備試験を含め本試験の実施は低カルシウム血症予防のため、従来から提唱（Goff と Horst 1993 ; Horst ら 1997）されている方法の中からカルシウム給与の制限とビタミン D の給与を分娩予定 3 週間前から分娩までの期間全供試牛に対して行った。すなわち、カルシウムの制限はカルシウムを含むミネラル剤が配合されていない乾乳牛用配合飼料を使用し、カルシウム含量の低いチモシー主体の 1 番乾草を自由採食させることによって行った。また、ビタミン D はビタミン D₃ を 1 日当たり 12,000 IU 給与した。日本飼養標準（1999）では分娩前 3 週間の成雌牛（体重 650 kg）のカルシウムとビタミン D の 1 日当たり要求量はそれぞれ 44 g, 6,300 IU と示され、これらの値と比較し、本試験において分娩前のカルシウムは不足の状態にあり、ビタミン D は不足することがないと考えられる。しかし、乾乳期に DFA III を給与しなかった予備試験と乾乳期給与試験の対照群の牛において、胎子娩出直後に低カルシウム血症となった牛は 67%と高率であった。副甲状腺ホルモン（PTH）分泌を刺激し、乳熱を予防するカルシウム給与量として、Horst ら（1997）は 1 日当たり 10 ~ 20 g 以下に制限することを示しており、本試験程度のカルシウム制限では低カルシウム血症の予防効果は十分ではないと考えられた。

これに対し、乾乳期の DFA III 給与によって胎子娩出直後の血中カルシウム濃度低下は大きく軽減された。これまで、DFA III を含む難消化性糖類の多くは腸管からのカルシウム吸収を促進することがラットやヒトにおいて認められている。この難消化性糖類がカルシウム吸収を促進する機構の仮説として、佐久間（2002）は①短鎖脂肪酸による消化管内の pH 低下は不溶性カルシウムを可溶性にし、細胞間を拡散的に移行する、②短鎖脂肪酸はイオン化したカルシウムよりも吸収のよいカルシウムと酢酸の複合体を形成する、③短鎖脂肪酸の中で酪酸は上皮細胞の細胞増殖を促進する、など腸内微生物が難消化性糖類を分解し産生する短鎖脂肪酸の

関与を示唆している。しかし、反芻動物は単胃動物と異なり、腸内微生物に分解されやすい難消化性糖類を第一胃で分解し、小腸以降でのカルシウム吸収への効果は少ないものと考えられる。一方、DFA III、DFA IV；ラフィノース、フラクトオリゴ糖、マルチトール、メリビオースなどは腸内微生物の関与を受けずに直接小腸上皮細胞間のタイトジャンクションに作用し、カルシウム吸収を促進する難消化性糖類であることがラットやヒトで報告されている（Mineo ら 2001，2002；Suzuki と Hara 2004）。第二章および第三章で示したように DFA III は第一胃微生物に分解されにくく、乳牛の腸管には 12 時間程度存在していると考えられる。DFA III が促進する上皮細胞間からのカルシウム吸収は腸管腔側と体液側のイオン濃度勾配によって受動的に行われ（Bronner 1998）、カルシウムのイオン濃度差が大きいほど、吸収が高まる（Tang と Goodenough 2003）。したがって、血中のカルシウム濃度低下が大きいほどイオン濃度差も大きくなり、受動的なカルシウム吸収能は大きくなる。その結果、DFA III 給与群は血中カルシウム濃度の低下が抑制され、分娩時の血中カルシウム濃度を高く維持したものと考えられる。

乳牛の分娩時低カルシウム血症は加齢に伴い増加する（Rajala ら 1999）。本試験においてもこの関係は認められ、乾乳期給与試験の対照群の中で、予備試験でも供試した 7 頭の同一牛において、予備試験時から 1 産次増えた乾乳期給与試験時での胎子娩出時の血中カルシウム濃度は 0.6 mg/100mL 低下した。さらに、予備試験を含めた乾乳期に DFA III を給与しなかった 39 頭においても胎子娩出時血中カルシウム濃度の低下は 1 産次の増加につき 0.6 mg/100mL と同じで、低カルシウム血症の割合は 2 産次 47%、3 産次 78%、4 産次 77% および、頭数は少ないが 5 産次 100% と加齢により増加したことが認められた。Goff ら（1991）は乳熱を発症した牛のうち、活性型ビタミン D の生産が不十分である割合は約 10% と少なく、分娩時に血中カルシウム濃度が低下した牛の多くは PTH と活性型ビタミン D 濃度が増加し、カルシウム濃度を維持する機能は正常に働いていることを示した。また、腸管の上皮細胞にあるビタミン D 受容体は加齢により減少することを示し、産次数の

増加がより深刻な低カルシウム血症を引き起こす原因の一つは、ビタミン D 受容体の減少であるとしている。乾乳期に DFA III を給与した牛においても、加齢によりビタミン D 受容体が減少し、上皮細胞内を通るカルシウムの吸収は減少していると予想されるが、産次と胎子娩出時血中カルシウム濃度に負の関係はみられなかった。DFA III が亢進するカルシウム吸収作用は受動輸送に関係するものであり、ビタミン D 受容体が関与する能動輸送の影響を受けることはないと考えられる。その結果、DFA III 給与群は血中カルシウム濃度の低下が抑制され、産次数の影響を受けなかったものと考えられる。

以上の結果より、乾乳後期の DFA III 給与は分娩直後の血中カルシウム濃度低下を抑制し、その後の血中カルシウム濃度の回復も早く、低カルシウム血症の改善が期待できると考えられた。また、この効果は産次数の影響を受けにくく、ラットやヒトで確認された腸管からのカルシウム吸収亢進効果が、反芻動物である乳牛でも発現しているものと考えられた。

第五節 小括

DFA III はヒトやラットで腸管からのカルシウム吸収亢進効果が認められており、ウシの第一胃微生物にも分解されにくく、乳牛での利用が期待できる。そこで、2 産以上のホルスタイン種乳牛を使用し、乾乳後期の DFA III 給与が分娩時の血中カルシウム濃度に及ぼす影響を調査した。胎子娩出直後の血中カルシウム濃度は DFA III 給与牛が 8.0 mg/100mL で、無給与牛の 6.6 mg/100mL よりも高く、6 および 24 時間後の血中カルシウム濃度も DFA III 給与牛が無給与牛よりも高い値を示した。DFA III 給与牛は胎子娩出後 6 時間目で血中カルシウム濃度が正常閾と考えられる 9 mg/100mL に達し、無給与牛は 72 時間目で 8.7 mg/100mL になった。DFA III 無給与牛は産次が増えると胎子娩出直後の血中カルシウム濃度は低下したが、給与牛ではこのような関係は認められなかった。以上より、DFA III は分娩時の血中カルシウム濃度低下を抑制し、低カルシウム血症の予防に有効であると考えられた。

第五章 Difructose Anhydride IIIと酸化マグネシウムの給与が乳牛の分娩前後の血清カルシウムおよびマグネシウム濃度に及ぼす影響

第一節 緒言

第三章で DFA III はカルシウムの他、マグネシウムの吸収に対して効果を持つ可能性を示した。乳牛においてマグネシウムの吸収率は低く、分娩時に低マグネシウム血症になることがある(NRC 2001)。ヒトにおいて、マグネシウムはカルシウムと同様、上皮細胞内と上皮細胞間から腸で吸収され(Schlingmann と Gudermann 2005)、DFA III のミネラル吸収促進効果はカルシウムだけでなく、マグネシウムでもラットを用いた試験で認められている(Mineo ら 2004)。成牛はマグネシウムを第一胃と腸で吸収する(Leonhard-Marek ら 2005)が、DFA III によって低マグネシウム血症を予防できる可能性は高い。

第四章の試験では、低カルシウム血症予防に推奨されているカルシウム含量の低い配合飼料を乾乳後期に給与した。しかし、DFA III のカルシウム吸収促進は上皮細胞間から濃度勾配による生じるため、カルシウム含量の高い配合飼料の方がより高い効果を持つ可能性が予想される。

そこで、本試験では乾乳牛にカルシウム含量の高い泌乳牛用配合飼料を給与し、DFA III と酸化マグネシウム給与が分娩前後の血清カルシウムおよびマグネシウム濃度に及ぼす影響を調査し、低カルシウム血症と低マグネシウム血症に対する DFA III の効果を検討した。

第二節 材料および方法

試験は日本甜菜製糖株式会社総合研究所附属清川農場で飼養している 2 産以上のホルスタイン種乳牛を 20 頭供した。供試牛は分娩予定の 60 日前に乾乳し、乾乳日から分娩予定 3 週間前(乾乳前期)までと、その後分娩まで(乾乳後期)の 2 群に分けパドック付きのフリーバーンで飼養し、試験飼料はセルフロックスタンション

のついた飼槽で給与した。分娩徴候確認後は個別のペンに移動し、分娩後 3 日間はこのペンで飼養した。

試験期間中はの配合飼料(イースター 18F, 日本甜菜製糖(株), 東京)を乾乳前期は 2 kg, 乾乳後期から分娩 3 日後までは 4 kg 給与した。これに加え、分娩から 3 日間はグラスおよびコーンサイレージ主体の搾乳牛用 TMR を原物で 20 kg 給与した。配合飼料と TMR はそれぞれ 7 時と 16 時の 2 回に分けて給与した。全ての牛に試験期間中、チモシー主体 1 番乾草を給与し自由摂取とした (Table 5-1)。

Table 5-1 Dry matter content and chemical composition of the feeds

	Formula feed ¹	Hay ²	TMR ³
Dry matter, %	87.9	83.7 - 95.5	53.2
Crude protein, %DM	21.4	6.2 - 8.1	16.5
NDF ⁴ , %DM	17.5	62.8 - 76.3	37.3
Calcium, %DM	0.83	0.21 - 0.30	0.75
Phosphorus, %DM	0.53	0.17 - 0.24	0.51
Magnesium, %DM	0.26	0.08 - 0.13	0.24
Potassium, %DM	1.52	0.99 - 1.53	1.50

¹ Formula feed for lactation cows (Yeaster 18F produced by Nippon Beet Sugar Manufacturing, Co., Ltd, Tokyo, Japan).

² Range.

³ Total mixed ration containing 27.7 % grass silage, 17.2 % corn silage, 43.1 % formula feed (Yeaster 18), 11.8 % beet pulp and 0.2 % mineral premix, each as dry matter.

⁴ Neutral detergent fiber.

DFA III と酸化マグネシウムの給与は分娩予定 3 週間前から分娩までの期間に給与した配合飼料 4 kg に、純度 97% の DFA III (日本甜菜製糖(株)) 50 g と飼料用として市販されている酸化マグネシウム(マグネシウムペレット, 東洋電化工業(株), 高知; Mg 52%) を 30 g 混合した DFAMg 群, DFA III を 50 g 混合した DFA 群, 酸化マグネシウムを 30 g 混合した DMg 群, および DFA III と酸化マグネシウム無

Table 5-2 Parity, milk yield and body condition score at calving (mean \pm SE) in cows supplemented with or without DFA III and/or magnesium oxide

	Treatment ¹				P
	DFAMg	DFA	DMg	Control	
Number of cows, head	5	5	5	5	
Number of parity	3.20 \pm 0.37	3.00 \pm 0.45	3.20 \pm 0.73	3.20 \pm 0.73	0.9934
Milk yield in previous lactation period, kg/305d	10,651 \pm 1,019	9,316 \pm 512	10,183 \pm 953	10,789 \pm 387	0.5384
Body condition score at calving ²	3.65 \pm 0.10	3.65 \pm 0.10	3.55 \pm 0.05	3.45 \pm 0.15	0.4926

¹ Treatment: DFAMg = 50 g of DFA III and 30 g of magnesium oxide (MgO)/d; DFA = 50 g of DFA III/d; DMg = 30 g of MgO/d; and Control.

² Five-point evaluation of body condition (Ferguson ら 1994).

添加の Control 群の 4 処理を行い、それぞれ各 5 頭の牛 (Table 5-2) に給与した。分娩後は第四章と同様、全牛に分娩直後とその 6 時間後の 2 回、採血後に 250 mL の水に混合した DFA III 90 g と炭酸カルシウム (日鉄鉱業㈱, 東京; Ca 38%) 100 g を経口投与した。なお、分娩後は経口投与以外の DFA III 給与や、酸化マグネシウムの給与は行わなかった。

採血は分娩予定 5 日前をめぐりに開始し、分娩前は毎朝 9 時、分娩後は分娩直後 (0) とその 6 (0.25 日)、24 (1 日) および 72 (3 日) 時間後に尾根部から真空採血管を使用し採取した。血液は採血後直ちに 3,500 rpm で 10 分間遠心分離した。血清カルシウムおよびマグネシウムは VetTest8008 (IDEXX Laboratories, Inc., Westbrook, ME, USA) を使用して分析した。

データは平均 \pm 標準誤差で表し、統計処理は JMP 9 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) で行った。各牛の分娩 5 日前から 2 日前までの血清カルシウムとマグネシウム濃度の平均を乾乳期の基準値 Base Value とし、処理ごとにこの基準値と各採血時間の値との間の有意差を t 検定した。採血時間ごとに、血清カルシウムとマグネシウムは処理間による差を一元配置法で検定し、差が認められた場合は

Tukey の HSD 検定により多重比較した。また、血清カルシウムは乾乳期の DFA III 給与の有無により、DFAMg 群と DFA 群を合わせた DFA III 給与牛と、DMg 群と Control 群を合わせた DFA III 無給与牛の 2 群で、採血時間ごとに差異を検定した。

第三節 結果

乾乳牛に給与した配合飼料、DFA III および酸化マグネシウムは全て採食され、食べ残しは見られなかった。また、Table 5-2 に示した産次数、前産次の 305 日乳量、および分娩時のボディコンディションスコアは処理間に差はみられなかった。

乾乳後期の DFA III と酸化マグネシウム給与処理による分娩前後の血清カルシウム濃度の値を Table 5-3 に示した。乾乳期の基準値 (Base Value) とした分娩前 5 日から 2 日の血清カルシウム濃度はいずれの処理も 9 mg/100mL 以上の正常閾で推移し、各群間においても差異はみられなかった。血清カルシウム濃度の低下は分娩 1 日前から始まり、分娩直後に最も低い値となった。これら変化のパターンは処理間で違いはみられず、分娩直後の血清カルシウム濃度は DFAMg 群 7.9 ± 0.4 mg/100mL、DFA 群 8.1 ± 0.3 mg/100mL、DMg 群 7.3 ± 0.6 mg/100mL および Control 群 7.2 ± 0.6 mg/100mL で、それぞれ Base Value よりも有意に低下した ($P < 0.05$)。分娩後はいずれの処理においても血清カルシウム濃度は増加したが、乾乳期の DFA III 給与の有無によって異なる傾向がみられた。すなわち、乾乳期に DFA III を給与した DFAMg および DFA 群は分娩後 6 から 24 時間で血清カルシウム濃度が正常閾である 9 mg/100mL にほぼ達し、3 日後には基準値よりも高い 10 mg/100mL になったが、DFA III を給与しなかった DMg および Control 群が 9 mg/100mL の正常閾に達したのは分娩 3 日後であった。

乾乳期の DFA III 給与の差異を明確にするために、Figure 5-1 に DFAMg と DFA 群を合わせた 10 頭の DFA III 給与牛と、DMg と Control 群を合わせた DFA III 無給与牛 10 頭の血清カルシウム濃度の推移を示した。分娩 2 日前までの血清カルシウム濃度は DFA III 給与牛および無給与牛とも 9 mg/100mL 以上で推移し、

Table 5-3 Concentrations of the serum calcium around parturition in cows supplemented with or without DFA III and/or magnesium oxide

	Treatment ¹				SE	P
	DFAMg	DFA	DMg	Control		
Base Value ²	9.5	9.4	9.2	9.3	0.1	0.4895
-1 d	9.2	9.1	8.5 *	9.0	0.4	0.5931
0 d	7.9 *	8.1 *	7.3 *	7.2 *	0.5	0.5037
0.25 d	8.7 *	8.9	7.5 *	7.4 *	0.6	0.2472
1 d	9.2 ^a	8.9 ^{ab}	7.9 ^{*ab}	7.4 ^{*b}	0.4	0.0274
3 d	10.0 *	10.2 *	9.0	9.0	0.4	0.0443

* Different from the base value at $P < 0.05$.

^{a,b} Means in the same row with different superscript letter differ at $P < 0.05$.

¹ Treatment: DFAMg = 50 g of DFA III and 30 g of magnesium oxide (MgO)/d; DFA = 50 g of DFA III/d; DMg = 30 g of MgO/d; and Control.

² Base Value: Mean serum calcium concentration 2-5 d before calving. Parturition occurred at 0 d.

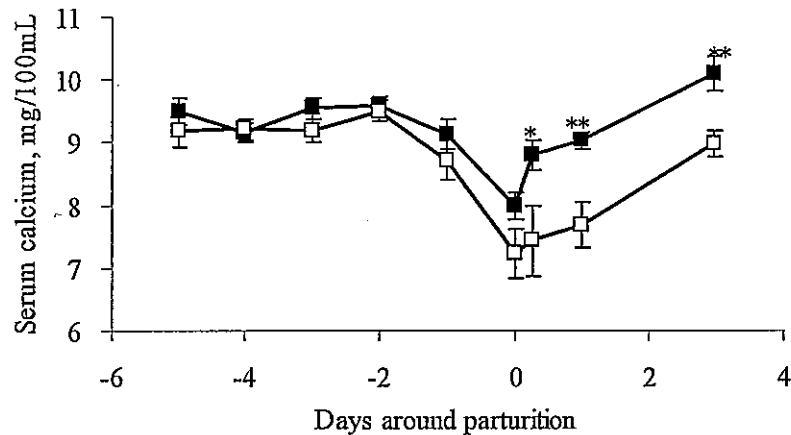


Figure 5-1 Serum calcium concentrations (mean \pm SE) in cows fed (■) or not fed (□) 50 g of DFA III. Parturition occurred at 0 d. *, **Different from the cows fed the diet without DFA III at $P < 0.05$ or $P < 0.01$, respectively.

DFA III 給与による差異はみられなかった。分娩 1 日前から血清カルシウム濃度は両牛とも低下し、分娩直後に最少となったが、その濃度は DFA III 給与牛が無給与牛よりも高い傾向にあり、それぞれ分娩 1 日前 9.1 ± 0.2 と 8.7 ± 0.3 mg/100mL ($P < 0.31$)、分娩直後 8.0 ± 0.2 と 7.2 ± 0.4 mg/100mL ($P < 0.13$) であった。分娩後の血清カルシウム濃度は DFA III 給与牛が無給与牛よりも高く、それぞれ分娩 6 時間後 8.8 ± 0.2 と 7.4 ± 0.6 mg/100mL ($P < 0.05$)、1 日後 9.0 ± 0.1 と 7.7 ± 0.4 mg/100mL ($P < 0.01$)、3 日後 10.1 ± 0.3 と 9.0 ± 0.2 mg/100mL ($P < 0.01$) であった。

乾乳後期の DFA III と酸化マグネシウム給与処理による、分娩前後の血清マグネシウム濃度の変化を Table 5-4 に示した。DFA III と酸化マグネシウムを給与しなかった Control 群において、血清マグネシウム濃度は分娩 5 日前から分娩 1 日後まで約 2 mg/100mL で推移し、3 日後は 1.8 mg/100mL に低下した。この傾向は酸化マグネシウムだけ給与した DMg 群、酸化マグネシウムを給与せず DFA III だ

Table 5-4 Concentrations of the serum magnesium around parturition in cows supplemented with or without DFA III and/or magnesium oxide

	Treatment ¹				SE	P
	DFAMg	DFA	DMg	Control		
Base Value ²	2.2	1.9	2.0	2.1	0.1	0.0141
-1 d	2.4	1.9	2.0	2.0	0.2	0.2492
0 d	2.7 ^{*a}	2.1 ^b	2.0 ^b	2.1 ^b	0.1	0.0082
0.25 d	2.6 [*]	2.1	2.0	2.0	0.2	0.0435
1 d	2.1	2.2	1.9	1.9	0.1	0.3229
3 d	1.7 [*]	1.9	1.7	1.8 [*]	0.1	0.5928

* Different from the base value at $P < 0.05$.

^{a,b} Means in the same row with different superscript letter differ at $P < 0.05$.

¹ Treatment: DFAMg = 50 g of DFA III and 30 g of magnesium oxide (MgO)/d; DFA = 50 g of DFA III/d; DMg = 30 g of MgO/d; and Control.

² Base Value: Mean serum magnesium concentration 2-5 d before calving. Parturition occurred at 0 d.

け給与した DFA 群とも同じであった。一方、DFA III と酸化マグネシウムを合わせて給与した DFAMg 群の血清マグネシウム濃度は乾乳期の基準値とした分娩 5 日前から 2 日前までの 2.2 ± 0.1 mg/100mL と比較し、分娩 1 日前は 2.4 ± 0.1 mg/100mL ($P < 0.26$) で増加傾向にあり、分娩直後には 2.7 ± 0.1 mg/100mL ($P < 0.001$) で最大となり、6 時間後 2.6 ± 0.1 mg/100mL ($P < 0.01$) にやや低下し、1 日後 2.1 ± 0.1 mg/100mL ($P < 0.30$) で、3 日後には 1.7 ± 0.2 mg/100mL ($P < 0.001$) に基準値よりも低下した。この分娩前後の一時的な上昇は DMg 群、DFA 群および Control 群ともみられず、DFAMg 群にだけみられた。各処理間の血清マグネシウム濃度は、Base Value, 0 d, 0.25 d において差異がみられ、DFAMg 群の血清マグネシウム濃度は 0 d において他の 3 群よりも有意に高い値 ($P < 0.05$) であった。

第四節 考察

カルシウムに関し、第四章と本章の違いは乾乳期に給与する配合飼料のカルシウム濃度を高めたことである。分娩時の低カルシウム血症予防の一つとして、副甲状腺ホルモン (PTH) の分泌や活性型ビタミン D ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$) の分泌を亢進するために乾乳期のカルシウム給与量を制限し、カルシウム不足の状態にするとの考えがある (NRC 2001)。第四章ではこの考えから、乾乳期のカルシウム給与量を制限した。しかし、DFA III の機能は上皮細胞間隙から受動輸送によるミネラル吸収を高めることであり、腸管内のカルシウム濃度は高い方がより高い効果が得られるのではないかと考え、カルシウム濃度の高い配合飼料を使用した。しかし、どちらの試験においても DFA III を給与した牛の分娩時血清カルシウム濃度は 8.0 mg/100mL と変わらなかった。

DFA III の給与期間は乾乳後期の約 20 日間としたが、DFA III を摂取した牛の血清カルシウム濃度は分娩前の 2 日以前において無給与の牛と変わらなかった。Shigematsu ら (2004) は健康なヒトにおいて、DFA III 摂取後 2 ~ 6 時間において

尿中へのカルシウム排せつ量の増加を報告している。乾乳牛のカルシウム吸収が DFA III の給与によって増加しても、体内への蓄積や体外への排泄量が増加し、血清カルシウム濃度は一定に維持され、差異はなかったのかもしれない。

本試験の血清カルシウム濃度低下は分娩 1 日前から始まり、分娩直後に最小となったが、DFA III を給与した牛の血清カルシウム濃度低下は、DFA III 無給与の牛の低下よりも抑制された。ラットの腸管膜を使った試験で Mineo ら (2001) は、DFA III が上皮細胞間にあるタイトジャンクションの結合間隙を弛め、細胞間通路からのカルシウム吸収を促進することを示した。また、細胞間通路からのカルシウム吸収はカルシウムの濃度勾配が大きいほど亢進する (Pansu ら 1993)。腸管内容物と血液間のカルシウム濃度差は血清カルシウム濃度が低いほど大きくなり、カルシウムの吸収能が亢進し、加えて DFA III のタイトジャンクションへの作用がカルシウム吸収をさらに促進したものと考えられる。

分娩後の飼養管理は供試牛すべて同一であるが、乾乳期に DFA III を給与した牛の血清カルシウム濃度回復は、第四章と同様非常に早かった。血中カルシウム濃度低下に対し、副甲状腺ホルモンが分泌され、骨からのカルシウム再吸収が亢進し、血中カルシウム濃度を高めようとする。しかし、分娩時において骨から血液へのカルシウム移行は遅延するといわれ (Liesegang ら 2000 ; Sato ら 2003 ; Kamiya ら 2005)、血中へのカルシウム供給は腸管からのカルシウム吸収が主体になる。しかし、血中カルシウム濃度が低いほど消化管の運動は弱まり、採食量の低下や廃絶が起こる (NRC 2001)。これに対し、分娩時の血中カルシウム濃度低下が少ないと、乾物摂取量は多く (Joyce ら 1997)、飼料からのカルシウム供給量は多くなる。本試験では乾物摂取量を測定していないが、乾物摂取量の増加がカルシウムの供給を高め、血中カルシウム濃度回復に大きく貢献したと推察される。

1 日当たり 30 g の酸化マグネシウムの給与によって、マグネシウム摂取量は DFA および Control 群より DFAMg 群と DMg 群は約 15 g 多いと予想される。しかし、DFAMg 群と DMg 群間で血清マグネシウム濃度の変化は異なり、酸化マグネシ

ウムと DFA III を併用給与した DFAMg 群だけが分娩前後に一時的な増加がみられた。分娩前後の血中マグネシウム濃度の上昇は、乾乳期間のマグネシウム摂取が十分であったことを示すといわれており (Stabel ら 2002), DFAMg 群のマグネシウム吸収量はそれ以外の群よりも多かったことを示唆すると考えられる。Mineo ら (2004) は DFA III のタイトジャンクションに対する作用がマグネシウムの吸収においても促進効果を持つことを示しており、ウシにおいても DFA III はマグネシウム吸収を促進したものと考えられる。

一方、DMg 群の血清マグネシウム濃度は DFA および Control 群と同様、乾乳期からほぼ一定に推移し、マグネシウム摂取量増加による血清マグネシウムへの効果はみられなかった。Jittakhot ら (2004) の試験において、NRC (2001) が推奨する量とほぼ等しい 40 g のマグネシウムを摂取した乾乳牛のマグネシウムバランスはほぼ 0 で、体蓄積の増加はみられない。本試験においても、給与飼料のマグネシウム含量から、マグネシウム摂取量は DFAMg および DMg 群でも 40 g を大きく超えることはないと考えられ、その結果、DMg 群では酸化マグネシウムの給与効果が得られなかったのかもしれない。また、第一胃は成牛の主要なマグネシウム吸収部位であり (Martens と Gabel 1986), 第一胃の pH はマグネシウムの溶解性と吸収に影響する (Emanuele と Staples 1994; Johnson ら 1988)。乾乳牛は乾草主体で飼養されることが多く、高い第一胃 pH により給与したマグネシウム剤の効果が影響を受ける可能性も高い。しかし、少ないマグネシウム摂取量ではあっても、DFA III はマグネシウムの吸収率を高め乾乳牛に十分なマグネシウムを供給したものと考えられた。

カルシウムおよびマグネシウムは 2 価の陽イオンで、これらのミネラルは腸管の上皮細胞内を通る細胞内通路と上皮細胞間を通る細胞間通路の 2 経路で吸収される。細胞間通路からの吸収は濃度勾配に依存する受動的輸送であり、難消化性糖類の多くがこの経路からのミネラル吸収を促進する効果を持つ。その理由の一つは難消化性糖類が高等動物の消化酵素で分解されず、腸内微生物に分解され、産生

する短鎖脂肪酸が腸管内を酸性化するからであり、不溶性のカルシウムやマグネシウムは pH の低下により溶解し、吸収が促進される。このような難消化性糖類の発酵によるミネラル吸収に対する効果は、単胃動物で数多く報告されている(Levratら 1991; Schulzら 1993; Younesら 1996; Watanabeら 2000)が、反芻動物では食道直下で第一胃微生物による分解作用を受けるため、単胃動物でみられるようなミネラル吸収に対する難消化性糖類の明確な効果は示されていない。しかし、第三章で示したように、DFA III は牛の第一胃を通過しており、ミネラル吸収に対し単胃動物における難消化性糖類と同様な働きをしている可能性は高い。難消化性糖類がミネラル吸収を促進するもう一つの理由として、DFA III, DFA IV, ラフィノース, フラクトオリゴ糖, マルチトール, メリビオースなどのタイトジャンクションへの作用が報告されている(Mineoら 2001, 2002; SuzukiとHara 2004)。上皮細胞は体内と体外を分ける組織であり、細胞間の隙間から物質が漏出するのを防いでいるのがタイトジャンクション(密着結合)で、キルト風のシールを形成している(石崎と丸山 2010)。ラットの腸管膜を使った試験で Mineoら(2001)は、DFA III が上皮細胞間にあるタイトジャンクションの結合間隙を弛め、細胞間通路からのカルシウム吸収を促進することを示し、さらにマグネシウムの吸収においても促進効果を持つことを示した(Mineoら 2004)。DFA III はウシにおいてもこのような二つの作用によって、カルシウムやマグネシウムなどのミネラル吸収を促進している可能性が高く、第四章に示した分娩牛の血中カルシウム濃度低下を抑制だけでなく、マグネシウム吸収に対しても影響したと考えられた。

第五節 小括

DFA III はラットにおいてカルシウムやマグネシウムの吸収亢進が認められ、乾乳後期にカルシウム含量の低い配合飼料を給与した乳牛において、分娩時の低カルシウム血症改善がみられた。本研究の目的は乾乳期にカルシウム含量の高い配合飼料を給与し、低カルシウム血症と低マグネシウム血症への DFA III の効果を検討

することであった。

DFA III と酸化マグネシウムを分娩前のホルスタイン種乳牛(2産以上)20頭に給与し、分娩5日前から分娩3日後の血清カルシウムとマグネシウムの変化を調査した。処理は乾乳後期に DFA III と酸化マグネシウムを給与した DFAMg 群、DFA III だけを給与した DFA 群、酸化マグネシウムだけを給与した DMg 群、および DFA III と酸化マグネシウム無給与の Control 群の4処理とした。

DFA III を給与した DFAMg 群と DFA 群を合わせた DFA III 給与牛と、DMg 群と Control 群を合わせた無給与牛の血清カルシウムに分娩2日前以前では、差異はなかったが、分娩時の血清カルシウム濃度平均は DFA III 給与牛 8.0 ± 0.2 mg/100mL、DFA III 無給与牛 7.2 ± 0.4 mg/100mL で、DFA III 給与牛がやや高い値となった。分娩後6、24および72時間の血清カルシウム濃度は DFA III 給与牛が無給与牛よりも有意に高い値となり、DFA III はカルシウム含量の高い配合飼料であっても血清カルシウム濃度の低下に対して抑制効果を持ち、分娩後の血清カルシウム濃度回復に有効であると考えられた。分娩前後の血清マグネシウム濃度は DFA 群、DMg 群および Control 群の3処理に大きな違いはみられず、2 mg/100mL 前後で一定に推移した。一方、DFA III と酸化マグネシウムを併用給与した DFAMg 群は、乾乳期にマグネシウム摂取が十分であった場合にみられる、分娩前後の一時的な血清マグネシウムの増加が認められ、DFA III はマグネシウムの吸収も高めているものと考えられた。これらの結果、DFA III はカルシウムとマグネシウムの吸収を改善し、低カルシウム血症と低マグネシウム血症の改善に効果を持つことが示唆された。

第六章 分娩前後の Difructose Anhydride III とカルシウムの給与が血中カルシウム濃度と周産期疾病に及ぼす影響

[本章の内容は日本家畜臨床学会誌, 30, 31-38 (2007) に掲載済みである]

第一節 緒言

乳牛の低カルシウム血症は酪農家に多くの損害をもたらしている。臨床的に起立不能になり、獣医師の治療あるいは廃用を余儀なくされる場合や、潜在的な低カルシウム血症により、いわゆる周産期疾病である胎盤停滞、ケトーシス、第四胃変位、食欲不振などを引き起こし (Correa ら 1993 ; Goff と Horst 1997b ; Shaver 1997), その後の繁殖障害にまで影響を及ぼす可能性が高い (佐藤と村山 2004)。

現在、低カルシウム血症の予防は乾乳期に飼料の陰・陽イオン濃度の調節、ビタミン D の給与、カルシウム給与量の制限などの方法 (Horst ら 1997) が示されているが、十分な効果を得るまでには至っていない。特に、カルシウム給与量制限による方法は、副甲状腺ホルモン (PTH) 分泌を刺激するために、分娩前のカルシウム給与量を 1 日当たり 10 ~ 20 g に制限しなければならず (Horst ら 1997), 日常、給餌される飼料からこの低い量を維持するのは非常に難しく、逆に母牛の体内蓄積を枯渇させる恐れがある (平井 2005)。第四章と第五章では乾乳期を前期と後期に分けられることを前提に、乾乳後期に使用する配合飼料のカルシウム含量と DFA III の給与効果を検討した。しかし、酪農家の中には乾乳牛を分けられず、一つの配合飼料しか使用できないということは少なくない。

このような条件の中でも、DFA III の効果を最大限発揮する方法を検討するため、カルシウム濃度を低くした配合飼料と、通常の泌乳期用配合飼料と同程度カルシウムを含んだ配合飼料を使用し、これらの飼料に DFA III を混合して乾乳牛に給与し、さらに、分娩後にカルシウムと DFA III を経口投与して、分娩前後の血中カルシウム濃度を比較した。また、一般酪農家 4 軒の協力を得て、延べ 599 の分娩を調査し、DFA III 給与による周産期疾病の予防効果を検討した。

第二節 材料および方法

試験 1

日本甜菜製糖株式会社総合研究所附属清川農場で飼養している 2 産以上のホルスタイン種乳牛 15 頭を用いた。供試牛は分娩予定の 60 日前に乾乳し、乾乳日から分娩予定 3 週間前(乾乳前期)と、その後分娩まで(乾乳後期)に分けてパドック付きのフリー・バーンで飼養した。すべての牛は試験期間中、チモシー主体 1 番乾草(DM 83.2 ~ 90.6%, DM 中 CP 5.3 ~ 9.5%, NDF 73.5 ~ 78.3%, Ca 0.16 ~ 0.31%, P 0.17 ~ 0.26%)を自由採食させた。乾乳期の配合飼料はカルシウム剤無添加の低カルシウム配合飼料(ヨーデルドライ, 日本甜菜製糖(株), 東京; DM 86.8%, DM 中 CP 25.5%, NDF 18.0%, Ca 0.19%, P 0.63%, Vitamin D₃ 3,000 IU/kg)と通常の搾乳牛用配合飼料のカルシウム含量と同水準にした常カルシウム配合飼料(イースター 20F, 日本甜菜製糖(株); DM 89.1%, DM 中 CP 24.7%, NDF 17.4%, Ca 1.06%, P 0.63%, Vitamin D₃ 3,000 IU/kg)の 2 種類を使用し、いずれか 1 種類の配合飼料を乾乳前期は 2 kg, 乾乳後期は 4 kg 給与した。

供試牛は以下のように 5 頭ずつ 3 群に分け、Table 6-1 に示した方法で飼養管理した。

第 1 群(低 Ca・後期 DFA + 分娩後 Ca・DFA)は低カルシウム配合飼料を乾乳全期間使用し、DFA III を乾乳後期に配合飼料 1 kg 当たり 12.5 g (50 g/日)添加し給与した。

第 2 群(常 Ca・全期 DFA + 分娩後 Ca・DFA)は常カルシウム配合飼料を乾乳全期間使用し、DFA III を配合飼料 1 kg 当たり 12.5 g (乾乳前期 25 g/日, 後期 50 g/日)添加し給与した。

第 3 群(常 Ca・後期 DFA)は常カルシウム配合飼料を乾乳全期間使用し、DFA III を乾乳後期に配合飼料 1 kg 当たり 12.5 g (50 g/日)添加し給与した。

第 1 群と第 2 群の牛には、分娩直後(0 時間)とその 6 時間後の採血終了後に第四章と同様、純度 97% の DFA III (日本甜菜製糖(株)) 90 g と炭酸カルシウム(日

Table 6-1 Formula feed calcium concentration and DFA III supply for dry period, and DFA III and calcium supplementation following parturition

	Far-off dry period	Close-up dry period	Following parturition
1st group			
Formula feed Ca concentration	0.19%	0.19%	DFA III and Ca oral administration ¹
DFA III	0 g	50 g supply	
2nd group			
Formula feed Ca concentration	1.06%	1.06%	DFA III and Ca oral administration ¹
DFA III	50 g supply	50 g supply	
3rd group			
Formula feed Ca concentration	1.06%	1.06%	DFA III and Ca non supply
DFA III	0 g	50 g supply	

¹ Water (250 mL) containing 90 g of DFA III and 100 g of calcium carbonate (Ca: 38%) was orally administered to the cows twice, immediately following parturition and 6 hours following parturition, in both cases after blood was collected.

鉄鋳業(株, 東京) 100 g を 250 mL の水に混合し経口投与した。

分娩後はグラスおよびコーンサイレージ主体の搾乳牛用 TMR (DM 51.4%, DM 中 CP 16.6%, NDF 34.4%, Ca 0.73%, P 0.50%) 20 kg と常カルシウム配合飼料 4 kg を給与した。乾草は乾乳期間中と同様、自由採食である。

採血は 10 mL 真空採血管を使用し、分娩前 5 日間の午前 9 時および分娩直後 (0) と 6, 24, 72 時間後に尾根部からおこなった。血液は採取後直ちに氷冷し、実験室で 3,500 rpm, 10 分間遠心分離した。血清は分析まで -30 °C で保存した。血清カルシウムは O-クレゾールフタレイン-コンプレクソン (OCPC) 法により日立 7350 自動分析装置 (株) 日立製作所, 東京) を使用し分析した。

データは平均 ± 標準誤差で表し、統計処理は JMP 4.0.5J (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) で行った。各群間の差異を一元配置法で検定した。また、それぞれの群内で、採血時間による血中カルシウム濃度の有意差を一元配置分散分析で

検定し、平均値間の差を Tukey の HSD 検定により多重比較した。

試験 2

北海道十勝支庁内の 4 農家 (Table 6-2) の協力を得て、対照年として 2004 年 4 月から 12 月の初産も含めた 295 分娩、試験年は 2005 年 1 月から 11 月末までの同じく 304 分娩、合計 599 の分娩について、分娩直前から分娩 7 日後までの疾病発生状況を農業共済組合の家畜診療データを用いて調査した。搾乳牛頭数は 30 頭から 190 頭と開きがあり、また乳量も約 8,000 kg 台が 3 軒、10,000 kg 台が 1 軒である。乾乳期間の飼養方法も様々で、乾乳の前期後期を一群管理している農家からフリーストールで前期と後期に分けている農家も含まれる。

DFA III の給与は低カルシウム配合飼料 4 kg に DFA III が 50 g 含まれるように混合した。配合飼料は朝・夕 1 日 2 回、2 kg ずつ、他の飼料とは混合せずに給与した。B 農家の乾乳前期後期一群管理の牛群は全乾乳期間を通じて、また前期と後期を分けて二群管理を行っている牛群は後期のみ給与した。なお、ケトーシスと脂肪肝は区別して取り扱うことは困難であるが (川村ら 2002)、家畜診療データは両診断名が記載されていたので両診断名を記載した。

Table 6-2 Outline of the dairy farms that examined DFA III feeding study

Farm	A	B	C	D
The number of lactation cows	30	110	60	190
Milk yield, kg/305 days	8,365	8,650	10,300	8,400
Period of DFA III feed supplied	Close-up	All dry period	Close-up	Close-up
Dry cows management	2 groups	1 group	2 groups	2 groups
	Free stool	Free barn	Tie stool	Free stool

第三節 結果

試験 1.

血中カルシウム濃度の推移を Figure 6-1 に示した. 各群間の同時点では有意差はみられなかった. 乾乳全期間, 低カルシウム配合飼料と乾乳後期に DFA III を給与した第 1 群は, 分娩直後の血中カルシウム濃度は 7.2 ± 0.7 mg/100mL と平均

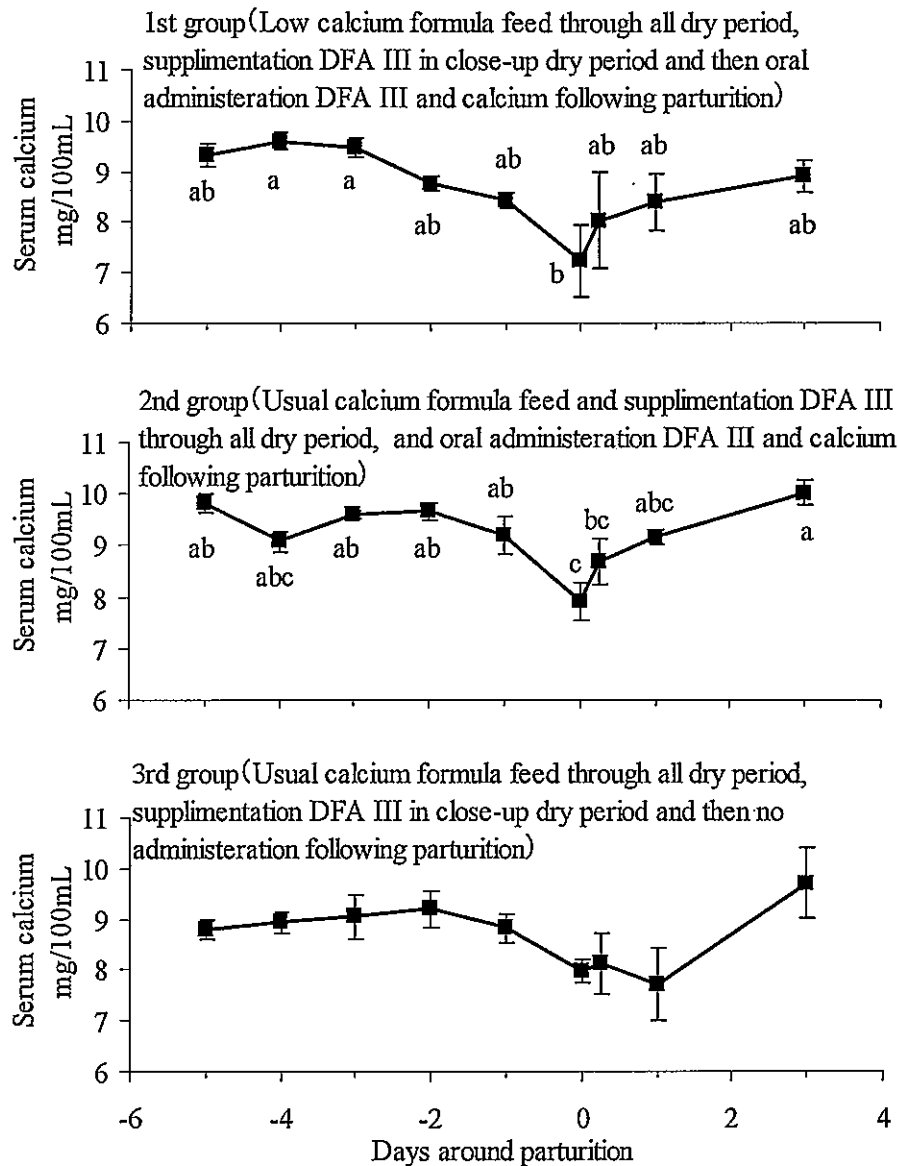


Figure 6-1 Serum calcium concentrations (mean \pm SE). Parturition occurred at 0 d. a-c Plots with different superscript letter differ at $P < 0.05$.

値ではあるが低カルシウム血症の範囲(GoffとHorst 1997a)(7.5 mg/100mL以下)に入った。これに対して、乾乳全期間通常のカルシウム濃度の配合飼料とDFA IIIを給与していた第2群の分娩直後の血中カルシウム濃度は 7.9 ± 0.4 mg/100mL、乾乳全期間通常のカルシウム濃度の配合飼料と乾乳後期にDFA IIIを給与していた第3群は 8.0 ± 0.2 mg/100mLまでしか低下しなかった。

分娩直後と6時間後にカルシウムとDFA IIIを経口投与した第1群と第2群の血中カルシウム濃度は分娩6時間後から上昇を続けたが、経口投与をしなかった第3群は、分娩24時間後の血中カルシウム濃度が 7.7 ± 0.7 mg/100mLと、0、6時間後よりも低下した。

試験2.

試験期間中の疾病発生頭数をTable 6-3に示した。A, B, C, D各農家の発生頭数は対象年が6, 13, 16, 96頭で合計131頭、分娩頭数に対する疾病発生割合が44.4%であったが、試験年は4, 18, 7, 83頭で合計112頭、分娩頭数に対する疾病発生割合が36.8%となり、合計では試験年の方がやや低下した。

低カルシウム血症が大きく影響する乳熱のA, B, C, D各農家の発生頭数は対照年がそれぞれ3頭(A農家の疾病発生頭数に対する割合は50.0%, 以下同様), 5頭(38.5%), 3頭(18.8%), 2頭(2.1%)で合計13頭(合計の疾病発生頭数に対する割合は9.9%)なのに対し、試験年は3頭(75.0%), 2頭(11.1%), 3頭(42.9%), 1頭(1.2%)で合計9頭(8.0%)になった。また、とダウン症候群は対照年が0頭(0.0%), 1頭(7.7%), 2頭(12.5%), 3頭(3.1%)で合計6頭(4.6%)なのに対し、試験年は0頭(0.0%), 1頭(5.6%), 1頭(14.3%), 0頭(0.0%)で合計2頭(1.8%)になり、低カルシウム血症が大きく影響する乳熱とダウン症候群の合計の発生頭数は、対照年の19頭(14.5%)から試験年の11頭(9.8%)に減少した。

Table 6-3 Occurrences of perinatal diseases and incidence of each disease for the perinatal diseases

[Control year (before conducted this study)]

Farm	Parturition	Total disease	Milk fever	Downer syndrome	Retained placenta	Displaced abomasum	Ketosis	Fatty liver	Dystocia	Puerperal fever	Others
Number of cows											
A	25	6	3						1		2
B	69	13	5	1		2	1			2	2
C	40	16	3	2		1	1		3	2	4
D	161	96	2	3	4	8	13	6	6	7	47
Total	295	131	13	6	4	11	15	6	10	11	55
Incidence of each disease for the perinatal disease, %											
A		100.0	50.0						16.7	0.0	33.3
B		100.0	38.5	7.7		15.4	7.7			15.4	15.4
C		100.0	18.8	12.5		6.3	6.3		18.8	12.5	25.0
D		100.0	2.1	3.1	4.2	8.3	13.5	6.3	6.3	7.3	49.0
Total		100.0	9.9	4.6	3.1	8.4	11.5	4.6	7.6	8.4	42.0
			14.5% (19/131)			27.5% (36/131)					
			42.0% (55/131)								

[Test year]

Farm	Parturition	Total disease	Milk fever	Downer syndrome	Retained placenta	Displaced abomasum	Ketosis	Fatty liver	Dystocia	Puerperal fever	Others
Number of cows											
A	29	4	3								1
B	79	18	2	1			1		2	2	10
C	45	7	3	1		1					2
D	151	83	1		1	3			6	8	64
合計	304	112	9	2	1	4	1	0	8	10	77
Incidence of each disease for the perinatal disease, %											
A		100.0	75.0								25.0
B		100.0	11.1	5.6			5.6		11.1	11.1	55.6
C		100.0	42.9	14.3		14.3					28.6
D		100.0	1.2		1.2	3.6			7.2	9.6	77.1
合計		100.0	8.0	1.8	0.9	3.6	0.9	0.0	7.1	8.9	68.8
			9.8% (11/112)			5.4% (6/112)					
			15.2% (17/112)								

低カルシウム血症が影響する可能性が高い周産期疾病の胎盤停滞は D 農家の

みの発生で、対照年は 4 頭 (4.2%) なのに対し、試験年では 1 頭 (1.2%) に、第四胃変位は B, C, D 各農家で対照年はそれぞれ 2 頭 (15.4%), 1 頭 (6.3%), 8 頭 (8.3%) の合計 11 頭 (8.4%) なのに対し、試験年では 0 頭 (0.0%), 1 頭 (14.3%), 3 頭 (3.6%) の合計 4 頭 (3.6%) に減少した。ケトーシスと脂肪肝を合わせた B, C, D 各農家の発生頭数は、対照年がそれぞれ 1 頭 (7.7%), 1 頭 (6.3%), 19 頭 (19.8%) で合計 21 頭 (16.0%) なのに対し、試験年では B 農家でケトーシス 1 頭 (5.6%) のみで合計 1 頭 (0.9%) に大きく減少した。低カルシウム血症が影響する可能性の高い周産期疾病である胎盤停滞、第四胃変位、ケトーシス、脂肪肝の合計は対照年の 36 頭 (27.5%) から試験年の 6 頭 (5.4%) に大きく減少した。結局、低カルシウム血症と関連した周産期疾病発生率は対照年 55 頭 (42.0%) から試験年 17 頭 (15.2%) に減少した。

第四節 考察

本試験で、乾乳全期間でカルシウム濃度の低い配合飼料を給与した第 1 群では乾乳後期に DFA III 50 g を給与していたにもかかわらず、他の試験区に比較して分娩前からカルシウム濃度が低くなる傾向を示し、分娩時には 5 頭の平均値ではあるが、7.2 mg/100mL 以下になった。第四章で示したように乾乳後期のみカルシウム濃度が低い配合飼料と DFA III 50 g を給与した場合、8.0 mg/100mL を維持している。Paracellular pathway のカルシウム吸収は濃度依存性なので、消化管内容物に十分なカルシウムが存在することが必要である。このため、DFA III が給与されていても腸管内カルシウム濃度が低ければ、その吸収量は低下すると考えられる。しかし、腸からのカルシウム吸収が低くなっても、骨などにカルシウムの体内蓄積が十分存在すれば、そちらからの供給が血中濃度の維持に働く可能性がある。乾乳前期からカルシウム濃度の低い配合飼料を給与した第 1 群では分娩後の回復も遅い傾向がみられた。このことから乾乳期間中にカルシウムの体蓄積を枯渇させるような飼養管理は分娩時の血中カルシウム濃度低下に大きな影響を与えられ

た。

血中カルシウム濃度は分娩時よりも分娩後 16 ～ 32 時間後の方が低下することが示されている(内藤 2004)。骨からの再吸収機能の回復は分娩後数日かかり、分娩直後は飼料からのカルシウムだけが血中への供給源であるとの報告もある(Goffら 1989)。今回の第 3 群でも、乾乳全期間、カルシウムが 1.06%含まれた配合飼料と乾乳後期には DFA III 50 g が給与されていたにもかかわらず、分娩直後と 6 時間後のカルシウムと DFA III の給与がなかったため、24 時間後には分娩時よりもその値は低下した。DFA III は水溶性なので、消化管内の通過は非常に早く、経口投与された DFA III は十二指腸では投与後 2 時間以内ピークに達し 6 時間以降検出されなかった(中井ら 2007)ので、給与を中止するとその効果はすぐに低下すると考えられる。これらのことから、第 1 群、特に第 2 群では、分娩後にも DFA III と高濃度のカルシウムが経口投与され、消化管内のカルシウム濃度が上がったことにより、腸管の paracellular pathway からのカルシウム吸収が増加し、より早く血中カルシウム濃度が回復したと考えられた。今回は実験を行っていないが、分娩後に DFA III を含んでいないカルシウムの経口投与も、腸管内容物のカルシウム濃度が上がり、paracellular pathway からのカルシウム吸収が増加すると考えられるため、血中カルシウム濃度の回復に有効だと考えられる。

実験 2 による野外試験では、乾乳期に給与された粗飼料中のカルシウム濃度は測定しておらず、カルシウム給与量が要求量を満たしていたかどうかは不明である。また分娩直後と 6 時間後のカルシウムと DFA III の経口投与は行っていない。しかし、DFA III を給与しなかった対照年よりも給与した試験年の方が乳熱やダウン一症候群、低カルシウム血症に伴う周産期疾病が減少した。分娩時の低カルシウム血症を抑制するだけでも筋肉の運動性や消化管の動きが維持される。これにより採食量の低下が抑制され、カルシウム摂取量が維持されてその後の周産期疾病発生の改善につながったのではないかと考えられた。少数例ではあるが、乳熱よりもダウン一症候群の減少が大きくなった。ラットでは、DFA III はカルシウム以外にも

マグネシウムなど他のミネラル吸収促進作用が確認されているので(Asvarujanon
ら 2005 ; Mitamura と Hara 2005), ダウナー症候群発生予防につながったのかも
しれない。しかし、乳量の高い C 酪農家では、例数が少ないが乳熱の発生頭数は
対照年、試験年とも 3 頭で、その効果は明白ではない。泌乳量が多いと乳中に流出
するカルシウム量も増え、分娩後数日間骨からのカルシウム補給は期待できず
(Goff ら 1989), 消化管からのカルシウム補給が間に合わなくなる。このような場
合、今回は野外では行っていないが、分娩後にもカルシウムと DFA III を給与するこ
とで、低カルシウム血症が予防できる可能性がさらに高まると考えられた。

結論として、分娩前3週間から分娩までは paracellular pathway からのカルシウ
ム吸収を増加させるオリゴ糖 DFA III を給与し、さらに、分娩後には消化管カルシウ
ム濃度を上げるために要求量以上のカルシウム剤と、DFA III の給与を行うことで、
潜在性を含めた分娩時およびその後の低カルシウム血症を予防することが可能で
あると考えられた。

第五節 小括

カルシウム含量の異なる配合飼料と DFA III の給与方法および分娩後に DFA III
とカルシウムの混合剤を経口投与することの有効性について、血中カルシウム濃度
の推移から検討した。また、一般酪農家で、乾乳期 DFA III 給与による周産期疾病
の予防効果を検討した。乾物中カルシウム含量 0.19%の配合飼料と乾乳後期に
DFA III を給与した第 1 群の分娩時血中カルシウム濃度は 7.2 mg/100mL であつ
た。一方、他の 2 群では、カルシウム含量 1.06%の配合飼料を給与し、乾乳前・後
期と分娩後にも DFA III を給与した第 2 群と、乾乳後期のみ DFA III を給与した第 3
群における分娩時の血中カルシウム濃度はそれぞれ 7.9 と 8.0 mg/100mL であつ
た。とくに、分娩後カルシウムと DFA III を経口投与しなかった第 3 群は、分娩 24 時
間後の血中カルシウム濃度が 7.7 ± 0.7 mg/100mL と、0, 6 時間後よりも低下し
血中カルシウム濃度の回復が遅延した。一般酪農家での DFA III の給与試験では、

診療頭数に対する低カルシウム血症と関連した周産期疾病発生率は、DFA III を給与していない対照年が 42%に対して、DFA III を給与した試験年は 15.2%に低下した。以上より乾乳期間に DFA III の給与、さらに分娩後にカルシウムと DFA III の混合剤を経口投与することで、分娩後の低カルシウム血症を軽減し、関連した周産期疾病の発生率を低下させる可能性が示唆された。

第七章 Difructose anhydride III の給与が泌乳牛の乳生産、体重、血液成分、乳房炎、蹄疾患および繁殖に及ぼす影響

第一節 緒言

DFA III は分娩牛の血中カルシウムやマグネシウム濃度に影響していることが確認され (Mineo ら 2004), ヒトやラットと同様, ウシにおいてもカルシウムとマグネシウムの吸収を亢進していると予想される。さらに, ラットを使った試験で, 亜鉛 (Mineo ら 2004) や鉄 (Asvarujanon ら 2005) での吸収亢進も報告されている。しかし, DFA III の効果はこれだけであろうか? 低カルシウム血症の劇的な改善作用から, 新しい効果に対する期待も高い。

乳牛の泌乳能力の向上はミネラル不足を助長している (NRC 2001)。さらに, 微量ミネラルである亜鉛, マンガン, 銅, コバルトの給与により, 産乳, 乳房炎, 蹄疾患, および繁殖が改善する (Nockels ら 1993; Nocek ら 2000; Uchida ら 2001)。牛で確認された DFA III のミネラルに対する効果は, 第四章および第五章に示した分娩牛の血清カルシウムとマグネシウムに関するものだけであるが, 泌乳牛の乳生産と健康改善に効果を持つ可能性も考えられる。そこで, 乳生産, 体重, 血液成分, 乳房炎, 蹄疾患, および繁殖に対し DFA III はどのように影響し, どのような効果を持つ可能性があるかを検討するために, 日本甜菜製糖株式会社総合研究所附属清川農場の泌乳牛を全て使用し, DFA III 給与試験を一年にわたって行った。

なお, 清川農場では飼料給与を個体ごとに管理することができず, 採食量の把握は群単位でもできない。このため, 泌乳牛を使った試験で最も基本となる栄養摂取量の点から結果を考察することができなかつた。また, 個体差による結果への影響を小さくするために支障がない限り搾乳牛を試験に組み入れ, 調査期間を 1 年とした。このため, DFA III 給与処理間で統計処理するための斉一性が十分に保たれず実験条件を満たしていない項目も多い。しかし, 泌乳牛に対する効果の可能性を示し, 今後の DFA III 研究の指針とすることを目的に本実験を実施した。

第二節 材料および方法

1. 供試動物と試験区分

試験は 2008 年 5 月から 2009 年 5 月まで、日本甜菜製糖株式会社総合研究所 附属清川農場で実施した。試験開始直前の乳牛データを基に、全搾乳牛を分娩後の日数、305 日乳量、産次などがほぼ等しくなるように 3 群に分け、受胎を確認した育成牛(未経産牛)についても、出産日を基に交互に各群に配置されるように振り分けた(Table 7-1)。これらの 3 群にそれぞれ、DFA III 粗シラップ(日本甜菜製糖(株)、東京;純度 97%の DFA III 製品を製造する過程で産出される液;固形分 65%, DFA III 33%含有)とビートパルプを 55 対 45 の割合で混合し、これを乾燥し作成した DFA III 混合飼料(DFA III 20%含有)を 1 頭・1 日当たり 0, 200 (DFA III として 40 g), および 400 g (DFA III として 80 g) 給与し、それぞれ DFA0, DFA40, および DFA80 とした。

Table 7-1 Days in milk, milk yield, number of parity, and number of cows in the each lactation number in groups

	Treatment ¹			P
	DFA0	DFA40	DFA80	
Days in Milk, d	232	239	246	0.957
Milk yield, kg/305 d	9,621	9,629	9,630	1.000
Number of parity	2.57	2.79	2.71	0.945
Lactation number, number of cows				
0	2	3	3	
1	5	4	5	
2	3	3	3	
3	2	2	1	
4	2	3	3	
>4	2	2	2	

¹ Treatment: DFA0 = 0 g of DFA III, DFA40 = 40 g of DFA III, DFA80 = 80 g of DFA III.

2. 給与飼料

給与飼料の主体はグラスサイレージ、コーンサイレージと、泌乳牛用配合飼料（イースター 18F，日本甜菜製糖(株)）などを混合した Table 7-2 の TMR で、これを全頭に給与した。この TMR は日乳量約 40 kg の生産に必要な養分を含有しており、粗飼料割合は 47.3%で、CP 中溶解性蛋白質は 53%、飼料設計ソフト Spartan ration evaluator / balancer for dairy cattle 2.0 (Michigan state university, East Lansing, MI, USA) で求めた CP 中バイパス蛋白質は 33.5%であった。TMR は朝夕 1 日 2 回に分け、次の給餌まで飼料が残る量をパドックの飼槽で給与した。

この他、搾乳時に牛舎内でイースター 18 ; 500 g を全頭に給与し、合わせて試験区分にしたがい、DFA III 混合飼料を 1 日分の半量、給与した。チモシー 1 番乾草は不断給餌とし、パドックの草架に常時配置した。

3. 飼養管理

牛は搾乳のため 5 時と 15 時、1 回当たり約 1 時間 30 分牛舎に係留した。この

Table 7-2 Ingredient and chemical composition of the TMR

	TMR
Ingredient composition of the TMR, % of DM	
Grass silage	15.3
Corn silage	32.0
Yeaster 18 ¹	28.7
New super M ¹	11.8
New culture ¹	11.5
Tricalcium phosphate	0.3
Yeast hi-mix ¹	0.4
Chemical composition of TMR	
Dry matter, %	47.0
Crude protein, % of DM	17.0
NEI, Mcal/kg of DM	1.69
Nonfiber carbohydrate, % of DM	38.3
Starch, % of DM	21.3
Neutral detergent fiber, % of DM	33.7
Calcium, % of DM	0.67
Phosphate, % of DM	0.47

¹ Yeaster 18: formula feed for lactation cows, New super M: supplement feed for lactation cows, New culture: beet pulp mixed feed, Yeast hi-mix: yeast, vitamin, and trace mineral complex feed, produced by Nippon Beet Sugar Mfg., Co., Ltd, Tokyo.

係留以外、牛は牛舎外のパドックに放飼した。パドックは水槽、飼槽、牛床があり、牛はこの中で自由に行動することができた。なお、試験を開始した5月から11月まで10～15時の間、雨天でなければ放牧を行った。

4. 調査および分析方法

体重は毎週水曜日14時に計量した。

乳量は毎月下旬に1回、水曜日夕方と翌木曜日朝に乳量を計量し、1日の産乳量とした。この2回の乳を混合し、乳成分測定に用いた。これ以外の水曜日、夕方は毎週乳量を計量し、下の①式を用いて日乳量とした。

$$\text{日乳量} = (1 + (\text{夕} \sim \text{朝の搾乳間隔}; 14\text{時間}) \div (\text{朝} \sim \text{夕の搾乳間隔}; 10\text{時間})) \times \text{夕方搾乳量} \cdots \text{①}$$

血液は分娩1日前、分娩直後、1、2、3、5、7日後、その後は火および金曜日の週2回、分娩109日後まで、朝の搾乳時に尾根部から真空採血管で採取した。採取した血液は直ちに氷冷し、実験室で3,500 rpm、10分遠心し、血清を分析まで-30℃で保存した。

蹄疾患の調査は試験開始直前の2008年5月21日、試験中の11月28日、試験終了直前の2009年5月29日の削蹄時に行った。

乳成分は十勝農協連生乳検査センター(帯広)で分析した。血液の総蛋白質は血清蛋白屈折計(株)アタゴ、東京)で、カルシウム、リン、マグネシウム、血糖、総コレステロール、遊離脂肪酸および尿素窒素は和光純薬工業(株)(大阪)の生化学検査試薬;カルシウム E-テストワコー、ホスファ C-テストワコー、マグネシウム B-テストワコー、グルコース C II-テストワコー、コレステロール E-テストワコー、NEFA C-テストワコー、および尿素窒素 B-テストワコーで分析した。蹄疾患の判定は眞鍋弘行削蹄師が行い、乳房炎および繁殖は飼養管理の記帳データを使用した。

統計処理は JMP 4.0.5J (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を使用し、一元配置分散分析で検定し、平均値間の差を Tukey の HSD 検定により多重比較した。

第三節 結果と考察

1. 乳量および体重

Table 7-3, Figure 7-1 および 7-2 の乳量と体重は試験期間に連続で、分娩から 140 日間(泌乳初期～中期)測定できた 23 頭と、分娩後 147 日から 252 日までの期間(泌乳中期～後期)測定できた 20 頭に分け比較した。なお、初産牛は乳量および体重が経産牛と大きく異なるため、集計には使用しなかった。

分娩から 140 日間(泌乳初期～中期)の牛においての乳生産能力は前産の 305 日乳量で比較し、各群間に差はなく、泌乳初期から中期の 1 日当たり乳量(今産日みられなかったが、本試験の 1 日当たり乳量は DFA80 が DFA0 および DFA40 より有意に増加した(Table 7-3 および Figure 7-1)。

Table 7-3 Milk yield for 0 ~ 140 days in milk (early- mid lactation period) and 147 ~ 252 days in milk (mid-late lactation period)

	Treatment ¹			P
	DFA0	DFA40	DFA80	
Early-mid lactation				
Number of cows	7	8	8	
Milk yield				
Previous lactation, kg/305 d	10,415	10,212	10,536	0.933
Present lactation, kg/d	44.0	43.3	44.6	0.522
Mid-late lactation				
Number of cows	8	6	6	
Milk yield				
Previous lactation, kg/305 d	10,465	10,217	11,032	0.639
Present lactation, kg/d	35.5 ^b	35.4 ^b	38.4 ^a	0.007

¹Treatment: DFA0 = 0 g of DFA III, DFA40 = 40 g of DFA III, DFA80 = 80 g of DFA III

^{a,b} Means in the same row with different superscript letter differ at $P < 0.05$.

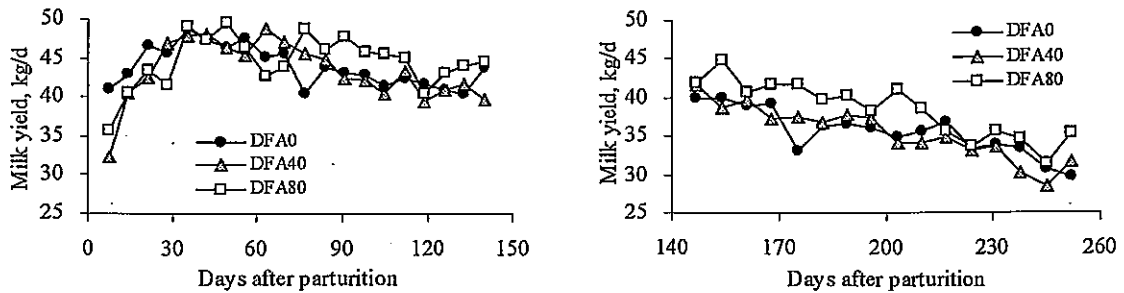


Figure 7-1 Milk yield for 0 ~ 140 days in milk (early-mid lactation period) and 147 ~ 252 days in milk (mid-late lactation period). DFA0 = 0 g of DFA III, DFA40 = 40 g of DFA III, DFA80 = 80 g of DFA III.

体重は分娩後 2 ~ 4 週に最少となり、その後回復した。体重が最少になった後の 1 日当たり増体重は、Figure 7-2 の回帰直線の傾きから、泌乳初期から中期の DFA0; 138 g, DFA40; 407 g, DFA80; 442 g で、泌乳中期から後期は DFA0; 292 g, DFA40; 323 g, DFA80; 332 g と、DFA III を給与した 2 群の回復が DFA III 無給与の DFA0 よりもやや高い傾向にあった。

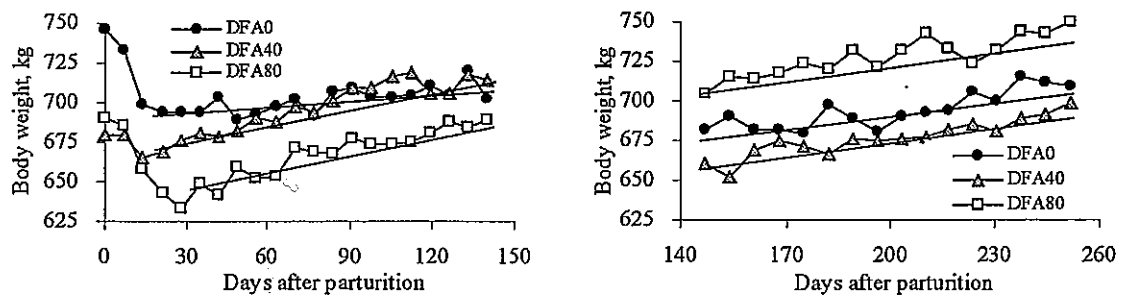


Figure 7-2 Body weight for 0 ~ 140 days in milk (early-mid lactation period) and 147 ~ 252 days in milk (mid-late lactation period). DFA0 = 0 g of DFA III, DFA40 = 40 g of DFA III, DFA80 = 80 g of DFA III.

2. 乳量検定成績

Table 7-4 は月一回実施している乳量検定の、2008 年 6 月から 2009 年 5 月まで 12 回のデータを、DFA III 給与処理ごとに単純平均した結果である。乳量、乳脂

肪、乳糖は DFA40 および DFA80 が DFA0 よりやや高い傾向にあり、305 日乳量も多かったが、無脂固形分と乳蛋白は DFA0 が DFA40 および DFA80 よりやや高かった。乳質に影響し、乳房炎の指標でもある体細胞数は DFA0 が 260,000 個/mL と DFA40 の 99,000 個/mL、DFA80 の 148,000 個/mL よりも高い傾向にあった。乳中のミネラルにおいて、カルシウムとマグネシウム濃度は処理群間に差がみられ ($P < 0.05$)、DFA80 は DFA0 および DFA40 よりも高く、一日当たり、乳中に移行したカルシウムは DFA0; 32.9 ± 0.9 g, DFA40; 33.6 ± 0.9 g, および DFA80; 37.0 ± 1.0 g で、マグネシウムは DFA0; 3.8 ± 0.1 g, DFA40; 3.8 ± 0.1 g, および DFA80; 4.1 ± 0.1 g であった。

乳糖とミネラルは浸透圧を高め(古村 2006), 乳量増加に最も影響する成分であり、低い体細胞数も乳生産を高める(Philpot と Nickerson 2001) ために効果を持つ。乳糖と体細胞に対する DFA III の影響はまだ不明であるが、体重回復の面から

Table 7-4 Monthly milk recording data from June 2008 to May 2009

	Treatment ¹			P
	DFA0	DFA40	DFA80	
Milk yield, kg/d	34.9	35.2	36.3	0.525
Fat, %	3.73	3.91	3.75	0.060
Solids-not-fat, %	8.88	8.83	8.78	0.608
Crude protein, %	3.39	3.30	3.22	0.402
Lactose, %	4.49	4.52	4.56	0.767
Calcium, mg/100mL	94.8 ^b	96.7 ^b	101.7 ^a	0.002
Calcium, g/d	32.9 ^b	33.6 ^b	37.0 ^a	0.004
Magnesium, mg/100mL	10.9 ^b	11.0 ^b	11.4 ^a	0.021
Magnesium, g/d	3.8 ^b	3.8 ^b	4.1 ^a	0.009
Somatic cell count, ×1,000 cells/mL	260	99	148	0.054
Milk yield, kg/305 d	10,174	10,398	10,426	0.486

¹ Treatment: DFA0 = 0 g of DFA III, DFA40 = 40 g of DFA III, DFA80 = 80 g of DFA III.

^{a,b} Means in the same row with different superscript letter differ at $P < 0.05$.

採食量の増加が予想され、微量ミネラル摂取の増加による免疫機能(Sharman ら 2008)や健康維持による効果が影響した可能性が考えられた。

3. 分娩後の血液成分

試験開始から 2009 年 2 月 11 日の間に分娩し、109 日間の採血を終了した牛は DFA0; 11 頭, DFA40; 12 頭, DFA80; 10 頭である。これらの血液成分で DFA III 給与処理間に有意差が認められたのは、リンの乾乳期と分娩 5 日後、マグネシウムの分娩 5 日後、総コレステロールの乾乳期、遊離脂肪酸の分娩 7 日後、および血清尿素態窒素の分娩 1 日後であった。

カルシウムは乾乳期と比較し、各群とも分娩直後および 1 日後、有意に低下した。分娩 2 日後約 9.5 mg/100mL に回復したが、泌乳期間は 10 mg/100mL 以上で推移しており、血中カルシウム濃度が安定するのは分娩 14 ~ 17 日後以降と考えられた(Figure 7-3)。

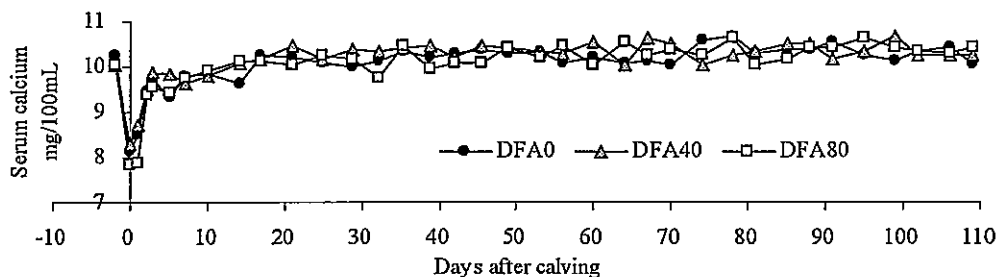


Figure 7-3 Changes in serum calcium concentration in cows treated with 0 g (●), 40 g (▲) and 80 g (□) of DFA III.

リンは各群とも乾乳期 5 ~ 6 mg/100mL が、分娩時 4 mg/100mL 前後に低下し、3 日後約 6 mg/100mL に一時的な上昇があり、5 ~ 7 日後約 5 mg/100mL に低下した後、徐々に 6 mg/100mL に向かって増加する傾向がみられた(Figure 7-4)。なお、分娩直後と比較し、分娩 3 日後のリンは各群とも有意に上昇した。血中のカル

シウムが低下すると副甲状腺ホルモン(PTH)が分泌され、骨組織からカルシウムが再吸収される。リンもまた骨の構成成分であるため血中のリン濃度は増加する(干勝と松本 1999)。分娩 3 日後のリン増加は PTH による骨からの供給が反映しているのではないかと考えられた。

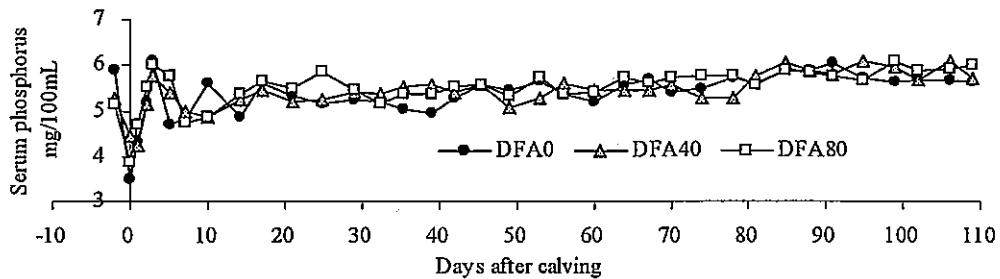


Figure 7-4 Changes in serum phosphorus concentration in cows treated with 0 g (●), 40 g (▲) and 80 g (□) of DFA III.

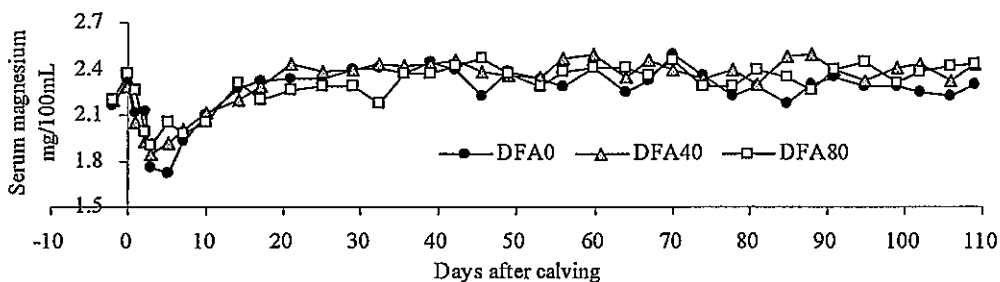


Figure 7-5 Changes in serum magnesium concentration in cows treated with 0 g (●), 40 g (▲) and 80 g (□) of DFA III.

マグネシウムは乾乳期と比較し、分娩時に一時的な増加があり、その後 3 ~ 5 日に最低となり、回復には分娩後 21 日目頃までかかった (Figure 7-5)。乾乳期にマグネシウムを十分摂取していると、分娩時にマグネシウムは一時的に増加 (Stabel ら 2002) する。しかし、マグネシウムの体内蓄積は少なく、飼料から供給されなければならない (NRC 2001)。分娩後 3 ~ 5 日にかけてのマグネシウム低下

は、乳量の増加に飼料摂取量が対応できず低下しているのかもしれない。DFA40 および DFA80 は DFA0 よりも、分娩後の血中マグネシウム低下が少ない傾向にあり、分娩 5 日後には DFA80 と DFA0 間に有意差がみられるなど、DFA III 給与が分娩後の飼料摂取量の低下抑制に効果を持つ可能性が示唆された。

血清中の総蛋白質と総コレステロールは分娩から 1 日後にかけ低下した後、増加し、総蛋白質は 7.0 ~ 7.5 g/100mL、総コレステロールは 170 ~ 210 mg/100mL の値となった (Figure 7-6 および 7-7)。これに対し、血糖、遊離脂肪酸、尿素窒素は分娩時に一時的な増加がみられた (Figure 7-8, 7-9 および 7-10)。総蛋白質と総コレステロールの低下および、遊離脂肪酸の増加は飼料摂取量の低下と乳生産の増加による蛋白質およびエネルギーの不足が影響する (岡田 2005) ことから、充足するまでに蛋白質は 40 ~ 50 日、エネルギーは 60 ~ 100 日を要したと予想される。血糖はストレスで高まり (岡田 2005)、分娩に伴う反応として分娩の 24 時間前頃から増加するため、分娩予測に利用されている (松井ら 2001)。尿素窒素の増加はエネルギー不足や肝機能の低下が原因といわれている (岡田 2005)。しかし、肝機能の低下であれば長期にわたって尿素窒素は高値を示すと考えられるが、分娩後 3 日以内に尿素窒素は低下しており、分娩時の採食量低下によるエネルギー不足が影響したものと考えられた。

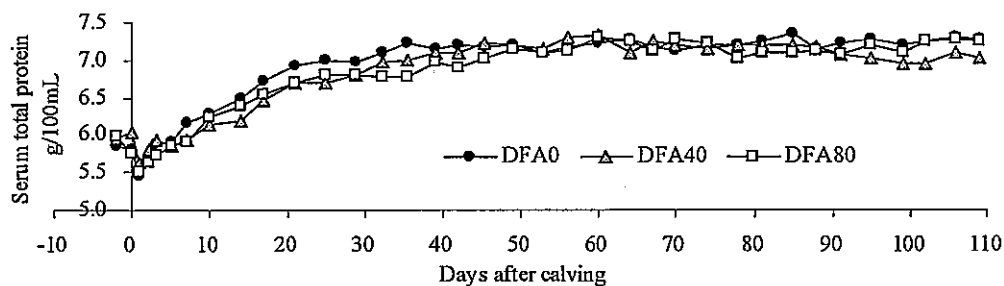


Figure 7-6 Changes in serum total protein concentration in cows treated with 0 g (●), 40 g (▲) and 80 g (□) of DFA III.

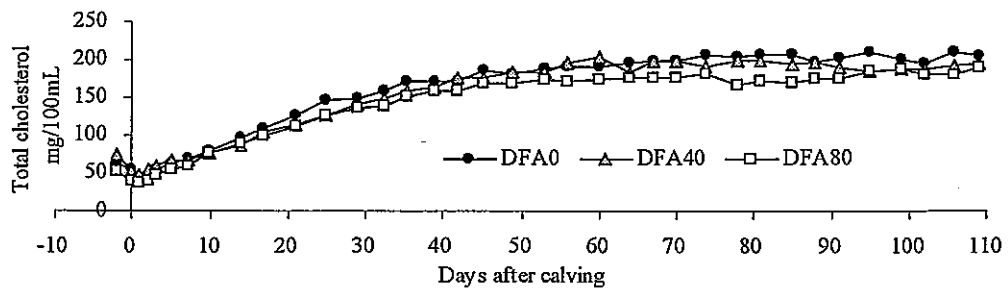


Figure 7-7 Changes in total cholesterol concentration in cows treated with 0 g (●), 40 g (▲) and 80 g (□) of DFA III.

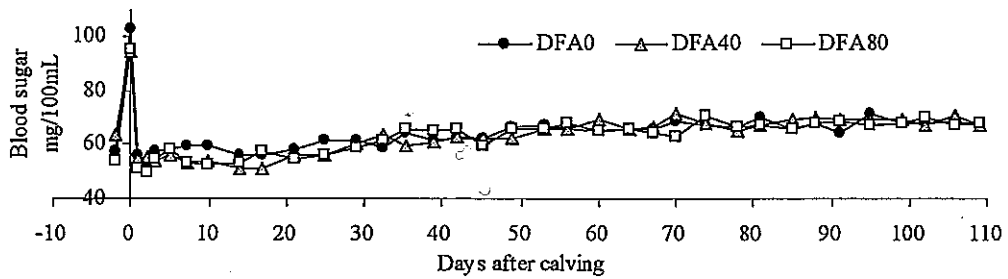


Figure 7-8 Changes in blood sugar concentration in cows treated with 0 g (●), 40 g (▲) and 80 g (□) of DFA III.

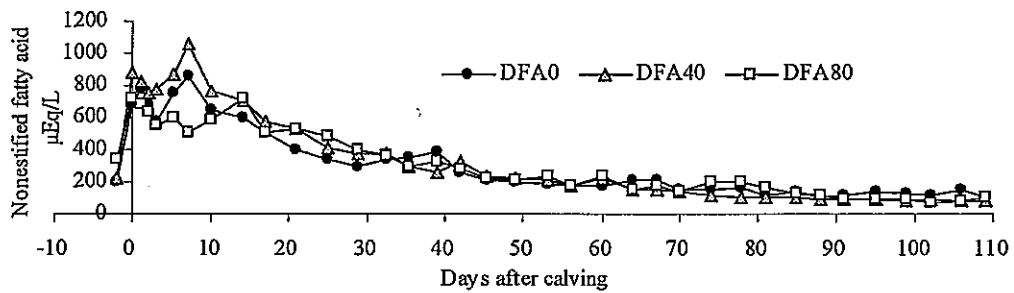


Figure 7-9 Changes in nonesterified fatty acid concentration in cows treated with 0 g (●), 40 g (▲) and 80 g (□) of DFA III.

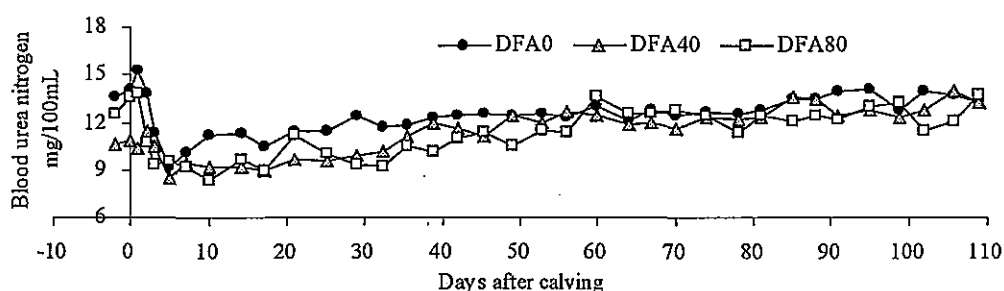


Figure 7-10 Changes in blood urea nitrogen concentration in cows treated with 0 g (●), 40 g (▲) and 80 g (□) of DFA III.

4. 乳房炎

試験を開始した2008年5月23日を境に、その前年；2007年6月～2008年5月までを対照年とし、DFA0、DFA40およびDFA80の対象牛の乳房炎を調査した。その結果、乳房炎の分房数、治療回数および乳廃棄日数とも群間に差はみられなかった。一方、試験期間中の乳房炎は、乳房炎の分房数、治療回数および乳廃棄日数ともDFA III 給与処理で有意差 ($P < 0.01$) があり、治療回数および乳廃棄日数はDFA40およびDFA80がDFA0より有意に少なかった ($P < 0.05$)。

分娩前、胎子を異物として排除しないために免疫は抑制の状態にある。また、分娩後はエネルギーや蛋白質、ビタミンおよびミネラルなどの要求量が増大し、免疫機能維持に必要な栄養素が不足しやすい。そのため、ビタミンやミネラルの増給による免疫機能の改善事例が、これまで多数報告 (Nockelsら1993；Weiss 2005) されている。本試験においても、乳房炎は分娩後の早い時期ほど発生が多い傾向にあるが (Figure 7-11)、治療回数合計に占める分娩から50日間の治療回数の割合は、対照とした試験前年が41%であるの対し、試験年は32%に減少した。DFA III 給与によって、乳中に移行するカルシウムおよびマグネシウム量が増加しており、他の微量ミネラルの吸収量が増加した可能性も予想される。DFA III 給与によるこれらミネラル吸収の増加が乳房炎を減少させたのかもしれない。

Table 7-5 Effect of DFA III supplementation on mastitis of lactating cows

	Treatment ¹			<i>P</i>
	DFA0	DFA40	DFA80	
In the previous year of this study				
Number of cows	14	13	13	
Clinical mastitis				
Number of cows	10	8	5	
Number of quarters	13	11	9	0.737
Treatment of mastitis	21	14	10	0.334
Total days of discard milk	215	116	71	0.095
In this study				
Number of cows ²	17 (3)	17 (4)	16 (3)	
Clinical mastitis				
Number of cows ²	14 (6)	7 (2)	6 (3)	
Number of quarters ²	23 ^a (16)	12 ^{ab} (6)	8 ^b (6)	0.008
Treatment of mastitis	38 ^a	14 ^b	10 ^b	0.010
Total days of discard milk	388 ^a	140 ^b	93 ^b	0.005
This study/previous year, %				
Clinical mastitis				
Number of cows	140	88	120	
Number of quarters	177	109	89	
Treatment of mastitis	181	100	100	
Total days of discard milk	180	121	131	

¹ Treatment: DFA0 = 0 g of DFA III, DFA40 = 40 g of DFA III, DFA80 = 80 g of DFA III.

² Number in parentheses represents new disease occurrence cows and quarters after this study.

^{a,b} Means in the same row with different superscript letter differ at $P < 0.05$.

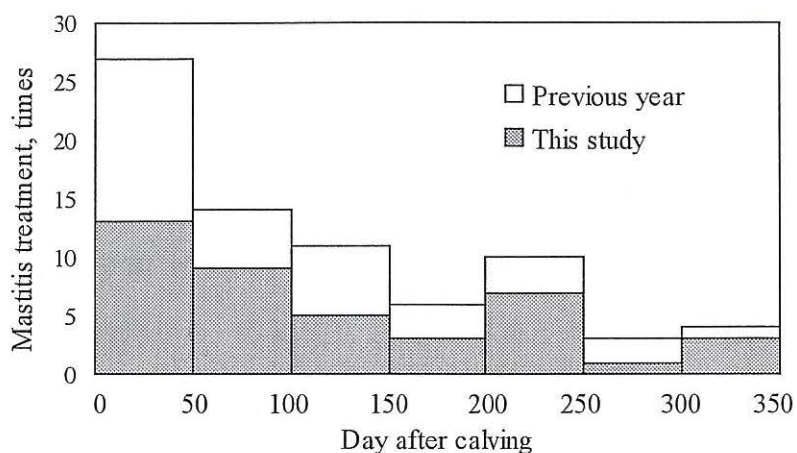


Figure 7-11 Mastitis treatment after calving.

5. 蹄疾患

蹄疾患調査は試験開始直前(開始前)の 2008 年 5 月 21 日, 試験中(中期)の 2008 年 11 月 28 日, および試験終了直前(終了前)の 2009 年 5 月 29 日の計 3 回, 削蹄にあわせて実施した. 結果の集計は, 3 回の調査を全て受けた牛 34 頭について行った. 蹄質が影響する蹄疾患は, 白帯病(蹄壁が白帯部分から遊離し起こす炎症)が終了前, DFA0 で 2 蹄に見られた以外は, 全て蹄底潰瘍(蹄底部に生じる潰瘍)であった. 細菌による感染性の蹄疾患は, ヘアリーアタック(白帯の感染症)が DFA40 の同一牛の同一 1 蹄で中期および終了前に見られ, 趾間フレグモーネ(趾間皮膚から深部への感染)が DFA0 の中期に 1 蹄で見られた以外は, 全て趾皮膚炎(趾間および蹄球に隣接する趾間隆起部に発生するスピロヘータ様細菌による感染症)であった.

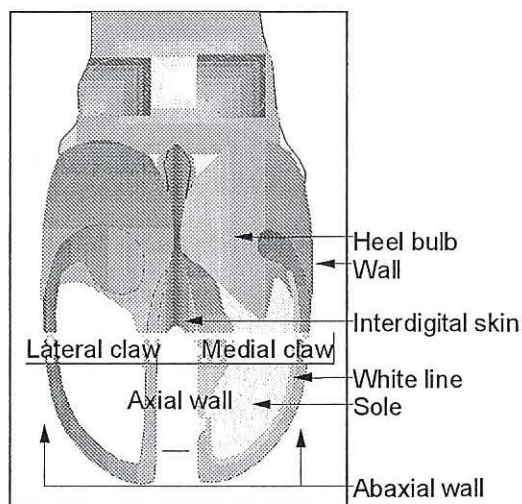


Figure 7-12 Structure of cattle hoof.

調査対象牛において蹄質が影響する蹄疾患は、開始前 0 蹄であったが、中期 4 蹄、終了前 9 蹄に増加した。この蹄疾患の発生は DFA III の給与で異なる傾向がみられ、DFA III を給与しない DFA0 が最も多く、DFA III を最も多く給与した DFA80 が終了前で 1 蹄と最も少なかった。一方、感染性の蹄疾患は開始前 19 蹄に見られ、中期 22 蹄、終了前 10 蹄で、DFA III 給与による差はみられなかった (Table 7-6)。なお、試験開始時から、感染性の趾間皮膚炎予防と治療のため、10%硫酸銅溶液による蹄消毒を週 2 回行った。

Table 7-6 Effect of DFA III supplementation on claw disease

	Treatment ¹			P
	DFA0	DFA40	DFA80	
Number of cows	12	12	10	
Claw disease that hoof quality influences, number of hooves				
Before initiation of treatments	0	0	0	
Middle period in this study ²	2 (2)	1 (1)	0 (0)	0.291
At expiration of this study ²	5 (3)	3 (2)	1 (1)	0.302
Infectious claw diseases, number of hooves				
Before initiation of treatments	9	7	3	0.288
Middle period in this study ²	8 (4)	10 (8)	5 (4)	0.578
At expiration of this study ²	2 (0)	4 (0)	4 (2)	0.528

¹ Treatment: DFA0 = 0 g of DFA III, DFA40 = 40 g of DFA III, DFA80 = 80 g of DFA III.

² Number in parentheses represents new disease occurrence claw.

蹄質が影響する疾患に「かかる確率; p」と、「かからない確率; 1 - p」の比「p ÷ (1 - p)」からオッズ (odds) を求め、DFA III 無給与の DFA0 の「odds ÷ (DFA40 あるいは DFA80 の odds)」から、DFA III を摂取した DFA40 および DFA80 は摂取しない DFA0 に比べて、どのくらい蹄質が影響する疾患にかかりにくいかを求めた (odds ratio)。DFA40 は DFA0 の約 2 倍、DFA80 は約 4 倍蹄質が影響す

る蹄疾患にかかりにくいと考えられた (Table 7-7).

Table 7-7 Odds ratios that is resistant to claw disease affected by hoof quality for DFA III treatments

	Treatment ¹		
	DFA0	DFA40	DFA80
Odds			
Before initiation of treatments	0.00	0.00	0.00
Middle period in this study	0.04	0.02	0.00
At expiration of this study	0.12	0.07	0.03
Odds ratio			
Middle period in this study		2.00	—
At expiration of this study		1.70	4.50

¹ Treatment: DFA0 = 0 g of DFA III, DFA40 = 40 g of DFA III, DFA80 = 80 g of DFA III.

蹄はケラチンタンパク質からなり、この構造を強化する栄養としてはビオチン (Midla ら 1998) と、ミネラルでは亜鉛 (Nocek ら 2000) がある。本試験では亜鉛の分析を行っていないため、DFA III と蹄疾患の関係を亜鉛の点から検討できない。しかし、カルシウムも蹄角質の表皮でケラチノサイトが分化する際に必要で、欠乏すると角質の成熟が影響を受ける (Van Amstel と Shearer 2008) といわれている。本試験ではカルシウム吸収量の増加が、乳中カルシウムの増加から示唆されており、蹄質強化にも DFA III が関与した可能性が考えられた。

6. 繁殖

2008 年 5 月 22 日～2009 年 2 月 27 日の試験期間中に分娩した牛は 37 頭で、その内 31 頭を繁殖に供用した。受胎を確認した牛は 29 頭で、DFA0 の 2 頭は受胎させることができず廃用した。

血中プロゲステロンの変化から推測した初回排卵日は分娩後 10 ~ 78 日の範囲にあり、平均 28 日で処理間に差はなかった。繁殖に供用した牛は全て人工授精を行い、初回授精日は分娩後平均 83 日、初回受胎率は 45% で処理間に差はなかった。受胎牛において、授精回数は平均 2.2 回、空胎日数は分娩後 137 日で、これらの値においても処理間に差異はみられなかった (Table 7-8)。初回排卵が分娩後 40 日以上かかった牛は DFA0 の 1 頭、DFA40 の 3 頭、および DFA80 の 2 頭で、この 6 頭平均の初回排卵は分娩後 57 日、305 日乳量 11,895 kg、分娩時の体重 646 kg、分娩 60 日後の体重 628 kg、分娩後 60 日間の最少体重は 591 kg であり、初回排卵日が 39 日以内だった牛の 21 日、11,210 kg、693 kg、668 kg、642 kg と比較し、産乳量、体重の減少量、および減少からの体重増加とも大きな差異はなく、初回授精 87 日、授精回数 2.7 回、受胎日 157 日で 6 頭全て受胎した。

Table 7-8 Effect of DFA III supplementation on reproduction performance of the lactating cows

	Treatment ¹			P
	DFA0	DFA40	DFA80	
Parturition cows	13	14	10	
Breeding cows	11	12	8	
First ovulation, day	26±5	32±5	25±6	0.641
First service, day	85±11	84±11	79±13	0.082
First service conception rate, %	45	42	50	0.941
Conception cows				
Number of cows	9	12	8	
Service per conception	2.1±0.6	2.3±0.5	2.4±0.6	0.947
Days open	132±26	144±22	134±28	0.922
Non-conception cows				
Number of cows	2			
Service	5.5			
Final service day	215			

Values are mean ± SE.

¹ Treatment: DFA0 = 0 g of DFA III, DFA40 = 40 g of DFA III, DFA80 = 80 g of DFA III.

Uchida ら(2001)は高泌乳牛に微量ミネラルの亜鉛、マンガン、銅と、コバルトを給与し、初回授精、授精回数、空胎日数が改善したことを報告している。本試験でも DFA III 給与により繁殖に対する効果を期待したが、DFA III 給与による差異はみられなかった。供試牛は全て初回排卵が認められ、授精は 1 回以上行った。しかし、DFA0 では 2 頭の牛が受胎せず、受胎牛の授精回数と空胎日数から、これらの牛の数値は除外している。

第四節 小括

本試験は泌乳牛に対する DFA III の給与効果確認を目的としており、DFA0、DFA40 および DFA80 の群間において分娩時血清カルシウム濃度に差異はなかった。分娩後 DFA III を給与した DFA40 および DFA80 は、給与しなかった DFA0 と比較し、泌乳中期から後期の乳量が多く、泌乳全期間にわたり体重増加も多い傾向がみられた。DFA III 給与牛は分娩後の血清マグネシウム濃度低下が少なく、飼料摂取量の増加が示唆され、乳量や体重増加に影響した可能性があると考えられた。また、DFA III 給与によって、乳中のカルシウムおよびマグネシウムが増加し、乳糖も増加する傾向にあり、これらも乳量増加に影響したものと考えられた。乳房炎や蹄疾患の発生でもやや改善効果がみられ、健康改善が乳量向上や体重回復に影響した可能性も考えられる。繁殖に差異はみられなかったが、DFA III を給与しなかった DFA0 では 2 頭を未受胎を理由に廃用したが、DFA40 および DFA80 では全頭受胎させることができた。

第八章 Difructose Anhydride III の給与が出生子牛の血清免疫グロブリン G 濃度に及ぼす影響

[本章の内容は *Journal of Dairy Science* に掲載予定 (in press) である]

第一節 緒言

免疫は感染や病気から体を守る生体防御機能である。新生子は自己免疫機能が確立されておらず、母親の免疫グロブリンを受動免疫として受け継ぐ。ヒトの胎児は胎盤を経由して母親の免疫グロブリンを取得する。しかし、ウシ、ヒツジ、ブタなど、有蹄類は胎盤が免疫グロブリンを通さず、これらの動物は出生後初乳を飲み、免疫グロブリンを獲得する。子牛の免疫グロブリン吸収は生後 24 ~ 36 時間しか続かず (Stott ら 1979)、非常に短時間で終了する。また、この免疫グロブリン吸収は初乳中の免疫グロブリン濃度、免疫グロブリン摂取量、生まれてから初乳を摂取するまでの時間、子牛の遺伝的、および生理的な環境などの影響を受ける (Kruse 1970; Stott ら 1976; Stott と Fellah 1983; Jaster 2005)。子牛が十分な免疫グロブリンを獲得するため、これらの現象面から初乳給与についての提案 (NRC 2001) がある。しかし、健康やその後の生存が影響を受ける受動免疫移行の失敗といわれる、生後 24 時間目の血中免疫グロブリン G 濃度が 10 mg/mL に達しない子牛も少なくない (Brignole と Stott 1980)。

新生子の免疫グロブリン吸収は、小腸上皮細胞内に取り込まれ体内に吸収されるトランスサイトーシスといわれている (Staley と Bush 1985)。上皮細胞への取り込みに際し、選択性のある特異的受容体を介したトランスサイトーシス; specific receptor-mediated transcytosis と、選択性をもたない非特異的トランスサイトーシス; nonspecific transcytosis の2つの方法で行われ (Pácha 2000)、どちらで吸収されるかは動物で異なる。Jakoi ら (1985) はラットの腸細胞から免疫グロブリン G と結合する蛋白質の分離抽出を報告し、齧歯類においてその吸収は選択的であることを示した。一方、子牛は受容体が確認されず、またいろいろな蛋白質が吸収される

ことから非特異的で選択性をもたないと考えられている(Staley と Bush 1985)。

本報告は出生子牛の免疫グロブリン G 吸収に及ぼす DFA III の効果を検討するものである。DFA III は上皮細胞のタイトジャンクションに作用し、細胞間通路からミネラル、特にカルシウムの吸収を高める(Mineo ら 2001)オリゴ糖であり、第四章および第五章に示した乳牛の分娩時血清カルシウム濃度低下を抑制する効果も認められた。これら確認された DFA III の機能は細胞間通路からの吸収亢進と考えられるが、エンドサイトーシスに対する作用は報告されていない。しかし、DFA III が免疫グロブリン G の吸収を高めるならば、DFA III は上皮細胞のエンドサイトーシスを亢進するか、あるいは免疫グロブリン G の吸収が上皮細胞のエンドサイトーシスだけでなく、細胞間通路からの吸収を示唆するものと考えられる。そこで、DFA III が出生子牛の血清免疫グロブリン G 濃度と免疫グロブリン G の吸収に及ぼす効果を明らかにするとともに、出生直後の子牛の免疫グロブリン G 吸収機構についても考察した。

第二節 材料および方法

1. 供試動物と飼養管理

DFA III は日本甜菜製糖株式会社清水工場でイヌリンを原料に酵素合成された純度 97%ものを使用した。DFA III は子牛に給与する初乳および代用乳に混合し 7 日間給与した。DFA III の給与量と処理は 0 g 混合した DFA0, 3 g 混合した DFA3, 6 g 混合した DFA6 および 18 g 混合した DFA18 の 4 処理である。120 頭の子牛(ホルスタイン種 87 頭, ホルスタイン種と黒毛和種の交雑種 33 頭)を使用した。子牛は各処理に無作為に振り分けた(Table 8-1)。子牛は出生後、授乳する前に、母牛から分離し、体重を量り、個別のペンに収容した。

分娩後 2 時間以内に母牛から 3.5 L の初乳を搾った。その 1.5 L を直ぐに子牛に飲ませ、残りは冷蔵保存した。2 回目のほ乳は、出生 10 時間後に冷蔵した第 1 回目の初乳を温めて 2 L 給与した。3 回目のほ乳は出生 24 時間目の採血終了後に

給与し、その後は通常のほ乳時間である6時30分と16時に、1回に2 L 給与した。分娩後3日間は母牛の乳を、その後は市販の代用乳を給与した。水、スターター(スタート、日本甜菜製糖㈱、東京; DM 87.2%, CP 23.8%, NDF 14.3%, Ca 0.92%, P 0.56%), および乾草は出生直後から給与したが、7日間の試験期間において、スターターと乾草はほとんど摂取されなかった。採血は出生後0, 24時間目と、2, 3, 5および7日目の6時、ほ乳前に実施した。

2. 分析方法

血液は真空採血管で頸静脈から採取し、直ちに氷冷した。3,500 rpmで10分間遠心し、血清を採取し、分析まで、-30℃で保存した。初乳と血清の免疫グロブリンG含量は一元放射免疫拡散法(㈱メタボリックエコシステム研究所、宮城県)で分析した。血清は21倍に、初乳は51倍に希釈し、5 μLをジェルプレートの穴に注入し、37℃で48時間培養後、リングの直径を測定した。同時にウシ免疫グロブリンG濃度0.5 mg/mLと2 mg/mLの標準液から検量線を作成し、血清と初乳の免疫グロブリンG濃度を定量した。免疫グロブリンG吸収率(AEA; apparent efficiency of immunoglobulin G absorption)は血液量をQuigleyら(1998)に準じ出生時体重の8.6%に設定し、24時間目の血清免疫グロブリンG濃度から求めた血液中の免疫グロブリンG量と、出生後24時間内の免疫グロブリンG摂取量から求めた。

3. 統計分析

実験データの統計処理はJMP 9 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を使用した。体重、1および2回目のほ乳時間、1および2回目の採血時間、初乳免疫グロブリンG濃度、免疫グロブリンG摂取量、1および2回目採血の血清免疫グロブリンG濃度および免疫グロブリンG吸収率はDFA IIIによる処理を説明変数とし、一元配置法によって分析した。Table 8-1の頭数の項におけるP値は遺伝要因を示し、品種ごとの頭数を、分割表によるカイ二乗検定で分析した。体重データは、

品種ごとに集計し、処理間の頭数が異なるので平均± SEM で示した。24 時間目の血清免疫グロブリン G 濃度に影響する要因として、DFA III 摂取量、初乳免疫グロブリン G 濃度、体重、1 回目のほ乳から 2 回目の採血までの時間、2 回目のほ乳から 2 回目の採血までの時間、品種、性別、初乳蛋白質濃度、および初乳比重の 9 項目をステップワイズ法で検討し、1 回目のほ乳から 2 回目の採血までの時間、品種、初乳蛋白質濃度、および初乳比重を除いた 5 項目を説明変数として重回帰分析を行った。各変数の偏回帰係数については標準化偏回帰係数を求め、効果を比較した。初乳免疫グロブリン G 濃度と 24 時間目の血清免疫グロブリン G 濃度の関係を、単回帰分析を使い、全子牛と DFA III 処理別子牛で表示し、また、共分散分析を行い DFA III 摂取による効果を分析した。

第三節 結果と考察

処理間に品種の偏り、体重差はみられなかった (Table 8-1)。

Table 8-2 に示すように出生後 24 時間に子牛が摂取した初乳の免疫グロブリン G 濃度は、最少 19.7 mg/mL から最大 140.4 mg/mL の範囲で、各処理間の平均濃

Table 8-1 The number and body weight of calves of Holstein and Holstein × Japanese black in each treatment

	Treatments ¹				P
	DFA0	DFA3	DFA6	DFA18	
Number of calves	30	30	30	30	0.483
Holstein	24	21	23	19	
Holstein×Japanese Black	6	9	7	11	
Birth body weight, kg	42.3 ± 1.1	40.8 ± 0.8	42.7 ± 1.1	41.3 ± 0.9	0.494
Holstein	43.2 ± 1.2	41.1 ± 1.1	44.2 ± 1.0	43.2 ± 0.9	0.225
Holstein×Japanese Black	38.7 ± 1.6	40.0 ± 1.2	37.5 ± 2.6	37.9 ± 1.2	0.702

Values are mean ± SEM.

¹ Treatments: DFA0 = 0 g DFA III; DFA3 = 3 g DFA III; DFA6 = 6 g DFA III; DFA18 = 18 g DFA III.

度は DFA 0 ; 65.9 mg/mL , DFA 3 ; 61.1 mg/mL , DFA 6 ; 62.3 mg/mL および DFA 18 ; 58.7 mg/mL であった。子牛が出生後 24 時間で摂取した 3.5 L の初乳に含有する免疫グロブリン G 総量は DFA 0 ; 231 g , DFA 3 ; 214 g , DFA 6 ; 218 g および DFA 18 ; 206 g で処理間に差はなかった。出生時の血清免疫グロブリン G 濃度は各処理ともほぼ 0 mg/mL だった。24 時間後の血清免疫グロブリン G 濃度は DFA 0 ; 16.4 mg/mL , DFA 3 ; 17.1 mg/mL , DFA 6 ; 21.0 mg/mL および DFA 18 ; 21.2 mg/mL で、DFA III 摂取量が多いほど高い傾向 ($P = 0.053$) を示した。免疫グロブリン G 吸収率は初乳への DFA III 添加量が多いほど高く、DFA 0 ; 26.0% , DFA 3 ; 29.7% , DFA 6 ; 36.2% および DFA 18 ; 37.2% で有意に ($P < 0.001$) 増加した。

Table 8-2 Means and standard errors (SE) of study parameters in calves fed colostrum with or without DFA III

	Treatments ¹				SE	P
	DFA0	DFA3	DFA6	DFA18		
Age at feeding, h						
1st feeding, h	1.2	1.1	1.1	1.3	0.1	0.603
2nd feeding, h	10.1	10.4	9.8	10.2	0.2	0.383
Age at blood sampling, h						
1st blood sampling, h	0.8	0.8	0.9	0.9	0.1	0.766
2nd blood sampling, h	24.8	24.8	24.6	24.7	0.2	0.933
Colostum immunoglobulin G, mg/mL	65.9	61.1	62.3	58.7	5.0	0.786
Immunoglobulin G intake, g	230.6	214.1	218.2	205.5	17.5	0.787
Serum immunoglobulin G, mg/mL						
0 h	0.0	0.3	0.0	0.0	0.1	0.177
24 h	16.4	17.1	21.0	21.2	1.6	0.053
Apparent efficiency of immunoglobulin G absorption ² , %	26.0 ^b	29.7 ^b	36.2 ^a	37.2 ^a	1.6	0.001

^{a,b} Means in the same row with different superscript letter differ at $P < 0.05$.

¹ Treatments: DFA0 = 0 g DFA III; DFA3 = 3 g DFA III; DFA6 = 6 g DFA III; DFA18 = 18 g DFA III.

² AEA = Apparent efficiency of immunoglobulin G absorption, calculated as serum IgG at 24 h \times BW at birth, kg, \times 8.6 (serum volume as a percentage of body weight, divided by immunoglobulin G intake).

出生 24 時間後の血清免疫グロブリン G 濃度は DFA III による処理間に差はみられなかった。しかし、DFA III 摂取量、初乳免疫グロブリン G 濃度、体重、2 回目のほ乳から 2 回目の採血までの時間、および性別の 5 項目を説明変数とする重回帰分析の結果、寄与率 0.697 で $P < 0.001$ の重回帰式が得られた (Table 8-3)。これら項目の標準化偏回帰係数 β から、血清免疫グロブリン G 濃度の増加に対する効果は、DFA III 摂取量が 0.25 で、初乳免疫グロブリン G 濃度の 0.8 に次いで高い値であった。さらに、免疫グロブリン G 吸収に影響するといわれている 1) 免疫グロブリン G 摂取量、2) 初乳免疫グロブリン G 濃度、3) ほ乳時間、4) 体重、5) 遺伝(品種)の DFA III 処理間における P 値は、それぞれ 1) $P = 0.787$ 、2) $P = 0.786$ 、3) 1 回目; $P = 0.603$ 、2 回目; $P = 0.383$ 、4) $P = 0.494$ 、5) $P = 0.483$ で差はみられず、血清免疫グロブリン G 濃度や免疫グロブリン G 吸収率の差異は、摂取した DFA III の影響であると考えられた。

Table 8-3 Results of multiple regression analysis for serum IgG concentration at 24 h of age

R square		0.697		
Variables	Correlation coefficient	Beta ¹	P	
DFA III intake, g	0.32	0.25	<0.001	
Colostrum immunoglobulin G, mg/ml	0.26	0.80	<0.001	
Body weight, kg	-0.44	-0.27	<0.001	
Time from second feeding to second blood sampling, h	0.64	0.11	0.034	
Sex ²	-1.11	-0.13	0.017	

¹ Beta is the standardized partial regression coefficient of multiple regression analysis.

² As a dummy variable, values 1 (female) and -1 (male) were assigned.

本試験で使用した全子牛のデータから得られた生後 24 時間目の血清免疫グロブリン G 濃度は、Figure 8-1 に示したように初乳免疫グロブリン G 濃度と正の相関を持ち、それは一次式で表された ($r^2=0.5391$, $P < 0.001$)。Stott と Fellah

(1983) の試験でもこの関係がみられ、血清免疫グロブリン G 濃度は初乳の給与量よりもその初乳に含まれる免疫グロブリン G 濃度により大きく影響を受けることが示された。Pansu ら(1983) はラットを使い、投与した溶液中のカルシウム濃度とカルシウム吸収について saturable process と nonsaturable process の差異を示した。それによると saturable process はカルシウム結合蛋白質の影響を受け、上皮細胞の中を通る細胞内通路からの吸収で、Michaelis-Menten の式で表すことができ、吸収量は最大値を持つ。Nonsaturable process は上皮細胞と上皮細胞の間を通る細胞間通路からの吸収が主体の濃度勾配による吸収で、正の一次式で表すことができる。Stott と Fellah (1983) の報告と同様、本試験の結果は免疫グロブリン G の吸収が nonsaturable で上皮細胞間からの吸収であることを示唆する。新生子牛の蛋白質吸収が選択性をもたず、受容体をもたない非選択制のエンドサイトーシスと考えられる(Staley と Bush 1985) ことにおいても、免疫グロブリン G 吸収は濃度勾配による nonsaturable process であると考えられる。しかし、免疫グロブリン G の吸収は小腸上皮細胞のエンドサイトーシスによるといわれている(Staley と Bush 1985)。一方、DFA III で確認された機能は、タイトジャンクションへの作用による細胞間通路からのミネラル、特にカルシウムの吸収促進であり(Mineo ら 2001)、エ

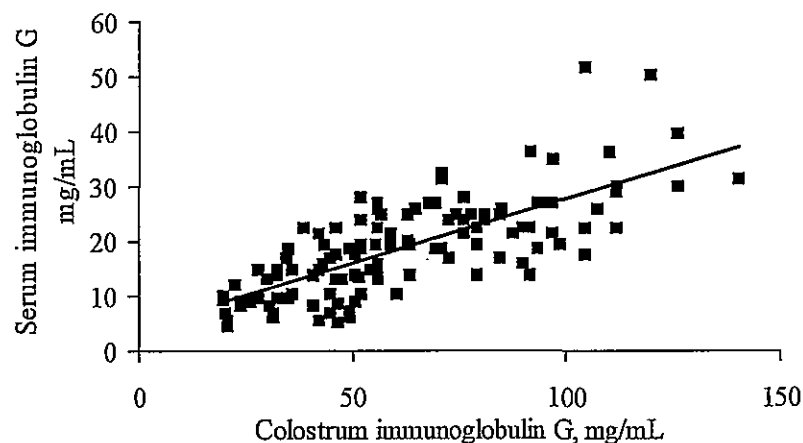


Figure 8-1 Relationship between colostrum IgG and serum IgG at 24 h of age based on data from all calves. The linear line in the figure shows the relationship; Serum IgG = $4.379 + 0.234 \times \text{Colostrum IgG}$ ($R^2 = 0.539$, $P < 0.001$).

ンドサイトーシスに対する効果は確認されていない。

Figure 8-1 で示した血清免疫グロブリン G と初乳免疫グロブリン G のグラフを、DFA III 処理ごとに分け回帰直線を描くと、DFA III 摂取量が多いほど血清免疫グロブリン G 濃度は高く、初乳免疫グロブリン G 濃度が高いほどその差は大きくなる傾向がみられた (Figure 8-2)。共分散分析から、これらのグラフは傾きに差異はないものの、高さへの影響が確認された ($r^2=0.6317$, $P < 0.001$)。このことも免疫グロブリン G が細胞間通路から吸収されていることを示唆する証左と考えられる。これまで、タイトジャンクションは上皮細胞間を接着し、細胞間通路からの物質移動を強力に防いでいると考えられてきた。しかし、タイトジャンクションを形成する蛋白質；クロードイン (claudin) にはいろいろなタイプがあり、その組み合わせや量比によってバリアー機能は異なる (Furuse ら 2001 ; Van Itallie ら 2001 ; Amasheh ら 2002)。また、タイトジャンクションのストランドは端と端あるいは端と側面で切れたりつながったりして、高分子の物質もゆっくり通ることができる (Sasaki ら 2003)。Pansu ら (1983) は nonsaturable process によるカルシウム吸収は出生後早いほど多いことを示し、さらに、Wisser と Horster (1978) は未熟な腸ほど大人の腸より透過率が高いことを示した。出生子牛に早く初乳を飲ますほど、免疫グロブリン G 吸収は多く、免疫グロブリン G を吸収できる時間は出生後 24 ~ 36 時間程度と限定される。この理由として上皮細胞の成熟や腸内の蛋白質分解の増加 (Telemo ら 1987 ; Martin ら 1993 ; Martin ら 1997) と腸内微生物や腸内微生物による産生物 (Staley ら 1972) などの影響が示唆されている。しかし、タイトジャンクションのバリアー機能の変化とそれによる効果と考えれば、大きな矛盾は生じないのではないだろうか。

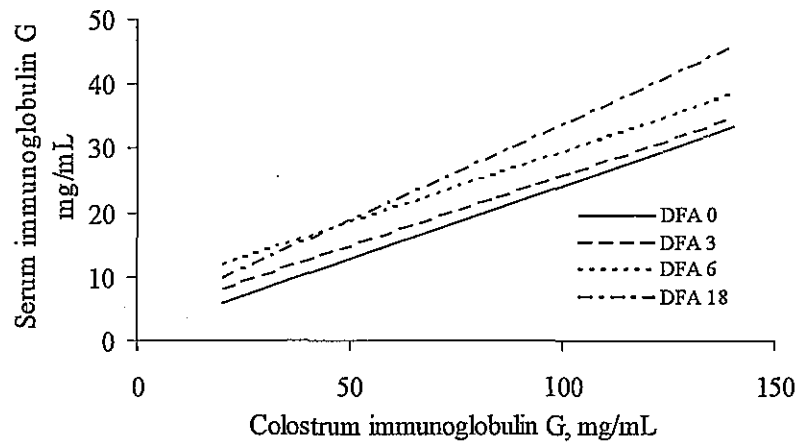


Figure 8-2 Regression lines of colostrum immunoglobulin G vs. serum immunoglobulin G at 24 h of age in calves treated with 0 g ($R^2=0.717$), 3 g ($R^2=0.696$), 6 g ($R^2=0.385$) and 18 g ($R^2=0.684$) of DFA III.

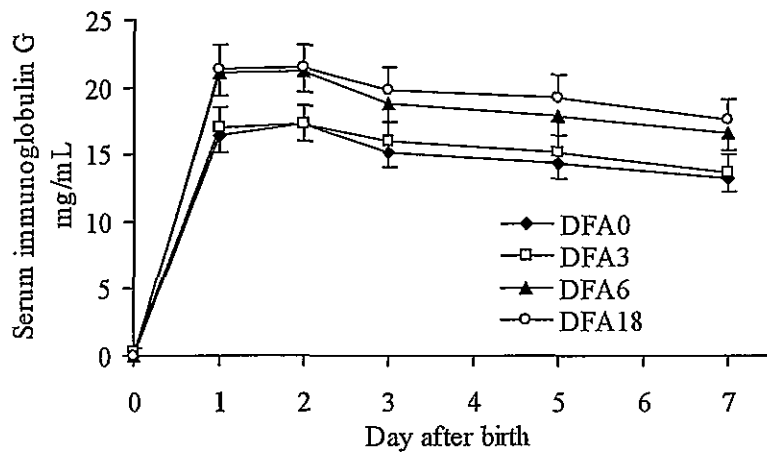


Figure 8-3 Changes in serum immunoglobulin G concentration in calves treated with 0 g, 3 g, 6 g and 18 g of DFA III. The mean serum immunoglobulin G concentration on the same day did not differ among treatments. Error bars indicate standard errors of the means.

Figure 8-3 の出生後の血清免疫グロブリン G 濃度は同一時間において処理間に差はなく、平均値でその推移を示した。出生後 24 時間以降の血清免疫グロブリン G 濃度の変化は各処理とも同様で、2 日目に最大になり、その後減少した。免疫

グロブリン G 吸収の終了 (intestinal closure) は出生後 24 ~ 48 時間の間で起き、これに DFA III は関与しなかった。タイトジャンクションに作用する難消化性糖類として DFA IV, ラフィノース, フラクトオリゴ糖, マルチトール, メリビオースなどが知られているが、これらの中で DFA III はカルシウム吸収亢進に高い効果を持ち (Mineo ら 2001; Mineo ら 2002; Suzuki と Hara 2004), タイトジャンクションへの作用は大きいと考えられる。しかし、免疫グロブリン G 吸収の intestinal closure を変えるほど DFA III のタイトジャンクションに関わる作用は小さくなく、出生後の腸における輸送機能の発達のような大きな変化には影響しないと考えられた。

第四節 小括

本研究の目的は、DFA III が出生子牛の血清免疫グロブリン G 濃度と免疫グロブリン G 吸収に及ぼす効果を明らかにすることであり、免疫グロブリン G の吸収方法についても考察した。処理は初乳に DFA III を 0 g 混合した DFA0, 3 g 混合した DFA3, 6 g 混合した DFA6 および 18 g 混合した DFA18 の 4 処理である。ホルスタイン種と、ホルスタイン種 × 黒毛和種からなる 120 頭の子牛を 30 頭ずつ各処理に無作為に振り分けた。出生 24 時間後において各処理の血清免疫グロブリン G 濃度は 16.4 ~ 21.2 mg/mL, 免疫グロブリン G 吸収率は 26.0 ~ 37.2% で、DFA III 摂取量が多いほど、血清免疫グロブリン G 濃度と免疫グロブリン G 吸収率は増加した。出生 24 時間後の血清免疫グロブリン G 濃度に及ぼす DFA III 摂取量の影響は、重回帰分析による標準化偏回帰係数から初乳免疫グロブリン G 濃度の 0.80 に次ぐ、0.25 と見積もられた。全子牛の初乳免疫グロブリン G 濃度と出生 24 時間後の血清免疫グロブリン G 濃度の関係は、正の一次回帰式で高い相関が得られた。これは非選択的な吸収であり、濃度勾配による細胞間通路からの吸収と同じ特徴である。さらに、DFA III 処理を加えた共分散分析の結果、DFA III による直線の高さへの影響が確認された。免疫グロブリン G 吸収に対するこのような DFA III の効果から、出生子牛において免疫グロブリン G は細胞間通路からも吸収されている可能

性が高いと考えられた。一方、DFA III は小腸から免疫グロブリン G が吸収されなくなる intestinal closure には影響せず、免疫グロブリン G 吸収期間を延長することはできなかった。

第九章 総合考察

カルシウムの吸収経路は細胞内通路； transcellular pathway と細胞間通路； paracellular pathway，二つの経路がある。単胃動物においてカルシウムの 50%は細胞間通路を介した受動輸送で吸収される（Nellans 1988）。反芻動物においても細胞間通路からの吸収は重要であろうと考えられるが、乳牛では第一胃の希釈作用が足かせになり、これまで十分な検討が加えられていない。本研究はこの細胞間通路からのミネラル吸収亢進効果を持つ DFA III について、反芻動物である乳牛に対する生理的機能性と、合わせて産業的価値の検討を、分娩牛、搾乳牛、出生子牛を使用して進めた。DFA III は新しい素材であり、ヒトに対する研究も始まって日が浅く、本書を構成する各章に沿って論理的に研究が進んだわけではない。出てきた結果を説明するために後から組んだ実験や、第三章、第七章のようにまだその成果が発表する水準に達していないものもある。しかし、DFA III が反芻動物に持つであろう機能性について、これまで検討した全体を示し、今後の取り組みに資することができることを期待して、本研究の結果をまとめた。

反芻動物は食道直下に微生物が棲息する反芻胃を持ち、摂取した飼料はこの反芻胃で微生物による分解作用を受ける。アミノ酸組成に優れた蛋白質であってもアンモニアに分解され、糖やデンプンは発酵され、揮発性脂肪酸やメタンが生成される。私たち単胃動物の栄養価値観とまったく異なり、私たちに効果のあるものが、そのまま効果を維持することは反芻動物では難しい。このため、飼料の機能性を反芻動物で検討する上で最初出てくるのが反芻胃で分解されるか、否かという点である。DFA III が主要な腸内微生物に分解されないという報告は、DFA III を乳牛で利用しようと考えたときの大きな後ろ盾であった。第一胃微生物による分解性を検討する *in vitro* 試験は比較的簡単な実験であり、結果も短期間で判明する。しかし、生体から回収した微生物が全て生育するわけではなく、その結果は他の結果とも合わせ、慎重に検討する必要がある。DFA III については微生物が機能していることを

確認するために、同一培養液に、同系統のオリゴ糖を加えて培養結果を検討したり、異なる飼養管理の牛から採取した微生物を使用するなど条件を変え検討し、DFA III が第一胃微生物に分解されにくいことを確認した。

しかし、基本は生体を使った *in vivo* での確認であり、本研究の第三章がこれに当たる。ラットの腸管を使用した *in vitro* による試験で (Mineo ら 2002), DFA III の効果は腸管の部位で異なり、また DFA III の濃度もカルシウム吸収に影響することが示されている。したがって効率よく DFA III を乳牛に給与するためには、DFA III がウシの腸管の中をどのように移動し、どのような濃度で存在するかを知ることが必要になる。ウシの第一胃は巨大な発酵槽であるだけでなく、飼料は反芻・混合・希釈されて第一胃から下部消化管へ流れていく。この流出速度は液相と固相で異なる。DFA III は水によく溶け、液相の移動パターンに近似し、腸管内での滞留時間と濃度変化もほぼ確認できたと考えている。しかし、精確な結果を残すためには斉一な動物を十分な頭数確保することが必要であり、今後新たな実験が行われることを期待している。

DFA III を乳牛に給与しようと考えた一番の目的は、分娩時の低カルシウム血症を改善したいと考え、その素材を検討していたからである。乳牛の低カルシウム血症は 1793 年には文献に登場する古くからある疾病で、分娩時に特異的に発生し、遺伝的改良による泌乳能力の向上は低カルシウム血症の発生を高めている。低カルシウム血症の予防で、現在最も効果がある方法とされているのが飼料の陰陽イオン差 (DCAD) の調節であり、これに関連しナトリウムとカリウム給与の制限と、陰イオン塩の給与がある。これ以外ではカルシウム給与量の制限や、ビタミン D の投与があり、直接的な予防ではないが、分娩後のカルシウム剤の経口投与も示されている (NRC 2001)。しかし、これらの方法はまだ十分にうまくいっていない。DFA III はショ糖の半分の甘さで牛の嗜好性が良く、配合飼料や液状飼料などへの加工も容易である。また、カルシウムの吸収に対する機能が乳牛でこれまでほとんど検討されたことのない細胞間通路からの促進であり、その高い効果にも期待がもてた。

試験を開始した 2002 年はまだ DFA III の工業的な生産が始まっておらず、試作製造された少量の DFA III で効果を確認するために、分娩後の投与効果を検討した。分娩後の投与効果は確認できたが、その効果は分娩直後の血清カルシウム濃度の影響を強く受けると考えられた。その打開策として乾乳期の給与を検討したが、乾乳期に血清カルシウム濃度が高まる可能性と、その結果、副甲状腺ホルモンや活性型ビタミン D の分泌が抑制されるかもしれない懸念があった。実際、実験してみるとこれらは全くの杞憂であり、分娩時の血清カルシウム濃度低下に対する抑制効果は驚くほどであった。本研究では示さなかったが、副甲状腺ホルモンと活性型ビタミン D の変化は、乾乳期に DFA III を給与しても、血清カルシウム濃度の変化によく対応することを確認している。また、第五章で示したように DFA III を乾乳期に給与していても、乾乳期の血清カルシウム濃度は給与していない牛と変わらない。

DFA III を乾乳期に使用するに当たって、このとき給与する飼料のカルシウム濃度が問題になる。現在、乾乳期のカルシウム給与量の制限が効果は十分ではないが、最も簡単であるため、低カルシウム血症予防対策として広く実施されている。しかし、DFA III によるカルシウムの吸収亢進は濃度勾配により生じるため、一緒に給与する飼料のカルシウム濃度は高い方が有効ではないかと考えられる。様々な飼養管理が混在する中で、DFA III の効果が最も発揮できる配合飼料のカルシウム濃度を検討した。また、DFA III を添加した配合飼料を乾乳牛に給与することによる効果について、実際の酪農家で給与試験を行い、周産期疾病に対する改善効果を明らかにした。

乳牛の泌乳能力の向上はミネラル不足を助長し、微量ミネラルである亜鉛、マンガ、銅、コバルトの給与により、産乳、乳房炎、蹄疾患、および繁殖の改善が報告されている。これらの試験では、吸収が良いといわれるアミノ酸や多糖類と結合した有機ミネラルが使用される。泌乳牛に DFA III を給与した場合においても、同様な効果が示唆されたが、第五章のマグネシウムと同様、微量ミネラルの投与を含めた検討によりその効果がより明瞭になるのかもしれない。泌乳牛を対照とした試験で精

度を高めるためには斉一性と頭数確保が重要であり、大規模な試験が行われることを期待したい。また、DFA III の効果として出生子牛の免疫抗体吸収を検討した。その結果はこれまでの吸収経路に対する定説を覆す可能性を持ち、感染性疾患から子牛を守る、新しい初乳の給与方法を構築できる可能性を秘めていると感じている。

DFA III と同様、タイトジャンクションに作用するオリゴ糖は DFA IV、ラフィノース、フラクトオリゴ糖、マルチトール、メリビオースなどがある。また、多くのオリゴ糖は腸内細菌に分解され、その際に産生される揮発性脂肪酸が腸内を酸性化し、カルシウムをイオン化するため、カルシウムの吸収は亢進されると報告されている。したがって、ヒトにおいては多種類のオリゴ糖がカルシウム吸収を亢進し、それは日常的な現象であると考えられる。しかし、ウシでは第一胃微生物がこのようなオリゴ糖を分解するため、ヒトやラットで得られる効果がウシでは発現しない。第一胃微生物に分解されにくい DFA III はこの点で特別なオリゴ糖であり、ウシでの効果が顕著な理由であろう。DFA III 研究はこれまで、分娩牛のカルシウム吸収を中心に行ってきたが、泌乳牛に対する効果も期待でき、出生子牛の免疫グロブリン G 吸収といった全く異なる効果も得られた。さらに、Matsumoto ら (2009) と Takagi ら (2011) は黒毛和種の子牛に対するプロバイオテックとしての利用を報告している。今後も新しい機能と、さらに新たな畜種での効果についても検討し、畜産経営と家畜の健康に貢献したいと考えている。

要約

Difructose anhydride (DFA) III はチコリーの貯蔵物質であるイヌリンを原料に、酵素合成によって製造されるフラクトースが 2 分子結合したオリゴ糖である。ショ糖の半分の甘味で、水によく溶けるが吸湿性は極めて低く、加工性と貯蔵性に優れている。さらに、二つの特徴を有している。ひとつは、高等動物の消化酵素で分解されず、主要な腸内微生物によっても資化されない難消化性であり、もうひとつは、腸管の上皮細胞と上皮細胞を結合し、体内への物質通過を制限している密着結合 (tight junction) に作用し、細胞間通路 (paracellular pathway) を介したミネラル、特にカルシウムの吸収を亢進することである。これらの機能は食品素材としての利用を検討する中でラットやヒトなど単胃動物を対象として見出された。

本研究はこの二糖類である DFA III を、反芻胃を持つ乳牛に給与し、効果を検討した初めての取り組みであり、乳牛の分娩時低カルシウム血症に対する顕著な改善効果を明らかにした。さらに、搾乳牛の産乳、乳房炎、蹄疾患、および繁殖に対する効果や、出生子牛の免疫グロブリン G 吸収に対する効果についても合わせて検討し、それぞれに有益な効果を確認した。

DFA III の効果を反芻動物である乳牛で検討するに当たり、第一胃微生物による DFA III の分解性と、牛消化管内における DFA III の動態を調査した。DFA III は第一胃微生物に分解されにくいですが、糞中に検出される割合は少なく、腸内微生物によって多くが分解されていると考えられた。牛の消化管内での動態は液相の移動パターンに近似し、摂取後 1 時間で十二指腸に出現し、十二指腸内容液中の DFA III 濃度ピークは 1 ~ 3 時間の間にあると考えられた。9 時間後でも第一胃から十二指腸へ DFA III は流入しており、糞中には 9 および 12 時間後で認められたことから、DFA III は腸管に 12 時間以上滞留するものと考えられる。ラット腸管による *in vitro* 試験で、DFA III のミネラル吸収亢進効果は腸管の広い範囲で確認されており、ウシにおいてもヒトやラットと同様、ミネラル吸収を亢進するものと考えられる。

乳牛は分娩時、特異的に血中カルシウム濃度が低下し、低カルシウム血症になる牛は経産牛の60%に達する。DFA IIIを乾乳後期に給与するとこの分娩時の血中カルシウム濃度低下が抑制され、その後の回復も早かった。この結果は乾乳後期にカルシウム含量の低い(0.20%)配合飼料を給与して得られたものであるが、カルシウム含量の高い(0.83%)配合飼料を給与しても血中カルシウム濃度の低下抑制と回復に対するDFA IIIの効果は変わらないことを確認した。また、酸化マグネシウムはDFA IIIと一緒に給与することで吸収に対する効果が高まると考えられ、DFA IIIは低カルシウム血症だけでなく、低マグネシウム血症にも有効であると考えられた。低カルシウム血症は周産期疾病に影響する。一般酪農家で実施した試験により、乾乳牛にDFA IIIを添加した配合飼料を給与すると、低カルシウム血症が大きく影響する乳熱とダウナー症候群や、低カルシウム血症が影響する可能性の高い胎盤停滞、第四胃変位、ケトーシス、脂肪肝の発生がDFA IIIを給与しなかった前年よりも大きく減少し、乾乳期のDFA III給与は周産期疾病対策としても有効であると考えられた。

新たなDFA IIIの効果について、搾乳牛と出生子牛を用いて検討した。搾乳牛は泌乳能力が向上したことから泌乳初期においてミネラル不足になっている可能性が高く、微量ミネラルの給与で産乳、乳房炎、蹄疾患、繁殖などが改善したと報告されている。搾乳牛にDFA IIIを給与した試験において、DFA III給与牛は乳に移行するカルシウムとマグネシウム量が増加し、乳量も増加する可能性が示唆された。また、乳房炎に罹患した分房数、治療回数、乳廃棄日数が減少し、蹄質が影響する蹄疾患にもかかりにくく、健康改善にも効果が見られた。繁殖に差異は認められなかったが、DFA III給与牛は全頭受胎し、DFA IIIを給与しなかった牛では2頭が未受胎のため廃用になった。出生子牛では初乳に含まれる免疫グロブリンGの吸収に対する効果を検討した。これまで出生子牛の免疫グロブリンG吸収に関する定説は、上皮細胞に取り込まれ吸収されるトランスサイトーシスといわれている。しかし、DFA IIIは免疫グロブリンGの吸収を高めており、出生子牛の免疫抗体吸収がトラ

ンスサイトーシスよりも上皮細胞間隙で行われている可能性を初めて示した。

乳牛の栄養吸収に関し、腸管の細胞間通路からの吸収はこれまでほとんど検討されていない。しかし、密着結合に作用する DFA III を使用することにより、現象面ではあるが細胞間通路からの吸収が乳牛においても様々な可能性を持ち、また効果も大きく、吸収経路として重要であることを明らかにできたと考えている。研究を開始してまだ 10 年であり、基礎研究を含め多くの課題が残っている。今後も新しい機能と、さらに新たな畜種での効果についても検討し、畜産経営と家畜の健康に貢献したい。

引用文献

- Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schöneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M. 2002. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *Journal of Cell Science* **115**, 4969-4976.
- 新木敏正. 1999. カルシウムの腸管吸収の仕組み. In: 西沢良記, 白木正孝, 江澤郁子, 広田孝子 (eds), カルシウムーその基礎・臨床・栄養. pp. 68-75. (社) 全国牛乳普及協会, 東京.
- Asvarujanon P, Ishizuka S, Hara H. 2005. Promotive effects of non-digestible disaccharides on rat mineral absorption depend on the type of saccharide. *Nutrition* **21**, 1025-1035.
- Brignole TJ, Stott GH. 1980. Effect of suckling followed by bottle feeding colostrum on immunoglobulin absorption and calf survival. *Journal of Dairy Science* **63**, 451-456.
- Bronner F. 1998. Calcium absorption — a paradigm for mineral absorption. *The Journal of Nutrition* **128**, 917-920.
- 千勝典子, 松本俊夫. 1999. カルシウム代謝とその調節. In: 西沢良記, 白木正孝, 江澤郁子, 広田孝子 (eds), カルシウムーその基礎・臨床・栄養. pp. 61-67. (社) 全国牛乳普及協会, 東京.
- Correa MT, Erb HN, Scarlett JM. 1993. Risk factors for downer cow syndrome. *Journal of Dairy Science* **76**, 3460-3463.
- Dechow CD, Goodling RC. 2008. Mortality, culling by sixty days in milk, and production profiles in high- and low-survival Pennsylvania herds. *Journal of Dairy Science* **91**, 4630-4639.
- D・サダヴァ他著, 石崎泰樹, 丸山敬監訳・翻訳. 2010. ブルーバックス, カラー図解アメリカ版大学生物学の教科書, 第1巻細胞生物学. pp. 98-106. 講談社, 東京.

- Emanuele SM, Staples CR. 1994. Influence of pH and rapidly fermentable carbohydrate on mineral release in and flow from the rumen. *Journal of Dairy Science* 77, 2382-2392.
- Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 77, 2695-2703.
- 古瀬幹生. 2006. タイトジャンクションのバリア機能を担う分子基盤. *生化学誌* 78, 601-608.
- 古村圭子. 2006. 乳の生合成と泌乳期における体器官の適応. In : 柏村文郎, 増子孝義, 古村圭子 (eds), 乳牛管理の基礎と応用. pp. 119-120. デーリィ・ジャパン社, 東京.
- Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. 2001. Conversion of Zonula Occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into MDCK I cells. *The Journal of Cell Biology* 153, 263-272.
- Gibson GR. 1999. Dietary modulation of the human gut microflora using the prebiotics oligofructose and inulin. *The Journal of Nutrition* 129, 1438S-1441S.
- Goff JP, Horst RL. 1990. Effect of subcutaneously released 24F-1,25-dihydroxyvitamin D₃ on incidence of parturient paresis in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 73, 406-412.
- Goff JP, Horst RL. 1993. Oral administration of calcium salt for treatment of hypocalcemia in cattle. *Journal of Dairy Science* 76, 101-108.
- Goff JP, Horst RL. 1997a. Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to parturition rations on milk fever in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 80, 176-186.
- Goff JP, Horst RL. 1997b. Physiological changes at parturition and their relationship to metabolic disorders. *Journal of Dairy Science* 80, 1260-1268.
- Goff JP, Horst RL, Jawdon PW, Borelli C, Wedam J. 1996. Field trials of oral calcium

- propionate paste as an aid to prevent milk fever in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* **79**, 378-383.
- Goff JP, Reinhardt TA, Horst RL. 1989. Recurring hypocalcemia of bovine parturient paresis is associated with failure to produce 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology* **125**, 49-53.
- Goff JP, Reinhardt TA, Horst RL. 1991. Enzymes and factors controlling vitamin D metabolism and action in normal and milk fever cows. *Journal of Dairy Science* **74**, 4022-4032.
- Goff JP, Stabel JR. 1990. Decreased plasma retinol, α -tocopherol, and zinc concentration during the periparturient period: effect of milk fever. *Journal of Dairy Science* **73**, 3195-3199.
- Greger JL. 1999. Nondigestible carbohydrates and mineral bioavailability. *The Journal of Nutrition* **129**, 1434S-1435S.
- Hayirli A, Grummer RR, Nordheim EV, Crump PM. 2003. Models for predicting dry matter intake of Holsteins during the prefresh transition period. *Journal of Dairy Science* **86**, 1771-1779.
- 平井洋次. 2005. 低カルシウム血症の原因と対策. 日本獣医師会雑誌 **58**, 12-19.
- Horst RL, Goff JP, Reinhardt RA, Buxton DR. 1997. Strategies for preventing milk fever in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **80**, 1269-1280.
- Jackson RF, McDonald E. 1931. Two new crystalline difructose anhydrides from hydrolyzed inulin. *Journal of research of the National Bureau of Standards* **6**, 709-715.
- Jakoi ER, Cambier J, Saslow S. 1985. Transepithelial transport of maternal antibody: purification of IgG receptor from newborn rat intestine. *The Journal of Immunology* **135**, 3360-3364.
- Jaster EH. 2005. Evaluation of quality, quantity, and timing of colostrums feeding on

- immunoglobulin G1 absorption in jersey calves. *Journal of Dairy Science* **88**, 296-302.
- Jittakhot S, Schonewille JT, Wouterse H, Yuangklang C, Beynen AC. 2004. Apparent magnesium absorption in dry cows fed at 3 levels of potassium and 2 levels of magnesium intake. *Journal of Dairy Science* **87**, 379-385.
- Johnson CL, Helliwell SH, Jones DA. 1988. Magnesium metabolism in the rumens of lactating dairy cows fed on spring grass. *Quarterly Journal of Experimental Physiology and Cognate Medical Sciences* **73**, 23-31.
- Joyce PW, Sanchez WK, Goff JP. 1997. Effect of anionic salts in prepartum diets based on alfalfa. *Journal of Dairy Science* **80**, 2866-2875.
- Kamiya Y, Kamiya M, Tanaka M, Shioya S. 2005. Effect of calcium intake and parity on plasma minerals and bone turnover around parturition. *Animal Science Journal* **76**, 325-330.
- 川村清市, 佐藤繁, 内藤善久, 宮本亨. 2002. 周産期疾患の診療指針 : 家畜共済の診療指針 I , pp. 64 . 全国農業共済協会, 東京.
- Kikuchi H, Inoue M, Saito H, Sakurai H, Aritsuka T, Tomita F, Yokota A. 2009. Industrial production of difructose anhydride III (DFA III) from crude inulin extracted from chicory roots using *Arthrobacter* sp. H65-7 fructosyltransferase. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **107**, 262-265.
- Kikuchi H, Nagura T, Inoue M, Kishida T, Sakurai H, Yokata A, Asano K, Tomita F, Sayama K, Senba Y. 2004. Physical, chemical and physiological properties of difructose anhydride III produced from inulin by enzymatic reaction. *The Japanese Society of Applied Glycoscience* **51**, 291-296.
- Koenig KM, Rode LM, Knight CD, Vazquez-Anon M. 2002. Rumen degradation and availability of various amounts of liquid methionine hydroxy analog in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **85**, 930-938.

- Kruse V. 1970. A note on the estimation by simulation technique of the optimal colostrums dose and feeding time at first feeding after the calf's birth. *Journal of Animal Production* **12**, 661-664.
- Leonhard-Marek S, Stumpff F, Brinkmann I, Breves G, Martens H. 2005. Basolateral Mg^{2+}/Na^{+} exchange regulates apical nonselective cation channel in sheep rumen epithelium via cytosolic Mg^{2+} . *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology* **288**, 630-645.
- Levrat MA, Behr SR, Remesy C, Demigne C. 1991. Effects of soybean fiber on cecal digestion in rats previously adapted to a fiber-free diet. *The Journal of Nutrition* **121**, 672-678.
- Liesegang A, Eicher R, Sassi ML, Risteli J, Kraenzlin M, Riond JL, Wanner M. 2000. Biochemical markers of bone formation and resorption around parturition and during lactation in dairy cows with high and low standard milk yields. *Journal of Dairy Science* **83**, 1773-1781.
- Martens H, Gabel G. 1986. Pathogenesis and prevention of grass tetany from the physiologic viewpoint. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* **93**, 170-177.
- Martin MG, Wu SV, Walsh JH. 1993. Hormonal control of intestinal Fc receptor gene expression and immunoglobulin transport in suckling rats. *The Journal of Clinical Investigation* **91**, 2844-2849.
- Martin MG, Wu SV, Walsh JH. 1997. Ontogenetic development and distribution of antibody transport and Fc receptor mRNA expression in rat intestine. *Digestive Diseases and Sciences* **42**, 1062-1069.
- 松井義貴, 伊藤めぐみ, 川本哲. 2001. 乳牛における血糖値を用いた分娩予測. 日本獣医学会学術集会講演要旨.
- Matsumoto D, Takagi M, Hasunuma H, Fushimi Y, Ohtani M, Sato T, Okamoto K, Shahada F, Tanaka T, Deguchi E. 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 - Australasian Journal of Animal Sciences* **22**, 1640–1647.
- Midla LT, Hoblet KH, Weiss WP, Moeschberger ML. 1998. Supplemental dietary biotin for prevention of lesions associated with aseptic subclinical laminitis (pododermatitis aseptical diffusa) in primiparous cows. *American Journal of Veterinary Research* **59**, 733-738.
- Minamida K, Ohashi M, Hara H, Asano K, Tomita F. 2006. Effects of ingestion of difructose anhydride III (DFA III) and the DFA III-assimilating bacterium *Ruminococcus productus* on rat intestine. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **70**, 332–339.
- Mineo H, Hara H, Kikuchi H, Sakurai H, Tomita F. 2001. Various indigestible saccharides enhance net calcium transport from the epithelium of the small and large intestine of rats *in vitro*. *The Journal of Nutrition* **131**, 3243-3246.
- Mineo H, Hara H, Shigematsu N, Okuhara Y, Tomita F. 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*. *The Journal of Nutrition* **132**, 3394-3399.
- Mineo H, Amano M, Chiji H, Sigematsu N, Tomita F, Hara H. 2004. Indigestible disaccharides open tight junctions and enhance net calcium, magnesium, and zinc absorption in isolated rat small and large intestinal epithelium. *Digestive Diseases and Sciences* **49**, 122–132.
- Mitamura R, Hara H, Aoyama Y, Chiji H. 2002. Supplemental feeding of difructose anhydride III restores calcium absorption impaired by ovariectomy in rats. *The Journal of Nutrition* **132**, 3387-3393.
- Mitamura R, Hara, H. 2005. Prolonged feeding of difructose anhydride III increases strength

- and mineral concentrations of the femur in ovariectomized rats. *British Journal of Nutrition* **94**, 268-274.
- Mitchell AD, Chappell A, Knox KL. 1979. Metabolism of betaine in the ruminant. *Journal of Animal Science* **49**, 764-774.
- 光岡知足. 2002. プレバイオティクスと腸内フローラ. 腸内細菌学雑誌 **16**, 1-10.
- 内藤善久. 2004. 乳牛ではなぜ低カルシウム血症がおきやすいのか? 臨床獣医 **22**, 10-14.
- 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 Diffructose 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, seventh revised ed. Washington, D. C.: National Academy Press.
- Nellans HN. 1988. Contributions of cellular and paracellular pathways to transepithelial intestinal calcium transport. In: Bronner F, Peterlik M (eds), Cellular calcium and phosphate transport in health and disease. pp. 269. Alan R. Liss, Inc, New York.
- Nocek JE, Johnson AB, Socha MT. 2000. Digital characteristics in commercial dairy herds fed metal-specific amino acid complexes. *Journal of Dairy Science* **83**, 1553-1572.
- Nockels CF, DeBonis J, Torrent J. 1993. Stress induction affects copper and zinc balance in calves fed organic and inorganic copper and zinc sources. *Journal of Animal Science* **71**, 2539-2545.
- 農林水産省農林水産技術会議事務局編. 1999. 日本飼養標準・乳牛 (1999 年版). 社団法人中央畜産会, 東京.
- Oetzel GR. 1991. Meta-analysis of nutritional risk factors for milk fever in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* **74**, 3900-3912.
- Ohta A, Ohtsuki M, Hosono A, Adachi T, Hara H, Sakata T. 1998. Dietary fructooligosaccharides prevent osteopenia after gastrectomy in rats. *The Journal of*

Nutrition **128**, 106-110.

- 岡田啓司. 2005. 代謝プロファイルテストを用いた牛群検診. In: 川村清市, 内藤善久, 前出吉光 (eds), 獣医内科学—大動物編. 第1版. pp. 304-311. 文永堂出版, 東京.
- Pácha J. 2000. Development of intestinal transport function in mammals. *Physiological Reviews* **80**, 1633-1667.
- Pansu D, Bellaton C, Bronner F. 1983. Developmental changes in the mechanisms of duodenal calcium transport in the rat. *American Journal of Physiology* **244** (Gastrointestinal and Liver Physiology 7), G20-G26.
- Pansu D, Duflos C, Bellaton C, Bronner F. 1993. Solubility and intestinal transit time limit calcium absorption in rats. *The Journal of Nutrition* **123**, 1396-1404.
- Philpot WM, Nickerson SC, 竹村香里/訳. 2001. 乳房炎との戦いに打ち勝つために. pp. 10-13. デーリィ・ジャパン社, 東京.
- Quigley JD, III, Drewry JJ, Martin KR. 1998. Estimation of plasma volume in Holstein and Jersey calves. *Journal of Dairy Science* **81**, 1308-1312.
- Rajala PJ, Gröhn YT, McCulloch CE. 1999. Effects of milk fever, ketosis, and lameness on milk yield in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **82**, 288-294.
- Russell JB, O'Connor JD, Fox DG, Van Soest PJ, Sniffen CJ. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diet: I. Reminal fermentation. *Journal of Animal Science* **70**, 3551-3561.
- Saito K, Tomita F. 2000. Difructose anhydride: their mass-production and physiological functions. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**, 1321-1327.
- 佐久間慶子. 2002. フラクトオリゴ糖によるカルシウム吸収促進作用の分子生物学的メカニズム. 腸内細菌学雑誌 **16**, 11-19.
- Sakurai K, Yokota A, Sumita Y, Mori Y, Matsui H, Tomita F. 1996. Metabolism of DFA III by *Arthrobacter* sp. H65-7: purification and properties of a DFA III hydrolysis

- enzyme (DFA IIIase). *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **61**, 989-993.
- Sargent FD, Lytton VH, Wall OG. 1968. Test interval method for calculating dairy herd improvement association records. *Journal of Dairy Science* **51**, 170-179.
- Sasaki H, Matsui C, Furuse K, Mimori-Kiyosue Y, Furuse M, Tsukita S. 2003. Dynamic behavior of paired claudin stands within apposing plasma membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 3971-3976.
- Sato J, Sato R, Takagi A, Goto T, Okada K, Yasuda J, Naito Y. 2003. Association between changes in plasma calcium concentration and plasma tartrate-resistant acid phosphatase activity in periparturient cows. *Journal of Veterinary Medical Science* **65**, 291-293.
- 佐藤繁, 村山勇雄. 2004. 乳熱とダウナー症候群の発生状況および経済的損失. *臨床獣医* **22**, 15-18.
- Schlingmann KP, Gudermann T. 2005. A critical role of TRPM channel-kinase for human magnesium transport. *The Journal of Physiology* **566**, 301-308.
- Schulz AGM, van Amelsvoort JMM, Beynen AC. 1993. Dietary native resistant starch but not retrograded resistant starch raises magnesium and calcium absorption in rats. *The Journal of Nutrition* **123**, 1724-1731.
- 社団法人北海道乳牛検定協会. 1989. 乳牛の泌乳曲線. pp.75-85. 社団法人北海道乳牛検定協会, 北海道.
- 社団法人家畜改良事業団. 2011. 牛群検定・後代検定 牛群検定情報. [homepage on internet]. 社団法人家畜改良事業団, 東京; [cited 19 November 2011]. Available from URL: <http://liaj.lin.gr.jp/japanese/kentei/kentei.html>.
- Sharman ED, Wagner JJ, Larson CK, Schutz JS, Davis NE, Engle TE. 2008. The effects of trace mineral source on performance and health of newly received steers and the impact of cobalt concentration on performance and lipid metabolism during the

- finishing phase. *The Professional Animal Scientist* **24**, 430–438.
- Shaver RD. 1997. Nutritional risk factors in the etiology of left displaced abomasums in dairy cows: A review. *Journal of Dairy Science* **80**, 2449-2453.
- Shiga K, Hara H, Okano G, Ito M, Minami A, Tomita F. 2003. Ingestion of difructose anhydride III and voluntary running exercise independently increase femoral and tibial bone mineral density and bone strength with increasing calcium absorption in rats. *The Journal of Nutrition* **133**, 4207-4211.
- Shigematsu N, Okuhara Y, Shiomi T, Tomita F, Hara H. 2004. Effect of difructose anhydride iii on calcium absorption in humans. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **68**, 1011–1016.
- Sniffen CJ, O'Connor JD, Van Soest PJ, Fox DG, Russell JB. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diet: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science* **70**, 3562-3577.
- Stabel JR, Goff JP, Kimura K. 2002. Effects of supplemental energy on metabolic and immune measurements in periparturient dairy cows with Johne's disease. *Journal of Dairy Science* **86**, 3527–3535.
- Staley TE, Bush LJ. 1985. Receptor mechanisms of the neonatal intestine and their relationship to immunoglobulin absorption and disease. *Journal of Dairy Science* **68**, 184-205.
- Staley TE, Corley LD, Jones EW. 1972. Malabsorption in neonatal pigs monocontaminated with *Escherichia coli* (055B5). *American Journal of Digestive Diseases* **17**, 239-247.
- Stott GH, Fella A. 1983. Colostral immunoglobulin absorption linearly related concentration for calves. *Journal of Dairy Science* **66**, 1319-1328.
- Stott GH, Marx DB, Menefee BE, Nightengale GT. 1979. Colostral immunoglobulin transfer in calves I. Period of absorption. *Journal of Dairy Science* **62**, 1632-1638.

- Stott GH, Wiersma F, Menefee BE, Radwanski FR. 1976. Influence of environment on passive immunity in calves. *Journal of Dairy Science* **59**, 1306-1311.
- Suzuki T, Hara H, Kasai T, Tomita F. 1998. Effects of difructose anhydride III on calcium absorption in small and large intestines of rats. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **62**, 837-841.
- Suzuki T, Hara H. 2004. Various non-digestible saccharides increase intracellular calcium ion concentration in rat small-intestinal enterocytes. *British Journal of Nutrition* **92**, 751-755.
- Takagi M, Hasunuma H, Matsumoto D, Obi T, Takase K, Ohtani M, Sato T, Watanabe U, Okamoto K, Tanaka T, Tshering C, Deguchi E. 2011. Effects 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.
- Tamura A, Shiomi T, Tamaki N, Shigematsu N, Tomita F, Hara H. 2004. Comparative effect of repeated ingestion of difructose anhydride III and palatinose on the induction of gastrointestinal symptoms in humans. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* **68**, 1882-1887.
- Tang VW, Goodenough DA. 2003. Paracellular ion channel at the tight junction. *Biophysical Journal* **84**, 1660-1673.
- Telemo E, Weström BR, Ekström G, Karlsson BW. 1987. Intestinal macromolecular transmission in the young rat: influence of protease inhibitors during development. *Biology of the Neonate* **52**, 141-148.
- Tveit B, Svendsen M, Hove K. 1991. Heritability of hypocalcemia at first parturition in Norwegian cattle: genetic correlations with yield and weight. *Journal of Dairy Science* **74**, 3561-3567.
- Uchida K, Mandebvu P, Ballard CS, Sniffen CJ, Carter MP. 2001. Effect of feeding a

- combination of zinc, manganese and copper amino acid complexes, and cobalt glucoheptonate on performance of early lactation high producing dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* **93**, 193-203.
- Van Amstel SR, Shearer JK, 田口清/訳. 2008. 牛の跛行マニュアルー治療とコントロール. pp. 41. チクサン出版社, 東京.
- Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. 2001. Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *The Journal of Clinical Investigation* **107**, 1319-1327.
- Watanabe O, Hara H, Aoyama Y, Kasai T. 2000. Increased intestinal calcium absorption from the ingestion of a phosphorylated guar gum hydrolysate independent of cecal fermentation in rats. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **64**, 613-616.
- Weiss WP. 2005. 抗酸化栄養素、免疫機能、および乳質との関係. Dairy Science Update. ウィリアムマイナー農業研究所, 東京.
- Wisser J, Horster M. 1978. *In vitro* perfused, non-isolated small intestine: ontogeny of transmural hydraulic permeability. *Pflugers Archiv* **373**, 205-208.
- Yamagishi N, Dohmae H, Shirato A, Sato J, Sato R, Naito Y. 2000. Effects of oral administration of "rumen-bypass" vitamin D₃ on vitamin D and calcium metabolism in periparturient cows. *Journal of Veterinary Medical Science* **62**, 403-408.
- Yokota A, Hirayama S, Enomoto K, Miura Y, Takao S, Tomita F. 1991. Production of inulin fructotransferase (depolymerizing) by *Arthrobacter* sp. H65-7 and preparation of DFA III from inulin by the enzyme. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **72**, 258-261.
- Younes H, Demigne C, Remesy C. 1996. Acidic fermentation in the caecum increases absorption of calcium and magnesium in the large intestine of the rat. *The British Journal of Nutrition* **75**, 301-314.

謝 辞

本論文は 2002 年から 2011 年まで日本甜菜製糖株式会社総合研究所で実施した DFA III に関する研究をまとめたものです。本論文を取りまとめるに当たり、主指導教員としてご指導賜りました元帯広畜産大学地域環境学研究部門植物性産学分野・本江昭夫教授(現名誉教授)、本江先生退官後主指導教員をお引き受けいただきました畜産科学分野家畜生産科学分野・日高智教授に心よりお礼申し上げます。

DFA III の共同研究者として、連大入学以前から終始ご指導いただき、入学後は副指導教員として本論文作成のご指導、ご校閲を賜りました帯広畜産大学畜産科学分野家畜生産科学分野・花田正明准教授、副指導教員として研究に対しいつも暖かいご助言をくださり、励ましてくださいました山形大学農学部食糧生命環境学科・高橋敏能教授、論文の審査員をお引き受けいただいただけでなく、成長初期の栄養を通して DFA III の新しい可能性を示唆いただき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には深く深く感謝申し上げます。

DFA III の研究を始めた当初からご理解いただき、普及のために応援いただきました元帯広畜産大学教授・岡本明治博士、帯広畜産大学地域連携推進センター田中一郎博士に厚くお礼申し上げます。

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、有塚勉取締役総合研究所長、研究の遂行に対し多大なるご支援賜りました井村悦夫常務取締役(元取締役飼料事業部長)、仙波美博元取締役総合研究所長、佐渡谷裕朗飼料事業部長、試験支えていただきました菊地裕人総合研究所主席研究員、総合研究所附属清川農場場員の皆様、総合研究所第一グループの皆様、飼料事業部生産支援室の皆様には心より深謝申し上げます。