

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08052

研究課題名(和文) 乳牛の亜急性ルーメンアシドーシスによる繁殖機能低下要因の解明と代謝機能改善効果

研究課題名(英文) Elucidation of factors that impair reproductive function and improvement of metabolic function due to subacute rumen acidosis in dairy cows

研究代表者

大滝 忠利(OHTAKI, Tadatoshi)

日本大学・生物資源科学部・准教授

研究者番号：10434101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：乳牛におけるルーメン内LPS濃度上昇が繁殖機能に及ぼす影響を明らかにする目的で、濃厚飼料多給後のLPS濃度と血液生化学性状を調べた。その結果、対照群に比べ、濃厚飼料多給群ではルーメン液中LPSおよびハプトグロビン濃度が有意に高く、アルブミンが低かった。また、濃厚飼料多給後のHpとASTが、給餌前と比較して大幅に増加し、T-Cholは有意に低下した。しかし、末梢血、肝門脈血、卵胞液、子宮灌流液中LPS濃度には明らかな差は認められなかった。結論として、ルーメン液中LPS濃度の上昇が中程度の場合は、生殖器には直接影響を与えないが、肝臓へのLPS流入の増加は、肝機能に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、ルーメン液中LPS濃度の上昇が中程度の場合は、生殖器には直接影響を与えないが、肝臓へのLPS流入の増加は、肝機能に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。また、搾乳牛におけるルーメン内LPS濃度の動態には個体差が大きく、変動が大きい個体すなわちルーメン内環境が安定していない個体では空胎日数の延長が認められた。これらの成果から、ルーメン内LPS濃度の上昇は、肝機能の低下を引き起こし、間接的に繁殖機能を低下させるものと推察された。ルーメンLPSの増加が繁殖機能に及ぼす影響を明らかにするには、肝臓へのLPS流入が高い牛を用いてのさらなる研究が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of clarifying the effect of increased LPS concentration in the rumen on reproductive function in the dairy cows by high-concentrate diet, LPS concentration and blood biochemical properties after the high-concentrate diet were investigated. We observed that the ruminal LPS and haptoglobin (Hp) levels were higher and albumin levels were lower in the high-concentrate diet group than in the control. The Hp levels and AST activity were higher and the total cholesterol levels were lower after high-concentrate diet feeding than before feeding. No differences were observed in LPS levels in the peripheral veins, hepatic veins, hepatic portal vein, uterine perfusate, and follicular fluids between the groups. In conclusion, our results indicate that high-concentrate diets do not have a direct effect on the reproductive organs upon a moderate ruminal LPS level increase. However, an increased ruminal LPS influx into the liver might affect negatively liver function.

研究分野：獣医臨床繁殖学

キーワード：乳牛 ルーメン エンドトキシン 繁殖機能 肝機能 濃厚飼料多給

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、乳牛の繁殖成績低下が世界的な問題となっている。乳牛は分娩後の急激な乳量増加により、飼料からの摂取エネルギーに乳生産のエネルギーが追い付かず、負のエネルギー状態に陥る。このエネルギー不足を解消するために、高エネルギー飼料として濃厚飼料が給与されており、その給与量は泌乳量の増加に比例し増加し続けている。濃厚飼料を多量に給与すると、発酵が進みルーメン内の揮発性脂肪酸産生量が増加し、特に酢酸/プロピオン酸比が低下してルーメン内 pH が低下し亜急性ルーメンアシドーシス (SARA) を引き起こす。見た目は健康な牛でも日常的に SARA が認められており、蹄葉炎、脂肪肝、第四胃変位など様々な疾患を引き起こすことが知られている。この SARA に伴い、ルーメン内細菌叢が変化し、グラム陰性菌が死滅することで、その菌体より細胞壁を構築している LPS がルーメン液に遊離し、ルーメン壁から吸収されて静脈に移行し、門脈を経て肝臓に達する。その流入量が肝臓の解毒処理能力を超えると、末梢血中 LPS 濃度が上昇する。末梢血中 LPS は、下垂体からの黄体形成ホルモン (LH) のパルス状分泌の抑制、血中エストラジオール濃度の上昇抑制、卵巣での黄体退行阻害などの繁殖機能に影響を与えることが知られている。しかし、ルーメン内 LPS やその結果産生される TNF- α の上昇が繁殖機能に与える影響は明確にはわかっていない。このことから、乳牛の繁殖成績低下の一要因として、濃厚飼料多給によるルーメン内の LPS 濃度上昇とそれを解毒するための肝機能の低下が挙げられる。

(2) 申請者らの予備試験では、飼料乾物中でのん粉含量が 40% の給餌を行った結果、ルーメン内 LPS 濃度は有意に上昇したものの、肝機能が良好な個体では肝臓で LPS の大部分が解毒され、その結果末梢血中へ遊離する LPS は増加しなかったことを確認している。しかし、濃厚飼料多給により上昇したルーメン液由来の LPS がどの程度門脈に移動し、生殖器に与える影響については明らかにされていない。

2. 研究の目的

(1) エネルギー不足を補うために、濃厚飼料が多給傾向にあるが、これによりルーメン内の LPS 濃度が増加し、繁殖機能を抑制することが報告されている。本研究では、まず、濃厚飼料多給モデル牛を用いて、ルーメン液、肝門脈血、肝静脈血、末梢血、卵胞液、子宮灌流液中の LPS 濃度を測定し、肝臓への LPS の流入量を把握することで、肝臓における LPS の解毒処理能力と肝機能との関係を調べる。また、ルーメン内 LPS 濃度と血中 TNF- α 濃度、栄養代謝系ホルモン濃度、ステロイドホルモンなどの繁殖機能との関係を調査する。

(2) 高泌乳牛では分娩後の濃厚飼料多給によりルーメン内の LPS 濃度が上昇することが知られている。一方、濃厚飼料多給ではない飼養環境下においても、分娩後ルーメン内 LPS 濃度上昇に伴う繁殖成績悪化リスクが想定されるが、粗飼料多給飼養環境下における乳牛のルーメン内 LPS 濃度と繁殖機能との関連については明らかにされていない。そこで、本研究では粗飼料多給飼養環境下における乳牛の分娩後ルーメン内 LPS 濃度と繁殖機能との関連性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 濃厚飼料多給による乳牛のルーメン内 LPS 上昇が生殖器へ与える影響

本試験では、非妊娠乾乳ホルスタイン牛 12 頭を使用した。対照群 (n=5) はチモシー乾草主体で、濃厚飼料多給群 (n=7) は飼料乾物中の粗飼料割合を 40% から 30、25、20% となるようにチモシーを段階的に 4 週間かけて減らし、トウモロコシ、大豆粕主体の飼料で飼養した。供試牛は、シダーシンク法により発情同期化を行い、2 回目の GnRH 投与日の翌日 (濃厚飼料多給開始から 4 週目) に末梢血、肝門脈血、肝静脈血、ルーメン液、卵胞液、子宮灌流液を採取し、LPS 濃度を測定した。また、末梢血は血液生化学性状、ハプトグロビン (Hp) を、ルーメン液は揮発性脂肪酸濃度を測定した。さらに、濃厚飼料多給群では、給餌前後の血液パラメーターを比較するために濃厚飼料多給開始前に末梢血を採取した。

(2) 分娩後のルーメン内 LPS 濃度と繁殖機能との関係性

乳量水準が 8,000kg 程度の牛群にて泌乳牛 42 頭からルーメン液 (分娩後約 3 日、4、8、12 週) および血液を分娩後 12 週目まで採取した。採取したルーメン液中の LPS および VFA を測定した。また、血液生化学性状、IGF-1、LPS、Hp 濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) 濃厚飼料多給による乳牛のルーメン内 LPS 上昇が生殖器へ与える影響

濃厚飼料多給群のルーメン pH は、対照群よりも有意に低かった。濃厚飼料多給群のルーメン液中の VFA は対照群に比べて、酢酸が有意に低く、酪酸とイソ吉草酸は有意に高かった。また、酢酸とプロピオン酸の比率 (A/P 比) は、濃厚飼料多給群の方が対照群よりも有意に低かった。ルーメン LPS 濃度は、対照群よりも濃厚飼料多給群で有意に高かった。

Hp 濃度は、対照群よりも濃厚飼料多給群で有意に高かったが、LPS 結合蛋白 (LBP)、SAA、および TNF- α には有意差はなかった。血液生化学性状は、ALB が対照群よりも濃厚飼料多給群で

意に低かったが、AST、GGT、T-Chol、および NEFA には有意差はなかった。濃厚飼料多給群では、濃厚飼料多給後の Hp と AST が、給餌前と比較して大幅に増加し、T-Chol は有意に低く、ALB は低下する傾向を示した (図 1)。しかし、両群間の末梢血、肝門脈血、卵胞液、子宮灌流液中 LPS 濃度には明らかな差は認められなかった (表 1)。

全頭で比較したところ、ルーメン液中 LPS 濃度は、ALB 濃度との間に有意な負の相関、AST および Hp 濃度と正の相関傾向が認められた。また、肝門脈血中の LPS 濃度は、AST および SAA 濃度と正の相関傾向を示した。

結論として、濃厚飼料の多給は、ルーメン液中 LPS 濃度の上昇が中程度の場合は、生殖器には直接影響を与えないことを示した。ただし、肝臓へのルーメン液 LPS 流入の増加は、肝臓機能に悪影響を及ぼす可能性が示唆された。

(2) 分娩後のルーメン内 LPS 濃度と繁殖機能との関係性

炎症性疾患による血中 LPS 濃度上昇の影響を避けるため、周産期疾病、蹄病などに罹患した個体および双子を分娩した個体は除外して解析を行った。その結果、ルーメン内 LPS 濃度は個体または分娩後週数ごとにバラツキが認められた。そこで、分娩後 4 週時での LPS 濃度を中央値で区分し、高 LPS 群 (n=8) と低 LPS 群 (n=9) として比較検討した。その結果、分娩後 4 週および 8 週時での IGF-1 濃度は低 LPS 群に比べ高 LPS 群で有意に低かった。またルーメン液中の A/P 比が高 LPS 群で低い傾向にあった。さらに、両群間で初回排卵日数に有意な差は認められなかったが、初回授精日数は高 LPS 群で有意に長かった (p < 0.05)。一方、ルーメン内 LPS 濃度と血中 LPS 濃度との間に有意な相関は認められなかった。ことから、濃厚飼料多給でない牛群においてもルーメン内 LPS 濃度の上昇が繁殖成績に影響を及ぼす可能性が示唆された。

ルーメン内 LPS 濃度には個体による大きなバラツキがあり、分娩後の経過に伴い大きく変動する個体と、変動が小さい個体が認められた。そこで、分娩後 4 週から 12 週でのルーメン内 LPS 濃度の変動係数が 40% より高い個体群を不安定群 (n=4)、40% 以下の個体群を安定群 (n=10) として解析を行った。その結果、不安定群では分娩後 3 日および 1 週から 4 週にかけて、有意に上昇し、分娩後 4 週および 8 週で安定群に比べ有意に高値を示した。血中 IGF-1 濃度は安定群に比べ不安定群で低く推移する傾向にあった。また、分娩後 8 週および 12 週時でのルーメン内酪酸濃度は不安定群で有意に高かったが、pH には差が認められなかった。分娩後初回排卵日数に有意差は認められなかったが、空胎日数は不安定群で有意に延長した。以上の事から、粗飼料多給飼養環境下で分娩後にルーメン内 LPS 濃度が不安定すなわち、ルーメン環境の変動が大きい個体は、繁殖成績悪化リスクが高い可能性が示された。

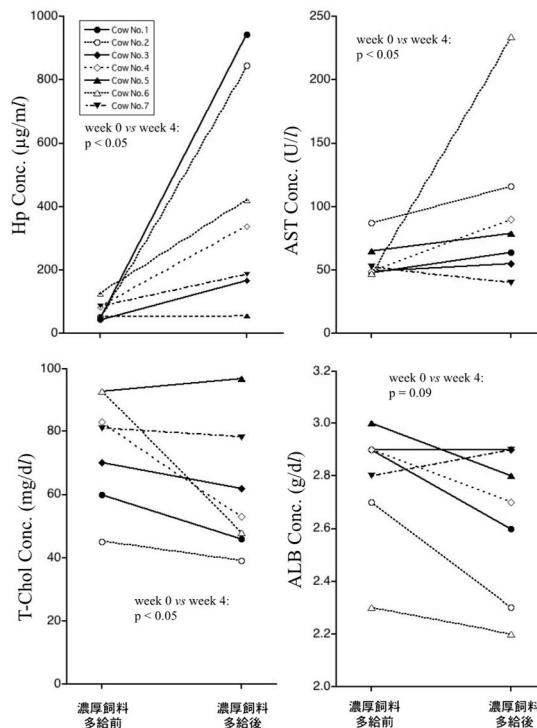


図1 濃厚飼料多給前後 (給与0週および4週) における血液パラメーターの変化

表1. 末梢血、肝門脈血、肝静脈血、子宮灌流液、卵胞液中のLPS濃度

採取部位	対照群		濃厚飼料多給群	
末梢血 (EU/ml)	0.28 ± 0.00	(n = 5)	0.26 ± 0.01	(n = 7)
肝門脈血 (EU/ml)	0.35 ± 0.10	(n = 4)	0.31 ± 0.06	(n = 3)
肝静脈血 (EU/ml)	0.20 ± 0.05	(n = 4)	0.21	(n = 1)
子宮灌流液 (EU/ml)	0.27 ± 0.03	(n = 5)	0.27 ± 0.00	(n = 7)
卵胞液 (EU/ml)	0.31 ± 0.02	(n = 4)	0.31 ± 0.03	(n = 4)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tadatoshi OHTAKI, Kanae OGATA, Hiroshi KAJIKAWA, Toshiaki SUMIYOSHI, Sanae ASANO, Shigehisa TSUMAGARI, Tetsuya HORIKITA	4. 巻 82
2. 論文標題 Effect of high-concentrate corn grain diet-induced elevated ruminal lipopolysaccharide levels on dairy cow liver function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Vet. Med. Sci.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1292/jvms.20-0117	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大矢琴美、大滝忠利、梶川 博、住吉俊亮、浅野早苗、沼田洋一、津曲茂久、堀北哲也
2. 発表標題 乳牛における分娩後のルーメン内LPS濃度と繁殖機能との関連性
3. 学会等名 第161回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ogata, K., Ohtaki, T., Kajikawa, H., Sumiyoshi, T., Asano, S., Tsumagari, S. and Horikita, T.
2. 発表標題 Effects of Increased of Lipopolysaccharide Level in the Rumen due to Feeding with Increased Corn Grain in Concentrated Feed on the Reproductive Organs of Dairy Cows.
3. 学会等名 The 30th World Buiatrics Congress 2018 Sapporo (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小田川 陽、大滝 忠利、大矢 琴美、大澤 光、梶川 博、沼田 洋一、住吉 俊亮、浅野 早苗、堀北 哲也
2. 発表標題 同一飼養環境下におけるホルスタイン種乳牛とジャージー種乳牛のルーメン液中LPS濃度の変動の比較
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大矢 琴美、大滝 忠利、古山敬祐、梶川 博、住吉 俊亮、浅野 早苗、堀北 哲也
2. 発表標題 粗飼料多給飼養環境下の乳牛における分娩後ルーメン内LPS濃度の変動と繁殖成績との関連性
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大滝 忠利、小方 可奈江、梶川 博、住吉 俊亮、浅野 早苗、堀北 哲也
2. 発表標題 乳牛への濃厚飼料多給によるルーメン内LPS濃度上昇が生殖器に及ぼす影響
3. 学会等名 第162回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	古山 敬祐 (KOYAMA keisuke) (50611026)	地方独立行政法人北海道立総合研究機構・農業研究本部酪農試験場・研究職員 (80122)	
研究分担者	梶川 博 (KAJIKAWA Hiroshi) (90414705)	日本大学・生物資源科学部・教授 (32665)	