

令和 3 年 8 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K08063

研究課題名(和文) 乳牛における健康時の血中抗酸化物質濃度は乳房炎発症リスクと関連するか

研究課題名(英文) Does antioxidant substance concentration of dairy cows relate to the risk of mastitis?

研究代表者

黒川 勇三 (Kurokawa, Yuzo)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・准教授

研究者番号：00234592

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)：乳牛の抗酸化物質(全血中グルタチオン(GSH)、血漿中ビタミンC(VitC))濃度と乳房炎(CM)発症との関係を解析した。分娩後日数(DIM)が、1-95日、96-190日、191-285日、286以上の期間ごとのCM発症とGSH濃度、VitC濃度との関連を、2項ロジスティック検定で検定した。GSHとCM発症との関連が有意($P < 0.05$)で、GSHが高い期間でCM発症率が低かった。VitCとCM発症との関連は有意でなかった。生存時間解析のロジスティック検定により血中GSH濃度が低い個体で、CM発症率の増加が早いことが示された。全血中GSH濃度が低い個体で、CM発症率が高くなることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

酪農において、高泌乳牛のホルスタイン種で生産寿命の短縮が大きな問題になっている。その原因のひとつに、乳房炎があげられる。本研究での解析では、血液中の抗酸化物質であるグルタチオンの濃度が高い乳牛では、乳房炎を発症する確率が低いことが明らかになった。グルタチオンの血中濃度に、産次や分娩後日数の影響が認められないため、この影響は主に個体差によるものと考えられた。抗酸化物質であるビタミンCが乳房炎発症時に低下することが過去に報告されていたが、個体ごとのグルタチオンの血中濃度が、乳房炎と関連するという事実は新しい知見であり、乳牛の乳房炎予防のための基礎的知見として活用できると期待される。

研究成果の概要(英文)：The relation between blood antioxidants (AOX) (whole blood glutathione (GSH) and plasma vitamin C (VitC)) concentration and clinical mastitis incidence of dairy cows were analyzed. The binomial logistic tests showed the blood concentration of GSH significantly ($P < 0.05$) associated with the CM incidence during the same period of days in milk (DIM) (1-95, 96-190, 191-285 and 286 or more) as the blood sampling. The blood concentration of VitC was not significantly associated with CM incidence. Survival analyses with stratified log-rank tests using the parity group as strata showed significantly ($P < 0.05$) earlier and higher increase in CM incidence density during the lactation period for the individual of dairy cows with low blood GSH concentration than those with high or middle blood GSH concentration, regardless of parity. Those results showed the individual of dairy cows with lower whole blood GSH are at high risk for CM incidence.

研究分野：乳牛のライフサイクル

キーワード：乳牛 ライフサイクル 抗酸化物質 グルタチオン ビタミンC 乳房炎 生存時間解析 2項ロジスティック検定

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

酪農において、高泌乳牛のホルスタイン種で生産寿命の短縮が大きな問題になっている。その原因のひとつに、乳房炎があげられる。臨床性乳房炎(CM)は乳牛に広く認められる疾病であり、乳量(Schukkenら2009)や繁殖成績(Kumarら2017)に影響を及ぼし、農家としての利益を低下させる要因になることが知られている(Dezetterら2017)。このように、乳房炎予防の重要性は、十分認識されているにもかかわらず、Hoomanら(2018)はCM発症率が産次進行に伴って増加する理由が不明であると述べているなど、その発症に影響するライフサイクルにかかわる要因について、十分明らかになっているとは言えない。

一方、抗酸化能が、家畜の老化(aging)と、疾病の予防に関連することはよく知られており(LykkefeldtとSvensen2007)、本研究の実施者は、乳牛のライフサイクルの改善に寄与する可能性があると考えた。Ranjanら(2005)は、乳牛の乳房炎発症時に、血中ビタミンC(VitC)の濃度が低下することを報告した。Osorioら(2014)は、周産期の乳牛飼料にバイパスメチオニン製剤を添加することで、肝臓中の抗酸化物質であるグルタチオン(GSH)濃度が増加して、免疫能が高まったことを報告している。しかし、これらの抗酸化物質の変化が、CM発症率に及ぼす影響は、明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、CM発症が繁殖や除籍などに及ぼす影響を調べて、ライフサイクルへの影響を明らかにする。そのうえで、乳牛のライフサイクルのなかで、血中抗酸化物質濃度の変化の要因を調べつつ、その違いとCM発症との関連性を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CM発症と除籍、繁殖等のライフサイクル関連要因との関連性

・データと飼養管理等

広島大学農場に蓄積された2000年-2019年のデータを解析した。広島大学の農場では、常時25頭前後のホルスタイン種搾乳牛が飼養されていた。2011年3月に、自動搾乳システム(Automatic milking system, AMS (Astronaut A3 Next; Lely, Maassluis, the Netherlands))が導入されていた。AMS導入前には、午前9時と午後4時の2回パーラーで搾乳が行われ、飼料は分離給与であった。導入後には混合飼料とAMS訪問時の濃厚飼料給与のシステムが採用されている。

・統計処理

AMS導入前後と産次が、CM発症率に及ぼす影響を、以下の一般化線形モデルで解析した。

$$Y_{ij} = \mu + AMS_i + PAR_j + \varepsilon_{ij}$$

ここに、 Y_{ij} は従属変数で、CM発症の有無(0, 発症無し; 1, 発症有り)、 AMS_i はAMSの導入前後($i=1$, 導入前; $i=2$, 導入後)、 PAR_j は産次($j=1$, 初産; $j=2$ 産; $j=3$, 3産; $j=4$, 4産以上)を表す。

CM発症の有無が、除籍率、当該産次で除籍にならなかった場合の分娩間隔(日)に及ぼす影響を、以下の一般化線形モデルで解析した。

$$Y_{ijkl} = \mu + AMS_i + PAR_j + Cmonth_k + CM_l + \varepsilon_{ijkl}$$

ここに、 Y_{ijkl} は従属変数で、除籍の有無(0, 除籍無し; 1, 除籍有り)または分娩間隔を表す。 AMS_i はAMSの導入前後($i=1$, 導入前; $i=2$, 導入後)、 PAR_j は産次($j=1$, 初産; $j=2$ 産; $j=3$, 3産; $j=4$, 4産以上)、 $Cmonth_k$ は分娩月、 CM_l は乳房炎発症の有無($l=0$, 発症無し; $l=1$, 発症有り)、 μ は全体平均、 ε は残差である。

(2) 血中抗酸化物質濃度とCM発症との関連性

2017年から2020年の4年間に、広島大学農場で飼養されている合計61頭の乳牛を供試し、112例のデータセットを得て、以下の解析を行った。

・血中抗酸化物質濃度に及ぼす産次と分娩後日数の影響(分散分析)

この112例のデータセットを用い、産次と分娩後日数が、血中抗酸化物質濃度に及ぼす影響を以下のモデルを用いて分散分析により解析した。

$$Y_{ijklm} = \mu + par_j + DIMg_k + Cmonth_l + cow_m + \varepsilon_{ijklm}$$

ここに、 Y_{ijklm} は従属変数であり、 par_j (産次)、 $DIMg_k$ (分娩後日数グループ; $k=1$ 1-95, $k=2$ 96-190, $k=3$ 191-285, $k=4$ 286-)、 $Cmonth_l$ (分娩季節グループ; $l=1$ February-May, $l=2$ June-September, $l=3$ October-January)を固定効果とし、 cow_m ($m=1, 2, \dots, 41$)をランダム変数とした、混合モデルにより解析した。 μ は全体平均、 ε_{ijklm} はモデルの残差である。

・血中抗酸化物質濃度が個体ごとDIMgごとの乳房炎発症率に及ぼす影響の解析

GSHとVitCがDIMgごとの乳房炎発症率に及ぼす影響を、以下のモデルで解析した。

$$Y_i = \mu + AOXc_i + \varepsilon_i$$

ここに、 Y_{ijk} は従属変数で、乳房炎発症または非発症(0: DIMg中に非発症, 1: DIMg中に1回以上発症)、 $AOXc_i$ は、個体ごと、DIMgごとのGSHとVitCの階級であり、この階級が乳房炎発症率に及ぼす影響を、2項ロジスティック検定により解析した。なお、GSHとVitCの階級は、最大値と最小値の差を3等分することにより、それぞれ479.3-767.1, 767.2-1055.0, 1055.0-1342.8 μM 、1.12-3.81, 3.81-6.51, 6.51-9.20 $\mu\text{g/mL}$ と設定した。

・泌乳期の進行に伴う乳房炎発症率の推移に及ぼす血中抗酸化物質濃度の影響の生存時間解析
生存時間解析により、Kaplan–Meier 曲線を描きつつ、乳牛の個体ごとの血中抗酸化物質濃度が、泌乳期の進行に伴う乳房炎発症に及ぼす影響を、産次の影響を除いた層別ロジック検定により調べた。乳牛の供試頭数は上述の 62 頭であり、上述の分散分析及び 2 項ロジスティック検定とは別途にデータベースを構築した。産次ごとの泌乳期間中の乳房炎発症の有無、乳房炎発症時の分娩後日数について、農場に記録されたデータを用いた。当該産次に乳房炎の発症が無かった場合には、乾乳または除籍の日をもって、打ち切りとした。乳牛個体ごとの血中抗酸化物質濃度については、以下の分散分析による最小二乗平均値 (LSM) の算出によった。

$$Y_i = \mu + cow_i + \varepsilon_i$$

ここに、 cow_i は乳牛の個体を表す。

なお、すべての統計解析は R ver. 3.6.2 (R Core Team, 2019)によって行った。

4. 研究成果

(1) CM 発症と除籍、繁殖等のライフサイクル関連要因との関連性

AMS 導入後、産次の進行に伴って、除籍率は有意に増加した ($P < 0.01$) (表 1)。CM 発症により、除籍率は有意に増加した ($P < 0.05$) (表 2)。AMS 導入後、分娩間隔は有意に長くなった ($P < 0.01$) が、産次の進行に伴って、分娩間隔は影響を受けなかった。CM 発症により、同じ産次の分娩間隔は、有意に長くなる傾向を示した ($P < 0.1$) (表 2)。

(2) 血中抗酸化物質濃度と CM 発症との関連性

全血中 GSH と血漿中 VitC に対する、産次と DIMg の影響は有意ではなかった (表 3)。

図 1 に全血中 GSH 濃度の階級が DIMg ごとの CM 発症率に及ぼす影響を示した。GSH 濃度の階級が CM 発症率に及ぼす影響は有意 ($P < 0.05$) で、高 GSH の階級で、CM 発症率が最も低くなった。一方、VitC 濃度の階級が CM 発症率に及ぼす影響は有意ではなかった (図 2)。

図 3 に個体ごとの血中 GSH 濃度が、分娩後日数の進行に伴う CM 非発症率の推移に及ぼす影響を示した。血中 GSH 濃度が低い群で、CM の発症率が有意に早く上昇した ($P < 0.05$)。一方、個体ごとの血漿中 VitC 濃度が、分娩後日数の進行に伴う CM 非発症率の推移に及ぼす影響は有意ではなかった (データ不掲載)。

(3) CM が乳牛のライフサイクルに及ぼす影響

CM 発症率は、AMS 導入後および産次の進行に伴って高くなった (表 1) が、産次の進行と血中抗酸化物質濃度との関連性については明確にはできなかった (表 3)。表 2 に示した通り、CM の発症と除籍率増加との間の有意な関連性 ($P < 0.01$)、当該産次に除籍にならなかった場合の分娩間隔の延長と関連する傾向 ($P < 0.1$) が認められた。Dalanezi ら (2020) の報告によれば、グラム陽性細菌が原因の乳房炎を発症した個体は、空胎期間が延長する傾向がある。

これらのことから、CM の発症は、乳牛のライフサイクルに、除籍率を高める、分娩間隔を延長するといった大きな負の影響を与えることが確認された。CM の発症を抑制することは、極めて重要であることが改めて示された。

(4) 血中抗酸化物質濃度と CM 発症との関連性の理由とその意義について

・血中抗酸化物質濃度に対する乳牛の産次、分娩後日数の影響

本研究では産次の進行に伴って、乳房炎の発症率が高まっていた (Kurokawa ら, in press) が、産次が血中抗酸化物質濃度に影響するとはいえなかった。よって、産次の進行に伴う乳房炎発症率や除籍率の増加の要因について、本研究の抗酸化物質濃度の変化では説明することができなかった。Hooman ら (2018) も、産次の進行に伴う CM 発症率の増加理由の説明はできなかったと述べている。

一方、本研究では DIMg が血中抗酸化物質濃度 (表 3) に及ぼす影響は有意ではなかった。しかし、先行研究 (Osorio ら 2014、Zhou ら 2016) では分娩直後の 1 - 2 週間に肝臓中 GSH 濃度が低下すると報告されている。また、乳房炎の発症は、分娩直後の数週間に高まることが知られている (Green ら 2007)。これらの報告から、泌乳初期の乳房炎発症と GSH の変動との間に、関連性がある可能性はあるが、そのような視点での研究は行われていない。泌乳初期に疾病が多いことはよく知られており (Green ら 2007)、その要因の解明に、血液中の抗酸化物質の動態の研究が寄与することが期待される。

本研究では、分娩後日数を 95 日区切りとして DIMg の影響を検定しており、血中抗酸化物質濃度への、DIM の影響を調べるためにはより細かい DIMg の設定が必要であった可能性がある。本研究における DIMg の設定は、家畜改良事業団の統計で、2019 年現在の乳牛の分娩間隔の全国平均が 433 日であり、乾乳期の 60 日を差し引いた泌乳期間 373 日を 4 等分した値に近い 95 日を 1 つの DIMg の期間の長さとして、産次ごとの同じ長さの DIMg 間での乳房炎の発症率を比較しようとしたものである。

・個体ごと分娩後日数グループ (DIMg) ごとの血中 GSH 濃度と乳房炎発症率との関係の意義

血中 GSH が高い階級で CM 発症率が有意に低かった (図 2) から、血中 GSH が乳房炎発症と関連していることが示唆された。ただし、DIMg による血中 GSH 濃度の変動が認められなかったことから、この血中 GSH 濃度と CM 発症率との関連性には、供試された乳牛個体ごとの血中 GSH 濃度が影響していると考えられた。すなわち、血中 GSH の高い個体で、乳房炎発症率が低く

なっていたことを示す結果と考えられる。

- ・ 個体ごとの血中 GSH 濃度が分娩後日数の進行に伴う CM 発症率増加に及ぼす影響の意義
生存時間解析により、血中 GSH 濃度が高い個体では、DIM が 100 日以前に CM が多く発症し、泌乳期を通じてその発症率が高いことが示唆された(図 3)。この結果からも、血中 GSH の個体差が、CM 発症率の個体差に影響していることが示唆されている。
- ・ 血中抗酸化物質濃度と CM 発症率との関連性の理由

Osorio ら(2014)、Zhou ら(2016)は、バイパスメチオニン製剤を周産期の乳牛飼料に添加することにより、肝臓組織中の GSH 濃度が高まったことを報告した。それに伴い、血中の抗酸化能が高まり、白血球の細菌に対する貪食能が高まって、分娩直後の炎症性の反応が低下したという。このことから、肝臓中の GSH が高まることで、乳牛生体中の抗酸化能を高めることにつながっていると考えられる。本研究の結果(図 1、3)から、血中 GSH が高い乳牛個体で、高い抗酸化能に基づく、乳房炎等疾病の予防効果が発揮されていた可能性がある。しかし、乳牛の血中 GSH 濃度の動態についての報告は限られており、特に疾病の多い時期における血中 GSH の動態の詳細について、さらなる研究が必要である。

一方、血中 VitC 濃度と CM 発症との関連性は有意ではなかった(図 2)。Ranjan ら(2005)は、CM 発症時の血中 VitC の低下を報告しているが、本研究は CM を発症していない乳牛から採取した血液中の抗酸化物質濃度を調べたものである点が異なっている。この点で、本研究で明らかにしようとしている、GSH、VitC の血中濃度と CM 発症との関連性は、血中抗酸化物質による CM 発症の予防も含む関連性であると考えられることができる。

- ・ 血中 GSH 濃度に関する検討の乳牛ライフサイクル改善に向けた意義

表 2 から、CM の発症が、除籍率を高めることが明らかであるのに加え、繁殖成績を悪化させる可能性がある。血中 GSH 濃度が高い個体では、CM 発症率が低下して、繁殖成績の低下が防がれ、産次ごとの除籍率が低下する可能性が考えられる。繁殖成績が向上しつつ、除籍率が低下すれば、後継牛の生産を高めつつ、乳牛の生産寿命が延長する可能性が高い。血中 GSH が高まることで、乳牛のライフサイクル改善につながる可能性が高いと考えられる。Wu ら(2004)は、ヒトの様々な疾病の予防と GSH とが密接に関連していることを報告している。

今後は、乳牛個体ごとの血中 GSH が高くなる要因を明らかにするとともに、CM 発症率の低減につながるメカニズムをより明らかにしていくことが必要になるであろう。それらの成果が、生産寿命の改善につながれば、酪農家の利益、乳牛の福祉等に直結する成果となることが期待される。

表1 AMS導入前後と乳牛の産次が乳房炎発症率に及ぼす影響

	産次	before AMS		after AMS		P-value		
		LSM	SE	LSM	SE	AMS	産次	分娩月
乳房炎発症率	1	0.202 ±	0.05	0.334 ±	0.06	<0.01	<0.01	<0.1
	2	0.347 ±	0.06	0.513 ±	0.06			
	3	0.430 ±	0.07	0.599 ±	0.07			
	>4	0.481 ±	0.05	0.648 ±	0.06			

表2 搾乳ロボットの導入、CMの発症、産次が、乳牛の除籍率と分娩間隔に及ぼす影響

	Parity	Before AMS				After AMS				P-values			
		CM-		CM+		CM-		CM+		AMS	parity	CM	分娩月
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE				
除籍率	1	0.06 ±	0.02	0.10 ±	0.04	0.17 ±	0.05	0.27 ±	0.08	<0.01	<0.01	<0.05	<0.1
	2	0.08 ±	0.03	0.14 ±	0.05	0.22 ±	0.06	0.35 ±	0.07				
	3	0.20 ±	0.05	0.32 ±	0.07	0.45 ±	0.09	0.60 ±	0.08				
	>4	0.34 ±	0.06	0.49 ±	0.07	0.63 ±	0.08	0.76 ±	0.06				
分娩間隔(日)	1	396 ±	11.1	415 ±	13.7	452 ±	11.8	470 ±	14.0	<0.01	0.21	<0.1	0.19
	2	403 ±	11.4	422 ±	13.0	459 ±	12.6	477 ±	13.9				
	3	406 ±	13.5	424 ±	14.0	461 ±	16.0	480 ±	16.2				
	>4	426 ±	12.2	444 ±	12.7	481 ±	15.1	500 ±	15.3				

表3 産次と分娩後日数が血中抗酸化物質濃度に及ぼす影響

	parity	Days in milk (DIM)								P-value		
		1-95		96-190		191-285		286-		Parity	DIM	Season
		LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE	LSM	SE			
GSH	1st	898 ± 46		897 ± 43.4		966 ± 39		960 ± 39.5		0.80	<0.1	0.30
	2nd	922 ± 44.4		921 ± 43.7		990 ± 43.5		984 ± 46.3				
	3rd or more	906 ± 47.3		904 ± 48.5		974 ± 47.4		967 ± 49.6				
VitC	1st	4.55 ± 0.41		5.34 ± 0.40		5.24 ± 0.34		4.81 ± 0.34		0.53	0.24	<0.0
	2nd	4.14 ± 0.40		4.93 ± 0.43		4.82 ± 0.43		4.4 ± 0.44				
	3rd or more	4.24 ± 0.42		5.02 ± 0.40		4.92 ± 0.38		4.5 ± 0.41				

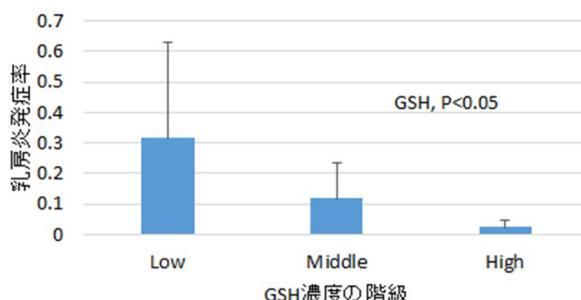


図1 血中GSH濃度が個体ごとDIMごとの乳房炎発症率に及ぼす影響

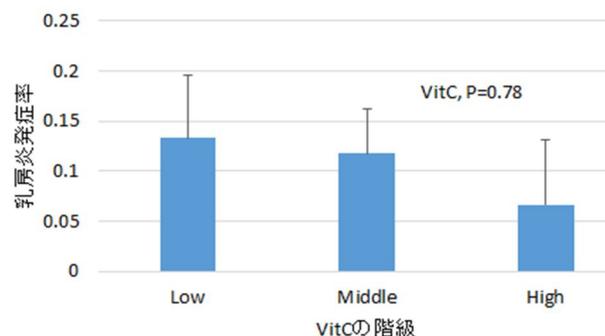


図2 VitCの階級が個体ごとDIMごとの乳房炎発症率に及ぼす影響

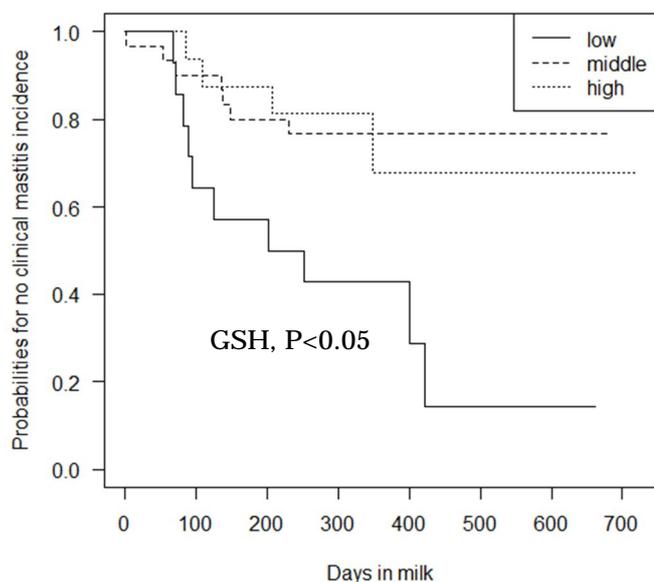


図3. 乳牛の血中GSH濃度が、分娩後日数の進行に伴う乳房炎非発症率の推移に及ぼす影響

・本研究におけるCM発症が乳牛のライフサイクルに及ぼす影響の部分は、“Relationships between milk production, clinical mastitis incidence, and reproductive performance with the culling rate and lifetime of dairy cows at Hiroshima University Farm. Yuzo KUROKAWA, Miki OKITA, Hirokazu KUBOTA, Yoshimasa TSUMIYAMA, Ichiro CHIKAMATSU, Akiyoshi TANAKA, Taketo OBITSU and Kensuke KAWAMURA”, Animal Science Journal (in press).

・血中抗酸化物質濃度とCM発症との関連性の部分は、“The relationship of blood antioxidants concentration with the mastitis incidence of dairy cows. Yuzo KUROKAWA, Yutaro YAMADA, Miki OKITA, Kensuke KAWAMURA and Taketo OBITSU”として、Animal Science Journal に投稿中。

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 0件）

1. 著者名 黒川勇三・森 久史・沖田美紀・窪田浩和・田中明良・近松一朗・積山嘉昌・小櫃剛人・川村健介	4. 巻 90
2. 論文標題 広島大学農場における乳牛の分娩間隔が乳生産に及ぼす影響	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本畜産学会報	6. 最初と最後の頁 111-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒川勇三・村井怜王・沖田美紀・豊後貴嗣・小櫃剛人
2. 発表標題 夏季暑熱が乳牛における血中抗酸化物質および血液性状に及ぼす影響
3. 学会等名 日本畜産学会第124回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 黒川勇三
2. 発表標題 夏季暑熱による乳牛の生産性低下の科学的理解と対応策の展望
3. 学会等名 日本畜産学会（招待講演）
4. 発表年 2021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	小櫃 剛人 (Obitsu Taketo) (30194632)	広島大学・統合生命科学研究科（生）・教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------