

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450397

研究課題名(和文) 暑熱下乳牛の飼料改善による抗酸化能向上はエネルギー効率低下抑制と両立するか

研究課題名(英文) Is an increase in antioxidant capacity for dairy cows under hot summer season with feed improvement compatible with energy efficiency improvement?

研究代表者

黒川 勇三 (Kurokawa, Yuzo)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：00234592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：夏季暑熱時の乳牛における酸化ストレスとエネルギー代謝における変化の関連性把握を目的とした。

泌乳牛の乳生産と血液中代謝産物、酸化ストレスマーカーを調べた。夏季暑熱時に血漿グルコースとビタミンCが低下し、酸化ストレスマーカーは変化しなかった。グルコース代謝の変化による活性酸素生成低下、抗酸化物質ビタミンCの細胞内取り込みが示唆された。またバイパスメチオニンの飼料添加により、夏季暑熱時乳腺組織へのグルコース取り込みが減少し、肝臓でのグルタチオン生産量増加が、活性酸素量増加に伴うグルコース代謝変化を抑制したと示唆された。暑熱時に酸化ストレス発生と乳生産低下をともに防止する技術開発の可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to grasp the relationship between oxidative status and energy metabolism of dairy cows in hot summer season. Exp1; in hot summer season, blood glucose and vitamin C were decreased, but MDA, oxidative stress marker, was not affected. It was suggested that in summer hot season reactive oxygen species synthesis was decreased with the change in glucose metabolism, and uptake of vitamin C, which is antioxidant, by peripheral tissue cell increased. Exp2; supplementation of bypass-methionine in hot summer season decreased uptake of glucose by mammalian tissue. This result suggested that bypass-methionine supplementation increased glutathione synthesis in the liver and decreased the uptake of glucose by the mammalian tissue without increase in MDA. In conclusion, it was suggested the possibility of development of feeding technology for preventing oxidative stress without negative effects on milk production in hot summer season.

研究分野：家畜生産学

キーワード：酸化ストレス 抗酸化能 乳牛 乳生産 エネルギー代謝 グルコース メチオニン 夏季暑熱

1. 研究開始当初の背景

夏季暑熱時の乳牛において、体温上昇に伴う疾病の増加、飼料摂取量や乳生産の低下といった問題が発生することが知られている。またビタミン C の血中濃度低下や、体温と酸化ストレスマーカーとの正の相関関係といった、酸化ストレスの上昇を示唆する報告もある。酸化ストレスは様々な疾病と関連することが知られている。

Baumgard と Rhoads(2012)は、暑熱時乳牛における血中グルコースの低下(Wheelockら 2010)が、熱産生の低下とともに活性酸素種発生量の低下と関連しており、エネルギー代謝と乳生産の低下と酸化ストレス抑制気孔が、必然的に結びついているという仮説を提示している。この仮説が正しいとすると、暑熱時に抗酸化能を高めて、活性酸素の除去が促進された場合、熱産生が高まり、体温上昇の抑制ができず、暑熱ストレスが高まる可能性がある。

夏季暑熱時の酸化ストレスの問題を解決する対策立案には、そのメカニズムを理解しつつ、体温維持や乳生産の機構との関連などを明確にする必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、夏季暑熱時の乳牛において、以下の点を明らかにすることであった。

酸化ストレスと抗酸化能の変化を把握して、エネルギー代謝の変化との関連性を明らかにすること

抗酸化能を高める処理が、乳生産に及ぼす影響を明らかにすること

3. 研究の方法

1) 概要

広島大学附属農場で飼養されているホルスタイン種乳牛を供試して、以下の試験を行った。搾乳は分娩 7 日後を除いては、自動搾乳システム(AMS)で行われた。搾乳牛に給与された飼料は混合飼料(PMR)と濃厚飼料であった。

・試験 1

乳牛の乳生産エネルギー代謝マーカーと、酸化ストレスマーカー及ぼす夏季暑熱の影響。夏季暑熱時と秋季とで、乳生産、直腸温、酸化ストレスマーカー等を比較した試験。

・試験 2

バイパスメチオニンの飼料添加が、夏季暑熱時の乳生産、エネルギー代謝、酸化ストレスマーカーに及ぼす影響。春から夏季の初めにかけて、バイパスメチオニンの飼料添加が及ぼす影響を調べた試験。

・試験 3

分娩前後の動脈および乳静脈中のエネルギー代謝と酸化ストレスのマーカーの変化について。

これらの試験のほかに、夏季暑熱時のバイパス脂肪酸の飼料添加の影響に関する試験も行ったが、明確な結果が得られなかったの

でここでは省略する。

2) 調査項目と分析方法

飼料摂取量は給与量と残飼量の差から求めた。乳量は AMS の記録によった。乳脂肪などの乳成分は、赤外分析法によって分析した。血液の採取は、試験 1 では尾静脈から、試験 2 と 3 では、尾動脈と乳静脈から行い、直ちに遠心分離して、分析まで - 30 で凍結保存した。血液性状は生化学分析装置で、酸化ストレスマーカーはキットを用いて、分析した。

4. 研究成果

1) 試験 1

1 期 2 週間からなる試験を 7 月 - 8 月(第 1 期)と 10 月 - 11 月(第 2 期)に行い、それぞれ 12 頭、14 頭のホルスタイン泌乳牛を供試した。2 期を通じて同様な構成の飼料を給与し、乳生産、血漿中代謝産物および酸化ストレスマーカーを調べた。

血液性状と酸化ストレスマーカーの結果を表 1 に示した。乾物摂取量と乳量に、試験期の影響は認められなかった。18 時の直腸温度は第 1 期のほうが高く(P < 0.05)、乳タンパク質率は第 1 期のほうが低く(P < 0.05)、第 1 期における乳牛の乳生産が夏季暑熱の影響を受けていることが示唆された。血漿中グルコース、アスコルビン酸とデヒドロアスコルビン酸の合計(AA)の濃度は第 1 期のほうが低かった(P < 0.05)が、マロンジアルデヒド(MDA)濃度に試験期間の差は認められなかった(P > 0.05)。

表 1. 血液性状、酸化ストレスマーカーに及ぼす夏季暑熱の影響

		1 期†	2 期†	SEM‡	P
TG	mg/dL	8.62	8.04	1.40	0.63
T-CHO	mg/dL	153.2	173.8	21.3	0.30
NEFA	μEq/L	143.3	162.5	43.5	0.76
BUN	mg/dL	10.5	10.7	1.04	0.55
Glucose	mg/dL	65.7	77.1	2.66	<0.01
KB	μM	377.7	465.5	97.3	0.04
Insulin	ng/mL	3.37	4.23	0.77	0.10
AA	mg/L	3.52	4.37	0.46	<0.01
MDA	μM	2.00	1.85	0.26	0.52

†1 期, July 24– August 6; 2 期, October 26 – December 8.

‡SEM, standard error of mean.

TG 中性脂肪、T-CHO 総コレステロール、NEFA 遊離脂肪酸、KB ケトン体、AA ビタミン C、MDA マロンジアルデヒド

第 1 期の血漿中グルコースと AA の低下は、末梢組織における AA 取り込み量の増加によるものと考えられた。グルコースの取り込み増加は、上述の Baumgard と Rhoads(2012)の仮説と一致する結果であり、夏季暑熱時の

活性酸素生成量抑制に寄与している可能性がある。一方、AA の取り込み増加は、細胞内において増加する活性酸素生成量と抗酸化能のバランスを維持することに寄与したことが示唆された。それらの結果として、血漿中酸化ストレスマーカーである MDA 濃度に対する夏季暑熱の影響が認められなかった可能性がある。

## 2) 試験 2

供試動物は泌乳中・後期のホルスタイン 11 頭とした。処理区を添加区と対照区に分け、試験期間を 1 期 (5/11 ~ 5/26)、2 期 (5/27 ~ 6/10)、3 期 (6/11 ~ 7/1) に設定した。添加区では 1 期に農場の慣行的な飼養管理を行い、2 期・3 期にバイパスメチオニンを朝夕 1 頭当たり 10g ずつ (1 日計 20g) 飼料に添加した。対照区は全期を通し慣行的な飼養管理を行った。

畜舎内の気温と湿度から計算した温湿度指数は、第 3 期に上昇し、暑熱の影響が示唆された。乾物摂取量は両区とも第 2 期から第 3 期にかけて低下し、有意な試験期の効果が

認められた。乳量、乳糖率では処理区、試験区とも有意な効果はなかった。乳タンパク率は有意な試験期の効果と交互作用が認められ、対照区で認められた第 2~3 期の低下が添加区で認められなかった。よって、両区で夏季暑熱の影響を受けており、その影響は対照区のほうが大きかったと示唆された。

肝機能マーカーである動脈 AST と  $\gamma$ -GT にはメチオニン添加の効果が認められなかった。動脈、静脈、動静脈差において中性脂肪 (TG)、総コレステロール (T-CHO)、遊離脂肪酸 (NEFA) にメチオニン添加の効果は認められなかった。しかし第 3 期の添加区で、グルコース動静脈差が有意に低下した ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

酸化ストレスマーカーの結果を表 3 に示した。動脈 AA において処理区、試験期の効果と交互作用は有意ではなかったが、静脈 AA において試験期の進行に伴って低下する傾向を示した。MDA では静脈において処理と試験期の有意な交互作用の傾向が認められ、添加区が対照区に比べ低い値であった。

表 2 バイパスメチオニンの添加が血液代謝産物濃度の動静脈差に及ぼす影響

	処理区	試験期			SEM	P		
		1 期	2 期	3 期		処理	試験期	交互作用
TG	対照区	4.4	4.2	5.4	0.53	0.63	0.46	0.71
g/L	添加区	4.4	4.3	4.6				
T-CHO	対照区	-5.4	-3.7	-3.1	1.65	0.78	0.23	0.81
mg/dL	添加区	-6.5	-2.7	-3.8				
NEFA	対照区	-9.7	-6.6	-9.4	9.22	0.053	0.86	0.71
$\mu$ Eq/L	添加区	-21.7	-32.7	-21.5				
GLU	対照区	16.9	15.7	17.7a	0.89	0.34	0.06	0.03
mg/dL	添加区	17.7	15.1	13.1b				
ケトン体	対照区	348.4	348.4	419.4	27.8	0.33	0.90	0.12
$\mu$ M	添加区	339.8	348.4	305.0				
Ca	対照区	0.30	0.44	0.52	0.06	0.18	0.43	0.12
mg/dL	添加区	0.33	0.33	0.28				

TG 中性脂肪, T-CHO 総コレステロール, NEFA 遊離脂肪酸 Ca カルシウム, GLU グルコース

a b, 異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ )

表3 バイパスメチオニンの飼料添加が動脈および乳静脈中の酸化ストレスマーカーに及ぼす影響

	処理区	試験期			SEM	P		
		1期	2期	3期		処理	試験期	交互作用
動脈 MDA μM	対照区	2.03	2.82	2.68	0.22	0.61	0.04	0.27
	添加区	2.43	2.52	3.08				
		c		d				
乳静脈 MDA μM	対照区	2.66	1.51	3.19	0.20	0.25	<0.01	0.08
	添加区	2.11	1.68	2.35				
		a	b	a				
動脈ビタミン C mg/L	対照区	7.91	7.92	6.14	0.99	0.38	0.18	0.99
	添加区	8.72	8.42	6.88				
乳静脈ビタミン C mg/L	対照区	8.20	8.03	7.34	0.84	0.95	0.06	0.28
	添加区	9.94	7.17	6.64				
		c		d				
ビタミン C 動静 脈差 mg/L	対照区	-0.30	-0.11	-1.20	1.20	0.54	0.51	0.58
	添加区	-1.22	1.26	0.24				

MDA マロンジアルデヒド

夏季暑熱時に静脈中グルコースと AA 濃度は低下することが知られており、グルコースと AA の末梢組織への取り込みが増えることがその原因と考えられている (Kurokawa ら印刷中)。第 3 期のグルコースの乳腺組織への取り込みが、添加区で低下したことは、上述のような夏季暑熱の影響を、メチオニンの飼料添加が抑制していたことを示唆する。

夏季暑熱時の末梢組織へのグルコース取り込み増加は、Baumgard と Rhoads(2012) の仮説において、ATP 生産がグルコースの酸化から解糖系へとシフトして、活性酸素の生成量を抑制することと関連すると考えられる。よって、この取り込み増加が起きない場合、活性酸素の生成量は高くなると予想される。ところが、添加区でも乳静脈中の MDA は増加していなかった。

これらのことから、添加区の乳腺組織では何らかの抗酸化メカニズムが働いて、ATP 生産が解糖系にシフトする必要がなかった可能性がある。そのメカニズムの候補として考えられることは、メチオニンの飼料添加によって肝臓での産生量が増加したグルタチオンが、乳腺組織に多く供給されたことが考えられる。

本研究では血中グルタチオンの測定を試みたものの、血漿中の濃度が低いためと血漿の保存法に問題があった可能性があり、検出することができなかった。血中グルタチオンの測定は、今後の課題である。

3) 試験 3

ホルスタイン種 6 頭 (1~3 産) を供試し、分娩予定 4 週間前、分娩 1 週間後、6 週間後のステ

ージに、乳生産、飼料摂取、尾動脈と乳静脈の血漿中代謝産物、MDA、AA、乳中 AA の濃度を測定した。

動脈血中 NEFA は分娩 1 週間後に上昇し、6 週間後に低下した (P < 0.05)。血液性状の変化から、分娩 7 日後の肝機能低下が示唆された。グルコースと中性脂肪の濃度は動脈血のほうが高く、その差は分娩後大きくなった (P < 0.05)。動脈血中 MDA と動静脈血中ビタミン C の濃度にステージの影響は認められず、乳静脈血中 MDA 濃度のみが分娩後低下した (P < 0.05)。MDA 濃度に動静脈間の差が認められ (P < 0.1)、分娩後乳静脈血で低値を示したが、AA に有意な動静脈間の差が認められなかった。乳中 AA 濃度は血漿中濃度の約 3~4 倍であった。

分娩直後の肝機能低下、エネルギー代謝の変化と、動静脈中酸化ストレスマーカーとの関連は明らかでなかった。乳中への AA 分泌が認められているにもかかわらず、分娩後の動静脈中 AA の低下が認められなかったことから、AA の体内での生産量増加が示唆された。このことが、分娩後の乳生産開始に伴って、乳腺組織における酸化ストレスの増加が認められなかった要因のひとつであると考えられた。

4) まとめ

夏季暑熱が乳牛に及ぼす影響として、試験 1 では直腸温度の上昇、乳タンパク質濃度の低下など、試験 2 では、乳腺組織におけるグルコース取り込み量増加などが認められている。これらは、乳牛が夏季暑熱の影響を受けて、エネルギー代謝や乳生産が変化していることを示唆している。一方、分娩後の乳生

産の開始に伴って、乳腺組織におけるエネルギー代謝が活発になっていることが示唆されている。これらの結果はいずれも、エネルギー代謝の変化に伴って、活性酸素の生成量が影響を受けていることを示唆している。言い換えると、夏季の暑熱や分娩後の乳生産の開始は、酸化ストレスが高まる要因になる可能性が高いことを示している。

それにもかかわらず、夏季暑熱によって、また、分娩後の乳生産開始によって、酸化ストレスマーカーであるMDAに明確な変化は認められなかった。夏季暑熱時にはビタミンCの末梢組織への取り込み量が増加することが示唆され(試験1)、分娩後にはビタミンCの体内での生産量増加が示唆されている(試験3)。すなわち、活性酸素生成量が増加するような生体内の変化が起きるときに、それに対応したビタミンCの動態変化が起きることが示唆されている。

酸化ストレスとは、体内で発生する活性酸素に起因する酸素毒と、生体の持つ抗酸化能とのバランスが崩れた状態といわれている。本研究では、健康な乳牛を供試したために、そのバランスが崩れた状態をとらえることができなかつたと考えられる。しかし、活性酸素生成量が増加する条件では、そのバランスをとるような抗酸化物質の動態変化が、生体内で起きていることが示唆される。

一方、試験2では、バイパスメチオニンの飼料添加によって、夏季暑熱時の乳腺組織におけるグルコース代謝変化を引き起こすことなく、また、酸化ストレスを上昇させることなく、乳生産が維持されたと考えられる結果が得られた。この結果から、当初の目的とした、「乳生産を低下することなく抗酸化能を高める飼料給与法」の一端を見出すことができる可能性が示唆された。

これらの結果から、抗酸化物質の動態変化が酸化ストレスの緩和に寄与すること、その際に、グルコース等の動態を含めたエネルギー代謝の変化が同時に起こる場合と、起こらない場合(抑制できる場合)とがあることが示された。

今後は、そのエネルギー代謝の変化を含めて総合的にバランスをとる機構、バランスが崩れやすくなる要因(乳牛の加齢や泌乳期の進行などを想定)などを明らかにする方向に、研究を展開していきたいと考えている。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3件)

1. Kurokawa Y, Yamashita R, Okita M, Yoshitoshi R, Sugino T, Obitsu T and Kawamura K. A comparison of plasma glucose and oxidative status in lactating dairy cows in summer and autumn. Animal Science Journal. (印刷中 DOI: 10.1111/asj.12548) 査読有

2. 沖田美紀・古川平哲・山下莉奈・爾見知保・豊後貴嗣・黒川勇三 2015. 夏季暑熱が低密度飼養乳牛の飼料摂取行動、休息行動、自動搾乳システム訪問に及ぼす影響. 日本家畜管理学会誌 51, 73-82 査読有
3. 沖田美紀・山下莉奈・黒川勇三・豊後貴嗣・小櫃剛人. 2014. 暑熱期の乳牛の生理と生産性に及ぼす剪毛の影響. 日本家畜管理学会誌 50, 127-136. 査読有

[学会発表](計 3件)

1. 黒川勇三・森本実穂・竹内悠貴・沖田美紀・小櫃剛人・杉野利久 乳牛の分娩前後における尾動脈および乳静脈血中酸化ストレス指標の変化 日本畜産学会第121回大会(平成28年3月29日 日本獣医生命科学大学 東京都武蔵野市)
2. 黒川勇三・山下莉奈・蒲野紳之助・吉田ひかる・沖田美紀・小櫃剛人・杉野利久 乳牛の産次が周産期における血液性状と酸化ストレス、抗酸化能に及ぼす影響 日本畜産学会第119回大会(平成27年3月28日 宇都宮大学 峰キャンパス 栃木県宇都宮市)
3. 山下莉奈・沖田美紀・爾見知保・古川平哲・小櫃剛人・杉野利久・黒川勇三 暑熱が乳牛のエネルギー代謝関連ホルモンと抗酸化能に及ぼす影響 関西畜産学会第64回大会(平成26年9月9日 広島大学生物生産学部 広島県東広島市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

黒川 勇三 (Kurokawa Yuzo)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：00234592

(2)研究分担者

小櫃 剛人 (Obitsu Taketo)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：30194632