

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03131

研究課題名（和文）酸性ミルクオリゴ糖に着目した乳用子牛のラクトクライン仮説の検証

研究課題名（英文）The relationship between the oligosaccharides in bovine colostrum and lactocrine function in dairy calves.

研究代表者

杉野 利久 (Sugino, Toshihisa)

広島大学・統合生命科学研究科（生）・教授

研究者番号：90363035

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：経産牛では乾乳期の栄養水準ではなく、乾乳期間の長さが酸性オリゴ糖濃度に影響することが示され、新生子牛の体重は酸性オリゴ糖濃度と正の相関があることが明らかとなった。国内で市販される代用初乳は、その製造過程の違いにより、酸性オリゴ糖濃度が大きく異なり、濃縮ホエーによりIgG含量を高めるタイプは、酸性オリゴ糖濃度が母牛由来の初乳と比較して低いことが示された。高酸性オリゴ糖濃度の代用初乳を給与した子牛では、哺乳量が高まる2から3週齢において、糞性状が良好であった。このことから出生後1ヵ月齢までは酸性オリゴ糖含量の高い代用初乳を給与した群で栄養消化を高める可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

初乳には、成長因子やインスリンなども豊富に含まれており、これら因子が腸管機能の発達に影響する。乳用子牛の初乳に関する研究は多く、それらの成果は子牛の初乳管理に活用されており、FPTを中心にIgGを指標とした初乳給与基準の設定されており、また初乳に含まれる主要な成長因子、代謝ホルモン（インスリン等）と子牛の発育に関する知見は多い。しかし、依然として乳用子牛の下痢症、死産率は高く、同様の飼養管理下でも個体により発育が異なるケースが多い。初乳に多く含まれる酸性オリゴ糖は腸管機能に影響することが知られており、本研究で得られた知見は酪農現場での乳用子牛の飼養管理の改善に寄与できる基礎的知見である。

研究成果の概要（英文）：In multiparous dairy cows, it demonstrated that the length of the dry period affects the concentration of acidic oligosaccharides. It also been revealed that there is a positive correlation between the concentration of acidic oligosaccharides and the body weight of newborn calves. Commercially colostrum replacer in Japan varied significantly in the concentration of acidic oligosaccharides due to differences in the manufacturing process. It was demonstrated that types of colostrum replacer that enhance IgG content through concentrated whey have lower concentrations of acidic oligosaccharides compared to colostrum derived from cows. Calves fed with colostrum replacer with high concentrations of acidic oligosaccharides exhibited good fecal score during the period of increased milk intake at 2-3 weeks of age. Therefore, it is speculated that providing colostrum replacer with high acidic oligosaccharide content until one month of age could enhance nutritional digestion in calves.

研究分野：家畜栄養生理学

キーワード：乳用子牛 初乳 酸性オリゴ糖

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新生子牛は、免疫力が弱いため、初乳に高濃度で含まれる免疫グロブリン (IgG) を摂取し小腸から吸収することで、受動的に体液性免疫を獲得する。出生後 24~48 時間の子牛の血清 IgG 濃度が 10 mg/mL 以下の場合、免疫の受動伝達不全 (FPT) と定義されている (Godden, 2008)。IgG の吸収は、生後 12 時間を境に減少する (Osaka ら, 2014)。これは小腸上皮細胞間のタイトジャンクションの透過性が生後 6 時間を経過すると徐々に低下するためである。FPT の場合、哺育子牛の健康や増体に影響し (Donovan ら, 1998)、初産分娩月齢の遅延、初産乳量の減少、6 ヶ月齢までの日増体量の減少および飼料効率の低下を招く (Soberon ら, 2012)。

初乳には、成長因子やインスリンなども豊富に含まれており (Blum, J. W. and Hammon, H. 2000)、これら因子が腸管機能の発達に影響する。乳用子牛の初乳に関する研究は多く、それらの成果は子牛の初乳管理に活用されており、FPT を中心に IgG を指標とした初乳給与基準の設定されており、また初乳に含まれる主要な成長因子、代謝ホルモン (インスリン等) と子牛の発育に関する知見は多い。しかし、依然として乳用子牛の下痢症、死産率は高く、同様の飼養管理下でも個体により発育が異なるケースが多い。このことは、初乳中に含まれる他の因子と子牛の栄養生理および飼養管理に関する研究が必要であることを示している。

2. 研究の目的

本研究は、初乳・移行乳にのみ多く含まれ腸管免疫機能や発達に影響する酸性ミルクオリゴ糖に着目し、未だ明らかではない①初乳中酸性オリゴ糖の変動要因、②新生子牛への機能性とその持続性 (ラクトクライン仮説) を *in vivo* 実験系を用いて明らかにし、酪農現場に応用可能な基礎的知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 初乳中酸性オリゴ糖の変動要因

供試動物としてホルスタイン種乳牛 23 頭 (初産牛 8 頭、経産牛 15 頭) を供試した。分娩直後に搾乳したものを初乳として、その後 4 日間 (計 8 回) の乳 (移行乳) を搾乳し、初乳および移行乳 1mL に対してクロロホルム:メタノール (2:1) を 4 倍量加え、遠心分離により上澄みを回収 (計 3 回繰り返す) を行い、糖質画分サンプルとした。得られた糖質画分サンプルを PMP (1-フェニル-3-メチル-5-ピラゾロン) による標識化を行い、いくつかの逆相 HPLC カラムを利用し分析条件を検討した。その結果、以下の条件で分析することとした (図 1)。

サンプル量: 4 μ L

移動相: 20%アセトニトリル含有 100mM リン酸カリウム緩衝液 (pH7.0)

流速: 0.7mL/min

カラム: YMC 社 TriartBioC18 (内径 4.6 \times 長さ 250mm, 粒径 3 μ m, 細孔径 30nm)

カラム温度: 35 $^{\circ}$ C

検出器: 245nm

酸性ミルクオリゴ糖は 6'-シアリルラクトース (6'-SL), 3'-シアリルラクトース (3'-SL), ジシアリルラクトース (DSL), N-アセチルラクトサミン (LacNAc), 6'-シアリルラクトサミン (6'-SLN) を測定した。

また測定供試牛 23 頭に関しては、分娩前の栄養水準、体格、乾乳期間 (経産牛) および出生子牛の体重などを調査し、初乳および移行乳中酸性オリゴ糖含量との相関を解析した。

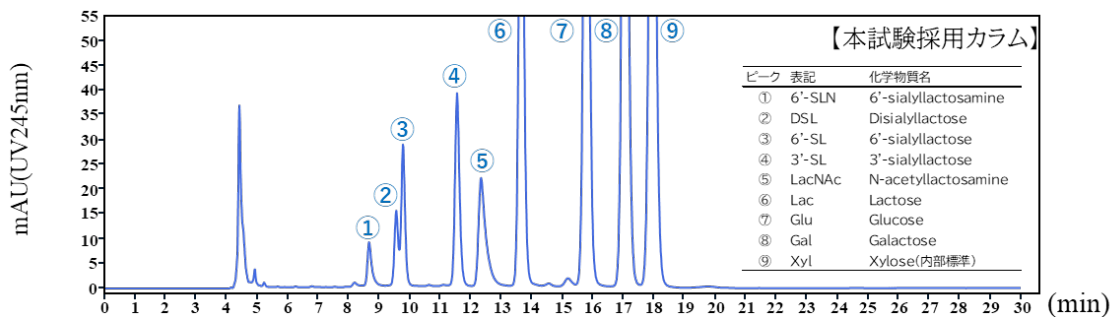


図 1: 本試験で採用した酸性オリゴ糖測定条件による標準液の検出結果

2) 新生子牛への機能性とその持続性

2) -1 代用初乳中の酸性オリゴ糖濃度の検証

試験①より、母牛から得られる初乳中の酸性オリゴ糖含量には個体差があることが明らかとなった。このことから、試験 2 では、新生子牛への酸性オリゴ糖給与試験に供試する初乳を市販されている代用初乳 (粉末) を用いることとし、市販されている代用初乳中の酸性オリゴ糖含量を解析した。国内で市販されている代用初乳 5 銘柄 (濃縮ホエータイプ 3 銘柄, 初乳粉末タイプ

2 銘柄) を用い、各銘柄 3 ロットおよび対照として母牛から得られた初乳 5 検体の酸性オリゴ糖含量を代用初乳は 4g を蒸留水に溶解し、その後の工程は試験 1 と同様に測定した。

2) -2 新生子牛への酸性オリゴ糖給与試験

酸性オリゴ糖給与試験として、ホルスタイン種メス子牛 8 頭 (出生時体重 42.4±4.2 kg) を供試した。処理区として高 IgG 低酸性オリゴ糖代用初乳を給与する L0 区と低 IgG 高酸性オリゴ糖代用初乳を給与する H0 区の 2 区を設けた (n=4)。それぞれの代用初乳を出生後 3 時間以内に乾物で 750g を給与し、その後の給飼から代用乳を高栄養哺乳プログラム (最大哺乳量 1,300g/日) に基づき給与する飼養管理を実施し、離乳は 8 週齢とした。人工乳、乾草および水は自由摂取とした。試験期間中、代用乳、人工乳および乾草の乾物摂取量を毎日測定し、体格指標として、体重、体高、十字部高、水平体長、腰角幅および胸囲を毎週測定した。また、消化管機能の指標として糞スコアを毎日測定した。試験期間は 13 週齢までとした。H0 区の 1 頭は、途中、疾病により除外したため、最終的な例数は、L0 区 4 頭、H0 区 3 頭となった。

4. 研究成果

1) 初乳中酸性オリゴ糖の変動要因

初乳および移行乳中のラクトース濃度は、初乳中濃度が最も低く、その後徐々に増加した。一方でグルコース濃度は一定の濃度で推移した。ガラクトース濃度は、初乳中濃度が最も高く、その後、徐々に減少した。本研究で分析した酸性ミルクオリゴ糖は、初乳中濃度が最も多く、その後減少した。酸性ミルクオリゴ糖のうち、3'-SL が最も初乳中濃度が高く、次いで 6'-SLN, LacNAc, DSL, 6'-SL の順であったが、3'-SL と比較して微量であった (表 1-1)。6'-SL, DSL および LacNAc 濃度は、初産牛よりも経産牛において高値を示した。初産牛において 3'-SL および 6'-SLN 濃度は初乳量とは相関関係が認められなかったが、子牛生時体重との間には正の相関が認められた。一方、経産牛においては、3'-SL と初乳量には負の相関が、乾乳期間および子牛生時体重と正の相関が認められた (表 1-2, 3)。

表 1-1: 初乳・移行乳中の酸性オリゴ糖濃度の推移

糖	初乳・移行乳中濃度 (mg/mL)								SEM	P値
	初乳	2	3	4	5	6	7	8		
6'-SLN	0.055	0.056	0.050	0.041	0.035	0.031	0.028	0.029	0.006	0.002
DSL	0.033	0.019	0.010	0.009	0.008	0.008	0.012	0.010	0.003	<0.001
6'-SL	0.009	0.009	0.008	0.007	0.007	0.007	0.006	0.005	0.001	0.006
3'-SL	0.176	0.107	0.070	0.048	0.036	0.027	0.021	0.017	0.010	<0.001
LacNAc	0.044	0.036	0.032	0.027	0.024	0.018	0.014	0.010	0.003	<0.001
Lactose	8.751	11.42	14.01	14.94	15.64	16.01	17.40	17.91	1.085	<0.001
Glucose	0.024	0.026	0.025	0.023	0.022	0.025	0.030	0.033	0.005	0.756
Galactose	0.071	0.058	0.043	0.043	0.034	0.035	0.030	0.029	0.005	<0.001

表 1-2: 初乳中酸性オリゴ糖濃度と初乳量および子牛生時体重との相関 (初産牛)

糖	乳量 (kg)	子牛生時体重
6'-SLN	-0.151	0.167
DSL	-0.163	0.355
6'-SL	0.061	-0.218
3'-SL*	-0.231	0.558
LacNAc*	0.156	0.438
Lactose	-0.220	-0.091
Glucose	-0.295	-0.328
Galactose	0.159	0.423

*: P<0.05

表 1-3: 初乳中酸性オリゴ糖濃度と初乳量、子牛生時体重および乾乳期間との相関 (経産牛)

糖	乳量 (kg)	乾乳期間	子牛生時体重
6'-SLN	-0.311	0.211	0.177
DSL	-0.489	0.402	0.305
6'-SL	0.174	-0.497	-0.240
3'-SL*	-0.605	0.437	0.530
LacNAc	-0.101	0.064	0.337
Lactose	-0.259	0.204	0.021
Glucose	-0.165	-0.338	-0.302
Galactose	-0.124	-0.108	0.290

*: P<0.05

2) 新生子牛への機能性とその持続性

2) -1 代用初乳中の酸性オリゴ糖濃度の検証

3'-SL 濃度は、初乳と比較して濃縮ホエータイプの代用初乳 A および C では低く、同じ濃縮ホエータイプである E は 3'-SL 濃度が高値であったが、濃縮ホエータイプはその他の酸性オリゴ糖濃度がほぼ検出されなかった。一方で初乳粉末タイプである代用初乳 B および D は、初乳と比較して、全ての酸性オリゴ糖濃度が高値を示した (表 2-1)。

表 2-1：代用初乳中の酸性オリゴ糖濃度

mg/mL	6'-SLN	DSL	6'-SL	3'-SL	LacNAc
初乳(1回目)	0.06	0.05	0.01	0.25	0.06
代用初乳A	-	-	-	0.02	0.04
代用初乳B	0.08	0.21	0.09	0.55	0.13
代用初乳C	-	-	-	0.09	0.03
代用初乳D	-	0.14	0.06	0.29	0.04
代用初乳E	-	-	-	0.41	0.08

濃縮ホエータイプ：代用初乳 A, C, E

初乳粉末タイプ：代用初乳 B および D

2) -2 新生子牛への酸性オリゴ糖給与試験

試験 2) -1 の結果から、IgG 含量も考慮して、代用初乳 E を L0 区、代用初乳 B を H0 区として給与試験を実施した。給与した代用初乳に含まれる 3' -SL 濃度から、L0 区では 307.5mg, H0 区では 412.5mg の酸性オリゴ糖を摂取した。出生後 24 時間の血清 IgG 濃度は、L0 区で 28.5g/L, H0 区で 23.8 g/L であったが、統計的には差がなかった (P=0.22)。試験期間を通して、代用乳の摂取量は H0 区で低く推移し、乾草摂取量も同様であったが、人工乳摂取量に両区で違いはなかった (表 2-2)。体重は、乾物摂取量を反映して、H0 区が L0 区と比較して低値で推移した。他の体格指標も同様の推移であった。一方で、栄養消化や腸管機能の指標となる糞スコアでは、哺乳量の高まる 2 週および 3 週齢において、L0 区と比較して H0 区で低値を示した。

表 2-2：試験期間中の乾物摂取量

乾物摂取量 (g/日)	処理区		SEM	P値
	L0	H0		
代用乳	951	868	8.48	<0.01
人工乳	1164	1172	21.4	0.78
乾草	135	68	6.93	<0.01

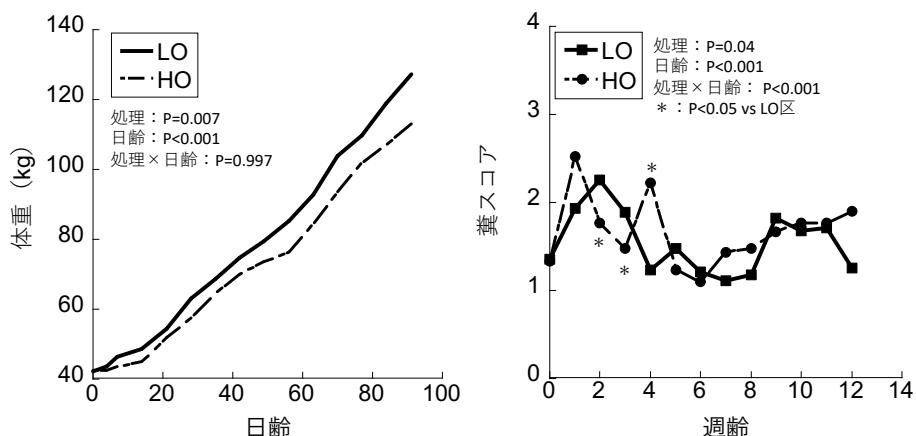


図 2-1：代用初乳中の酸性オリゴ糖濃度の違いが哺育子牛の体重推移 (左) と糞スコア (右) に及ぼす影響

L0：高 IgG 低酸性オリゴ糖代用初乳

H0：低 IgG 高酸性オリゴ糖代用初乳

糞スコア：1 正常便～4 水様便 (下痢)

考察

初乳中酸性オリゴ糖濃度は、母牛の分娩前のコンディションによって変化することが明らかとなった。特に、経産牛では乾乳期の栄養水準ではなく、乾乳期間の長さが酸性オリゴ糖濃度に影響することが示された。さらに新生子牛の体重は酸性オリゴ糖濃度と正の相関があり、新生子牛の体重が大きいほど濃度が高いことが示された。本知見は先行研究がないことから、その詳細は不明であるが、胎児期栄養による胎児の発育と乳腺での酸性オリゴ糖産生には関係があるかもしれない。

本研究では、酸性オリゴ糖給与試験に関して、市販の代用初乳を供試した。市販の代用初乳に関しては、その製造過程の違いにより、酸性オリゴ糖濃度が大きく異なることが明らかとなった。濃縮ホエーにより IgG 含量を高めるタイプは、酸性オリゴ糖濃度が母牛由来の初乳と比較して低いことが示された。濃縮ホエーは、その製造方法から濃縮時に低分子の酸性オリゴ糖が濾過されている可能性がある。実際、濾過物の酸性オリゴ糖濃度を分析したところ、濾過物中の 3' -SL 濃度は 1.93mg/mL と母牛からの初乳と比較して 7.7 倍も含まれていた。酸性オリゴ糖濃度の

異なる代用初乳を給与した子牛において、飼料摂取量および発育は IgG 含量の高い代用初乳群で高値であった。一方で、哺乳量が高まる 2~3 週齢では、高酸性オリゴ糖群の糞性状が良好であった。このことから出生後 1 ヶ月齢までは酸性オリゴ糖含量の高い代用初乳を給与した群で栄養消化を高める可能性が考えられたが、詳細は不明であり、今後の研究課題である。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Inabu Y., Haisan J., Oba M., Sugino T.	4. 巻 74
2. 論文標題 Effects of feeding a moderate- or high-energy close-up diet to cows on response of newborn calves to milk replacer feeding and intravenous injection of glucagon-like peptide 1.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Domestic Animal Endocrinology	6. 最初と最後の頁 106528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.domaniend.2020.106528	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉野利久, 朝隈貞樹, 上田靖子, 篠田優香, 沖村朋子, 石川 翔, 大澤 玲, 村山恭太郎, 小櫃剛人, 櫛引史郎
2. 発表標題 ホルスタイン種乳牛の初乳中酸性オリゴ糖濃度の推移
3. 学会等名 日本畜産学会第130回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 朝隈貞樹, 櫛引史郎, 村山恭太郎, 杉野利久
2. 発表標題 代用初乳中の各種ウシミルクオリゴ糖濃度およびその測定方法に関する研究
3. 学会等名 日本酪農科学会酪農科学シンポジウム2022
4. 発表年 2022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	櫛引 史郎 (KUSHIBIKI SHIRO) (30355218)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門・主席研究員 (82111)	

6. 研究組織（つづき）

	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	朝隈 貞樹 (ASAKUMA SADAHI) (50374773)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道 農業研究センター・上級研究員 (82111)	

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