

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380160

研究課題名(和文)ラクトフェリンとセロビオースのシンクロナイズド効果による乳用子牛の発育促進

研究課題名(英文)Improvement of growth performance in dairy calves by synchronized with lactoferrin and cellobios

研究代表者

櫛引 史郎 (KUSHIBIKI, Shiro)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・家畜生理栄養研究領域・上席研究員

研究者番号：30355218

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円、(間接経費) 4,050,000円

研究成果の概要(和文)：子牛が哺乳期から育成期になるまでの生後から約12週間は、生体機能の安定と向上を基盤とする栄養管理が重要である。本研究では、小腸から吸収されて免疫機能を向上するラクトフェリン(LF)と大腸で栄養素となる揮発性低級脂肪酸(VFA)を産生して栄養素代謝を活性化させるセロビオース(CB)を子牛に給与して、両者のシンクロ効果を検討した。発育、栄養素代謝、および免疫機能は、LFまたはCBにより向上した。特に、離乳期における発育遅延が抑制された。LFやCB単独給与で生体機能を高位安定させる十分な効果が発現したため、両者によるシンクロ効果は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, the calves were fed lactoferrin (LF), which is absorbed by the small intestine and improves immune functions, and cellobiose (CB), which volatile fatty acids (VFA) (a substance that is converted to nutrients in the large intestines) and activates nutrient metabolism. We also evaluated the synchronization effect of LF and CB. Growth, nutrient metabolism, and immune functions improved after LF or CB were given. LF and CB were identified as functionality components that contribute to healthy long-term growth from the suckling to rearing period. In particular, the suppression of growth retardation during the weaning period is a new finding of this study. On the other hand, a synchronized effect was not observed because independent supply of LF and CB both sufficiently stabilized the biological functions.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学

キーワード：子牛 ラクトフェリン セロビオース 発育

1. 研究開始当初の背景

子牛は生後 4~6 週齢以降、ルーメンが発達し、反芻動物特有の栄養生理機能を持つようになるとともに、免疫機能から能動免疫へと大きく変化する。この時期は、栄養素摂取過程や内分泌機能が変化し生体の抗病性が低下することから下痢や肺炎等の感染症が多く、発育遅延や損耗率の増加を招いている。したがって、子牛の生体機能を向上させ感染症を予防するとともに、順調な発育につながる飼養技術の開発が必要である。そのためには、生体侵襲に対してサイトカインの発現バランスを維持しながら生体防御機構の活性化である急性相反応を適正に制御し、代謝および内分泌機能の変調を抑えることが必要である。特に哺乳期においては免疫機能が未成熟なため、生体侵襲に対して免疫関連細胞から炎症性サイトカインが過剰産生されて、本来であれば免疫細胞の活性化や病原体の排除に関わるべきこれらのサイトカインが病態誘導の主因になっている。さらに、離乳期に反芻動物としての栄養素代謝が順調に備わらないと、採食量や生体機能の低下により発育が停滞し、その後の生産性に大きく影響する。

2. 研究の目的

本研究は、免疫機能が未成熟でかつ栄養素代謝が大きく変わる哺乳期から離乳後の長期間の牛ラクトフェリン(LF)とセロピオース(CB)の給与試験を中心に行い、乳用子牛に対する LF の免疫調節作用および CB の消化機能活性化作用を明らかにし、小腸から吸収されてサイトカインネットワークを介して発現する LF の多機能性と、大腸内で CB の分解により産生される揮発性脂肪酸 (VFA) の生理作用とのシンクロナイズド効果により生体機能を安定かつ向上させ、免疫機能と栄養素代謝の相互作用による発育促進効果について総合的な解析を行う。

3. 研究の方法

畜産草地研究所で生産されたホルスタイン種子牛 40 頭 (雌 24 頭、雄 16 頭) を用いた。生後 3 日から 12 週間を試験期間として設定し、6 週目までは全乳を体重比 12% (朝 5%、夕方 7%) 給与、7 週目に離乳してその後は子牛用配合飼料とカットチモシーを給与した。供試子牛は試験開始時に対照区、LF 区、CB 区、または LF+CB 区の 4 処理区に各 10 頭 (雌 6 頭、雄 4 頭) を配置した。LF の給与量は 3g/日および CB の給与量は 5g/日として、哺乳期は全乳に混和、離乳後の育成期は配合飼料に振りかけた。

(1) 試験開始 (0w) から終了時 (12w) まで隔週で採血を行い、血漿中の代謝・内分泌関連項目を測定するとともに、全血中から白血球を抽出後サイトカインの mRNA 発現を解析した。血漿中グルコース濃度は、市販の酵素法キットを用いて定量した。インスリン濃

度は RIA 法で測定した。また、炎症性サイトカイン濃度は市販の抗体を組み合わせたサンドウィッチ ELISA 法で定量した。

(2) 雄子牛の 12w 時に、大腸菌来りポポリ サッカライド (LPS) を頸静脈投与 (10ng/BWkg) して生体に急性相反応を誘導し、全身性炎症反応に対する LF、CB、または LF+CB 給与の生体防御機構に及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

(1) 試験開始時における子牛の体重に区間差は認められなかった。12 週間における日増体量 (DG) は (表 1) 対照区 0.74kg に対して LF 区が 0.89kg、CB 区が 0.92kg、そして LF+CB 区が 0.91kg となり、3 処理区の全てが対照区よりも発育が向上した ($p < 0.05$)。しかし、3 つの処理区間での有意差は認められなかった。対照区と処理区における DG の差が明瞭になったのは離乳開始以降であり、特に減乳 (6w) から離乳完了 (8w) までの 14 日間における体重増加量は、対照区が 4.2kg であったのに対し、3 処理区では 10kg を超えるレベルを示した。子牛への機能性成分の給与試験では、一般的に哺乳期後半もしくは育成期前半から効果が認められるが、本研究でも同様の傾向であった。ただし、LF や CB によって離乳期における体重停滞が抑制された結果は、従来から報告されておらず、本研究による新知見である。

表 1. 子牛の日増体量 (kg)

	対照区	LF 区
12 週間の DG	0.74 ± 0.02 ^a	0.89 ± 0.03 ^b
離乳期の DG ¹⁾	4.2 ± 1.4 ^a	11.0 ± 0.9 ^b
	CB 区	LF+CB 区
12 週間の DG	0.92 ± 0.03 ^b	0.91 ± 0.03 ^b
離乳期の DG ¹⁾	12.1 ± 2.0 ^b	12.3 ± 2.4 ^b

平均値 ± 標準誤差で表示。

¹⁾6~8w の 14 日間の体重増加量

異文字間 (a, b) で有意差、 $p < 0.05$

(2) 血漿中代謝・内分泌関連項目では、LF 区におけるグルコース濃度が対照区に比べて低く推移する期間が認められた ($p < 0.05$)。一方で、CB 区のグルコース濃度は対照区よりも高くなる傾向が認められた ($p < 0.1$)。LF+CB 区のグルコース濃度は、対照区と同じレベルを推移した。インスリン濃度もグルコース濃度と同じ反応を示した。すなわち、LF 区では対照区よりも低くなり ($p < 0.1$)、CB 区は逆に高まった ($p < 0.05$)。LF+CB 区は対照区と有意な差は認められなかった。ヒトや実験動物の知見によると、LF はインスリン感受性を高めてグルコースの体内吸収効率を改善する。ま

た、CB は腸管内で揮発性低級脂肪酸 (VFA) の産生を促すことからグルコース産生を促進することが知られている。したがって、LF および CB はそれぞれの作用機構により子牛のグルコースおよびインスリン濃度に影響を及ぼしたと考えられる。つまり、LF によるグルコース吸収効率改善と CB による VFA とグルコース産生亢進が誘導されたものと推察される。当初の目的は LF と CB のシンクロ効果を期待する試験設計であったが、体重や血漿中成分にシンクロ効果を見出すことは出来なかった。その理由としては、子牛が本来有する代謝・内分泌機能を超える栄養素や機能性成分を給与しても生体内で利用される可能性が低いことが考えられる。体重の増加も、LF と CB の効果が発現し出したのは 6w 以降であり、DG だと 1.0kg 前後である。この時期における DG としては上限付近であり、LF または CB 単独給与で十分な効果が認められている。したがって、低生時体重子牛や虚弱子牛など十分な哺乳や採食が確保しにくい場合におけるシンクロ効果は期待できると推察される。

(3) 血漿中サイトカイン濃度は、LF 区および LF+CB 区が対照区と CB 区に比べて低いレベルで推移した。特に、腫瘍壊死因子 (TNF) およびインターロイキン (IL)-1 濃度は、有意な低下であった。LF は炎症性サイトカインである TNF や IL-1 の末梢組織における発現を抑制することが知られているが、血漿中レベルに影響することを明らかにした成果は本研究による新たな知見である。しかし、CB が LF の効果に相乗的な影響を及ぼす傾向は認められなかった。

(4) 白血球中サイトカインの mRNA 発現では、LF を給与した LF 区と LF+CB 区における IL-2 および IL-18 の発現割合が、対照区および CB 区に比べて有意に高まった (図 1)。こ

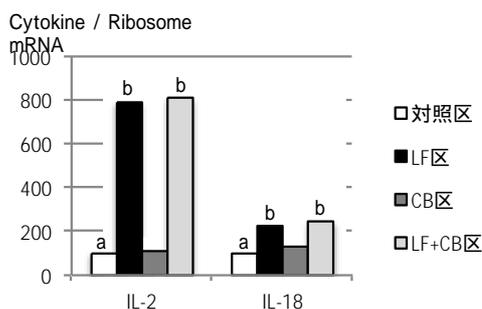


図1. 4w時における白血球中サイトカインmRNA発現
異文字間 (a, b) で有意差、 $p < 0.05$

れらの変化は 4w 以降 12w まで継続して認められた。マウスでは、LF 給与後における肝門脈血中の IL-2 および IL-18 濃度の上昇が報告されており、細胞性免疫の機能向上につながっている。本研究では末梢血の白血球中の発現割合から LF の細胞性免疫活性を明らかにしており、LF とサイトカインの関連性を証

明する新たな成果である。

(5) LPS 投与後では、血漿中インスリン濃度の一過性上昇や急性期タンパクであるハプトグロビン (HP) および炎症性サイトカイン (TNF、IL-1) 濃度が増加した。しかし、LF 区および LF+CB 区ではこのような変化は抑制された。LF の経口投与による抗炎症作用は広く知られており、本研究でも既往の報告と同様の結果であった。LF 給与が LPS 誘導急性相反応における HP 産生を抑制したことは、LF が肝臓における抗炎症作用を有することを示唆しており、肝細胞への LF および LF 分解ペプチドの蓄積効果が推察される。また、LF による抗炎症作用に CB のシンクロ効果が認められなかったことは、前述のように、十分な栄養状況では免疫機能に対するシンクロ効果が発現しにくいことが影響している。

(6) 以上の結果から、LF および CB は哺乳期から育成期にかけて長期間における健全な発育に寄与する機能性成分であることが明らかになった。特に、離乳期における発育停滞を回避出来ることは、今後の研究展開に大きなインパクトを及ぼす成果である。離乳期は、摂取飼料が液体から固体に移行すると同時に反芻行動も始まる重要な時期である。このような期間に採食量を十分に確保することはこれまでの栄養研究では難しい技術であった。また、低生時体重子牛や虚弱子牛の飼養技術も依然として改善されていないことから、本研究によるシンクロ効果をさらに適応可能な技術として検討することが必要であろう。

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 4 件)

小木野瑞奈、櫛引史郎(10人中6番目)、新宮博行(10人中7番目)、 Plasma cortisol and prolactin secretion rhythms in cattle under varying external environments and management techniques. Animal Science Journal、査読有、Vol.85、No.1、2013、pp.58-68. DOI:10.1111/asj.12090.

小木野瑞奈、櫛引史郎(9人中5番目)、新宮博行(9人中6番目)、 Plasma melatonin secretion rhythms in cattle under varying seasonal conditions. Animal Science Journal、査読有、Vol.84、No.3、2013、pp.253-257. DOI:10.1111/j.1740-0929.2012.01059.

蓮沼俊哉、櫛引史郎(10人中10番目、CA) Effect of cellulosaccharide or synbiotics feeding on growth performance, fecal condition and hormone concentrations in Holstein

calves. Animal Science Journal、査読有、Vol.82、No.4、2011、pp.543-548.
DOI:10.1111/j.1740-0929.2010.00861.
櫛引史郎、Tumor necrosis factor-alpha-induced inflammatory responses in cattle. Animal Science Journal、査読有、Vol.82、No.4、2011、pp.504-511.
DOI:10.1111/j.1740-0929.2011.00931.

研究者番号：80609701

〔学会発表〕(計 5件)

平林晴飛、櫛引史郎(6人中6番目) 加熱処理初乳の給与が黒毛和種 ET 子牛の血中免疫物質濃度に及ぼす影響、日本畜産学会、2013年9月10日、新潟大学。
山地佳代子、櫛引史郎(8人中7番目) 哺乳子牛の急性炎症反応に及ぼすアスタキサンチン給与の影響、日本畜産学会、2012年3月29日、名古屋大学。
福森理加、新宮博行(10人中4番目)、櫛引史郎(10人中9番目) 脂肪酸カルシウム給与乳牛のインスリン感受性に対する保護メチオニンの併給効果、日本畜産学会、2012年3月28日、名古屋大学。
秋山 清、櫛引史郎(4人中4番目) 黒毛和種子牛へのシンバイオティクス給与が腸内細菌叢とふん性状に及ぼす影響、日本畜産学会、2011年8月26日、北里大学。
福森理加、櫛引史郎(10人中3番目)、新宮博行(10人中4番目) 乳牛における長鎖脂肪酸カルシウムとルーメン保護メチオニン補給に伴う消化管ホルモンの変動、日本畜産学会、2011年8月26日、北里大学。

6. 研究組織

(1)研究代表者

櫛引 史郎(KUSHIBIKI, Shiro)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所・家畜生理栄養研究領域・上席研究員
研究者番号：30355218

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

新宮 博行(SHINGU, Hiroyuki)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所・家畜生理栄養研究領域・主任研究員
研究者番号：40355219

小林 寿美(KOBAYASHI, Hisami)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所・家畜生理栄養研究領域・研究員