

乳用牛におけるグルタチオンを活用した肝機能改善による繁殖成績向上技術のための研究

日野翔・根本聡実・鬼沢直樹¹⁾・足立憲隆・白谷浩之

1) 現：茨城県農林水産部畜産課

Study for the breeding performance improvement by improving liver function using glutathione in dairy cows

Sho HINO・Satomi NEMOTO・Naoki ONIZAWA・Noritaka ADACHI・Hiroyuki SHIRATANI

要 約

分娩前後の乳用牛にかかる酸化ストレスと肝機能、肝機能と繁殖性の関係について調査するとともに、抗酸化物質であるグルタチオンを活用した肝機能の維持、改善による繁殖成績向上技術について検討した。

分娩前から泌乳初期にかけて試験牛の平均血中総抗酸化能は上昇しており、牛体にかかる酸化ストレスが増加傾向にあったことが推察された。また、肝機能の指標となる血中 GGT 値は分娩直後及び分娩後 4 週に上昇し、GOT 値は分娩直後から分娩後 2 週にかけて上昇傾向にあったことから、この時期には肝機能にも負荷がかかっていたと推察される。

また、血中 T-Cho 値、GGT 値及び IGF-1 濃度と発情回帰日数との間に関連性が示唆されたことから、肝機能の低下による周産期疾病等を防ぎ、早期に発情を回帰させることで、繁殖成績を向上させることができると考えられた。

グルタチオン含有酵母給与試験では、500g/日（グルタチオンにして 15g/日）給与した群は、対照群に比べて試験期間中の血中 T-Cho 値が高い傾向で推移し、分娩後の血中 GOT 値は低めに推移し、特に分娩直後には有意に低い値となった。これらのことから、グルタチオン含有酵母の給与と肝機能との間に関連がある可能性が示唆された。

キーワード：乳用牛，グルタチオン，酸化ストレス，肝機能，繁殖性

緒 言

これまで、酪農では改良により生産性の向上を追求してきた結果、経営規模の大型化と 1 頭あたりの泌乳能力の向上を果たした。しかし、それと引き替えに乳用牛の繁殖性は低下し、ここ 10 年で都府県における分娩間隔は 441 日から 444 日へと延長している¹⁾。生乳生産額が全国第 8 位である茨城県においても²⁾、全国平均を 4 日程度上回る¹⁾ など繁殖性の改善が大きな課題となっている。

分娩後の乳用牛は急激な乳量増加のため、飼料からの摂取エネルギーに乳生産のためのエネルギーが追いつかず負のエネルギー状態に陥る³⁾。乳生産を維持するために牛体内では活発なエネルギー代謝を行っているが、その際に生成する活性酸素が細胞の生体膜を損傷する（＝酸化ストレス⁴⁾）などにより健康を阻害し、繁殖成績の低下をもたらす⁵⁾。

牛体において、肝臓は、性ホルモンの材料となるコレステロールの合成⁶⁾ や、インスリン用成長因子（IGF-1）の産生³⁾ など、繁殖に関わる代謝機能を有していることから、卵巣機能と深い関連性があると考えられる。Roche らは、肝機能が低下している乳用牛は、

分娩後に繁殖障害を発症しやすく、卵巣機能の回復が遅い傾向にあると報告している⁷⁾。

グルタチオンは、グルタミン酸、システイン、グリシンの 3 つのアミノ酸から成るトリペプチドであり、生体が有する主要な抗酸化物質であるほか⁸⁾、肝臓保護作用を有する⁹⁾。ラットにおいては、グルタチオン高含有酵母エキスの経口摂取が肝臓グルタチオン濃度を増加させ肝障害を抑制し¹⁰⁾、黒毛和種去勢牛においては、グルタチオン強化酵母の給与が全血中還元型グルタチオン濃度を上昇させる⁹⁾ など、グルタチオンの肝機能改善効果が報告されている。

酸化ストレスは抗酸化物質の給与によって一定程度制御できるとされ、乳用牛への脂溶性ビタミン¹¹⁾ やトレハロース¹²⁾ 等の給与試験は行われてきたが、グルタチオンを乳用牛に給与した試験はない。また、分娩前後の乳用牛にかかる酸化ストレスと肝機能の関連性も明らかにされていない。

そこで、分娩前後の乳用牛にかかる酸化ストレスと肝機能、肝機能と繁殖性の関係について調査するとともに、抗酸化物質であるグルタチオンを活用した肝機能の維持、改善による繁殖成績向上技術について検討を行った。

材料および方法

1 試験牛

2012 年から 2016 年にかけて、茨城県畜産センター（平均搾乳頭数 40 頭、乳量 28kg/日）のフリーストール牛舎で飼養するホルスタイン種雌牛延べ 40 頭（8 頭/年）を供試した。試験牛にはトウモロコシサイレージ主体の混合飼料を 1 日 2 回給与し、泌乳期配合飼料の量は日本飼養標準¹³⁾に基づき乳量に応じて調整した。これに加えて乾草を 1 日 3 回給与し、水と固形塩を自由摂取させた。搾乳は朝夕 2 回行った。

2 グルタチオンの給与

1) 2015 年の試験牛

試験牛 8 頭をグルタチオン 3%含有酵母 (K 社製) を給与する牛 4 頭 (給与群) と給与しない牛 4 頭 (対照群) に分けた。河上ら³⁾の黒毛和種去勢牛への給与事例を参考に、給与群にはグルタチオン含有酵母を 50g/日 (グルタチオンにして 1.5g/日) 給与した。グルタチオン含有酵母の給与は分娩前 4 週から分娩後 12 週まで毎日 8 時 30 分に、混合飼料の上から振りかけるトップドレス法にて行った。

2) 2016 年の試験牛

試験牛 8 頭を給与群 4 頭と対照群 4 頭に群分けし、給与群には K 社において血中 GOT 値低減効果を確認した 500g/日のグルタチオン含有酵母 (グルタチオンにして 15g/日) を給与した。給与方法については、2015 年と同様にした。

3 測定項目

1) 酸化ストレスの指標

分娩前 4 週, 2 週, 分娩直後及び分娩後 1 週, 2 週, 4 週, 6 週, 8 週, 12 週まで, 13 時に試験牛の尾静脈から採血した。

これを遠心分離 (3,000rpm, 15 分間, 4°C) して得た血漿を用いて, グルタチオンを比色法にて測定した。遠心分離して得た血清を用いて, 総抗酸化能 (Potential Anti Oxidant) を比色法にて測定した。

グルタチオン及び総抗酸化能の測定は外部委託により行った。

2) 肝機能の指標

1) と同様に採血及び遠心分離を行い血漿を分離した。これを分析用試料とし, 総コレステロール (T-Chol), γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ (GGT), グルタミン・オキサロアセティック・トランスアミナーゼ

(GOT) を, 乾式臨床化学分析装置 (スポットケム EZ, アークレイ社) を用いて, 添付の手順に従い分析した。

3) 繁殖性の指標

1) と同様に採血及び遠心分離を行い, 血清を用いて, IGF-1 を放射性免疫測定法 (RIA 法) にて測定した。

また, 分娩後の発情回帰日数を確認するため, 分娩直後及び分娩後 1 週から 12 週まで毎週 2 回同様に採血, 遠心分離して得た血清を用いて, プロゲステロンを電気化学発光免疫測定法 (ECLIA) にて測定した。

IGF-1 及びプロゲステロンの測定は外部委託により行った。

さらに, 目視による行動観察のほか, 牛群管理システムに記録される活動量差を参考に試験牛の発情を判断し, 人工授精 (AI) を実施した。

4) その他

分娩後 1 週から 12 週まで, 当センターの牛群管理システムに記録されている日乳量データを用い, 各週の平均日乳量を算出した。また, 乳質は週 1 回, 朝夕の搾乳時に生乳を採取し, 乳脂率, 無脂固形分率, 蛋白質率, 乳糖, 体細胞数, 乳中尿素態窒素 (MUN) を測定した。

4 統計解析

Student's t 検定により 2 群間を比較した。データはすべて平均±標準誤差 (SEM) で示し, $P < 0.05$ の場合に有意であるとした。

結果および考察

1 乳用牛にかかる酸化ストレスと肝機能について

分娩前から泌乳初期にかけて, 試験牛の平均血中総抗酸化能は上昇傾向にあった。酸化ストレスマーカーである総抗酸化能が上昇していたことから, 分娩, 泌乳開始等により環境が変化する中で, 牛体にかかる酸化ストレスが増加傾向にあったことが推察される (図 1)。

また, 肝機能の指標となる血中 GGT 値は分娩直後及び分娩後 4 週に上昇し (図 2), GOT 値は分娩直後から分娩後 2 週にかけて上昇傾向にあった (図 3)。

酸化ストレスが増加傾向にあると考えられる分娩後数週間間に, 肝機能にも負荷がかかっていたことが推察されるが, 総抗酸化能が徐々に上昇したのに対し, 血中 GGT 値は分娩直後に, GOT 値は分娩後 2 週において最高値を示した後, やや低下する傾向にあった。

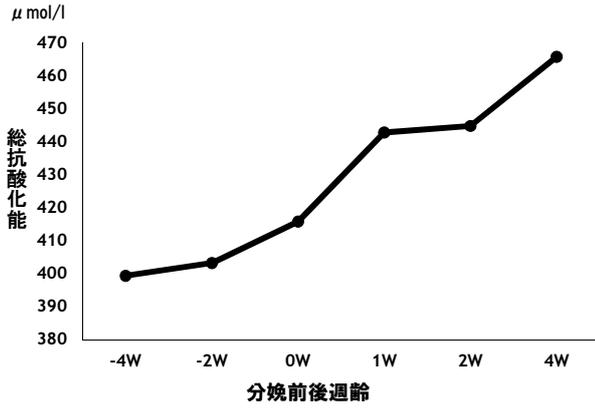


図1 平均血中総抗酸化能の推移

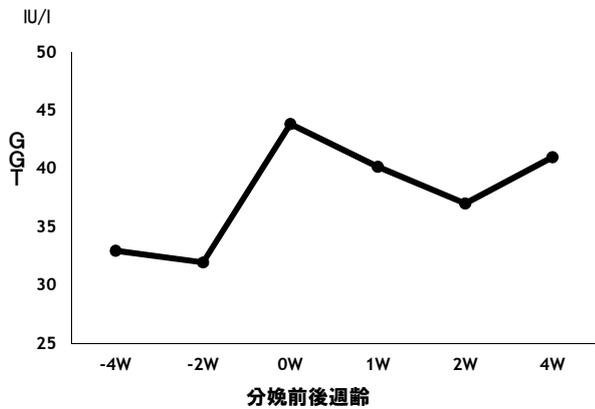


図2 平均血中GGT値の推移

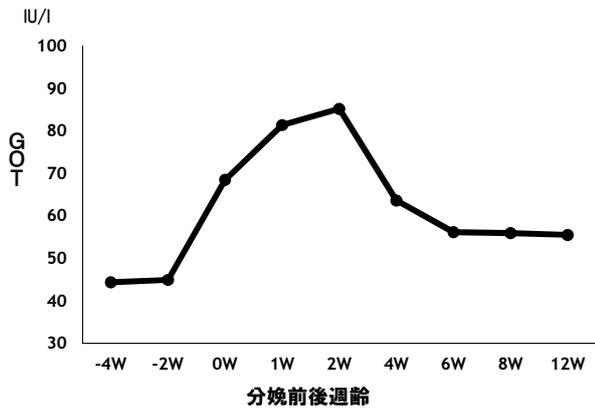


図3 平均血中GOT値の推移

2 乳用牛の肝機能と発情回帰日数について

森山ら⁴⁾の報告を参考に、分娩後初めてプロゲステロン濃度が1.00ng/mlを上回った時点を発情回帰として、供試牛延べ40頭を、発情回帰が分娩後40日以内であった早期群(n=21)と、それ以降であった遅延群(n=19)とに群分けした。

遅延群は、早期群と比較して分娩後6週及び8週の血中T-Cho値が有意に低く(図4)、また分娩前4週、2週、分娩直後、分娩後1週、2週の血中GGT値が有意に高かった(図5)。これらのことから、肝機能の指標である血中T-Cho値及びGGT値と発情回帰日数とが関連していることが示唆された。

さらに、遅延群は、早期群と比較して分娩後1週、2週、6週、8週の血中IGF-1濃度が有意に低かった(図6)。これは、分娩後早期の乳用牛において初回排卵が遅れる牛では早い牛に比べて有意にIGF-1濃度が低いとした⁵⁾以前の報告と同様の傾向を示しており、IGF-1濃度と発情回帰日数との関連性が示唆された。

牛では血中のIGF-1の殆どが肝臓で産生される³⁾ことから、肝機能と発情回帰日数との関連性が推察され、肝機能の低下による周産期疾病等を防ぎ、卵巣機能の回復を早めて発情を回帰させることで、繁殖成績を向上させることができると考えられる。

また、有意差はみられなかったものの、試験期間を通して、遅延群は早期群に比べて血中グルタチオン濃度が低めに推移しており(図7)、グルタチオン濃度と発情回帰日数とが関連している可能性が推察された。しかし、血中グルタチオン濃度は値のばらつきが大きく、測定精度の向上など更なる検討が必要である。

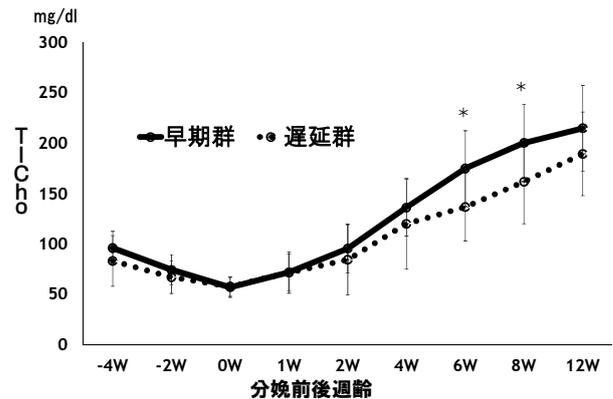


図4 分娩後の発情回帰と血中T-Cho値の関係 (エラーバーは標準偏差, *P<0.05)

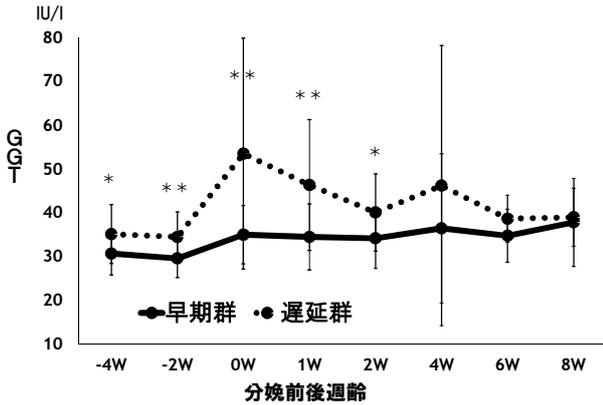


図5 分娩後の発情回帰と血中GGT値の関係 (エラーバーは標準偏差, **P<0.01, *P<0.05)

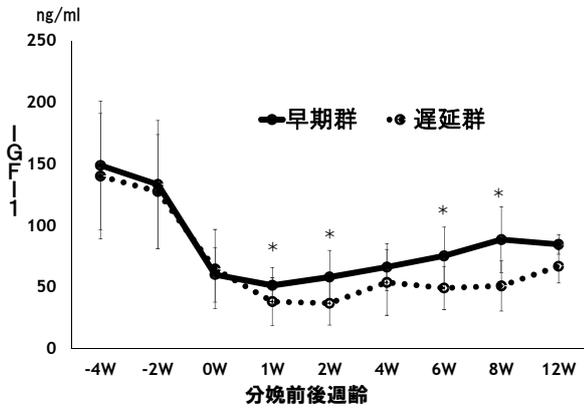


図6 分娩後の発情回帰と血中IGF-1濃度の関係 (エラーバーは標準偏差, *P<0.05)

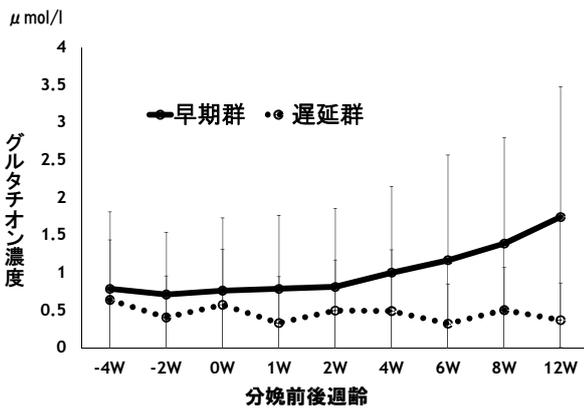


図7 分娩後の発情回帰と血中グルタチオン濃度の関係 (エラーバーは標準偏差)

3 乳用牛へのグルタチオン給与が肝機能と繁殖性に及ぼす影響について

1) 2015年の試験牛について

血中グルタチオン濃度について群間での有意な差は見られなかった。一方で、給与群の血中総抗酸化能は、分娩前4週から分娩後6週にかけて、対照群よりも高めに推移した(図8)。また、血中T-Cho, GGT, GOT値について両群間での差はみられなかった。

試験期間中、給与群1頭を除いた7頭にAIを実施し、給与群3頭中1頭、対照群4頭中2頭が受胎した。受胎までのAI回数はいずれも1回であった。プロゲステロン濃度を基準とした発情回帰までの日数は給与群が平均47日、対照群が平均19日であった。

乳量、乳質について群間での差はみられなかった。

両群間で血中グルタチオン濃度、T-Cho, GGT, GOT値に差が見られなかったこと、また給与群の平均発情回帰日数が対照群よりも長かったことから、本試験によりグルタチオン含有酵母の給与効果を確認することはできなかった。

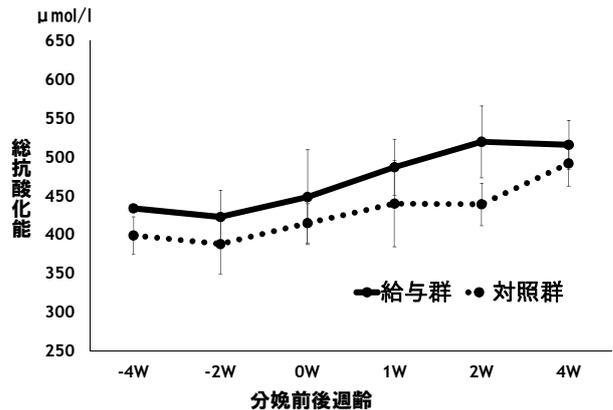


図8 血中総抗酸化能の推移 (2015年の試験牛) (エラーバーは標準偏差)

2) 2016年の試験牛について

血中グルタチオン濃度は、分娩後1週で給与群が有意に高くなったものの、その前後では群間に有意な差は見られなかった(図9)。また、両群共に図7における遅延群と同程度の水準で推移していたため、給与したグルタチオンがどの程度牛体内に吸収されたかは不明であった。

血中T-Cho値は試験期間をとおして、給与群において対照群よりも高い傾向で推移した(図10)。これは図4の早期群と同程度の水準であった。また、分娩後の血中GOT値は、給与群において対照群よりも低めに推移し、特に分娩直後には給与群が有意に低い値とな

った (図 11)。これらのことから、グルタチオン含有酵母の給与と肝機能との間に関連がある可能性が示唆された。

発情回帰までの日数は給与群が平均 36 日、対照群が平均 42 日であり、給与群の方が対照群より 6 日早かった。また、血中 IGF-1 濃度について、分娩前は対照群において高めであったが、分娩後は給与群で高めに推移した (図 12)。これらのことから、グルタチオン含有酵母給与群で発情回帰が早まる傾向にあったことが示唆された。

乳量、乳質について群間での差はみられなかった。

以上の結果、牛体内に吸収されたグルタチオンは肝臓で効果を発揮する可能性があるものの、末梢血濃度の上昇に反映されるわけではないことが推察された。

給与試験については例数が少なく、また経口給与ではグルタチオンの一部が第一胃 (ルーメン) 内微生物によりアミノ酸にまで分解され、全てがグルタチオン単体として吸収されていない可能性があるため、給与方法の見直しを含めた例数の積み上げが必要である。

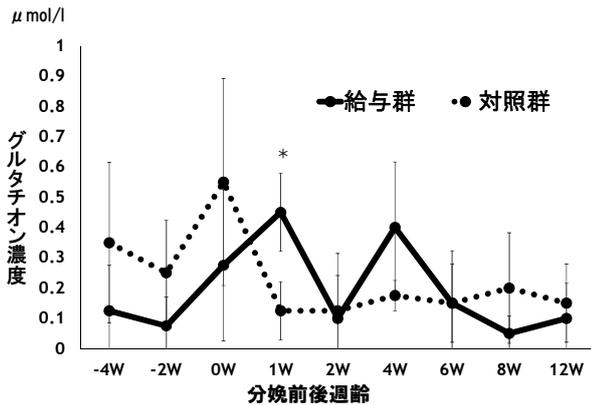


図 9 血中グルタチオン濃度の推移 (2016 年の試験牛) (エラーバーは標準偏差, *P<0.05)

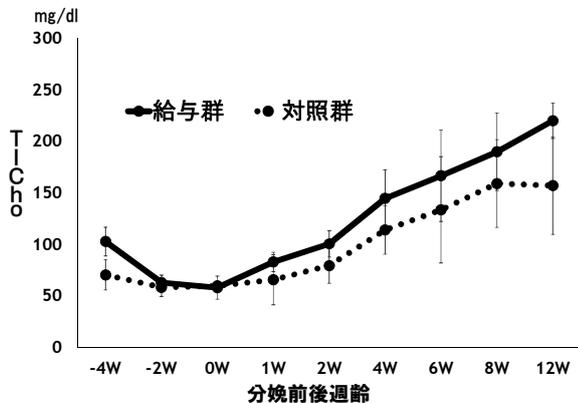


図 10 血中 T-Chol 値の推移 (2016 年の試験牛) (エラーバーは標準偏差, *P<0.05)

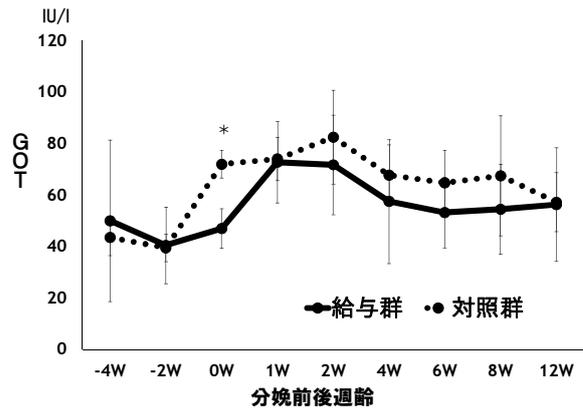


図 11 血中 GOT 値の推移 (2016 年の試験牛) (エラーバーは標準偏差, *P<0.05)

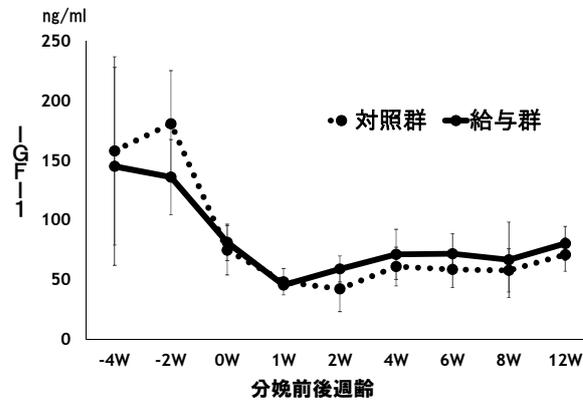


図 12 血中 IGF-1 濃度の推移 (2016 年の試験牛) (エラーバーは標準偏差, *P<0.05)

参考文献

- 1) 乳用牛群検定協議会, 2017, 乳用牛群能力検定成績速報
- 2) 農林水産省 大臣官房統計部, 2017, 農林水産統計平成 28 年 農業産出額及び生産農業所得 (都道府県別)
- 3) 川島千帆, 2009, 高泌乳牛の肝機能に作用する遺伝形質の解明による繁殖性向上へのアプローチ, 科学研究費補助金研究成果報告書
- 4) Miller, J. K., Brzezinska-Slebozinska, E. and Madsen, F. C., 1993, Oxidative stress, antioxidants, and animal function., J. Dairy Sci., 76, 2812-2823
- 5) 久米新一, 2011, 高泌乳牛の代謝特性と暑熱ストレスの影響, 畜産の研究, 65 巻 9 号, 881-891

- 6) 岡田啓司, 2007, 家畜診療, 54 卷 10 号
- 7) Roche JF, 2006, The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency, Anim Reprod Sci, 96, 282-296
- 8) 春松慎, 福田卓, 松井博之, 松田芳和, 2013, かき肉エキスのアセトアミノフェンによる肝障害抑制作用の検討, Trace Nutrients Research, 30, 41-43
- 9) 河上眞一, 栗野貴子, 山田知哉, 中西直人, 仮屋喜弘, 石崎宏, 安藤貞, 1998, グルタチオン強化酵母の給与が黒毛和種去勢牛の全血中還元型グルタチオン濃度に及ぼす影響, 日本畜産学会第 105 回大会講演要旨集, Vol. 51 No. 4, 189-193
- 10) 杉村洋一郎, 山元一弘, 1998, グルタチオン高含有酵母エキスのアセトアミノフェン誘発性肝障害に対する有効性, 日本栄養・食糧学会誌, Vol. 51 No. 4, 189-193
- 11) 田中正仁, 野中最子, 神谷裕子, 2014, 夏季の脂溶性抗酸化ビタミンと脂肪酸給与は, 酸化ストレスと泌乳成績を改善する, (独) 農業・食品産業技術総合研究機構 九州沖縄農業研究センター 畜産草地研究領域 研究成果情報
- 12) 青木直人, 佐藤幹, 神田修平, 小原嘉昭, 板橋久雄, 2013, トレハロース給与による乳牛の体内抗酸化能の改善, 栄養生理研究会報, 57(1), 21-32
- 13) 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 編, 2006, 日本飼養標準 乳牛, 中央畜産会
- 14) 森山直樹, 高木光博, 大谷昌之, 宮澤清志, 宮本明夫, 松井基純, 三宅陽一, 2007, ホルスタイン種乳用牛の周産期における血液と乳成分および体重の変動と分娩後の卵巣活動の関連性, 家畜臨床誌, 30(2), 45-50
- 15) Kawasima C, Sakaguchi M, Suzuki T, Sasamoto Y, Takahashi Y, Matsui M, Miyamoto A, 2006, Metabolic profiles in ovulatory and anovulatory primiparaous daily cows during the first follicular wave postpartum., J Reprod Develop, 52, 113-1209