

乳用牛へのファイトケミカル給与による繁殖成績及び乳生産性向上技術の開発

木村将士・日野翔¹⁾・白谷浩之²⁾・大浦俊彦・山口大輔³⁾・高橋郁菜子・埜和靖俊

1) 現：茨城県畜産センター養豚研究所 2) 現：茨城県鹿行農林事務所 3) 現：茨城県北家畜保健衛生所

Development of technology to improve reproductive performance and milk productivity by feeding phytochemical to dairy cattle

Masashi KIMURA, Shou HINO, Hiroyuki SHIRATANI, Toshihiko OURA, Daisuke YAMAGUCHI,
Kanao TAKAHASHI, Yasutoshi HAGA,

要約

乳用牛の改良により泌乳能力が向上した一方、分娩後の急激な乳量増加に伴った酸化ストレスの増大、肝機能への負担増加などの影響により受胎率等の繁殖成績が年々低下し、経営に影響を及ぼしている。そこで本研究では、ヒトにおいて酸化ストレスを低減させ、肝機能を改善することが報告されているファイトケミカル的一种であるスルフォラファンに着目し、繁殖成績及び乳生産への影響について調査を行った。

スルフォラファンを含むブロッコリー、ブロッコリーサイレージ、スルフォラファン前駆体含有粉末（パウダー）を給与した結果、肝機能および酸化ストレス改善の可能性が示唆された。また、分娩前後にパウダーを給与した結果、分娩後において子宮の早期回復効果の可能性が示唆された。一方、乳量については給与による増加は確認できなかった。

キーワード：乳用牛、スルフォラファン、ブロッコリー、酸化ストレス、肝機能

緒言

乳用牛は改良により泌乳能力が向上した一方、受胎率などの繁殖成績が年々低下（H26時点で57%¹⁾→H29時点で49.3%²⁾）し、経営に影響を及ぼしている。繁殖成績低下の原因としては、分娩後の急激な乳量増加に伴う酸化ストレスの増大³⁾、肝機能への負担増加⁴⁾が影響していると言われている。

ヒトにおいて酸化ストレス（TBARS）を低減⁵⁾させ、肝機能を改善させることが報告⁶⁾されている成分としては、ファイトケミカル的一种であるスルフォラファンが挙げられる。スルフォラファンは前駆体であるグルコラファニンの状態でブロッコリーの新芽等に多く含まれ、口内、小腸でミロシナーゼが作用することでスルフォラファンに変化、次いでSFN-GSH、SFN-Cysなどを経て代謝される。また、スルフォラファンはグルタチオンS転移酵素を誘導し、グルタチオン濃度を増加することが報告⁷⁾されており、ウシにグルタチオン給与をすることで血中の総抗酸化能が増加、肝酵素（GOT（AST）、γ-GTP（GGT））が低下し肝機能が改善することが示唆されたとの報告⁸⁾がある。

本試験ではスルフォラファンを乳用牛に投与するこ

とにより、分娩前後における酸化ストレス低減効果、肝機能改善効果などの給与効果に加え、ブロッコリー及びより保存性が高いブロッコリーサイレージについての給与効果についても検討した。

材料および方法

1 乳用牛への適切なスルフォラファン給与形態の検討

1) 検討資材

ブロッコリー（花蕾、茎、葉）、ブロッコリースプラウト、市販のスルフォラファン前駆体含有粉末（オリザ油化（株）製、以下パウダー）について（株）機能性植物研究所に分析を依頼し、LC/MS/MS法により、スルフォラファン前駆体であるグルコラファニンの含有量を測定した。

なお、ブロッコリーについては県内のブロッコリー圃場から刈り取ったものを使用、189種類の残留農薬の一斉検査を行い、いずれも基準値は下回った。

2 ブロッコリーサイレージ作成方法の検討

ブロッコリーは常温で数日持たず傷んでくるため、より保存性が高いブロッコリーサイレージの作成方法を検討した。

1) 検討資材

ブロッコリーのみ、ブロッコリーにビートパルプ(水分調整のため)を加えたもの、ブロッコリーにギ酸を加えたもの(pHを酸性よりにするため)、ブロッコリーにビートパルプ、ギ酸を加えたものを検討資材とした。なおブロッコリーは5cm程度に裁断し、ビートパルプは全量の約33%、ギ酸は全量の0.05%を添加した。

2) 方法

それぞれフリーザーバッグに入れて密封、発泡スチロールに入れて常温で1か月間保管しサイレージ化した。

各サイレージについて臭気、カビの有無、pH、水分量、vスコアを確認、測定した。

なおpH、水分量、vスコアについては十勝農業協同組合連合会農産科学研究所に分析を依頼した。

3 スルフォラファン給与と血中スルフォラファン濃度の関連性

1) 供試牛

当センターのフリーストール牛舎(平均搾乳頭数30頭、平均乳量23kg/頭)で飼養している乳用牛(ホルスタイン種)12頭を供試した(ブロッコリー3kg給与群1頭、ブロッコリー1kg給与群5頭、サイレージ1kg給与群4頭、パウダー給与群2頭)。通常飼料として日本飼養標準(乳牛用・2017年版)に基づき乾草(オーツヘイ)、乳牛用配合飼料((株)鹿島フィードワン製。以下乳配)、ヘイキューブ、ビートパルプ、サプリメントおよび炭酸カルシウムを給与し、水と固形塩を自由摂取させた。搾乳は朝夕2回行った。

2) 方法

それぞれの給与群に対して、通常飼料に加え、ブロッコリー1kg/日、3kg/日、パウダー10g/日、サイレージ1kg/日を給与した。なおパウダーについては50ml遠沈管に入れ蒸留水で溶かしたものを口から直接流し込んで給与した。

3) 採血

各群について、給与前、給与後2週間の時点において頸静脈から採血を実施、ヘパリン採血管に移し、遠心分離(4℃、3,000rpm、15分)後の血漿を血漿中総グルタチオン濃度の測定に利用し、残った血漿及びバフィーコートをアスピレーターで除いた後、ダルベッコPBSでメスアップしたものを血球としてスルフォラファン代謝物(SFN-GSH、SFN-

Cys)の測定に利用した。

4) 測定方法

総グルタチオン濃度およびスルフォラファン代謝物の測定については(株)機能性植物研究所に依頼し、液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析(LC/MS/MS)法にて測定した。

5) 統計処理

SFN-GSH、SFN-Cys、総グルタチオンの当日、2週間後間の有意差検定についてはWilcoxon符号付順位和検定を実施した。

4 スルフォラファン給与が分娩前後の乳用牛に及ぼす影響

1) 供試牛

当センターの牛舎単房で飼養している分娩予定日前2週間から分娩後4週間までの乳用牛16頭(対照群8頭(平均産歴2.5産)、パウダー給与群8頭(平均産歴1.9産))を供試した。通常飼料として日本飼養標準に基づき乾草(オーツヘイ)、乳配、ヘイキューブ、ビートパルプ、サプリメントおよび炭酸カルシウムを給与し、水と固形塩を自由摂取させた。

2) 方法

パウダー給与群について3-2)と同様、パウダー10g/日を遠沈管に入れ蒸留水で溶かしたものを口から直接流し給与した。

3) 採血

各群において分娩予定日2週間前、分娩時、分娩1週間後、2週間後、4週間後の時点において頸静脈から採血を実施、ヘパリン採血管に移し遠心分離した血漿を使用し、肝酵素(AST、GGT)、血中酸化ストレスマーカーであるTBARS(チオバルビツール酸反応物)、血中プロゲステロンを測定した。

4) 測定方法

肝酵素(AST、GGT)はスポットケム(アークレイ(株))を用いて測定した。TBARSについては(株)機能性植物研究所に依頼し液体クロマトグラフ-タンデム型質量分析(LC/MS/MS)法で、プロゲステロンについては(株)セントラル医学検査研究所に依頼し電気化学発光免疫測定法(ECLIA)にて測定した。

また、分娩後初回発情日数については日々の発情確認にて記録されたものから、乳量については牛群管理システム(DMS21、GEA FARM technologies GmbH社製)にて測定されたものから算出した。

5) 統計処理

AST、GGTのパウダー給与群、対照群間の有意差検定はマンホイットニー-U検定を実施した。

TBARS、乳量のパウダー給与群、対照群間の有意

差検定は対応のある t 検定を実施した。

いずれも $p < 0.1$ で傾向ありとした。

なお統計ソフトは EZR version 1.55 を使用した。

5 スルフォラファン給与がエサ切り替え前後の乳用牛に及ぼす影響

1) 供試牛

3-1) と同環境の乳用牛 8 頭 (対照群 4 頭 (平均産歴 2.0 産、平均分娩後日数 248 日)、パウダー給与群 4 頭 (平均産歴 1.8 産、平均分娩後日数 245 日)) を供試した。

2) 方法

エサ変更前は乳配 10kg/頭、サイレージ無しであったが、これを乳配 7kg/頭、サイレージ 12kg/頭に変更した。変更 2 週間前からパウダー給与群ではパウダーを給与 (3-2) と同様の方法) し、エサ切り替えに伴うストレス環境下でのスルフォラファン給与効果を検証した。

3) 採血

各群において給与前 (エサ切替 2 週間前)、給与 1 週間後、切替当日、切替 1 週間後、切替 2 週間後の時点において頸静脈から採血を実施、ヘパリン採血管に移し遠心分離した血漿を使用し、肝酵素 (AST、GGT)、血中酸化ストレスマーカーである TBARS を測定した。

4) 測定方法

肝酵素、TBARS の測定および乳量の算出については 4-4) と同様の手法により行った。

5) 統計処理

AST、GGT のパウダー給与群、対照群間の有意差検定はマンホイットニー-U 検定を実施した。

TBARS、乳量のパウダー給与群、対照群間の有意差検定は対応のある t 検定を実施した。

いずれも $p < 0.1$ で傾向ありとした。

なお統計ソフトは EZR version 1.55 を使用した。

6 サイレージ、ブロッコリー給与が乳用牛に及ぼす影響

1) 供試牛

3-1) と同環境の乳用牛 12 頭 (対照群 4 頭 (平均分娩後日数 263)、ブロッコリー給与群 4 頭 (平均分娩後日数 197 日)、ブロッコリーサイレージ給与群 4 頭 (平均分娩後日数 118 日)) を供試した。なおいずれも産歴は 1 産であった。

給与飼料についても 3-1) と同様であった。

2) 方法

ブロッコリーサイレージについては県内圃場から

刈取りしたブロッコリーを 20kg ずつ 45L のポリ袋に入れ、空気を抜き結束バンドで封をしたものを漬物樽に入れ、上から土を入れて密閉、その上から 20kg 程度の重りをのせ、1 か月間おいて作成した。開封時一部カビの付着が認められたためカビを除いたものを給与飼料とした。なお 5 か所ランダムにサンプリングし、カビ毒の ELISA 検査 (トータルアフラトキシン ELISA キット、(株) プラクティカル製) を実施、いずれも基準値を下回った。

ブロッコリーについては県内圃場で刈取りしたものを 20kg ずつ 45L ポリ袋に入れ、サイレージ完成までの 1 か月冷凍保管したものを使用した。

3) 採血

対照群、給与群について、給与前、給与後 1 週間、給与後 2 週間の時点において頸静脈から採血を実施、ヘパリン採血管に移し遠心分離 (4°C、3,000rpm、15 分) した血漿を使用した。

4) 測定方法

肝酵素、TBARS の測定および乳量の算出については 4-4) と同様の手法により行った。

5) 統計処理

AST、GGT のサイレージ給与群、ブロッコリー給与群、対照群間の有意差検定は SteelDwass 検定を実施した。

TBARS、乳量のサイレージ給与群、ブロッコリー給与群、対照群間の有意差検定は Tukey 検定を実施した。

なお統計ソフトは EZR version 1.55 を使用した。

結果

1 乳用牛への適切なスルフォラファン給与形態の検討

ブロッコリー残さの花蕾、茎、葉、ブロッコリースプラウト、パウダーのグルコラファニン含有量を測定し、必要量を算出した (表 1)。なお必要量については、ヒトでの肝機能 (GGP) 改善効果が報告されたグルコラファニン摂取量は 30mg⁶⁾であり、ウシの体重はヒトの体重の 10 倍程度であることから、ヒトの推奨摂取量の 10 倍である 300mg とした。

その結果、グルコラファニン 300mg 摂取のために必要な量としてはブロッコリー 340g、ブロッコリースプラウト 60g、パウダー 5g であった。

表 1 ブロッコリー、ブロッコリースプラウト、パウダー中のグルコラファン含有量および必要量

検体名	mg/100g(乾物)	現物中の割合(%)	グルコラファン	
			300mg摂取の際の必要量(g/日)	平均で
花蕾	1,101	平均で 612mg /100g	0.22%	137
茎	455		0.09%	340
葉	281		0.06%	544
スプラウト	5,154	0.52%		60
パウダー	6,916	6.92%		5

2 ブロッコリーサイレージ作成方法の検討

ブロッコリーのみは弱い乳酸臭、ビートパルプ添加は通常のサイレージと同等の乳酸臭があり、ギ酸添加したものは弱い乳酸臭となった (表 2)。

ブロッコリーのみ、ブロッコリーにビートパルプ添加、ブロッコリーにギ酸添加したものはいずれも空気の当たるところに一部カビが確認された。

pH、v-スコアはいずれもほぼ差はなく、水分量についてはビートパルプ添加したものは低く抑えられる結果となった。

いずれの方法でも特段給与に問題はないと判断し、簡便かつ添加物の影響を排除するため、給与試験ではブロッコリー単独でサイレージ化をすることとした。

表 2 作成方法ごとの結果

種類	臭気	かび	pH	水分量	v-スコア
ブロッコリーのみ	乳酸臭 (○)		4.4	88.5	98
ブロッコリー + ビートパルプ	乳酸臭 (◎)	空気の当たるところに一部あり (微小)	4.4	63.6	99
ブロッコリー + ギ酸	乳酸臭 (-)		4.5	89.9	99
ブロッコリー + ビートパルプ + ギ酸	乳酸臭 (-)	無し	4.4	64.6	98

3 スルフォラファン給与と血中スルフォラファン濃度の関連性

ブロッコリー、パウダーを 2 週間給与した結果、ブロッコリー1kg 給与群、3kg 給与群、パウダー10g 給与群いずれでも SFN-GSH、SFN-CYS ともに増加した一方、サイレージについては SFN-GSH の増加はほぼ見られず、SFN-Cys のみ増加した (図 1、図 2)。

また、ブロッコリー1kg 給与群と 3kg 給与群を比較したところ SFN-GSH は 3kg 給与群で 1kg 給与群の約 1.2 倍、SFN-Cys は 3kg 給与群で 1kg 給与群の約 2.1 倍と増加していたものの、給与量を 3 倍に増やしたほどの差は見られなかった。

総グルタチオン濃度についてはいずれも 2 週間の給与前後で変化が見られなかった (図 3)。

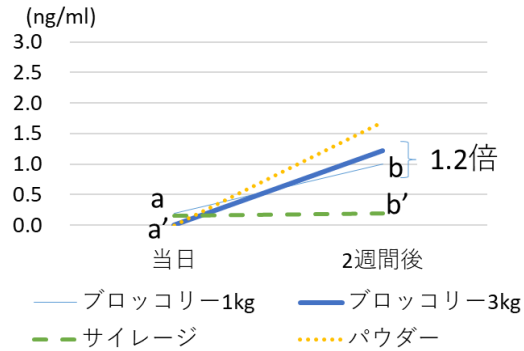


図 1 スルフォラファン給与と SFN-GSH の推移

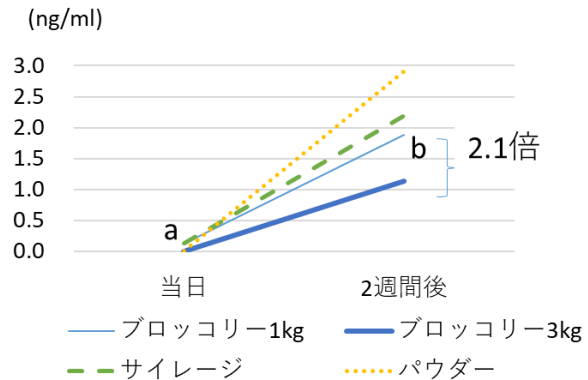


図 2 スルフォラファン給与と SFN-Cys の推移

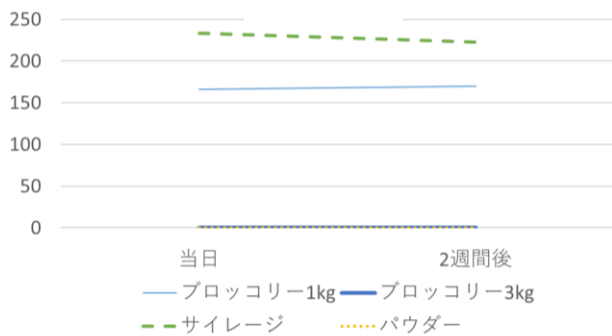


図 3 スルフォラファン給与と総グルタチオン濃度の推移

4 スルフォラファン給与が分娩前後の乳用牛に及ぼす影響

肝酵素 (AST、GGT) を測定した結果、AST については対照群と比較し、給与群において分娩時に低値で、分娩 1 週間後以降では高値で推移した (図 4) 一方、GGT は給与群において分娩時以降低値で推移したことから、肝機能改善に寄与した可能性が考えられた (図 5)。

酸化ストレスマーカーである TBARS については、分娩 2 週間後以外の期間において給与群のほうが対照群より低値で推移し、最初の値からの変動も対照群よ

り少なかったことから、分娩後の酸化ストレス低下に寄与した可能性が考えられた (図 6)。

分娩後の卵巣機能回復の指標とされるプロゲステロン値については、1ng/ml 以上であると分娩後に排卵可能な卵胞が存在する目安⁹⁾とされており、1ng/ml 以上に回復した時期は対照群では 4 週間後であったのに対し、給与群では 2 週間後であり、給与群のほうがより早期に子宮回復した可能性が考えられた (図 7)。また、分娩後初回発情日数について調べたところ、給与群 74 日にに対し、給与群 67 日と、こちらも給与群で 1 週間程度短縮した可能性があった。

一方、乳量を比較したところ、給与群と対照群でほぼ差は見られなかった (図 8)。

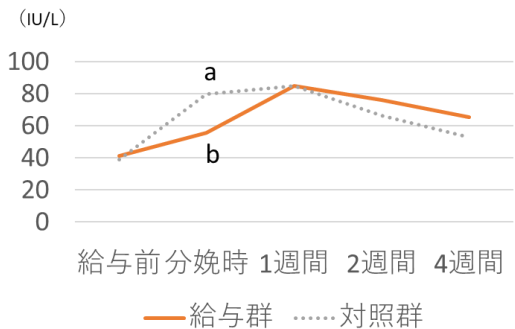


図 4 分娩時パウダー給与と AST 値の推移
* 異符号間で傾向あり (p<0.1)

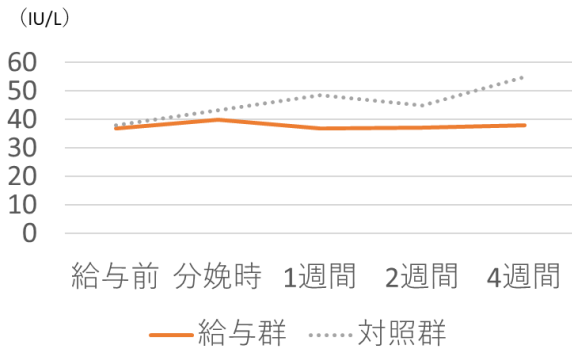


図 5 分娩時パウダー給与と GGT 値の推移

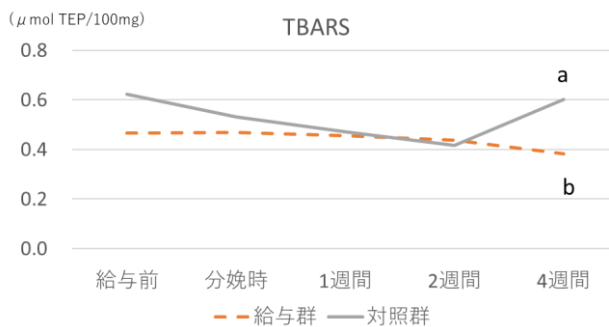


図 6 分娩時パウダー給与と TBARS 値の推移
* 異符号間で傾向あり (p<0.1)

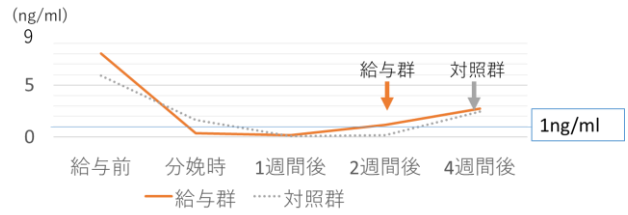


図 7 分娩時パウダー給与とプロゲステロン値の推移

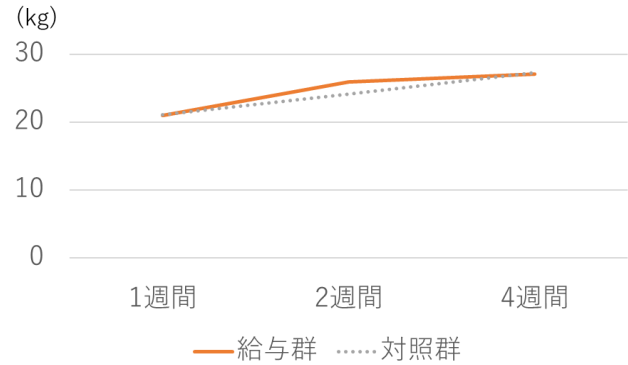


図 8 分娩時パウダー給与と乳量の推移

5 スルフォラファン給与がエサ切り替え前後の乳用牛に及ぼす影響

肝酵素 (AST、GGT) を測定した結果、AST については給与群で高くなった (図 9) 一方、GGT については給与群で低く推移した (図 10)。

次に TBARS については、給与前から切替当日まで給与群で低く推移したことから、切替当日までの酸化ストレス低下に関与した可能性が考えられた (図 11)。

また、乳量を比較したところ、給与群は対照群と比較し、給与前の時点から一貫して高く推移した (図 12)。

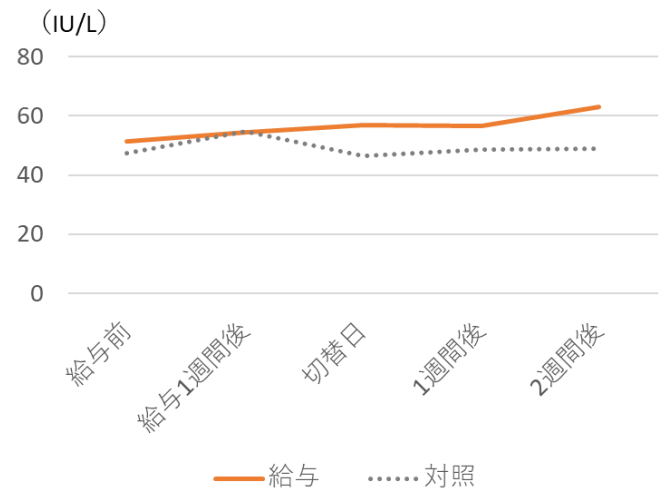


図 9 エサ切替時パウダー給与と AST 値の推移

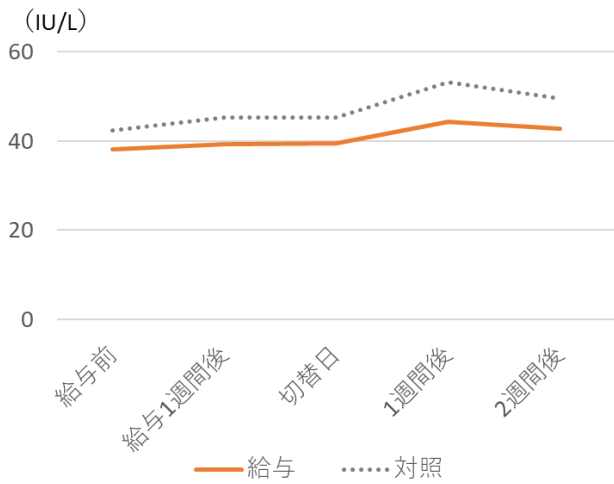
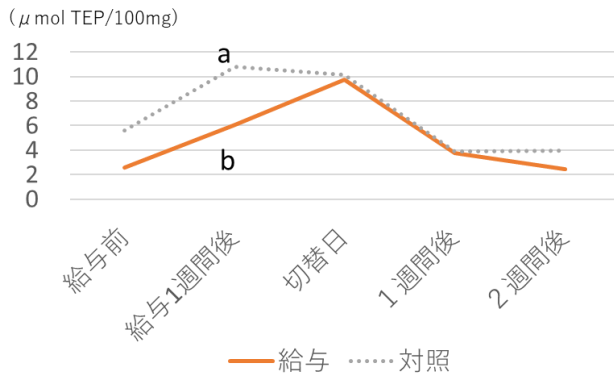
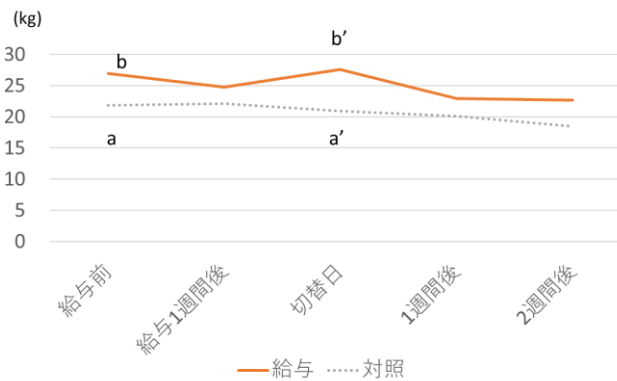


図 10 エサ切替時パウダー給与と GGT 値の推移



*異符号間で傾向あり (p<0.1)

図 11 エサ切替時パウダー給与と TBARS 値の推移



*異符号間で傾向あり (p<0.1)

図 12 エサ切替時パウダー給与と乳量の推移

6 サイレージ、ブロッコリー給与が乳用牛に及ぼす影響

肝酵素 (AST、GGT) を測定した結果、AST については特定の傾向が見られなかった (図 13)。一方、GGT についてはサイレージ給与群で対照群より低値で推移した (図 14)。

TBARS については、給与 2 週間後の時点では対照群

と比較し、サイレージ、ブロッコリー給与群では低値で推移した (図 15)。

また、各群の乳量を比較したところ、各群とも給与前からほぼ横ばいで推移した (図 16)。

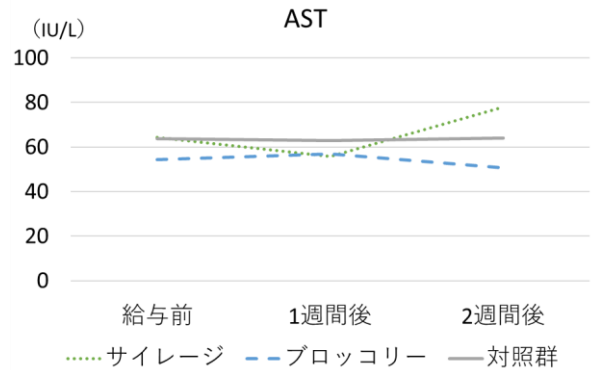


図 13 サイレージ、ブロッコリー給与と AST 値の推移

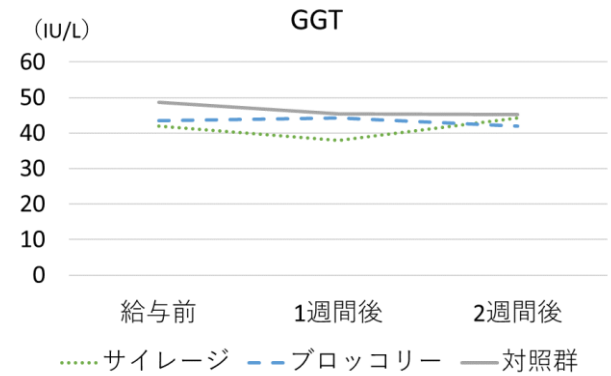


図 14 サイレージ、ブロッコリー給与と GGT 値の推移

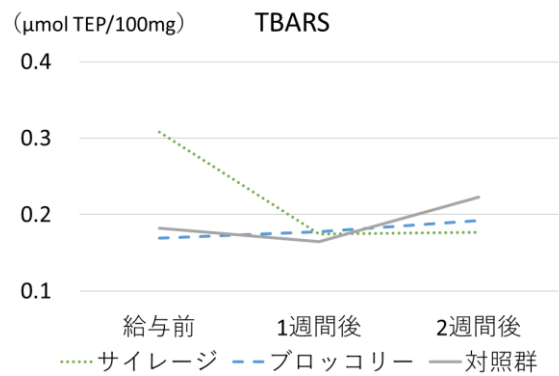


図 15 サイレージ、ブロッコリー給与と TBARS 値の推移

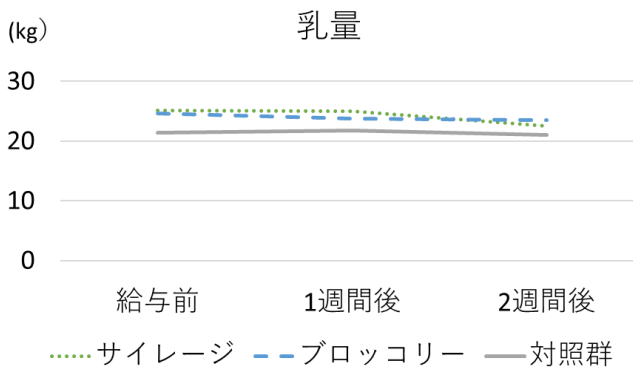


図 16 サイレージ、ブロccoliリー給与と乳量の推移

考察

ブロccoliリー給与、パウダー給与、サイレージ給与のいずれにおいても対照群と比較し TBARS 値および GGT 値が低値で推移したことから、ヒトでの報告と同様、ウシにおいてもスルフォラファン給与により酸化ストレス低減効果⁵⁾および肝機能改善効果⁶⁾がある可能性が示唆された。

また、スルフォラファン給与が分娩前後の乳用牛に及ぼす影響を調査した結果、給与群において分娩後のプロゲステロン値の回復および初回発情日数が短かったことから、給与により卵巣機能の早期回復、繁殖成績改善につながる可能性が示唆された。大澤ら¹⁰⁾による抗酸化機能を有するアスタキサンチン、セレン、ビタミン A・E を用いた給与試験による結果でもいずれの抗酸化物質給与でも分娩後発情回復日数が短縮される傾向があったことから、本試験においてもスルフォラファンの抗酸化作用により分娩後初回発情が短縮されたことが考えられた。

一方で、いずれの試験においてもスルフォラファン給与による乳量の増加は認められなかった。

いずれの試験でも有意差までは認められなかったことについて、試験設計上のサンプル数が少なかったためと考えられ、より正確な結論を出すためにはサンプル数の積み上げが必要と考えられた。

給与資材については、当初ブロccoliリースプラウトの給与も検討を進めていたが、コストが約 250 円/60g/頭と割高であるうえ、常温での保存が 1 週間に満たないこと、複数の販売店舗から日々買い集めないと分量集めることができないことなど労力的にも見合わないことから検討材料から除外した。

パウダーについては給与の手軽さについて利点がある一方、コストが約 990 円/10g/頭と高いことが欠点であった。

一方、ブロccoliリーやブロccoliリーサイレージは農家

やブロccoliリー冷凍加工工場などから無償ないし安価に入手可能であるという利点があり、今後ブロccoliリー冷凍加工工場と農家のマッチングを進めていく予定である。

冷凍加工工場に聞き取りをした結果、ブロccoliリーの加工をしている期間については通年稼働や数か月の期間限定の稼働など、工場により違うということが判明した。今回は生のブロccoliリーの他、ブロccoliリーサイレージで同様の効果が得られる可能性が示唆されたため、工場と農家の利便性に合わせた給与方法を提案していきたい。

参考文献

- 1) 一般社団法人家畜改良事業団、2016、平成 26 年受胎調査成績、11
- 2) 一般社団法人家畜改良事業団、2020、平成 29 年受胎調査成績、11
- 3) 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
- 4) 権五鏡、1985、乳牛の分娩前後の血液成分および疾病発生と繁殖成績との関係、家畜繁殖誌、31 巻 2 号、63-67
- 5) Shoichi Komine、2021、Effect of a sulforaphane supplement on muscle soreness and damage induced by eccentric exercise in young adults:A pilot study、Physiological Reports
- 6) Masahiro Kikuchi、2015、Sulforaphane-rich broccoli sprout extract improves hepatic abnormalities in male subjects、World Gastroenterol、21:21(43):12457-12467
- 7) Irena Misiewicz、2004、Sulforaphane-mediated induction of a phase 2 detoxifying enzyme NAD(P)H: quinone reductase and apoptosis in human lymphoblastoid cell、Acta Biochimica Polonica、51(3):711-721
- 8) 日野翔、2018、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、茨城畜セ研報 50 号、1-6
- 9) 山本静二、1995、牛における分娩後の受胎早期化に関する研究、東北大学機関リポジトリ
- 10) 大澤玲、2014、抗酸化機能性サプリメントの給与がホルスタイン種初産牛の繁殖成績に及ぼす影響、日本肺移植研究会、36 巻 3 号、149-156