

乳用子牛の離乳期第一胃アシドーシスの
制御と発育向上に関する研究

2021年1月

竹村 恵

乳用子牛の離乳期第一胃アシドーシスの制御と発育向上に関する研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

先端農業技術科学専攻

博士（農学）学位論文

竹村 恵

略語

酸性デタージェント繊維 (Acid detergent fiber; ADF)

α 1-酸性糖蛋白質 (α 1-acid glycoprotein; AGP)

アルブミン/グロブリン比 (albumin/globulin ratio; A/G 比)

アルカリホスファターゼ (alkaline phosphatase; ALP)

酢酸：プロピオン酸比 (acetate:propionate ratio; A:P 比)

急性期蛋白質 (acute phase proteins; APPs)

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (aspartate aminotransferase; AST)

曲線下面積 (area under the curve; AUC)

β ヒドロキシ酪酸 (β -hydroxybutyric acid; BHB)

血中尿素窒素 (blood urea nitrogen; BUN)

カルシウム (calcium; Ca)

クレアチンキナーゼ (creatin kinase; CK)

C 反応性蛋白 (c-reactive protein; CRP)

粗蛋白質 (crude protein; CP)

日増体重 (daily gain; DG)

乾物摂取量 (dry matter intake; DMI)

エンドトキシン単位 (endotoxin unit; EU)

成長ホルモン (growth hormone; GH)

ハプトグロビン (haptoglobin; Hp)

インターフェロン (interferon; IFN)

インスリン様成長因子- I (insulin like growth factor- I ; IGF- I)

インターロイキン (interleukin; IL)

γ -リベチン (Immunoglobulin Yolk; IgY)

無機リン (inorganic phosphorus; iP)

カリクレイン阻害単位 (kallikrein inhibitor unit; KIU)

リポ多糖結合蛋白質 (lipopolysaccharide binding protein; LBP)

血清乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase; LDH)

リポ多糖 (lipopolysaccharide; LPS)

中性デタージェント繊維 (neutral detergent fiber; NDF)

非構造的繊維炭水化物 (non-fiber carbohydrate; NFC)

遊離脂肪酸 (non-esterified fatty acid; NEFA)

血清アミロイド A 蛋白 (serum amyloid A; SAA)

総コレステロール (total cholesterol; T-Cho)

腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor; TNF)

総蛋白質 (total protein; TP)

揮発性脂肪酸 (volatile fatty acids; VFA)

可消化養分総量 (total digestible nutrients; TDN)

目 次

第 1 章	緒論	1
第 2 章	離乳前後における粗飼料の摂取およびスターターの多給が第一胃液 pH、発酵、および血漿代謝・内分泌成分に及ぼす影響	
2.1	緒言	8
2.2	材料と方法	10
2.3	結果	14
2.4	考察	17
2.5	図表	21
第 3 章	活性酵母の給与が第一胃液 pH と発酵、血漿代謝・内分泌成分、および発育性に及ぼす影響	
1 節	活性酵母の給与が濃厚飼料多給時の第一胃液 pH および関連成分へ及ぼす影響	
3.1.1	緒言	33
3.1.2	材料と方法	35
3.1.3	結果	38
3.1.4	考察	41
3.1.5	図表	44
2 節	活性酵母の給与が離乳前後 7 週間の発育、血漿代謝・内分泌成分、および第一胃発酵に及ぼす効果の検証	
3.2.1	緒言	57
3.2.2	材料と方法	59
3.2.3	結果	62

3.2.4	考察	64
3.2.5	図表	68
第4章	抗大腸菌 IgY の給与が第一胃液 LPS 濃度と発酵、血漿代謝・内 分泌成分、および発育性に及ぼす影響	
1 節	抗大腸菌 IgY の給与が濃厚飼料多給時の第一胃液 LPS 濃度お よび関連成分へ及ぼす影響	
4.1.1	緒言	75
4.1.2	材料と方法	77
4.1.3	結果	80
4.1.4	考察	83
4.1.5	図表	86
2 節	抗大腸菌 IgY の給与が離乳前後 7 週間の第一胃液 LPS 濃度お よび発酵、血漿中の代謝・内分泌成分、ならびに発育に及ぼす 効果の検証	
4.2.1	緒言	100
4.2.2	材料と方法	102
4.2.3	結果	104
4.2.4	考察	106
4.2.5	図表	110
第5章	総括	115
	引用文献	125
	謝辞	142

第1章 緒論

乳用子牛は出生後速やかに母牛と分離され、液状飼料を給与する哺育期を経て6週齢を目途に離乳し、育成期に入る（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構, 2017）。哺育期から育成期にかけての飼料は、生乳あるいは代用乳、スターター、そして粗飼料へと切り替わりながら給与される。大坂（2016）は、哺育期から3か月齢までの育成期を例として栄養利用特性別にステージ分けしている。すなわち、6週齢離乳を前提に、3週齢までを乳を栄養源とする液状飼料期、3週齢から離乳までを乳とスターターを栄養源とする離乳移行期、離乳から8週齢までをスターターが栄養源の大部分を占める反芻期への移行期、および9週齢以降を粗飼料が発育に影響を及ぼす反芻期とした（大坂, 2016）。従来から行われている哺乳方法では、生乳あるいは代用乳の給与を生時体重の10%程度に制限することでスターターへの切り替えを早期に促し、6週齢での離乳を達成している（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構, 2017）。この方法では、エネルギー変換効率の高い乳による発育向上よりも、スターター摂取の増加による第一胃絨毛の発達を優先させている。従来法では作業労力と飼料コストを最小限にできるが、哺乳の制限による子牛のストレスは大きい（Van Amburgh, 2003）。そこで近年は、従来法よりも高栄養で哺乳する方法が主流となってきている（Van Amburgh, 2003; Soberon and Van Amburgh, 2013）。高栄養哺乳は、発育を優先し従来法よりも多く哺乳させるもので、増体重が離乳指標のひとつとなる（Van Amburgh *et al.*, 2008; 齋藤, 2012）。高栄養で哺乳す

ることで哺育期の成長が高まる一方、スターターの摂取が抑制されるため第一胃の発達は遅延する (Hill *et al.*, 2010; Davis Rincker *et al.*, 2011)。高栄養で哺乳した場合の 6 週齢離乳と 8 週齢離乳を比較した試験 (Eckert *et al.*, 2015) では、6 週齢離乳区で一時的に消化不良と離乳後の発育停滞が認められ、離乳時の消化管機能が未熟であったことが要因と推察された。離乳によるエネルギー供給量の落差を減らすため、高栄養で哺乳する場合の離乳週齢は従来の哺乳方法よりも遅く 8 週齢程度と見込まれている (Smith and Van Amburgh, 2002; Eckert *et al.*, 2015; 齋藤, 2012)。

過去 20 年で、子牛の飼養環境や栄養状態と、健康、発育、および将来の生産性との関連について研究が進み (Kertz *et al.*, 2017)、生後 2 か月間の発育は育成期の成長 (Khan *et al.*, 2011b)、性成熟 (Bollwein *et al.*, 2016)、および初産時以降の生産性 (Bach and Ahedo 2008; Soberon *et al.*, 2012; Kertz *et al.*, 2017) など長期にわたって影響を及ぼすことが明らかになってきている。高栄養で哺乳する方法は子牛の発育向上、ストレスの軽減 (Jasper and Weary, 2002)、免疫機能の強化 (Sharon *et al.*, 2019)、ひいては将来の生産性向上が期待される一方で、第一胃の発達が遅れることにより従来法よりも飼料コストや労力を要する。酪農現場では大規模化が進展する一方、中小規模経営の労働力不足が深刻であり、飼養管理の省力化は喫緊の課題となっている (農林水産省, 2020)。効率化を進めながら健全な子牛を育成するために、哺乳量を確保しつつもスターター摂取量を早期に最大化して第一胃絨毛の発達を促し、発育と離乳の早期化を両立さ

せる高度な飼養管理法の確立が求められている。

いずれの哺乳方法を用いても 6 週齢から 8 週齢で離乳を行う現在の飼養体系では、離乳移行期にスターターの給与量が著増し、反芻期への移行期にかけてスターターの占める割合の高い状態が続く。スターターは嗜好性と栄養価が高く、産生された VFA によって第一胃絨毛が発達するが、同時に第一胃液 pH は低下する (Khan *et al.*, 2011b)。過去の知見では、この時期の第一胃液 pH が成牛と同程度まで低下することが報告されている (Suárez *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2011a)。第一胃液の低 pH が日常的に繰り返される状態は、成牛では亜急性第一胃アシドーシス (以下、SARA) として知られている (Kleen *et al.*, 2003; Stone, 2004)。SARA は粗濃比の低下や飼料の急変などの飼養管理が誘因となり (Nocek, 1997; Kleen *et al.*, 2003)、下痢 (Nocek, 1997; Kleen *et al.*, 2003)、蹄葉炎 (Nocek, 1997; Stone, 2004)、肝膿瘍 (Nocek, 1997; Kleen *et al.*, 2003)、DMI および乳量の低下 (Allen, 2000)、ならびに乳脂率の低下 (Kleen *et al.*, 2003; Stone, 2004) など炎症性疾患を含む様々な病態と関連することが報告されている。SARA と病態をつなぐ要因の一つとして、第一胃液 pH の低下に伴うグラム陰性菌の死滅による胃液 LPS 濃度の上昇と、LPS の血中への移行が推察されている (Gozho *et al.*, 2005)。既往の知見において、実験的に誘発された SARA による炎症反応は血中 APPs 濃度の上昇としてモニタリングされることが多い (Gozho *et al.*, 2005; Khafipour *et al.*, 2009a)。しかし、第一胃液 LPS 濃度は個体による差が大きく (Hirabayashi *et al.*, 2017)、必ずしも第一胃液 pH の低下と胃液 LPS 濃度

の上昇、および血中 APPs 濃度の上昇は一致しない (Khafipour *et al.*, 2009b)。Laarman ら (2011; 2012) は第一胃液 pH を連続測定することにより、離乳移行期および反芻期への移行期における第一胃液 pH が採食後に低下して成牛の SARA の基準に達すること、そして第一胃液 pH が粗飼料摂取量とも相関することを明らかにした。離乳移行期における粗飼料の摂取は、第一胃筋層および容積の発達に寄与するが (Tamate *et al.*, 1962)、スターター給与量の 20% を超える粗飼料給与は摂取固形飼料全体のエネルギー濃度が低くなる可能性があるため推奨されておらず (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構, 2017)、現在の飼養体系では離乳移行期および反芻期への移行期にかけて SARA が発生する可能性は高い。しかし子牛における給与飼料が、SARA、第一胃液 LPS 濃度、代謝成分、および内分泌反応に及ぼす影響に関する知見はない。今後、スターターを最大限活用した哺育期管理の高度化を進めるにあたり、給与飼料と SARA、そして代謝との関連を解明することは重要な研究課題である。

前述の通り、離乳移行期から反芻期の移行期にかけては、第一胃絨毛を発達させて固形飼料への移行を促し、かつ、成牛よりも体重当たり高い養分要求量を満たすためにスターターの給与量が最大化される (Laarman and Oba, 2011; Omid-Mirzael *et al.*, 2018)。そのため、スターター主体の給与飼料体系を維持したまま、SARA および SARA が生体へ及ぼすリスクとなる第一胃液中の LPS を制御する技術についても検討する必要がある。制御の方法としては、第一胃発酵の安定性に寄与して第一胃液 pH の低下を制御する機能性成分、そして第一

胃液中の LPS を中和する機能性成分の利用が挙げられる。

第一胃環境の安定に寄与する機能性成分のひとつとしては *Saccharomyces cerevisiae* (以下、SC) がある。SC は元来糖を代謝する酵母であり、乳牛ではプロバイオティクスのひとつとして以前から広く利用されている (Uyeno *et al.*, 2015)。SC の給与により、第一胃の嫌気状態が維持され、さらに糖を代謝する乳酸産生菌などの胃内細菌と競合することで第一胃内の環境が安定することが知られている (Chauchayras-Durand *et al.*, 2008)。その特性から、給与効果として、成牛では繊維消化率の向上 (Ding *et al.*, 2014) や乳量の増加 (AlZahal *et al.*, 2014)、SARA の軽減 (AlZahal *et al.*, 2014; Bach *et al.*, 2007) の知見がある。子牛では哺育期から育成期にかけて SC の長期給与により、スターター摂取量 (Galvão *et al.*, 2005) や DG (Panda *et al.*, 1995) の増加が報告されているが、第一胃液 pH への制御効果について詳細な検討はされていない。子牛への SC 給与効果は飼料の乾物量や組成、および健康状態など複数の要因により影響を受けるため (McAllister *et al.*, 2011; Alugongo *et al.*, 2017a)、報告によりその効果が多様であるが (Quigley *et al.*, 1992a; He *et al.*, 2017; Magalhães *et al.*, 2008)、成牛と同等、またはそれ以上に粗濃比および第一胃液 pH が低下する可能性がある子牛への SC 給与は、第一胃発酵の安定化によって第一胃液 pH の向上に寄与すると考えられる。

次に、第一胃液 LPS の中和に寄与する機能性成分としては、鳥の卵黄に含まれる可溶性蛋白質の IgY がある。IgY は親鳥血清由来の IgG (Martin and Cook,

1958) であり、卵から得られる特異的抗体として経口受動免疫療法への応用が注目されている (食品機能性の科学, 2008)。実際に、牛用飼料として腸管毒素原性大腸菌、サルモネラ属菌、牛ロタウイルスなどの病原体に対する特異 IgY が実用化されている。生後 7 日齢の子牛に IgY を給与すると、給与後 4 時間では胃から結腸にかけて消化管全域に、給与後 6 時間では主に回腸から結腸に、抗体活性を持つ IgY が分布する (Ikemori *et al.*, 1996)。子牛に給与された特異 IgY は腸管で病原体と抗原抗体結合して標的を不活化させる。病原体による感染試験の結果、IgY を給与した子牛における臨床症状の軽減や (Ikemori *et al.*, 1992)、感染から免れたことによる発育向上 (Özpinar *et al.*, 1996) などの効果が報告されている。子牛における特異 IgY の作製は主に液状飼料期に問題となる腸管感染性の病原体をターゲットにしてきたが、近年では *Streptococcus bovis* や *Fusobacterium necrophorum* など第一胃内細菌に対する応用が検討されている (Dilorenzo *et al.*, 2006; 2008)。しかし、IgY に関する既往の報告において、第一胃液 LPS を標的とし、血漿 APPs 濃度などの関連成分とあわせて子牛への給与効果を検討した知見はない。

本研究においては、先ず、離乳の前後 4 週間における粗飼料の摂取およびスターターの多給が、第一胃液 pH、発酵、および血漿代謝成分に及ぼす影響を検討した。次に、SC または IgY を添加した子牛に濃厚飼料を多給して実験的に SARA を誘発し、機能性成分による第一胃液 pH、LPS 濃度、および炎症カスケード反応への制御効果を検討した。さらに、SC または IgY の添加給与が離乳前

後の発育性や代謝成分に及ぼす影響を解明するため、3 週齢から 10 週齢までの 7 週間における長期の効果を評価する飼養試験を行った。

本研究は、離乳前後における粗飼料の摂取およびスターターの多給と第一胃液 pH、発酵、および代謝・内分泌機能との関連性を解明するとともに、機能性成分による第一胃液 pH と LPS 濃度の制御を目指し、以て乳用子牛の健全な発育向上に寄与することを目的とする。

第2章 離乳前後における粗飼料の摂取およびスターターの多給が第一胃液 pH、 発酵、および血漿代謝・内分泌成分に及ぼす影響

2.1 緒言

離乳移行期における粗飼料の摂取は第一胃液 pH 低下の軽減に重要な役割を持つことが報告されている (Laarman and Oba, 2011)。一方で、現在の飼養体系では離乳移行期から反芻期への移行期にかけてスターターの給与量が最大化されるため、SARA を経験する可能性が高い。しかし、第一胃液 pH の低下が第一胃液 LPS 濃度、血中代謝成分、およびホルモン濃度へ及ぼす影響は不明であるため、子牛の SARA リスクについての結論は出ていない。成牛において、濃厚飼料の多給により誘発された SARA は、LBP を含む血中 APPs 濃度を増加させることが報告されている (Khafipour *et al.*, 2009a)。ところが、アルファルファペレットにより SARA を誘発すると血中 APPs 濃度の増加は認められず (Khafipour *et al.*, 2009b)、飼料内容によって SARA に対する生体反応に違いが認められる。子牛における既往の報告でも、第一胃液 pH 低下に対する生体の反応は給与飼料により異なる結果を得ている。例えば、離乳移行期 (Suárez *et al.*, 2006; 大坂, 2016) および反芻期まで (Gelsinger *et al.*, 2020) を粗飼料を併給せずに飼養すると、第一胃液 pH の低値に加えて第一胃絨毛の凝集や組織の変性など第一胃粘膜に肉眼的な異常が認められる。一方で、反芻期への移行期における粗飼料併給下の第一胃液 pH の低下は、血中代謝成分およびホルモン濃度に負の影響を及ぼさなかった (Laarman *et al.*, 2012)。

これらを踏まえ、先ず本章は、離乳移行期から反芻期への移行期にかけた粗飼料の摂取およびスターターの多給と、SARA ならびに全身への影響との関連性を解明することを目的とした。試験の実施は離乳前 1 週から離乳後 3 週とし、粗飼料の摂取およびスターターの多給が、第一胃液 pH、発酵、および LPS 濃度、ならびに血漿代謝、内分泌成分に及ぼす影響について検討した。

2.2 材料と方法

動物の飼養および試験は、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の動物実験等実施規定に従って実施した。

1. 供試牛および処理区

個別ペンで飼養するホルスタイン種雄子牛 16 頭を供試した。供試牛は 4 週齢時に左臍部に第一胃フイステルの装着手術を行った。飼料給与は 8:00 と 16:30 の 1 日 2 回、日量を等分して給与し、飲水は自由とした。4 週齢から 6 週齢までは、代用乳 (CP 24 %、CF 29 % メイラック ; 明治飼糧株式会社、東京)、スターター (CP 22 %、CF 3% ミルキースターター ; 明治飼糧株式会社、東京)、および粗飼料 (オーチャードとチモシー乾草、CP 10.8%、NDF 56.6%) を給与した。4 週齢から 11 週齢までの給与飼料の量および成分は表 2.1 および表 2.2 に示した。試験期間は 7 週齢から 11 週齢までとした。開始時に供試牛 (77.6kg ± 4.5kg ; 平均 ± 標準誤差) を併給区 (n = 8) またはスターター区 (n = 8) に無作為に配置した。7 週齢で代用乳の給与を両区とも半量に減らし、8 週齢で離乳した。併給区は試験期間中、スターターと粗飼料を給与した (表 2.1)。スターター区は試験開始時に粗飼料の給与を止め、試験終了までスターターのみで飼養した (表 2.1)。試験期間における両区の固形飼料の乾物給与量はほぼ等量、かつ、日本飼養標準 (2017) の養分要求量を充足するよう設定した。供試子牛の飼料摂取量は毎日、体重は週に 1 回、個別に記録した。

2. 第一胃液と血液の採取

7、8、9、および11週齢、すなわち離乳前1週（離乳後-1週）、離乳後0週、1週、および3週の8:00の飼料給与前に、フイステルより第一胃液そして頸静脈より血液を採取した。第一胃液は採取後速やかに2層にした滅菌ガーゼを通し、濾液10mLには25%メタホスフィン酸入り3N硫酸を2mL加えてVFA測定用サンプルとした。また、濾液2mLは遠心（ $9,000 \times g$ 、30分、 4°C ）後、上清を採取してLPS濃度測定用サンプルとした。各胃液サンプルは分析まで -80°C で保存した。血液はヘパリンNaおよびEDTA2Na加真空採血管（テルモ株式会社、東京）に採取した後、速やかに500 KIU/mLのアプロチニン（シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京）を加えて混合、遠心し（ $2,000 \times g$ 、20分、 4°C ）、得た血漿を分析まで -80°C で保存した。

3. 第一胃液および血漿成分の分析

第一胃液の総VFA量および各VFA濃度は、Thermon-3000 3%ガラスカラム（進和化学工業株式会社、京都）を用い、ガスクロマトグラフィー（Model135；株式会社日立ハイテクノロジーズ、東京）にて定量した。第一胃液LPS濃度は、Hirabayashi *et al.* (2017) の方法に準じて測定した。血漿中のTP、アルブミン、グルコース、トリグリセリド、iP、Ca、鉄、AST、GGT、ALP、LDH、CK、およびNEFAの濃度は、自動分析装置（7070；株式会社日立ハイテクノロジーズ、

東京) にて測定した。血漿グレリン濃度は時間分解蛍光イムノアッセイ法 (Sugino *et al.*, 2004)、GH 濃度とインスリン濃度はラジオイムノアッセイ法 (Kushibiki *et al.*, 2003) により測定した。測定内変動係数は、グレリンが 6.9%、GH が 7.2%、およびインスリンが 1.9%であった。血漿 LBP 濃度 (HK503 ; Hycult Biotech、Uden、Dutch)、Hp 濃度 (Cow Haptoglobin ELISA Kit ; Life Diagnosis Inc.、WestChester、USA)、および SAA 濃度 (Multispecies SAA ELISA kit ; Tridelata Development Ltd.、Maynooth Country Kildare、Ireland) はそれぞれ市販の ELISA キットを用いて測定した。血漿 TNF- α 、IL-1、IL-6、および IFN- γ 濃度は、Kushibiki *et al.* (2006) の方法で測定した。

4. 第一胃液 pH の測定と解析

研究用に開発された子牛用無線電送式 pH メーター (山形東亜 DKK 株式会社、山形 ; 図 2.1.A) をフィステルから第一胃に投入し、センサーに取り付けたコードをフィステルの蓋内側に固定した (図 2.1.B)。第一胃液の pH は試験期間を通して 10 分間隔で測定し、得られたデータを舎内に設置された受信機を通してパーソナルコンピュータに表示、記録した (図 2.1.C)。各週の第一胃液採材日から 72 時間分の pH データを用いて、同時刻の平均 pH と 1 日当たりの最大、最小、および平均 pH を算出した。加えて、1 日あたりの pH5.6 未満の時間数 (分/日) と AUC (分 \times pH/日) を算出した。

5. 統計処理

統計ソフト (SAS University Edition; SAS Institute, Cary, NC, USA) の MIXED procedure を用いて、DMI、DG、第一胃液および血液の各測定項目における処理効果の判定を行った。使用した線形混合モデルは以下の通りである。

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + C(i)j + W_k + TW_{ik} + e_{ijk}$$

ここで、 μ は全平均、 T_i は処理区の効果、 $C(i)j$ は供試子牛の変量効果、 W_k は採材週の効果、 TW_{ik} は処理区と採材週の交互作用、 e_{ijk} は誤差を示す。交互作用が有意であった時に Tukey の検定により採材週における処理区の差を判定した。結果は最小二乗平均および標準誤差で示し、 $P < 0.05$ を有意差あり、 $P < 0.1$ を有意傾向ありとした。

2.3 結果

試験期間中、両区の供試子牛は給与飼料をすべて摂取し、DMI に区間の差はなかった。試験期間における DG は併給区で 0.98 ± 0.08 kg/日、スターター区で 1.02 ± 0.08 kg/日となり、両区間に有意な差はなかった。健康状態や便性状に異常な変化は認められなかった。

1. 第一胃液 pH、VFA 組成、および LPS 濃度

試験期間における第一胃液 pH の日内変動を図 2.2 に示した。併給区の第一胃液 pH は、試験期間を通じて朝夕の採食後に 2 時間ほどかけて低下した後増加に転じ、翌朝には前日朝の採食前 pH と同程度まで回復した。一方、スターター区の第一胃液 pH は全ての週において併給区のような日内変動が消失し、1 日を通して pH5.6 前後を示した。そのため、試験期間中、スターター区の第一胃液 pH の日内変動は併給区よりも有意に低く推移した。試験期間における第一胃液 pH の日平均値、最大値、および最小値を表 2.3 に示した。日平均値と最大値は、試験期間を通して併給区よりもスターター区で有意に低かった。第一胃液 pH の最小値に区間差は認められなかった。スターター区における第一胃液 pH5.6 未満の時間数は試験期間を通して併給区よりも有意に長く、AUC は有意に大きくなった (図 2.3)。また、併給区における同値は、離乳以降顕著な減少が見られた。

第一胃液中の総 VFA 量に区間の差は認められなかった (図 2.4)。VFA 組成で

は、離乳後 1 週および 3 週におけるスターター区の酢酸割合が併給区よりも低く ($P < 0.05$)、プロピオン酸割合が高まった ($P < 0.05$)。そのため、スターター区における離乳後の A:P 比は有意に低くなった。

第一胃液の LPS 濃度は、ほとんどの週で両区ともに 100,000EU/mL を超える極めて高い値を示した (図 2.5)。また、スターター区の LPS 濃度は併給区よりも高い傾向が認められた ($P < 0.1$)。

2. 血漿代謝成分およびホルモン濃度

血漿代謝成分の推移を図 2.6 および図 2.7 に示した。血漿 TP、アルブミン、A/G 比、およびグルコース濃度に処理の影響は認められなかった。スターター区の血漿 AST および ALP 濃度は週齢に伴い大きく増加し、離乳後 1 週と 3 週で併給区よりも高まった ($P < 0.05$)。スターター区の血漿 LDH 濃度も離乳後 1 週にかけて増加し、離乳後 3 週で併給区よりも高い傾向 ($P < 0.1$) を認めた。血漿 CK 濃度に区間の差はなく、両区とも検査基準の範囲内で推移した。血漿 APPs 濃度とサイトカイン濃度に区間の差は認められなかった (図 2.8 および血漿 IL-6 濃度はデータ示さず)。また、他の血漿代謝成分およびミネラル濃度に区間の差はなかった (データ示さず)。血漿ホルモン濃度を図 2.9 に示した。両区の血漿インスリン濃度に差は認められなかった。併給区の血漿 GH 濃度は離乳後 3 週にかけて緩やかに増加した。一方、スターター区の血漿 GH 濃度は週齢とともに低下して離乳後 0 週および 3 週で併給区と有意な差が認められた。血

漿グレリン濃度に区間の差は認められなかった（データ示さず）。

2.4 考察

早期離乳を目指す現在の飼養体系では、離乳移行期にスターターの給与量が著増し、反芻期への移行期にかけて粗飼料摂取割合の低い状態が続く。既往の報告において、哺育期の粗飼料摂取量は第一胃液 pH と正の相関を示すことが報告されている (Laarman and Oba, 2011)。実際、離乳の前後を粗飼料を給与せずに飼養すると、第一胃液 pH は日常的に低値を示す (Kim *et al.*, 2016)。本試験において併給区の第一胃液 pH は、飼料摂取に伴い低下し、その後に回復する日内変動が認められた。一方、粗飼料を給与しないスターター区の第一胃液 pH は、飼料採食に伴う変化が消失かつ低値が持続し、先行研究 (Kim *et al.*, 2016) と同様の結果を得た。成牛の SARA 診断基準 (Gozho *et al.*, 2005) を適用すると、本試験のスターター区は試験期間を通して SARA であった。併給区における第一胃液 pH5.6 未満の 1 日あたりの時間数は、離乳前 1 週の時点では SARA の基準を超えていたが、離乳以降は顕著に低下し SARA から回復した。これには離乳による粗飼料採食量の増加が影響したと考えられた。既往の報告では離乳移行期および反芻期への移行期ともに粗飼料摂取量の増加に伴う第一胃液 pH 平均値の上昇が認められている (Laarman and Oba, 2011; Laarman *et al.*, 2012)。これは粗飼料摂取の増加による反芻時間の延長および唾液分泌の亢進と考察されており (Laarman and Oba, 2011)、本試験の離乳後も同様の機序と推察される。

本試験では第一胃液の総 VFA 濃度に区間の差は認められなかった。子牛のス

スターター摂取量 (Kim *et al.*, 2016) やデンプン含量 (Laarman *et al.*, 2012) を変えた既往の知見でも、総 VFA 濃度が増加せずに第一胃液 pH が低下している。つまり、第一胃液 pH の低下は総 VFA 量の増加を必ずしも伴わない。第一胃液の VFA 組成では、離乳後 1 週および 3 週において、スターター区の酢酸割合の低下とプロピオン酸割合の増加により、併給区と比較して A:P 比が有意に低下した。子牛におけるスターター摂取量の増加 (Kristensen *et al.*, 2007)、また、成牛における濃厚飼料多給によっても (Khafipour *et al.*, 2009a; Li *et al.*, 2012)、第一胃液のプロピオン酸割合の増加や A:P 比の低下が認められる。本試験のスターター区では、離乳を機にスターターの採食量が増えたことで第一胃液プロピオン酸割合が増加し、A:P 比の低下につながったと考えられる。

スターター区では週齢に伴い第一胃液の LPS 濃度が増加し、併給区と比較して高い傾向 ($P < 0.1$) が認められた。泌乳牛や去勢牛では第一胃液 pH の低下と LPS 濃度の増加が関連することが報告されている (Khafipour *et al.*, 2009a)。一方で、第一胃液の LPS 濃度は個体差が大きく、特に高栄養条件では個体差による影響が顕著に現れることも指摘されている (Hirabayashi *et al.*, 2017)。スターター区における第一胃液 LPS 濃度の増加も成牛同様に第一胃液 pH の低下と関連すると思われるが、個体差が影響したため併給区との統計的な有意差は示さなかった。また、併給区と同濃度も 100,000 EU/mL を超える高いレベルで推移し、成牛を用いた SARA 誘発試験 (Khafipour *et al.*, 2009b; Li *et al.*, 2012) と同等もしくは上回る値を示した。なお、離乳の前後における第一胃液 LPS 濃度

に関するデータは、我々が初めて示した知見である。子牛の第一胃微生物叢は生後2日にはほぼ成牛と同程度の密度となる (Minato *et al.*, 1992)。しかし、第一胃から第二胃以降へ内容液が通過する速度は固形飼料の摂取量と第一胃容積に比例するため、成牛よりも遅くなる (Berends *et al.*, 2015)。つまり本試験では、第一胃で死滅した細菌を含む内容液が第二胃以降へ流入する速度が成牛と比較して遅く、滞留したことで、高い第一胃液 LPS 濃度を示した可能性がある。しかしながら、実際の機序については今後さらなる検討が必要である。

スターター区における血漿 AST および ALP 濃度は週齢に伴い増加し、併給区と比較して離乳後に有意に高くなった。また、スターター区の LDH 濃度は併給区に比べて離乳後3週で高い傾向を示した。血漿 CK 濃度に区間差が認められなかったことから、スターター区の子牛では肝臓における炎症が推察された。しかし、血漿 APPs 濃度ならびにサイトカイン濃度は、試験期間を通して区間差が認められなかった。成牛の SARA 誘発試験においても、第一胃液 LPS 濃度の上昇と血中 APPs 濃度の上昇は必ずしも一致していない (Khafipour *et al.*, 2009b; Li *et al.*, 2012)。また、育成牛に SARA を誘発して血中 AST 濃度の増加が認められた報告もあるが (Marchesini *et al.*, 2013)、第一胃液 LPS 濃度が上昇した時の血中の肝細胞逸脱酵素濃度に関する知見は乏しい。

本試験では、スターター区の血漿 GH 濃度が試験の経過とともに減少し、併給区と比較して有意に低値を示した。第一胃液中の VFA が反芻動物の血中 GH 濃度に影響を及ぼすことは以前から知られている (Matsunaga *et al.*, 1997)。さ

らに、羊では飼料中の濃厚飼料割合に依存して血中 GH 濃度の低値が維持される (Hagino *et al.*, 2005)。本試験のスターター区においても併給区と比較して離乳後に第一胃液プロピオン酸割合が高まっている。つまり、スターター区における血漿 GH 濃度の低下は第一胃液 VFA 組成の変化に関連したものと考えられた。

以上から、離乳の前後 4 週間に粗飼料を併給せずスターターのみで飼養すると、第一胃液 pH の日内変動が消失、低値が持続して成牛における SARA の診断基準に達し、その状態が継続した。同時に第一胃液 A:P 比の低下ならびに LPS 濃度の増加が認められた。また、この第一胃発酵の変化は血漿中肝細胞逸脱酵素濃度を増加させ、GH 濃度を低下させた。つまり、粗飼料の無給与が第一胃内だけでなく肝臓の傷害や内分泌成分へ影響をもたらすことが明らかとなった。一方で、離乳移行期から反芻期への移行期にかけた粗飼料の給与は、第一胃液 pH の採食に伴う変動を作出し、第一胃発酵を含む代謝・内分泌機能の健全な恒常性を維持するために重要であることが示された。

2.5 図表

表2.1 試験飼料の給与量

		← 試験期間 →							
		週 齢							
		4	5	6	7	8	9	10	11
併給区	代用乳, g・L/日	600・ 3.6	600・ 3.6	600・ 3.6	300・ 3.6	0			
	ペレットスターター, kg/日	1.2	1.2	1.2	1.6	1.6	2	2.4	2.4
	オーチャードと チモシー乾草, kg/日	0.2	0.2	0.2	0.2	0.6	0.6	0.8	0.8
スターター区	代用乳, g・L/日	600・ 3.6	600・ 3.6	600・ 3.6	300・ 3.6	0			
	ペレットスターター, kg/日	1.2	1.2	1.2	1.6	2.2	2.6	3.2	3.2
	オーチャードと チモシー乾草, kg/日	0.2	0.2	0.2	0				

数値は現物給与量

表2.2 試験飼料の成分

	代用乳	ペレット スターター	オーチャード と チモシー乾草
乾物, %	96.9	88.1	83.2
乾物中割合, %			
CP	24.7	22.4	10.8
Crude fat	20.9	3.7	1.1
灰分	5.6	5.1	8.0
NDF	—	13.9	56.6
ADF	—	7.3	33.7
デンプン	—	26.3	2.0
Ca	0.7	0.7	0.5
P	0.6	0.4	0.2

オーチャードとチモシー乾草は細断せずに給与



A



B



C

図 2.1

A) 研究用に開発された子牛用無線伝送式 pH メーター（長さ 160mm、直径 32mm）

成牛の無線伝送式 pH メーター（Sato *et al.*, 2012）に基づき開発

B) 第一胃フィステルの蓋と pH メーターをコードで接続し、第一胃内に留置する

C) 実験風景

測定した pH は舎内の受信機を通してパーソナルコンピュータ上に表示、記録される

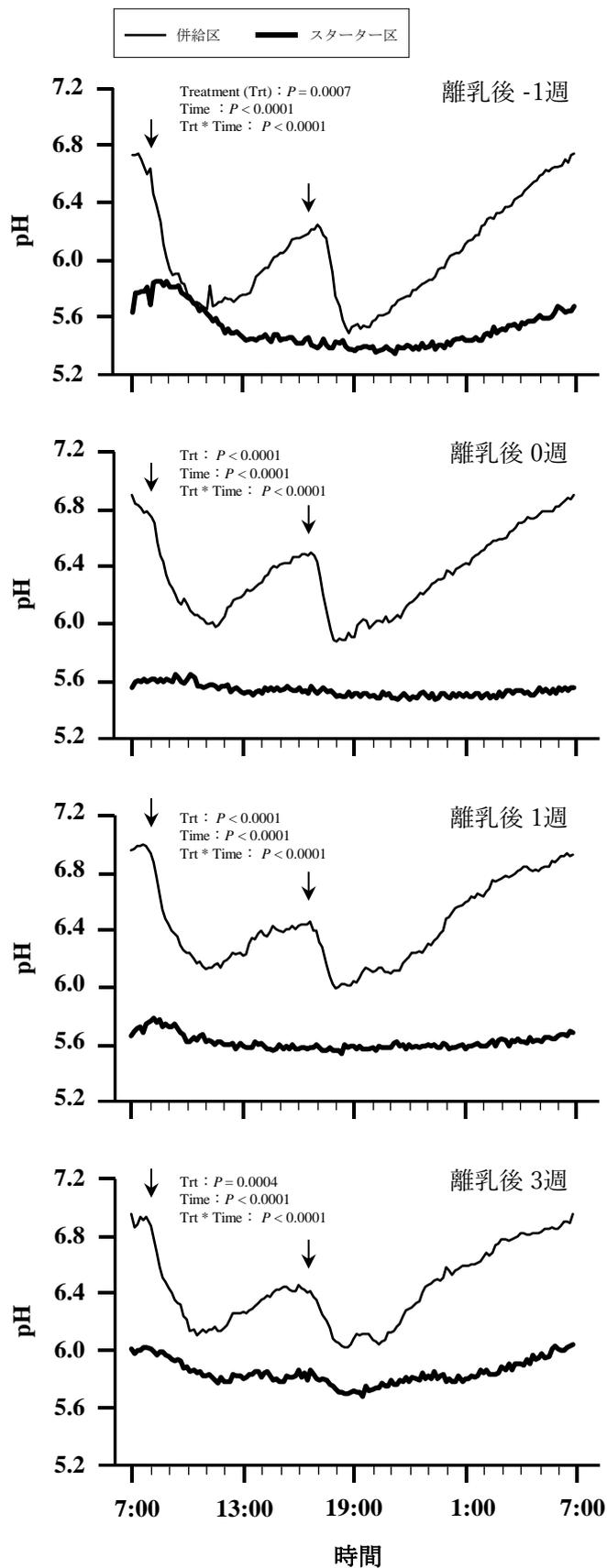


図 2.2 第一胃液 pH の日内変動
 各区 $n = 8$ 、最小二乗平均
 細い実線は併給区、太い実線は
 スターター区
 矢印は飼料給与時間
 各週、採材日から 72 時間分の
 データを使用

表2.3 第一胃液pHの日最小、日最大、および日平均値

項目	離乳後週数												SEM	Treatment (Trt)	P-value Week (Wk)	Trt × Wk
	-1週			0週			1週			3週						
	併給区	スターター区	併給区	スターター区	併給区	スターター区	併給区	スターター区	併給区	スターター区	併給区	スターター区				
日平均値	6.04 ^a	5.51 ^b	6.35 ^a	5.54 ^b	6.43 ^a	5.61 ^b	6.44 ^a	5.84 ^b	0.10	0.001	0.001	0.001	0.022			
日最小値	5.29	5.27	5.59	5.41	5.70	5.50	5.68	5.59	0.10	0.245	0.001	0.001	0.734			
日最大値	6.92 ^a	6.03 ^b	7.11 ^a	5.76 ^b	7.12 ^a	5.88 ^b	7.14 ^a	6.23 ^b	0.14	0.001	0.127	0.127	0.018			

^{a,b}異文字は同週における区間の有意差 ($P < 0.05$)
各区 $n = 8$
各週、採材日から72時間分のデータを使用

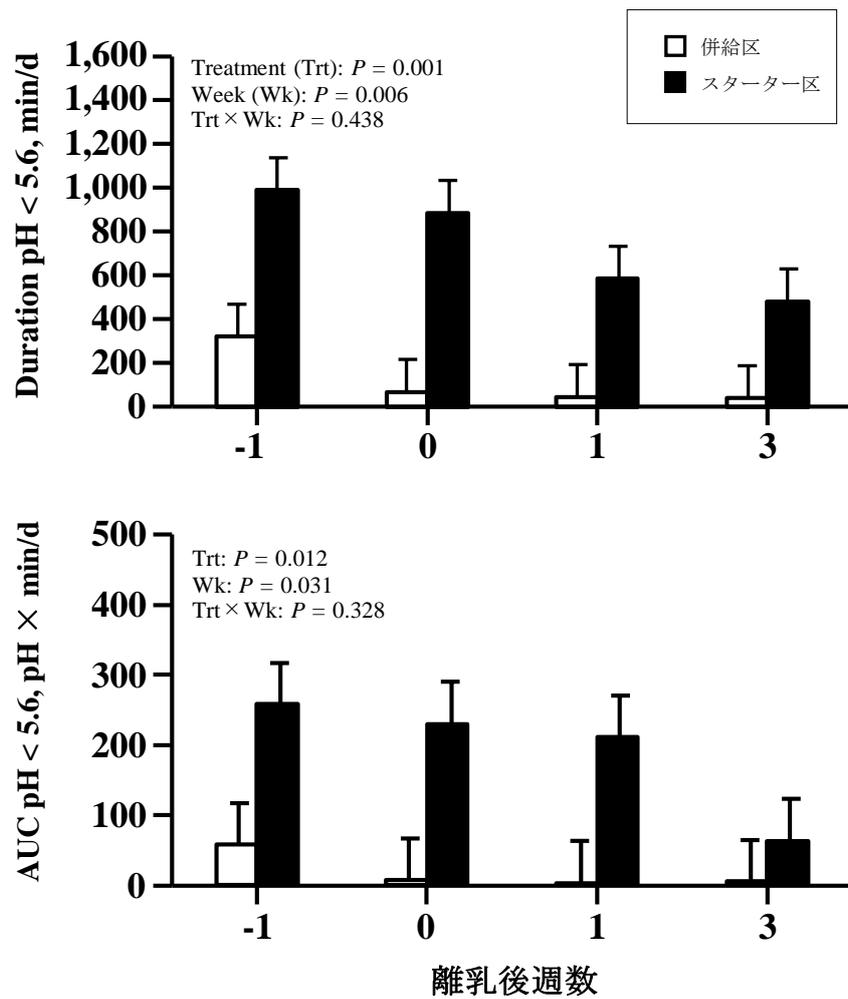


図 2.3 第一胃液 pH5.6 未満の時間数 (分数/日) および AUC (pH × 分数/日)
 各区 n = 8、最小二乗平均 ± 標準誤差
 □は併給区、■はスターター区
 各週、採材日より 72 時間分のデータを使用

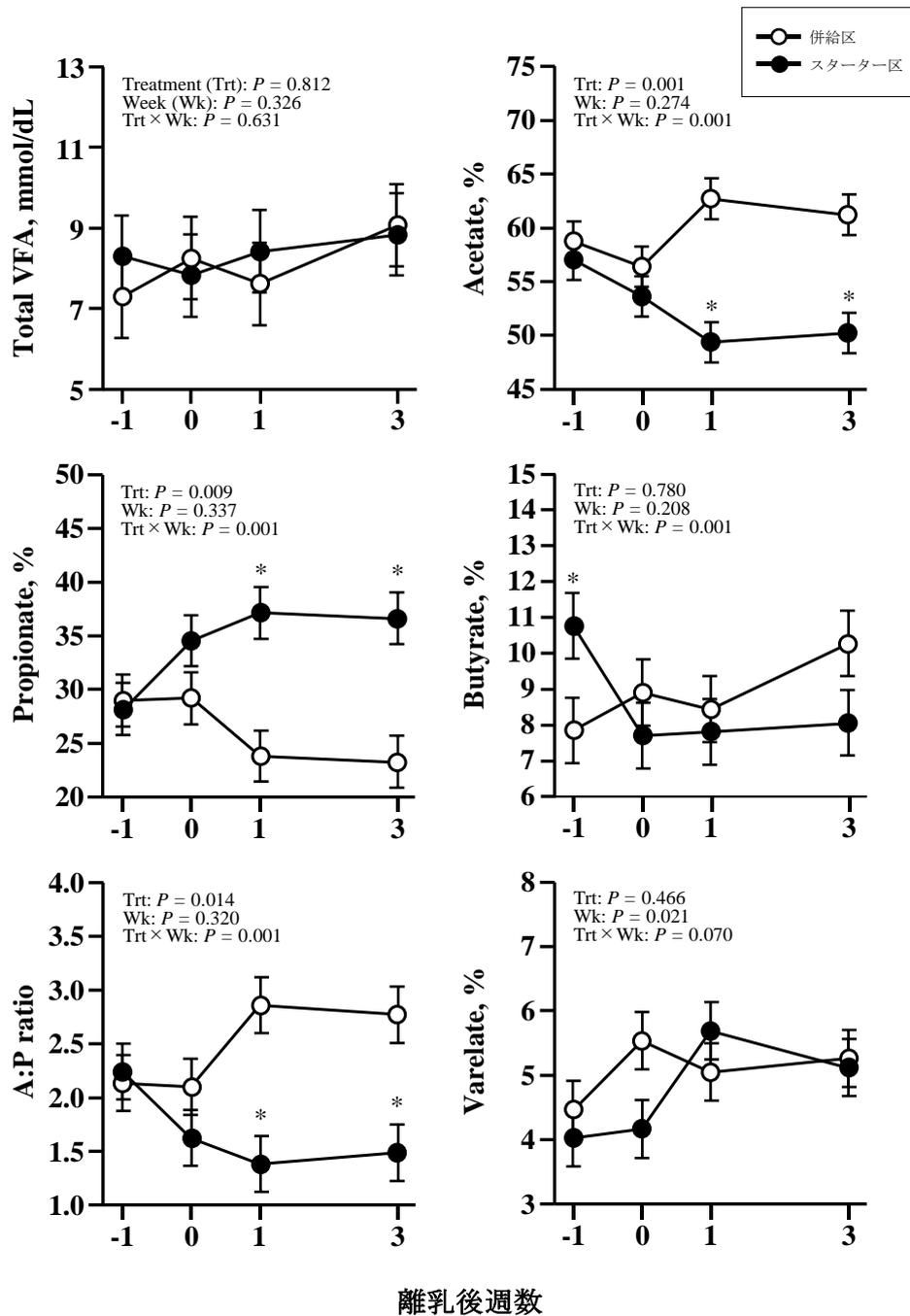


図 2.4 第一胃液総 VFA 量および VFA 組成
 各区 n = 8、最小二乗平均 ± 標準誤差
 ○は併給区、●はスターター区
 * $P < 0.05$ (各週の区間)

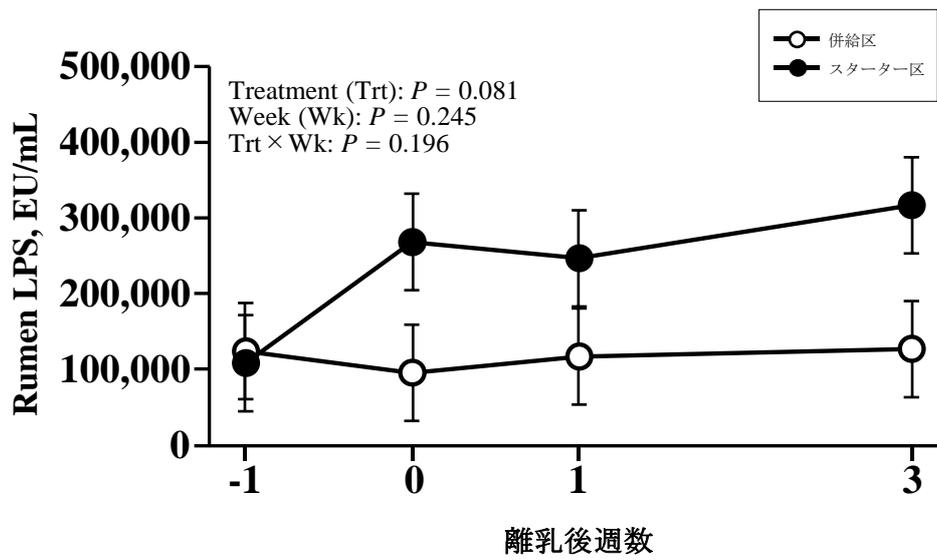


図 2.5 第一胃液 LPS 濃度

各区 n = 8、最小二乗平均 ± 標準誤差

○は併給区、●はスターター区

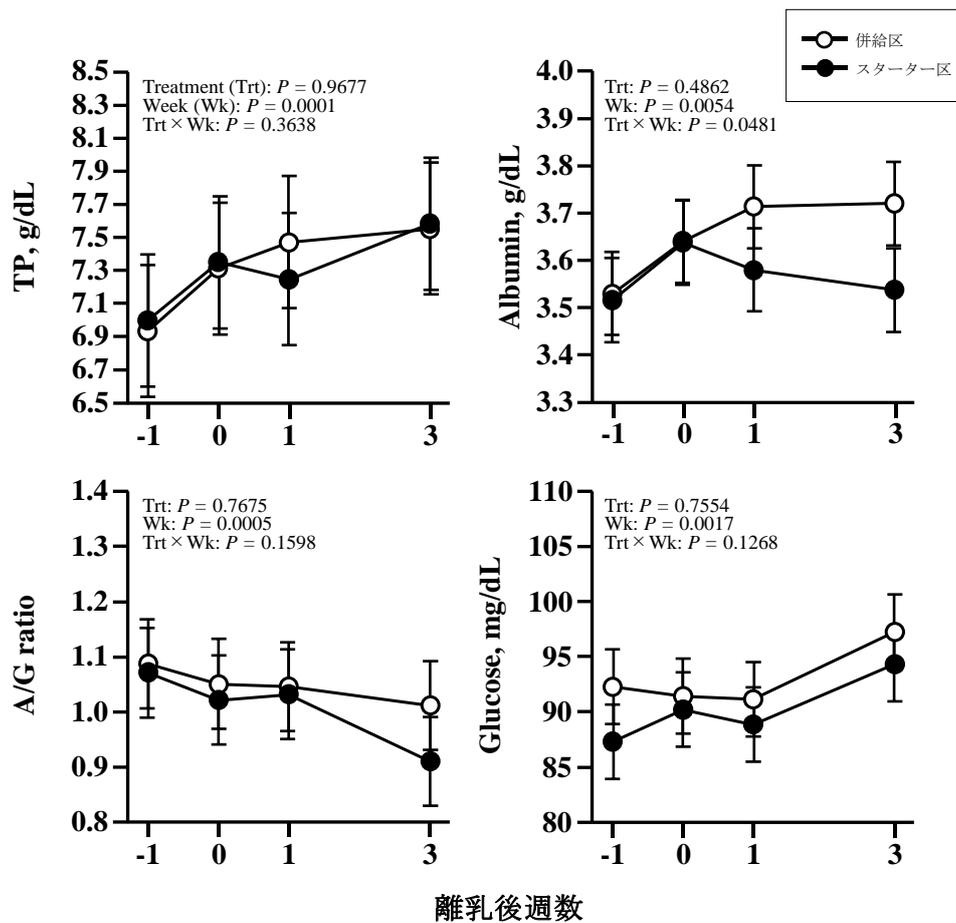


図 2.6 血漿代謝成分濃度

各区 n = 8、最小二乗平均±標準誤差

○は併給区、●はスターター区

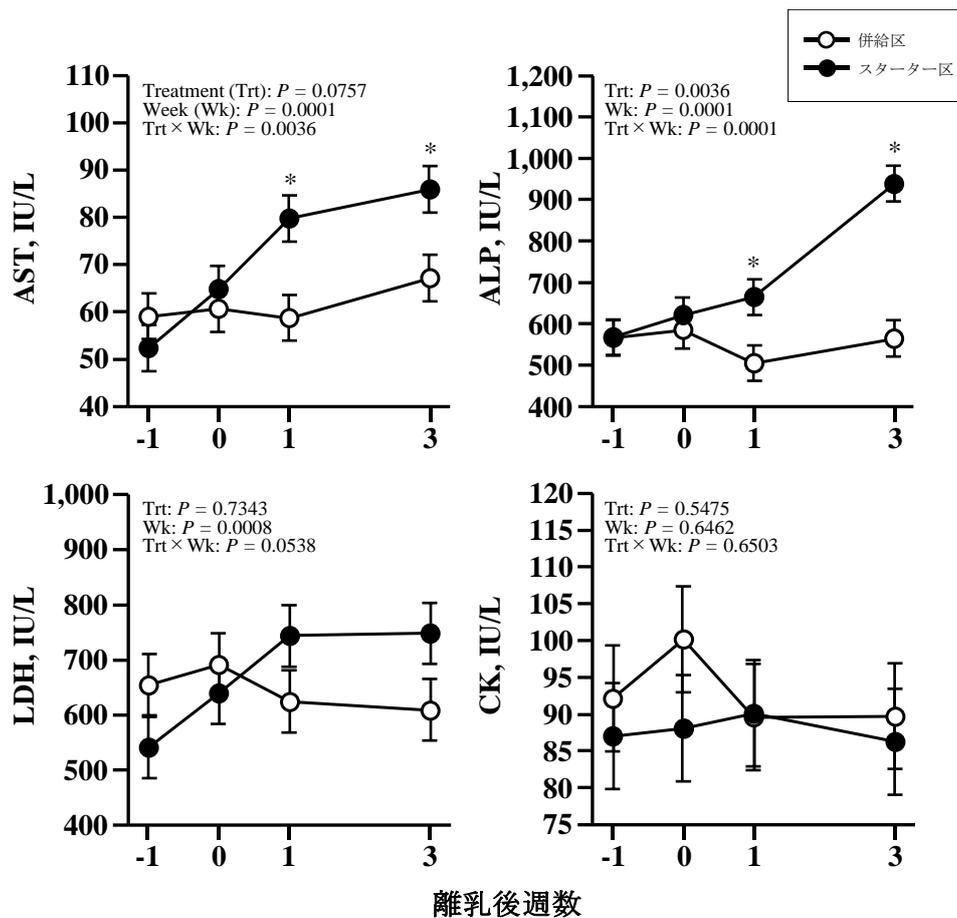


図 2.7 血漿代謝成分濃度

各区 $n = 8$ 、最小二乗平均 ± 標準誤差

○は併給区、●はスターター区

* $P < 0.05$ (各週の区間)

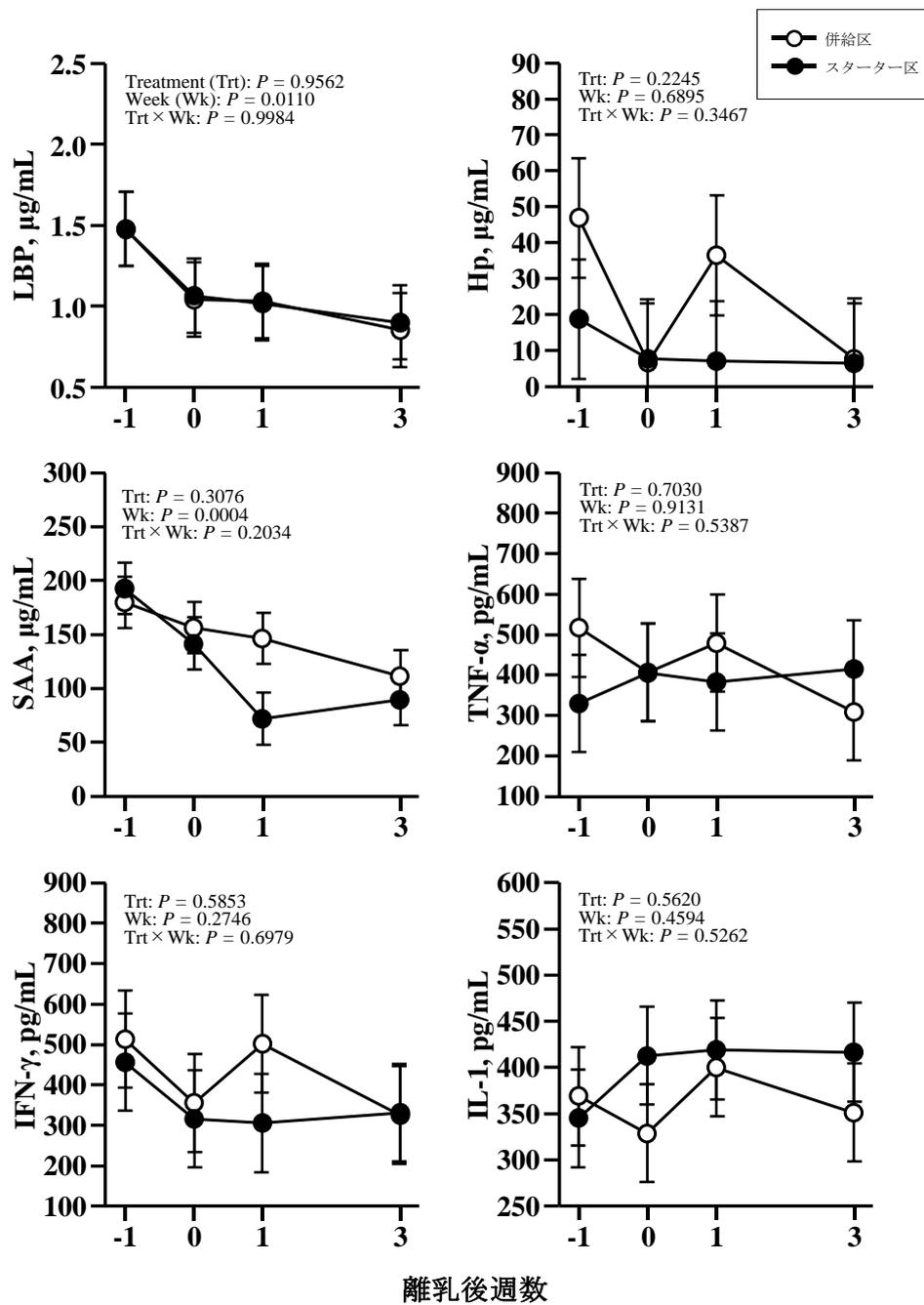


図 2.8 血漿 APPs およびサイトカイン濃度
 各区 n = 8、最小二乗平均 ± 標準誤差
 ○は併給区、●はスターター区

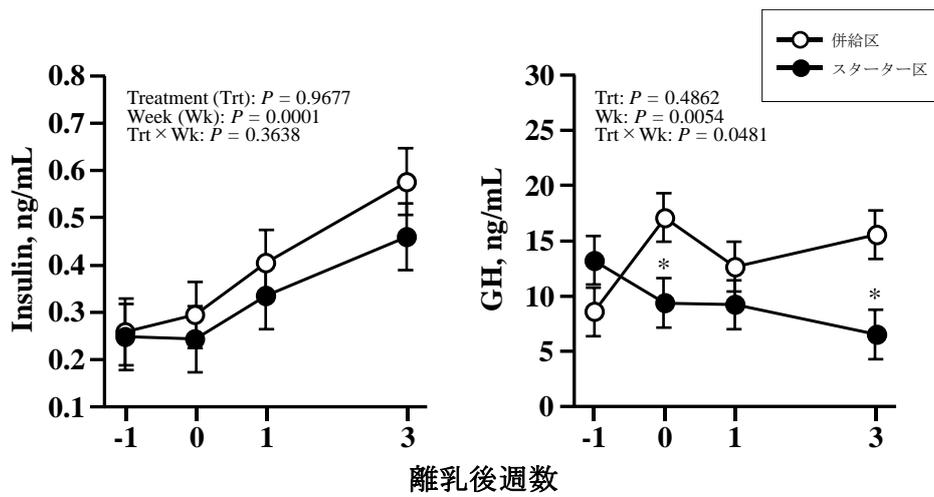


図 2.9 血漿ホルモン濃度

各区 n = 8、最小二乗平均±標準誤差

○は併給区、●はスターター区

* $P < 0.05$ (各週の区間)

第3章 活性酵母の給与が第一胃液 pH と発酵、血漿代謝・内分泌成分、および 発育性に及ぼす影響

1 節 活性酵母の給与が濃厚飼料多給時の第一胃液 pH および関連成分へ及 ぼす影響

3.1.1 緒言

プロバイオティクスは、適当量の摂取により宿主の健康効果が期待し得る生きた微生物と定義される (FAO/WHO, 2001)。家畜におけるその機能としては7項目、すなわち、消化吸収の促進、飼料効率の改善、体重増加の促進、感染症に対する抵抗性亢進、死亡率または罹患率の減少、乳生産性の向上、および第一胃アシドーシスの軽減が挙げられている (Fuller, 1999)。反芻動物では以前からプロバイオティクスとして酵母や真菌の利用が進んでおり (Wallace and Newbold, 1992)、特に乳牛では *Saccharomyces cerevisiae* (SC) が広く用いられている (Uyeno *et al.*, 2015)。成牛では、SC の給与により実験的な SARA 誘発の有無や泌乳ステージに因らず第一胃液 pH 低下が軽減されることが報告されている (Desnoyers *et al.*, 2009; Bach *et al.*, 2007; Alzahal *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2019)。一方、哺育期や育成期の SC 給与においては、第一胃の成熟促進 (Brewer *et al.*, 2014)、第一胃液総 VFA 量 (Quigley *et al.*, 1992a; Mutusvangwa *et al.*, 1992)、および DG (Lesmeister *et al.*, 2004) の増加が認められている。しかし、子牛への効果は健康な状態では現れにくく (He *et al.*, 2017)、離乳、濃厚飼料の多給、および疾病などの状況において SC の効果がより顕著となりやすいとの知

見もある (Alugongo *et al.*, 2017)。子牛への SC 給与が第一胃液 pH に及ぼす影響については、哺育期には変化なし (Hučko *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 2016)、育成期には低下 (Mutusvangwa *et al.*, 1992) または変化なし (Agarwal *et al.*, 2002) と報告がある。しかし、いずれも経口あるいは第一胃から直接採取した胃液 pH を測定しており、成牛で認められる第一胃液 pH 低下の軽減効果について連続した pH データにより詳細に検討した知見はない。

第 2 章では、離乳移行期および反芻期への移行期に粗飼料を併給せずに飼養すると第一胃液 pH の採食に伴う変動が消失し、成牛の SARA 基準に達することを明らかにした。さらに、血漿中の肝細胞逸脱酵素濃度の増加や GH 濃度の低下など代謝・内分泌成分への影響も伴うことがわかった。本章 1 節では、SARA の発生する可能性が高い離乳移行期から反芻期への移行期を想定し、SC 添加給与による第一胃液 pH の制御効果ならびに第一胃発酵への影響について検証する。

3.1.2 材料と方法

本試験計画は国立大学法人岩手大学動物実験委員会に承認され（A201453）、動物の飼養および試験は動物実験等管理規則に従って実施した。

1. 供試牛および処理区

ホルスタイン種雄子牛 4 頭 ($147.0 \pm 5.8\text{kg}$, 3.6 ± 0.2 か月齢; 平均 \pm 標準誤差) を供試した。試験期間中はラバーマットを敷いた $2.0 \times 1.2\text{m}$ の個別ペンで飼養し、飲水は自由とした。なお、供試牛は 4 週齢時に左臍部に第一胃フィステル装着手術を行っている。試験はクロスオーバー法により実施した。すなわち、供試牛を対照区および SC 区に区分し、21 日間の試験期間の後に 14 日間のウォッシュアウト期間を設け、区を入れ替えて再度同じ試験を行った。SC 区には試験期間を通して 2g の SC (Levucell[®] SC、*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 株、 $1.0 \times 10^9\text{CFU}$; Lallemand、Toulouse、France; 図 3.1.1) を、第一胃フィステルから 8 時と 17 時の 1 日 2 回投入した。対照区には SC の給与を行わなかった。21 日間の試験期間 (Day -15 から Day 4) のうち、最初の 15 日間 (Day -15 から Day -1) は、粗濃比 57:43 の飼料を給与した。その後 2 日間 (Day 0 および Day 1) は、粗飼料の給与を止め、濃厚飼料のみを給与した。最後の 4 日間 (Day 2 から Day 5) は再び粗濃比 57:43 の飼料を給与した。14 日のウォッシュアウト期間は粗飼料のみの給与とした。試験飼料の組成および成分は表 3.1.1 の通りである。飼料は 1 日量を等分して、SC 添加と同時の 8 時と 17 時に給与し、飼

料摂取量は毎日個別に記録した。なお、4週齢時における第一胃フイステル手術当日から3日間以外に供試牛への抗生物質の投与は行っていない。

2. 第一胃液と血液の採取

Day -1、Day 2、Day 3、および Day 5 の4日間は1日1回、朝8時の飼料給与前に第一胃フイステルより第一胃液を、頸静脈より血液を採取した。Day 0 および Day 1 の2日間は1日2回、朝の給与前および給与後3時間（8時および11時）に第一胃液と血液を採取した。採取後の胃液および血液の処理方法は第2章と同様である。加えて本試験では、滅菌ガーゼ濾過後の第一胃液 30mL をアンモニア態窒素濃度の測定サンプルとし、分析まで-80°Cで保管した。

3. 第一胃液および血漿成分の分析

第一胃液および血漿成分の分析項目と方法は第2章と同様である。加えて本試験では第一胃液乳酸濃度、第一胃液アンモニア態窒素濃度、および血漿 CRP 濃度の分析を行った。なお、血漿 CRP 濃度のみ、Day 0、1、2、および5の朝の飼料給与前に採材した検体を用いて計4回の分析とした。第一胃液乳酸濃度は VFA 測定用サンプルを用いて第2章と同様にガスクロマトグラフィーにて、第一胃液アンモニア態窒素濃度は窒素自動蒸留装置 (Kjeltec Auto 1035、Tecator Inc.、Sweden) にて測定した。血漿 CRP 濃度の測定は市販の ELISA キット (Cow CRP ELISA Kit ; Life Diagnosis Inc.、WestChester、USA) を用いた。また、本

節では血漿グレリン濃度を分析項目から除外した。

4. 第一胃液 pH の測定と解析

供試牛の第一胃液 pH は第 2 章と同様に 10 分間隔で連続測定した。得られた pH データを用いて、Day -1 から Day 2 まで各日毎に 1 時間平均を、Day -1 から Day 3 まで各日毎に日平均、最小、最大値、pH5.6 未満の時間数、および pH5.6 未満の AUC を算出した。

5. 統計処理

統計ソフト (SAS University Edition; SAS Institute, Cary, NC, USA) の MIXED procedure を用いて、DG、第一胃液 pH、胃液成分および血液の各測定項目における処理効果の判定を行った。使用した線形混合モデルは以下の通りである。

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + P_j + C_k + e_{1ijk} + H_l + T \times H_{il} + e_{2ijkl}$$

ここで、 Y_{ijkl} は測定値、 μ は全平均、 T_i は処理区の効果、 P_j は試験期の効果、 C_k の供試子牛の効果、 e_{1ijk} は一次誤差、 H_l は採材時間の効果、 $T \times H_{il}$ は処理と採材時間の交互作用、 e_{2ijkl} は二次誤差を示す。なお、 P_j と C_k は変量効果として扱った。また、処理区と採材時間の交互作用が有意であった時に、sheffe の方法により多重比較を行った。

結果は最小二乗平均および標準誤差で示し、 $P < 0.05$ を有意差あり、 $P < 0.1$ を有意傾向ありとした。

3.1.3 結果

試験期間中、両区の供試子牛は給与飼料をすべて摂取し、DMI に区間の差はなかった。試験開始から終了までの DG は、対照区が 17.1 ± 0.8 kg/日、SC 区が 15.0 ± 2.3 kg/日で、両区間に有意な差はなかった。

1. 第一胃液 pH、VFA 組成、および LPS 濃度

Day -1 から Day 2 における第一胃液 pH の 1 時間平均値による日内変動を図 3.1.2 に示した。Day -1 までの第一胃液 pH は両区ともに 7 時と 17 時の飼料摂取後に 2 時間ほどかけて低下した後、次の採食時間までに採食前の pH に向かって緩やかに上昇するという日内変動を示した。濃厚飼料を多給した Day 0 と Day 1 には、他の日と比較して両区ともに飼料摂取後の pH 低下の程度が顕著に大きくなった。さらに、SC 区では Day 1 にその低下の程度が対照区よりも有意に大きくなった。しかし、SC 区的第一胃液 pH の低下は次の採食までに回復して対照区との差が認められなくなった。濃厚飼料多給を止めた Day 2 以降は採食後における pH 低下の増大および両区の差は消失した。Day -1 から Day 3 における第一胃液 pH の日平均、最小、および最大値を表 3.1.2 に、pH5.6 未満の時間数および AUC を図 3.1.3 に示した。第一胃液 pH の日平均、最小、および最大値は、1 時間平均値同様、濃厚飼料の多給により全ての項目で両区ともに値が低下した ($P < 0.05$)。また、SC 区の日平均値は対照区と比較して Day 1 に有意に低くなった。第一胃液 pH5.6 未満の時間数は SC 区の Day 0 および Day 1

で、第一胃液 pH5.6 未満の AUC は、SC 区の Day 1 で対照区よりも有意に大きくなった。

第一胃液中の総 VFA 量、VFA 組成、アンモニア態窒素濃度、および乳酸濃度を図 3.1.4 および図 3.1.5 に示した。両区の総 VFA 量は Day 0 および Day 1 の飼料給与後 3 時間に給与前よりも増加した ($P < 0.05$)。また、総 VFA 量は処理と採材時間の交互作用に有意傾向が認められ、SC 区の Day 0 および Day 1 の採食後 3 時間で対照区よりも高まった。両区の酢酸割合は Day 0 から Day 2 にかけて直線的に下降し、一方で両区のプロピオン酸割合は上昇した。酢酸割合およびプロピオン酸割合に区間の差はなかった。両区の酪酸割合および吉草酸割合は、総 VFA 量と同様に給与後 3 時間で一過性に高まった。SC 区の酪酸割合は Day 0 および Day 1 の採食後 3 時間で対照区よりも高値を示した ($P < 0.05$)。吉草酸割合に両区の差は認められなかった。SC 区のアンモニア態窒素濃度は Day 0 から Day 1 の朝の採食前まで対照区よりも低く推移したが、統計的な有意差はなかった。両区の乳酸濃度は Day 1 の採食後 3 時間に一過性の上昇 ($P < 0.05$) が認められた。

第一胃液 LPS 濃度は、両区ともに Day 0 から Day 2 にかけて上昇し、Day 2 の朝をピークとしてその後低下した (図 3.1.6)。なお、区間の差は認められなかった。

2. 血漿 APPs 濃度およびサイトカイン濃度

血漿 APPs およびサイトカイン濃度の推移を図 3.1.7 および図 3.1.8 に示した。APPs 濃度およびサイトカイン濃度に濃厚飼料多給の影響および区間の差は認められなかった。

3. 血漿代謝成分およびホルモン濃度

血漿代謝成分の推移を図 3.1.9 および図 3.1.10 に示した。両区の血漿 BHB 濃度は第一胃液総 VFA 量、酪酸および吉草酸割合と同様、Day 0 および Day 1 の採食後 3 時間に一過性に上昇した ($P < 0.05$)。また、SC 区の BHB 濃度は Day 1 の採食後 3 時間に対照区よりも有意に高まった。他の代謝成分およびミネラルの濃度は基準範囲内で推移し、区間の差はなかった (図以外の成分はデータ示さず)。

両区の血漿インスリンおよび GH 濃度は、処理の影響を受けなかった (図 3.1.11)。

3.1.4 考察

本節では、子牛の SARA に対応する技術として、活性酵母の給与による第一胃液 pH 制御の可能性を検討した。濃厚飼料の多給処理により、両区の第一胃液 pH の 1 時間平均値および 24 時間平均値は有意に低下した。また、両区の第一胃液 pH5.6 未満の時間数および pH5.6 未満の AUC が有意に増加し、Day 0 および Day 1 とも SARA が誘発された。しかし、濃厚飼料多給による第一胃液 pH の低下は SC 区でより大きくなり、成牛における効果とは逆の結果を示した。SC 区では濃厚飼料多給後 3 時間で対照区と比較して総 VFA 量の増加しており、この増加が第一胃液 pH の低下に関連していると考えられる。既往の子牛の知見でも、SC の添加による採食後の第一胃液中総 VFA 量の増加と第一胃液 pH の低下が認められている (Mutsvangwa *et al.*, 1992)。本節ではさらに SC 添加の有無による第一胃液 pH の日内変動の差を明らかにした。すなわち、SC 区では濃厚飼料の多給により第一胃液 pH が対照区よりも大きく低下するものの、次の採食前までに対照区と同じレベルに回復した。さらに、第一胃液中の総 VFA 量や酪酸割合でも同様の変動を示した。つまり、子牛への SC 添加は濃厚飼料多給時の第一胃発酵を亢進させて対照区よりも多くの VFA を産生し、次の採食までにその VFA は吸収されたと推察される。一方で、濃厚飼料の多給を止めた Day 2 以降、第一胃液 pH の区間差は速やかに消滅した。離乳後すぐの子牛は、見かけ上十分に体重が増加し、第一胃微生物の数や多様性が成牛と同程度に発達しても、第一胃発酵の機能としては成熟していない (Watanabe *et al.*, 2019)。既往

の知見において、SC の給与は生後早期の第一胃内微生物の定着を促すだけでなく (Chaucheyras-Durand and Fonty, 2002)、微生物の数も増加させる (Newbold *et al.*, 1995)。また、哺育期から育成期にかけての SC の給与により DG (Lesmeister *et al.*, 2004; Panda *et al.*, 1995) やスターター摂取量 (Galvão *et al.*, 2005; Pinos-Rodríguez *et al.*, 2008) の増加が認められており、本試験の結果を考慮すれば SC が第一胃発酵機能を向上させた結果と考えられる。以上から、本試験では SC 給与により第一胃発酵機能が向上した結果、対照区では許容量を超える量であった濃厚飼料を SC 区では利用することができ、第一胃発酵の亢進が顕著に現れたと推察された。

本試験では濃厚飼料の多給により両区の第一胃液プロピオン酸割合が増加した。スターターや濃厚飼料の多給による第一胃液プロピオン酸割合の増加は、前章および成牛 (Khafipour *et al.*, 2009a; Li *et al.*, 2012) でも認められている。加えて、SC 区では濃厚飼料多給時の第一胃液酪酸割合および血漿 BHB 濃度が対照区よりも高まった。離乳前後の第一胃液中の酪酸濃度と血中 BHB 濃度は相関することが知られており (Deelen *et al.*, 2016)、SC 区の血漿 BHB 濃度の増加は第一胃液酪酸割合が高まったことによると考えられた。既往の報告 (Quigley *et al.*, 1992a; Xiao *et al.*, 2016) においても、哺育期に SC を給与することで第一胃液酪酸濃度および血中 BHB 濃度の増加が認められている。また、3 か月齢の子牛を用いた先行研究 (Watanabe *et al.*, 2019) では、SC の給与により第一胃液

酪酸濃度と乳酸および酪酸産生との関与が示唆される *Bifidobacterium* 属菌の割合が増加したが、その機序は明らかとなっていない。

濃厚飼料の多給により、前章と同様に両区とも第一胃液 LPS 濃度の増加が認められた。SC 区的第一胃液 pH は、濃厚飼料の多給により対照区よりも低下の程度および pH5.6 未満の時間数が増加したものの、第一胃液 LPS 濃度に区間の差は認められなかった。さらに、血漿 APPs 濃度、サイトカイン濃度、および肝細胞逸脱酵素濃度に区間差はなかったことから、本試験の処理による炎症反応および肝細胞の傷害は起こらなかったと考えられた。

結論として、3 か月齢の子牛を、SC を添加給与する区と対照区に分けて飼養した後に濃厚飼料を多給したところ、両区とも第一胃液 pH が低下して SARA の基準に達した。また、両区とも第一胃液中の総 VFA 量とプロピオン酸割合が増加した。SC 区では濃厚飼料多給による第一胃液 pH の低下が対照区よりも大きくなり、SC による第一胃液 pH 低下の軽減効果は認められなかった。この時 SC 区的第一胃液 LPS 濃度や血漿 APPs 濃度は対照区との差がなく、生体へ負の影響は認められなかった。すなわち、SC 給与によって第一胃発酵機能が向上した結果、多給された濃厚飼料により発酵が亢進、対照区よりも総 VFA 量が増したために第一胃液 pH が低下したと推察された。また、SC の給与は対照区よりも濃厚飼料多給時の第一胃液酪酸割合および血漿 BHB 濃度をさらに高め、エネルギー源としての VFA の利用が高まった可能性が示唆された。

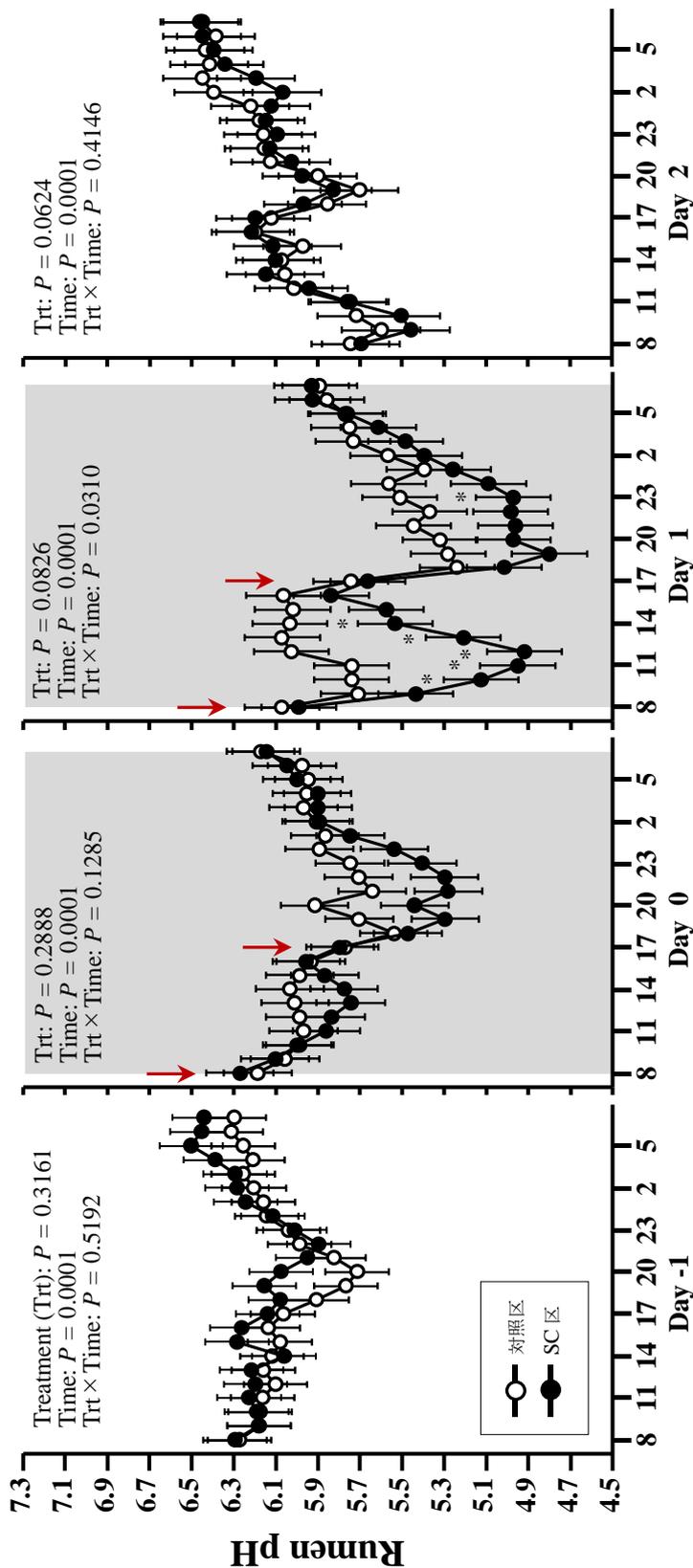
3.1.5 図表



図 3.1.1 添加した SC、1 日給与量 4g
(Levucell[®] SC、*Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077 株、 2.0×10^9 CFU ; Lallemand、Toulouse、France)

表3.1.1 試験飼料の組成および成分

項目	試験期間		Wash-out期間
	Day 0,1以外	Day 0,1	
飼料組成 (%)			
オーチャードおよびチモシー乾草	57	0	100
濃厚飼料	43	50	0
大豆粕フレーク	0	50	0
飼料成分(乾物中%)			
TDN	68.4	80.5	60.9
CP	15.2	15.7	13.0
ADF	30.7	12.8	40.5
NDF	51.3	25.7	68.0
NFC	20.8	48.7	8.0
Ca	0.6	0.4	0.5
P	0.3	0.4	0.3



濃厚飼料多給開始後時間(時)および日数(日)

図 3.1.2 第一胃液 pH の日内変動

各区 n = 4、最小二乗平均 ± 標準誤差

○は対照区、●は SC 区

* $P < 0.05$ (同時間における区間)

灰色の背景および矢印は濃厚飼料多給日および飼料給与時間

表3.1.2 第一胃液pHの平均、最小、および最大値

項目	Day -1		Day 0		Day 1		Day 2		Day 3		SEM	Treatment (Trt)	P -value	
	対照区	SC区	対照区	SC区	対照区	SC区	対照区	SC区	対照区	SC区			Day	Trt × Day
日平均値	6.13	6.18	5.93	5.76	5.67 ^a	5.38 ^b	6.06	6.08	6.21	6.22	0.12	0.453	0.001	0.040
日最小値	5.52	5.67	5.25	5.03	4.88	4.66	5.09	5.29	5.54	5.54	0.21	0.873	0.001	0.608
日最大値	6.58	6.58	6.51	6.45	6.38	6.35	6.56	6.57	6.72	6.64	0.11	0.805	0.001	0.904

各区n = 4

^{a,b}異なる文字は同日における区間の有意差

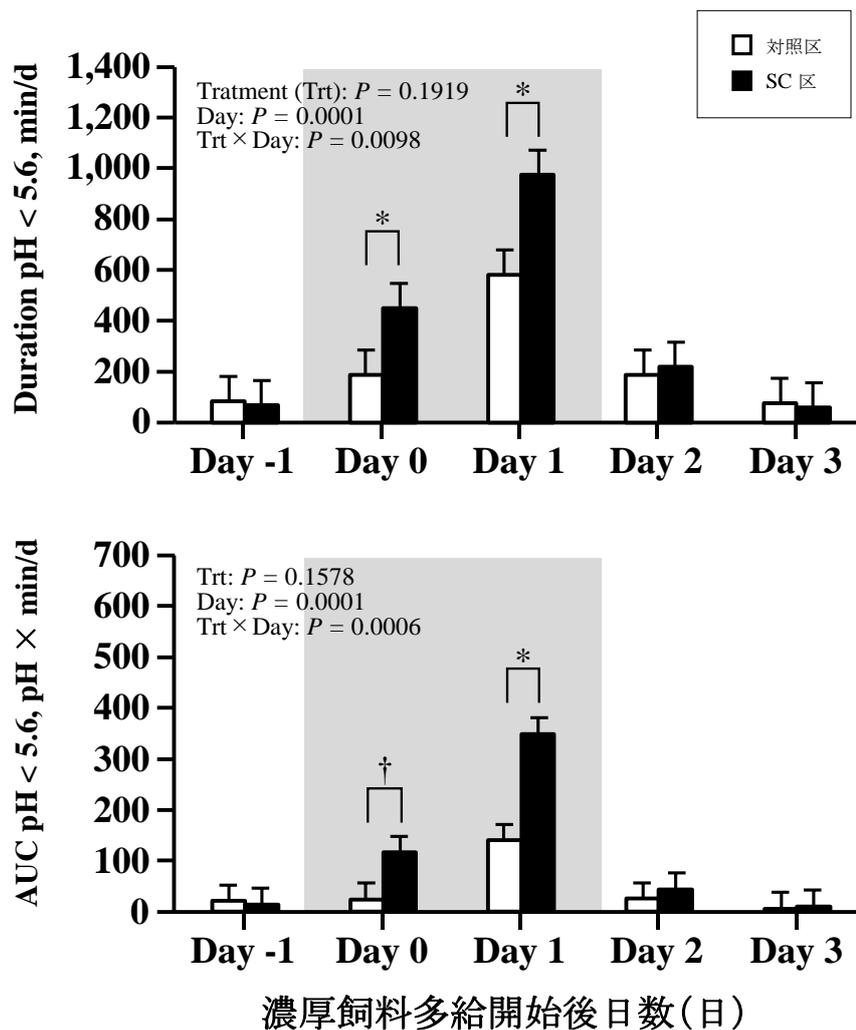


図 3.1.3 第一胃液 pH5.6 未満の時間数 (分数/日) および AUC (pH × 分数/日)

各区 n = 4、最小二乗平均 ± 標準誤差

□は対照区、■は SC 区

* $P < 0.05$ および † $P < 0.1$ (同日の区間)

灰色の背景は濃厚飼料多給日

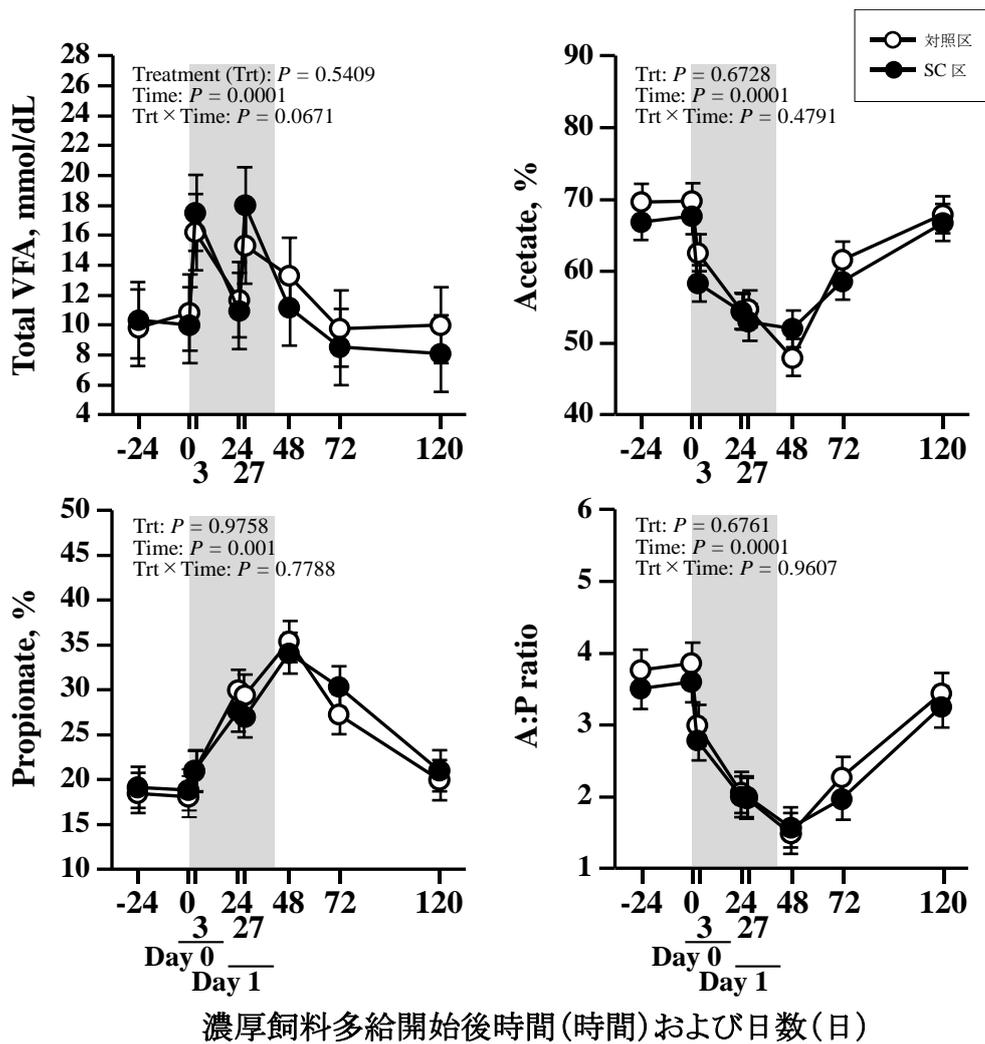


図 3.1.4 第一胃液総 VFA 量および VFA 組成
 各区 $n = 4$ 、最小二乗平均 ± 標準誤差
 ○は対照区、●は SC 区
 灰色の背景は濃厚飼料多給日

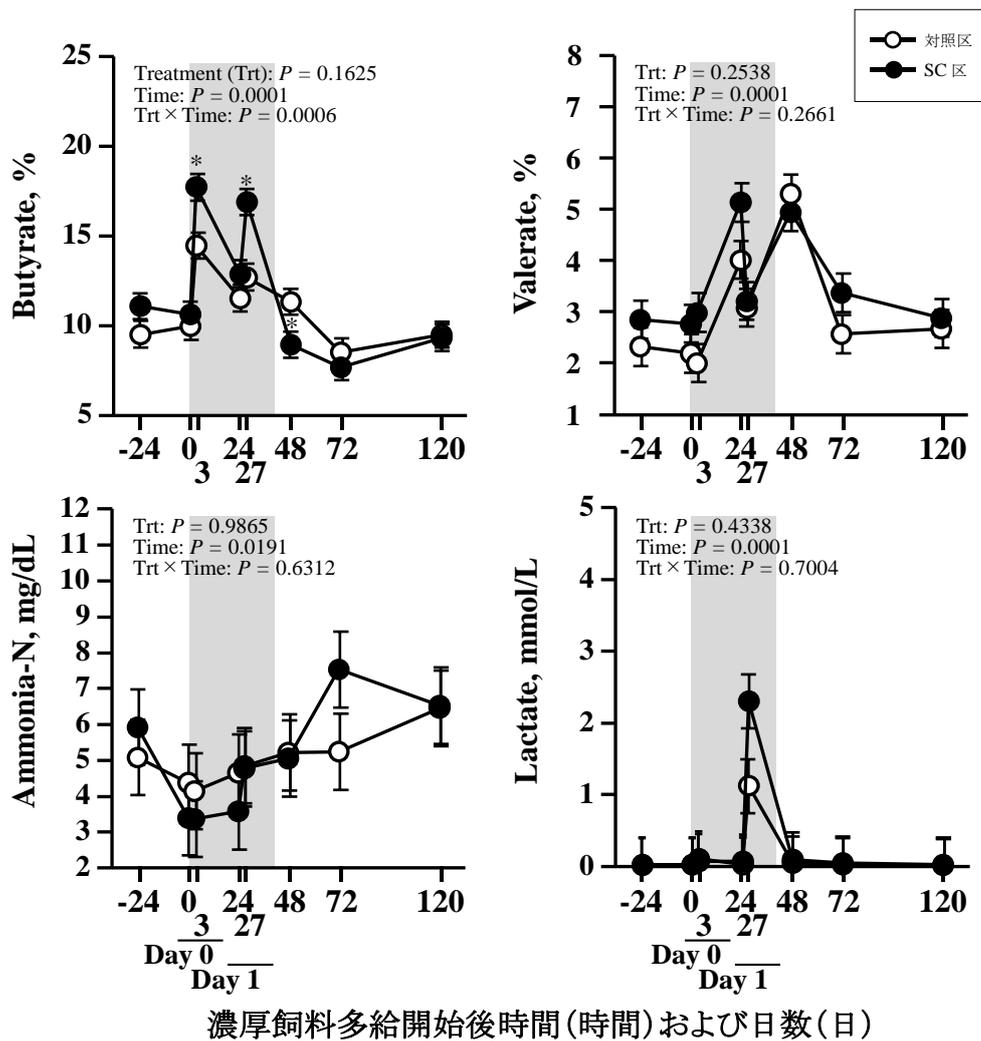
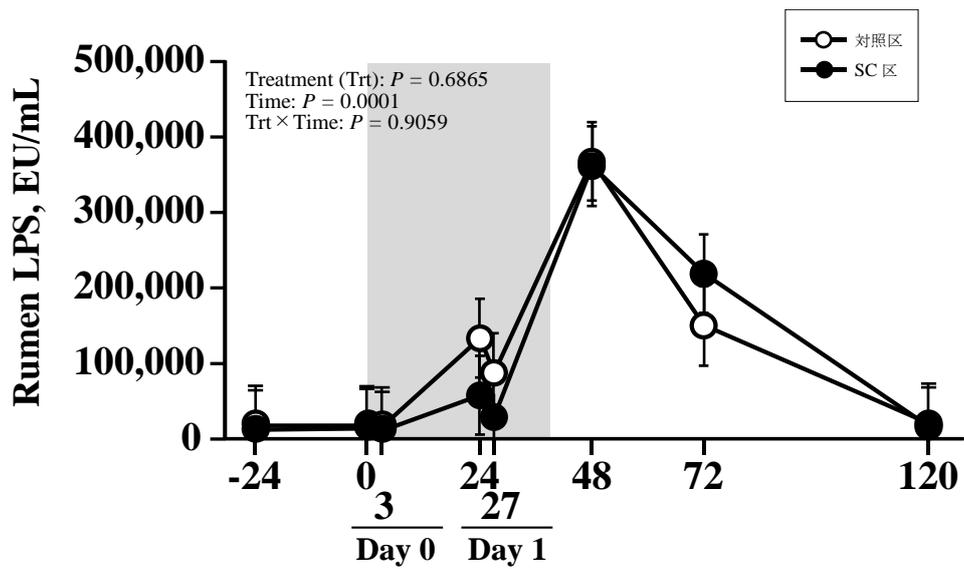


図 3.1.5 第一胃液 VFA 組成、アンモニア態窒素濃度、および乳酸濃度
 各区 n = 4、最小二乗平均 ± 標準誤差
 ○は対照区、●は SC 区
 * $P < 0.05$ (同時間における区間)
 灰色の背景は濃厚飼料多給日



濃厚飼料多給開始後時間(時間)および日数(日)

図 3.1.6 第一胃液 LPS 濃度

各区 n = 4、最小二乗平均±標準誤差

○は対照区、●は SC 区

灰色の背景は濃厚飼料多給日

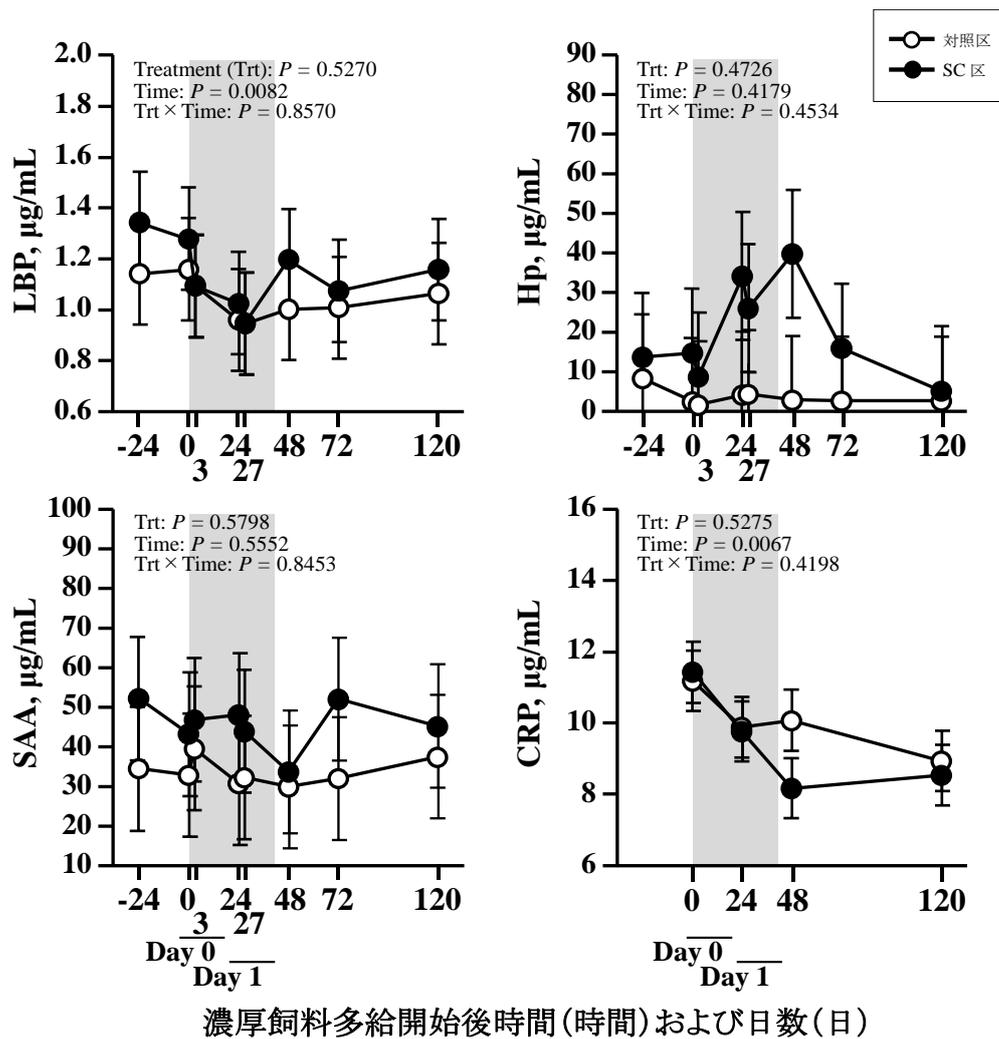


図 3.1.7 血漿 APPs 濃度

各区 n = 4、最小二乗平均 ± 標準誤差

○は対照区、●は SC 区

灰色の背景は濃厚飼料多給日

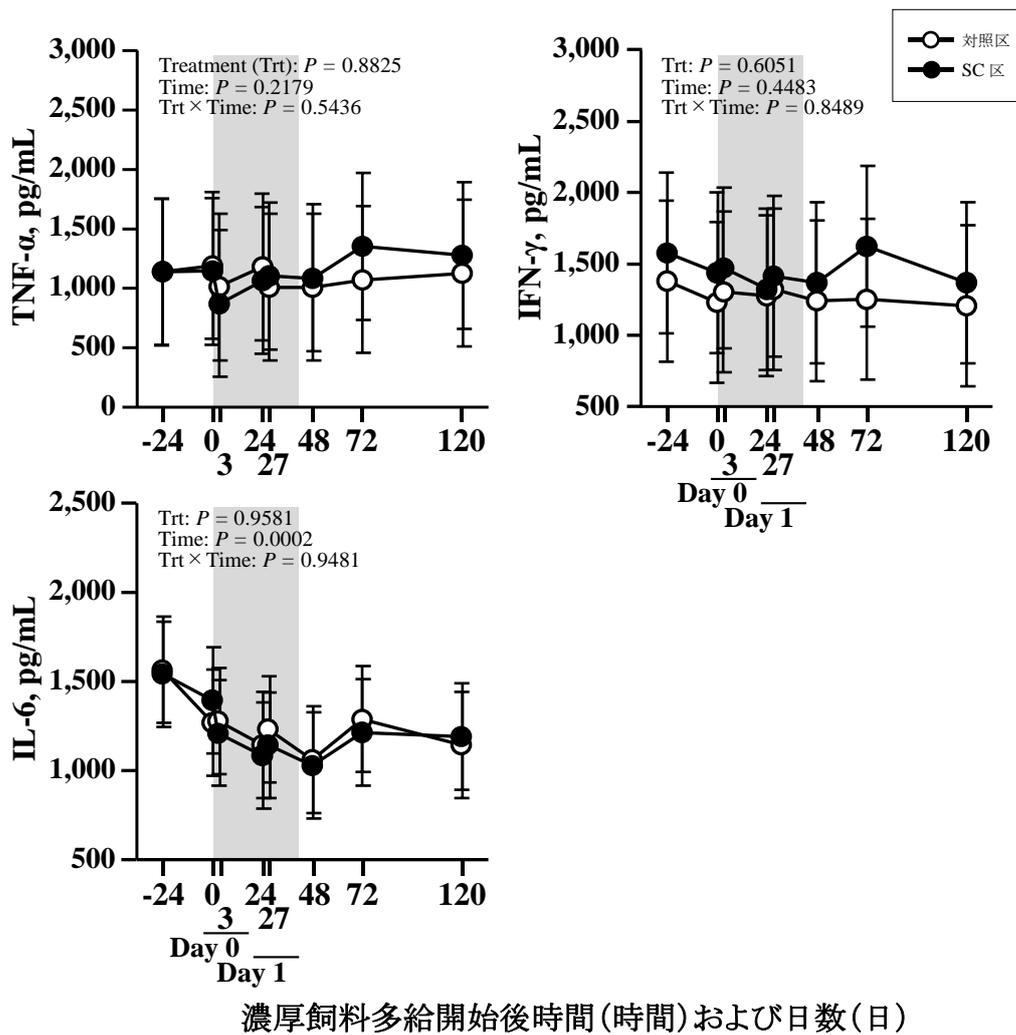


図 3.1.8 血漿サイトカイン濃度

各区 n = 4、最小二乗平均 ± 標準誤差

○は対照区、●は SC 区

灰色の背景は濃厚飼料多給日

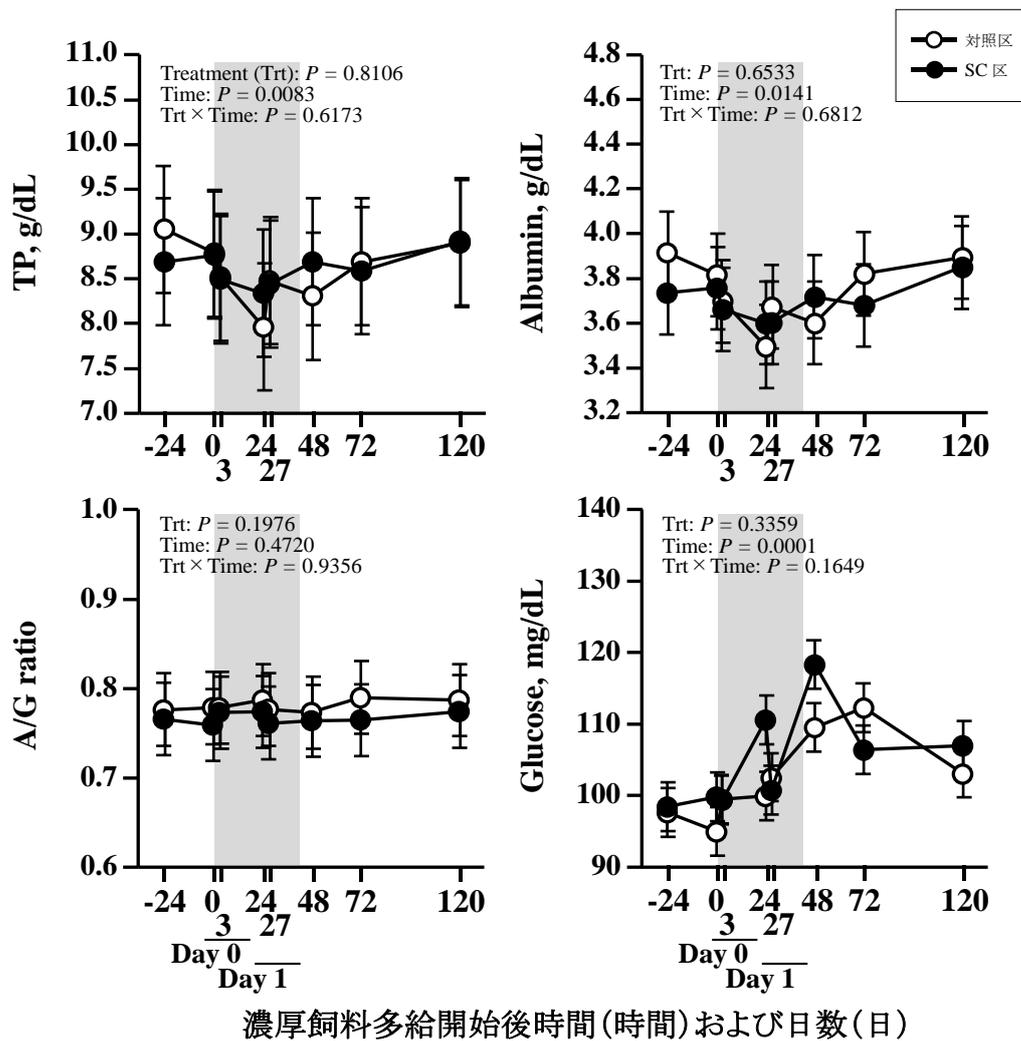
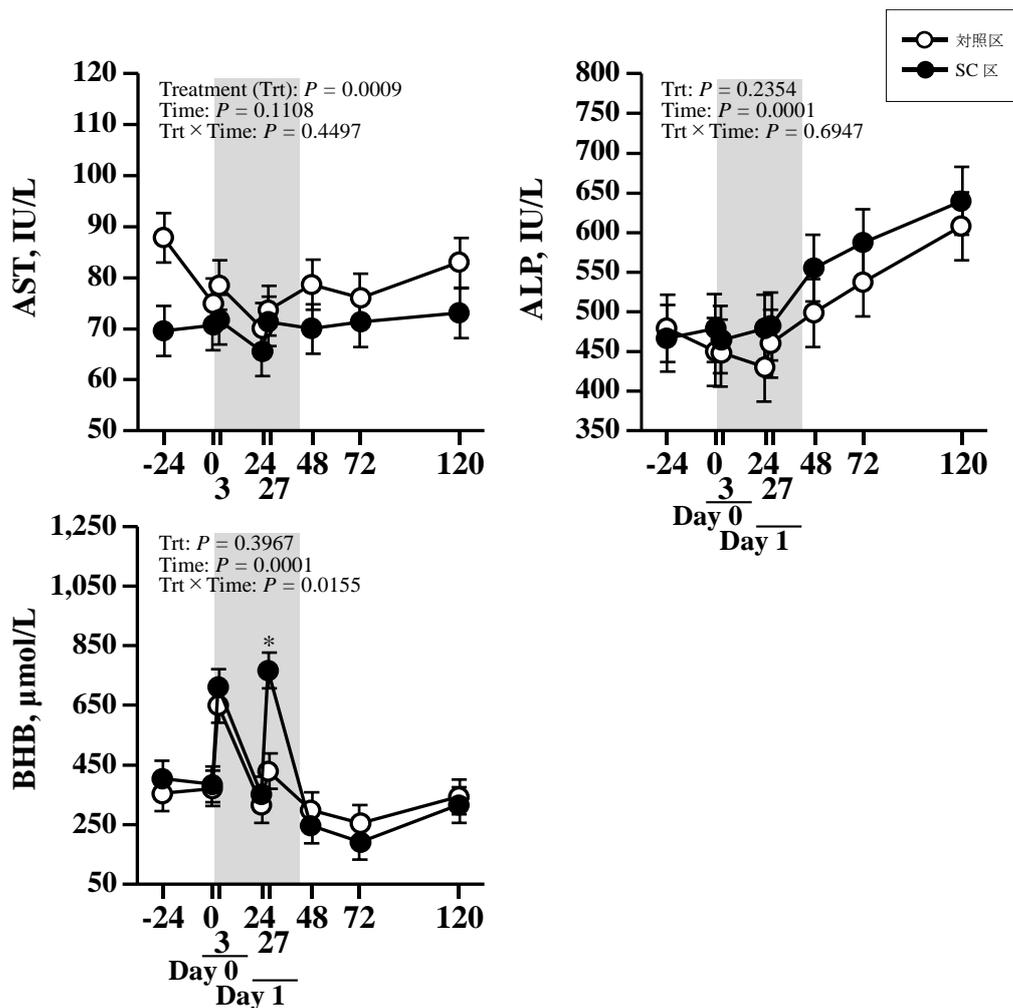


図 3.1.9 血漿代謝成分濃度

各区 $n = 4$ 、最小二乗平均 \pm 標準誤差

○は対照区、●は SC 区

灰色の背景は濃厚飼料多給日



濃厚飼料多給開始後時間(時間)および日数(日)

図 3.1.10 血漿代謝成分濃度

各区 $n = 4$ 、最小二乗平均 \pm 標準誤差

○は対照区、●は SC 区

* $P < 0.05$ (同時間における区間)

灰色の背景は濃厚飼料多給日

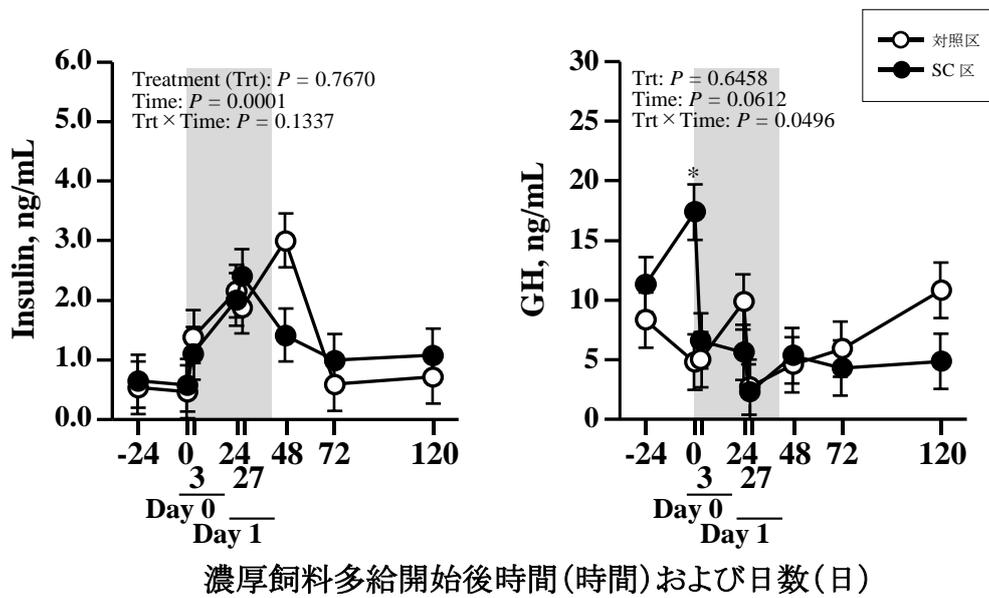


図 3.1.11 血漿ホルモン濃度

各区 n = 4、最小二乗平均±標準誤差

○は対照区、●は SC 区

* $P < 0.05$ (同時間における区間)

灰色の背景は濃厚飼料多給日

第3章 活性酵母の給与が第一胃液 pH と発酵、血漿代謝・内分泌成分、および 発育性に及ぼす影響

2節 活性酵母の給与が離乳前後7週間の発育、血漿代謝・内分泌成分、および 第一胃発酵に及ぼす効果の検証

3.2.1 緒言

本章1節において、子牛へのSC給与は、濃厚飼料を多給することにより実験的に誘発されたSARAを軽減させる効果が認められなかった。一方、SCの給与は濃厚飼料多給時の第一胃発酵を亢進し、飼料中のエネルギー利用効率を高めた。つまり、離乳移行期から反芻期の移行期におけるSCの利用は、第一胃の発酵機能を向上させ、発育を高める可能性がある。

これまで、SCは第一胃環境の安定作用 (Chauchayras-Durand *et al.*, 2008) を目的として離乳や濃厚飼料の多給などにより消化管微生物叢に影響が及ぶ時期に利用されてきた (Chauchayras-Durand *et al.*, 2008)。既往の知見においても、哺育期から育成期にかけてのSCの給与は、スターター摂取量 (Galvão *et al.*, 2005)、飼料利用効率 (Panda *et al.*, 1995; Galvão *et al.*, 2005)、およびDG (Panda *et al.*, 1995; Lesmeister *et al.*, 2004) を向上させることが報告されている。しかし、プロバイオティクスの性質上、SCの給与効果は飼料の乾物量や組成 (McAllister *et al.*, 2011; Alugongo *et al.*, 2017a)、子牛の健康状態 (Alugongo *et al.*, 2017a) など複数の要因により影響を受ける。そのため、SCを給与した子牛の第一胃発酵 (Kumar *et al.*, 1997; Hučko *et al.*, 2009; Mutsvangwa *et al.*, 1992) や代謝・内

分泌反応 (Quigley *et al.*, 1992a; Lesmeister *et al.*, 2004 ; Galvão *et al.*, 2005; Alugongo *et al.*, 2017b) への影響についても多様な結果が報告されている。つまり、SC による子牛の代謝・内分泌反応の変化と、発育および第一胃発酵への影響との関連が明確になっていない。

そこで本章 2 節では、離乳移行期から反芻期への移行期にかけた SC の給与が、発育、代謝・内分泌反応、および第一胃発酵に及ぼす効果を検証することを目的とした。

3.2.2 材料と方法

動物の飼養および試験は、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の動物実験等実施規定に従って実施した。

1. 供試動物および飼養管理

ホルスタイン種の子牛 24 頭（雌 12 頭および雄 12 頭）を用いた。子牛には生後 6 時間以内に体重の 10%量の初乳を給与した。試験期間は 3 週齢から 10 週齢までの 7 週間とし、個別ペンで飼養した。供試牛は、試験開始時に対照区または SC 区（各区、雌 6 頭および雄 6 頭）へ無作為に配置した。SC 区には、4g/日（ 2.0×10^9 cfu/日）の SC（Levucell® SC; *Saccharomyces cerevisiae* I-1077 株、Lallemand、Toulouse、France）を 1 日 1 回給与した。SC の添加は、離乳前は全乳、離乳後はスターターへ行き、朝の給与飼料に混合した。

飼料の給与は 9:00 と 16:00 の 1 日 2 回とした。全乳は給与上限を 8L/日として 1 日あたり体重の 11%量（朝 5%、夕 6%）を給与した。6 週齢で哺乳量を減らし、7 週齢で離乳した。スターター（TDN 84%、CP 21 %、ニューメイクスター；全国酪農飼料株式会社、東京、日本）およびカットチモシー（CP 8.1%、NDF 63.5%）の給与は 1 週齢から開始し、週齢に合わせて増量した。試験期間の飼料給与量を表 3.2.1 に示した。供試子牛の飼料摂取量は毎日個別に記録した。体重は週に 1 回、13:00 に計測した（表 3.2.2）。

2. 血液と第一胃液の採取

採材は表 3.2.2 の通りに行った。すなわち、血液を 3、4、6、7、8、および 10 週齢時における 9:00 の飼料給与前に頸静脈から採取した。第一胃液は 10 週齢の 11:00 に、ルミナー胃汁採取器（富士平工業株式会社、東京、日本）を用いて経口採取した。採取後の胃液および血液の処理方法は第 2 章および本章 1 節と同様である。

3. 血漿および第一胃液サンプルの分析

第一胃液および血漿成分の分析項目と方法は第 2 章と同様である。また、本章 1 節と同様の方法により第一胃液アンモニア態窒素濃度を測定した。加えて本節では血漿 IGF-I 濃度およびグルカゴン濃度の分析を行った。血漿 IGF-I 濃度は時間分解蛍光免疫アッセイ法 (Sugino *et al.*, 2004) により、血漿グルカゴン濃度は市販のキット (Glucagon RIA 「SML」; セルフメディカルラボ株式会社、千葉、日本) を用いたラジオ免疫アッセイ法により測定した。測定内変動係数は、IGF-I が 5.1% およびグルカゴンが 2.1% であった。

4. 統計処理

統計ソフト (SAS University Edition ; SAS Institute, Cary, NC, USA) の GLM procedure を用いて第一胃液の各測定項目における処理効果の判定を行った。使用した一般化線形モデルは以下の通りである。

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + S_j + T \times S_{ij} + e_{ijk}$$

ここで、 μ は全平均、 T_i は処理区の効果、 S_j は性別の効果、 $T \times S_{ij}$ は処理区と性別の交互作用、 e_{ijk} は誤差を示す。

また、MIXED procedure を用いて、DMI、DG、および血液の各測定項目における処理効果の判定を行った。使用した線形混合モデルは以下の通りである。

$$Y_{ijkl} = \mu + T_i + S_j + C(TS)_{ijk} + W_l + T \times S_{ij} + T \times W_{il} + e_{ijkl}$$

ここで、 μ は全平均、 T_i は処理区の効果、 S_j は性別の効果、 $C(TS)_{ijk}$ は処理区 $T_i S_j$ における供試子牛 C_k の効果、 W_l は週齢の効果、 $T \times S_{ij}$ は処理区と性別の交互作用、 $T \times W_{il}$ は処理区と週齢の交互作用、 e_{ijkl} は誤差を示す。なお、処理区における供試子牛の効果は変量模型として取り扱った。また、処理区と週齢の交互作用が有意であった時に、Tukey の検定により各週齢における処理区の差を判定した。

各項目において最小二乗平均および標準誤差を算出した。 $P < 0.05$ を有意差あり、 $P < 0.1$ を有意傾向ありとした。

3.2.3 結果

1. 飼料摂取量と発育成績

試験期間中、両区の子牛は給与飼料を完食し、DMI に区間の差はなかった。

また、健康状態や便性状に異常な変化を認めなかった。

両区の体重および DG を表 3.2.3 に示した。試験終了時の SC 区の体重は対照区よりも有意に高まった。SC 区の DG は、離乳前 ($P < 0.05$)、離乳後 ($P < 0.1$)、および試験期間を通して ($P < 0.05$) 対照区よりも高まった。

2. 血漿中の代謝成分およびホルモン濃度

血漿中の代謝成分の推移を図 3.2.1 に示した。両区のグルコース濃度は週齢とともに緩やかに低下したが ($P < 0.05$)、SC 区の濃度は試験期間を通して対照区よりも高く推移した ($P < 0.05$)。他の代謝成分およびミネラル濃度は試験期間を通して区間の差はなかった (データ示さず)。血漿中のホルモン濃度の推移を図 3.2.2 に示した。SC 区のインスリン濃度は 6 週齢、8 週齢、および 10 週齢時に対照区よりも有意に高まった。SC 区の GH 濃度と IGF- I 濃度は 6 週齢から 8 週齢にかけて増加し、対照区よりも高値を示した (GH 濃度 $P < 0.05$ および IGF- I 濃度 $P < 0.1$)。SC 区のグルカゴン濃度は週齢に伴い増加し対照区よりも高い傾向 ($P < 0.1$) を示した。両区のグレリン濃度は週齢とともに低下し、有意な区間差は認められなかった。両区における他の代謝成分およびミネラル濃度に有意な差はなかった (データ示さず)。

3. 血漿中の APPs 濃度およびサイトカイン濃度

血漿中の APPs 濃度およびサイトカイン濃度を図 3.2.3 に示した。試験期間中、SC 区の LBP 濃度は対照区よりも低く推移し ($P < 0.05$)、4 週齢、7 週齢、および 8 週齢で有意な区間差を認めた ($P < 0.05$)。両区の SAA 濃度は試験開始から離乳時にかけて低下し ($P < 0.05$)、区間の差は認められなかった。また、Hp 濃度に区間の差は認められなかった。IFN- γ 濃度、および他のサイトカイン濃度（データ示さず）に区間の差は認められなかった。

4. 第一胃液成分

10 週齢時における第一胃液性状を表 3.2.4 に示した。両区の総 VFA 量に区間の差は認められなかった。VFA 組成では、SC 区のプロピオン酸割合が対照区より有意に高まり、A:P 比は低い傾向 ($P < 0.1$) を示した。SC 区の第一胃液アンモニア態窒素濃度は対照区に比べて高い値を示した ($P < 0.05$)。第一胃液 LPS 活性に有意な区間差はなかった。

3.2.4 考察

SC 区の DG は試験期間を通して対照区よりも高まった。SC 給与による子牛の発育向上は過去にも報告されている (Panda *et al.*, 1995; Lesmeister *et al.*, 2004)。これら報告の中では、SC 給与により飼料摂取量ならびに飼料効率 (Lesmeister *et al.*, 2004)、または飼料中 CP 消化率 (Panda *et al.*, 1995) が向上し、DG 増加につながった可能性を指摘している。本試験では、DMI に区間の差がなかったことから飼料効率が向上したと考えられる。実際に、本章 1 節および育成期に SC を給与した報告 (Mutsvangwa *et al.*, 1992; Watanabe *et al.*, 2019) では VFA 濃度が増加して第一胃発酵の亢進が認められている。また、SC 区の第一胃液アンモニア態窒素濃度は対照区と比較して高値 ($P < 0.05$) を示した。本試験の胃液採材は給与飼料の発酵が進んだ採食後 2 時間に行っている。過去の知見 (Panda *et al.*, 1995) を踏まえると、SC 区では飼料中 CP 消化率が向上し、対照区よりも高いアンモニア態窒素濃度を示したと考えられた。試験期間中の両区の血漿中 BUN 濃度に差は認められなかったことから (データ示さず)、SC 区では、対照区よりも効率よく飼料中 CP が分解かつ利用されたと考えられた。

さらに、SC 区の DG は対照区と比較して離乳前にも増加が認められている。SC の添加給与は子豚の盲腸の細菌叢を変化させ、DG を増加させることが報告されている (Kiros *et al.*, 2019)。本試験においても、離乳前の SC 給与が同様に腸管に作用した可能性は否定できない。離乳前は SC を全乳に添加しており第一

胃液の採材も行っていないため、両区の離乳前における第一胃液 VFA 濃度およびアンモニア態窒素濃度については不明である。

SC 区では、血漿中グルコース濃度と、成長や栄養代謝に関連するホルモン濃度が対照区より高値を示した。一般に、子牛の血中 GH ならびに IGF- I 濃度は、飼料中のエネルギーおよび CP 摂取量に影響される (Elsasser *et al.*, 1989; Smith *et al.*, 2002)。本試験におけるホルモン濃度の変化も、既往の知見同様、SC の給与により飼料中エネルギーおよび CP の利用効率が向上した結果と考えられた。GH および IGF- I は子牛の成長を調整する主要な内分泌因子である (Frieten *et al.*, 2018)。SC 給与による DG 増加は、血漿中 GH および IGF- I 濃度の増加も影響したものと考えられる。また、哺乳子牛では栄養摂取の増加に伴い DG と血漿中グルコース、インスリン、および IGF- I 濃度に増加が認められており (Smith *et al.*, 2002)、離乳前の SC 区においても同様の結果を示した。

SC 区では、離乳後に血漿中グルコース濃度の増加に加えて第一胃液プロピオン酸割合の増加が認められており、第一胃壁からの VFA 吸収が増加 (Nakamura *et al.*, 2018)、および糖新生が亢進した (Zhang *et al.*, 2016) と推察される。既往の知見では、SC の長期給与は、第一胃内の繊維消化率を向上させ、酢酸割合を増加させる (Kumar *et al.*, 1997; Hučko *et al.*, 2009)。しかし *in vitro* の試験では第一胃液 VFA 組成は SC を添加する飼料内容の影響を受け (Lila *et al.*, 2004)、本試験と同様にプロピオン酸割合が増加する知見もある (Lila *et al.*, 2004)。離乳後には、血漿中のグルコース濃度の増加に呼応して、SC 区の血漿インスリン

濃度とグルカゴン濃度も対照区と比較して高値を示した。子牛を用いた報告では、プロピオン酸の静脈内投与により血漿グルコース、インスリン、およびグルカゴン濃度の増加が認められており (Sano *et al.*, 1999)、離乳後の SC 区で認められた血漿グルコース濃度およびホルモン濃度の増加も同様の機序と推察された。また、インスリンは体組織の成長を促すだけでなく、直接もしくは間接的に血中 IGF- I 濃度を増加させる (McGuire *et al.*, 1995)。

SCの細胞壁に含まれる β グルカンやマンナンオリゴ糖などの多糖類は免疫調整作用を持つ (Alugongo *et al.*, 2017a)。SC を含むプロバイオティクスの免疫応答に関する報告は特定の病原因子の投与を伴うものが多く、健康な宿主への影響はほとんど検討されていない (McAllister *et al.*, 2011)。本試験において、IFN- γ を含むサイトカインの濃度、および LBP 以外の急性期蛋白質濃度に SC 給与の影響は認められなかった。SC 区の血漿中 LBP 濃度は、試験期間中、対照区よりも低値で推移した。離乳前後の試験では SC の給与による腸管細菌叢の変化が報告されている (Fomenky *et al.*, 2018; Xiao *et al.*, 2019)。また、健康な成牛の糞中 *Enterobacteriaceae* 数と血中 LBP 濃度には正の相関が認められる (Schroedl *et al.*, 2014)。本試験でも過去の知見と同様に、SC の給与が腸管内細菌叢、ひいては血漿中 LBP 濃度に影響したのかも知れないが、詳細は不明である。

結論として、離乳前後 7 週間における SC の給与は飼料のエネルギーおよび CP 利用効率を向上させ、血漿中 GH および IGF- I 濃度を高めることが明らかとなった。離乳移行期から反芻期の移行期にかけての SC の給与と内分泌反応に関

するデータは今回我々が初めて示した知見である。これら代謝・内分泌反応の変化は、DGの向上と密接に関連していると考えられた。

3.2.5 図表

表3.2.1 飼料の給与量

	週齢							
	3	4	5	6	7	8	9	10
全乳, L/日	体重の11%量(朝5%、夕6%) を給与 (ただし、日量8Lを上限とした)							
ペレットスターター, kg/日	0.6	0.8	1	1.2	1.6	2	2	2
カットチモシー, kg/日	0.3	0.3	0.3	0.4	0.6	0.6	0.8	0.8

数値は現物給与量

ペレットスターター(ニューメイクスター;全国酪農飼料株式会社、東京)、TDN 84.2% CP 21.8%

カットチモシー、CP 8.1% NDF 63.5%

表3.2.2 採材スケジュール

項目	採材時間	採材週齢							
		3	4	5	6	7	8	9	10
飼料摂取量	翌朝の 飼料給与前	← 毎日 →							
個別体重	13:00	○	○	○	○	○	○	○	○
血液	8:30	○	○		○	○	○		○
胃液	11:00								○

表3.2.3 体重およびDG

項目	処理		SEM	P-value
	対照区	SC区		
体重, kg				
開始時	56.71	58.18	1.32	0.441
終了時	92.85	103.46	2.30	0.004
DG, kg				
全期間	0.74	0.93	0.04	0.002
離乳前	0.72	0.95	0.05	0.003
離乳後	0.76	0.91	0.05	0.056

各区n = 12

全期間 21-70日齢、離乳前 21-48日齢、離乳後 49-70日齢

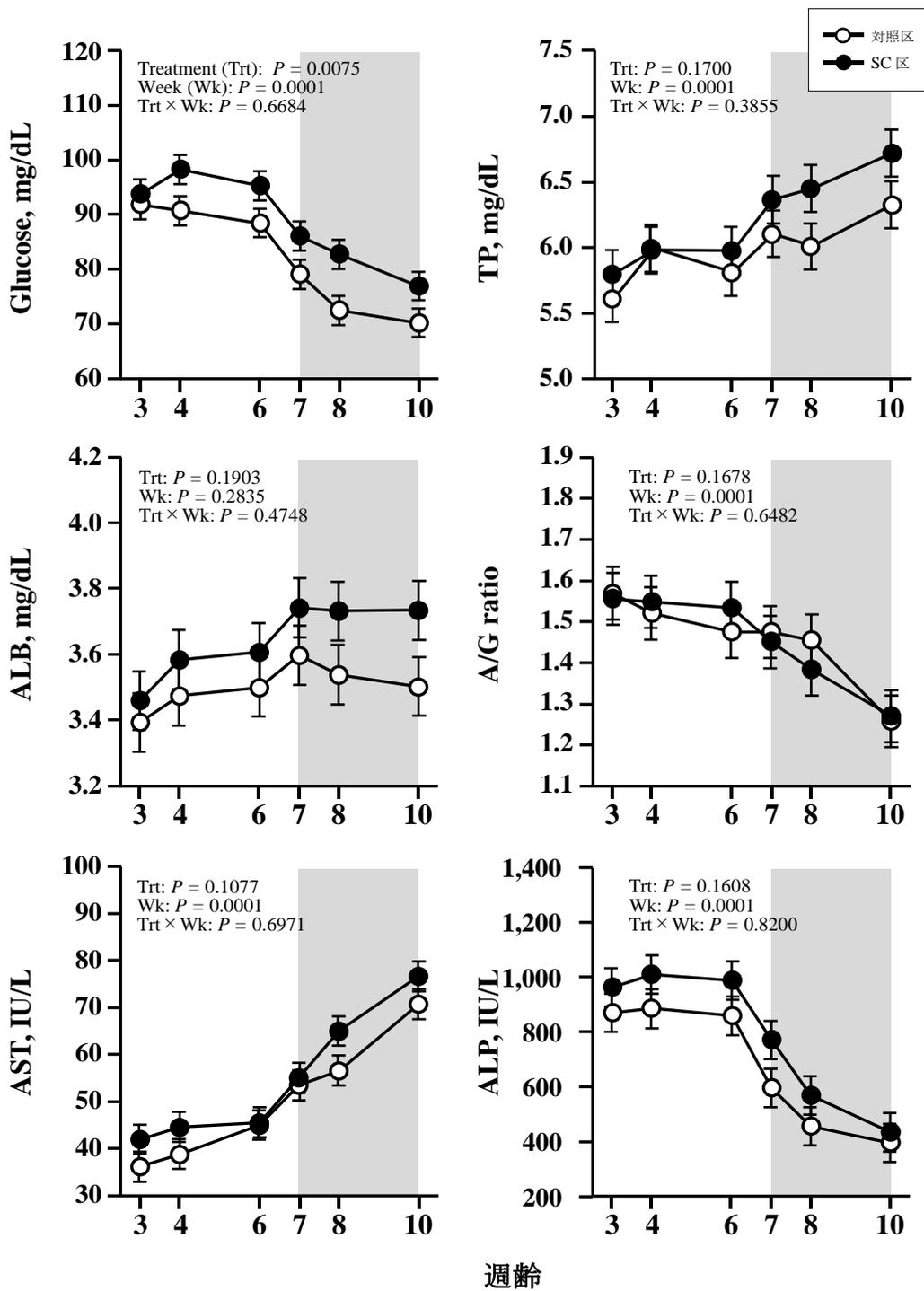


図 3.2.1 血漿代謝成分濃度

各区 n = 12、最小二乗平均 ± 標準誤差

○は対照区、●は SC 区

* $P < 0.05$ および † $P < 0.1$ (各週の区間)

灰色の網掛けは離乳後の期間

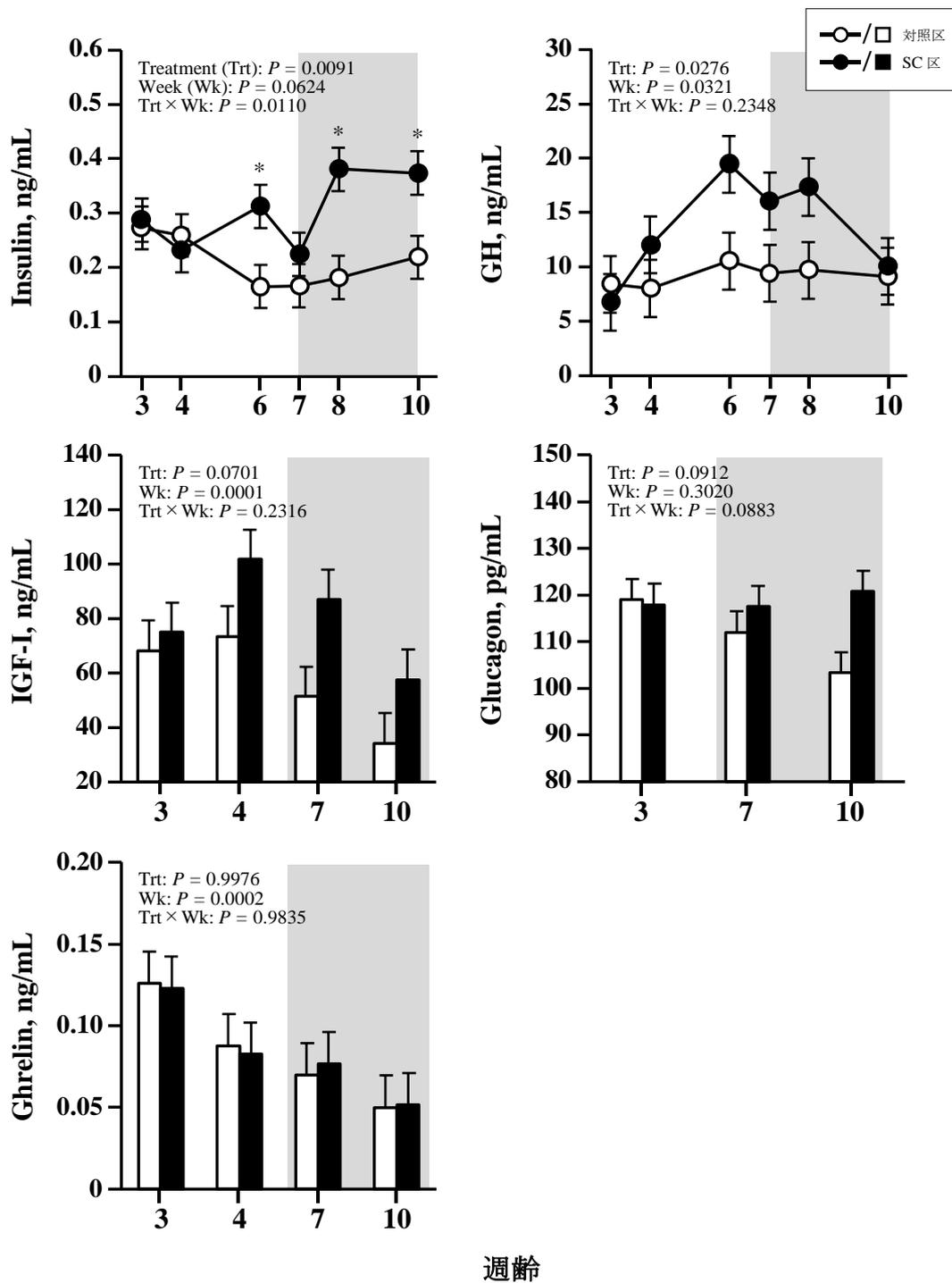


図 3.2.2 血漿ホルモン濃度

各区 n = 12、最小二乗平均 ± 標準誤差

○/□は対照区、●/■は SC 区

* $P < 0.05$ および † $P < 0.1$ (各週の区間)

灰色の網掛けは離乳後の期間

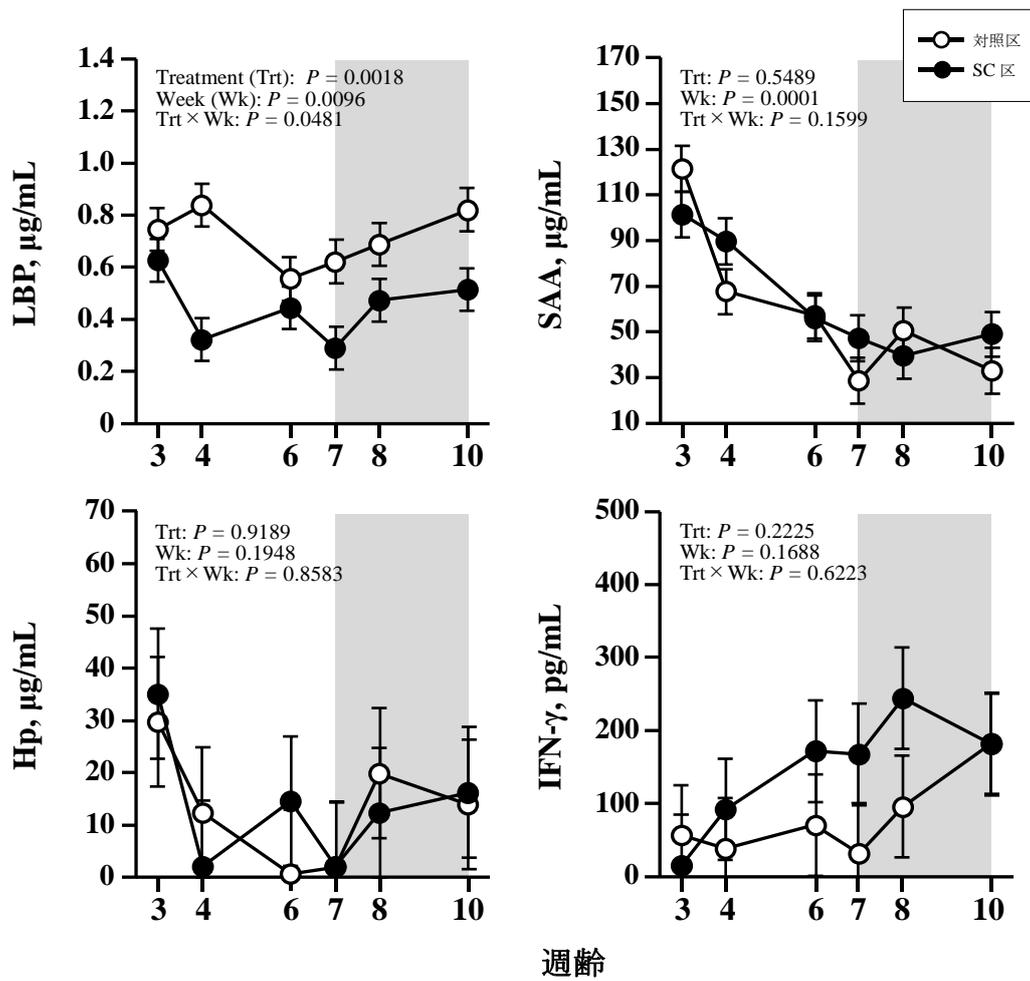


図 3.2.3 血漿 APPs およびサイトカイン濃度
 各区 n = 12、最小二乗平均 ± 標準誤差
 ○は対照区、●は SC 区
 * $P < 0.05$ および † $P < 0.1$ (各週の区間)
 灰色の網掛けは離乳後の期間

表3.2.4 第一胃液成分

項目	処理		SEM	P-value
	対照区	SC区		
総VFA濃度, mmol/dL	9.58	9.89	0.87	0.789
VFA組成, mol/100moL				
酢酸	65.52	60.12	2.28	0.101
プロピオン酸	21.50	25.79	1.40	0.038
酪酸	10.92	11.47	0.97	0.674
吉草酸	2.07	2.61	0.27	0.164
A:P 比	3.16	2.43	0.26	0.054
アンモニア態窒素濃度, mg/dL	8.70	13.27	1.09	0.010
LPS濃度, EU/mL	103,837	74,202	20,805	0.326

各区n = 12

第4章 抗大腸菌 IgY の給与が第一胃液 LPS 濃度と発酵、血漿代謝・内分泌成分、および発育性に及ぼす影響

1 節 抗大腸菌 IgY の給与が濃厚飼料多給時の第一胃液 LPS 濃度および関連成分へ及ぼす影響

4.1.1 緒言

成牛では、SARA に関連する病態を引き起こす要因の一つとして、第一胃液の LPS 濃度の上昇と血中移行が推察されている (Gozho *et al.*, 2005)。すなわち、第一胃液 pH の低下によるグラム陰性菌の死滅、第一胃液 LPS 濃度の上昇、胃液 LPS の血中移行、および移行した LPS が惹起する炎症カスケード反応の一連の流れである。しかし、SARA は必ずしも第一胃液 LPS 濃度および炎症を示す血中 APPs 濃度の上昇を伴わない (Khafipour *et al.*, 2009b)。第2章では、離乳移行期から反芻期の移行期にかけて子牛に粗飼料を給与せずに飼養すると、第一胃液 pH が低下して成牛の SARA 基準に達し、第一胃液 LPS 濃度が対照よりも増加することを明らかにした。粗飼料を給与しない子牛では血漿 APPs 濃度の増加は認められず、一方で血漿 AST、ALP、および LDH 濃度が上昇して肝細胞の傷害が示唆された。第3章では、SC を用いて第一胃液 pH 低下の軽減効果を検討した。SC を給与した子牛に実験的に SARA を誘発したところ、第一胃液 pH の低下および第一胃液 LPS 濃度の増加が認められたが、血漿 APPs 濃度と肝細胞逸脱酵素濃度は増加しなかった。以上の結果を受け、本章では、病態との関連が推察される第一胃液 LPS を中和することによる炎症カスケード反応の制

御効果について検討した。

鳥の IgG、つまり IgY は、血清よりも卵黄で高濃度となることが知られている (Larsson *et al.*, 1993)。卵黄を使った IgG の産生は鳥の血液を必要とせず、精製も比較的簡単であるため、効率的かつ経済的にポリクローナル抗体を作製できる手法である (Akita and Nakai, 1992)。ホルマリン処理した大腸菌で鶏を免疫することにより得た IgY は、*in vitro* において LPS と特異的に結合することが明らかになっている (Shimizu *et al.*, 1988)。しかし、第一胃液の LPS 中和を目的として抗大腸菌 IgY を牛へ給与し、関連成分と併せて検討した報告はない。そこで本章 1 節では、以下 2 つを目的とした試験を行った。1 つ目は抗大腸菌 IgY を子牛へ給与して *in vivo* における第一胃液 LPS の中和効果を検証すること、2 つ目は抗大腸菌 IgY を給与した子牛へ濃厚飼料を多給して実験的に SARA を誘発し、第一胃 LPS 濃度、発酵、および関連成分への影響を明らかにすることである。

4.1.2 材料と方法

1. 抗大腸菌 IgY の作製、LPS との抗原抗体結合試験、および給与量の決定

本試験に用いた抗大腸菌 IgY は、Zúñiga ら (1997) の方法に準じ、株式会社イーダブルニュートリション・ジャパン (岐阜) にて作製した。抗大腸菌 IgY の作製手順の概要は図 4.1.1 および以下の通りである。なお、本節の試験でプラセボは使用しなかった。1×10⁹cfu/mL の不活化大腸菌 O139 全菌体を含む抗原液を採卵鶏の大胸筋に投与して免疫を賦与した。8 週間後、同様の手順で追加の免疫賦与を行った。追加免疫から 2 週間後、卵の回収を開始した。回収した卵は処理まで 4°C で保存した。得た全卵は、濾過後にスプレー乾燥し、抗大腸菌 IgY を含む全卵粉末とした。

次に、ELISA 法を用いて作製した抗大腸菌 IgY と大腸菌 O111 B4 の精製 LPS (シグマアルドリッチジャパン合同会社、東京) との抗原抗体結合試験 (Zúñiga *et al.*, 1997) を行い、作製した IgY で中和可能な LPS 量を算出した。図 4.1.2 に概要を示した。試験に使用した抗体は抗大腸菌 O111 B4 LPS ウサギ IgG、抗大腸菌 O111 B4 LPS モルモット IgG、および HRP 結合抗モルモット IgG ウサギ IgG (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, USA) である。その結果、1g の抗大腸菌 IgY は 0.25g の精製 LPS に結合した。第一胃液 LPS 濃度を 5 μg/mL (Motoi *et al.*, 1993)、第一胃容積を 100L と仮定し、本試験の抗大腸菌 IgY の給与量を 2g/頭・日と決定した。

2. 供試牛および処理区

本試験計画は国立大学法人岩手大学動物実験委員会に承認され(A201453-1)、動物の飼養および試験は動物実験等管理規則に従って実施した。

第一胃にフイステルを装着したホルスタイン種雄の子牛 10 頭 (164±14kg、生後 5-6 か月齢；平均±標準誤差) を供試した。供試牛を対照区および IgY 区に区分し、14 日間の試験期間の後に、区を入れ替えて再度同じ試験を行った。IgY 区には試験期間を通して 2g の抗大腸菌 IgY (図 4.1.3) を、第一胃フイステルから 1 日 1 回、8 時に投入した。対照区には IgY を添加給与しなかった。14 日間の試験期間 (Day -11 から Day 2) のうち、最初の 11 日間 (Day -11 から Day -1) は、両区とも粗飼料 (オーチャードとチモシー乾草) のみの給与とした。その後 2 日間 (Day 0 および Day 1) は、粗飼料の給与を止め、濃厚飼料と大豆粕を半量ずつ給与した。最後 1 日間 (Day 2) は再び粗飼料のみを給与した。試験飼料の組成および成分は表 4.1.1 の通りである。飼料は 1 日量を等分して、8 時と 16 時 30 分に給与し、飼料摂取量は毎日個別に記録した。なお、試験期間中に供試牛への抗生物質の投与は行っていない。

3. 第一胃液と血液の採取

Day -1、Day 0、および Day 1 の 3 日間は 1 日 2 回、朝 8 時の飼料給与前および給与後 6 時間に第一胃フイステルより第一胃液を、頸静脈より血液を採取した。Day 2 は 1 日 1 回、朝の飼料給与前に採材した。採取後の胃液および血液の

処理方法は第 2 章および第 3 章 1 節と同様である。

3. 第一胃液および血漿成分の分析

第一胃液および血漿成分の分析項目と方法は第 3 章 1 節と同様である。なお本節では、第一胃液乳酸濃度を分析項目から除外した。

4. 第一胃液 pH の測定と解析

供試牛の第一胃液 pH は第 2 章および第 3 章と同様に 10 分間隔で連続測定した。得られた pH データを用いて、Day -1 から Day 2 まで各日毎に 1 時間平均、日平均、最小、最大値、pH5.6 未満の時間数、および pH5.6 未満の AUC を算出した。

5. 統計処理

統計ソフト (SAS University Edition; SAS Institute, Cary, NC, USA) の MIXED procedure を用いて、第一胃液 pH、胃液成分および血液の各測定項目における処理効果の判定を行った。使用した線形混合モデルは第 3 章 1 節と同様である。結果は最小二乗平均および標準誤差で示し、 $P < 0.05$ を有意差あり、 $P < 0.1$ を有意傾向ありとした。

4.1.3 結果

試験期間中、両区の供試子牛は給与飼料をすべて摂取し、DMI および試験開始から終了までの DG に区間の差はなかった（データ示さず）。

1. 第一胃液 pH、VFA 組成、および LPS 濃度

Day -1 から Day 2 における第一胃液 pH の 1 時間平均値による日内変動を図 4.1.4 に示した。Day -1 までの第一胃液 pH は粗飼料のみであり、両区ともに採食に伴う変動は小さく、pH6.5 前後を推移した。両区の第一胃液 pH はともに、濃厚飼料を多給した Day 0 から Day 1 にかけて大きく低下し、粗飼料のみの給与に戻した Day 2 で徐々に上昇して回復した。IgY 区は濃厚飼料のみの給与を開始した Day 0 で対照区よりも第一胃液 pH の低下が軽減される傾向にあった ($P < 0.1$)。Day 1 には第一胃液 pH の区間差は消失した。しかし、Day 2 には再び IgY 区の第一胃液 pH が対照区よりも高く推移する傾向を示した ($P < 0.1$)。Day -1 から Day 2 における第一胃液 pH の日平均、日最小、および日最大値を表 4.1.2 に、pH5.6 未満の時間数および AUC を図 4.1.5 に示した。1 時間平均値同様、濃厚飼料の多給により日平均、日最小および日最大値全てで両区ともに値が低下した ($P < 0.05$)。また、pH5.6 未満の時間数は両区ともに Day 0 および Day 1 で 180 分を超えた。区間で比較すると、IgY 区の日平均値および日最小値は対照区よりも高い傾向 ($P < 0.1$)、ならびに pH5.6 未満の AUC は対照区よりも小さい傾向にあった ($P < 0.1$)。

対照区の第一胃液 LPS 濃度は、Day 0 および Day 1 と比較して Day 2 に大きく増加した ($P < 0.05$)。一方で、IgY 区ではその増加が認められず、Day 2 においても濃厚飼料多給前の値と同じレベルを維持した (図 4.1.6)。そのため、Day 2 に有意な区間差が認められた。

第一胃液中の総 VFA 量、VFA 組成、アンモニア態窒素濃度を図 4.1.7 および図 4.1.8 に示した。両区の総 VFA 量、プロピオン酸割合、酪酸割合、吉草酸割合、および乳酸濃度は濃厚飼料の多給に伴い Day 0 から Day 1 の飼料給与後 6 時間にかけて増加した ($P < 0.05$; 乳酸濃度はデータ示さず)。逆に、酢酸割合および A:P 比は Day 0 から Day 1 にかけて低下した ($P < 0.05$)。採食後における両区の第一胃液アンモニア態窒素濃度は、Day 0 で低下した一方、Day 1 に増加し一定の傾向をとらなかった。

2. 血漿 APPs 濃度およびサイトカイン濃度

血漿 APPs 濃度の推移を図 4.1.9 に、サイトカイン濃度の推移を図 4.1.10 に示した。血漿 Hp 濃度は両区ともそれぞれの第一胃液 LPS 濃度と同じ動きを示した。すなわち、対照区では Day 2 のみ高値を示し、IgY 区ではその増加が認められなかった。その結果、Day 2 の血漿 Hp 濃度に有意な区間差が認められた。IgY 区の血漿 TNF- α 濃度は、Day -1 および Day 0 の採食後に対照区と比較して有意に低下したが、Day 1 の採食後に区間差は認められなかった。他の APPs 濃度およびサイトカイン濃度に濃厚飼料多給の影響および区間の差はなかった。

3. 血漿代謝成分およびホルモン濃度

血漿代謝成分の推移を図 4.1.11 に示した。両区の血漿グルコース濃度は Day 0 から Day 2 にかけて増加し ($P < 0.05$)、Day 2 に対照区が IgY 区よりも有意に高まった。IgY 区の血漿 AST 濃度は対照区よりも低く推移し、Day 0 の採食前、Day 1 の採食後、および Day 2 で有意な区間差を認めた。他の代謝成分およびミネラルの濃度は基準範囲内で推移し、区間の差はなかった (図以外の血漿代謝成分はデータ示さず)。

両区の血漿インスリン濃度は、グルコース濃度と同様に Day 0 から Day 2 にかけて増加した (図 4.1.12; $P < 0.05$)。血漿 GH 濃度に濃厚飼料多給の影響および区間の差は認められなかった。

4.1.4 考察

本節では、SARA の影響を軽減させる飼養技術として、抗大腸菌 IgY の給与による第一胃液 LPS の中和効果、ならびに炎症カスケード反応への影響を検討した。濃厚飼料の多給により、両区の第一胃液 pH の 1 時間平均値および 24 時間平均値は有意に低下した。両区の第一胃液 pH5.6 未満の時間数および pH5.6 未満の AUC は有意に増加し、Day 0 および Day 1 とも SARA が誘発された。IgY 区における第一胃液 pH の 1 時間平均値は Day 0 と Day 2 に対照区よりも高く推移する傾向にあった。*Streptococcus bovis*、*Fusobacterium necrophorum* および大腸菌を含む複数の菌に対する IgY を給与した乾乳牛に濃厚飼料を多給または飼料の急変を行った試験では、第一胃液総 VFA 量、乳酸濃度、および組成に影響なく、IgY 給与牛の第一胃液 pH が対照よりも上昇し、本試験と同様の結果を示した (Marino *et al.*, 2011; Barros *et al.*, 2019)。これら報告の中では、IgY 給与牛における第一胃液 pH 上昇と NDF 消化率の向上との関連が推察されたものの、実際の機序は不明としている。また、本試験で使用した抗大腸菌 IgY は *in vitro* において他のグラム陰性腸内細菌と交差反応を示さないことを確認している (データ示さず)。つまり、本試験で給与した抗大腸菌 IgY は第一胃内で遊離した LPS のみと結合し、第一胃微生物叢には影響を及ぼさないと考えられる。しかし、*Streptococcus bovis* と *Fusobacterium necrophorum* に対する IgY を去勢牛に給与した報告でも、特異 IgY が第一胃における標的以外のグラム陰性菌に影響を与えた可能性が考察されており (DiLorenzo *et al.*, 2006)、抗大腸菌 IgY

が第一胃液中の微生物叢や消化率に及ぼす影響についてはさらなる検討が必要である。

本試験において、IgY 区の第一胃液 LPS 濃度は対照区で認められた Day 2 における増加を抑制し、抗大腸菌 IgY の LPS 中和作用が *in vivo* でも示された。抗大腸菌 IgY は濃厚飼料多給時の総 VFA 量および VFA 組成に影響を及ぼさなかった。濃厚飼料の多給により、両区とも総 VFA 量、プロピオン酸割合、酪酸割合、および乳酸濃度が増加、そして酢酸割合が低下したが、これらの変化は乳用種で実験的に誘発された SARA の既往の知見と一致する (AlZahal *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2018)。したがって、抗大腸菌 IgY の給与は、主要な第一胃発酵に影響を及ぼさずに第一胃液 LPS を中和することで、LPS 濃度の上昇を抑制することが明らかとなった。

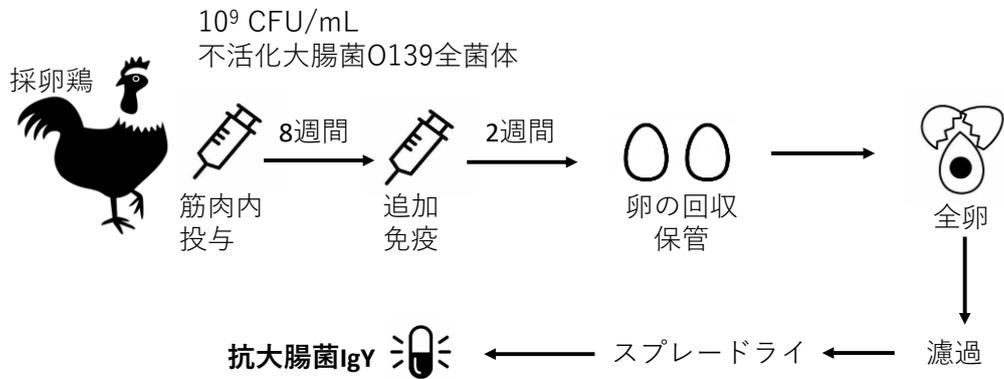
消化管の LPS が全身循環へ移行すると、肝臓のクッパー細胞で TNF- α 、IFN- γ 、および IL-6 などの前炎症性サイトカインが放出される (Eckel and Ametaj, 2016)。前炎症性サイトカインは APPs 分泌を刺激し、LBP、Hp、および SAA など APPs の血中濃度が増加する (Eckel and Ametaj, 2016)。本試験では、Day 2 の血漿中 Hp 濃度において、対照区が増加した一方、IgY 区は増加が抑制された。また、IgY 区の血漿 AST 濃度が試験期間を通して対照区よりも低く推移し、特に Day 1 と Day 2 にかけて区間の差が大きくなった。第 2 章の結果も踏まえると、対照区および IgY 区それぞれの血漿 Hp および AST 濃度の変化は、第一胃液 LPS 濃度の変化に対応したものと推察される。しかし、他の血漿 APPs 濃

度や血漿 ALP 濃度に区間の差は認められなかった。IgY 区の血漿 TNF- α 濃度は、Day -1 および Day 0 の採食後に対照区よりも低値を示した。マウスに LPS を腹腔内投与した前後に抗大腸菌 IgY を同じ手順で投与した試験では、LPS 投与後に IgY 投与マウスの血清 TNF- α 濃度が低下し、下方制御された (Zhen *et al.*, 2011)。本試験の血漿 TNF- α 濃度も LPS の血中移行による影響が推察されるが、第一胃液 LPS 濃度や血漿 Hp 濃度に並行した変化を示しておらず、他の前炎症性サイトカイン濃度に区間の差がないことから、変化を及ぼした機序は不明である。

結論として、抗大腸菌 IgY を給与する IgY 区および対照区に子牛を区分し、濃厚飼料の多給により実験的に SARA を誘発したところ、IgY 区で第一胃液 LPS 濃度の増加が抑制された。したがって、抗大腸菌 IgY による第一胃液 LPS の中和効果が *in vivo* においても示された。また、抗大腸菌 IgY による第一胃液 LPS 濃度の増加抑制は、LPS が血中へ移行することによって生じると推察される血中 APPs 濃度の増加や肝細胞への影響を減じることが明らかとなった。

4.1.5 図表

抗大腸菌IgYの作製



プラセボ（全卵粉末）の作製

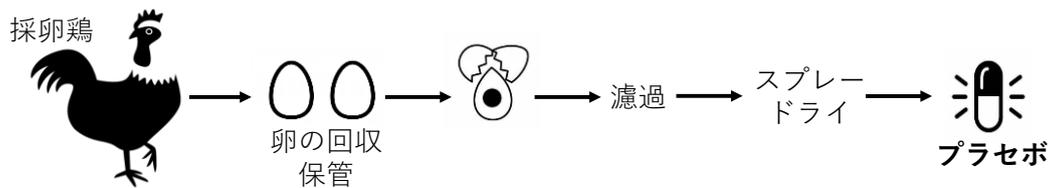
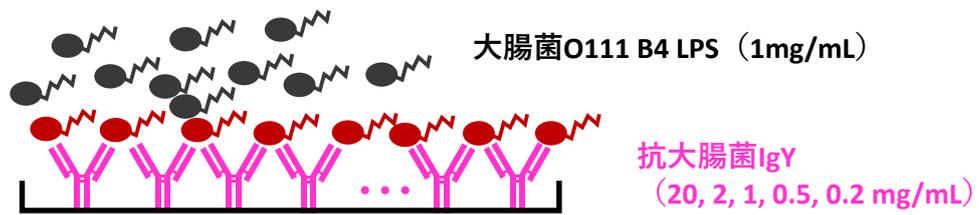


図 4.1.1 抗大腸菌 IgY 作製方法の概要

① 抗大腸菌IgYとLPSの抗原抗体結合



② 残LPSの定量

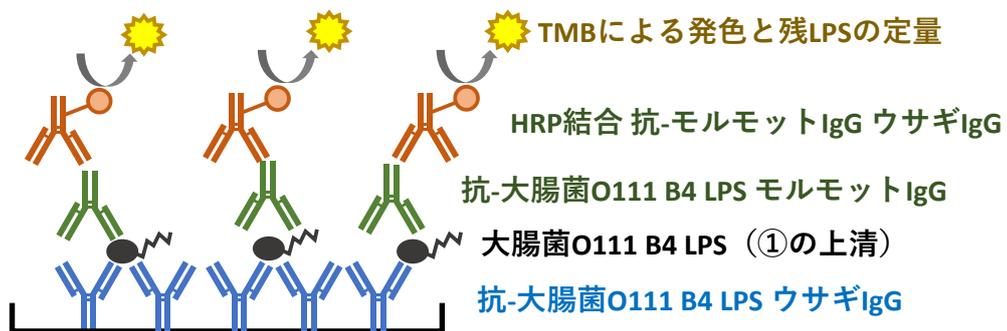


図 4.1.2 抗大腸菌 IgY と LPS の抗原抗体結合試験の概要 (*in vitro*)

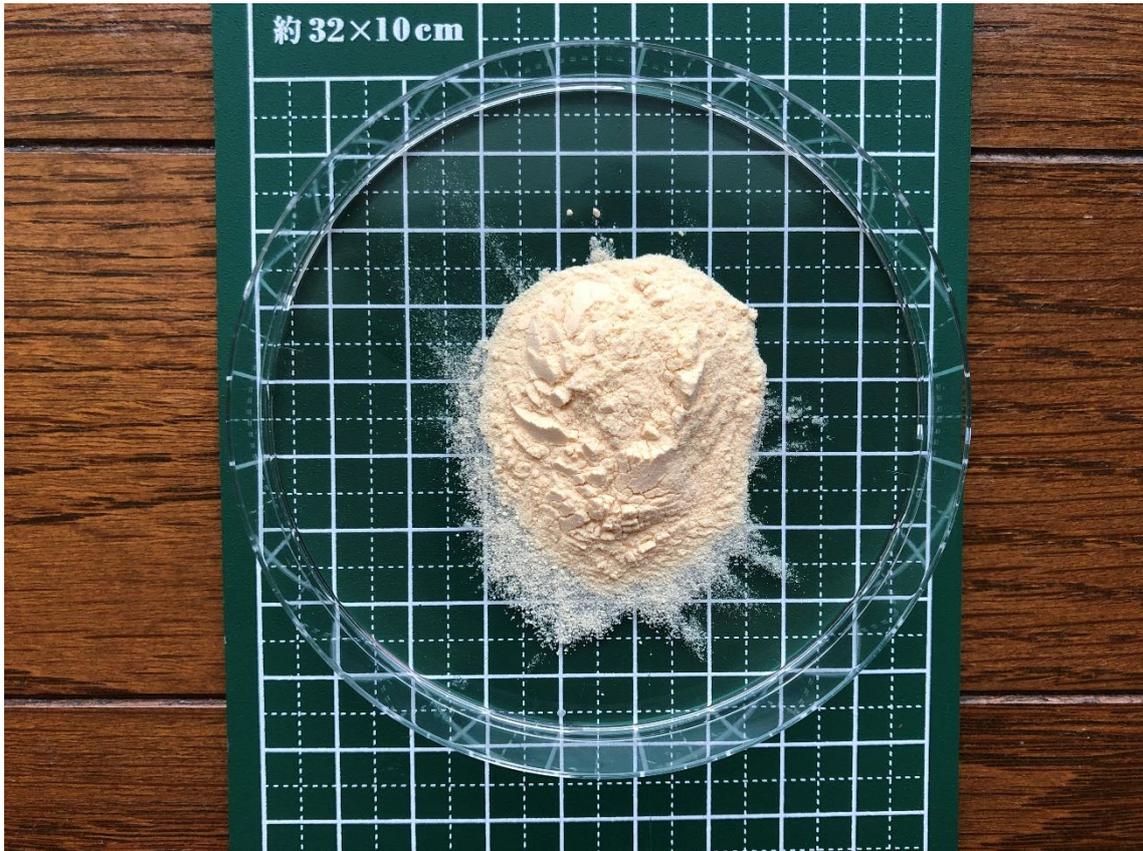
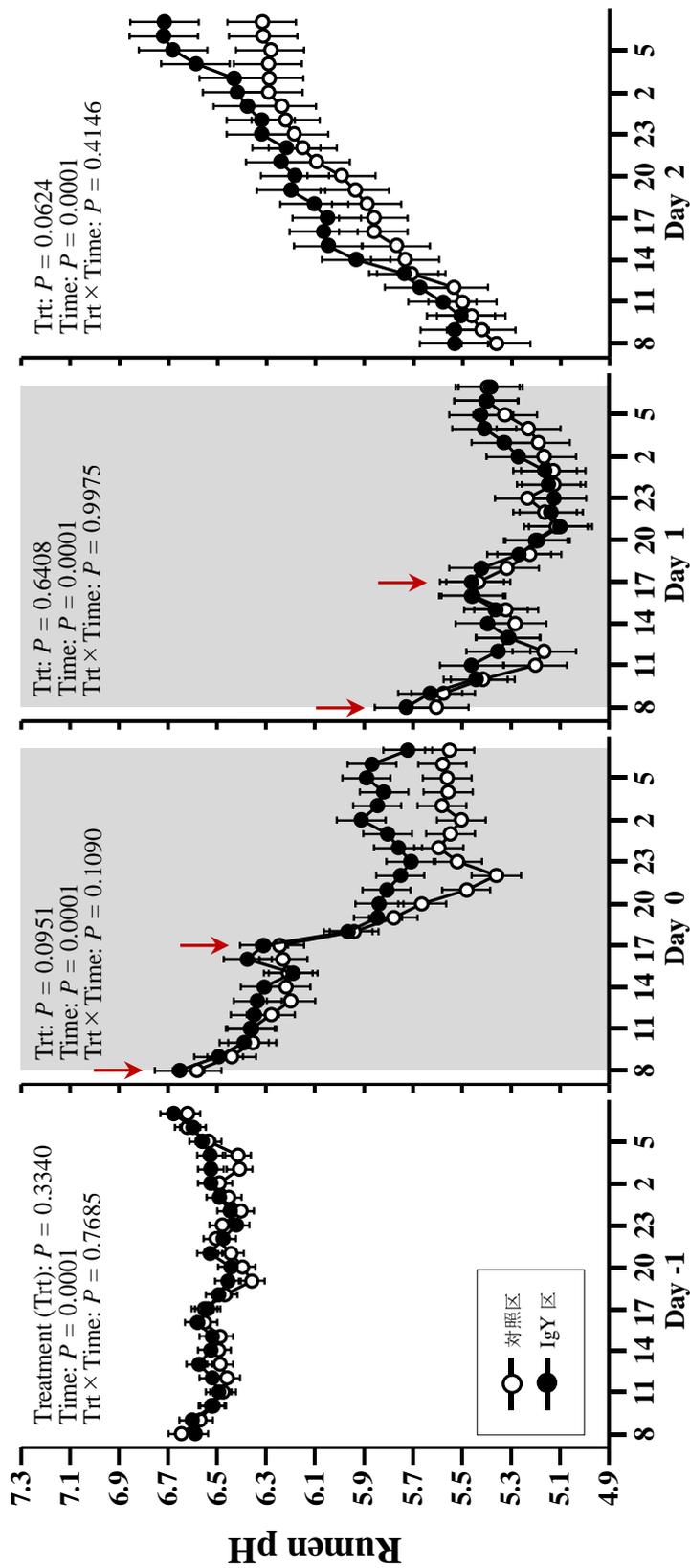


図 4.1.3 添加した抗大腸菌 IgY、1 日給与量 2g

(株式会社イーダブルニュートリション・ジャパン、岐阜)

表4.1.1 試験飼料の組成および成分

項目	試験期間	
	Day 0および1以外	Day 0およびDay 1
飼料組成 (%)		
オーチャードおよびチモシー乾草	100	0
濃厚飼料	0	50
大豆粕フレーク	0	50
飼料成分 (乾物中%)		
TDN	60.9	80.5
CP	13.0	15.7
ADF	40.5	12.8
NDF	68.0	25.7
NFC	8.0	48.7
Ca	0.5	0.4
P	0.3	0.4



濃厚飼料多給開始後時間(時)および日数(日)

図 4.1.4 第一胃液 pH の日内変動

各区 $n = 10$ 、最小二乗平均土標準誤差

○は対照区、●は IgY 区

* $P < 0.05$ (同時間における区間)

灰色の背景および矢印は濃厚飼料多給日および飼料給与時間

表4.1.1.2 第一胃液pHの平均、最小、および最大値

項目	Day -1		Day 0		Day 1		Day 2		SEM	Treatment (Trt)	Day	Trt × Day	P-value
	対照区	IgY区	対照区	IgY区	対照区	IgY区	対照区	IgY区					
日平均値	6.49	6.53	5.85	6.02	5.28	5.34	5.98	6.17	0.09	0.069	0.001	0.673	
日最小値	6.07	6.21	5.09	5.35	4.68	4.89	5.24	5.36	0.11	0.077	0.001	0.915	
日最大値	6.80	6.81	6.68	6.69	6.06	6.06	6.55	6.84	0.08	0.121	0.001	0.108	

各区n = 10

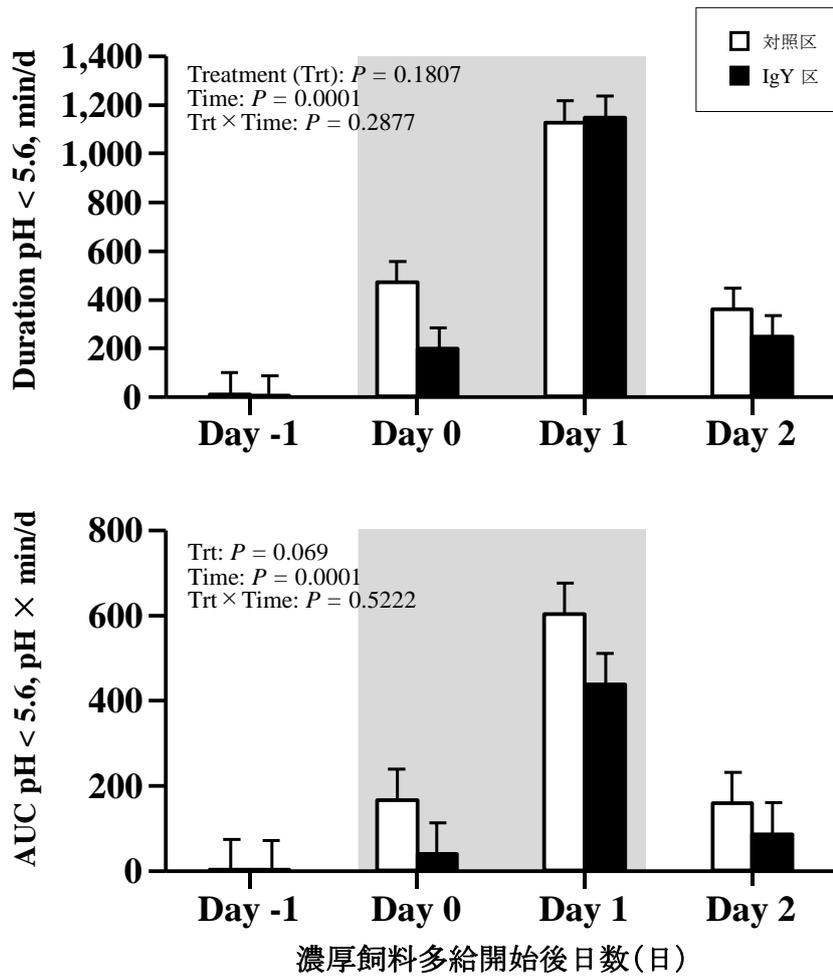


図 4.1.5 第一胃液 pH5.6 未満の時間数 (分数/日) および AUC (pH × 分数/日)

各区 n = 10、最小二乗平均 ± 標準誤差

□は対照区、■は IgY 区

灰色の背景は濃厚飼料多給日

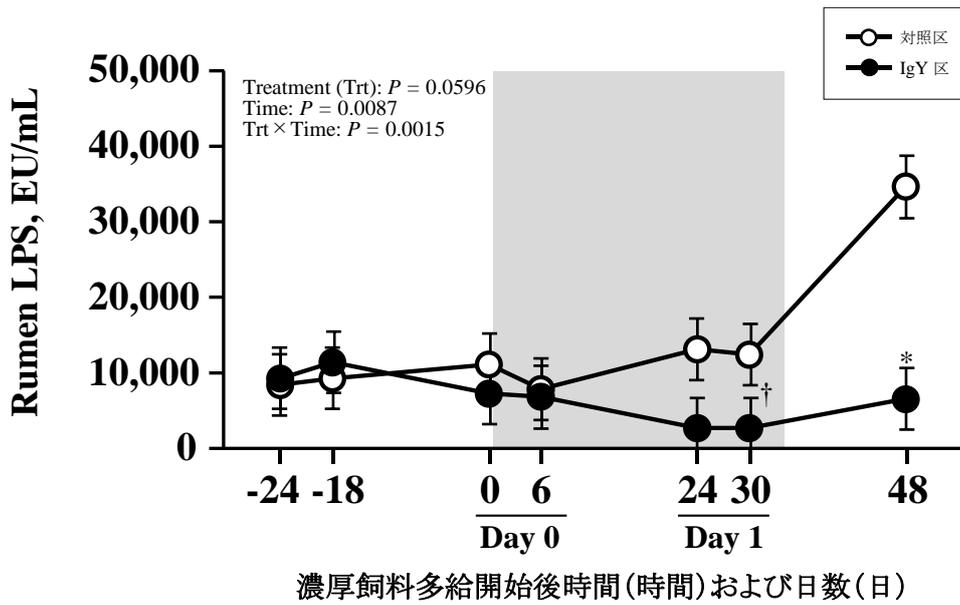


図 4.1.6 第一胃液 LPS 濃度

各区 n = 10、最小二乗平均 ± 標準誤差

○は対照区、●は IgY 区

* $P < 0.05$ および[†] $P < 0.1$ (同時間における区間)

灰色の背景は濃厚飼料多給日

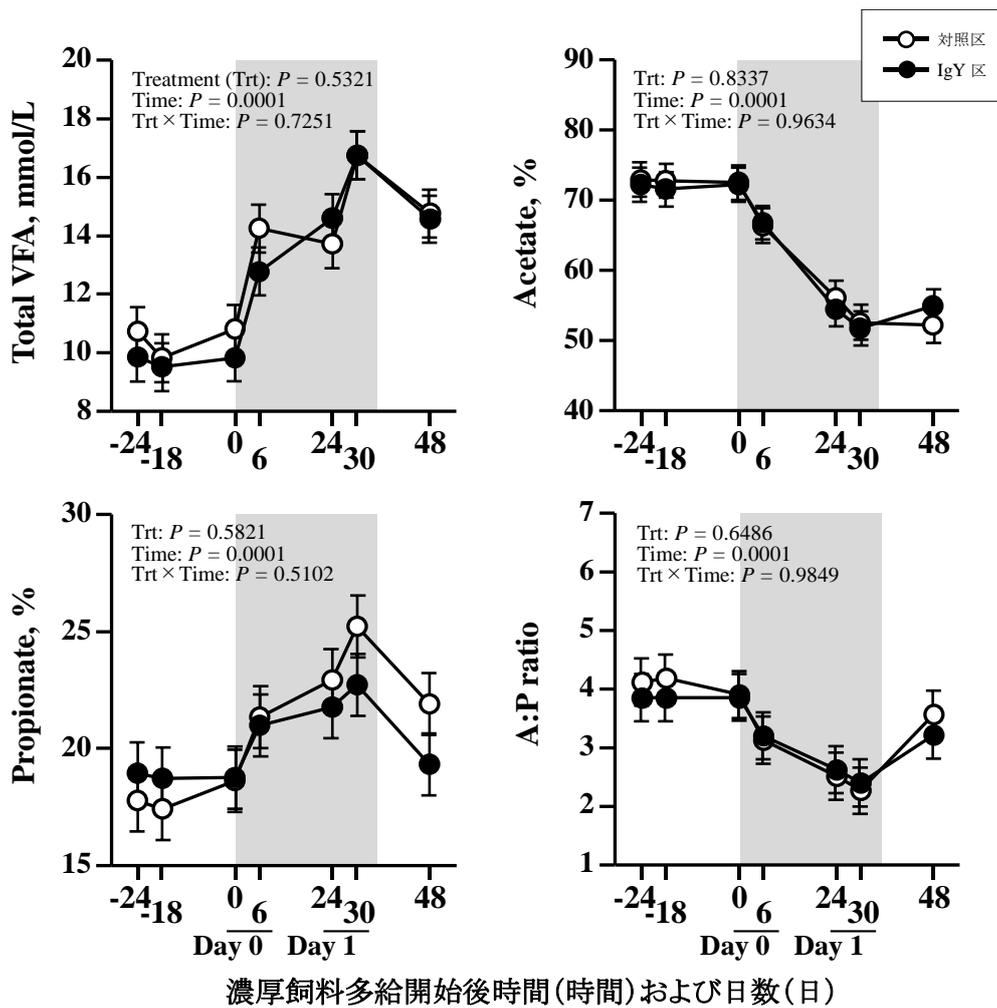
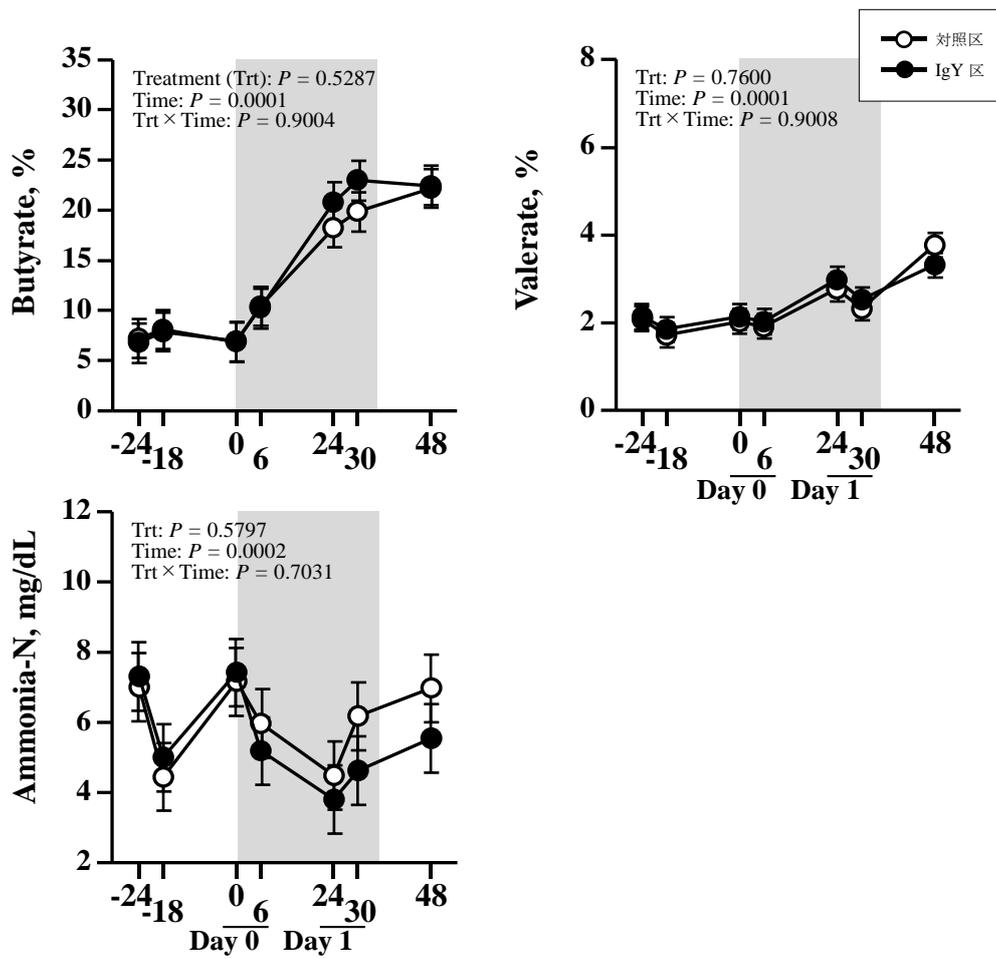


図 4.1.7 第一胃液総 VFA 量および VFA 組成

各区 $n = 10$ 、最小二乗平均 \pm 標準誤差

○は対照区、●は IgY 区

灰色の背景は濃厚飼料多給日



濃厚飼料多給開始後時間(時間)および日数(日)

図 4.1.8 第一胃液 VFA 組成およびアンモニア態窒素濃度

各区 n = 10、最小二乗平均 ± 標準誤差

○は対照区、●は IgY 区

灰色の背景は濃厚飼料多給日

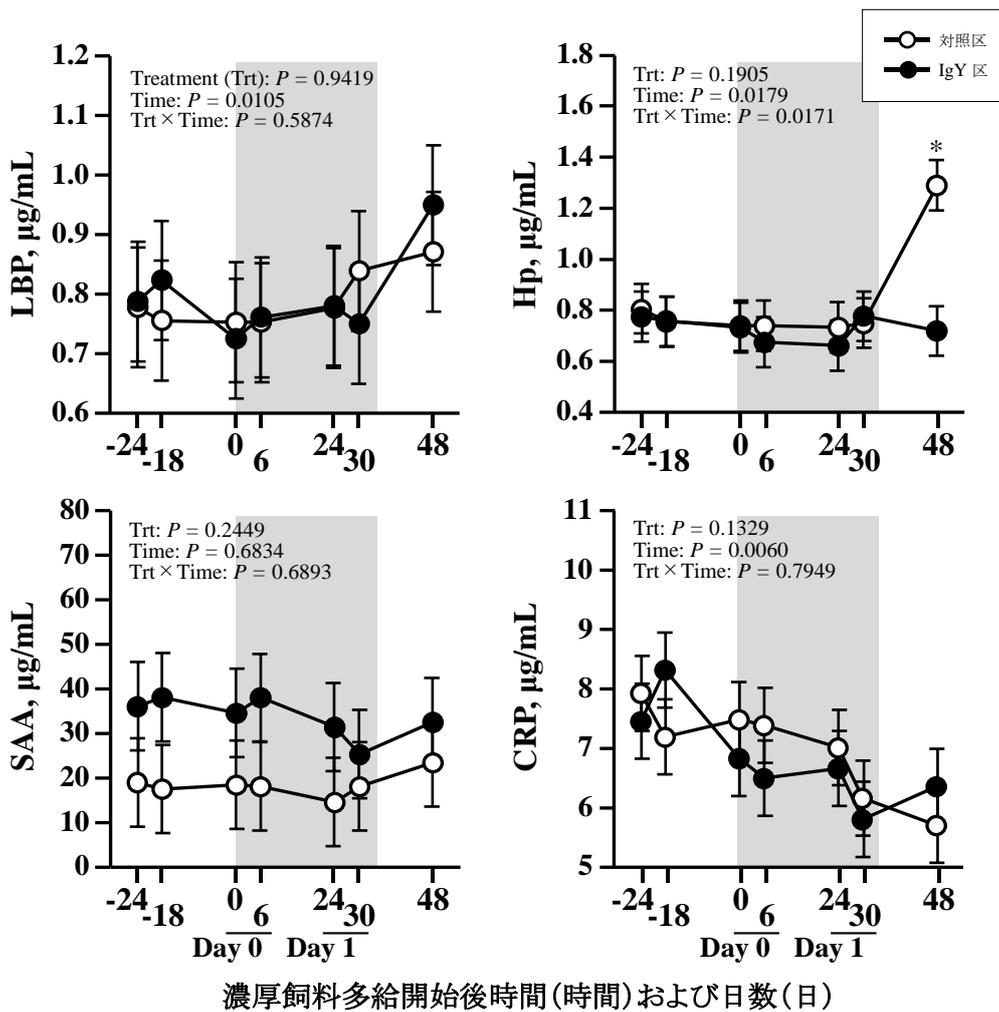


図 4.1.9 血漿 APPs 濃度

各区 n = 10、最小二乗平均±標準誤差

○は対照区、●は IgY 区

* $P < 0.05$ (同時間における区間)

灰色の背景は濃厚飼料多給日

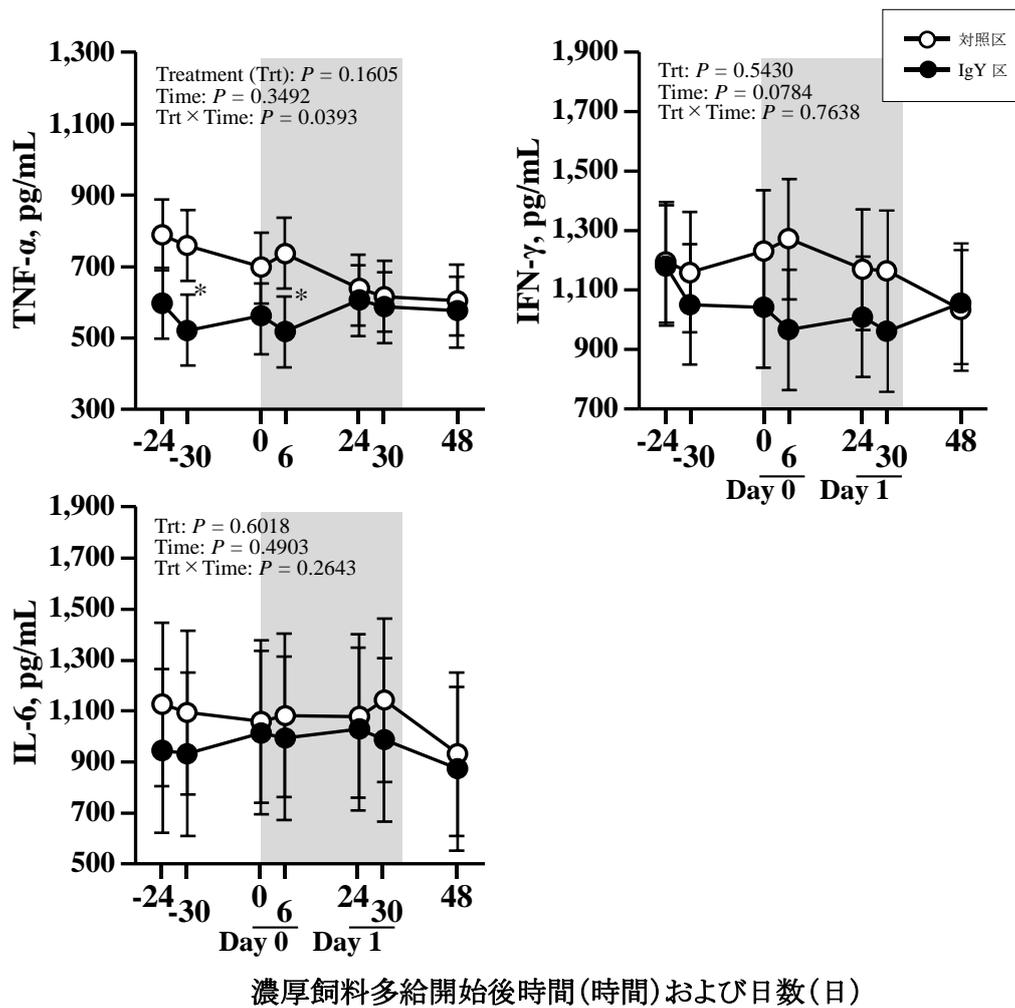


図 4.1.10 血漿サイトカイン濃度

各区 $n = 10$ 、最小二乗平均±標準誤差

○は対照区、●は IgY 区

* $P < 0.05$ (同時間における区間)

灰色の背景は濃厚飼料多給日

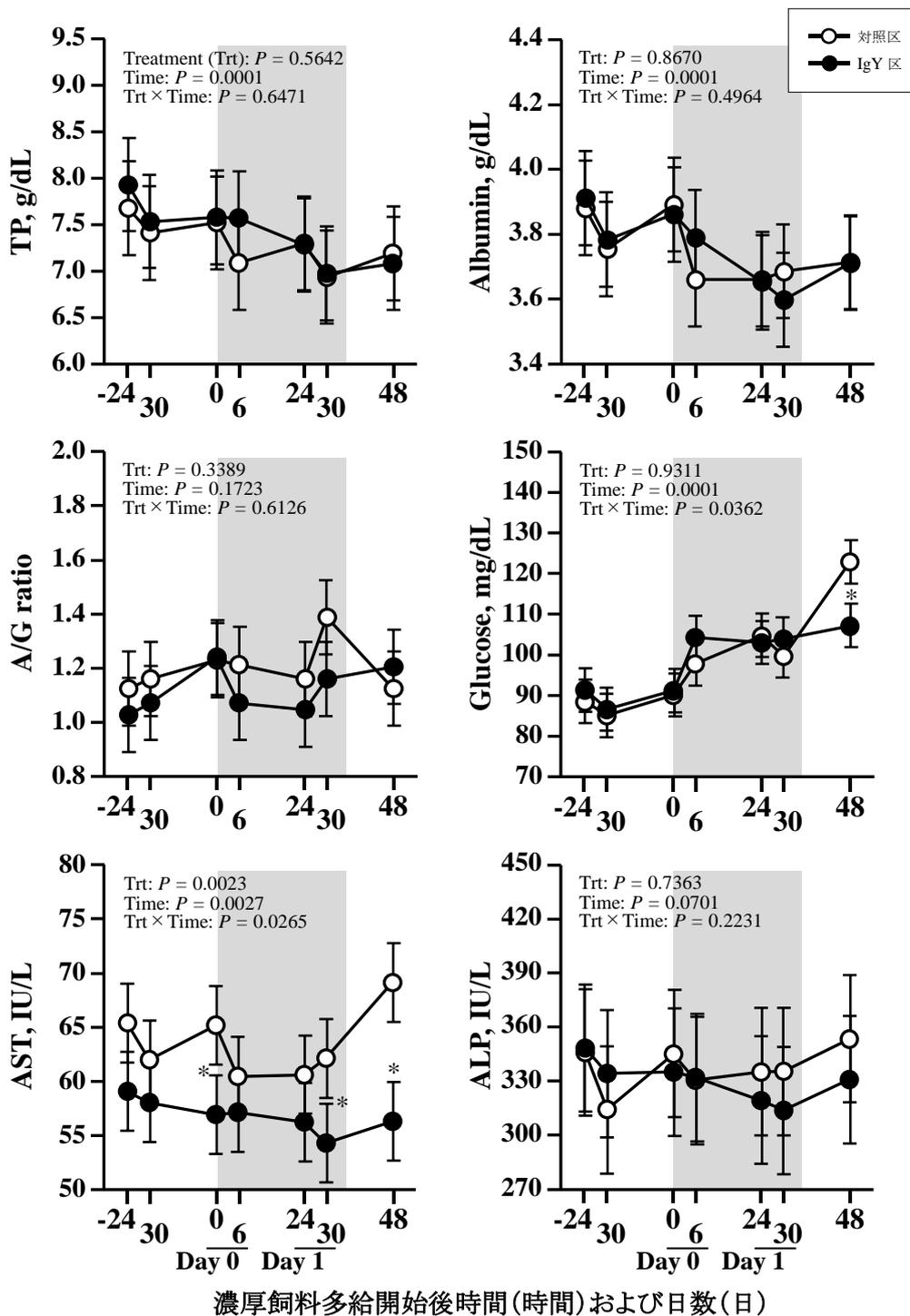


図 4.1.11 血漿代謝成分濃度

各区 n = 10、最小二乗平均±標準誤差

○は対照区、●は IgY 区

* $P < 0.05$ (同時間における区間)

灰色の背景は濃厚飼料多給日

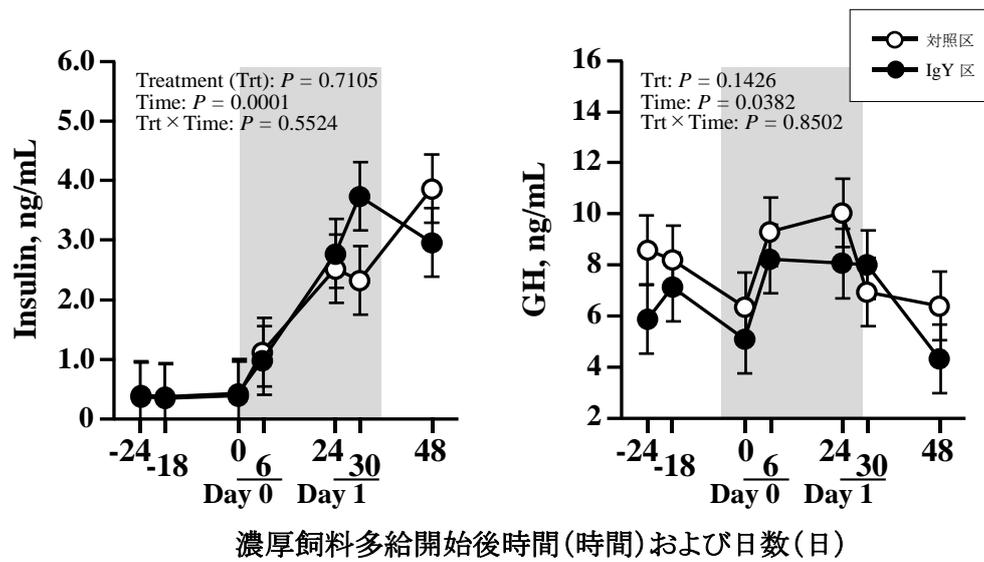


図 4.1.12 血漿ホルモン濃度

各区 $n = 10$ 、最小二乗平均 \pm 標準誤差

○は対照区、●は IgY 区

灰色の背景は濃厚飼料多給日

第4章 抗大腸菌 IgY の給与が第一胃液 LPS 濃度と発酵、血漿代謝・内分泌成分、および発育性に及ぼす影響

2節 抗大腸菌 IgY の給与が離乳前後7週間の第一胃液 LPS 濃度および発酵、血漿中の代謝・内分泌成分、ならびに発育に及ぼす効果の検証

4.2.1 緒言

本章 1 節において、抗大腸菌 IgY の給与により第一胃発酵に影響を及ぼさずに濃厚飼料多給時における第一胃液 LPS 濃度の増加が抑制されることが明らかとなった。この第一胃液 LPS の中和効果により、抗大腸菌 IgY 給与牛では濃厚飼料の多給と第一胃液 LPS 濃度の増加に伴う血漿 Hp および AST 濃度への影響が軽減された。子牛における既往の知見では、腸管毒素原性大腸菌の感染を防ぐことを目的に抗大腸菌 K99 線毛 IgY が使用されている (Ikemori *et al.*, 1992; Ozpinar *et al.*, 1996)。大腸菌による感染試験の結果、抗大腸菌 K99 線毛 IgY を給与した子牛では臨床症状が軽減された (Ikemori *et al.*, 1992)。また、野外試験では大腸菌の感染から免れたことによる発育向上 (Ozpinar *et al.*, 1996) などの効果が示されている。しかし、抗大腸菌 IgY の給与による第一胃液 LPS 濃度の増加抑制が、離乳移行期から反芻期への移行期にかけて実際の代謝・内分泌成分や発育に及ぼす影響は明らかになっていない。

以上から、本節では、濃厚飼料の給与割合が高く、SARA が発生する可能性の高い離乳移行期から反芻期の移行期までの長期間における抗大腸菌 IgY の給与が、第一胃液 LPS 濃度および発酵、血漿代謝・内分泌成分、ならびに発育へ及

ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

4.2.2 材料と方法

動物の飼養および試験は、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の動物実験等実施規定に従って実施した。

1. 供試動物および飼養管理

ホルスタイン種子牛 30 頭（雌 16 頭および雄 14 頭）を用いた。試験期間は 3 週齢から 10 週齢までの 7 週間とし、個別ペンで飼養した。供試牛は、試験開始時に対照区または IgY 区（各区、雌 8 頭および雄 7 頭）へ無作為に配置した。IgY 区には、本章 1 節と同じ抗大腸菌 IgY を 1 日 1 回、2g/日給与した。IgY の添加は、離乳前は全乳、離乳後はスターターへ行き、朝の給与飼料に混合した。対照区には抗大腸菌 IgY のプラセボとして全卵粉末を 2g/日、IgY 区と同様に添加給与した。抗大腸菌 IgY およびプラセボの全卵粉末の作製手順の概略は本章 1 節の図 4.1.1 に示した通りである。飼料給与量、飼料成分値、および飼養管理方法は第 3 章 2 節と同様である。

2. 血液と第一胃液の採取

血液および第一胃液の採材、ならびに採材後のサンプル処理方法は第 3 章 2 節と同様である。

3. 血漿および第一胃液サンプルの分析

第一胃液および血漿成分の分析項目と方法は第 3 章 2 節と同様である。なお、

血漿グルカゴン濃度は分析項目から除外した。加えて本節では血漿 AGP 濃度の分析を行った。血漿 AGP 濃度は、3、7、および 10 週齢のサンプルを用いて計 3 回、市販の ELISA キット (Cow AGP ELISA Kit; Life Diagnosis Inc., WestChester, USA) を用いて分析した。

4. 統計処理

統計解析ソフト (SAS University Edition; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて各項目の統計解析を行った。第一胃液の各測定項目の処理効果判定に使用した一般線形モデル、ならびに DMI、DG、および血液の各測定項目における処理効果の判定に使用した線形混合モデルは第 3 章 2 節と同様である。各項目において最小二乗平均および標準誤差を算出した。 $P < 0.05$ を有意差あり、 $P < 0.1$ を有意傾向ありとした。

4.2.3 結果

1. 第一胃液成分

表 4.2.1 に 10 週齢時における第一胃液性状を示した。IgY 区の第一胃液 LPS 濃度は、10 万 EU/mL を超えた対照区と比較して半分以下の濃度となり有意な差が認められた。第一胃液総 VFA 量に区間の差は認められなかった。IgY 区の第一胃液プロピオン酸割合は対照区よりも高い傾向 ($P < 0.1$) にあった。その他の第一胃液 VFA 組成およびアンモニア態窒素濃度に有意な区間の差はなかった。

2. 血漿中の APPs 濃度およびサイトカイン濃度

血漿 APPs 濃度およびサイトカイン濃度の推移を図 4.2.1 に示した。血漿 APPs 濃度およびサイトカイン濃度に両区の差は認めなかった (IFN- γ 以外のサイトカイン濃度はデータ示さず)。

3. 血漿中の代謝成分およびホルモン濃度

血漿代謝成分の推移を図 4.2.2 に、血漿ホルモン濃度の推移を図 4.2.3 に示した。血漿中の TP 濃度は、IgY 区で週齢に伴い増加した一方、対照区で週齢に伴う変化を示さなかった。そのため、IgY 区の TP 濃度は対照区と比較して有意な差が認められた ($P < 0.05$)。両区の A/G 比は週齢に伴い低下し ($P < 0.05$)、6 週齢以降、IgY 区の A/G 比が対照区よりも有意な低値を示した ($P < 0.05$)。AST

濃度は両区とも週齢に伴い増加したが ($P < 0.05$)、IgY 区は対照区よりも高く推移した ($P < 0.05$)。血漿ホルモン濃度、他の代謝成分、およびミネラル濃度に区間の差はなかった (一部データ示さず)。

4. 飼料摂取量と発育成績

試験期間中、両区の子牛は給与飼料を完食し、DMI に区間の差はなかった。

また、健康状態や便性状に異常な変化を認めなかった。

試験開始時および終了時の体重、試験期間における DG を表 4.2.2 に示した。試験終了時の体重は IgY 区で対照区よりも高まったが、統計的な有意差はなかった。IgY 区の DG は、離乳前 (3 週齢から 6 週齢) に対照区よりも高い傾向 ($P < 0.1$) を認め、離乳後 (7 週齢から 10 週齢) および試験期間全体 (3 週齢から 10 週齢) に対照区よりも有意に高まった。

4.2.4 考察

離乳前後の7週間に抗大腸菌 IgY を給与することにより 10 週齢時の第一胃液 LPS 濃度は対照の子牛と比較して半分以下となった。本章 1 節と同様、離乳移行期から反芻期の移行期にかけての給与においても第一胃液 LPS 濃度の中和効果が示された。このとき、第一胃液総 VFA 量、およびアンモニア態窒素濃度に有意な区間差はなく、IgY 区のプロピオン酸割合は対照区よりも高い傾向を示した。離乳移行期から反芻期への移行期にかけての第一胃液総 VFA 量やプロピオン酸割合の増加はスターターの摂取と関連する (McCurdy *et al.*, 2019)。第 2 章ではスターター給与割合の増加により第一胃液プロピオン酸割合が増加したが、本試験では飼料給与量に区間の差はなかった。 *Fusobacterium necrophorum* や *Streptococcus bovis* を含む複数の細菌に対する IgY を肥育牛 (DiLorenzo *et al.*, 2008) および乾乳牛 (Marino *et al.*, 2011) の飼料に添加給与した既往の報告、ならびに本章第一節の結果では第一胃液総 VFA 量および VFA 組成に IgY 給与の影響は認められていない。本試験において抗大腸菌 IgY が第一胃内の他の微生物と交差した可能性は低いと考えられるが、IgY 区的第一胃液 VFA 組成に変化を及ぼした原因は不明である。抗大腸菌 IgY の添加により 10 週齢時の第一胃液 LPS 濃度は対照区よりも著減したが、血漿 APPs 濃度およびサイトカイン濃度は試験期間を通して区間の差がなかった。したがって、本試験では両区ともに炎症反応は認められず、抗大腸菌 IgY 添加による第一胃液 LPS 濃度抑制の効果は第一胃内のみであった。なお、離乳移行期から反芻期の移行期にかけての抗大腸

菌IgYの給与による第一胃液LPS中和効果、およびその関連データについては、今回我々が初めて示した知見である。

一方で、離乳前は抗大腸菌IgYを全乳に添加しているため、給与されたIgYは主に第四胃以降に到達すると推察される。消化能力が十分でない新生子牛では抗体活性を維持したまま胃から結腸まで到達しIgYによる受動免疫が賦与されるが (Ikemori *et al.*, 1996)、日齢の経過および消化管の発達とともにIgYは胃酸や消化酵素の影響を受ける程度が増し、活性を持ったIgYが腸まで到達する割合が低下する (Yokoyama *et al.*, 1993)。しかし、離乳豚の報告では、給与されたIgYの一部が活性を維持して腸まで到達し標的の細菌と結合することが示されている (Tan *et al.*, 2019)。本試験においても、離乳前の給与IgYは第一胃よりも腸管内に分布して作用したと考えられる。離乳前後におけるIgY区の血漿A/G比は、対照区よりも低値を示した。離乳前後の子牛へ長期間、酵母とフラボノイド混合物を給与した報告では、給与区における離乳直前の血清IgG濃度が増加した (Kong *et al.*, 2019)。この報告の中で著者らは、本試験と同様に離乳前には乳へ、離乳後にはスターターへ混合物の添加を行っていた。また、血清IgG濃度の増加が認められた実際の機序は不明としながらも、プロバイオティクスと腸内細菌叢の相互作用により腸管上皮細胞の免疫が賦活化された可能性を考察した (Kong *et al.*, 2019)。豚およびマウスの既往の報告においても、IgYは腸管内でターゲット微生物と抗原抗体結合して腸管上皮細胞への付着を防ぐだけでなく、消化管上皮の免疫応答を調整する働きを持つことが報告されてい

る (Park *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016)。これらの報告を踏まえると、本試験では抗大腸菌 IgY の添加により腸上皮細胞における免疫が賦活化され、血中 IgG 濃度の増加、すなわち血漿 A/G 比の低下につながった可能性が考えられた。また、10 週齢における IgY 区の血漿 A/G 比も対照区よりも低値であることから、添加 IgY の一部は離乳後もある程度の期間は活性を持って腸管まで移行したと推察される。

血漿代謝成分のうち、IgY 区の AST 濃度は対照区よりも高く推移した。一般に、血漿 AST 濃度の増加は心臓および骨格筋や肝臓の細胞における傷害の指標とされる (Quezada-Tristán *et al.*, 2014)。しかし IgY 区では、血漿 ALP 濃度、APPs 濃度、およびサイトカイン濃度に対照区との差はなく、炎症を示唆する所見は認められなかった。また、本章 1 節で実施した濃厚飼料多給試験では、IgY 区の AST 濃度が対照区よりも有意に低く推移し、本試験とは逆の結果を示している。大腸菌および *Salmonella Typhimurium* を経口感染させた豚の報告でも IgY 添加区における血清 AST 濃度の低下が認められ、IgY による免疫調整作用の関与が示唆されている (Park *et al.*, 2011)。本試験において IgY 区の AST 濃度上昇は血漿 A/G 比の低下と一致しており、添加 IgY による免疫賦活作用が影響した可能性が推察される。前節の結果や既往の報告との不一致は、濃厚飼料の多給や実験感染といったストレス要因の有無によると考えられるが、実際の機序や要因は不明である。

抗大腸菌 IgY の添加により、試験期間全体および離乳後において IgY 区の DG

は対照区よりも高まった。一般に、給与された特異 IgY は体内でターゲットとなる病原体と抗原抗体結合して宿主への感染を防ぎ、新生子牛では下痢等の臨床症状が減少し、ひいては発育の向上効果が報告されている (Ikemori *et al.*, 1992; Özpınar *et al.*, 1996)。しかし、早期離乳豚への添加試験では供試豚に臨床症状はなく、IgY 給与による発育向上効果は認められなかった (Tan *et al.*, 2019)。また、肥育牛に抗 *Streptococcus bovis* IgY を添加した報告では給与飼料あたりの体重増加率が向上し、IgY による第一胃細菌叢の変化が関連した可能性が推察されたものの、機序は明らかでなかった (DiLorenzo *et al.*, 2008)。前節では抗大腸菌 IgY 給与牛の第一胃液 pH 低下が軽減され、既往の知見 (Marino *et al.*, 2011; Barros *et al.*, 2019) では特異 IgY 給与牛における第一胃液 pH の上昇と NDF 消化率の向上との関連が考察されている。本節で飼料の消化率については解析しておらず、IgY 区における DG 向上の要因は今後の検討が必要である。

結論として、離乳移行期から反芻期への移行期にかけた抗大腸菌 IgY の給与は、離乳後 3 週における第一胃液 LPS 濃度を対照よりも有意に低下させた。本試験の条件では血漿 APPs 濃度およびサイトカイン濃度に区間の差は認められず、第一胃内に限局した効果であった。また、抗大腸菌 IgY を給与した子牛では離乳前 1 週以降、血漿 A/G 比が対照よりも低く推移し、これには腸管内に分布した IgY による免疫賦活作用が関与した可能性が推察された。さらに、抗大腸菌 IgY の給与は離乳後および試験期間全体の DG を向上させたが、その機序や要因は明らかでなかった。

4.2.5 図表

表4.2.1 第一胃液成分

項目	処理		SEM	P- value
	対照区	IgY区		
総VFA量, mmol/dL	9.22	9.51	0.52	0.694
VFA組成, mol/100moL				
酢酸	65.15	62.96	1.34	0.261
プロピオン酸	22.45	25.07	1.06	0.092
酪酸	10.12	9.69	0.62	0.634
吉草酸	2.28	2.28	0.23	0.989
A:P 比	3.00	2.60	0.17	0.118
アンモニア態窒素濃度, mg/dL	11.80	11.36	2.56	0.905
LPS濃度, EU/mL	133,411	54,007	12,788	0.001

各区n = 15

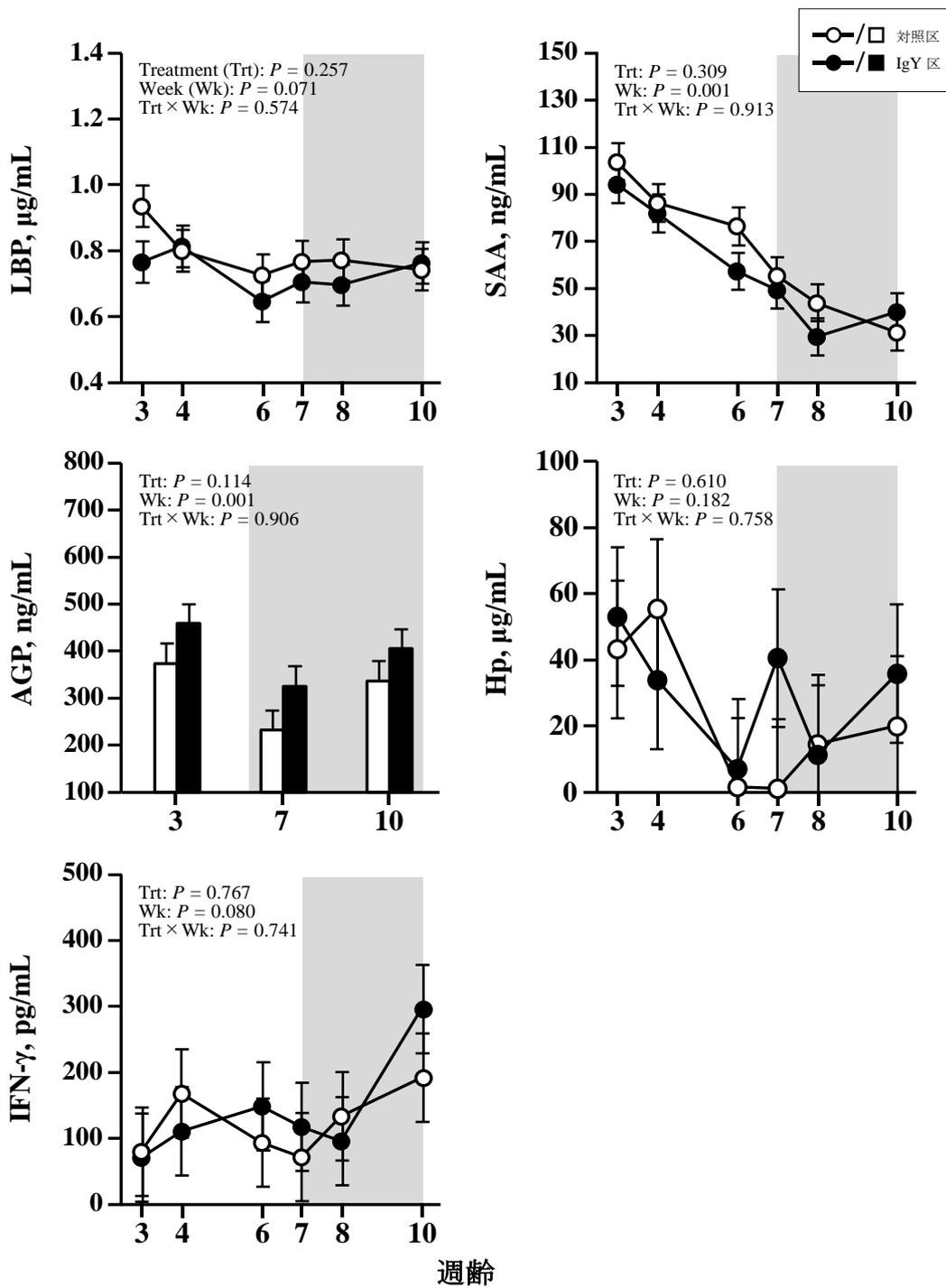


図 4.2.1 血漿 APPs およびサイトカイン濃度

各区 n = 15、最小二乗平均 ± 標準誤差

○は対照区、●は IgY 区

灰色の網掛けは離乳後の期間

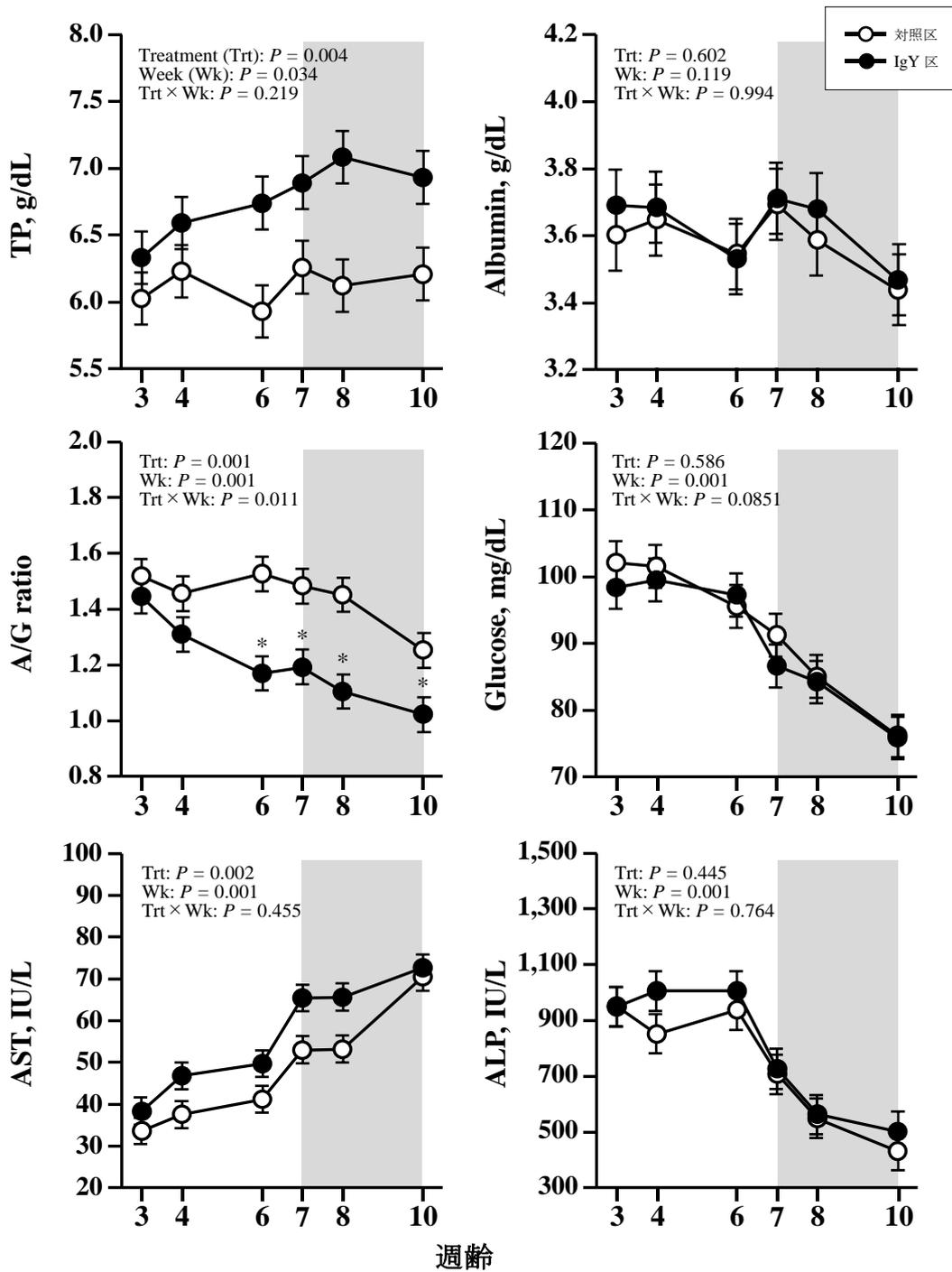


図 4.2.2 血漿代謝成分濃度

各区 n = 15、最小二乗平均 ± 標準誤差

○は対照区、●は IgY 区

灰色の網掛けは離乳後の期間

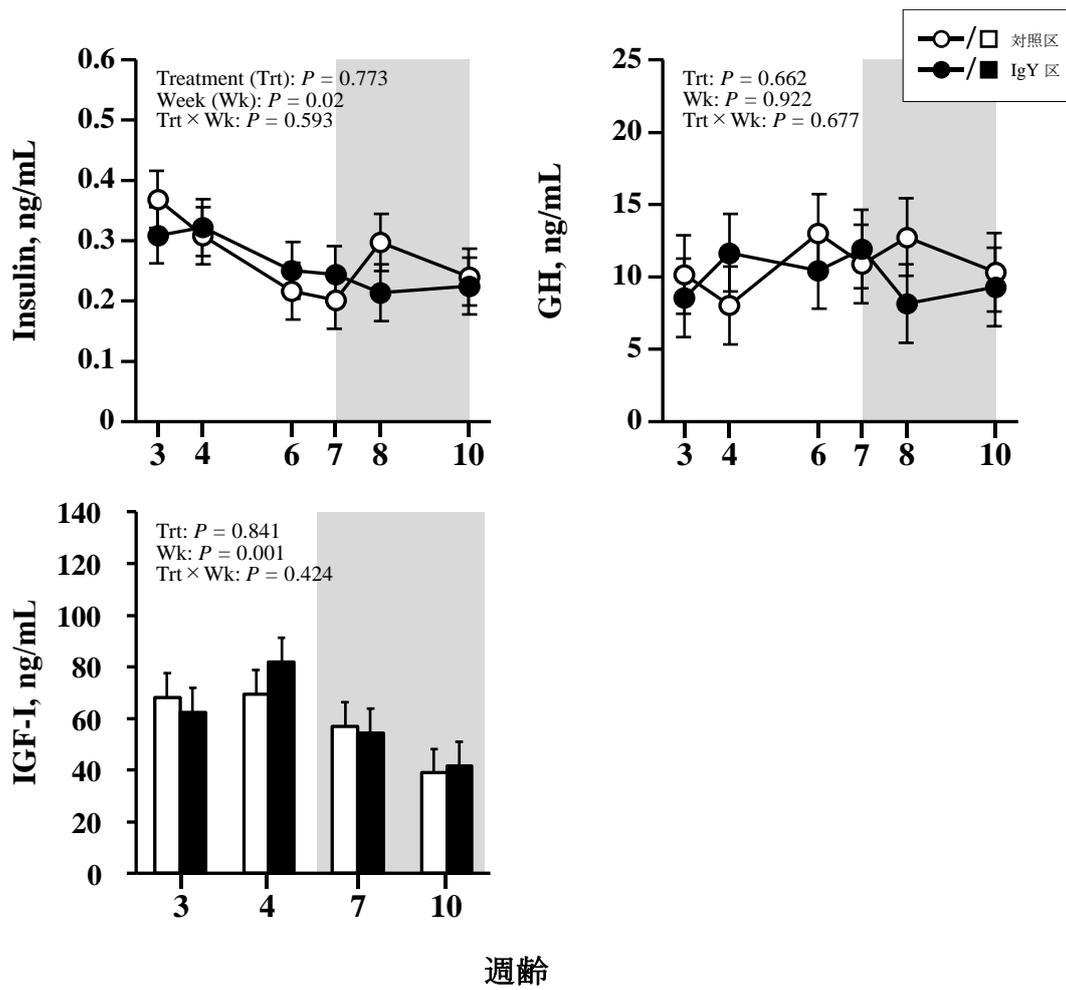


図 4.2.3 子牛の血漿ホルモン濃度

各区 $n = 15$ 、最小二乗平均 \pm 標準誤差

○/□は対照区、●/■は IgY 区

灰色の網掛けは離乳後の期間

表4.2.2 体重およびDG

項目	処理		SEM	P-value
	対照区	IgY区		
体重, kg				
開始時	56.79	54.78	1.36	0.310
終了時	91.72	96.68	2.16	0.117
DG, kg				
全期間	0.71	0.86	0.03	0.001
離乳前	0.71	0.81	0.04	0.084
離乳後	0.74	0.92	0.03	0.023

各区n = 15

全期間 21-70日齢、離乳前 21-48日齢、離乳後 49-70日齢

第5章 総括

生後2か月間における栄養摂取量の増加は初産以降の乳量に反映されることから (Bach and Ahedo 2008; Soberon *et al.*, 2012; Kertz *et al.*, 2017)、哺育期から育成期のはじめにかけては、乳牛の生涯の中でも、より生産性に及ぼす影響が大きい時期であることが明らかとなってきた。そのため、酪農現場では哺育期に高栄養で哺乳する方法にシフトしつつある (Soberon and Van Amburgh, 2013)。また、従来法よりも哺乳量が増えるため、その分哺育期間も長く設定されている (Smith and Van Amburgh, 2002; Eckert *et al.*, 2015; 齋藤, 2012)。一方で、スターターの給与量は哺乳の方法に関わらず離乳に向けて著増する。第一胃絨毛の発達が不十分なまま離乳すると、エネルギー供給量に落差が生じて発育の停滞につながる可能性がある (Fukumori *et al.*, 2012; Eckert *et al.*, 2015)。そのため、現在の早期離乳体系では離乳移行期にスターターを十分量摂取することが重要となっている (Laarman and Oba, 2011; 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構, 2017)。しかしながら、スターターによる発酵速度の亢進とVFAの産生は第一胃液pHを低下させる (Khan *et al.*, 2011b; Quigley *et al.*, 1992b)。スターター給与割合の高い離乳移行期から反芻期への移行期にかけては、成牛におけるSARAの基準に達する可能性の高いことがわかっている (Laarman and Oba, 2011)。

成牛においてSARAの発生は給与飼料の粗濃比など栄養管理と密接に関連する (Kleen *et al.*, 2003)。第一胃液pHの低値が繰り返され、DMIの低下のみな

らず、第一胃炎、肝膿瘍、および蹄葉炎など様々な代謝疾病の誘因となることが報告されている (Enemark, 2008)。アメリカの野外調査では泌乳初期の 19%、泌乳中期の 26%の牛で SARA が認められており (Garret *et al.*, 1997)、経済的にも重要な問題となっている。SARA 関連疾病を起こす要因として第一胃液 LPS 濃度の上昇および胃液 LPS の血中への移行が推察されているが、臨床的あるいは血中レベルでの炎症反応との関連は報告により一致していない (Gozho *et al.*, 2005; Khafipour *et al.*, 2009a,b)。

酪農経営では大規模化が進む一方、中小規模の経営の生産基盤強化を図るために労働負担の軽減が重要となっている (農林水産省, 2020)。哺育期の管理においても、省力化、つまり離乳の早期化と子牛の健全性を両立させる高度な飼養管理技術の確立が求められている。離乳に向けた第一胃絨毛の成長には、酪酸やプロピオン酸を多く産生するスターターの摂取が重要となるのに対し、粗飼料の給与量については、固形飼料全体のエネルギー濃度が低下する可能性があることからスターター給与の 20%を超える量は推奨されていない (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構, 2017)。一方で、栄養価の低い粗飼料をスターター給与の 5%未満量で給与すると、反対にスターターの摂取および利用効率が高まり、発育向上につながる可能性が指摘されている (Kertz *et al.*, 2017)。さらに近年では、離乳移行期および反芻期への移行期における粗飼料摂取量は第一胃液 pH 低下の軽減に重要な役割を果たすことが報告されている (Laarman and Oba, 2011; Laarman *et al.*, 2012)。今後、哺育期管理の高度化を進める上で、

給与飼料と SARA、第一胃液 LPS 濃度、血中代謝成分、および内分泌反応との関係を明らかにすることにより、この時期の第一胃液 pH の低下が子牛にとって代謝障害とみなされるべきなのか、あるいは VFA を吸収する第一胃機能を促進させるための正常な生理状態なのか（大場, 2011）を解明することは重要な研究課題である。

離乳移行期から反芻期への移行期は、代謝が大きく変化するため子牛の発育や健康への影響が大きい（Baldwin *et al.*, 2004）。同時期における給与飼料と SARA、および代謝・内分泌機能との関連の解明に並行し、機能性成分により第一胃液 pH の低下や SARA のリスクを制御する可能性を検討することも現実的な飼養技術として必要である。本研究では第一胃液 pH の低下を軽減する効果が報告されている SC、および SARA が生体へ及ぼすリスク要因と推察される第一胃液 LPS を中和する抗大腸菌 IgY の 2 つの機能性成分に着目した。SC はプロバイオティクスのひとつとして子牛と泌乳牛の双方で用いられている（Uyeno *et al.*, 2015）。酵母は第一胃内の酸素を消費して嫌気状態を保持する、糖を分解する乳酸産生菌と競合するなどの性質を持つため、第一胃環境を安定化させて微生物の機能を向上させる（Chauchayras-Durand *et al.*, 2008）。泌乳牛に対しては繊維消化率や生産性の向上（Ding *et al.*, 2014; AlZahal *et al.*, 2014）、SARA の軽減効果（AlZahal *et al.*, 2014; Bach *et al.*, 2007）が報告されている。子牛では、SC 給与によるスターター摂取量および増体の向上（Galvão *et al.*, 2005; Panda *et al.*, 1995）が報告されているが、これまで子牛における SARA の軽減効果を

詳細に検証した知見はない。IgY は、経口受動免疫により腸管感染性の病原体を不活化することを目的として、主に液状飼料期に活用されている機能性飼料である。反芻期以降では、SARA の軽減を目的として *Streptococcus bovis* など特定の第一胃微生物をターゲットにした IgY の給与効果が報告されている (Dilorenzo *et al.*, 2006; 2008)。しかし、IgY による第一胃液遊離 LPS の中和効果に関する知見は見当たらない。本研究では、上述した 2 つの機能性成分が第一胃液 pH および遊離 LPS を制御することにより、子牛の SARA ならびに生体へ及ぼす影響が軽減される結果、発育向上に寄与すると考えた。

本研究では先ず第 2 章として、離乳移行期から反芻期の移行期にかけた粗飼料の摂取およびスターターの多給が SARA および生体へ及ぼす影響を明らかにするための飼養試験を行った。その結果、粗飼料の併給は採食に伴う第一胃液 pH の日内変動を作出し、低 pH が持続するのを防ぐことで SARA を軽減させることが明らかとなった。一方粗飼料を併給しない子牛は、第一胃液の低 pH が継続して成牛における SARA の基準に達した。さらに、スターターのみ給与は第一胃液 LPS 濃度および血漿中の肝細胞逸脱酵素濃度を増加させた。また、第一胃液プロピオン酸割合を高め、血漿 GH 濃度の増加を抑制した。このことから、離乳移行期から反芻期への移行期にかけた子牛の SARA が生体へ及ぼすリスクは粗飼料の摂取により異なることが明らかとなった。粗飼料併給区では、離乳前に SARA が発生したものの粗飼料摂取の増加に伴い pH5.6 未満の時間数は著減した。一方、離乳以降に粗飼料を併給した既往の知見では本試験の併給区と

同様に第一胃液 pH の日内変動が認められたが、pH5.6 未満の時間数は 180 分/日を超えていた (Laarman *et al.*, 2012)。この時、血漿代謝・内分泌成分と DG に負の影響は認められていない。すなわち、SARA が生体に及ぼすリスクの軽減には第一胃液 pH が低下しても持続せずに回復することが重要であり、粗飼料の摂取はその第一胃液 pH の日内変動の作出に寄与すると考えられる。本試験で粗飼料を給与しない区では、SARA および第一胃液 LPS 濃度の上昇と共に血漿中の肝細胞逸脱酵素濃度が上昇し、肝細胞の傷害が示唆された。この変化は成牛で推察されている第一胃液 LPS の血中移行および血漿 APPs 濃度の増加 (Khafipour *et al.*, 2009a) と同様の機序かも知れない。離乳移行期から反芻期にかけて粗飼料を給与せずに飼養すると、第一胃壁の変性や組織生検により肝臓の炎症像などの所見が認められ、子牛においても成牛の SARA と同様の炎症カスケード反応を辿る可能性が指摘されている (Li *et al.*, 2019; Gelsinger *et al.*, 2020)。しかし、本試験で血漿 APPs 濃度に区間差はなく、スターターのみ給与した子牛で認められた血漿中の肝細胞逸脱酵素濃度の増加も検査基準範囲を大きく逸脱するレベルではなかったことから、SARA による代謝への影響は限局的であると推察される。また、粗飼料の無給与による第一胃液プロピオン酸割合の増加は血漿 GH 濃度の増加を抑制したが、試験期間の発育には影響を及ぼさなかった。

第 3 章 1 節では、濃厚飼料により SARA を実験的に誘発して子牛における SC の第一胃液 pH 低下に対する軽減効果を検証した。その結果、SC 添加区および

対照区ともに SARA が誘発され、SC の SARA 軽減効果は認められなかった。さらに SC 区では、採食後における第一胃液 pH 低下とその後の回復というパターンは対照区と同様であったが、pH 低下の程度が大きくなった。SC 区の pH 低下増大に並行して総 VFA 量も増加したことから、SC 給与による第一胃発酵の亢進が示唆された。この時、血漿 APPs 濃度、サイトカイン濃度、および肝細胞逸脱酵素濃度の増加は認められなかった。一般に、プロバイオティクスは生体の消化管微生物叢と相互に関係することで間接的に宿主に有益に作用する (Quadis *et al.*, 2014)。SC はその特性から第一胃環境を安定させるが、効果の発現や程度は飼料組成や子牛の健康状態の影響を大きく受ける (McAllister *et al.*, 2011; Alugongo *et al.*, 2017a)。先行研究の知見 (Watanabe *et al.*, 2019) を踏まえると、本試験では SC の給与によって第一胃発酵機能が向上したため、多給された濃厚飼料による発酵が対照区以上に亢進したと推察された。実際、子牛への SC 給与により認められるスターター摂取量および DG の増加 (Galvão *et al.*, 2005; Panda *et al.*, 1995) などの知見は SC による第一胃発酵機能の向上と関連した結果と考えられる。

第 3 章 1 節で明らかとなった SC の第一胃発酵亢進作用は、スターター給与割合の高い離乳前後においても代謝に負の影響を及ぼすことなく第一胃発酵機能を向上させ、発育を高める可能性を示唆した。そこで 2 節では離乳移行期から反芻期の移行期にかけて SC を添加する長期飼養試験を行った。その結果、SC の給与により離乳前および離乳後とも対照区の子牛より DG が顕著に向上した。

さらに SC 区では対照区よりも血漿グルコース、インスリン、GH、および IGF-I 濃度に有意な増加が認められた。一般に、子牛の血中 GH および IGF-I 濃度の増加は飼料エネルギーおよび CP 摂取量の増加、すなわち栄養摂取の増加に伴う (Smith *et al.*, 2002)。本試験では飼料摂取量に両区の差がないことから SC 区の飼料利用効率が向上したと考えられた。離乳後の第一胃液成分で認められた SC 区のプロピオン酸割合およびアンモニア態窒素濃度の増加は、1 節および SC 給与により CP 消化率が向上した既往の知見 (Panda *et al.*, 1995) を踏まえると、第一胃発酵亢進との関連が示唆される。以上から、離乳移行期から反芻期への移行期にかけた SC の添加給与は、第一胃発酵を亢進させて飼料中のエネルギーおよび CP の利用効率を高めた結果、糖新生の亢進や血漿 GH および IGF-I 濃度の増加につながったと推察された。ヤギに SC および *Bacillus informis* の混合物を長期給与した知見でも血液成分に同様の変化を認め、DG が向上している (Jia *et al.*, 2018)。本試験において認められた血漿代謝・内分泌成分の変化は、SC 区の DG 向上に密接に関連していると考えられた。しかし、離乳前の第一胃液性状は本試験で解析しておらず、また、高い栄養価を持つ代用乳を用いた場合における給与効果の発現については今後検討する必要がある。

次に第 4 章 1 節において、前章 1 節と同様の方法を用いて抗大腸菌 IgY の給与による第一胃液 LPS の中和効果を検証した。その結果、両区とも SARA が誘発されたが、IgY 区では対照区で認められた第一胃液 LPS 濃度および血漿ハプトグロビン濃度の増加が抑制された。また、IgY 区の血漿 AST 濃度は対照区よ

りも低く推移した。つまり、抗大腸菌 IgY の給与は第一胃液 LPS を中和することにより炎症カスケード反応の惹起を防ぎ、生体への SARA の影響を低減させることが明らかとなった。そこで 2 節では、離乳移行期から反芻期への移行期にかけて抗大腸菌 IgY を添加給与し、長期間における第一胃液 LPS の中和効果を検証した。その結果、離乳後における IgY 区の第一胃液 LPS 濃度は対照区よりも半分以下に低下した。血漿 APPs およびサイトカイン濃度に IgY 区と対照区の差は認められず、本長期試験の条件では、抗大腸菌 IgY の LPS 中和効果は第一胃内に限局したものであった。一方で IgY 区は離乳後および試験期間全体における DG が対照区よりも向上した。第一胃液中の微生物に対する特異 IgY を給与した報告では第一胃液微生物叢の変化 (DiLorenzo *et al.*, 2008) および NDF 消化率向上 (Marino *et al.*, 2011; Barros *et al.*, 2019) と発育向上との関連が考察されている。さらに、IgY 区では血漿 A/G 比の低下および AST 濃度の上昇が認められた。これは抗大腸菌 IgY が第一胃液 LPS 中和作用だけでなく、腸管における免疫賦活作用 (Park *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2016) を有する可能性を示唆する。しかし、DG および血漿代謝成分の変化に認められた、抗大腸菌 IgY の副次的な効果をもたらした実際の機序については、今後の検討が必要である。

以上、本研究では離乳移行期から反芻期への移行期にかけたスターターのみ
の給与が、採食に伴う第一胃液 pH の日内変動を消失させて低値で持続することにより SARA の診断基準に達し、第一胃液 LPS 濃度を増加し、炎症カスケード反応を惹起し、さらに血漿内分泌成分に影響を及ぼすことを明らかにした。ま

た、粗飼料の摂取による第一胃液 pH 日内変動の作出は、離乳期の SARA を軽減し、代謝・内分泌機能の恒常性維持に寄与することを示した。一方で、SC を給与した子牛に濃厚飼料を多給して SARA を誘発すると、炎症カスケード反応を伴わずに第一胃発酵が亢進し、第一胃液 pH が対照よりも低下した。そこで離乳前後に SC を給与したところ、血漿代謝・内分泌成分の濃度変化と発育の向上につながった。つまり、SARA は飼料の摂取に始まる一連の代謝変化のひとつであり、子牛における SARA の意味は生体の恒常性維持との関係の中で判断していく必要があることが本研究より導いた結論である。また、抗大腸菌 IgY の給与によっては第一胃液 LPS の中和効果が実証され、SARA に伴う第一胃液 LPS の増加が生体へ及ぼす影響を軽減させる新たな知見を提示した。本研究の結果は学術的に新たな知見であるとともに、子牛の給与飼料と SARA、そして代謝との関連を明らかにするための基礎的かつ有用なデータとなる。

本研究では総じて、粗飼料の給与を止めて飼料内容を急変させることにより SARA を誘発した。しかし、本研究における SARA と野外における自然発生の SARA とは生体に及ぼす影響が異なる可能性がある。実験的な SARA の誘発は健康な子牛に短期的な負荷をかけるため、限局した変化に留まり全身への影響が及びにくい。成牛においても SARA を示唆する症状や関連する代謝疾病が報告されているが (Enemark, 2008; Plaizier *et al.*, 2009)、試験条件下でこれらの関係を再現できるとは限らない (Li *et al.*, 2012; Gao and Oba, 2016)。今後、子牛の SARA と代謝変化における生体の恒常性維持との関係について検討を進め

るためには、実験的な SARA のみならず野外でのデータ採取と解析を並行して
いく必要がある。さらに、粗飼料の摂取だけでなく、代用乳給与、離乳の時期や
方法、およびスターターの成分や組成など SARA に影響を及ぼす可能性のある
要因を多様な野外データを用いて解明していくことは、発育の向上を前提とし
た哺育期管理の高度化と省力化、以て将来の生産性の向上にも貢献する大きな
価値を持つ。

引用文献

- Agarwal, N., Karma, D. N., Chaudhary, L. C., Agarwal, I., Sahoo, A., and Pathak, N. N. 2002. Microbial status and rumen enzyme profile of crossbred calves fed on different microbial feed additives. *Letters in Applied Microbiology*, 34, 329–336.
- Akita, E. M. and Nakai, S. 1992. Immunoglobulins from egg yolk: isolation and purification. *Journal of Food Science*, 57, 629–634.
- AlZahal, O., Dionissopoulos, L., Laarman, A. H., Walker, N., and McBride, B. W. 2014. Active dry *Saccharomyces cerevisiae* can alleviate the effect of subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 97, 7751–7763.
- Allen, M. S. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 83, 1598–1624.
- Alugongo, G. M., Xiao, J. X., Wu, Z. H., Li, S. L., Wang, Y. J., and Cao, Z. J. 2017a. Review: Utilization of yeast of *Saccharomyces cerevisiae* origin in artificially raised calves. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8:34.
- Alugongo, G. M., Xiao, J. X., Chung, Y. H., Dong, S. Z., Li, S. L., Yoon, I., Wu, Z. H., and Cao, Z. J. 2017b. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: Performance and health. *Journal of Dairy Science*, 100, 1189–1199.
- Bach, A., Iglesias, C., and Devant, M. 2007. *Short communication* Daily rumen pH pattern of loose-housed dairy cattle as affected by feeding pattern and live yeast supplementation. *Animal Feed Science and Technology*, 136, 146–153.
- Bach, A. and Ahedo, J. 2008. Record keeping and economics of dairy heifers. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 24, 117–138.
- Baldwin, IV, R. L., McLeod, K. R., and Klotz, J. L. 2004. Rumen development,

- intestinal growth and hepatic metabolism in the pre- and postweaning ruminant. *Journal of Dairy Science*, 87, E55–E65.
- Barros, T. A., Cassiano, E. C. O., Marino, C. T., Pacheco, R. D. L., Ferreira, F. A., Perna Junior, F., Martins, M. F., Meyer, P. M., Millen, D. D., Arrigoni, M. D. B., and Rodrigues, P. H. M. 2019. Polyclonal antibodies as a feed additive for cattle adapted or not adapted to highly fermentable carbohydrate diets. *Journal of Applied Animal Research*, 47, 565–572.
- Berends, H., van den Borne, J. J. G. C., Stockhofe-Zurwieden, N., Gilbert, M. S., Zandstra, T., Pellikaan, W. F., van Reenen, C. G., Bokkers, E. A. M., and Gerrits, W. J. J. 2015. Effects of solid feed level and roughage-to-concentrate ratio on ruminal drinking and passage kinetics of milk replacer, concentrates, and roughage in veal calves. *Journal of Dairy Science*. 98(8), 5621–5629.
- Bollwein, H., Janett, F., and Kaske, M. 2016. Impact of nutritional programming on the growth, health, and sexual development of bull calves. *Domestic Animal Endocrinology*, 56, (Supplement), S180–S190.
- Brewer, M. T., Anderson, K. L., Yoon, I., Scott, M., and Carlson, S. A. 2014. Amelioration of salmonellosis in pre-weaned dairy calves fed *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products in feed and milk replacer. *Veterinary Microbiology*, 172, 248–255.
- Chaucheyras-Durand, F. and Fonty, G. 2001. Establishment of cellulolytic bacteria and development of fermentative activities in the rumen of gnotobiotically-reared lambs receiving the microbial additive *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-1077. *Reproduction Nutrition Development*, 41, 57–68.
- Chaucheyras-Durand, F., Walker, N. D., and Bach, A. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: Past, present and future. *Animal Feed Science and Technology*, 145, 5–26.
- Davis Rincker, L. E., VandeHaar, M. J., Wolf, C. A., Liesman, J. S., Chapin, L. T.,

- and Weber Nielsen, M. S. 2011. Effects of intensified feeding of heifer calves on growth, pubertal age, calving age, milk yield, and economics. *Journal of Dairy Science*, 94(7), 3554–3567.
- Deelen, S. M., Leslie, K. E., Steele, M. A., Eckert, E., Brown, H. E., and DeVries, T. J. 2016. Validation of a calf-side β -hydroxybutyrate test and its utility for estimation of starter intake in dairy calves around weaning. *Journal of Dairy Science*, 99, 7624–7633.
- Desnoyers, M., Giber-Reverdin, S., Bertin, G., Duvaux-Ponter, C., and Sauvant, D. 2009. Meta-analysis of the influence of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on ruminal parameters and milk production of ruminants. *Journal of Dairy Science*, 92, 1620–1632.
- DiLorenzo, N., Diez-Gonzalez, F., and DiCostanzo, A. 2006. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on ruminal bacterial populations and ruminal pH of steers fed high-grain diets. *Journal of Animal Science*, 84, 2178–2185.
- DiLorenzo, N., Dahlen C. R., Diez-Gonzalez, F., Lamb, G. C., Larson, J. E., and DiCostanzo, A. 2008. Effects of feeding polyclonal antibody preparations on rumen fermentation patterns, performance, and carcass characteristics of feedlot steers. *Journal of Animal Science*, 86, 3023–3032.
- Ding, G., Chang, Y., Zhao, L., Zhou, Z., Ren, L., and Meng, Q. 2014. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* on alfalfa nutrient degradation characteristics and rumen microbial populations of steers fed diets with different concentrate-to-forage ratios. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 5, 24.
- Eckel, E. F. and Ametaj, B. N. 2016. *Invited review*: Role of bacterial endotoxins in the etiopathogenesis of periparturient diseases of transition dairy cows. *Journal of dairy science*, 99, 5967–5990.
- Eckert, E., Brown, H. E., Leslie, K. E., DeVries, T. J., and Steele, M. A. 2015.

- Weaning age affects growth, feed intake, gastrointestinal development, and behavior in Holstein calves fed an elevated plane of nutrition during the preweaning stage. *Journal of Dairy Science*, 98, 6315–6326.
- Elsasser, T. H., Rumsey, T. S., and Hammond, A. C. 1989. Influence of diet on basal and growth hormone-stimulated plasma concentrations of IGF-1 in beef cattle. *Journal of Animal Science*, 67, 128–141.
- Enemark, J. M. D. 2008. The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *The veterinary research*, 176, 32–43.
- FAO/WHO. 2001 Oct. 1–4. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina.
- Fomenky, B. E., Do, D. N., Talbot, G., Chiquette, J., Bissonnette, N., Chouinard, Y. P., Lessard, M., and Ibeagha-Awemu, E. M. 2018. Direct-fed microbial supplementation influences the bacteria community composition of the gastrointestinal tract of pre- and post-weaned calves. *Scientific reports*, 8, 14147.
- Frieten, D., Gerbert, C., Koch, C., Dusel, G., Eder, K., Hoeflich, A., Mielenz, B., and Hammon, H. M. 2018. Influence of ad libitum milk replacer feeding and butyrate supplementation on the systemic and hepatic insulin-like growth factor I and its binding proteins in Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 101, 1661–1672.
- Fukumori, R., Mita, T., Sugino, T., Hasegawa, Y., Kojima, M., Kangawa, K., Obitsu, K., and Taniguchi, K. 2012. Effects of glucose and volatile fatty acids on blood ghrelin concentrations in calves before and after weaning. *Journal of Animal Science*, 90, 4839–4845.

- Fuller, R. 1999. Probiotics for farm animals. (*in Probiotics: A Critical Review*. Ed. by Tannock, G. W.). Horizon Scientific Press, Wymondham, UK, pages 15–22.
- Galvão, K. N., Santos, J. E. P., Coscioni, A., Villaseñor, M., Sisco, W. M., and Berge, A. C. B. 2005. Effect of feeding live yeast products to calves with failure of passive transfer on performance and patterns of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli*. *Reproduction, nutrition, development*, 45, 427–440.
- Gao, X., and Oba, M. 2016. Characteristics of dairy cows with a greater or lower risk of subacute ruminal acidosis: Volatile fatty acid absorption, rumen digestion, and expression of genes in rumen epithelial cells. *Journal of Dairy Science*, 99, 8733–8745.
- Garret, E. F., Nordlund, K. V., Goodger, W. J., and Oetzel, G. R. 1997. A cross-sectional field study investigating the effects of periparturient dietary management on ruminal pH in early lactation dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 80 (Suppl. 1), 169 (Abstract).
- Gelsinger, S. L., Coblenz, W. K., Zanton, G. I., Ogden, R. K., and Akins, M. S. 2020. Physiological effects of starter-induced ruminal acidosis in calves before, during, and after weaning. *Journal of dairy Science*, 103, 2762–2772.
- Gozho, G. N., Plaizier, J. C., Krause, D. O., Kennedy, A. D., and Wittenberg, K. M. 2005. Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *Journal of Dairy Science*, 88, 1399–1403.
- Hagino, A., Inomata, E., Sato, T., Ohtomo, Y., Sasaki, Y., and Obara, Y. 2005. Effect in sheep of dietary concentrate content on secretion of growth hormone, insulin and insulin-like growth factor- I after feeding. *Animal Science Journal*, 76, 55–63.
- He, Z. X., Ferlisi, B., Eckert, E., Brown, H. E., Aguilar, A., and Steele, M. A. 2017.

- Supplementing a yeast probiotic to pre-weaning Holstein calves: Feed intake, growth and Fecal biomarkers of gut health. *Animal Feed Science and Technology*, 226, 81–87.
- Hill, T. M., Bateman, II, H. G., Aldrich, J. M., and Schlotterbeck, R. L. 2010. Effect of milk replacer program on digestion of nutrients in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 93, 1105–1115.
- Hirabayashi, H., Kawashima, K., Okimura, T., Tateno, A., Suzuki, A., Asakuma, S., Isobe, N., Obitsu, T., Kushibiki, S., and Sugino, T. 2017. Effect of nutrient levels during the far-off period on postpartum productivity in dairy cows. *Animal Science Journal*. 88, 1162–1170.
- Hučko, B, Bampidis, V. A., Kodeš, A., Christodoulou, V., Mudřík, Z., Poláková, K., and Plachý, V. 2009. Rumen fermentation characteristics in pre-weaning calves receiving yeast culture supplements. *Czech Journal of Animal Science*, 54, 435–442.
- Ikemori, Y., Kuroki, M., Peralta, R. C., Yokoyama, H., and Kodama, Y. 1992. Protection of neonatal calves against fatal enteric colibacillosis by administration of egg yolk powder from hens immunized with K99-piliated enterotoxigenic *Escherichia coli*. *American Journal of Veterinary research*, 53, 2005–2008.
- Ikemori, Y., Ohta, M., Umeda, K., Peralta, R. C., Kuroki, M., Yokoyama, H., and Kodama, Y. 1996. Passage of chicken egg yolk antibody treated with hydroxypropyl methylcellulose phthalate in the gastrointestinal tract of calves. *Journal of veterinary medical science*, 58, 365–367.
- Jasper, J. and Weaey, D. M. 2002. Effects of ad libitum milk intake on dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 85, 3054–3058.
- Jia, P., Cui, K., Ma, T., Wan, F., Wang, W., Yang, D., Wang, Y., Guo, B., Zhao, L., and Diao, Q. 2018. Influence of dietary supplementation with *Bacillus*

- licheniformis* and *Saccharomyces cerevisiae* as alternatives to monensin on growth performance, antioxidant, immunity, ruminal fermentation and microbial diversity of fattening lambs. *Scientific Reports*, 8, 16712.
- Kertz, A. F., Hill, T. M., Quigley, III, J. D., Heinrichs, A. J., Linn, J. G., and Drackley, J. K. 2017. *A 100- Year Review: Calf nutrition and management*. *Journal of Dairy Science*, 100, 10151–10172.
- Khafipour, E., Krause, D. O., and Plaizier, J. C. 2009a. A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *Journal of Dairy Science*, 92, 1060–1070.
- Khafipour, E., Krause, D. O., and Plaizier, J. C. 2009b. Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. *Journal of Dairy Science*, 92, 1712–1724.
- Khan, M. A., Weary, D. M., and von Keyserlingk, M. A. G. 2011a. Hay intake improves performance and rumen development of calves fed higher quantities of milk. *Journal of Dairy Science*, 94, 3547–3553.
- Khan, M. A., Weary, D. M., and von Keyserlingk, M. A. G. 2011b. *Invited review: Effects of milk ration on solid feed intake, weaning, and performance in dairy heifers*. *Journal of Dairy Science*, 94, 1071–1081.
- Kim, Y-H., Nagata, R., Ohtani, N., Ichijo, Y., Ikuta, K., and Sato, S. 2016. Effects of dietary forage and calf starter diet on ruminal pH and bacteria in Holstein calves during weaning transition. *Frontiers Microbiology*, 7, 1575.
- Kiros, T. G., Luise, D., Derakhshani, H., Petri, R., Trevisi, P., D’Inca, R., Auclair, E., and van Kessel, A. G. 2019. Effect of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on the performance and cecum microbial profile of suckling piglets. *PLoS One*, 14, e0219557.
- Kleen, J. L., Hooijer, G. A., Rehage, J., and Noordhuizen, J. P. T. M. 2003.

- Subacute ruminal acidosis (SARA): a Review. *Journal of Veterinary Medicine*, A50, 406–414.
- 国立研究開発法人 農業・食品産業技術研究機構編. 日本飼養標準 乳牛 (2017年版). 2017. 中央畜産会. 東京.
- Kong, L., Yang, C., Dong, L., Diao, Q., Si, B., Ma, J., and Tu, Y. 2019. Rumen fermentation characteristics in pre- and post-weaning calves upon feeding with mulberry leaf flavonoids and *Candida tropicalis* individually or in combination as a supplement. *Animals*, 9, 990.
- Kristensen, N. B., Sehested, J., Jensen, S. K., and Vestergaard, M. 2007. Effect of milk allowance on concentrate intake, ruminal environment, and ruminal development in milk-fed Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 90, 4346–4355.
- Kumar, U., Sareen, V. K., and Singh, S. 1997. Effect of yeast culture supplement on ruminal microbial populations and metabolism in Buffalo calves fed high roughage diet. *Journal of the science of food and agriculture*, 73, 231–236.
- Kushibiki, S., Hodate, K., Shingu, H., Obara, Y., Touno, E., Shinoda, M., and Yokomizo, Y. 2003. Metabolic and lactational responses during recombinant bovine tumor necrosis factor- α treatment in lactating cows. *Journal of Dairy Science*, 86, 819–827.
- Kushibiki, S., Shingu, H., Komatsu, T., Itoh, F., Kasuya, E., Aso, H., and Hodate, K. 2006. Effect of recombinant bovine tumor necrosis factor- α on hormone release in lactating cows. *Animal Science Journal*, 77, 603–612.
- Laarman, A. H. and Oba, M. 2011. *Short communication*: Effect of calf starter on rumen pH of Holstein dairy calves at weaning. *Journal of Dairy Science*, 94, 5661–5664.
- Laarman, A. H., Sugino, T., and Oba, M. 2012. Effects of starch content of calf starter on growth and rumen pH in Holstein calves during the weaning

- transition. *Journal of Dairy Science*, 95, 4478–4487.
- Larsson, A., Bålöw, R. M., Lindahl, T. L., and Forsberg, P. O. 1993. Chicken antibodies: taking advantage of evolution-a review. *Poultry Science*, 72, 1807–1812.
- Lesmeister, K. E., Heinrichs, A. J., and Gabler, M. T. 2004. Effects of supplemental yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) culture on rumen development, growth characteristics, and blood parameters in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 87, 1832–1839.
- Li, S., Khafipour, E., Krause, D. O., Kroecker, A., Rodriguez-Lecompte, J. C., Gozho, G. N., and Plaizier, J. C. 2012. Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 95, 294–303.
- Li, W., Gelsinger, S., Edwards, A., Riehle, C., and Koch, D. 2019. Changes in meta-transcriptome of rumen epimural microbial community and liver transcriptome in young calves with feed induced acidosis. *Scientific Reports*, 9, 18967.
- Li, X., Yao, Y., Wang, X., Zhen, Y., Thacker, P. A., Wang, L., Shi, M., Zhao, J., Zong, Y., and Xu, Y. 2016. Chicken egg yolk antibodies (IgY) modulate the intestinal mucosal immune response in a mouse model of *Salmonella typhimurium* infection. *International Immunopharmacology*, 36, 305–314.
- Lila, Z. A., Mohammed, N., Yasui, T., Kurokawa, Y., Kanda, S., and Itabashi, H. 2004. Effects of a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells on mixed ruminal microorganism fermentation in vitro. *Journal of Animal Science*, 82, 1847–1854.
- Magalhães, V. J. A., Susca, F., Lima, F. S., Branco, A. F., Yoon, I., and Santos, J. E. P. 2008. Effect of feeding yeast culture on performance, health, and immunocompetence of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 91, 1497–1509.

- Marchesini, G., Nardi, R. D., Giancesella, M., Stefani, A-L., Morgante, M., Barberio, A., Andrighetto, I., and Segato, S. 2013. Effect of induced ruminal acidosis on blood variables in heifers. *BMC Veterinary Research*, 9, 98.
- Marino, C. T., Otero, W. G., Rodrigues, P. H. M., DiCostanzo, A., Millen, D. D., Pacheco, R. L. D., DiLorenzo, N., Martins, C. L., and Arrigoni, M. D. B. 2011. Effects of adding polyclonal antibody preparations on ruminal fermentation patterns and digestibility of cows fed different energy sources. *Journal of Animal Science*, 89, 3228–3235.
- Martin, W. G. and Cook, W. H. 1958. Preparation and molecular weight of gamma-livetin from egg yolk. *Canadian Journal of Biotechnology and Physiology*, 36, 153–160.
- Matsunaga, N., Goka, T., Nam, K. T., Oda, S., Ohneda, A., and Sasaki, Y. 1997. Inhibition of GH releasing factor (GRF)-induced GH secretion by intraruminal infusion of volatile fatty acids (VFA) in sheep. *Endocrine Journal*. 44, 133–140.
- McAllister, T. A., Beauchemin, K. A., Alazzeah, A. Y., Baah, J., Teather, R. M., and Stanford, K. 2011. Review: The use of direct fed microbials to mitigate pathogens and enhance production in cattle. *Canadian Journal of Animal Science*, 91, 193–211.
- McCurdy, D. E., Wilkins, K. R., Hiltz, R. L., Moreland, S., Klanderman, K., and Laarman, A. H. 2019. Effects of supplemental butyrate and weaning on rumen fermentation in Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 102, 8874–8882.
- McGuire, M. A., Dwyer, D. A., Harrell, R. J., and Bauman, D. E. 1995. Insulin regulates circulating insulin-like growth factors and some of their binding proteins in lactating cows. *American Journal of Physiology*, 269, E723–E730.

- Minato, H., Otsuka, M., Shirasaka, S., Itabashi, H., and Mitsumori, M. 1992. Colonization of microorganisms in the rumen of young calves. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 38, 447–456
- Motoi, Y., Oohashi, T., Hirose, H., Hiramatsu, M., Miyazaki, S., Nagasawa, S., and Takahashi, J. 1993. Turbidimetric-kinetic assay of endotoxin in rumen fluid or serum of cattle fed rations containing various levels of rolled barley. *Journal of Veterinary Medical Science*, 55, 19-25.
- Mutsvangwa, T., Edwards, I. E., Topps, J. H, and Paterson, G. F. M. 1992. The effect of dietary inclusion of yeast culture (Yea-Sacc) on patterns of rumen fermentation, food intake and growth of intensively fed bulls. *Animal Production*, 55, 35–40.
- Nakamura, S., Haga, S., Kimura, K., and Matsuyama, S. 2018. Propionate and butyrate induce gene expression of monocarboxylate transporter 4 and cluster of differentiation 147 in cultured rumen epithelial cells derived from preweaning dairy calves. *Journal of Animal Science*, 96, 4902–4911.
- Newbold, C. J., Wallace, R. J., Chen, X. B., and McIntosh, F. M. 1995. Different strains of *Saccharomyces cerevisiae* differ in their effects on ruminal bacterial numbers in vitro and in sheep. *Journal of Dairy Science*, 73, 1811–1818.
- Nocek, J. E. 1997. Bovine acidosis: implications on laminitis. *Journal of Dairy Science*, 80, 1005–1028.
- 農林水産省. 2020. 令和元年度 食料・農業・農村白書. 農林水産省, 東京. [cited 16. June 2020]. Available from URL: https://www.maff.go.jp/j/wpaper/w_maff/r1/attach/pdf/zenbun-2.pdf
- Omidi-Mirzaei, H., Azarfar, A., Mizaei, M., Kiani, A., and Ghaffari, M. H. 2018. Effects of forage source and forage particle size as a free-choice provision on growth performance, rumen fermentation, and behavior of dairy calves fed texturized starters. *Journal of Dairy Science*, 101, 4143–4157.

- 大場真人. 2011. 乳用子牛の離乳移行期の栄養管理. 産業動物臨床医学雑誌, 2, 161–168.
- 大坂郁夫. 2016. 早期離乳を基本とした乳用子牛の液状飼料期、移行期および反芻期における総合的な飼養方法の再構築. 北海道大学大学院農学院学位論文, doi: 10.14943/doctoral.r6988
- Özpinar, H., Erhard, M. H., Aytug, N., Özpinar, A., Baklaci, C., Karamüptüoğlu, S., Hofmann, A., and Lösch, U. 1996. Dose-dependent effects of specific egg-yolk antibodies on diarrhea of newborn calves. Preventive Veterinary Medicine. 27, 67–73.
- Panda, A. K., Singh, R., and Pathak, N. N. 1995. Effect of dietary inclusion of *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance of crossbred calves. Journal of Applied Animal Research, 7, 195–200.
- Park, H. S., Park, K. II., Nagappan, A., Lee, D. H., Kang, S. R., Kim, J. A., Kim, E. H., Han, D. Y., and Kim, G. S. 2011. Proteomic analysis of effects on natural herb additive containing immunoglobulin Yolksac (IgY) in pigs. The American Journal of Chinese Medicine, 39, 477–488.
- Pinos-Rodríguez, J. M., Robinson, P. H., Ortega, M. E., Berry, S. L., Mendoza, G., and Bárcena, R. 2008. Performance and rumen fermentation of dairy calves supplemented with *Saccharomyces cerevisiae*¹⁰⁷⁷ or *Saccharomyces boulardii*¹⁰⁷⁹. Animal Feed Science and Technology, 140, 223–232.
- Plaizier, J. C., Krause, D. O., Gozho, G. N., and McBride, B. W. 2009. Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences. The Veterinary Journal, 176, 21–31.
- Quadis, A. Q., Goya, S., Ikuta, K., Yatsu, M., Kimura, A., Nakanishi, S., and Sato, S. 2014. Effects of a bacteria-based probiotic on ruminal pH, volatile fatty acids and bacterial flora of Holstein calves. Journal of Veterinary Medical Science, 76, 877–885.

- Quezada-Tristán, T., García-Flor, V. L., Ortiz-Martínez, R., Arredondo-Figueroa, J. L., Medina-Esparza, L. E., Valdivia-Flores, A. G., and Montoya-Navarrete, A. L. 2014. Biochemical parameters in the blood of Holstein calves given immunoglobulin Y-supplemented colostrums. *BMC Veterinary Research*, 10, 159.
- Quigley, III, J. D., Wallis, L. B., Dowlen, H. H., and Heitmann, R. N. 1992. Sodium bicarbonate and yeast culture effects on ruminal fermentation, growth, and intake in dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 75, 3531–3538.
- Quigley, III, J. D., Steen, T. M., and Boehms, S. I. 1992. Postprandial changes of selected blood and ruminal metabolites in ruminating calves fed diets with or without hay. *Journal of Dairy Science*, 75, 228–235.
- 齋藤昭. 2012. 哺育子牛の栄養と飼養管理の変遷 ～“強化”哺育への道程～. *家畜感染症学会誌*, 1, 37–47.
- Sano, H., Arai, H., Takahashi, A., Takahashi, H., and Terashima, Y. 1999. Insulin and glucagon responses to intravenous injections of glucose, arginine and propionate in lactating cows and growing calves. *Canadian Journal of Animal Science*, 79, 309–314.
- Sato, S., Mizuguchi, H., Ito, K., Ikuta, K., Kimura, A., and Okada, K. 2012. Technical note: development and testing of a radio transmission pH measurement system for continuous monitoring of ruminal pH in cows. *Preventive Veterinary Medicine*, 103, 274–279.
- Schroedl, W., Kleessen, B., Jaekel, L., Shehata, A. A., and Krueger, M. 2014. Influence of the gut microbiota on blood acute-phase proteins. *Scandinavian journal of immunology*, 79, 299–304.
- Sharon, K. P., Liang, Y., Burdick Sanchez, N. C., Carrol, J. A., Broadway, P. R., Davis, E. M., and Ballou, M. A. 2019. Pre-weaning plane of nutrition and *Mannheimia haemolytica* dose influence inflammatory responses to a bovine

- herpesvirus-1 and *Mannheimia haemolytica* challenge in post-weaning Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 102, 9082–9096.
- Shi, W., Knoblock, C. E., Yoon, I., and Oba, M. 2019. Effects of supplementing a *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product during the transition period on rumen fermentation of dairy cows fed fresh diets differing in starch content. *Journal of Dairy Science*, 102, 9943–9955.
- Shimizu, M., Fitzsimmons, R. C., and Nakai, S. 1988. Anti-*E. Coli* immunoglobulin Y isolated from egg yolk of immunized chickens as a potential food ingredient. *Journal of Food Science*, 53, 1360–1366.
- Smith, J. M., and Van Amburgh, M. E. 2002. Effect of feeding conjugated linoleic acid and other fatty acids during the prepubertal period on the composition of growth and lactation yield of Holstein heifers. *Cornell Nutrition Conference*, East Syracuse, NY. Proceedings, pages 159–173.
- Smith, J. M., Van Amburgh, M.E., Díaz, M. C., Lucy, M.C., and Bauman, D. E. 2002. Effect of nutrient intake on the development of the somatotropic axis and its responsiveness to GH in Holstein calves. *Journal of Animal Science*, 80, 1528–1537.
- Soberon, F., Raffrenato, E. Everett, R. W., and Van Amburgh, M. E. 2012. Prewaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 95, 783–793.
- Soberon, F., and Van Amburgh, M. E. 2013. The effect of nutrient intake from milk or milk replacer of preweaned dairy calves on lactation milk yield as adults: A meta-analysis of current data. *Journal of Animal Science*, 91, 706–712.
- Stone, W. C. 2004. Nutritional approaches to minimize subacute ruminal acidosis and laminitis in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 87, E13–E26.

- Sugino, T., Hasegawa, Y., Kurose, Y., Kojima, M., Kanagawa, K., and Terashima, Y. 2004. Effects of Ghrelin on food intake and neuroendocrine function in sheep. *Animal Reproduction Science*, 82–83, 183–194.
- Suárez, B. J., Van Reenen, C. G., Gerrits, W. J. J., Stockhofe, N., van Vuuren, A. M., and Dijkstra, J. 2006. Effects of supplementing concentrates differing in carbohydrate composition in veal calf diets: II. Rumen development. *Journal of Dairy Science*, 89, 4376–4386.
- Suárez, B. J., Van Reenen, C. G., Stockhofe, N., Dijkstra, J., and Gerrits, W. J. J. 2007. Effect of roughage source and roughage to concentrate ratio on animal performance and rumen development in veal calves. *Journal of Dairy Science*, 90, 2390–2403.
- 食品機能性の科学編集委員会編. 食品機能性の科学. 2008. 産業技術サービスセンター, 東京.
- Tamate, H., McGilliard, A. D., Jacobson, N. L., and Getty, R. 1962. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. *Journal of Dairy Science*, 45, 408–420.
- Tan, X., Li, J., Li, Y., Li, J., Wang, Q., Fang, L., Ding, X., Huang, P., Yang, H., and Yin, Y. 2019. Effect of chicken egg yolk immunoglobulins on serum biochemical profiles and intestinal bacterial populations in early-weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103, 1503–1511.
- Uyeno, Y., Shigemori, S., and Shimosato, T. 2015. *Minireview* Effect of Probiotics/Prebiotics on cattle health and productivity. *Microbes and Environments*, 30, 126–132.
- Van Amburgh, M. E. 2003. A systematic approach to calf and heifer rearing: “Intensified” feeding and the target growth system. 6th Western Dairy Management Conference, March 12-14, Reno, NY. Proceedings, pages 59–68.

- Van Amburgh, M. E., Soberon, F., Karzses, and Everett, R. W. 2008. Early life nutrition and management impacts long-term productivity of calves. 23rd Annual Southwest Nutrition and Management Conference, Tucson, Arizona. Department of Animal Sciences, University of Arizona, Tucson. Proceedings, pages 1–8.
- Wallace, R. J., and Newbold, C. J. 1992. Probiotics for ruminants (*in Probiotics: The scientific basis*. Ed. by Fuller, R.). Chapman and Hall, London, pages 317–353.
- Watanabe, Y., Kim, Y-H., Kushibiki, S., Ikuta, K., Ichijo, T., and Sato, S. 2019. Effects of active dried *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and bacterial community during the short-term ruminal acidosis challenge model in Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 102, 6518–6531.
- Xiao, J. X., Alugongo, G. M., Chung, R., Dong, S. Z., Li, S. L., Yoon, I., Wu, Z. H., and Cao, Z. J. 2016. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: Ruminal fermentation, gastrointestinal morphology, and microbial community. *Journal of Dairy Science*, 99, 5401–5412.
- Xiao, J., Alugongo, G. M., Ji, S., Wu, Z., Dong, S., Li, S., Yoon, I., Chung, R., and Cao, Z. 2019. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on the microbial Community throughout the gastrointestinal Tract of Calves. *Animals*, 9, 4.
- Yokoyama, H., Peralta R. C., Sendo, S., Ikemori, Y., and Kodama, Y. 1993. Detection of passage and absorption of chicken egg yolk immunoglobulins in the gastrointestinal tract of pigs by use of enzyme-linked immunosorbent assay and fluorescent antibody testing. *American Journal of Veterinary Research*, 54, 867–872.
- Zhang, Q., Koser, S. L., and Donkin, S. S. 2016. Propionate induces mRNA

expression of gluconeogenic genes in bovine calf hepatocytes. *Journal of Dairy Science*, 99, 3908–3915.

Zhao, C., Liu, G., Li, X., Guan, Y., Wang, Y., Yuan, X., Sun, G., Wang, Z., and Li, X. 2018. Inflammatory mechanism of Rumenitis in dairy cows with subacute ruminal acidosis. *BMC veterinary research*, 14, 135.

Zhen, Y. H., Fang, R., Ding, C., Jin, L. J., Li, X. Y., Diao, Y. P., Shu, X. H., Ma, X. C., and Xu, Y. P. 2011. Efficacy of specific IgY for treatment of lipopolysaccharide-induced endotoxemia using a mouse model. *Journal of Applied Microbiology*, 111, 1524–1532.

Zúñiga, A., Yokoyama, H., Albicker-Rippinger, P., Eggenberger, E., and Bertschinger, H. U. 1997. Reduced intestinal colonization with F18-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* in weaned pigs fed chicken egg antibody against the fimbriae. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 18, 153–161.

謝 辞

本論文の作成に当たり、終始ご懇切なるご教示とご校閲を賜りました筑波大学大学院生命環境科学研究科先端農業技術科学専攻の櫛引史郎教授に深甚なる万謝の意を表します。また、同大学大学院生命環境科学研究科先端農業技術専攻の三森眞琴教授、田島清准教授、同大学大学院生命環境科学研究科生物圏資源科学専攻の田島淳史教授に貴重なご意見を戴き心から感謝の意を表します。

本研究を進めるにあたり、多大なご協力と有益なご教示を戴きました岩手大学農学部佐藤繁教授、一條俊浩准教授、木村淳特任助教、ならびに Kim Yo-Han 特別研究員、無線伝送式 pH センサーの利用について有益なご助言とご協力を戴きました山形東亜 DKK 株式会社ならびに岩手大学研究支援・産学連携センターの水口人史客員教授、胃液成分の分析とデータの解析について有益なご教示とご協力を戴きました兵庫県立淡路農業技術センターの生田健太郎博士、血漿成分の分析について有益なご教示とご協力を戴きました広島大学大学院生物圏科学研究科の杉野利久准教授ならびに農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センターの新宮博行博士、データの解析について有益なご教示とご協力を戴きました明治飼料株式会社研究開発部の寺田文典博士、本研究で供試した SC をご提供戴きましたラレマンドバイオテック株式会社、ならびに IgY をご提供戴きました株式会社イーダブルニュートリション・ジャパンに深く感謝の意を表します。