

乳用子ウシの発育に対するセロオリゴ糖およびシンバイオティクスの
給与効果に関する研究

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

蓮沼俊哉

目 次

第Ⅰ章 緒論	
1. 哺育期の乳用子ウシの特性	1
2. プロバイオティクスとプレバイオティクスに関する既往の研究	6
3. 本研究の目的と概要	9
4. 図表	10
5. キーワード	12
6. 略語	13
第Ⅱ章 乳用子ウシにおけるセロオリゴ糖およびシンバイオティクスの生理作用の解析	
1. 目的	14
2. 材料および方法	16
3. 結果	19
4. 考察	20
5. 要約	23
6. 図表	24
第Ⅲ章 抗菌性物質非含有代用乳へのシンバイオティクスの添加効果	
1. 目的	31
2. 材料および方法	33
3. 結果	36
4. 考察	38
5. 要約	41
6. 図表	42
第Ⅳ章 代用乳へのセロオリゴ糖添加による発育への影響	
1. 目的	48
2. 材料および方法	49
3. 結果	52
4. 考察	53
5. 要約	56
6. 図表	57
第Ⅴ章 総括	66
引用文献	71
謝 辞	82

第 I 章 緒論

1. 哺育期の乳用子ウシの特性

酪農は、ヒトが食料として利用できない資源をウシに給餌して、乳や乳製品等の形でヒトに食料を供給するのが本来の姿である。また、酪農は飼料生産による水田の有効利用を通じた農地や環境の維持に貢献すると同時に、地域を支える重要な産業、そして食育の場であるなど、様々な役割・機能を有している。こうした酪農の役割や機能を維持・発展させていくためには、輸入飼料への依存体質から脱却して、自給飼料を有効活用し、食料自給率の向上と環境負荷の低減、資源循環に資する産業に転換する必要がある。そのためには、地域や経営における生産条件を基盤に、生産者の創意工夫や主体性を活かした多様な経営の実現を図らなければならない（農林水産省生産局畜産部畜産企画課 2010a）。しかし、わが国の酪農の現状は、乳牛の泌乳能力が飛躍的に向上した反面、初回授精受胎率の低下や分娩間隔の延長などの繁殖成績が低下している。また、向上した泌乳能力を十分に発揮させるためには、輸入に依存している穀類飼料を多給しなければならない。これら要因が生産コストの上昇や、産業としての酪農全体の生産性低下を招き、酪農経営を困難なものにしている。このような状況から、酪農においては健全な飼養管理と採算性の両立が不可欠である。

近年の原油価格高騰に連動したトウモロコシ価格の高騰は、わが国の酪農経営における飼料基盤の脆弱さを露呈するとともに採算性の悪化を招いている。このことから、自給粗飼料の生産および利用拡大による飼料自給率の向上が急務であると考えられるようになった。自給粗飼料中心の飼料体系にするためには、繊維消化性が高くかつ粗飼料を食い込める子ウシの育成技術の確立が必要である。また、2009年の初産分娩月齢の平均は26ヶ月であるが、家畜改良増殖

目標では24ヶ月を目標としている(農林水産省生産局畜産部畜産企画課 2010b)。しかしながら、給与飼料中の蛋白質含量を高めることにより育成前期に著しく高い増体をさせた場合、初産時の泌乳量は分娩月齢が23ヶ月齢のウシより21ヶ月齢のウシの方が減少することが指摘されている(Ishiiら印刷中)。このことから、濃厚飼料給与量を減らして、さらに初産分娩月齢を24ヶ月程度として初産泌乳量を低下させないためには、哺育期の発育停滞や損耗率を低減させるとともに適正な高増体を目指す飼養管理が必要である。このためには、乳用子ウシの消化管の発達を促進するとともに、繊維消化性の高い微生物叢を早期に定着させることが重要と考えられる。

乳用子ウシの病傷事故別件数は、平成19年度家畜共済統計表(農林水産省経営局保険課保険数理室 2009)によると消化器病が58,164頭(48.6%)と最も多く、中でも下痢を主徴とする感染性腸炎が45,245頭(77.8%)でその予防が重要であると考えられる。子ウシの下痢発生原因の多くは不適切な飼養管理にあり、劣悪な飼養環境や初乳給与不足、栄養不良、牛乳の過剰摂取、感染症などが単独もしくは複合的に作用して発生する(小倉 1999)。この時期の下痢の発生は発育の停滞をもたらし、その後の生産性に影響を及ぼすことから経済的損失が大きい。現状での下痢への対策はワクチンや抗菌性物質による予防や治療が中心である。また、国内で市販されている代用乳には、発育促進目的として抗菌性物質が添加されている。しかし、予防目的の抗菌性物質の多用は薬剤耐性菌の出現を引き起こし、治療のための抗菌性物質多用も新たな感染症を引き起こし易い(Abeら 1995; Cruywagenら 1996; Donovanら 2002; Quigleyら 2002)。近年、ヨーロッパにおいては抗菌性飼料添加物の規制が強化され(福本 2003)、加えて世界保健機構(WHO)は、食用動物における抗菌性物質の使用は慎重にすべきと勧告している(WHO 2000)。以上のことを背景として、国外では多くの抗菌性飼料添加物代替品の研究が行われている(Donovanら 2002; Heinrichs

ら 2003 ; Berge ら 2005)。国内においても昭和 51 年に「飼料の安全性確保および品質の改善に関する法律」(飼料安全法)が施行され、生菌剤や乳酸菌発酵物が家畜・家禽の発育促進や下痢の予防・治療目的で使用されるようになり、その有効性が示唆されている(光岡 1978a ; 1978b)。実際、富山県では哺育牛の損耗防止のために発酵初乳を給与する指導を行い、良好な成績を得ている(松村ら 1984)。

一方、子ウシは妊娠中には母体からの免疫グロブリン (immunoglobulin ; Ig) の獲得がなく、誕生直後に初乳を介して得られる Ig-G を腸管から吸収することによって自身の感染防御に役立っている(小岩 1999 ; 大塚 2001)。分娩 1 日目の乳汁中 Ig-G 濃度は約 3000 mg/100mL であるが、3 日後には約 50 mg/100mL に減少する(加藤と小原 2006)。吸収された初乳中の Ig は、子ウシの体内で移行抗体として働き、液性免疫応答において最も重要な物質であるとされている。また、好中球を活性化させる腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α ; TNF- α) や、リンパ球および単球を活性化させるインターロイキン (interleukin ; IL) -1 とインターフェロン (interferon ; IFN) などの細胞性免疫活性物質であるサイトカインも初乳中に含まれていることが知られている(Hagiwara ら 2000 ; 加藤と小原 2006)。以上のことから、子ウシは初乳を介して Ig による液性免疫を得るとともに、初乳に含まれるサイトカインによって細胞性免疫を活性化すると考えられる。子ウシは、受動免疫から能動免疫に移行する重要な時期であるが、免疫応答が不十分である場合もあり、生体機能の変調を起こしやすい。

生後数週間の子ウシではルーメンが形態的に発達しておらず、第四胃が胃の大部分を占め、哺乳したミルクは第二・第三胃溝を介して第三胃以降に運ばれる(小原 2006)。子ウシのルーメンの発達は、粘膜と筋層の成長を刺激するルーメン内の粗剛な物質と、ルーメン内の微生物発酵によって産生される揮発性脂肪酸 (volatile fatty acid ; VFA) の両方に依存しているとされている(Tamate

ら 1962)。生後 4～6 週齢にかけてルーメンは大きく発達するとともに機能的にもその働きを開始し、ルーメン内の微生物発酵により摂取した粗飼料から VFA を産生するようになり、反芻家畜独特の消化機能を持つようになる (小原 2006)。以上のことから、離乳はこの時期に行うのが最適とされ (小原 2006)、子ウシの飼料は、離乳前後で液状から固形へと著しく変化する。

このように、離乳前後の子ウシは免疫機能や摂取飼料が大きく変化する時期であることから様々な要因が複合的に作用して下痢が発生しやすく、その対策が求められている。当面する対応として、抗菌性物質に依存せず子ウシの生体機能を向上させる飼養法の確立が求められている。

一方、動物の身体内諸器官の機能は、血液によって運ばれる諸種のホルモンによって調節されている。成長に関係するホルモンは、成長ホルモン (growth hormone ; GH) やインスリンなどが挙げられる (真島 1986)。

GH は標的器官に対する直接作用と、インスリン様成長因子 - I (insulin-like growth factor-I ; IGF-I) の産生を介する間接作用の 2 つの面をもっており、成長促進作用、蛋白質同化作用、脂肪異化作用などの生理作用を示す (甫立 1998)。GH は肝臓にある GH 受容体と結合することにより、IGF-I の合成を促進し、肝臓から IGF-I を分泌させる (Gluckman ら 1987)。ホルスタイン雄子ウシを用いて離乳前後で比較した研究では、離乳後の血漿 GH 濃度が離乳前より減少し、GH 放出ホルモンや GH 分泌刺激ペプチドによる GH 分泌も同様に低下した。この GH 分泌能の低下は、離乳せずにミルクのみで飼育した 13 週齢の子ウシでも認められることから、加齢が GH 抑制効果を起こすと考えられている (Katoh ら 2004)。さらに、子ウシの栄養状態が血中 GH 濃度に影響することも知られている (Thomas ら 1990 ; Matsuzaki ら 2001 ; Takahashi ら 2008)。成ヒツジへの高エネルギー飼料給与は GH 濃度を抑制し、逆に、飢餓や低栄養は GH 濃度を増大する (加藤 2006)。

インスリンは、糖質、脂質、および蛋白質代謝において極めて強い同化作用をもち、物質代謝の恒常性の調節における要のホルモンである（甫立 1998）。反芻動物における炭水化物代謝の特徴は、摂取した飼料中の炭水化物を微生物発酵により VFA に変え、これをエネルギー源として利用していることである（小原 2004）。このため、離乳後のウシは生体機能の維持、成長に必要なグルコースを糖新生によって賄わなければならない。このように、糖代謝を調節するインスリンは成長の過程において重要なホルモンであると考えられる。インスリンは子ウシの栄養摂取量を高めると上昇する（Smith ら 2002 ; Bartlett ら 2006 ; Kamiya ら 2009）。また、VFA は GH 分泌を抑制し、インスリン分泌を刺激することが報告されている（Matsunaga ら 1999）。

病原体の侵入、高温などの物理的障害、あるいは化学物質による障害など、生体にとって有害な刺激に対して、生体は急性反応性シグナルとして炎症性サイトカインを産生する。例えば、生体に侵入した細菌のリポ多糖（lipopolysaccharide ; LPS）がマクロファージに結合すると、マクロファージは IL-1 や TNF- α を産生する（井本と西郷 2007）。ホルスタイン種育成牛に TNF- α を投与した試験では、血漿インスリン濃度は一過性に上昇し、血漿 GH 濃度は二峰性に上昇すると報告がある（Kushibiki ら 2000）。

このように、GH、インスリン、および IGF-I は、子ウシの発育、栄養摂取、加齢、および炎症にともなう異常反応と密接に関連する内分泌物質である。したがって、子ウシのルーメンの発達が大きく変化する離乳前後に GH、インスリン、および IGF-I を解析することは、反芻動物の生体機能と内分泌機能の関係の解明に重要であると考えられる。

2. プレバイオティクスとプロバイオティクスに関する既往の研究

子ウシの下痢を抑えて発育を向上させるには、下部消化管における病原性大腸菌を減らすなどの腸内環境の改善が考えられる。腸内細菌叢を整える方法としては、①有害菌の増殖を抑制することと、②有用菌を増殖させることが挙げられる。宿主（ヒトや家畜、家禽など）の腸内細菌叢を整えることで発育促進と飼料効率の改善効果を期待する物質としては、プロバイオティクスとプレバイオティクスが広く知られている（伊藤 2003；安田 2008）。プロバイオティクスという言葉は、最初はある種の前虫によって産生される他の前虫の増殖促進物質という意味で用いられた（Lilly と Stillwell 1965）。その後、プロバイオティクスは、宿主の腸内細菌叢の制御を通して宿主に有効な影響をもたらす物質と定義された（Parker 1974）。現在では、宿主の腸内細菌叢のバランスを改善することにより、宿主に保健効果の示す生きた微生物と定義されている（Fuller 1989）。また、プレバイオティクスは、腸内に生息している有用微生物の増殖を促進し、その活性を高めることにより宿主に有益な効果をもたらす難消化性の食物成分と定義されている（Gibson と Roberfroid 1995）。

難消化性オリゴ糖は、上部消化管で消化吸収されず、下部消化管において腸内細菌によって利用されることからプレバイオティクスとして作用すると考えられている（渡辺 1998；Van Loo ら 1999）。難消化性オリゴ糖には、キシロオリゴ糖、ガラクトオリゴ糖、フラクトオリゴ糖、およびマンナンオリゴ糖などがある（Van Loo 1999）。このうち、フラクトオリゴ糖やマンナンオリゴ糖は、代用乳に混合して子ウシに給与することにより、成長促進および下痢防止効果が認められている（Donovan ら 2002；Quigley ら 2002；Heinrichs ら 2003）。一方、セルロースは地球上に最も多量に存在する多糖であり、セルロースの β -1-4 結合を残したセロオリゴ糖（cellooligosaccharide；CE；図 1.1）は、難消化性オ

リゴ糖に分類される（里内ら 1996；渡辺 1998）。しかし、CE を子ウシに給与して生体に及ぼす影響を検討した報告はない。*In vitro* 研究では、CE のひとつであるセロビオースはルーメン内細菌による有機酸の発酵に影響することが示されている（Callaway と Martin 1997；Lila ら 2006）。また、ルーメン内のセルロース分解菌である *Fibrobacter succinogenes* や *Ruminococcus flavefaciens* は、CE の主成分であるセロビオースを利用する（三森と湊 2004）。これらのことから、CE は子ウシへ給与することにより消化管機能を向上させて、繊維消化率の向上や成長促進効果が期待できる。近年、工業レベルでの CE の供給が可能となったことから、畜産分野でも CE の有効性を応用する研究が始まっている（把田 2008）。

プロバイオティクスである *Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属などの乳酸菌の子ウシへの給与は、体重増加や下痢防止効果があることが認められている（Abe ら 1995；Cruywagen ら 1996）。しかしながら、プロバイオティクスを摂取しても腸内細菌との競合があり、腸管内での十分な生育や定着を期待することが難しい場合もある（Ogawa ら 2005a）。一方、乳酸菌を含む有用菌の生育を促進するプレバイオティクスとしては、ラクチュロース、ガラクトオリゴ糖、およびフラクトオリゴ糖などが知られている（MacGillivray ら 1959；Rowland と Tanaka 1993；Gibson と Wang 1994）。そこで、腸内細菌と栄養源を競合してしまふ弱点を補う手法としてプレバイオティクスとプロバイオティクスを組合せて利用することが考えられ、これらの組合せを Gibson と Roberfroid（1995）はシンバイオティクスと提唱した。デキストランを単独で使用した場合、ニワトリ初生ヒナにおいて *Salmonella Enteritidis* 定着抑制効果（深田ら 1999）、ブタにおいて体重増加向上効果（田島ら 2000）、そして黒毛和種去勢牛において体重増加向上と下痢防止効果（佐藤 2001）が認められている。また、デキストランと *Lactobacillus casei* subsp. *casei* JCM1134^T 株からなるシンバイオティクス

(synbiotics ; SB ; 図 1.2) は、マウス (Ogawa ら 2005b) および採卵鶏 (Ogawa ら 2006a) において免疫機能の増強作用、マウスとヒトにおいてアレルギー抑制効果 (Ogawa ら 2006b)、暑熱下におけるホルスタイン種泌乳牛の乳量低下抑制の効果が報告されている (Yasuda ら 2007)。

しかしながら、消化管機能を向上させ、繊維消化率の向上や成長促進効果が期待できるプレバイオティクスである CE の乳用子ウシへの効果については報告がない。また、プレバイオティクスとプロバイオティクスの弱点を補い、消化管内細菌叢を整え、下痢防止効果や成長促進効果が期待できる SB の乳用子ウシへの効果についても、その有効性は不明である。

3. 本研究の目的と概要

乳用牛の育成は、泌乳を開始する前の飼養期間であり、収益を生まないことから、その飼養管理についてはあまり注意が払われてこなかった。しかし最近、経営全体としてのコスト削減の観点に加えて生涯生産性の向上や良質自給粗飼料の活用の観点から、この時期の飼養管理改善の重要性がクローズアップされている（寺田 2006）。そこで、乳用子ウシの育成において高栄養飼料給与による発育促進ではなく、ルーメンや下部消化管における微生物叢を制御することにより生体機能を向上させて発育促進につなげる飼養法の検討は、子ウシの健全な発育とともに下痢予防のための抗菌性物質の削減にも寄与すると考えられる。また、この飼養法は、子ウシ本来の生理反応に依拠した発育に伴う生体機能の解明についても可能となると考えられる。

本論文では、これらの観点に立ち、第Ⅱ章において乳用子ウシにおける CE および SB の飼料添加物としての効果およびそれに対する子ウシの生理作用を解析するため、全乳給与時の発育と腸内細菌叢および内分泌機能にどのような影響があるかについて考察した。第Ⅲ章では、実際の酪農現場では代用乳を給与することが多いことから、抗菌性物質非含有代用乳を特別に製造して、SB の添加効果を考察した。そして、第Ⅳ章では、同様に抗菌性物質非含有代用乳への CE 添加による発育への影響について考察した。

4. 図



図 1.1 セロオリゴ糖 (CE)

セロビオース 90%以上含有 (日本製紙ケミカル株式会社、東京)

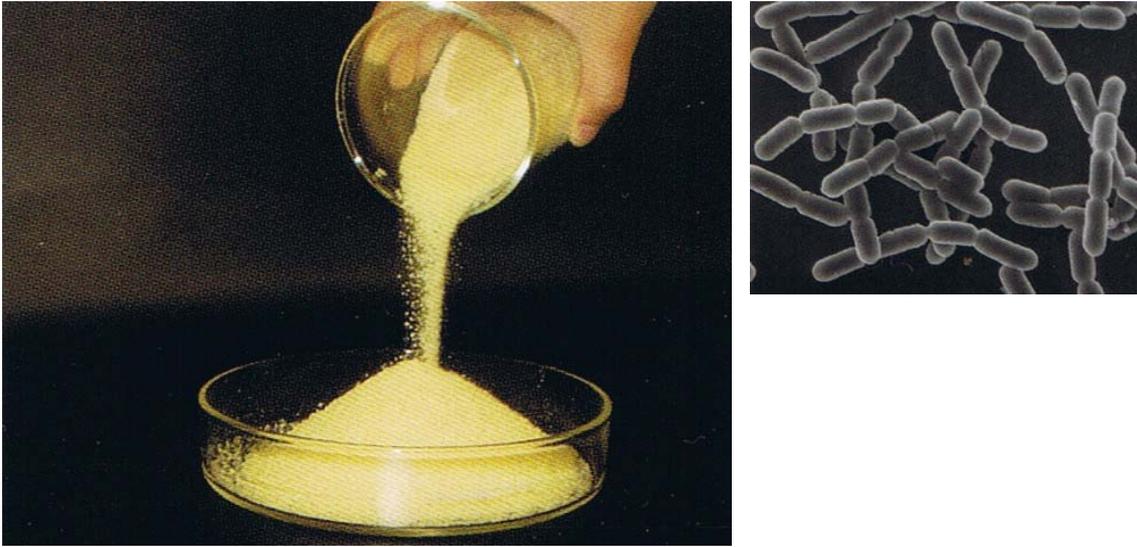


図 1.2 シンバイオティクス (SB)

デキストラン (名糖産業株式会社、清須) と *Lactobacillus casei* subsp. *casei* strain JCM1134^T の混合物 (独立行政法人理化学研究所、和光)

5. キーワード

セロオリゴ糖 (cellooligosaccharide ; CE)

セルロースをグルコースまで加水分解するのではなく β -1-4 結合を残したセロオリゴ糖は、難消化性オリゴ糖に分類される (里内ら 1996 ; 渡辺 1998)。

難消化性オリゴ糖 (nondigestible oligosaccharides ; NDO)

フラクトオリゴ糖やマンナンオリゴ糖といった難消化性オリゴ糖は、上部消化管で消化吸収されず、下部消化管において腸内細菌によって利用され生体に様々な生理的作用を及ぼす (渡辺 1998 ; Van Loo ら 1999)。

プレバイオティクス (prebiotics)

プレバイオティクスとは、腸内に生息している有用微生物の増殖を促進し、その活性を高めることにより宿主に有益な効果をもたらす難消化性の食物成分 (Gibson と Roberfroid 1995)。

プロバイオティクス (probiotics)

プロバイオティクスとは、宿主の腸内細菌叢のバランスを改善することにより、宿主に保健効果の示す生きた微生物 (Fuller 1989)。

シンバイオティクス (synbiotics ; SB)

シンバイオティクスとは、プレバイオティクスとプロバイオティクスの弱点を補うべく、両者を組合せて利用すること (Gibson と Roberfroid 1995)。

6. 略語

抗菌性物質 (antibiotics ; AB)

コロニー形成単位 (colony-forming units ; cfu)

日増体量 (daily body weight gain ; DG)

成長ホルモン (growth hormone ; GH)

免疫グロブリン (immunoglobulin ; Ig)

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)

Lactobacillus casei subsp. *casei* strain JCM1134^T (Lcc)

リポ多糖 (lipopolysaccharide ; LPS)

ラジオイムノアッセイ (radioimmunoassay ; RIA)

リボソーム (ribosome ; r)

腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor- α ; TNF- α)

揮発性脂肪酸 (volatile fatty acid ; VFA)

第Ⅱ章 乳用子ウシにおけるセロオリゴ糖およびシンバイオティクスの生理作用の解析

1. 目的

難消化性オリゴ糖は、上部消化管で消化吸収されず、下部消化管において腸内細菌によって利用されプレバイオティクスとして作用すると考えられている（渡辺 1998 ; Van Loo ら 1999）。難消化性オリゴ糖のうち、フラクトオリゴ糖やマンナンオリゴ糖は、代用乳に混合して子ウシに給与することにより、成長促進および下痢防止効果が認められている（Donovan ら 2002; Quigley ら 2002; Heinrichs ら 2003）。セルロースの β -1-4 結合を残した CE は、難消化性オリゴ糖に分類される（里内ら 1996 ; 渡辺 1998）。離乳ブタへの CE 給与は、日増体量（daily body weight gain ; DG）を向上させることが報告されている（Otsuka ら 2004）。*In vitro* 研究では、CE はルーメン内細菌による有機酸の発酵に影響することが示されている（Callaway と Martin 1997 ; Lila ら 2006）。しかし、CE 給与がルーメンの未発達な子ウシへ与える影響は明らかではない。

一方、腸内細菌のうちプロバイオティクスとして知られる *Bifidobacterium* 属や *Lactobacillus* 属などの乳酸菌を子ウシに給与することは、DG と糞便状態を向上させることが認められている（Abe ら 1995 ; Cruywagen ら 1996）。これに対して、*Lactobacillus* 属を含む微生物濃縮物の子ウシへの給与は、成長への有意な効果が無かったとの報告もある（Jenny ら 1991）。プロバイオティクスの栄養源である糖類は、他の多くの腸内細菌にも利用されるためプロバイオティクスと栄養源を競合してしまう。その弱点を補うべくプレバイオティクスとプロバイオティクスを組合せて利用するシンバイオティクスが考えられた（Gibson と Roberfroid 1995）。プロバイオティクスである乳酸菌とこの乳酸菌の特異的な基

質とを組み合わせることが考えられる。最近の研究では、*Lactobacillus casei* subsp. *casei* のある 2 菌株は、デキストランを特異的に資化することが明らかにされ (Ogawa ら 2005a)、デキストランと *Lactobacillus casei* subsp. *casei* strain JCM1134^T (SB) の混合物は、マウスにおいて免疫機能の増強作用があり (Ogawa ら 2005b)、ホルスタイン種泌乳牛において暑熱下における乳量低下抑制効果があることが報告されている (Yasuda ら 2007)。

そこで本章では、CE および SB の飼料添加物としての効果を乳用子ウシで検証することを目的として、CE および SB を離乳までは全乳に溶解し、離乳後は温水に溶解して給与することにより、発育、腸内細菌叢、および内分泌機能への影響について検討した。

2. 材料および方法

1) 供試動物と飼養管理

供試動物は、富山県農林水産総合技術センター、千葉県畜産総合研究センター、愛知県農業総合試験場、石川県畜産総合センター、茨城県畜産センター、および神奈川県農業技術センターの各研究機関で生産され、生後 30 分以内に初乳を摂取したホルスタイン種雌子ウシ 52 頭である。これらの子ウシを以下の 3 区に分け、試験を実施した。CE を給与した CE 区 (n = 16)、SB を給与した SB 区 (n = 18)、および添加物を給与しなかった対照区 (n = 18)。試験期間は、生後から 90 日齢までとした。また、動物の飼育および動物を使用した実験については、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所のガイドラインに従って実施した。

哺乳は、生時体重から DG として 0.4 kg が得られるのに必要な量（農林水産省農林水産技術会議事務局編 1999）の全乳を算定した。この量を午前 9 時と午後 4 時に、哺乳瓶またはニップル付きバケツを用いて離乳まで行った。CE 区については、1 日当り 5 g の CE（セロビオース 90%以上含有、日本製紙ケミカル株式会社、東京）を全乳に溶解して給与し、SB 区については、1 日当り 5 g のデキストラン（名糖産業株式会社、清須）と 1.0×10^9 colony-forming units (cfu) の *Lactobacillus casei* subsp. *casei* strain JCM1134^T（Lcc；独立行政法人理化学研究所、和光）を全乳に溶解して給与した。離乳後は、同量の CE または SB を温水に溶解して給与した。水と抗菌性物質非含有の人工乳（ニューメイクスター；全国酪農飼料株式会社、東京）およびチモシー乾草（1 番草、出穂期、カナダ）は自由摂取とした。離乳は、人工乳を 800 g/日摂取した時点で行い、離乳後の人工乳は 2400 g/日を上限に増給した。人工乳とチモシー乾草は、隔週で試料を採

取し 2 か月分の試料の栄養成分を分析した（藤田 2001、表 2.1）。

体重は、午前 9 時の給餌前に週 1 回測定した。血液は、0 日齢、7 日齢、21 日齢、35 日齢、離乳時、および 90 日齢において、午前 9 時の給餌前にヘパリン添加採血管（テルモ株式会社、東京）を用いて頸静脈より採取した。血液は、採血後直ちに、遠心分離（20000 g、30 分間、4°C）で血漿を分離後、分析まで-20°C で保存した。直腸糞の採取は、0 日齢、35 日齢、70 日齢、および 90 日齢で行い、菌を分離するまで-20°C で保存した。糞便形状は毎日観察し、0 = 硬い、1 = 普通、2 = 軟便、3 = 液状、4 = 水溶性と 5 段階でスコア化した（Cruywagen 1996、図 2.1）。また、スコア 3 以上は下痢と判断した。

2) 糞便中細菌数の分析

糞便中の乳酸菌数と大腸菌群数は、Liu ら（2008）の方法を改変して計測した。すなわち、糞便 1 g を滅菌生理食塩水 9 mL に懸濁してから 10 倍段階希釈を行い、その懸濁液を検査材料とした。乳酸菌は、懸濁液を de Man Rogosa Sharpe (MRS) 培地（Becton Dickinson and Company、Franklin Lakes、NJ、USA）に塗布し、嫌気培養（37°C、48 時間）した。大腸菌群は、懸濁液をマッコンキー寒天培地（栄研化学、東京）に塗布し、好気培養（37°C、24 時間）した。糞便 1 g 中の菌数は、培養後の cfu から算出し、対数値で表した。

3) 血漿中ホルモン濃度の分析

血漿中 GH 濃度は、Johke（1978）によるラジオイムノアッセイ（radioimmunoassay ; RIA）法で測定した。インスリン濃度は、ウシインスリン濃度の測定に適合する市販の RIA キット（Insulin Eiken RIA kit ; 栄研化学）を用

いて測定した (Itoh ら、1997)。IGF-I 濃度は、Hodate ら (1990) の RIA 法で測定した。全てのホルモン濃度は、測定間変動を抑えるため同じ分析で測定した。血漿 GH、インスリン、および IGF-I 濃度の測定内変動率は、各々7%、3%、および5%であった。

4) 統計処理

データは、各研究機関をブロックにした乱塊法として次のモデルを用いて検定した。

$$X_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + e_{ijk}$$

X_{ijk} , 測定値 ijk

μ , 総平均

α_i , 処理 i の効果

β_j , ブロック (研究機関) j の効果

e_{ijk} , 誤差

有意差の認められた項目については、Fisher の Protected Least Significant Difference テストにより検定し、 $P < 0.05$ を有意差とした。統計分析は、Stat View 5.0J (SAS Institute、Cary、NC、USA) を用いて行った。

3. 結果

図 2.2 に全乳に CE および SB を溶解して給与した乳用子ウシにおける体重の推移を示した。体重は、56 日齢から 90 日齢で CE 区が対照区より増加して ($P < 0.05$)、56 日齢から 63 日齢で CE 区が SB 区より増加した ($P < 0.05$)。また、離乳後 CE 区は他の 2 区より高く推移した。70 日齢から 90 日齢で SB 区が対照区に比べて上回る傾向が見られ ($P < 0.1$)、84 日齢で SB 区が対照区より増加した ($P < 0.05$)。また、離乳後 SB 区も対照区より高くなる傾向を示した。90 日齢時体重、離乳から 90 日齢までの DG と飼料効率、CE 区が対照区に対して上回った ($P < 0.05$) (表 2.2)。離乳時日齢は、各区間とも同様であった。積算糞スコアは、SB 区が対照区に対して低下する傾向が見られて ($P < 0.1$)、下痢日数も減少傾向を示した。

図 2.3 に全乳に CE および SB を溶解して給与した乳用子ウシにおける糞便中乳酸菌数と大腸菌群数の推移を示した。乳酸菌数は、離乳後の 70 日齢および 90 日齢で SB 区が対照区より増加する傾向を示した。大腸菌群数は、離乳後の 70 日齢で SB 区が対照区より減少し ($P < 0.05$)、35 日齢および 90 日齢で CE 区および SB 区が対照区より減少する傾向を示した。

図 2.4 に全乳に CE および SB を溶解して給与した乳用子ウシにおける血漿中 GH、インスリン、および IGF-I 濃度の推移を示した。GH 濃度は、各区間に差が無かった。インスリン濃度は、90 日齢で CE 区が対照区より増加した ($P < 0.05$)。IGF-I 濃度は、90 日齢で CE 区が対照区より増加する傾向を示した ($P < 0.1$)。

4. 考察

ルーメン発酵に及ぼす CE の影響は、プロピオン酸および総 VFA 濃度の増加であるとされている (Lila ら 2006)。CE は炭素と栄養源を供給し、電子配列をプロピオン酸産生にシフトさせる (Callaway と Martin 1997)。Lila ら (2006) も同様に、CE は *in vitro* においてプロピオン酸濃度と総 VFA 濃度の上昇を示すことから、ルーメン発酵の促進や消化率の向上に繋がることを示唆している。加えて、CE による VFA 産生の上昇は、子ウシのルーメンにおける絨毛の発達促進につながる (Tamate ら 1962) と期待される。したがって、離乳後 CE 区で DG と飼料効率が向上したことは、ルーメンでの VFA 産生が上昇したことによると推察される。この試験では、ルーメン液中の VFA 含量は測定していないが、Haga ら (2008) は、子ウシにおいて VFA の代謝産物である酢酸と β -ヒドロキシ酪酸の血漿中濃度が、離乳後から増加することを認めていることから、離乳後においてルーメンでの VFA の産生は始まっていると考えられる。

腸管においては、CE が腸内細菌によって発酵を受けると主に酪酸が生成される (渡辺 1998)。また、ラットの腸管内の VFA 含量は、腸管運動を調整する神経刺激のひとつと考えられている (Yajima 1985)。これらのことから、下部消化管では CE の給与により VFA、特に酪酸の産生と吸収が増加すると推察され、このことが本研究における乳用子ウシの発育向上の原因と類推された。

消化管からの VFA、特にプロピオン酸および酪酸の吸収が反芻動物において血漿中インスリン濃度を上昇させることは良く知られている (小林と板橋 1987 ; Itoh ら 1998 ; Matsunaga ら 1999)。小林と板橋 (1987) は、離乳後の子ウシのルーメンおよび十二指腸内にプロピオン酸および酪酸を注入することによるインスリン濃度上昇を報告している。また、Lila ら (2006) は、CE が *in vitro* においてセルロース分解菌数の増加およびプロピオン酸と総 VFA 産生を増加さ

せ、繊維消化率を上昇させたことを報告している。本試験では、インスリン濃度が 90 日齢で対照区に比べて CE 区で高かったが、この実験条件では、午前 9 時に給与した CE そのものの発酵によって産生されたプロピオン酸や酪酸が翌日の採血時におけるインスリン濃度に影響した可能性は低いと見られる。従って、CE の添加効果はセルロース分解菌の活性化による総 VFA 産生の上昇およびプロピオン酸優性の発酵に変化させることの両者、またはいずれか一方で、インスリン濃度の上昇に寄与したと考えられる。

子ウシにおける血清 IGF-I 濃度と離乳後の飼料効率には正の相関が認められ (Stick ら 1998)、離乳後における子ウシの体重は、血漿 IGF-I 濃度と正の相関を示す (Suda ら 2003)。また、高蛋白・高エネルギー飼料摂取は、子ウシの DG と血漿 IGF-I 濃度を増加させる (Brown ら 2005)。本研究でも離乳後 CE 区が対照区より IGF-I 濃度が高くなり、発育において同様の傾向が認められた。従って、CE 給与による IGF-I 濃度の増加は、離乳後の子ウシにおいて CE がルーメンからの VFA を含んだ栄養素の吸収量の増加を引き起こしていることに起因すると考えられる。

プロバイオティクスの代用乳への添加効果は、*Bifidobacterium pseudolongum* や *Lactobacillus acidophilus* を用いた場合 7 から 56 日齢で DG と飼料効率、糞の状態を向上するという報告がある (Abe ら 1995)。その効果は、*L. acidophilus* の添加で最初の 2 週間だけであるが同様の効果が認められた (Cruywagen ら 1996)。一方、*L. acidophilus*、*L. lactis* と *Bacillus subtilis* を含む微生物濃縮物は、子ウシの DG と飼料効率の改善に有意差が無かったとの報告もある (Jenny ら 1991)。本試験では、デキストランを特異的に資化する Lcc を用いたが、試験期間を通じて SB の給与による子ウシの DG と飼料効率の改善は CE 給与ほど認められなかった。しかし、離乳後の乳酸菌数は対照区に比較すると増加する傾向が見られた。また、大腸菌群数は試験期間を通じて減少する傾向を示した。一

方、SB を給与した子ウシの糞便中 Lcc は、給与開始後 1 週から検出された（図 2.5）。この試験は、SB 区の糞便を用いてシンバイオティクスとして給与した Lcc が下部消化管に届いているか確認するために行ったものである。Lcc の分離、同定は、適宜希釈した糞便サンプルをデキストラン含有 MRS 寒天培地に塗布、培養して（Ogawa ら 2005a）、生育の見られた各コロニーから DNA を抽出し、Lcc の 16S リボソーム（ribosome ; r）RNA 特異的プライマーを用いた PCR にて同定した（Ogawa ら 2005b）。この試験では、給与開始後 5 週以降は測定していないが、1 週、3 週、および 5 週目の糞便から Lcc が検出され、SB として給与した Lcc の増殖を確認した。これらの変化が、SB 区における子ウシの糞便状態の向上に寄与していると考えられる。

以上のことから、子ウシへの CE の給与により、離乳後の飼料効率の増進と増体量の向上に効果が認められた。このことはルーメン内のセルロース分解菌の活性化による総 VFA 産生の上昇および VFA 吸収量の増加が関与していることが推察された。一方、SB の給与により、糞便中の乳酸菌数の増加傾向と大腸菌群数の減少傾向が認められ、それらの変化が糞便状態の向上に寄与していると推察された。第Ⅲ章では、実際の酪農現場では代用乳が給与されることが多いことから、抗菌性物質非含有代用乳を特別に製造して、SB と抗菌性物質の給与効果を比較検討することにより、子ウシの発育、腸内細菌叢、および内分泌機能への影響を明らかにする。

5. 要約

本章では、セルロース由来の難消化性オリゴ糖である CE、およびデキストランと Lcc の混合物である SB の生理作用を乳用子ウシで検証することを目的として、それらの給与効果が発育、腸内細菌、および内分泌に及ぼす影響について検討した。90 日齢時体重、離乳から 90 日齢までの DG と飼料効率は、CE 区が対照区より増加した。積算糞スコアと下痢日数は、SB 区が対照区より低下する傾向が見られた。糞便中の乳酸菌数は、離乳後 SB 区が対照区より増加する傾向があり、大腸菌群数は、試験期間中 CE 区および SB 区が対照区より減少する傾向があった。血漿インスリン濃度は、90 日齢で CE 区が対照区より増加した。以上のことから、子ウシに対する CE の給与により、離乳後の飼料効率の増進と増体量の向上に効果が認められ、このことはルーメン内のセルロース分解菌の活性化による総 VFA 産生量の上昇およびルーメンからの VFA 吸収量の増加が関与していることが推察された。一方、子ウシに対する SB の給与により、糞便中の乳酸菌数の増加傾向と大腸菌群数の減少傾向が認められ、それらの変化が糞便状態の向上に寄与していると推察された。

6. 図表

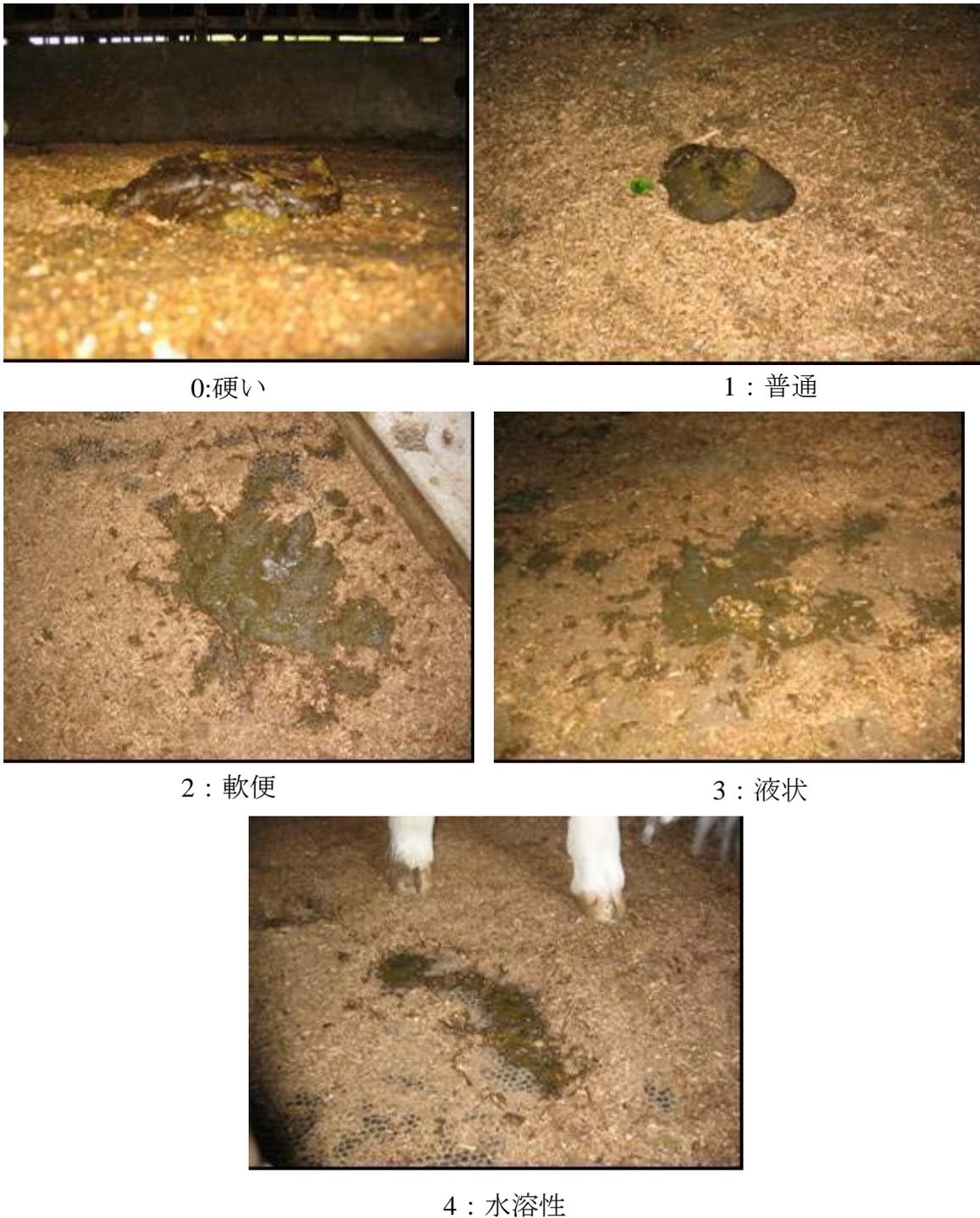


図 2.1 糞スコア

糞便形状を 0 = 硬い、1 = 普通、2 = 軟便、3 = 液状、4 = 水溶性と 5 段階でスコア化し毎日観察。スコア 3 以上を下痢と判断した。

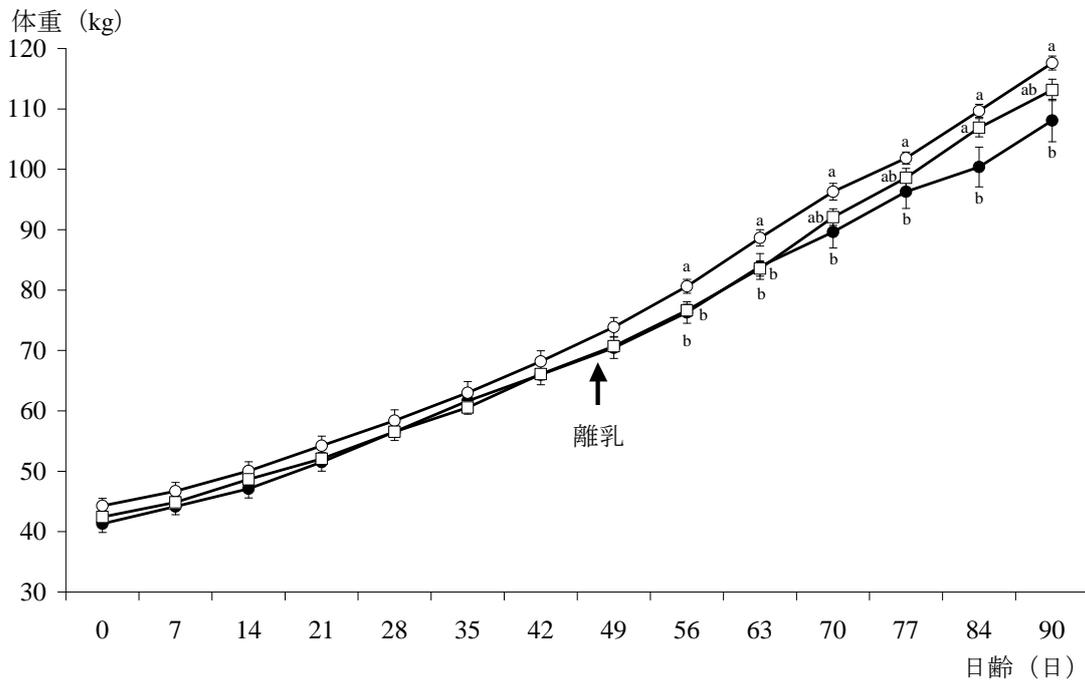


図 2.2 全乳に CE および SB を溶解して給与した乳用子ウシにおける体重の推移

● : 対照区 (n = 18)、○ : CE 区 (n = 16)、□ : SB 区 (n = 18)。

各値は平均値±標準誤差で表示。

CE および SB は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

a, b : 同日齢において処理間に有意差 ($P < 0.05$) を認めたもの。

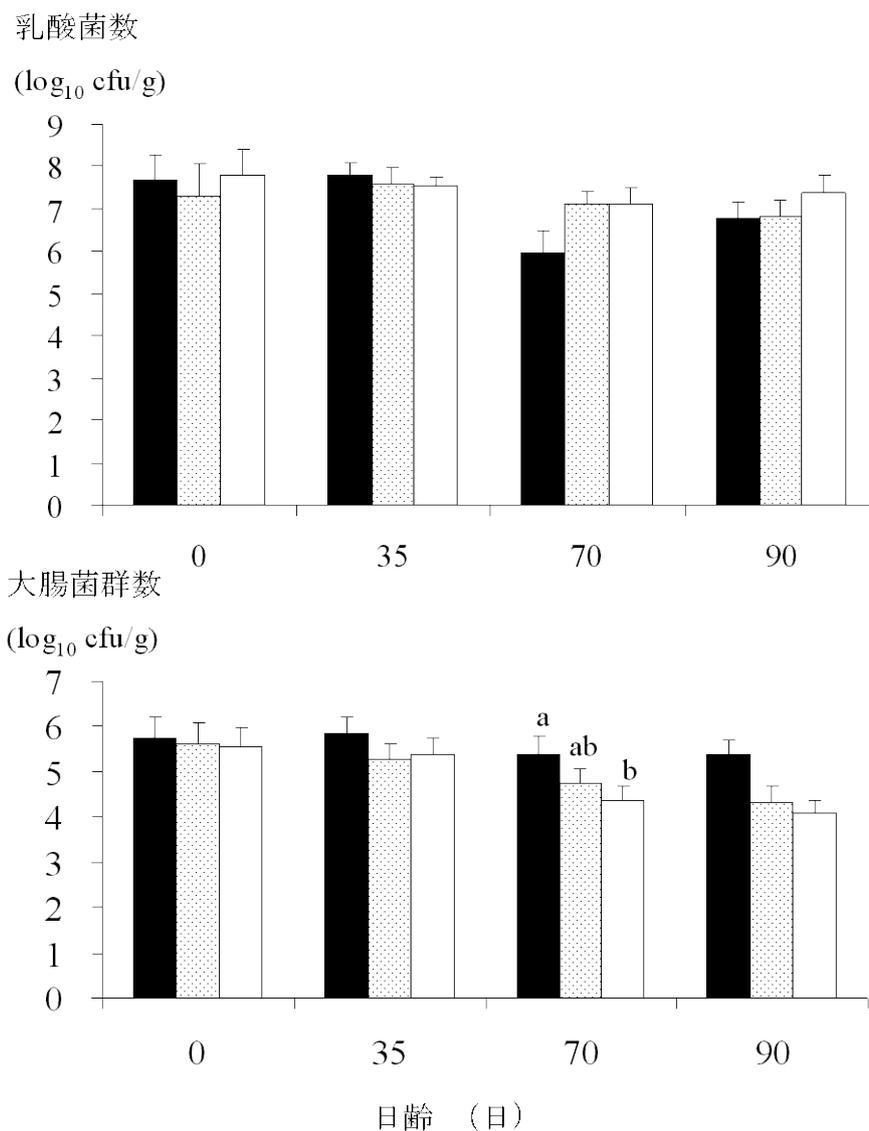


図 2.3 全乳に CE および SB を溶解して給与した乳用子ウシにおける糞便中乳酸菌数と大腸菌群数の推移

■ : 対照区 (n = 18)、▨ : CE 区 (n = 16)、□ : SB 区 (n = 18)。

各値は平均値 + 標準誤差で表示。

CE および SB は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

a, b : 同日齢において処理間に有意差 ($P < 0.05$) を認めたもの。

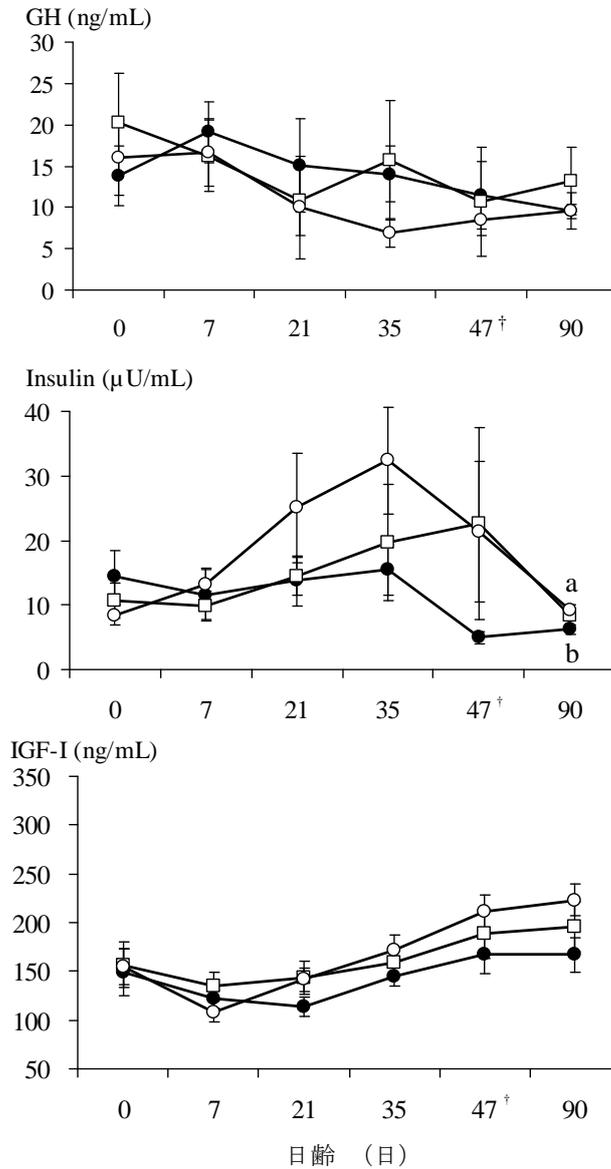


図 2.4 全乳に CE および SB を溶解して給与した乳用子ウシにおける血漿中 GH、インスリン、および IGF-I 濃度の推移

● : 対照区 (n = 18)、○ : CE 区 (n = 16)、□ : SB 区 (n = 18)。

各値は平均値±標準誤差で表示。

CE および SB は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

a, b : 同日齢において処理間に有意差 ($P < 0.05$) を認めたもの。

[†]離乳日齢。

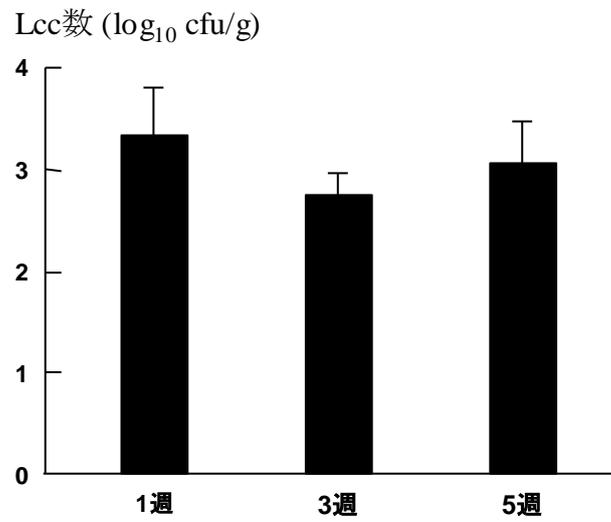


図 2.5 シンバイオティクスを給与した子ウシの糞便中 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* strain JCM1134^T (Lcc) 数の推移

各値は平均値+標準誤差で表示。

SB は、1 日当り 5 g のデキストランと 1.0×10^9 cfu の Lcc を 1 日 1 回午前 9 時に給与。

表 2.1 供試飼料の成分組成（乾物）

区分	人工乳 [†]	チモシー乾草 [‡]
乾物, %	86.0	89.1 [§]
有機物, %	93.5	93.3 [§]
粗蛋白質, %	21.8	8.1 [§]
中性デタージェント繊維, %	20.5	63.5 [§]
可消化養分総量, %	84.2	62.6 [¶]

[†] 人工乳：ニューメイクスター，全国酪農飼料株式会社，東京

[‡] チモシー乾草：1 番草，出穂期，カナダ産

[§] 各研究機関の平均値

[¶] 日本標準飼料成分表（NARO 2001）

表 2.2 全乳に CE および SB を溶解して給与した乳用子ウシにおける体重、日増体量、離乳日齢、乾物摂取量、飼料効率、積算糞スコア、および下痢日数

区分	対照区	CE区	SB区
頭数	18	16	18
体重, kg			
生時	40.5 ± 1.4	42.8 ± 1.1	42.2 ± 1.0
離乳時	69.2 ± 1.5	72.4 ± 1.7	70.3 ± 1.2
90日齢	107.0 ± 3.3 ^a	116.3 ± 1.2 ^b	112.4 ± 1.8 ^{ab}
日増体量, kg			
全期間	0.73 ± 0.03 ^a	0.82 ± 0.01 ^b	0.78 ± 0.02 ^{ab}
離乳前	0.62 ± 0.02	0.60 ± 0.02	0.59 ± 0.02
離乳後	0.88 ± 0.05 ^a	1.07 ± 0.02 ^b	1.01 ± 0.04 ^{ab}
離乳日齢	46.3 ± 1.1	46.8 ± 1.0	47.5 ± 1.0
乾物摂取量 [†] , kg	128 ± 6	139 ± 5	132 ± 5
飼料効率			
全期間	0.49 ± 0.01	0.51 ± 0.01	0.51 ± 0.01
離乳前	0.74 ± 0.03	0.70 ± 0.02	0.72 ± 0.03
離乳後	0.39 ± 0.02 ^a	0.44 ± 0.01 ^b	0.43 ± 0.01 ^{ab}
積算糞スコア [‡]	120 ± 6 ^c	115 ± 6 ^{cd}	109 ± 5 ^d
下痢日数 [§]	9.2 ± 2.0	7.0 ± 1.8	5.5 ± 1.4

各値は平均値±標準誤差で表示。

CE および SB は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

a, b : 処理間に有意差 ($P < 0.05$) を認めたもの。

c, d : 処理間に差 ($P < 0.1$) を認めたもの。

† : 全乳、人工乳、およびチモシー乾草の合計とした。

‡ : 試験期間中の糞スコア (0 = 硬い、1 = 普通、2 = 軟便、3 = 液状、4 = 水溶性) の合計とした。

§ : 糞スコアが 3 以上の日数の合計とした。

第Ⅲ章 抗菌性物質非含有代用乳へのシンバイオティクスの添加効果

1. 目的

飼料安全法では、全ての抗菌性飼料添加物は飼料が含有している栄養成分の有効な利用を促進するの用途（発育促進目的）で指定されている（米持 2003）。実際にはその添加は、家畜の育成段階における病原性微生物の感染圧力を軽減する面で大きな貢献をしており、とりわけ、消化器疾病の抑制作用は、治療用抗菌剤の使用量削減に結びついている（福本 2003）。しかし、抗菌性飼料添加物のアボパルシンがヒトの医療上重要なバンコマイシンと交差耐性を示すことからヨーロッパにおいて使用が禁止された。それ以降抗菌性飼料添加物使用の規制が強化され、その代替法としてプロバイオティクスの使用が進められている（伊藤 2003）。プロバイオティクスの有効性は、腸内有害菌の増殖の抑制と有用菌の増殖作用と考えられている（伊藤 2003）。

このような抗菌性物質の代替となりうるプロバイオティクスの持つ効果を実証することを目的として本論文の第Ⅱ章では、プロバイオティクスとプレバイオティクスを併せ持つ SB を全乳に溶解して子ウシに給与した。その結果、試験期間を通じての DG および飼料効率の明瞭な改善は認められなかったが、糞スコアの改善と下痢日数の減少傾向が見られた。また、SB の給与は腸内細菌叢への影響も認められた。

一方、子ウシの代用乳にプロバイオティクスまたはプレバイオティクスを添加して抗菌性物質添加と比較検討した研究では、発育は同レベルであることからそれらは抗菌性物質の代替になりうると考えられている（Donovan ら 2002 ; Heinrichs ら 2003）。しかし、プロバイオティクスおよびプレバイオティクスの給与は、子ウシの生体機能および発育には有意な影響を及ぼさないとの報告も

ある (Heinrichs ら 2009)。

そこで本章では、実際の酪農現場では代用乳を給与することが多いことから、市販の代用乳から抗菌性物質と生菌剤を除き、**SB** の添加効果が代用乳でも子ウシで発現するか検証することを目的に、**SB** の子ウシの発育、腸内細菌叢、および内分泌機能への影響について検討した。さらに、通常在市販代用乳には抗菌性物質が添加されていることから、抗菌性物質含有代用乳に **SB** を添加した場合についても検討した。

2. 材料および方法

1) 供試動物と飼養管理

供試動物は、富山県農林水産総合技術センター、千葉県畜産総合研究センター、愛知県農業総合試験場、石川県畜産総合センター、茨城県畜産センターおよび神奈川県農業技術センターの各研究機関で生産され、生後 30 分以内に初乳を摂取したホルスタイン種雌子ウシ 46 頭である。これらの子ウシを以下の 3 区に分け、試験を実施した。SB を添加した SB 区 (n = 17)、抗菌性物質 (antibiotics ; AB) を添加した AB 区 (n = 17) および AB と SB を添加した ABSB 区 (n = 12)。試験期間は、生後から 91 日齢までとした。また、動物の飼育および動物を使用した実験については、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所のガイドラインに従って実施した。

哺乳は、生時体重から DG として 0.4 kg が得られるのに必要な量（農林水産省農林水産技術会議事務局編 1999）の抗菌性物質および生菌剤非含有の代用乳（株式会社日本ミルクプレイサー、神栖）を算定した。この量を午前 9 時と午後 4 時に、哺乳瓶またはニップル付きバケツを用いて離乳まで行った。SB 区については、1 日当り 1 g のデキストラン（名糖産業株式会社）と 1.0×10^{10} cfu の Lcc（独立行政法人理化学研究所）を代用乳に溶解して給与した。AB 区については、亜鉛バシトラシン 420 万単位/トンと硫酸コリスチン 20 g 力価/トンを含む生菌剤非含有代用乳を給与し、ABSB 区については、SB 区で用いた SB を AB 区で用いた抗菌性物質含有代用乳に溶解して給与した。離乳後 SB 区と ABSB 区は、同量の SB を温水に溶解し給与した。水と抗菌性物質および生菌剤非含有の人工乳（ニューメイクスター；全国酪農飼料株式会社）およびチモシー乾草（1 番草、出穂期、カナダ）は自由摂取とした。離乳は、人工乳を 1000 g/日摂取し

た時点で行い、離乳後の人工乳は 2400 g/日を上限に増給した。人工乳とチモシー乾草は、隔週で試料を採取し 2 か月分の試料の栄養成分を分析した(藤田 2001、表 3.1)。

体重は、午前 9 時の給餌前に週 1 回測定した。血液は、2 日齢、21 日齢、35 日齢、70 日齢、および 91 日齢の午前 9 時の給餌前にヘパリン添加採血管(テルモ株式会社)を用いて頸静脈より採取した。血液は、採血後直ちに、遠心分離(20000 g、30 分間、4°C)血漿を分離後、分析まで-20°C で保存した。直腸糞の採取は、21 日齢、35 日齢、および 70 日齢で行い、菌を分離するまで-20°C で保存した。ルーメン液は、91 日齢の午後 1 時にカテーテル(富士平工業株式会社、東京)を用いて経口的に採取し、二重ガーゼでろ過した後、遠心分離(20000 g、10 分間、4°C)し、上清を分析まで-20°C で保存した。糞便形状は毎日観察し、0 = 硬い、1 = 普通、2 = 軟便、3 = 液状、4 = 水溶性と 5 段階でスコア化した(Cruywagen 1996)。また、スコア 3 以上は下痢と判断した。

2) 糞便中細菌数の分析

糞便中の乳酸菌数と大腸菌群数の分析方法は、第 II 章 2. 2) と同様とした。

3) ルーメン液の VFA 濃度の分析

ルーメン液の VFA 濃度は、須藤(1973)の方法に準じてガスクロマトグラフィー(hp5890; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)により分析した。ルーメン液は、1.5 mL を遠心分離し(56000 g、30 分間、4°C)、その上清(0.75 mL)に内部標準物質としてクロトン酸溶液(20 mM、0.75 mL)を加えた後、85%リン酸溶液(0.015 mL)で徐蛋白した。注入試料は遠心分離(20000 g、15 分間、

4°C)した後の上清を用いた。注入量は1 μ Lとした。分析は、カラム温度 220°C、キャピラリーカラム DB-FFAP(内径 0.32 mm、長さ 30 m; Agilent Technologies Inc.)に窒素ガスを 30 mL/分の流量で流し、水素炎イオン化検出器で検出した。

4) 血漿中ホルモン濃度の分析

血漿中 GH、インスリン、および IGF-I 濃度の分析方法は、第 II 章 2. 3) と同様とした。

5) 統計処理

データの統計処理は、第 II 章 2. 4) と同様とした。

3. 結果

図 3.1 に抗菌性物質非含有代用乳に SB および AB を添加した乳用子ウシと抗菌性物質含有代用乳に SB を添加した乳用子牛における体重の推移を示した。体重は、SB 区および AB 区が 7 日齢から ABSB 区より高く推移し、7 日齢から 14 日齢、28 日齢から 35 日齢、および 49 日齢から 91 日齢において SB 区が ABSB 区より上回った ($P < 0.05$)。また、7 日齢および 70 日齢から 84 日齢で AB 区が ABSB 区に比べて高くなり ($P < 0.05$)、91 日齢で AB 区が ABSB 区より増加する傾向を示した ($P < 0.1$)。試験期間を通じた DG は、SB 区と AB 区が ABSB 区に比べて増加し ($P < 0.05$)、SB 区と AB 区には差が認められなかった。また、離乳前の DG は各区間に差が無かったが、離乳後においては SB 区が ABSB 区に比べて高くなった ($P < 0.05$)。乾物摂取量は、AB 区が ABSB 区に比べて多くなり ($P < 0.05$)、SB 区も ABSB 区に比べて多くなる傾向を示した ($P < 0.1$)。飼料効率は、離乳前各区間に差が無かったが、離乳後 SB 区が AB 区より上回った ($P < 0.05$)。離乳时日齢、積算糞スコア、および下痢日数は、各区間に有意差が認められなかった (表 3.2)。

図 3.2 に抗菌性物質非含有代用乳に SB および AB を添加した乳用子ウシと抗菌性物質含有代用乳に SB を添加した乳用子牛における糞便中乳酸菌数と大腸菌群数の推移を示した。乳酸菌数は、35 日齢で SB 区が AB 区および ABSB 区に対して多くなった ($P < 0.05$) が、21 日齢および 70 日齢では各区間に差が認められなかった。大腸菌群数は、各日齢で区間に有意差が認められなかった。

抗菌性物質非含有代用乳に SB および AB を添加した乳用子ウシと抗菌性物質含有代用乳に SB を添加した乳用子牛におけるルーメン液中の総 VFA 濃度は、ABSB 区が SB 区および AB 区より増加する傾向があり、酢酸比率は ABSB 区が AB 区に比べ低くなり ($P < 0.1$)、プロピオン酸比率は ABSB 区が AB 区に比べ

高くなった ($P < 0.1$)。また、酢酸プロピオン酸比は、**ABSB** 区が **AB** 区に比べて低くなった ($P < 0.1$) (表 3.3)。

図 3.3 に抗菌性物質非含有代用乳に **SB** および **AB** を添加した乳用子ウシと抗菌性物質含有代用乳に **SB** を添加した乳用子牛における血漿 **GH**、インスリン、および **IGF-I** 濃度の推移を示した。**GH** 濃度は、各区間に有意差が認められなかった。インスリン濃度は、91 日齢で **ABSB** 区が **SB** 区および **AB** 区に比べて増加した ($P < 0.05$)。**IGF-I** 濃度は、各区日齢が進むにつれて増加する傾向を示し、91 日齢で **AB** 区が **SB** 区に比べて増加した ($P < 0.1$)。

4. 考察

子ウシに対するプロバイオティクスの代用乳への添加効果は、生後 5 週間の DG、飼料効率および糞便状態が抗菌性物質添加と同様であったとの報告がある (Donovan ら 2002)。一方、ストレスフリーのような健康な状態であるとプロバイオティクスまたは抗菌性物質の添加は、生後 8 週間の発育には有意な影響を及ぼさないとの報告もある (Heinrichs ら 2009)。本試験では、SB を哺乳期間および離乳後に給与することにより、91 日齢体重、試験期間を通じての DG、および飼料効率が、抗菌性物質含有代用乳と比較しても遜色ない結果が得られた。このことは、哺乳期間および離乳後を通して SB が生体機能の維持または改善目的で代用乳に添加される抗菌性物質の代替になる可能性があることを示唆している。一方、本試験では、体重の推移、DG、および乾物摂取量が ABSB 区に比べて SB 区および AB 区が高くなった。この試験で用いた SB に含まれる Lcc は、亜鉛バシトラシンに感受性がある (最小発育阻止濃度 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。したがって、バシトラシンが Lcc の生育を阻害することで消費され、他の有害細菌が生育し易くなったことが推察される。ABSB 区の発育は標準的であることから抗菌性物質と SB の組み合わせにおいては、相乗効果が期待できない場合もあると考えられる。

殺菌した全乳と代用乳を混合したものに *L. acidophilus* を添加した試験では、9 週齢で *Lactobacillus* 属菌数が無添加区より添加区が高くなるが、試験期間中の *Lactobacillus* 属菌数および大腸菌群数には影響を与えなかった (Abu-Tarboush ら 1996)。また、代用乳にプロバイオティクス (*L. gasseri* と *Propionibacterium freudenreichi*) または抗菌性物質 (オキシテトラサイクリン、ネオマイシン) を添加した試験では、2 週齢で *Lactobacillus* 属菌数が抗菌性物質添加区よりプロバイオティクス添加区が高くなる傾向を示し、4 週齢で腸内細菌数が抗菌性物質添

加区よりプロバイオティクス添加区が低くなったが、全期間では影響が認められなかった (Heinrichs ら 2009)。また、健康な子ウシの糞便中乳酸菌と大腸菌群は日齢が進むにつれ減少するが、*Bifidobacterium* 属菌や大腸菌群の方が *Lactobacillus* 属菌よりも優勢である (Vlková ら 2006)。本試験では、Abu-Tarboush ら (1996) および Heinrichs ら (2009) の報告と同様に、離乳前の 35 日齢で SB 区の *Lactobacillus* 属菌数が増加したが、試験期間を通じての大腸菌群数の変化への影響は無かった。一方、Vlková ら (2006) の報告と同様に *Lactobacillus* 属菌数が増加することは無かったが、大腸菌群数は AB 区および ABSB 区も減少した。本試験では *Bifidobacterium* 属などの腸内細菌数は分析していないが、SB の給与は、腸内細菌数の経時的変化への影響は少ないものの、抗菌性物質と同様に腸内細菌叢の構成比に影響を与えていると推察される。

ルーメン液中のプロピオン酸濃度は、サリノマイシンやモネンシンなどのイオノフォア抗菌性物質の給与により上昇することが良く知られている (Kobayashi ら 1990 ; Clary ら 1993 ; Bohnert ら 2000)。これは、ウシにイオノフォアを給与することによりプロピオン酸を生成する細菌が選抜されるためである (板橋 1998)。また、イオノフォアは、乳酸を生成する *Lactobacillus* 属菌の増殖を阻害するが乳酸利用菌への阻害作用は示さない (板橋 1998)。子ウシにサリノマイシンを給与することにより、離乳後ルーメン内のプロピオン酸割合が高まり、酢酸と酪酸の割合が低下したことは、乳酸利用菌によって乳酸がプロピオン酸に代謝されたためと考えられている (Kobayashi ら 1990)。本試験の ABSB 区では、離乳後も SB を給与したことにより、離乳前に抗菌性物質の作用により減少したルーメン内の *Lactobacillus* 属菌が増加に転じたため乳酸が産生され、それを利用する細菌が増加することによりプロピオン酸が産生したと推察される。また、このことが第 II 章の試験の CE 区と同様に血漿インスリン濃度の上昇に寄与した可能性が類推された。

IGF-I は、吸収アミノ酸量に応じて血中濃度が変化し、一定水準を超えると安定した値を示す。そして、IGF-I は吸収アミノ酸組成が適正であるほど血中濃度が高まり、血中濃度に応じて蛋白質同化能が変化するなどの特徴を示す（松本 1998）。また、子ウシの血漿 IGF-I 濃度は、代用乳の給与量を高めることによって上昇し（Smith ら 2002）、高蛋白・高エネルギー飼料摂取によって増加する（Brown ら 2005）。反芻家畜では、摂取した飼料中蛋白質の一部はルーメン内で一旦アンモニアまでに分解され、飼料中の非蛋白質態窒素や消化管内に再循環してきた血中の尿素態窒素などとともに微生物態蛋白質となり、第四胃以下で消化、吸収されることにより体成分のアミノ酸源として利用している（須藤と小原 1996）。本試験では代用乳に添加された抗菌性物質は、ルーメン内および下部消化管の細菌叢に影響を及ぼしていることが推察された。しかしながら、蛋白質の消化吸収および血漿 IGF-I 濃度の上昇にどのように作用したかは不明である。今後は、子ウシの消化生理に伴う血漿 IGF-I 濃度の変化について検討する必要がある。

以上のことから、子ウシに給与する代用乳への SB の添加は、離乳後も給与継続すれば発育改善のため抗菌性物質添加の代替となる可能性が示唆された。しかし、抗菌性物質と SB の併用は、相乗効果が期待できない可能性が示唆された。また、SB の抗菌性物質非含有代用乳への添加は、腸内細菌数の経時的変化には影響は少ないものの、腸内細菌叢の構成比に影響を与えていると考えられた。しかし、SB の血漿ホルモン濃度に対する影響は明確でなかった。第IV章では、抗菌性物質および生菌剤非含有の代用乳への CE 添加の効果について検証することを目的に、子ウシの発育、腸内細菌叢および内分泌機能への影響について検討した。

5. 要約

子ウシに対する SB の給与効果を実証することを目的に、本章では抗菌性物質非含有の代用乳に SB を添加して抗菌性物質含有代用乳と比較検討した。さらに、市販の代用乳には抗菌性物質が添加されていることから SB を抗菌性物質含有代用乳に添加して効果を解析した。91 日齢体重、DG、および乾物摂取量は、SB 区と AB 区が ABSB 区に比べて高くなった。糞便中の乳酸菌数は、35 日齢で SB 区が AB 区および ABSB 区に対して多くなったが、70 日齢では有意な影響は認められなかった。以上のことから、SB は子ウシに給与する代用乳における抗菌性物質の代替となる可能性が示唆された。しかし、抗菌性物質と SB の併用は、相乗効果が期待できない可能性が示唆された。また、SB の抗菌性物質非含有代用乳への添加は、腸内細菌数の経時的変化には影響は少ないものの、抗菌性物質と同様に腸内細菌叢の構成比に影響を与えていると考えられた。

6. 図表

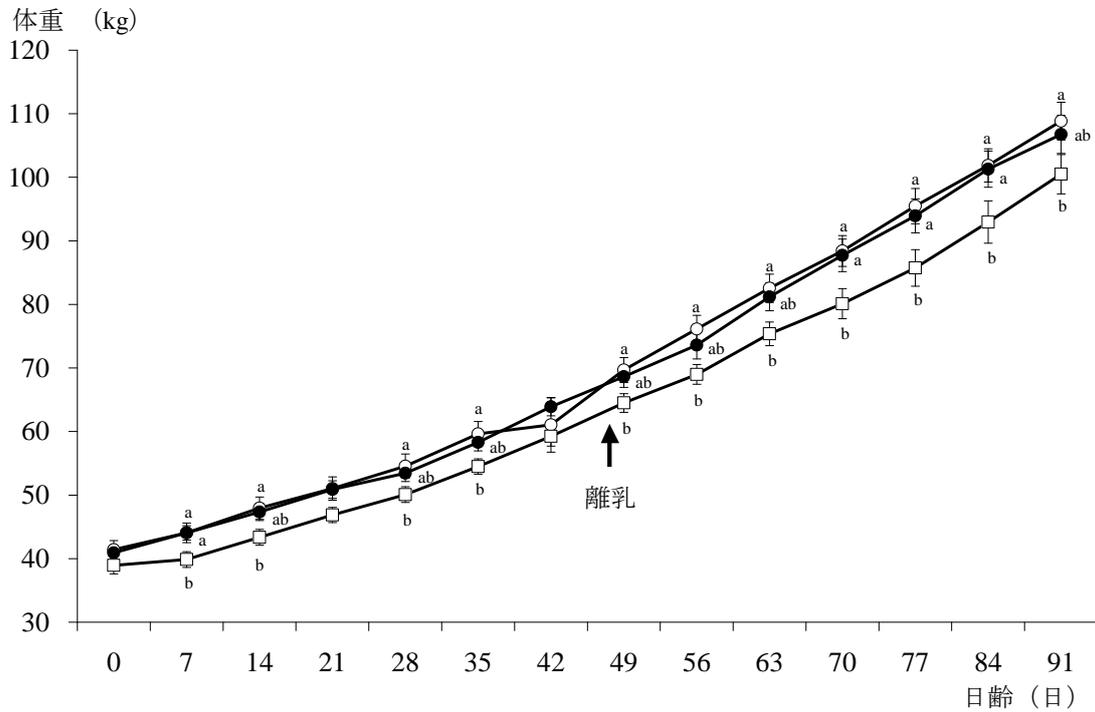


図 3.1 抗菌性物質非含有代用乳に SB および AB を添加した乳用子ウシと抗菌性物質含有代用乳に SB を添加した乳用子牛における体重の推移

○ : SB 区 (n = 17)、● : AB 区 (n = 17)、□ : ABSB 区 (n = 12)。

各値は平均値±標準誤差で表示。

SB は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

a, b : 同日齢において処理間に有意差 ($P < 0.05$) を認めたもの。

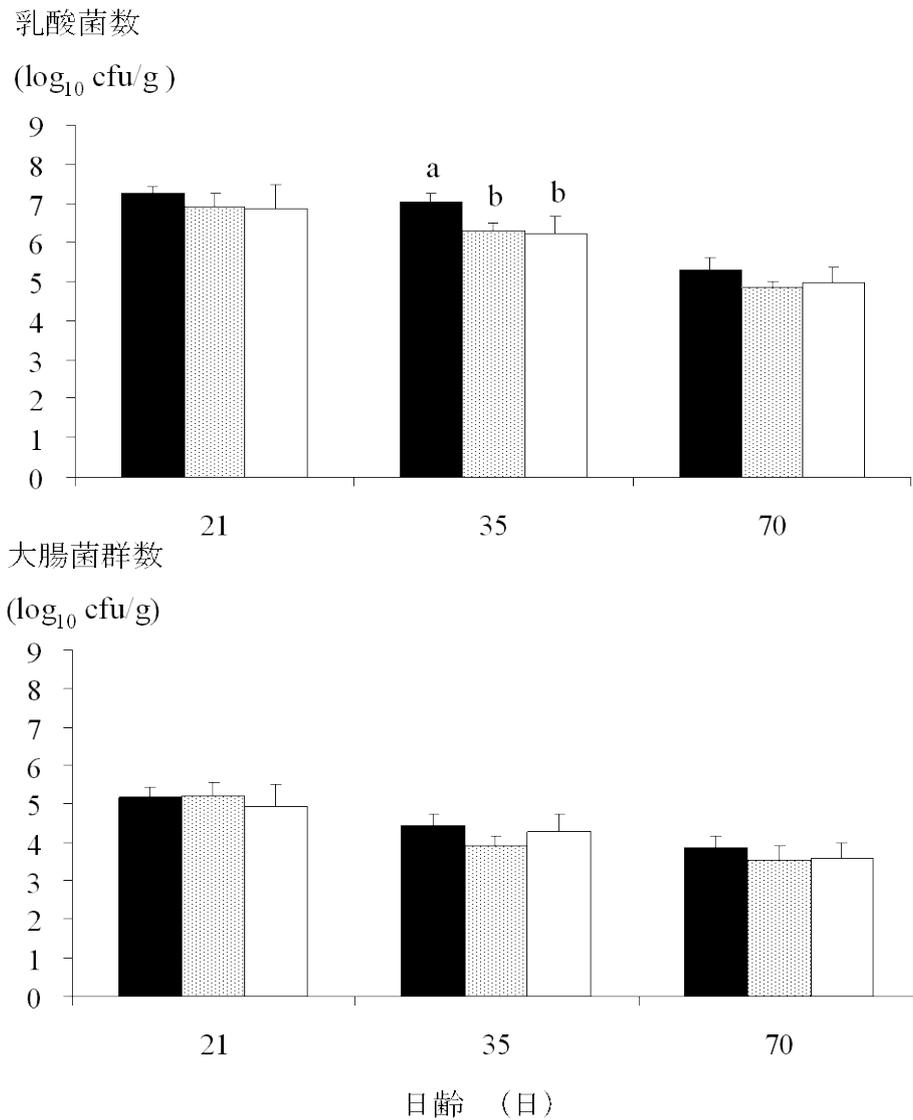


図 3.2 抗菌性物質非含有代用乳に SB および AB を添加した乳用子ウシと抗菌性物質含有代用乳に SB を添加した乳用子牛における糞便中乳酸菌数と大腸菌群数の推移

■ : SB 区 (n = 17)、▨ : AB 区 (n = 17)、□ : ABSB 区 (n = 12)

各値は平均値 + 標準誤差で表示。

SB は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

a, b : 同日齢において処理間に有意差 ($P < 0.05$) を認めたもの。

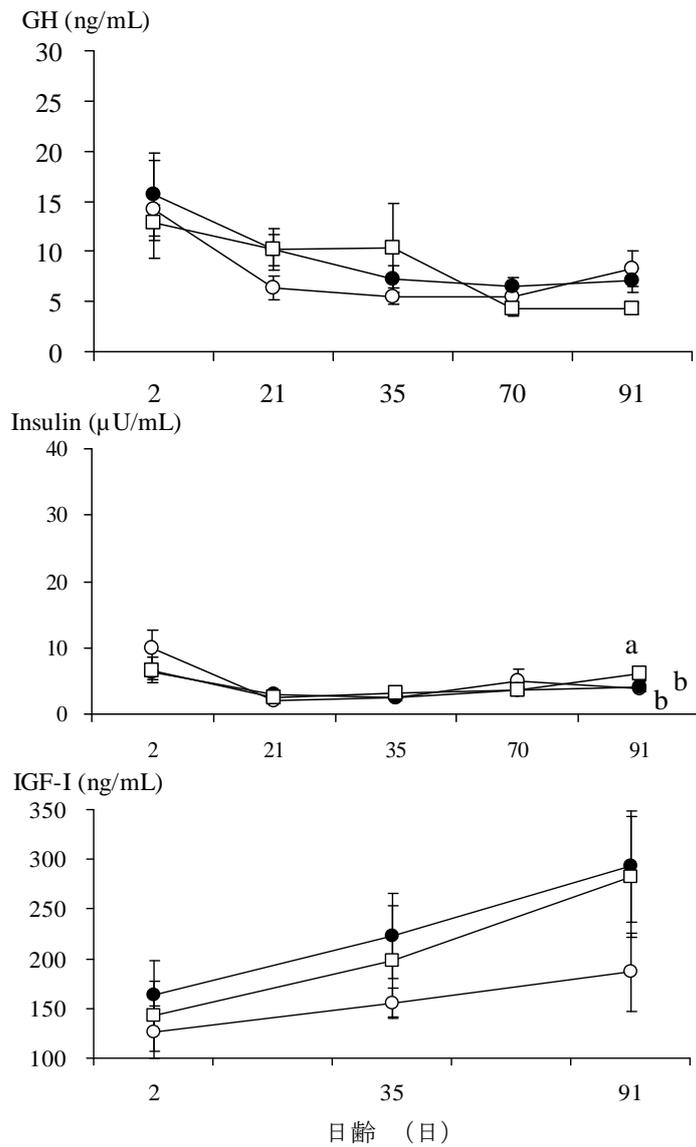


図 3.3 抗菌性物質非含有代用乳に SB および AB を添加した乳用子ウシと抗菌性物質含有代用乳に SB を添加した乳用子牛における血漿中 GH、インスリン、および IGF-I 濃度の推移

○ : SB 区 (n = 17)、● : AB 区 (n = 17)、□ : ABSB 区 (n = 12)。

各値は平均値±標準誤差で表示。

SB は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

a, b : 同日齢において処理間に有意差 ($P < 0.05$) を認めたもの。

表 3.1 供試飼料の成分組成（乾物）

区分	代用乳 [†]	人工乳 [‡]	チモシー乾草 [§]
乾物, %	96.7	88.7	91.7
有機物, %	93.7	94.6	93.3
粗蛋白質, %	24.7	23.1	10.1
粗脂肪, %	21.1	2.8	2.8 [¶]
中性デタージェント繊維, %		17.8	60.8
可消化養分総量, %	110.5	83.8	62.6

[†] 代用乳：株式会社日本ミルクリプレイサー，神栖

[‡] 人工乳：ニューメイクスター，全国酪農飼料株式会社，東京

[§] チモシー乾草：1 番草，出穂期，カナダ産

[¶] 日本標準飼料成分表（NARO 2001）

表 3.2 抗菌性物質非含有代用乳に SB および AB を添加した乳用子ウシと抗菌性物質含有代用乳に SB を添加した乳用子牛における体重、日増体量、離乳日齢、乾物摂取量、飼料効率、積算糞スコアおよび下痢日数

区分	SB区	AB区	ABSB区
頭数	17	17	12
体重, kg			
生時	41.3 ± 1.5	40.9 ± 1.5	38.7 ± 1.7
離乳時	67.4 ± 2.0	67.2 ± 1.9	64.0 ± 2.3
91日齢	109.3 ± 2.5 ^a	107.0 ± 2.4 ^c	100.6 ± 2.9 ^{bd}
日増体量, kg			
全期間	0.74 ± 0.02 ^a	0.75 ± 0.02 ^a	0.68 ± 0.02 ^b
離乳前	0.58 ± 0.02	0.56 ± 0.02	0.54 ± 0.03
離乳後	0.95 ± 0.04 ^a	0.88 ± 0.04 ^{ab}	0.87 ± 0.05 ^b
離乳日齢	46.0 ± 2.2	45.4 ± 2.2	48.9 ± 2.6
乾物摂取量 [†]	140.9 ± 4.9 ^c	142.8 ± 4.8 ^a	128.7 ± 5.8 ^{bd}
飼料効率			
全期間	0.47 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.49 ± 0.02
離乳前	0.68 ± 0.04	0.79 ± 0.11	0.77 ± 0.11
離乳後	0.44 ± 0.01 ^a	0.39 ± 0.02 ^b	0.41 ± 0.01 ^{ab}
積算糞スコア [‡]	101 ± 9	96 ± 9	93 ± 10
下痢日数 [§]	4.9 ± 2.1	4.0 ± 2.3	2.6 ± 2.6

各値は平均値±標準誤差で表示。

SB は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

a, b : 処理間に有意差 ($P < 0.05$) を認めたもの。

c, d : 処理間に差 ($P < 0.1$) を認めたもの。

† : 代用乳、人工乳およびチモシー乾草の合計とした。

‡ : 試験期間中の糞スコア (0 = 硬い、1 = 普通、2 = 軟便、3 = 液状、4 = 水溶性) の合計とした。

§ : 糞スコアが 3 以上の日数の合計とした。

表 3.3 抗菌性物質非含有代用乳に SB および AB を添加した乳用子ウシと抗菌性物質含有代用乳に SB を添加した乳用子牛におけるルーメン液の総 VFA 濃度、酢酸、プロピオン酸、酪酸比率および酢酸プロピオン酸比

区分	SB区	AB区	ABSB区
総VFA濃度, mmol/L	73.7 ± 5.2	67.1 ± 4.6	77.1 ± 8.2
VFA比率, mol percentage			
酢酸	62.9 ± 1.9 ^{cd}	66.1 ± 1.3 ^c	61.5 ± 2.5 ^d
プロピオン酸	26.4 ± 1.7 ^{cd}	23.1 ± 1.4 ^c	27.9 ± 3.0 ^d
酪酸	9.7 ± 1.0	9.7 ± 1.0	9.7 ± 1.1
酢酸:プロピオン酸比	2.52 ± 0.24 ^{cd}	2.98 ± 0.17 ^c	2.45 ± 0.29 ^d

各値は平均値±標準誤差で表示。

SB は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

ルーメン液は、91 日齢に採取したもの。

c, d : 処理間に差 ($P < 0.1$) を認めたもの。

第IV章 代用乳へのセロオリゴ糖添加による発育への影響

1. 目的

難消化性オリゴ糖である CE は、*in vitro* の実験でセルロース分解菌数の増加、並びにプロピオン酸および総 VFA 産生を上昇させ、繊維消化率の増加をもたらす (Lila ら 2006)。そして、CE は腸管において腸内細菌によって発酵されて酪酸が生成される (渡辺 1998)。そこで本論文第 II 章では、離乳まで CE を全乳に添加し、離乳後 CE を飲水給与した。その結果、離乳後の飼料効率の向上とともに増体量が促進した。これらの効果は、ルーメンにおける VFA 産生量の増加と下部消化管における VFA を含む栄養素の吸収量の増加が関与していた可能性がある (Hasunuma ら 印刷中)。

子ウシの育成では、代用乳の使用が一般的であり、全乳で認められた CE の効果の一般的な応用を考えた場合、代用乳での検討が必要である。そこで本章では、第 III 章と同様に市販の代用乳から抗菌性物質および生菌剤を除いた抗菌性物質非含有代用乳への CE 添加の効果を検証することを目的に、発育、消化管内細菌叢、および内分泌機能への影響について検討した。

2. 材料および方法

1) 供試動物と飼養管理

供試動物は、富山県農林水産総合技術センター、千葉県畜産総合研究センター、愛知県農業総合試験場、石川県畜産総合センター、茨城県畜産センター、および神奈川県農業技術センターの各研究機関で生産され、生後 30 分以内に初乳を摂取したホルスタイン種雌子ウシ 32 頭である。これらの子ウシを以下のよう
に 2 区に分け、試験を実施した。CE を給与した CE 区 (n = 12) と給与しな
かった対照区 (n = 10)。試験期間は、生後から 91 日齢までとした。また、動物の
飼育および動物を使用した実験については、独立行政法人農業・食品産業技術
総合研究機構畜産草地研究所のガイドラインに従って実施した。

哺乳は、生時体重から DG として 0.4 kg が得られるのに必要な量（農林水産
省農林水産技術会議事務局編 1999）の抗菌性物質および生菌剤非含有の代用乳
（株式会社日本ミルクプレイサー）を算定した。この量を午前 9 時と午後 4
時に、哺乳瓶またはニップル付きバケツを用いて離乳まで行った。CE 区につい
ては、1 日当り 5 g の CE（セロビオース 90%以上含有、日本製紙ケミカル株式
会社）を代用乳に溶解して給与した。離乳後における CE 区については、同量の
CE を抗菌性物質および生菌剤非含有の人工乳（ニューメイクスター；全国酪農
飼料株式会社）に混合して給与した。水と人工乳およびチモシー乾草（1 番草、
出穂期、カナダ）は自由摂取とした。離乳は 46 日齢で行い、離乳後の人工乳は
2400 g/日を上限に増給した。人工乳とチモシー乾草は隔週で試料を採取して 2
か月分の試料の栄養成分を分析した（藤田 2001、表 4.1）。

体重は週 1 回午前 9 時の給餌前に測定した。血液は、3 日齢、10 日齢、4 週齢、
7 週齢、および 13 週齢において、午前 9 時の給餌前にヘパリン添加採血管（テ

ルモ株式会社) を用いて頸静脈より採取した。血液は採血後直ちに遠心分離 (20000 g、30 分間、4°C) で血漿を分離後、分析まで-20°C で保存した。直腸糞の採取は、4 週齢、7 週齢、および 13 週齢で行い、採取した糞を直ちに 10 mM EDTA 加 50 mM 滅菌リン酸緩衝液 1 mL に懸濁して、遠心分離 (110000 g、10 分間、4°C) 後、上清を捨てた後 10 mM EDTA 加 50 mM 滅菌リン酸緩衝液 160 μ L と 10 mg/mL t-RNA 酵母溶液 (Life Technologies Corporation、Carlsbad、CA、USA) 40 μ L 加えて、分析まで-80°C で保存した。ルーメン液の採取は、13 週齢の午後 1 時にカテーテル (富士平工業株式会社) を用いて経口的に採取し、二重ガーゼでろ過した後、遠心分離 (11000 g、10 分間、4°C) して、その上清 2 mL を遠心分離 (110000 g、10 分間、4°C) して、沈殿物を糞と同様に処理し RNA 分析まで-80°C で保存した。また、ろ過後のルーメン液の一部は、遠心分離 (20000 g、10 分間、4°C) して、上清を VFA 分析まで-20°C で保存した。糞便形状は毎日観察し、0 = 硬い、1 = 普通、2 = 軟便、3 = 液状、4 = 水溶性と 5 段階でスコア化した (Cruywagen 1996)。また、スコア 3 以上は下痢と判断した。

2) 糞便およびルーメン内細菌群構成の解析

糞便およびルーメン内細菌群構成は、Uyeno ら (2007) の方法で全 RNA 溶液を消化管内容物から抽出し、16SrRNA をターゲット分子として RNA 6000 Nano kit (Agilent Technologies Inc.) を使用して、Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.) によって細菌群構成の解析を行った。

3) ルーメン液の VFA 濃度の分析

ルーメン液の VFA 濃度の分析方法は、第三章 2. 3) と同様とした。

4) 血漿中ホルモン濃度の分析

血漿中 GH およびインスリン濃度の分析方法は、第Ⅱ章 2. 3) と同様とした。

5) 統計処理

データの統計処理は、第Ⅱ章 2. 4) と同様とした。

3. 結果

図 4.1 に抗菌性物質非含有代用乳に CE を添加した乳用子ウシにおける体重の推移を示した。両区の体重の変化に有意差は認められなかったが、離乳後において CE 区が対照区に比べて高く推移する傾向を示した。91 日齢体重、離乳後の DG、および乾物摂取量は、CE 区が対照区に比べて高くなる傾向があったが、飼料効率、積算糞スコア、および下痢日数は、区間に有意差は認められなかった（表 4.2）。

表 4.3 に抗菌性物質非含有代用乳に CE 添加した乳用子ウシにおける糞便内細菌群構成の推移を示した。16S rRNA 全量に対する *Bifidobacterium* 属菌の割合は、4 週齢で CE 区が対照区に比べ多くなる傾向があったが ($P < 0.1$)、他の細菌グループは、区間に有意差は認められなかった。

表 4.4 に抗菌性物質非含有代用乳に CE 添加した乳用子ウシにおけるルーメン内細菌群構成を示した。16S rRNA 全量に対する *Ruminococcus flavefaciens* の割合は、CE 区が対照区に比べ多くなる傾向があったが ($P < 0.1$)、他の細菌グループは、区間に有意差は認められなかった。

ルーメン液の総 VFA 濃度およびプロピオン酸割合は、CE 区が対照区に比べ高くなる傾向が認められた（表 4.5）。

図 4.2 に抗菌性物質非含有代用乳に CE 添加した乳用子ウシにおける血漿 GH およびインスリン濃度の推移を示した。血漿 GH およびインスリン濃度は、区間に有意差は認められなかった。

4. 考察

CEの生理作用は、微生物に対する直接的な作用および微生物を介して発現する間接的作用が、*in vitro* 研究で報告されている。すなわち、CEの給与効果は腸内腐敗の抑制あるいは整腸作用などの作用を示す *Bifidocacterium* 属菌に対する増殖作用（矢野ら 1990）、腸内細菌による発酵を受けての酪酸産生（渡辺 1998）、およびセルロース分解菌の増加（Lila ら 2006）が認められている。これらの給与効果は、子ウシの生体機能とりわけ消化機能の活性化に寄与すると考えられる。本論文の第II章では、CEを離乳まで全乳に溶解、離乳後温水に溶解して子ウシに給与することにより、その給与効果を検証した。その結果、CEの子ウシへの給与は離乳後において飼料効率の増進とともに増体量の向上効果が認められた。したがって、CEはルーメン内のセルロース分解菌の活性化による総VFA産生の上昇とそれに伴うVFA吸収量の増加が子ウシの発育向上に寄与したと考えられた（Hasunuma ら 印刷中）。一方、生後3日以内から35日齢までの期間において母乳摂取子ウシと代用乳摂取子ウシの腸内細菌の定着を比較した成績では、総菌数は11日から14日齢では代用乳の方が高くなるものの、その後35日齢では母乳の方が高いことが認められている。さらに *Lactobaccillus* 属菌は代用乳に比較して母乳の方が優性に出現し、大腸菌は3日から14日齢までは母乳の方が高く分離されるものの、15日齢以降は代用乳でも優性に検出される（Watase と Takenouchi 1978）。一般的に、子ウシの腸管内細菌叢は、*Bacteroides* 属菌が優性に出現し、次いで *Bifidocacterium* 属菌、*Lactobaccillus* 属菌、大腸菌、および *Enterococcus* 属菌が多く検出される（嶋と光岡 1983）。子ウシの糞内細菌叢を構成している腸内細菌の約10%前後は培養可能であるが、残り90%は培養困難な菌種であることから、分子生物学的手法を導入することにより培養困難な腸内細菌の全貌が見えてきた（辨野 2004）。本試験では、市販の代用乳から

抗菌性物質と生菌剤を除き、成分は一般的なものを子ウシに給与し、糞便中細菌叢を 16S rRNA クローンライブラリーより検索した。その結果、*Bacteroides* 属菌が最も優性に検出され、次いで *Clostridium coccooides* であった。*Bifidobacterium* 属菌および *Lactobaccillus* 属菌はさらに少ない構成割合であったが、*Bifidobacterium* 属菌の割合は、4 週齢で CE 区が対照区に比べ多くなる傾向があった。第 II 章の試験では本章のような分子生物学的手法で細菌検索を行っていないが、全乳と代用乳によって腸内細菌の出現パターンに違いがあり、特に CE を資化できる細菌が全乳よりも代用乳の方が少なかったためと推察された。そのことが、全乳を給与した場合は CE の増体量向上効果が認められ、代用乳を給与した場合は増体や飼料摂取量に対する効果が少なかったことに影響したと考えられた。しかしながら、離乳前の 4 週齢では *Bifidobacterium* 属菌が CE 区で多くなる傾向が見られ、CE は下部消化管で腸内細菌に利用されていることが推察された。

Fibrobacter succinogenes および *Ruminococcus flavefaciens* は、いずれもセルロース分解菌でセロビオースを利用する（三森と湊 2004）。第 II 章の試験では、CE の給与によりルーメン内のセルロース分解菌数の増加が推察された。本試験では、ルーメン内の *Fibrobacter* 属菌は区間に差が認められなかったが、*Ruminococcus flavefaciens* は CE 区で多くなる傾向が見られた。加えて離乳後においては、給与した CE によりルーメン内の VFA 濃度およびプロピオン酸の割合が高くなったことから、CE は一部のルーメン細菌に利用されているものと思われる。しかし、区間に有意差は認められず、抗菌性物質および生菌剤非含有代用乳では全乳給与時ほどルーメン内及び腸内細菌叢に対する影響を与えないと考えられた。一方、全乳に CE を添加して雄子ウシに給与した試験では、明瞭な効果が確認できた（図 4.3、表 4.6）。この試験は、本章の結果を受けて全乳への CE 添加の効果を再確認するために行ったものである。この試験では、6 週間

の哺乳期の後半から DG の伸びが認められ、離乳後の 1 週間における DG は CE 区が極めて順調な伸びを示した。このように全乳での試験では、CE の明瞭な効果を確認した。したがって今後は、代用乳での CE の添加効果が発現する条件を検討する必要があると考えられた。

消化管からの VFA、特にプロピオン酸および酪酸の吸収が反芻動物において血漿中インスリン濃度を上昇させることは良く知られている（小林と板橋 1987 ; Itoh ら 1998 ; Matsunaga ら 1999）。本試験では、ルーメン内および腸内細菌叢に対する CE 給与の効果が明瞭でなかったため、血漿 GH およびインスリン濃度にも影響しなかったと考えられた。

以上のことから、子ウシに給与する代用乳への CE 添加は、抗菌性物質および生菌剤非含有代用乳の場合、全乳への添加と違いルーメン内および腸内細菌叢に対して影響が小さく、発育および内分泌機能への影響も殆ど認められないことが示唆された。

5. 要約

代用乳への CE 添加の効果を検証することを目的に、本章では抗菌性物質非含有代用乳に CE を添加して発育、消化管内細菌叢、および内分泌機能への影響について検討した。体重、離乳後の DG、および乾物摂取量は、CE 区が対照区に比べて有意差は認められないが高くなる傾向を示した。飼料効率、積算糞スコア、および下痢日数は、区間に差は認められなかった。糞便中 *Bifidobacterium* 属菌の割合、ルーメン液中 *Ruminococcus flavefaciens* の割合、ルーメン液中の総 VFA 濃度およびプロピオン酸割合は、CE 区が対照区に比べ高くなる傾向があった。血漿 GH およびインスリン濃度は、各区間に有意差が認められなかった。以上のことから、子ウシに給与する代用乳への CE 添加は、抗菌性物質および生菌剤非含有代用乳の場合、ルーメン内および腸内細菌叢に対する効果は全乳ほどではなく、発育および内分泌機能への影響も殆ど認められなかった。

6. 図表

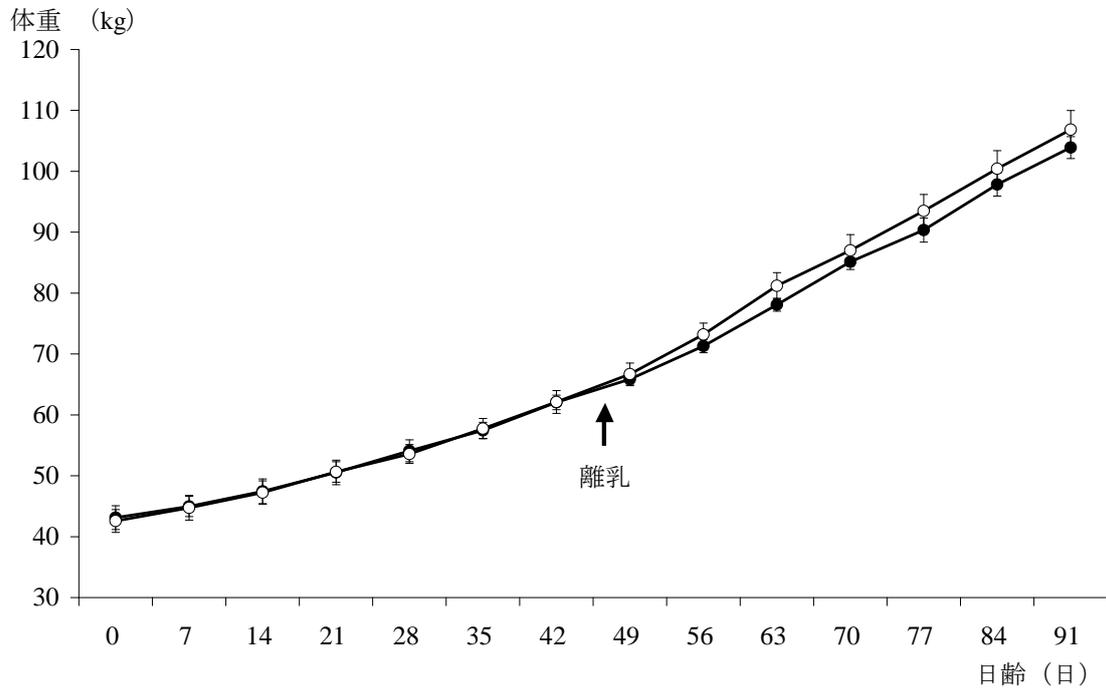


図 4.1 抗菌性物質非含有代用乳に CE 添加した乳用子ウシにおける体重の推移

● : 対照区 (n = 10)、○ : CE 区 (n = 12)。

各値は平均値±標準誤差で表示。

CE は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

46 日齢で離乳。

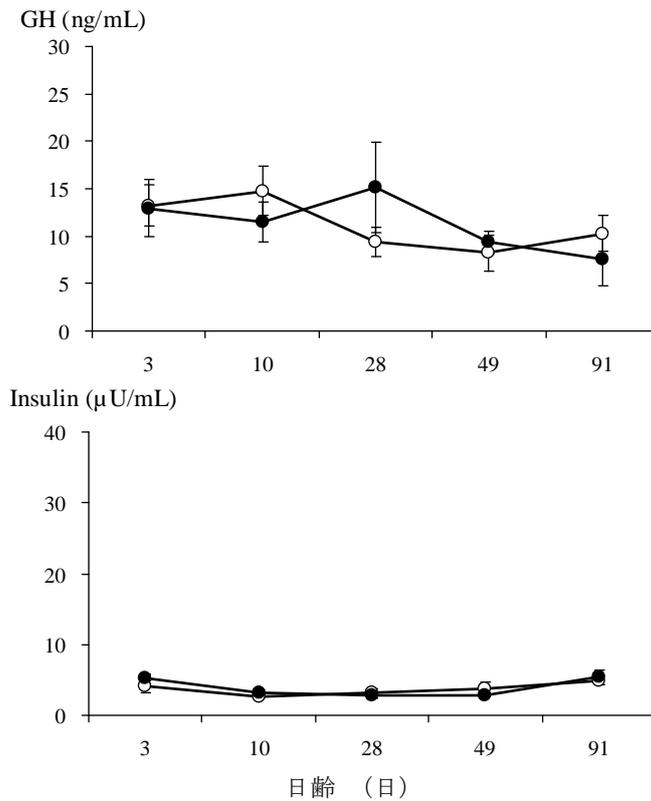


図 4.2 抗菌性物質非含有代用乳に CE 添加した乳用子ウシにおける血漿中 GH およびインスリン濃度の推移

● : 対照区 (n = 10)、○ : CE 区 (n = 12)。

各値は平均値±標準誤差で表示。

CE は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

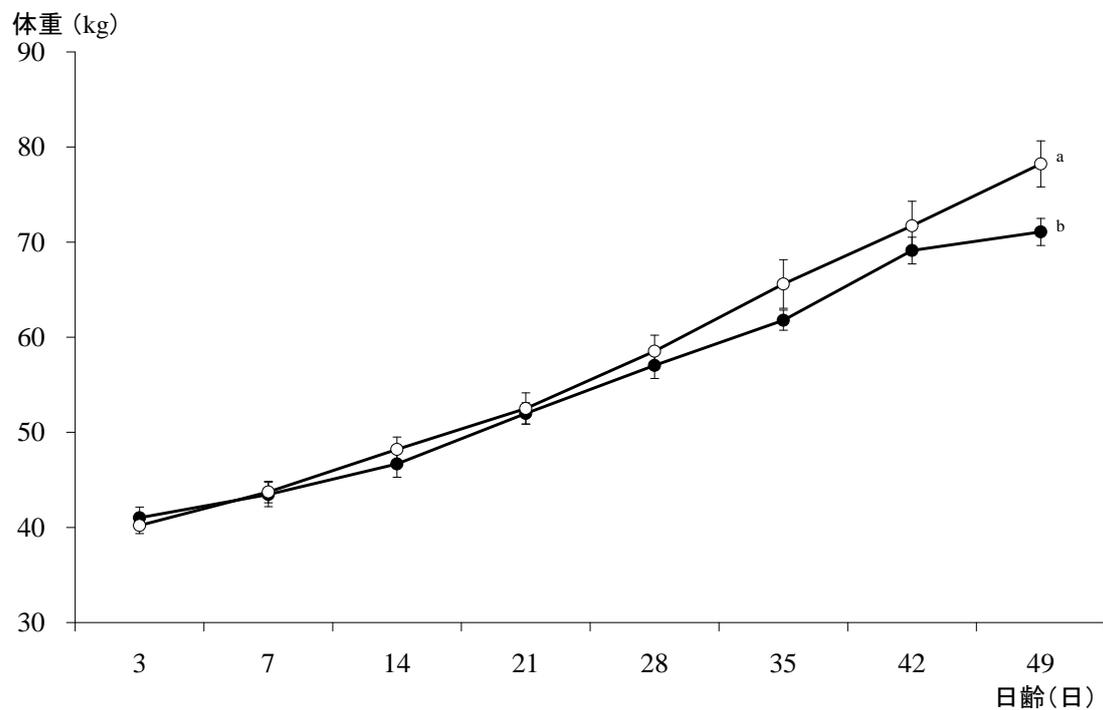


図 4.3 全乳に CE 添加した乳用雄子ウシにおける体重の推移

● : 対照区 (n = 7)、○ : CE 区 (n = 7)。

各値は平均値±標準誤差で表示。

体重の 10% (朝 4%、夕 6%) の全乳を 9 時と 16 時に哺乳。

CE は溶解して全乳に混合。

42 日齢で離乳。

a, b : 同日齢において処理間に有意差 ($P < 0.05$) を認めたもの。

表 4.1 供試飼料の成分組成（乾物）

区分	代用乳 [†]	人工乳 [‡]	チモシー乾草 [§]
乾物, %	96.7	88.7	91.7
有機物, %	93.7	94.6	93.3
粗蛋白質, %	24.7	22.3	11.8
粗脂肪, %	21.1	2.8	2.8 [¶]
中性デタージェント繊維, %		17.8	60.8
可消化養分総量, %	110.5	83.8	57.3

[†] 代用乳：株式会社日本ミルクリプレイサー，神栖

[‡] 人工乳：ニューメイクスター，全国酪農飼料株式会社，東京

[§] チモシー乾草：1 番草，出穂期，カナダ産

[¶] 日本標準飼料成分表（NARO 2001）

表 4.2 抗菌性物質非含有代用乳に CE 添加した乳用子ウシにおける体重、日増
 体量、乾物摂取量、飼料効率、積算糞スコア、および下痢日数

区分	対照区	CE区
頭数	10	12
体重, kg		
生時	42.4 ± 2.0	42.4 ± 1.9
離乳時	62.5 ± 1.4	61.7 ± 1.7
91日齢	104.2 ± 1.8	107.3 ± 3.1
日増体量, kg		
全期間	0.67 ± 0.02	0.71 ± 0.02
離乳前	0.43 ± 0.02	0.42 ± 0.03
離乳後	0.90 ± 0.03	0.98 ± 0.05
乾物摂取量 [†] , kg	141 ± 5	148 ± 5
飼料効率		
全期間	0.44 ± 0.01	0.44 ± 0.01
離乳前	0.50 ± 0.04	0.48 ± 0.03
離乳後	0.37 ± 0.02	0.38 ± 0.01
積算糞スコア [‡]	103 ± 4	107 ± 4
下痢日数 [§]	4.0 ± 1.0	3.5 ± 1.0

各値は平均値±標準誤差で表示。

CE は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

† : 代用乳、人工乳、およびチモシー乾草の合計とした。

‡ : 試験期間中の糞スコア (0 = 硬い、1 = 普通、2 = 軟便、3 = 液状、4 = 水溶性) の合計とした。

§ : 糞スコアが 3 以上の日数の合計とした。

表 4.3 抗菌性物質非含有代用乳に CE 添加した乳用子ウシにおける糞便内細菌群構成の推移

細菌グループ	週	16S rRNA全量に対する割合 (%)	
		対照区	CE区
<i>Bacteroides /Prevotella</i>	4	34.7 ± 5.8	43.1 ± 5.5
	7	38.3 ± 4.8	42.7 ± 4.9
	13	33.1 ± 3.8	35.2 ± 3.3
<i>Clostridium coccoides-Eubacterium rectale</i> group	4	8.7 ± 2.9	7.0 ± 1.0
	7	10.4 ± 1.6	9.1 ± 1.4
	13	10.2 ± 2.5	11.2 ± 1.6
<i>Bifidobacterium</i>	4	0.45 ± 0.16	0.61 ± 0.10
	7	0.15 ± 0.11	0.19 ± 0.08
	13	0.00 ± 0.00	0.09 ± 0.09
<i>Lactobacillus</i>	4	1.38 ± 0.27	1.16 ± 0.33
	7	0.85 ± 0.14	0.75 ± 0.14
	13	0.31 ± 0.15	0.55 ± 0.18
<i>Fibrobacter</i>	4	0.01 ± 0.08	0.04 ± 0.06
	7	0.78 ± 0.19	0.93 ± 0.16
	13	2.10 ± 0.27	1.50 ± 0.30
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	4	0.01 ± 0.33	0.04 ± 0.21
	7	0.78 ± 0.24	1.33 ± 0.30
	13	1.97 ± 0.55	1.57 ± 0.45

各値は平均値±標準誤差で表示。

CE は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

表 4.4 抗菌性物質非含有代用乳に CE 添加した乳用子ウシにおけるルーメン内細菌群構成

細菌グループ	16S rRNA全量に対する割合 (%)	
	対照区	CE区
<i>Bacteroides/Prevotella</i>	48.3 ± 3.6	44.5 ± 3.0
<i>Clostridium coccoides-Eubacterium rectale</i> group	11.3 ± 2.0	9.6 ± 1.6
<i>Clostridium viride</i> and relatives	1.00 ± 0.36	1.68 ± 0.39
<i>Atopobium</i>	0.46 ± 0.20	0.85 ± 0.21
<i>Oscillospira</i>	1.86 ± 0.51	2.02 ± 0.45
<i>Fibrobacter</i>	2.09 ± 0.35	1.99 ± 0.21
<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	3.24 ± 0.60	7.92 ± 0.33
<i>Archaea</i>	6.26 ± 1.11	5.77 ± 0.74

各値は平均値±標準誤差で表示。

CE は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

ルーメン液は、91 日齢に採取したもの。

表 4.5 抗菌性物質非含有代用乳に CE 添加した乳用子ウシにおけるルーメン液中総 VFA 濃度、酢酸、プロピオン酸、酪酸比率、および酢酸プロピオン酸比

区分	対照区	CE区
総VFA濃度, mmol/L	62.8 ± 6.6	68.4 ± 8.4
VFA比率, mol percentage		
酢酸	62.0 ± 0.20	60.9 ± 0.05
プロピオン酸	22.7 ± 0.02	27.1 ± 0.03
酪酸	14.5 ± 0.03	11.9 ± 0.02
酢酸:プロピオン酸比	2.91 ± 0.27	2.72 ± 0.35

各値は平均値±標準誤差で表示。

CE は 1 日 1 回午前 9 時に給与。

ルーメン液は、91 日齢に採取したもの。

表 4.6 全乳に CE 添加した乳用雄子ウシにおける体重および日増体量

	対照区	CE区
頭数	7	7
体重, kg		
3日齢	41.0 ± 1.1	40.2 ± 0.9
離乳時(42日齢)	69.1 ± 1.4	71.7 ± 2.6
49日齢	71.1 ± 1.4*	78.2 ± 2.4*
日増体量, kg		
全期間	0.63 ± 0.01**	0.79 ± 0.04**
離乳前	0.69 ± 0.02	0.77 ± 0.05
離乳後	0.33 ± 0.07***	1.09 ± 0.09***

各値は平均値±標準誤差で表示。

体重の 10%（朝 4%、夕 6%）の全乳を 9 時と 16 時に哺乳。

CE は溶解して全乳に混合。

42 日齢で離乳。

* : 処理間に有意差 ($P < 0.5$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) を認めたもの。

第V章 総括

わが国の酪農の現状は、乳牛の泌乳能力が飛躍的に向上した反面、初回授精受胎率の低下や分娩間隔の延長などの繁殖成績が低下していることが指摘されている。また、向上した泌乳能力を十分に発揮させるためには、輸入に依存している穀類飼料を多給しなければならない。これらの要因が生産コストの上昇や、産業としての酪農全体の生産性低下を招き、酪農経営を困難なものにしている。このような状況から、酪農においては健全な飼養管理と採算性の両立が不可欠である。近年の原油価格高騰に連動したトウモロコシ価格の高騰は、わが国の酪農経営における飼料基盤の脆弱さを露呈するとともに採算性の悪化を招いている。このことから、自給粗飼料の生産および利用拡大による飼料自給率の向上が急務であると考えられるようになった。自給粗飼料中心の飼料体系にするためには、繊維消化性が高くかつ粗飼料を食い込める子ウシの育成技術の確立が必要である

乳用牛の育成は、泌乳を開始する前の飼養期間であり、収益を生まないことから、その期間の短縮は採算性向上の観点からも重要なことである。育成期間の短縮において重要視すべきことは、初産分娩時に難産を招かない体格に成長させることであり、そのためには、哺育期の発育停滞や損耗率を低減させるとともに、適正な高増体を目指す飼養管理が必要である。このためには、乳用子ウシの消化管の発達を促進するとともに、繊維消化性の高い微生物叢を早期に定着させることが重要と考えられる。しかしながら、離乳前後の子ウシは免疫機能や摂取飼料が大きく変化する時期であることから様々な要因が複合的に作用して下痢が発生しやすく、その対策が求められている。当面する対応として、抗菌性物質に依存せずに子ウシの生体機能を向上させる飼養法の確立が求められている。

現状での感染性の下痢対策には、ワクチンや抗菌性物質による予防や治療が中心である。また、国内で市販されている代用乳には、発育促進目的として抗菌性物質が添加されている。しかし、予防目的の抗菌性物質の多用は薬剤耐性菌の出現を引き起こし、治療のための抗菌性物質多用も新たな感染症を引き起こし易い(Abeら 1995;Cruywagenら 1996;Donovanら 2002;Quigleyら 2002)。そのため、プレバイオティクスやプロバイオティクスが、発育促進や下痢の予防目的で使用されてきた (Abeら 1995;Cruywagenら 1996;Donovanら 2002;Quigleyら 2002;Heinrichsら 2003)。

セルロースは地球上に最も多量に存在する多糖であり、その部分分解物である CE もプレバイオティクスとして機能することが予想される。しかし、CE を子ウシに給与し生体に及ぼす影響を検討した報告はない。In vitro 研究では、CE はルーメン細菌による有機酸の発酵に影響することが示されている (Callaway と Martin 1997 ; Lila ら 2006)。また、セルロース分解菌である *Fibrobacter succinogenes* や *Ruminococcus flavefaciens* は、CE の主成分であるセロビオースを利用する (三森と湊 2004)。これらのことから、CE の子ウシへの給与により消化管機能を向上させ、繊維消化率の向上や成長促進効果が期待できる。

プロバイオティクスである乳酸菌を子ウシに給与することは、体重増加や下痢防止効果があることが認められている (Abeら 1995 ; Cruywagenら 1996)。これら乳酸菌を含む有用菌の生育を促進するプレバイオティクスとしては、ラクチュロース、ガラクトオリゴ糖、およびフラクトオリゴ糖などが知られている (MacGillivrayら 1959 ; Rowland と Tanaka 1993 ; Gibson と Wang 1994)。しかしながら、プロバイオティクスを摂取しても腸内細菌と栄養源の奪い合いがあり、十分な生育や定着を期待することが難しい (Ogawaら 2005a)。そこで、これらの弱点を補う手法としてプレバイオティクスとプロバイオティクスを組合せて利用することが考えられ、これらの組合せを Gibson と Roberfroid (1995)

がシンバイオティクスと提唱した。また、プレバイオティクスであるデキストランは、ニワトリ初生ヒナにおいて *Salmonella Enteritidis* 定着抑制効果（深田ら 1999）、ブタにおいて体重増加向上効果（田島ら 2000）、そして黒毛和種去勢牛において体重増加向上と下痢防止効果（佐藤 2001）が認められている。これらのことから、デキストランとこれを特異的に資化する Lcc からなる SB は、子ウシへ給与することにより消化管内細菌叢を整え、下痢防止効果や成長促進効果が期待できる。

成長に関係するホルモンは、GH やインスリンなどが挙げられる（真島 1986）。GH は標的器官に対する直接作用と、IGF-I の産生を介する間接作用の 2 つの面をもっており、成長促進作用、蛋白質同化作用、脂肪異化作用などの生理作用を示す（甫立 1998）。また、インスリンは、糖質、脂質、および蛋白質代謝においてきわめて強い同化作用をもち、物質代謝の恒常性の調節における要のホルモンである（甫立 1998）。したがって、子ウシのルーメンの発達が大きく変化する離乳前後に GH、インスリン、および IGF-I の分泌レベルを解析することは、反芻動物の生体機能と内分泌機能の関係の解明に重要であると考えられる。

そこで本論文では、乳用子ウシの育成において高栄養飼料給与による発育促進ではなく、ルーメンや下部消化管における微生物叢を制御することにより生体機能を向上させて発育促進に繋げる飼養法の検討することを目的に、子ウシに CE および SB を給与した。

第 II 章では、哺育期の乳用子ウシに離乳までは全乳に、離乳後は温水に CE および SB を溶解して給与することにより、子ウシの発育への影響について考察した。その結果、子ウシに対する CE の給与により、離乳後の飼料効率の増進と増体量の向上に効果が認められ、このことはルーメン内のセルロース分解菌の活性化による総 VFA 産生の上昇および VFA 吸収量の増加が関与していることが推察された。一方、SB の給与により、糞便中の乳酸菌数の増加傾向と大腸菌群数

の減少傾向が認められ、それらの変化が糞便状態の向上に寄与していると推察された。

第Ⅱ章で SB を全乳に溶解した時の子ウシの発育について考察したが、第Ⅲ章では、実際の酪農現場では代用乳を給与することが一般的であり、市販の代用乳から抗菌性物質と生菌剤を除き、SB の給与効果が代用乳給与の子ウシで発現するか検証することを目的に、子ウシの発育、腸内細菌叢、および内分泌機能への影響について考察した。さらに、通常市販代用乳には抗菌性物質が添加されていることから、抗菌性物質含有代用乳に SB を添加した場合についても考察した。その結果、子ウシに給与する代用乳への SB の添加は、離乳後も給与継続すれば発育改善のため抗菌性物質添加の代替となる可能性が示唆された。しかし、抗菌性物質と SB の併用は、相乗効果が期待できないこと示唆された。

第Ⅱ章で CE を全乳に溶解した時の子ウシの発育について考察したが、子ウシの育成では、代用乳の使用が一般的であり、全乳で認められた CE の効果の一般的な応用を考えた場合、代用乳での検討が必要である。そこで第Ⅳ章では第Ⅲ章と同様に市販の代用乳から抗菌性物質および生菌剤を除いた抗菌性物質非含有代用乳への CE 添加の効果を検証することを目的に、発育、消化管内細菌叢、および内分泌機能への影響について考察した。その結果、子ウシに給与する代用乳への CE 添加は、抗菌性物質および生菌剤非含有代用乳の場合、全乳への添加と違いルーメン内および腸内細菌叢に対して影響が少なく、発育および内分泌機能への影響も殆ど認められないことが示唆された。一方、第Ⅳ章の結果を受けて全乳への CE 添加の効果を再確認するため雄子ウシに給与する試験を行った。その結果、全乳での試験では、CE の明瞭な効果を確認した。したがって今後は、代用乳での CE の添加効果が発現する条件を検討する必要があると考えられた。

以上の結果より、プレバイオティクスである CE を子ウシに給与する場合、生

体機能および発育の向上効果を発現させるには、全乳給与が代用乳給与よりも優れていることが明らかになった。その効果はルーメン内のセルロース分解菌の活性化による総VFA濃度の上昇およびVFA吸収量の増加が関与しているためと考えられた。また、デキストランとLccからなるSBを子ウシに給与する場合、抗菌性物質非含有の代用乳に添加することは、離乳後も給与を継続すれば抗菌性物質添加代用乳と同様の発育効果があることを明らかにした。しかし、抗菌性物質とSBの併用は、相乗効果が期待できない可能性が示唆された。これらのことからCEおよびSBは、乳用子ウシにとってルーメン内および腸内細菌叢を整えて生体機能や発育向上を目指すために有用な添加物になる可能性があることを示した。特に、これら機能性物質による効果が、基礎飼料との組合せにより発現に違いがあることを示した本研究の成果は、子ウシの成長と機能性飼料に関する現状と今後の研究展開に新たな問題と方向性を提示した極めて重要な知見である。このように、本研究で実施した乳用子ウシへの発育に対するCEおよびSBの給与効果の解析は、今後の子ウシの飼養管理技術の発展に寄与するものとする。

引用文献

- Abe F, Ishibashi N, Shimamura S. 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *Journal of Dairy Science* **78**, 2838-2846.
- Abu-Tarboush HM, Al-Saiady MY, Keir El-Din AH. 1996. Evaluation of diet containing lactobacilli on performance, fecal coliform, and lactobacilli of young dairy calves. *Animal Feed Science and Technology* **57**, 39-49.
- Bartlett KS, McKeith FK, VandeHaar MJ, Dahl GE, Drackley JK. 2006. Growth and body composition of dairy calves fed milk replacers containing different amounts of protein at two feeding rates. *Journal of Animal Science* **84**, 1454-1467.
- 辨野義己. 2004. 腸内細菌の生態と機能. 小野寺良次監修, 板橋久雄編. 新ルーメンの世界. pp. 534-543. 社団法人農山漁村文化協会. 東京.
- Berge ACB, Lindeque P, Moore DA, Sisco WM. 2005. A clinical trial evaluating prophylactic and therapeutic antibiotic use on health and performance of preweaned calves. *Journal of Dairy Science* **88**, 2166-2177.
- Bohnert DW, Harmon DL, Dawson KA, Larson BT, Richards CJ, Streeter MN. 2000. Efficacy of laidlomycin propionate in low-protein diets fed to growing beef steers: effects on steer performance and ruminal nitrogen metabolism. *Journal of Animal Science* **78**, 173-180.
- Brown EG, VandeHaar MJ, Daniels KM, Liesman JS, Chapin LT, Keisler DH, Weber Nielsen MS. 2005. Effect of increasing energy and protein intake on body growth and carcass composition of heifer calves. *Journal of Dairy Science* **88**, 585-594.

- Callaway TR, Martin SA 1997. Effects of cellobiose and monensin on *in vitro* fermentation of organic acids by mixed ruminal bacteria. *Journal of Dairy Science* **80**, 1126-1135.
- Clary EM, Brandt RTJ, Harmon DL, Nagaraja TG. 1993. Supplemental fat and ionophores in finishing diets: feedlot performance and ruminal digesta kinetics in steers. *Journal of Animal Science* **71**, 3115-3123.
- Cruywagen CW, Jordan I, Venter L. 1996. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation of milk replacer on preweaning performance of calves. *Journal of Dairy Science* **79**, 483-486.
- Donovan DC, Franklin ST, Chase CC, Hippen AR. 2002. Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or Enteroguard. *Journal of Dairy Science* **85**, 947-950.
- 深田恒夫, 笹井和美, 宮本忠, 馬場栄一郎. 1999. デキストラン発酵副産シロップの鶏ひなにおけるサルモネラ定着抑制効果について. 日本獣医師会雑誌 **52**, 125-128.
- Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* **66**, 365-378.
- 福田一夫. 2003. ヨーロッパにおける抗菌性飼料添加物禁止後の影響. 動物用抗菌剤研究会報 **25**, 23-32.
- 藤田泰仁. 2001. 飼料の化学分析. 自給飼料品質評価研究会編. 粗飼料の品質評価ガイドブック. pp. 7-10. 社団法人日本草地畜産種子協会. 東京.
- Gibson GR, Roberfroid MB. 1995. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* **125**, 1401-1412.
- Gibson GR, Wang X. 1994. Bifidogenic properties of different types of

- fructo-oligosaccharides. *Food Microbiology* **11**, 491-498.
- Gluckman PD, Breier BH, Davis SR, 1987. Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. *Journal of Dairy Science* **70**, 442-466.
- Haga S, Fujimoto S, Yonezawa T, Yoshioka K, Shingu H, Kobayashi Y, Takahashi T, Otani Y, Katoh K, Obara Y. 2008. Changes in hepatic key enzymes of dairy calves in early weaning production systems. *Journal of Dairy Science* **91**, 3156-3164.
- Hagiwara K, Kataoka S, Yamanaka H, Kirisawa R, Iwai H. 2000. Detection of cytokines in bovine colostrums. *Veterinary Immunology and Immunopathology* **76**, 183-190.
- Hasunuma T, Kawashima K, Nakayama H, Murakami T, Kanagawa H, Ishii T, Akiyama K, Yasuda K, Terada F, Kushibiki S. Effect of cellooligosaccharide or synbiotic feeding on growth performance, fecal condition, and hormone concentrations in Holstein calves. *Animal Science Journal* (印刷中)
- Heinrichs AJ, Jones CM, Elizondo-Salazar JA, Terrill SJ. 2009. Effects of a prebiotic supplement on health of neonatal dairy calves. *Livestock Science* **125**, 149-154.
- Heinrichs AJ, Jones CM, Heinrichs BS. 2003. Effects of mannanoligosaccharide or antibiotics in neonatal diets on health and growth of dairy calves. *Journal of Dairy Science* **86**, 4064-4069.
- 甫立孝一. 1998. 成長の生理. 佐々木康之監修, 小原嘉昭編. 反芻動物の栄養生理学. pp. 360-368. 社団法人農山漁村文化協会. 東京.
- Hodate K, Johke T, Ozawa A, Ohashi S. 1990. Plasma growth hormone, insulin-like growth factor-I, and milk production responses to exogenous human growth hormone-releasing factor analogs in dairy cows. *Endocrinologia Japonica* **37**, 261-273.

- 井本しおん, 西郷勝康. 2007. 臨床に役立つサイトカインネットワークの知識. 臨床サイトカイン研究会編. 臨床サイトカイン学. pp. 1-4. 株式会社メディカル・サイエンス・インターナショナル. 東京.
- Ishii T, Kawashima K, Oribe H, Ueda H, Hasunuma T, Akiyama K, Kurihara M, Terada F, Kushibiki S. Effects of growth and dietary crude protein level until first insemination on milk production during first lactation in Holstein heifers. *Animal Science Journal* (印刷中)
- 板橋久雄. 1998. ルーメン内における消化. 佐々木康之監修, 小原嘉昭編. 反芻動物の栄養生理学. pp. 87-109. 社団法人農山漁村文化協会. 東京.
- Itoh F, Obara Y, Fuse H, Osaka I, Hodate K. 1997. Responses of plasma insulin, glucagon, growth hormone, and metabolites in heifers during cold and heat exposure. *Animal Science and Technology* **68**, 727-734.
- Itoh F, Obara Y, Fuse H, Rose MT, Osaka I, Takahashi H. 1998. Effects of heat exposure on plasma insulin, glucagon and metabolites in response to nutrient injection in heifers. *Comparative Biochemistry and Physiology* **119C**, 157-164.
- 伊藤喜久治. 2003. プロバイオティクスの現状と有効性. 獣医畜産新報 **56**, 473-475.
- Jenny BF, Vandijk HJ, Collins JA. 1991. Performance and fecal flora of calves fed a *Bacillus subtilis* concentrate. *Journal of Dairy Science* **74**, 1968-1973.
- Johke T. 1978. Effects of TRH on circulating growth hormone, prolactin and triiodothyronine levels in the bovine. *Endocrinologia Japonica* **25**, 19-26.
- Kamiya M, Matsuzaki M, Orito H, Kamiya Y, Nakamura Y, Tsuneishi E. 2009. Effects of feeding level of milk replacer on body growth, plasma metabolite and insulin concentrations, and visceral organ growth of suckling calves. *Animal Science Journal* **80**, 662-668.
- 加藤和雄. 2006. 成長にともなう内分泌機能の動態. 小原嘉昭編. ルミノロジ

- 一の基礎と応用. pp. 141-149. 社団法人農山漁村文化協会. 東京.
- Katoh K, Furukawa G, Kitade K, Katsumata N, Kobayashi Y, Obara Y. 2004. Postprandial changes in plasma GH and insulin concentrations, and responses to stimulation with GH-releasing hormone (GHRH) and GHRP-6 in calves around weaning. *Journal of Endocrinology* **183**, 497-505.
- 加藤和雄, 小原嘉昭. 2006. 生理活性物質による代謝・内分泌・免疫機能制御. 小原嘉昭編. ルミノロジーの基礎と応用. pp. 130-135. 社団法人農山漁村文化協会. 東京.
- 小林剛, 板橋久雄. 1987. 子牛における頸静脈, 第一胃および十二指腸内への VFA の注入が血漿インスリンとガストリン濃度の及ぼす影響. 日本畜産学会報 **58**, 455-460.
- Kobayashi Y, Takazawa H, Wakita M, Hoshino S. 1990. Microbial development and metabolic aspect of the rumen of calves given ionophore antibiotics. *Japanese Journal of Zootechnical Science* **61**, 850-857.
- 小岩政照. 1999. 現場における子牛の免疫の臨床的意義とその管理. 臨床獣医 **17**, 16-19.
- Kushibiki S, Hodate K, Ueda Y, Shingu H, Mori Y, Itoh T, Yokomizo Y. 2000. Administration of recombinant bovine tumor necrosis factor-alpha affects intermediary metabolism and insulin and growth hormone secretion in dairy heifers. *Journal of Animal Science* **78**, 2164-2171.
- Lila ZA, Mohammed N, Takahashi T, Tabata M, Yasui T, Kurihara M, Kanda S, Itabashi H. 2006. Increase of ruminal fiber digestion by cellobiose and a twin strain of *Saccharomyces cerevisiae* live cells *in vitro*. *Animal Science Journal* **77**, 407-413.
- Lilly DM, Stillwell RH. 1965. Probiotics: Growth-promoting factors produced by

- microorganisms. *Science* **147**, 747-748.
- Liu P, Piao XS, Kim SW, Wang L, Shen YB, Lee HS, Li SY. 2008. Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs. *Journal of Animal Science* **86**, 2609-2618.
- MacGillivray PC, Finlay HV, Binns TB. 1959. Use of lactulose to create a preponderance of Lactobacilli in the intestine of bottle-fed infants. *Scottish Medical Journal* **4**, 182-189.
- 真島英信. 1986. 内分泌. 生理学改訂第 18 版. pp. 521-572. 株式会社文光堂. 東京.
- 松村隆治, 永井勝, 村井安芳, 井上人士也, 土倉道之. 1984. 発酵初乳を利用した哺育牛の損耗防止. 畜産の研究 **38**, 1114-1118.
- Matsunaga N, Arakawa NT, Goka T, Nam KT, Ohneda A, Sasaki Y, Katoh K. 1999. Effects of ruminal infusion of volatile fatty acids on plasma concentration of growth hormone and insulin in sheep. *Domestic Animal Endocrinology* **17**, 17-27.
- 松本光人. 1998. 窒素の代謝. 佐々木康之監修, 小原嘉昭編. 反芻動物の栄養生理学. pp. 211-219. 社団法人農山漁村文化協会. 東京.
- Matsuzaki M, Sato T, Shiba N, Hara S, Tsuneishi E, Yamaguchi T. 2001. Effects of restricted concentrate feeding during the early growing phase on growth performance, carcass characteristics and the somatotrophic axis in Holstein steers. *Animal Science Journal* **72**, 483-493.
- 三森眞琴, 湊一. 2004. ルーメン細菌の種類と生態. 小野寺良次監修, 板橋久雄編. 新ルーメンの世界. pp. 43-86. 社団法人農山漁村文化協会. 東京.
- 光岡知足. 1978a. 腸内菌叢と家畜の生産性 (I). 日本獣医師会雑誌 **31**, 199-207.

- 光岡知足. 1978b. 腸内菌叢と家畜の生産性(Ⅱ). 日本獣医師会雑誌 **31**, 259-267.
- 農業技術研究機構編(NARO). 2001. 日本標準飼料成分表(2001年版). pp. 54-55. 社団法人中央畜産会. 東京.
- 農林水産省経営局保険課保険数理室. 2009. 政府統計の総合窓口. 農林水産省. 東京. URL: <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001042115>.
- 農林水産省生産局畜産部畜産企画課. 2010b. 家畜改良増殖目標. 農林水産省. 東京. URL: http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/l_hosin/pdf/h2207_katiku_mokuhyo.pdf.
- 農林水産省生産局畜産部畜産企画課. 2010a. 酪農及び肉用牛生産の近代化を図るための基本方針. 農林水産省. 東京. URL: http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/l_hosin/pdf/h2207_rakuniku.pdf.
- 農林水産省農林水産技術会議事務局編. 1999. 日本飼養標準・乳牛(1999年版). pp. 106-108. 社団法人中央畜産会. 東京.
- 小原嘉昭. 2004. 糖質の代謝調節. 小野寺良次監修, 板橋久雄編. 新ルーメンの世界. pp. 341-354. 社団法人農山漁村文化協会. 東京.
- 小原嘉昭. 2006. 反芻家畜の成長にともなう栄養生理機能の獲得. 小原嘉昭編 ルミノロジーの基礎と応用. pp. 97-107. 社団法人農山漁村文化協会. 東京.
- Ogawa T, Asai Y, Sakamoto H, Yasuda K. 2006a. Oral immunoadjuvant activity of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* in dextran-fed layer chickens. *British Journal of Nutrition* **95**, 430-434.
- Ogawa T, Asai Y, Tamai R, Makimura Y, Sakamoto H, Hashikawa S, Yasuda K. 2005b. Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clinical and Experimental Immunology* **143**, 103-109.

- Ogawa T, Asai Y, Yasuda K, Sakamoto H. 2005a. Oral immunoadjuvant activity of a new synbiotic *Lactobacillus casei* subsp. *casei* in conjunction with dextran in BALB/c mice. *Nutrition Research* **25**, 295-304.
- Ogawa T, Hashikawa S, Asai Y, Sakamoto H, Yasuda K, Makimura Y. 2006b. A new synbiotic, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* together with dextran, reduces murine and human allergic reaction. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **46**, 400-409.
- 小倉喜八郎. 1999. 哺育・育成プログラム. 全国家畜畜産物衛生指導協会編. 生産獣医療システム乳牛編 1. pp. 10-12. 社団法人農山漁村文化協会. 東京.
- Otsuka M, Ishida A, Nakayama Y, Saito M, Yamazaki M, Murakami H, Nakamura Y, Matsumoto M, Mamoto K, Takada R. 2004. Dietary supplementation with cellooligosaccharide improves growth performance in weanling pigs. *Animal Science Journal* **75**, 225-229.
- 大塚浩通. 2001. 初乳の給与と子牛の免疫. *臨床獣医* **19**, 26-33.
- Parker RB. 1974 Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Animal Nutrition and Health* **29**, 4-8.
- Rowland IR, Tanaka R. 1993. The effects of transgalactosylated oligosaccharides on gut flora metabolism in rats associated with a human faecal microflora. *Journal of Applied Microbiology* **74**, 667-674.
- Quigley JD, Kost CJ, Wolfe TA. 2002. Effects of spray-dried animal plasma in milk replacers or additives containing serum and oligosaccharides on growth and health of calves. *Journal of Dairy Science* **85**, 413-421.
- 佐藤友吾. 2001. 肉用牛の増体・下痢に対するデキストランオリゴ糖の効果. *家畜診療* **48**, 653-657.

- 里内美津子, 渡辺隆司, 若林茂, 大隈一裕, 越島哲夫, 桑原正章. 1996. ラクトおよびヒトにおけるセロオリゴ糖の消化吸収性および生体に及ぼす影響. 日本栄養・食糧学会誌 **49**, 143-148.
- 嶋英邦, 光岡知足. 1983. 子牛の腸内フローラにおよぼすパントテン酸投与の影響. 日本獣医師会雑誌 **36**, 584-588.
- Smith JM, Van Amburgh ME, Díaz MC, Lucy MC, Bauman DE. 2002. Effect of nutrient intake on the development of the somatotropic axis and its responsiveness to GH in Holstein bull calves. *Journal of Animal Science* **80**, 1528-1537.
- Stick DA, Davis ME, Loerch SC, Simmen RCM. 1998. Relationship between blood serum insulin-like growth factor I concentration and postweaning feed efficiency of crossbred cattle at three levels of dietary intake. *Journal of Animal Science* **76**, 498-505.
- Suda Y, Nagaoka K, Nakagawa K, Chiba T, Yusa F, Shinohara H, Nihei A, Yamagishi T. 2003. Change of plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-I) concentration with early growth in Japanese beef cattle. *Animal Science Journal* **74**, 205-210.
- 須藤恒二. 1973. ルーメン液検査. 中村良一, 米村寿男, 須藤恒二共編. 牛の臨床検査法. pp. 6 - 39-42. 社団法人農山漁村文化協会. 東京.
- 須藤まどか, 小原嘉昭. 1996. ルーメン内窒素代謝と生産性 [4] 飼料への易発酵性炭水化物添加による反芻家畜の窒素カイネティクスと炭水化物代謝との関連性. 畜産の研究 **50**, 1109-1115.
- 把田雅彦. 2008. セルロースを原料とした新素材「セロオリゴ糖」の開発. *Cellulose Communications* **15**, 34-37.
- 田島茂行, 栗田隆之, 安藤康紀, 北島秀敏. 2000. デキストラン発酵副産シロップの飼料添加が子豚の発育に与える影響. 愛知県農業総合試験場研究

報告 **32**, 225-228.

Takahashi T, Kobayashi Y, Hasegawa S, Touno E, Otani Y, Haga S, Itoh F, Katoh K, Obara Y. 2008. Different responses in postprandial plasma ghrelin and GH levels induced by concentrate or timothy hay feeding in wethers. *Domestic Animal Endocrinology* **34**, 432-439.

Tamate H, Mcgilliard AD, Jacobson NL, Getty R. 1962. Effect of various dietaries on the anatomical development of the stomach in the calf. *Journal of Dairy Science* **45**, 408-420.

寺田文典. 2006. 高泌乳牛に対応した栄養管理. 小原嘉昭編. ルミノロジーの基礎と応用. pp. 56-77. 社団法人農山漁村文化協会. 東京.

Thomas GB, Mercer JE, Karalis T, Rao A, Cummins JT, Clarke IJ. 1990. Effect of restricted feeding on the concentrations of growth hormone (GH), gonadotropins, and prolactin (PRL) in plasma, and on the amounts of messenger ribonucleic acid for GH, gonadotropin subunits, and PRL in the pituitary glands of adult ovariectomized ewes. *Endocrinology* **126**, 1361-1367.

Uyeno Y, Sekiguchi Y, Tajima K, Takenaka A, Kurihara M, Kamagata Y. 2007. Evaluation of group-specific, 16S rRNA-targeted scissor probes for quantitative detection of predominant bacterial populations in dairy cattle rumen. *Journal of Applied Microbiology* **103**, 1995-2005.

Van Loo J, Cummings J, Delzenne N, Englyst H, Franck A, Hopkins M, Kok N, Macfarlane G, Newton D, Quigley M, Roberfroid M, van Vliet T, van den Heuvel E. 1999. Functional food properties of non-digestible oligosaccharides: a consensus report from the ENDO project (DGXII AIRII-CT94-1095). *British Journal of Nutrition* **81**, 121-132.

Vlková E, Trojanová I, Rada V. 2006. Distribution of bifidobacteria in the

- gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiologica* **51**, 325-328.
- 渡辺隆司. 1998. セルロース系オリゴ糖の生理機能開発. *Cellulose Communications* **5**, 91-97.
- Watase H, Takenouchi T. 1978. Bacterial flora in the digestive tract of cattle. I. Comparison of nonselective culture medium and changes in fecal bacterial flora with age. *National Institute of Animal Health Quarterly* **18**, 143-154.
- World Health Organization (WHO). 2000. WHO Press Releases 2000. The World Health Organization, Geneva, Switzerland; URL: <http://who.int/inf-pr-2000/en/pr2000-43.html>
- Yajima T. 1985. Contractile effect of short-chain fatty acids on the isolated colon of the rat. *Journal of Physiology* **368**, 667-678.
- 矢野俊博, 立木隆, 栢倉辰六郎, 齋藤忠夫. 1990. ビフィズス菌の選択増殖と関連酵素機構. 酪農科学・食品の研究 **39**, A229-A237.
- Yasuda K, Hashikawa S, Sakamoto H, Tomita Y, Shibata S, Fukata T. 2007. A new synbiotic consisting of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and dextran improves milk production in Holstein dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science* **69**, 205-208.
- 安田憲司. 2008. デキストラン資化性乳酸桿菌を用いたシンバイオティクスの畜産分野への応用. 栄養生理研究会報 **52**, 23-30.
- 米持千里. 2003. 日本における抗菌性飼料添加物の役割と課題. 動物用抗菌剤研究会報 **25**, 33-38.

謝 辞

本論文の作成に当たり、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ご懇切なるご教示とご校閲を賜った。また、同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いただき心から感謝の意を表す。

本研究は、独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所企画管理部長寺田文典博士ご指導のもとに開始したものであり、その遂行に当たり、格別の便宜とご指導を戴いた。本研究は、千葉県畜産総合研究センター川嶋賢二氏、元愛知県農業総合試験場中山博文氏、現同試験場野田正人氏、元石川県畜産総合センター金川博行氏、村上俊明氏、石田美保氏、現同センター永島茂男氏、元茨城県畜産センター石井貴茂氏、現同センター脇本亘氏、神奈川県農業技術センター秋山清氏ら乳牛育成協定各県との共同研究であり、試験に携わった方々には、試験設計、データの解析、家畜の飼養管理について有益なご助言とご協力を戴いた。名糖産業株式会社名古屋研究所安田憲司博士には、シンバイオティクスの提供と細菌分析をして戴いた。日本製紙ケミカル株式会社把田雅彦氏には、セロオリゴ糖を提供していただいた。全国酪農業協同組合連合会上野豊氏には、細菌叢の分析をしていただいた。富山県農林水産総合技術センター畜産研究所久保博文所長および同僚諸氏には、常に多大なご教示とご協力を戴いた。さらに、協定各県で飼養され試験に供試されたホルスタイン種雌子ウシには、血液、糞便並びに第一胃液を提供して戴いた。ここに記して、深く感謝の意を表します。

なお、本研究は、農林水産省農林水産技術会議事務局の平成 18、19 年度先端技術を活用した農林水産研究高度化事業、平成 20 年度新たな農林水産政策を推

進する実用技術開発事業の委託研究「乳用子牛の生体機能向上による健全な哺育管理技術の開発」および平成 21 年度「消化管機能向上による子牛育成管理技術の開発」により実施したものである。