

## 目次

序論	3
第 1 章 山形県最上地方の酪農場における SARA の発生状況	
1.1 緒論	8
1.2 材料および方法	9
1.3 結果	15
1.4 考察	22
1.5 小括	26
第 2 章 周産期乳牛における前胃液 pH と血液性状の関連	
2.1 緒論	27
2.2 材料および方法	28
2.3 結果	36
2.4 考察	40
2.5 小括	44
第 3 章 周産期乳牛における SARA のルーメン性状および生産性の変化	
3.1 緒論	45
3.2 材料および方法	46
3.3 結果	54
3.4 考察	58
3.5 小括	61
第 4 章 パルプ製材給与による SARA 低減の試み	
4.1 緒論	62
4.2 材料および方法	63
4.3 結果	64
4.4 考察	71
4.5 小括	75

総括	・ ・ ・ ・ ・ 76
引用文献	・ ・ ・ ・ ・ 81
謝辞	・ ・ ・ ・ ・ 87

## 序論

### 1. 近年の畜産において重要課題である潜在性ルーメンアシドーシス(SARA)

ルーメンアシドーシスは、濃厚飼料多給によりルーメン内の揮発性脂肪酸(VFA)や乳酸が増加しルーメン pH が低下することによって生じる(小原, 2006)。ウシが摂取した炭水化物はルーメン内で微生物による発酵を受け、酢酸、プロピオン酸、酪酸等の VFA に変化する。飼料給与後は、これらの酸の生成によりルーメン pH は徐々に低下するが、通常はアルカリ性の唾液の多量の分泌により中和されルーメン液の pH は 6~7 に維持される。ルーメン発酵は飼料条件が一定の場合には恒常性が維持されているが、濃厚飼料が短時間に多量給与されるとルーメン内で乳酸や VFA の産生が増加し、pH が低下してグラム陽性菌が急速に増殖し、さらにルーメン pH が 5 以下に低下する。死滅したグラム陰性菌から産生されるエンドトキシンは炎症を惹起するほか、ルーメンや第四胃運動に抑制的に作用し、循環系を経由して蹄部にも影響を及ぼす(小原, 2006)。したがって、従来から、ルーメンアシドーシスは第一胃不全角化症、肝膿瘍、蹄病などの原因として重視されているが、近年高泌乳牛の飼養管理と関連した潜在性ルーメンアシドーシス(Subacute ruminal acidosis; SARA)の問題が注目されている(小原, 2006)。

急性アシドーシスがルーメン pH 5~5.2 以下に低下する状態であるのに対し、SARA の乳牛におけるルーメン pH は 5.5~5.6 程度であるとされている(Stone, 2004)。pH の低下により *Streptococcus bovis* が増殖し乳酸産生が盛んになるが、pH 5.2 以上では乳酸濃度はあまり増加しないため SARA で見られるルーメン pH の低下は乳酸濃度の増加よりはむしろ、総 VFA の蓄積と不十分な緩衝作用と関連があると考えられている(Stone, 2004; Plaizier, 2008)。

給与飼料の改善や育種改良によって、わが国における経産牛 1 頭当たりの年間乳量は 1985 年からの 20 年間で約 2200kg 増加した(牛群検定成績、家畜改良事業団)。一方、濃厚飼料 1kg で生産した乳量を示す“飼料効果”は、この 20 年間約 2.8 でほとんど変化していない。このことは近年達成された高泌乳が濃厚飼料に大きく依存していることを意味している(木田, 2013)。そのため濃厚飼料多給による乳牛への負担が増大し、ルーメン機能異常に起因した様々

な疾病発生や繁殖障害の増加が問題となっている(小原, 2006)。以上により、SARA は近年の国内の畜産現場において重要課題であると言える。

## 2. SARA の診断基準および診断法の確立

SARA は反復するルーメン pH の低下を特徴とすることから(Plaizier et al, 2008)、その診断においてルーメン pH の測定は最も適した方法である(Kleen et al, 2003)。SARA の定義として Gozho らは、ルーメン液が pH5.6 未満の状態が少なくとも 3 時間以上継続する状態であるとしている(Gozho et al, 2005)。しかし、従来行われてきた経口的なルーメン液の採取では唾液の混入により正確な pH の測定が困難であること、ルーメン穿刺による方法では腹膜炎のリスクがあること(Duffield et al, 2004)、野外の個体ではルーメンフィステルの装着が困難であることなどの理由から野外の牛群において簡便かつ正確にルーメン pH を把握することが困難であり、乳牛の SARA の実態については不明な点が多い(Kleen et al, 2003)。しかし、近年 Sato らによって無線伝送式ルーメン pH センサー（以下、pH センサー）を使用した測定システムが開発され、非観血的で連続的なルーメン pH 測定が可能となった(Sato et al, 2012b; Sato et al, 2012c)。経口的に投与された pH センサーのほとんどが第二胃内へ留置され、センサーからの pH データが牛舎内に設置したパーソナルコンピュータに表示される。Sato らは、このセンサーを使用して第二胃液 pH による SARA の診断が可能であり、診断基準は pH6.3 であると報告している(Sato et al, 2012a; Kimura, 2013)。以上により、このシステムを用いた SARA の実態の把握と SARA の制御への応用が期待されるが、これまでに野外での調査報告は少ない。

## 3. 潜在性ルーメンアシドーシスの病態

高穀類、低繊維飼料はルーメン内 VFA の産生を増加させ pH の低下につながる。しかし、近年、高消化性の牧草の給与によっても SARA は生じることが報告されている(O'Grady et al, 2006)。また、牧草の切断長は咀嚼や反芻に

よる唾液量に影響するために、飼料中繊維含量の指標として物理的有効繊維 (physically effective fiber; peNDF)の重要性も明らかになった(Plaizier et al, 2008)。このように、SARA は飼料中の粗濃比だけでなく飼料の消化性や物理的な繊維効果、ルーメン壁からの VFA 吸収能力などさまざまな要因によって VFA の蓄積量と唾液による緩衝作用のバランスが崩れた結果、pH が低下した状態が継続する。これまでに様々な飼料条件で人為的に SARA を誘発した研究が数多く報告されているが、その手法によってルーメン pH の低下に対する牛の反応性に違いが見られることは、SARA が単に pH だけでは定義付けできない、他の要因が関与する病態をもつことを示唆している(Plaizier et al, 2008)。

穀類多給により飼料中デンプン濃度を高めることで生じる SARA (grain-based SARA challenge; GBSC)は、急性アシドーシスと同様にルーメン内で産生された酸の蓄積によってルーメン pH が低下し、ルーメン内微生物の死滅と、それに続いて起こる LPS 濃度の増加や細菌のトランスロケーションによって炎症性サイトカインやヒスタミン、急性相蛋白の増加を引き起こす (Gozho et al, 2005)ために、局所的または全身的な炎症反応につながる炎症性疾患である(Plaizier et al, 2012)。繊維分解菌の減少は繊維消化率を低下させ、乾物摂取量の低下とルーメン内の飼料代謝効率の低下を引き起こすほか、下痢や乳脂肪率の低下の原因となる (Kleen et al, 2003; Plaizier et al, 2008)。また、ルーメン上皮のバリア機能の低下と細菌やエンドトキシンのトランスロケーションは運動器病の発症、肝臓瘍、免疫機能の低下等の健康被害を及ぼし、大きな経済損失をもたらす (Kleen et al, 2003; Plaizier et al, 2008)。一方、アルファルファペレットの多給によりデンプン濃度は通常と同程度のまま非繊維性炭水化物 (Non-Fiber Carbohydrate; NFC)含量を高めることで生じる SARA (alfalfa-pellet SARA challenge; APSC)は、穀類多給で生じる SARA (GBSC)と同じようにルーメン pH の低下とルーメン液中 LPS 濃度の上昇を生じるにも関わらず、GBSC は血中急性相蛋白の上昇と乾物摂取量の低下を引き起こすが、APSC は炎症反応と乾物摂取量の低下を生じなかったという報告がある (Plaizier et al, 2008)。このことは、炎症も乾物摂取量を低下させる要因のひとつであるという点 (Plaizier et al, 2008)と、両者に共通して起こるルー

メン pH の低下やルーメン内 LPS 濃度の増加以外の要因が急性炎症反応の有無に影響している (Plaizier et al, 2012)ことを示唆している。さらに Li らは、GBSC は盲腸消化物中の LPS 濃度を上昇させ消化管からの LPS のトランスロケーションのリスクを高めるが、APSC では盲腸内の LPS 濃度に変化はなかったと報告している (Li et al, 2012)。高濃度のデンプン摂取は大腸内での発酵を増加させることから、GBSC で見られる急性相蛋白の上昇は大腸消化物内のデンプン濃度と関連があると考えられている (Plaizier et al, 2012; Li et al, 2012)。したがって、SARA はルーメンだけでなく大腸内の炎症とも関連した病態をもつ疾病であると言える。

SARA は特有の症状に乏しく個体での診断は非常に困難であるが、SARA のリスクが高い牛群では、反芻の減少、採食量の変動、同一の飼料を給与されている牛群内における正常便と異常便の混在、便中への未消化飼料やムチンの出現などの兆候が見られるため (Hall et al, 2002)、SARA は牛群レベルでの問題であると考えられている (Kleen et al, 2003)。

近年、ヒト医学では慢性炎症が生活習慣病やがんに広く寄与することが明らかにされており (Multhoff et al, 2012; Franceschi et al, 2014)、炎症と代謝は密接に関係すると言われている。しかし、ウシにおける炎症性疾患のひとつである SARA と代謝性疾患との関係は明らかにされておらず、SARA が代謝に与える影響は不明である。

#### 4. SARA 予防および低減の試み

ウシにおいて疾病発生を抑え生産性を向上させるためには、ルーメン微生物の機能を最大限に発揮させる飼料給与が重要となる。高泌乳牛では濃厚飼料の給与割合が高まるため、ルーメン環境の恒常性を維持し発酵を安定的に保つことが極めて重要である (小原, 2006)。ルーメンの pH 低下を防ぐためには高品質の粗飼料の給与により一定割合の飼料中繊維含量を確保することが必要であり、日本飼養標準では繊維水準として中性デタージェント繊維 (Neutral Detergent Fiber; NDF) で 35%、酸性デタージェント繊維 (Acid Detergent Fiber; ADF) で 21%、粗繊維で 17% を推奨している。

飼料中繊維含量を高める方法のひとつとして、クラフトパルプの活用に関する研究が行われている。クラフトパルプは、木材チップから消化の妨げになるリグニンが除去された、セルロースを主成分とする高栄養価繊維飼料である（寺田, 2017）。高い消化率とトウモロコシと同等の可消化養分総量(TDN)をもつが、ルーメン内での発酵がゆるやかに進むため pH の低下が抑えられ、SARA の予防効果が期待されている (Nishimura et al, 2019)。クラフトパルプをはじめとした森林資源の畜産的利用には、海外からの輸入に依存しない国産飼料の安定的供給や林畜連携による中山間地域振興などのメリットも挙げられる（寺田, 2017; Nishimura et al, 2019）。しかし、クラフトパルプの畜産現場での普及にはコストや嗜好性等の課題もあり、クラフトパルプを活用した畜産現場での SARA の予防あるいは低減に関する報告は少ない。

以上の背景から、本研究は乳牛における SARA の病態解明および予防・低減法確立のために、無線伝送式ルーメン pH センサーを使用した SARA の実態把握、SARA 発症牛の血液性状の変化およびクラフトパルプ投与による SARA 低減効果を明らかにすることを目的として、一連の実験を行った。なお、本研究における pH の測定はすべて pH センサーを用いて行っており、第一胃液または第二胃液のいずれかの pH を測定しているため、これらを合わせて前胃液 pH と表現する。

## 第 1 章 山形県最上地方の酪農場における SARA の発生状況

### 1.1 緒論

潜在性ルーメンアシドーシス (Subacute ruminal acidosis, SARA) は反復するルーメン液 pH の低下によって生じる (Plaizier et al, 2008)。このため、その診断においてルーメン液 pH の測定は最適な方法である (Kleen et al, 2003)。従来、ルーメン液の採取方法としてカテーテルを用いた経口的採取やルーメン穿刺などが行われてきた。経口カテーテル法では、唾液の混入により正確な pH の測定が難しく、採取部位によって測定値が異なること、ルーメン穿刺では腹膜炎のリスクがあることなど、それぞれの方法にはいくつかの問題点が存在する (Duffield et al, 2004)。また、ルーメン pH は一定ではなく一日を通して変動するため、ルーメン液の採取時間にも注意を要する。Sato らは、外科的処置が不要で経口投与が可能な無線伝送式ルーメン pH センサー (以下 pH センサー) によるルーメン液 pH 測定システムを新たに開発した (Sato et al, 2012b; Sato et al, 2012c)。経口的に投与された pH センサーのほとんどが第一胃から第二胃に移行し留置される。pH センサーからのデータは受信機を介してパーソナルコンピュータのディスプレイに表示される。乳牛で重要な課題となっている SARA の診断と予防にこのシステムを応用するための基礎的研究はこれまでに多数報告があるが、一般の農家で飼養されている牛での報告は少ない。本研究は、このシステムを利用して山形県最上地方の酪農場における SARA の発生状況を調査するとともに、飼養形態の異なる農場間の前胃液 pH を比較し、それに影響する飼養管理要因について検討することを目的とした。



## 1.2 材料および方法

### 動物

山形県最上地方の 5 戸の酪農場（T, K, I, H, S 農場）において、一戸あたり 8 頭のホルスタイン種乳牛を対象とした。

### 飼養方法

本研究を行った 5 農場の飼養形態を表 1-1 に示した。S 農場のみ、つなぎ飼いで分離給与を行っていた。それ以外の 4 農場はフリーストールで混合飼料 (Total Mixed Ration; TMR) を給与していた。移行期の管理方法については、I 農場と H 農場で特徴が見られた。I 農場は乾乳牛に搾乳牛用 TMR を給与しており、分娩 2 週間前からこれを飽食させていた。また、H 農場は他の農場と比較して分娩前に短期間で急激な濃厚飼料の増飼をしていた。

図 1-1、表 1-2 に飼料計算結果を示した。I 農場以外の 4 農場では、分娩前後で同じような飼料中栄養成分の変化が見られた。すなわち、乾乳牛飼料は中性デタージェント繊維 (Neutral Detergent Fiber; NDF) 含量が高く、非繊維性炭水化物 (Non-Fiber Carbohydrate; NFC) とデンプン含量が低いが、搾乳牛飼料は NDF と NFC が 1:1 に近くなりデンプン濃度は乾乳期飼料と比較して約 2 倍になっていた。一方、I 農場は分娩前後で同じ TMR を給与しているため飼料中栄養成分の変化はほとんどなかった。I 農場の飼料中 NFC 濃度は他の 4 農場の搾乳牛飼料と同レベルであったが、デンプン濃度は他の 4 農場と比較して約半分であった。

### 前胃液 pH の測定および pH パラメーターの算出

前胃液 pH の測定は、前述の無線伝送式 pH センサーを用いて行った (Sato et al, 2012b; Sato et al, 2012c)。無線伝送式 pH センサーによる測定システムは、pH センサー、データ受信器、中継器および専用ソフトウェア (YCOW-S; DKK-Toa Yamagata, Japan) 搭載のパーソナルコンピューターから構成される。センサーを経口投与し、pH は 10 分間隔で連続測定した。金属探知機によってセンサーが第二胃内に留置されたことを確認した。

センサーより得られた pH データを以下の pH パラメーターに要約した。まず、それぞれの個体において 1 日 pH 平均値、最小値、最大値、pH 較差を算出した（図 1-2、図 1-3）。また、一両日中のルーメン内環境の安定性を評価するために、不安定化指標を算出した。これは 1 日 pH 平均値と当日の移動平均の差であり正にも負にもなる値であるが、変動の大きさを評価するために絶対値として評価した（図 1-4）。次に、大まかな pH の動きを捉えるために、分娩前後 50 日間を次の 6 つのステージに分け（分娩 10 日前～1 日前、分娩日～分娩 3 日後、分娩 4 日後～10 日後、分娩 11 日後～20 日後、分娩 21 日後～30 日後、分娩 31 日後～40 日後）、ステージ pH 平均値、ステージ pH 較差を算出した（表 1-3、表 1-4）。各農場における個体間のばらつきの程度は変動係数を算出することによって比較した（図 1-5）。また、分娩 10 日前～分娩 1 日前の pH 平均値をゼロとした時の各ステージ pH 変化量を算出した（表 1-5）。さらに、1 日のうち第二胃液 pH<6.3 が 3 時間以上継続した日を SARA と診断し、農場ごとの平均 SARA 出現率を算出した（表 1-6）。Gozho らは、ルーメン pH が 5.2～5.6 の状態が少なくとも 3 時間以上継続すれば SARA であると定義しているが（Gozho et al, 2005）、これを基にした Sato ら、Kimura の報告により、pH センサーを用いた第二胃液 pH による SARA の診断基準は pH<6.3、持続時間は 1 日 3 時間以上が適した基準であると報告されている（Sato et al, 2012a; Kimura, 2013）。本研究においても投与したセンサーが全頭において第二胃内に留置したことを確認したため、第二胃液 pH の基準に基づき SARA の診断をおこなった。各パラメーターの算出方法を以下に示す。

1 日 pH 平均値 = 1 日 144 個の pH データの総計 / 144

1 日 pH 較差 = 1 日 pH 最大値 - 1 日 pH 最小値

不安定化指標 = 当日の 1 日 pH 平均値 - 当日の移動平均

ステージ pH 平均値 = ステージ内の pH データの総計 / ステージ内データ個数

ステージ pH 較差 = ステージ内の pH 較差の総計 / ステージ内データ個数

ステージ pH 変化量 = あるステージ pH 平均値 - (分娩 10～1 日前のステージ pH 平均値)

個体の SARA 出現率 = 期間中 SARA と判定された日数 / 測定日数 × 100

農場の平均 SARA 出現率 = 個体の SARA 出現率の総計 / 測定頭数

なお、センサーの不具合による明らかな異常値データは欠損値とし、ステージ内データの半数が欠損したステージは無効とした。また、試験期間中に治療行為を受けた個体は含まれるが、死亡・廃用の転帰となった個体は除外した。

## 統計

センサーのエラーや試験牛の死亡・廃用等によるデータの除外により各農場のサンプル数が少なくなったため、すべての統計処理はノンパラメトリック検定により行った。ステージ pH 平均値、ステージ pH 較差、ステージ pH 変化量について、Kruskal-Wallis 検定により農場間の比較を、Friedman 検定によりステージ間の比較を行った。農場の平均 SARA 出現率は、農場間の比較を Kruskal-Wallis 検定により行った。

表 1-1. 各農場における飼養管理形態の比較

	T 農場		K 農場		I 農場		H 農場		S 農場	
飼養 形態	FS	77 頭	FS	76 頭	FS	37 頭	FS	35 頭	TS	50 頭
給餌 形態	TMR	1 回/ 日	TMR	1 回/ 日	TMR	1 回/ 日	TMR	2 回/ 日	分離 給与	2 回/ 日
分娩前 増給	予定日 21 日前～		予定日 30 日前～		予定日 2 週間前～		予定日 5 日前～		予定日 2 週間前～	
	濃厚飼料 3kg		濃厚飼料 3kg		搾乳用 TMR 飽食		濃厚飼料 4kg		濃厚飼料 最大 3kg	

FS: フリーストール

TS: タイストール（つなぎ）

TMR: Total Mixed Ration（混合飼料）

表 1-2. 各農場の DM 充足率

DM 充足率 (%)	T 農場	
	乾乳	搾乳
	106.3	98.0
	K 農場	
	乾乳	搾乳
	113.6	95.9
	I 農場	
	乾乳	搾乳
	94.4	119.6
	H 農場	
	乾乳	搾乳
	113.1	
	S 農場	
	乾乳	搾乳
	101.6	106.0

表は各農場で給与されていた DM の、要求量に対する充足率を示す。

DM: Dry Matter (乾物)

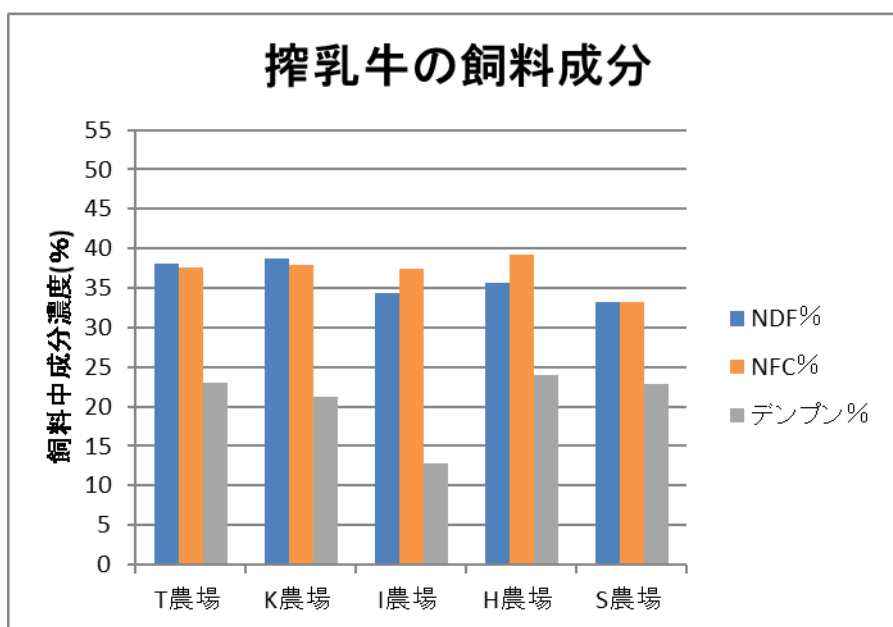
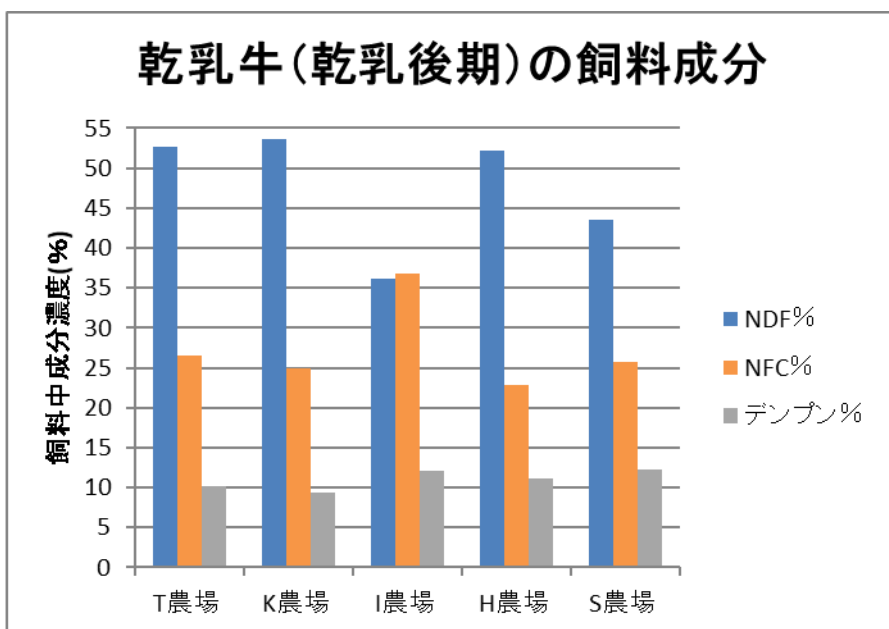


図 1-1. 各農場の飼料計算結果

図は各農場の NDF、NFC、デンプンの飼料中濃度を示す。

NDF: Neutral Detergent Fiber (中性デタージェント繊維)

NFC: Non-Fiber Carbohydrate (非繊維性炭水化物)

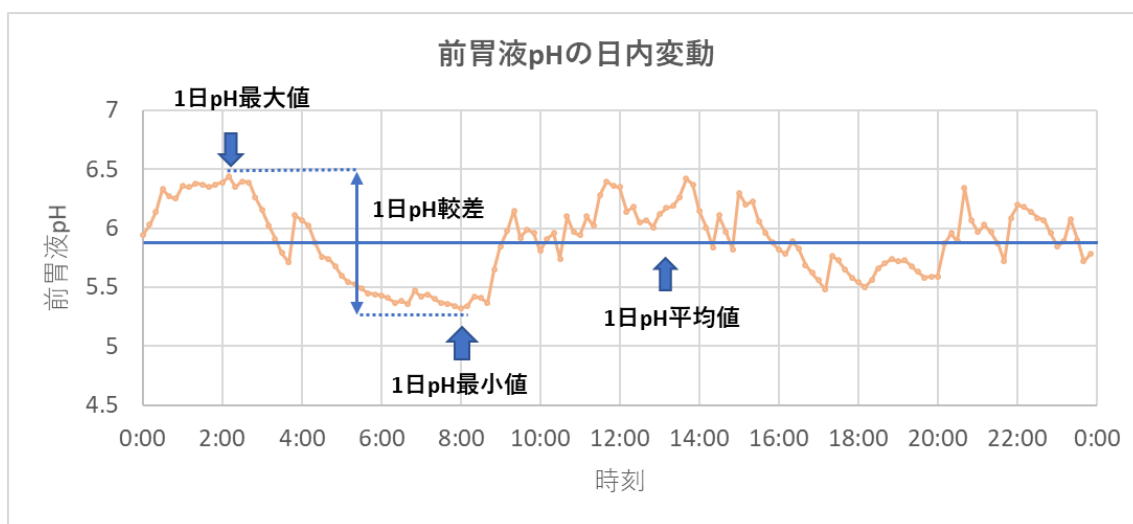


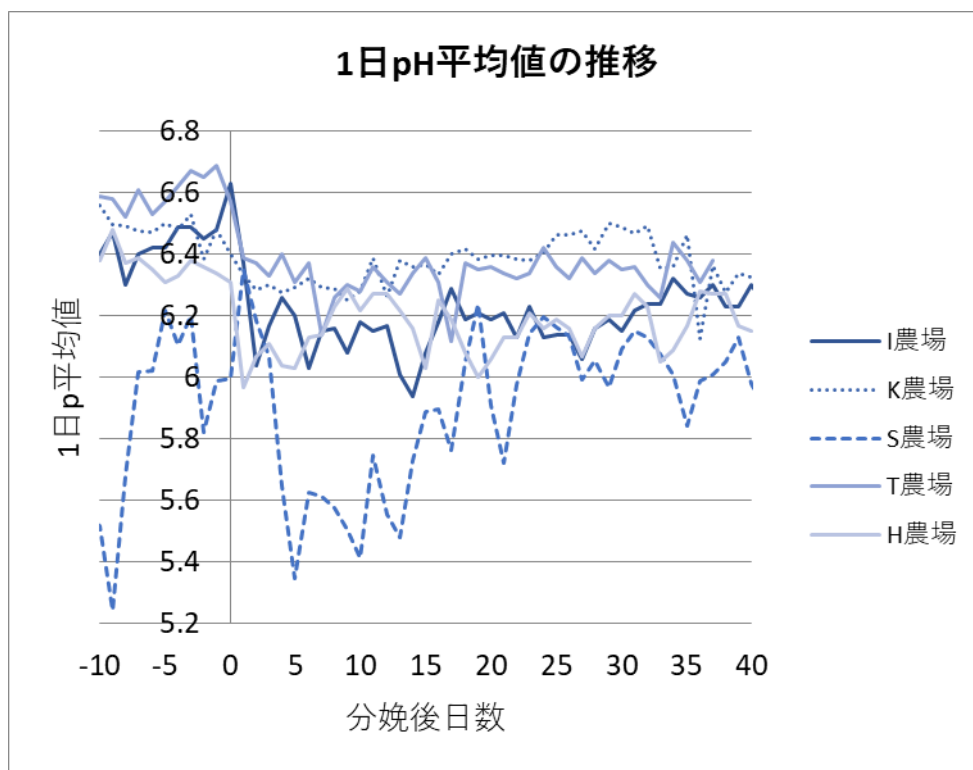
図 1-2. pH パラメーターの算出

図は前胃液 pH の日内変動を示す。

24 時間のうち最大の pH を 1 日 pH 最大値、最小の pH を 1 日 pH 最小値、その差を 1 日 pH 較差とした。24 時間の pH の平均を 1 日 pH 平均値とした。

### 1.3 結果

分娩前後における 5 農場の 1 日 pH 平均値、最小値、最大値の推移を図 1-3 に示した。すべての農場で分娩を境に pH が低下し、その後ゆるやかに回復する傾向が見られた。S 農場は 5 農場中、1 日 pH 平均値、最小値、最大値すべてにおいて最も低い pH を示した。H 農場は分娩直後に pH の急激な低下が見られた。一両日中のルーメン環境の安定性を示す不安定化指標（絶対値）は、分娩後日数が経過しても S 農場で高いレベルが継続した(図 1-4)。



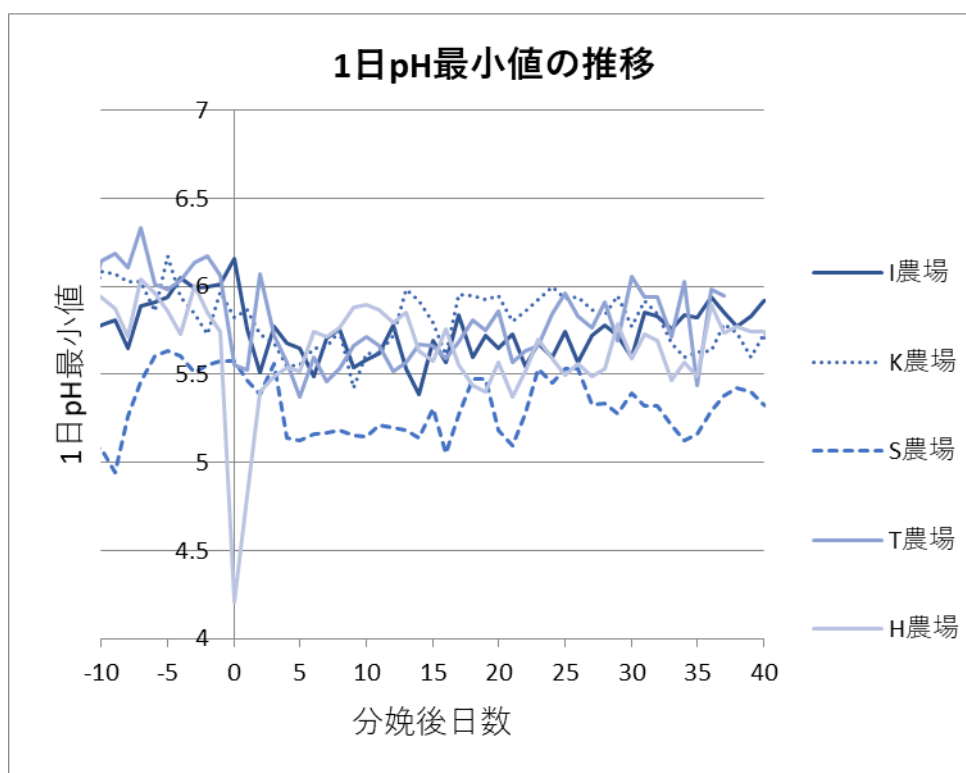
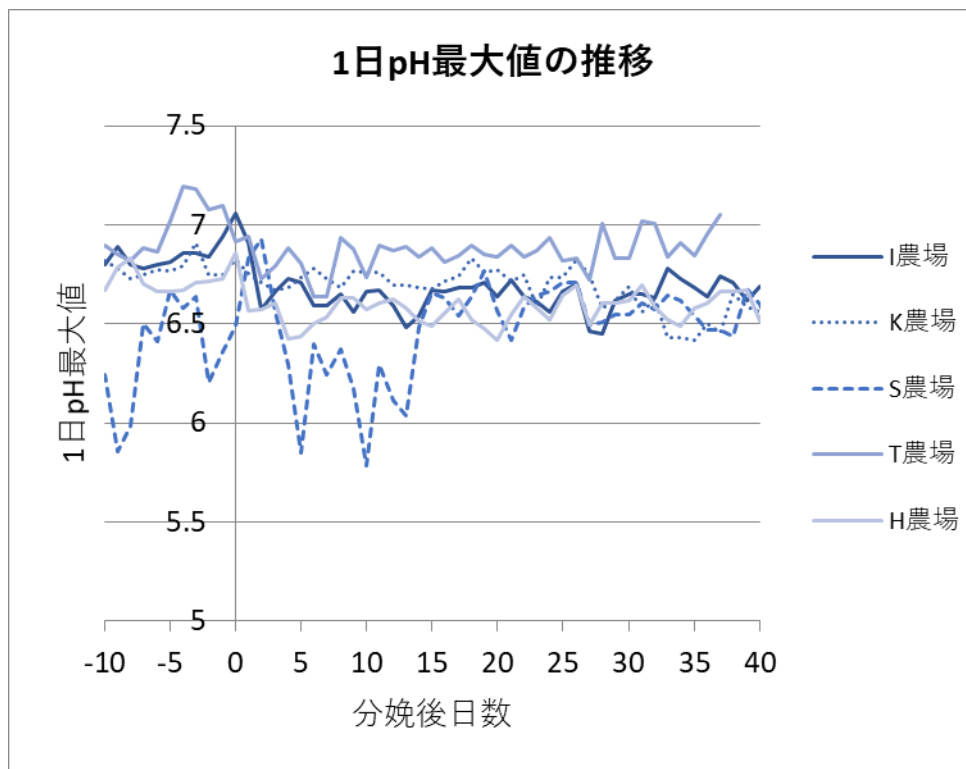


図 1-3. 5 農場の pH パラメーターの推移



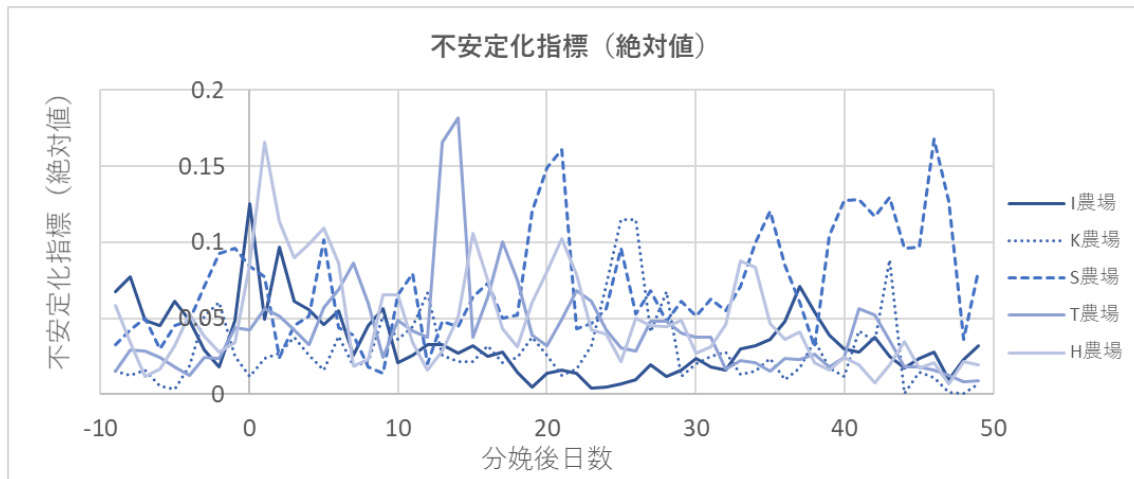


図 1-4. 5 農場の不安定化指標（絶対値）

次に、pH の大まかな動きを捉えやすくするために、分娩 10 日前～1 日前 (Day-10~-1)、分娩日～分娩 3 日後 (Day0~Day3)、分娩 4 日後～10 日後 (Day4~Day10)、分娩 11 日後～20 日後 (Day11~Day20)、分娩 21 日後～30 日後 (Day21~Day30)、分娩 31 日後～40 日後 (Day31~Day40) の 6 つに区分した。各ステージにおける、ステージ pH 平均値、ステージ pH 較差を表 1-3、表 1-4 に示した。Day4~10 において、農場間のステージ pH 平均値に差がみられる傾向にあった ( $p<0.1$ )。Day11~20 において、農場間のステージ pH 平均値に有意な差が見られ ( $p<0.05$ )、S 農場が最も低値を示した。各農場内の個体間のばらつきを示す変動係数は、Day-10~-1、Day4~10、Day11~20 で S 農場が最も大きく、Day21~30、Day31~40 は I 農場が最も大きい値を示した (図 1-5)。T 農場はステージ間で pH 平均値が有意に変化していた ( $p<0.05$ )。Day0~3 において、農場間のステージ pH 較差に有意な差が見られ、H 農場は I 農場と比較して pH 較差が有意に大きかった ( $p<0.05$ )。ステージ pH 変化量を表 1-5 に示した。T 農場はステージ間で pH 変化量に差がみられる傾向にあった ( $p<0.1$ )。

表 1-3. ステージごとの前胃液 pH 平均値

	Day-10~-1	Day0~3	Day4~10	Day11~20	Day21~30	Day31~40
T 農場	6.62 ±0.10 <sup>bb</sup>	6.49 ±0.12 <sup>bb</sup>	6.28 ±0.17 <sup>a,bb</sup>	6.33 ±0.14 <sup>aa,bb</sup>	6.38 ±0.20 <sup>bb</sup>	6.42 ±0.21 <sup>bb</sup>
K 農場	N D	6.38 ±0.22	6.30 ±0.03 <sup>a</sup>	6.44 ±0.05 <sup>aa</sup>	6.33 ±0.24	N D
I 農場	6.43 ±0.18	6.30 ±0.24	6.14 ±0.16 <sup>a</sup>	6.04 ±0.31 <sup>aa</sup>	6.08 ±0.35	6.34 ±0.31
H 農場	6.37 ±0.07	6.12 ±0.24	6.15 ±0.25 <sup>a</sup>	6.15 ±0.22 <sup>aa</sup>	6.16 ±0.11	6.22 ±0.15
S 農場	5.95 ±0.34	6.15 ±0.12	5.53 ±0.37 <sup>a</sup>	5.79 ±0.20 <sup>aa</sup>	6.07 ±0.24	6.04 ±0.21

平均 ± SD

a: Day4~10 において農場間で Kruskal-Wallis 検定により  $p < 0.1$

aa: Day11~20 において農場間で Kruskal-Wallis 検定により  $p < 0.05$

bb: T 農場において各ステージ間で Friedman 検定により  $p < 0.05$

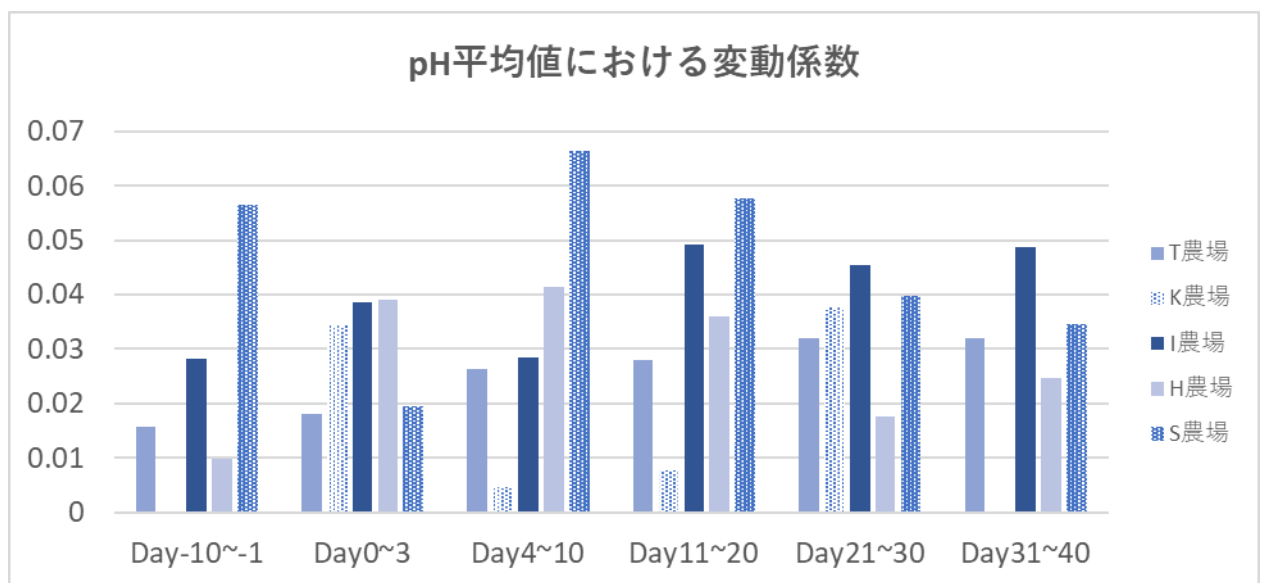


図 1-5. 5 農場の pH 平均値における変動係数

表 1-4 . ステージごとの前胃液 pH 較差

	Day-10~-1	Day0~3	Day4~10	Day11~20	Day21~30	Day31~40
T 農場	0.76 ±0.12	1.02 ±0.17 <sup>aa</sup>	1.03 ±0.35	1.03 ±0.25	0.94 ±0.34	0.96 ±0.26
K 農場	ND	0.85 ±0.20 <sup>aa</sup>	1.06 ±0.24	0.79 ±0.16	0.82 ±0.19	ND
I 農場	0.94 ±0.20	1.00 ±0.09 <sup>aa'</sup>	1.01 ±0.07	1.03 ±0.09	0.85 ±0.20	0.87 ±0.08
H 農場	0.85 ±0.17	1.67 ±0.26 <sup>aa'</sup>	0.81 ±0.26	0.90 ±0.26	1.03 ±0.32	0.92 ±0.21
S 農場	0.91 ±0.27	1.20 ±0.05 <sup>aa</sup>	1.00 ±0.09	1.22 ±0.15	1.19 ±0.23	1.27 ±0.22

平均 ± SD

aa: Day0~3 において Kruskal-Wallis 検定により  $p<0.05$

aa': H 農場-I 農場間  $p<0.05$

表 1-5. Day-10～-1 の前胃液 pH 平均値を基準としたときの pH 変化量

	$\Delta$ Day0～3	$\Delta$ Day4～10	$\Delta$ Day11～20	$\Delta$ Day21～30	$\Delta$ Day31～40
T 農場	-0.12 $\pm 0.14^b$	-0.30 $\pm 0.090^b$	-0.29 $\pm 0.098^b$	-0.24 $\pm 0.13^b$	-0.20 $\pm 0.16^b$
I 農場	-0.13 $\pm 0.22$	-0.29 $\pm 0.19$	-0.34 $\pm 0.27$	-0.44 $\pm 0.38$	-0.18 $\pm 0.28$
H 農場	-0.32 $\pm 0.21$	-0.26 $\pm 0.21$	-0.25 $\pm 0.17$	-0.24 $\pm 0.036$	-0.19 $\pm 0.086$
S 農場	0.20 $\pm 0.33$	-0.42 $\pm 0.047$	-0.16 $\pm 0.20$	-0.027 $\pm 0.51$	-0.00095 $\pm 0.36$

平均  $\pm$  SD

$\Delta$  Day0～3: ( Day-10～-1 の前胃液 pH 平均値 ) - ( Day0～3 の前胃液 pH 平均値 )

$\Delta$  Day4～10: ( Day-10～-1 の前胃液 pH 平均値 ) - ( Day4～10 の前胃液 pH 平均値 )

$\Delta$  Day11～20: ( Day-10～-1 の前胃液 pH 平均値 ) - ( Day11～20 の前胃液 pH 平均値 )

$\Delta$  Day21～30: ( Day-10～-1 の前胃液 pH 平均値 ) - ( Day21～30 の前胃液 pH 平均値 )

$\Delta$  Day31～40: ( Day-10～-1 の前胃液 pH 平均値 ) - ( Day31～40 の前胃液 pH 平均値 )

b: T 農場のステージ間で Friedman 検定により  $p < 0.1$

農場ごとの平均 SARA 出現率を表 1-6 に示した。農場間の平均 SARA 出現率に差が見られる傾向にあった( $p<0.1$ )。飼養形態と SARA の出現率の関連を調べるために T 農場を一般的なスタイルとして H 農場、I 農場、S 農場と比較した(図 1-6)。S 農場は期間中のほぼすべての時期で T 農場より SARA 出現率が高い傾向にあった。また、H 農場は T 農場と比較して分娩前から SARA が出現し、分娩後に SARA 出現率が顕著に増加し、分娩後日数が経過しても高い傾向にあった。I 農場は T 農場と比較して、分娩後の SARA 出現率が低い傾向にあった。

表 1-6. Day-4~40 の 45 日間における平均 SARA 出現率

	T 農場	K 農場	I 農場	H 農場	S 農場
Day-4~40 における 平均 SARA 出現率 (%)	42.4 <sup>a</sup>	35.2 <sup>a</sup>	29.0 <sup>a</sup>	67.6 <sup>a</sup>	77.4 <sup>a</sup>

a: 5 農場間で Kruskal-Wallis 検定により  $p<0.1$

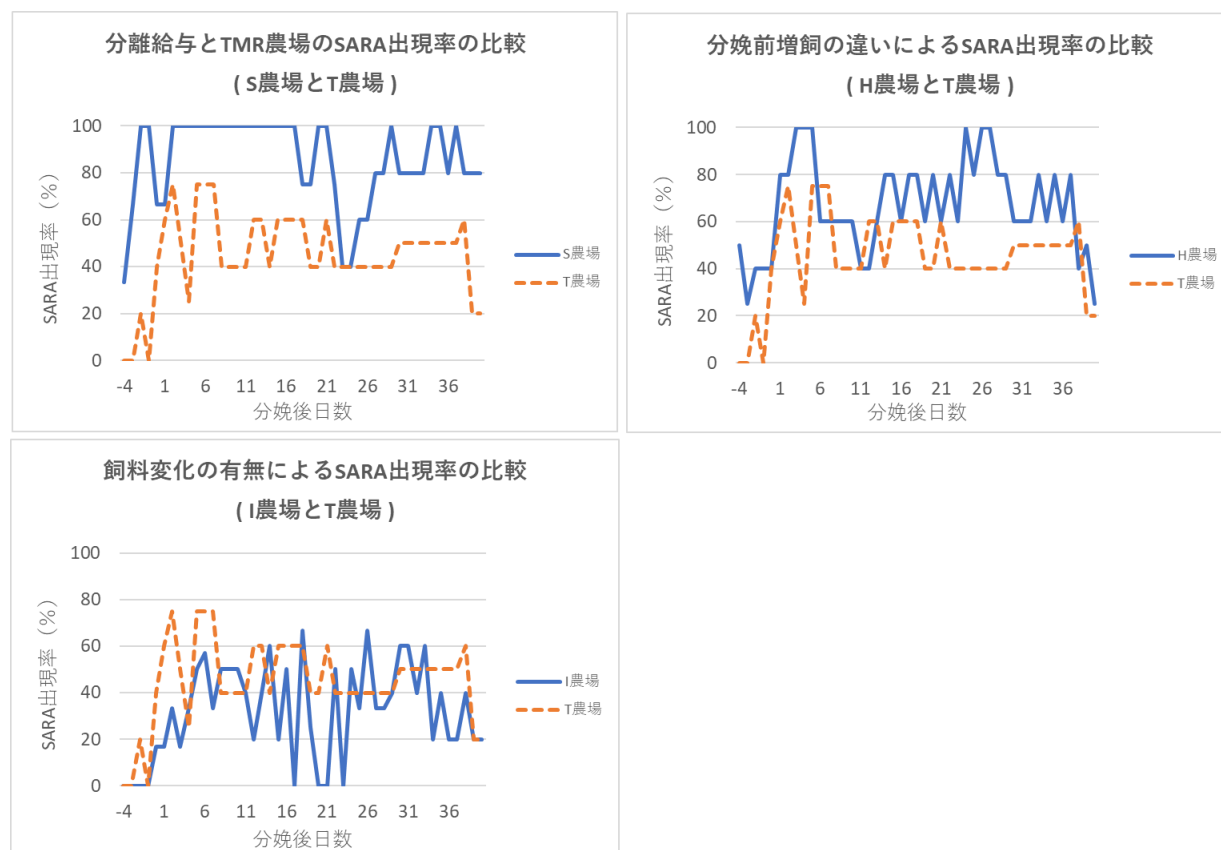


図 1-6. 飼料給与形態の違いによる SARA 出現率の比較

## 1.4 考察

本研究は、近年開発された無線伝送式ルーメン pH センサーを用いて山形県最上地方の酪農家における SARA の発生状況を調査すること、さらに農場間で比較することにより、牛群の前胃液 pH に与える影響について検討することを目的として行った。Kleen ら(2009)の過去の調査によると、オランダの乳牛における農場ごとの SARA 有病率は 0~38%であったと報告されている。Kleen らの調査はランダムな泌乳ステージの牛で、ピンポイントのルーメン穿刺で得られたルーメン液 pH によって SARA の診断を行っていた。一方、本研究では同じ個体の pH を連続的にモニタリングし、閾値以下の pH を示す持続時間によって SARA を診断したうえで調査期間中の SARA 出現率を算出した。5 農場の分娩を挟んだ 45 日間の SARA 出現率は 29.0~77.4%であった。サンプリング方法と用いた SARA の診断基準が異なるため、有病率と出現率を単純比較することはできないが、Kleen らの報告と比較して高い割合で分娩前後の SARA が認められた。通常、周産期には給与飼料の組成の変化によってルーメン内の微生物叢や発酵産物、ルーメン壁の絨毛密度などが変動するため、飼料の品質や給与方法の変化はルーメン pH の低下を招く(小原, 2006)。分娩後は飼料中の濃厚飼料割合の増加と乾物摂取量の増大によって、ルーメン環境が不安定となり、SARA のリスクが高い時期とされる(Dohme et al, 2008)。このような周産期のルーメン機能の変化は周産期病の発生と密接な関連があるため、周産期にはルーメンの恒常性を維持し、pH の変動を最小限にするための飼養管理が重要となる(小原, 2006)。

Bramley ら(2008)は、アシドーシス牛群では健康牛群と比較して高代謝エネルギー(Metabolizable Energy; ME)、高 NFC%、高デンプン%、低 NDF%、低 peNDF%の飼料特性があったと報告している。本研究を行った 5 農場の飼料計算結果は、I 農場のデンプン濃度が低い以外はほぼ適正範囲内であり、I 農場以上の 4 農場では設計上の飼料成分濃度に差が見られない牛群の比較であったにもかかわらず、前胃液 pH に大きな違いが見られた。

分離給与の S 農場は、飼料成分濃度が他の TMR 農場と大きく変わらないにも関わらず、5 農場中で pH が最も低値を示し、分娩を挟んだ 45 日間の SARA

出現率は最も高い傾向にあった( $p<0.1$ )。特に、分娩 11 日～20 日後において 5 農場間の pH 平均値に有意な差が見られた。混合された TMR 飼料でさえも、パーティクルサイズによる選り好み、すなわち長い粒子よりも細かい粒子を好んで摂取する選り食いは、易発酵性炭水化物をより多く摂取し物理的有効繊維の摂取が抑えられてしまうことにより(Plaizier et al, 2008)、ルーメン内 VFA 産生の増加と不十分な咀嚼による唾液分泌の減少につながるため(DeVries et al, 2008)、アシドーシスのリスクを高めると言われている(Gao and Oba, 2014; Stone, 2004)。分離給与は飼料の特性上、TMR よりもさらに選り食いが起きやすいと考えられ、Maekawa ら(2002)は分離給与と TMR のアシドーシスリスクの違いを報告している。このことから、S 農場の牛群の pH が他の TMR 農場と比較して低いことの理由として、分離給与による飼料の選り食いの影響が大きいことが推察された。

また、分娩前に短期間で急激な濃厚飼料の増給を行っていた H 農場の分娩 0 ～3 日後の pH 較差は、分娩前後で飼料変化のない I 農場と比較して有意に高値を示した。図 1-3 より H 農場の個体において分娩日に pH の急激な低下が見られたことから、分娩直後にルーメンの状態に大きな変化が起きていることが推察された。乾乳後期、特に分娩 3 週間前からのクローズアップ期は、徐々に穀類比率を増量することで分娩後の高エネルギー飼料に備えてルーメンを馴致することが重要となる(Kleen et al, 2003)。ルーメン粘膜が配合飼料の多い飼料に順応するには 4～6 週間、ルーメン微生物叢の変化には 3 週間を要すると言われている(Dohme et al, 2008; Nordlund et al, 1995)。したがって、分娩後のルーメン内の急激な変化を軽減するために、分娩前の段階的な馴致によって VFA の吸収、代謝能力を泌乳期飼料へ適応させることが必要であり(Kleen et al, 2003)、不十分な馴致期間は泌乳初期の SARA の大きなリスクとなり得る(Penner et al, 2007)。このことから、H 農場の牛群の pH が他の農場と比較して分娩直後に大きく低下する理由として、分娩前に短期間で急激な濃厚飼料の増給を行っているため泌乳期飼料へのルーメンの順応が不十分であることが考えられた。

さらに、乾乳期から搾乳牛用の飼料を給与していた I 農場は、分娩を挟んだ 45 日間の SARA 出現率が最も低い傾向にあった( $p<0.1$ )。I 農場の乾乳牛に与

えられていた搾乳牛用飼料は、NFC 濃度は他農場と同程度であったが、デンプン濃度は他農場の半分程度であった。NFC の中には有機酸、単糖・二糖類、デンプン、ペクチン等の可溶性繊維などが含まれ、これらの消化特性やルーメン pH に対する影響はそれぞれ異なる。糖類とデンプンは発酵により酢酸、酪酸、プロピオン酸と比較して 10 倍強い酸である乳酸に変化する。しかし、糖類の一部はグリコーゲンに変換されるので、デンプンほどルーメンアシドーシスを引き起こさない。ペクチン等の可溶性繊維は急速に発酵するが、低 pH 下では可溶性繊維の発酵は低下するので酸としての影響は減弱する。このように、NFC のルーメン pH に対する影響は NFC の総量よりも NFC のタイプにより変化する (Hall, 2002)。このことから、I 農場では乾乳期から搾乳牛用の高 NFC 飼料が給与されていたにもかかわらずデンプン濃度が低かったために、SARA 出現率が他農場より低い傾向にあったと考えられた。

一方、ひとつの農場内の個体間においても前胃液 pH には個体差が見られた。個体間のばらつきの程度を変動係数で比較したところ (図 1-5)、S 農場と I 農場において大きい傾向があったことから、これらの農場において飼料要因以外の個体要因が前胃液 pH や SARA 発生頻度の差に影響している可能性が考えられた。過去の研究論文においても個体間のばらつきの存在は報告されており、アシドーシスになりやすい食餌要因への適応能力は個体により異なることが知られている (Schwartzkopf-Genswein et al, 2003)。この個体差は年齢、遺伝的背景、生後定着するルーメン微生物叢のポピュレーション、過去のアシドーシス罹患歴等により生じる (Dohme et al, 2008)。Dohme らの実験では、単回の SARA 誘発であればその後ルーメン pH は回復するが、2 回、3 回と繰り返すと pH の回復が不十分となり SARA の重症度が増加した。このような不十分な pH 回復はルーメン微生物叢の不安定性をもたらす (Nagaraja and Titgemeyer, 2007)。また、アシドーシスによりルーメン上皮が障害を受けるとルーメン上皮からの VFA 吸収能力が低下してルーメン内の VFA 蓄積の一因となる (Harmon et al, 1985; Krehbiel et al, 1995)。以上の報告をふまえて、S 農場、I 農場において個体間にばらつきをもたらした個体要因として、以下の二点が考えられた。一点目は、S 農場、I 農場は自家産の個体と他の農場からの導入個体が混在しており、多様な遺伝的背景やルーメン微生物叢のポピュレーションを持つ集団であ



る点である。二点目は、S 農場は慢性的に SARA のリスクが高く、SARA の継続期間や罹患歴がルーメン微生物叢の不安定性やルーメン上皮の機能に影響を与えた可能性である。S 農場におけるルーメン不安定化指標は、分娩後日数が経過しても他の農場より大きい傾向があり(図 1-4)、慢性的あるいは長期的な SARA がルーメン微生物叢の不安定性をもたらしていると考えられた。

牛群の SARA を予防するためには、設計上の飼料特性に加えて実際の飼料摂取状況や乾物摂取量に影響する様々な因子、すなわち選び食い、固め食い、飼料品質、飼料へのアクセス、牛群密度、移行期の管理等のさまざまな観点からアプローチする必要があると言われている(Kleen et al, 2003; Stone 2004)。本研究では、無線伝送式ルーメン pH センサーを用いて牛群の前胃液 pH をモニタリングし飼養管理方法との関連を調査した結果、飼料給与形態の違い、飼料中デンプン濃度、分娩前後の飼料の変化と移行スピードが牛群の前胃液 pH に影響を与える要因であると考えられた。また、同一牛群内における前胃液 pH や SARA の出現頻度のばらつきは、個体要因によって生じる可能性があると考えられた。

## 1.5 小括

本研究では、近年開発された無線伝送式ルーメン pH センサーを用いて、山形県最上地方の酪農場における SARA の発生状況を調査するとともに、飼養形態の異なる農場間のルーメン pH を比較し、牛群のルーメン pH に影響する飼養管理要因について検討を行った。本研究で調査した 5 農場の、分娩を挟んだ 45 日間の SARA 出現率は 29.0～77.4% であり、分娩前後における SARA の発生が認められた。分娩日～分娩 3 日後のステージにおいて、農場間のステージ pH 較差に有意な差が認められ、分娩前に急激な濃厚飼料の増給を行っていた H 農場は、分娩前後で飼料変化のない I 農場と比較して有意に大きい較差を示した。また、分娩 11 日後～20 日後のステージにおいて、農場間のステージ pH 平均値に有意な差が認められ、分離給与の S 農場が最も低値を示した。分娩を挟んだ 45 日間の SARA 出現率は農場間で差が見られる傾向にあり、分離給与の S 農場が最も高く、飼料中デンプン濃度が低い I 農場が最も低かった。以上の結果から、飼料給与形態の違い、飼料中デンプン濃度、分娩前後の飼料の変化と移行スピードが牛群の前胃液 pH に影響を与える飼料要因であると考えられた。また、S 農場、I 農場では他の農場と比較して個体間で前胃液 pH のばらつきが大きい傾向があり、飼料要因以外の個体要因が関与している可能性が考えられ、遺伝的背景やルーメン微生物叢の多様性に加え S 農場における長期的な SARA によるルーメンの不安定性がこれらの要因であると考えられた。

## 第2章 周産期乳牛における前胃液 pH と血液性状の関連

### 2.1 緒論

潜在性ルーメンアシドーシス(SARA)は乳牛においてよく見られる疾病である(Kleen et al, 2003; Enemark, 2008)。過去の報告では、オランダの乳牛におけるルーメン穿刺によるポイント調査で SARA の有病率は 11%(O'Grady et al, 2008)、13.8%(Kleen et al, 2009)、20%(Kleen et al, 2013)であり、農場ごとの有病率は 0~38%であったとされる(Kleen et al, 2009)。また、アメリカでの調査では SARA の有病率は泌乳初期で 19%、泌乳中期で 26%であったと報告される(Garrett et al, 1997)。SARA は、その臨床的兆候が個体レベルよりも牛群レベルで明白であることから、牛群における問題と考えられている(Kleen et al, 2003)。しかし、SARA の臨床的兆候はわずかなものであるため、診断が困難である(Humer et al, 2018)。一方、SARA は肝膿瘍、蹄葉炎、乳脂肪率の低下等を引き起こし、畜産業において深刻な経済的損失を与える(Kleen et al, 2003; Plaizier et al, 2008)。ルーメン pH のモニタリングが SARA の診断に有用であるが、近年、無線伝送式ルーメン pH センサーを使ったルーメン pH の連続的なモニタリングが可能となった(Sato et al, 2012b; Sato et al, 2012c)。また、SARA はルーメン内 LPS 濃度の増加と炎症反応を引き起こす(Gozho et al, 2005)。そしてマクロファージから分泌される  $\text{TNF}\alpha$  はインスリン抵抗性を引き起こすことが知られている(Li et al, 2007; Ohtsuka et al, 2001)。炎症と代謝性疾患の二つの側面から SARA が与える影響を調べるために、我々は脂肪酸代謝に関連するホルモンや代謝産物が指標になると仮説を立てた。本研究では、乳牛における SARA の病態を反映する血中マーカーを模索することを目的として、前述の無線伝送式ルーメン pH センサーを用いた前胃液 pH のモニタリングといくつかの血中パラメーターの測定を行いそれらの関連性を調査した。

## 2.2 材料および方法

### 動物

本試験では、第一章の研究で SARA が高率に見られた山形県最上管内の S 農場で飼養された計 11 頭のホルスタイン種経産牛を用いた。春から夏に分娩した個体を選択し、2015 年に 6 頭、2016 年に 5 頭から採材を行った（表 2-1）。

### 飼養管理

S 農場は 50 頭のホルスタイン種乳牛を飼養するタイストール農場で、乾乳牛、搾乳牛ともに分離給与を行っていた（表 2-2、表 2-3）。ランダムに選定された一部の個体には、SARA を低減する目的でクラフトパルプが給与されていた。クラフトパルプは木材チップからウシが消化できないリグニンを選択的に除去した高消化性繊維飼料であり、トウモロコシと同等のエネルギー価を持つが消化速度が緩やかなため、ルーメン pH を安定化し SARA を防ぐ効果が報告されている（Nishimura et al, 2019）。

### 前胃液 pH の測定と pH パラメーターの評価

前胃液 pH は前述の無線伝送式 pH センサーを用いて 10 分間隔で連続測定した（Sato et al, 2012b; Sato et al, 2012c）。センサーを経口投与し、金属探知機によってセンサーの留置場所を確認した。1 頭のみセンサーは第一胃内に留置されたが、他の 10 頭はすべて第二胃内に留置された。SARA は第一胃液 pH が 5.6 未満、もしくは第二胃液 pH が 6.3 未満の状態が 1 日に 3 時間以上継続した状態と定義される（Gozho et al, 2005; Sato et al, 2012a; Kimura 2013）。本研究は SARA の病態を反映する血中マーカーを模索することを目的としたため、第一章の pH パラメーターとは別に、10 分ごとに測定される pH データを SARA の診断基準を使用して以下の 2 種の pH パラメーターとして評価した。

#### 1. 低 pH 時間

分娩日から分娩 1 週間後、4 週間後、8 週間後までの期間で第一胃液 pH が 5.6 未満、もしくは第二胃液 pH が 6.3 未満の状態である時間の総数を求め、こ

れを本研究中では 1w-低 pH 時間、4w-低 pH 時間、8w-低 pH 時間と定義した。

## 2. SARA 日数

過去の論文で報告されている診断基準に基づいて、第一胃液 pH が 5.6 未満、もしくは第二胃液 pH が 6.3 未満の状態が 1 日 3 時間以上継続した日を SARA と判定し、分娩後 30 日間における SARA の発症日数を算出した。これを、本研究中では SARA 日数と定義した。なお、センサーのエラーで pH データが欠損した 3 個体を除外した計 8 頭を、4w-低 pH 時間および分娩後 30 日間の SARA 日数によって中央値より高値群、低値群に分けた（高値群：n=4; 4w-低 pH 時間 > 25900 分、SARA 日数 > 25 日、低値群：n=4; 4w-低 pH 時間 ≤ 25900 分、SARA 日数 ≤ 25 日）（表 2-4）。

## 血液パラメーターの測定

血液サンプルは 2015 年に 6 頭、2016 年に 5 頭の尾静脈より、それぞれ分娩 1 週間後、分娩 4 週間後、分娩 8 週間後の 3 ステージで採取した。採材はすべて午前 9 時から午後 5 時までの時間に行った。血液は 4°C、800×g で 10 分間遠心し血清を分離後、-80°C で保管した。グルコース (GLU)、総コレステロール (TC)、遊離脂肪酸 (FFA) はオートアナライザー (AU680, Access 2; Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) を用いて測定した。インスリン (INS) とアディポネクチン (ADN) は市販の ELIZA キット (Insulin ELIZA kit; Shibayagi Co., Ltd., Gunma, Japan, および Mouse/Rat Adiponectin ELIZA kit; Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて測定した。血清リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) 活性と乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性は Kaloustian ら (1969) と Bergmeyer と Bernt (1974) の方法で測定した。1 分間あたりの 1 マイクロモルの基質分解を 1 単位とした。MDH 活性/LDH 活性 (M/L 比) をエネルギー代謝の指標として算出した (Arai et al, 2003; Li et al, 2012)。また、インスリン感受性の指標として有用とされる Revised quantitative insulin sensitivity check index (RQUICKI) (Holtenius P and Holtenius K, 2007) を、以下の式によって算出した。

$$RQUICKI = 1 / (\log_{10} (Gb) + \log_{10} (Ib) + \log_{10} (FFAb))$$

Gb: 血清グルコース (mg/dL); Ib: 血清インスリン ( $\mu$  U/mL); FFAb: 血清 FFA (mmol/L)

## 統計処理

ADN 濃度と SARA 日数の正規性の検定は Shapiro-Wilk 検定、Kolmogorov-Smirnov 検定を行ったうえでヒストグラムや正規 QQ プロットを合わせて判断した。ADN を従属変数、他の血液パラメーターおよび低 pH 時間を独立変数として重回帰分析を行った。変数選択は AIC を用いたステップワイズ減少法を用いた。得られたモデルは分布拡大要因 (VIF) により多重共線性の評価を行った。また、ADN 濃度と SARA 日数において、Spearman の順位相関係数を算出した。さらに、pH パラメーターで分けた高値群と低値群において、Friedman 検定により分娩 1 週後、4 週後、8 週後の血液性状を比較した。統計的な有意差は  $p < 0.05$  とした。すべての統計処理は EZR (Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan) を用いて行った。

表 2-1. 調査個体の年齢及び産歴

試験区	個体 No.	生年月日	年齢	産歴	パルプ投与
2015	No.1	2011/1/23	4	2	-
	No.2	2010/12/23	4	3	-
	No.3	2010/12/11	4	2	○
	No.4	2008/12/2	6	3	-
	No.5	2012/9/8	3	1	○
	No.6	2012/10/20	3	1	○
2016	No.7	2010/1/30	6	3	-
	No.8	2012/4/3	4	1	○
	No.9	2013/1/19	3	1	○
	No.10	2012/1/3	4	2	○
	No.11	2012/1/7	4	2	○

表 2-2. S 農場における給与飼料

2015 年

	乾乳牛	搾乳牛	
		通常	パルプ群
コーンフレーク	1kg	1kg	1kg
デントコーンサイレージ	3～4kg	8kg	8kg
グラスサイレージ		4kg	4kg
稲ホールクロップサイレージ	6～7kg	7kg	7kg
オーツヘイ	2kg	2kg	
ルーサンヘイ	3kg	5kg	5kg
ビール粕	5kg	2kg	2kg
濃厚飼料	2kg	8kg	8kg
ビタミン添加剤		50g	50g
リン酸カルシウム		150g	150g
重曹ペレット		150g	150g
クラフトパルプ			2kg



2016 年

		搾乳牛	
	乾乳牛	通常	パルプ群
コーンフレーク			
デントコーンサイレージ		8kg	8kg
グラスサイレージ		4kg	4kg
稲ホールクロップサイレージ	3～5kg	7kg	7kg
オーツヘイ	2kg	2kg	
ルーサンヘイ	1～2kg	5kg	5kg
ビール粕	2kg	2kg	2kg
濃厚飼料	2kg(クロース アップのみ)	8kg	8kg
ビタミン添加剤		50g	50g
リン酸カルシウム		150g	150g
重曹ペレット		150g	150g
チモシー	飽食		
乾乳用配合飼料	2kg		
クラフトパルプ			2kg

表 2-3. S 農場における飼料計算結果

	2015			2016		
	乾乳牛	搾乳牛		乾乳牛	搾乳牛	
		通常	パルプ群		通常	パルプ群
水分 (%)	46.5	38.1	37.8	32.2	38.8	38.5
TDN/DM (%)	63.5	65.3	68.7	61.7	64.4	68.0
C P/DM (%)	15.3	15.2	14.4	14.8	15.4	14.6
ADF/DM (%)	27.0	23.6	28.3	30.1	24.4	29.3
NDF/DM (%)	40.6	34.4	37.9	51.6	35.4	39.0
NFC(NSC)/DM (%)	31.6	37.4	35.3	23.1	35.9	33.7
NDF/NFC	1.3	0.9	1.1	2.2	1.0	1.2
有効 NDF/DM (%)	39.5	32.7	-	51.0	33.7	-
粗飼料 DM/BW (%)	1.1	2.2	2.2	1.2	2.2	2.2
デンプン/DM (%)	16.8	21.1	20.7	9.6	19.1	18.8

TDN: Total Digestible Nutrients (可消化養分総量) ; DM: Dry Matter (乾物) ; CP: Crude Protein (粗蛋白質) ; ADF: Acid Detergent Fiber (酸性デタージェント繊維) ; NDF: Neutral Detergent Fiber (中性デタージェント繊維) ; NFC: Non-Fiber Carbohydrate (非繊維性炭水化物) ; BW: Body Weight

クラフトパルプ中の有効 NDF 含量が不明のためパルプ群の有効 NDF/DM は算出していない。

表 2-4. 4w-低 pH 時間および分娩後 30 日間の SARA 日数による群分け

群	個体 No.	1w-低 pH 時間 (分)	4w-低 pH 時間 (分)	8w-低 pH 時間 (分)	分娩後 30 日間の SARA 日数	パルプ 投与
高値群	No.1	4440	26950	-	26	
	No.2	9840	39920	-	29	
	No.7	8550	32930	67070	30	
	No.9	8310	33550	58240	29	○
低値群	No.3	6090	22420	34350	21	○
	No.4	2760	14400	44320	14	
	No.5	4380	17600	34710	18	○
	No.6	4260	24850	-	25	○
除外	No.8	8830	-	-	-	○
	No.11	-	-	-	-	○
	No.10	7960	-	-	-	○
中央値		7025	25900	44320	25.5	

センサーのエラーで pH データが欠損した 3 個体を除外した計 8 頭の 4w-低 pH 時間における中央値は 25900 分、分娩後 30 日間 SARA 日数における中央値は 25.5 日となった。これらの pH パラメーターにより 8 頭を高値群、低値群に分けた。高値群 4 頭中 1 頭、低値群 4 頭中 3 頭がクラフトパルプを給与されていた。

## 2.3 結果

### 1. 血液パラメーターと前胃液 pH の関係

表 2-5 と図 2-1 に分娩後 4 週の ADN を従属変数、他の血液パラメーターおよび 1w-低 pH 時間を独立変数とした重回帰分析の結果を示した。なお、ADN 濃度は正規分布に従った。重回帰分析で得られたモデルは分布拡大要因(VIF)が 5 未満で多重共線性の可能性が低いことを確認した。AIC を用いたステップワイズ減少法による最終モデルは重決定係数 0.461 であり 5%水準で有意な値となった。このモデルから、4w-ADN に関連する因子として 1w-低 pH 時間が同定された ( $p<0.05$ )。

### 2. SARA 日数と ADN の関係

分娩後 30 日間の SARA 日数と、分娩 4 週後の血中 ADN 濃度もしくは分娩 1 週後と 4 週後の ADN 平均値 (1,4w-ADN 平均値) との関係を散布図にプロットし、相関分析を行った (図 2-2)。SARA 日数は正規性の検定において  $p>0.05$  となり正規分布でないという帰無仮説が否定されたが、ヒストグラムが大きく右に偏っており、正規分布とはみなせずノンパラメトリック検定を行った。両者の間には、それぞれ Spearman 順位相関係数 0.778 と 0.731 の強い相関があり、5%水準で統計学的に有意であった。

### 3. pH パラメーターによって区分した 2 群間の血液性状の比較

pH パラメーターによって群分けした 2 群において、各ステージの血液性状を Friedman 検定により比較した (図 2-3)。ADN は各ステージ間でも群間でも有意差は見られなかったが、分娩後 4 週のステージで、高値群が低値群に比べ高値を示し 10%水準でその傾向が認められた ( $p=0.057$ )。TC は各ステージ間で有意な差が見られた ( $p<0.05$ )。GLU、FFA、M/L、RQUICKI はいずれも有意差は見られなかった。

表 2-5. 血液パラメーターと pH パラメーターの重回帰分析

独立変数	$\beta$	t
1w-低 pH 時間	0.747*	2.95
F 値	8.71*	
R <sup>2</sup>	0.521	
補正 R <sup>2</sup>	0.461	
自由度	8	
N	10	

分娩 4 週後の ADN を従属変数、分娩 4 週後の GLU、TC、FFA、M/L および 1w-低 pH 時間を独立変数とした重回帰分析で得られた最終モデル。β は標準偏回帰係数を示す。1w-低 pH 時間が欠損した 1 頭(No. 11)を除いた(n=10)。

1w-低 pH 時間：分娩後 1 週間で第一胃液 pH<5.6 もしくは第二胃液 pH<6.3 となった時間の総量

\*  $p < 0.05$

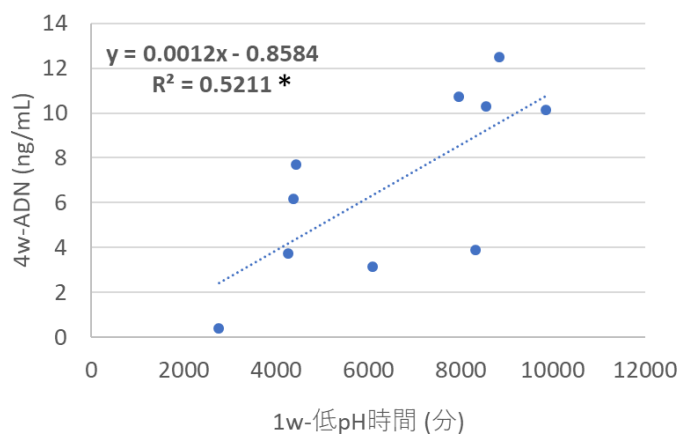


図 2-1. 1w-低 pH 時間と分娩 4 週後の ADN の関係

図は回帰分析の結果を示す。分娩 4 週後の ADN に関連する因子として 1w-低 pH 時間が同定された。1w-低 pH 時間が欠損した 1 頭(No. 11)を除いた(n=10)。

4w-ADN: 分娩 4 週後の血中アディポネクチン濃度

\* は統計的有意性を示す (F test,  $p < 0.05$ )。

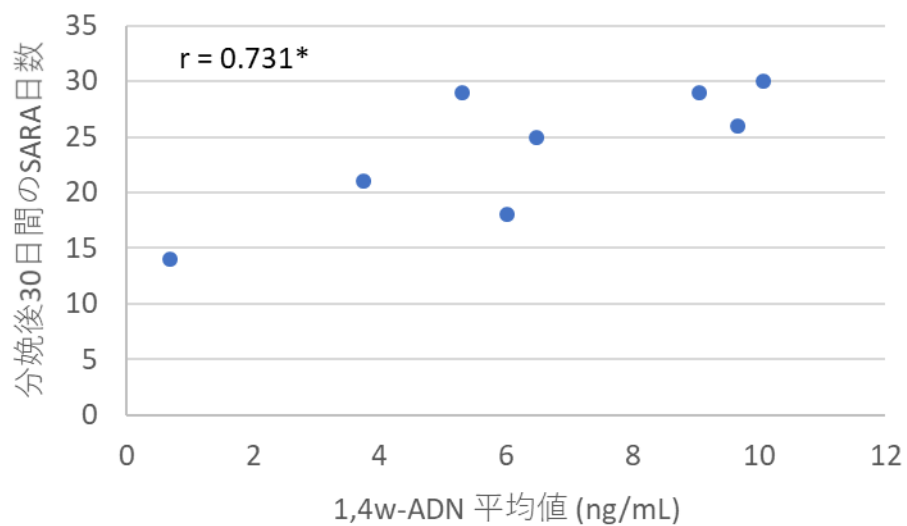
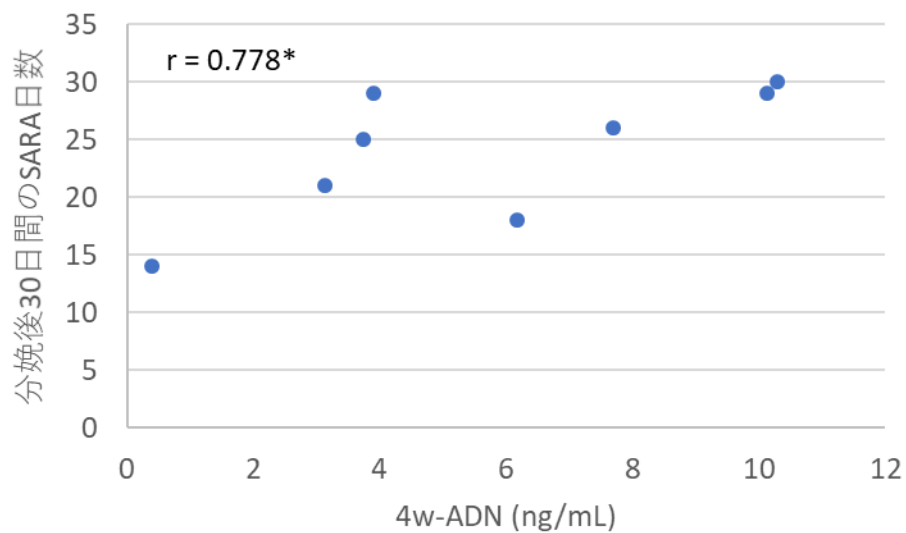


図 2-2. ADN と SARA 日数の関係

図は相関関係を示す。分娩 4 週後の ADN 濃度もしくは分娩後 1 週、4 週の ADN 平均値と、分娩後 30 日間の SARA 日数における Spearman の順位相関係数は強い相関を示した。データが欠損した 3 頭(No.8、10、11)を除外した(n=8)。

4w-ADN: 分娩 4 週後の血中アディポネクチン濃度

1,4w-ADN 平均値: 分娩後 1 週、4 週の血中アディポネクチン濃度平均値

\*は Spearman の順位相関係数に基づく有意な相関を示す ( $p < 0.05$ )。

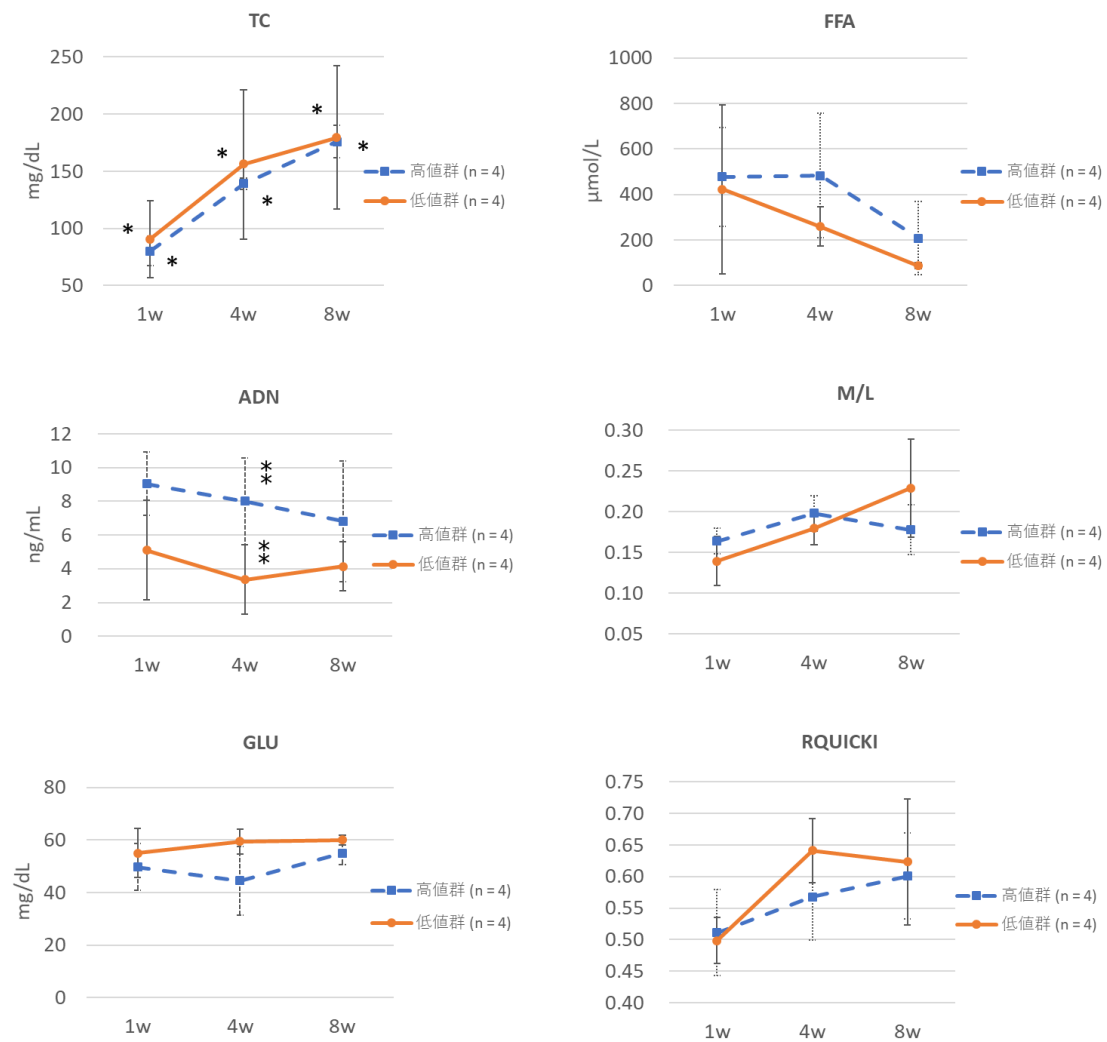


図 2-3. pH パラメーターにより群分けした 2 群の血液パラメーターの推移

2 群は Friedman 検定によって比較した。

TC は分娩後 1 週、4 週、8 週の各ステージ間で有意に差が見られた。

\*  $p < 0.05$

\*\*  $p < 0.1$

## 2.4 考察

第 1 章の研究結果より、牛群の前胃液 pH に影響を与える飼料要因として、飼料給与形態の違い (TMR、分離給与)、飼料中デンプン濃度、そして分娩前後の飼料の変化と移行スピード等が考えられた。ルーメン発酵の異常は必ずしも血液性状の変化や周産期疾患の発生に反映されない。そのため、通常の血液検査項目はルーメン発酵の異常を検出するのに適しているとは言い難く、ルーチンで実施される血液検査によって泌乳牛のルーメン発酵の状態を評価するのは困難である。一方、近年開発された無線伝送式ルーメン pH センサーは、カテーテル採取の際に問題となる唾液の混入や穿刺による腹膜炎のリスクなどの問題点をクリアし、非観血的かつ連続的にルーメン pH をモニタリングすることを可能にした。我々は、ルーメン pH と、エネルギー代謝にかかわる血液パラメーターの関連性を解析することは、SARA の病態を理解するのに非常に重要であると考え、本研究では前胃液 pH を反映する指標としての ADN の有用性を示した。

ADN は脂肪細胞から分泌されるアディポサイトカイン (Hu et al, 1996) で、グルコースや脂肪酸代謝に関与する (Yamauchi et al, 2001)。また、肝臓における糖新生を抑制し骨格筋における糖取り込みを促進することによってインスリン抵抗性を改善する (Yamauchi et al, 2002; Maeda and Shimomura, 2011)。さらに ADN は移行期の牛においてメタボリックストレスによる炎症反応を抑制する (Kabara et al, 2014)。分娩 4 週後の ADN 濃度は分娩 1 週までの低 pH 時間と因果関係が認められたこと、分娩 4 週後の ADN 濃度もしくは分娩 1 週間後と 4 週間後の ADN の平均値は、分娩後 30 日間の SARA 日数と強い相関関係が認められたことから、ADN は泌乳牛におけるルーメン発酵の状態を反映することが示された。

調査した 11 頭のうち、センサーの異常を示した 3 頭を除外した 8 頭を分娩後 4 週までの低 pH 時間および分娩後 30 日間における SARA 発生日数によって高値群と低値群の 2 群に分けたところ、統計学的有意差は認められなかったものの、高値群は分娩後 4 週において低値群と比較して ADN 濃度が高い傾向にあった ( $p < 0.1$ )。血漿 ADN 濃度は乾乳中のレベルと比較して分娩後 1 週間



は低下し (Kabara et al, 2014) その後回復する (Ohtani et al, 2012)。分娩後の ADN 濃度の低下は負のエネルギーバランスに起因し、脂肪組織での脂肪分解を増強させる (Krumm et al, 2017; Kabara et al, 2014)。今回の研究でも過去の報告と同様に、分娩後 1 週間の ADN 濃度は分娩前と比較して低下した (データ未掲載)。しかし、その後の ADN 濃度の回復は見られなかった。高値群の ADN 濃度は常に低値群の ADN 濃度より高いレベルを維持したが、分娩 8 週後まで低下した ADN レベルが回復することはなかった。これは高値群の個体では FFA の上昇、GLU の低下、インスリン抵抗性の増大といった事象がより長く続いたためと考えられた。我々は頻発する SARA はエネルギー産生を低下させ、乳蛋白質率の低下や分娩間隔の延長を引き起こすのではないかと仮説を立てた。この仮説を立証するために、エネルギー代謝の指標と考えられる M/L 比 (Arai et al, 2003; Li et al, 2012) を測定したが、M/L 比と SARA 日数の間には相関性は認められなかった。それゆえ、今回の研究では M/L 比の SARA のバイオマーカーとしての有効性を示すことはできなかった。

穀類多給によって生じる SARA はルーメン内のエンドトキシンレベルを増加させ、全身性の非特異的な炎症反応を引き起こすことが知られている (Gozho et al, 2005)。また、炎症によりマクロファージから分泌される腫瘍壊死因子はインスリン抵抗性を引き起こす (Li et al, 2007; Ohtsuka et al, 2001)。したがって、SARA はインスリン抵抗性を誘導する可能性がある。我々は、この研究において RQUICKI の算出により同様の傾向を確認した。分娩 4 週までの低 pH 時間と分娩 4 週後の RQUICKI の間には負の相関傾向が認められた (データ未掲載、 $p < 0.1$ )。また、有意差は認められなかったが、分娩後 4 週において SARA の頻度がより高い高値群は、頻度が比較的低い低値群と比較して低い RQUICKI を示す傾向にあった ( $p > 0.05$ )。このことから、高頻度の SARA は ADN を上昇させるが、これは LPS に起因する炎症反応の抑制とインスリン感受性の亢進による代償性反応であると考えられた。

これまでに報告されている SARA の誘発実験において、穀類で誘発した SARA (grain-based SARA challenge; GBSC) とアルファルファペレットで誘発した SARA (alfalfa-pellet SARA challenge; APSC) では、炎症反応に違いがあることが明らかになっている (Plaizier et al, 2012; Plaizier et al, 2008; Li et al,

2012)。GBSC と APSC では、両者ともにルーメン pH の低下とルーメン内 LPS 濃度の上昇を生じる。しかし、前者は消化管からの LPS のトランスロケーションと、それに起因する急性相蛋白の上昇が見られるのに対し、後者では見られない。このことはルーメン pH の低下やルーメン内 LPS 濃度の上昇以外の別の要因が LPS のトランスロケーションと急性相蛋白反応に関与していることを示唆しており、前者はルーメンに加えて大腸内の LPS 濃度も上昇することからルーメン上皮よりも傷つきやすい大腸粘膜のバリア機能が傷害されることで、大腸において LPS のトランスロケーションが起きると考えられている (Plaizier et al, 2012; Li et al, 2012)。さらに、両者における飼料成分の最大の違いはデンプン濃度であることから、SARA によって生じる炎症反応には大腸内消化物中のデンプン濃度が影響していると考えられている (Plaizier et al, 2012; Li et al, 2012)。本研究の結果から ADN 濃度と pH パラメーターに関連があることが示され、高頻度の SARA が ADN の上昇をもたらす理由として炎症反応の抑制とインスリン感受性の亢進による代償性反応であると推察した。しかし、本研究で見られた SARA は野外農場で通常の飼養管理下で生じるものであり、給与されていた飼料は過去の研究で SARA の誘発のために給与されていた GBSC や APSC ほど極端な成分濃度になっていないため、S 農場で生じる SARA の病態が前述した二つのタイプのどちらに近いのかは不明である。したがって今後 SARA と血中 ADN 濃度の関係を解明するためには、ルーメン pH だけでなく炎症マーカーやサイトカイン、糞便中の LPS 濃度の測定等による LPS トランスロケーションと炎症の評価が必要であると考えられた。

また、本研究で示された ADN 濃度と pH パラメーターの関連性について、両者の時間的關係性、すなわち代償性の ADN の上昇がリアルタイムに起こるのかタイムラグがあるのかについては明らかにできなかった。スポットデータである ADN と蓄積データである pH パラメーターの時間的關係を明らかにするためには、両者を様々な組み合わせで解析する必要があるからである。したがって、分娩前の時期を含めたあらゆる組み合わせによって全体の関係を調べることで、ADN と pH パラメーターの時間的關係性を解明できる可能性がある。

この研究における限界は、不十分なサンプル数と SARA 牛と非 SARA 牛の比

較ができていない点である。今後サンプル数を増やし、SARA の個体と SARA でない個体を比較することで、ADN による SARA の診断も可能になると推察する。加えて、ルーメン内微生物との関連も調査する必要がある。また、本研究において明らかとなった ADN と前胃液 pH の関連は体重変動や他の炎症性疾患の有無を考慮していないため、これらが無いという前提のもとに導かれた結論である。ADN は分娩初期の負のエネルギーバランスに伴う体脂肪動員と関連することが報告されている (Krumm et al, 2017; Kabara et al, 2014)。したがって、今後はエネルギー収支がプラスに転じ体重変動が少ない泌乳中期や泌乳後期の乳牛において、乳房炎や運動器病等の急性炎症反応を起こしうる他の炎症性疾患の影響を除外した上で ADN と前胃液 pH の関連を調査する必要がある。

以上より、ADN が泌乳牛の前胃液 pH と関連し、SARA 日数と相関することが示されたことから、頻発する SARA は ADN を上昇させるが、これは炎症性  $\text{TNF}\alpha$  の抑制とインスリン感受性の亢進による代償性反応であると考えられた。

## 2.5 小括

本研究では、無線伝送式ルーメン pH センサーを用いてルーメン pH をモニタリングし、エネルギー代謝に関係するホルモンや代謝産物の血中濃度を測定した。分娩 4 週後の ADN 濃度は分娩 1 週間までの低 pH 時間と因果関係が認められ、分娩 4 週後の ADN 濃度もしくは分娩 1 週間後と 4 週間後の ADN の平均値は、分娩後 30 日間の SARA 日数と強い相関関係が認められた。以上の結果より、前胃液 pH を反映する SARA の評価指標としての ADN の有用性が示された。高頻度の SARA は ADN の上昇によって、LPS に起因する炎症反応の抑制とインスリン感受性の亢進による代償性反応を引き起こしている可能性があると考えられた。本研究で導かれた結論は、体重変動の大小や他の炎症性疾患がないということを前提としているため、今後はこれらの影響について検討を行う必要がある。また、SARA の病態には飼料成分が関与しており、大腸内でのデンプンの発酵と LPS 濃度の上昇が LPS のトランスロケーションと急性炎症反応において重要な因子とされていることから、SARA と血中 ADN 濃度の関係を解明するためには、これらの評価が必要であると考えられた。

### 第3章 周産期乳牛における SARA のルーメン性状および生産性の変化

#### 3.1 緒論

ルーメン pH はルーメン内微生物の活性と増殖に影響を与え、発酵パターンを変化させる。濃厚飼料の多給により易発酵性炭水化物が急速に発酵して多量の VFA が生成されて pH が低下すると、セルロース分解菌が死滅して VFA 中の酢酸割合が低下する。pH5 以上であると、産生された乳酸が微生物によりプロピオン酸に変換されるが、微生物の処理能力を超えた乳酸が生成されるとさらに pH は低下する。pH4.8 以下になると乳酸発酵が著しくなり、pH の低下とともに乳酸濃度が増加する(小原, 2006)。pH6~7 の範囲ではセルロース消化が主体で VFA 中の酢酸割合は 60%前後であるが、pH6 以下になるとプロピオン酸、乳酸の生成が盛んになる(Kaufmann, 1980)。このため、SARA の乳牛では繊維消化率が低下し、飼養効率の低下、BCS の低下などにつながる(Plaizier et al, 2008; Kleen et al, 2003)。また、酢酸はルーメンから吸収され乳腺で脂肪酸に合成されて乳脂肪になるため、SARA の乳牛では乳脂肪率の低下が見られる(Kleen et al, 2003)。第二章では、SARA の乳牛において前胃液 pH と血中 ADN 濃度に関連があることを示した。そこで、第三章ではルーメン内の発酵パターンと ADN の関連性を明らかにすることを第一の目的として、血中 ADN 濃度とルーメン VFA との相関性を調査した。さらに、第一章、第二章で調査を行った S 農場では、同一牛群内で前胃液 pH や SARA の出現頻度に個体間のばらつきが見られた。そこで、本研究では通常の飼養管理下で生じる SARA の頻度の違いが生産性に与える影響を明らかにすることを第二の目的として、SARA の頻度で分類した二つの群における比較を行った。

## 3.2 材料および方法

### 動物

本試験は第一章の研究で SARA が高率に見られた山形県最上管内の S 農場で飼養された計 11 頭のホルスタイン種経産牛を用いた。春から夏に分娩した個体を選択し、2015 年に 6 頭、2016 年に 5 頭から採材を行った（表 2-1）。

### 飼養管理

S 農場は 50 頭のホルスタイン種乳牛を飼養するタイストール農場で、乾乳牛、搾乳牛ともに分離給与を行っていた（表 2-2、表 2-3）。ランダムに選定された一部の個体には、SARA を低減する目的でクラフトパルプが給与されていた。クラフトパルプは木材チップからウシが消化できないリグニンを選択的に除去した高消化性繊維飼料であり、トウモロコシと同等のエネルギー価を持つが消化速度が緩やかなため、ルーメン pH を安定化し SARA を防ぐ効果が報告されている（Nishimura et al, 2019）。

### 前胃液 pH の測定と pH パラメーターの評価

前胃液 pH は前述の無線伝送式 pH センサーを用いて 10 分間隔で連続測定した（Sato et al, 2012b; Sato et al, 2012c）。センサーを経口投与し、金属探知機によってセンサーの留置場所を確認した。1 頭のみセンサーは第一胃内に留置されたが、他の 10 頭はすべて第二胃内に留置された。SARA は第一胃液 pH が 5.6 未満、もしくは第二胃液 pH が 6.3 未満の状態が 1 日に 3 時間以上継続した状態と定義される（Gozho et al, 2005; Sato et al, 2012a; Kimura 2013）。この基準を使用して、10 分ごとに測定される pH データを以下の 2 種の pH パラメーターとして評価した。

#### 1. 低 pH 時間

分娩日から分娩 1 週間後、4 週間後、8 週間後までの期間で第一胃液 pH が 5.6 未満、もしくは第二胃液 pH が 6.3 未満の状態である時間の総数を求め、これを本研究中では 1w-低 pH 時間、4w-低 pH 時間、8w-低 pH 時間と定義した。

## 2. SARA 日数

過去の論文で報告されている診断基準に基づいて、第一胃液 pH が 5.6 未満、もしくは第二胃液 pH が 6.3 未満の状態が 1 日に 3 時間以上継続した日を SARA と判定し、分娩後 30 日間における SARA の発症日数を算出した。これを、本研究中では SARA 日数と定義した。なお、センサーのエラーで pH データが欠損した 3 個体を除外した計 8 頭を、4w-低 pH 時間および分娩後 30 日間 SARA 日数によって中央値より高値群、低値群に分けた（高値群：n=4; 4w-低 pH 時間 > 25900 分、SARA 日数 > 25 日、低値群：n=4; 4w-低 pH 時間 ≤ 25900 分、SARA 日数 ≤ 25 日）（表 2-4）。

## 血液パラメーターの測定

血液サンプルは 2015 年に 6 頭、2016 年に 5 頭の尾静脈より、それぞれ分娩 1 週間後、分娩 4 週間後、分娩 8 週間後の 3 ステージで採取した。採材はすべて午前 9 時から午後 5 時までの時間に行った。血液は 4°C、800×g で 10 分間遠心し血清を分離後、-80°C で保管した。グルコース (GLU)、総コレステロール (TC)、遊離脂肪酸 (FFA) はオートアナライザー (AU680, Access 2; Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) を用いて測定した。インスリン (INS) とアディポネクチン (ADN) は市販の ELIZA キット (Insulin ELIZA kit; Shibayagi Co., Ltd., Gunma, Japan, および Mouse/Rat Adiponectin ELIZA kit; Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて測定した。血清リンゴ酸脱水素酵素 (MDH) 活性と乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性は Kaloustian ら (1969) と Bergmeyer と Bernt (1974) の方法で測定した。1 分間あたりの 1 マイクロモルの基質分解を 1 単位とした。MDH 活性/LDH 活性 (M/L 比) をエネルギー代謝の指標として算出した (Arai et al, 2003; Li et al, 2012)。また、インスリン感受性の指標として有用とされる Revised quantitative insulin sensitivity check index (RQUICKI) (Holtenius P and Holtenius K, 2007) を、以下の式によって算出した。

$$RQUICKI = 1 / (\log_{10} (Gb) + \log_{10} (Ib) + \log_{10} (FFAb))$$

Gb: 血清グルコース (mg/dL); Ib: 血清インスリン ( $\mu$  U/mL); FFAb: 血清 FFA (mmol/L)

### 乳データおよび繁殖成績

個体の乳量、乳脂肪率、乳蛋白質率、乳中尿素窒素 (MUN)、乳蛋白乳脂肪比 (P/F 比) は分娩後 50~80 日の間 (50-80 DIM) で行われた牛群検定のデータから抽出した。305 日補正乳量も牛群検定データより抽出した。分娩間隔は繁殖台帳をもとに算出した。

### ルーメン液中 VFA の測定

ルーメン液サンプルは、分娩 4 週後に経口カテーテル法にて採取した。すべて午前 9 時から午後 5 時までの時間に採材を行った。ルーメン液は唾液の混入を防ぐために最初の 200ml 程度を捨て、50~100ml 採取したのち滅菌ガーゼでろ過後、-20°C で冷凍保存した。冷凍保存したルーメン液を流水で解凍し、遠心分離機 (KUBOTA3630; KUBOTA Corporation co., Ltd., Tokyo, Japan) により遠心分離 ( $10000 \times g$ , 10 分, 4°C) した。上清 700  $\mu$ l を分取し、内部標準液として等量の 2mmol/dL クロトン酸溶液と、徐タンパク液としてリン酸 14  $\mu$ l を混合した後、一昼夜冷蔵保存 (4°C) した。その後、遠心分離 ( $10000 \times g$ , 10 分, 4°C) を行い、その上清を試料とした。VFA は、ガスクロマトグラフ (GC-2010; Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) により測定した。カラムは、DB-FFAP 全長 30m、内径 0.25mm、膜厚 0.25  $\mu$ m (Agilent Technologies Japan, Ltd., Tokyo, Japan)、キャリアガスはヘリウムを用いた。測定条件として注入口温度 250°C、カラム温度は、50°C で 1 分間保持した後、40°C/分で 140°C とした後、10°C/分で 240°C とし 2 分間保持し、検出器温度は 260°C に設定した。

### 統計処理

ルーメン中総 VFA 濃度、酢酸モル比、プロピオン酸モル比、酢酸/プロピオン酸比の正規性の検定は、Shapiro-Wilk 検定、Kolmogorov-Smirnov 検定を行ったうえでヒストグラムや正規 QQ プロットを合わせて判断した。また、これ



らと分娩 4 週後の血中 ADN 濃度の Pearson の相関係数を算出した。さらに、センサー異常により pH データが欠損した 3 頭を除外した 8 頭を pH パラメーターで分けた高値群と低値群の二つの群において、分娩 4 週後のルーメン液性状を比較した。低値群の 1 頭でルーメン液サンプル欠損のため統計処理を行うことができず、データは箱ひげ図で示した。また、両群の乳データは Mann-Whitney の U 検定により比較した。両群の分娩間隔は、高値群の 1 頭で受胎せずその後除籍となったため統計処理を行うことができず、データは箱ひげ図で示した。

統計的な有意差は  $p < 0.05$  とした。すべての統計処理は EZR(Saitama Medical Center, Jichi Medical University, Saitama, Japan)を用いて行った。

表 2-1. 調査個体の年齢及び産歴

試験区	個体 No.	生年月日	年齢	産歴	パルプ投与
2015	No.1	2011/1/23	4	2	-
	No.2	2010/12/23	4	3	-
	No.3	2010/12/11	4	2	○
	No.4	2008/12/2	6	3	-
	No.5	2012/9/8	3	1	○
	No.6	2012/10/20	3	1	○
2016	No.7	2010/1/30	6	3	-
	No.8	2012/4/3	4	1	○
	No.9	2013/1/19	3	1	○
	No.10	2012/1/3	4	2	○
	No.11	2012/1/7	4	2	○

表 2-2. S 農場における給与飼料

2015 年

	乾乳牛	搾乳牛	
		通常	パルプ群
コーンフレーク	1kg	1kg	1kg
デントコーンサイレージ	3～4kg	8kg	8kg
グラスサイレージ		4kg	4kg
稲ホールクロップサイレージ	6～7kg	7kg	7kg
オーツヘイ	2kg	2kg	
ルーサンヘイ	3kg	5kg	5kg
ビール粕	5kg	2kg	2kg
濃厚飼料	2kg	8kg	8kg
ビタミン添加剤		50g	50g
リン酸カルシウム		150g	150g
重曹ペレット		150g	150g
クラフトパルプ			<b>2kg</b>

2016 年

	乾乳牛	搾乳牛	
		通常	パルプ群
コーンフレーク			
デントコーンサイレージ		8kg	8kg
グラスサイレージ		4kg	4kg
稲ホールクロップサイレージ	3～5kg	7kg	7kg
オーツヘイ	2kg	2kg	
ルーサンヘイ	1～2kg	5kg	5kg
ビール粕	2kg	2kg	2kg
濃厚飼料	2kg(クロース アップのみ)	8kg	8kg
ビタミン添加剤		50g	50g
リン酸カルシウム		150g	150g
重曹ペレット		150g	150g
チモシー	飽食		
乾乳用配合飼料	2kg		
クラフトパルプ			2kg

表 2-3. S 農場における飼料計算結果

	2015			2016		
	乾乳牛	搾乳牛		乾乳牛	搾乳牛	
		通常	パルプ群		通常	パルプ群
水分 (%)	46.5	38.1	37.8	32.2	38.8	38.5
TDN/DM (%)	63.5	65.3	68.7	61.7	64.4	68.0
C P/DM (%)	15.3	15.2	14.4	14.8	15.4	14.6
ADF/DM (%)	27.0	23.6	28.3	30.1	24.4	29.3
NDF/DM (%)	40.6	34.4	37.9	51.6	35.4	39.0
NFC(NSC)/DM (%)	31.6	37.4	35.3	23.1	35.9	33.7
NDF/NFC	1.3	0.9	1.1	2.2	1.0	1.2
有効 NDF/DM (%)	39.5	32.7	-	51.0	33.7	-
粗飼料 DM/BW (%)	1.1	2.2	2.2	1.2	2.2	2.2
デンプン/DM (%)	16.8	21.1	20.7	9.6	19.1	18.8

TDN: Total Digestible Nutrients (可消化養分総量) ; DM: Dry Matter (乾物) ; CP: Crude Protein (粗蛋白質) ; ADF: Acid Detergent Fiber (酸性デタージェント繊維) ; NDF: Neutral Detergent Fiber (中性デタージェント繊維) ; NFC: Non-Fiber Carbohydrate (非繊維性炭水化物) ; BW: Body Weight

クラフトパルプ中の有効 NDF 含量が不明のためパルプ群の有効 NDF/DM は算出していない。

表 2-4. 4w-低 pH 時間および分娩後 30 日間の SARA 日数による群分け

群	個体 No.	1w-低 pH 時間 (分)	4w-低 pH 時間 (分)	8w-低 pH 時間 (分)	分娩後 30 日間の SARA 日数	パルプ 投与
高値群	No.1	4440	26950	-	26	
	No.2	9840	39920	-	29	
	No.7	8550	32930	67070	30	
	No.9	8310	33550	58240	29	○
低値群	No.3	6090	22420	34350	21	○
	No.4	2760	14400	44320	14	
	No.5	4380	17600	34710	18	○
	No.6	4260	24850	-	25	○
除外	No.8	8830	-	-	-	○
	No.11	-	-	-	-	○
	No.10	7960	-	-	-	○
中央値		7025	25900	44320	25.5	

センサーのエラーで pH データが欠損した 3 個体を除外した計 8 頭の 4w-低 pH 時間における中央値は 25900 分、分娩後 30 日間 SARA 日数における中央値は 25.5 日となった。これらの pH パラメーターにより 8 頭を高値群、低値群に分けた。高値群 4 頭中 1 頭、低値群 4 頭中 3 頭がクラフトパルプを給与されていた。

### 3.3 結果

#### 1. ルーメン液性状と ADN の関係

分娩 4 週後のルーメン液中総 VFA 濃度、酢酸およびプロピオン酸それぞれのモル比、酢酸/プロピオン酸比と分娩 4 週後の ADN 濃度の相関関係を表 3-1 に示した。なお、各変数はすべて正規分布に従った。酢酸モル比と分娩 4 週後の ADN 濃度の間には Pearson の相関係数-0.636 の相関があり、5%水準で統計学的に有意であった。

#### 2. pH パラメーターにより区分した 2 群間のルーメン液性状の比較

pH パラメーターによって群分けした 2 群において、分娩 4 週後のルーメン液中総 VFA 濃度、酢酸/プロピオン酸比を比較した（図 3-1）。両群間に差は見られなかった。

#### 3. pH パラメーターにより区分した 2 群間の乳生産の比較

pH パラメーターによって群分けした 2 群において、50-80 DIM のある一時点における乳データと補正乳量を Mann-Whitney U 検定により比較した（図 3-2）。両群で有意差は認められなかった。

#### 4. pH パラメーターにより区分した 2 群間の分娩間隔の比較

pH パラメーターによって群分けした 2 群において、分娩間隔を比較した（図 3-3）。両群間に差は見られなかった。

表 3-1. 血中 ADN 濃度とルーメン性状の相関関係

	総 VFA (mmol/dL)	A/P	酢酸 (%)	プロピオン酸 (%)
4w-ADN	-0.0606 ( $p = 0.868$ )	-0.454 ( $p = 0.188$ )	-0.636 * ( $p = 0.0482$ )	0.43 ( $p = 0.215$ )

表は分娩 4 週後の血中 ADN 濃度とルーメン中総 VFA 濃度、VFA 組成における Pearson の相関係数を示す。ルーメン液サンプルが欠損した 1 頭 (No.6) を除く ( $n=10$ )。

4w-ADN: 分娩 4 週後の血中 ADN 濃度

A/P: 酢酸/プロピオン酸比

酢酸、プロピオン酸は総 VFA 中モル比で示した。

\*は Pearson の相関係数に基づく有意な相関を示す ( $p<0.05$ )。

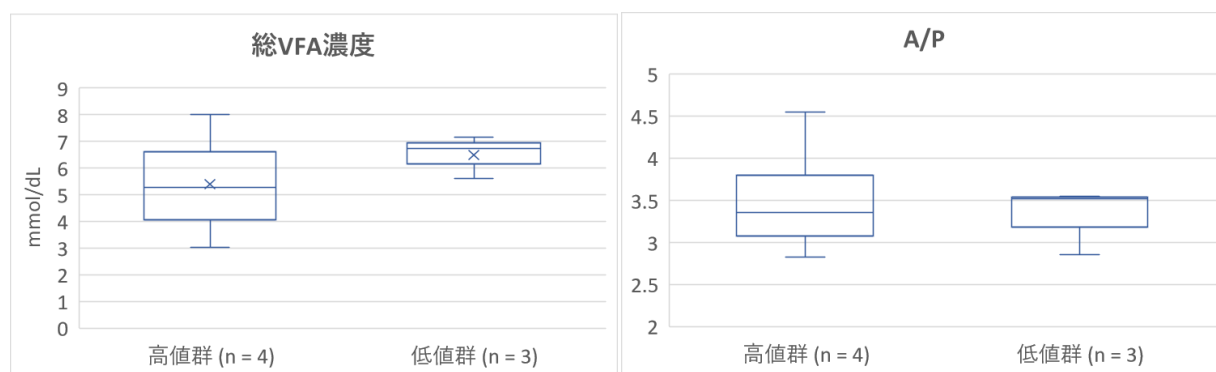


図 3-1. pH パラメーターにより群分けした 2 群のルーメン性状の比較

数値は箱ひげ図で示した。低値群の 1 頭 (No.6) はルーメン液サンプルが欠損したため  $n=3$  となった。

A/P: 酢酸/プロピオン酸比

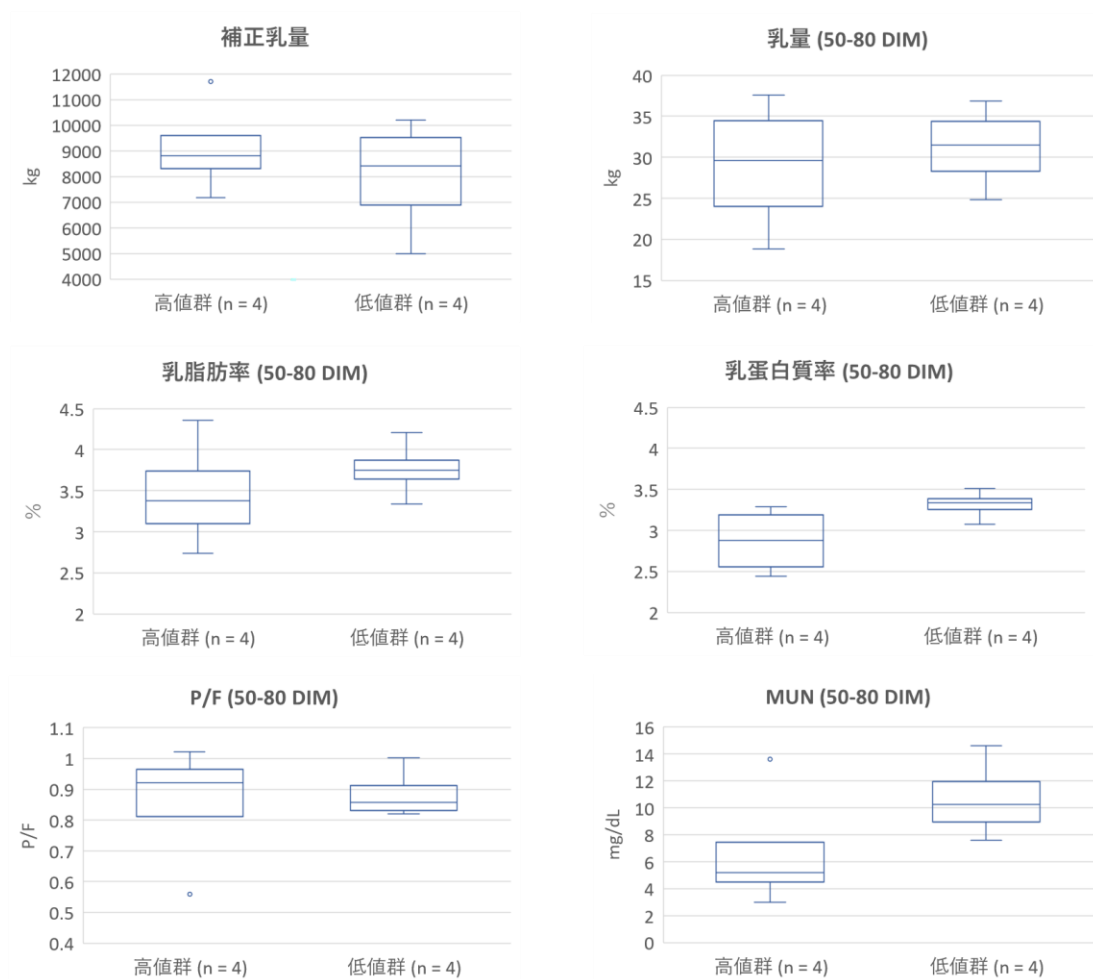


図 3-2. pH パラメーターで群分けした 2 群の乳生産の比較

数値を箱ひげ図で示した。

2 群は乳生産を Mann-Whitney U 検定によって比較した。いずれも有意差は認められなかった。

50-80DIM: 分娩後 50～80 日の間の一点

MUN: 乳中尿素窒素

P/F: 乳蛋白質/乳脂肪比



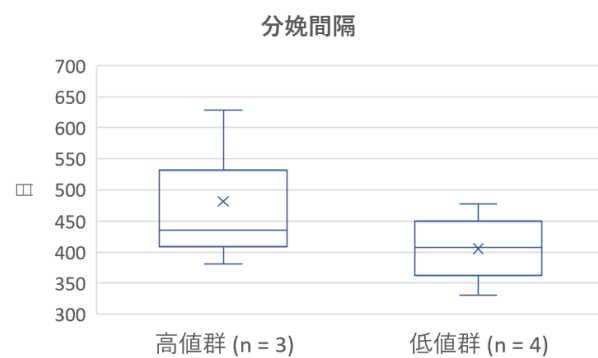


図 3-3. pH パラメーターで群分けした 2 群の分娩間隔の比較

数値を箱ひげ図で示した。

高値群の 1 頭 (No.2) が受胎せずその後除籍となったため  $n=3$  となった。

### 3.4 考察

第二章の研究結果より、前胃液 pH を反映する SARA の評価指標としての ADN の有用性が示された。ルーメン pH は発酵による VFA 産生量、ルーメン壁からの VFA 吸収速度、酸を中和する唾液の分泌量およびルーメン内アンモニア産生量等の種々の要因によって変化し、発酵生成物の組成や唾液分泌量に影響する。これをふまえ、ルーメン発酵と ADN の関連性を明らかにすることを目的として本研究を行った。

ルーメン pH は微生物叢やプロトゾアの活性と増殖に影響を与え、発酵パターンに影響を及ぼす。すなわち、飼料中粗繊維含量が 20% 程度の高い含量の場合、ルーメン pH はセルロース消化の至適範囲である 6.0~6.7 程度に安定し、酢酸の比率は VFA 全体の 60% 前後となるが、pH の低下とともに乳酸やプロピオン酸の生成が盛んになり酢酸の比率は低下する (Kaufmann et al, 1980)。本研究結果より、分娩 4 週後の血中 ADN 濃度はルーメン液中酢酸モル比と負の相関関係が認められた。この結果は第二章で示された ADN と前胃液 pH の関連性を裏付けるものであり、血中 ADN 濃度がルーメン発酵パターンを反映することが示された。

ルーメン内の VFA 蓄積と唾液による中和の不足によってルーメン pH が低下する SARA は、乾物摂取量の低下、繊維消化率の低下、乳脂肪率の低下、下痢、エンドトキシンに起因した炎症などの原因となることが明らかにされている (Plaizier et al, 2007; Kleen et al, 2003)。これら SARA の影響は、対象牛群に給与される飼料成分を変化させることによって、実験的に SARA を誘発させることで研究されてきた。一方、本研究では通常の飼養管理下で発生する SARA が生産性へ与える影響を調査するために、調査した 11 頭のうち pH データを正しく取得できた 8 頭を分娩後 30 日間における SARA 発生日数によって高値群と低値群の 2 群に分け、ルーメン性状、乳生産、繁殖成績を比較した。本研究では 2015 年と 2016 年で若干の飼料成分の違いがあること、両年とも対象牛の一部にクラフトパルプが給与されており、完全に同一の飼料を給与された牛群内の比較とは言えないものの、これらの変動は乾物中 2~5% 程度であり、飼料要因の影響は少ないものと判断した。

ルーメン性状についてはサンプル数の不足により統計的比較ができなかったものの、両群間で総 VFA 濃度および酢酸/プロピオン酸比に顕著な差は認められなかった。過去の研究において、SARA を誘発した群は対照群と比較してルーメン中総 VFA 濃度の増加が見られた (Khafipour et al, 2009a, 2009b) という報告がある一方、増加しなかった (Li et al, 2012) という報告もあり、SARA が総 VFA の蓄積によるルーメン pH の低下であると結論づけられている (Goad et al, 1998) にも関わらず、必ずしも SARA と総 VFA の増加は一致しないようである。酢酸/プロピオン酸比については、複数の論文で SARA 群が対照群と比較して低下するとの報告がある (Gozho et al, 2007, Khafipour et al, 2009, Li et al, 2012)。一方、Gao らは、同一高穀類飼料を給与して SARA を誘発しても SARA の程度に個体差が生じ、SARA に耐性がある群と感受性が高い群でルーメン中総 VFA 濃度や組成に差が見られなかったとしており (Gao et al, 2014)、本研究の結果と類似していた。

乳生産の比較に関して、SARA 発生日数で分けた高値群と低値群の両群間に有意差は見られなかったが、低値群において、高値群と比較して乳中尿素窒素 (MUN) が高い傾向にあった。MUN は飼料中の分解性蛋白質から生成されるアンモニアの最終代謝産物であり、分解性蛋白質と発酵エネルギーの量的な相対関係を反映して変動するため、これらの絶対量あるいは両者の相対的なバランス、もしくは分解性の程度などが MUN に影響を与える。Gao らは、高穀類飼料給与下で SARA に耐性がある群は感受性が高い群と比較して乳量、乳組成には差が見られないが MUN が有意に高く、これはルーメン内の有機物発酵性の違いに起因すると報告している (Gao et al, 2014)。本研究において低値群にはクラフトパルプを給与されていた個体が 3 頭、高値群には 1 頭含まれており、これらの個体は通常の搾乳牛と比較して NDF 含量が 3.5% 程度高く NFC 含量が 2% 程度低い飼料を給与されていた。しかし、この給与飼料の差はルーメン液中の酢酸/プロピオン酸比や乳蛋白質/乳脂肪比に影響を与えなかった。したがって両群間でみられた MUN の違いは飼料成分以上にルーメン内の発酵性由来するものと考えられた。Gao らの実験はエネルギー収支がプラスに安定している泌乳後期において高穀類飼料を給与した実験である一方、本研究の MUN 値は泌乳最盛期のものであり乳量やエネルギー収支の要因を受けやすい

時期であったこと、SARA の誘発を行っておらずルーメンへの負荷が高穀類飼料ほど高くなかったことにより、両群における MUN の差が顕著に表れなかった可能性があった。

繁殖成績の比較に関して、SARA 発生日数で分けた高値群と低値群の両群間の分娩間隔に差は見られなかった。しかし、繁殖成績には卵巢や子宮機能など牛側の要因のほかに発情発見の有無、人工授精のタイミング、適切なホルモン剤使用等の人為的要因や、暑熱ストレス等の環境要因も大きく関与する。近年、分娩後の卵巢機能を早期に回復させるためには分娩前 3 週間（乾乳後期）と分娩後 3 週間（産褥期）を合わせた移行期の飼養管理が重要とされている (Grant and Albright, 1995; Peters, 1996)。乾乳後期の栄養・環境管理に問題があると、分娩事故や周産期病の発生リスクが高まる結果、分娩後の乾物摂取量が不足し、エネルギー不足の状態が長期化すると卵巢や子宮機能の回復が遅延するためである。これらをふまえると、SARA が繁殖成績に与える影響を調査するためには、乾乳後期からの SARA の評価と分娩後のエネルギー充足および卵巢や子宮の機能回復に注目する必要があると考えられた。

本研究により、血中 ADN 濃度がルーメン発酵パターンを反映することが示され、これは第二章の結果を裏付けるものであった。また、通常の飼養管理下で生じる SARA 発生頻度の違いがルーメン液、乳生産と繁殖成績に与える影響に関して過去の研究と類似の傾向が認められたものの、生産性に及ぼす影響については明らかにすることができなかった。本研究の課題は完全に同一の飼料条件下での比較をできていない点と、サンプル数の不足により十分な統計的比較が行えなかった点である。また、乳量や繁殖には SARA 以外の要因も多く関与するため、それらの要因を考慮したうえでの調査が必要である。今後は調査頭数を増やすとともに、乳成分や卵巢機能のモニタリングと乾乳後期の SARA との関連性について、ルーメン微生物叢を含めた総合的な解析が必要であると考えられた。

### 3.5 小括

本研究は、ルーメン発酵と ADN の関連性を明らかにすることを目的として血中 ADN 濃度とルーメン液性状の相関関係を調査した。また、通常の飼養管理下で発生する SARA が生産性へ与える影響を調査するために、分娩後 30 日間における SARA 発生日数によって高値群と低値群の 2 群に分け、ルーメン性状、乳生産、繁殖成績を比較した。分娩 4 週後の血中 ADN 濃度はルーメン液中酢酸モル比と負の相関関係が認められた。この結果は、第二章で示された前胃液 pH と ADN の関係を裏付けるものであり、血中 ADN 濃度がルーメン発酵パターンを反映することが示された。

ルーメン中総 VFA 濃度と VFA 組成、および乳量と乳組成、分娩間隔において高値群と低値群において有意な差は認められず、過去の研究と類似の傾向が認められたものの、生産性に及ぼす影響については明らかにすることができなかった。近年、分娩後の生産性に関して移行期の飼養管理の重要性が広く認識されている。今後は乳成分や卵巣機能のモニタリングと乾乳後期の SARA との関連性について、ルーメン微生物叢を含めた総合的な解析が必要であると考えられた。

## 第4章 パルプ製材給与による SARA 低減の試み

### 4.1 緒言

乳牛は分娩後、飼料中の濃厚飼料割合の増加と乾物摂取量の増大によって、ルーメン環境が不安定となり、SARA のリスクが高い時期とされる (Dohme et al, 2008)。第一章では、山形県最上地方の酪農家において分娩前後で SARA の発生が見られることを明らかにした。第二章では、SARA は糖・脂質代謝に関連するホルモンである血中アディポネクチン濃度に影響を及ぼすことを明らかにした。ルーメン内の安定性を保ち SARA のリスクを減らすためには、飼料中易発酵性炭水化物含量の過剰を防止することと、繊維による咀嚼刺激作用を確保することが重要である。飼料中繊維は咀嚼刺激作用をもち、咀嚼時に分泌される唾液中の重炭酸塩等はルーメン内の pH を安定化させるための緩衝能を高める (Stone, 2004)。

木材の飼料価値は昔から知られているが、近年、スギチップや木材クラフトパルプの実用化にむけた研究が進んでいる。我が国の国土面積の 66% を占める森林資源の畜産的利用には、海外からの輸入に依存しない国産飼料の安定的供給や林畜連携による中山間地域振興などのメリットがある (寺田, 2017; Nishimura et al, 2019)。クラフトパルプは、木材チップから、消化の妨げになるリグニンを選択的に除去した、セルロースを主成分とした高栄養価繊維飼料である (寺田, 2017; Nishimura et al, 2019)。他の家畜飼料と比べて初期の消化スピードが著しく遅いが、一定時間遅れた後に急激に消化が進み、最終的にほぼ 100% 消化される (Nishimura et al, 2019)。このように、高消化性でありながら発酵が穏やかに進むためルーメン pH の低下が軽減され、SARA 予防への応用が期待されている (Nishimura et al, 2019)。

本研究は、SARA のリスクが高い分娩前後の乳牛にクラフトパルプを給与し、SARA 低減効果および脂質代謝改善効果を検討することを目的とした。

## 4.2 材料および方法

本研究は、第二章および第三章の研究で得られたサンプルを使用して行った。したがって、試験対象個体、飼養管理、前胃液 pH の測定と pH パラメーターの算出、血液パラメーターの測定、乳データ・繁殖成績の抽出、ルーメン液 VFA の測定については第二章、第三章に準ずる。なお、試験対象とした 2015 年の 6 頭のうち 3 頭、2016 年の 5 頭のうち 4 頭は、飼料の一部をクラフトパルプに代替し、クラフトパルプは分娩前から徐々に馴致して調査期間中毎日給与した。クラフトパルプを給与した個体をパルプ群、給与していない個体を対照群とした。パルプ群の個体は 11 頭の中からランダムに選定した。クラフトパルプは日本製紙株式会社より提供を受けた。

### ルーメン中 LPS の測定

ルーメン液サンプルは、分娩 4 週後に経口カテーテル法にて採取したものを使用し、市販の LAL 試薬(Pyrochrome with Glucashield Buffer, Seikagaku Co., Tokyo, Japan)を用いてエンドスペシー法にて分析した。

### 統計処理

2015 年、2016 年ともに対照群、パルプ群のサンプル数が少なく統計処理は実施することができなかった。両群の比較は、箱ひげ図で示した。

### 4.3 結果

#### 前胃液 pH におけるクラフトパルプの給与効果

前胃液 pH におけるクラフトパルプの給与効果を表 4-1 に、対照群とパルプ群の一日 pH 平均値の推移を図 4-1 に示す。2015 年はパルプ群で対照群と比較して前胃液 pH の改善効果が見られたが、2016 年にはほとんど認められなかった。2016 年は、2015 年と比較して低 pH 時間および SARA 日数が増加する傾向にあった。2015 年では、パルプ群の 4w-低 pH 時間は対照群と比較して少ない傾向にあった(21623 分 vs 27090 分)。両年ともパルプ群では対象群と比較して SARA 日数が減少する傾向にあった(2015 年は 21.3 日 vs 23 日、2016 年は 29 日 vs 30 日)。分娩 7 日前、分娩 7 日後、分娩 14 日後の日内変動を図 4-2 に示す。2015 年はパルプ群で対照群と比較して前胃液 pH が高く維持された。ルーメン不安定化指標は、2016 年においてパルプ群が対照群より低くなる傾向にあった(図 4-3)。

#### 血液性状におけるクラフトパルプの給与効果

血液性状に対するクラフトパルプの給与効果を図 4-4 に示す。2015 年において、パルプ群では対照群と比較して分娩 4 週後、分娩 8 週後の ADN が低値を示す傾向にあった。また、分娩 1 週後、4 週後、8 週後の TC が高値を示す傾向にあった。

#### ルーメン液 VFA におけるクラフトパルプの給与効果

ルーメン液性状におけるクラフトパルプの給与効果を図 4-5 に示す。両年ともパルプ群では対照群と比較して総 VFA 量が高くなる傾向にあった。

#### ルーメン液 LPS 濃度におけるクラフトパルプの給与効果

ルーメン液中 LPS 濃度におけるクラフトパルプの給与効果を図 4-6 に示す。2015 年において、パルプ群は対照群と比較して高値を示す傾向にあった。



### 乳生産におけるクラフトパルプの給与効果

乳生産におけるクラフトパルプの給与効果を図 4-7 に示す。両年ともパルプ群は対照群と比較して 50-80DIM の MUN が高い傾向にあった。

### 分娩間隔におけるクラフトパルプの給与効果

分娩間隔におけるクラフトパルプの給与効果を図 4-8 に示す。両年ともパルプ群は対照群と比較して分娩間隔が短縮する傾向にあった。

表 4-1. 前胃液 pH におけるクラフトパルプの給与効果

	2015 年		2016 年		平均	
	4w-低 pH 時間 (分)	分娩後 30 日間の SARA 日数	4w-低 pH 時間 (分)	分娩後 30 日間の SARA 日数	4w-低 pH 時間 (分)	分娩後 30 日間の SARA 日数
対照群	27090 (n = 3)	23.0	32930 (n = 1)	30.0	28550 (n = 4)	24.8
パルプ群	21623 (n = 3)	21.3	33550 (n = 1)	29.0	24605 (n = 4)	23.3
平均	24357 (n = 6)	22.2	33240 (n = 2)	29.5	26578 (n = 8)	24

センサーのエラーで測定期間後半の pH データが欠損した 2016 年のパルプ群 3 頭(No.8,10,11)を除外した。

4w-低 pH 時間：分娩後 4 週間で第一胃液 pH<5.6 もしくは第二胃液 pH<6.3 となった時間の総量。

SARA 日数：第一胃液 pH が 5.6 未満、もしくは第二胃液 pH が 6.3 未満の状態が 1 日に 3 時間以上継続した日を SARA と判定し、分娩後 30 日間における SARA の発症日数。

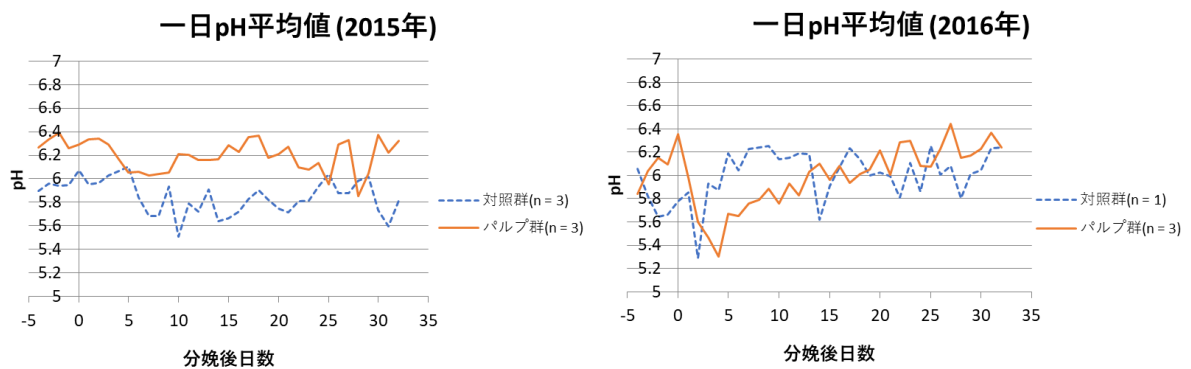


図 4-1. 一日 pH 平均値に対するパルプの効果

センサーのエラーで全測定期間の pH データが欠損した 2016 年のパルプ群 1 頭 (No.11) を除外した。

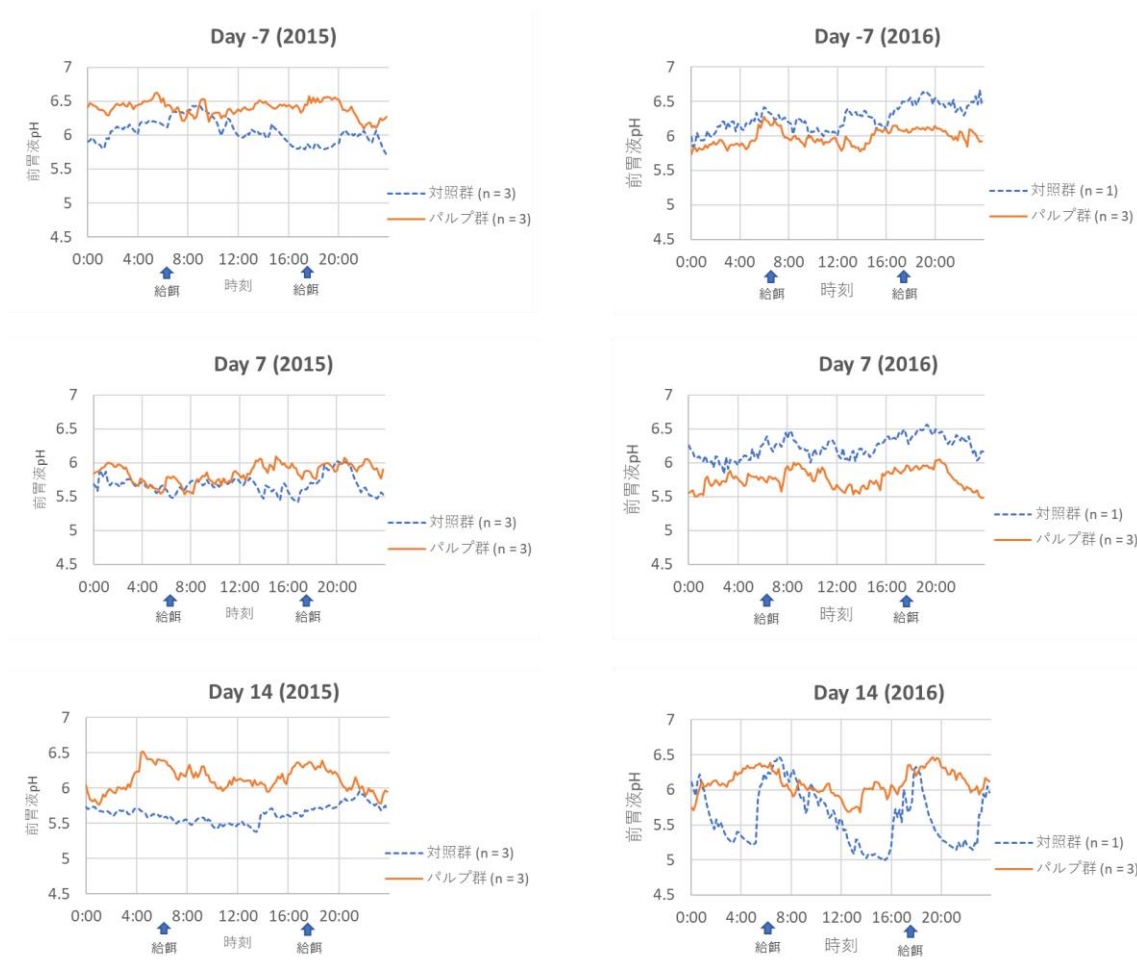


図 4-2. 対照群とパルプ群の分娩 7 日前、7 日後、14 日後における前胃液 pH の日内変動

センサーのエラーで全測定期間の pH データが欠損した 2016 年のパルプ群 1 頭 (No.11) を除外した。

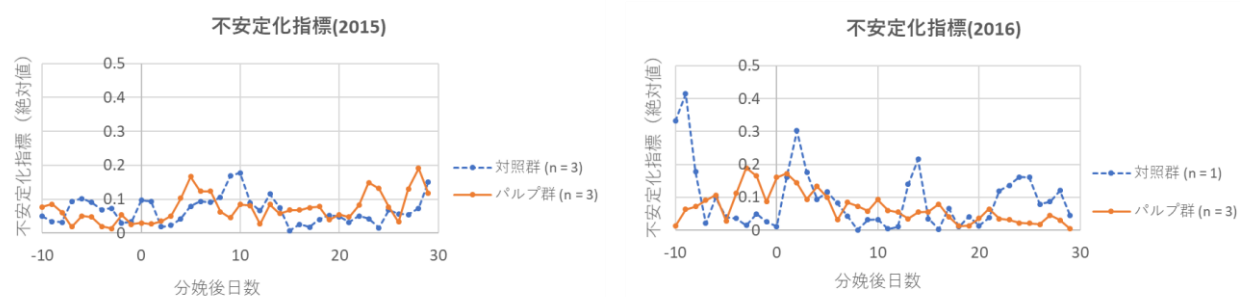


図 4-3. 対照群とパルプ群の不安定化指標（絶対値）

センサーのエラーで全測定期間の pH データが欠損した 2016 年のパルプ群 1 頭 (No.11) を除外した。

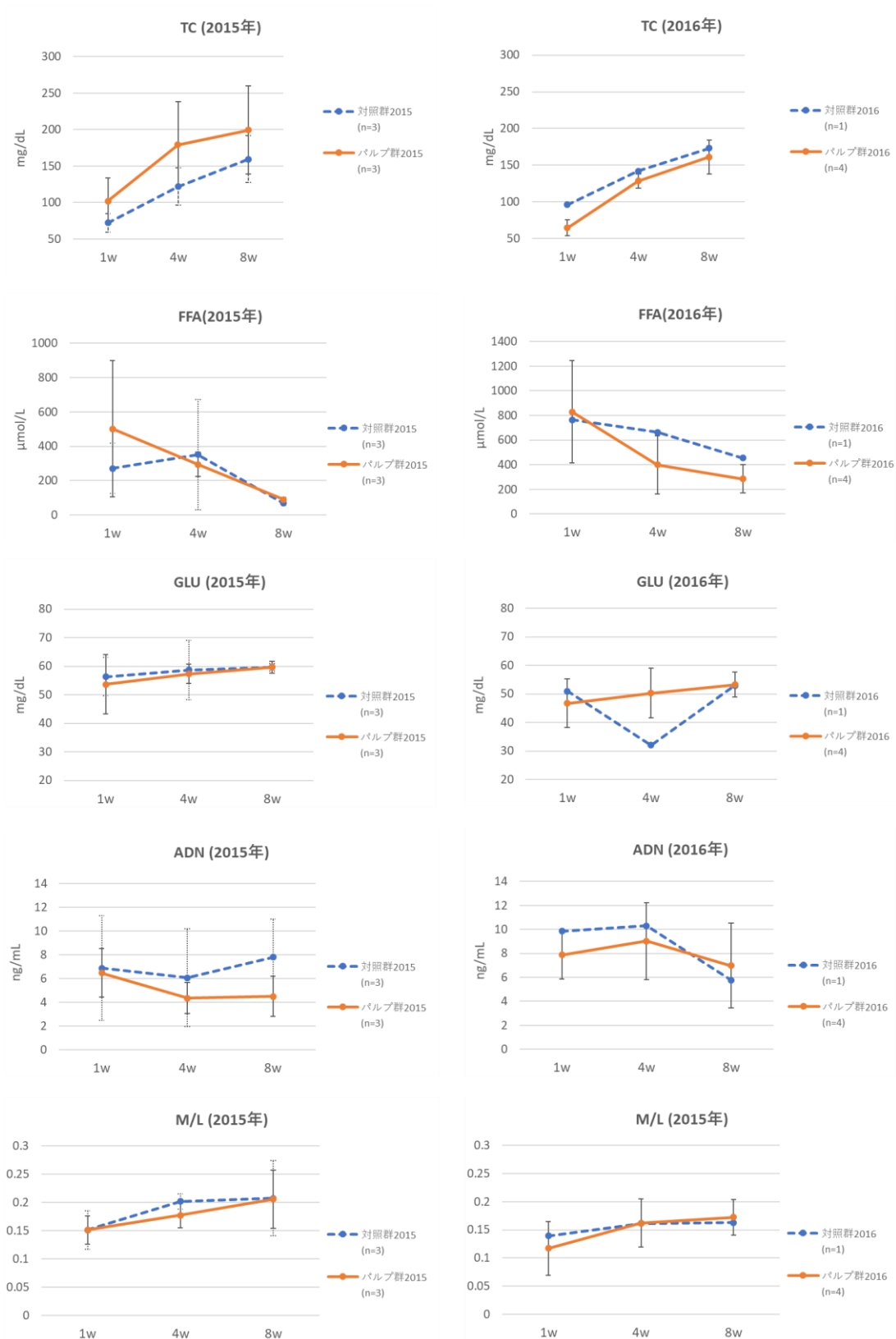


図 4-4. 対照群とパルプ群の血液パラメーターの推移

平均  $\pm$  SD

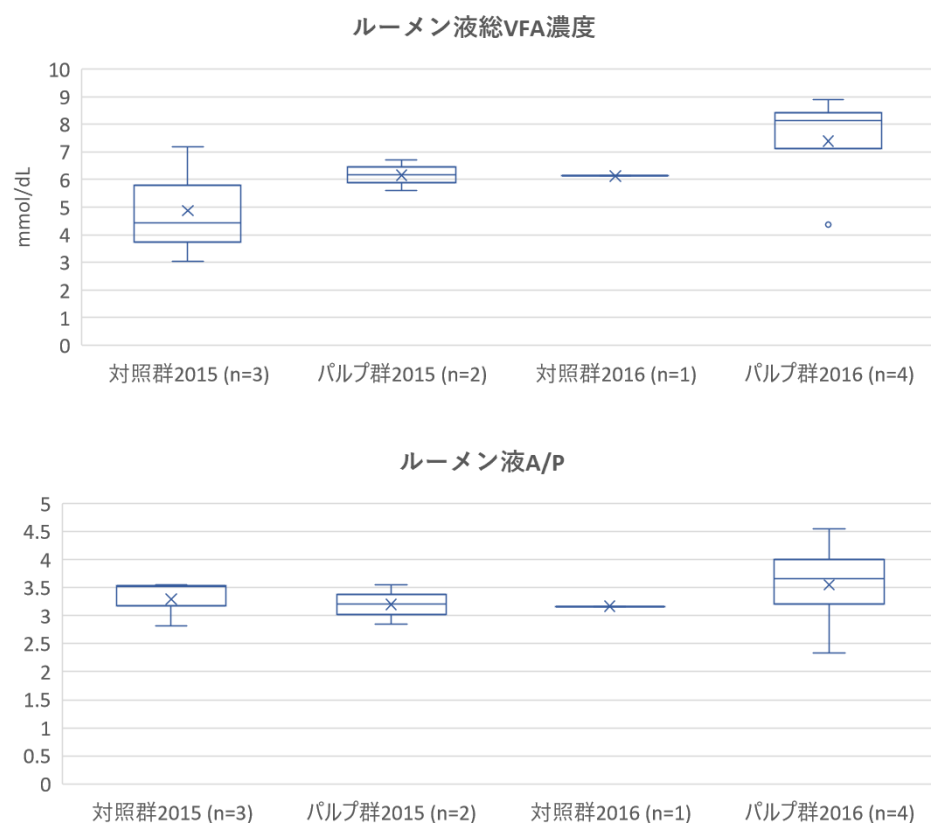


図 4-5. ルーメン液 VFA におけるクラフトパルプの給与効果

数値を箱ひげ図で示した。

2015 年のパルプ群の 1 頭 (No.6) でルーメン液サンプル欠損のため n=2 となった。

A/P: 酢酸/プロピオン酸比

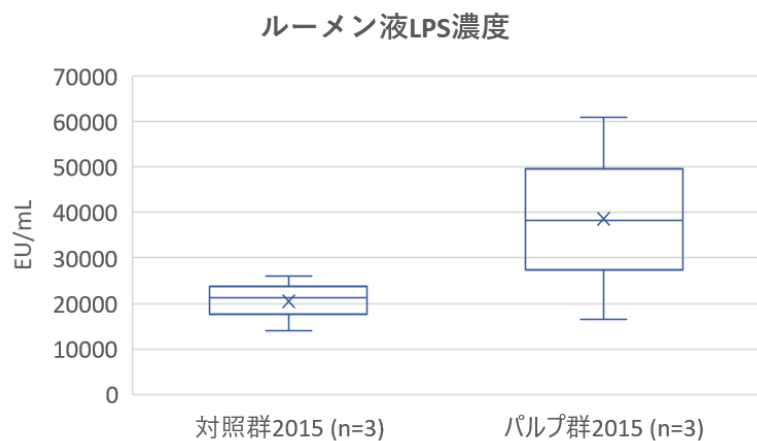


図 4-6. 対照群とパルプ群のルーメン中 LPS 濃度の比較

数値を箱ひげ図で示した。

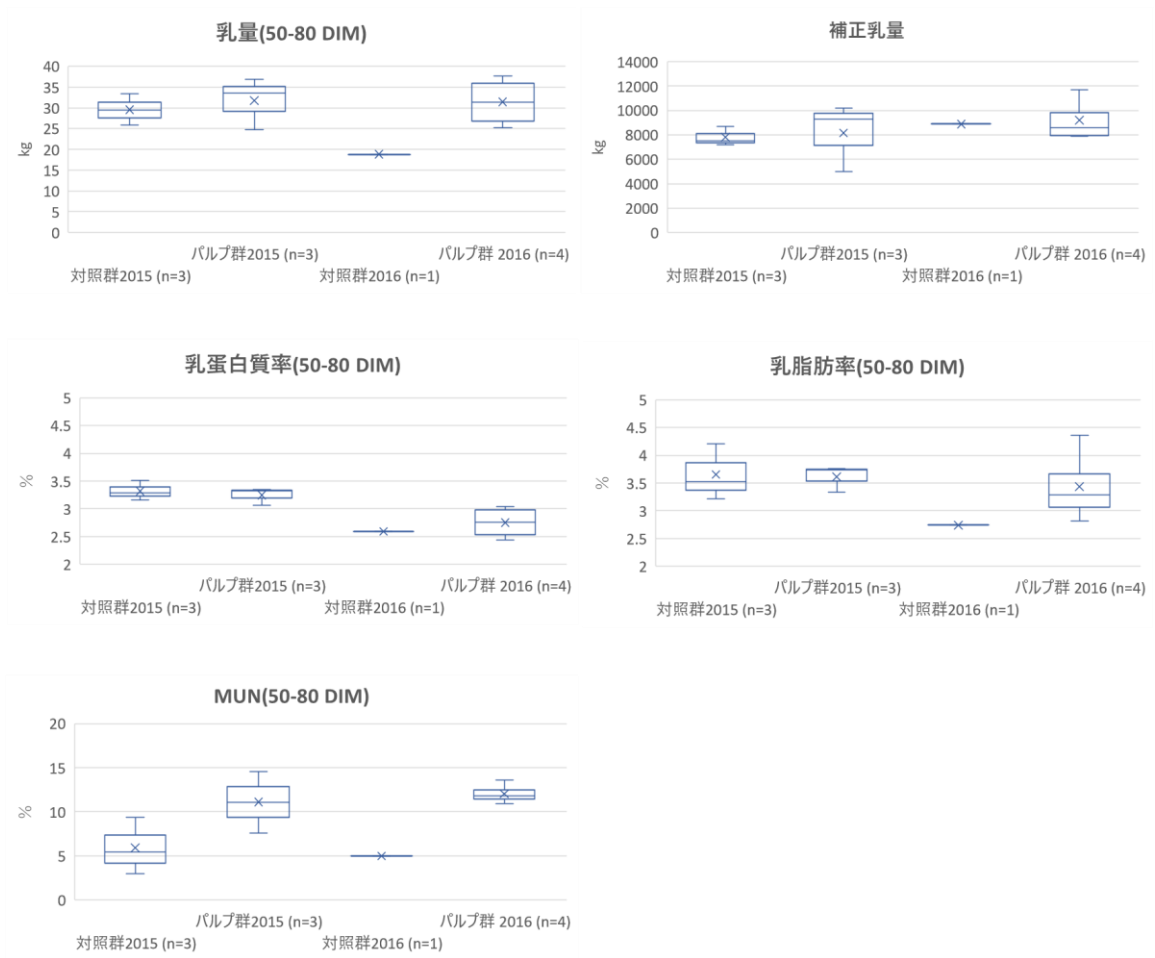


図 4-7. 対照群とパルプ群の乳生産の比較

数値を箱ひげ図で示した。

50-80DIM: 分娩後 50～80 日の間の一点; MUN: 乳中尿素窒素;

P/F: 乳蛋白質/乳脂肪比

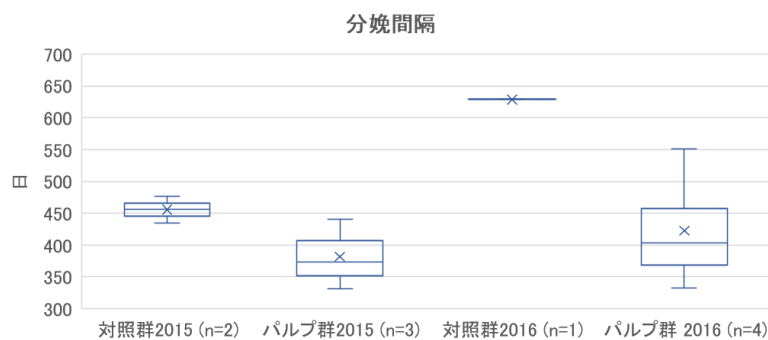


図 4-8. 対照群とパルプ群の分娩間隔の比較

数値を箱ひげ図で示した。

2015 年対照群の 1 頭(No.2)が受胎せずその後除籍のため n=2 となった。

#### 4.4 考察

本研究は、クラフトパルプ給与による SARA 低減と脂質代謝改善効果の検討を目的として行われた。クラフトパルプは繊維を多く含むため、飼料中 NDF 含量を高め、ルーメン pH を安定させる(寺田, 2017)。本研究では、クラフトパルプの持続的な給与により SARA の有病率を低下することはできなかったが、同一個体の SARA の発生頻度はわずかに低減させることができた。2015 年の試験においては、クラフトパルプの給与による前胃液 pH の改善効果がみられたが、2016 年の試験においては、その効果は見られなかった(図 4-1、図 4-2、表 4-4)。ルーメン pH は飼料中の繊維の物理的有効性や、NFC のタイプと量に影響を受ける(Hall, 2002)。2015 年の飼料成分濃度は、2016 年と比較して乾乳期の NDF 充足率および粗濃比が低く、乾物中 NFC およびデンプン濃度が高かった。すなわち乾乳中からルーメン pH が低下しやすい飼料であったため、クラフトパルプの給与効果が出やすかったと考えられた。しかし、2016 年の乾乳期の飼料は NDF 充足率および粗濃比、乾物中 NFC 濃度およびデンプン濃度は是正されていたものの、乾乳期飼料と泌乳期飼料で乾物中 NFC 濃度およびデンプン濃度のギャップが大きくなっていた。このことから、2016 年には分娩後の NFC、特にデンプン濃度の急激な増加によってルーメン発酵の不安定化が顕著となり、クラフトパルプ給与により不安定化の改善は認められたものの、SARA を防ぐほどの前胃液 pH 改善効果が出にくかったと考えられた。したがって、クラフトパルプの給与効果は基礎飼料の成分濃度によって異なると考えられた。

クラフトパルプ群の分娩 4 週間後におけるルーメン液中総 VFA 濃度は、対照群と比較してやや高い傾向にあったものの、酢酸/プロピオン酸比には差が見られなかった。Nishimura らは泌乳中期の乳牛におけるクラフトパルプの給与効果について報告している。圧ぺんとうもろこしの 50% をクラフトパルプで代替したとき、クラフトパルプの乾物中割合は 12% であり、パルプ給与群において第二胃液 pH が 6.1 を下回る時間が減少する傾向にあったと報告している。また、ルーメン総 VFA 量には変化がなかったが、VFA 中の酢酸/プロピオン酸比が有意に上昇したと報告している(Nishimura et al, 2019)。本研究ではクラフト

パルプを粗飼料であるオーツヘイと代替し、クラフトパルプの乾物中割合は約 5%であった。オーツヘイ 2kg とパルプ 2kg を代替した際の繊維増加分は NDF 800g であり、泌乳牛の給与飼料原物中 3.4~3.6%の増加であった。そのため、Nishimura らの報告と比較してクラフトパルプ群における総繊維含量の増加がわずかであり、酢酸発酵に対する影響が小さくルーメン中酢酸濃度の増加に寄与しなかったと考えられた。このことから、濃厚飼料と代替しクラフトパルプの乾物中割合をさらに高めたほうが、より高い繊維増加が見込まれ SARA 低減効果は高くなることが予想された。一方、クラフトパルプは消化開始までのラグタイムが長く急激な発酵が抑えられるという消化特性を持っている。このことから、クラフトパルプの代替により増加した総繊維含量はわずかであったものの発酵速度が変化したことにより前胃液 pH の改善効果がもたらされたものと考えられた。

クラフトパルプ給与による前胃液 pH の改善効果が見られた 2015 年では、クラフトパルプ給与群の血中 TC 濃度は対照群と比較して、分娩後 1 週、4 週、8 週において高値を示す傾向にあった。また、分娩 4 週後のルーメン液中総 VFA 濃度はやや高い傾向にあり、泌乳最盛期における乳中尿素態窒素(MUN)が高く、分娩間隔は短い傾向にあった。MUN は飼料中の分解性蛋白質から生成されるアンモニアの最終代謝産物であり、分解性蛋白質と発酵エネルギーの量的な相対関係を反映して変動する。このほかに乾物摂取量や産歴、季節、搾乳頻度等の非栄養性因子の影響も受け、SARA との関連性も報告されている(Gao et al, 2014)。過去に Gao らが行った実験では、高穀物飼料を給与して SARA を誘発したとき、pH が SARA の診断閾値を下回った部分の低 pH 面積を乾物摂取量で割った acidosis index によって SARA に耐性がある群と感受性の高い群に分けられ、耐性群は感受性群と比較してルーメン総 VFA 濃度と組成には有意な差が見られなかったにもかかわらず、ルーメン中アンモニア濃度が高い傾向があり、高い MUN を示したと報告している。この理由として、同一飼料を給与されているにもかかわらず、耐性のある群はルーメン内での有機物発酵が低い点を挙げている。本研究においてはパルプ群の給与飼料は対照群と比較して NDF 含量が 3.5%程度高く NFC 含量が 2%程度低かった。しかし、この給与飼料の差はルーメン液中の酢酸/プロピオン酸比や乳蛋白質/乳脂肪比に影響を与



えなかった。したがって両群間でみられた MUN の違いは飼料成分以上にルーメン内の発酵性に由来するものと考えられた。すなわち本研究で見られたパルプ群の MUN の高値は、パルプ給与により有機物の発酵性や発酵速度が変化し、ルーメン内のエネルギーと分解性蛋白質の相対関係が変化したことにより生じたと考えられた。一方、乾物摂取量の指標である血中 TC 濃度と、ルーメン内発酵産物である総 VFA 濃度、および MUN の高値を合わせて考えると、パルプ群は対照群と比較して乾物摂取量が高かった可能性も考えられた。泌乳初期の負のエネルギーバランスは、分娩後の卵巣機能の回復を遅延させる (Staples et al, 1990)。加藤らは分娩後 16-45 日における低い乳蛋白質率は、その後の繁殖成績の悪化につながったことを報告している (Kato et al, 1996)。本研究では分娩後 50~80 日の間の牛群検定においてパルプ群と対照群で乳蛋白質率に違いは見られなかった。しかし、パルプ群が対照群と比較して分娩間隔が短縮する傾向にあったことから、クラフトパルプ給与による乾物摂取量の増加が分娩間隔の短縮につながった可能性が考えられた。一方、血中 ADN はパルプ群において対照群より低値を示す傾向にあった。第二および第三章では ADN は前胃液 pH および SARA の頻度と相関があることを示し、SARA の牛における ADN の上昇は、SARA によって引き起こされる炎症反応とインスリン抵抗性に対する代償性の反応であると考察した。本研究においても、ルーメン環境が改善されていたパルプ群が対照群と比較して低い ADN を示したことは、この結論と矛盾しない。一方、2015 年においてパルプ群の低 pH 時間および SARA 日数は対照群と比較して改善されていたにもかかわらず、パルプ群のルーメン中 LPS 濃度は対照群より高い傾向があり、これは ADN の低値と矛盾した。ただし、SARA のウシにおける LPS 濃度は過去に多くの報告があるが、文献によりかなりの変動がある (Plaizier et al, 2012)。また、本研究では両群の LPS 濃度の差を統計比較することができず、両群間の差について評価することが困難であった。さらに、SARA によって生じる急性相蛋白反応にはルーメン内 LPS 濃度以上に大腸内のデンプン発酵の増加と LPS 濃度の上昇が関連していると考えられている (Li et al, 2012; Plaizier et al, 2012) ことから、SARA の病態を評価するためにはルーメン内の情報だけでは不十分であり、今後炎症マーカーやサイトカインのほか、糞便内 LPS 濃度を測定することで、ルーメン pH と炎症、

ADN の関係がより明らかにできると考えられた。

以上のことから、本研究ではクラフトパルプによる SARA の低減効果と脂質代謝改善効果を確認することができた。しかし、本研究によって導かれた結論には以下の問題点がある。一点目は、クラフトパルプの効果について言及するためには、特定の農場のみの検証では不十分であることである。二点目は不十分なサンプル数から統計処理ができていないことである。第一章において、飼料の給与形態、飼料中デンプン濃度、移行期の飼料変化と移行スピードが牛群の前胃液 pH に影響を与えることが示された。したがって、これらの因子とクラフトパルプの効果を個別に検証することでクラフトパルプの有効的な使用につなげることができると考えられた。

#### 4.5 小括

本研究では、クラフトパルプ給与による SARA 低減と脂質代謝改善効果を検討した。クラフトパルプの持続的な給与により SARA の有病率を低下させることはできなかったが、同一個体の SARA の発生頻度はわずかに低減させることができた。乾乳期の NDF 充足率および粗濃比が低く、乾物中 NFC およびデンプン濃度が高かった 2015 年においては、パルプ群の低 pH 時間が対照群と比較して低下した。一方、乾乳期飼料と泌乳期飼料で乾物中 NFC 濃度およびデンプン濃度のギャップが大きくなっていた 2016 年においては、パルプの給与によるルーメンの安定化が見られたものの pH の改善効果は認められなかった。パルプ群の分娩 4 週後におけるルーメン液総 VFA 濃度は、対照群と比較してやや高い傾向にあった。パルプ群の血中 TC 濃度および泌乳最盛期における MUN は対照群と比較して高い傾向があり、ADN は低い傾向があった。以上よりクラフトパルプ給与による SARA 低減効果とそれによる脂質代謝改善効果を確認することができた。これはパルプの給与によりルーメン発酵速度が変化しルーメン環境が改善したためと考えられた。これらの効果は 2015 年と 2016 年で異なっていたことから、ベースとなる飼料の成分濃度によって効果に違いが出るものと考えられた。今後は、牛群の前胃液 pH に影響を与える飼料の給与形態や飼料中デンプン濃度、移行期の飼料変化等に対するクラフトパルプの効果を検証することで、パルプによる効果的な SARA の予防、低減につなげることができると考えられた。

## 総括

本研究は、乳牛における潜在性ルーメンアシドーシス(SARA)の病態解明および予防・低減法確立のために、無線伝送式ルーメン pH センサー（以下、pH センサー）を使用した SARA の実態把握、SARA 発症牛の血液性状の変化およびクラフトパルプ投与による SARA 低減効果を明らかにすることを目的として、一連の実験を行った。

第一章では、SARA の実態把握のために、近年新たに開発された SARA 診断ツールである pH センサーを用いて山形県最上地方の酪農場における SARA の発生状況を調査するとともに、飼養形態の異なる農場間の前胃液 pH を比較し、牛群の前胃液 pH に影響する飼養管理要因について検討を行った。調査した 5 農場の、分娩を挟んだ 45 日間の SARA 出現率は 29.0～77.4%と農場間で大きく異なり、飼料を分離給与している S 農場が最も高く、他の農場と比較して低いデンプン濃度の TMR 飼料を給与している I 農場が最も低かった。前胃液 pH は採食に伴い日内変動を示すが、最大 pH と最小 pH の差を pH 較差として農場間で比較したとき、分娩後 4 日間において農場間で有意差が見られた。すなわち、分娩前に急激な濃厚飼料の増給を行っていた H 農場は、分娩前後で飼料変化のない I 農場と比較して有意に大きい較差を示した。この結果から、分娩前後の飼料変化がルーメン環境に影響を及ぼす要因の一つであることが示唆された。また、分娩 11 日～20 日後の農場ごとの平均 pH は、5 農場間で有意に異なり、分離給与を行っている S 農場が最も低値を示した。この結果から、飼料給与形態は牛群の pH に影響を及ぼすことが示唆された。以上により、飼料給与形態、飼料中デンプン濃度、移行期の飼料変化が牛群の前胃液 pH に影響を与える要因であると考えられた。また、S 農場、I 農場においては同一の飼料を給与されている個体間で前胃液 pH にばらつきが見られ、両農場における遺伝的背景やルーメン微生物叢の多様性、S 農場の長期的な SARA によるルーメン微生物叢の不安定化等の個体要因が関与している可能性が考えられた。

第二章では、SARA が代謝に及ぼす影響を解明するために、第一章の調査で SARA が高い割合で見られた S 農場において pH センサーを用いて前胃液 pH をモニタリングし、エネルギー代謝に係るホルモンや代謝産物の血中濃度

を測定した。前胃液 pH を評価するにあたり、SARA の診断基準となる pH 閾値を下回った時間の総計(低 pH 時間)と SARA と診断された日数 (SARA 日数) の二つのパラメーターを算出し、血液性状との関係性を検討したところ、分娩 4 週後の血中アディポネクチン(ADN)濃度は分娩後 1 週間の低 pH 時間との関連性が認められた。加えて、分娩 4 週後の血中 ADN 濃度もしくは分娩 1 週間後と 4 週間後の ADN 平均濃度と、分娩後 30 日間の SARA 日数には強い正の相関関係が認められた。この結果から、脂肪細胞から分泌されるアディポカインの一つとして知られる ADN は、前胃液 pH を反映する SARA の評価指標として有効であることが示唆された。ADN は糖・脂肪酸代謝に関連し、その機能の一つとしてインスリン抵抗性の改善作用が知られている。また、ウシの *in vitro* 研究において LPS によって誘導される炎症性サイトカイン  $\text{TNF}\alpha$  の分泌抑制作用が報告されている。以上により、高頻度の SARA は ADN を上昇させるが、これは LPS に起因する炎症反応の抑制とインスリン感受性の亢進による代償性反応であると考えられた。

第三章では、ADN とルーメン発酵の関係性を明らかにするために血中 ADN 濃度とルーメン性状の相関関係を調査した。また、通常の飼養管理下で発生する SARA が生産性へ与える影響を調査するために、分娩後 30 日間における SARA 発生日数によって高値群と低値群の 2 群に分け、ルーメン性状、乳生産、繁殖成績を比較した。分娩 4 週後の血中 ADN 濃度はルーメン液中酢酸モル比と負の相関関係が認められた。この結果から、ADN がルーメン発酵パターンを反映することが示され、第二章で論じた pH と ADN の関係性を裏付けるものであった。SARA が高頻度であった高値群と比較的低頻度であった低値群においてルーメン性状、乳生産、繁殖成績に有意な差は見られなかったものの、乳中尿素窒素(MUN)は低値群で高い値を示す傾向があり、SARA の罹患しやすさと MUN に関連があることを報告した過去の研究論文と類似した結果であった。

第四章では、SARA の低減法確立のために、近年実用化されたクラフトパルプの給与による SARA 低減効果および脂質代謝改善効果について検討を行った。本研究では第一章の調査で SARA が高い割合で見られた S 農場において、オーツヘイをクラフトパルプに代替したパルプ群と、パルプを給与しない対照群において前述の二つの pH パラメーター、血液性状、ルーメン性状、乳データお

よび分娩間隔を比較した。2015 年に行った実験では、パルプ群において pH パラメーターが改善される傾向にあり、分娩 7 日前、7 日後、14 日後の日内変動を観察すると、パルプ群では対照群と比較して pH が高く維持されていた。2015 年の給与飼料と比較して、乾乳期飼料と泌乳期飼料で乾物中 NFC 濃度およびデンプン濃度のギャップが大きくなっており、分娩後のデンプン濃度の急激な増加によりルーメン発酵の不安定化を生じやすい飼料内容となっていた。2016 年の実験では、パルプ群における pH 改善効果が 2015 年と同程度には認められなかった。また、パルプ群の分娩 4 週後におけるルーメン液総揮発性脂肪酸 (VFA) 濃度は、対照群と比較してやや高い傾向にあり、パルプ群の血中総コレステロール (TC) 濃度および泌乳最盛期における MUN は対照群と比較して高い傾向があった。血中 ADN 濃度は低い傾向にあった。パルプ群の分娩間隔は対照群と比較して短縮する傾向にあった。パルプの代替により増加した総繊維含量は給与飼料原物量の 3.4~3.6% とわずかであったものの、パルプの持つ消化特性により発酵速度が変化したことによって前胃液 pH 改善効果がもたらされたものと考えられた。MUN の高値はパルプ給与により有機物の発酵性や発酵速度が変化し、ルーメン内のエネルギーと分解性蛋白質の相対関係が変化したことにより生じたと考えられ、また乾物摂取量の指標である血中 TC 濃度とルーメン内発酵産物である総 VFA 濃度の高値、分娩間隔の短縮と合わせて考えると、パルプ群は対照群と比較して乾物摂取量が高かった可能性も考えられた。第二章において高頻度の SARA における ADN の上昇は、SARA によって引き起こされる炎症反応とインスリン抵抗性に対する代償性の反応であると考察したが、本研究においてルーメン環境が改善されていたパルプ群が対照群と比較して低い ADN を示したことは、この結論と一致した。しかし、パルプ群のルーメン中 LPS 濃度は対照群より高い傾向があり、ルーメン内 LPS 以上に大腸内の LPS 濃度の上昇が炎症反応に関連しているとの過去の報告をふまえて、今後詳細な検討が必要である。以上により、クラフトパルプ給与は SARA 低減効果と脂質代謝改善効果を示す可能性があるが、その効果は基礎飼料の成分濃度によって異なると考えられた。

以上の結果をふまえ、本研究の結びにあたって以下に今後の展望を探る。本研究では山形県最上地方の酪農家で飼養されている乳牛において SARA の発生

が見られ、飼料形態や飼料中デンプン濃度、移行期の飼料変化が牛群の前胃液 pH や SARA 発生率に影響すること、前胃液 pH を反映する SARA の評価指標として血中 ADN 濃度が有用である可能性を示した。SARA は消化管上皮の傷害や LPS のトランスロケーションに起因した炎症性疾患である一方、ルーメンの異常は代謝病に直結するために代謝性疾患としての側面も持つ。本研究では、この二つを結びつけるものとして血中 ADN 濃度が有用であることを見出した。SARA はそれを引き起こす飼料成分によって炎症の度合いに違いが生じ、炎症の因子としてルーメンだけでなく大腸内のデンプン濃度と LPS 濃度が関与していると言われている。今後は炎症マーカーやサイトカインの測定のほか、大腸 LPS の評価も行うことで、SARA と炎症、ADN の関係の解明につなげることができると考えられた。本研究において導かれた結論は体重変動の大小や他の炎症性疾患の影響がないことを前提としているため、今後はエネルギー収支がプラスに転じ体重変動が少ない泌乳中期や泌乳後期の乳牛において、乳房炎や運動器病等の急性炎症反応を起こしうる他の炎症性疾患の影響を除外した上で ADN と前胃液 pH の関連を調査する必要がある。また、SARA は粗濃比だけでなく飼料中繊維の物理的有効性、消化速度、ルーメン壁からの VFA 吸収速度などさまざまな要因で VFA の蓄積と唾液による緩衝作用のバランスが崩れることによって生じる。したがって、SARA の予防のためには、移行期の適切な管理と健全なルーメン発酵を維持するための栄養マネジメントが重要となる。本研究では、SARA のリスクが増大する移行期の乳牛において、高栄養価でありながら多くの繊維分を含み、消化速度が緩やかなクラフトパルプを給与することで SARA の低減効果を示すことができた。今後はクラフトパルプと置換する飼料の種類や量、乳量や乳成分に与える影響等を検討することで、SARA 低減効果を最大にするためのパルプ利用につなげることができると考えられた。また、SARA と血中 ADN 濃度の関係を解明することは、血中 ADN 濃度を指標としたクラフトパルプの給与効果と代謝改善効果の評価を可能にすると考えられた。

ウシを含む反芻類家畜の最大の利点は、ヒトが利用できない植物資源を消化・吸収して高品質なタンパク質食品を生産できる点である。増加する世界人口に対し、地球上に豊富な植物繊維から安定的に食糧資源を供給するという点にお

いて反芻類家畜の意義は非常に大きい。一方、世界的には家畜を飼養する農家戸数は年々減少する反面、一戸当たりの飼養頭数が増加し、農場の大規模化・集約化がめざましいが、日本国内の乳用牛飼養頭数は毎年減少傾向にあり、生乳生産量も同様の傾向にある。今後、日本国内の酪農業の維持・発展のためには、後継牛の確保とともに、個体の能力を最大限に発揮できる飼養管理の徹底、供用期間の延長が重要となる。乳用牛の供用期間は年々短縮傾向にあり、その理由は疾病による死亡・廃用が大部分を占める。これまで乳量増加と乳質改善を図るために濃厚飼料が多給されてきたものの、ルーメン発酵の異常は代謝性疾患や肢蹄障害に直結し、供用期間の短縮につながっている。したがって、個体の能力を引き出し、長命連産性を高くする飼養管理の鍵はルーメン発酵の健全化にあると考察される。本研究では、高泌乳牛の管理において課題となっている SARA の実態を把握するとともに、ルーメン発酵が糖・脂質代謝にかかわる ADN の血中濃度と関連していることを明らかにし、クラフトパルプ給与による SARA 低減の可能性を示した。本研究を基盤として SARA のバイオマーカーとしての ADN の有用性、SARA と代謝性疾患の関連、さらに効果的な SARA の予防・低減法など様々な研究につながっていくことが期待される。

本研究の結果は、SARA の病態解明および予防・低減法解明に寄与するものと考えられる。



## 引用文献

- Arai T, Inoue A, Takeguchi A, Mizutani H, Shimoo M, Sako T, Yoshimura I, Kimura N (2003) Comparison of enzyme activities in plasma and leukocytes in dairy and beef cattle. *J Vet Med Sci* 65:1241–1243.
- Bergmeyer HU, Bernt E (1974) Malate dehydrogenase. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods in enzymatic analysis*, Volume 2. Verlag Chemie Weinheim Academic Press, New York, pp. 613-617.
- Bramley E, Lean IJ, Fulkerson WJ, Stevenson MA et al. (2008) The definition of acidosis in dairy herds predominantly fed on pasture and concentrates. *J Dairy Sci* 91(1), 308-321.
- DeVries TJ, Dohme F, Beauchemin KA (2008) Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: Feed sorting. *J Dairy Sci* 91(10), 3958-3967.
- Dohme F, Devries TJ, Beauchemin KA (2008) Repeated Ruminal Acidosis Challenges in Lactating Dairy Cows at High and Low Risk for Developing Acidosis: Ruminal pH. *J Dairy Sci* 91, 3554-3567.
- Duffield T, Plaizier JC, Fairfield A (2004) Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 87:59-66.
- Enemark JMD (2008) The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): a review. *Vet J* 176:32–43.
- Franceschi C, Campisi J (2014) Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals of Gerontology Series A* 69, S4-9.
- Gao X, Oba M (2014) Relationship of severity of subacute ruminal acidosis to rumen fermentation, chewing activities, sorting behavior, and milk production in lactating dairy cows fed a high-grain diet. *J Dairy Sci* 97(5), 3006-3016.
- Garrett EF, Nordlund KV, Goodger WJ et al. (1997) A cross-sectional field study investigating the effect of periparturient dietary management on ruminal pH in early lactation dairy cows. *J Dairy Sci* 80 (Suppl. 1), 169.

- Goad DW, Goad CL, Nagaraja TG (1998) Ruminal microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J Anim Sci* 76:234-241.
- Gozho GN, Krause DO, Plaizier JC (2007) Ruminal lipopolysaccharide concentration and inflammatory response during grain-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows. *J Dairy Sci* 90:856–866.
- Gozho GN, Plaizier JC, Krause DO, Kennedy AD, Wittenberg KM (2005) Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J Dairy Sci* 88:1399–403.
- Grant RJ, Albright JL(1995) Feeding behaviour and management factors during the transitin period in dairy cattle. *J Anim Sci* 73:2791-2903
- Hall MB (2002) Rumen acidosis: carbohydrate feeding considerations. In: *Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Symposium on Lameness in Ruminants*, Orlando, FL, USA, pp.51-69.
- Harmon DL, Britton RA, Prior L, Stock RA (1985) Net portal absorption of lactate and volatile fatty acids in steers experiencing glucose-induced acidosis or fed 70% concentrate diet ad libitum. *J Anim Sci* 60:560-569.
- Holtenius P, Holtenius K (2007) A model to estimate insulin sensitivity in dairy cows. *Acta Vet Scand* 49:29–31.
- Hu E, Liang P, Spiegelman BM (1996) AdipoQ is a novel adipose-specific gene dysregulated in obesity. *J Biol Chem* 270:10697-10703.
- Humer E, Aschenbach JR, Neubauer V, Kröger I, Khiaosa-Ard R, Baumgartner W, Zebeli Q (2018) Signals for identifying cows at risk of subacute ruminal acidosis in dairy veterinary practice. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 102:380–392.
- Kabara E, Sordillo LM, Holcombe S, Contreas GA (2014) Adiponectin links adipose tissue function and monocyte inflammatory responses during bovine metabolic stress. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 37;49-58.

- Kaloustian HD, Stolzenbach FE, Everse J, Kaplan NO (1969) Lactate dehydrogenase of lobster (*Homarus americanus*) tail muscle. I. Physiological and chemical properties. *J Biol Chem* 244:2891–2901.
- Kato T, Goto M, Sato H (1996) Relationship between milk protein levels at an early postpartum stage and reproductive efficiency in dairy cows. *Jpn J Zootech Sci* 67(6):579-582.
- Kaufmann W, Hagemeister H, Dirksen G (1980) Adaptation to changes in dietary composition level and frequency of feeding. In: *Digestive physiology and Metabolism in Ruminants*. (Ruckebusch Y and Thivend P, eds.) MTP Press, Lancaster, 587-602.
- Khafipour E, Krause DO, Plaizier JC (2009a) A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *J Dairy Sci* 92:1060-1070.
- Khafipour E, Krause DO, Plaizier JC (2009b) Alfalfa pellet-induced subacute ruminal acidosis in dairy cows increases bacterial endotoxin in the rumen without causing inflammation. *J Dairy Sci* 92:1712-1724.
- Kimura A (2013) Studies on diagnosis and control of subacute rumen acidosis (SARA) in dairy cows using a radio transmission pH sensor. *Jpn J Large Anim Clin* 4:51–59.
- Kleen JL, Hooijer GA, Rehage J, Noordhuizen JP (2009) Subacute ruminal acidosis in Dutch dairy herds. *Vet Rec* 164:681-683.
- Kleen JL, Hooijer GA, Rehage J, Noordhuizen JPTM (2003) Subacute ruminal acidosis (SARA): a review. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 50:406–414.
- Kleen JL, Uppgang L, Rehage J (2013) Prevalence and consequences of subacute ruminal acidosis in German dairy herds. *Acta Vet Scand* 55(1): 48.
- Krehbiel CR, Britton RA, Harmon DL et al.(1995) The effects of ruminal acidosis on volatile fatty acid absorption and plasma activities of pancreatic enzymes in lambs. *J Anim Sci* 73:3111-3121.

- Krumm CS, Giesy SL, Caixeta LS, Butler WR, Sauerwein H, Kim JW, Boisclair YR. (2017) Effect of hormonal and energy-related factors on plasma adiponectin in transition dairy cows. *J Dairy Sci* 100:9418-9427.
- Li G, Barrett EJ, Barrett MO, Cao W, Liu Z (2007) Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces insulin resistance in endothelial cells via a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Endocrinology* 148:3356–3363.
- Li G, Lee P, Mori N, Yamamoto I, Arai T (2012) Long term intensive exercise training leads to a higher plasma malate/lactate dehydrogenase (M/L) ratio and increased level of lipid mobilization in horses. *Vet Res Commun* 36:149–155.
- Li S, Khafipour E, Krause DO et al. (2012) Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows. *J Dairy Sci* 95:294-303.
- Maeda M (2016) Influence of differences in rearing methods on rumen fluid pH in dairy cows. *J Vet Medicine Life Sci* 2(1):7–14.
- Maeda N, Shimomura I (2011) Obesity and adipocytokine. *J Jpn Soc Intern Medicine* 100:911–916.
- Maekawa M, Beauchemin KA, Christensen DA (2002) Effect of concentrate level and feeding management on chewing activities, saliva production, and ruminal pH of lactating dairy cows. *J Dairy Sci* 85(5):1165-1175
- Multhoff G, Molls M, Radons J (2012) Chronic inflammation in cancer development. *Frontiers in Immunology* 12, 98.
- Nagaraja TG, Titgemeyer EC (2007) Ruminal acidosis in beef cattle: The current microbiological and nutritional outlook. *J Dairy Sci* 90:E17-E38.
- Nishimura K, Kurosu K, Terada F, Mizuguchi H, Sato S, Kushibiki S (2019) Effect of wood kraft pulp feed on digestibility, ruminal characteristics, and milk production performance in lactating dairy cows. *Anim Sci J* 90:189-195.

- Nordlund KV, Garrett EF, Oetzel GR (1995) Herd-based rumenocentesis- a clinical approach to the diagnosis of subacute rumen acidosis. The Compendium X, s48-s56.
- O'Grady L, Doherty ML, Mulligan FJ (2008) Subacute ruminal acidosis (SARA) in grazing Irish dairy cows. Vet J 176:44-49.
- Ohtani Y, Takahashi T, Sato K, Ardiyanti A, Song SH, Sato R, et al. (2012) Changes in circulating adiponectin and metabolic hormone concentrations during periparturient and lactation periods in Holstein dairy cows. Anim Sci J 83:788-795.
- Ohtsuka H, Koiwa M, Hatsugaya A, Kudo K, Hoshi F, Itoh N, Yokota H, Okada H, Kawamura S (2001) Relationship between serum TNF activity and insulin resistance in dairy cows affected with naturally occurring fatty liver. J Vet Med Sci 63:1021–1025.
- Peters AR (1996) Herd management for reproductive efficiency. Anim Reprod Sci 42:455-464
- Penner GB, Beauchemin KA, Mutsvangwa T (2007) Severity of ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period. J Dairy Sci 90:365-375.
- Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, McBride BW (2008) Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. Vet J 176:21–31.
- Plaizier JC, khafipour E, Li S, Gozho GN, Krause DO (2012) Subacute ruminal acidosis (SARA), endotoxins and health consequences. Animal Feed Science and Technology 172(1-2):9-21.
- Sato S, Ikeda A, Tuchiya Y, Ikuta K, Murayama I, Kanehira M, Okada K, Mizuguchi H (2012a) Diagnosis of subacute ruminal acidosis (SARA) by continuous reticular pH measurements in cows. Vet Res Commun 36:201–205.
- Sato S, Kimura A, Anan T, Yamagishi N, Okada K, Mizuguchi H, Ito K (2012b) A radio transmission pH measurement system for continuous

- evaluation of fluid pH in the rumen of cows. *Vet Res Commun* 36:85–89.
- Sato S, Mizuguchi H, Ito K, Ikuta K, Kimura A, Okada K (2012c) Technical note: Development and testing of a radio transmission pH measurement system for continuous monitoring of ruminal pH in cows. *Prev Vet Medicine* 103:274–279.
- Schwartzkopf-Genswein KS, Beauchemin KA, Gibb DJ et al. (2003) Effect of bunk management on feeding behavior, ruminal acidosis and performance of feedlot cattle: A review. *J Anim Sci* 81:E149-E158.
- Staples CR, Thatcher WW, Clark JH (1990) Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of high producing dairy cows. *J Dairy Sci* 73:938–947.
- Stone WC (2004) Nutritional Approaches to Minimize Subacute Ruminal Acidosis and Laminitis in Dairy Cattle. *J Dairy Sci* 87:E13-E26.
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, Ito Y, Waki H, Uchida S, et al (2002) Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med* 8:1288–1295.
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, Terauchi Y, Kubota N, Hara K, et al (2001) The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipodystrophy and obesity. *Nature Med* 7:941-946.
- 小原嘉昭 (2006) ルミノロジーの基礎と応用 -高泌乳牛の栄養生理と疾病対策-. 農山漁村文化協会, 東京, pp27,50,55,190-207.
- 木田克弥 (2013) 濃厚飼料の急激な増給や粗飼料品質変動が乳牛の健康と繁殖に及ぼす影響. *畜産技術* 700:2-7
- 寺田文典 (2017) 新しい国産飼料資源としての森林資材 (チップ、パルプ) の活用～林業分野と畜産分野の新しい接点を探る～. *畜産の情報* 2017年6月号, 独立行政法人農畜産業振興機構, pp40-49.

## 謝辞

本研究を行うにあたり、懇篤なご指導とご高配を賜りました日本獣医生命科学大学基礎獣医学部門、新井敏郎教授に深く御礼申し上げます。血液生化学的検査について、測定および解析にご尽力を賜りました日本獣医生命科学大学基礎獣医学部門、川角浩准教授に深く御礼申し上げます。ルーメン pH 測定についてセンサーの提供、ご指導、ご助言を賜りました岩手大学農学部共同獣医学科、佐藤繁教授に深く御礼申し上げます。ルーメン pH 測定についてセンサーの提供、測定にご尽力を賜りました山形東亜 DKK 株式会社、水口人史氏に深く御礼申し上げます。ルーメン LPS 測定について採材のご指導、測定および解析にご尽力を賜りました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、櫛引史郎氏に深く御礼申し上げます。ルーメン VFA 測定について、測定および解析にご尽力賜りました山形県畜産試験場の職員の方々に深く御礼申し上げます。クラフトパルプの提供を賜りました日本製紙株式会社、研究開発本部の職員の方々に深く御礼申し上げます。

並びに、本研究を行うにあたり多大なご支援とご協力をいただきました山形県農業共済組合 最上家畜診療所の職員の方々、本研究に関わる各種実験およびその解析などにご尽力を賜りました日本獣医生命科学大学基礎獣医学部門の在籍教室員の方々、並びに大学院生、博士研究員、大学院研究生、教室室員の皆様に御礼申し上げます。