

黒毛和種雌肥育牛における血中脂肪酸濃度の  
推移ならびに生菌剤投与による脂肪酸代謝への  
影響

山口大学大学院共同獣医学研究科

米重 隆一

2022年9月

## 目次

主な略号一覧 .....	1
第 1 章 .....	3
序 論 .....	4
第 2 章 黒毛和種雌肥育牛における血中の各種脂肪酸濃度の推移 .....	11
1 緒論 .....	12
2 材料と方法 .....	13
3 結果 .....	15
4 考察 .....	17
5 小括 .....	20
6 図表 .....	22
第 3 章 肥育中後期の黒毛和種肥育牛への生菌剤投与が脂肪酸代謝に及ぼす影響 .....	28
1 緒論 .....	29
2 材料と方法 .....	30
3 結果 .....	31
4 考察 .....	33
5 小括 .....	35
6 図表 .....	36
第 4 章 .....	44
総合考察 .....	45

第 5 章 .....	51
結 論 .....	52
SUMMARY .....	54
謝 辞 .....	57
引用文献 .....	58

## 主な略号一覧

AA	arachidonic acid
Alb	albumin
ALA	alpha-linolenic acid
AST	aspartate aminotransferase
BHB	beta-hydroxybutyric acid
BRDC	bovine respiratory disease complex
Ca	calcium
DGLA	dihomo-gamma-linolenic acid
DHA	docosahexaenoic acid
D5D	delta-5 desaturase
D6D	delta-6 desaturase
EFA	essential fatty acid
EPA	eicosapentaenoic acid
FAs	fatty acids
FFA	free fatty acid
GGT	gamma-glutamyl transferase
iP	inorganic phosphorus
LA	linoleic acid
MA	mead acid
Mg	magnesium
MUFAs	monounsaturated fatty acids
OA	oleic acid
PA	palmitic acid
PUFAs	polyunsaturated fatty acids

SA	stearic acid
SCD1	stearoyl-CoA desaturase1
SFAs	saturated fatty acids
T·Cho	total cholesterol
TFAs	total fatty acids
TP	total protein
UFAs	unsaturated fatty acids
UN	urea nitrogen
VA	vitamin A
VE	vitamin E
$\omega$ 3 FAs	$\omega$ 3 fatty acids
$\omega$ 6 FAs	$\omega$ 6 fatty acids
$\omega$ 9 FAs	$\omega$ 9 fatty acids

# 第 1 章

## 序 論

### 1. 黒毛和種肉用牛における飼養管理と疾病発生

近年、日本の黒毛和種肉用牛農場は大規模化と集約化が進み、育成早期から濃厚飼料多給による筋間脂肪の増加を主たる目標とした飼養管理技術が普及、一般化している。このような飼養形態の中で、呼吸器疾患をはじめ肝炎や関節炎、中耳炎などの慢性炎症性疾患が年々増加傾向にあり、農業災害補償制度家畜共済統計表 ([https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/katiku\\_kyosai/index.html](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/katiku_kyosai/index.html)) によると、特に 2013 年頃から呼吸器疾患の発生増加が認められている[43](Figure1)。2018 年度の全国の肉用牛における病類別の疾患割合をみると、呼吸器疾患が 1,120,142 件中 392,890 件で 35.1%、腸炎が 329,688 件、29.4%と 2 疾病で全病傷の 64.5% を占めており、牛の診療現場ではこれらの感染症対策が喫緊の課題となっている (Figure2)。木村は、これらの増加を我が国における肉牛飼養管理の変化に伴うものと推察し、肥育牛の免疫能の低下が想定されるとしているが[27]、その後詳細な報告はみられない。呼吸器疾患を含む感染性疾患の治療には、主に多くの種類と量の抗生物質が選択され、動物医薬品検査所が発行する動物用医薬品等販売高年報 (<https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/index.html>) による各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量から、肉用牛に使用された過去 10 年間の主要な抗生物質・合成抗菌剤の原末換算量 (kg) の推移をみると、汎用抗生物質では benzylpenicillin procaine、dihydrostreptomycin sulfate、ampicillin sodium 及び florfenicol の使用量が呼吸器疾患等の増加に相応して 2014 年を境に年々増加している[42] (Figure3)。さらに、2016 年に内閣府により「薬剤耐性 (AMR) 対策アクション・プラン (2016-2020)」の中でワンヘルス・アプローチの考えから第二次選択薬としての使用が明記され、慎重使用が謳われている第 3 世代セファロスポリン系の ceftiofur sodium、cefquinome sulfate、フルオロキノロン系の enrofloxacin、marbofloxacin、orbifloxacin 及び 15 員環マクロライド系抗生物質で

ある tulathromycin の使用量は増加の一途をたどっており (Figure4)、黒毛和種肉用牛の診療現場において、これらの抗菌剤の使用量低減のための予防・治療法の改善が喫緊の課題である。

## 2. 動物体内における各種脂肪酸 (fatty acids; FAs) の役割

動物体内脂質中の多価不飽和脂肪酸 (polyunsaturated fatty acids; PUFAs) はメチル端から数えた二重結合の位置により  $\omega$ 3 系脂肪酸 ( $\omega$ 3 fatty acids;  $\omega$ 3 FAs) と  $\omega$ 6 系脂肪酸 ( $\omega$ 6 fatty acids;  $\omega$ 6 FAs) 及び一部の  $\omega$ 9 系脂肪酸 ( $\omega$ 9 fatty acids;  $\omega$ 9 FAs) に分類され、人では 1971 年に Bang ら [4] がイヌイットの疫学調査により、魚油脂質の生体に及ぼす影響を報告して以来、 $\omega$ 3 FAs のエイコサペンタエン酸 (eicosapentaenoic acid; EPA) やドコサヘキサエン酸 (docosahexaenoic acid ; DHA) の血小板凝集抑制効果、血液粘度抑制効果、中性脂質低下作用 [39]、さらに抗炎症及び抗アレルギー作用など [54] が報告されている。また、近年では  $\omega$ 3 FAs から代謝されるレゾルビン (resolvin) やプロテクチン (protectin) などに組織保護作用や好中球浸潤抑制、炎症性サイトカイン抑制など強い抗炎症効果があることがわかり、脂肪酸クオリティの多様性と病態について多くの研究成果が報告 [7,8,53,57] されている。

## 3. 黒毛和種肉用牛において脂肪酸濃度に影響を与える要因

濃厚飼料の多給は、生体内の脂質に対して量的にも質的にも影響を及ぼすものと考えられるが、これまで黒毛和種肉用牛の肥育期間中、導入から出荷までの血中 FAs 濃度の推移について明らかにした報告はみられず、日本特有の飼養方法が脂肪酸組成へ及ぼす影響は不明である。高級牛肉とされるいわゆる「霜降り肉」生産のために濃厚飼料多給が主流となっている黒毛和種肥育牛における脂肪酸動態を明らかにすることは、年々増加傾向にある呼吸器疾患をはじめ関節炎や中耳炎などの慢性炎症性疾患との関連を究明するうえで基礎となる事実を捉えることになると考えられる。



一方、現在、畜産領域で利用されているプロバイオティクスは「適正な量を摂取した時に、宿主に有益な生理作用をもたらす微生物」と定義され[14]、家畜の腸内細菌叢の平衡を維持し、動物と消費者の両方に脅威を与える病原体に対応するための効果的な方法の一つとして使用されている[30]。反芻獣に対するプロバイオティクスの利用はルーメン pH の安定により揮発性脂肪酸の生成を増加させると考えられており、効率的なルーメン機能をもたらし、微生物生態系、栄養素消化率及び飼料要求率を高めることで成長能力を向上させることや[1]、免疫系を抗炎症表現型にリダイレクトすることで、多くの有益な臨床効果をもたらすことが期待されている[20]。上野らはプロバイオティクスの投与がルーメン内微生物生態系へ影響し短鎖脂肪酸 (short-chain fatty acids; SCFAs) レベルに変化をもたらす可能性があることを報告している[62]が、これまでプロバイオティクスを黒毛和種肥育牛の中後期ステージで投与した場合の、長鎖脂肪酸 (long-chain fatty acids; LCFAs) 及び超長鎖脂肪酸 (very long chain fatty acids; VLCFAs) などの血中 FAs 濃度に及ぼす影響についての報告はない。

#### 4. 本研究について

本研究では、これらの課題解決に向けて栄養学的側面からのアプローチとして、近年人医療において抗炎症作用が注目されている体内脂質に着目し、これまでほとんど明らかにされていない黒毛和種肥育牛の血中 FAs 動態について調査し、臨床検査で汎用される血液生化学検査値との関連性を明らかにした。次に、黒毛和種雌肥育牛に対して一定期間、複合プロバイオティクス製剤の投与を行い、血中 FAs 濃度と血液生化学検査値の変化に基づき、プロバイオティクス投与が脂肪酸代謝に及ぼす影響について検討し、その有用性を検証した。

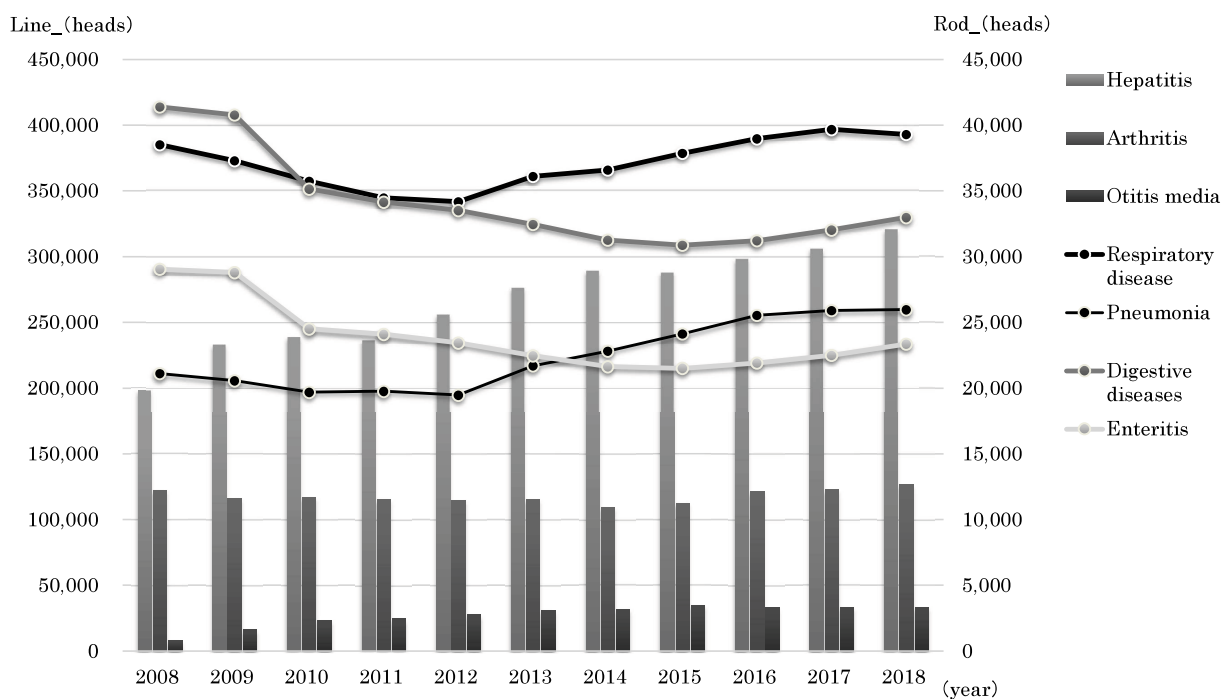


Figure1. Changes in disease outbreaks by year in Japanese Black cattle.  
 ([https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/katiku\\_kvosai/index.html](https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/katiku_kvosai/index.html))

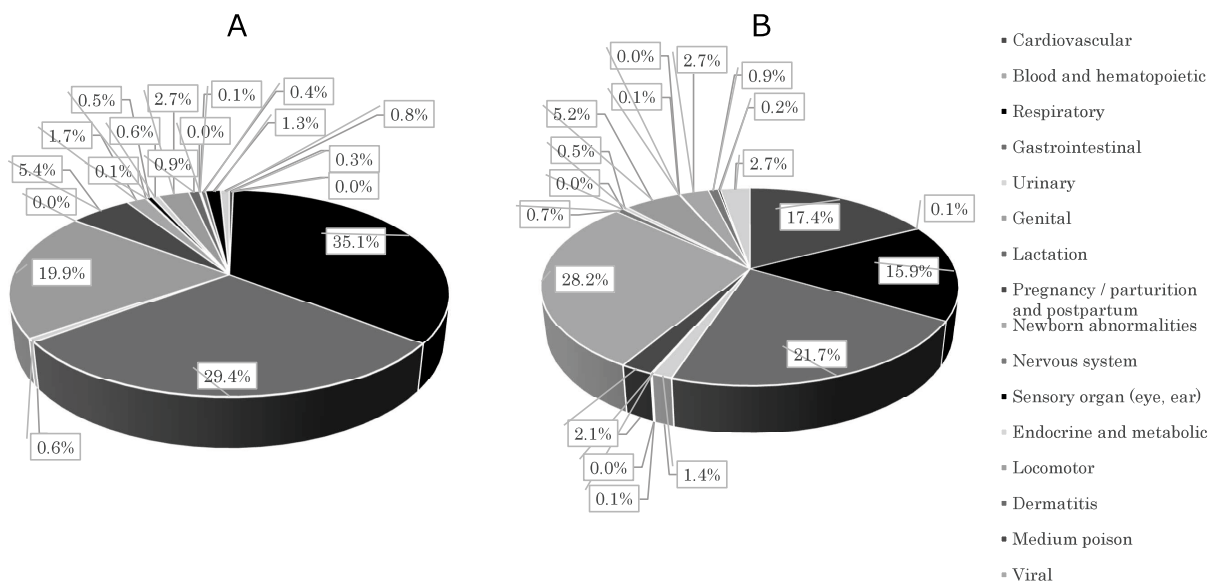


Figure2. Incidence by disease in Japanese Black cattle (2018).  
 A: Incidence rate by disease type of treated cattle, B: Incidence rate by disease type of dead / disused cattle.  
 ([https://www.maff.go.jp/i/tokei/kouhyou/katiku\\_kvosai/index.html](https://www.maff.go.jp/i/tokei/kouhyou/katiku_kvosai/index.html))

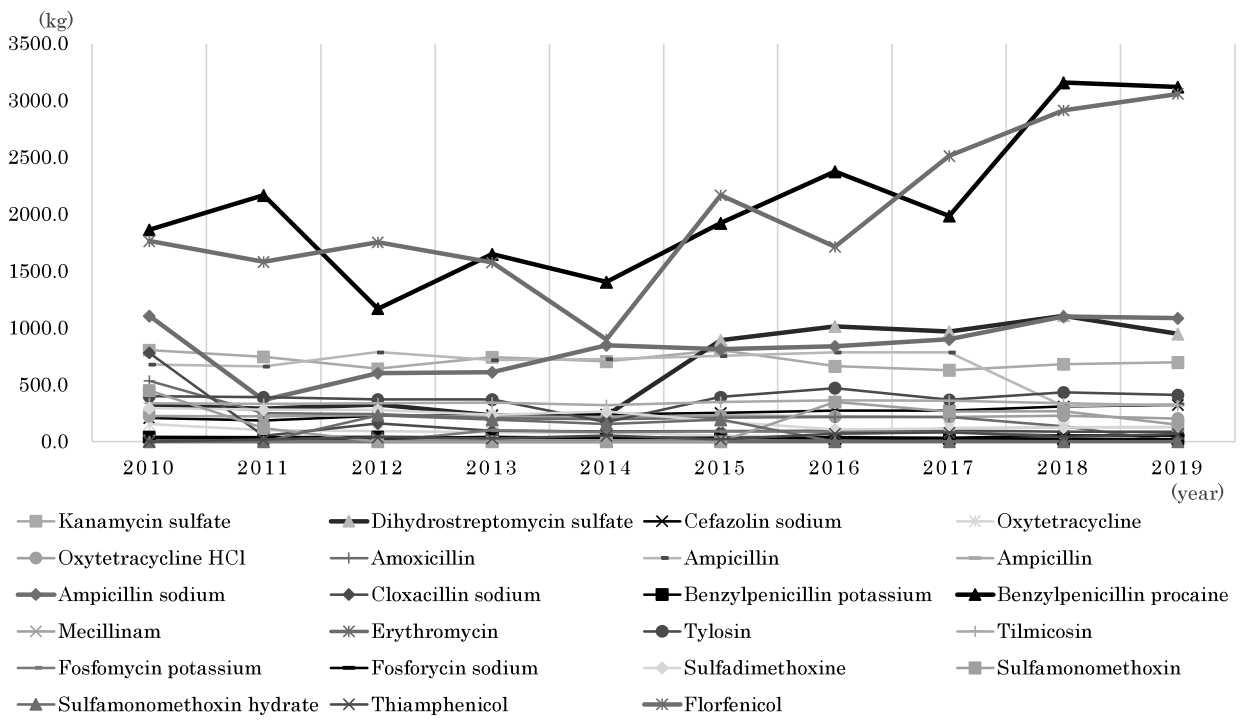


Figure 3. Changes in bulk powder equivalent (kg) of major antibiotics and synthetic antibacterial agents over the past 10 years. (<https://www.maff.go.jp/nval/ivakutou/hanbaidaka/index.html>)

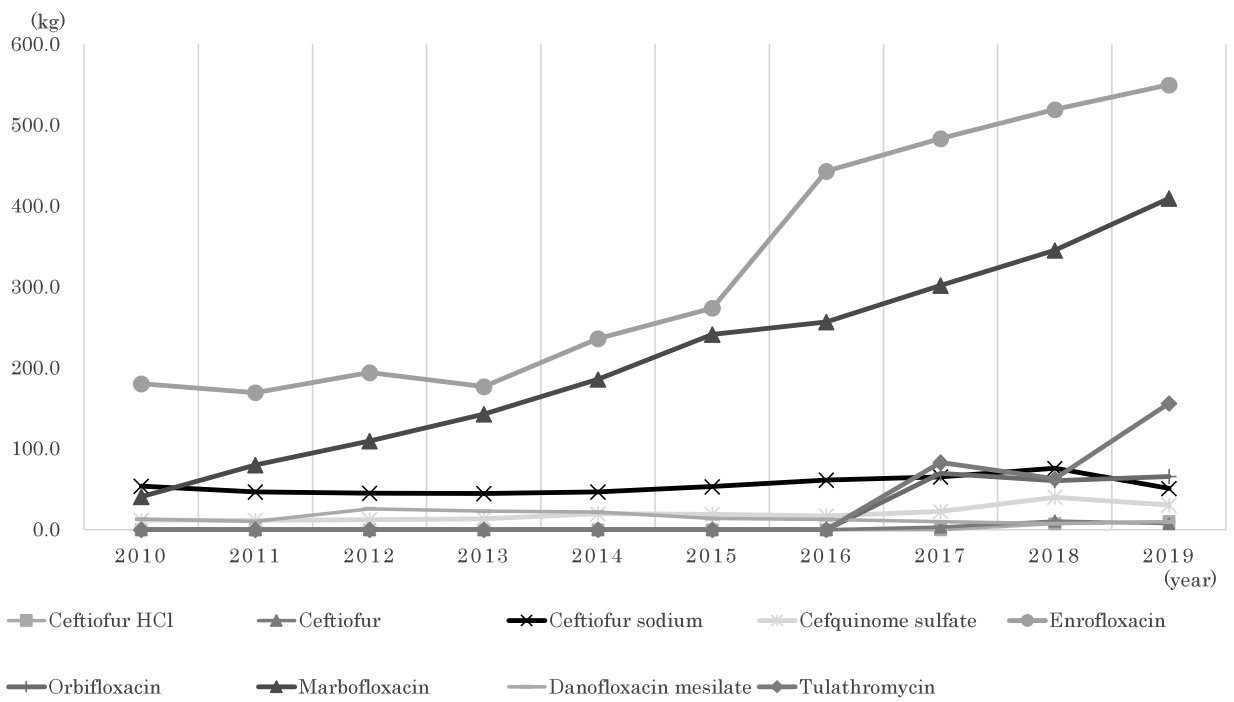


Figure4. Changes in bulk powder equivalent (kg) of 3rd generation cephalosporins, fluoroquinolones and 15-membered ring macrolide antibiotics over the past 10 years. (<https://www.maff.go.jp/nval/ivakutou/hanbaidaka/index.html>)

## 第 2 章

### 黒毛和種雌肥育牛における血中の各種脂肪酸濃度の推移

## 1. 緒論

脂質は生体膜成分、エネルギー源、シグナル分子として様々な機能を有し、中でも分子中に二重結合を含む PUFAs の多くは、酵素的な酸化反応によって生理活性を獲得し、脂質メディエーターとして重要な機能を果たしている[7,57]。しかし、この PUFAs の中で  $\omega$ 6 FAs 及び  $\omega$ 3 FAs の初発脂肪酸であるリノール酸(linoleic acid; LA)と  $\alpha$ -リノレン酸(alpha-linolenic acid; ALA)は哺乳動物自身では生合成できないため、植物などに由来するこれらの脂肪酸を食餌として摂取しなければならず必須脂肪酸(essential fatty acid; EFA)と呼ばれている。摂取された EFA ならびに動物自身で合成しうるオレイン酸(oleic acid; OA)は関与する酵素とその作用順序が類似した経路により代謝され機能を発揮する[3]。

生体の脂肪酸組成や濃度は、摂取される食餌に強く影響を受け、脂質組成の遷移による生体膜構造の変化は、反芻胃の健康状態、子宮内環境、免疫機構、酸化ストレス状態や内分泌シグナルに影響すると考えられている[56]。牛の飼養形態において粗飼料多給型の放牧飼養の牛では筋肉脂肪酸組成における  $\omega$ 3 FAs が増加し、逆に穀類多給の飼養では  $\omega$ 6 FAs の増加が認められ、これらは畜産物となっても維持されるため人間の健康への潜在的な影響も懸念されている[13]。また、黒毛和種牛はホルスタイン種や褐毛和種、あるいはシャロレー種よりも高濃度の一価不飽和脂肪酸(monounsaturated fatty acids; MUFAs)を含む枝肉脂質を生成する遺伝的素因を持っていることが示唆されており[70]、近年では食味性向上に関連すると報告されている OA や MUFAs の割合が枝肉評価の 1 基準として注目され[11,29,33]、給与飼料や添加剤の投与が体脂肪酸組成に及ぼす影響についていくつかの報告がされている[12,16,68]。しかし、穀類多給が黒毛和種肥育牛の血中 FAs 濃度に及ぼす影響について詳細に検討した報告は少ない。さらに、濃厚飼料を多給する黒毛和種肥育牛の場合、免疫障害の主な原因としてビタミン A(vitamin A; VA)欠乏やルーメンアシドーシス

による免疫系細胞への影響などが報告されているが[27,31,66]、血中 FAs 濃度と VA を含めた血液生化学検査値との関連性について検討した報告もみられない。

本章では、慣行的な濃厚飼料を多給する飼養法により管理されている黒毛和種雌肥育牛を用いて、肥育ステージに沿って血中の各種 FAs 濃度を測定し、その推移を調査するとともに、牛臨床現場で汎用される血液生化学検査値との関連性を明らかにした。

## 2. 材料と方法

### 2.1 調査期間及び供試牛

2014年8月～2017年7月の期間に、1肥育農場で飼養されていた臨床的に健康な黒毛和種雌肥育牛延べ120頭を供試した。供試牛は、乙丸ら[46]の方法に準じて肥育ステージにより肥育前期(early fattening stage; 9～13カ月齢: 25頭)、肥育中前期(early middle stage; 14～16カ月齢: 32頭)、肥育中後期(late middle stage; 17～19カ月齢: 32頭)、肥育後期(late stage; 20～23カ月齢: 16頭)、仕上げ期(finishing; 24～30カ月齢: 15頭)に分類した。

供試牛の頸静脈より血清分離用真空採血管(ベノジェクトII VP-H100K、テルモ(株)、東京)を用いて採血し、遮光下で2～3時間常温に静置したのち、3,000rpmで20分間遠心して血清を分離し、測定日まで-60℃で保存した。

### 2.2 給与飼料の概要

調査期間に給与した飼料の1日給与量をTable1に、濃厚飼料の成分をTable2に示した。粗飼料には稲わら、オーツヘイ、アルファルファヘイキューブを使用し、濃厚飼料は肥育ステージに合わせて自動給餌装置を使用して給与量が計測され、肥育期間を通じて規定量を不断給餌するとともに自由飲水とした。



## 2.3 血清全脂質中脂肪酸濃度の測定

血清を分離後ただちに検査施設((株)クリニカルパソロジーラボラトリー、鹿児島)へ搬入し、小沢ら[48]の方法に準じて測定した。検体は分注した後、誘導体化試薬(国産化学(株)、東京)及び内部標準溶液(国産化学(株)、東京)を添加し、攪拌及び加熱することにより、血清サンプル中の脂質を誘導体化した。次に、NaOHとn-ヘキサン(国産化学(株)、東京)を添加して振盪後、遠心分離して上層をサンプルチューブに分注した。調製したサンプルは、シス-トランスFA分離用のGCキャピラリーカラム(TC-70、ジーエルサイエンス(株)、東京)を使用してガスクロマトグラフィー(GC-2010、株島津製作所、京都)で測定した。全血清脂質中の24分画FAs濃度は、データ処理装置(C-R7A、株島津製作所、京都)を使用して計算した。

本研究では、飽和脂肪酸(saturated fatty acids; SFAs)としてパルミチン酸(palmitic acid; PA)、ステアリン酸(stearic acid; SA)、MUFAsとしてOA、 $\omega$ 6 FAsとしてLA、ジホモ- $\gamma$ -リノレン酸(dihomo- $\gamma$ -linolenic acid; DGLA)及びアラキドン酸(arachidonic acid; AA)、 $\omega$ 3 FAsとしてALA、EPA及びDHAを分析対象とし、また、EPA/AAと $\omega$ 6/ $\omega$ 3の比率を算出した。さらに第一章ではWarensjöら[65]の方法によりステアロイル CoA デサチュラーゼ 1(stearoyl-CoA desaturase 1; SCD1; =OA/SA)、D6D(delta-6 desaturase; =DGLA/LA)、D5D(delta-5 desaturase; =AA/DGLA) について推定不飽和化酵素活性を算出し、それぞれ血液生化学検査値との関連性を調べた。

## 2.4 血液生化学検査及びVA、ビタミンE(vitamin E; VE)の測定

血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(aspartate aminotransferase; AST)、 $\gamma$ -グルタミルトランスフェラーゼ( $\gamma$ -glutamyl transferase; GGT)、尿素窒素(urea nitrogen; UN)、総蛋白(total protein; TP)、アルブミン(albumin; Alb)、総コレステロール(total cholesterol; T-Cho)、カルシウム(calcium; Ca)、無機リン

(inorganic phosphorus; iP)、遊離脂肪酸(free fatty acid; FFA)、マグネシウム(magnesium; Mg)及びβヒドロキシ酪酸(beta-hydroxybutyric acid; BHB)について自動分析装置(7180型、(株)日立ハイテクフィールディング、東京)を用いて測定した。

血清VA及びVEの測定は、高速液体クロマトグラフィー法(高速液体クロマトグラフLC-2000、日本分光(株)、東京)により測定した。

## 2.5 統計学的解析

検査データはステージ毎に血中FAs濃度及び血液生化学検査値を平均±標準偏差として示した。検査値のステージ別平均値の推移の比較には一元配置分散分析により有意性を確認してBonferoniの方法による多重比較検定を行い、肥育前期を対照群として濃厚飼料が多給される以後の肥育ステージの検査値と比較検討した。また、各脂肪酸濃度及び推定不飽和化酵素活性と血液生化学検査値についての関連性はPearsonの相関分析を用いて検定し、いずれの検定結果も危険率5%未満を有意差ありと判定した。なお、全ての統計学的解析にはEZR(<http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmed.html>) [25]を使用した。

## 3. 結果

### 3.1 全脂質中脂肪酸濃度の測定結果

全脂質中脂肪酸濃度の測定結果をTable3に示した。PAは前期で163.9µg/mlと低値であったが、中前期以降は有意に増加し270µg/ml前後で推移した。SAも同様に前期で211.7µg/mlであったものが、中前期以降400µg/ml前後に有意に増加した。ω9 PUFAsに含まれるMUFAsであるOAは、肥育前期126.4µg/mlで肥育経過とともに徐々に増加し、仕上げ期で174.2µg/mlと有意に増加した。ω6 FAsの一つであるLAは、肥育前期において428.7µg/mlと低値であったが、濃厚飼料の給与量が

増加した中前期より有意に上昇し、総脂肪酸(total fatty acids; TFAs)に対する比率も50%以上で推移し、仕上げ期では1118.5 $\mu\text{g}/\text{mI}$ となった。DGLAは肥育前期で25.5 $\mu\text{g}/\text{mI}$ であり、中前期で47.3 $\mu\text{g}/\text{mI}$ と倍増して仕上げ期までその濃度を維持した。一方、AAは肥育前期の53.8 $\mu\text{g}/\text{mI}$ から中前期では60.5 $\mu\text{g}/\text{mI}$ と若干増加したものの有意差は認められず、中後期以降は肥育中前期と同程度の値で推移した。 $\omega 3$  FAsのALAは肥育前期で39.2 $\mu\text{g}/\text{mI}$ であったものが、中前期では31.3 $\mu\text{g}/\text{mI}$ と有意に低下した。その後は肥育後期で40.0 $\mu\text{g}/\text{mI}$ まで一旦上昇したが、仕上げ期では31.2 $\mu\text{g}/\text{mI}$ へと再び低下した。EPAは肥育前期には5.9 $\mu\text{g}/\text{mI}$ であったが、中前期には3.2 $\mu\text{g}/\text{mI}$ と有意に低値となり、仕上げ期まで低値のままであった。DHAは肥育前期で2.7 $\mu\text{g}/\text{mI}$ であったものが中前期には1.4 $\mu\text{g}/\text{mI}$ まで有意に低下し、仕上げ期に若干上昇したものの低値で推移した。EPA/AA比は肥育前期で0.11、中前期以降は有意に低下し0.05で推移した。一方、 $\omega 6/\omega 3$ 比は肥育前期で9.6であったが、中前期で26.7と有意な上昇を認め、その後仕上げ期まで高値で推移した。SCD1は肥育前期で0.63であったが、中前期で0.33と有意な低下を認め、仕上げ期では0.42と若干の上昇がみられた。D6D及びD5D活性は、いずれも肥育前期と比較して中前期以降で有意に低下した。

### 3.2 血液生化学検査

血液生化学検査の結果をTable4に示した。血清AST値は肥育前期で67.5IU/Iであったが、中前期では85.2IU/Iとやや高値を示し、肥育中後期では92.3IU/Iと有意な高値となった。血清GGT値は肥育前期では16.2IU/Iであったが、中前期で25.1IU/Iと有意に高値を示し、その後も高値で推移した。血清UN値は肥育前期では9.9mg/dIであったが、中前期～後期で16.2～17.3mg/dIと有意に高値となった。血清TP値は前期では6.6g/dIであったが、中後期で7.0g/dIと有意に高値となり、その後も高値で推移した。血清Alb値及び血清T-Cho値は肥育前期で3.1g/dI及び

87.0mg/dIとやや低値であったが、中前期でそれぞれ 3.5g/dI 及び 166.3mg/dI と有意に上昇し、その後も高値で推移した。血清 iP 値及び血清 VA 値は肥育前期ではそれぞれ 8.1mg/dI と 85.3IU/dI であったが、肥育ステージが進むにつれて低下し、中後期で 7.3mg/dI と 68.9IU/dI と有意な低値となった。血清 VE 値は肥育前期では 87.1µg/dI と低値であったが、中前期は 319.7µg/dI と有意に高値になり、仕上げ期で 491.2µg/dI と最も高値であった。

### 3.3 脂肪酸と血液生化学検査値の相関

脂肪酸と血液生化学検査値の相関係数を Table5 に示した。PA 及び SA は UN、Alb、A/G (Alb/(TP-Alb))、T-Cho、Mg、VE との間で有意な正の相関がみられ、OA は FFA、VE との間で正の相関を認めた。ω6 FAs では LA と DGLA が UN、Alb、A/G、T-Cho、Mg、VE との間で正の相関がみられ、AA は T-Cho との間に弱い正の相関( $r=0.465$ )がみられたが、LA ( $r=0.984$ ) や DGLA ( $r=0.804$ ) は T-Cho との間で高い正の相関関係を認めた。ω3 FAs の EPA は GGT、UN、TP、Alb、VE との間で、DHA は UN、T-Cho、VE との間でそれぞれ負の相関を認めた。EPA/AA 比は GGT、UN、Alb、T-Cho、Mg、VE との間で負の相関がみられ、ω6/ω3 比は UN、Alb、T-Cho、Mg、VE との間で正の相関を認めた。SCD1 及び D5D は UN、Alb、A/G、T-Cho、Mg、VE と有意な負の相関がみられたが、SCD1 と FFA との間では逆に正の相関を認めた。D6D は GGT、TP、T-Cho、VE との間で負の相関を認めた。

## 4. 考察

牛において、飼料中の脂質はルーメン内微生物により加水分解された後、不飽和脂肪酸 (unsaturated fatty acids; UFAs) は水素添加されて SFAs になり、小腸で吸収される[49,58]。しかし、飼料中の UFAs 含量が多く、ルーメン内水素添加能力を超過する場合には、一部は飽和化されずに体脂肪に移行し、蓄積脂肪の脂肪酸組成に

影響する可能性があり[34]、これまでも UFAs を多く含む飼料を給与することで飼料中の UFAs を体脂肪に蓄積させる試みがなされてきたが[11,33,68]、明確な効果は得られていない。本研究の検査によって得られた血中 FAs 濃度は、消化管から吸収され変化を受けずに蓄積された外因性の脂肪酸と体内で合成された内因性の高級脂肪酸の両方から成立していると考えられ、その割合は不明である。しかし、現在、体重増加と脂肪交雑の向上を目的とした、日本で慣行的に行われている出生後の早い時期からの濃厚飼料給与は、同時に体内の脂肪酸組成に多大な影響を与えていると考えられる。

脂肪酸は、哺乳動物の重要なエネルギー源であると同時に生体膜の主要な構成成分として生体の恒常性維持に必須の栄養素であり、その代謝物は免疫応答など様々な生理活性を有している[7,8,22]。牛における脂肪酸と生体機能の関連については、繁殖性に関する知見として、バイパス処理化された多価不飽和脂肪酸の適切な給与が卵胞の発育、卵子・胚品質ならびに耐凍性に影響を与え、繁殖に関わるステロイドホルモンやエイコサノイドの産生を促進させるとの報告[51,56]をはじめ、体外受精卵の発生率の改善[15]、 $\omega 3$  FAs 補給による卵子の分割率の増加[69]、リノール酸アルブミン (linoleic acid-Albumin: LAA) の培地添加による耐凍性増強効果[19]などが報告されている。また、肉用牛では枝肉評価の 1 基準として筋肉中の脂肪酸組成、特に OA 含有率が注目され、SCD 遺伝子型の発現と脂肪細胞分化や脂肪交雑の関連などが報告されており[12,18,32]、Smith らは穀物の給餌は肉用牛の脂肪生成を刺激するのに対し、牧草の給餌は筋肉内脂肪組織を含む脂肪組織の発達を抑制し、脂肪細胞の分化を抑制するような飼養方法の試行は MUFAs の合成を制限すると報告している[55]。

今回の研究で、肥育前期において低値であった LA は、濃厚飼料の給与量が増加した中前期より有意に上昇し高値を維持した。Eric らは長期間穀物を給与した肥育牛の筋肉中脂肪酸は  $\omega 6$  FAs 比率が上昇すると報告しており[13]、今回の  $\omega 6$  FAs 中の LA 及び DGLA の増加は濃厚飼料の多給が主な要因と考えられた。

一方、今回の研究では血小板活性化因子 (platelet-activating factor; PAF)、プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなど脂質メディエーターと総称される炎症性エイコサノイドが生成されるアラキドン酸カスケードの基点となる  $\omega 6$  FAs ファミリーである AA[7,38,59]については、中前期で若干増加を認めたものの、肥育期間を通してほぼ同様の値で推移し、濃厚飼料の多給が必ずしも AA の増加を招くことはないことが示された。中前期以降で D5D と D6D 活性の低下が認められたことから、これらの不飽和化酵素活性の低下が LA 濃度上昇と AA 濃度変化が一致しない 1 要因と考えられた。また、Trevisiらは乳牛の移行期におけるルーメンバイパス処理された  $\omega 3$  FAs 製剤の投与により、無症状の炎症の影響を弱め、エネルギーバランスを改善したことを報告し、アラキドン酸誘導体、炎症促進性メディエーターの形成が減り、炎症の始まりに対抗する可能性を示唆しており[59]、今回の研究において生後 20~22 カ月齢で給与された日量 500g のアルファルファヘイキューブが、肥育後期以降の AA 濃度上昇に抑制的に作用したのかもしれない。

血中 FAs 濃度と血液生化学検査値との関連性について、T-Chol は SFAs 及び  $\omega 6$  FAs との間で強い正の相関が認められたが AA との相関はやや弱く、ALA 以外の  $\omega 3$  FAs 及び不飽和化酵素活性とは負の相関を認めた。また、T-Chol は VE との間でも強い有意な正の相関( $r=0.838$ )がみられた。肥育開始後高値で推移した VE は  $\omega 3$  FAs が組織に組み込まれるまでその保護作用を発揮し、さらに炎症誘発性サイトカイン合成の減少に寄与する作用を有することから[59]、肥育牛においては  $\omega 6/\omega 3$  比が高い状態でも脂質機能の質的均衡が保たれているのかもしれない。FFA は  $\omega 9$  FAs(OA)、SCD1 との間で正の相関を認めた。FFA は乳牛において負のエネルギーバランス状態で体脂肪動員の結果として増加することが知られているが[63]、FFA の構成脂肪酸として体脂肪中に蓄積された OA との関連性については不明な点も多く、さらに検討が必要である。

本研究により、日本で一般的に普及している飼養方法で管理された黒毛和種雌肥育牛の肥育期間中における血中 FAs 動態の詳細が明らかとなった。肥育経過とともに LA の上昇、EPA の低下を伴う  $\omega 6/\omega 3$  比の上昇が観察されたが、その一方で、炎症性エイコサノイドの基点となる AA の有意な上昇は認められず、黒毛和種雌肥育牛においては  $\omega 6/\omega 3$  比が高い状態でも脂質機能の質的均衡が概ね保たれている可能性が示唆された。しかし、肥育経過に伴う EPA の低下から、軽微な飼養管理の失宜により脂質バランスが破綻する可能性も危惧されることから、肥育期間中の全期を通じた安定的な脂質バランスの維持が必要であると考えられた。

## 5. 小 活

近年、日本の黒毛和牛農場は大規模化、高密度化が進み、生後早期から濃厚飼料多給による霜降り牛肉の生産が行われている。その結果、呼吸器疾患、関節炎、中耳炎などの慢性炎症性疾患が増加し、特殊な飼養による免疫力低下が推測される。本研究では、個体の免疫に重要な役割を持つ 3 大栄養素の一つである脂質に注目し、生後 9 ～ 30 カ月の黒毛和種肥育雌牛 120 頭を供試牛として、血中脂肪酸の推移を調査するとともに牛臨床現場で汎用される血液生化学検査値との関連性を明らかにすることを目的として肥育ステージに沿って血中の各種 FAs 濃度を測定し、血液生化学検査を実施した。

$\omega 6$  FAs の LA は肥育中前期で有意に増加し、仕上げ期まで高値を維持したが、AA はほとんど変化がなく推移した。一方、 $\omega 3$  FAs の EPA は肥育中前期以降有意な減少を示し、 $\omega 6/\omega 3$  比の上昇が明らかになった。血中 FAs 濃度と血液生化学検査値との関連性について、T-Cho は SFAs 及び  $\omega 6$  FAs との間で強い正の相関が認められたが AA との相関はやや弱く、ALA 以外の  $\omega 3$  FAs 及び不飽和化酵素活性とは負の相関を認めた。また、T-Cho は VE との間でも強い有意な正の相関がみられた。

以上の結果、日本で一般的に普及している飼養方法で管理された黒毛和種雌肥育牛の肥育期間中における血中 FAs 動態の詳細が明らかとなった。



6. 図表

Table1. Feeding amount in the fattening period.

Fattening stage	early fattening stage <sup>2</sup>					early middle stage			late middle stage			late stage				finishing														
Age after birth (M)	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30								
Rice straw (saturated)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1								
Basic concentrated feed					5.5	5.5	6.5	7.5	9	9	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	8	7	6	5	4	4			
Concentrated feed for previous period		1	2	3	4	5																								
Concentrated feed for later period																							1	1	2	3	3	3	3	3
Haycube	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2													0.5	0.5						
Oat hay	2	2	2	2	2	2	2																							

<sup>1</sup> Feed amount of daily / head (kg). <sup>2</sup> Stage classification by age after birth. early fattening stage: 9~13M, early middle stage: 14~16M, late middle stage: 17~19M, late stage: 20~23M, finishing: 24~30M.

↔ : Arrow period same amount.

Table2. Components of the concentrated feed used.

Feed name	Concentrated feed for previous period		Basic concentrated feed		Concentrated feed for later period	
Crude protein %		16.0 $\geq$		13.0 $\geq$		8.0 $\geq$
Crude fat %		2.0 $\geq$		2.0 $\geq$		3.0 $\geq$
Crude fiber %		8.0 $\geq$		8.0 $\geq$		8.0 $\geq$
Coarse ash %		8.0 $\leq$		8.0 $\leq$		8.0 $\leq$
calcium %		0.40 $\geq$		0.05 $\geq$		0.01 $\geq$
Phosphorus %		0.30 $\geq$		0.20 $\geq$		0.20 $\geq$
TDN %		72.0 $\geq$		72.0 $\geq$		76.0 $\geq$
Raw material name, etc.	Mixing ratio (%)	Raw material name <sup>1</sup>	Mixing ratio (%)	Raw material name	Mixing ratio (%)	Raw material name
cereal	52.0	Heat-treated corn corn flour	67.0	Heat-treated corn corn wheat Heat-treated barley Heat-treated soy	96.0	Heat-treated barley corn barley, brown rice Heat-treated soy
bran	24.0	Bran Corn gluten feed	24.0	Bran (Corn gluten feed) <sup>2</sup>	1.0	Bran
Vegetable oil residue	18.0	Soybean meal Rapeseed oil meal	7.0	Soybean meal		
others	6.0	Molasses, calcium carbonate Salt, Petrified seaweed Saccharomyces Servisier yeast Alfalfa meal	2.0	Alfalfa meal Calcium phosphate Salt, Saccharomyces Servisier yeast (calcium carbonate) <sup>2</sup>	3.0	Molasses (sugar) <sup>2</sup>

<sup>1</sup> In principle, the raw material names are shown in descending order of blending ratio. <sup>2</sup>( ) Raw materials in parentheses may not be used due to changes in raw material procurement.

Table3. Concentration of blood fatty acids at the fattening stage.

Fattening stage	early fattening stage <sup>1</sup>		early middle stage		late middle stage		late stage		finishing	
	n = 25		n = 32		n = 32		n = 16		n = 15	
TFAs <sup>2</sup> (µg/ml)	1130.5 ±	196.0	2018.2 ±	394.1 **	2163.6 ±	409.9 **	2189.3 ±	328.1 **	2220.3 ±	236.9 **
SFAs (µg/ml)	394.9 ±	54.5	649.7 ±	118.7 **	701.3 ±	132.3 **	705.9 ±	102.8 **	726.3 ±	56.5 **
PA	163.9 ±	24.5	250.2 ±	43.9 **	270.1 ±	46.6 **	269.3 ±	35.0 **	279.9 ±	24.5 **
SA	211.7 ±	35.8	371.0 ±	73.4 **	399.7 ±	84.0 **	404.9 ±	66.5 **	414.8 ±	36.3 **
MUFAs (µg/ml)	145.8 ±	35.0	141.4 ±	16.9	160.2 ±	31.5	170.0 ±	34.2	204.5 ±	35.9 **
ω9 FAs	134.8 ±	31.8	128.4 ±	14.7	145.9 ±	28.7	154.0 ±	31.2	184.3 ±	31.3 **
OA	126.4 ±	30.3	120.0 ±	14.6	137.1 ±	27.7	145.8 ±	30.0	174.2 ±	30.0 **
PUFAs (µg/ml)	589.8 ±	157.6	1227.2 ±	275.1 **	1302.2 ±	267.8 **	1313.4 ±	227.3 **	1289.5 ±	168.3 **
ω6 FAs	530.9 ±	152.6	1181.8 ±	267.4 **	1257.4 ±	259.2 **	1263.1 ±	220.1 **	1246.7 ±	163.0 **
LA	428.7 ±	136.4	1041.4 ±	249.2 **	1122.0 ±	233.7 **	1134.6 ±	192.9 **	1118.5 ±	154.6 **
DGLA	25.5 ±	6.2	47.3 ±	13.7 **	48.0 ±	14.0 **	45.0 ±	15.7 **	46.2 ±	7.7 **
AA	53.8 ±	15.8	60.5 ±	12.5	56.8 ±	14.7	55.2 ±	11.3	57.7 ±	10.2
ω3 FAs	56.9 ±	13.5	44.3 ±	8.8 **	44.0 ±	9.1 **	49.5 ±	8.6	41.7 ±	5.8 **
ALA	39.2 ±	10.5	31.3 ±	6.8 **	33.1 ±	7.4 *	40.0 ±	7.4	31.2 ±	4.6 *
EPA	5.9 ±	1.9	3.2 ±	0.8 **	2.7 ±	0.8 **	2.8 ±	0.7 **	2.9 ±	0.9 **
DHA	2.7 ±	1.5	1.4 ±	0.5 **	1.2 ±	0.3 **	1.2 ±	0.3 **	1.7 ±	0.6 **
EPA/AA ratio <sup>3</sup>	0.11 ±	0.03	0.05 ±	0.01 **	0.05 ±	0.01 **	0.05 ±	0.01 **	0.05 ±	0.01 **
ω6/ω3 ratio	9.6 ±	3.0	26.7 ±	2.9 **	28.7 ±	2.2 **	25.7 ±	2.9 **	30.0 ±	1.9 **
SCD1(D9D) <sup>1</sup>	0.63 ±	0.27	0.33 ±	0.06 **	0.35 ±	0.05 **	0.36 ±	0.07 **	0.42 ±	0.07
D6D <sup>5</sup>	0.06 ±	0.01	0.05 ±	0.01 **	0.04 ±	0.01 **	0.04 ±	0.01 **	0.04 ±	0.01 **
D5D <sup>6</sup>	2.21 ±	0.75	1.39 ±	0.55 **	1.22 ±	0.24 **	1.32 ±	0.37 **	1.26 ±	0.19 **

The values are expressed mean  $\pm$  SD. \*P<0.05, \*\*P<0.01 vs early fattening stage. <sup>1</sup> early fattening stage: 9~13M, early middle stage: 14~16M, late middle stage: 17~19M, late stage: 20~23M, finishing: 24~30M. <sup>2</sup> TFAs: total fatty acids, SFAs: saturated fatty acids, MUFAs: monounsaturated fatty acids, PUFAs: polyunsaturated fatty acids, PA: palmitic acid (16:0), SA: stearic acid (18:0), OA: oleic acid (18:1 $\omega$ -9), LA: linoleic acid (18:2 $\omega$ -6), ALA: alpha-linolenic acid (18:3 $\omega$ -3), DGLA: dihomo- gamma-linolenic acid (C20:3 $\omega$ 2-6), AA: arachidonic acid (20:4 $\omega$ -6), EPA: eicosapentaenoic acid (20:5 $\omega$ -3), DHA: docosahexaenoic acid (22:6 $\omega$ -3).

<sup>3</sup> EPA/AA ratio = eicosapentaenoic acid / arachidonic acid,  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 ratio =  $\omega$ 6 FAs /  $\omega$ 3 FAs. <sup>4</sup> SCD1 (stearoyl-CoA desaturase)=OA/SA,

<sup>5</sup> D6D(delta-6 desaturase)=DGLA/LA, <sup>6</sup> D5D(delta-5 desaturase)=AA/DGLA

Table4. Blood biochemical test values at the fattening stage.

	early fattening stage <sup>1</sup>		early middle stage		late middle stage		late stage		finishing	
	n = 25		n = 32		n = 32		n = 16		n = 15	
Average age(Month)	10.0 ± 0.8		14.6 ± 0.7 **		18.0 ± 0.7 **		20.5 ± 0.6 **		25.4 ± 0.7 **	
AST <sup>2</sup> (IU/l)	67.5 ± 38.0		85.2 ± 34.4		92.3 ± 29.8 *		84.2 ± 30.5		81.3 ± 12.6	
GGT (IU/l)	16.2 ± 7.1		25.1 ± 11.3 **		29.6 ± 9.0 **		30.2 ± 13.8 **		22.3 ± 5.1	
UN (mg/dl)	9.9 ± 3.3		16.2 ± 2.7 **		16.5 ± 2.1 **		17.3 ± 3.1 **		11.3 ± 2.0	
TP (g/dl)	6.6 ± 0.4		6.8 ± 0.5		7.0 ± 0.3 **		7.3 ± 0.5 **		7.3 ± 0.4 **	
Alb (g/dl)	3.1 ± 0.2		3.5 ± 0.3 **		3.6 ± 0.2 **		3.5 ± 0.2 **		3.7 ± 0.2 **	
A/G	0.9 ± 0.2		1.1 ± 0.2 **		1.1 ± 0.1 **		0.9 ± 0.1		1.1 ± 0.1	
T-Cho (mg/dl)	87.0 ± 19.5		166.3 ± 33.0 **		170.0 ± 33.4 **		172.7 ± 26.8 **		171.1 ± 23.6 **	
Ca (mg/dl)	9.5 ± 0.4		9.3 ± 0.3		9.3 ± 0.3		9.5 ± 0.2		9.3 ± 0.4	
iP (mg/dl)	8.1 ± 1.1		7.8 ± 0.8		7.3 ± 0.8 **		6.9 ± 0.7 **		7.1 ± 1.0 *	
VA (IU/dl)	85.3 ± 21.0		82.5 ± 23.8		68.9 ± 17.9 *		44.9 ± 9.0 **		53.3 ± 13.7 **	
VE (µg/dl)	87.1 ± 31.3		319.7 ± 97.9 **		370.8 ± 86.2 **		346.2 ± 75.7 **		491.2 ± 113.4 **	
FFA (mEq/l)	193.3 ± 122.4		121.7 ± 34.2 **		168.6 ± 66.9		171.8 ± 57.1		220.4 ± 82.8	
Mg (mg/dl)	2.1 ± 0.2		2.4 ± 0.3 **		2.5 ± 0.3 **		2.3 ± 0.2		2.3 ± 0.2	
BHB (µmol/l)	344.7 ± 181.6		280.7 ± 51.3		266.5 ± 64.1 *		286.8 ± 78.8		252.7 ± 50.0	

The values are expressed mean ± SD. \*P<0.05, \*\*P<0.01, vs early fattening stage. <sup>1</sup> early fattening stage: 9~13M, early middle stage: 14~16M, late middle stage: 17~19M, late stage: 20~23M, finishing: 24~30M. <sup>2</sup> AST: aspartate aminotransferase, GGT: gamma-glutamyl transferase, UN: urea nitrogen, TP: total protein, Alb: albumin, A/G: Alb/(TP-Alb), T-Cho: total cholesterol, Ca: calcium, iP: inorganic phosphorus, VA: vitamin A, VE: vitamin E, FFA: free fatty acid, Mg: magnesium, BHB: beta-hydroxybutyric acid.

Table5. Correlation between blood fatty acids, SCD activity and Blood biochemical test values.

	SFAs		ω9 FAs		ω6 FAs			ω3 FAs			EPA/AA ratio <sup>2</sup>	ω6/ω3 ratio	SCD1 <sup>3</sup>	D6D <sup>4</sup>	D5D <sup>5</sup>
	PA <sup>1</sup>	SA	OA	LA	DGLA	AA	ALA	EPA	DHA						
AST	0.209 *	0.163	0.070	0.235 **	0.058	0.025	-0.114	-0.333 ***	-0.239 **	-0.349 ***	0.274 **	-0.187 *	-0.318 ***	-0.082	
GGT	0.311 ***	0.307 ***	0.142	0.346 ***	0.076	-0.048	-0.083	-0.480 ***	-0.368 ***	-0.481 ***	0.386 ***	-0.272 **	-0.499 ***	-0.142	
UN	0.529 ***	0.555 ***	-0.017	0.621 ***	0.531 ***	0.192 *	0.065	-0.459 ***	-0.507 ***	-0.579 ***	0.532 ***	-0.561 ***	-0.358 ***	-0.531 ***	
TP	0.243 **	0.249 **	0.309 ***	0.195 *	-0.075	-0.262 **	-0.179	-0.461 ***	-0.247 **	-0.361 ***	0.329 ***	-0.004	-0.415 ***	-0.010	
Alb	0.642 ***	0.678 ***	0.284 **	0.598 ***	0.512 ***	-0.044	-0.084	-0.484 ***	-0.357 ***	-0.500 ***	0.645 ***	-0.458 ***	-0.299 ***	-0.643 ***	
A/G	0.441 ***	0.470 ***	0.048	0.429 ***	0.536 ***	0.155	0.053	-0.130	-0.171	-0.219 *	0.365 ***	-0.409 ***	0.002	-0.514 ***	
T-Cho	0.927 ***	0.892 ***	0.334 ***	0.984 ***	0.804 ***	0.465 ***	0.249 **	-0.394 ***	-0.418 ***	-0.657 ***	0.765 ***	-0.599 ***	-0.514 ***	-0.568 ***	
Ca	-0.195 *	-0.139	-0.046	-0.233 *	-0.273 **	-0.229 *	0.137	0.166	0.090	0.293 **	-0.233 *	0.097	0.078	0.126	
iP	-0.098	-0.053	-0.172	-0.122	0.077	0.054	0.285 **	0.248 **	0.016	0.223 *	-0.272 **	-0.054	0.242 **	-0.021	
Mg	0.460 ***	0.517 ***	-0.035	0.455 ***	0.502 ***	-0.001	-0.058	-0.391 ***	-0.361 ***	-0.402 ***	0.441 ***	-0.519 ***	-0.144	-0.565 ***	
FFA	0.079	-0.057 ***	0.528 ***	-0.075	-0.084	0.045	0.048	0.129	0.435 ***	0.136	-0.183 *	0.542 ***	0.168	0.234 *	
BHB	-0.137	-0.133	-0.189 *	-0.124	-0.067	0.078	0.303 ***	0.173	-0.017	0.114	-0.261 **	-0.085	0.045	0.056	
VA	-0.170	-0.113	-0.328 ***	-0.181 *	0.054	-0.020	0.070	0.225 *	0.028	0.275 **	-0.254 **	-0.122	0.337 ***	-0.069	
VE	0.831 ***	0.845 ***	0.453 ***	0.864 ***	0.641 ***	0.245 **	0.054	-0.527 ***	-0.417 ***	-0.676 ***	0.798 ***	-0.503 ***	-0.524 ***	-0.567 ***	

The numbers are correlation coefficients, \* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001. <sup>1</sup> PA: palmitic acid, SA: stearic acid, OA: oleic acid, LA: linoleic acid, DGLA: dihomom- gamma-linolenic acid, AA: arachidic acid, ALA: alpha-linolenic acid, EPA: eicosapentaenoic acid, DHA: docosahexaenoic acid. <sup>2</sup> EPA/AA ratio: eicosapentaenoic acid / arachidic acid. <sup>3</sup> SCD1 (stearoyl-CoA desaturase) = OA/SA. <sup>4</sup> D6D (delta-6 desaturase) = DGLA/LA. <sup>5</sup> D5D (delta-5 desaturase) = AA/DGLA.

## 第 3 章

肥育中後期の黒毛和種肥育牛への生菌剤投与が脂  
肪酸代謝に及ぼす影響

## 1. 緒論

黒毛和種肉用牛の飼養農場は年々規模拡大が進み、農林水産省の畜産統計によると2020年の全国の肉用牛の飼養戸数は43,900戸、飼養頭数は2,555,000頭となっており、10年前と比較すると1戸当たりの飼養頭数は41.8頭から58.2頭へと増加している[43]。肉用牛農家の主たる生産目標は体重増加と脂肪交雑の向上に主眼が置かれ、出生後の早い時期から濃厚飼料の給与を開始している。第2章において、このように慣行的に行われている濃厚飼料の多給が牛の血中FAs濃度に及ぼす影響を把握するために、黒毛和種雌肥育牛の血中FAs濃度の推移を調査したところ、 $\omega 6$  FAsであるLAが肥育中前期から増加して、その後高値を維持するとともに、 $\omega 3$  FAsであるEPAは肥育中前期以降に有意に減少し、その結果 $\omega 6/\omega 3$ 比が上昇することが明らかとなった。

一方、畜産分野における生産性の向上を目的としたプロバイオティクスの利用は、以前よりその有用性が認識されており、牛に対する効果として、ルーメン内の細菌群集の構成を多様化し、ルーメンと腸内微生物のバランスを調節し、ルーメンの発達と早期離乳に対する有益な作用を有し[71]、さらに、肥育牛における枝肉重量の増加[23,47]など生産性に関する有用性に加え、糞便中の総免疫グロブリンA濃度の上昇[47]や、Th1 (IFN- $\gamma$ 、IL-12) 及び抗炎症 (IL-10) 応答に関連するサイトカインの増強、それとは対照的にTh2 (IL-4) 及び炎症誘発性 (TNF- $\alpha$ ) 応答に関連するサイトカイン産生を低下させる可能性、さらにはIFN- $\gamma$  レベルの用量依存的効果など免疫系に及ぼす作用などが明らかにされている[9,20,50]。

しかし、プロバイオティクスがこれらの作用を発揮するメカニズムについては未だに不明な点も多く、特に黒毛和種肥育牛にプロバイオティクスを給与した時の血中FAs濃度に対する影響について調査した報告はみられない。

本章では、プロバイオティクスを肥育中後期の黒毛和種雌肥育牛に2カ月間投与して、投与開始時から投与終了後6カ月までの血中FAs濃度の測定と血液生化学検査



を実施し、プロバイオティクス投与が FAs 代謝に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2.1 調査期間及び供試牛

第一章と同じ肥育農場で通常の方法で飼育された 18 頭の臨床的に健康な黒毛和種雌肥育牛を供試した。供試牛は、農場に移動してから 9 カ月後に、プロバイオティクス投与群 (probiotics group、n = 9) または対照群 (control group、n = 9) にランダムに分類した。群間で血統的な差はなく、平均年齢±標準偏差はプロバイオティクス投与群で 18.0±0.5 カ月、対照群で 17.6±0.5 カ月であり、年齢に有意差は無かった。また、研究開始時に実施した血液生化学検査の結果で異常値は認められなかった。

### 2.2 試験の概要

試験期間中に給与した飼料の 1 日給与量と濃厚飼料の成分を Table 6 に示した 給餌環境は両群とも同じで、粗飼料には稲わらとアルファルファヘイキューブを使用し、濃厚飼料は自動給餌装置を使用して給餌量を測定した。また、両群ともに農場の給餌プログラムに従って、プロバイオティクス投与期間終了の 1 週間前から 2 カ月間、アルファルファヘイキューブを日量 500g 追加給与した。肥育期間中、規定量の飼料が継続的に給餌され、自由飲水とし、プロバイオティクスとして BIO-THREEACE (東亜薬品工業株、東京) を使用した。このプロバイオティクスの 1g には、 $1 \times 10^8$  の *Enterococcus faecium* T-110、 $1 \times 10^6$  の *Clostridium butyricum* TO-A 及び  $1 \times 10^6$  の *Bacillus subtilis* TO-A が含まれている。トップドレスにより 1 日 1 頭あたり 50g の BIO-THREEACE を投与し、投与期間は試験開始日から 2 カ月間とした。対照群はプロバイオティクス投与開始前から 2 カ月後までの間プロバイオティクスを投与されておらず、同一飼養環境の下でプロバイオティクス群と同時に試験に供した。

血清分離用の真空採血管(ベノジェクトⅡVP-H100K、テルモ(株)、東京)を使用して、プロバイオティクス投与前(Pre)、2カ月後(Post1;プロバイオティクス投与終了時)、投与開始後3カ月(Post2)、8カ月(Post3)の計4回頸静脈から採血した。採血後、サンプルは室温で2~3時間室内に静置後、3,000 rpmで20分間遠心分離して血清を分離し、測定日まで-60℃で保存した。

### 2.3 血清全脂質中脂肪酸濃度の測定

第2章と同様に実施した(第2章.2.3参照)。

### 2.4 血液生化学検査及びVA、VEの測定

第2章と同様に実施した(第2章.2.4参照)。

### 2.5 統計学的解析

血中FAs濃度及び血液生化学検査値は平均±標準偏差として示した。2群の時間的推移の有意性は、それぞれ反復測定一元配置分散分析(one-way repeated measures ANOVA)によって確認し、その後、多重比較検定をBonferoniの方法によって実施して有意差を求めた。一方、群間の比較は、等分散性の有無をBartlett検定で確認し、次に二元配置分散分析(two-way ANOVA)で有意性を確認したのちにBonferoniの方法によって検定した。また、すべてのサンプル(n = 72)の血中FAs濃度と血液生化学検査値との相関は、Pearsonの相関分析によって検定した。いずれの検定結果も危険率5%未満で有意性ありと判定し、すべての統計分析にはEZR(<http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmed.html>) [25]を使用した。

## 3. 結果

### 3.1 血中 FAs 濃度

研究期間中における供試牛の血中の総脂質中 FAs 濃度を Table7 示した。

ANOVA 検定で交互作用は認められなかったが、独立した多重比較検定で時間経過と群間でいくつかの項目について有意差が示された。すなわち、プロバイオティクス投与群では、Post1 における ALA の濃度は  $42.6\mu\text{g}/\text{mI}$  と Pre 値と比較して有意に増加した。Post1 における EPA 増加には有意差はなかったが、 $\omega 3$  FAs 濃度は  $54.4\mu\text{g}/\text{ml}$  と Pre 値と比較して有意に増加した。MUFAs も Post1 で  $190.1\mu\text{g}/\text{mI}$  と有意な増加を認め、一方、対照群では、EPA のみが Post1 で Pre 値と比較して増加の傾向を示したが有意差はなかった。Post2 においてはプロバイオティクス投与群の OA と両群の ALA が Pre 値より有意に高く、Post2 での  $\omega 6/\omega 3$  比は両群で Pre 値よりも有意に低かった。Post3 の両群の OA と DHA は、Pre 値よりも有意に高かった。

対照群との比較では Post1 における OA 及び ALA の濃度がプロバイオティクス投与群で有意に高かった。その結果、プロバイオティクス投与群では、Post1 の MUFAs、 $\omega 3$  FAs 濃度が対照群より有意に高く、Post1 の  $\omega 6/\omega 3$  比は 26.6 となり、対照群よりも有意に低かった。さらに、プロバイオティクス投与開始前を 0 ベースとして血中 FAs 濃度の増減を群間で比較した結果、Post1 のプロバイオティクス投与群の TFAs、PUFAs、LA、ALA は対照群よりも有意に高かった。(Figure5)

### 3.2 血液生化学検査

血液生化学検査の結果を Table8 に示した。同様に ANOVA での交互作用に有意性は認められなかった。多重比較検定ではプロバイオティクス投与群の T-Cho は Pre 時の  $167.9\text{mg}/\text{dI}$  から Post1 で  $197.7\text{mg}/\text{dI}$  へと増加傾向を認めたが、対照群では変化を認めなかった。Post1 での Mg はプロバイオティクス投与群で  $2.4\text{mg}/\text{dI}$ 、VA は  $48.7\text{IU}/\text{dI}$  となり、対照群においても Mg が  $2.2\text{mg}/\text{dI}$ 、VA は  $39.1\text{IU}/\text{dI}$  と Pre 値より減少しており両群で有意差を認めた。しかし、プロバイオティクス投与群の VA は、同

時期の対照群との比較で Post1 及び Post2 において有意に高値を示した。プロバイオティクス投与群の Alb 及び A/G は、Post1 及び Post2 で対照群よりも有意に高かった。さらに、プロバイオティクス投与群の VE は、プロバイオティクス投与終了時の Post1 から Post3 までの全ての期間で対照群よりも 100 $\mu$ g/dl 余り高値で推移し有意に高かった。

### 3.3 脂肪酸と血液生化学検査値の相関

FAs と血液生化学検査値との相関において、T-Chol は PA、SA、LA、DGLA、AA、ALA 及び EPA と有意な正の相関を示した。また、FFA と OA の間、さらに VE と PA 及び OA の間に有意な正の相関がみられた。(Figure6)

## 4. 考察

本研究で供試したプロバイオティクスは、*Enterococcus faecium* T-110、*Clostridium butyricum* TO-A 及び *Bacillus subtilis* TO-A の混合物である。この複合プロバイオティクスは牛以外の動物種にも利用され、雌ブタの下痢の発生率を低下させ、繁殖成績を改善し[17]、ワクチン未接種のブタ流行性下痢 (PED) に感染した雌ブタの免疫系を強化するなどの効果が報告されている[60]。人においても、このプロバイオティクスの臨床用途は広範囲であり、臍頭十二指腸切除術後の術後感染性合併症の軽減[41]や、サルモネラ感染またはロタウイルス感染中の重度の下痢の大幅な軽減[21]が報告されている。

今回の試験設定では、プロバイオティクス添加による交互作用の有意性は認められなかった。しかし、独立した多重比較検定では、投与終了時のプロバイオティクス投与群では、投与前と比較して数種類の血中 FAs 濃度が有意に増加した。一方、対照群では、post1 の FAs 濃度は EPA のみで増加傾向を認めた。興味深いことに、本調査では Post1 の両群間で SA の濃度に有意差は認められなかったが、プロバイオティクス投

与群の OA は、対照群よりも有意に高い値を示した。従って、このプロバイオティクスには、SA から OA への不飽和化反応を促進する効果があるかもしれない。また、プロバイオティクス投与終了後、ALA を除いて血中 FAs 濃度は徐々に低下し、Post3 では対照群との差は消失した。この結果からプロバイオティクス投与終了後には血中 FAs 濃度に対して持続的な影響は認められず、消化管内に定着することなく徐々に消失し、長期的な効果は得られないことが示唆された。

プロバイオティクス投与後の両群における ALA、EPA の Post2 までの継続的な増加は、農場プログラムに従って追加給与されたアルファルファヘイキューブの影響を考慮する必要がある。しかし、プロバイオティクス投与群の Post1 での ALA は、対照群よりも有意に高く、今回供試したプロバイオティクスは  $\omega 3$  FAs の ALA に対して吸収促進効果があることが示唆された。Herdmann らは ALA 添加飼料を給餌した雄牛の牛肉製品は、ALA と  $\omega 3$  FAs が豊富で、生産条件下での処理中に  $\omega 3$  FAs の損失がなかったと報告している[18]。本研究においても Post2 において両群で  $\omega 6/\omega 3$  比の低下が観察され、炎症反応制御に関わる脂質メディエーターを調整するための 1 つの手段として肥育中後期におけるアルファルファヘイキューブの活用とプロバイオティクスの併用は有効な手段となる可能性が高い。しかし天然粗飼料であることから製品は均一でなく、品質、給与量、給与期間等さらに検討を進める必要がある。

血液生化学検査の結果、プロバイオティクス投与群の T-Chol 及び VE は、投与前と比較して投与終了時に増加し、VE は試験終了まで対照群よりも有意に高値で推移した。さらに、プロバイオティクス投与群の Alb と A/G は、投与終了後 1 カ月である Post2 まで対照群よりも有意に高かった。

以上の結果から、肥育中後期におけるプロバイオティクスの投与は、脂質とタンパク質の両方の消化と吸収に影響を与え、血中 FAs 濃度を高めることで黒毛和種肥育牛の生産性に有益な効果をもたらす可能性が示唆された。

## 5. 小活

本研究では、肥育中後期における黒毛和種雌肥育牛の脂肪酸代謝に対するプロバイオティクス投与の影響を明らかにすることを目的に、血中 FAs 濃度の変化および血液生化学検査値について調査した。同じ肥育農場で飼育された 18 頭の臨床的に健康な黒毛和種雌肥育牛を、プロバイオティクス投与群 (n = 9) または対照群 (n = 9) にランダムに分類して供試した。プロバイオティクス投与群では、1 頭 1 日 50g のプロバイオティクスを 18 カ月齢から 2 カ月間投与し、両群ともにプロバイオティクス投与前、2 カ月後、3 カ月後、8 カ月後の計 4 回、同時期に頸静脈から採血した。

プロバイオティクス投与群では、PA、LA、AA 及び ALA がプロバイオティクス投与前と比較して、投与終了時に高くなる傾向を認めた。さらに、多重比較検定の結果、プロバイオティクス投与終了時に同時期の対照群との比較において、OA 及び ALA の濃度が有意に高く、 $\omega 6/\omega 3$  比が有意に低かった。血液生化学検査値では VA、VE、および Alb が、投与終了時に対照群よりも有意に高かった。

以上の結果、肥育中後期におけるプロバイオティクスの投与により、一部の血中 FAs 濃度が増加することが明らかとなり、黒毛和種肥育牛の生産性に有益な効果をもたらす可能性が示唆された。

6. 図表

Table6. Feeding management status, viable agent administration period and blood sampling age.

Age after birth (month)	17	~ 20	21	22	~	23	24	~	30
Rice straw (saturated)	1 <sup>1</sup>	1	1	1	1	1	1	1	1
Basic concentrated feed <sup>2</sup>	10	10	10	9	9	8	7	6	5
Concentrated feed for later period <sup>3</sup>				1	1	2	3	3	3
Alfalfa hay cubes <sup>4</sup>	←→								
Probiotics' administration period	←→								
Blood sampling <sup>5</sup>	Pre	Post1	Post2					Post3	

<sup>1</sup> Data are expressed daily feed amount (Kg/ head). <sup>2</sup> Mixing ratio of raw materials: Cereal 67.0%, Bran 24.0%, Vegetable oil residue 7.0%, Others 2.0%, Total Digestible Nutrients: 74.0% or more, Crude protein: 13.0% or more. <sup>3</sup> Mixing ratio of raw materials: Cereal 96.0%, Bran 1.0%, Vegetable oil residue 0.0%, Others 3.0%. Total Digestible Nutrients: 76.0% or more, Crude protein: 8.0% or more.

<sup>4</sup> An additional dose of 500 g / day was given for 2 months according to the farm feeding program. <sup>5</sup> Pre: Immediately before the start of administration, Post1: 2 months after the start of administration, Post2: 3 months after the start of administration, Post3: 8 months after the start of administration.

Table 7. Blood fatty acids concentrations during the test period.

	Group	Pre <sup>2</sup>		Post1		Post2		Post3		p-value <sup>1</sup>		
										Group	Time	Group×Time
TFAs <sup>3</sup> (µg/mD)	Probiotics	2166.4 ± 495.2	2184.8 ± 440.5	2497.6 ± 429.0	2188.2 ± 262.2	2350.4 ± 420.4	2132.6 ± 433.7	2281.0 ± 356.6	2290.8 ± 243.4	0.184	0.631	0.506
	Control											
SFAs (µg/mD)	Probiotics	724.8 ± 156.4	696.7 ± 137.1	803.0 ± 111.8	683.9 ± 100.1	750.6 ± 119.0	677.8 ± 122.9	747.6 ± 115.1	738.0 ± 68.5	0.045	0.752	0.519
	Control											
	PA	280.3 ± 50.5	268.0 ± 54.0	306.3 ± 45.6	262.2 ± 33.5	290.7 ± 46.4	260.7 ± 42.5	286.8 ± 38.7	280.7 ± 29.3	0.027	0.849	0.546
	SA	412.9 ± 103.7	398.0 ± 80.8	461.2 ± 65.0	390.5 ± 67.5	424.9 ± 73.2	385.8 ± 78.2	428.0 ± 77.5	424.6 ± 40.7	0.075	0.716	0.552
MUFAs (µg/mD)	Probiotics	165.6 ± 18.6	146.9 ± 35.0	190.1 ± 20.1 <sup>*##</sup>	154.2 ± 26.9	195.9 ± 29.2 <sup>*</sup>	165.4 ± 35.1	217.0 ± 27.5 <sup>**</sup>	213.8 ± 42.0 <sup>**</sup>	0.003	0.000	0.385
	Control											
	ω9FAs	150.8 ± 16.2	134.2 ± 32.0	170.7 ± 17.2 <sup>##</sup>	139.3 ± 24.5	177.1 ± 25.5 <sup>*</sup>	149.8 ± 32.0	196.2 ± 24.1 <sup>**</sup>	192.8 ± 36.3 <sup>**</sup>	0.003	0.000	0.406
	OA	141.5 ± 15.5	125.8 ± 30.6	161.9 ± 15.9 <sup>##</sup>	131.4 ± 23.7	167.3 ± 24.2 <sup>*</sup>	141.5 ± 30.6	185.9 ± 23.5 <sup>**</sup>	182.6 ± 34.5 <sup>**</sup>	0.003	0.000	0.404
PUFAs (µg/mD)	Probiotics	1275.9 ± 327.1	1341.2 ± 273.1	1504.6 ± 310.8	1350.0 ± 184.7	1403.9 ± 295.6	1289.4 ± 300.1	1316.4 ± 247.6	1339.0 ± 147.7	0.475	0.565	0.554
	Control											
	ω6 FAs	1230.8 ± 317.0	1297.7 ± 263.2	1449.2 ± 301.6	1303.2 ± 178.9	1345.8 ± 284.1	1238.9 ± 290.3	1271.4 ± 241.1	1295.0 ± 141.3	0.508	0.580	0.556
	LA	1095.6 ± 289.3	1161.1 ± 229.7	1299.3 ± 267.7	1166.8 ± 157.6	1203.0 ± 254.6	1111.1 ± 253.9	1143.7 ± 214.6	1166.8 ± 130.8	0.534	0.564	0.533
DGLA	Probiotics	46.9 ± 16.1	48.1 ± 16.3	52.7 ± 13.6	47.7 ± 12.4	50.9 ± 17.5	44.0 ± 19.1	47.3 ± 14.7	45.1 ± 8.6	0.371	0.878	0.860
	Control											
	AA	58.1 ± 16.7	56.2 ± 16.7	65.9 ± 19.1	58.6 ± 12.9	61.6 ± 15.9	55.2 ± 14.2	57.3 ± 13.4	58.6 ± 9.8	0.316	0.749	0.806
	Control											
ω3 FAs	Probiotics	44.2 ± 10.6	42.7 ± 9.8	54.4 ± 9.6 <sup>**#</sup>	46.0 ± 6.3	57.0 ± 11.5 <sup>**</sup>	49.7 ± 10.6 <sup>**</sup>	43.9 ± 7.0	43.1 ± 6.3	0.040	0.003	0.499
	Control											
	ALA	33.2 ± 8.0	32.2 ± 7.5	42.6 ± 6.9 <sup>**#</sup>	35.8 ± 5.9	46.5 ± 10.1 <sup>**</sup>	40.6 ± 9.0 <sup>**</sup>	32.8 ± 5.3	32.0 ± 4.9	0.042	0.000	0.486
	Control											
EPA	Probiotics	2.7 ± 0.9	2.5 ± 0.8	3.6 ± 1.1	3.1 ± 0.9	3.2 ± 0.9	2.7 ± 0.9	2.8 ± 0.7	2.8 ± 1.1	0.136	0.117	0.779
	Control											
DHA	Probiotics	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.3 ± 0.3	1.4 ± 0.4	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	2.3 ± 0.3 <sup>**</sup>	2.2 ± 0.2 <sup>**</sup>	0.723	0.000	0.884
	Control											
EPA/AA ratio <sup>4</sup>	Probiotics	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01 <sup>**</sup>	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.01	0.097	0.022	0.973
	Control											
ω6/ω3 ratio	Probiotics	27.8 ± 2.2 <sup>##</sup>	30.6 ± 1.6	26.6 ± 1.7 <sup>#</sup>	28.4 ± 1.6	23.6 ± 0.9 <sup>**</sup>	25.0 ± 2.6 <sup>**</sup>	28.9 ± 2.2	30.2 ± 1.6	0.000	0.000	0.619
	Control											



Data are shown as the mean  $\pm$  SD. <sup>1</sup> P-value of main effect and interaction by Two-way ANOVA, followed by Bonferoni's multiple comparison method was used to determine within-group differences. \* p <0.05, \*\* p <0.01, compared to before administration (Pre): # p <0.05, ## p <0.01, compared to the control group at the same time. <sup>2</sup> Pre: Immediately before the start of administration, Post1: 2 months after the start of administration, Post2: 3 months after the start of administration, Post3: 8 months after the start of administration. <sup>3</sup> TFAs: total fatty acids, SFAs: saturated Fatty Acids, MUFAs: monounsaturated fatty acids, PUFAs: polyunsaturated fatty acids, PA: palmitic acid (16:0), SA: stearic acid (18:0), OA: oleic acid (18:1 $\omega$ -9), LA: linoleic acid (18:2 $\omega$ -6), ALA: alpha-linolenic acid (18:3 $\omega$ -3), DGLA: dihomo- gamma-linolenic acid (C20:3 $\omega$ 2-6), AA: arachidonic acid (20:4 $\omega$ -6), EPA: eicosapentaenoic acid (20:5 $\omega$ -3), DHA: docosahexaenoic acid (22:6 $\omega$ -3). <sup>4</sup> EPA/AA ratio = eicosapentaenoic acid / arachidonic acid,  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 ratio =  $\omega$ 6 FAs /  $\omega$ 3 FAs.

Table8. Blood biochemical test values during the test period.

	Group	Pre <sup>2</sup>	Post1	Post2	Post3	p-value <sup>1</sup>		
						Group	Time	Group×Time
Average age	Probiotics	18.0 ± 0.5	20.0 ± 0.5	21.0 ± 0.5	26.0 ± 0.5	0.001	0.000	0.984
	Control	17.6 ± 0.5	19.6 ± 0.5	20.6 ± 0.5	25.7 ± 0.5			
AST <sup>3</sup> (IU/l)	Probiotics	78.7 ± 15.7	77.2 ± 16.4	64.7 ± 10.3	71.1 ± 5.8 <sup>#</sup>	0.031	0.088	0.920
	Control	86.9 ± 15.5	93.9 ± 46.4	72.8 ± 18.9	81.8 ± 11.9			
GGT (IU/l)	Probiotics	28.4 ± 5.6	29.1 ± 7.4	25.7 ± 5.7	26.6 ± 7.2	0.099	0.485	0.900
	Control	24.7 ± 4.2	26.8 ± 9.0	24.9 ± 7.3	23.0 ± 5.5			
UN (mg/dl)	Probiotics	17.0 ± 1.7	18.3 ± 2.7	16.8 ± 2.4	11.1 ± 1.0 <sup>**</sup>	0.311	0.000	0.666
	Control	15.4 ± 2.7	17.6 ± 2.6	16.4 ± 3.0	11.4 ± 2.4 <sup>**</sup>			
TP (g/dl)	Probiotics	7.0 ± 0.2	6.9 ± 0.3	6.9 ± 0.2	6.9 ± 0.2 <sup>#</sup>	0.002	0.848	0.488
	Control	7.0 ± 0.3	7.1 ± 0.3	7.2 ± 0.4	7.2 ± 0.3			
ALB (g/dl)	Probiotics	3.7 ± 0.2	3.8 ± 0.2 <sup>#</sup>	3.6 ± 0.2 <sup>*,#</sup>	3.7 ± 0.2	0.001	0.003	0.149
	Control	3.6 ± 0.1	3.6 ± 0.2	3.4 ± 0.2	3.7 ± 0.1			
A/G	Probiotics	1.2 ± 0.1	1.2 ± 0.1 <sup>##</sup>	1.1 ± 0.1 <sup>##</sup>	1.2 ± 0.1	0.000	0.015	0.398
	Control	1.1 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.1 ± 0.1			
T-Cho (mg/dl)	Probiotics	167.9 ± 39.3	197.7 ± 41.3	189.9 ± 36.2	170.8 ± 29.0	0.283	0.365	0.562
	Control	172.1 ± 32.4	177.0 ± 25.1	171.1 ± 35.0	172.0 ± 23.9			
Ca (mg/dl)	Probiotics	9.4 ± 0.2	9.4 ± 0.3	9.6 ± 0.4	9.3 ± 0.2	0.927	0.022	0.998
	Control	9.4 ± 0.1	9.4 ± 0.3	9.5 ± 0.2	9.3 ± 0.3			
iP (mg/dl)	Probiotics	7.2 ± 0.4	7.1 ± 0.4	6.8 ± 0.6	6.6 ± 0.6 <sup>*</sup>	0.607	0.010	0.568
	Control	7.4 ± 0.9	6.7 ± 0.7	6.7 ± 0.7	6.6 ± 0.6			
VA (IU/dl)	Probiotics	75.8 ± 15.2	48.7 ± 7.3 <sup>**,#</sup>	59.9 ± 9.7 <sup>**##</sup>	51.1 ± 12.8 <sup>**</sup>	0.000	0.000	0.725
	Control	65.5 ± 14.1	39.1 ± 10.4 <sup>**</sup>	46.7 ± 8.2 <sup>**</sup>	46.1 ± 6.1			
VE (µg/dl)	Probiotics	393.6 ± 99.0	464.9 ± 104.3 <sup>#</sup>	463.1 ± 92.6 <sup>#</sup>	669.8 ± 103.7 <sup>**#</sup>	0.000	0.000	0.398
	Control	367.9 ± 81.1	346.5 ± 89.0	355.6 ± 90.4	561.2 ± 65.8 <sup>**</sup>			
FFA (mEq/l)	Probiotics	160.8 ± 51.1	183.9 ± 33.1	213.2 ± 33.1	223.8 ± 109.8	0.401	0.012	0.793
	Control	152.6 ± 78.5	151.0 ± 42.7	187.7 ± 69.6	234.4 ± 98.6			
Mg (mg/dl)	Probiotics	2.6 ± 0.2	2.4 ± 0.2 <sup>**</sup>	2.4 ± 0.3	2.4 ± 0.2 <sup>**</sup>	0.001	0.002	0.964
	Control	2.4 ± 0.1	2.2 ± 0.2 <sup>*</sup>	2.3 ± 0.2 <sup>*</sup>	2.2 ± 0.1 <sup>*</sup>			
BHB (µmol/l)	Probiotics	307.7 ± 78.4 <sup>#</sup>	303.4 ± 38.8	375.9 ± 42.9	325.1 ± 52.5 <sup>##</sup>	0.000	0.001	0.810
	Control	247.0 ± 34.4	263.2 ± 63.8	326.4 ± 85.2	249.0 ± 45.5			

Data are shown as the mean  $\pm$  SD. <sup>1</sup> P-value of main effect and interaction by Two-way ANOVA, followed by Bonferoni's multiple comparison method was used to determine within-group differences. \* p <0.05, \*\* p <0.01: compared to before administration (Pre); # p <0.05, ## p <0.01: compared to the control group at the same time. <sup>2</sup> Pre: Immediately before the start of administration, Post1: 2 months after the start of administration, Post2: 3 months after the start of administration, Post3: 8 months after the start of administration. <sup>3</sup> AST: aspartate aminotransferase, GGT: gamma-glutamyl transferase, UN: urea nitrogen, TP: total protein, Alb: albumin, A/G: Alb/(TP-Alb), T-Cho: total cholesterol, Ca: calcium, iP: inorganic phosphorus, VA: vitamin A, VE: vitamin E, FFA: free fatty acid, Mg: magnesium, BHB: beta-hydroxybutyric acid.

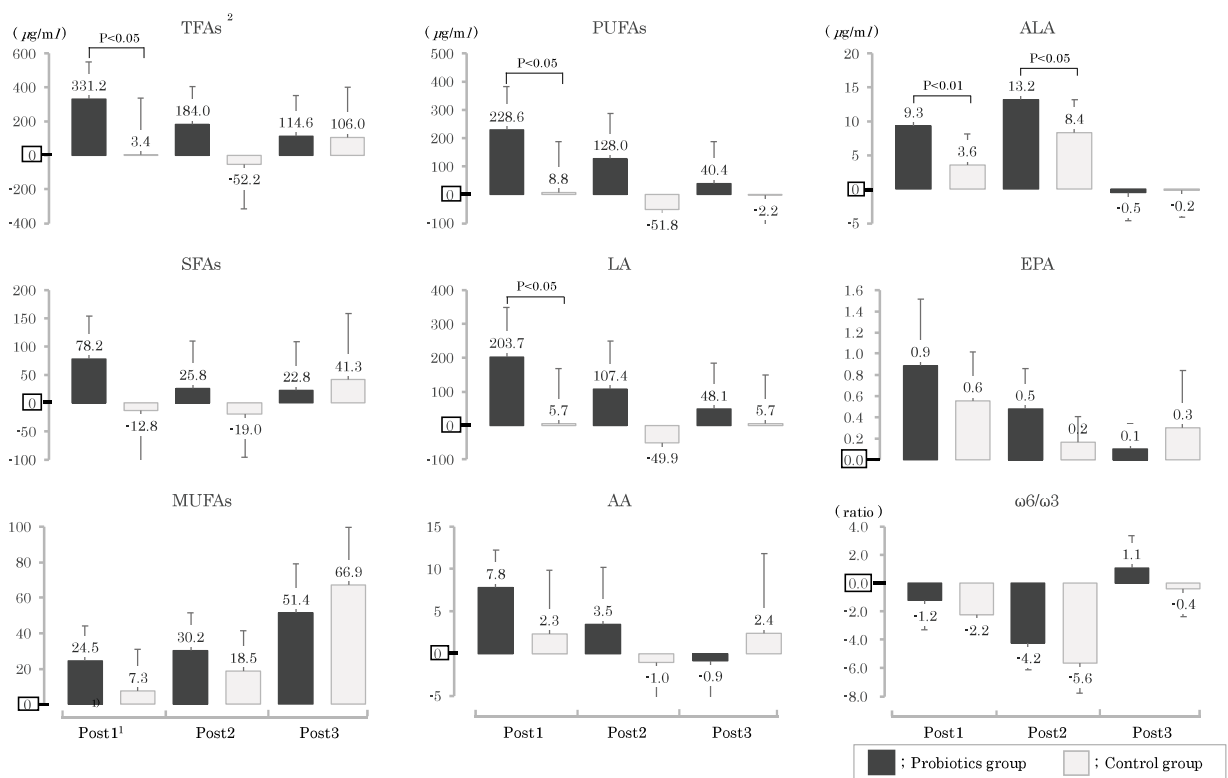


Figure5. Comparison of increase / decrease in FAs concentration in both groups.

The graph shows the mean and standard deviation of the increase or decrease. The test result immediately before the start of administration was set to 0, and the subsequent increase or decrease was shown in both groups. To determine the differences between the groups used Bonferoni's multiple comparison method. <sup>1</sup> Post1: 2 months after the start of administration, Post2: 3 months after the start of administration, Post3: 8 months after the start of administration. <sup>2</sup> TFAs: total fatty acids, SFAs: saturated fatty acids, MUFAs: monounsaturated fatty acids, PUFAs: polyunsaturated fatty acids, LA: linoleic acid (18:2 $\omega$ -6), AA: arachidonic acid (20:4 $\omega$ -6), ALA: alpha-linolenic acid (18:3 $\omega$ -3), EPA: eicosapentaenoic acid (20:5 $\omega$ -3).

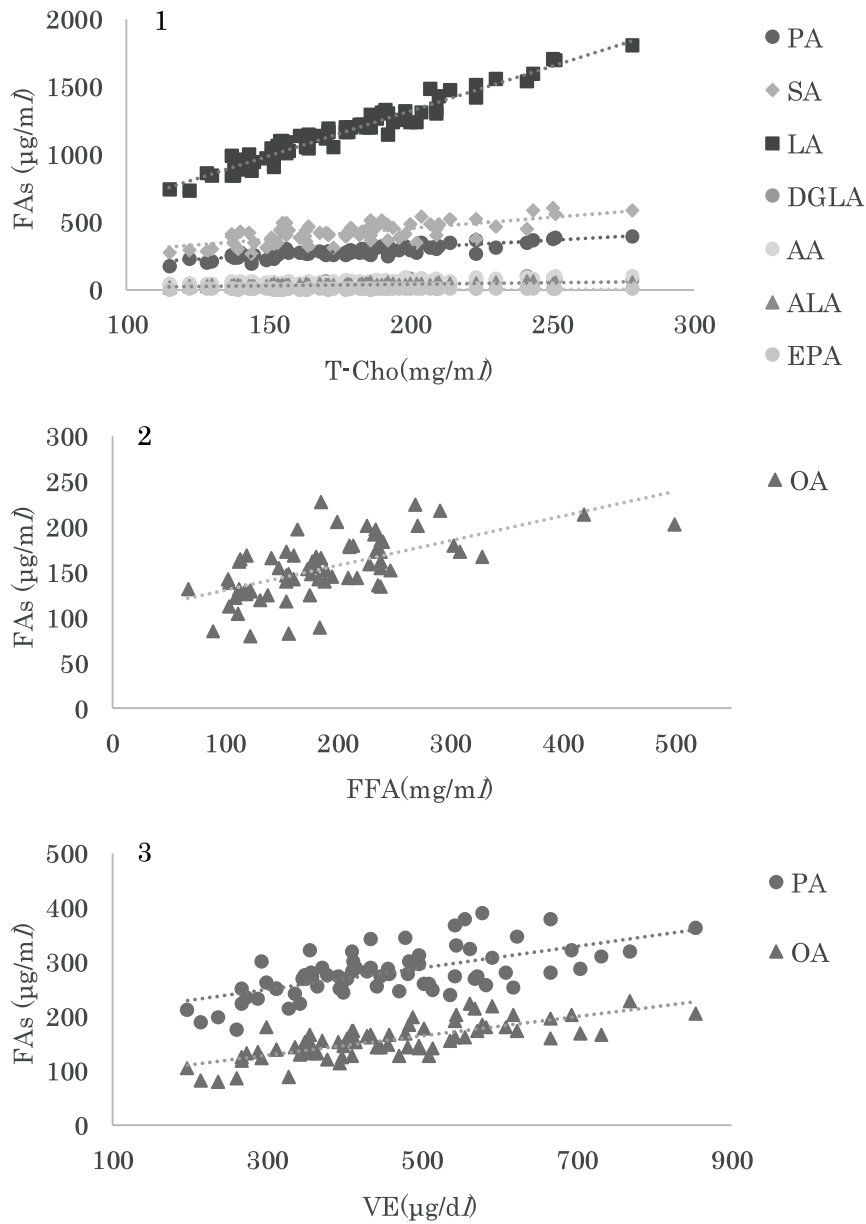


Figure6. Correlation diagram of fatty acids and blood biochemical test values.

This figure shows the items for which a significant correlation ( $P < 0.001$ ) was confirmed by Pearson's correlation analysis, and the correlation coefficient is shown in parentheses. <sup>1</sup> T-Chol vs PA (0.858), vs SA (0.724), vs LA (0.973), vs DGLA (0.697), vs AA (0.811), vs ALA (0.860), vs EPA (0.662). <sup>2</sup> FFA vs OA (0.610). <sup>3</sup> VE vs PA (0.629), vs OA (0.749).

## 第 4 章

## 総合考察

第一胃内脂質の脂肪酸には、飼料に含まれる脂肪酸由来のものと、ルーメン微生物自体が生合成したものがあり、通常は反芻獣の第一胃内では給与された不飽和脂肪酸は水素添加により飽和化が進行するとされる[58]。一方、Polanら[49]はLAが完全に水素添加を受けるためには2つの段階があること、すなわち第1段階はLAからOAへの変換であり、第2はOAからSAへの変換と考えた場合、LAが高濃度に存在している時にOAからSAに変換する第2段階が完全に阻害されることを観察している。本研究において、肥育前期からの血中FAs濃度の推移を見ると、OAは肥育後期までは肥育ステージに伴う大きな変化がみられなかったが、LAは肥育中前期より有意に増加した。このことから濃厚飼料を多給する肥育牛では第1段階であるLAからOAへの変換が抑制状態にあることが示唆された。そして、本研究で観察された肥育中前期以降のLAの顕著な増加は、給与された濃厚飼料の主としてトウモロコシや加熱トウモロコシの給与増加に伴う変化であると考えられ、これは去勢牛の消化及び第一胃発酵に対する補足脂肪源の影響を調査し、トウモロコシ胚芽、トウモロコシ油給与でLAの増加、亜麻仁油給与でALAの増加を認めたMontgomeryらの報告[37]を裏付ける結果であった。

LAの顕著な増加は、その下流のPUFAsであるAAの増加を誘導すると考えられたが、予想に反してAAは肥育中前期で若干増加したものの、肥育期間を通してほぼ同様の値で推移し、濃厚飼料の多給が必ずしもAAの極端な増加を招くことは無いことが明らかとなった。Ericら[13]も長期(150~200日)の穀物給餌飼料によっても筋肉のAAは増加しなかったことを報告しており、今回肥育中前期以降で確認された不飽和化酵素活性(D5D, D6D)の低下がLA濃度上昇とAA濃度変化が一致しない1要因と考えられた。SCDやD5D、D6Dなどの不飽和化酵素はPUFAs代謝の鍵となる酵素であり、人においては肥満やインスリン抵抗性、メタボリックシンドロームとの関連などが報告されている[65]。しかし、牛の脂肪酸や不飽和化酵素活性と生体機能の関連について



では PUFAs が卵巣・子宮機能の両方に影響を与える可能性を示唆した報告や[51]、枝肉評価の 1 基準として筋肉中の OA 含有率が注目され SCD 遺伝子型の関連などの報告がみられるものの[32]、PUFAs 代謝と疾患リスクとの関連性については未だ不明な点が多く、今後さらに検討が必要である。

Trevisi らは、乳牛の出産前後の  $\omega 3$  FAs 投与が炎症反応と生産能力に及ぼす影響を調査し、この期間では炎症に類似した状態で炎症誘発性メディエーター(エイコサノイドやサイトカイン)の放出を引き起こす代謝チャレンジを受け、このエイコサノイドの合成は前駆体である  $\omega 3$  FAs 及び  $\omega 6$  FAs の比率を変更することによって調整可能であると報告している[59]。今回の調査では、肥育経過に伴い EPA 及び DHA の低下など抗炎症性脂質メディエーターの基点となる PUFAs が低下することが明らかとなった。現在、発生が増加傾向にある牛呼吸器病症候群(bovine respiratory disease complex; BRDC)では *Mannheimia haemolytica* (Mh)などの原因菌により、炎症性サイトカインの誘導が引き起こされ[28]、重篤な病態が発現する。さらに、急性期を回避した後も組織障害により慢性化して予後不良となる場合も少なくない。人の呼吸器疾患発症機序においては、脂質メディエーターであるエイコサノイドは極めて重要な生理的意義を有することが推察されており[38]、牛における  $\omega 3$  FAs と免疫機能との関連性についてさらに詳細な検討を進める必要がある。今回、肥育後期で認められた ALA の一過性の上昇は、アルファルファヘイキューブの追加給与によるものと考えられるが、EPA、DHA 及び EPA/AA 比に有意な上昇は認められなかった。現在、牛用の脂質エマルジョンの商品化が無いなかで、ALA 含量が高い荏胡麻、亜麻仁などを原料とする  $\omega 3$  FAs 強化飼料の応用、あるいは農場が一般に利用しやすい  $\omega 3$  FAs 源の効率的な利用法の開発が期待される。

日本における黒毛和種肥育牛の特異的な飼養技術として、脂肪交雑の向上を目的とした 23 カ月齢以前の VA の制限給与[2,45]が普及しているが、過度の VA 制限は飼料摂食量の低下とともに筋肉水腫等を誘発し、免疫機能の低下や最終的には死に

至ることも知られている[27,67]。本研究で供試した農場においても通常の飼養管理プログラムの中でVAの制限給与が実施されており、肥育中後期から肥育後期にかけてVA値が漸次低下していた。このVAと血中FAs濃度の相関性をみると、OAとの間で有意な弱い負の相関が認められた。哺乳動物においてEFAが欠乏すると体内脂質代謝が変容し、脂肪酸伸長酵素(elongation of very long chain fatty acids protein 5; Elovl5)や脂肪酸デサチュラーゼ1(fatty acid desaturase 1; Fads1)、脂肪酸デサチュラーゼ2(fatty acid desaturase 2; Fads2)酵素群の作用により $\omega$ 9 FAsのOAからミード酸(mead acid; MA)が代謝産生されるようになることが報告されている[22]。また、常石らは放牧飼養の日本短角種牛の体脂肪及び筋肉の脂肪酸組成を調査して $\omega$ 9 FAsの増加を確認し、 $\omega$ 6 FAsの摂取不足に起因するのではないかと考察している[61]。OAの体内動態について平常時には脂肪組織からのOA放出が抑制されるが[35]、飢餓状態では血清遊離脂肪酸とトリグリセリド及び肝臓中性脂質でSAの割合が減少し、OAが増加することが報告されている[6]。以上のことから、本研究において確認されたVAとOAの関連は、VAの低下に伴う飼料摂取量の低下に起因するものではないかとも考えられた。

第2章の調査結果により、黒毛和種肥育牛の肥育期間中における血中FAsの推移が明らかとなったが、今回測定した血中FAsは外因性脂肪の脂肪酸組成だけでなく、内因性脂肪の脂肪酸組成が寄与していると考えられる。人では腸内細菌叢が食事のPUFAs代謝を調節することにより、高脂肪食(high-fat diet ; HFD)によって誘発される肥満に対する宿主の抵抗性を与えることが示唆されている[36]。そこで第3章では、腸内細菌叢との相互作用による種々の効果が認められている[9,17,30,44]プロバイオティクスを投与して牛の血中FAs濃度に及ぼす影響を調査した。

現在、日本の畜産領域においては集約的飼養管理システムにより単位面積当たりの飼養頭数を最大化することが追及され、生産性の効率化を優先した飼養形態へと変様を続けているが、飼養管理技術が未熟な場面においては、呼吸器感染症をはじめとする

様々な障害、疾病発生が増加する傾向にある。この問題に対する一つの対応策として家畜用プロバイオティクスの利用が注目され、飼料に添加して長期間連投する低用量の抗菌剤の代替として家畜の健康維持や増体改善に対する効果が期待されている[24]。しかし、プロバイオティクスは使用される菌株により特有の効果とメカニズムを有しており、健康に有益な効果や免疫調節効果は菌株に依存するため[44]、各動物種とそのライフステージ、及び各個体に適した特定のプロバイオティクス株を見出すことが重要である。

牛へのプロバイオティクス投与の効果について、Beaucheminらは肥育牛にエンテロコッカス属乳酸菌 (*Enterococcus faecium* EF212) と酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を投与した後、プロピオン酸濃度の上昇、酪酸濃度の低下、ルーメン内の pH 最低点の低下、十二指腸への飼料窒素の流れの増加が観察されたと報告している[5]。また、Colomboらは酵母由来のプレバイオティクスと枯草菌のプロバイオティクス (*Bacillus subtilis*) の混合物を投与された去勢牛の代謝と栄養補給が部分的に強化され、牛呼吸器病 (bovine respiratory disease; BRD) 治療に対する反応が改善され、免疫能力が改善されたと報告している[10]。しかし、これらのプロバイオティクスがこのような有益な役割を果たす正確なメカニズムは不明な部分も多く、肥育中後期の黒毛和種肉用牛に対するプロバイオティクス投与が血中 FAs 濃度へ及ぼす影響も知られていない。エネルギー源としてのみならず、その代謝物が脂質メディエーターとしても作用する脂肪酸へどのような影響を及ぼすかを明らかにすることは、黒毛和種肥育牛に対するプロバイオティクスの作用メカニズムについて新たな理解が得られる可能性がある。

今回の研究の結果、プロバイオティクス投与群では、多種類の血中 FAs 濃度が投与前と比較して投与終了時に有意に増加した。さらに、PA、OA 及び ALA の濃度は、投与終了時に同時期の対照群の濃度と比較して有意に高かった。プロバイオティクスの投与は、ルーメンの細菌群集に影響を与え、さらに腸内細菌叢を安定化させることにより、ルーメンの pH の低下を抑制し[1,50,72]、給与飼料中 FAs の消化・吸収を効率的に促進すると考えられた。

Adachiらは優れた出荷結果を示した黒毛和種肥育牛農場では、肥育後期におけるT・ChoとVEの値が増加していたと報告している[2]。さらに、KatoらはT・Cho濃度は、枝肉の重量及びバラ厚と正の遺伝的相関関係があり、これらのパフォーマンスを改善するための効果的な生理学的指標であることを示唆している[26]。今回の調査結果から、T・ChoはLAと最も強い正の相関関係があり、プロバイオティクス投与群において投与終了時の濃度が高い傾向にあった。したがって、肥育中後期でのプロバイオティクスの投与は、出荷成績の改善にも有益な効果をもたらす可能性が示唆された。

一方で、今回の調査結果では、FFAとOAの間に正の相関関係があることも示された。FFAは、負のエネルギーバランス状態での体脂肪動員の結果として乳牛で増加することが知られている[63]。Nogalskiらは泌乳量の多い栄養喪失状態が高い牛群では、蓄積体脂肪の動員により、乳汁中のMUFAs、主にOAレベルが有意に増加することを報告している[40]。このことからPost3において両群で認められたOAの増加は、体内合成だけでなく、体脂肪に蓄積されたOAからの優先的な動員についても考慮する必要があるかもしれない。今回の試験ではプロバイオティクス投与終了後、FAsに対する影響は漸次消失し、Post3において対照群との有意差は認められなかった。第2章で明らかとなったVAとの関連性なども考慮して、今後さらに肥育牛の生産性に有益となる投与時期、投与期間、投与量等の検討を重ねる必要があると考えられた。

プロバイオティクスは菌株特異的な作用を持つため[62]、今回供試した複合プロバイオティクス投与により観察されたFAsに対する影響が、単一の菌株の作用によるものなのか、相互作用によるものなのかを明確にすることはできなかった。しかし、人では食事のPUFAsの腸内細菌叢に関連付けられている代謝経路が決定されており、腸管で生成されるFAs分子種は、腸管内の乳酸菌のPUFAs代謝に依存し、宿主の健康に影響を与える可能性が示唆されている[36]。さらに、今回の研究で使用したプロバイオティクスの1菌株である*Bacillus mesentericus* TO-Aの培養上清は、*Bifidobacterium*の増殖を促進すること[52]や、ALAと組み合わせた*Bifidobacterium* NCIMB

702258 の補給により、肝臓の EPA 濃度と脳の DHA 濃度が増加したとの報告[64]などを考慮すると、今回供試した複合プロバイオティクスとアルファルファヘイキューブとの併用は、牛体の腸内細菌及び飼料由来 ALA の代謝物間との相互作用を高め、肥育経過とともに低下することが確認された EPA の低下を補完し、安定的な脂質バランスを維持するための有効な手段となり得るかもしれない。

結論として、黒毛和種肉用牛の肥育中後期におけるプロバイオティクス投与は、飼料の消化と吸収に関連して FAs の代謝に影響を及ぼし、多くの血中 FAs 濃度が変化する可能性が示唆され、黒毛和種肥育牛の生産性向上に寄与するものと考えられた。

## 第 5 章

## 結 論

近年、黒毛和種肉用牛の飼養は、自家粗飼料給与を主体とした家族経営による少数頭規模の飼養形態から、海外から購入した粗飼料と濃厚飼料の多給を主体としたコスト追求型の飼養形態へと移行し、数百頭から数千頭に及ぶ大規模経営による集約的飼養形態へと大きく変化しつつある。その結果、呼吸器疾患、関節炎、中耳炎などの慢性炎症性疾患が増加し、特殊な飼養による免疫力低下が推測される。そこで本研究では、個体の免疫に重要な役割を持つ3大栄養素の一つである脂質に注目し、これまで詳細な報告が行われていない黒毛和種肥育牛の血中 FAs の動態を明らかにするとともに、近年、畜産領域で広く使用されているプロバイオティクスの投与が血中 FAs 濃度に及ぼす影響を調査し、肥育牛の生産性向上に対する有効性を明らかにすることを目的とした。

第2章では生後9~30カ月の黒毛和種雌肥育牛120頭を供試牛として、血中 FAs 濃度の推移を調査するとともに血液生化学検査値との関係を調査した。その結果、PUFAs の中で $\omega 6$  FAs の LA は肥育中前期で有意に増加し、仕上げ期まで高値を維持したが、AA はほとんど変化がなく推移した。また、 $\omega 3$  FAs の EPA は肥育中前期以降有意な減少を示し、 $\omega 6/\omega 3$  比の上昇が明らかになった。血液生化学検査値との関連をみると、エネルギー代謝の評価指標である T-Chol と SFAs 及び  $\omega 6$  FAs の LA、DGLA との間で強い正の相関が認められたが、AA との相関は弱く、FFA は  $\omega 9$  FAs との間で正の相関を認めた。

以上の結果から、黒毛和種雌肥育牛では肥育経過とともに LA を主体とした  $\omega 6$  FAs の上昇と  $\omega 3$  FAs の有意な減少が認められ、結果として  $\omega 6/\omega 3$  比の上昇が確認された。一方で、炎症性エイコサノイドの基点となる AA の有意な上昇は認められず、 $\omega 6/\omega 3$  比が高い状態でも脂質機能の質的均衡が保たれている可能性が示唆された。しかし、同時に肥育開始後早期から抗炎症性エイコサノイドの基点となる EPA の低下が明らか

となったことから、軽微なストレス要因によっても免疫バランスの不調が起り得るのではないかと考えられた。

第3章では肥育中後期の黒毛和種肥育牛にプロバイオティクスを投与し、血中 FAs 濃度及び血液生化学検査値から、脂肪酸代謝に対するプロバイオティクス投与の影響を調査した。同じ肥育農場で飼育された 18 頭の臨床的に健康な黒毛和種雌肥育牛を、プロバイオティクス投与群 (probiotics group, n=9) と対照群 (control group, n=9) にランダムに分類し、プロバイオティクス投与群では、1 日 1 頭当たり 50g のプロバイオティクスを 18 カ月齢から 2 カ月間投与した。プロバイオティクス投与開始前及びプロバイオティクス投与開始後 2, 3, 8 カ月の 4 回それぞれ採血し試験に供した。プロバイオティクス投与群では、PA、LA、AA 及び ALA が、プロバイオティクス投与前と比較して投与終了時に増加の傾向を示した。さらに、プロバイオティクス投与終了時に同時期の対照群の濃度との比較では、OA 及び ALA の濃度が有意に高値となり、その結果 MUFAs は有意に高く、 $\omega 6/\omega 3$  比は有意に低かった。また、プロバイオティクス投与群の T-Chol は、投与前よりも投与終了時に増加傾向を示し、VA、VE、及び Alb が、投与終了時に同時期の対照群よりも有意に高かった。

以上の結果から、肥育中後期におけるプロバイオティクスの投与は、飼料の消化と吸収に関連して脂肪酸代謝に影響を及ぼし、一部の血中 FAs 濃度に変化することが明らかとなり、黒毛和種肥育牛の生産性に利益をもたらす可能性が示唆された。これはプロバイオティクスが濃厚飼料を多給する肥育牛の第一胃及び腸内細菌叢の恒常性維持に対して安定的な作用をもたらした結果と考えられた。

今後は、より有用なプロバイオティクス製剤の探索とともに投与時期、投与期間及び投与量等の検討や免疫機能との関連性など詳細なメカニズムの検討が必要であるが、肥育中後期におけるプロバイオティクスの投与は、牛体の腸内細菌及び飼料由来 FAs の代謝物間との相互作用を高め、濃厚飼料の多給に依存した現在の黒毛和種肉用牛の飼養形態の中で脂質バランスを調整するための有効な一手段として応用が期待できる。



## SUMMARY

In recent years, the breeding of Japanese Black cattle has shifted from a family-owned small-scale breeding system to a cost-oriented breeding system centered on large amounts of roughage and concentrated feed purchased from overseas. As a result, chronic inflammatory diseases such as respiratory diseases, arthritis, and otitis media increase, and it is presumed that the immune system is weakened by special feeding. Therefore, in this study, we focused on lipids, which are one of the three major nutrients that play an important role in individual immunity, which have not been reported in detail so far. The purpose of this study is to clarify the dynamics of blood fatty acids in Japanese Black fattening cattle and to investigate the effect of probiotics administration, which has been widely used in the livestock field in recent years, on blood FAs concentration. And it is to clarify the effectiveness for improving the productivity of fattening cattle.

In Chapter 2, 120 Japanese Black female fattening cattle 9 to 30 months old were used as test cattle to investigate changes in blood FAs concentration and their relationship with blood biochemical test values. As a result, among PUFAs, LA of  $\omega 6$  FAs increased significantly in the early middle stage of fattening, and the high level was maintained until the finishing stage, but AA remained almost unchanged. In addition EPA, which is an  $\omega 3$  FAs, showed a significant decrease after the early middle stage of fattening, and an increase in the  $\omega 6/\omega 3$  ratio was revealed. Looking at the correlation with blood biochemical test values, T-Cho which is an evaluation index of energy metabolism, was positively correlated with

SFAs and LA, DGLA. However, the correlation with AA, which belongs to the same  $\omega$ 6 FAs, was weak, and FFA showed a positive correlation with  $\omega$ 9 FAs.

From the above results, in Japanese Black female fattening cattle, an increase in  $\omega$ 6 FAs, mainly LA, and a significant decrease in  $\omega$ 3 FAs were observed with the progress of fattening, and as a result, an increase in the  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 ratio was confirmed. On the other hand, no significant increase in AA, which is the base point of inflammatory eicosanoids, was observed, suggesting that the qualitative equilibrium of lipid function may be maintained even when the  $\omega$ 6/ $\omega$ 3 ratio is high. However, at the same time, it became clear that EPA, which is the base point of anti-inflammatory eicosanoids, decreased from the early stage after the start of fattening, suggesting that even minor stress factors may cause imbalance in the immune system.

In Chapter 3, probiotics were administered to Japanese Black fattening cattle in the late middle stages of fattening, and the effects of probiotics on fatty acid metabolism were investigated from blood FAs concentrations and blood biochemical test values. Eighteen clinically healthy Japanese Black female fattening cattle raised on the same fattening farm were randomly assigned to a probiotics group (n = 9) and a control group (n = 9). In the probiotics group, 50 g of probiotics were administered per animal per day from 18 months old between 2 months. Blood was collected total four times, before the start of probiotics administration and two, three, and eight months after the start of probiotics administration, and submitted to the test. In the probiotics group, PA, LA, AA and ALA tended to increase at the

end of administration compared to before administration of probiotics. Furthermore, the concentrations of OA and ALA were significantly higher than those of the control group at the end of probiotics administration, and as a result, MUFAs were significantly higher, and  $\omega 6/\omega 3$  ratio was significantly lower. In addition, T-Cho in the probiotics group showed an increasing tendency at the end of administration than before administration, and VA, VE and Alb were significantly higher than those of the control group.

From the above results, it was clarified that the administration of probiotics in the late middle stages of fattening affects the fatty acid metabolism related to the digestion and absorption of feed, and the FAs concentration in some blood increases. It has been suggested that it may help Japanese Black fattening cattle productivity. This is considered to be the result of probiotics having a stable effect on the maintenance of homeostasis of the rumen and intestinal flora of fattening cattle fed with a large amount of concentrate.

In the future, it will be necessary to search for more useful probiotics preparations, examine the administration time, administration period, dosage, etc., and investigate detailed mechanisms such as the relationship with immune function. Administration of probiotics in the late middle stages of fattening period in Japanese Black cattle is expected to be applied as an effective means for enhancing the interaction between the intestinal bacteria of cattle and the metabolites of feed-derived FAs and adjusting the lipid balance.

## 謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜りました鹿児島大学共同獣医学部 三角一浩教授、安藤貴朗准教授に心より感謝申し上げます。

学位論文審査においては、主査としてご指導いただきました、山口大学共同獣医学部 高木光博教授に深謝いたします。

また、本研究を進めるにあたり、調査当初からデータ収集にご協力いただきました鹿児島県農業共済組合北薩家畜診療センターの獣医師の皆様にも心から深謝いたします。最後に妻、子供をはじめとする家族の協力に対して心から感謝します。

## 引用文献

- [1] Abd El-Tawab, M. M., Youssef, I. M. I., Bakr, H. A., Fthenakis, G. C. and Giadinis, N. D. 2016. Role of probiotics in nutrition and health of small ruminants. *Pol. J. Vet. Sci.* 19: 893-906.
- [2] Adachi, K., Kawano, H., Tsuno, K., Nomura, Y., Katsura, N., Arikawa, A., Tsuji, A. and Onimaru, T. 1997. Values of the serum components in Japanese black beef steers at farms with high productivity and low frequencies of disease and death in Miyazaki Prefecture. *J. Vet. Med. Sci.* 59: 873-877.
- [3] 秋庸裕, 小埜和久, 鈴木修. 2000. 哺乳類の $\Delta$ -6 脂肪酸不飽和化酵素:その遺伝子クローニングと生理学的意義. 日本油化学会誌. 49: 3-10.
- [4] Bang, H. O., Dyerberg, J. and Nielsen, A. B. 1971. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. *The Lancet.* 1: 1143-1145.
- [5] Beauchemin, K. A., Yang, W. Z., Morgavi, D. P., Ghorbani, G. R., Kautz, W. and Leedle, J. A. Z. 2003. Effects of bacterial direct-fed microbials and yeast on site and extent of digestion, blood chemistry, and subclinical ruminal acidosis in feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81: 1628-1640.
- [6] Brumby, P. E., Anderson, M., Tuckley, B., Storry, J. E. and Hibbit, K. G. 1975. Lipid metabolism in the cow during starvation-induced ketosis. *Biochem. J.* 146: 609-615.

- [7] Calder, P. C. 2006. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am. J. Clin.* 83:1505S-1519S.
- [8] Calder, P. C. 2012. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J. Nutr.* 142: 592S-599S.
- [9] Chen, C C., Kong, M. S., Lai, M. W., Chao, H. C., Chang, K. W., Chen, S. Y., Huang, Y. C., Chiu, C. H., Li, W. C., Lin, P. Y., Chen, C. J. and Li, T. Y. 2010. Probiotics have clinical, microbiologic, and immunologic efficacy in acute infectious diarrhea. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **29**: 135-138.
- [10] Colombo, E. A., Cooke, R. F., Brandão, A. P., Wiegand, J. B., Schubach, K. M., Sowers, C. A., Duff, G. C. Block, E. and Gouvêa, V. N. 2021. Performance, health, and physiological responses of newly received feedlot cattle supplemented with pre- and probiotic ingredients. *Animal.* 15: 100214.
- [11] Dryden, F. D. and Maechello, J. A. 1970. Influence of total lipid and fatty acid composition upon the palatability of three bovine muscles. *J. Anim. Sci.* 31: 36-41.
- [12] 遠藤彰, 田賀千尋, 笹木教隆. 2016. 黒毛和種肥育牛における脂肪組織中のオレイン酸割合に及ぼす遺伝的および給与飼料の影響. 福井県畜産試験場研究報告. 29: 1-5.

[13] Eric, N. P., Neil, J. M. and Andrew, J. S. 2006. Effect of feeding systems on omega-3 fatty acids, conjugated linoleic acid and trans fatty acids in Australian beef cuts: potential impact on human health. *Asia. Pac. J. Clin. Nutr.* 15: 21-29.

[14] FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Ontario. 2002.  
[https://www.who.int/foodsafety/fs\\_management/en/probiotic\\_guidelines.pdf](https://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf)

[15] Fouladi-Nashta, A. A., Gutierrez, C. G., Gong, J. G., Garnsworthy, P. C. and Webb, R. 2007. Impact of dietary fatty acids on oocyte quality and development in lactating dairy cows. *Biol Reprod.* 77: 9-17.

[16] 橋元大介, 岩元禎, 川口雅彦, 中西良孝. 2013. 黒毛和種去勢牛の肥育後期における米ぬかまたは脂肪酸カルシウム添加飼料の給与が産肉性, 食肉の理化学特性ならびに官能特性に及ぼす影響. 日本暖地畜産学会報. 56: 151-157.

[17] Hayakawa, T., Masuda, T., Kurosawa, D. and Tsukahara, T. 2016. Dietary administration of probiotics to sows and/or their neonates improves the reproductive performance, incidence of post-weaning diarrhea and histopathological parameters in the intestine of weaned piglets. *Anim. Sci. J.* 87: 1501-1510.

- [18] Herdmann, A., Martin, J., Nuernberg, G., Dannenberger, D. and Nuernberg, K. 2010. Effect of dietary n-3 and n-6 PUFA on lipid composition of different tissues of German Holstein bulls and the fate of bioactive fatty acids during processing. *J. Agric. Food. Chem.* 58: 8314-8321.
- [19] Hochi, S., Kato, m., Ito, K., Hirabayashi, M., Ueda, M., Sekimoto, A., Nagao, Y., Kimura, K. and Hanada, A.2000. Nuclear transfer in cattle: effect of linoleic acid-albumin on freezing sensitivity of enucleated oocytes. *J. Vet. Med. Sci.* 62: 1111-1113.
- [20] Hua, M. C., Lin, T. Y., Lai, M. W., Kong, M. S., Chang, H. J. and Chen, C.C. 2010. Probiotic Bio-Three induces Th1 and anti-inflammatory effects in PBMC and dendritic cells. *World. J. Gastroenterol.*16: 3529-3540.
- [21] Huang, Y. F., Liu, P. Y., Chen, Y. Y., Nong, B. R., Huang, I. F., Hsieh, K. S. and Chen, K. T. 2014. Three-combination probiotics therapy in children with salmonella and rotavirus gastroenteritis. *J. Clin. Gastroenterol.* 48: 37-42.
- [22] Ichi, I., Kono, N., Arita, Y., Haga, S., Arisawa, K., Yamano, M., Nagase, M., Fujiwara, Y. and Arai, H. 2014. Identification of genes and pathways involved in the synthesis of Mead acid (20:3n-9), an indicator of essential fatty acid deficiency. *Biochim. Biophys. Acta.* 1841: 204-213.



- [23] Ichijo, T., Kohno, M., Yoshida, Y., Kinami, A., Kikuchi, T., Takahashi, C. and Numatsu, K. 2010. Effect of administering BIO-THREE, a probiotic, during the early to middle fattening period in Japanese Black Fattening Cattle. *Jpn. J. Large. Anim. Clin.* 1: 10-14.
- [24] 亀上知世子, 牛田一成. 2014. 畜産領域におけるプロバイオティクスの現状と問題点. *腸内細菌学雑誌*. 28: 147-154.
- [25] Kanda, Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone. Marrow. Transplant.* 48: 452-458.
- [26] Kato, Y., Ito, M. and Hirooka, H. 2011. Genetic parameters of serum vitamin A and total cholesterol concentrations and the genetic relationships with carcass traits in an F1 cross between Japanese Black sires and Holstein dams. *J. Anim. Sci.* 89: 951-958.
- [27] 木村信熙. 2012. 肥育牛の栄養と感染症—飼養管理と免疫の関連性を探る—. *家畜感染症学会誌*. 1: 59-62.
- [28] Lafleur, R. L., Malazdrewich, C., Jeyaseelan, S., Bleifield, E., Abrahamsen, M.S. and Maheswaran, S.K. 2001. Lipopolysaccharide enhances cytolysis and inflammatory cytokine induction in bovine alveolar macrophages exposed to *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* leukotoxin. *Microb. Pathog.* 30: 347-357.

[29] Mandell, I. B., Buchanan-Smith, J. B. and Campbell, C. P. 1998. Effects of forage vs grain feeding on carcass characteristics, fatty acid composition, and beef quality in Limousin-cross steers when time on feed is controlled. *J. Anim. Sci.* 76: 2619-2630.

[30] Markowiak, P. and Ślizewska, K. 2018. The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut. Pathog.* 10: 21.

[31] 松田敬一. 2015. 黒毛和種肥育牛における飼養管理と炎症性疾患の関係. 家畜感染症学会誌. 4: 49-60.

[32] Matsushashi, T., Maruyama, S., Uemoto, Y., Kobayashi, N., Mannen, H., Abe, T., Sakaguchi, S. and Kobayashi, E. 2011. Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle. *J. Anim. Sci.* 89: 12-22.

[33] Melton, S. L., Amiri, M., Davis, G. W. and Backus, W. R. 1982. Flavor and chemical characteristics of ground beef from grass-, forage-grain-and grain finished steers. *J. Anim. Sci.* 55: 77-87.

[34] 三橋忠由, 三津本充, 山下良弘, 小沢忍. 1988. 黒毛和種去勢牛の発育にともなう蓄積脂肪の融点と脂肪酸組成の変化. 中国農研報. 2: 43-51.

- [35] 三橋忠由. 1991. 牛脂肪組織からの脂肪酸放出. 栄養生理研究会報. 34: 39-50.
- [36] Miyamoto, J., Igarashi, M., Watanabe, K., Karaki, S., Mukouyama, H., Kishino, S., Li, X., Ichimura, A., Irie, J., Sugimoto, Y., Mizutani, T., Sugawara, T., Miki, T., Ogawa, J., Drucker, D. J., Arita, M., Itoh, H. and Kimura, I. 2019. Gut microbiota confers host resistance to obesity by metabolizing dietary polyunsaturated fatty acids. *Nat. Commun.* 10: 4007.
- [37] Montgomery, S. P., Drouillard, J. S., Nagaraja, T. G., Titgemeyer, E. C. and Sindt, J. J. 2008. Effects of supplemental fat source on nutrient digestion and ruminal fermentation in steers. *J. Anim. Sci.* 86: 640-650.
- [38] 長瀬隆英. 2004. 脂質メデイエーターと肺疾患. 日内会誌. 93: 1206-1210.
- [39] 二宮利治. 2018. 脂肪酸クオリティと疾患リスク. 医学のあゆみ. 264: 939-943.
- [40] Nogalski, Z., Wroński, M., Sobczuk-Szul, M., Mochol, M. and Pogorzelska, P. 2012. The Effect of Body Energy Reserve Mobilization on the Fatty Acid Profile of Milk in High-yielding Cows. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 25: 1712-1720.
- [41] Nomura, T., Tsuchiya, Y., Nashimoto, A., Yabusaki, H., Takii, Y., Nakagawa, S., Sato, N., Kanbayashi, C. and Tanaka, O. 2007. Probiotics

reduce infectious complications after pancreaticoduodenectomy.

*Hepatogastroenterology*. 54: 661-663.

[42] 農林水産省．動物医薬品検査所．2019．動物用医薬品等販売高年報（Annual Report of Sales Amount and Sales Volume of Veterinary drugs, Quasi-drugs and Medical Devices）.

<https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/index.html>

[43] 農林水産省大臣官房統計部．2021．農林水産統計（畜産統計）令和3年．農林水産省．<https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tikusan/>

[44] Ohashi, Y. and Ushida, K. 2009. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. *Anim. Sci. J.* 80: 361-371.

[45] Oka, A., Maruo, Y., Miki, T., Yamasaki, T. and Saito, T. 1998. Influence of vitamin A on the quality of beef from the Tajima strain of Japanese Black cattle. *Meat. Sci.* 48: 159-167.

[46] 乙丸孝之介，志賀英恵，柳田孝司．2012．鹿児島県における黒毛和種肥育雌牛の血液生化学的性状．産業動物臨床医誌．3: 169-173.

[47] Otomaru, K. and Inatomi, T. 2017. Effect of a probiotic product during the late fattening period in Japanese Black steers. *Jpn. J. Large. Anim. Clin.* 8: 15-19.

- [48] 小沢昭夫, 高柳香都子, 藤田孝夫, 平井愛山, 浜崎智仁, 寺野隆, 田村泰, 熊谷朗. 1982. ガスクロマトグラフィーを用いたヒト血しょう総脂質の高級脂肪酸の定量法について. *BUNSEKI KAGAKU*. 31: 87-91.
- [49] Polan, C. E., Mcneil, J. J. and Tove, S.B. 1964. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids by rumen bacteria. *J. Bact.* 88: 1056-1064.
- [50] Qadis, A. Q., Goya, S., Yatsu, M., Kimura, A., Ichijo, T. and Sato, S. 2014. Effects of a Bacteria-Based Probiotic on Subpopulations of Peripheral Leukocytes and Their Cytokine mRNA Expression in Calves. *J. Vet. Med. Sci.* 76: 189-195.
- [51] Robinson, R. S., Pushpakumara, P. G. A., Cheng Z., Peters, A. R., Abayasekara, D. R. E. and Wathes, D. C. 2002. Effects of dietary polyunsaturated fatty acids on ovarian and uterine function in lactating dairy cows. *Reproduction*. 124: 119-131.
- [52] Seo, G., Akimoto, Y., Hamashima, H., Masuda, K., Shiojima, K., Sakuma, C., Sasatsu, M. and Arai, T. 2000. A new factor from *Bacillus mesentericus* which promotes the growth of *Bifidobacterium*. *Microbios*. 101: 105-114.
- [53] Serhan, C. N. 2014. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature* 510: 92-101.

- [54] 清水俊明. 2012. n-3系多価不飽和脂肪酸の小児における有用性. *J. Lipid. Nutr.* 21: 217-229.
- [55] Smith, S. B., Kawachi, H., Choi, C. B., Choi, C. W., Wu, G. and Sawyer, J. E. 2009. Cellular regulation of bovine intramuscular adipose tissue development and composition. *J. Anim. Sci.* 87: 72-82.
- [56] 高橋正弘, 山本公平. 2017. 牛の繁殖性や過剰排卵反応に及ぼす多価不飽和脂肪酸の効果. 産業動物臨床医誌. 8: 201-207.
- [57] 竹山廣光, 社本智也. 2014. 脂質メディエーター. 静脈経腸栄養. 29: 5-10.
- [58] 田中桂一. 1974. 第一胃内における長鎖脂肪酸の代謝について. 日畜会報. 45: 307-318.
- [59] Trevisi, E., Grossi, P., Piccioli, C. F., Cogrossi, S. and Bertoni, G. 2011. Attenuation of inflammatory response phenomena in periparturient dairy cows by the administration of an  $\omega$ 3 rumen protected supplement containing vitamin E. *Ital. J. Anim. Sci.* 10: 277-286.
- [60] Tsukahara, T., Inatomi, T., Otomaru, K., Amatatsu, M., Romero-Pérez, G. A. and Inoue, R. 2018. Probiotic supplementation improves reproductive performance of unvaccinated farmed sows infected with porcine epidemic diarrhea virus. *Anim. Sci. J.* 89: 1144-1151.

[61] 常石英作, 滝本勇治, 西村宏一, 渡辺彰, 武田尚人. 1988. 放牧飼養が肉牛の体脂肪および筋肉の脂肪酸組成に及ぼす影響. 日畜会報. 59: 614-618.

[62] Uyeno, Y., Shigemori, S. and Shimosato, T. 2015. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes. Environ.* 30: 126-132.

[63] Vandehaar, M. J., Yousif, G., Sharma, B. K., Herdt, T. H., Emery, R. S., Allen, M. S. and Liesman, J. S. 1999. Effect of energy and protein density of prepartum diets on fat and protein metabolism of dairy cattle in the periparturient period. *J. Dairy Sci.* 82: 1282-1295.

[64] Wall, R., Ross, R. P., Shanahan, F., O'Mahony, L., Kiely, B., Quigley, E., Dinan, T. G., Fitzgerald, G. and Stanton, C. 2010. Impact of Administered *Bifidobacterium* on Murine Host Fatty Acid Composition. *Lipids.* 45: 429-436.

[65] Warensjö, E., Rosell, M., Hellenius, M. L., Vessby, B., Faire, U.D. and Risérus, U. 2009. Associations between estimated fatty acid desaturase activities in serum lipids and adipose tissue in humans: links to obesity and insulin resistance. *Lipids. Health. Dis.* 8: 37.

[66] 渡辺大作, 小松咲, 渡邊菜美, 安藤貴朗, 大塚浩通, 富岡美千子, 高岸聖彦, 大橋秀一. 2011. 黒毛和種肥育去勢牛の月齢および血液成分と白血球ポピュレーションとの関連性. 産業動物臨床医誌. 2: 20-29.

- [67] Yano, H., Ohtsuka, H., Miyazawa, M., Abiko, S., Ando, T., Watanabe, D., Matsuda, K., Kawamura, S., Arai, T. and Morris, S. 2009. Relationship between immune function and serum vitamin A in Japanese black beef cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 199-202.
- [68] Yoshida, E., Iwamoto, E. and Oka, A. 2015. Effect of rice bran, rice flour, and crushed rice on carcass characteristics and fatty acid composition of carcass fat in Japanese Black Steers. *Bull. Hyogo Pre. Tec. Cent. Agri. Forest. Fish. (Animal Husbandry)*. 51: 20-26.
- [69] Zachut, M., Dekel, I., Lehrer, H., Arieli, A., Arav, A., Livshitz, L., Yakoby, S. and Moallem, U. 2010. Effects of dietary fats differing in n-6: n-3 ratio fed to high-yielding dairy cows on fatty acid composition of ovarian compartments, follicular status, and oocyte quality. *J. Dairy. Sci.* 93: 529-545.
- [70] Zembayashi, M., Nishimura, K., Lunt, D. K. and Smith, S. B. 1995. Effect of breed type and sex on the fatty acid composition of subcutaneous and intramuscular lipids of finishing steers and heifers. *J. Anim. Sci.* 73: 3325-3332.
- [71] Zhang, L., Jiang, X., Liu, X., Zhao, X., Liu, S., Li, Y. and Zhang, Y. 2019. Growth, health, rumen fermentation, and bacterial community of Holstein calves fed *Lactobacillus rhamnosus* GG during the preweaning stage. *J. Anim. Sci.* 97:2598-2608.



[72] Zhang, R., Dong, X., Zhou, M., Tu, Y., Zhang, N., Deng, K. and Diao, Q. 2017. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* and *Bacillus subtilis* on rumen fermentation and the bacterial community in calves. *Anim. Sci. J.* 88: 755-762.