

給与飼料の不良発酵による揮発性塩基態窒素の
上昇が泌乳牛の代謝，免疫機能および
受胎率に及ぼす影響

平成 28 年
(2016)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科
博士後期課程 畜産衛生学専攻
角田 英

Effects of increase in feed-derived volatile basic
nitrogen levels originated from poor-fermented
feed on metabolism, immune function, and
conception rate in lactating cows

2016

Ei TSUNODA

Doctoral program in Animal and Food Hygiene

Graduate School of Animal Husbandry

Obihiro University of

Agriculture and Veterinary Medicine

目次

| | |
|----------|----|
| 略語一覧 | 2 |
| 緒言 | 3 |
| 第Ⅰ章 | |
| 1. 序言 | 10 |
| 2. 材料と方法 | 11 |
| 3. 結果 | 20 |
| 4. 考察 | 25 |
| 5. 小括 | 29 |
| 第Ⅱ章 | |
| 1. 序言 | 31 |
| 2. 材料と方法 | 32 |
| 3. 結果 | 35 |
| 4. 考察 | 38 |
| 5. 小括 | 40 |
| 総合考察 | 41 |
| 総括 | 45 |
| Summary | 48 |
| 引用文献 | 50 |
| 謝辞 | 56 |

略語一覧

| | |
|-------|--|
| AI | 人工授精、artificial insemination |
| AST | アスパラギン酸トランスフェラーゼ、aspartate transferase |
| BHBA | β ヒドロキシ酪酸、beta-hydroxybutyric acid |
| BUN | 血液尿素窒素、blood urea nitrogen |
| CP | 粗タンパク質、crude protein |
| CS | コーンサイレージ、corn silage |
| DIM | 泌乳日数、days in milk |
| DMI | 乾物摂取量、dry matter intake |
| GGT | γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ、gamma-glutamyltranspeptidase |
| Glu | グルコース、glucose |
| GS | グラスサイレージ、grass silage |
| MUN | 乳中尿素態窒素、milk urea nitrogen |
| NEFA | 非エステル型脂肪酸、non-esterified fatty acid |
| PMN | 多形核白血球、polymorphonuclear leukocyte |
| ROS | 活性酸素種、reactive oxygen species |
| T-cho | 総コレステロール、total cholesterol |
| TMR | 完全混合飼料、total mixed ration |
| TN | 総窒素、total nitrogen |
| VBN | 揮発性塩基態窒素、volatile basic nitrogen |
| WBCL | 全血中の化学発光、whole blood chemiluminescence |

緒 言

乳牛の高泌乳化と問題点

近年、日本を含む先進国の乳牛において、遺伝的改良と飼養管理の向上により高泌乳化が進んできた。一方で、乳量の増加に伴い分娩間隔の増加や受胎に至るまでの人工授精の回数の増加といった繁殖成績の悪化が問題となってきた。

高泌乳化に伴う繁殖成績の低下については、分娩後の負のエネルギーバランス（NEB）が大きな要因になることが知られている [1, 2]。乳量は分娩後から急激に増加して 4~8 週目にピークに達するが [3]、飼料摂取量には限りがあるため、この時期は摂取エネルギー量より生産として排泄するエネルギー量が多くなる。不足しているエネルギーは、体脂肪などの蓄積養分から動員し、結果として牛は負のエネルギーバランスに陥る [2, 4]。採食量は、10~18 週目にピークに達するために [3]、特に分娩後最初の 1 か月では深刻な負のエネルギーバランスが生じやすく、繁殖能力への悪影響、免疫能の低下、代謝病の増加を引き起こす [1, 2, 4]。このため、負のエネルギーバランスを改善するような管理が重要となる。

負のエネルギーバランスを改善するうえで、高エネルギー飼料である濃厚飼料は重要な役割を担っている。しかしながら、過度な濃厚飼料の増給は、第一胃内の発酵異常を引き起こし、ルーメンアシドーシスなどの疾病を引き起こす [5, 6]。したがって、適切な粗飼料割合を常に考慮し、第一胃内の発酵を安定的に維持するために、濃厚飼料に頼り切らない給与が要求される。そのためには、乾物摂取量（DMI）を高める飼養管理が必要不可欠である。乾物摂取量は、飼料構成、飼料品質、環境要因など多要因により影響されるので、これらの要因に対して牛の不快指数を低くすることが重要である [3, 7]。したがって、適切な飼料設計、飼料給与管理、快適な環境は、

DMI の向上、及び負のエネルギーバランスの改善、繁殖成績の改善につながるため乳牛の飼養管理における基本的要因である。

サイレージの品質低下と乳牛の健康被害

サイレージ技術は、高水分の作物を長期間保存することができるため、作物が入手困難な冬の間も家畜に栄養分を供給する手段として、何世紀にもわたって重要な役割を担ってきた。長期保存は、密封により嫌気状態を保つことで、好気性菌の増殖を抑えて、乳酸菌の増殖を促進させ、増殖した乳酸菌が炭水化物を乳酸に変えることで pH を低下させ、不良発酵を防止することにより可能になる [8, 9]。その際、飼料中のタンパク質の一部は分解されてアンモニアやアミン類などの揮発性塩基態窒素 (VBN) に変化する。この変化は、サイレージの製造または調整や保存における不適切な管理によりよって増大し、乳牛の健康に害を及ぼす [3, 8-12] (Figure 1)。サイレージの詰込み密度の低下や不適切な飼料の取り出しは、サイレージと空気の接触を促進し、好気性菌を増殖させ、発熱を伴う 2 次発酵が促進される (Figure 1 ①)。主な好気性菌には、酵母、カビ、バチルス属などがあり、サイレージが好気性環境にさらされると、まず酵母が増殖する。これらの好気性菌の中には、直接的に乳牛の疾病に関与する菌も多く存在し、給与飼料に混在した場合、マイコトキシン中毒や乳房炎などの疾病を引き起こすことが知られている [9, 10]。また、酵母はサイレージ中の乳酸などの有機酸や水溶性炭水化物を分解利用するために、サイレージの pH が高くなる。サイレージの pH が高くなると、その他のカビやバチルス属など雑菌の増加につながる。

酪酸菌は低水分飼料において増加が抑制されることが知られているが、水分調整の失敗や大雨などでサイロが浸水して高水分になり水溶性炭水化物濃度が低下すると増加する (Figure 1 ②)。酪酸菌もまた乳酸を分解し、酪酸を産生するためにサイレ

ージの pH がさらに高くなる。酪酸菌はタンパク質を分解し、アンモニアやアミン類などの VBN を産生する。飼料中の VBN 濃度が泌乳牛に及ぼす影響についての直接的な報告はほとんどないが、高タンパク質飼料や尿素添加などにより第一胃内アンモニア濃度が高くなると、肝機能障害や繁殖障害につながる事が知られている [3]。また、酪酸発酵が進んだサイレージでは DMI の低下やケトーシスを引き起こすことも知られている [9, 12]。このように不良発酵サイレージを乳牛に給与すると、DMI の低下、疾病の増加、繁殖性の低下など様々な健康障害に繋がる。したがって、不適切なサイレージ管理を行わないように注意することは言うまでもないが、定期的に飼料の品質を評価・判定することも重要である。

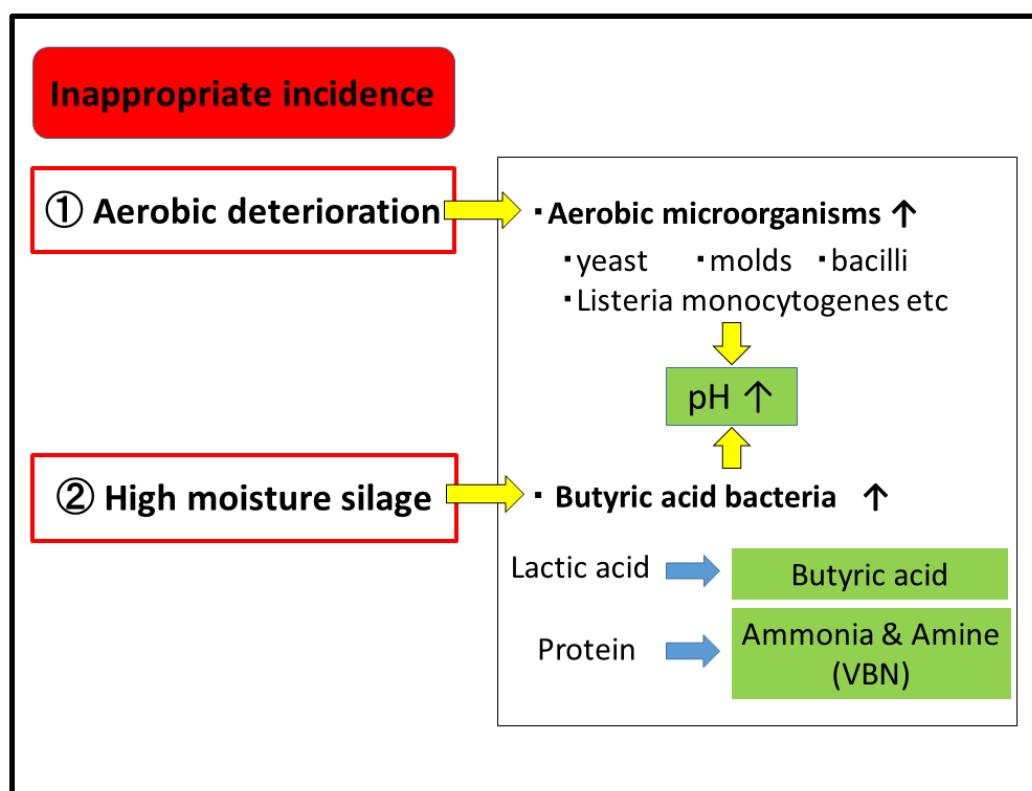


Figure 1 Effects of inappropriate incidence in grass silage on fermentative quality.

サイレージの発酵品質評価法

酪酸発酵が進んだ発酵品質の低いサイレージでは、pH が高く、酪酸やアンモニア含量が多く、乳酸含量が少なくなるため [10, 13]、サイレージの発酵品質を化学的に評価するときには、pH、有機酸含量、VBN 含量で評価する方法が用いられている。

日本でのサイレージ発酵品質評価は、フリーク評点や V スコアによって行われている。フリーク評点は、サイレージ中の乳酸、酢酸、酪酸の重量比に基づいた評点法であり、特に乳酸発酵の良否が重要視される評点法である [14]。しかし本法では、牧草ロールサイレージなどの低水分サイレージでは発酵全般が抑えられているために、保存状態が良好であるにもかかわらず高得点になることはなく、この方法は適さない。さらに、不良発酵過程で生じるアンモニアについては、フリーク評点では評価の対象になっていない。

V スコアは、サイレージの発酵品質を化学的に評価する方法であり、有機酸だけでなく VBN/ TN（全窒素）、VFA 濃度などに基づいて減点方式で総合的に判定算出する方法である [14]。評価において VBN 濃度の配点が高くなっており、不良発酵が起きていると顕著に点数に反映される。また、材料水分に関わりなく同一の評価ができるためにサイレージの発酵品質評価において広く使われている評価法である。

飼料中の VBN 変動と泌乳牛への影響

通常、サイレージの VBN は、第一胃内においては溶解性タンパク質として微生物に利用される。そのため、不良発酵サイレージを給与すると、溶解性タンパク質の割合が増加して、ルーメン内のアンモニア濃度上昇を引き起こすことが報告されている [15, 16]。ルーメン内のアンモニア濃度が上昇すると、ルーメン壁より吸収されるアンモニア量が増加し、吸収されたアンモニアは肝臓で解毒され尿素に変換される [17]。このようにアンモニアは窒素代謝の最終産物の尿素に合成され体外へと排泄

されるため健康な乳牛においては、従来問題視されることはなかった。しかしながら、肝臓へのアンモニアの流入量の増加に伴う初期免疫や繁殖成績に対する負の影響が懸念されている。例えば、ヒトの肝性脳症 [18]、ラット [19] とヒト [20] でヘリコバクターピロリ感染に関連した胃粘膜障害に際し、アンモニアが、初期免疫を担う細胞の多くを占める多形核白血球（PMN）に負の影響を与えることが報告されている。さらに、乳牛の栄養と繁殖の関係では、高タンパク質飼料給与による、血液尿素窒素（BUN）や乳中尿素窒素（MUN）濃度上昇に伴い繁殖成績が低下することが報告 [21-24] されている。しかしながら、これらの報告はヒトの特殊な病態の一徴候や極端な栄養管理の結果であり、牛における変質飼料に由来する VBN が与える影響についてはほとんど報告されていない。

本研究の目的と概要

前述してきた通り、サイレージの VBN 濃度は不良発酵の指標であり、乳牛の健康に対する悪影響も大きいと考えられるが、それにも関わらず実際に現場での飼料中の VBN 濃度変動が泌乳牛の健康に与えた影響についての報告はほとんどされていない。

そこで、本研究では、帯広畜産大学畜産フィールド科学センターにて、TMR 中の VBN 濃度の調査を 2012 年 10 月 1 日から 2013 年 7 月 15 日にわたっておこなったところ、期間中に急激な VBN 濃度の変動がみられたので、2 つの視点に立った解析をおこなった。

第 I 章では、上述した期間を給与した TMR 中の VBN 濃度変動を基準に 3 期間（期間 A：TMR 中の VBN 濃度が低濃度で安定していた期間；期間 B：TMR 中の VBN 濃度が急速に上昇し、高濃度の TMR が給与されていた期間；期間 C：TMR 中の VBN 濃度が B の期間と比較し低下した期間）に分けた。そして、この 3 期間における各期間の 80 頭規模の牛群の代謝状況、牛群より部分抽出した牛の末梢血中の PMN

の ROS 産生能、牛群の人工授精による受胎率を TMR 中の VBN 濃度変動によって分けた 3 期間で比較検討し、継続的な高濃度の VBN 濃度飼料を給与することの泌乳牛群への影響を詳細に調査した。

第 II 章では上述の牛群について、第 I 章の解析とは異なり、泌乳牛が摂取した TMR 中の VBN 濃度変動と血中 PMN の ROS 産生能の関係性について数日間のスパンに基づいた個体レベルの情報をリアルタイムに相関分析を中心に解析した。

本研究は、以上の 2 つの異なる解析をもって、帯広畜産大学畜産フィールド科学センターにおける 9 か月半に及ぶ TMR 中の VBN 濃度調査より、給与した TMR 中の VBN 濃度上昇に伴う泌乳牛の代謝、免疫機能及び受胎率に与える影響について示したケーススタディに基づいたものである。

第I章

高濃度の揮発性塩基態窒素を含む飼料の継続的な給与が
泌乳牛群の代謝、免疫機能および受胎率に及ぼす影響

1. 序 言

変質サイレージ給与は、乳牛に健康被害をもたらすことが知られている。例えば、酪酸発酵したサイレージを給与すると、酪酸中毒としてケトosisが集団発生したり [12]、カビ汚染された粗飼料を給与するとマイコトキシン中毒 [10, 25] による消化障害や不妊症に陥ったりする。

サイレージは、本来、乳酸産生菌により炭水化物を乳酸に変えて pH を低下させることにより保存する技術であるが [10]、その際、飼料中のタンパク質の一部は分解されてアンモニアやアミン類などの揮発性塩基態窒素 (VBN) に変化する。特に、原料が高水分のために糖含量が低くて乳酸菌が増殖できないと酪酸菌などの不良細菌が増殖し、サイレージ中の酪酸や VBN の割合が高くなる [10, 11]。このようにサイレージの品質は調整技術の良否によって大きく変化するため、発酵品質を評価することは極めて重要である。サイレージの品質評価法として、フリーク評点や McDonald の方法が知られており [26]、特に日本では V スコア [14] がよく知られている。

通常、サイレージの VBN は、第一胃内においては溶解性タンパク質として微生物に利用される。牧草サイレージが、サイロ内ではその一部が変質している場合などでは、CP 濃度に変化がなくとも、その部分である溶解性タンパク質の割合が増加する。飼料中の溶解性タンパク質が増加すると、ルーメン内アンモニア濃度が上昇し、ルーメン壁より吸収されるアンモニアの吸収量が増加する。アンモニアは肝臓で窒素代謝の最終産物の尿素に合成され体外へと排泄されるため、VBN 濃度の変化が乳牛に与える影響については調査されてこなかった。しかしながら、肝臓へのアンモニアの流入量の増加に伴う初期免疫や繁殖成績に対する負の影響が懸念されている。例えば、アンモニアが初期免疫機能に与える影響として、ヒトの肝性脳症 [18]、ラット [19] とヒト [20] でヘリコバクターピロリ感染に関連した胃粘膜障害に際し、アンモニア

が、初期免疫を担う細胞の多くを占める多形核白血球（PMN）に負の影響を与えることが報告されている。さらに、乳牛の栄養と繁殖の関係では、高タンパク質飼料給与による、BUN や MUN 濃度上昇に伴い繁殖成績が低下することが報告 [21-24] されている。

本研究では、帯広畜産大学畜産フィールド科学センターにて、飼料変敗の目安として VBN 濃度の調査を 2012 年 10 月 1 日から 2013 年 7 月 15 日に行ったところ、TMR 中の VBN 濃度が 3 期間（期間 A：VBN 濃度が低濃度で安定していた時期、期間 B：TMR 中の VBN 濃度が急速に上昇し、高濃度の TMR が給与されていた時期、期間 C：TMR 中の VBN 濃度が B の期間と比較し低下した期間）に分けてはっきりと異なる濃度を示した。そこで、その 3 期間における VBN 濃度の違いが泌乳牛群の代謝状況、その牛群より部分抽出した泌乳牛の末梢血中の PMN を中心にした活性酸素（ROS）産生能、牛群の人工授精による受胎率について、その関係性を調査した。特に、サイレージの不良発酵が急激に冬期間に起き VBN 濃度が増加し、それに伴う血中 PMN の ROS 産生能の明らかな上昇とともに肝機能ストレスが増加した。この一連の現象は、サイレージの不良発酵給与が牛群の健康にマイナスの影響を与えることを示すわかりやすい例と考えられるのでここに報告する。

2. 材料と方法

（1） 牛群の飼養管理

対象牛群は、帯広畜産大学畜産フィールド科学センターのホルスタイン種搾乳牛で、フリーストール牛舎に飼養されて、搾乳は 1 日 2 回（5：00, 17：00）、平均搾乳頭数 75 頭、平均日乳量 30 kg であった。

給与飼料は、バンカーサイロに貯蔵されているコーンサイレージ（CS）とグラス

サイレージ (GS) 主体の TMR (Table 1) で、毎日 8 : 00 と 15 : 00 に給与されていた。さらに乾草と水は自由摂取で、乳量に応じて配合飼料をフィードステーションで個別給与されていた。

Table 1. TMR ingredients and chemical composition during A, B, and C phases.

| Item | Phase | | |
|--------------------------------|-------|------|------|
| | A | B | C |
| Ingredient (kgDM) | | | |
| Grass hay | 1.3 | 1.2 | 2.3 |
| Grass silage | 6.6 | 5.7 | 2.8 |
| Corn silage | 7.1 | 6.0 | 7.7 |
| Earcorn silage | - | 1.3 | 1.3 |
| Beet pulp | 2.0 | 1.5 | 1.2 |
| Rice bran | - | - | 1.0 |
| Soybean meal | 1.5 | 1.5 | 1.5 |
| Rolled barley | - | - | 1.0 |
| Mixed concentrate | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Molasses | 0.2 | - | 0.2 |
| Vitamin-mineral supplement | 0.04 | 0.06 | 0.16 |
| Nutrient content (% DM) | | | |
| Crude protein | 15.3 | 15.7 | 15.4 |
| NDF | 41.0 | 39.8 | 35.6 |
| ADF | 22.7 | 22.0 | 21.2 |
| NFC | 34.4 | 35.8 | 37.5 |
| Ether extract | 3.4 | 3.4 | 3.3 |

DM, dry matter; NDF, neutral detergent fibre; ADF, acid detergent fibre;

NFC, non-fibre carbohydrate.

(2) 繁殖管理

分娩後 40 日目から、直腸検査または超音波画像診断装置で卵巣観察を行い、分娩後 60 日以降に発情行動が観察された牛に人工授精 (AI) を行った。また、直腸検査で明らかな発情兆候が確認された場合も発情とした。

(3) 調査概要

本調査の概要を Fig. 2 に示す。

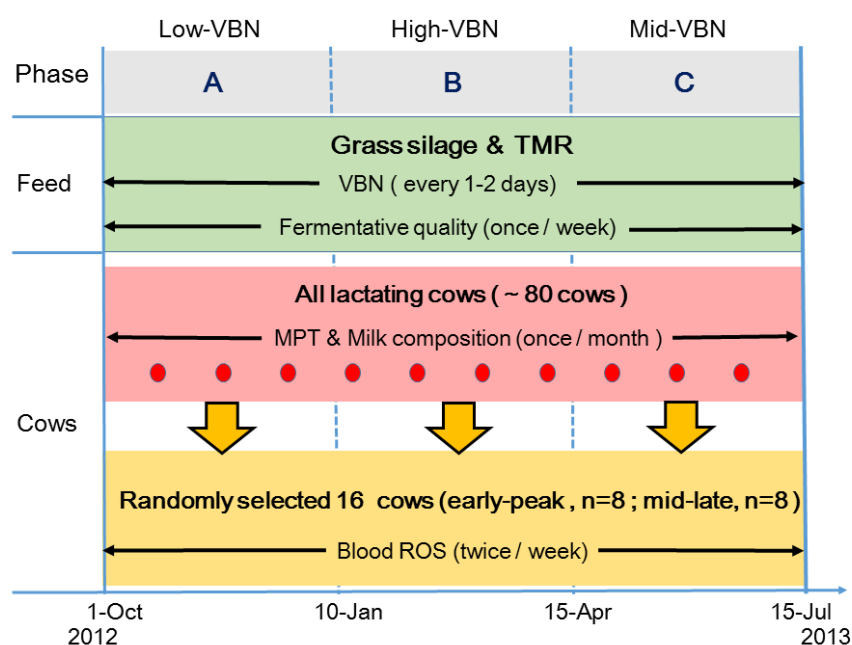


Figure 2. Design of the protocol. Changes in VBN during the period were classified into three phases: A, B, and C. Mean levels of VBN concentration drastically changed during divided three phase (see detail Figure 4). The concentrations of VBN in GS and TMR were measured every one to two days, and the quality of fermentation was assessed each week. Metabolic profile test (MPT) was conducted once every month. In order to investigate the ROS production of peripheral blood, blood samples were collected twice a week from 16 apparently healthy milking cows (early lactation and peak phase: 8 cows; mid-lactation phase and late phase: 8 cows).

(4) TMR 中の VBN 濃度に基づく期間わけの設定

TMR 中の VBN 濃度の高値の基準を下記の計算式より設定し、期間 B（高 VBN 濃度期間）を定義した。

$$\text{High-VBN concentration in TMR (\%DM)} = \text{median value} + 1 \text{ SD} = 0.14 (\%DM)$$

期間 B（高 VBN 濃度期間）は、下記に示す〔期間開始日〕から〔期間終了日〕までの間の期間と定義した（Fig. 3）。

〔期間開始日〕＝VBN 濃度が上昇し、中央値+SD を超えた期間が 2 週間以上続いたときの最初に中央値+SD を超えた日。

〔期間終了日〕＝VBN 濃度が低下し、中央値+SD を超えていない日が 2 週間以上続いたときに VBN 濃度が高い期間の終了とし、最後に VBN 濃度が中央値+SD を超えた日。

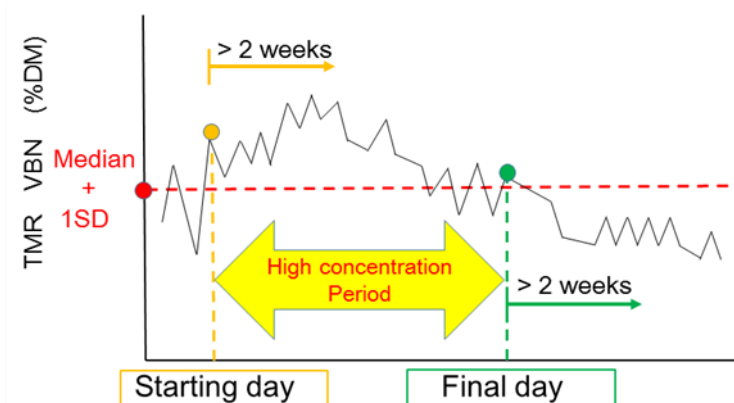


Figure 3. Illustrative diagram to show the starting and ending time point for the high VBN concentration period in the investigated period.

基準に基づいて分類した結果、本調査は下記の3期間に分類された (Fig. 4a)。

期間 A: TMR 中の VBN 濃度が低濃度で安定していた時期 (2012.10.1-2013.1.10)

期間 B: TMR 中の VBN 濃度が急速に上昇し、高 VBN 濃度の TMR が給与されていた時期 (2013.1.11-4.15)

期間 C: TMR 中の VBN 濃度が B の期間と比較し低下した時期 (2013. 4.16-7.15)

分類の結果、各期間の GS の pH の平均値は (A : 3.9、B : 4.8、C : 4.6)、GS の VBN の濃度平均 (% DM) は (A : 0.12、B : 0.48、C : 0.30)、TMR の VBN 濃度平均 (% DM) は (A : 0.08、B : 0.16、C : 0.10) となった (Fig. 4b)。

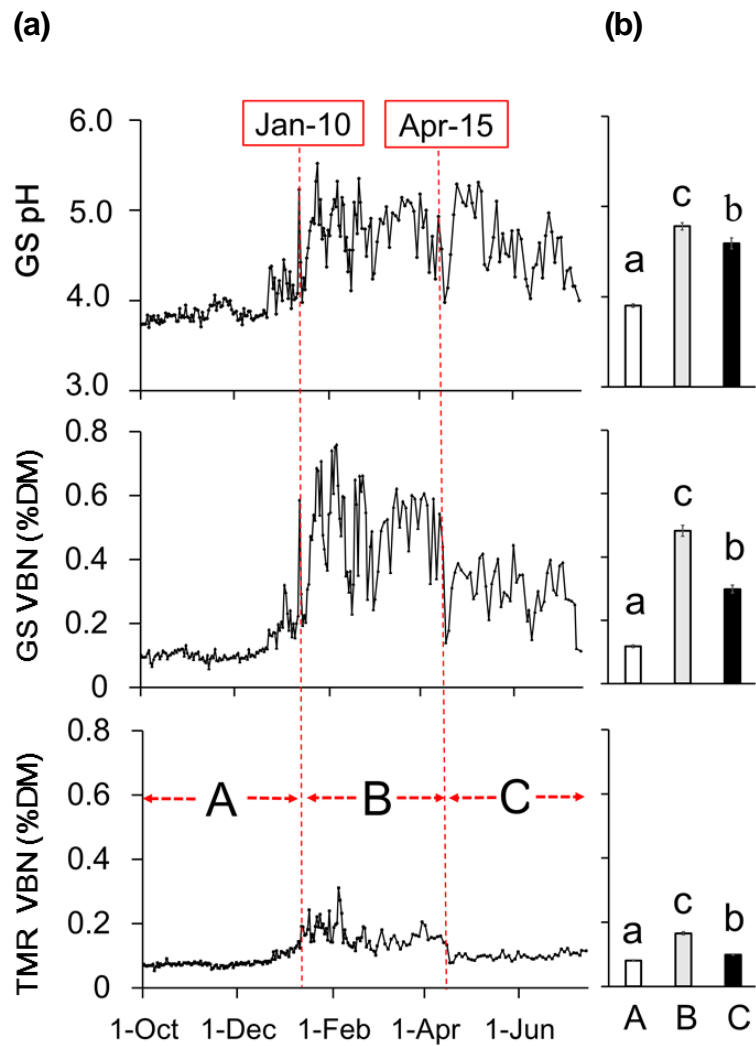


Figure 4. Changes in GS pH and VBN concentrations of GS and TMR. (a) shows the actual measurement data changes in GS pH, GS, and TMR during the study period. (b) shows mean value \pm SEM of GS pH, GS VBN and TMR VBN during each phase (A, $n = 99$; B, $n = 71$; C, $n = 45$). Different letters above the bars indicate significant difference ($P < 0.05$).

(5) Grass Silage (GS)・TMR 採取

毎日もしくは2日に1回、GSとTMRを採取した。GSは、15:00前にバンカーサイロでTMRを製造するのに使用したGSを採取。TMRは、15:00に製造直後のTMRを飼槽より採取した。採取したGS、TMRは、一部を化学成分分析のために-30℃で冷凍保存し、残りをVBN濃度測定に用いた。

(6) 血液サンプル採取

月一回、健康な搾乳牛全頭を対象に尾静脈血よりブレイン管(VP-P100K; Terumo, Tokyo, Japan)を用いて採取し、血液生化学検査に用いた。

週2回、任意の外見上健康な牛16頭(泌乳初期・最盛期:8頭、泌乳中期・後期:8頭)から尾静脈血をヘパリン管(VP-H070K; Terumo, Tokyo, Japan)を用いて採取し、末梢血中の白血球数、顆粒球数、Whole blood chemiluminescence (WBCL)の測定に用いた。

(7) 乳量・乳成分データ

個体別の乳量及び乳成分は月一回の乳検の記録 (Hokkaido Dairy Milk Recording & Testing Association, Sapporo, Japan)を活用した。

(8) Grass Silage (GS)・TMR の化学成分分析

GSとTMR中のVBN濃度は、各々のサンプルの抽出液より、微量拡散法[27]で測定した。抽出液は、各々のサンプルを5-10mmに細切断し、乾物15g相当量に蒸留水140mLを加え、サンプル瓶に入れ、数時間おきに攪拌しながら24時間冷蔵庫に保存した後、濾紙 (Quantitative Filters Papers 5A 185 mm; ADVANTEC, Tokyo, Japan)でろ過を行い、抽出液とした。各サンプルの乾物中濃度は、以下のように計算した。

$$\text{VBN (\%DM)} = A \times B / 15 \times 100$$

A : VBN concentration in extracted solution

B : total volume of extracting solution

GS の pH は、抽出液より突き刺し電極の pH メーター (pHSpear; AS ONE, Osaka, Japan) で毎日もしくは2日に1回測定をした。

発酵品質の分析は、凍結保存した TMR を1週間分ずつにまとめ、実施した (Tokachi Federation of Agricultural Cooperative Associations)。発酵品質は VBN/TN (総窒素)、乳酸、酢酸、酪酸、プロピオン酸を測定した。

(9) Grass Silage (GS) の発酵品質評価

GS の発酵品質の評価を McDonald [26] 及び V スコア [14] で評価した。両評価とも各期間中の平均値を評価に用いた。

(10) 血液生化学検査

血液サンプル採取後は、直ちに血清分離し、測定日まで -30°C で凍結保存した。測定は、化学自動分析装置 (TBA-120FR, Toshiba Medical Systems Co., Tochigi, Japan) を用い、血液尿素窒素 (BUN)、アスパラギン酸トランスフェラーゼ (AST)、γ グルタミルトランスフェラーゼ (GGT)、グルコース (Glu)、β ヒドロキシ酪酸 (BHBA)、非エステル型脂肪酸 (NEFA)、総コレステロール (T-cho) を測定した [28]。

(11) 白血球数・PMN 数

白血球数は、全自動血球計数器 (セルタック α; Nihon Kohden Corporation, Tokyo, Japan) を用いて測定した。また、PMN 数を算出するために、白血球を分離し、フロ

ーサイトメトリー (COULTER EPICS XL Flow Cytometer; Beckman Coulter Inc. Brea, CA, USA) を用いて白血球百分比 (PMN, リンパ球および単球の割合) を測定した。PMN 数は、白血球数と顆粒球の割合より算出した (PMN 数 = 白血球数 × 顆粒球の割合)。

(1 2) 全血中の化学発光の測定 (Whole blood chemiluminescence : WBCL)

WBCLは、採取した血液サンプルを約25°Cの保冷瓶で保持し、1時間以内に化学発光法で測定した。発光試薬は Luminol (5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthalazinedione; Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan)、刺激剤は Zymosan A (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan)を用い、生物・化学発光装置 (AB-2350, Phelios, Atto Corporation, Osaka) で、37°C で30分間測定を行った。発光量の測定は全て3連で行い、30分間の測定によって得られた発光量の総量の平均値を求めた。また、WBCL を顆粒球数で割り、血中の PMN 数当たりの ROS 産生量を算出した。

(1 3) 牛群の受胎率

各期間における搾乳牛における分娩後3回以内の人工授精を対象に受胎率を調査した。受胎率は下記のように計算した。

$$\text{Conception rate} = \text{the number of pregnant cows} / \text{total number of AI}$$

受胎は、AI 実施後 36 日目において、子宮内に胎子を確認できたものを受胎の定義とした。また、ホルモン処置を行った後に人工授精した牛とリピードブリーダー牛の AI については対象から除外した。

(14) 統計解析

統計学的解析には、SAS Enterprise Guide ver5.1 を用いた。

GS の VBN と TMR の VBN の相関関係を Spearman の順位相関係数で検定した。

3 期間における血液サンプルおよび乳サンプルの測定値の比較は、Kolmogorov-Smirnov test の結果、正規分布していなかったため、ノンパラメトリック検定を行った。各期間の測定値の比較は、Kruskal-Wallis 検定を行った後、有意差が確認された場合、多重比較はシェッフェの方法にて有意差を検定した。

各期間の受胎率の比較は、カイ二乗検定を行った。

全てのデータは mean ± SEM で示した。P<0.05 の場合に有意差ありとした。

3. 結 果

(1) 飼料品質

GS の VBN と TMR の VBN との間には有意な正の相関 ($\rho = 0.87, P < 0.0001$) が認められた。

有機酸の測定の結果を Table 2 に示す。GS、TMR とともに A の期間と比較して B と C の期間では、酪酸濃度、酢酸濃度、プロピオン酸濃度が有意に高値であった ($P < 0.05$)。一方で、乳酸濃度は、有意に低値であった ($P < 0.05$)。

GS の発酵品質の評価結果を Table 3 に示す。期間 A の GS は、McDonald と V—スコアの両評価法ともに良好であった。一方で、期間 B と C は GS の品質は不良であった。

Table 2. Organic acid concentration of GS and TMR. Compared to phase A, lactate concentration decreased rapidly during phase B, but a notable increase in the other three organic acids was observed, suggesting that a notable amount of aerobic fermentation occurred.

| Grass silage (% DM) | Phase | | |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | A | B | C |
| Lactic acid | 10.1 ± 1.0 ^a | 6.9 ± 2.0 ^b | 4.3 ± 1.6 ^c |
| Acetic acid | 1.88 ± 0.76 ^a | 4.70 ± 0.77 ^c | 3.92 ± 1.66 ^b |
| Butyric acid | 0.01 ± 0.00 ^a | 2.52 ± 0.85 ^c | 1.61 ± 0.55 ^b |
| Propionic acid | 0.05 ± 0.10 ^a | 0.72 ± 0.25 ^c | 0.53 ± 0.16 ^b |
| TMR (% DM) | | | |
| Lactic acid | 7.1 ± 0.1 ^a | 5.1 ± 0.1 ^b | 5.1 ± 0.1 ^b |
| Acetic acid | 1.17 ± 0.02 ^a | 1.95 ± 0.03 ^c | 1.71 ± 0.04 ^b |
| Butyric acid | 0.06 ± 0.01 ^a | 0.68 ± 0.03 ^c | 0.28 ± 0.02 ^b |
| Propionic acid | 0.05 ± 0.00 ^a | 0.21 ± 0.01 ^c | 0.13 ± 0.00 ^b |

The values for each parameter are the mean values ± SEM (A, n=102; B, n = 95; C, n = 91).

Different letters in the table indicate a significant difference (P < 0.05).

Table 3. Fermentative quality of grass silage assessed by McDonald and V-score

| Phase | McDonald [†] | | | | | | V-score [‡] | | |
|-------|-----------------------|---------|-----------|----------------|---------|-------------|----------------------|---------|-----------|
| | pH | | | VBN/TN | | | | | |
| | classification | average | (min-max) | classification | average | (min-max) | classification | average | (min-max) |
| A | good | 3.9 | (3.7-4.4) | very good | 4.3 | (3.2-7.4) | very good | 95 | (87-98) |
| B | very bad | 4.8 | (4.0-5.5) | very bad | 18.8 | (14.6-25.4) | bad | 6 | (0-57) |
| C | very bad | 4.6 | (4.0-5.3) | medium | 15.4 | (9.6-23.3) | bad | 38 | (2-79) |

[†]McDonald method criteria (McDonald & Whittenbury 1973)

- pH (≤4.2: good; 4.3-4.5: medium; ≥4.5: poor)
- VBN/TN (≤12.5: very good; 12.5-15.0: good; 15.1-17.5: medium; 17.6-20.0: poor; ≥20.1: very bad)

[‡]V-score criteria (Masaki *et al.* 1994)

80>: very good, 60-80; good, 60<: bad

(2) 血液生化学検査

血液生化学検査の結果を Fig. 5 に示す。

各血液生化学検査項目は、全てが基準値 [27] の範囲内であった。しかし 3 期間で比較すると、A の期間に対して、B と C の期間では BUN、AST、T-cho、が有意に高値で ($P < 0.05$)、さらに B では GGT も有意に高値であった ($P < 0.05$)。

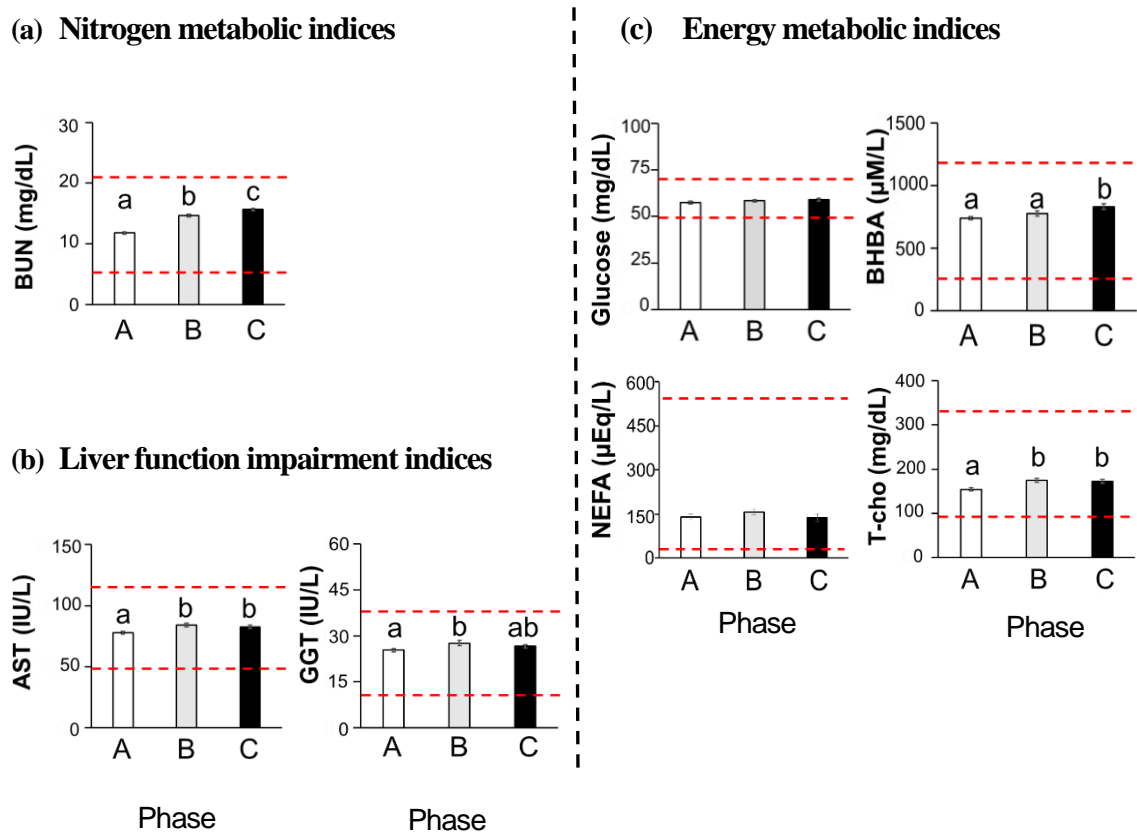


Figure 5. Metabolic profile for A, B, and C phases. The value for each parameter is the mean value \pm SEM (A, $n = 93$; B, $n = 96$; C, $n = 88$). Different letters above the bars indicate significant difference ($P < 0.05$). The area between dotted red lines indicates the normal range of each metabolite found in healthy cows (Kida, 2002).

(3) 乳量・乳成分データ

3 期の乳量・乳成分データの結果を Table 4 に示す。

MUN は、A の期間と比較して B と C の期間で有意に高値であった。一方で、A、B と比較して C の期間で乳脂率、無脂固形分率、乳蛋白率が有意に低値であった。

Table 4. Milk yield and milk composition of lactating cows during the phase A, B and C.

| | Phase | | |
|--|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | A | B | C |
| No. of lactations | 2.7 ± 0.2 ^{ab} | 2.6 ± 0.2 | 2.5 ± 0.2 |
| DIM [†] (days) | 184 ± 13 | 169 ± 12 | 205 ± 12 |
| Milk yield (kg/d) | 29.0 ± 0.7 | 31.0 ± 0.9 | 30.1 ± 0.9 |
| Milk composition | | | |
| SCC [‡] (10 ³ /mL) | 75.0 ± 9.4 | 66.0 ± 6.0 | 61.6 ± 5.7 |
| MUN [§] (mg/dL) | 11.3 ± 0.2 ^a | 12.4 ± 0.2 ^b | 13.1 ± 0.2 ^c |
| Fat (%) | 4.2 ± 0.1 ^a | 4.1 ± 0.1 ^a | 3.9 ± 0.1 ^b |
| SNF [¶] (%) | 9.1 ± 0.0 ^a | 9.0 ± 0.0 ^a | 8.9 ± 0.0 ^b |
| Protein (%) | 3.5 ± 0.0 ^a | 3.5 ± 0.0 ^a | 3.4 ± 0.0 ^b |
| Lactose (%) | 4.5 ± 0.0 | 4.5 ± 0.0 | 4.5 ± 0.0 |

The values for each parameter are the mean values ± SEM (A, *n*=90; B, *n*=95; C, *n*=85).

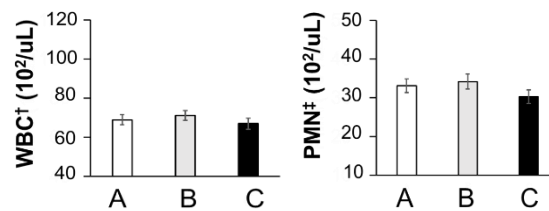
Different letters in the table indicate a significant difference (*P* < 0.05). [†]: days in milk; [‡]:

somatic cell count; [§]: milk urea nitrogen; [¶]: solids-not-fat ratios.

(4) 全血中の白血球数、顆粒球数、全血中の化学発光量 (WBCL)

白血球数、PMN 数は共に A 期と B 期、C 期の間に有意な差はなかった (Fig. 6a)。一方、WBCL と PMN 1 細胞当たりの ROS 産生能は、A 期と比較して B、C 期で、有意に高値であった ($P < 0.05$) (Fig. 6b)。

(a) The number of immune cells



(b) ROS production

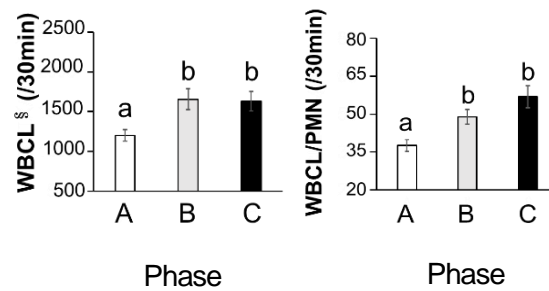


Figure 6. Immune index parameter for A, B, and C phases. The values for each parameter were the mean values \pm SEM (A, $n = 25$; B, $n = 27$; C, $n = 24$). Different letters above the bars indicate significant difference ($P < 0.05$). (a) shows the white blood cell count and PMNs counts for each phase. (b) shows the results of ROS production. †: white blood cell; ‡: polymorphonuclear leukocyte; § whole blood chemiluminescence.

(5) 受胎率

各期間の受胎率を Table 5 に示す。A 期と比較して B 期の受胎率は有意に低かった ($P < 0.05$)。

Table 5 Conception rate for each period.

| Phase | Conception rate (%) | |
|-------|---------------------|---------|
| A | 69.7 ^b | (23/33) |
| B | 39.1 ^a | (9/23) |
| C | 58.3 ^{ab} | (14/24) |

The value in parentheses shows number of conception cows and total number of artificial insemination. Different letters in the table indicate significant differences ($P < 0.05$).

4. 考 察

本研究では、9 ヶ月半に亘って TMR 中の VBN 濃度を測定し、TMR 中その変動に基づいて 3 期（期間 A：VBN 濃度が低濃度で安定していた時期、期間 B：TMR 中の VBN 濃度が急速に上昇し、高濃度を継続した時期、期間 C：TMR 中の VBN 濃度が B の期間より低下した期間）に分け、各期間における VBN 濃度の違いと牛群の代謝状況、牛群より部分抽出した牛の末梢血中の PMN を中心にした ROS 産生能、牛群の受胎率との関係性を調査した。

本研究において TMR 中 VBN 濃度が B 期に急激に上昇した。この理由として、TMR 中の粗タンパク (CP) 濃度は、全期間を通じ、平均 $15.8 \pm 0.5\%$ と NRC2001 [3] のガイドラインに沿って概ね一定の水準で推移し、期間中の CP 濃度と TMR 中 VBN 濃度との間には有意な関係は認められなかった ($\rho = -0.09, P = 0.78$) (データ未掲載)。一方、GS の VBN と TMR の VBN との間には有意な強い正の相関 ($\rho = 0.86, P < 0.0001$) が認められた。したがって、本研究における TMR 中の VBN 濃度変動は GS の VBN 由来であることが明らかであった。さらに A の期間に比べ B、C の期間では、VBN 濃度の増加の他にも pH、酢酸・酪酸・プロピオン酸濃度が高値で、乳酸濃度が低値であった。加えて、期間 B と C では GS の発酵品質も低評価であった。したがって本研究の B と C の期間は不良発酵飼料を給与していたと考えられた。

本研究における、搾乳牛の血液代謝物濃度は全て正常範囲内で推移した。しかし、A の期間に比べて B と C の期間でルーメン内アンモニアの濃度増加が示唆される BUN が高値で肝臓へのアンモニア負荷が示唆される肝逸脱酵素 (AST、GGT) の高値が観察された。また、乳中の MUN は BUN と同様に窒素代謝の指標になることが知られているが [29, 30]、MUN も高値を示した。溶解性タンパクの増加は、ルーメン内でのアンモニア濃度上昇を引き起こすことが報告されており [15, 16]、ルーメン内のアンモニア濃度の上昇に伴い、ルーメン壁より吸収されるアンモニア量も増加して、BUN 及び MUN が高値になったと考えられる。

本研究において、B 期は PMN の ROS 産生能が高かった。乳牛の PMN をアンモニアガス下で培養した後に、PMA 刺激すると PMN 一細胞当たりの ROS 産生能が増加した報告 [31]、ヒトの肝性脳症において、PMN とアンモニアを共培養したところ自発性の ROS 産生量が増加した報告 [18] がある。これらの報告同様に、本研究でも不良発酵サイレージの VBN に関連するアンモニアにより PMN の ROS 産生能が増加した可能性は十分に考えられた。

不良発酵サイレージが、血中 PMN の ROS 産生能に与える他の要因として、酪酸やマイコトキシンが考えられる。乳牛において、血中の BHBA 濃度の上昇により、免疫能が変化する報告がある [32, 33]。しかしながら、本調査では飼料中の酪酸濃度が増加したが、血中の BHBA 濃度に変化は認められず、本研究における血中 PMN の ROS 産生能の変化は酪酸濃度の影響は受けていないと考えられた。また、マイコトキシンは、乳牛の PMN の ROS 産生能を低下させる報告 [34, 35] がされており、本研究における血中の PMN の ROS 産生能の増加にマイコトキシンは直接的な影響はないと考えた。

肝臓は、腸管バリアを通過した微生物や毒素に対する最初の免疫防御の場所であり、重要な初期免疫応答の役割を担う臓器である [36, 37]。PMN より産生される ROS は主に初期免疫応答を担うが、過度の ROS 産生は、組織損傷や炎症を引き起こすことも知られており [38]、肝臓でも PMN による損傷が報告されている [39]。本調査では、A の期間に比べて B と C の期間で血中 PMN の ROS 産生量が高値で且つ、AST や GGT も上昇したことから、肝臓で酸化障害が起きて肝臓における酸化ストレスが高まった可能性が考えられる。

本研究では、不良発酵した GS を原料とする TMR を給与していた B と C の期間で WBCL が A 期に比べて高値であった。WBCL は、初期免疫能指標の 1 つとして貪食細胞から発生する ROS を測定する方法で簡易的かつ信頼できる方法であり、白血球の貪食能を評価するのに利用されるが [40, 41]、末梢血下での ROS 産生は、PMN が主に産生することが知られている [41, 42]。そのため、PMN 数の変化や PMN における ROS 産生能の変化が WBCL 値に変化をもたらすと考えられる。本調査では、PMN 1 細胞当たりの ROS 産生能は A 期と比較して B、C 期は有意に高値であり、不良発酵したサイレージと血中 PMN の ROS 産生能が増加したことの関係性が示唆された。

PMN は、TNF- α や IL-8 などのサイトカインでプライミングされると ROS 産生が増加するということが人やラットで知られている [43, 44]。一方で、アンモニアによりラットの脳血管内皮細胞から TNF- α と IL-1 β の産生量が増加したという報告 [45]、高アンモニア血症にしたラットでの TNF- α の増加 [46] の報告があり、本研究でもアンモニアの流入量が増えたことにより、TNF- α などの産生量が増加し、PMN をプライミングし ROS 産生能が増加した可能性も考えられる。

本調査では、A の期間と比較して、TMR 中の VBN 濃度が大きく増加した B の期間において分娩後の 1~3 回の AI の受胎率が有意に低かった。この理由として、TMR 中の高 VBN が受胎率低下の一因となった可能性がうかがわれた。本調査では、AI を実施した牛の BUN 濃度は A 期で 12.1 mg/dl、B 期で 15.2 mg/dl であった。Ferguson は、BUN 濃度が 14.9 mg/dl 以上で受胎率が低下したことを報告 [21] しており、この報告と一致した。

5. 小 括

不良発酵サイレージに由来する高 VBN 飼料の継続的給与による影響を、泌乳牛群レベルで調査したところ、泌乳牛の血中代謝物濃度は全て正常範囲内で推移し、泌乳牛の健康に大きな影響はないと思われた。しかしながら、TMR 中の VBN 濃度が増加していた期間では、正常範囲ながら BUN と MUN が上昇し、同時に刺激された血中 PMN の ROS 産生能 (WBCL) が上昇し、血液代謝パラメーターにおいて肝機能への負荷が認められた。加えて、この期間に受胎率の著しい低下がみられた。これらのことは、不良発酵により VBN 濃度が上昇した飼料を摂取することで、第一胃から吸収されたアンモニアにより血中 PMN の ROS 産生能が過度に賦活化され、生体の代謝系、さらには受胎性にも負の影響を及ぼしていることを示唆している。したがって、サイレージが不良発酵しないように、品質を適正に保つことの重要性が改めて示された。

第Ⅱ章

TMR 中の揮発性塩基態窒素濃度の変動と乳牛の血中の活性酸素種
産生能との個体レベルにおけるリアルタイムの関係性の観察

1. 序 言

ルーメン内の微生物タンパク質合成は、飼料タンパク質などの分解で生じたアミノ酸やアンモニアなどを原料にし、炭水化物をエネルギーとして行なわれる。しかしながら、供給されたアンモニアに対して、エネルギー供給が追い付かない場合には、微生物が吸収しきれないアンモニアは蓄積され、ルーメン壁から門脈を経由し、肝臓へのアンモニアの流入量が増加する [47]。特に飼料中の溶解性タンパク質の増加は、ルーメン内でのアンモニア濃度上昇を引き起こすことが報告されており [15, 16]、不良発酵などで生じた飼料中の揮発性塩基態窒素 (VBN) の上昇でもまた、同様に肝臓へのアンモニアの流入量が増加すると考えられる。肝臓にアンモニアが流入すると解毒され尿素に変換され、血中では血中尿素窒素 (BUN)、乳中では乳中尿素窒素 (MUN) として反映される [17]。Gustafsson and Palmquist の報告 [48] では、乳牛において飼料摂取後、BUN は 1.5-2 時間、MUN は BUN の上昇後 1-2 時間後に上昇し、Elrod and Butler の報告 [49] では、給餌後 8-12 時間後に BUN が上昇するとされている。

第 I 章では、TMR 中の VBN 濃度が高い 3 か月間において、泌乳牛群レベルで血中 PMN の ROS 産生能が増加することが確認された。しかしながら、VBN 濃度が増加した飼料を摂取すると数時間でアンモニアの肝臓への流入量が増加することを考えると、血中 PMN の ROS 産生能の上昇も短期間のうちに起こると考えられる。そこで、本章では、酪農現場において不良発酵サイレージを含む TMR を給与された泌乳牛では、高 VBN 飼料の摂取後、短期間のうちに血中の PMN が直接的な影響を受けて ROS 産生能が増加する、という仮説をたて、この検証を行うことを目的とした。そのために、TMR 中の VBN 濃度の変動パターンが異なる 3 期間 (低濃度で安定していた期間、低濃度から高濃度に上昇した期間、高濃度から濃度が低下した期間) に分けて解

析した。そして、各期間において摂取した TMR 中の VBN 濃度変動と数日後の個体内の血中 PMN の ROS 産生能のリアルタイムの関係性について、相関分析を中心に観察した。

2. 材料と方法

(1) 牛群の飼養管理

本調査は帯広畜産大学畜産フィールド科学センターで行った。対象牛群は、ホルスタイン種の搾乳牛でフリーストール牛舎に飼養されており、搾乳は 1 日 2 回搾乳で (5 : 00, 17 : 00)、平均搾乳頭数 75 頭、平均日乳量 30 kg で構成されていた。

給与飼料は、バンカーサイロに貯蔵されているコーンサイレージ (CS) とグラスサイレージ (GS) 主体の TMR (I 章 Table1 参照) を毎日 8 : 00 と 15 : 00 に給与していた。さらに乾草と水は自由摂取のうえ、乳量に応じて配合飼料をフィードステーションで個別給与していた。

(2) 比較期間の設定

TMR 中の VBN 濃度の変動パターンが異なる下記の 2 か月間の期間を設定した。

期間 I : TMR 中の VBN 変動が少なく低値で安定した推移をしていた期間

(10 月 1 日～12 月 1 日)

期間 II : TMR 中の VBN 濃度が低濃度から高濃度に上昇していった期間

(12 月 10 日～2 月 10 日)

期間 III : TMR 中の VBN 濃度が高濃度から減少していった期間

(3 月 15 日～5 月 15 日)

(3) 対象牛

本調査の対象牛は、各調査期間を通して血中 PMN の ROS 産生能の測定を行った牛を対象とした（期間Ⅰ： $n=9$ ； 期間Ⅱ： $n=8$ ； 期間Ⅲ： $n=9$ ）。

(4) TMR 中の VBN 濃度の測定

毎日もしくは 2 日に 1 回、15:00 に製造直後の TMR サンプルを飼槽より採取した。サンプルを 5-10 mm に細切断し、乾物 15 g 相当量に蒸留水 140mL を加え、サンプル瓶に入れ、数時間おきに攪拌しながら 24 時間冷蔵庫に保存した後、濾紙（Quantitative Filters Papers 5A 185 mm; ADVANTEC, Tokyo, Japan）でろ過を行い、抽出液とした。TMR 中の VBN 濃度として、サンプルの抽出液より、微量拡散法 [27] で測定した。抽出液は、各サンプルの乾物中濃度は、以下のように計算した。

$$\text{VBN (\%DM)} = A \times B / 15 \times 100$$

A : VBN concentration in extracted solution

B : total volume of extracting solution

(5) 全血中の化学発光の測定 (Whole blood chemiluminescence : WBCL)

第Ⅰ章と同様に全血中の WBCL を行い末梢血中の PMN の ROS 産生能を評価した。

採血は、対象牛より週 2 回尾静脈血よりヘパリン管を用いて採取し、約 25°C の保冷瓶で保持し、1 時間以内に化学発光法で測定した。発光試薬は Luminol、刺激剤は Zymosan A を用い、生物・化学発光装置で、37°C で 30 分間測定を行った。発光量の測定は全て 3 連で行い、30 分間の測定によって得られた発光量の総量の平均値を求めた。

(6) TMR 中の VBN 濃度と血中の PMN の ROS 産生能の関係性の解析

TMR 中の VBN 濃度変化が血中の PMN の ROS 産生能に及ぼす影響を調査するために、対象牛ごとに TMR 中の VBN 濃度と WBCL の相関分析を行った。TMR 中の VBN 濃度は、対象の WBCL 測定日前の 3 日間の平均値を算出した。相関分析は、正規分布していなかったため Spearman の順位相関係数で検定した。

また、TMR 中の VBN 濃度が増加した前後での血中 PMN の ROS 産生能の変化を評価するために、各期間 10 日前後離れた 2 回の測定による WBCL を比較した。期間 II では TMR 中の VBN 濃度が上昇し始める前の WBCL と TMR 中の VBN 濃度が上昇し始めてから測定した WBCL を比較し、期間 III では TMR 中の VBN 濃度が減少し始める前に測定した WBCL と VBN が減少した後の WBCL を比較した。期間 I は、VBN 濃度が安定していた期間であったので任意の 10 日程度離れた WBCL の 2 測定を比較した。各期間の WBCL の比較は、対応のある t 検定で検定した。

統計学的解析には、SAS Enterprise Guide ver5.1 を用いた。

3. 結 果

TMR 中の VBN 濃度と血中 PMN の ROS 産生の関係性の解析結果を Figure 7 に示す。

期間Ⅰでは9頭中全ての牛で TMR 中の VBN 濃度と WBCL の間に有意な相関関係は認められなかった。一方、期間Ⅱでは、8頭中7頭で有意な正の相関関係が認められた（相関係数が 0.4-0.6 が3頭；0.6 -0.8 が4頭： $P<0.05$ ）。有意な相関関係が認められた2個体（Cow A, Cow B）について例として Figure 8 に示す。Cow A は、 $\rho = 0.59$ ($P < 0.01$) (Fig. 8a)、Cow B は、 $\rho = 0.72$ ($P < 0.001$) (Fig. 8b) であり、ともに有意な高値の正の相関係数であった。期間Ⅲでは、9頭中7頭が無相関であった。また、各期間での血中 PMN の ROS 産生能の変化の評価においては、期間Ⅱのみで有意な変動を示しており、TMR 中の VBN 濃度が上昇し始める前に比較して、TMR 中の VBN 濃度が上昇し始めてから測定した血中 PMN の ROS 産生能の方が約2倍に増加した。

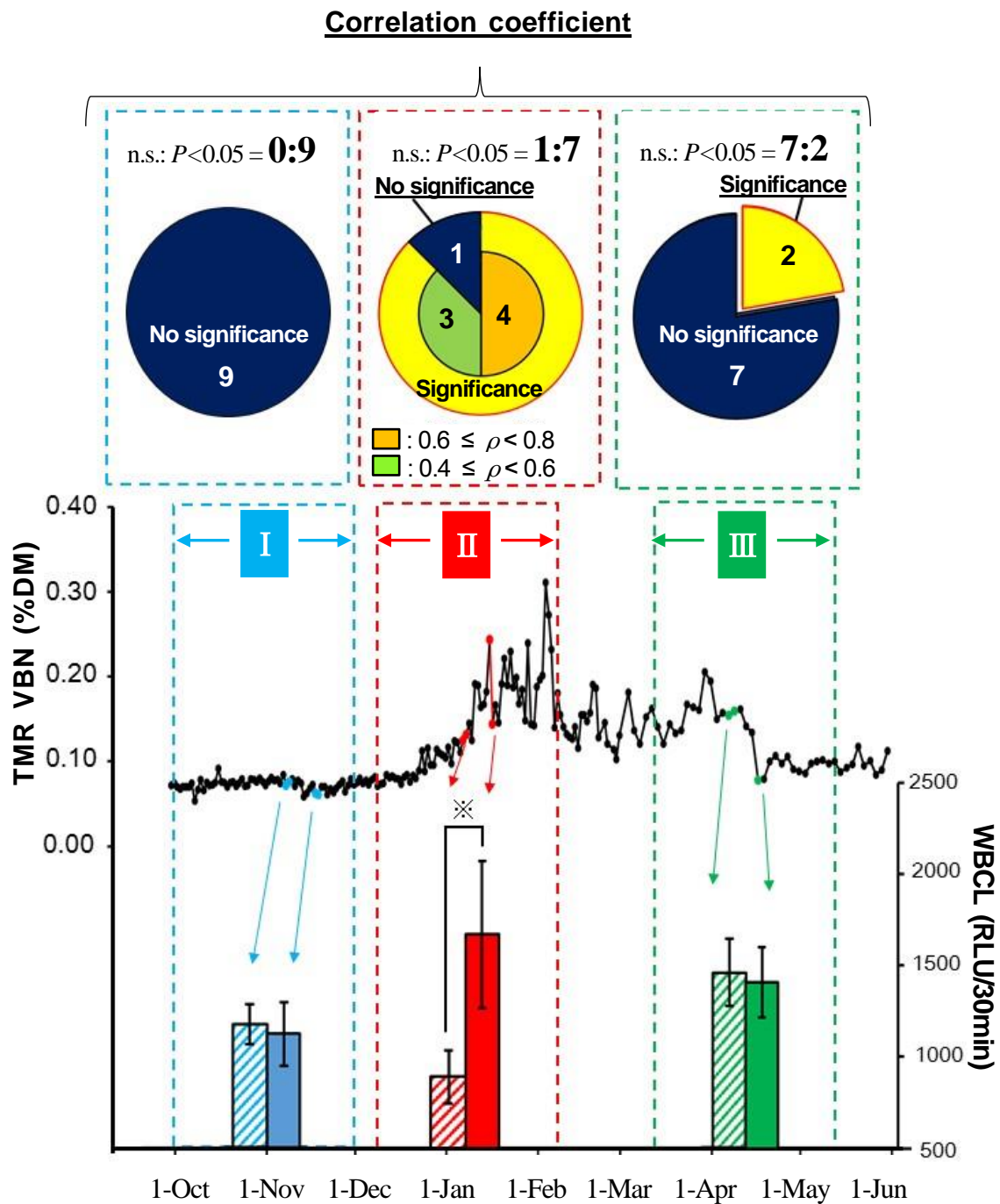
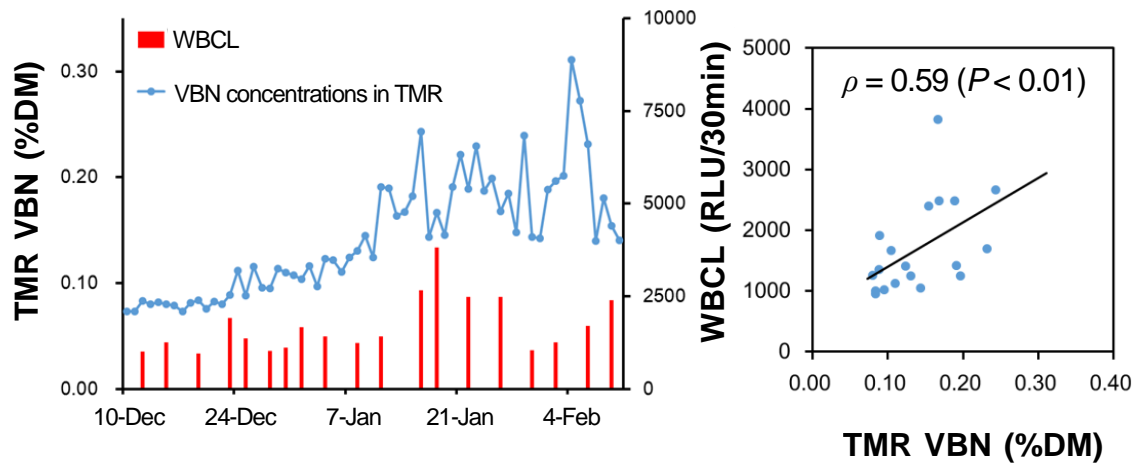


Figure 7. Effect of changes in VBN concentrations in TMR on individual ROS production (WBCL) during each period. Hatched bars (▨) indicate first measurement and solid bars (■) indicate second measurement of WBCL in each period.

(a) Cow A



(b) Cow B

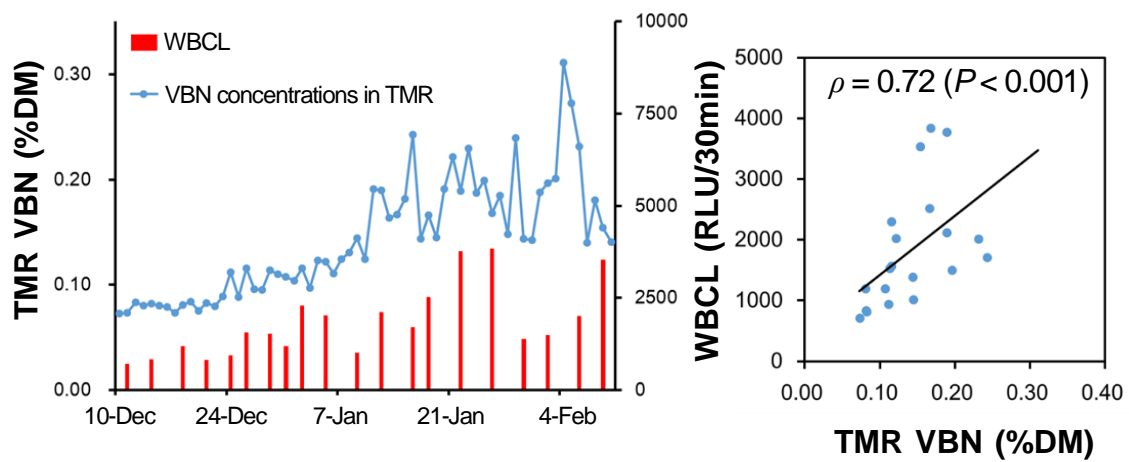


Figure 8. Typical two cows (A and B) showing a significant correlation between VBN concentration in TMR and WBCL (Cow A: $\rho = 0.61$, $P < 0.01$; Cow B: $\rho = 0.72$, $P < 0.001$).

4. 考 察

本章は、泌乳牛が高濃度の VBN 濃度飼料の摂取後、短期間のうちに直接的な影響を受けて ROS 産生能が増加するという仮説の検証が目的であった。そのために、TMR 中の VBN 濃度が上昇した期間に着目し、高濃度の VBN 飼料摂取の影響が 3 日間のうちに血中 PMN の ROS 産生能に影響を及ぼしているかについて解析をおこなった。

給与した TMR 中の VBN 濃度が低値から高値に変動していった期間Ⅱでは、この VBN 濃度と WBCL の間に 8 頭中 7 頭の牛で有意な正の相関が認められ、TMR 中の VBN 濃度の急激な上昇が、それを摂取した泌乳牛の血中の PMN の ROS 産生能の増加に短期間のうちに強く反映されたことが示唆された。これは、摂取した TMR 中の VBN 濃度の上昇に伴い、ルーメン壁から吸収されるアンモニア量が増加し、PMN は直接的 [18, 31]、さらにプライミング [43-46] によって、ROS 産生能の増加が引き起こされたと考えられる。期間Ⅱにおいて、給与した TMR 中の VBN 濃度の上昇に伴い、8 頭の泌乳牛の血中 PMN の ROS 産生能の平均値が約 2 倍に増加したことは、この考えを支持する。

乳牛において、アンモニアは肝臓で解毒され尿素となり、血中では BUN として、乳中では MUN として反映されるが [17]、給与飼料を摂取後 BUN や MUN は数時間で上昇することが報告されている [48, 49]。このことは、本調査で観察された短期間のうちに血中 PMN の ROS 産生能の増加が、血中アンモニアの迅速な上昇によって引き起こされていることを示唆している。

一方で、TMR 中の VBN 濃度が低濃度で安定していた期間Ⅰでは、TMR 中の VBN 濃度と WBCL は、9 頭全てで有意な相関関係は認められなかった。同様に、期間Ⅰに

おける血中 PMN の ROS 産生能は安定して変化はなく、期間 I では、TMR 中の VBN は、血中 PMN の ROS 産生能に影響を及ぼしていないと考えられた。

さらに、TMR 中の VBN 濃度が高濃度から減少していった期間 III において、9 頭中 7 頭の牛において摂取した TMR 中の VBN 濃度と血中 PMN の ROS 産生能の間に相関関係は認められなかった。また、血中 PMN の ROS 産生能は、TMR 中の VBN 濃度の減少前後での変化は認められなかった。これらは、予想外であった。すなわち、TMR 中の VBN 濃度の減少により、ルーメン壁から吸収されるアンモニアの量もまた減少すると考えられるため、血中 PMN の ROS 産生能は減少すると考えられるからである。この期間 III、すなわち TMR 中の VBN 濃度が減少した時期に血中 PMN の ROS 産生能に変化がみられなかった理由については不明である。

5. 小 括

酪農現場において不良発酵サイレージを含む TMR を給与された泌乳牛が、高い濃度の飼料を摂取することで、血中の PMN が短期間のうちに直接的な影響を受けて ROS 産生能が増加するという仮説の検証をおこなった。

検証の結果、TMR 中の VBN 濃度上昇が、それを摂取した泌乳牛の血中の PMN の ROS 産生能の増加を短期間のうちに引き起こした可能性が強く示唆され、上述の仮説が支持されたと考えられた。血中の PMN の ROS 産生能の過度の増加は、無関係な周辺組織の損傷につながり [38, 39]、結果的に健康にも被害を引き起こしかねない。さらに、この影響は飼料中の VBN 濃度が上昇した飼料の摂取後に、短期間で起きていることから、酪農現場では貯蔵飼料の変質に気づいたら即座に対応する必要があることが改めて確認された。また、本研究では TMR 中の VBN 濃度の減少に対し、血中の PMN の ROS 産生能はリアルタイムに反応していなかったが、この理由については不明であり、今後の課題である。

総合考察

不良発酵サイレージ給餌は、乳牛に健康被害をもたらすことが知られている。この健康被害の例として、酪酸発酵サイレージ給与によるケトーシス [12]、カビ汚染した粗飼料給与によるマイコトキシン中毒 [10, 25] などが報告されている。一方で、牛において変質飼料に起因する VBN 濃度の変化が泌乳牛の健康、免疫細胞機能、繁殖性に与える影響についての調査報告はほとんどされていない。そこで、本研究では、帯広畜産大学畜産フィールド科学センターにおいて、9 か月半にわたる TMR 中の VBN 濃度の調査を行ったところ、調査期間の TMR 中の VBN 濃度が 3 期間に分けてはっきりと異なる濃度を示したので、これに着目して 2 つの視点に立った解析を行った。

第 I 章では、各期間の 80 頭規模の泌乳牛群の代謝状況、この牛群より部分抽出した牛の末梢血中の PMN を中心にした ROS 産生能、牛群の人工授精による受胎率を比較することで、継続的に高濃度の VBN 濃度飼の TMR を給与することの影響を詳細に調査した。その結果、全ての期間で搾乳牛の代謝状況は全て正常範囲内で推移し、泌乳牛の健康に大きな支障はないと思われた。しかしながら、継続的な高濃度の VBN 濃度の TMR を給与した期間では、低濃度の VBN 濃度の TMR を給与されていた期間と比較して、牛群の BUN 及び MUN が高値であり、ルーメン内のアンモニア濃度の上昇に伴い、ルーメン壁より吸収されるアンモニアの量が増加し、肝臓へのアンモニアの流入量が増加したことが示唆された。また、このアンモニアの流入の増加に伴い、血中 PMN における ROS 産生能の上昇、肝機能への負荷、受胎率の低下といった負の影響につながったことが示唆された。

第 II 章では上述の牛群について、第 I 章の解析とは異なり、泌乳牛が摂取した TMR 中の VBN 濃度変動と血中 PMN の ROS 産生能の関係について個体レベルで

アルタイムに調査した。その結果 TMR 中の VBN 濃度上昇が、それを摂取した泌乳牛の血中の PMN の ROS 産生能の増加を短期間のうちに引き起こした可能性が強く示唆された。

以上の2つの異なる視点に立った解析、すなわち 80 頭規模の牛群レベルの数週間単位での解析、そして、その牛群のうち 8-9 頭についての個体内の詳細な数日間単位でのリアルタイム解析によって、TMR 中の VBN 濃度の急激な上昇は、BUN や MUN などの上昇を伴い、血中 PMN の ROS 産生能が増加し、それらが複合的に肝機能への負荷を増大させ、受胎率の低下も引き起こすことが示唆された。そして、これらの影響は短期間のうちに起こると考えられた。

以上の結果から、実際の酪農現場では貯蔵飼料の不良発酵に気づいたら即座に対応する必要があることが改めて確認された。基本的に不良発酵が起きたサイレージは給与しないことが一番であるが、実際の酪農現場では経済的な負担もあり、給与しないということは現実的な対応策であるとはいえない。したがってこのような場合、給与飼料の構成を変更して対応することが1つの対応策であると考えられる。一般に VBN が分類される溶解性タンパクは、上昇するとルーメン内でアンモニアが生成するスピードが速いため、微生物タンパクの合成に必要なエネルギー供給が追いつかなくなる [15, 16]。このような溶解性タンパクを多く含んだ飼料を給与する際には、糖蜜のような急速にエネルギー源となる飼料添加をすることがよいと考えられている [42, 50]。これはルーメン内の微生物タンパク合成を高めてやることで、より効率よく微生物タンパクを合成できるようになり、余剰なアンモニアを減らすことができるためである。

しかしながら、どのようなタイミングでエネルギー源となる飼料を添加すべきであるかが、大きな問題となる。一般に現場では、サイレージの品質はサイロの切り替わりの際に品質を確認する以外では、現場の官能検査に委ねられるところが多い。

もしも、官能検査だけではなく簡易的な VBN の測定手法があれば、エネルギー源となる飼料添加のタイミング判断の手助けになるであろうと考えられる。しかしながら、給与飼料中の VBN 濃度について明確な基準はない。そこで、まずは給与飼料中の VBN 濃度がどの程度までなると泌乳牛に負の影響を及ぼしうるのかの検証を行うことが、今後の課題であると考えられる。併せて、今回の検証では不良発酵の指標として VBN に着目したが、実際には不良発酵サイレージでは酪酸菌やカビの影響も当然無視できない存在である。今後は、飼料中の VBN 濃度に加え、不良発酵に伴うカビ毒などのリスク要因を合わせて分析し、泌乳牛の健康と繁殖機能との関係性を調べることが重要と考えられる。

以上のことを踏まえて、本検証で得られた TMR 中の VBN 濃度が泌乳牛の健康に及ぼす影響についての総括を Figure 9 にまとめた。すなわち、i) サイレージの生成過程や保存において不適切な管理により、飼料中の不良発酵が進み、アンモニアやアミン類などの揮発性塩基態窒素 (VBN) の産生が進む。ii) VBN を高濃度に含むサイレージを搾乳牛に給与すると BUN や MUN などの上昇を伴い、血中 PMN の ROS 産生能が増加し、それらが複合的に肝機能への負荷を増大させ、受胎率の低下も引き起こすことが示唆された。そして、これらの影響は短期間のうちに起こると考えられた。

これらの牛群と個体レベルの詳細な情報は、不良発酵飼料の給餌による影響の一部を示した貴重な報告であり、TMR 中の VBN 濃度の上昇に伴う乳牛の健康状態に与える影響を示したケーススタディとして役に立つと考えられる。

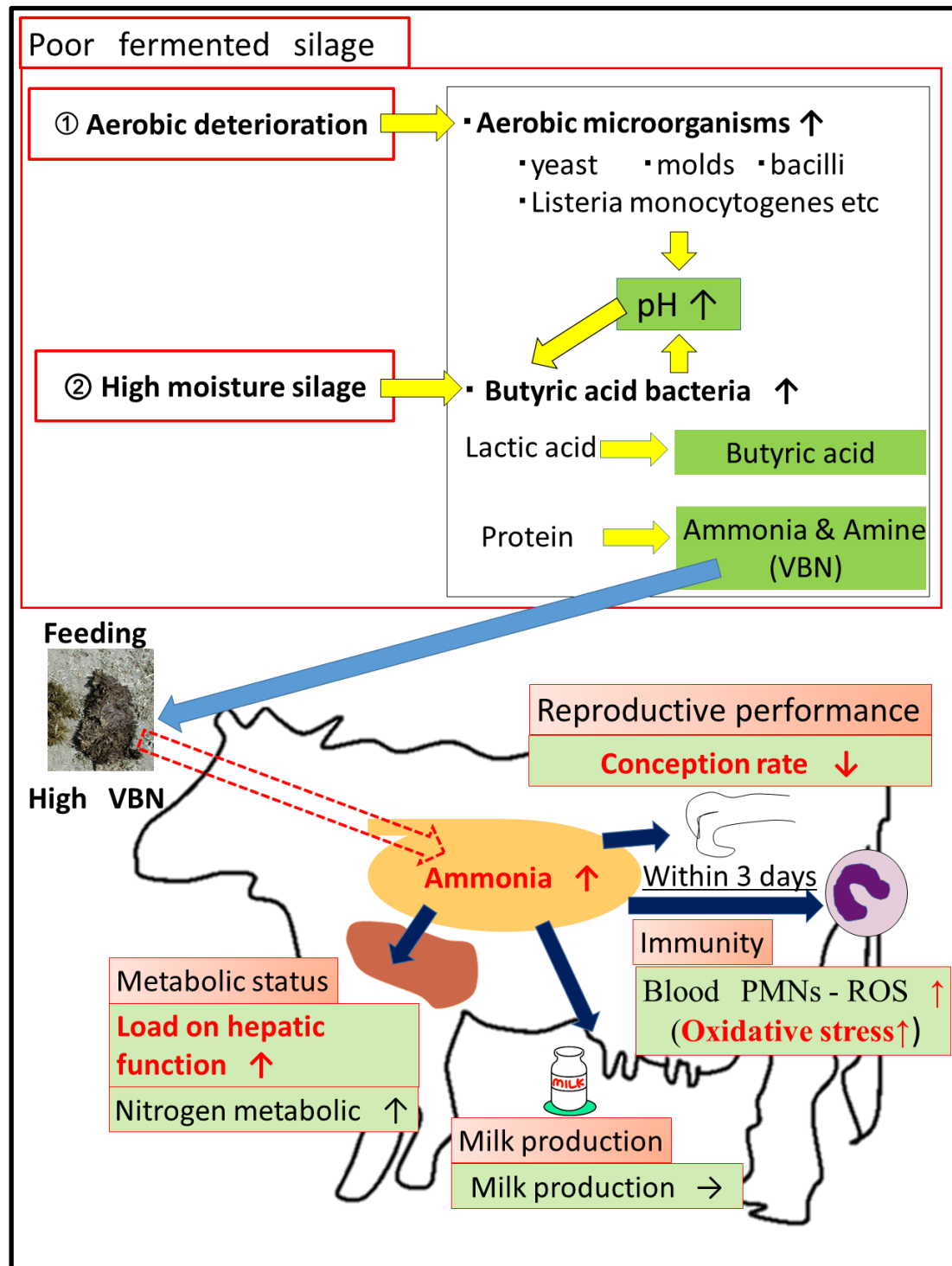


Figure 9. Summary for the effects of increase in feed-derived volatile basic nitrogen (VBN) levels originated from poor-fermented feed on metabolism, immune function, and conception rate in lactating cows.

総 括

酪農現場では、サイレージの不良発酵が原因で品質低下した貯蔵飼料の給与により、健康被害が引き起こされることが知られている。この不良発酵の際に増加する揮発性塩基態窒素（VBN）濃度の変化と、乳牛の健康、免疫細胞機能、受胎性との関係性について詳細に調査した報告はほとんどない。本研究では、帯広畜産大学畜産フィールド科学センターにて、2012年10月1日から2013年7月15日にわたって、混合飼料（TMR）中のVBN濃度測定と共に、泌乳牛の末梢血中顆粒球（PMN）の活性酸素（ROS）産生能と代謝プロファイルの詳細な調査を行った。特に、期間中に急激なVBN濃度の変動、すなわちパターンが著しく異なる3期間（低濃度で安定していた期間、低濃度から高濃度に急激に上昇した期間、高濃度から濃度が徐々に低下した期間）が観察されたので、この飼料中VBN濃度変動と上述した乳牛血中の各指標および人工受精後の受胎率との関係性を調べた。

第I章では、各期間の80頭規模の牛群の代謝状況、牛群より部分抽出した牛の末梢血中のPMNのROS産生能、牛群の人工授精による受胎率をTMR中のVBN濃度変動によって分けた3期間で比較検討した。その結果、調査対象とした3期間全てで窒素代謝、肝機能障害、栄養代謝の指標となるパラメーターは代謝プロファイルテストで定める正常範囲内で推移しており、乳牛の健康に大きな支障はないと思われた。しかしながら、VBN濃度が急激に高濃度に上昇した飼料を給与した期間では、安定して低濃度のVBN濃度飼料を給与した期間と比較して、窒素代謝の指標となる血液尿素窒素（BUN）及び乳中尿素態窒素（MUN）、肝機能障害の指標となるアスパラギン酸・トランスフェラーゼと γ -グルタミルトランスペプチダーゼ、血中のPMNのROS産生能が高値であり、牛群の受胎率は低かった。このことから、ルーメン内の

アンモニア濃度の急激な上昇に伴い、ルーメン壁より吸収されるアンモニアの量が増加し、肝臓へのアンモニアの流入量が増加した結果、肝機能への負荷が増加し、結果として血中 PMN の ROS 産生能が上昇し、受胎率も低下するといった負の複合的な影響につながったことが示唆された。以上の調査結果より、不良発酵により VBN 濃度が上昇した飼料を摂取することで、アンモニアにより血中の PMN の ROS 産生が過度に賦活化され、生体の代謝系にも負の影響を及ぼしていることが伺われた。

第Ⅱ章では上述の牛群について、第Ⅰ章の解析と異なり、泌乳牛が摂取した TMR 中の VBN 濃度変動と血中 PMN の ROS 産生能の関係性について数日間のスパンに基づいた個体レベルの情報をリアルタイムに相関分析を中心に解析した。その結果、TMR 中の VBN 濃度が低濃度から高濃度に急激に上昇した期間において、血中 PMN の ROS 産生能は TMR 中の VBN 濃度と 8 頭中 7 頭において高い相関関係（相関係数が 0.4-0.6 が 3 頭 ; 0.6-0.8 が 4 頭 : $P<0.05$ ）が認められ、TMR 中の VBN 濃度の急激な上昇が、それを摂取した泌乳牛の血中の PMN の ROS 産生能の増加に短期間のうちに強く反映されたことが示唆された。一方、TMR 中の VBN 濃度が低濃度で安定していた期間では、9 頭全てで相関関係は認められなかった。また、TMR 中の VBN 濃度が高濃度から徐々に減少していった期間では、9 頭中 7 頭の牛において両者の間に相関関係は認められなかった。これらの結果から、血中 PMN の ROS 産生能の増加は、摂取した TMR 中の VBN 濃度の急激な上昇に伴い、ルーメン壁から吸収されるアンモニア量が増加し、PMN の ROS 産生能の増加が引き起こされたと考えられた。また、TMR 中の VBN 濃度が上昇した数日間後には、血中 PMN の ROS 産生能が増加していたことは、飼料摂取後に数時間という早さで BUN 及び MUN の上昇が起きることからも、摂取した VBN 増加と血中 PMN の ROS 産生能増加との正の相関関係が支持される。以上の結果より、TMR 中の VBN 濃度が急上昇すると、血中 PMN の ROS 産

生能はリアルタイムに反応して増加し、摂取した TMR 中の VBN 濃度の影響を短期間のうちに受けることが示唆された。

以上の2つの異なる視点に立った解析、すなわち 80 頭規模の牛群レベルの数週間単位での解析、そして、その牛群のうち 8-9 頭についての個体内の詳細な数日間単位でのリアルタイム解析によって、TMR 中の VBN 濃度の急激な上昇は、BUN や MUN などの上昇を伴い、血中 PMN の ROS 産生能が増加し、それらが複合的に肝機能への負荷を増大させ、受胎率の低下も引き起こすことが示唆された。そして、これらの影響は短期間のうちに起こると考えられた。今後は、飼料中の VBN 濃度に加え、不良発酵に伴うカビ毒などのリスク要因を合わせて分析し、泌乳牛の健康と繁殖機能との関係性を調べることが重要と考えられる。

以上の牛群と個体レベルの詳細な情報は、不良発酵飼料を含む TMR 中の VBN 濃度の急激な上昇に伴って、それを摂取した乳牛の健康状態と受胎率が悪影響を受けることを示したケーススタディとして酪農現場に役立つと考えられる。

Summary

The present study investigated the effects of changes in fermentative quality of grass silage (GS), a major component in total mixed rations (TMR), associated with changes in the concentration of volatile basic nitrogen (VBN) on the metabolism; reactive oxygen species (ROS) production, with a focus on polymorphonuclear leukocytes (PMNs in the circulation); and conception rate in the lactating cows of experimental dairy farm. According to VBN concentrations in TMR over 9 month.

In chapter I, I divided survey periods as three phases (phase A: low-VBN; phase B; high-VBN; phase C; mid-VBN). The immunological and metabolic status and reproductive performance of milking cows between each phase were compared, and the effect of changes in VBN was investigated. During each phase, variations of metabolic parameters in blood were all within the normal range. However, during the elevated phase of VBN levels (phase B and C), nitrogen metabolic indices rose, and a simultaneous increase in the ability of ROS production ability in blood PMNs and load on hepatic function were observed in hematological and metabolic parameters with low conception rate. This suggests that the feed intake with elevated VBN levels due to poor fermented GS leads to overactivation of the ROS production ability in blood PMNs by ammonia, and negatively affects metabolism and reproductive performance.

In chapter II, it was hypothesized that “changes of VBN in TMR affect ROS production in blood PMNs in a short time”. In order to verify the hypothesis, three phases were defined (each period was for 2 months; phase I: VBN concentrations were low and stable; phase II: VBN concentrations were increasing from low to high levels; phase III: VBN concentrations were decreasing from high to mid-level), and a correlation between ROS production in blood PMNs in individual cow and the average of VBN in the fed TMR during each phase was analyzed. In

phase II, seven of eighth cows showed a positive correlation between VBN in TMR and ROS production in blood PMNs (3 cows with $0.4 \leq \rho < 0.6$, and 4 cows with $0.6 \leq \rho < 0.8$, $P < 0.05$). This result suggested that the increase of VBN in TMR affects ROS production in blood PMNs real-time.

The present study implies that elevated VBN intake *via* poor fermented feed results in an activation of ROS production of blood PMNs by ammonia within several days, and induces load on hepatic function and low fertility rate. The present case study will supply a farm-based valuable information on the possible negative impact of poor-fermented feed in lactating cows.

引用文献

- 1 Wathes DC, Fenwick M, Cheng Z, Bourne N, Llewellyn S, Morris DG, Kenny D, Murphy J, Fitzpatrick R. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. *Theriogenology* 68, 232-241.
- 2 Walsh SW, Williams EJ, Evans ACO. 2011. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. *Animal Reproduction Science* 123, 127-138.
- 3 NRC. 2001. Nutrient requirements of dairy cattle, seventh revised ed., National Academic Press, Washington, DC, USA. *Nutrient Requirements of Dairy cattle. 7th Ed.* The National Academies Press, Washington, DC.
- 4 Grummer RR. 2007. Strategies to improve fertility of high yielding dairy farms: management of the dry period. *Theriogenology* 68, 281-288.
- 5 Owens FN, Secrist DS, Hill WJ, Gill DR. 1998. Acidosis in cattle: a review. *Journal of Animal Science* 76, 275-286.
- 6 Coe ML, Nagaraja TG, Sun YD, Wallace N, Towne EG, Kemp KE, Hutcheson JP. 1999. Effect of virginiamycin on ruminal fermentation in cattle during adaptation to a high concentrate diet and during an induced acidosis. *Journal of Animal Science* 77, 2259-2268.
- 7 大場 真人. 2004. 第1章 DMI を決める究極のメカニズム. *DMI を科学する*. デーリイジャパン社, pp. 10-18.
- 8 McDonald P, Whittenbury R. 1973. The ensilage process. In: Butler GW, Bailey RW (eds), *Chemistry and Biochemistry of Herbage*, 33-60. Academic Press, London, New York.
- 9 増子孝義. 1994. 第1章 サイレージ発酵と微生物. *サイレージの科学*. デーリイジャパン社. 9-30, 66-75.
- 10 Muck RE. 2010. Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira de Zootecnia* 39, 183-191.

- 11 Fujita H, Matsuoka S, Takahashi J, Fukazawa A, Takase K. 1979. Effect of aerobic deterioration on the nutritive value of grass silage. *The Japanese Journal of Zootechnical Science* 51, 511-518.
- 12 Oetzel, GR. 2007. Herd-Level Ketosis - Diagnosis and Risk Factors. *In: Proceedings of 40th annual conference of American Association of Bovine Practitioners*, Vancouver, BC, Canada, pp. 67-91.
- 13 Kearney PC, Kenned WK. 1962. Relationship between losses of fermentable sugars and changes in organic acids of silage. *Agronomy Journal* 54, 114-115.
- 14 柁木茂彦, 名久井忠, 丸山富美子. 1994. サイレージの品質判定. *粗飼料の品質評価ガイドブック*, 日本草地畜産種子協会, pp. 79-87.
- 15 Ludwick RL, Fontenot JP, Tucker RE. 1972. Studies of the adaptation phenomenon by lambs fed urea as the sole nitrogen source. Chemical alterations in ruminal and blood parameters. *Journal of Animal Science* 35, 1036-1045.
- 16 Broderick A, Reynal SM. 2009. Effect of source of rumen-degraded protein on production and ruminal metabolism in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* 92, 2822-2834.
- 17 Hammond AC. 1997. Update on BUN and MUN as a guide for protein supplementation in cattle. *In: Proceedings of the 8th annual Florida Ruminant Nutrition Symposium*, Gainesville, Florida, pp. 43-52.
- 18 Shawcross DL, Shabbir SS, Taylor NJ, Hughes RD. 2010. Ammonia and the Neutrophil in the Pathogenesis of Hepatic Encephalopathy in Cirrhosis. *Hepatology* 51, 1062-1069.
- 19 Suzuki M, Miura S, Suematsu M, Fukumura D, Kurose I, Suzuki H, et al. 1992. Helicobacter pylori-associated ammonia production enhances neutrophil-dependent gastric mucosal cell injury. *American Journal of Physiology* 263, 719-725.

- 20 Murakami M, Asagoe K, Dekigai H, Kusaka S, Saita H, Kita T. 1995. Products of neutrophil metabolism increase ammonia-induced gastric mucosal damage. *Digestive Diseases and Sciences* 40, 268-273
- 21 Ferguson, JD, Galligan DT, Blanchard T, Reeves M. 1993. Serum urea nitrogen and conception rate: the usefulness of test information. *Journal of Dairy Science* 76, 3742-3746.
- 22 Butler WR. 1998. Review: Effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 81, 2533-2539.
- 23 McCormick ME, French DD, Brown TF, Cuomo GJ, Chapa AM, Fernandez JM, Beatty JF, Blouin DC. 1999. Crude protein and rumen undegradable protein effects on reproduction and lactation performance of Holstein cows. *Journal of Dairy Science* 82, 2697-2708.
- 24 Rhoads ML, Rhoads RP, Gilbert RO, Toole R, Butler WR. 2006. Detrimental effects of high plasma urea nitrogen levels on viability of embryos from lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 91, 1-10.
- 25 Whitlow, L. W., and W. M. Hagler. 2005. Mycotoxins: A review of dairy concerns. p. 47–58 in Proc. *Mid-South Ruminant Nutrition Conference*, Texas Animal Nutrition Council, Dallas, TX.
- 26 McDonald P, Whittenbury R. 1973. The ensilage process. In: Butler GW, Bailey RW (eds), *Chemistry and Biochemistry of Herbage*, pp. 33-60. Academic Press, London, New York.
- 27 Conway EJ, O'malley E. 1942. Microdiffusion methods. Ammonia and urea using buffered absorbents (revised methods for ranges greater than 10 µg. N). *Biochemical Journal* 36, 655-661.
- 28 Kida K. 2002. Use of every ten-day criteria for metabolic profile test after calving and dry off in dairy herds. *The Journal of Veterinary Medical Science* 64, 1003-1010.

- 29 Kauffman, A.J., St-Pierre, N. R., 2001. The relationship of milk urea nitrogen to urine nitrogen excretion in Holstein and Jersey cows. *Journal of Dairy Science* 84, 2284-2294.
- 30 Nousiainen, J., Shingfield, K. J., Huhtanen, P., 2004. Evaluation of milk urea nitrogen as a diagnostic of protein feeding. *Journal of Dairy Science* 87, 386-398.
- 31 Murata K, Horino R. 1999. Effects of in vitro atmospheric ammonia exposure on recovery rate and luminol-dependent chemiluminescence of bovine neutrophils and bronchoalveolar macrophages. *The Journal of Veterinary Medical Science* 61, 279-281.
- 32 Hoeben D, Heynemann R, Burvenich C. 1997. Elevated levels of beta hydroxybutyric acid in periparturient cows and in vitro effect on respiratory burst activity of bovine neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 58, 165-170.
- 33 Zarrin M, Wellnitz O, van Dorland HA, Bruckmaier RM. 2014. Induced hyperketonemia affects the mammary immune response during lipopolysaccharide challenge in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 97, 330-339.
- 34 Takayama H, Shimada N, Mikami O, Murata H. 2005. Suppressive effect of deoxynivalenol, a fusarium mycotoxin, on bovine and porcine neutrophil chemiluminescence: an in vitro study. *The Journal of Veterinary Medical Science* 67, 531-533.
- 35 Wada K, Nabae A, Higuchi, H, Nagahata H. 2010. Effects of mycotoxins on chemiluminescent response and cytokine mRNA expression on bovine neutrophils. *The Journal of Veterinary Medical Science* 72, 1507-1511.
- 36 Janeway, CA, Medhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology* 20, 197-216.
- 37 Liaskou E, Wilson DV, Oo YH. 2012. Innate immune cells in liver inflammation. *Mediators of Inflammation*, 1-21.

- 38 Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. 2014. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxidants & Redox Signaling* 20, 1126-1167.
- 39 Ramaiah, SK, Jaeschke H. 2006. Role of neutrophils in the pathogenesis of acute inflammatory liver injury. *Toxicologic Pathology* 35, 757-766.
- 40 DeChatelet LR, Shirley PS. 1981. Evaluation of chronic granulomatous disease by a chemiluminescence assay of microliter quantities of whole blood. *Clinical Chemistry* 27, 1739-1741.
- 41 Nagahata H, Dezzuti CS, Kociba GJ. 1991. A rapid microassay for measuring the luminol-dependent chemiluminescent response in canine whole blood. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 29, 285-293.
- 42 Lindena J, Burkhardt H, Dwenger A. 1987. Mechanisms of non-opsonized zymosan-induced and luminol-enhanced chemiluminescence in whole blood and isolated phagocytes. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 25, 765-778.
- 43 Yuo A, Kitagawa S, Kasahara T, Matsushima K, Saito M, Takaku F. 1991. Stimulation and priming of human neutrophils by interleukin-8: Cooperation with tumor necrosis factor and colony-stimulating factors. *Blood* 78, 2708-2714.
- 44 Elbim C, Chollet-Martin S, Bailly S, Hakim J, Gougerot-Pocidalo MA. 1993. Priming of polymorphonuclear neutrophils by tumor necrosis factor alpha in whole blood: identification of two polymorphonuclear neutrophil subpopulation in response to formyl-peptides. *Blood* 82, 633-640.
- 45 Jayakumar AR, Tong XY, Curtis KM, Ruiz-Cordero R, Abreu MT, Norenberg MD. 2014. Increased toll-like receptor 4 in cerebral endothelial cells contributes to the astrocyte swelling and brain edema in acute hepatic encephalopathy. *Journal of Neurochemistry* 128, 890-903.

- 46 Germoush MO. 2014. Protective effect of hesperidin against ammonium chloride-induced hyperammonemia in rats. *Life Science Journal* 11, 365-370.
- 47 Waldo, DR., 1968. Nitrogen Metabolism in the Ruminant. *Journal of Dairy Science* 51, 265-275.
- 48 Gustafsson, AH, Palmquist DL. 1993. Diurnal variation of rumen ammonia, serum urea and milk urea in dairy cows at high and low yields. *Journal of Dairy Science* 76, 475-484.
- 49 Elrod CC, and Butler WR. 1993. Reduction of fertility and alteration of uterine pH in heifers fed excess ruminally degradable protein. *Journal of Animal Science* 71, 694-701.
- 50 Webb, DW, Bartley EE, Meyer RM, 1972. A comparison of nitrogen metabolism and ammonia toxicity from ammonium acetate and urea in cattle. *Journal of Animal Science* 35, 1263-1270.

謝 辞

稿を終えるにあたり、論文作成に終始ご指導ならびにご校閲を賜りました、帯広畜産大学 畜産衛生学研究部門 動物医科学分野 宮本明夫教授に深く感謝いたします。また、本研究の遂行に当たり、帯広畜産大学 畜産フィールド科学センター 木田克弥教授、同 川島千帆准教授には私生活から研究に至るあらゆる面においてご指導並びにご助言頂いた事を深く感謝いたします。

本論文の一章に基づいた投稿論文の作成にあたり、スイスのベルン大学の Prof. Rupert M. BRUCKMAIER と Dr. Josef J. GROSS には、多くの助言を頂いた事を深く感謝いたします。

本論文のとりまとめに際し、ご懇篤なるご助言を賜りました帯広畜産大学 松井基純教授、同 清水隆准教授に深く感謝いたします。

畜産フィールド科学センターでの飼料のサンプリングをするにあたり、畜産フィールド科学センターの職員の皆様には、飼量の情報提供など多大なるご協力をうけ賜り、心から感謝いたします。特に飼料担当の職員の上杉幸子様、生田はるか様、堀田努様には毎日のサイレージの使用箇所の情報記入など多大なる協力を頂いた事、深く感謝いたします。

研究活動を通して、帯広畜産大学畜産フィールド科学センターのスタッフ及び所属学生の皆様には、本研究への協力及び温かい激励を頂き感謝しております。特に実研開始時に甚大なる協力を頂いた本田利彦さん、原田雄基さん、靱倉茂朗さん、唐木智尋さん、山下陽子さん、藤本賢さん、一緒に研究活動を共にした宗万信司さんには深く感謝しております。また、農場の特任研究員の小川公二博士には、本研究の遂行にあたり細部にわたって的確な助言を頂き心から感謝いたします。

また、宮本研究室と清水研究室の皆様には、突然現れた自分に対し、温かく迎え入れてくれ、応援して頂いた事に深く感謝しております。Mohamed Samy さんには投稿論文の添削を懇切丁寧に指導して頂いた事、心から感謝いたします。

最後に、長い学生生活の支援と応援してくれた家族と、心の支えとなり相談に乗ってくれた友人に心から感謝いたします。