

## 乾乳牛へのペレット状グリセリン給与が分娩前後の栄養代謝状態および分娩後の疾病発生や乳量、繁殖機能回復へ及ぼす影響

川島千帆<sup>1</sup>・近藤萌里<sup>1</sup>・長谷川類<sup>1</sup>・畔上正晴<sup>1</sup>・大井樹里<sup>1</sup>・澁谷俊樹<sup>1</sup>・杉本優香<sup>1</sup>・山岸則夫<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 帯広畜産大学畜産フィールド科学センター，帯広市 080-8555

<sup>2</sup> 帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター，帯広市 080-8555

(2020. 9. 14 受付, 2021. 1. 19 受理)

**要約** 乾乳牛へのペレット状グリセリン給与が分娩前後の栄養代謝状態と分娩後の疾病発生や生産性へ及ぼす影響を調査した。分娩予定3週前から分娩までグリセリン80g含有ペレット (Gly, 20頭) またはプラセボペレット (Cnt, 21頭) を毎日給与した。Cntのルーメンフィルスコアは分娩前に低下したが ( $P < 0.05$ )、Glyで変化せず、分娩前の血中 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 (BHBA) 濃度はGlyで低かった ( $P < 0.05$ )。分娩前後のボディコンディションスコア (BCS) はGlyで高かった (前;  $P < 0.05$ , 後;  $P = 0.06$ )。ケトosis発症頭数に差はないが治療牛の血中BHBA濃度はGlyで低い傾向にあった ( $P = 0.07$ )。以上より、分娩予定3週前からグリセリンペレット給与は給与中の採食量を一定に保ち脂質代謝を改善させ、分娩前後のBCSの適切な維持やケトosisの症状を緩和させる可能性が示された。

日本畜産学会報 92(2), 159-168, 2021

**キーワード**：乾乳牛，グリセリンペレット，ケトosis， $\beta$ -ヒドロキシ酪酸

乳牛において、分娩前の栄養代謝状態と分娩後の栄養代謝状態、疾病発生および繁殖機能回復との間には密接な関係がある。分娩前の2週間に血液中のグルコース濃度が低く、遊離脂肪酸 (Non-esterified fatty acid; NEFA) 濃度が高いウシは、分娩後も同様の傾向があること (佐藤ら 2005) や、分娩前の血中NEFA濃度が高いウシでは分娩後のケトosisおよび第四胃変位の発生リスクが増加すること (Cameronら 1998) が報告されている。さらに分娩後の初回排卵が遅いウシは早いウシに比べて、分娩前のエネルギーバランスが低い傾向にあることや、血中グルコース濃度やインスリン様成長因子-I濃度が低く、低エネルギー状態であることが示されている (Kawashimaら 2007; Castroら 2012)。また、左臍部の状態から第一胃の充満度を5段階で評価するルーメンフィルスコア (Rumen fill score; RFS) を用いた筆者らの研究において、RFSの低値や日間変動を示す乾乳牛は、血液性状から判断されるエネルギー状態が低く、分娩後の疾病発生や乳量低下、卵巣機能の回復遅延につながることを示された (近藤ら 2019)。したがって、分娩前のエネルギー状態の改善が分娩前後の栄養代謝状態を改善し、分娩後の疾病発生予防や繁殖機能の早期回復につながるといえる。

グリセリンは無色透明の粘度の高い液状の物質で、乳牛への経口投与により糖新生を促し、泌乳初期のウシへの投与で体重減少が軽減されたことや (Fisherら 1973)、分

娩前後または分娩後のウシへの投与で血中 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 ( $\beta$ -Hydroxybutyrate acid; BHBA) 濃度の上昇が抑えられていたことから脂質代謝の改善に寄与することが報告され (Osmanら 2008; Osborneら 2009)、分娩後のケトosis治療にも用いられている (Khattab 2015)。しかし、液状グリセリンはお湯と混合しながら強制的に経口投与する方法が一般的であり、投与者とウシの双方が慣れていない場合は時間やストレスがかかり、誤嚥のリスクもある。そのため、日常の飼養管理下で利用する場合は飼料添加により給与する方が有用であると考えられる。分娩後4-63日目のウシの飼料に液状グリセリンを1日1頭当たりグリセリンとして100g、200gおよび300g給与した研究では、給与量に関係なく血中グルコース濃度の低下やBHBA濃度の上昇が軽減されたが、乳量への影響はなかったことが報告されている (Wangら 2009)。一方、分娩後3週間のウシに対してグリセリンとして1日1頭当たり162.5gとなるように粉末状グリセリンを飼料に添加給与した研究では、前述の研究結果と同様に血中グルコース濃度の低下やBHBA濃度の上昇が軽減されたが、その効果は小さく、一方で給与終了後の分娩後6週目の乳量が高くなる傾向が確認されている (Chungら 2007)。

グリセリンの代謝経路はまだ明らかではなく、第一胃内微生物の分解を受けてプロピオン酸となり糖新生に寄与す

連絡者：川島千帆 (fax : 0155-49-5653, e-mail : kawasima@obihiro.ac.jp)

る経路と下部消化管から直接グリセリンとして吸収され糖新生に寄与する経路に分かれるが、その割合は研究報告により大きく異なる (Omazic ら 2014; Khattab 2015)。さらに前述した Wang ら (2009) と Chung ら (2007) の研究結果から、飼料へ添加した場合でもグリセリンの形状により効果が異なることが推察される。すなわち、液状の場合はリアルタイムに血液性状が変化してエネルギー状態が改善されること、一方、固形状の場合はグリセリン給与中の血液性状の変化は小さいが、液状に比べて第一胃内におけるプロピオン酸生成が緩やかに促進され、それが脂質代謝改善に寄与し、給与終了後も乳量増加などの効果が継続する可能性が考えられる。乳牛へのグリセリン給与効果を検証した研究の多くは、分娩前後もしくは分娩後に給与しており、分娩前だけの給与効果を検証した研究はほとんどない。しかし、固形状のグリセリンを用いることで分娩前だけの給与で、分娩後の栄養代謝状態の改善やその後の生産性への効果も見込めることが考えられる。

そこで本試験では、サイレージとの混合やフィードステーションでの給与が可能なペレット状のグリセリンを用い、分娩予定3週前から分娩までの給与が分娩前後の栄養代謝状態および分娩後の疾病発生や乳量、繁殖機能回復へ及ぼす影響について調査した。

## 材料および方法

### 1. 供試牛および飼養管理

本試験は国立大学法人帯広畜産大学動物実験に関する規律に基づき実施した (承認番号 #29-228, 18-24)。

試験には、帯広畜産大学畜産フィールド科学センターで飼養されているホルスタイン種乳牛のうち、2017年11月13日から2018年10月2日に分娩した初産以上 (1-4産) の乾乳牛41頭を用いた。供試牛は、分娩予定の約6週間前よりパドックが併設された乾乳牛用フリーストール牛舎で飼養した。分娩兆候を確認後、直ちに分娩房に移動し、分娩後約6日目までつなぎ牛舎で飼養した。その後は、搾乳牛用フリーストール牛舎で飼養した。試験期間を通して、グラスサイレージとコーンサイレージを主体に乾乳牛用、もしくは搾乳牛用の配合飼料を混合した完全混合飼料 (表1) を、乾乳牛は制限給餌として1日1回 (午前11時半頃)、搾乳牛は自由採食として1日2回 (午前10時および午後4時頃) 給与した。水、ミネラル添加塩、乾草は全期間を通して自由採食とした。また、搾乳は1日2回 (午前5時と午後5時) 行った。

### 2. 試験処理

産次や分娩季節に加えて、分娩予定日4週前のボディコンディションスコア (Body condition score; BCS) および RFS に偏りがないようにペレット状グリセリン給与群 (Gly 群; 産次:  $1.8 \pm 0.2$ , BCS:  $3.49 \pm 0.05$ , RFS:  $3.4 \pm 0.1$ ) 20頭とグリセリンを含まないプラセボペレット給与群 (Cnt 群; 産次:  $1.6 \pm 0.2$ , BCS:  $3.38$

$\pm 0.04$ , RFS:  $3.5 \pm 0.1$ ) 21頭の2群に分けた (各数値は平均値±標準誤差)。ペレット状グリセリン (MF フィード, 北海道) は40%のグリセリンを含有し、ペレットの基材は主にアルファルファミールであった。それぞれのペレットを、分娩予定日3週間前から分娩日まで毎日200gずつ、給餌3時間前に個別給与した。給与したペレット状グリセリンに含まれるグリセリンの正味エネルギーは1.92 Mcal/kgであった。

### 3. 試料採取

分娩予定日3週間前から分娩後6週目まで週2回、乾乳牛は給餌約3時間前である午前8時頃、搾乳牛は午前9時頃に尾動脈から採血し、同時にBCSを測定した (Ferguson ら 1994)。RFSはZaaijerとNoordhuizen (2003) の方法により分娩予定3週間前から分娩まで週3回測定した。本試験ではRFSの各スコア (1から5) の中間に位置する状態を0.5刻みでスコア化し、9段階でスコアリングした (近藤ら 2019)。

また、Williams ら (2005) の方法を参考に子宮内の細菌感染状況を把握するため、分娩後3週目と4週目の腔内貯留粘液をメトリチェックデバイス (Simcro Tech Ltd, Hamilton, New Zealand) により採取し、採取した粘液のうち50%以上の膿や白濁があり悪臭がする状態のスコア5から透明または半透明の粘液のスコア1までの5段階にメトリチェックスコアを判定した。さらに、超音波画像診断装置 (動物用超音波画像診断装置, HS-101V; 本多電子, 愛知) を用いた卵巣観察を週2回行った。その他に、分娩状況として分娩難易度、子牛の性別や体重、分娩後3週目までの疾病の種類、分娩後30日目までの日乳量を記録した。

採血には、血清採取用に9mL血清分離剤入りブレイン真空採血管 (滅菌済み ベノジェクトII 真空採血管; テルモ, 東京)、血漿採取用に同ブレイン管に200 $\mu$ Lの抗凝固剤 (0.3M EDTA, 1% アセチルサリチル酸, pH 7.4) を注入した採血管を使用した。採血後、採血管を速やかに氷水に浸し、実験室に持ち帰った後、血清採取用採血管は38 $^{\circ}$ Cの温水中で10分間加温してフィブリンを析出させてから遠心分離 (2,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 15分間) を行い、血清を回収した。血漿採取用採血管はそのまま遠心分離 (2,000 $\times$ g, 4 $^{\circ}$ C, 15分間) を行った。血清および血漿は、分析まで-30 $^{\circ}$ Cで保存した。

### 4. 測定および評価方法

血清中代謝物濃度は自動化学分析装置 (TBA-120FR; 東芝メディカルシステムズ, 栃木) を用いグルコース、NEFA, BHBA, 総コレステロール (Total cholesterol; T-cho), 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ペプチターゼ ( $\gamma$ -Glutamyl transpeptidase; GGT) を測定した。さらに分娩前の血漿中インスリン濃度をBovine Insulin ELISA 10-1201-01 (Mercodia,

**Table 1** Feed ingredients and chemical composition during the prepartum and postpartum period

Items	Ration	
	Prepartum	Postpartum
Ingredient (kg DM / day)		
Grass silage <sup>1</sup>	4.4	6.6
Corn silage	3.0	6.6
Concentrate for dry cows <sup>2</sup>	2.6	-
Concentrate for lactating cows <sup>3</sup>	-	8.7
Grass hay <sup>1</sup>	<i>ad libitum</i>	<i>ad libitum</i>
Soy bean meal	-	0.5
Beet pulp	-	0.9
Vitamin-mineral supplement	0.2	0.1
Total <sup>4</sup>	11.9	24.4
Nutrient content except for grass hay (% DM)		
Crude protein	13.3	14.9
peNDF	36.2	28.6
ADF	27.1	22.2
NFC	32.0	38.9
Ether extract	4.6	4.1
NEL (Mcal / kg DM)	1.54	1.62

<sup>1</sup>Timothy or orchardgrass mixed with clover, alfalfa or galega.

<sup>2</sup>Crude protein 18.0%, crude fat 2.0%, crude fiber 9.0%, ash 8.0%, Ca 0.50%, P 0.40%, total digestible nutrient 74%.

<sup>3</sup>Crude protein 17.0%, crude fat 2.0%, crude fiber 10.0%, ash 10.0%, Ca 0.50%, P 0.40%, total digestible nutrient 74.0%.

peNDF, physically effective neutral detergent fiber; ADF, acid detergent fiber; NFC, non-fibrous carbohydrates.

<sup>4</sup>Including estimated intake for grass hay.

Uppsala, Sweden) により測定し、既報から妊娠末期の乳牛の総合的な栄養代謝状態の指標に有用であると考えられる Revised quantitative insulin sensitivity check index (RQUICKI) を血清中グルコースおよび NEFA 濃度と血漿中インスリン濃度から算出した (Hasegawa ら 2019)。また、分娩後の血漿中プロゲステロン (Progesterone ; P4) 濃度をジエチルエーテルによって抽出した後、二抗体法により測定した (Miyamoto ら 1992)。抽出効率は 80% だった。超音波画像診断装置による分娩後の初回排卵とその後の黄体形成の確認に加え、血漿中 P4 濃度が 1.0 ng/mL 以上の場合を機能的な黄体が存在するとし (Stevenson と Britt 1979)、分娩後初めて血漿中 P4 濃度が 1.0 ng/mL を超えた日を初回黄体形成日とした。一方、分娩後 6.5 週目までに初回黄体形成がみられなかった個体は無排卵と定義した。

## 5. 統計解析

実際の分娩日が分娩予定日より 1 週間早まるウシが数頭いたことから、分娩前の BCS と血中代謝物濃度については、分娩前 2 週間の計 4 回のデータ、血中インスリン濃度と RQUICKI については、分娩 2 週および 1 週前の計 2 回のデータをペレット給与期間の値として解析に用いた。分娩後は血中代謝物濃度が大きく変動する 0 週目 (分娩後 0-6 日間) を除き、分娩後 4 週目までの計 8 回のデータを分娩後 1 ヶ月間の栄養代謝状態の比較のため解析に用いた。また、日乳量は分娩後 1-4 週目の平均値を週ごとに算出して解析に用いた。RFS は、値だけでなく日間変動もエネルギー状態や分娩後の疾病発生や乳量低下、卵巣機能の回復遅延に關与することから (近藤ら 2019)、分娩 1-2 週間前の週 3 回の値を解析に用いた。

統計解析には、SigmaPlot® 13 (Systat Software,



Inc, San Jose, CA, USA) を用いた。RFS, BCS, 血液性状および RQUICKI は、二元配置の反復測定分散分析を行い、群と週次の間に交互作用がみられた場合は、各週次での 2 群間の比較ならびに各群内の週次間の比較を Holm-Šidák 法を用いて行った。出生子牛の雌雄、分娩後の疾病発生、無排卵牛割合、子宮内の細菌感染状況を反映する分娩後 3 週目および 4 週目のメトリチェックスコア 3 以上 (Williams ら 2005) のウシの割合は Fisher の直接確率検定によって解析した。その他のデータは、Shapiro-Wilk 検定で正規性の解析を行った後、Student の t 検定もしくはマン・ホイットニーの U 検定を用いて解析した。P<0.05 を有意差あり、0.05≤P<0.1 を傾向ありとした。データはすべて平均±標準誤差 (Standard error of the mean ; SEM) で表した。

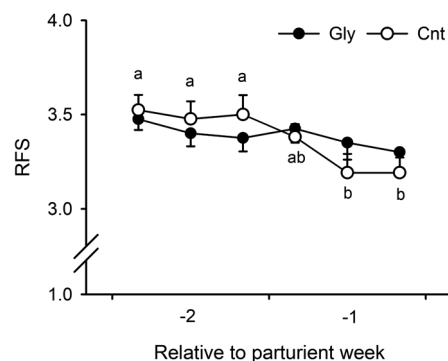
## 結 果

分娩予定日と実際の分娩日との差は、Gly 群で−2.0±0.9 日 (最大 5 日, 最小−8 日), Cnt 群では−1.0±0.8 日 (最大 7 日, 最小−8 日) であり (P=0.410), それぞれのペレット給与日数は Gly 群では 19.1±0.9 日, Cnt 群では 21.4±1.3 日 (P=0.307) であった。

図 1 に分娩 1-2 週間前の RFS を示した。試験期間を通して両群間に有意な差はなかったが、群と週次の間に交互作用の傾向が認められた (P=0.063)。Cnt 群では、分娩 2 週間前に比べて分娩前 2 回の測定の RFS の値が低かった (P<0.01)。一方、Gly 群では分娩 1-2 週間前の RFS に有意な変化がなかった。

グリセリンまたはプラセボペレットが給与されていた分娩前 2 週間の BCS, 血中代謝物およびインスリン濃度, RQUICKI の推移を図 2 に示した。給与期間を通して、Gly 群が Cnt 群に比べて BCS が高く (P=0.037), 血中 BHBA 濃度が低かった (P=0.039)。その他の項目には両群間で差はなかった。

表 2 に分娩状況, 分娩後 3 週間の疾病発生割合, ケトosis 治療を受けたウシ, および分娩後の繁殖機能回復について示した。産子における雄の割合は、Gly 群に比べて Cnt 群の方が高い傾向があり (P=0.084), 子牛の出生時体重も Cnt 群で重い傾向がみられたが (P=0.076), 分娩難易度は両群間で同程度であり、多くが自然分娩であった。予防的処置も含めた分娩後 3 週間以内の疾病発生割合は両群間で差がなかった。ケトosis と診断されて治療を受けたウシの頭数は、Gly 群で 5 頭, Cnt 群で 4 頭であり両群間に差はなかったが、これらのウシの最も高かった血中 BHBA 濃度の平均値は、Gly 群に比べて Cnt 群で高い傾向があった (P=0.068)。Gly 群の 2 頭は、胎盤停滞の治療のため、分娩後 2 週目に子宮洗浄が行われたことから、分娩後の繁殖機能回復の解析から除外した。さらに Gly 群の 1 頭は分娩後 17 日目に黄体形成が確認されたが、分娩後 4 週目に卵胞吸引されたことから 4 週目のメ



**Figure 1** Average of rumen fill score (RFS) in Gly (n=20) and Cnt (n=21) group. Values are presented as the mean±SEM. A group and time interaction was observed (P=0.063). a vs. b: Significantly difference within Cnt group (P<0.01).

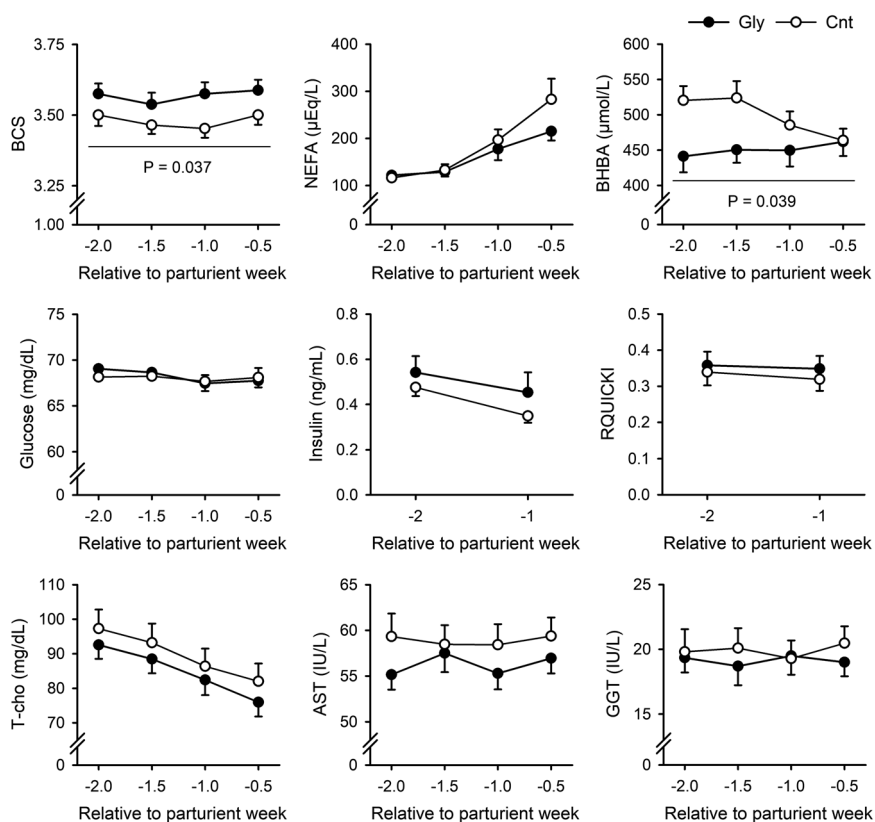
トリチェックスコアの解析から除外した。試験期間中に無排卵だったウシを除いた分娩後の黄体形成日数および無排卵牛の割合は両群間で差はなかった。また、分娩後 3 週目および 4 週目にメトリチェックスコアが 3 以上を示し子宮内の細菌感染が疑われるウシの割合は、両群間で差はなかった。

図 3 に分娩週を除く分娩後 4 週目までの BCS, 血中代謝物濃度および日乳量を示した。血中 NEFA 濃度は Gly 群の方が Cnt 群より高い傾向があったが (P=0.087), 血中 BHBA 濃度は両群間に差はなかった。また、BCS は Gly 群の方が Cnt 群に比べて高い傾向にあった (P=0.062)。さらに血中 GGT 活性値において、群と週次の間に交互作用が認められ (P=0.005), 分娩後 4 週ならびに 4.5 週目の血中 GGT 活性値は、Gly 群が Cnt 群よりも高かった (P<0.05)。その他の項目において、両群間に差は認められなかった。

## 考 察

本試験において、分娩予定日 3 週間前から分娩前までペレット状グリセリンを給与されたウシは、RFS が分娩まで低下せず一定に推移した。RFS は、測定前の約 12 時間以内の乾物摂取量 (Dry matter intake; DMI) や原物摂取量と正の相関があり (Burfeind ら 2010), さらに乾乳後期牛の RFS と血中 T-cho 濃度との間に正の相関があることも示されている (Kawashima ら 2016)。血中 T-cho 濃度は DMI との間に正の相関があることから (Spicer ら 1993), 乾乳牛の RFS は DMI の簡易的な指標として利用できる。乳牛において、グリセリン給与による DMI への影響は研究により様々であるが、DMI が減少したと示している DeFrain ら (2004) の研究における 1 日当たりのグリセリン給与量は 690 g, Osbrone ら (2009) の研究では 670 g であった。一方、DMI への影響が認められなかった Chung ら (2007) の研究にお

乾乳牛へのグリセリン給与効果

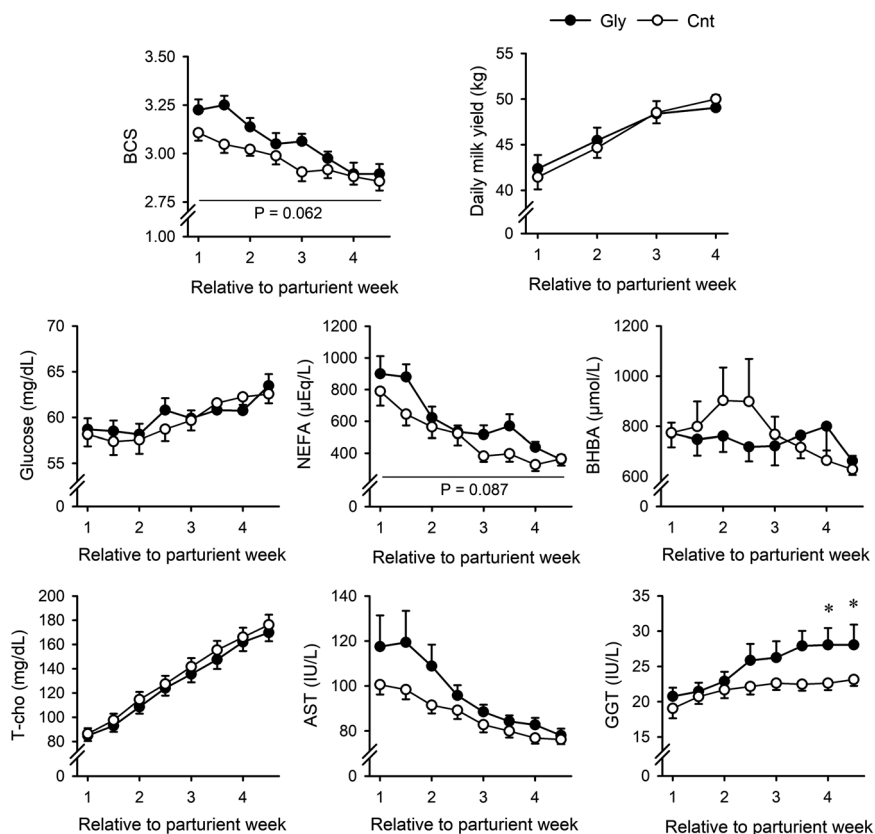


**Figure 2** BCS, concentration of serum metabolites and plasma insulin and RQUICKI during pellet supply period (1-2 prepartum weeks) in Gly (n=20) and Cnt (n=21). Data are presented as the mean±SEM. AST: aspartate aminotransferase; BHBA: β-hydroxybutyrate; GGT: gamma-glutamyl transpeptidase; NEFA: nonesterified fatty acid; T-cho: total cholesterol; RQUICKI: Revised quantitative insulin sensitivity check index.

る1日当たりのグリセリン給与量は162.5g, Wangら(2009)の研究では100g, 200gおよび300gであり, DMIが減少した研究に比べて給与量は少ない。多くのグリセリンを給与した場合, 第一胃内のプロピオン産生が急激に上昇することから(DeFrainら2004), 糖新生が亢進されて採食抑制に働く可能性があるといえる。本試験で給与した1日当たりのペレット状グリセリン200g中のグリセリン含量は80gであり, 前述したすべての研究と比較して最も少ない。そのため, 採食が抑制されることがなく, RFSの低下が起きなかったと考えられる。一般的にウシ胎子の体重は, 妊娠の最後の2ヵ月間で2倍以上に増加するため(高橋, 2014), 物理的圧迫を受けて分娩2-3週間前から母牛のDMIは減少する(日本飼養標準; 農業・食品産業技術総合研究機構編2017)。しかし, 分娩後の初回授精で受胎するウシは乾乳期のエネルギー状態が良好であり, 妊娠末期でもRFSの変化が小さく, 分娩に向けて有意な低下を示さないことが明らかになっている(Kawashimaら2016)。さらに乾乳牛の適切なRFSは4以上とされているが(ZaaijerとNoordhuizen2003), RFSが高い値でも日間変動を示す乾乳牛は, 分娩後の疾

病発生や初回排卵の遅延につながる(近藤ら2019)。したがって, 本試験で用いたペレット状グリセリンの給与量と給与期間は, 採食を抑制せず分娩までの採食量を一定に保つことに寄与し, 分娩後の疾病発生や初回排卵および受胎の遅延リスク低下につながる可能性が示された。

グリセリンを給与したウシにおいて血中BHBA濃度が低くなったことは過去の多くの研究報告と一致していた(Chungら2007; Osmanら2008; Osbroneら2009; Wangら2009)。前述したように妊娠末期は胎子の急激な成長に伴い物理的圧迫を受けて分娩2-3週間前から母牛のDMIは減少するが, 養分要求量は増加する(高橋2014; 日本飼養標準 農業・食品産業技術総合研究機構編2017)。エネルギー充足時または軽度なエネルギー不足時では, NEFAから産生されたアセチルCoAはTCA回路に入りATP産生に利用されるが(Drackley1999; Rocheら2007; Rocheら2009), 分娩前後の乳牛では体脂肪動員によりNEFAからアセチルCoAが大量に産生される一方で, グルコースが不足しており, 多くのアセチルCoAはTCA回路に入らず, ケトン体の産生が高まり, 結果として血中BHBA濃度の上昇につながる



**Figure 3** BCS, concentration of serum metabolites and daily milk yield during 4 weeks postpartum in Gly (n=20) and Cnt (n=21). Data are presented as the mean±SEM. A significant group and time interaction for blood GGT activities was observed ( $P=0.005$ ). \*: Significantly difference between Gly and Cnt group ( $P<0.05$ ). AST: aspartate aminotransferase; BHBA:  $\beta$ -hydroxybutyrate; GGT: gamma-glutamyl transpeptidase; NEFA: nonesterified fatty acid; T-cho: total cholesterol.

(Roche ら 2009 ; 及川 2015). 本試験における両群の血中 BHBA 濃度は、同期間の血中濃度を調査した他の研究と同程度で一般的なレベルであるが (Oikawa ら 2019), Gly 群ではグリセリンを給与したことでグルコース生成が高まり, Cnt 群に比べて血中 BHBA 濃度の上昇が抑えられたと考えられる. 本試験において, グリセリン給与による血中グルコース濃度の増加は確認されなかった. 分娩後ではあるが本試験と同じ給与期間の 3 週間, 乾燥グリセリンを飼料ヘトッドレス給与した Karami-Shabankareh ら (2013) の研究においても血中 BHBA 濃度は低下したが, グルコース濃度は変化しなかったことが示されている. また, 妊娠末期において, グルコースの恒常性維持に対するインスリンの作用が高まるため (Wilcox 2005 ; Catalano 2010 ; Freemark 2010), 血中グルコース濃度は代謝ホルモン濃度の違いが認められるようなエネルギー状態が異なる場合でも血中濃度は変化しない (Kawashima ら 2007). さらに肝機能や肝機能障害の指標となる血中 T-cho 濃度ならびに血中 AST および GGT 活性値は両群間で差はなく, 標準的な値であった

(Kida 2002b). したがって, 本試験ではグリセリン給与により血中グルコース濃度は増加しなかったが, TCA 回路を円滑にして血中 BHBA 濃度低下につながったことが示唆された. また, このことが一般的に分娩に向けて低下する RFS において, Gly 群では低下せず維持したことに寄与した可能性がある. さらにその結果, 両群ともに標準範囲内の BCS ではあったが (Kida 2002b), Cnt 群に比べて Gly 群の分娩前の BCS が高く維持され, 分娩後も高く推移する傾向を示したことが考えられる. 一方, 分娩前の血中インスリン濃度や NEFA 濃度および総合的な栄養代謝状態を示す RQUICKI は両群間に有意差はなく, これらの値は既報と比較して同程度であった (Kida 2002b ; 近藤ら 2019 ; Hasegawa ら 2019 ; Oikawa ら 2019). 本試験のグリセリン給与量の 8 倍程度を飼料ヘトッドレス給与した DeFrain ら (2004) の報告においても分娩前の血中 NEFA 濃度やインスリン濃度には変化がなかったことから, 本試験で給与した少量のグリセリンは分娩前の栄養代謝状態を大きく変化させないことが示された.

**Table 2** Calving difficulty, sex of calves, body weight of calf, diagnosis of postpartum disease, cows with treatment for ketosis, ovarian activity, and uterus involution in Gly and Cnt group<sup>1</sup>

Items	Gly (n=20)	Cnt (n=21)	P value
Calving difficulty <sup>2</sup>	1.3±0.2	1.6±0.2	0.312
Sex of calves (male/female)	9/11	16/5	0.084
Body weight at the birth of calves (kg)	44.4±0.9	46.4±0.6	0.076
Diagnosis of postpartum disease <sup>3</sup>	60.0% (12/20)	52.4% (11/21)	0.860
Number of cows with treatment for ketosis	5	4	0.719
Highest blood BHBA concentration in cows with treatment for ketosis <sup>4</sup> (μmol/L)	1,293±192 (843–1,918)	2,418±541 (894–3,426)	0.068
Onset of luteal activity (days)	26.4±2.9	28.3±2.1	0.472
Ratio of anovulatory cows during the experimental period	22.2% (4/18 <sup>5</sup> )	4.8% (1/21)	0.162
Ratio of cows with vaginal mucus score ≥3 on 3 weeks postpartum	33.3% (6/18 <sup>5</sup> )	57.1% (12/21)	0.244
Ratio of cows with vaginal mucus score ≥3 on 4 weeks postpartum	29.4% (5/17 <sup>6</sup> )	23.8% (5/21)	0.727

<sup>1</sup>Values are the mean±SEM.

<sup>2</sup>1, unassisted birth (natural, without human assistance); 2, easy calving with human assistance; 3, difficult calving with a few humans; 4, dystocia (requiring much more force than normal); and 5, surgical treatment or death of cow.

<sup>3</sup>Ketosis, mastitis, ruminal acidosis, hypocalcemia, milk fever, puerperal fever, retained placenta and endometritis from calving day to 3 weeks postpartum.

<sup>4</sup>Values are the mean±SEM (minimum-maximum)

<sup>5</sup>Two cows were excluded from the analysis due to intrauterine douching.

<sup>6</sup>Cow was excluded from the analysis due to follicular aspiration.

本試験において、両群間における分娩後の疾病発症頭数に差はなく、その中でケトーシスまたはその可能性が疑われたために治療を受けたウシは Gly 群で 5 頭、Cnt 群で 4 頭であった。臨床型ケトーシスの血中 BHBA 濃度の基準は 3,000 μmol/L、潜在性ケトーシスは 1,200 μmol/L とされている (及川 2015)。Gly 群で治療を受けた 5 頭のうち 3 頭のそれぞれの血中 BHBA 濃度は最も高い週次でも 1,200 μmol/L 未満、残りの 2 頭の最大値は 1,918 μmol/L と 1,524 μmol/L であり潜在性ケトーシスの範囲内であった。一方、Cnt 群で治療を受けた 4 頭のうち 1 頭は最も高い血中 BHBA 濃度が 1,200 μmol/L 未満、2 頭は潜在性ケトーシスの範囲である 2,536 μmol/L と 2,816 μmol/L であり、残りの 1 頭は臨床型ケトーシスと判断される 3,426 μmol/L であった。したがって、本試験でのグリセリン給与量と給与期間ではケトーシスの予防には至らなかったが、症状を緩和させる可能性が示された。

分娩後の血中 NEFA 濃度は標準的な値であったが (Kida 2002b), Gly 群の方が Cnt 群に比べて高い傾向があった。

深刻なエネルギー不足の場合、体脂肪から生じた NEFA は血中 BHBA 濃度の上昇につながり (及川 2015)、血中グルコース濃度の低下や肝機能障害を引き起こす (Kida 2002a)。しかし、本試験において血中グルコースおよび BHBA 濃度、肝機能障害を示す血中 AST および GGT 活性値は標準的な値を示しており (Kida 2002a)、分娩後 4 週目および 4.5 週目の血中 GGT 活性値のみ Gly 群の方が Cnt 群よりも高かったが、それ以外は両群間に有意な差は認められなかった。そのため、Gly 群の血中 NEFA 濃度がやや高く推移した理由は不明であるが、このことが、その後の肝機能障害を引き起こしたと推察される。しかし、各血中濃度から体脂肪動員も肝機能障害も健常範囲内であったと考えられる。また、本試験ではグリセリン給与による日乳量への影響はみられず、この結果は過去の報告と一致していた (DeFrain ら 2004 ; Chung ら 2007 ; Osbrone ら 2009 ; Wang ら 2009)。これらの研究と比較して、本試験のグリセリン給与量は少なく、乳量を増加させるほどの給与量ではなかったと考えられる。

分娩後の黄体形成日数は両群間で同程度であり、乾乳期



のグリセリン給与の影響はなかった。分娩後初回排卵までの卵胞波数が3回以上の場合には初回授精が遅れることが報告されている (Sakaguchi ら 2004)。分娩後最初の卵胞波で排卵した場合は分娩後 18 日目に、第 2 卵胞波で排卵した場合は分娩後 29 日目に排卵が確認されており (Sakaguchi ら 2004)、排卵後は 3 日程度で血中 P4 濃度が 1 ng/mL 以上に達する (Kawashima ら 2007)。本試験での初回黄体形成日数は Gly 群で 26.4±2.9 日、Cnt 群で 28.3±2.1 日であったことから、多くのウシにおいて初回授精に影響を及ぼさない分娩後 1-2 回の卵胞波での排卵であり、分娩後の卵巣機能回復が良好な牛群であったことが考えられる。しかし、試験期間に無排卵だったウシは、有意差がないものの Cnt 群の 1 頭に対して Gly 群では 4 頭と多かった。無排卵牛では全頭乳房炎が確認され、Gly 群で無排卵だった 2 頭は試験期間やその後も繰り返して乳房炎を発症しており、残りの 2 頭は 1 回の治療で治癒したが、分娩後 1 週目から日乳量が 50 kg を超える高泌乳牛であった。Cnt 群の無排卵牛は軽度な乳房炎であり、平均的な日乳量 (最大 46 kg/日) であったため、無排卵となった理由は特定できなかった。このように無排卵に至る理由は個体ごとに異なったが、乾乳期のグリセリン給与の有無よりも乳房炎や高泌乳が排卵の遅れに影響したことが考えられる。

分娩後 3 週目および 4 週目における子宮内の細菌感染状況を反映するメトリチェックスコアが 3 以上のウシの割合は、どちらの週次も両群間に差はなかったが、Cnt 群では分娩後 3 週目に半数以上のウシにおいて細菌感染を疑われたことに対し、Gly 群では 3 割程度であった。Sheldon ら (2008) は 4 割程度のウシが分娩後に子宮炎になり、その半数は分娩後 3-5 週目に子宮内膜炎に移行すると示している。つまり、分娩後 3 週目までは子宮内に細菌が存在することは一般的であり、それ以降に多くのウシでは細菌が排除され、そうでないウシは子宮内膜炎に罹患するといえる。したがって、Gly 群の方が Cnt 群より子宮内からの細菌の排出が早く、その後、子宮内膜炎へ罹患するウシが少なかった可能性がある。しかし子宮修復の評価には、本試験で実施したメトリチェック以外にも直腸検査 (LeBlanc ら 2002) や超音波画像診断装置 (Scully ら 2013 ; Kawashima ら 2018) を用いた子宮角や子宮頸部の直径評価、細胞診 (Barlund ら 2008) および血中プロスタグランジン F2 $\alpha$  の代謝物である 13, 14- ジヒドロ -15- ケトプロスタグランジン F2 $\alpha$  濃度のモニタリング (Mishra と Prakash 2005 ; Kawashima ら 2018) などの様々な方法がある。そのため、乾乳期のグリセリン給与による子宮修復への効果については、これらの評価方法を取り入れた更なる調査が必要といえる。

以上より、乾乳牛に対する少量のグリセリンを含むペレットの分娩予定 3 週間前から分娩までの給与は、給与期間中の血中 BHBA 濃度の減少や分娩に向けた RFS 低下

の抑制、さらに分娩前後の BCS の適切な維持につながった。また、分娩後のケトosisの予防には至らなかったが、グリセリンを給与されたケトosis発症牛の血中 BHBA 濃度は低く、症状を緩和させる可能性が示された。ペレット状グリセリンは液状グリセリンに比べて、給与時の栄養代謝状態を大きく変化させないが、液状グリセリン給与時のような一時的な血中グルコース濃度増加 (Osman ら 2008) が起きないため、採食量は低下せず、また、乾燥したグリセリンは給与後も効果が継続する可能性が示されている (Chung ら 2007)。したがって、ペレット状グリセリンは、分娩前からの給与で、給与期間中の採食の安定や脂質代謝改善への効果に加えて、分娩後のエネルギー状態の改善やケトosisの症状の軽減に寄与することが示唆された。

## 謝 辞

本論文の試料採取や執筆にあたりご助言頂いた帯広畜産大学木田克弥教授、松井基純教授、ACOSTA AYALA Tomas J 准教授ならびに齊藤朋子助教、本試験の着想に至った予備試験にご協力いただいた本研究室卒業生の稲葉愛子氏、加藤里佳氏ならびに獣医師の小川公二氏に深く感謝申し上げます。また、本研究で用いたグリセリンおよびプラセボペレットを提供して頂いた MF フィード株式会社に厚く御礼申し上げます。本研究は JSPS 科研費 (15K07684) および栗林育英学術財団の助成の一部ならびに、MF フィード株式会社から共同研究費を受けて実施したものです。

## 文 献

- Barlund CS, Carruthers TD, Waldner CL, Palmer CW. 2008. A comparison of diagnostic techniques for postpartum endometritis in dairy cattle. *Theriogenology* **69**, 714-723.
- Burfeind O, Sepúlveda P, von Keyserlingk MAG, Weary DM, Veira DM, Heuwieser W. 2010. Technical note: Evaluation of a scoring system for rumen fill in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **93**, 3635-3640.
- Cameron REB, Dyk PB, Herdt TH, Kaneene JB, Miller R, Bucholtz HF, Liesman JS, Vandehaar MJ, Emery RS. 1998. Dry cow diet, management, and energy balance as risk factors for displaced abomasum in high producing dairy herds. *Journal of Dairy Science* **81**, 132-139.
- Castro N, Kawashima C, van Dorland HA, Morel I, Miyamoto A, Bruckmaier RM. 2012. Metabolic and energy status during the dry period is crucial for the resumption of ovarian activity postpartum in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **95**, 5804-5812.
- Catalano PM. 2010. Obesity, insulin resistance, and pregnancy outcome. *Reproduction* **140**, 365-371.
- Chung YH, Rico DE, Martinez CM, Cassidy TW, Noirot V, Ames A, Varga GA. 2007. Effects of feeding dry glycerin to early postpartum Holstein dairy cows on



- lactational performance and metabolic profiles. *Journal of Dairy Science* **90**, 5682-5691.
- DeFraen JM, Hippen AR, Kalscheur KF, Jardon PW. 2004. Feeding Glycerol to Transition Dairy Cows: Effects on blood metabolites and lactation performance. *Journal of Dairy Science* **87**, 4195-4206.
- Drackley JK. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: the final frontier?. *Journal of Dairy Science* **82**, 2259-2273.
- Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N. 1994. Principal descriptors of body condition score in holstein cows. *Journal of Dairy Science* **77**, 2695-2703.
- Fisher LJ, Erfle JD, Lodge GA, Sauer FD. 1973. Effects of propylene glycol or glycerol supplementation of the diet of dairy cows on feed intake, milk yield and composition, and incidence of ketosis. *Canadian Journal of Animal Science* **53**, 289-296.
- Freemark M. 2010. Placental hormones and the control of fetal growth. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **95**, 2054-2057.
- Hasegawa R, Iwase I, Takagi T, Kondo M, Matsui M, Kawashima C. 2019. Insulin resistance: relationship between indices during late gestation in dairy cows and effects on newborn metabolism. *Animal Science Journal* **90**, 1544-1555.
- Karami-Shabankareh H, Kafilzadeh F, Piri V, Mohammadi H. 2013. Effects of feeding dry glycerol to primiparous Holstein dairy cows on follicular development, reproductive performance and metabolic parameters related to fertility during the early post-partum period. *Reproduction in Domestic Animals* **48**, 945-953.
- Kawashima C, Fukihara S, Maeda M, Kaneko E, Amaya Montoya C, Matsui M, Shimizu T, Matsunaga N, Kida K, Miyake Y-I, Schams D, Miyamoto A. 2007. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave postpartum in high-producing dairy cows. *Reproduction* **133**, 155-163.
- Kawashima C, Karaki C, Munakata M, Matsui M, Shimizu T, Miyamoto A, Kida K. 2016. Association of rumen fill score and energy status during the close-up dry period with conception at first artificial insemination in dairy cows. *Animal Science Journal* **87**, 1218-1224.
- Kawashima C, Suwanai M, Honda T, Teramura M, Kida K, Hanada M, Miyamoto A, Matsui M. 2018. Relationship of vaginal discharge characteristics evaluated by Metricheck device to metabolic status in postpartum dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* **53**, 1396-1404.
- Khattab MSA. 2015. Glycerol as feedstuff for ruminant. *Science International* **3**, 90-94.
- Kida K. 2002a. The metabolic profile test: Its practicability in assessing feeding management and periparturient diseases in high yielding commercial dairy herds. *Journal of Veterinary Medical Science* **64**, 557-563.
- Kida K. 2002b. Use of every ten-day criteria for metabolic profile test after calving and dry off in dairy herds. *Journal of Veterinary Medical Science* **64**, 1003-1010.
- 農業・食品産業技術総合研究機構. 2017. 日本飼養標準・乳牛(2017年版). pp.64-68, 117-122. 公益社団法人中央畜産会, 東京.
- 近藤萌里, 長谷川類, 加藤葉月, 福嶋知賀子, 川島千帆. 2019. 乳牛における分娩前のルーメンフィロスコアの変動と分娩後の栄養代謝状態および分娩後の疾病発生と繁殖機能回復との関係. *日本畜産学会報* **90**, 295-305.
- LeBlanc SJ, Duffield TF, Leslie KE, Bateman KG, Keefe GP, Walton JS, Johnson WH. 2002. Defining and diagnosing postpartum clinical endometritis and its impact on reproductive performance in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **85**, 2223-2236.
- Mishra DP, Prakash BS. 2005. Validation of a 13,14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2</sub> $\alpha$  enzyme immunoassay and its application for reproductive health monitoring in postpartum buffaloes. *Animal Reproduction Science* **90**, 85-94.
- Miyamoto A, Okuda K, Schweigert FJ, Schams D. 1992. Effects of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor-beta and nerve growth factor on the secretory function of the bovine corpus luteum in vitro. *Journal of Endocrinology* **135**, 103-114.
- 及川 伸. 2015. 乳牛の潜在性ケトosisに関する最近の研究動向. *日本獣医師会雑誌* **68**, 33-42.
- Oikawa S, Elsayed HK, Shibata C, Chisato K, Nakada K. 2019. Peripartum metabolic profiles in a Holstein dairy herd with alarm level prevalence of subclinical ketosis detected in early lactation. *Canadian Journal of Veterinary Research* **83**, 50-56.
- Omazic AW, Kronqvist C, Zhongyan L, Martens H, Holtenius K. 2014. The fate of glycerol entering the rumen of dairy cows and sheep. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* **99**, 258-264.
- Osborne VR, Odongo NE, Cant JP, Swanson KC, McBride BW. 2009. Effects of supplementing glycerol and soybean oil in drinking water on feed and water intake, energy balance, and production performance of periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science* **92**, 698-707.
- Osman MA, Allen PS, Mehyar NA, Bobe G, Coetzee JF, Koehler KJ, Beitz DC. 2008. Acute metabolic responses of postpartal dairy cows to subcutaneous glucagon injections, oral glycerol, or both. *Journal of Dairy Science* **91**, 3311-3322.
- Roche JR, Friggens NC, Kay JK, Fisher MW, Stafford KJ, Berry DP. 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *Journal of Dairy Science* **92**, 5769-5801.
- Roche JR, Lee JM, Macdonald KA, Berry DP. 2007. Relationships among body condition score, body weight, and milk production variables in pasture-based dairy cows. *Journal of Dairy Science* **90**, 3802-3815.
- Sakaguchi M, Sasamoto Y, Suzuki T, Takahashi Y, Yamada Y. 2004. Postpartum ovarian follicular dynamics and estrous activity in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science* **87**, 2114-2121.
- 佐藤 繁, 河野充彦, 村山勇雄, 高橋孝幸, 鈴木利行. 2005. 乳牛における分娩前の血糖および遊離脂肪酸値と分娩後の負のエネルギーバランスの関係. *日本家畜臨床学会誌* **28**, 1-6.
- Scully S, Maillou V, Duffy P, Kelly AK, Crowe MA, Rizos D, Lonergan P. 2013. The effect of lactation on post -

- partum uterine involution in Holstein dairy cows. *Reproduction in Domestic Animals* **48**, 888-892.
- Sheldon IM, Williams EJ, Miller AN, Nash DM, Herath S. 2008. Uterine diseases in cattle after parturition. *The Veterinary Journal* **176**, 115-121.
- Spicer LJ, Vernon RK, Tucker WB, Wettemann RP, Hogue JF, Adams GD. 1993. Effects of inert fat on energy balance, plasma concentrations of hormones, and reproduction in dairy cows. *Journal of Dairy Science* **76**, 2664-2673.
- Stevenson JS, Britt JH. 1979. Relationships among luteinizing hormone, estradiol, progesterone, glucocorticoids, milk yield, body weight and postpartum ovarian activity in Holstein cows. *Journal of Animal Science* **48**, 570-577.
- 高橋 透. 2014. 胎子および受胎産物. 小笠 晃, 金田義宏, 百目鬼郁男 (監修). 動物臨床繁殖学. pp.165-174. 朝倉書店, 東京.
- Wang C, Liu Q, Yang WZ, Huo WJ, Dong KH, Huang YX, Yang XM, He DC. 2009. Effects of glycerol on lactation performance, energy balance and metabolites in early lactation Holstein dairy cows. *Animal Feed Science and Technology* **151**, 12-20.
- Wilcox G. 2005. Insulin and insulin resistance. *Clinical Biochemist Reviews* **26**, 19-39.
- Williams EJ, Fischer DP, Pfeiffer DU, England GC, Noakes DE, Dobson H, Sheldon IM. 2005. Clinical evaluation of postpartum vaginal mucus reflects uterine bacterial infection and the immune response in cattle. *Theriogenology* **63**, 102-117.
- Zaaijer D, Noordhuizen J. 2003. A novel scoring system for monitoring the relationship between nutritional efficiency and fertility in dairy cows. *Irish Veterinary Journal* **56**, 145-115.

## The effect of the glycerol pellet supply on dairy cows during the close-up dry period

Chiho KAWASHIMA<sup>1</sup>, Moeri KONDO<sup>1</sup>, Rui HASEGAWA<sup>1</sup>, Masaharu AZEGAMI<sup>1</sup>, Juri OI<sup>1</sup>, Toshiki SHIBUYA<sup>1</sup>, Yuka SUGIMOTO<sup>1</sup> and Norio YAMAGISHI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Field Center of Animal Science and Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

<sup>2</sup> Research Center for Global Agromedicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido 080-8555, Japan

Corresponding : Chiho KAWASHIMA (fax : +81 (0) 155-49-5653, e-mail : kawasima@obihiro.ac.jp)

This study examined the effects of the glycerol pellet supply during the close-up dry period in dairy cows. The peripartum metabolic status, postpartum disease, milk yield, and recovery of reproductive function were examined in 41 dry Holstein cows. Daily doses of 200 g of glycerol pellets containing 40 % glycerol (Gly group, n=20) or 200 g of placebo pellets without glycerol (Cnt group, n=21) were orally administered 21 days before the expected calving date through parturition. The rumen fill score (RFS) before calving did not change in the Gly group, but the RFS decreased gradually as the calving day approached ( $P<0.05$ ) in the Cnt group. In the Gly group, the  $\beta$ -hydroxybutyrate acid (BHBA) blood concentration during 2 weeks prepartum was lower ( $P<0.05$ ), and the body condition score (BCS) during 2 weeks prepartum ( $P<0.05$ ) and 4 weeks postpartum ( $P=0.06$ ) was higher. In addition, blood non-esterified fatty acid concentration during 4 weeks postpartum was tended to be higher ( $P=0.09$ ) and blood  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase activity at 4 and 4.5 week postpartum was higher ( $P<0.05$ ) in Gly group than in Cnt group. The number of cows that developed ketosis after parturition did not differ between groups, although the Gly group cows with ketosis tended to have lower blood BHBA concentrations ( $P=0.07$ ). There were no differences in the milk yield and recovery of reproductive function after parturition between groups. Administering 40 % glycerol pellets to dairy cows during the close-up dry period may help to maintain feed intake, improve hepatic lipidosis, proper maintaining of BCS, and alleviate ketosis symptoms.

*Nihon Chikusan Gakkaiho* 92 (2), 159-168, 2021

**Key words** : dry cow, glycerol pellet, ketosis,  $\beta$ -Hydroxybutyrate acid