

牛に対するアミノ酸の最近の知見

芝野 健一, 井上 陽一, 小野 哲嗣

岡山理科大学獣医学部

はじめに

自然界には700種類以上のアミノ酸が見出されているが、蛋白質を構成するアミノ酸はわずか20種類である。そのアミノ酸は炭素にカルボキシ基 (-COOH) とアミノ基 (-NH₂)、水素、そして側鎖をそれぞれ結合し固有のアミノ酸を構成している。20種類のうち反芻動物と非反芻動物の必須アミノ酸は組織間における代謝を基本にした場合、両者とも同様の10種類と考えられている。反芻動物以外は食料を介してアミノ酸を摂取するが、反芻動物では飼料由来のものと第一胃に生息する微生物によって産生される菌体蛋白質でその多くを賄っていると推察され、反芻動物特有の蛋白質代謝が行われている。しかし、実際には20種すべてのアミノ酸が第一胃で合成されるかは不明である。また動物種によっては、成長段階でのみ必須と区分されるアミノ酸も存在する。乳牛における必須アミノ酸と非必須アミノ酸の違いは体内で合成できない、あるいは必要とする分量を合成できないアミノ酸を必須アミノ酸と言い、それ以外のアミノ酸を非必須アミノ酸と区別している。

乳牛におけるアミノ酸の役割は生体維持、成長、妊娠、生産であり、中でも乳生産には相当量のアミノ酸が必要と考えるのが妥当であるが、単にタンパク質の構成成分として必要となるばかりでなく、菌体蛋白質やクエン酸回路等の代謝中間体の生成に深く関与し、乳生産と生命維持に重要な栄養素である。アミノ酸は炭素、水素、酸素、窒素の4つの元素を持ち合わせており、生体にとって使い勝手が良いものと考えられる。アミノ酸は様々な生体分子の前駆体としてこれらの素材を提供する役割を担っており、

その機能は想像をはるかに超える¹⁾。

血中遊離アミノ酸 (Free amino acids : FAA) 濃度は、飼料摂取、消化管への直接注入、サプリメント、体内消費によって変動するが、このような人為的あるいは極端な現象が生体に起きない限り概ね一定の割合で推移している。そして、重篤な疾病の発生や極度の栄養不足状態に陥った場合、そこではじめて血中濃度は極端な変化を示し、一部を除いて多くのアミノ酸濃度は減少する。このように、濃度変動は産乳量や飼料摂取量の影響を大きく受けるがFAA濃度を調査した国内の報告は比較的少ない。乳牛の妊娠末期では産乳に向けた活発な栄養代謝が始まり、肝臓における糖新生、体脂肪からの脂肪酸動員、筋肉組織からのアミノ酸動員が増大する^{2,3)}。特に高泌乳牛では飼料中の蛋白質含量や飼料のルーメンバイパス性、エネルギー摂取状況に影響される⁴⁻⁷⁾。また飼料へのアミノ酸サプリメントはFAA濃度を直接増加させる⁸⁻¹⁰⁾。このように、乳牛のアミノ酸代謝を検討する場合、乳期別、経時的変動、泌乳量、疾病との関連性に関する報告は興味深い。

本稿では牛を対象にした分娩前後の変動、分娩後の脂肪肝やケトーシス発症牛のFAA濃度と国内外の子牛に対する応用例を報告する。

乳牛の分娩前後のアミノ酸濃度

供試牛は1農場に飼養され8~11月の4か月間に分娩した2産次以上のホルスタイン種乳牛7頭 (4.3±1.3産次) とした。供試牛7頭の305日補正平均乳量は8,304±653kgで標準的な搾乳牛である。泌乳期飼料は乳牛用配合飼料を1日4回乳量に応じて分離給与し、泌乳量が35kg以上の個体にはトウモ

ロコシフレークと圧ペン大麦を追加給餌した。粗飼料はアルファルファ乾草、スーダングラス乾草、オーツ乾草、イタリアンライグラス乾草およびビートパルプとし、1日1回緩衝剤とミネラルを添加した。乾乳期飼料は粗飼料を主体に給与し、配合飼料は分娩予定3週間より漸次増量し、1日当りの給与量の上限を4kgとした。

採血は分娩予定20日前、同10日前、分娩翌日、分娩15日後、同30日後、同60日後、同90日後の計7回とし、毎回午前10～11時に頸静脈からプレイン採血管を用いて行った。アミノ酸分析は、逆相分配カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー法により、必須アミノ酸 (EAA) はメチオニン (Met)、リジン (Lys)、バリン (Val)、ロイシン (Leu)、イソロイシン (Ile)、フェニルアラニン (Phe)、アルギニン (Arg)、スレオニン (Thr)、トリプトファン (Trp)、ヒスチジン (His)、非必須アミノ酸 (NEAA) はグリシン (Gly)、アラニン (Ala)、セリン (Ser)、プロリン (Pro)、チロシン (Tyr)、グルタミン (Gln)、グルタミン酸 (Glu)、アスパラギン (Asn)、アスパラギン酸 (Asp)、オルニチン (Orn) の血清中濃度を測定した。測定値はstudent's *t*-testを用いて検定し、分娩予定20日前に対する値で示した。分析の結果4つのタイプに分類された (図1)。

タイプ1にはVal, Leu, Ile, Trp, Ala, Tyr, Pro, Asn, Asp, Ornが分類され、これらの変動は産前から有意に低下し、分娩翌日の値を最低値として再び有意に上昇した。タイプ2にはGly, Serが分類され、産前から分娩翌日にかけて上昇し ($P<0.05$)、分娩後30日以降は下降した。タイプ3にはMet, Phe, Lys, Thr, Arg, Gluが分類され、産前から分娩翌日にかけて低下し、産後は顕著な変化を示さなかった。タイプ4にはHis, Glnが分類され、分娩翌日から分娩90日後まで引き続き低下した。

このように、血中のFAA濃度は特徴的な変動を示した。クエン酸回路の代謝中間体である α ケトグルタル酸の前駆アミノ酸はGluで、その生成にはGln, Arg, Pro, Orn, Hisが必要である。同様にコハク酸ではVal, Gly, Ser, Ala, Tyr, Orn, フマル酸ではArg, オキサロ酢酸ではAsp, Asnが必要である。さらに、脂肪代謝の代謝中間体のピルビン酸にはIle, Ala, Ser, アセチルCoAにはLeu, Trp, Tyrがそれぞれ関与している。したがって、分娩前後の各FAA濃度の変動は飼料からの供給量や泌乳の開始により活発なアミノ酸代謝の結果を反映しており、これらの変動要因を調査することは乳牛の分娩前後の生理的変化や給与飼料内容を検討する上で有用と思われる。

タイプ1に分類されたVal, Leu, Ileは分枝鎖アミ

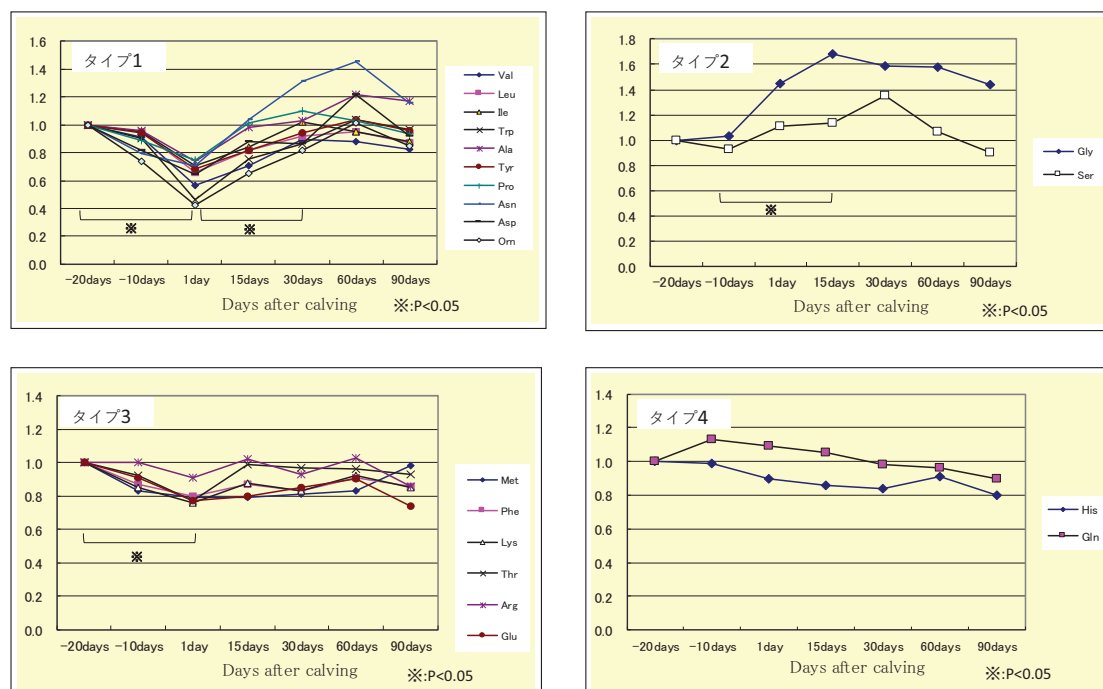


図1 血清中遊離アミノ酸濃度の変化 (Type 1～4)

ノ酸 (BCAA) と呼ばれ、エネルギー代謝と関連するアミノ酸である。Trpを加えた4種のEAAは分娩を境に有意な減少と増加が観察された。この変動は分娩前後の乾物摂取量を反映していると考えられる。一方NEAAは糖新生に関連するアミノ酸のAla, Tyr, Pro, Asn, Asp, Ornがタイプ1に分類された。Alaは筋肉組織と肝臓間でグルコース・アラニンサイクルを構築し、糖新生性アミノ酸の中では最も合成速度が早いと言われている。またOrnは尿素回路を構成するアミノ酸である。したがって、タイプ1に分類された10種のアミノ酸の中で、BCAAとTrpの推移は飼料摂取量と関連し、Ala, Tyr, Pro, Asn, Asp, Ornの6種のNEAAは糖新生における代謝過程と蛋白質代謝を反映していると思われ、飼料摂取量とアミノ酸代謝が直接FAA濃度に影響したと推察された。

タイプ2のGlyとSerは産前から分娩翌日にかけて上昇した。多くのアミノ酸濃度が産前に低下する中、相反する変動として観察され、過去の報告と同様であった⁵⁾。Glyは活性メチレン基をもつ唯一のアミノ酸で多くの活性物質の基質として利用され、総NEAAに占める割合は最も高い。ReisらはGly濃度について、飼料摂取量が低下する分娩前に比べ乾物摂取量が増加する分娩後は高値となりその後低下すると報告している¹¹⁾。ケトーシス牛へのデキサメサゾン投与では薬剤による糖新生効果によってGlyは顕著に低下する¹²⁾。したがって、産前からのGly濃度の上昇は産前のエネルギー要求量の増大に伴うタンパク質不足を筋肉組織からの動員で補うもので、分娩後30日以降の低下は乾物摂取量の上昇によって栄養出納が改善され筋肉組織からの動員が減少するためと思われる。Ser濃度はGlyとほぼ同様に推移した。これは解糖系中間体である3-ホスホグリセリン酸からGlyとSerが合成されることやGlyとSer間には可逆的な異化反応が存在するためである。このように、タイプ2に分類されたアミノ酸は体組織からの動員や糖分解過程で生成されるアミノ酸と考えられた。

タイプ3に分類されたMet, Phe, Lys, Thr, Arg, Gluは産前に低下したが産後の上昇は観察されなかった。Meijerらは分娩前6週と分娩後15週の各

FAA濃度を比較したところMet, Phe, Lys, Gluは分娩後15週で低値を示したと報告している⁵⁾。今回の成績も同様に産前の低下は乾物摂取量の減少を示し、産後は乳腺組織への取り込みやNEAA合成のための消費が増大した結果と推察される。このように、タイプ3のアミノ酸は産乳性に影響を及ぼす可能性があり、制限アミノ酸のMet, Lysはこのタイプに含まれる。

タイプ4に分類されたHisとGln濃度は分娩後泌乳期が進むに従い漸次低下した。アミノ酸プールを構成する主なアミノ酸のGlnは総NEAA量に占める割合は高い。分娩後のGln濃度は乳腺組織への取り込みの増大を反映し、分娩直後に比べ泌乳期で有意に低下するとの報告があり⁵⁾、今回の成績も同様の傾向を示した。GlnはグルタミンナーゼによってGluを生成するが、これを障害する反応過程は存在しないため、Gluへの転換が進行し遊離するGln濃度は漸次減少したと推察される。一方Hisは成長期の動物にとって不可欠なアミノ酸である。また、EAAであるため飼料からの供給量に関連すると思われるが、産前から連続して低下した要因は今回明らかにできなかった。タイプ4に分類されたアミノ酸はタイプ3のアミノ酸と同様に搾乳牛にとって不足しやすいアミノ酸と推察される。しかし、タイプ3, 4に分類された各アミノ酸の変動要因は飼料由来のアミノ酸含量、ルーメンバイパス性、下部消化管からの吸収率との関連性も合わせて今後検討して行く必要がある。

乳牛の分娩前後のFAA濃度は飼料摂取量を直接反映するEAAの増減と体組織からの動員や代謝中間体の生成に関連するNEAAの増減が強く関与していた。分娩前後のFAA濃度の測定は乳牛の栄養状態を判定する上で有用な情報になるとと思われる。

乳牛の分娩前後に発生した脂肪肝とアミノ酸濃度

乳牛の分娩前後は乾物摂取量低下、代謝病や周産期病発生、肝機能低下、免疫機能低下が起こる^{13~15)}。妊娠末期では胎子の成長、胎盤や乳腺組織の発達・維持のため、エネルギー要求量は増大する²⁾。同時に、分娩に向けた内分泌の変化や各種のストレスは

表1 血液生化学所見とボディコンディションスコア

| | | 分娩後日数 | | | | | | | | ANOVA P ¹⁾ |
|------------------------|------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|----------------|--------------------------|
| | | -30 | -14 | -7 | 1 | 7 | 14 | 30 | 60 | |
| BHBA (μ mol/L) | 脂肪肝群 | 423 \pm 81 | 415 \pm 74 | 425 \pm 131 | 1022 \pm 331 | 1798 \pm 1016 | 1287 \pm 775 | 1961 \pm 1241 | 511 \pm 78 | 0.0049 |
| | 対照群 | 428 \pm 36 | 453 \pm 88 | 409 \pm 93 | 675 \pm 305 | 693 \pm 192 | 610 \pm 225 | 786 \pm 268 | 582 \pm 201 | ** |
| FFA (μ Eq/L) | 脂肪肝群 | 301 \pm 63 | 298 \pm 137 | 264 \pm 111 | 779 \pm 321 | 1398 \pm 500 | 1186 \pm 277 | 616 \pm 336 | 288 \pm 56 | 0.0719 |
| | 対照群 | 172 \pm 46 | 194 \pm 69 | 200 \pm 43 | 744 \pm 391 | 1169 \pm 664 | 639 \pm 143 | 426 \pm 196 | 324 \pm 291 | |
| 血糖 (mg/dL) | 脂肪肝群 | 67 \pm 3 | 69 \pm 2 | 68 \pm 4 | 60 \pm 13 | 50 \pm 7 | 61 \pm 6 | 53 \pm 9 | 58 \pm 4 | 0.6333 |
| | 対照群 | 65 \pm 4 | 61 \pm 4 | 65 \pm 5 | 62 \pm 22 | 55 \pm 3 | 55 \pm 4 | 57 \pm 5 | 63 \pm 1 | |
| TCho (mg/dL) | 脂肪肝群 | 119 \pm 23 | 107 \pm 24 | 89 \pm 20 | 70 \pm 9 | 67 \pm 15 | 76 \pm 28 | 146 \pm 31 | 233 \pm 64 | 0.0002 |
| | 対照群 | 136 \pm 15 | 132 \pm 19 | 111 \pm 18 | 87 \pm 6 | 89 \pm 21 | 110 \pm 11 | 178 \pm 14 | 279 \pm 64 | ** |
| AST (IU) | 脂肪肝群 | 63 \pm 16 | 56 \pm 13 | 56 \pm 10 | 73 \pm 7 | 239 \pm 152 | 155 \pm 71 | 103 \pm 21 | 71 \pm 5 | 0.9198 |
| | 対照群 | 61 \pm 7 | 73 \pm 15 | 73 \pm 30 | 105 \pm 22 | 141 \pm 56 | 108 \pm 21 | 78 \pm 8 | 71 \pm 9 | |
| LCAT (IU) | 脂肪肝群 | 739 \pm 164 | 743 \pm 128 | 753 \pm 177 | 588 \pm 140 | 521 \pm 98 | 640 \pm 127 | 837 \pm 150 | 1110 \pm 39 | 0.0001 |
| | 対照群 | 965 \pm 71 | 976 \pm 112 | 926 \pm 72 | 792 \pm 102 | 808 \pm 70 | 870 \pm 30 | 1043 \pm 64 | 1034 \pm 50 | ** |
| BCS | 脂肪肝群 | 4.13 \pm 0.4 | 4.13 \pm 0.4 | 4.00 \pm 0.5 | 3.75 \pm 0.5 | 3.31 \pm 0.4 | 3.06 \pm 0.4 | 2.63 \pm 0.3 | 2.44 \pm 0.2 | 0.9319 |
| | 対照群 | 3.94 \pm 0.1 | 3.94 \pm 0.1 | 3.94 \pm 0.1 | 3.81 \pm 0.2 | 3.56 \pm 0.1 | 3.06 \pm 0.2 | 2.75 \pm 0.3 | 2.50 \pm 0.3 | |

1) 反復二元配置分散分析 (* * : P<0.01) 2) 平均値 \pm 標準偏差

3) 同一項目内同一採血時の有意性(†: P<0.01)

負のエネルギーバランスを来たし、栄養代謝異常に陥ると考えられる¹⁶⁾。母体側で生じたエネルギー不足は体蓄積脂肪の動員によって補われるが、肝臓の処理能力を超えて大量の脂肪酸が肝細胞に流入すれば、肝細胞の脂肪化が進行し脂肪肝が発生する。ここでは、分娩前後に発生した脂肪肝牛のFAA濃度を測定し、アミノ酸の量的・質的なアンバランスと肝臓の脂肪化とアミノ酸との関連性について検討した。

供試牛は高泌乳牛を飼養する1酪農場で、乾乳期に高いボディコンディションスコアを示す経産牛8頭(試験開始時平均BCS: 4.06 \pm 0.27, 平均年齢: 5.5歳)とした。供試牛8頭を脂肪肝や第四胃変位に罹患した4頭(脂肪肝群)と周産期を健康に経過した4頭(対照群)に区分した。血液サンプルは分娩前30日, 14日, 7日, および分娩後1日, 7日, 14日, 30日, 60日の計8回とし, 毎回午前10~11時に頸静脈より採血した。

血中FAA濃度は逆相分配カラムを用いたHPLC法により10種類のアミノ酸を分離・定量した。血液生化学検査は血糖, 総コレステロール, 遊離脂肪酸, β ヒドロキシ酪酸, ASTを全自動分析装置(TBA-80FR, 東芝メディカルシステムズ, 栃木)で測定した。血漿中レシチンコレステロールアセチルトランスフェラーゼ(Lecithin-cholesterol acyltransferase: LCAT)活性値は, 市販キット(Anasolv LCAT, Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd., Tokyo)を用いて測定した。BCSは, Fergusonの評価法^{17,18)}に従って実施した。

脂肪肝群の肝臓組織は当該牛の第四胃変位開腹手術時に生検し, ヘマトキシレンエオジン(HE)法により染色した。両群間の比較は反復二元配置分散分析およびStudent's *t*-testにより実施した。測定値は平均値 \pm 標準偏差で示した。

脂肪肝群の肝片組織標本では肝細胞に著しい空胞変性がび慢性に認められ, 重度の肝脂肪化が観察された。血液生化学所見は脂肪肝群のBHBA濃度は対照群に比べて高値を示し, LCAT活性値, TCho濃度は対照群に比べて低値を示した(P<0.01)。また, 採血日毎の比較では脂肪肝群のLCAT活性値が分娩前30日から分娩後30日まで対照群に比べ低値であった(P<0.01)。: 血糖, AST, BCSは両群間に差は認められなかった(表1)。FAA濃度は脂肪肝群のMet, PheおよびArg濃度が対照群に比べ低値であった(P<0.01, P<0.05)。特に脂肪肝群のMet濃度は分娩14日前から低下する傾向を示し(P<0.07), 分娩翌日および分娩14日後は対照群に比べ低値を示した(P<0.01)(表2)。

Metは乳蛋白質生成のために乳腺組織への取り込み量が多いことや肝臓に流入する遊離脂肪酸をvery low density lipoproteins (VLDL)に変換し, 肝臓外に運搬するのに必要なアポリポ蛋白質やリン脂質の合成過程のメチル基供与に重要である^{1,3,19)}。またMetやLysは肝臓に流入した遊離脂肪酸が肝細胞内のミトコンドリアの内膜通過に関与するcarnitineの合成にも関与している。周産期病の主要な原因は

表2 血中遊離アミノ酸濃度

| | | 分娩後日数 | | | | | | ANOVA |
|---------------------------|------|-----------------|----------------|----------------|----------------|------------------|------------------|-----------------|
| | | -30 | -14 | 1 | 14 | 30 | 60 | p ₁₎ |
| Met | 脂肪肝群 | 26±2 (100) | 23±2 (91) | 21±2 (83) | 18±3 (70) | 17±3 (66) | 20±6 (79) | 0.0088 ** |
| | 対照群 | 26±3 (100) | 26±2 (100) | 26±4 (101) | 23±2 (88) | 22±6 (87) | 20±3 (79) | |
| Lys | 脂肪肝群 | 83±5 (100) | 71±7 (85) | 50±10 (60) | 55±13 (67) | 66±14 (80) | 67±18 (81) | 0.1290 |
| | 対照群 | 92±24 (100) | 77±23 (94) | 51±10 (71) | 66±8 (74) | 74±15 (85) | 78±16 (83) | |
| Phe | 脂肪肝群 | 55±8 (100) | 54±5 (98) | 42±7 (78) | 43±7 (79) | 43±7 (80) | 43±9 (80) | 0.0291 * |
| | 対照群 | 62±6 (100) | 53±2 (83) | 47±9 (76) | 48±5 (80) | 50±6 (84) | 50±4 (80) | |
| Trp | 脂肪肝群 | 29±5 (100) | 30±5 (106) | 13±8 (44) | 30±1 (105) | 36±9 (130) | 41±7 (147) | 0.0551 |
| | 対照群 | 42±12 (100) | 29±15 (73) | 12±3 (31) | 40±5 (104) | 47±9 (121) | 42±5 (107) | |
| Thr | 脂肪肝群 | 58±3 (100) | 54±3 (94) | 42±8 (73) | 45±10 (78) | 59±19 (102) | 54±9 (93) | 0.3291 |
| | 対照群 | 70±13 (100) | 57±16 (81) | 41±9 (62) | 56±14 (81) | 58±17 (84) | 54±9 (82) | |
| Arg | 脂肪肝群 | 166±17 (100) | 156±22 (94) | 120±13 (73) | 115±17 (69) | 121±16 (73) | 133±23 (82) | 0.0245 * |
| | 対照群 | 173±26 (100) | 163±27 (94) | 133±26 (77) | 136±17 (80) | 150±32 (87) | 157±18 (92) | |
| His | 脂肪肝群 | 87±5 (100) | 66±9 (76) | 72±11 (82) | 53±5 (62) | 44±14 (50) | 44±17 (49) | 0.3798 |
| | 対照群 | 81±9 (100) | 67±9 (83) | 75±18 (91) | 58±9 (72) | 53±15 (67) | 53±6 (66) | |
| BCAA ²⁾ | 脂肪肝群 | 515±16 (100) | 469±21 (91) | 321±64 (62) | 364±87 (70) | 555±205 (107) | 445±49 (87) | 0.0713 |
| | 対照群 | 594±85 (100) | 490±99 (82) | 313±59 (55) | 423±57 (72) | 575±72 (99) | 612±121 (107) | |

1) 反復二元配置分散分析)BCAA=Val+Leu+Ile 平均値±標準偏差
同一項目同一採血時の有意性(‡P<0.01)

妊娠末期における過肥、負のエネルギーバランス、肝脂肪化が要因となるが、本調査においても脂肪肝群では脂肪肝の診断パラメーターの多くが異常を示した。Metの低下は肝臓における脂質の排泄障害の原因となるため、分娩前後の血中Met濃度の低下は肝脂肪化を増悪化し周産期病の発生に関与すると思われる。

ケトーシス牛の血清中遊離アミノ酸濃度

乳牛の移行期は乾乳、出産、乳生産へ進行するが、栄養要求量の増加に伴って代謝亢進、免疫能の低下、

内分泌的变化が生じ、分娩後数週間は様々な疾病が発生する^{2,20)}。乳牛の全疾病の約75%は周産期に集中するが²¹⁾、同時に泌乳量も最大となるため疾病リスクは最も高い²²⁾。周産期病や代謝病は乳房炎、乳房水腫、子宮炎、胎盤停滞、ケトーシスがあるが^{23,24)}、ケトーシスとFAA濃度を検討した報告は少ない。

供試牛は1酪農場に飼養されるホルスタイン種経産牛で、ケトーシスを発症した6頭(ケト群)とケトーシスを発症しなかった5頭(対照群)の計11頭とした。飼養形態はフリーストールで1日2回TMR飼料を給与した。供試牛は6月~10月の同一

期間に分娩予定牛を無作為に選定し、分娩14~10日前（分娩前）、分娩翌日、分娩15日後（15日後）、分娩30日後（30日後）に尾静脈より採血した。

血液生化学性状は血糖、TCho、BHBA、NEFAを全自動分析装置（TBA120-FR、東芝メディカルシステムズ、栃木）で測定した。ケトーシスの診断基準は血中BHBA濃度を $1200\mu\text{mol/L}$ 以上とした²⁵⁾。FAA濃度の測定はMet、Gly、Alaとし、蛋白栄養指標としてGly/Ala比²⁶⁾、エネルギーおよび蛋白栄養指標にはMet/Gly比（Met/Gly $\times 100$ ）²⁷⁾を算出し、栄養バランス判定にこれらの指標を用いた。BCSは、Fergusonの評価法^{17,18)}に従って評価した。測定結果はルービン検定によって等分散性を確認後、ケト群と対照群の比較は各牛項目内で反復一元配置分散分析を行った。各項目内の分娩翌日に対する比較はFisherの最小有意差法にて多重検定を実施した。危険率5%未満を有意差ありとし、測定結果は平均値 \pm 標準偏差で示した。

血液生化学性状を表3に示した。血糖では、ケト群の分娩翌日は対照群に比べて高く、ケト群の15日後は分娩翌日に対し有意に低下した（ $P<0.01$ ）。

BHBAでは、ケト群の分娩翌日に対し15日後は増加し、対照群に比べて高かった（ $P<0.01$ ）。NEFAでは、対照群の分娩翌日に対し15日後は減少し（ $P<0.05$ ）、30日後はケト群に対し有意に低かった（ $P<0.01$ ）。主なエネルギー源であるグルコースは代謝燃料として適切な代謝機能と免疫機能に不可欠であり、血糖維持は乳牛の代謝疾患を防止するために重要である^{28~31)}。分娩後の低血糖はエネルギー産生の急増が生体内で起こり、エネルギー不足状態に陥りBHBA、NEFAが増加した。

搾乳牛のGly濃度はSerとともに産前から増加するが、ケト群の15日後は増加した（ $p<0.01$ ）。Gly/Ala比では、Alaはピルビン酸キナーゼを阻害し糖新生および解糖を調節してグルコース産生を促すため、Ala濃度は減少する³²⁾。エネルギーに対する相対的なタンパク質不足状態はケトーシス発症と栄養学的関連性があり、ケトーシス治療にはアミノ酸からのアプローチも必要と思われる。Met/Gly比はエネルギーと蛋白栄養の指標で²⁷⁾、必須アミノ酸のMetは乾物摂取量の影響を受ける。ケト群では分娩翌日に対し15日後は低下した（ $P<0.05$ ）。5.0を下回る場

表3 血中遊離アミノ酸濃度

| 群区分 | | 分娩前(14~10日) | 分娩翌日 | 分娩15日後 | 分娩30日後 | |
|-------------------------------|-----|-------------|-----------------|-----------------|----------------------------|-----------------|
| 血糖 (mg/dl) | ケト群 | n=6 | 63 \pm 2 | 65 \pm 12 | 48 \pm 4 [‡] | 55 \pm 5 |
| | 対照群 | n=5 | 58 \pm 6 | 51 \pm 5 | 49 \pm 4 | 56 \pm 5 |
| BHBA ($\mu\text{mol/l}$) | ケト群 | n=6 | 465 \pm 80 | 582 \pm 134 | 956 \pm 382 [‡] | 770 \pm 227 |
| | 対照群 | n=5 | 452 \pm 83 | 570 \pm 139 | 530 \pm 49 | 557 \pm 169 |
| NEFA ($\mu\text{Eq/l}$) | ケト群 | n=6 | 227 \pm 194 | 490 \pm 103 | 423 \pm 125 | 393 \pm 132 |
| | 対照群 | n=5 | 174 \pm 130 | 497 \pm 96 | 328 \pm 114 [†] | 196 \pm 81 |
| Gly (nmol/ml) | ケト群 | n=6 | 293 \pm 90 | 396 \pm 57 | 679 \pm 68 [‡] | 470 \pm 128 |
| | 対照群 | n=5 | 293 \pm 74 | 480 \pm 22 | 515 \pm 120 | 452 \pm 143 |
| Met/Gly比 | ケト群 | n=6 | 7.0 \pm 2.3 | 6.3 \pm 1.7 | 3.0 \pm 0.9 [‡] | 4.3 \pm 0.8 |
| | 対照群 | n=5 | 7.4 \pm 1.2 | 5.6 \pm 1.3 | 4.2 \pm 0.9 [‡] | 5.2 \pm 1.2 |
| Gly/Ala比 | ケト群 | n=6 | 1.4 \pm 0.2 | 2.0 \pm 0.3 | 3.5 \pm 0.8 [‡] | 2.3 \pm 0.6 |
| | 対照群 | n=5 | 1.5 \pm 0.3 | 2.5 \pm 0.3 | 2.3 \pm 0.3 | 1.9 \pm 0.6 |
| BCS | ケト群 | n=6 | 3.50 \pm 0.16 | 3.15 \pm 0.25 | 2.95 \pm 0.34 | 2.70 \pm 0.37 |
| | 対照群 | n=5 | 3.25 \pm 0.32 | 3.17 \pm 0.37 | 2.88 \pm 0.47 | 2.75 \pm 0.38 |

Met/Gly比:Met $\times 100$ /Gly Gln%:Gln/(Gln+Glu) $\times 100$

平均値 \pm 標準偏差

同一群内同一項目内の分娩翌日との有意性 †: $P<0.05$, ‡: $P<0.01$

両群間の有意性 *: $P<0.05$, ** $P<0.01$

合はタンパク質摂取不足が強く疑われる結果となった。BCSではケトーシス発症にかかわらず分娩前に対し30日後は低下した ($P<0.01$)。

高泌乳牛は高いエネルギー要求が起こり、体脂肪動員が優先される^{33~35}。ケトーシスの発生はエネルギーとタンパク質不足が顕著で、Met濃度の増加は緩慢で飼料摂取量が低迷していたと推察される。周産期病及び代謝病は泌乳量や繁殖成績にも影響を及ぼすため¹⁶、酪農場への経済的な影響は大きくアミノ酸不足もその要因と思われる。

応用例

① 虚弱子牛への対策

近年、和牛繁殖農場では妊娠末期の栄養が出生子牛の免疫機能に影響を及ぼすことが明らかにされ、特に飼料中タンパク質濃度の不足が問題との指摘があり、不足することが推察される産前の給与飼料の増量が推奨されている^{35,36}。虚弱子牛症候群の子牛のFAA濃度はVal, Leu, Ile, Met, His, Arg, Tyrの低下が顕著で、これらは骨格筋の筋線維の構成成分であると共にエネルギー代謝、及び成長と免疫に関係するアミノ酸の減少が明らかにされている。同時にこれらの子牛を出生した母牛のFAA濃度も低値を示し、その要因は分娩60~15日前の飼料中粗蛋白充足率の不足であった。予防対策として飼料中粗蛋白濃度を高め、さらに5種類のバイパスアミノ酸を含有する製剤を1日あたり100gと設定し、分娩60日前より飼料添加したところ、虚弱子牛の出生は見られなくなり、FAA濃度は投与後有意に増加した。同時に胸腺スコアの増加、腸炎の発生率も低下し、妊娠末期の母牛栄養は虚弱子牛の出生に関連性があると報告している³⁷。

② エピジェネティクスと肥育成績

出生直後のホルスタイン種子牛を用いて、分枝鎖アミノ酸 (BCAA) を3日齢から25日間連続添加し、その後の成長を無添加群と比較した。添加したアミノ酸量は体重1kgあたり2gとし、Val, Leu, Ileを1対1対1の割合で調整したものを代用乳に添加した。その結果、試験開始後2か月齢の平均DGは添加群 1.16 ± 0.26 kg/日に対し無添加群 0.51 ± 0.08 kg

/日と有意な差が見られた。さらに、20か月間肥育したところ、出荷時体重は添加群 759.5 ± 17.7 kgに対し無添加群 661.7 ± 21.2 kgと有意な差がみられた。これに伴って、添加群では血中成長ホルモンとIGF-1濃度も有意に増加した³⁸。

国内の他の添加試験では、2パターンのアミノ酸を含有するカクテルを用意し、初乳を5日間投与した健全な交雑種雄子牛を用いたアミノ酸カクテル投与試験がある。アミノ酸投与の目的は体質の改善を促し成長や生産性の向上を期待するものである。本試験では血液性状、血中アミノ酸濃度、体型についてアミノ酸投与2群と無投与の対照群を比較した。設定したアミノ酸カクテルは、山羊において成長ホルモン分泌亢進作用が知られているアルギニンとグルタミン酸を含むカクテル10 (Asp, Lys, Val, Met, Leu, Thr, Ile, Trp, Arg, Glu) とカクテル8 (Asp, Lys, Met, Thr, Glu, Val, Leu, Ile) を用いて、生後5日齢から14日間、カクテル10は500mg/kg/日、カクテル8は250mg/kg/日を代用乳に混和し、対照群には投与しなかった。その結果、32週齢後の体重、体高、胸囲、管囲は、カクテルを投与した2群が対照群に比べ有意に高く、その後25~30か月齢まで肥育したところ、投与群は対照群に比べ出荷が早まり肉質評価に差は無かった。血液性状と血中アミノ酸濃度は各群間に差はなかったが、投与群では対照群に比べIGF-1の合成分泌亢進が認められた。さらにアミノ酸カクテルの投与後も引き続き高く推移した。投与群では成長ホルモンが肝実質細胞に働きかけてIGF-1合成分泌を亢進し、IGF-1による標的器官の細胞分裂を高める作用が発現した。このように、骨格筋、骨、肝臓、腎臓、神経、皮膚、肺臓などの細胞に対し、インスリン様作用に加え、細胞の成長と発達を促したと考察している。さらにアミノ酸カクテル投与終了後も継続してIGF-1合成分泌が亢進したことから、飼育環境要因 (栄養状態) が遺伝子発現を調節するエピジェネティック現象の積極的な効果と結論づけている³⁹。

③ ホルスタイン種育成子牛の栄養改善と初回検定成績

3か月齢以内の育成子牛の栄養濃度と発育率がその後の産乳能力に影響を及ぼすか検討したニュー

ジールランドの報告がある。3日齢のホルスタイン種 (n=57) に対し、1日あたり全乳4リットルを哺乳し、19日齢に達したところで無作為に3群に区分した。炭水化物群には1日あたり全乳4リットルに200gの植物性炭水化物を添加し、アミノ酸群には1日あたり全乳4リットルに200gの植物性炭水化物とアミノ酸を添加した、対照群には1日あたり全乳4リットルのみを哺乳し、生体重が90kgで離乳した。その結果、アミノ酸群、炭水化物群、対照群の離乳日数は、それぞれ74.5日、77.7日、82.9日でアミノ酸群が短かった (P<0.01)。1日あたりの平均増体重は0.876kg, 0.815kg, 0.765kgでアミノ酸群が高かった (P<0.01)。初産時の初回検定成績では、1日あたりの泌乳量は、18.7kg, 18.8kg, 16.8kg, 乳脂肪量は、49.5g, 49.9g, 47.7gで対照群に対しアミノ酸群が多かった (P<0.01)。以上から哺乳期における栄養改善は、体重増加と初産時の乳生産に影響を及ぼすと報告している⁴⁰⁾。

まとめ

本稿では臨床現場におけるアミノ酸の応用例のごく1部を紹介したに過ぎないが、飼料成分濃度をアミノ酸レベルで検討する時代が訪れている。哺乳期のアミノ酸添加や妊娠末期の母体へのアミノ酸添加は虚弱子牛の出生を低減し、免疫機能の亢進、成長を高める効果が期待できる。しかも、アミノ酸の応用は育成期の成長効果にとどまらず、投与した子牛にやがて訪れる泌乳や繁殖成績など将来の生産性向上に寄与する結果が得られ興味深い。アミノ酸の応用にあたっては飼料添加物として承認されているアミノ酸であることや費用対効果を検討することは言うまでもないが、基礎となる給与飼料成分の充足を整えた上で、アミノ酸製剤を応用することが新たな飼養管理技術として貢献できるものと思われる。

引用文献

- 1) Chalupa W, Sniffen C: Protein and amino acid nutrition of lactating dairy cattle, *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice*, 7, 352-372 (1991)
- 2) Bell AW: Regulation of organic nutrient metabolism during

- transition from late pregnancy to early lactation, *J Anim Sci*, 73, 2804-2819 (1995)
- 3) Grummer RR: Etiology of lipid-related metabolic disorder in periparturient dairy cows, *J Dairy Sci*. 76 : 3882-3896 (1993)
- 4) Bach A, Huntington GB, Calsamiglia S, Stem MD: Nitrogen metabolism of early lactation cows fed diets with two different levels of protein and different amino acid profiles, *J Dairy Sci*, 83, 2585-2595 (2000)
- 5) Meijer GAL, Van Der Meulen J, Bakker JGM, Van Der Koelen CJ, Van Vuuren AM : Free amino acids in plasma and muscle of high yielding dairy cows in early lactation, *J Dairy Sci*, 78, 1131-1141 (1995)
- 6) Polan CE: Free amino acids in plasma and muscle of high yielding dairy cows in early lactation, *J Dairy Sci*, 74, 2997-3013 (1991)
- 7) Velle w, Sjaastad VS, Aulie A, Gronset DG, Feigenwinter KF, Framstad T: Rumen escape and apparent degradation of amino acids after individual intraruminal administration to cows, *J Dairy Sci*, 80, 3325-3332 (1997)
- 8) Ruquin H, Delaby L : Effects of the energy balance of dairy cows on lactational responses to rumen-protected methionine, *J Dairy Sci*, 80, 2513-2522 (1997)
- 9) 芝野健一, 大西真美, 中野恭治: 輸入乾草に依存するホルスタイン種乳牛に対するバイパスメチオニンの投与効果, *日獣会誌*, 53, 508-513 (2000)
- 10) Wu Z, Fisher JF, Polan CE, Schwab CG: Lactational performance of cows fed low or high ruminally undergradable protein prepartum and supplemental methionine and lysin postpartum, *J Dairy Sci*, 80, 722-729 (1997)
- 11) Reis PJ, Tunks DA: Changes in plasma amino acid Patterns in Sheep Associated with Supplements of casein and formaldehyde-treated casein, *Aust. J Biol Sci*, 23, 673-680 (1970)
- 12) 新林恒一, 元井霞子: 疾病における牛の血漿遊離アミノ酸について, *栄養生理研究会報*, 32, 1-23 (1988)
- 13) Fronk Tj, Schults LH, Hardie AR: Effect of dry period overconditioning on subsequent metabolic disorders and performance of dairy cows, *J Dairy Sci*, 63, 1080-1090 (1980)
- 14) Gerloff BJ, Herdt TH, Emery RS: Relationship of hepatic lipidosis to health and performance in dairy cattle, *J Amer Vet Med Assoc*, 188, 845-850 (1986)
- 15) Morrow DA: Fat cow syndrome, *J Dairy Sci*, 59, 1625-1629 (1976)
- 16) Goff JP, Horst RL: Physiological changes at parturition and thire relationship to metabolic disorders, *J Dairy Sci*, 80, 1260-1268 (1997)
- 17) Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N: Principal descriptors of body condition in Holstein dairy cattle, *J Dairy Sci*, 77, 2695-2703 (1994)
- 18) Ferguson JD, Azzaro G, Licitra G: Body condition assessment using digital images, *J Dairy Sci*, 89, 3833-3841 (2006)
- 19) McCarthy RD, Porter GA, Griel LC: Fatty acid composition

- of blood serum lipoproteins from normal and ketotic cows, *J Dairy Sci*, 51, 459-462 (1968)
- 20) Kimura K, Goff JP, Kehrl ME Jr, Harp JA: Phenotype analysis of peripheral blood mononuclear cell in periparturient dairy cows, *J Dairy Sci*, 82, 315-319 (1999)
- 21) LeBlanc S J, Lissemore K D, Kelton D F, Duffield T F, Leslie K E: Major advances in disease prevention in dairy cattle, *J Dairy Sci*, 89, 1267-1279 (2006)
- 22) Ingvarsen K D, Dewhurst R J, Friggens N C: On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle?, A position paper. *Livestock Science* 83, 277-308 (2003)
- 23) Kauko M: The levels of lipid peroxidation products in bovine retained and non retained placenta. *Prostaglandins, Leukotrienes and essential fatty acids*, 64, 33-36 (2001)
- 24) Miller JK, Brzezinska-Slebodzinska: Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J Dairy Sci*. 76, 2812-2823 (1993)
- 25) McArt JAA, Nydam DV, Ospina PA, Oetzel GR: A field trial on the effect of propylene glycol on displaced abomasum, removal from herd, and reproduction in fresh cows diagnosed with subclinical ketosis. *J Dairy Sci*, 95, 2505-2512 (2011)
- 26) Shibano K, Kawamura S, Hakamada R, Kawamura Y: The relationship between changes in serum glycine and alanine concentrations in non-essential amino acid and milk production in the transition period in dairy cows. *J Vet Med Sci* 67, 191-193 (2005)
- 27) Broderick GA, Satter LD, Harper AE: Use of plasma amino concentration to identify limiting amino acids for milk production. *J Dairy Sci* 57, 1015-1023 (1974)
- 28) LeBlanc SJ: Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period, *J Reprod Dev*, 56, suppl, 29-35 (2010)
- 29) Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL: Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows, *Veterinary Journal* 169, 286-292 (2005)
- 30) Sordillo LM: Selenium-dependent regulation of oxidative stress and immunity in periparturient dairy cattle, *Veterinary Medicine international*, 8, (2013)
- 31) Trevisi E, Amadori MC, Fogrossi S, Razzuoli E, Berroni G: Metabolic stress and inflammatory response in high yielding, periparturient dairy cows, *Research in Veterinary Sci*, 93, 695-704 (2012)
- 32) Wu G, Self JT: Amino acids: metabolism and functions. in, *Encyclopedia of Animal Science* (Ed. Pond wg, BellAW). Marcel Dekker, Inc, NY, pp9-12 (2005)
- 33) Contreras GA, Sordillo LM: Lipid mobilization and inflammatory responses during the transition period of dairy cows, *Comparative immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 34, 281-289 (2011)
- 34) Wathes DC, Clemson AM, Pollott GE: Associations between lipid metabolism and fertility in the dairy cow, *Reproduction Fertility and Development*, 25, 48-61 (2013)
- 35) 芝野健一, 大塚浩通, 嵐泰弘, 黒木智成, 斎藤隆文: 黒毛和種牛の周産期における低栄養が出生子牛の血液性状に及ぼす影響, *日獣会誌*, 62, 538-541 (2009)
- 36) 田波絵里香, 大塚浩通, 向井真知子, 小比類巻正幸, 安藤貴朗, 小形芳美, 川村清市: 妊娠末期における母牛の栄養状態が出生後の黒毛和種産子の末梢血白血球ポピュレーションに及ぼす影響, *日獣会誌*, 62, 623-629 (2009)
- 37) 小岩政照, 安藤貴朗, 鈴木一由, 田口清, 水江萌衣, 大塚浩通, 伊藤綾子, 板東勝彦: 虚弱子牛症候群の出生制御, *臨床獣医*, 27, 44-49 (2009)
- 38) Li JY, Suzuki J, Koike Y, Chen DS, Yonezawa T, Nishihara M, Manabe N: Effect of Dietary supplementation with branched-chain amino acids (BCAAs) during nursing on plasma BCAA levels and subsequent growth in cattle, *Asian Australian Journal Science*, 19, 1440-1444 (2005)
- 39) 眞鍋昇, 李俊佑: アミノ酸カクテル強化哺乳による牛のエピジェネティクス体質改善, *畜産技術*, 4, 16-20 (2012)
- 40) Margerison JK, Robarts ADJ, Reynolds GW: The effect of increasing the nutrient and amino acid concentration of milk diets on dairy heifer individual feed intake, growth, development, and lactation performance, *J Dairy Sci*, 96, 6539-6549 (2013)

プロフィール

芝野 健一

岡山理科大学 獣医学部 獣医学科
産業動物講座 教授

1970年北里大学獣医畜産学部 獣医学科卒業後, 兵庫県農業共済組合連合会就職, 2005年博士(獣医学)取得, 2014年4月 帯広畜産大学 臨床獣医学研究部門 産業動物獣医療学分野 教授, 2018年4月より現職