

## トレハロースの飼料添加が暑熱環境下の泌乳牛の酸化ストレス指標に及ぼす影響

北崎宏平<sup>1),2)†</sup> 大谷喜永<sup>3)</sup> 小原嘉昭<sup>3)</sup> 太田 剛<sup>1)</sup> 梅田剛利<sup>1)</sup>  
馬場武志<sup>1)</sup> 阿野仁志<sup>4)</sup> 片本 宏<sup>4)</sup>

- 1) 福岡県農林業総合試験場 (〒818-8549 筑紫野市大字吉木 587)  
2) 宮崎大学大学院医学獣医学総合研究科 (〒889-1692 宮崎市清武町木原 5200)  
3) 明治飼糧(株) 水戸研究牧場 (〒311-3123 東茨城郡茨城町若宮 870)  
4) 宮崎大学農学部 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西 1-1)

(2017年12月14日受付・2018年9月4日受理)

### 要 約

暑熱期の乳牛は、酸化ストレス状態にあることが知られている。泌乳牛において、トレハロースの飼料添加による酸化ストレス指標の改善が報告されているが、暑熱期での効果は不明である。本研究では、6頭の泌乳牛を対照区とトレハロース区(1.5%添加)に分け、2群×2期のクロスオーバー試験を暑熱期と適温期に実施し、血液、乳汁及び第一胃内容液の酸化ストレス指標への影響を調べた。暑熱期の飼料摂取量は、トレハロース区が対照区よりも多く( $P<0.01$ )、第一胃液中の原虫数は、暑熱期、適温期ともにトレハロース区において *Entodinium* 属が多かった( $P<0.05$ )。抗酸化能を表す 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性は、暑熱期、適温期ともにトレハロース区の乳汁で高く( $P<0.05$ )、血漿でも暑熱期のトレハロース区が高い傾向を示した。これらのことから、暑熱期における泌乳牛の飼料へのトレハロースの添加は抗酸化能の改善に有効と考えられた。

——キーワード：抗酸化能、乳牛、暑熱期、酸化ストレス、トレハロース。

-----日獣会誌 72, 147~153 (2019)

生体における酸化ストレスは、不対電子をもつフリーラジカルなどの活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) の発生とそれらを除去する抗酸化物質の体内バランスが不均衡となり、酸化力が亢進した状態である [1]。ROS は細菌感染時にマクロファージによる貪食作用で殺菌に利用されるなど生体防御で重要な役割をもつが、酸化力が亢進した状態では細胞膜、DNA、RNA の損傷を招き、動物の健康状態に悪影響を及ぼす [2, 3]。

周産期の乳牛では、脂質過酸化の指標となる血中 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 値が上昇するなどの酸化ストレス状態であり [4, 5]、その結果、免疫機能の低下によって乳房炎などの感染症を誘発すること [3, 5] が報告されている。また、暑熱環境下の乳牛は飼料摂取量の低下に伴って乳量と繁殖成績

が低下するが [6, 7]、Tanaka ら [8, 9] は泌乳牛において気温の上昇に伴う直腸温の上昇と血中アスコルビン酸濃度との間に負の相関が、TBARS 値との間に正の相関が認められるなど、暑熱環境下において酸化ストレスの状態であることを明らかにした。このように、泌乳牛は周産期と暑熱環境において酸化ストレスを受けやすいため、酪農経営を改善するためには、酸化ストレスを抑制することで生産性の低下による経済的損失を低減する必要がある。以前より、強い抗酸化能を有するビタミン E 投与による酸化ストレスの抑制が試みられ、乾乳期間における血中過酸化脂質濃度の低下 [10]、分娩後の血中グルタチオンペルオキシダーゼ活性の増加 [11] や乳中体細胞数の減少 [12] などの有効性が報告されている。その一方で、分娩日の血中過酸化脂質濃度の上昇を防げなかったこと [13] や潜在性及び臨床型乳房

† 連絡責任者：北崎宏平 (福岡県農林業総合試験場畜産部)

〒818-8549 筑紫野市大字吉木 587

☎ 092-925-5232 FAX 092-925-5038

E-mail : kitazaki-k6000@pref.fukuoka.lg.jp

炎の発症が増加したなどの副作用 [14] も報告されている。

トレハロースは天然に存在する二糖類で、 $\alpha$ グルコース 2 分子が 1-1 グリコシド結合したもので、不飽和脂肪酸の酸化抑制などの抗酸化能を有する [15, 16]。Aoki ら [1] は、泌乳牛の飼料にトレハロースを添加すると、血漿及び乳汁の抗酸化能の指標となる 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) ラジカル消去活性が増加し、脂質過酸化の指標となる TBARS 値が低下することを報告している。このため、飼料中にトレハロースを添加することで、暑熱環境下でも酸化ストレス指標が改善することが期待されるが、その効果については検討されていない。そこで、本研究では泌乳牛にトレハロース添加飼料を給与し、暑熱期と適温期における血液、乳汁及び第一胃内容液の酸化ストレス指標を調べることにした。

### 材料及び方法

**供試牛及び試験設計：**フリーストール牛舎内で飼養するホルスタイン種泌乳牛 6 頭を供試し、これらを 3 頭ずつ 2 群に分け、2 群×2 期のクロスオーバー法による飼養試験を実施した。1 期 14 日間とし、最初の 11 日間を予備期、のちの 3 日間を本試験期とした。暑熱期の試験期間は 7～8 月、期間中の日平均気温は  $29.4 \pm 1.7^\circ\text{C}$  (最高気温  $34.2 \pm 2.5^\circ\text{C}$ ) で、供試牛は体重  $736.6 \pm 72.9\text{kg}$ 、産次回数  $2.2 \pm 1.6$  回、泌乳日数  $377 \pm 131.2$  日、日乳量は  $23.0 \pm 5.2\text{kg}$  であった。また、適温期の試験期間は 10～11 月で、期間中の日平均気温は  $14.1 \pm 3.8^\circ\text{C}$  (最高気温  $18.5 \pm 2.5^\circ\text{C}$ )、供試牛の体重は  $716.3 \pm 80.6\text{kg}$ 、産次回数  $1.8 \pm 0.8$  回、泌乳日数  $301.0 \pm 100.8$  日、日乳量は  $24.8 \pm 4.0\text{kg}$  であった。なお、飼養試験では 1 期と 2 期の間に 7 日間のウォッシュアウト期間を設けることで持ち越し効果を防止した。基礎飼料としてイタリアンラップサイレージを粗飼料とする TMR (total mixed ration) 飼料を専用攪拌機 (コンプリートフィーダー, ㈱コンプリートサービス, 愛知) で混合し、個体別の TMR 摂取量がコンピュータに自動記録されるドアフィーダ飼槽 (GFR システム, ウェストファリアシステムマツト㈱, 東京) により 1 日 2 回 (10:00, 18:00)、個体ごとに飽食給与した (表 1)。試験区は TMR の基礎飼料のみを与えた対照区、基礎飼料に乾物当たり 1.5% のトレハロース (トレハ, ㈱林原, 岡山) をトップドレスで添加したトレハロース区を設定した。また、搾乳は 1 日 2 回 (8:45, 17:15) 実施した。

**調査方法及び採材方法：**乾物摂取量はコンピュータに自動記録された摂取量に、あらかじめ測定した TMR 乾物率を乗じて算出した。血液は 1 期, 2 期ともに、それぞれの本試験期の最後の 2 日間において、13:00 に頸静脈より採血管 (ベネジエクト II 真空採血管 EDTA-2Na

表 1 飼料の配合割合と成分値

	乾物%
配合割合	
イタリアンラップサイレージ出穂揃期	37.1
ビートパルプ (US)	5.3
醤油粕 (生)	5.1
大豆粕	3.8
大豆 (加熱)	4.0
圧べんとうモロコシ	16.3
フスマ (一般)	3.8
大麦圧べん	13.4
配合飼料 <sup>a)</sup>	10.6
ミネラル剤	0.7
成分値 <sup>b)</sup>	
TDN (可消化養分総量)	73.5
CP (粗蛋白質)	15.9
EE (粗脂肪)	3.5
CA (粗灰分)	2.4
NDF (中性デタージェント繊維)	35.8
NFC (非繊維性炭水化物)	38.1

a) 成分値 (乾物%) : TDN 85.3, CP 20.0, EE 3.1, NDF 21.7, NFC 47.7

b) 日本標準飼料成分表 (農林水産技術会議 2010) による推計値

入り, テルモ(株, 東京) に採取し, 遠心分離 (3,000rpm, 15 分,  $4^\circ\text{C}$ ) により血漿を分離し, 酸化ストレス指標の測定用として  $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存した [1]。生乳サンプルの採材は, 自動記録される乳量データとともに各本試験期の最後 3 日間に行い, 乳成分分析用は  $4^\circ\text{C}$  で冷蔵保存し, 酸化ストレス指標の測定用は  $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存した [1]。第一胃内容液は, 各本試験期最終日の 13:00 に経口カテーテル法により採取し, 二重ガーゼで濾過して pH を測定し, その 1ml に 4ml の MFS (methyl green-formalin-saline) 溶液を加えて小野寺 [17] の方法で原虫数を測定した。また, 揮発性脂肪酸 (VFA) 分析用及び酸化ストレス指標測定用の第一胃内容液は, それぞれ  $-30^\circ\text{C}$  と  $-80^\circ\text{C}$  で凍結保存した [1]。

**化学分析方法：**乳成分は赤外線牛乳成分分析機 (MILCO-SCAN FT6000UWF, Foss Electric 社, Hillerod, Denmark) を用いて, 乳脂率, 乳蛋白率, 乳糖率, 無脂固形分及び全固形成分を調べた。第一胃内容液の揮発性脂肪酸 (VFA) 濃度は, 高速液体クロマトグラフィーを用いて BTB ポストラベル法 [18] で測定した。血漿と生乳については, 抗酸化能の指標として DPPH ラジカル消去活性を, 脂質過酸化反応の指標として TBARS 値を分析した。また, 第一胃内容液の抗酸化能の指標として, superoxide dismutase (SOD) 様活性を測定した。DPPH ラジカル消去活性は Li ら [19] の方法で, TBARS 値は市販測定キット (TBARS Assay Kit, Cayman Chemical, Michigan, U.S.A.) を用いて Aoki

表2 トレハロース添加飼料を給与した乳牛の乾物摂取量、乳量及び乳成分

	対照区	トレハロース区	SEM
暑熱期			
乾物摂取量 (kg/日)	17.2	18.4**	0.6
乳量 (kg/日)	19.1	19.2	2.2
乳成分 (%)			
乳脂肪	4.1	4.2	0.1
乳蛋白	3.7	3.8	0.1
乳糖	4.4	4.4	0.1
無脂固形分	9.1	9.2	0.1
全固形成分	13.2	13.3	0.1
適温期			
乾物摂取量 (kg/日)	21.5	22.0	0.6
乳量 (kg/日)	21.8	21.1	1.4
乳成分 (%)			
乳脂肪	5.0	5.0	0.1
乳蛋白	4.1	4.2	0.1
乳糖	4.4	4.3	0.1
無脂固形分	9.5	9.5	0.1
全固形成分	14.4	14.5	0.2

SEM : standard error of mean

\*\* : 対照区との間の有意差 ( $P < 0.01$ )

ら [20] の方法で、また、SOD 様活性においても市販測定キット (SOD Assay Kit-WST, ㈱同仁化学研究所, 熊本) を用いて Fulghum ら [21] の方法で測定した。

**統計処理:** 得られた測定値は、分散分析により群及び時期の効果をブロック因子、飼料の効果を処理因子として解析した [22]。

## 成 績

**採食量及び産乳性:** 飼料の乾物摂取量、乳量及び乳成分を表2に示した。暑熱期の乾物摂取量と乳量は、全体的に適温期よりも低下する傾向を示した。暑熱期におけるトレハロース区の乾物摂取量は18.4kgで、対照区の17.2kgよりも多かった ( $P < 0.01$ )。乳量は両試験区の間には差は認められず、乳成分も同程度であった。適温期における乾物摂取量は、トレハロース区と対照区との間に差はなく、乳量及び乳成分も同程度であった。

**第一胃性状:** 第一胃内容液のpH、VFA濃度及び原虫数を表3に示した。暑熱期におけるpH、総VFA濃度及びVFA組成は、トレハロース区と対照区との間に差は認められなかった。総原虫数では、トレハロース区と対照区との間に差は認められなかったが、小型貧毛虫 *Entodinium* 属においてはトレハロース区が  $19.0 \times 10^4$  個/mlと対照区の  $15.4 \times 10^4$  個/mlよりも多かった ( $P < 0.05$ )。適温期におけるpH、総VFA濃度及びその組成についてもトレハロース区と対照区との間に差は認められなかった。しかし、総原虫数ではトレハロース区が  $37.1 \times 10^4$  個/mlと対照区の  $21.6 \times 10^4$  個/mlよりも多

表3 トレハロース添加飼料を給与した乳牛の第一胃液pH、VFA及び原虫数

	対照区	トレハロース区	SEM
暑熱期			
pH	6.6	6.5	0.1
総VFA (mM)	108.9	106.8	3.8
VFA組成 (molar%)			
酢酸	61.8	63.0	0.6
プロピオン酸	18.4	18.4	0.5
イソ酪酸	5.5	3.4	1.1
酪酸	12.0	12.2	0.5
イソ吉草酸	2.3	2.4	0.3
吉草酸	0.5	0.9	0.2
原虫数 ( $\times 10^4$ /ml)			
総数	26.5	27.8	2.9
<i>Isotricha</i> 属	0.4	0.3	0.1
<i>Dasytricha</i> 属	0.8	0.8	0.1
<i>Entodinium</i> 属	15.4	19.0*	1.9
<i>Diplodinium</i> 属	3.7	3.6	0.6
<i>Epidinium</i> 属	4.0	2.6	0.7
<i>Ophryoscolex</i> 属	1.9	1.1	0.3
その他	0.3	0.4	0.1
適温期			
pH	6.7	6.6	0.1
総VFA (mM)	108.7	112.4	3.3
VFA組成 (molar%)			
酢酸	60.7	61.1	0.7
プロピオン酸	19.5	18.8	0.4
イソ酪酸	6.3	5.6	0.7
酪酸	11.3	11.9	0.3
イソ吉草酸	1.3	2.3	0.6
吉草酸	0.8	0.4	0.3
原虫数 ( $\times 10^4$ /ml)			
総数	21.6	37.1*	3.6
<i>Isotricha</i> 属	0.1	0.2	0.1
<i>Dasytricha</i> 属	0.8	0.8	0.3
<i>Entodinium</i> 属	14.5	30.2*	3.5
<i>Diplodinium</i> 属	1.7	1.8	0.5
<i>Epidinium</i> 属	2.4	2.6	0.4
<i>Ophryoscolex</i> 属	0.8	1.2	0.1
その他	0.3	0.3	0.1

SEM : standard error of mean

\* : 対照区との間の有意差 ( $P < 0.05$ )

く ( $P < 0.05$ )、小型貧毛虫 *Entodinium* 属数においても暑熱期と同様にトレハロース区が  $30.2 \times 10^4$  個/mlと対照区  $14.5 \times 10^4$  個/mlよりも多かった ( $P < 0.05$ )。

**血液、乳汁及び第一胃内容液の酸化ストレス指標:** 血漿及び乳汁のDPPHラジカル消去活性値、TBARS値及び第一胃内容液のSOD様活性値を表4に示した。暑熱期の血漿、乳汁DPPHラジカル消去活性及び第一胃内容液のSOD様活性は、全体的に適温期よりも低値を示した。暑熱期における血漿DPPHラジカル消去活性は、トレハロース区が90.8U/mlと対照区の56.2U/mlよりも高い傾向 ( $P = 0.07$ ) が認められ、乳汁ではトレハロー

表4 トレハロース添加飼料を給与した乳牛の血液、乳汁及び第一胃液の酸化ストレス指標の値

	対照区	トレハロース区	SEM
<b>暑熱期</b>			
DPPH ラジカル消去活性 (U/ml)			
血漿	56.2	90.8 <sup>‡</sup>	8.0
乳汁	96.1	110.3 <sup>*</sup>	9.1
TBARS ( $\mu$ M malondialdehyde)			
血漿	2.2	2.6	0.2
乳汁	15.9	16.2	1.0
SOD 様活性			
第一胃内容液	22.6	26.5	1.6
<b>適温期</b>			
DPPH ラジカル消去活性 (U/ml)			
血漿	170.3	173.7	6.3
乳汁	178.0	208.9 <sup>*</sup>	8.3
TBARS ( $\mu$ M malondialdehyde)			
血漿	2.3	2.2	0.1
乳汁	15.6	16.6	1.0
SOD 様活性			
第一胃内容液	34.9	32.0	1.6

SEM : standard error of mean

‡ : 対照区との間の有意差 ( $P < 0.1$ )

\* : 対照区との間の有意差 ( $P < 0.05$ )

ス区が 110.3U/ml と対照区の 96.1U/ml よりも高かった ( $P < 0.05$ )。TBARS 値は血漿、乳汁のいずれにおいても両試験区の間には差がなく、第一胃内容液の SOD 様活性も同様に差が認められなかった。適温期における血漿 DPPH ラジカル消去活性は、トレハロース区と対照区の間には差は認められなかったが、乳汁においてトレハロース区が 208.9U/ml と対照区の 178.0U/ml よりも高かった ( $P < 0.05$ )。TBARS 値は血漿、乳汁のいずれにおいても両試験区の間には差がなく、第一胃内容液の SOD 様活性も同様に差が認められなかった。

## 考 察

トレハロースは微生物、植物及び無脊椎動物などの細胞内に含まれる天然の二糖類である。近年、トレハロースはトウモロコシやジャガイモのデンプンから酵素を使って生産できるようになり、その抗酸化能や保水力などの機能性により食品、化粧品、薬剤などに広く利用されている [23]。泌乳牛の飼料にトレハロースを乾物当たり 1% 添加すると血液、乳汁及び第一胃内容液の酸化ストレス指標が改善すること [1] が報告されているが、暑熱期に対する効果は不明である。そこで本研究では、トレハロース添加量を乾物当たり 1.5% に増加し、暑熱期と適温期における泌乳牛の酸化ストレス指標への影

響をクロスオーバー法により比較した。

Aoki ら [1] はトレハロースの飼料添加によって乾物摂取量が有意に増加し、それに伴い、乳成分の変化はないものの乳量が有意に増加したことを報告している。今回の試験でも、暑熱期の乾物摂取量が有意に増加したこと、及び暑熱期と適温期の両方において乳成分の変化がなかった点で一致したが、乳量の増加はいずれも認められなかった。一般に、暑熱環境は乳牛の乾物摂取量を低下させるが [24]、本試験における乾物摂取量の増加はトレハロースの飼料添加による酸化ストレス軽減の裏付けであると推察された。また、Islam ら [25] は、泌乳後期の乳牛は濃厚飼料を増飼しても乳量の変化が認められなかったことを報告している。このことから、本試験における乳量の結果は、供試牛の平均泌乳日数が暑熱期、適温期ともに 300 日以上と Aoki ら [1] の供試牛の平均 189 日より多いことが影響したものと考えられた。

酸化ストレス指標における DPPH ラジカル消去活性は、安定的な人工ラジカルである DPPH と試料中の水溶性抗酸化物質を反応させることでラジカル消失の程度を数値化したもので、抗酸化能の指標となる [19]。本試験では、暑熱期にトレハロースを飼料添加すると乳汁 DPPH ラジカル消去活性が有意に増加し、血漿では増加する傾向が認められるなど、Aoki ら [1] の報告とおおむね一致した。一方、適温期ではトレハロース飼料添加による血漿 DPPH ラジカル消去活性の変化は認められず、乳汁のみで増加した。これらのことから、トレハロースの飼料添加は、適温期よりも暑熱期において酸化ストレス指標の改善に有効であり、特に乳汁の抗酸化能の向上に対して効果的であると言える。しかし、適温期の両試験区の DPPH ラジカル消去活性は、血漿、乳汁ともに相対的に暑熱期よりも約 2~3 倍程度の高い値を示した。乳牛は、暑熱環境下における直腸温上昇に伴い、血中抗酸化物質であるアスコルビン酸濃度が低下し、TBARS 値が上昇する [8, 9] など酸化ストレス状態にあることが知られている。このことから、血中抗酸化物質の消費が多い暑熱期に、トレハロースによる抗酸化能の補充効果が現れた一方で、抗酸化物質の消費が少ないと考えられる適温期では血漿 DPPH ラジカル消去活性に差が出ず、さらにトレハロースによる余剰な抗酸化能が何らかの形で外分泌腺である乳腺を介して乳汁に移行し、乳汁 DPPH ラジカル消去活性が有意に上昇したものと推察された。また、Aoki ら [1] は血漿、乳汁ともに DPPH ラジカル消去活性の上昇に伴い TBARS 値が有意に低下したと報告しているが、今回の試験では暑熱期、適温期ともに TBARS 値に変化が認められなかった。TBARS 値は脂質過酸化によって生じるマロンジアルデヒドや過酸化アルデヒドなどのチオバルビツ-

ル酸反応物質の濃度であるが [20], 血中スルフィドリル基などの抗酸化物質との間に相関が認められないなど, 酸化ストレス指標としての不十分さを指摘する報告 [8, 26] もある. 本研究では, 暑熱期, 適温期とも対照区の TBARS 値が同程度であり, 暑熱期の酸化ストレスの影響が反映されなかったことによると推察された.

トレハロースの飼料添加が第一胃液性状に及ぼす影響について, Aoki ら [1] は総 VFA 濃度と VFA 組成に変化は認められなかったが, 総原虫数及び *Entodinium* 属が有意に増加したことを報告している. 本試験においても, 暑熱期及び適温期ともに総 VFA 濃度と VFA 組成に変化が認められなかったこと, 及び *Entodinium* 属が有意に増加した点で一致した. Gazi ら [27] は実験的に作出した第一胃原虫を持たない牛の第一胃液及び血漿 DPPH ラジカル消去活性は, 原虫を持つ牛よりも有意に低かったことを報告している. また, *Entodinium* 属はデンプン質飼料を与えると著しく増加すること [28], ほかの第一胃内原虫と比べて耐酸性が強いこと [29] などから, 今回の結果も, トレハロースの飼料添加により第一胃原虫の活性, 特に暑熱期と適温期ともに有意に増加した *Entodinium* 属が重要な役割を果たしている可能性が示唆された. しかし, 本試験では暑熱期, 適温期ともに対照区とトレハロース区との間に第一胃液の pH, 総 VFA 濃度及びその組成に差が認められなかったため, *Entodinium* 属の影響についてはさらなる検討が必要である. また, Aoki ら [30] は, 飼料添加により摂取されたトレハロースは血中, 乳汁中に移行しないこと, ROS を除去する酵素活性の指標である第一胃液 SOD 様活性の上昇と血漿及び乳汁 DPPH ラジカル消去活性の上昇が同時並行したこと, トレハロースの作用機序は, 第一胃内原虫の活性化による SOD 様活性の上昇であると結論付けている. 本試験では暑熱期, 適温期とも, トレハロースの飼料添加による第一胃液 SOD 様活性の上昇は認められなかったものの, 血漿及び乳汁 DPPH ラジカル消去活性の場合と同様, 適温期の第一胃液 SOD 様活性が暑熱期よりも相対的に高値を示した. このことは, 第一胃液 SOD 様活性と血漿及び乳汁 DPPH ラジカル消去活性の関連性を示唆しているが, トレハロースの作用機序の根拠とするには十分であるとは言えず, 今後の研究による解明が期待される.

以上の結果から, 暑熱期における泌乳牛へのトレハロース飼料添加は, 乾物摂取量を増加させ, 血漿及び乳汁の DPPH ラジカル消去活性の上昇を生じたことから, 酸化ストレス指標のうち, 抗酸化能の改善に一定の効果をもつことが明らかとなった. しかし, 適温期の抗酸化能と同水準にするためには, ほかの抗酸化物質との併用も検討する必要がある. さらに, 周産期における酸化ストレスの低減効果や, それに伴う泌乳初期に多発す

る乳房炎の予防への応用などについても, 今後検討する必要がある.

## 引用文献

- [1] Aoki N, Furukawa S, Sato K, Kurokawa Y, Kanda S, Takahashi Y, Mitsuzumi H, Itabashi H : Supplementation of the diet of dairy cows with trehalose results in milk with low lipid peroxide and high antioxidant content, *J Dairy Sci*, 93, 4189-4195 (2010)
- [2] Boots AW, Haenen GR, Bast A : Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical, *Eur J Pharmacol*, 585, 325-337 (2008)
- [3] Lykkesfeldt J, Svendsen O : Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals, *Vet J*, 173, 502-511 (2007)
- [4] Castillo C, Hernandez J, Bravo A, Lopez-Alonso M, Pereira V, Benedito JL : Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows, *Vet J*, 169, 286-292 (2005)
- [5] Waller KP : Mammary gland immunology around parturition. Influence of stress, nutrition and genetics, *Adv Exp Med Biol*, 480, 231-245 (2000)
- [6] Fuquay JW : Heat stress as it affects animal production, *J Anim Sci*, 52, 164-174 (1981)
- [7] Tanaka M, Kamiya Y, Suzuki T, Kamiya M, Nakai Y : Relationship between milk production and plasma concentrations of oxidative stress markers during hot season in primiparous cows, *Anim Sci J*, 79, 481-486 (2008)
- [8] Tanaka M, Kamiya Y, Kamiya M, Nakai Y : Effect of high environmental temperatures on ascorbic acid, sulfhydryl residue and oxidized lipid concentrations in plasma of dairy cows, *Anim Sci J*, 78, 301-306 (2007)
- [9] Tanaka M, Kamiya Y, Suzuki T, Nakai Y : Changes in oxidative status in periparturient dairy cows in hot conditions, *Anim Sci J*, 82, 320-324 (2011)
- [10] Bouwstra RJ, Nielen M, van Werven T : Comparison of the oxidative status of vitamin E-supplemented and non-supplemented cows under field conditions, *Tijdschr Diergeneesk*, 134, 656-661 (2009)
- [11] Zigo F, Farkašová Z, Elečko J, Lapin M, Chripková M, Czernski A : Effect of parenteral administration of selenium and vitamin E on health status of mammary gland and on selected antioxidant indexes in blood of dairy cows, *Pol J Vet Sci*, 17, 217-223 (2014)
- [12] Morgante M, Beghelli D, Pauselli M, Dall'Ara P, Capuccella M, Ranucci S : Effect of administration of vitamin E and selenium during the dry period on mammary health and milk cell counts in dairy ewes, *J Dairy Sci*, 82, 623-631 (1999)
- [13] Bouwstra RJ, Goselink RM, Dobbelaar P, Nielen M, Newbold JR, van Werven T : The relationship between oxidative damage and vitamin E concentration in blood, milk, and liver tissue from vitamin E supplemented and nonsupplemented periparturient heifers, *J Dairy Sci*, 91, 977-987 (2008)

- [14] Bouwstra RJ, Nielen M, Stegeman JA, Dobbelaar P, Newbold JR, Jansen EH, van Werven T : Vitamin E supplementation during the dry period in dairy cattle. Part I: adverse effect on incidence of mastitis postpartum in a double-blind randomized field trial, *J Dairy Sci*, 93, 5684-5695 (2010)
- [15] Oku K, Kurose M, Kubota M, Fukuda S, Kurimoto M, Tujisaka Y, Okabe A, Sakurai M : Combined NMR and quantum chemical studies on the interaction between trehalose and dienes relevant to the antioxidant function of trehalose, *J Phys Chem B*, 109, 3032-3040 (2005)
- [16] Oku K, Watanabe H, Kubota M, Fukuda S, Kurimoto M, Tsujisaka Y, Komori M, Inoue Y, Sakurai M : NMR and quantum chemical study on the OH...pi and CH...O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose, *J Am Chem Soc*, 125, 12739-12748 (2003)
- [17] 小野寺良次 : ルーメン機能解析法, 新編動物栄養試験法, 石橋 晃編, 407-416, 養賢堂, 東京 (2001)
- [18] 西村慶子, 中原高士, 大久津昌治, 川本康博, 中西良孝 : カンショ焼酎粕ケーキを添加した発酵 TMR 中の粗飼料の違いが乳用牛の栄養代謝と乳生産に及ぼす影響, *日畜会報*, 84, 341-348 (2013)
- [19] Li W, Hosseinian FS, Tsopmo A, Friel JK, Beta T : Evaluation of antioxidant capacity and aroma quality of breast milk, *Nutrition*, 25, 105-114 (2009)
- [20] Aoki M, Oshita T, Sakaguchi M : The comparison of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) concentrations in plasma and serum from dairy cattle, *J Vet Med Sci*, 70, 107-110 (2008)
- [21] Fulghum RS, Worthington JM : Superoxide dismutase in ruminal bacteria, *Appl Environ Microb*, 48, 675-677 (1984)
- [22] 横山 学, 椿 満生, 浅岡壮平, 梅田剛利, 古賀康弘 : 乾燥カンショを含む TMR の給与が泌乳牛の乾物摂取量, 第一胃内性状および泌乳成績に及ぼす影響, *日本草地学会誌*, 54, 148-152 (2008)
- [23] Oku K, Kurose M, Kubota M, Fukuda S, Kurimoto M, Tujisaka Y, Sakurai M : Interaction between trehalose and alkaline-earth metal ions, *Biosci Biotech Bioch*, 69, 7-12 (2005)
- [24] Wheelock JB, Rhoads RP, Vanbaale MJ, Sanders SR, Baumgard LH : Effects of heat stress on energetic metabolism in lactating Holstein cows, *J Dairy Sci*, 93, 644-655 (2010)
- [25] Islam MR, Ishida M, Ando S, Nishida T, Yoshida N : Estimation of nutritive value of whole crop rice silage and its effect on milk production performance by dairy cows, *Asian Austral J Anim*, 17, 1383-1389 (2004)
- [26] Dotan Y, Lichtenberg D, Pinchuk I : Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress, *Prog Lipid Res*, 43, 200-227 (2004)
- [27] Gazi MR, Yokota M, Tanaka Y, Kanda S, Itabashi H : Effects of protozoa on the antioxidant activity in the ruminal fluid and blood plasma of cattle, *Anim Sci J*, 78, 34-40 (2007)
- [28] 脇田正彰, 星野貞夫 : *In vitro*, *in vivo* における第一胃内 *Entodinium* 属繊毛虫のデンブンの取り込みと分解に関する定量的観察, *日畜会報*, 60, 1-6 (1989)
- [29] Dehority BA : Effect of pH on viability of *Entodinium caudatum*, *Entodinium exiguum*, *Epidinium caudatum*, and *Ophryoscolex purkynjei* in vitro, *J Eukaryot Microbiol*, 52, 339-342 (2005)
- [30] Aoki N, Sato K, Kanda S, Mukai K, Obara Y, Itabashi H : Time course of changes in antioxidant activity of milk from dairy cows fed a trehalose-supplemented diet, *Anim Sci J*, 84, 42-47 (2013)

---

Effects of Trehalose Supplementation on Oxidative Stress Markers in Dairy Cows  
at High Environmental Temperatures

Kohei KITAZAKI<sup>1,2)†</sup>, Yoshihisa OHTANI<sup>3)</sup>, Yoshiaki OBARA<sup>3)</sup>, Tsuyoshi OHTA<sup>1)</sup>,  
Taketoshi UMEDA<sup>1)</sup>, Takeshi BABA<sup>1)</sup>, Hitoshi ANO<sup>4)</sup>  
and Hiromu KATAMOTO<sup>4)</sup>

- 1) *Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center, Department of Animal Production, 587 Oaza-Yoshiki, Chikushino, 818-8549, Japan*
- 2) *Graduate School of Medicine and Veterinary Medicine, University of Miyazaki, 5200 Kihara, Kiyotake, Miyazaki, 889-1692, Japan*
- 3) *Meijifood Co. Ltd., Mito Research Center, 870 Wakamiya, Ibaraki, Higashiibaraki, 311-3123, Japan*
- 4) *Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1 Gakuen Kibanadai-nishi, Miyazaki, 889-2192, Japan*

SUMMARY

The objective of this study was to investigate the effect of dietary supplementation with trehalose on oxidative-stress markers in the blood, milk and rumen fluid of dairy cows during the hot or comfortable season. The respective average maximum daytime temperatures in the hot and comfortable seasons were 34.2°C and 18.5°C. Six Holstein dairy cows housed in a freestall barn were divided into two groups, with each group receiving a different dietary treatment (control diet or 1.5% trehalose-supplemented diet) following a 2×2 crossover study in both seasons. In the hot season, food intake increased in trehalose-supplemented cows ( $P<0.01$ ); while milk yield and milk components were unchanged by trehalose supplementation in both seasons. In terms of the number of protozoa, the number of *Entodinium* increased with trehalose supplementation in both seasons ( $P<0.05$ ). The values of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity in milk increased with trehalose supplementation in both seasons ( $P<0.05$ ). Furthermore, the values of DPPH radical scavenging activity in plasma tended to increase with trehalose supplementation in the hot season. Dietary supplementation with trehalose resulted in the improvement of antioxidant activity in milk and blood. These findings suggest that trehalose supplementation might be effective for reducing oxidative stress in dairy cows during the hot season. — Key words : antioxidant activity, dairy cow, hot season, oxidative stress, trehalose.

† Correspondence to : Kohei KITAZAKI (*Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center, Department of Animal Production*)

*587 Oaza-Yoshiki, Chikushino, 818-8549, Japan*

*TEL 092-925-5232 FAX 092-925-5038 E-mail : kitazaki-k6000@pref.fukuoka.lg.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 147 ~ 153 (2019)*