

ケトーシス発症乳牛の酸化ストレスマーカーと 血液生化学性状

芝野健一^{1)†} 下夕村幸薫¹⁾ 伊藤めぐみ¹⁾ 千葉暁子¹⁾
 滄木孝弘¹⁾ 小野哲嗣²⁾ 山田 裕²⁾

1) 帯広畜産大学獣医学研究部門 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)
 2) 岡山理科大学獣医学部 (〒794-8555 今治市いこいの丘1-3)

(2019年6月15日受付・2020年8月26日受理)

要 約

本研究では、北海道内の1酪農場に飼養されるホルスタイン種経産牛24頭のうち、分娩後ケトーシスを発症した12頭(ケト群)と発症しなかった12頭(対照群)を供試し、血中酸化ストレスマーカーと血液生化学性状を調査した。採血は両群ともに分娩前10~14日、分娩翌日、分娩後15日に実施した。分娩後15日の血中ヒドロペルオキシド、 β ヒドロキシ酪酸、非エステル型脂肪酸濃度、及びグリシン/アラニン比は、ケト群が対照群に比べて有意に高かった($P<0.05$ 及び $P<0.01$)。血糖値、メチオニン/グリシン比は、ケト群が対照群に比べて有意に低く($P<0.05$)、エネルギーに加えてタンパク質不足が推察された。以上より、移行期のケトーシスは脂質の過酸化が進み、ヒドロペルオキシド濃度が増加するため、酸化ストレスが関与している可能性がある。

——キーワード：乳牛、遊離アミノ酸、ケトーシス、酸化ストレス、活性酸素種。

-----日獣会誌 74, 59~63 (2021)

乳牛の分娩前3週から分娩後3週の6週間は移行期といわれ、疾病対策上最も重要なステージに位置付けられている[1]。移行期では産乳のための栄養要求量増加、代謝の亢進、免疫細胞数の減少、インスリン抵抗性の出現などの内分泌的变化が起こる[2, 3]ため、全疾病の約75%はこの時期に集中して発症する[4]。生体におけるエネルギー代謝過程では種々の活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)が産生されるが、生体にはROSによる損傷を防御する酸化防御機能が備わっている[5]。特に高泌乳牛では産乳に伴うエネルギー要求量が高まるため、ROS産生が酸化防御機能を上回り、酸化ストレス状態に陥ると考えられている。酸化防御機能に関与するものには酸化酵素と酸化物質が存在し、おもな酸化物質にはセレン(Se)、亜鉛(Zn)、銅(Cu)などの微量ミネラルと脂溶性ビタミン等が知られている。酸化物質の応用は分娩後の代謝性疾患や感染症の発症リスクを軽減するとの報告[6, 7]があり、疾病予防対策上重要と考えられている。乳牛の移行期でみられる負のエネルギーバランスでは、活発な体脂肪動員によるROS産生が増加するため[8]、ケトーシス発

生要因に酸化ストレスの関与が推察される。

本研究で用いた活性酸素代謝産物(Diacron-Reactive Oxygen Metabolites: d-ROMs)テストは、生体内の活性酸素やフリーラジカルの代謝産物のうち、主として血中ヒドロペルオキシドをはじめとした総過酸化物質濃度を呈色反応によって測定するものである。酸化能(Biological Antioxidant Potential: BAP)テストは、呈色させた三価鉄塩(塩化第二鉄)溶液を酸化作用で二価鉄(塩化第一鉄)に還元される際の脱色変化を測定するものである。Bernabucciら[6]は本マーカーを用いて、乳牛の周産期における酸化ストレスと代謝の関連性を報告しているが、ケトーシスとの関連性を検討した報告はみられない。

本研究では分娩後ケトーシスを発症した乳牛の分娩前後の酸化ストレスと血液生化学性状を調査し、ケトーシスの病態との関連性を検討した。

材料及び方法

調査対象牛：北海道帯広市内にある1酪農場のホルスタイン種乳牛220頭の中から、2018年6~12月に分娩

† 連絡責任者(現所属)：芝野健一(岡山理科大学獣医学部)

〒794-8555 今治市いこいの丘1-3

☎0898-52-9261 FAX 0898-52-9211

E-mail: k-shibano@vet.ous.ac.jp

表1 飼料配合割合と成分値

配合割合	乾物% ^{a)}	
	乾乳後期	泌乳期
コーンサイレージ (自家産)	21.4	29.3
チモシーロール (自家産)	32.1	22.0
ビートパルプ (生)	16.8	10.2
圧ペントウモロコシ	12.2	16.5
大豆粕	2.8	6.8
綿実	2.3	3.3
フスマ (一般)	3.8	1.8
ナタネ粕	4.0	1.1
トウフ粕 (生)	0.9	1.9
小麦粉	0.2	1.5
コーングルテンミール	—	1.2
ルーサンミール (デハイ)	0.8	0.4
炭酸カルシウム	—	1.1
ミネラルミックス	2.7	1.8
食塩	—	1.1
成分値		
TDN (可消化養分総量)	68.4	71.1
CP (粗蛋白質)	13.7	15.2
ADF (酸性デタージェント繊維)	25.6	20.1
NDF (中性デタージェント繊維)	44.1	36.1
NFC (非繊維性炭水化物)	30.0	35.3
FAT (粗脂肪)	3.3	3.6

a) NRC2001による推定値

予定の経産牛を調査対象牛とした。このうち、低カルシウム血症、乳房炎、運動器病、慢性疾患に罹患した牛を対象牛から除外した。ケトーシス発症牛は、分娩後15日に行った聞き取りにより食欲不振などの臨床症状が認められ、血中βヒドロキシ酪酸(BHBA)が1,200μmol/l [9]以上となった経産牛12頭(ケト群、平均産次6.2±2.8産)とした。対照牛は採材期間中疾病に罹患しなかった個体のうち、すべての採材時の血中BHBA濃度が1,200μmol/l未満の経産牛12頭(対照群、同5.8±2.5産)の合計24頭を供試した。当酪農場の飼養形態はフリーストール様式で、泌乳期の給与飼料は混合飼料(total mixed rations : TMR)を1日当たり42kg、乾乳期はTMR18kgと自家産チモシー乾草3kgをそれぞれ半量ずつ1日2回(8:00, 16:00)給餌していた。ミネラルミックスは泌乳期の総飼料乾物量に対し1.8%、乾乳期は2.7%に相当する量を添加したが、バイパスメチオニンなどのアミノ酸製剤の添加はなかった(表1)。また、飼槽にはセレン含有鉱塩(セレニクス60TZ、日本全薬工業株、福島)が常時舐食できるように設置されていた。なお、当酪農場では分娩予定1週間前より泌乳期飼料によるならし給与が行われていた。

血液採取：採血は分娩前10~14日(分娩前)、分娩翌日、分娩後15日(分娩後)の計3回行い、毎回午前10:00~12:00に尾静脈より採取した。血液採取にはプ

レイン真空採血管(ベノジェクトIIプレイン真空採血管, テルモ株, 東京)と血糖測定用真空試験管(ベノジェクトIIフッ化ナトリウム加真空採血管, テルモ株, 東京)を用いた。採取した血液は保冷剤を入れたクーラーボックスにて持ち帰り、1時間以内に冷却遠心器(4℃, 3,000rpm, 15分間)で血清及び血漿を分離後、測定まで-80℃で保存した。

調査項目：d-ROMs及びBAP濃度の測定はフリーラジカル解析装置(FREE carpe diem, 株ウイスマー, 東京)で行った。血液生化学性状は血糖、アルブミン(Alb)、BHBA、非エステル型脂肪酸(NEFA)濃度をディスクリート方式による臨床化学自動分析装置(TBA120-FR, キャノンメディカルシステムズ株, 栃木)を用いて測定した。血中遊離アミノ酸濃度はメチオニン(Met)、グリシン(Gly)、アラニン(Ala)をLC/MS法で、血中微量ミネラル濃度はSeをフレイムレス原子吸光光度法、Cuを3.5-DiBr-PAESA法、Znを原子吸光分析法、ビタミンE(VE)濃度はHPLC法で、外部検査機関に依頼して測定した。栄養バランスの指標はタンパク質栄養指標としてGly/Ala比[10]、エネルギー及びタンパク質栄養指標としてMet/Gly比(Met/Gly×100)[11]をそれぞれ算出し、栄養判定に用いた。ボディコンディションスコア(Body condition score : BCS)はFerguson法[12]によって毎回採血直前に評価した。

統計処理：すべての測定結果は、ルビーン検定で等分散性を確認した。両群の各項目の群間比較は、反復測定一元配置分散分析を行った。各測定項目内の採血日間の比較は、Fisherの最小有意差法による多重検定を行いボンフェローニ補正した。等分散でなかったMet/Gly比は、マンホイットニーU検定で比較した。検定結果は危険率5%未満を有意差ありとし、測定値は平均±標準偏差、あるいは中央値で示した。

成 績

酸化ストレスマーカー測定値と血液生化学性状を表2に示した。ケト群と対照群はBHBA濃度によって分類したため、分娩後は両群間に差がみられた($P<0.01$)。分娩後のd-ROMs濃度はケト群が分娩前に比べて有意に高く($P<0.05$)、対照群に比べて高かった($P<0.05$)。分娩翌日のBAP濃度は両群ともに分娩前に比べて有意に低く($P<0.01$)、最低値を示した。分娩後の血糖値は両群ともに分娩前に比べて有意に低く($P<0.01$)、ケト群は対照群に比べてより低かった($P<0.05$)。分娩翌日のNEFA濃度は、両群ともに分娩前に比べて有意に高かった($P<0.05$ 及び $P<0.01$)。しかし、分娩後の対照群は分娩翌日に比べて有意に低く($P<0.01$)、両群間に差がみられた($P<0.05$)。Alb及びMet濃度はいずれ

表2 分娩前後の酸化ストレスマーカー測定値と血液生化学性状

測定項目 ^{a)} (単位)	ケト群 (n=12)	対照群 (n=12)	群間比較
d-ROMs (U.CARR)	分娩前 10~14日	122±15 ^{b)}	117±11
	分娩翌日	132±18	
	分娩後15日	135±9	
BAP (μmol/l)	分娩前 10~14日	2,629±230	2,623±181
	分娩翌日	2,304±97	
	分娩後15日	2,436±106	
血糖 (mg/dl)	分娩前 10~14日	59±4	58±5
	分娩翌日	50±12	
	分娩後15日	39±6	
BHBA (μmol/l)	分娩前 10~14日	441±65	479±164
	分娩翌日	792±241	
	分娩後15日	1,569±572	
NEFA (μEq/l)	分娩前 10~14日	384±314	310±281
	分娩翌日	701±358	
	分娩後15日	608±211	
Alb (g/dl)	分娩前 10~14日	3.52±0.25	3.56±0.25
	分娩翌日	3.51±0.16	
	分娩後15日	3.45±0.16	
Met (nmol/ml)	分娩前 10~14日	23±3	22±4
	分娩翌日	18±4	
	分娩後15日	18±4	
Gly (nmol/ml)	分娩前 10~14日	367±73	376±52
	分娩翌日	436±162	
	分娩後15日	568±128	
Ala (nmol/ml)	分娩前 10~14日	184±22	196±25
	分娩翌日	174±24	
	分娩後15日	169±41	
Gly/Ala	分娩前 10~14日	1.9±0.4	1.7±0.3
	分娩翌日	2.8±0.6	
	分娩後15日	4.0±1.3	
Met/Gly	分娩前 10~14日	6.16 ^{c)}	6.81
	分娩翌日	3.59	
	分娩後15日	2.78	

a) d-ROMs: ヒドロペルオキシド濃度

BAP: 生体抗酸化能

BHBA: βヒドロキシ酪酸

NEFA: 非エステル型脂肪酸

Alb: アルブミン Met: メチオニン

Gly: グリシン Ala: アラニン

b) 平均±標準偏差

c) 中央値として表示

両群間比較 * : P<0.05, ** : P<0.01

採血日間比較 † : P<0.05, ‡ : P<0.01

表3 分娩前後の血中微量ミネラル濃度とビタミンE濃度

測定項目 ^{a)} (単位)	ケト群 (n=12)	対照群 (n=12)
Se (ng/ml)	分娩前10~14日	80±25 ^{b)}
	分娩翌日	74±24
	分娩後15日	81±28
Cu (μg/dl)	分娩前10~14日	81±5
	分娩翌日	85±4
	分娩後15日	112±12
Zn (μg/dl)	分娩前10~14日	76±8
	分娩翌日	55±11
	分娩後15日	86±5
VE (μg/dl)	分娩前10~14日	217±15
	分娩翌日	201±16
	分娩後15日	237±56

a) Se: セレン, Cu: 銅, Zn: 亜鉛, VE: ビタミンE

b) 平均±標準偏差

採血日間比較 † : P<0.05, ‡ : P<0.01

の時期においても両群間に差はなかった。分娩後の Gly 濃度は両群ともに分娩前に比べて有意に高く (P<0.01), 分娩後の Ala 濃度はケト群が対照群に比べて有意に低かった (P<0.01)。分娩後のケト群の Gly/Ala 比は, 分娩前に比べて有意に高かった (P<0.01)。分娩翌日の対照群は分娩前に比べて有意に高かったが (P<0.05), その後変動はなく分娩後には両群間に差がみられた (P<0.01)。分娩後の Met/Gly 比は両群ともに分娩前に比べて有意に低かったが (P<0.01), ケト群はより低値で両群間に差がみられた (P<0.05)。

Se, Cu, Zn, VE 濃度を表3に示した。Se 濃度は両群ともに変化はなかった。分娩後のケト群の Cu 濃度は分娩翌日に比べて有意に高かった (P<0.05)。分娩後の Zn 濃度は両群ともに分娩翌日に比べて有意に高かった (P<0.05 及び P<0.01)。VE 濃度は両群ともに変化はなかった。

BCS 平均値はケト群 (分娩前対分娩後, 3.50±0.14 対 3.10±0.16), 対照群 (3.35±0.19 対 3.02±0.16) で両群ともに有意に低下したが (P<0.01), 両群間に差はなかった。

考 察

移行期の栄養要求量は泌乳中期に比べて高く, 移行期後半ではエネルギー代謝の亢進によって ROS 産生は高まり酸化ストレス状態に陥る [7]。そのため, 乳牛の周産期病と酸化ストレスの関連性を検討した報告は多い [6, 7, 13]。ROS 産生要因について, Mirzad ら [14] は摂取する粗飼料中の抗酸化物含量が影響すると報告し, Castillo ら [7] は乳牛の血中酸化ストレスマーカーは肉用牛に比べて高値で推移することから, 乳生産との関連性を報告している。肝臓は生体の代謝を担う主要な

臓器で、ミトコンドリアやペルオキシソームなどの細胞小器官では酵素反応によるエネルギーが産生される。また、ペルオキシソームではNEFAをアセチルCoAに分解する際、より多くのROSが産生される[5]。Bernabucciら[6]は搾乳牛のROS濃度とNEFA濃度に正の相関があると報告している。本研究においてもケト群のNEFA濃度は高く、脂質過酸化によるROS産生がd-ROMs濃度を増加させたものと推察する。一方、BAP濃度は分娩翌日には両群ともに最低値を示した。抗酸化防御機能は抗酸化物質などの単独あるいは相互作用で発揮されるが[7]、BAPテストは酸化鉄の還元力から抗酸化防御機能を総合的に判定するものである。Goffら[15]はVEやZnの初乳へ移行を報告し、Bernabucciら[6]は周産期(特に分娩後)には抗酸化物質が枯渇し酸化ストレス状態に陥ると報告している。当酪農場のSe、Cu、Zn濃度は二階堂ら[16]の報告に比べて高い値を維持し枯渇状態ではなかったが、分娩翌日のBAP濃度は減少しており、抗酸化防御機能の低下を示唆していた。Castilloら[7]は乾乳牛へのミネラルサプリメントによってROSリスクは軽減すると報告し、本酪農場の微量ミネラル維持には飼料へのミネラルミックスの添加が有効であった可能性がある。

血糖はエネルギー源として必要不可欠で、血糖維持は栄養管理上重要である。ケト群で観察された低血糖と高NEFA濃度はエネルギー不足を示していた。BCSでは分娩後のスコア低下はNEFA濃度の増加と関連すると報告[6]されているが、本研究では両群間に差はなかった。その要因は調査期間が分娩後15日までと短期間であったためと推察する。

タンパク質栄養の過不足判定は遊離アミノ酸濃度を用いて検討した。分娩前後のMet濃度は乾物摂取量を反映するも産乳に伴って低値で推移する[17]。Ala濃度は糖新生のおもな基質でエネルギー不足で低下する。これに対し、Gly濃度はエネルギーに対して相対的に不足するタンパク質を補うため[10]産前から増加し、分娩後は高値で推移する[17]。分娩前に対する分娩後のGly濃度増加率はケト群1.60倍に対し対照群1.36倍とケト群で高く($P<0.01$)、Ala濃度はケト群0.93倍に対し対照群1.16倍とケト群で低かった($P<0.01$)。ケト群のアミノ酸比率では、Gly濃度の増加とAla濃度の低下によるGly/Ala比の増加及びMet/Gly比の低下はタンパク質とエネルギー不足を示していた。

二階堂ら[16]は粗飼料中微量ミネラル濃度について、北海道東部の根釧地域の牧草は土壌中含量に比例して低値となるが、血中Se濃度は乾物摂取量と正の相関があると報告している。本研究のSe濃度が二階堂らの報告に比べて高かった要因は給与飼料の影響と考えられるが、飼料中含量を測定していないため明らかにでき

なかった。また、分娩後増加したCu、Zn濃度は、乾乳期飼料から泌乳期飼料へ変わったことや乾物摂取量の増加によると推察された。鈴木[18]は乳牛の血中VE濃度について、分娩前後は不足しやすいため300~600 $\mu\text{g}/\text{dl}$ の範囲を維持することが適当と報告している。Goffら[15]は分娩直前の血中VE濃度は慢性的な欠乏に陥ると報告しており、本研究で観察された分娩翌日のBAP濃度の低下はVE濃度が影響した可能性がある。Castilloら[7]とSordilloら[13]は、微量ミネラルと脂溶性ビタミンについて、脂質の過酸化を抑制し酸化ストレスを軽減するため、乳牛の代謝性疾患の予防に有効と報告しており、抗酸化防御機能を高めるには微量ミネラルとVEを含めて検討する必要がある。

以上より、ケトーシス発症牛はGly/Ala比の増加、Met/Gly比の低下があり、エネルギー不足に加えてタンパク質不足が観察された。さらに体脂肪動員による脂質の過酸化がd-ROMs濃度を増加させたものと推察され、移行期のケトーシスは酸化ストレスが関与すると考えられた。

引用文献

- [1] Grummer RR : Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow, *J Anim Sci*, 73, 2820-2833 (1995)
- [2] 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)
- [3] Bell AW : Regulation of organic nutrient metabolism during transition from late pregnancy to early lactation, *J Anim Sci*, 73, 2804-2819 (1995)
- [4] LeBlanc SJ, Lissemore KD, Kelton DF, Duffield TF, Leslie KE : Major advances in disease prevention in dairy cattle, *J Dairy Sci*, 89, 1267-1279 (2006)
- [5] 坪内博仁, 大重彰彦, 宇都浩文 : 肝と酸化ストレス, *肝臓*, 56, 313-323 (2015)
- [6] Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A : Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows, *J Dairy Sci*, 88, 2017-2026 (2005)
- [7] 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)
- [8] Sordillo LM, Raphael W : Significance of metabolic stress, lipid mobilization, and inflammation on transition cow disorders, *Vet Clin N Am-Food A*, 29, 267-278 (2013)
- [9] McArt JAA, Nydam DV, 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 (2012)
- [10] 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)
- [11] 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)
- [12] Ferguson JD, Galligan DT, Thomsen N : Principal descriptors of body condition score in Holstein cows, *J Dairy Sci*, 77, 2695-2703 (1994)
- [13] Sordillo LM, Aitken SL : Impact of oxidative stress on the health and immune function of dairy cattle, *Vet Immunol Immunopathol*, 128, 104-109 (2009)
- [14] Mirzad AN, Tada T, Ano H, Kobayashi I, Yamauchi T, Katamoto H : Seasonal changes in serum oxidative stress biomarkers in dairy and beef cows in a day-time grazing system, *J Vet Med Sci*, 80, 20-27 (2017)
- [15] Goff JP, Stable JR : Decreased plasma retinol, alpha-tocopherol, and zinc concentration during the periparturient period: effect of milk fever, *J Dairy Sci*, 73, 3195-3199 (1990)
- [16] 二階堂 聡, 草刈直仁, 大滝忠利, 田辺一志, 遠谷良樹 : 周産期における微量ミネラル投与が乳牛の疾病発生と繁殖成績に及ぼす影響, *日獣会誌*, 61, 205-209 (2008)
- [17] 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)
- [18] 鈴木保宜 : 乳牛の移行期の栄養管理と繁殖, *日獣会誌*, 66, 689-695 (2013)

Oxidative Stress Markers and Biochemical Characteristics of Cows with Ketosis

Kenichi SHIBANO^{1)†}, Yoshiyuki SHITAMURA¹⁾, Megumi ITHO¹⁾, Akiko CHIBA¹⁾,
Takahiro AOKI¹⁾, Tetsushi ONO²⁾ and Yutaka YAMADA²⁾

1) *Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Nishi 2-11, Inada-cho, Obihiro, 080-8555, Japan*

2) *Okayama University of Science, 1-3 Ikoinooka, Imabari, 794-8555, Japan*

SUMMARY

Twenty-four multiparous Holstein dairy cows from a dairy farm in Hokkaido were featured in this study. They were divided into two groups: a keto group, which developed postpartum ketosis, and a control group (n = 12 / group). Oxidative stress markers and blood biochemistry were investigated in both groups. Blood samples were collected 10 to 14 days before calving, and 1 and 15 days after calving. The blood concentration of hydroperoxide, β -hydroxy-butyric acid, non-esterified fatty acids and the ratio of glycine/alanine were significantly higher in the keto group than in the control group 15 days after calving ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). Blood glucose level and methionine/glycine ratio were significantly lower in the keto group than in the control group 15 days after calving ($P < 0.05$). Additionally, postpartum energy and protein deficiencies were observed in the keto group. In conclusion, ketosis might be related to oxidative stress due to enhanced lipid peroxidation and increases hydroperoxide levels in transition period.

— Key word : dairy cow, free amino acid, ketosis, oxidative stress, reactive oxygen species.

† *Correspondence to (Present address) : Kenichi SHIBANO (Okayama University of Science)*

1-3 Ikoinooka, Imabari, 794-8555, Japan

TEL 0898-52-9261 FAX 0898-52-9211 E-mail : k-shibano@vet.ous.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 74, 59 ~ 63 (2021)