

酸化ストレスから見た乳牛の周産期と暑熱環境

田中正仁

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター
畜産草地研究領域畜産環境・乳牛研究グループ

所在地：861-1192 熊本県合志市須屋 2421

連絡先：電話 096-242-7629 ファックス 096-249-1002

【要約】

暑熱環境下の乳牛の周産期および泌乳期においては、飼料摂取量の低下によるエネルギー不足に加えて、体内の酸化ストレス状態が深刻化する。この結果、代謝活性が低下し、生産性の低下や免疫力の低下による感染症のリスクが増加する。酸化ストレスのマーカーには多くの物質が提唱されている。その中のいくつかについて、周産期および暑熱期の変動と生産性形質との関係を示した。おおむね、酸化ストレスと生産形質には負の相関関係が見られた。酸化ストレス指標の改善には、抗酸化物質の体内吸収が有効であると考えられる。脂溶性の抗酸化物質は、第一胃による分解を受けにくいとされている。そこで、暑熱環境下において、エネルギー不足緩和のために高エネルギー飼料である脂肪酸を、そして、抗酸化飼料として脂溶性ビタミン群の給与効果を調べた。脂溶性ビタミンの給与は、酸化ストレスを緩和したが泌乳生産性向上には寄与しなかった。また、脂肪酸の給与は、若干泌乳生産性を向上させた。そして、両者の同時給与は、酸化ストレス指標をさらに改善し、泌乳生産性の向上も見られた。すなわち、暑熱期の泌乳生産性の向上には、酸化ストレス対策と低エネルギー対策の同時進行が重要であることが示された。

キーワード：乳牛、酸化ストレス、周産期、暑熱

酸化ストレス

「ストレス」は、1938年、カナダの生化学者H.セリエが、「質の異なる多様な刺激に対する同質の生体反応」として提唱した。ストレスを誘発する刺激-ストレッサー、その刺激に対する反応-ストレス反応、ストレスを引き起こしている状態-ストレス状態、に分けることができるが、しばしば、これらを包含した意味で「ストレス」は用いられることがあり、混乱をもたらす場合がある。酸化ストレスに関していえば、ストレッサーとしては、フリーラジカルや活性

酸素などの酸化的圧力であるということができ、状態としては、生体内が本来保つべき酸化と還元の水素原子が酸化側に移動した状態といえる。この状態に対して、生体のエネルギーを消費して各種の酵素反応や還元性分子の動員を図って状態の回復に努めている反応が酸化ストレス応答といえる。残念ながら、各々については、はなはだ概念的な表現にとどまらざるを得ないのでが現状である。さらに、ストレス応答は警告反応期、抵抗期、疲憊期からなり、それぞれの期は異なる表現型を示すと考えられるが、その詳細についても不明な点が多く残されている。このことが原因となって、数多く提唱されている酸化ストレスマーカーの変動についても、必

受理：2018年4月20日

ずしも一定した変化を示す結果が得にくいのが現状であるといえる。酸素呼吸をしている生物は、取り込んだ酸素の数パーセントが有害な活性酸素となることが知られている。これ以外にも様々な代謝反応の過程でラジカル反応を誘発する分子種が自然発生する。これらの酸化ストレスに対して、酸化還元電位の低いアスコルビン酸やチオール基、トコフェロール類やレチノール類などの抗酸化物質やSODやグルタチオンペルオキシダーゼなどの各種抗酸化酵素などが、体内の酸化還元バランスを一定範囲に維持する機能を果たしている。何らかの原因によってこのバランスが、一定範囲以上酸化側にずれ込んだ状態が酸化ストレス状態といえる。この結果、細胞内外の酸化還元電位が上昇し、生体膜の脂質を酸化して一部の機能を傷害したり、膜状のあるいは浮遊しているタンパク質分子を酸化して物質の膜透過性や各種の酵素反応を傷害したり、さらには、遺伝情報を担う核酸分子を酸化し、遺伝情報に障害を及ぼすことで、各種代謝反応や組織の機能に重大な影響を及ぼすことになる。たとえ、軽微な影響でも長時間慢性的に作用することで、様々な代謝疾患や組織、個体の局所的全体的な老化の原因となると考えられている。酸化ストレスあるいは酸化によるダメージは、動物生産現場において各種組織の代謝活性や生産性に大きな影響を与えると考えられている。

細胞の機能を制御する上で硫黄分子の可逆的な酸化が重要である [18]。泌乳牛の血漿中には350-400 μ Mのスルフヒドリル基が存在し、試験管内において、血漿中のスルフヒドリル基濃度は、ペルオキシラジカル発生試薬 (ABAP) の添加で減少する。すなわち、血漿中のスルフヒドリル基は、血管内のラジカルと反応し、それを消去する可能性を示している。血漿と同程度のスルフヒドリル基濃度に調整した還元型グルタチオン溶液では、同濃度の ABAP 添加により血漿以上にスルフヒドリル基が減少した。このことは、血漿中に含まれる尿酸 [9] やビタミン E [26] などの多くの抗酸化成分が共同して酸化ストレスを制御していることを示唆している。そして、同様の系に加えたアスコルビン酸は、ABAP 添加によるスルフヒドリル基の減少を部分的にはあるが抑制し、スルフヒ

ドリル基が、アスコルビン酸と同様にラジカルの標的となる分子種であることを示唆している。スルフヒドリル基とアスコルビン酸の関係については、ラット血漿において、酸化ストレスによって酸化されたアスコルビン酸がスルフヒドリル基によって還元され、還元型アスコルビン酸に再生される [27] ことが報告されている。この点において、スルフヒドリル基はアスコルビン酸よりも重要な抗酸化成分であるかもしれない。スルフヒドリル基は、細胞の内外にタンパク質結合型および非結合型として存在している。タンパク質結合型のスルフヒドリル基の主体はアルブミンである [19]。アルブミンは分子量が約 66000 で、血漿中に 400-600 μ M の濃度であり、分子内に一つのフリーなスルフヒドリル基を持つ [21]。乳牛においても血漿中のアルブミン濃度とスルフヒドリル基濃度の間には、正の有意な相関関係が認められている。このことは、アルブミンが抗酸化成分として機能しているという報告 [12] を支持している。我々の知見では、泌乳牛の血漿中には、おおよそ平均値で 383.6 μ M のスルフヒドリル基が存在し、アルブミン濃度は平均値で 463.6 μ M であった。その比率から、アルブミンの約 83% のスルフヒドリル基は還元状態にあり、また、17% が酸化状態にあると考えられた。この比率は、泌乳牛の生理状態や環境温度、酸化ストレスの程度で変動する可能性がある。

酸化ストレスと泌乳生産性

高温環境下の生体組織では、高温ストレスだけでなく酸化ストレスも観察され、あわせて代謝活動の低下を招く [20, 7]。直腸温度の上昇と泌乳量の低下を伴う高温環境下において、直腸温度と血漿中のスルフヒドリル基およびアスコルビン酸濃度との間には、負の相関関係が認められる。泌乳牛の血漿中においてもスルフヒドリル基は、酸化ストレスに対する体液の酸化還元状態を維持する上で重要や役割を担っている可能性が高い。一方、アスコルビン酸は、代表的な水溶性の抗酸化性ビタミンとして知られている [8]。牛においては、自身の体内で合成されるため供給が必要な栄養素とは考えられていない。しかし、飼養環境などによるストレス環境下においては、血漿中のアスコルビン酸濃

度は減少する [4]。また、乳房の炎症や酸化ストレスによってもその濃度が減少する [14]。そして、乳房炎罹患牛では、血中のスルフィドリル基濃度も顕著に減少する。さらに、そのほかのストレスとして、分娩などの負荷がかかるイベントにおいても酸化ストレスが亢進する [17]。分娩後の泌乳初期に TBARS 濃度が上昇することが報告されている [3]。これらの報告は、泌乳牛の血漿中のスルフィドリル基やアスコルビン酸が種々のストレス下の酸化ストレス制御において抗酸化成分として重要であることを示唆している。

高温環境下の乳牛では、血漿中のアスコルビン酸の濃度が高い群は、低い群に比較して泌乳量が高かった。このことは、酸化ストレスと泌乳成績に何らかの関係があることを示唆している。環境温度が 28℃ 一定の時、経産牛の泌乳量と乳タンパク質率および無脂固形分率は減少したが、乳脂肪率と乳糖率には変化が見られなかった [13]。血漿中のスルフィドリル基濃度と乳糖率、乳タンパク質率および無脂固形分率との間に有意な正の相関関係が認められたが、日泌乳量と乳脂肪率との間には一定の関係が得られなかった。一方、血漿中のアスコルビン酸濃度については、日泌乳量、乳糖率との間に正の相関関係が見られ、乳タンパク質率との間に有意な負の相関関係が見られた。スルフィドリル基の場合とアスコルビン酸の場合で異なる結果が得られたことは、この 2 つの抗酸化成分は、高温環境下の抗酸化ストレス機能において異なる作用様式を持つことを示唆している。

暑熱環境下の周産期と酸化ストレス

高温環境下において分娩した乳牛では、血漿中の酸化ストレス指標の変動から酸化ストレスが亢進していると考えられる。分娩前後においては適温環境下においても生理的、代謝的な変動が大きく各種疾病発症のリスクが高くなる [11]。また、急激な泌乳開始への適応には、脂肪組織、肝臓、腸管および乳腺組織における脂質代謝の制御が鍵になる [6]。分娩後の体重の減少や血漿中の AST 活性の上昇およびその後の BUN の減少は、この時期の生理的変化を示している。BUN の変動は、飼料摂取量の変動や分娩前の低 TDN 飼料から分娩後の高 TDN

飼料への変化によるルーメン微生物叢の変動やルーメン内における炭水化物と窒素化合物のバランスの変動によるものと考えられる [16]。

フリーラジカルの発生とそれを消去する抗酸化成分のバランスの欠如から生じる酸化ストレスは、乳牛に生理学的免疫学的な変動を起こし、乳腺水腫、乳熱、胎盤停滞、乳房炎などの各種疾病の原因となる [17]。さらに、分娩前後の酸化ストレスは泌乳牛の疾病発症の原因となる [10, 15]。そして、乳腺の炎症は部分的に酸化ストレスが関与している [14]。酸化ストレスは、妊娠後期と泌乳初期に亢進することが示唆されている [3]。泌乳牛の酸化ストレスは高温環境下において亢進する [2, 23]。我々の結果では、血漿中のアスコルビン酸濃度が減少し、TBARS 濃度が増加し、酸化ストレスが亢進していることを示している。

酸化ストレス指標として赤血球中の TBARS、グルタチオンパーオキシターゼ活性、スルフィドリル基、スーパーオキシドディスムターゼ活性を測定した時に、高温環境下の分娩前後で酸化ストレスの亢進を示すが血漿中においては変化がなかったことが報告されている [1]。このことは、血漿中の酸化ストレス指標が変動を示した我々の結果とは異なる。彼らの試験では分娩前 21 日から分娩後 35 日間を調べているが我々は分娩前 5 日から分娩後 10 日までを試験期間としている。分娩後の酸化ストレス状態は、その内容が比較的短期間で変化しているかもしれない。

細胞外において酸化ストレス防御を担っているスルフィドリル基 [25] と血漿の PAO (抗酸化能力) 値は、同様な挙動を示さなかった。このことは、血中の各種酸化ストレス指標の変動は、単調な画一的变化を示すわけではないという既報 [5] を支持している。分娩時にボディコンディションスコアの低い牛や分娩後の体重の減少が大きい牛は、そうでない牛に比較して酸化ストレスに対する感受性が高いことが報告されている [2]。血漿中の AST 活性については、しばしば乳牛の肝臓機能障害の指標として用いられている。我々は血漿中の TBARS 濃度と AST 活性の間に正の相関関係があることを報告している。分娩前後の酸化ストレスと肝臓機能障害の関係を示しているのかもしれない。

暑熱ストレス管理と酸化ストレス管理による 生産性の向上

泌乳牛では生産性が低下するような高温環境下では、血漿中のSH基濃度やアスコルビン酸濃度の減少およびTBARS濃度の増加が見られ、酸化ストレスが亢進している [22]。これまで、夏季の飼料摂取量の減少を改善する目的で、飼料のエネルギー濃度を高くする試みがなされてきた。代表的なサプリメントとして、高エネルギー飼料でしかもルーメンバイパス性が高い脂肪酸カルシウムがしばしば用いられてきた。我々は、カルシウムを含まないルーメンバイパス性脂肪酸でパルミチン酸含量が高い脂肪酸 (C18:0が85%以上) をTMRの外付けで給与した脂肪酸区、酸化脂溶性ビタミン類をTMRの外付けで補給したビタミン区、その両方を給与した脂肪酸ビタミン区、そして、無処理の対照区を設け、各区3頭で20日間試験した。この間の平均気温は28℃、平均湿度が78%以上であった。給与したサプリメントは、目視によりほぼ摂取されたものと思われた。

血漿中のSH基濃度は、各区で有意差は見られなかったが、平均値では、いずれの区も対照区より高くなった。また、血漿の潜在的抗酸化力(BAP)については、有意差は観察されなかった。TBARS濃度は、脂肪酸ビタミン区において対照区よりも有意に低い値であった。さらに、活性酸素代謝産物(dROM)濃度は脂肪酸区、脂肪酸ビタミン区で対照区より有意に低くなり、ビタミン区でも低い傾向にあった。血漿グルコース濃度は、脂肪酸ビタミン区においてのみ対照区よりも有意に高くなった。すなわち、酸化ストレス指標の変動から、脂肪酸ビタミン区において、最も酸化ストレス低減効果が高かった。このことは、酸化ストレス低減に対して、脂溶性抗酸化ビタミン類の給与単独では、十分な効果が得られないことを示唆している。高エネルギー飼料との同時給与によって、より酸化ストレスが低減される可能性が示された。つぎに、泌乳量については、対照区においては試験開始後20日目に、試験開始前の95.2%に低下した。これに対して、各処理区では、いずれも増加し、特に脂肪酸ビタミン区では試験開始前よりも約13%増加し、対照区と有意な差

となった。各種乳成分率において対照区と各処理区の間には有意な差は見られなかった。各種乳成分の生産量については、乳脂肪および乳糖生産量において脂肪酸ビタミン区で対照区よりも有意に高くなった。泌乳成績改善についても、脂肪酸ビタミン区において、最も高い効果が認められた [24]。

引用文献

- [1] Bernabucci, U., Ronchi, N., Lacetera, N., Nardone, A. 2002. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *J. Dairy Sci.* 85: 2173-2179.
- [2] Bernabucci, U., Ronchi, B., Lacetera, N., Nardone, A. 2005. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 88: 2017-2026.
- [3] Castillo, C., Hernandez, J., Bravo, A., Lopez-Alonso, M., Pereira, V., Benedito, J.L. 2005. Oxidative status during late pregnancy and early lactation in dairy cows. *Vet. J.* 169: 286-292.
- [4] Cummins, K.A., Brunner, C.J. 1991. Effect of calf housing on plasma ascorbate and endocrine and immune function. *J. Dairy Sci.* 74: 1582-1588.
- [5] Dotan, Y., Lichtenberg, D., Pinchuk, I. 2004. Lipid peroxidation cannot be used as a universal criterion of oxidative stress. *Prog. Lipid Res.* 43: 200-227.
- [6] Drackley, J.K. 1999. Biology of dairy cows during the transition period: The final frontier? *J. Dairy Sci.* 82: 2259-2273.
- [7] Flanagan, S.W., Moseley, P.L., Buettner, G.R. 1998. Increased flux of free radicals in cells subjected to hyperthermia: detection by electron paramagnetic resonance spin trapping. *FEBS Lett.* 431: 285-286.
- [8] Frei, B., England, L., Ames, B.N. 1989. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proceedings of National Academic Science in USA.* 86: 6377-6381.
- [9] Glantzounis, G.K., Tsimoyiannis, E.C., Kappas, A.M., Galaris, D.A. 2005. Uric acid and oxidative stress. *Curr. Pharm. Des.* 11: 4145-4151.
- [10] Grohn, Y.T., Erb, H.N., McCulloch, C.E., Saloniemi, H.S. 1989. Epidemiology of metabolic disorders of dairy cattle: Association among host characteristics, disease, and production. *J. Dairy Sci.* 72: 1876-1885.
- [11] Grummer, R.R. 1993. Etiologies of lipid related metabolic disorders in periparturient dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76: 3882-3896.
- [12] Halliwell, B. 1988. Albumin--an important

- extracellular antioxidant? *Biochem. Pharmacol.* 37: 569-571.
- [13] Kamiya, M., Iwama, Y., Tanaka, M., Shioya, S. 2005. Effects of high ambient temperature and restricted feed intake on nitrogen utilization for milk production in lactating Holstein cows. *Anim. Sci. J.* 76: 217-223.
- [14] Kleczkowski, M., Kluciński, W., Jakubowski, T., Sikora, J. 2006. Dependence between acute phase response, oxidative status and mastitis of cows. *Pol. J. Vet. Sci.* 9: 151-158.
- [15] Lomba, F. 1996. Influence of dietary cation-anion and oxidative-antioxidants balances on diseases occurring around parturition in the dairy cows. *Ann. Med. Vet.* 140: 109-122.
- [16] Macrae, A.I., Whitaker, D.A., Burrough, E., Dowell, A., Kelly, J.M. 2006. Use of metabolic profiles for the assessment of dietary adequacy in UK dairy herds. *Vet. Rec.* 159: 655-661.
- [17] Miller, J.K., Brzezinska-Slebodzinska, E., Madsen, F.C. 1993. Oxidative stress, antioxidants, and animal function. *J. Dairy Sci.* 76: 2812-2823.
- [18] Moran, L.K., Gutteridge, J.M., Quinlan, G.J. 2001. Thiols in cellular redox signaling and control. *Curr. Med. Chem.* 8: 763-772.
- [19] Radi, R., Bush, K.M., Cosgrove, T.P., Freeman, B.A. 1991. Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. *Arch. Biochem. and Biophys.* 286: 117-125.
- [20] Skibba, J.L., Powers, R.H., Stadnicka, A., Kalbfleisch, J.H. 1990. Lipid peroxidation caused by hyperthermic perfusion of rat liver. *Biochem. Pharmacol.* 40: 1411-1414.
- [21] Stocker, R., Frei, B. 1991. In: Sies H (ed.), in *Endogenous antioxidant defenses in human blood plasma*, p.213. Academic Press, London.
- [22] Tanaka, M., Kamiya, Y., Kamiya, M., Nakai, Y. 2007b. Effect of high environmental temperature on ascorbic acid, sulfhydryl residue and oxidized lipids concentrations in plasma of dairy cows. *Anim. Sci. J.* 78: 301-306.
- [23] Tanaka, M., Kamiya, Y., Suzuki, T., Kamiya, M., Nakai, Y. 2008. Relationship between milk production and plasma concentrations of oxidative stress markers during hot season in primiparous cows. *Anim. Sci. J.* 79: 481-486.
- [24] Tanana, M., Nonaka, M., Kamiya, Y. and Suzuki, T. 2014. Study on nutritional approach for improvement of dairy performance in hot environment. *Japanese Society for Anim. Nutr. Metab.* 58: 1-12.
- [25] Uleand, P.M., Mansoor, M.A., Guttormsen, A.B., Muller, F., Aukrust, P., Refsum, H., Svardal, A.M. 1996. Reduced, oxidized and protein-bound forms of homocysteine and other aminothiols in plasma comprise the redox thiol status-A possible element of the extracellular antioxidant defense system. *J. Nutr.* 126: 1281S-1284S.
- [26] Uneri, C., Sari, M., Baglam, T., Polat, S., Yuksel, M. 2006. Effects of vitamin E on cigarette smoke induced oxidative damage in larynx and lung. *Laryngoscope* 116: 97-100.
- [27] Vethanayagam, J.G., Green, E.H., Rose, R.C., Bode, A.M. 1999. Glutathione-dependent ascorbate recycling activity of rat serum albumin. *Free Rad. Biol. Med.* 26: 1591-1598.

Influences of oxidative stress on dairy performance around parturition and in hot environment

Masahito Tanaka

Biomass Utilization and Dairy Management Group,
Division of Livestock and Grassland Research,
Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO
Suya 2421, Koshi, Kumamoto 861-1192 Japan.
TEL: +81-96-242-7629 FAX: +81-96-249-1002

[Abstract]

Oxidative stress in dairy cow is increased in hot environment and around parturition, through intake energy deficiency. Consequently, metabolic activity and dairy performances were decreased. Also risk of infectious disease was increased by decrease of immune ability. Many oxidative stress markers were reported at present time. Some of them showed the critical relationship with dairy performances around parturition and in hot environment. Oxidative stress affected negative influences on dairy performances mostly. It is thought that supplying of antioxidant substances to animals improved oxidative status. In case of dairy cows, fat soluble materials showed some rumen resistance and higher absorption efficiency to body fluids. Therefore, effects of fat supplying against energy deficiency and supplying of fat soluble antioxidative vitamins against oxidative stress on oxidative stress and dairy performances in hot environment were studied. Fat soluble vitamins supplying alone improved oxidative status but not dairy performances. Fat supplying alone improved dairy performance to some extent. Both supplying at same time improved oxidative stress and dairy performances to more extent. It is concluded that supplying of fat and fat soluble antioxidative vitamins at same time is effective on improvement of oxidative stress and dairy performances in hot environment.

Keywords: Cow, Oxidative stress, Calving, Hot environment