

原著論文

## クローズアップ期の *Rhizopus oryzae* 水抽出物給与が産褥期における乳牛の血清中肝障害マーカーおよび肝組織中の機能関連遺伝子発現の動態に及ぼす影響

芳賀 聡<sup>1†</sup>、石崎 宏<sup>1</sup>、鈴木武人<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門 草地利用研究領域 放牧家畜ユニット 栃木県那須塩原市千本松 768

<sup>2</sup> 麻布大学 獣医学部 栄養学研究室 神奈川県相模原市中央区淵野辺 1-17-71

† 連絡担当者：芳賀 聡

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構  
畜産研究部門 草地利用研究領域 放牧家畜ユニット  
住所：栃木県那須塩原市千本松 768  
電話：0287-37-7239 FAX：0287-36-6629  
E-mail：hagatiku@affrc.go.jp

### 【要 約】

クローズアップ期の乳牛への *Rhizopus oryzae* 水抽出物 (RU) 連日給与が、産褥期の肝臓の障害、急性の炎症応答、小胞体 (ER) ストレスの亢進および機能関連遺伝子発現抑制を予防すると仮説を立て検証を試みた。移行期の乳牛各3頭を RU 区およびプラセボ (P) 区に配置した。RU 区には RU 製剤 10g (RU 実質量 0.5g/頭/日) を、P 区には RU 不含有疑似製剤 10g を、クローズアップ期に毎日給与し、定期的に経静脈採血、肝生検を行った。その結果、P 区と比較し RU 区では、産褥期におけるアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) およびアラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の血清中活性値の増加が抑制された。分娩3週間前と比較して ER ストレスマーカーである成熟型 X-box binding protein 1 および急性炎症マーカーハプトグロビンの肝組織中 mRNA 発現量は分娩直後に著増し、アルブミン、カタラーゼおよびビタミン E 特異的輸送タンパク質の肝組織中 mRNA 発現量は分娩直後に著減し分娩3日後も発現抑制が続いた。しかし、いずれの遺伝子も移行期を通して、両区間の有意差は認められなかった。以上より、クローズアップ期の RU 連日給与 (実質 0.5g/頭/日) は、産褥期乳牛の肝障害緩和効果を示すが、急性炎症応答、肝 ER ストレスの亢進と肝機能関連遺伝子発現抑制に対する予防効果は得られないことが示唆された。

**キーワード：**分娩、肝生検、ネクローシス様細胞死、予防効果、*Rhizopus oryzae* 水抽出物

### 【緒論】

後継牛および生乳の生産上、乳牛の分娩は、飼養管理において最も重要なイベントのひとつで細心の注意を要する。さらに、乳牛における疾病発生は、分娩直後から1週間程度の産褥期

に最も多発する [10]。すなわち、乳牛の健全性と生産性の維持向上において、産褥期の疾病リスクを効率的に低減できる、移行期の飼養技術が不可欠である。しかし、産褥期の多くの疾病罹患フローは複雑な要因が交絡しており、各疾病の末端要因を改善する対策だけでは乳牛が抱え得る疾病罹患リスクの抜本的な低減には繋がりにくい。

肝臓は、糖代謝、脂質代謝、コレステロール

受付：2020年5月15日

受理：2020年6月2日

生合成、タンパク質合成、脂溶性ビタミン体内輸送調節、解毒などあらゆる機能を担う代謝の中核器官である。特に高泌乳牛では分娩後、泌乳開始に伴う著しい代謝亢進のため、肝臓が担う役割は一層大きくなる。しかし実際には、分娩に伴う炎症、生理的ストレスおよび酸化ストレスの増大、急激な泌乳開始による負のエネルギーバランスが引き起こす体脂肪動員により、肝臓において細胞死（ネクローシス様ならびにアポトーシス様）や機能低下が起り生産性に影響する [2]。Tharwat ら (2012) の報告 [19] では、臨床症状がない乳牛においても、分娩約 1.5 日後および 3 週後の肝組織中では中性脂肪の蓄積（脂肪肝）と共に、肝細胞のアポトーシスが増加した。産褥期にケトーシスを発症した乳牛では肝過酸化脂質含量の増加と共に、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）およびアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）の血中活性（ネクローシス様細胞死等による肝細胞障害マーカー）と肝カスパーゼ 3 活性（アポトーシスマーカー）がさらに亢進する [3]。Gessner ら (2014) は、分娩に伴う炎症刺激や、体脂肪動員による肝臓への遊離脂肪酸（NEFA）の大量流入により、特に産褥期の肝臓において強い小胞体（ER）ストレスが誘導されることを報告している [5]。過剰な ER ストレスが生じた細胞ではさらに炎症やアポトーシスが誘導される。また、頻発する後産停滞や第四胃変位等のリスクファクターとして、移行期の血中ビタミン E（ $\alpha$ -トコフェロール： $\alpha$ -Toc）不足が報告されている [13, 14]。 $\alpha$ -Toc の体内動態は、主に肝臓に発現する  $\alpha$ -Toc 特異的輸送タンパク質（ $\alpha$ TTP）がキーレギュレーターとなっているが [9]、著者らは高泌乳牛の分娩直後の肝組織において、急性的な炎症マーカーと ER ストレスマーカーの発現亢進、そしてアルブミン（Alb）や抗酸化酵素といった肝機能関連遺伝子の発現抑制に加え、 $\alpha$ TTP の遺伝子発現も強く抑制されることを見出し、産褥期の低  $\alpha$ -Toc 血症との関連性を報告している [8]。以上より、現在の乳牛では分娩後に肝障害および肝機能低下が必発し、産褥期の疾病罹患リスクと強く繋がっていると推察される。そこで産褥期疾患の効率的な予防法を開発する上で、肝臓をターゲットとし、肝障害および肝機

能関連遺伝子発現抑制を防ぐことが戦略的に有効であると考えられる。

接合菌門接合菌綱ケカビ科のリゾープス麹菌 (*Rhizopus oryzae*) はアジア諸国で紹興酒やテンペなどの麹製造工程において用いられるが、その抽出物は動物体に対して免疫調節作用など様々な生理活性を示すことが知られている [17]。また、Suzuki ら (2015) は四塩化炭素 ( $CCl_4$ ) 投与による肝障害誘発ラットにおいて、*Rhizopus oryzae* 水抽出物 (RU) を誘発前に経口投与しておくことにより肝障害を低減できること [18]、さらに、乳牛への RU 給与が肝臓から分泌されるインスリン様成長因子-1 (IGF-1) の血中濃度を増加させる可能性を見出し [第 155 回日本獣医学会発表]、RU に肝障害改善作用や肝機能賦活化作用があることを示唆している。そこで著者らは、クローズアップ期の乳牛への RU 給与が産褥期の肝臓において起きる障害、急性の炎症応答、ER ストレスの亢進および機能関連遺伝子発現抑制を予防・緩和できるのではないか、という仮説に至った。

以上より本研究では、仮説を詳細に検証するため、1) 産褥期の肝機能関連遺伝子発現解析に関して、分娩直後および分娩 1 週後の 2 時点に留まっていた既報 [8] に対し、産褥期の推移をより正確に捉えるため、分娩 3 日 (0.5 週) 後を含めた 3 時点連続肝生検を試みた。そして、2) RU 給与区とプラセボ区を設定し、産褥期の乳牛における血清中肝障害マーカーならびに肝組織中の ER ストレスマーカー、急性期タンパク質および肝機能関連遺伝子の mRNA 発現量を測定し動態を比較解析した。

## 【材料と方法】

本研究は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）畜産研究部門動物実験委員会の事前計画承認を得て（承認番号 1711C074）、「畜産研究部門動物実験等実施要領」に従って実施された。なお本稿では、「クローズアップ期」を分娩予定 3 週間前から分娩までの期間、「産褥期」を分娩直後から 7 日間とそれぞれ定義し、分娩前後 3 週間の期間を「移行期」 [6] と称した。

## 1. 供試牛、飼養法および採材

栃木県那須塩原市にある農研機構畜産研究部門畜産飼料作研究拠点において、2017年5月から8月にかけて分娩したホルスタイン経産牛6頭を供試し、移行期を試験期間とした。給餌条件は、日本飼養標準・乳牛(2006)[12]を基に給与量を設計し、朝夕(9:30および16:30)の2回/日給餌とした。分娩前は市販の乾乳期用配合(乾物当たりの粗タンパク(CP)20%、可消化養分総量(TDN)72%以上)、コーンサイレージ(CP6.4%、TDN67%)およびイネ科乾草(チモシーまたはクレイングラス:CP16.5%、TDN63%)から成る飼料を給与し、分娩後は市販の搾乳牛用配合(CP17%、TDN74%以上)、分娩前と同様のコーンサイレージおよびイネ科乾草から成る飼料を給与した。試験期間を通じて夕方給与飼料にマグネシウム剤(ハイマグZ60HAP,日本全薬工業,福島)50gとビタミン剤(DCガードP,DSM,東京)100gを飼料ヘトッドレスにより添加補給し、自由飲水および鉍塩(鉍塩セレニクスTZ,日本全薬工業)を自由摂取とした。分娩後およびその翌日には、低Ca血症予防のためCa補給剤(ゲンキコールCa,日産合成,東京)を各500mL経口投与した。飼養条件は、全頭をフリーストールバーンにて飼養し、分娩前後約3日間は分娩房で単飼養した。産子は分娩当日中に分離飼養とし、分娩以降は毎日、朝(8:45-9:30)および夕(15:30-16:15)の2回搾乳を行った。搾乳は、分娩後数日間は牛の体調を確認しながら、搾り切らず徐々に搾乳量を増やし、その後、全量搾り切る搾乳に切り替えた。

供試牛の産次および分娩月を揃え、3頭をRU給与区(RU区、平均産次±標準誤差(SEM): $3 \pm 0.6$ )、3頭を対照となるプラセボ(Placebo)区(P区、 $3 \pm 0.6$ )に配置した。RU区では、分娩予定日の21日前から分娩日まで毎日、夕給餌前(16:15-16:30)にRU製剤(ヘパエイド,牛越生理学研究所,千葉)10gを給与した。本RU製剤は、リゾープス麹菌(*Rhizopus oryzae*/U-1株)培地を温水抽出しオートクレーブ後、デキストリンと重量比50%で混合しスプレードライしたRU粉末が重量10%含有した粉末製剤であり(残り90%を構成する賦形剤成分は脱脂米ぬか、炭酸カルシウムおよびブドウ

糖)、RU実質投与量は0.5g/頭/日であった。なお、フリーストールにおいてRU区以外の同居牛がRU製剤を誤摂取しないこと、かつRU区の牛が毎日規定給与量を確実に摂取できることを担保するため、保定し直接経口投与とした。対照区であるP区の乳牛にはRU粉末を含まない賦形剤成分のみの疑似RU製剤10gをRU区と同法により給与した。本試験におけるRU実質投与量および期間(クローズアップ期のみ)の設定は、鈴木らの既試験結果(第155回日本獣医学会発表)を参考にして決定した。

分娩予定日の3週間前(実分娩日に対する平均日数±SEM: $-18 \pm 1.3$ 日)、1週間前( $-6 \pm 0.3$ 日)、分娩直後(約9-13時間後)、分娩0.5週後( $3 \pm 0.2$ 日)、1週後( $7 \pm 0.2$ 日)、2週後( $14 \pm 0.4$ 日)、3週後( $21 \pm 0.3$ 日)に、21G採血針および血清用真空採血管(テルモ,東京)を用いて頸静脈から採血を行い、その後37°Cの温浴で1時間凝血させてから1000g、4°C、20分間の遠心処理を行い、血清サンプルを得た。得られた血清サンプルは分析に供するまで、 $-30$ °Cで冷凍保管した。肝組織採材は、分娩予定1週間前および分娩2週後を除き、採血日程に併せて行った。自動生検装置バードマグナム(Bard Biopsy Systems, Tempe, AZ, USA)および12G、10cmバードマグナムニードル(Bard Biopsy Systems)を用いて、著者らの既報[8]に基づいた立位術式により右側第11-12肋間部位から生検し、肝組織サンプル(1片は約1.5cm、50mg)を得た。採取した肝組織片は直ちに、滅菌冷PBS(-)が入ったチューブに回収して水中保管し、1時間以内に滅菌冷PBS(-)にて洗浄後、液体窒素を用いて凍結させ、分析まで $-80$ °Cにて冷凍保管した。分娩直後の採材を除いた全ての採材時刻は13:15-14:30とし、合わせて各牛の体重計量とボディコンディションスコア(BCS)の判定記録も行った。BCS判定については、毎回、スコアリング経験者を3名無作為に抽出し、UV法[4]により個別に判定した結果を平均して判定値とした。両区共に分娩30日後までの泌乳量を毎日記録した。なお、本試験では残飼量記録に基づく採食量調査は行わなかった。

## 2. 血清中成分分析

血清中の NEFA、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 (BHBA) 濃度および AST、ALT の血清中活性値は、自動分析装置 (Hitachi LABOSPECT, 日立ハイテク, 東京) により分析した。血清中  $\alpha$ -Toc 濃度は著者らの既報 [7] に基づき抽出し逆相高速液体クロマトグラフ (LC-1500 シリーズ, 日本分光, 東京) を用いて測定した。

## 3. 肝組織中の RNA 抽出、cDNA 合成および定量 RT-PCR

凍結肝組織片を破砕機 (マルチビーズショッカー, 安井器械, 東京) を用いて液体窒素凍結条件下で粉碎後、AGPC法 (TRIzol Reagent, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) により全RNAを抽出し、分光光度計 (Nano Drop ND-1000, Life Technologies) を用いてRNA溶液の純度確認 (A260/A280範囲: 1.75–1.94) と濃度測定を行った。逆転写酵素およびDNase (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser, タカラバイオ, 滋賀) を用いて、定法に従いゲノムDNAを除去し、全RNA 1 $\mu$ gを逆転写してcDNAを得た。続いて、PCR酵素 (THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix, 東洋紡, 大阪) およびStepOnePlus Real Time PCR

System (Life Technologies) を用いて定量 RT-PCRを行った。PCR反応条件は、95 $^{\circ}$ C 1minの熱処理後、95 $^{\circ}$ C 15sec、60 $^{\circ}$ C 1minの変性・伸長・検出サイクルを40または50cycle行った。増幅産物が単一であることを融解曲線解析により、増幅産物の目的長をアガロースゲル電気泳動により、それぞれ確認した。各遺伝子のプライマーは、PCR効率の妥当性を確認した (92–105%以内) 上で使用し、その配列、増幅産物長およびAccession No.は表1に示した。各遺伝子の発現定量は、既報 [8] に基づき、ribosomal protein S9 mRNA (*RSP9*) および $\beta$ -actin mRNA (*ACTB*) をマルチ内部標準遺伝子とした $\Delta\Delta$ Ct法により、専用ソフトウェア (StepOne Software v2.1, Life Technologies) を用いて解析した。各遺伝子の mRNA発現量は、6頭の分娩3週間前サンプルにおける平均発現量を基準値1とした相対値により示した。

## 4. 統計解析

各測定結果は、平均値 $\pm$ SEMで示した。統計処理にはSAS (Version ADD-In 7.1 for Microsoft Office, SAS Institute Japan, 東京) を用いた。個体を変動効果とし、分娩後週

表1 定量RT-PCRに用いた標的遺伝子および内部標準遺伝子のプライマー配列、増幅産物長およびAccession No.

遺伝子名 <sup>a</sup>	配列 (5'→3')	増幅産物長(bp)	Accession No.
<i>XBPIs</i>	F <sup>b</sup> : TGCTGAGTCCGCAGCAGGTTG R <sup>c</sup> : GCTGGCAGACTCTGGGGAAG	169	NM_001271737
<i>HP</i>	F: GGGCGAAATGAAAACCTCAA R: GTCGACGCCCTCATAGTGT	99	NM_001040470
<i>ALB</i>	F: AACAGACGGCCATGTTTCTC R: TCTGCATGGAAGGTGAACAA	89	NM_180992
<i>CAT</i>	F: CTCAAACGCACCTGAAGGAT R: GGAATCCCTCGATCACTGAA	103	NM_001035386
<i>IGF1</i>	F: TTGCACTTCAGAAGCAATGG R: GAAGAGATGCGAGGAGGATG	118	NM_001077828
<i>ATTP</i>	F: CACCGGCAGCAAAGTTCTGA R: TGTGTCTCTACCTCCTGGACAA	123	NM_001206676
<i>RPS9</i>	F: CCTCGACCAAGAGCTGAAG R: CCTCCAGACCTCACGTTTGTTTC	63	NM_001101152
<i>ACTB</i>	F: CATCGCGGACAGGATGCAGAAA R: CCTGCTTGCTGATCCACATCTGCT	158	NM_173979.3

<sup>a</sup> *XBPIs* = spliced form of X-box binding protein 1, *HP* = haptoglobin, *ALB* = albumin, *CAT* = catalase, *IGF1* = insulin-like growth factor 1, *ATTP* =  $\alpha$ -tocopherol transfer protein ( $\alpha$ TTP), *RPS9* = ribosomal protein S9, *ACTB* =  $\beta$ -actin

<sup>b</sup> For = forward primer

<sup>c</sup> Rev = reverse primer

(Week: W)、処理区 (Treat: T) およびWとTの交互作用を固定効果として混合モデル解析を行い、 $P < 0.05$ の場合に有意な差が有り、 $P < 0.1$ の場合に差の傾向有りとして判定した。W×T交互作用が有意であった場合にはTukeyの多重検定を実施して、同一週における処理区間の差を検定し、 $P < 0.05$ を有意差有り、 $P < 0.1$ の場合に差の傾向有りとして判定した。

### 【結果】

#### 1. 体重、BCS、泌乳量変化および臨床所見

両区の牛群の平均体重 (図 1A) は共に分娩前は800kgを超えていた。期間推移において有意な変化 ( $P < 0.01$ ) を示し、分娩前と比較して分娩後に約100kg程度減少した。W×T交互作用に有意な効果 ( $P < 0.05$ ) を検出した

が、各週における両区間の体重に有意な差は確認されなかった。BCS (図 1B) についても体重と類似した傾向を示し、両区共に、期間推移において有意な変化 ( $P < 0.05$ ) を示し、分娩前と比較して分娩後に低下した。分娩後の平均BCSはRU区がP区よりも値が低かったが、T効果およびW×T交互作用に有意な効果は認められなかった。分娩30日後までの泌乳成績 (データ略) では、両区の牛群の日泌乳量は共に泌乳最盛期に向けて著増し、試験期間において有意な日変化 ( $P < 0.01$ ) を示したが、両区間における毎日の平均日泌乳量および30日間の平均泌乳総量に有意な差は確認されなかった。

臨床所見では、RU区の乳牛1頭が分娩直後に臨床型乳房炎を発症し、分娩4-6日後に

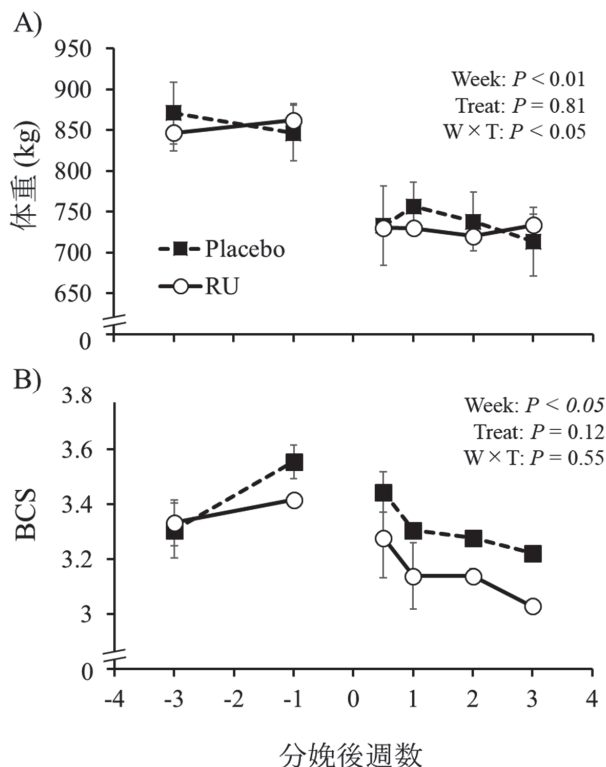


図1 移行期の体重およびボディコンディションスコア (BCS) の変化

A) 体重 (kg) およびB) BCSの推移を、平均値±標準誤差 (SEM) で示した。

*Rhizopus oryzae*水抽出物給与区 (RU区、実線・○、 $n = 3$ ) およびプラセボ給与区 (Placebo: P区、破線・■、 $n = 3$ )。計量、判定実施は分娩予定日の3週前 (実分娩日に対する日数:  $-18 \pm 1.3$ 日)、1週前 ( $-6 \pm 0.3$ 日)、分娩0.5週後 ( $3 \pm 0.2$ 日)、1週後 ( $7 \pm 0.2$ 日)、2週後 ( $14 \pm 0.4$ 日) および3週後 ( $21 \pm 0.3$ 日)。BCS値はスコアリング経験者3名がUV法[4]により判定した結果の平均値。統計処理は、個体を変動効果、分娩後週 (Week)、処理区 (Treat) およびWとTの交互作用 (W×T) を固定効果とした混合モデル解析 (SAS)。 $P < 0.05$ の場合に有意な差有りとして判定。

40℃超の発熱、食欲停滞を呈した。罹患乳房への抗生物質（セファメジンZ, 日本全薬工業）投与および解熱鎮痛消炎剤（ザルソプロカ糖注NZ, 日本全薬工業）を加えたリンゲル輸液による治療を行い、分娩2週間までに症状消失を確認した。

## 2. 血清中成分濃度および肝障害マーカー値の変化

血清中 NEFA、BHBA および  $\alpha$ -Toc 濃度の移行期の変化について表2に示した。両区の血清中 NEFA および BHBA 濃度は共に、期間推移において有意な変化 ( $P < 0.01$ ) を示し、平均 NEFA 濃度は分娩直後から、平均 BHBA 濃度は分娩0.5週間より、分娩前と比較して増加した。分娩2週間以降では、RU区の平均 NEFA および BHBA 濃度がP区より低く推移したが、統計的な有意差はどちらも認められなかった。血清中  $\alpha$ -Toc 濃度は両区共に移行期を通じて有意に変動した ( $P < 0.01$ )。具体的には、分娩3週間前から分娩にかけて漸減し、分娩直後から産褥期は低値で推移した後、分娩3週間にかけて漸増した。両区の濃度に有意な差は確認されなかった。

ネクローシス様細胞死等による肝細胞障害のマーカーである AST および ALT の血清中活性値の測定結果を図2に示した。血清中 AST 活性値 (図2A) は、移行期において有意な変

化 ( $P < 0.01$ ) を示し、分娩直後から産褥期に増加および高値が確認され、特にP区では分娩直後から著しく増加し、0.5週間後にピークとなり平均活性値 ( $180 \pm 59.9$  IU/L) が分娩前の値 ( $47 \pm 3.0$  IU/L) の約3.8倍にまで達し、1週間後 ( $141 \pm 14.4$  IU/L) でも約3倍高い状態が続いた。一方、W  $\times$  T 交互作用に効果傾向 ( $P < 0.1$ ) が検出され、RU区ではP区と比較して移行期において活性値が低い傾向 ( $P < 0.1$ ) を示し、特に産褥期における増加度が小さく、0.5週後の平均活性値はP区の約1/2であった。血清中 ALT 活性値 (図2B) は、AST のような顕著な変化を示さなかったが、移行期全体の推移は両区で大きく異なった ( $P < 0.05$ )。P区が期間を通じて漸増推移を示し、特に分娩0.5週間後には上昇ピークが確認された一方、RU区では産褥期はわずかに平均活性値が低下した結果、分娩0.5週間および1週間後の平均活性値はP区の約1/2となった。また、W  $\times$  T 交互作用に有意な効果 ( $P < 0.05$ ) を検出し、分娩0.5週間後においてRU区の活性値がP区の活性値より統計的に低い傾向 ( $P < 0.1$ ) が確認された。

## 3. 肝生検組織中 mRNA 発現量の変化

分娩直後に mRNA 発現量が著増する2遺伝子および著減する4遺伝子の変動について図3に示した。ER ストレスマーカーである転写因子成熟型 X-box binding protein 1 (XBPs) お

表2 *Rhizopus oryzae* 水抽出物給与区 (RU区) およびプラセボ給与区 (P区) における血清中遊離脂肪酸 (NEFA)、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 (BHBA) および  $\alpha$ -トコフェロール ( $\alpha$ -Toc) 濃度の変化 (各  $n = 3$ )

	分娩後週数							SEM <sup>a</sup>	$P^b$		
	-3	-1	0	0.5	1	2	3		Week	Treat	W $\times$ T
NEFA (mEq/L)											
P	0.25	0.32	0.77	0.75	0.54	0.83	0.59	0.05	< 0.01	0.24	0.44
RU	0.14	0.17	0.51	0.74	0.63	0.43	0.30				
BHBA (mM)											
P	0.59	0.67	0.66	0.94	1.17	1.65	2.34	0.10	< 0.01	0.22	0.28
RU	0.58	0.68	0.59	0.69	0.82	0.87	1.67				
$\alpha$ -Toc (mg/dL)											
P	0.38	0.26	0.19	0.16	0.20	0.25	0.32	0.02	< 0.01	0.60	0.80
RU	0.40	0.36	0.23	0.21	0.18	0.23	0.38				

<sup>a</sup> 標準誤差

<sup>b</sup> Week : 分娩後週数、Treat : 処理区、W  $\times$  T : 分娩後週数と処理区の交互作用

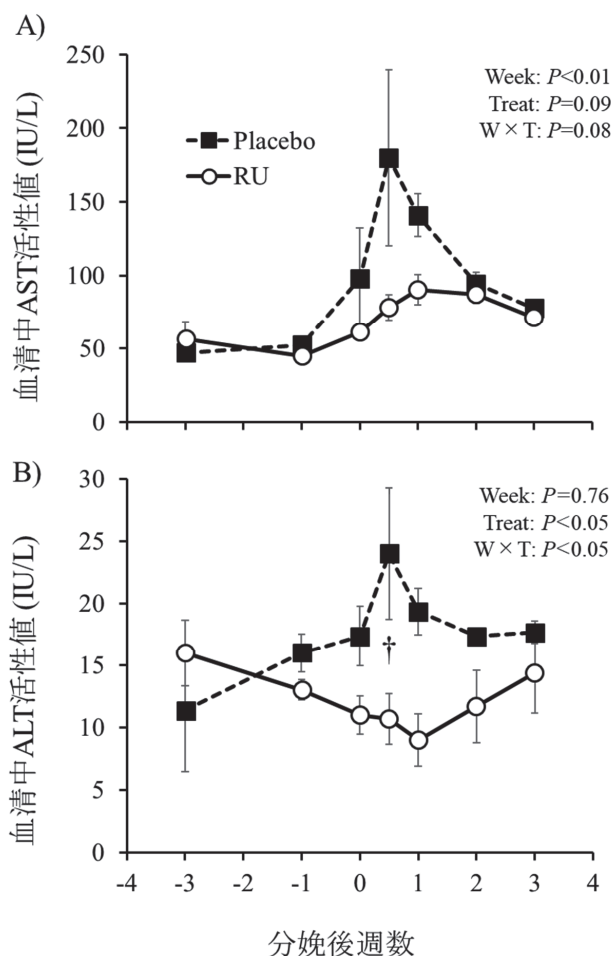


図2 移行期の血清中肝障害マーカー値の推移

A) アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) およびB) アラニンアミノトランスフェラーゼ (ALT) の血清中活性値 (IU/L) の推移。平均値±標準誤差 (SEM)。 *Rhizopus oryzae* 水抽出物給与区 (RU区、実線・○、 $n = 3$ ) およびプラセボ給与区 (Placebo: P区、破線・■、 $n = 3$ )。経静脈採血実施は分娩予定日の3週前 (実分娩日に対する日数:  $-18 \pm 1.3$ 日)、1週前 ( $-6 \pm 0.3$ 日)、分娩直後 (約9-13時間後)、分娩0.5週後 ( $3 \pm 0.2$ 日)、1週後 ( $7 \pm 0.2$ 日)、2週後 ( $14 \pm 0.4$ 日) および3週後 ( $21 \pm 0.3$ 日)。統計処理は、個体を変動効果、分娩後週 (Week)、処理区 (Treat) およびWとTの交互作用 (W x T) を固定効果として混合モデル解析 (SAS)。  $P < 0.05$ の場合に有意な差が、  $P < 0.1$ の場合に差の傾向有り と判定。W x T交互作用が  $P < 0.05$ 時にTukeyの多重検定を実施、同一週における処理区間の差について、  $P < 0.1$ の場合に差の傾向有り (†) と判定。

よび急性炎症マーカーであり主に肝臓に発現する急性期タンパク質ハプトグロビン (Hp) の各 mRNA 発現量は、移行期に有意な変動 ( $P < 0.01$ ) を示し、分娩3週前と比較して分娩直後に著しく高い発現量を示した。XBPIs の mRNA 発現量は分娩直後がピークであり、P区では0.5週後にはほぼ分娩3週前の発現量と同等レベルまで著減したが、一方、RU区では

平均 mRNA 発現量の低下はP区と比較して緩慢であった。Hpの平均 mRNA 発現量は0.5週後において、P区では低下推移になっていたが、RU区ではさらに高値となった。その後は両区共に同様の発現量まで低下した。しかし、各週における両区間の有意な違いはどちらの遺伝子においても認められなかった。

肝臓において合成、分泌される主要タンパク

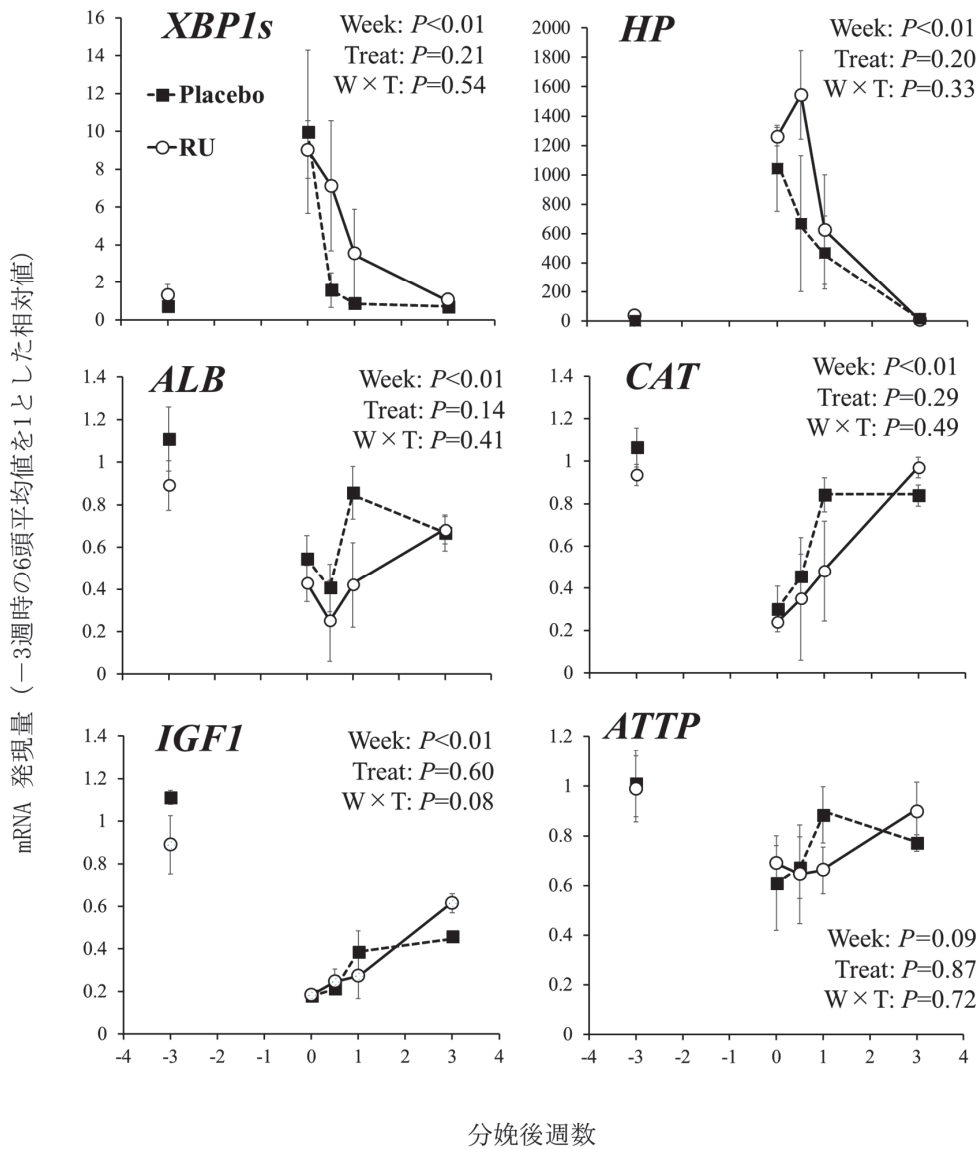


図3 移行期の肝生検組織中mRNA発現量の推移

*XBP1s* = spliced form of X-box binding protein 1、*HP* = haptoglobin、*ALB* = albumin、*CAT* = catalase、*IGF1* = insulin-like growth factor 1および*ATTP* =  $\alpha$ -tocopherol transfer protein ( $\alpha$ TTP)。表示は平均値 $\pm$ 標準誤差(SEM)。*Rhizopus oryzae*水抽出物給与区(RU区、実線・○、 $n = 3$ )およびプラセボ給与区(Placebo: P区、破線・■、 $n = 3$ )。肝生検実施は分娩予定日の3週前(実分娩日に対する日数:  $-18 \pm 1.3$ 日)、分娩直後(約9-13時間後)、分娩0.5週後( $3 \pm 0.2$ 日)、1週後( $7 \pm 0.2$ 日)および3週後( $21 \pm 0.3$ 日)。既報[8]に基づいた立位術式により右側第11-12肋間部位から生検。各遺伝子の発現定量は、既報[8]に基づき、ribosomal protein S9 mRNA (*RSP9*)および $\beta$ -actin mRNA (*ACTB*)をマルチ内部標準遺伝子とした $\Delta\Delta$ Ct法により解析。各遺伝子のmRNA発現量は、6頭の分娩3週前サンプルにおける平均発現量を基準値1とした相対値。統計処理は、個体を変動効果、分娩後週(Week)、処理区(Treat)およびWとTの交互作用(W x T)を固定効果として混合モデル解析(SAS)。 $P < 0.05$ の場合に有意な差が、 $P < 0.1$ の場合に差の傾向有りと判定。



質である Alb および主要な抗酸化酵素であるカタラーゼ (Cat) の各 mRNA 発現量は、移行期に有意に変動し ( $P < 0.01$ )、いずれも分娩 3 週前と比較して分娩直後に著減し分娩 0.5 週後も発現抑制が続いた。Alb および Cat の平均 mRNA 発現量は、RU 区においては分娩 1 週後に分娩 3 週前の値の約 40% 程度までの回復に留まったが、P 区の平均発現量は約 80% 程度まで回復した。分娩 3 週後には両区同等レベルの発現量となった。ただし、移行期を通して、両区間の有意差はいずれも認められなかった。肝臓由来の代表的な内分泌因子である IGF-1 の mRNA 発現量は、移行期に有意な変動 ( $P < 0.01$ ) を示し、分娩 3 週前と比較して分娩直後に 20% 程度まで著減し、その後分娩 3 週後にかけて緩やかな回復推移となった。W × T 交互作用に効果傾向 ( $P < 0.1$ ) を検出したが、両区間の有意差は認められなかった。 $\alpha$ -Toc の体内循環調節を担う  $\alpha$ TTP の mRNA 発現量は分娩前後の期間に変動する傾向が認められ ( $P < 0.1$ )、分娩 3 週前と比較して分娩直後から 0.5 週後にかけて mRNA 発現量が 60 - 70% まで低下した。分娩 3 週後に両区共に分娩 3 週前の約 80% 前後の発現量に回復した。ただし、移行期を通して、両区間の有意差はいずれも認められなかった。

### 【考察】

本研究では、クローズアップ期における RU 連日給与が、産褥期の乳牛に起きる肝臓の障害、急性の炎症応答、ER ストレスの亢進および機能関連遺伝子発現の抑制を予防・緩和する、という仮説の検証を試みた。その結果、クローズアップ期の RU 給与 (実質 0.5g/頭/日) は、産褥期のネクロシス様細胞死等の肝細胞障害に対する保護・緩和効果を発揮した可能性が示唆された一方、急性な炎症応答、ER ストレスの亢進および分娩直後から少なくとも 3 日間に渡って生じる肝機能関連遺伝子の発現抑制に対する予防効果は確認されなかった。

本試験では、分娩後の体重および BCS の有意な減少、泌乳最盛期に向けた泌乳量の急激な増加が確認された。また、血清中 NEFA および BHBA 濃度の推移から、分娩後に体脂肪動員とケトン血症の亢進を示した。採食量データ

は得ていないものの、以上の結果から、供試牛全体において、分娩以降、高泌乳牛に典型的なエネルギー不足 [1] が生じていたと推察された。分娩 2 週日以降、RU 区の血清中 NEFA および BHBA 濃度が P 区より低く推移したが、統計的な有意差は認められず、クローズアップ期の RU 給与 (実質 0.5g/頭/日) に、移行期のエネルギー代謝負荷を改善する効果があったかどうかは明らかにはできなかった。

肝細胞の壊死等による細胞膜破裂に伴って細胞内から血中に逸脱する AST および ALT の両酵素は、ネクロシス様細胞死等による肝細胞障害レベルを評価できるマーカーである。CCl<sub>4</sub> 肝障害誘発ラットを用いた Suzuki らの実績 [18] では、CCl<sub>4</sub> 投与前 10 日間の RU 連日経口給与 (10mg/kg BW) が、CCl<sub>4</sub> 誘発肝障害による AST および ALT の血清中活性値の増加を顕著に抑制した。本研究においても、産褥期に起きる AST および ALT の血清中活性値の増加が RU 区において抑制される傾向が確認され、クローズアップ期 3 週間の RU 連日給与 (実質 0.5g/日) が産褥期に起きる肝障害に対し保護・緩和効果を発揮した可能性が示唆された。CCl<sub>4</sub> の肝障害機序は多経路が関連するが、その発端は、肝臓に存在する薬物代謝酵素 cytochrome P450 群により CCl<sub>4</sub> から生じるトリクロロメチルラジカルが引き起こす酸化ストレスと炎症だと考えられている [16]。乳牛の産褥期における肝障害発生要因も単純ではないが、分娩により誘導される酸化ストレスと炎症応答が産褥初期の肝障害に強く影響していることが推察されることから、実験モデル動物における CCl<sub>4</sub> の肝障害機序と共通する因子があり、同様に RU 給与効果が得られた可能性がある。一方、供試牛のクローズアップ期の平均体重は 850kg 程度だったため、体重換算した RU 経口給与量は約 0.6mg/kg BW であり、単純計算になるが CCl<sub>4</sub> 肝障害誘発ラット [18] に用いた用量の約 6% 程度という微量で作用が確認されたことは特筆すべきである。これは実験動物への肝局所的な毒性暴露に当たる CCl<sub>4</sub> 投与と比較した場合、乳牛の分娩に起因する肝臓への酸化ストレスや炎症刺激が比較的マイルドであったため、微量でも効果を示したのではないかと考えられる。

著者らの既報 [8] では、分娩直後における肝組織中の Alb、Cat および  $\alpha$ TTP mRNA の発現抑制と、分娩 1 週後における発現量の回復を見出すに至っていた。しかし、肝生検を実施したタイミングが分娩直後および分娩 1 週後の 2 時点であり、産褥期において発現抑制がどの程度持続していたのかは不明であった。そこで産褥期の推移をより正確に捉えるため、本試験では、分娩 3 日後を含めた 3 時点連続肝生検を実施した。その結果、対照区である P 区の各 mRNA 発現量推移から、通常、少なくとも分娩後 3 日間はこれらの遺伝子発現抑制が持続していることが示された。RU 区では、産褥期の AST および ALT の血清中活性値の上昇は抑制されたものの、Hp と XBP1s mRNA 発現の亢進、Alb、Cat、IGF-1 および  $\alpha$ TTP mRNA の発現抑制を防ぐことはできなかった。著者らは仮説において、産褥期の肝組織で観察される Hp と XBP1s の発現亢進、肝機能関連遺伝子の発現抑制は肝障害に伴って生じるという現象フローを想定していた。そのため、肝細胞を障害から保護できれば、これらの遺伝子発現変化を予防できると考えていたが、本結果はこれを支持しなかった。そのため、肝臓では分娩に伴いネクロシス様細胞死等の障害を受ける細胞と受けない細胞が混在し（例えば肝小葉領域の違い）、障害を受けない細胞ではアポトーシス様細胞死を起こすものや、細胞死には至らなくても炎症応答により遺伝子発現等の機能のみ阻害される可能性が推察された。そしてこの機序には、RU (0.5g/頭/日) の効果が低かったか、作用点がなかったのかもしれない。Suzuki ら (2015) は、RU が肝障害後の細胞分裂に作用し肝細胞再生速度を高める可能性も示唆しているが [18]、新生細胞が十分な機能を備えているかは明らかではない。故に AST や ALT が示す肝障害に対して RU 給与は保護・緩和作用が観察され、肝臓全体の機能低下（肝機能関連遺伝子の発現低下）については予防効果が認められない結果となった可能性がある。

分娩直後に臨床型乳房炎を発症した RU 区の 1 頭に関して個体別データを精査すると、産褥期における各 mRNA 発現量は RU 区他 2 頭と比較して、Hp および XBP1s ではそれぞれ約 3 倍および 5 倍ほど発現が高く、一方、Alb およ

び Cat についてはそれぞれ 1/50-100 および 1/10 程度と極めて強い発現抑制が生じていた。すなわち、乳房炎発症による炎症応答に伴い、肝機能を強く阻害したものと推察された。RU 区の発現亢進した Hp と XBP1s の平均 mRNA 発現量の収束、そして Alb、Cat および  $\alpha$ TTP の平均 mRNA 発現量の回復が P 区より遅れていた動態については、いずれも、この乳房炎罹患牛の肝組織中 mRNA 発現量の他 2 頭との差異が強く寄与していた。乳房炎罹患牛の血清中 AST および ALT 活性値の上昇は抑制されていたため、乳房炎罹患にも関わらず RU の肝障害保護・緩和効果は発揮されていたと示唆されるが、クローズアップ期の RU 給与（実質 0.5g/頭/日）は乳房炎発症阻止に貢献することはできなかったと考えられる。1 頭のみデータであったが、乳房炎による炎症が、このように肝臓の急性炎症応答を励起し ER ストレスを亢進させるだけでなく、重要な肝機能関連遺伝子の発現を強く抑制する可能性が示唆された点は興味深い結果であった。

予備実験の結果では、肝障害後に RU を給与しても肝障害治癒効果は認められず、RU の作用は一定期間の継続的投与によって肝臓の障害に対する耐性を付与するものと考えられる。例えば腸内細菌叢を介した生体調節機能には、細菌叢の変化に一定の期間を要するが、RU 自体はオートクレーブによる滅菌を行った培養抽出物であるため生菌によるプロバイオティクス効果は見込まれない。一方、乳酸菌の加熱死菌体が免疫調節作用や腸内細菌叢の変化をもたらすことが報告されており [11, 15, 20]、RU に含まれる菌体成分が直接的あるいは腸内細菌叢の変化を介して生体に影響を与えている可能性は否定できない。実際のところ、牛のルーメン発酵において RU がどのような物理的、化学的影響を受けるのか、またルーメン微生物叢にどのような影響を与えるのかについても十分な知見が得られておらず、肝臓に対する RU 作用機序についてはなお一層の基礎研究が必要である。RU には様々な生理活性成分が含有されていることが示唆されているが、肝臓に作用している成分の同定も今後の重要な課題である。本研究では供試頭数が限定され、また投与量も一水準のみであったため、RU の乳牛への効用に関し

て、投与量や投与期間などをさらに詳細に検討する余地がある。

結論として、クローズアップ期のRU連日経口給与（実質0.5g/日）は、産褥期における肝障害に対し保護・緩和効果を示すが、産褥期の急性炎症応答、肝ERストレスの亢進および肝機能関連遺伝子発現抑制に対する予防効果は得られないことが示唆された。

#### [謝辞]

本研究を遂行するにあたり、RU製剤および疑似RU製剤を製造し無償提供して頂きました株式会社牛越生理学研究所に深謝致します。また、本研究をサポート頂きました畜産飼料作研究拠点技術支援センター那須業務科諸氏ならびに試験牛に深謝致します。採材に助力頂きました狩野友佳氏（麻布大学）に深謝致します。本研究の一部は、農林水産研究情報総合センターの科学技術計算システムを利用致しました。本研究の一部は、公益財団法人伊藤記念財団平成29年度研究助成を受けて実施致しました。ここに記して感謝致します。

#### [付記]

本論文に関して、開示すべき利益相反関連事項はない。また、英文については専門的校正（Editage、www.editage.com）を受けて記述した。

#### [引用文献]

- [1] Abuelo A., Hernández J., Benedito J. L., and Castillo C. 2019. Redox Biology in Transition Periods of Dairy Cattle: Role in the Health of Periparturient and Neonatal Animals. *Antioxidants* (Basel). 8:20.
- [2] Bertoni G., Trevisi E., Han X., and Bionaz M. 2008. Effects of Inflammatory Conditions on Liver Activity in Puerperium Period and Consequences for Performance in Dairy Cows. *J. Dairy Sci.* 91:3300–3310.
- [3] Du X., Chen L., Huang D., Peng Z., Zhao C., Zhang Y., Zhu Y., Wang Z., Li X1., and Liu G. 2017. Elevated Apoptosis in the Liver of Dairy Cows with Ketosis. *Cell Physiol. Biochem.* 43:568–578.
- [4] Ferguson JD., Galligan DT., and Thomsen N. 1994. Principal descriptors of body condition score in Holstein cows. *J Dairy Sci.* 77:2695–2703.
- [5] Gessner DK., Schlegel G., Ringseis R., Schwarz FJ., and Eder K. 2014. Up-regulation of endoplasmic reticulum stress induced genes of the unfolded protein response in the liver of periparturient dairy cows. *BMC Vet. Res.* 10:46.
- [6] Grummer RR. 1995. Impact of changes in organic nutrient metabolism on feeding the transition dairy cow. *J. Anim. Sci.* 73:2820–2833.
- [7] Haga S., Ishizaki H., Nakano M., Nakao S., Hirano K., Yamamoto Y., Kitagawa M., Sasaki H., and Kariya Y. 2014. Increase in plasma total antioxidant capacity of grazing Japanese Black heifers and cows in forestland in Japan. *Anim. Sci. J.* 85:135–142.
- [8] Haga, S., Miyaji, M., Nakano, M., Ishizaki, H., Matsuyama, H., Katoh, K. and Roh, S. G. 2018. Changes in the expression of  $\alpha$ -tocopherol-related genes in liver and mammary gland biopsy specimens of peripartum dairy cows. *J. Dairy Sci.* 101:5277–5293.
- [9] Haga S., Nakano M., Ishizaki H., Roh SG., and Katoh K. 2015. Expression of  $\alpha$ -tocopherol-associated genes and  $\alpha$ -tocopherol accumulation in Japanese Black (Wagyu) calves with and without  $\alpha$ -tocopherol supplementation. *J. Animal Sci.* 93:4048–4057.
- [10] Ingvarsen KL., Dewhurst RJ., and Friggens NC. 2003. On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livest. Prod. Sci.* 83:277–308.
- [11] Miyazawa K., Kawase M., Kubota A., Yoda K., Harata G., Hosoda M., and He F. 2015. Heat-killed *Lactobacillus gasseri* can enhance immunity in the elderly in a doubleblind, placebo-controlled clinical study. *Benef. Microbes.* 4:1-9.
- [12] National Agriculture and Food Research Organization, NARO. 2006. Japanese Feeding Standard for Dairy Cattle. Japan Livestock Industry Association, Tokyo, Japan [in Japanese].
- [13] Pontes GC., Monteiro Jr. PL., Prata AB., Guardieiro MM., Pinto DA., Fernandes GO., Wiltbank MC., Santos JE., and Sartori R. 2015. Effect of injectable vitamin E on incidence of retained fetal membranes and reproductive performance of dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98:2437–2449.
- [14] Qu Y., Lytle K., Traber MG., and Bobe G. 2013. Depleted serum vitamin E concentrations precede left displaced abomasum in early-lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 96:3012–3022.
- [15] Sawada J., Morita H., Tanaka A., Salminen S., He F., and Matsuda H. 2007. Ingestion of heat-treated *Lactobacillus rhamnosus* GG prevents development

- of atopic dermatitis in NC/Nga Mice. Clin. Exp. Allergy. 37:296–303.
- [16] Scholten D., Trebicka J., Liedtke C., and Weiskirchen R. 2015. The carbon tetrachloride model in mice. Laboratory Animals. 49:4–11.
- [17] Suzuki T., Fukuoka H., Ushikoshi S., and Morita H. 2007. Potency of Water Extracts of *Rhizopus oryzae* on the Salmonella Infection Rat. Food Sci. Technol. Res. 13:235–240.
- [18] Suzuki T., Fukuoka H., Ushikoshi S., Sato R., Morita H., and Takizawa T. 2015. Protective effect of aqueous extracts from *Rhizopus oryzae* on liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. Anim. Sci. J. 86:532–540.
- [19] Tharwat M., Takamizawa A., Hosaka YZ., Endoh D., and Oikawa S. 2012. Hepatocyte apoptosis in dairy cattle during the transition period. Can. J. Vet. Res. 76:241–247.
- [20] Yoda K., He F., Miyazawa K., Kawase M., Kubota A., and Hiramatsu M. 2012. Orally administered heat-killed *Lactobacillus gasseri* TMC0356 alters respiratory immune responses and intestinal microbiota of diet-induced obese mice. J. Appl. Microbiol. 113:155–162.

## Effects of orally administered *Rhizopus oryzae* aqueous extracts in the close-up dry period on postpartum serum liver injury markers and hepatic gene expression levels in dairy cows

Satoshi Haga<sup>1†</sup>, Hiroshi Ishizaki<sup>1</sup>, and Takehito Suzuki<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Grazing Animal Unit, Division of Grassland Farming, Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, 768 Senbonmatsu, Nasushiobara, Tochigi, Japan

<sup>2</sup> School of Veterinary Medicine, Azabu University, 1-17-71 Fuchinobe, Chuo-ku, Sagami-hara, Kanagawa, Japan

† Correspondence: Satoshi Haga

Grazing Animal Unit, Division of Grassland Farming, Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, 768 Senbonmatsu, Nasushiobara, Tochigi 329-2793, Japan

Tel: +81 287 37 7239 Fax: +81 287 36 6629

Email: hagatiku@affrc.go.jp

### **[Abstract]**

The aim of this study was to evaluate the preventive effects of orally administered *Rhizopus oryzae* aqueous extracts (RU) on puerperal hepatic injury, inflammation, endoplasmic reticulum (ER) stress, and suppression of hepatic gene expression in dairy cows. Treatments ( $n = 3$ ) on 6 multiparous Holstein cows included the RU group (orally administered RU (0.5 g/head/day), and a placebo (P) group from -3 weeks to 0 days postpartum. Blood samples were taken from the cows by jugular venipuncture, and liver tissue was obtained by biopsy. Liver injury was assessed based on the serum activities of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). The hepatic mRNA expression levels of ER stress-induced unfolded protein response marker (XBP1s), haptoglobin (Hp), albumin, catalase, and vitamin E transfer protein ( $\alpha$ TTP) were measured by RT-qPCR. After calving, AST and ALT serum activities in the RU group were lower than those in the P group. The hepatic mRNA expression levels of XBP1s and Hp temporarily increased at calving, while the hepatic mRNA expression levels of albumin, catalase, and  $\alpha$ TTP were downregulated during the 3 days after calving. However, we could not confirm a significant difference between these two groups. These results indicate that RU (0.5 g/head/day in the close-up period) may prevent liver injury after calving; however, they could not clearly demonstrate preventive effects on puerperal acute hepatic dysfunction (the suppression of gene expression) in dairy cows.

**Keywords:** calving, liver biopsy, necrotic-like cell death, preventive effect, *Rhizopus oryzae* aqueous extracts