

周産期におけるプロピオン酸菌製剤と乳酸菌発酵副産物の投与が経産牛の乳生産, 第一胃発酵及び血液性状に及ぼす影響

生田健太郎*・大谷喜永**・増子孝則**・森ゆうこ**・中野兼一**・小原嘉昭**

要 約

周産期の経産牛10頭を供試し, 乳生産と生理性状に対するプロピオン酸菌製剤 (PB) と乳酸菌発酵副産物 (LB) の投与効果を観察する実験を行った. 分娩予定3週前から分娩後4週までの間, 1日1頭当たりPB 20g (プロピオン酸菌量 5×10^{10} cfuを含有) とLB10gを飼料添加する投与区と無添加の対照区へ5頭ずつ配置し, 分娩予定3週前から分娩後12週まで飼養試験を行った結果, 以下に示す実験結果が得られた.

- 1 乾物摂取量は分娩後6週以降投与区で多く推移し, 8~12週にかけて有意差が認められた.
- 2 乳量は2週以降投与区が多く推移し, 5~12週にかけて有意差が認められた. 乳脂率は4週以降投与区が高く推移し, 4と6週で有意差が認められた. 乳蛋白質率は投与区で低く推移し, 4から12週にかけて有意差が認められた. 無脂固形率は投与区で4週以降低く推移し, 4週に有意差が認められた.
- 3 体重には差が見られなかったが, ボディ・コンディション・スコアは投与区で分娩後4週以降低く推移し, 8週で有意差が認められた.
- 4 第一胃液pHは両区間に差が見られなかった. アンモニア態窒素濃度は投与区で分娩後6週以降低く推移した. 総揮発性脂肪酸 (VFA) 濃度は両区間に差が見られなかったが, VFA中の酢酸割合は投与区で分娩前1週から高く推移し, 分娩後4週に有意差が認められた. 逆に, プロピオン酸割合は投与区で低く推移し, 分娩後4と12週に有意差が認められた.
- 5 血液のヘマトクリット値 (Ht) と β ヒドロキシ酪酸 (BHB) は投与区で高く推移し, Htでは分娩後2, 6, 8及び12週に, BHBでは分娩後8及び12週にそれぞれ有意差が認められた.

以上の結果より, 周産期の経産牛へのPBとLBの混合投与は第一胃内での窒素同化の促進や酢酸型発酵への誘導を介した乳生産向上効果が期待できる.

Effects of the Supplementation of Propionibacteria and the Fermentation Product of Lactic Acid Bacteria on Milk Production, Rumen Fermentation, and Blood Metabolites in Periparturient Multiparous Dairy Cows

Kentaro IKUTA, Yoshihisa OHTANI, Takanori MASHIKO, Yuko MORI, Kenichi NAKANO,
Yoshiaki OBARA

2013年8月31日 受理

*兵庫県立農林水産技術総合センター淡路農業技術センター ** (株) 明治飼糧

Summary

This experiment was conducted to determine the effects of the supplementation of *Propionibacterium freudenreihii* agent (PB) and the fermentation product of lactic acid bacteria (LB) on milk production, rumen fermentation, and blood metabolites in periparturient multiparous dairy cows. Ten multiparous cows were divided into two experimental groups: cows fed 1) a regular control diet (group C; n=5) and 2) regular control diets supplemented with 20 g/d of PB that included 5×10^{10} cfu/d *Propionibacterium freudenreihii* and 10 g/d LB (group T; n=5) from 3 wk before anticipated calving to 4 wk after calving. The experiment was conducted from 3 wk before anticipated calving to 12 wk after calving. The following results were obtained:

- (1) Dry matter intake (DMI) was higher in group T than in group C 6 wk after calving. There was a significant difference in DMI between the two groups from 8 wk to 12 wk after calving.
- (2) Milk yield was higher in group T than in group C 2 wk after calving. There was a significant difference in milk yield between the two groups from 5 wk to 12 wk after calving. The milk fat percentage was significantly higher in group T than in group C at 4 and 6 wk. The milk protein percentage was significantly lower in group T than in group C from 4 wk to 12 wk. The milk solid, not fat percentage, was significantly lower in group T than in group C at 4 wk.
- (3) There was no significant difference in body weight between the two groups. Body condition score (BCS) was lower in group T than in group C from 4 wk to 12 wk. There was a significant difference in BCS between the two groups at 8 wk.
- (4) There was no significant difference in ruminal pH between the two groups. Ruminal ammonia-N concentration was lower in group T than in group C from 6 wk to 12 wk. Although there was no significant difference in total volatile fatty acid (VFA) concentration, molar percentage of acetate was higher in group T than in group C from 1 wk before anticipated calving to 12 wk after calving. There was a significant difference in molar percentage of acetate at 4 wk after calving. Molar percentage of propionate was lower in group T than in group C after calving. There was a significant difference in molar percentage of propionate at 4 and 12 wk after calving.
- (5) Blood hematocrit (Ht) and plasma β -hydroxybutyrate (BHB) level were higher in group T than in group C after calving. There were significant differences in Ht at 2, 6, 8, and 12 wk and in BHB at 8 and 12 wk after calving.

These results suggest that the PB plus LB supplementation to periparturient multiparous dairy cows increased milk production most likely because it enhanced the nitrogen assimilation by microorganisms and stimulated acetic acid fermentation in the rumen.

キーワード：乳牛，周産期，プロピオン酸菌，乳酸菌発酵副産物

緒言

プロピオン酸菌はルーメン内で糖や有機酸からプロピオン酸を生成する細菌である。海外では既にプロピオン酸菌製剤(以下PBと呼ぶ)の乳牛への投与効果について報告されている⁷⁻⁹⁾が、我が国では未だ活用事例の報告はなされていない。そこで、著者らは国

内で新しく開発されたチーズスターター由来のPBを供試し、乳生産への効果を検討した。前報⁴⁾において、周産期における第一胃内環境の不安定化を防止することを目的に、初妊牛と経産牛を用いて、PB単独投与の影響を検討した結果、初妊牛において乾物摂取量(以下DMIと呼ぶ)の増加を認めたものの、乳量には影

響が認められず、乳成分は産次によって投与効果が異なることを報告した。本報では乳生産レベルの高い経産牛へのPB投与効果を増強するために、その増殖を増強することが確認されている乳酸菌発酵副産物(以下LBと呼ぶ)を併用投与してDMI、乳生産、第一胃発酵及び血液性状等に及ぼす影響について検討した。

材料及び方法

1 供試牛と処理区分

淡路農業技術センターで繋養するホルスタイン種乳用牛のうち、2011年9月から翌年1月に分娩予定の経産牛(1~4産) 10頭を供試した。

これらの乳牛を分娩予定日の3週間前から分娩後4週間までの間、PBを20g/日/頭(プロピオン酸菌量 5×10^{10} cfuを含有)とLBを10g/日/頭の混合物を飼料に添加する投与区と、無添加の対照区を設け、産次数と分娩予定日が偏らないよう両区に5頭ずつを配置した。

2 飼養管理状況

供試牛はコンフォート型タイストール牛舎に繋養し、給餌は8時30分と15時30分から、搾乳は8時と16時30分からそれぞれ1日2回行った。

乾乳期間中、現物日量でビートパルプ3kg、2種類(クレインとイタリアンまたはオーツ)の乾草7~9kg、乾乳期用配合飼料3~4kgを給与した。

分娩後は1週間かけて乾乳期飼料から完全混合飼料(TMR)に切り替え、その後は各供試牛の摂取量を見ながら増量し、給与量の10%程度の残飼量が出るように給与量を決定し、1日2回(朝:夕=4:6)に分けて給与した。

3 調査項目と測定方法

(1) 飼料摂取状況

給与量と残飼量は朝夕の給与毎に計量した。残飼量が多い場合はサンプルを採取し、100°C18時間の熱風乾燥により残飼の乾物率を測定した。

(2) 乳生産

乳量を朝夕の搾乳毎にミルクメーターに接続したミルクメーター(Fシリーズ、ツルテスト・ディストリビューター社製、ニュージーランド)により計測した。

乳成分は分娩2, 4, 6, 8, 12週後にミルクメーターのサンプラーを介して乳汁検体を採取し、近畿生乳

販連生乳検査所の多成分赤外線分析装置(コンビフォスTMFC、フォス社製、デンマーク)にて一般乳成分率と体細胞数の分析を行った。各乳成分率と体細胞数は朝夕の乳量比によって加重平均した。なお、体細胞数をリニアスコアに換算した後、統計処理に供した。

(3) 体重及びボディ・コンディション・スコア(BCS)

体重を分娩予定の3及び1週前、分娩日、分娩2, 4, 6, 8, 12週後に牛衡器で計測した。同時にEdmonsonら²⁾の方法によりBCSを評価した。

(4) 第一胃発酵

第一胃液を分娩予定の3及び1週前、分娩後2, 4, 6, 8, 12週の朝の飼料給与から4時間後に経口式胃汁採取器(ルミナー:富士平工業、東京)を用いて採取した。

pHを採取直後にガラス電極法(pHメーター YUSB-01/PH:山形東亜DKK, 山形)で測定した。アンモニア態窒素濃度は二重ガーゼで濾過した胃液を凍結保存し、水蒸気蒸留法によって測定した。揮発性脂肪酸(VFA)測定では濾過胃液2.5 mlを24%メタリン酸0.5mlと混和後、18時間室温放置し、冷却遠心(4°C, 3000回転/分, 30分間)によって得られた上清液を凍結保存した。測定時、上清液は融解後、水系0.45 μ mのディスクフィルターで濾過し、ガスクロマトグラフ(GC-2014:島津製作所, 京都)で測定した。

(5) 血液性状

(TP)は屈折法、血糖(Glu)、アルブミン(Alb)、尿素窒素、総コレステロール(TC)、カルシウム(Ca)、無機リン、アスパラギン酸トランスフェラーゼ及び γ グルタミルトランスペプチダーゼを乾式血液自動分析装置(富士ドライケム3030:富士フィルム, 東京)で測定した。さらに、凍結血漿を用いて、 β ヒドロキシ酪酸(BHB)を酵素サイクリング法、遊離脂肪酸(NEFA)は比色法により測定した。

(6) 繁殖成績

繁殖成績については初回発情日数、初回授精日数及び空胎日数について調査した。分娩後1年以内に受胎しないものを不受胎とした。廃用または死亡により除籍となった個体についてもその時点までの発情や授精について記録を採用した。また、供卵牛として採卵を行った投与区の1頭については採卵のための過排卵処置に入る基準日となった発情を初回授精とした。

4 統計処理

採材時点ごとに投与区と対照区の等分散性を確認後、Student-t検定により平均値の差の検定を行った。危険率5%未満を有意差とし、10%未満は差の傾向があるとした。

結果

1 乾物摂取量(DMI)

DMIは分娩前から分娩後5週までは両区ともほぼ等しく推移したが、分娩後6週以降は対照区が25~26kg/日程度で安定的に推移したのに対し、投与区では分娩後12週の30kg/日以上まで増加傾向を示し、分娩後8週以降両区間に有意差($P<0.05$)が認められた(図1)。

2 乳生産

(1) 乳量

実験期間中の平均日乳量は対照区 38.8 ± 4.1 kg/日、投与区 44.2 ± 3.3 kg/日で、投与区が多い傾向($P<0.10$)にあった。また、分娩後の週次毎にその推移を比較すると対照区が6週でピークに達した後、40kg/日程度で推移したのに対し、投与区は5週でピークに達した後、45kg/日以上で推移し、対照区との間に有意差($P<0.05$)または差がある傾向($P<0.10$)が認められた(図2)。

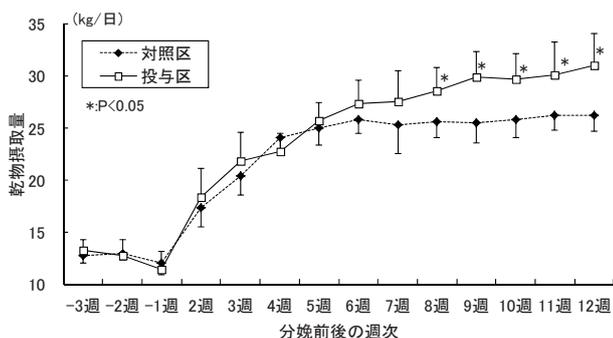


図1. 乾物摂取量の推移

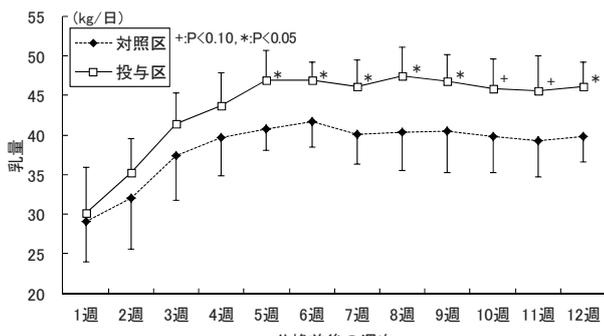


図2. 乳量の推移

(2) 乳成分

乳脂率は4週以降投与区が高く推移し、4週と6週で両区間に有意差($P<0.05$)が認められた(図3-1)。一方、乳蛋白質率は実験期間を通して投与区が低く推移し、4週以降両区間に有意差($P<0.01$ または 0.05)が認められた(図3-2)。その結果、無脂固形率も投与区が低く推移し、4週で両区間に有意差($P<0.05$)が認められた(図3-4)。乳糖率(図3-3)及び体細胞数リニアスコア(データ省略)は両区間に差が見られなかった。

3 体重とBCS

体重は両区間に差が見られなかった(図4-1)。BCSは分娩後4週以降、対照区の低下が緩やかになったのに対し、投与区は6週まで低下し、8週では両区間に有意差($P<0.05$)が認められた(図4-2)。

4 第一胃発酵

pHは、いずれの週次においても両区間に差が見られなかった(図5-1)。一方、アンモニア態窒素濃度は分娩後4週までは両区間に差が見られなかったが、6週以降、投与区が低く推移し、8週では両区間に差がある傾向が認められた(図5-2)。総VFA濃度は、いずれの週次においても両区間に差が見られなかった(図5-3)。VFA中の酢酸割合は分娩前1週から投与区が高く推移し、分娩後4週では両区間に有意差($P<0.05$)が、その他の週次では両区間に差の傾向($P<0.10$)が認められた(図5-4)。一方、プロピオン酸割合は投与区が低く推移し、分娩後4、12週で両区間に有意差($P<0.01$, $P<0.05$)が認められた(図5-5)。そのため、酢酸/プロピオン酸比は投与区が高く推移し、分娩後4、12週で両区間に有意差($P<0.01$, $P<0.05$)が認められた(図5-6)。

5 血液性状

測定した12項目のうち、HtとBHBの2項目で両区間に有意差が認められた。両項目とも概ね投与区が高く推移し、Htは分娩後2、6、8及び12週で、BHBは分娩後8、12週で両区間に有意差が認められた(図6-1, 2)。

6 繁殖成績

初回発情までの日数、初回授精までの日数、受胎率はいずれも両区間に差が見られなかった。なお、空胎日数と授精回数は例数不足により有意差検定はできなかった(表)。

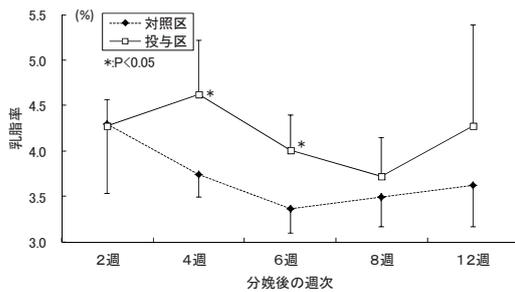


図3-1. 乳脂率の推移

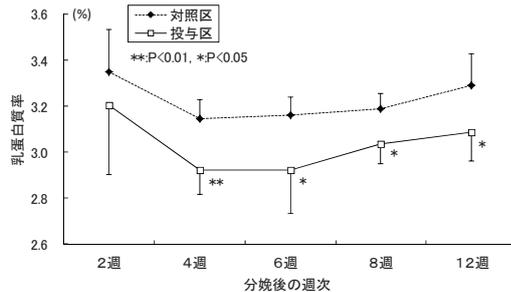


図3-2. 乳蛋白質率の推移

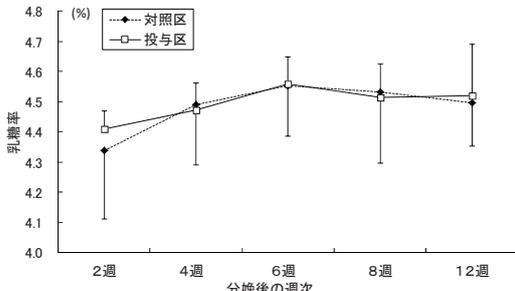


図3-3. 乳糖率の推移

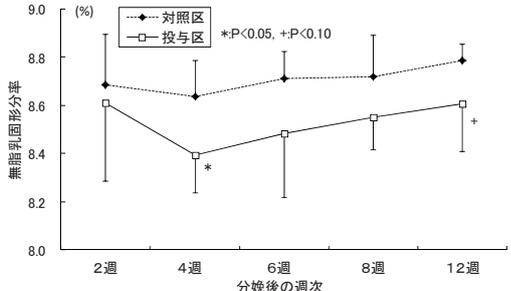


図3-4. 無脂固形分率の推移

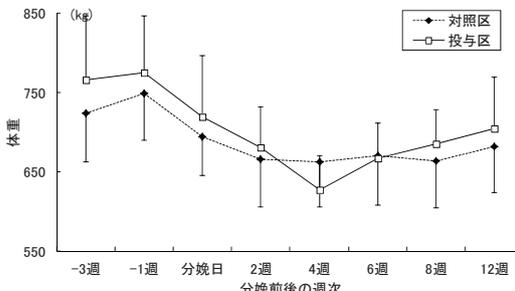


図4-1. 体重の推移

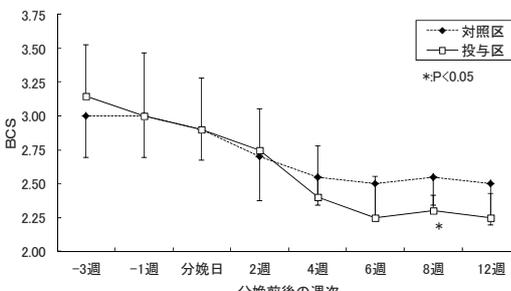


図4-2. BCSの推移

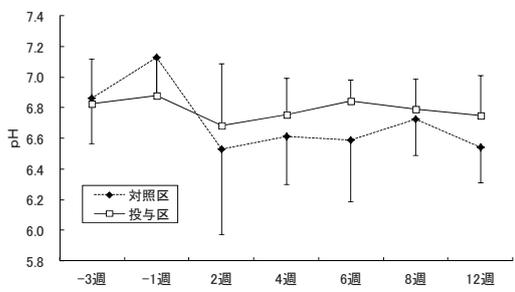


図5-1. pHの推移

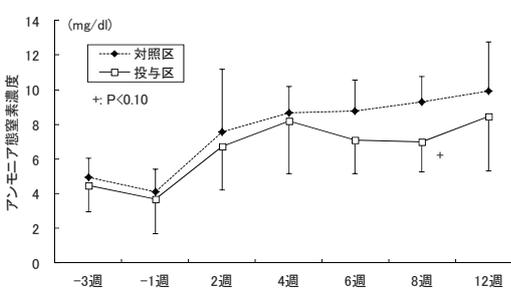


図5-2. アンモニア態窒素濃度の推移

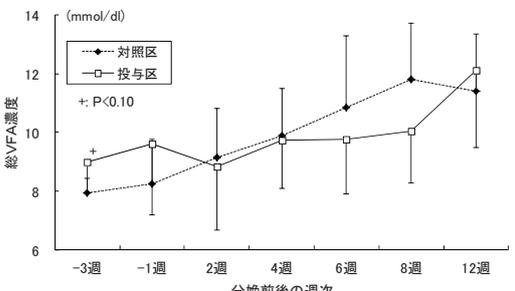


図5-3. 総VFA濃度の推移

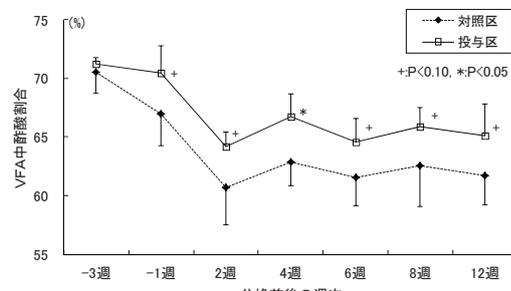


図5-4. VFA中酢酸割合の推移

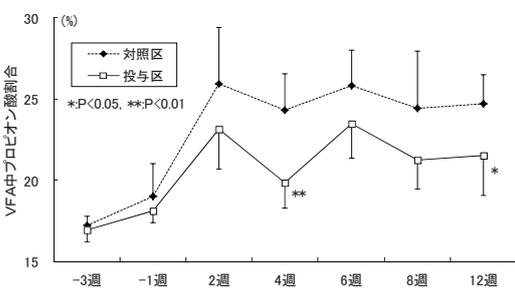


図5-5. プロピオン酸割合の推移

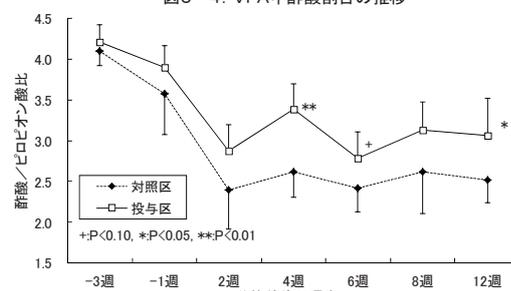


図5-6. 酢酸/プロピオン酸比の推移

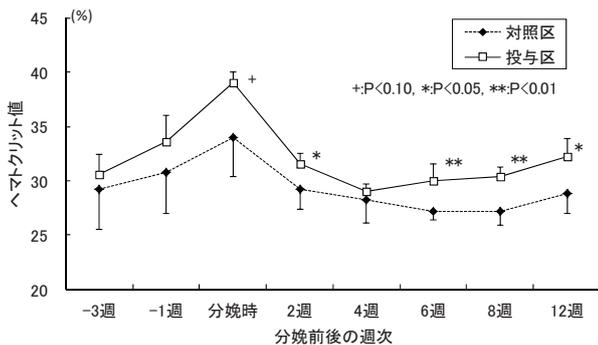


図6-1. ヘマトクリットの推移

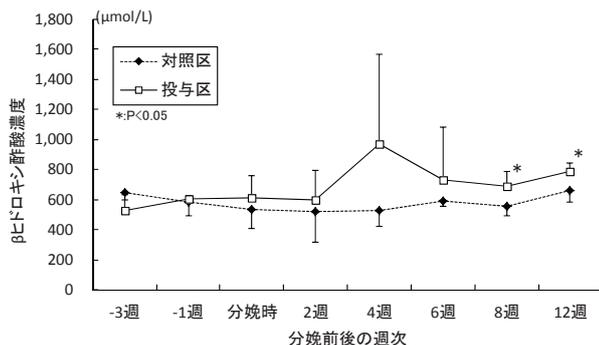


図6-2. βヒドロキシ酪酸の推移

表. 繁殖成績

	対照区	投与区	有意水準
初回発情日数	98 ± 21	94 ± 21	ns
調査対象頭数	4	5	
初回授精日数	141 ± 55	142 ± 43	ns
調査対象頭数	4	4	
受胎頭数(率)	4 (100%)	1 (33%)	ns
調査対象頭数	4	3	
空胎日数	149 ± 49	188 ± 15	-
授精回数	1.3 ± 0.5	3.0 ± 0.0	-
平均±標準偏差			
ns:有意差なし			

考察

DMIに関して、前報⁴⁾では経産牛においてPB投与の効果は見られなかったが、本報では分娩後に対照区が平均的な経産牛の摂取上限量⁶⁾に達し、PB+LB投与区ではそれを上回り顕著に増加した。一方、前報⁴⁾と同様に初産牛と経産牛を合わせて供試し、プロピオン酸菌を10⁹cfuレベルにして乳酸菌を併用投与した報告⁷⁾ではDMIに影響は見られなかったが、経産牛のみを供試し、プロピオン酸菌を10¹¹cfuレベル単独投与した報告^{3,9)}ではDMIが減少した。これらのことから、本報におけるプロピオン酸菌の投与量(10¹⁰cfuレベル)とLGの併用投与は経産牛のDMIに対して有効な組み合わせであったと考えられる。

乳量に関して、前報⁴⁾ではDMIが増加した初産牛においてもPB投与の効果は見られなかったが、本報ではDMI増加を反映して、乳量が増加した。DMIは記載されて

いないが、プロピオン酸菌投与で経産牛の乳量が増加したとする報告⁸⁾もある一方で、プロピオン酸菌投与でDMIが減少または変化しなかった実験では、乳量に効果はないとする報告^{3,7,9)}もある。これらのことから、本報告におけるPB+LB投与による乳量増加はDMI増加を介した効果と考えられた。

前報⁴⁾ではPB投与区の経産牛で乳脂率、乳蛋白質率及び無脂固形率が高くなる週次が見られた。本報ではPB+LB投与区で乳脂率は増加したが、乳蛋白質率と無脂固形率は低下した。これはPB+LB投与区では後述する第一胃内発酵パターンが酢酸型となったことと、乳量の増加により糖新生によるプロピオン酸からのグルコース産生が不足し、エネルギー不足になったことが影響していると考えられた。これまで、プロピオン酸菌投与により分娩後1週のみ経産牛の乳蛋白質率と無脂固形率が高くなるという報告³⁾、経産牛においてプロピオン酸菌投与により乳脂率は低くなり、乳糖率と無脂固形率が高くなるという報告⁸⁾、さらには影響がなかったとする報告^{7,9)}がなされている。これらの報告からプロピオン酸菌投与量と乳成分には直接的な関連性は認められないと思われ、乳成分への影響についてはDMIと乳量の関係によるエネルギー収支やVFA構成割合を反映した結果であると考えられた。

体重とBCSに関して、前報⁴⁾では初妊牛でPB投与区のDMIが高かったが乳量に変動せず、体重は増加し、分娩後のBCSの回復も早かった。本報では体重に差はなかったものの、PB+LB投与区のBCSが乳量増加の影響で低かった。一方、プロピオン酸菌投与によりDMIが減少しても乳量に差が見られなかった報告^{3,9)}では体重やBCSには影響が見られなかった。また、DMIは不明であるが乳量が増加したにも関わらず体重の回復が早かったとする報告⁸⁾がある。体重やBCSはエネルギー収支を反映するが、DMIと乳量の増減程度が報告によって異なるため、プロピオン酸菌の投与効果としては一定の傾向がつかめなかった。

第一胃発酵に関して、アンモニア態窒素濃度は前報⁴⁾では分娩後にPB投与区で低く推移し、本報も同様の結果が得られた。VFA構成割合は前報⁴⁾では分娩後12週のみ投与区のプロピオン酸割合が高くなる傾向がみられたが、本報ではPB+LB投与により酢酸割合が高く、

プロピオン酸割合が低くなった。前報⁴⁾と同様にプロピオン酸菌を 10^{11} cfuレベルで単独投与した同一菌株を用いた報告^{5,8,9)}では酢酸割合が減少し、プロピオン酸割合が増加した。一方、プロピオン酸菌を 10^9 cfuレベルで乳酸菌と併用投与した試験⁷⁾ではVFA発酵に影響しなかった。これらのことから、プロピオン酸菌の投与量が 10^{11} cfuレベル以上あればプロピオン酸割合が増加すると考えられた。また、本報で供試したプロピオン酸菌は共存する繊維分解菌の活性を刺激することが確認されている（未発表データ）。さらに、併用投与したLBは乳酸菌をホエイ培地で工業的に連続培養した上清で、乳酸や乳糖の他、菌の増殖に有用な成分を豊富に含むことから、PBとLBの作用が相まって繊維分解菌による粗飼料の発酵が促進され、酢酸割合が高くなったと考えられた。

血液性状に関しては、投与区のHtとBHBが高く推移しており、DMIの増加を反映したものと考えられた。前報⁴⁾では蛋白質（Alb, TP, α アミノ態窒素）やCa代謝に関与する項目がPB投与区で高くなった。一方、プロピオン酸菌投与によりDMIが減少した報告^{3,9)}でもGlu, TC, BHBには影響がなく、NEFAは分娩後1週では高まるが、その後は低下したとしており、血液プロファイルの項目によっては

DMIへの影響が反映されない場合もあると考えられた。また、プロピオン酸菌投与によって血液成分は変化するが、その効果は投与菌量と産次に依存するという報告¹⁾もあり、プロピオン酸菌投与が血液性状に及ぼす影響には複数の要因が複雑に関与すると考えられた。

繁殖成績に関しては、前報⁴⁾と同様に差は認められなかったが、繁殖成績の記載がある文献^{3,8)}も含めて、投与時期が周産期に限られるため、多くの要因が関与する繁殖に対するプロピオン酸菌の効果を考察することは困難である。

以上のようにPBとLBの併用投与によって、第一胃内で繊維分解菌が活性化したと推察され、その結果、総VFA中の酢酸割合が増加し、乳脂率が高まるとともに、第一胃内での飼料中繊維質の消化促進により、DMIが増加し、乳量が増加したものと考えられた。

引用文献

- (1) Aleman M.M., D.R. Stein, D.T. Allen, E. Perry, K.V. Lehloenaya, T.G. Rehberger, K.J. Mertz, D.A. Jones, L.J. Spicer (2007) : Effects of feeding propionibacteria to dairy cows on plasma hormones and metabolites. *J. Dairy Res.* 74 : 146-153
- (2) Edmonson A.J., I.J. Lean, L.D. Weaver, T. Farver and G. Webster (1989) : A body condition scoring chart for holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72 : 68-78
- (3) Francisco C.C., C.S. Chamberlain, D.N. Waldner, R.P. Wettemann and L.J. Spicer (2002) : Propionibacteria fed to dairy cows : Effects on energy balance, plasma metabolites and hormones, and reproduction. *J. Dairy Sci.* 85 : 1738-1751
- (4) 生田健太郎・小原嘉昭 (2013) : 周産期乳牛へのプロピオン酸菌製剤の投与が乳生産、第一胃発酵、血液性状に及ぼす影響 : 兵庫農技総セ研報 (畜産) 49, 17- 23
- (5) Lehloenya, K.V., C.R. Krehbiel, K.J. Mertz, T.G. Rehberger, and L.J. Spicer (2008) : Effects of propionibacteria and yeast culture fed to steers on nutrient intake and site and extent of digestion. *J. Dairy Sci.* 91:653-662
- (6) 農林水産省農林水産技術会議事務局編 (2006) : 日本飼養標準 乳牛 (中央畜産会), 49-50
- (7) Raeth-Knight M.L., J.G. Linn and H.G. Jung (2007) : Effect of direct-fed microbials on performance, diet digestibility, and rumen characteristics of holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 90 : 1802-1809
- (8) Stein D.R., D.T. Allen, E.B. Perry, J.C. Bruner, K.W. Gates, T.G. Rehberger, K. Mertz, D. Jones and L.J. Spicer (2006) : Effects of feeding propionibacteria to dairy cows on milk yield, milk components, and reproduction. *J. Dairy Sci.* 89:111-125
- (9) Weiss W.P., D.J. Wyatt and T.R. McKelvey (2008) : Effect of feeding propionibacteria on

milk production by early lactation dairy cows.

J. Dairy Sci. 91 : 646-652