

BULLETIN
OF
OITA PREFECTURAL AGRICULTURE, FORESTRY AND FISHERIES
RESEARCH CENTER

No.7

FEBRUARY 2018

大分県農林水産研究指導センター

研 究 報 告

第7号

平成30年2月

大分県農林水産研究指導センター

黒毛和種仔牛における麦焼酎粕濃縮液および
稲発酵粗飼料が成長に及ぼす影響

Effects of Condensed Barley Distillers Soluble and
Rice Whole Crop Silage on Growth of
Japanese Black Calves

鶴岡 克彦

Katsuhiko TSURUOKA

大分県農林水産研究指導センター
畜産研究部

Oita Prefectural Agriculture, Forestry and Fisheries Research Center,
Livestock Research Division

キーワード：麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、発酵、黒毛和種仔牛、ルーメン、骨格筋、
タンパク質分解、 β ヒドロキシ酪酸

*九州大学大学院生物資源環境科学府学位論文 2017年（平成29年）

目 次

緒 言	1
I 麦焼酎粕濃縮液の給与が黒毛和種成雌牛の第一胃発酵および血液代謝に及ぼす影響	
1 はじめに	3
2 材料および方法	3
3 結果および考察	4
II 黒毛和種仔牛の成長に及ぼす麦焼酎粕濃縮液給与の影響	
II-I 黒毛和種仔牛の成長、第一胃発達、および筋肉発達に及ぼす麦焼酎粕濃縮液の影響	
1 はじめに	10
2 材料および方法	10
3 結果	13
4 考察	16
II-II 黒毛和種仔牛の成長、第一胃発達、および筋タンパク質分解に関連する遺伝子の発現に及ぼす 麦焼酎粕濃縮液の影響	
1 はじめに	19
2 材料および方法	19
3 結果	21
4 考察	22
III 黒毛和種仔牛の成長、第一胃発達、および筋肉発達に及ぼす稲発酵粗飼料の影響	
1 はじめに	24
2 材料および方法	24
3 結果	25
4 考察	30
IV 麦焼酎粕濃縮液および稲発酵粗飼料を混合した発酵飼料が黒毛和種仔牛の成長、第一胃発酵、および 筋肉発達に及ぼす影響	
1 はじめに	32
2 材料および方法	32
3 結果	33
4 考察	36
V 総合考察	38
摘要	42
謝辞	44
引用文献	45

緒 言

日本の牛肉生産では、1頭当たり4～5tの濃厚飼料が必要であり、この多くは輸入飼料に依存している。日本は約1380万トンの濃厚飼料および20万トンの粗飼料を輸入している（農畜産業振興機構¹²¹⁾，2015)。2015年3月に閣議決定された食料・農業・農村基本計画では、2013年に26%であった飼料自給率を2025年には40%まで引き上げることを目標としている。しかし、2007年の飼料自給率は25%であり、2007年以降ほとんど増加していない（農林水産省¹²²⁾，2009)。2007年の粗飼料の自給率は、78%であり、濃厚飼料は10%である（農林水産省¹²²⁾，2009)。食料・農業・農村基本計画では、これらを上昇させるための施策として、飼料稲および飼料米の生産拡大、エコフィードの利用拡大などが掲げられている。2006年頃からの輸入穀物価格の上昇により、国内の畜産経営は厳しさを増しており、輸入飼料への過度の依存から脱却していく必要がある。

農林水産省によると、2014年度は1950万tの食品製造残渣が排出されている（農林水産省¹²³⁾，2016)。そのうち、1350万tがリサイクルされており、73%が飼料として利用されている（農林水産省¹²³⁾，2016)。利用されない食品製造残渣は、栄養価は高いが、成分構成が偏っており、貯蔵中の安定が悪いことから、利用されず埋め立て地に埋却又は焼却されてきた（梶川⁶⁹⁾，1996)。しかし、これらの食品製造残渣は、他の飼料と混合することで、栄養のバランスをとることができる（Clark *et al.*²⁵⁾，1987；Coppock²⁷⁾，1987)。食品製造残渣については、とうふ粕などの大豆残渣（丹羽¹¹⁶⁾，2001；井出⁵⁹⁾，2002；今井⁶²⁾，2002；家木ら⁶¹⁾，2010)、ビール粕（西野ら¹¹⁵⁾，2001)、および茶飲料製造残渣（Cai *et al.*¹⁷⁾，2001；額爾敦ら^{35) -37)}，2004，2005，2007)などが広く研究されてきた。りんごジュース粕（逢坂¹³⁰⁾，2001；徐、豊川¹⁸⁴⁾，2005)、ケールジュース残渣（家木ら⁶⁰⁾，2006)、かぼちゃおよびニンジンジュース粕（永西ら³⁴⁾，2004)、だいこん残渣（Okine *et al.*¹²⁸⁾，2007)、および野菜残渣（Cao *et al.*¹⁹⁾，2011)など地域特有の資源についても、飼料としての利用性の研究が行われてきた。

焼酎粕については、1972年のロンドン条約の1996年議定書により2007年から海洋投棄は禁止されている（International Maritime Organization⁶³⁾，2015)。

結果として、焼酎粕のリサイクル工場が建設され、飼料としての利用が増加してきた。2005年には焼酎粕の40%が飼料として使用されていると報告されていたが、2012年には70%まで増加している（林⁵¹⁾，2012)。焼酎粕は、水分を90%程度含むことから（宮崎ら¹⁰³⁾，2008)、貯蔵性が悪い。乾燥はコストが高いことから、乾燥せずに濃縮する方法で飼料として利用することで、大きなコスト削減につながる（宮崎ら¹⁰³⁾，2008)。加えて、濃縮と比較して、乾燥は3～4倍のCO₂を放出する（清水ら¹⁴⁶⁾，2013)。服部ら⁴⁹⁾（2012)は、焼酎粕濃縮液は高エネルギーで、原料が単一の場合、年間を通じて変動が大きいのは乾物率で、含量の多い粗タンパク質（CP）および可溶性無窒素物は変動が少ないことから、原料と乾物率を確認することで飼料成分はほぼ特定できることを報告している。神谷ら⁷¹⁾（2013)は、麦焼酎粕濃縮液の可消化養分総量（TDN）が84.9%であることを報告しており、これらから、焼酎粕濃縮液はエネルギー含量の高い飼料であると考えられる。焼酎粕濃縮液は約70%の水分含量であり、タンクローリーで工場から排出されることから、個々の農家での利用は難しい。それゆえ、最近ではTotal mixed ration（TMR）センターで発酵TMRの原料として利用されている。牛への焼酎粕濃縮液の利用については、それをTMRの原料として混合し、成牛または肥育牛に利用する研究が行われてきた。しかし、黒毛和種仔牛への焼酎粕濃縮液または原料として焼酎粕濃縮液を利用したTMRの給与の影響についてはまだ明らかにされていない。

日本での食用米消費は減少しており、過剰生産に対応するため、また飼料自給率の向上のために、飼料稲の生産が増加している。飼料稲は、茎葉および子実の全てを収穫し、梱包および密封され、稲発酵粗飼料として利用されている。2000年には、飼料稲専用の自走式収穫機が市販され（浦川、吉村¹⁷⁰⁾，2003)、2015年には38200haが生産されており、2000年から37700ha増加している（農林水産省¹²³⁾，2016)。飼料稲のCPおよび代謝エネルギーは乾物あたりそれぞれ、6.0～7.0%および8.3MJkg⁻¹で、これは、刈り取りが遅くなった牧草の乾草又はサイレージと同等である（Shioya、Cai¹⁵⁰⁾，2004)。飼料稲は、TDNを最大にするために黄熟期頃刈り取られる。飼料稲は中空構造であることから、牧草と比較してラッピング後に空気が残りやすく、品質が低下しやすい。稲発酵粗飼料は、乳酸含量および可溶性炭水化物含量が少なく、低品質な飼料であるとされてきた（吉田ら¹⁸⁹⁾，1987；永西，四十万

谷³³⁾, 1998; 蔡ら¹⁶⁾, 2003)。しかし、細断型ロールベアラで調製された稲発酵粗飼料の梱包密度は、飼料稲専用収穫機の約1.5倍であり、細断型ロールベアラを利用することで品質の良いサイレージ調製が可能である(農業・食品産業技術総合研究機構¹¹⁸⁾, 2005)。稲発酵粗飼料はβカロテンおよびαトコフェロール含量が高く(金谷⁷⁴⁾, 2007)、これらは、動物にとって重要な抗酸化物質であり、健康や免疫にとって良い効果をもたらす(Lindqvist *et al.*⁸⁸⁾, 2012)。それゆえ、牛への稲発酵粗飼料の給与は、健康や免疫にとって効果的であると考えられる。黒毛和種の肥育期においては、βカロテンまたはビタミンAの摂取量を制限することで、脂肪交雑を増加させることができる(Oka *et al.*¹²⁵⁾, 1998a)。それゆえ、黒毛和種の肥育期、特に肥育中期においては、飼料中のβカロテンおよびビタミンAは低く維持される。対照的に、黒毛和種の育成期においては、ビタミンAは成長を促進させるため、高く維持することから、育成期の牛への稲発酵粗飼料の給与は効果的であると考えられる。しかし、黒毛和種仔牛への稲発酵粗飼料の給与が成長に及ぼす影響は明らかにされていない。

TMRは、粗飼料、穀物、蛋白質飼料、ミネラル、ビタミン、および飼料添加物など必要な栄養すべてを含んだ単一飼料である(Cao¹⁸⁾, 2009)。発酵TMRは、適度な水分と高い乳酸を含んだ高品質なTMRサイレージである(Cao¹⁸⁾, 2009)。横山ら¹⁸⁸⁾(2009)は、麦焼酎粕濃縮液を混合したTMRサイレージは、乾乳牛の嗜好性に影響を及ぼさず、発酵品質は良好であることを報告している。西村ら¹¹⁴⁾(2013)は、トウモロコシサイレージ又は稲発酵粗飼料とカンショ焼酎粕濃縮液を混合した発酵TMRは良好な品質であることを報告している。また、カンショ焼酎粕濃縮液を原料とした発酵TMRの品質は良好であり(鈴木ら¹⁵⁷⁾, 2010a)、泌乳牛(鈴木ら¹⁵⁷⁾, 2010a)および肥育牛(神谷ら⁷⁰⁾, 2011)では、カンショ焼酎粕濃縮液をTMRの原料として利用可能であることが報告されている。鈴木ら¹⁵⁸⁾(2010b)は、TMR中の大豆粕を米焼酎粕濃縮液で置き換えることが可能であることを報告している。服部ら⁴⁹⁾(2012)は、発酵TMRへの米又は麦焼酎粕濃縮液の混合割合は、発酵品質向上や好気的変敗の生起を考慮すると乾物あたり10-20%の混合が適していると報告している。しかし、Khanら⁷⁶⁾(2014)は、乾物(DM)が35%未満になるように加水すると、TMRの摂取量が減少することを報告しており、水分含量が多い麦焼酎粕濃縮液および稲発酵粗飼料を原料としたTMRの調製

においては、水分含量に注意する必要があると考えられる。

大分県の焼酎の生産量は、2014年は86658klであり、国内生産量の9.8%を占めている(国税庁⁸¹⁾, 2014)。そのため、県内ではリサイクルが進んでいるものの、まだ多くの焼酎粕が産業廃棄物として処理されている。飼料稲の作付面積は、2015年は2208haであり、国内作付面積の5.8%を占めている(農林水産省¹²³⁾, 2016)。大分県は、黒毛和種仔牛を生産する黒毛和種繁殖農家が主体であり、これらの飼料を仔牛生産での利用を増加させることで、仔牛の発育を向上させるとともに、飼料自給率向上につながると考えられる。

本研究では、第一に、麦焼酎粕濃縮液の給与が黒毛和種性雌牛の第一胃発酵および血液代謝に及ぼす影響について検討し、次に、麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、およびこれらを混合した発酵混合飼料の給与が黒毛和種仔牛の成長および成長に関連する要因に及ぼす影響について検討し、これらの飼料が、黒毛和種仔牛の成長に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

1 麦焼酎粕濃縮液の給与が黒毛和種成雌牛の第一胃発酵および血液代謝に及ぼす影響

1 はじめに

反芻動物の第一胃は、反芻動物の生合成プロセスのための発酵最終生産物を生成する上で、重要な役割と機能を有している。第一胃の発達、特に仔牛の第一胃上皮におけるその機能的改善は、栄養の送達、吸収、および代謝において重要な役割を果たし、仔牛の健康および生産物に重要な影響を及ぼす (Bannink *et al.*⁷⁾, 2008; Martens *et al.*⁹⁷⁾, 2012)。第一胃は、健康であり、第一胃のpH、微生物、基質、発酵最終生産、および揮発性脂肪酸 (VFA) とタンパク質の微生物合成に関して良好に機能するために最適な環境を確立することが不可欠である (Wanapat¹⁷⁵⁾, 2000)。

第一胃微生物のタンパク質合成は、NFCなどの分解性炭水化物やタンパク質の供給に大きく依存する (Nocek, Russell¹¹⁷⁾, 1988)。仔牛では、第一胃の物理的な発達は、炭水化物の第一胃での発酵により生成される酪酸の代謝産物である血中 β ヒドロキシ酪酸 (BHBA) の変化と関連する (Quigley *et al.*¹³⁶⁾, 1991)。窒素補給は、低質熱帯性牧草を給与した牛の乾物 (DM) および中性ゲルジェント繊維 (NDF) の消化率を高めることが報告されている (Souza *et al.*¹⁵³⁾, 2010)。焼酎粕濃縮液は、分解性タンパク質 (DIP) やNFCの一つである有機酸含量が高い飼料である (服部⁵⁰⁾, 2010; 林⁵¹⁾, 2012)。これらのことから、麦焼酎粕濃縮液の給与は、第一胃の発達や第一胃における飼料の消化性の向上に良い影響を及ぼすことが示唆される。

しかし、鈴木ら¹⁵⁷⁾ (2010a) は、カンショ焼酎粕濃縮液を泌乳牛に給与しても第一胃発酵に影響しないことを報告している。また、鈴木ら¹⁵⁹⁾ (2011) は、米および麦焼酎粕濃縮液を乾乳牛に給与しても、第一胃発酵に影響しないことを報告している。しかし、これらの報告は、焼酎粕濃縮液をTMRの原料として用いたもののみであり、焼酎粕濃縮液そのものが第一胃の発酵や血液代謝に及ぼす影響は明らかにされていない。

本章では、麦焼酎粕濃縮液の給与が黒毛和種成雌牛の第一胃発酵および血液代謝に及ぼす影響を検討するため、麦焼酎粕濃縮液を乾草と混合して給与し、CP摂取量を同水準として大豆粕および乾草を給与した区および乾草のみを給与した区と比較した。

2 材料および方法

供試牛および給与飼料

供試牛には、黒毛和種非妊娠成雌牛9頭 (平均年齢 \pm 標準誤差:13.7 \pm 2.5、平均体重 \pm 標準誤差:546 \pm 66kg) を用い、個別の牛房で飼養し、1期35日とする3 \times 3ラテン方格法により配置した。飼料は9:00および16:00に半量ずつ給与し、飲水は自由摂取とした。麦焼酎粕濃縮液給与区 (焼酎粕区) は、乾物当たり給与量のうち、麦焼酎粕濃縮液を20%および乾草を80%給与した。大豆粕給与区 (大豆粕区) は、麦焼酎粕濃縮液給与区とタンパク質の摂取量が同等 (14.4%) になるように、乾物当たり給与量のうち、大豆粕を17.2%および乾草を82.8%給与した。乾草給与区 (乾草区) は、乾草のみ給与した。飼料の給与量は、日本飼養標準・肉用牛 (2008年版)¹¹⁹⁾ の乾物の維持要求量に基づき設計し、体重当たり1.22 \sim 1.35%の飼料を給与した。麦焼酎粕濃縮液は、乾草と混合して給与し、大豆粕は乾草にトップドレスして給与した。麦焼酎粕濃縮液は、株式会社三和酒類の拜田グリーンバイオ事業所で製造されたものを用いた。乾草は、畜産研究部で生産されたオーチャードグラス主体の乾草を用いた。飼料の摂取量は、それぞれの期の最後の14日間の摂取量から算出した。

第一胃液および血液採取

第一胃液の採取は、各期の最終日の朝の給与前と、岡本¹²⁷⁾ (1979) の報告に基づき、VFA濃度が最大となる給与3時間後に行った。胃液採取後、速やかにpHメーター (HM-40V; 東亜DKK株式会社) によりpHを測定し、4重ガーゼで残渣を取り除いた。除タンパクのため、残渣を取り除いた上清に5%になるように過塩素酸を加え、攪拌後、10分間、冷却遠心 (1200 \times g, 4 $^{\circ}$ C) した。上清は、分析まで-30 $^{\circ}$ Cで貯蔵した (Hosoda *et al.*⁵⁵⁾, 2012)。血液は、胃液採取前に、ヘパリン入りチューブにより頸静脈から採取した。10分間、冷却遠心 (1500 \times g, 4 $^{\circ}$ C) し、分析まで-80 $^{\circ}$ Cで貯蔵した。

飼料分析

試料は、通風乾燥機 (60 $^{\circ}$ C) で乾燥し、常温で一晩放置後、ウィリー粉砕器 (1mmメッシュ) で粉砕した。DM、CP、粗脂肪 (EE)、粗繊維 (CF)、および粗灰分 (CA) はAOAC⁵⁾ (2000) の方法により分析した。NDFは、耐熱性アミラーゼおよび亜硫酸ナトリウムを用いて分析した (van Soest *et al.*¹⁷²⁾, 1991)。DIPおよび溶解性タンパク質 (SIP) は、Roeら¹⁴⁰⁾ (1991) およびKrishnamoorthyら⁸³⁾ (1982) の方法により分析した。

結合性タンパク質 (UIP) は次の式により計算した。

$$\text{UIP} = \text{CP} - \text{DIP}$$

NFCは、次の式により計算した。

$$\text{NFC} = 100 - \text{CP} - \text{EE} - \text{CA} - \text{NDF}$$

有機酸は高速液体クロマトグラフ (HPLC) により分析した (Wahyono *et al.*¹⁷⁴⁾, 2015)。麦焼酎粕濃縮液は、イオン交換水で希釈後、大豆粕はイオン交換水で抽出後、スルホサリチル酸を2%になるように添加し、除タンパクした。カラムは、Shodex Rspak KC-811 (8mm×300mm, 昭和電工株式会社) を用いた。移動相は3mmol過塩素酸溶液、反応液は0.2mmolプロモチモールブルーおよび8mmolリン酸水素二ナトリウム溶液を用いた。流速は1.0ml/分とし、カラム温度は60°C、検出波長は450nmとした。グリセロールは、有機酸分析と同じサンプルを用いて、HPLCにより分析した (高野ら¹⁶⁵⁾, 2014)。カラムは、Shodex Asahipak NH2P-50 4E (4.6mm×250mm, 昭和電工株式会社) を、ガードカラムは、Shodex Asahipak NH2P-50G 4A guard columnを用いた。検出器は、RI検出器を用いた。溶離液は、アセトニトリル:水 (75:25 v/v) を用いた。流速は1.0ml/分とし、カラム温度は50°Cとした。飼料の成分値は表1に示した。

第一胃液分析

除タンパクした上清を中和するため、水酸化カリウムを添加し、10分間、冷却遠心 (1200×g, 4°C) し

表1 麦焼酎粕濃縮液 (CBDS)、大豆粕、および乾草の飼料成分

		CBDS	Soybean meal	Hay
DM	(% of FM)	29.2	89.7	84.7
CP	(% of DM)	42.5	51.2	7.3
DIP	(% of CP)	98.5	77.2	62.7
SIP	(% of CP)	92.7	17.6	21.9
UIP	(% of CP)	1.5	22.8	37.3
EE	(% of DM)	3.8	0.8	1.9
CF	(% of DM)	1.8	4.9	44.0
CA	(% of DM)	5.1	6.8	6.9
NDF	(% of DM)	4.2	11.3	71.8
NFC	(% of DM)	42.2	28.2	12.2
<i>Organic acid</i>				
Citric acid	(% of DM)	0.78	3.11	-
Tartaric acid	(% of DM)	nd	nd	-
Malic acid	(% of DM)	0.24	0.20	-
Succinic acid	(% of DM)	1.53	nd	-
Lactic acid	(% of DM)	13.93	0.03	-
Formic acid	(% of DM)	nd	0.02	-
Acetic acid	(% of DM)	1.89	0.09	-
Propionic acid	(% of DM)	nd	nd	-
Glycerol	(% of DM)	7.27	0.05	-

た。アンモニア態窒素濃度は、中和した上清を水蒸気蒸留法により分析した。中和した上清にイオン交換樹脂 (Amberlite IR120 Plus (H), MP biomedical) を加えて攪拌後、7700×gで3分間遠心分離した。その上清を孔径0.45μmのフィルターでろ過し、HPLCによりVFAを分析した (Hosoda *et al.*⁵⁶⁾, 2005)。HPLCは有機酸の分析と同様の条件で行った。

血漿分析

βヒドロキシ酪酸 (BHBA) の分析は、β-hydroxybutyrate Ketone Body Assay Kit (Cayman Chemical Co.) を用いて、比色法により行った。尿素態窒素 (BUN)、アンモニア、総タンパク質 (TP)、総コレステロール (Tcho)、およびグルコースは、生化学自動分析装置 (ドライケム、富士フィルム株式会社) を用いて分析した。遊離アミノ酸は、Acquity UPLC® system (Waters Co.) を用いて、AccQ-Tag methodにより分析した。

統計処理

統計処理は、R version 3.1.2 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) により行った。解析は、処理、期、および牛を要因とする多元配置分散分析により行った。処理区間に有意な差があった項目では、処理区間の平均値の差の検定をTukey法の多重比較検定により行った。同じ処理区内の給与前および給与3時間後の平均値の差の検定は、対応のあるt検定により行った。有意水準はP<0.05とした。

3 結果および考察

麦焼酎粕濃縮液の栄養特性と飼料摂取量

麦焼酎粕濃縮液のCP含量は42.5% (乾物中) であり、CP含量が高いが、大豆粕の51.2%と比較すると低いCP含量であった (表1)。麦焼酎粕濃縮液は、CP中のDIPおよびSIP含量、およびNFC含量が大豆粕より高かった (表1)。麦焼酎粕濃縮液および大豆粕の乾物中有機酸の総量 (クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、乳酸、および酢酸) は、それぞれ、18.39%、3.43%であった (表1)。グリセロール含量は、7.27%、0.05%であった。これらの結果から、麦焼酎粕濃縮液は、大豆粕と比較して、第一胃内でのタンパク質やエネルギーの利用性がより高いと考えられる。乾草の摂取量は、焼酎粕区および大豆粕区は乾草区より有意に少なかった (P<0.05、表2)。CPの摂取量は、焼酎粕区および大豆粕区は乾草区より有意に多かった (P<0.05、表2)。NDFの摂取量は焼酎粕区および大豆粕区は乾草区より有意に少なかった (P<0.05、

表2 乾草区 (Hay-t)、大豆粕区 (Soybean-t)、および焼酎粕区 (CBDS-t) における体重、飼料摂取量、および栄養摂取量

	Treatment			SEM	P value
	Hay-t	Soybean-t	CBDS-t		
Body weight(kg)					
Initial	552.8	549.2	546.9	34.27	0.982
Finish	549.8	553.1	551.2	34.08	0.995
Feed intake(DM kg/day)					
Total	6.78	6.93	7.21	0.24	0.200
Hay	6.78 ^a	5.74 ^b	5.77 ^b	0.20	<0.001
CBDS	-	-	1.44	-	-
Soybean meal	-	1.19	-	-	-
Nutrient intake(DM kg/day)					
CP	0.49 ^b	1.03 ^a	1.03 ^a	0.03	<0.001
DIP	0.31 ^c	0.73 ^b	0.87 ^a	0.03	<0.001
NDF	4.87 ^a	4.26 ^b	4.21 ^b	0.05	<0.001
NFC	0.83 ^c	1.04 ^b	1.31 ^a	0.04	<0.001

SEM: 標準誤差. CBDS: 麦焼酎粕濃縮液. ^{a,b,c}; P<0.05.

表2)。NFCの摂取量は、焼酎粕区が最も多く、乾草区が最も少なかった (P<0.05、表2)。乾物摂取量に有意な差は無かった (表2)。牛の体重は処理区間に有意な差は無かった (表2)。この結果から、制限給餌の条件下では、麦焼酎粕濃縮液を20%給与しても、乾物摂取量には影響しないと考えられた。

タンパク質の分解性、第一胃アンモニア態窒素、および血漿代謝の関係

岡本¹²⁷⁾ (1979) は、羊への乾草と麦圧ペンの給与により給与3時間後に第一胃内のVFA濃度は最大に達し、給与12時間後までゆっくりと減少することを報告している。乾草を基礎飼料とした他の研究では、

VFA濃度は給与後1.5~4時間後に最大に達することが報告されている (Sutoh *et al.*¹⁵⁶⁾, 1991; Carro *et al.*²⁰⁾, 2009; Zhang *et al.*¹⁹²⁾, 2012)。第一胃の上皮で酪酸から作られるBHBAは、給与2~4時間後に最も濃度が高くなるとされている (Blum *et al.*¹⁰⁾, 2000; Nikkhah *et al.*¹¹³⁾, 2008)。これらのことから、本研究では、給与前および給与3時間後に第一胃液および血液採取を行った。

第一胃液のpHは処理区間に有意な差はなかった (表3)。給与前のアンモニア態窒素濃度は、大豆粕区が最も高く、乾草区が最も低かった (P<0.05、表3)。給与3時間後のアンモニア態窒素濃度は、焼酎粕区が最も高く、乾草区が最も低かった (P<0.05、表3)。焼酎粕区のアンモニア態窒素濃度は、給与3時間後に増加したが (P<0.05、表3)、大豆粕区および乾草区は給与前後で変化はなかった (表3)。

焼酎粕区と大豆粕区は、CP摂取量に差はないが、DIPの摂取量は焼酎粕区が有意に多かった (P<0.05、表2)。麦焼酎粕濃縮液のCPは、SIPが92.7%であり、第一胃内での溶解性が高い (表1)。それゆえ、麦焼酎粕濃縮液のCPは給与後に第一胃内で急速に分解され、給与後に給与前の2.5倍程度まで上昇したと考えられる (表3)。大豆粕および乾草のタンパク質のin vitro 第一胃液分解パラメーターは、急速に分解される画分 (a画分) は、それぞれ16%および23%、ゆっくりと分解される画分 (b画分) は、それぞれ、82%

表3 乾草区 (Hay-t)、大豆粕区 (Soybean-t)、および焼酎粕区 (CBDS-t) における第一胃内pH、アンモニア態窒素濃度、VFA濃度、およびVFA割合

	Before feeding				3 h after feeding					
	Treatment			SEM	P value	Treatment			SEM	P value
	Hay-t	Soybean-t	CBDS-t			Hay-t	Soybean-t	CBDS-t		
pH	6.77	6.77 ^x	6.87 ^x	0.09	0.515	6.69	6.63 ^y	6.62 ^y	0.07	0.706
Ammonia-N (mg/100ml)	5.86 ^c	14.73 ^a	8.85 ^{by}	0.69	<0.001	5.41 ^c	14.36 ^b	22.40 ^{ax}	1.61	<0.001
VFA concentration(mmol/100ml)										
Acetate	6.63 ^{ab}	7.18 ^a	6.17 ^{by}	0.26	0.003	6.78	6.75	6.56 ^x	0.29	0.659
Propionate	1.39 ^{aby}	1.54 ^a	1.32 ^{by}	0.07	0.013	1.66 ^{bx}	1.62 ^b	1.95 ^{ax}	0.08	0.001
Iso-Butyrate	0.12	0.18	0.17	0.03	0.090	0.14	0.16	0.17	0.02	0.430
Butyrate	0.74 ^{aby}	0.84 ^{ay}	0.71 ^{by}	0.04	0.029	0.90 ^{bx}	0.98 ^{bx}	1.21 ^{ax}	0.07	<0.001
Iso-Valerate	0.09 ^{bx}	0.17 ^{ax}	0.12 ^{by}	0.01	<0.001	0.07 ^{by}	0.13 ^{ay}	0.17 ^{ax}	0.02	<0.001
Valerate	0.04 ^y	0.06	0.05 ^y	0.01	0.158	0.07 ^{bx}	0.08 ^b	0.21 ^{ax}	0.02	<0.001
Total	9.01 ^{by}	9.96 ^a	8.55 ^{by}	0.37	0.003	9.62 ^x	9.71	10.26 ^x	0.4	0.195
VFA composition(% mol)										
Acetate	73.60 ^{ax}	72.10 ^{bx}	72.10 ^{bx}	0.50	0.008	70.40 ^{ay}	69.50 ^{ay}	63.90 ^{by}	0.64	<0.001
Propionate	15.38 ^y	15.44 ^y	15.44 ^y	0.33	0.974	17.20 ^{bx}	16.70 ^{bx}	19.00 ^{ax}	0.52	<0.001
Iso-Butyrate	1.39	1.78	2.03 ^x	0.30	0.078	1.50	1.61	1.62 ^y	0.23	0.775
Butyrate	8.19 ^y	8.39 ^y	8.32 ^y	0.35	0.864	9.40 ^{bx}	10.10 ^{bx}	11.80 ^{ax}	0.43	<0.001
Iso-Valerate	1.00 ^{bx}	1.70 ^{ax}	1.40 ^{aby}	0.14	<0.001	0.70 ^{by}	1.30 ^{ay}	1.60 ^{ax}	0.13	<0.001
Valerate	0.42 ^y	0.64	0.63 ^y	0.15	0.183	0.70 ^{bx}	0.80 ^b	2.10 ^{ax}	0.16	<0.001

SEM: 標準誤差. ^{a,b,c}; P<0.05 (同一採取時間における同列). ^{x,y}; P<0.05 (同一処理区間における同列). Ammonia-N: アンモニア態窒素.

表4 乾草区 (Hay-t)、大豆粕区 (Soybean-t)、および焼酎粕区 (CBDS-t) における血漿成分濃度

	Before feeding					3 h after feeding				
	Treatment			SEM	P value	Treatment			SEM	P value
	Hay-t	Soybean-t	CBDS-t			Hay-t	Soybean-t	CBDS-t		
BHBA($\mu\text{mol/l}$)	225.2	182.4 ^y	212.7 ^y	35.10	0.412	282.6 ^b	285.1 ^{bx}	405.1 ^{ax}	36.95	0.009
BUN(mg/dl)	9.0 ^{by}	14.0 ^{ay}	15.0 ^{ay}	2.00	<0.001	10.8 ^{bx}	15.4 ^{ax}	17.1 ^{ax}	2.00	<0.001
ammonia($\mu\text{g/dl}$)	59.6	69.0	71.0	6.12	0.058	63.6	73.2	77.6	5.85	0.047
TP(mg/dl)	7.5 ^y	8.1 ^y	7.9 ^y	0.49	0.413	8.1 ^x	8.6 ^x	8.4 ^x	0.44	0.611
Tcho(mg/dl)	46.9 ^y	46.3 ^y	54.2 ^y	5.23	0.101	54.8 ^x	52.2 ^x	56.6 ^x	5.75	0.504
Glucose(mg/dl)	68.0	69.1	72.1 ^x	1.89	0.136	68.4	69.2	65.3 ^y	2.19	0.202

SEM: 標準誤差. ^{a,b,c}: $P < 0.05$ (同一採取時間における同列). ^{x,y}: $P < 0.05$ (同一処理区間における同列).

および58%、およびb画分の消失速度定数 (c画分) は、9%/hおよび5%/hである (日本標準飼料成分表 (2009年版)¹²⁰⁾). このことから、大豆粕および乾草は、a画分が少なく、CPの第一胃内での分解が緩やかであることから、大豆粕区および乾草区のアンモニア態窒素濃度のピークは、焼酎粕区より低く、給与前後で濃度に差がなかったと考えられた。

給与前および3時間後の血漿BUN濃度は、焼酎粕区および大豆粕区が乾草区より有意に高かったが ($P < 0.05$ 、表4)、焼酎粕区と大豆粕区に有意な差はなかった (表4)。血漿BUN濃度は、すべての処理区で給与前より給与3時間後が有意に高かった ($P < 0.05$ 、表4)。血漿アンモニア濃度は、処理区間に有意な差はなかった。(表4)。

BUN濃度は、第一胃内のアンモニア態窒素濃度と高い相関がある (Wanapat *et al.*¹⁷⁶⁾, 2008)。さらに、BUN濃度は、第一胃内の発酵での窒素損失を反映している (Xin *et al.*¹⁸³⁾, 2010)。これらのことから、焼酎粕区は第一胃内アンモニア態窒素濃度が大豆粕区より高いが ($P < 0.05$ 、表3)、BUN濃度は大豆粕区と差がなく (表4)、窒素損失は焼酎粕区と大豆粕区に差はなかったと考えられる。すべての処理区で、給与前後でBUN濃度が高くなったが ($P < 0.05$ 、表4)、大豆粕区と乾草区は、第一胃内のアンモニア態窒素濃度は給与前後で差がなかった (表3)。BUN濃度のピークは、第一胃内のアンモニア態窒素濃度のピークより1~2時間後に来るとされている (Sutoh *et al.*¹⁵⁶⁾, 1991; Cherdthong *et al.*²²⁾, 2011)。それゆえ、第一胃内のアンモニア態窒素濃度のピークは給与3時間後より前に来ていたのかもしれない。これらのことから、麦焼酎粕濃縮液と大豆粕は、第一胃内でのCPの分解性が異なり、第一胃内のアンモニア態窒素濃度の生成は異なるが、血漿中のBUNおよびアンモニア濃度に影響しないと考えられた。

第一胃内VFA濃度

給与前の総VFA濃度は、焼酎粕区は大豆粕区より有意に低かったが ($P < 0.05$)、給与3時間後は有意な差はなかった (表3)。給与前の酢酸濃度は、焼酎粕区は大豆粕区より有意に低かったが ($P < 0.05$)、給与3時間後は有意な差はなかった (表3)。乾草区の総VFAおよび酢酸濃度は、焼酎粕区および大豆粕区と有意な差はなかった (表3)。対照的に、給与前のプロピオン酸および酪酸濃度は、焼酎粕区は大豆粕区より有意に低かったが ($P < 0.05$)、給与3時間後は、焼酎粕区が大豆粕区より有意に高かった ($P < 0.05$ 、表3)。これらの結果から、麦焼酎粕濃縮液は給与後に第一胃内で急速に分解され、プロピオン酸および酪酸が増加するが、VFAの生成は、大豆粕と比較して長く続かないと考えられた。給与前の第一胃内の酢酸、プロピオン酸、および酪酸の割合 (% mol) は焼酎粕区と大豆粕区の間有意な差はなかったが (表3)、給与3時間後は酢酸の割合は、焼酎粕区が大豆粕区より有意に低く ($P < 0.05$ 、表3)、プロピオン酸および酪酸の割合は、焼酎粕区が大豆粕区より有意に高かった ($P < 0.05$ 、表3)。これらの結果から、麦焼酎粕濃縮液の給与は、大豆粕と比較して、給与後に急激に第一胃内のVFAの生成割合を変化させると考えられた。

NFCの構成、タンパク質の分解性、およびVFA濃度の関係

NFCの摂取量は、焼酎粕区で最も高く、乾草区で最も低かった ($P < 0.05$ 、表2)。NFCはデンプン、糖、水溶性繊維、および有機酸で構成される。反芻動物は、濃厚飼料やデンプンを多量に含む飼料を摂取すると、総VFA濃度が上昇する (Ørskov¹²⁹⁾, 1986; Marshall *et al.*⁹⁶⁾, 1992)。服部ら⁵⁰⁾ (2010) は、麦焼酎粕濃縮液の単糖類および二糖類含量は9% (乾物中) で、その構成は、アラビノース (7.4%)、キシロース (1.2%)、シュクロース (0.2%)、およびグルコース (0.2%) であることを報告している。焼酎の製造工程

ではデンプンが麹菌によって糖化されることから、焼酎粕のデンプン含量は低いと考えられる。大豆粕もデンプン含量は低い (Sniffen *et al.*¹⁵²⁾, 1992)。大豆粕の二糖類およびオリゴ糖は、シュクロース (6.8~8.7%)、スタキオース (5.3~5.9%)、およびラフィノース (0.6~1.2%) である (van Kempen *et al.*¹⁷¹⁾, 2006)。これらのことから、焼酎粕は有機酸およびグリセロール含量は高いが、糖含量は大豆粕よりも低いと考えられる。

給与前のプロピオン酸および酪酸濃度は焼酎粕区と乾草区間に有意な差はなかったが、給与3時間後は、焼酎粕区が有意に高かった ($P<0.05$ 、表3)。しかし、大豆粕区は乾草区よりNFC摂取量は多かったが ($P<0.05$ 、表2)、給与前および給与3時間後のいずれも、プロピオン酸および酪酸濃度は、大豆粕区と乾草区間に有意な差はなかった (表3)。給与前のプロピオン酸および酪酸の割合 (% mol) は処理区間に有意な差はなかったが (表3)、給与3時間後は、焼酎粕区が大豆粕区および乾草区より有意に高かった ($P<0.05$ 、表3)。麦焼酎粕濃縮液は、大豆粕と比較して、乳酸含量は多いが、クエン酸含量は少ない (表1)。乳酸の第一胃への注入により、プロピオン酸および酪酸濃度は増加し、酢酸濃度は減少することが報告されている (寺島ら¹⁶⁷⁾, 1976)。グリセロールの給与も、第一胃内の総VFA、プロピオン酸、および酪酸濃度を増加させることが報告されている (Wang *et al.*¹⁷⁸⁾, 2009b)。これらのことから、麦焼酎粕濃縮液に含まれる乳酸およびグリセロールが第一胃内のプロピオン酸および酪酸を増加させたと考えられた。クエン酸の給与量を増加させると、直線的に第一胃内の酢酸濃度が増加するが、プロピオン酸および酪酸濃度には影響しないことが報告されている (Wang *et al.*¹⁷⁷⁾, 2009a)。本研究では、大豆粕からのクエン酸の給与量はWangら¹⁷⁷⁾ (2009a) の報告のクエン酸の供給量よりも少なかった。そのため、大豆粕区では、酢酸濃度は増加しなかったと考えられた。

大豆粕区の総VFA濃度は給与前後で差がなかった (表3)。本研究で用いた乾草のNDF含量は71.8% (乾物中) と高く、乾草の消化性は低かったと考えられる。窒素の供給は、低質熱帯性牧草の乾物およびNDFの消化性を増加させることが示されている (Souza *et al.*¹⁵³⁾, 2010)。NDFの分解性に対する窒素供給の効果は、繊維性微生物の成長のために利用できる窒素化合物が増加する状況に、第一胃が改善されるためであるとされている (Detmann *et al.*³²⁾, 2009)。給与前の

大豆粕区の第一胃内のアンモニア態窒素濃度は、焼酎粕区および乾草区より有意に高かった ($P<0.05$ 、表3)。そのため、大豆粕区は、給与前は焼酎粕区および乾草区より微生物活性が高く、総VFA濃度も有意に高かったと考えられた (表3)。一方で、焼酎粕区は、給与前より給与3時間後に第一胃内アンモニア態窒素濃度は有意に高かったことから ($P<0.05$ 、表3)、給与3時間後のNDFの消化性は高く、給与前より給与3時間後の酢酸濃度が高かったと考えられた (表3)。これらのことから、乳酸およびグリセロール含量だけでなく、第一胃内でのCPの分解性の違いも、麦焼酎粕濃縮液と大豆粕の第一胃内でのVFA生成の違いをもたらしていると考えられた。

第一胃内VFA濃度、血漿中BHBAおよびグルコース濃度の関係

給与前の血漿中BHBA濃度は、処理区間に有意な差はなかった (表4)。給与3時間後は、焼酎粕区が大豆粕区および乾草区より有意に高かった ($P<0.05$ 、表4)。第一胃内でのVFA生成量の増加は、第一胃の上皮細胞の増殖を促進させ、酪酸の生成が急速に増加すると、第一胃上皮細胞の増殖が加速する (Sakata, Tamate¹⁴²⁾, 1978)。第一胃の乳頭の成長もプロピオン酸および酪酸の投与により刺激されることが示されている (Tamate *et al.*¹⁶⁶⁾, 1962)。血漿BHBAは、第一胃上皮代謝活性の指標であり、第一胃壁を通過する際に酪酸から産生される (Lane *et al.*⁸⁵⁾, 2000)。Weigandら¹⁸⁰⁾ (1975) は、第一胃乳頭に吸収された酪酸の26~33%がBHBAに変換されることを報告している。これらのことから、麦焼酎粕濃縮液の給与による第一胃内の酪酸濃度の急速な増加は、第一胃上皮の代謝を活性化し、BHBA濃度を増加させたと考えられた。Weigandら¹⁸⁰⁾ (1975) は、第一胃乳頭に吸収された吉草酸の18~24%がBHBAに変換されることも報告している。本研究では、給与前は吉草酸濃度に有意な差はないが、給与3時間後は、焼酎粕区が大豆粕区および乾草区より有意に高かった ($P<0.05$ 、表3)。このことから、麦焼酎粕濃縮液給与による吉草酸の増加も、血漿BHBA増加に影響していることが示唆された。

血漿中のTPおよびTcho濃度は、処理区間に有意な差はなかった (表4)。グルコース濃度も処理区間に有意な差はなかった (表4)。Sutohら¹⁵⁶⁾ (1991) は、第一胃内又は血中プロピオン酸濃度は血漿中のグルコース濃度と直接的な関連はないことを報告しており、本研究でも同様の結果であった。酪酸は、肝臓でのプロピオン酸の利用を抑制し、牛、羊、および山羊の肝

細胞におけるグルコースへの変換を抑制するとされている (Aiello *et al.*¹⁾, 1989)。一方で、酪酸は肝臓でのプロピオン酸の利用を抑制するが、抑制を引き起こすには、生理学的量以上の酪酸が必要であるとされている (Krehbiel *et al.*⁸²⁾, 1992)。また、ラクトースの給与量の増加により、第一胃内の酪酸および血漿中BHBA濃度が増加し、血漿中グルコース濃度が減少するが、血漿中グルコースおよびHBA濃度の変化はそれほど大きくなかったことが示されている (Defrain *et*

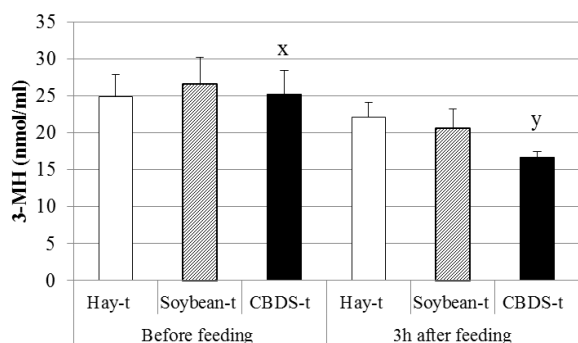


図1 乾草区 (Hay-t)、大豆粕区 (Soybean-t)、および焼酎粕区 (CBDS-t) における血漿3-MH (メチルヒスチジン) 濃度
^{x,y}; $P < 0.05$. バーは標準誤差.

*al.*³¹⁾, 2004)。これらのことから、本研究における第一胃内の酪酸の生成量は血漿グルコース濃度に影響する量ではなかったと考えられた。しかし、焼酎粕区の給与3時間後の血漿中グルコース濃度は、給与前より有意に低かった ($P < 0.05$, 表4)。急速な第一胃内の酪酸および血漿中BHBAの増加が、一時的に肝臓でのプ

ロピオン酸の利用とグルコースへの変換を抑制しているのかもしれない。

血漿中遊離アミノ酸濃度

血漿3メチルヒスチジン (3MH) 濃度は、処理区間に有意な差はなかった (図1)。しかし、焼酎粕区の給与3時間後の3MH濃度は給与前より有意に低かった ($P < 0.05$, 図1)。3MHは、主に筋原繊維タンパク質、ミオシンおよびアクチンに局在しており、定量的に尿中に排泄されるので、筋原繊維タンパク質分解の指標として使用される (Young, Munro¹⁹⁰⁾, 1978)。また、血漿3MHは、筋原繊維タンパク質分解の指標である (Nagasawa *et al.*¹¹⁰⁾, 1996)。ブロイラーでは、焼酎粕のヘキササン抽出物により血漿3MHは減少し、筋タンパク質分解が減少することが明らかとなっている (Kamizono *et al.*⁷²⁾, 2010)。Nagasawaら¹¹¹⁾ (2002) は、ロイシンがタンパク質食餌の再摂取後の筋原繊維タンパク質分解の調節因子の1つであり、筋原繊維タンパク質分解は、ロイシン単独の経口投与によって抑制され、ロイシン投与の2~4時間後まで応答が維持されたことを報告している。これらのことから、3MHの減少は、麦焼酎粕濃縮液の給与が、筋肉タンパク質分解を抑制する可能性があることが示唆された。

血漿中アミノ酸濃度は、処理区間に有意な差はなかった (表5)。しかし、焼酎粕区では、多くのアミノ酸が給与前と比較して、給与3時間後に有意に減少した ($P < 0.05$, 表5)。血漿中分枝鎖アミノ酸 (BCAA) 濃度は、それらの出現速度と消失速度との

表5 乾草区 (Hay-t)、大豆粕区 (Soybean-t)、および焼酎粕区 (CBDS-t) における血漿アミノ酸濃度

	Before feeding				3 h after feeding					
	Treatment			SEM	P value	Treatment			SEM	P value
	Hay-t	Soybean-t	CBDS-t			Hay-t	Soybean-t	CBDS-t		
Essential amino acid (nmol/ml)										
Arginine	89.5	93.1	93.8	13.2	0.407	81.8	90.8	82.2	8.5	0.783
Histidine	48.5	54.7	48.3	3.0	0.157	48.8	50.9	45.7	6.2	0.979
Isoleucine	89.3	92.3	92.5 x	10.4	0.558	74.8	88.7	73.5 y	8.4	0.689
Leucine	115.3	121.4	115.1 x	13.5	0.392	95.7	115.2	86.8 y	11.2	0.249
Lysine	91.2	87.2	98.2 x	10.9	0.632	74.9	87.0	76.7 y	8.1	0.857
Methionine	19.0	18.6	19.1 x	3.1	0.850	17.0	18.1	16.1 y	2.0	0.815
Phenylalanine	49.3	47.2	47.1 x	7.1	0.832	43.8	42.6	37.0 y	4.6	0.320
Threonine	66.8	58.7	65.0 x	10.6	0.867	57.6	56.3	52.1 y	7.3	0.957
Tryptophan	2.5	2.3	2.0	0.7	0.911	2.1	2.1	2.0	0.7	0.633
Valine	197.8	219.4	208.7 x	23.2	0.287	174.3	220.9	182.8 y	21.6	0.431
Non-essential amino acid (nmol/ml)										
Alanine	241.0	195.6	243.2 x	23.0	0.320	207.2	198.1	189.9 y	21.5	0.477
Aspartic acid	21.1	14.9	14.7	5.0	0.711	17.8	13.4	11.2	4.4	0.589
Asparagine	28.2	26.4	27.0 x	4.7	0.720	23.5	23.1	19.2 y	3.1	0.586
Glutamic acid	126.6	102.0	111.3 y	23.0	0.462	122.0	127.1	132.7 x	24.0	0.648
Glycine	242.2	158.7	214.8 x	46.0	0.801	188.7	157.6	141.8 y	32.7	0.526
Proline	63.7	57.4	61.2 x	7.5	0.978	55.7	56.4	51.3 y	4.7	0.873
Serine	115.5	75.5	96.0 x	23.9	0.705	95.9	71.0	69.6 y	19.8	0.499
Tyrosine	50.2	46.7	44.8 x	9.8	0.814	39.8	39.2	37.6 y	5.3	0.840

SEM: 標準誤差. ^{x,y}; $P < 0.05$.

間のバランスを表すとされている (Lynch *et al.*⁹²⁾, 2015)。また、BCAA出現率に影響を及ぼす因子には、食物摂取およびタンパク質分解に起因する組織におけるタンパク質分解が含まれるとされている (Lynch, Adams⁹¹⁾, 2014)。これらのことから、筋肉タンパク質分解が抑制により、血中への放出量が減少し、麦焼酎粕濃縮液の給与が血漿中イソロイシン、ロイシン、およびバリン濃度を減少させたことを示唆された。Swanepoelら¹⁶⁰⁾ (2015) は、アミノ酸は、個別にはではなく、全体として考慮すべき生物活性分子であり、それらの間の拮抗作用および相互作用も考慮すべきであるとしている。また、Swanepoelら¹⁶¹⁾ (2016) は、泌乳初期のホルスタイン牛では、他のアミノ酸との最も多くの相互作用に關与する血漿アミノ酸は、イソロイシン、ロイシン、バリン、メチオニン、およびフェニルアラニンであることを報告している。このことから、他の血漿アミノ酸の変化がBCAAの減少に關与したことが示唆された。焼酎粕区では、給与3時間後の血漿中グルタミン酸濃度は、給与前よりも有意に高かった ($P<0.05$, 表5)。グルタミン酸は、アンモニア代謝に關与する主要な代謝産物の1つである (Sutiak *et al.*¹⁵⁵⁾, 1999)。したがって、焼酎粕区における高い第一胃内アンモニア態窒素濃度が、グルタミン酸濃度を増加させたことが示唆された。

結論

NCF、特に乳酸およびグリセロール含量が高い麦焼酎粕濃縮液の給与は、第一胃内のプロピオン酸、酪酸、および吉草酸を増加させ、その結果、麦焼酎粕濃縮液の給与により、大豆粕の給与よりも血漿BHBA濃度が増加した。また、血漿中3MH濃度は、麦焼酎粕濃縮液の給与により、減少した。まとめると、麦焼酎粕濃縮液の給与が第一胃発酵および酪酸代謝を促進し、第一胃の発達を促進するとともに、黒毛和種成雌牛の筋タンパク質分解を抑制させることが示唆された。

II 黒毛和種仔牛の成長に及ぼす麦焼酎粕濃縮液給与の影響

II-1 黒毛和種仔牛の成長、第一胃発達、および筋肉発達に及ぼす麦焼酎粕濃縮液の影響

1 はじめに

Iの結果から、麦焼酎粕濃縮液の給与は、黒毛和種成雌牛の第一胃発酵および酪酸代謝を促進することが示された。仔牛の第一胃の発達、特に第一胃上皮の機能的向上は、栄養の送達、吸収、および代謝において重要な役割を果たし、仔牛の健康および将来の生産物の成績に重要な影響を及ぼすとされている (Bannink *et al.*⁷⁾, 2008; Martens *et al.*⁹⁷⁾, 2012)。酪酸、および、それほどではないが、プロピオン酸も、第一胃上皮においてエネルギー源として使用され、上皮発達に大きな影響を及ぼす (Tamate *et al.*¹⁶⁶⁾, 1962)。血漿BHBAは、第一胃上皮代謝活性の指標であり、第一胃壁を通過する際に酪酸から産生される (Lane *et al.*⁸⁵⁾, 2000)。大麦およびエン麦を給与した仔牛と比較して、トウモロコシおよび小麦を給与した仔牛では、血中グルコース濃度がより低く、血中尿素窒素 (BUN) がより多く、血中BHBA濃度がより高いことが、飼料摂取量を増加させ、第一胃の発酵を良好にし、さらに最終生産物の成績に影響を及ぼすことが報告されている (Khan *et al.*^{77), 78)}, 2007, 2008)。また、牛では、BHBAの筋肉での利用率が、人間やラットよりも高いとされている (Hocquette *et al.*⁵⁴⁾, 1998)。それゆえ、仔牛への麦焼酎粕濃縮液の給与は、成長を促進させる可能性がある。

黒毛和種は成長に伴い、II B型 (fast-twitch glycolytic) およびII A型 (fast-twitch oxidoglycolytic) 筋線維が減少し、I型 (slow-twitch oxidative) が増加するとされている (Gotoh⁴⁵⁾, 2003)。一方で、発育の向上と筋肉の発達には密接な関連がある。筋肉は、筋肉の代謝がより解糖系であり、酸化代謝がより少ない代謝において、より発達する (Hocquette *et al.*⁵⁴⁾, 1998)。BHBAは、タンパク質合成を促進することが報告されており (Nair *et al.*¹¹²⁾, 1988)、また、マウスの酸化的筋肉において、インスリンが媒介するグルコース移送を抑制することが報告されている (Yamada *et al.*¹⁸⁵⁾, 2010)。これらのことから、麦焼酎粕濃縮液の仔牛への給与は、筋肉の発達、筋線維型、および筋線維の代謝に影響する可

能性がある。

II-1では、黒毛和種仔牛の成長、第一胃発達、血液代謝、および骨格筋の組織化学的性質および代謝に関連する遺伝子の発現に及ぼす麦焼酎粕濃縮液の影響について検討した。

2 材料および方法

試験区および給与飼料

24頭の黒毛和種雄仔牛を4つの処理区に分け、3から9ヵ月齢まで試験に用いた。各試験区に3頭ずつの2セットの計6頭を配置した。1つのセットを一つの牛房で飼養し、飼料は9:00および16:00に半量ずつ給与し、飲水は自由摂取とした。すべての仔牛に、配合飼料 (TDN77.6%、CP19.8% (乾物中)) とオーチャードグラス主体の乾草を給与した。配合飼料と乾草は、別々に給与し、配合飼料は開始時体重当たり2%から終了時1.4%まで漸減して給与し、乾草は飽食とした。すべての仔牛を5ヵ月齢頃に去勢した。実験区は乾草に麦焼酎粕濃縮液を混合して給与し、1つの処理区では、乾草に乾物当たり5% (5%焼酎粕区)、もう一つの処理区では、乾物当たり15% (15%焼酎粕区) 混合して給与した。対照区は、実験区とCPおよびNFCの摂取量が同等になるように、配合飼料に大豆粕およびトウモロコシ圧パンを混合して給与し、5%焼酎粕区の対照区 (5%対照区) および15%焼酎粕区の対照区 (15%対照区) を配置した。

飼料分析

β カロテンは、HPLCにより分析した (自給飼料利用研究会⁶⁶⁾, 2009)。飼料2gを共栓付フラスコにとり、ヘキサン:アセトン:エタノール:トルエン (10:7:6:7) 溶液30mlを加え、1分間混合した。10%ピロガロール溶液1mlおよび40%水酸化カリウム溶液2mlを加えて攪拌後、窒素ガスでフラスコ内の空気を置換して、16時間暗所に放置した。ヘキサン30mlで3回抽出後、ロータリーエバポレーターを用いて、減圧下でヘキサンを留去した。残留物をエタノール5mlで溶解し、HPLC注入用試料とした。カラムは、X Bridge C18 column (4.6×150mm) (Waters Co, USA) を用いた。移動相は、エタノール:水 (98:2)、流速は2.0ml/分、波長は453nmとした。その他の分析は、Iで述べた方法で行った。

第一胃液分析

胃液は、4、6、および9ヵ月齢に朝給餌4時間後に採取した。処理および分析方法はIで述べた方法で行った。

表6 麦焼酎粕濃縮液 (CBDS)、大豆粕およびトウモロコシ圧ペン、および乾草の飼料成分

		CBDS	Soybean meal and corn	Hay
DM	(% of FM)	26.2	87.7	85.7
CP	(% of DM)	46.7	43.7	7.9
DIP	(% of CP)	98.4	78.9	63.4
SIP	(% of CP)	92.5	19.4	25.0
UIP	(% of CP)	1.6	21.1	36.6
EE	(% of DM)	3.8	2.1	2.2
CF	(% of DM)	1.8	5.0	33.7
CA	(% of DM)	5.1	12.5	5.4
NDF	(% of DM)	4.2	12.5	66.9
NFC	(% of DM)	40.1	37.2	17.6
β -carotene	(% of DM)	-	-	5.6

血漿分析

血液は3、6、および9ヵ月齢に頸静脈から採取した。GOT、GGT、BUN、Tcho、およびグルコースは、生化学自動分析装置（ドライケム、富士フィルム株式会社）を用いて分析した。遊離脂肪酸は、NEFA Cテストワコー（和光純薬工業株式会社、大阪）を用いて分析した。IGF-1の分析は、リンテック株式会社（福岡）に委託した。乳酸はHPLCにより分析した（Tabaru *et al.*, 1988）。血漿に等量のメタノールを加え攪拌し、10分間に室温に放置後、15分間遠心分離（1500×g）した。HPLCは飼料の有機酸含量の測定と同様の条件で行った。その他の分析は、Iで述べた方法で行った。

酵素組織化学的解析および遺伝子発現解析用微量組織採取

組織採取は、3、6および9ヵ月齢に行った。まず、0.3mg/100kg全身麻酔および5mlの局所麻酔の筋肉内注射により麻酔した。胸最長筋の微量組織（2mm×2mm×80mm）はニードルバイオプシーを用いて第12胸椎に相当する場所から採取した（図2）。肝臓微量

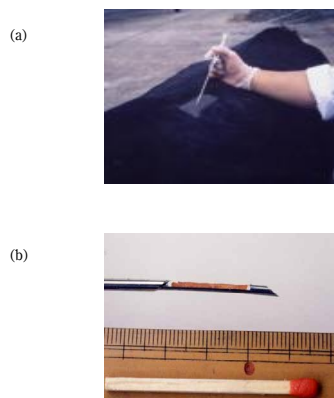


図2 バイオプシーおよび微量組織検体
(a) ニードルバイオプシー
(b) 微量組織検体（長さ15-20mm，幅2mm）

組織（2mm×2mm×40mm）は第10胸椎に相当する場所から採取した。遺伝子発現解析のための試料は、採取後速やかに液体窒素で凍結した。組織化学的解析用の試料は、Tissue Tek O.C.T. compound（サクラファインテックジャパン株式会社）を加えた後、液体窒素で凍結した。試料は、解析まで-80℃で貯蔵した。

酵素組織化学的解析

筋線維型構成（I型、II A型、およびII B型）の同定および筋線維直径の測定を目的として、クリオスタット（CM 1850, Leica）を用いて厚さ8 μ mの連続凍結切片を作製し、30分間風乾した後、以下の2種類の染色を施した。筋線維内のミオシンATPase活性の検出は、pH4.2の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液で5分間の酸性前処理した後、0.1Mバルビタールナトリウム溶液および0.18M塩化カルシウム溶液にATPを基質として加えた反応液（pH9.4）に45分間浸漬させて行った。これらの処理はすべて21℃で行った。その後、1%塩化カルシウムで3回洗い、蒸留水により水洗した。次に、0.05%バルビタールナトリウム溶液に2分間浸漬させ、蒸留水で水洗後、2%塩化コバルト溶液により5分間処理した。蒸留水で水洗した後、1%硫化アンモニウム溶液で2-3分間発色させ、蒸留水で水洗した後、水溶性封入剤で封入した（Brooke, Kaiser¹³⁾, 1969）。また、筋線維内のNADH 脱水素酵素活性はpH7.4の0.2Mリン酸緩衝液に還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドおよびニトロブルーテトラゾリウム塩を溶かした反応液に30℃で20分間浸漬し、検出した。その後水洗し、pH4.3の酢酸緩衝液に5分間浸漬し、さらに水洗した後、水溶性封入剤で封入した。ミオシンATPase活性およびNADH脱水素酵素活性の反応の特異性に基つき、筋線維をI型、II A型、およびII B型の3つの筋線維型に分類した後（Brooke, Kaiser^{14), 15)}, 1970a, b)、各型筋線維の直径の測定をそれぞれ行った。筋線維型の判別と筋線維直径の計測は、250倍の顕微鏡写真を撮影して行った。筋線維型は、個体ごとに筋線維300個以上を目安として判別し、その割合を求めた。筋線維の直径は筋線維が斜断されると楕円形あるいは長多角形の断面が得られ、その長軸は凍結切片作成時の影響を受けやすいため、長軸に対して垂直に交わる短軸のうち最大のものをその筋線維の直径とした。各筋線維型が占める相対的面積は次の式により求めた（Ozawa *et al.*¹³¹⁾, 2000）。

相対的面積= $S_x \times P_x / S_t$ (S_x は、x型筋線維の平均断面積。 P_x はx型筋線維の割合。 S_t はすべての筋線維の平均断面積。平均断面積は筋線維の直径から計算。

表7 プライマー配列

Gene of interest	Gene symbol	Accession No.	Sense	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
Citrate synthase	CS	NM_001044721.1	F	TTAATAGGCCAGCAAACAGGAC	140
			R	GGCCACAGCATCACCAATAG	
Carnitine palmitoyltransferase 1b	CPT-1b	NM_001034349.2	F	ATCCGTATGTTTCGACCCAAACAA	107
			R	TCACCCGCGATCATGTAGGA	
Uncoupling protein 3	UCP3	NM_174210.1	F	TTCAGGCCAGCATGCACAC	170
			R	GTCATAGGTCACCATCTCACCACAG	
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC1-α)	PPARδ	NM_177945.3	F	AACTTGTTCACAGGTCCTGCGTGA	109
			R	TTAGTTTGGCGTCCACACAGAGTTA	
Peroxisome proliferator-activated receptor delta	PPARδ	NM_001083636.1	F	TTGTGTCACTCACCAGCAGCTT	128
			R	AGGCCAGCGCGCTTAGTGTT	
Glucose transporter 4	GLUT4	NM_174604.1	F	GCTTCCAACAGATCGGCTCTG	174
			R	CCAGCCAGGTCCTATTGTAGC	
Glucose transporter 1	GLUT1	NM_174602.2	F	GTATGTGGAGCAACTGTGC	134
			R	AGCCAGAAGCAATCTCATC	
Hexokinase 1	HK1	NM_001012668.1	F	GGCGGTAACGTAGGTTACAA	150
			R	GAAACGGACGCCACTAAACTTCA	
Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4	PDK4	NM_001101883.1	F	GGGTGCTCTCATTCTAAATTTGTTG	125
			R	AATGTGCTAGACTGCCCTGTCC	
Cluster of differentiation 36	CD36	NM_001278621.1	F	CTACAGATGTGGCTTGAGCGTGA	116
			R	CAGGGTCCAGGATTTGTGTAGAATG	
phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	PCK1	NM_174737.2	F	GTGGCCAGAATTGAAAGCAAGC	181
			R	TGAACGGGATGACATACATGGTG	
Ribosomal protein S18	RPS18	NM_001033614.2	F	AGATATGCTCATGTGGTGTGAGGA	111
			R	GCGTGGATTCTGCATAATGGTG	

F: forward primer; R: reverse primer

RNA単離、cDNA合成、および定量的リアルタイムPCR

筋肉および肝臓の微量組織から、ISOGEN（ニッポン・ジーン株式会社）、クロロフォルム、およびイソプロパノールを用いて、totalRNAを抽出した。抽出後、混入したDNAを除去するため、DNase I 処理を行い、処理後、酢酸ナトリウムおよびエタノールを用いて、DNase I を除去した。total RNAを定量するため、カルキュレーター（Amersham GeneQuant RNA/DNA Calculator, England）を用いて、吸光度を測定した。260/280吸光度比を用いてRNA純度を算出し、比は1.80~2.00であることを確認した。cDNAは、Super-Script VIL0 Master Mix（ライフテクノロジー・ジャパン株式会社）を用いて、1.5μgのtotal RNAから合成した。リアルタイムPCRは、StepOne Plus Real-Time PCR System（ライフテクノロジー・ジャパン株式会社）により行った。1 μlのcDNAに各プライマー10 μM およびPower SYBR® Green PCR Master Mix（ライフテクノロジー・ジャパン株式会社）5 μlを加え、10 μlの至適反応液中において、95°Cで10分間加熱処理後、95°Cで15秒間、および60°Cで1分間の増幅サイクルを40回繰り返した。反応終了後、融解曲線解析を60°Cから95°Cまで、0.1°C/秒の昇温により行った。citrate synthase (CS)、carnitine palmitoyltransferase 1b (CPT-1b)、uncoupling protein 3 (UCP3)、peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α)、peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPAR δ), glucose transporter 4 (GLUT4)、glucose transporter 1 (GLUT1)、hexokinase 1 (HK1)、

pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4 (PDK4)、cluster of differentiation 36 (CD36)、および phosphoenolpyruvate carboxykinase 1 (PCK1) の遺伝子発現を解析した。内部標準としてribosomal protein 18 (RPS18) を用いた。解析に用いた遺伝子のプライマーは表7に示した。

表8 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における飼料および栄養摂取量

	5%		15%	
	Control	CBDS	Control	CBDS
DM intake(kg)				
Total	873.2	924.3	936.8	980.5
Concentrates	558.3	596.0	599.0	651.3
Formula feed	543.1	580.3	552.6	602.6
CBDS	-	15.7	-	48.7
Soybean meal and corn	15.2	-	46.4	-
Hay	314.9	328.3	337.8	329.2
CP intake	139.6	148.3	157.9	168.2
NFC intake	347.8	369.9	370.0	395.7
NDF intake	329.3	344.8	351.1	351.5
TDN intake	557.9	590.7	604.7	634.6
Percentage of body weight(%)				
Total DM intake	2.66	2.61	2.76	2.61
Concentrates	1.73	1.73	1.80	1.78
Formula feed	1.69	1.68	1.67	1.66
CBDS	-	0.04	-	0.12
Soybean meal and corn	0.04	-	0.13	-
Hay	0.92	0.88	0.96	0.83
CP intake	0.43	0.42	0.47	0.45
NFC intake	1.07	1.06	1.10	1.07
NDF intake	0.99	0.95	1.02	0.92
TDN intake	1.70	1.67	1.78	1.69

CBDS: 麦焼酎粕濃縮液。5%および15%CBDS: 5%および15%焼酎粕区。5%および15%control: 5%および15%対照区。

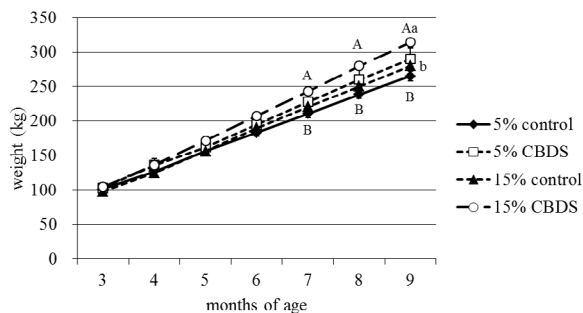


図3 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における体重の変化

^{A,B}: $P < 0.05$, ^{a,b}: $P < 0.1$, バーは標準誤差.

表9 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における1日当たりの増体量 (DG) および体測値

		5%		15%		SEM
		Control	CBDS	Control	CBDS	
DG (kg/day)	3 - 9 mo	0.91 ^B	1.04	1.01 ^b	1.16 ^{Aa}	0.07
	3 - 6 mo	0.91 ^B	1.02	1.02	1.14 ^A	0.09
	6 - 9 mo	0.91 ^B	1.05	1.00 ^b	1.18 ^{Aa}	0.09
WH (cm)	initial	91.3	92.6	90.9	93.2	1.69
	final	114.9	115.5	115.5	118.4	2.38
	gain	23.5	22.9	24.6	25.2	1.54
HH (cm)	initial	93.9	95.1	94.8	96.6	1.83
	final	116.7	117.6	116.4	120.7	2.45
	gain	22.8	22.5	21.7	24.1	1.58
BL (cm)	initial	92.6	90.3	91.6	92.6	2.54
	final	124.0	126.0	126.0	129.6	3.52
	gain	31.3	35.7	34.4	37.0	3.52
CG (cm)	initial	105.9	107.5	104.5	106.5	2.24
	final	150.3	152.3	152.6	155.6	3.11
	gain	44.4 ^B	44.7 ^b	48.1	49.1 ^{Aa}	2.16
BG (cm)	initial	119.6	119.1	117.1	119.5	3.82
	final	173.3 ^B	182.8	180.8	187.5 ^A	5.02
	gain	53.6 ^B	63.7 ^A	63.7 ^A	67.9 ^A	3.61

SEM: 標準誤差. ^{A,B}: $P < 0.05$ (同列), ^{a,b}: $P < 0.1$ (同列), mo: months of age. WH: 体高. HH: 十字部高. BL: 体長. CG: 胸囲. BG: 腹囲.

統計処理

統計処理は、R version 3.1.4 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) により行った。解析は、lme4パッケージによる一般化線形混合モデル (GLMM) により行った。処理 (給与飼料) を固定効果とし、各処理区内のセットをランダム効果とした。GLMM後、multcompパッケージのglht関数 (Hothorn *et al.*⁵⁷⁾, 2008) を利用したTukeyの多重比較により平均値の差の検定を行った (Bretz *et al.*¹²⁾, 2010)。同一処理内のサンプリング時期による筋線維の割合および直径の平均値の差の検定は、Tukeyの多重比較により行った。 $P < 0.05$ を有意水準とし、 $0.05 \leq P < 0.10$ を傾向があるとした。

3 結果

飼料摂取量および発育

飼料摂取量の結果は、表8に示した。体重および体側の結果は、図3および表9に示した。体重は、7、8、および9ヵ月齢において、15%焼酎粕区が5%対照区より有意に重かった ($P < 0.05$, 図3)。15%焼酎粕区の9ヵ月齢の体重は15%対照区より重い傾向であった ($P = 0.06$, 図3)。15%焼酎粕区の3から9ヵ月齢、3から6ヵ月齢、および6から9ヵ月齢の1日当たりの増体量 (DG) は、5%対照区より有意に大きかった ($P < 0.05$, 表9)。15%焼酎粕区の3から9ヵ月齢および6から9ヵ月齢のDGは、15%対照区より大きい傾向があった ($P = 0.06, 0.08$, 表9)。15%焼酎粕区の胸囲の増加率は5%対照区より有意に大きく ($P < 0.05$, 表9)、5%焼酎粕区より大きい傾向があった ($P = 0.06$, 表9) 15%焼酎粕区の9ヵ月齢の腹囲は5%対照区より有意に大きかった ($P < 0.05$, 表9)。5%焼酎粕区、15%対照区、および15%焼酎粕区の腹囲の増加率は、5%対照区より有意に大きかった ($P < 0.05$, 表9)

表10 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における第一胃内アンモニア態窒素濃度、VFA濃度、およびVFA割合および血漿BHBA濃度

	months of age	5%		15%		SEM
		Control	CBDS	Control	CBDS	
Ruminal Ammonia-N (mg/100ml)	4	4.1	4.0	3.4	5.7	1.5
	6	5.0	6.4	4.9	6.1	1.2
	9	7.2	4.5	6.4	5.4	1.6
VFA concentration (mmol/100ml) in rumen						
Acetate	4	5.62	5.70	5.10	5.46	0.81
	6	4.99	6.09	5.50	5.98	0.61
	9	5.80	5.42	5.06	5.63	0.71
Propionate	4	1.70	2.01	2.20	2.37	0.55
	6	1.69	1.79	1.92	2.04	0.28
	9	1.89	1.59	1.59	1.78	0.25
Butyrate	4	0.90	0.93	0.92	1.04	0.21
	6	0.75	0.97	0.94	1.06	0.17
	9	1.01	0.78	0.87	0.88	0.18
Valerate	4	0.14	0.12	0.08	0.21	0.08
	6	0.10	0.10	0.08 ^B	0.18 ^A	0.05
	9	0.12	0.11	0.06	0.14	0.05
Total VFA	4	8.52	8.86	8.31	9.20	1.37
	6	7.60	9.09	8.50	9.36	1.03
	9	8.71	8.01	7.58	8.50	1.09
Butyrate+Valerate	4	1.04	1.05	1.00	1.25	0.29
	6	0.85 ^b	1.07	1.02	1.24 ^a	0.19
	9	1.13	0.89	0.93	1.02	0.19
VFA composition (% mol) in rumen						
Acetate	4	65.69	64.52	61.40	60.30	3.72
	6	66.05	67.38	64.95	63.82	2.66
	9	64.63	67.94	66.30	66.28	1.18
Propionate	4	20.57	22.06	26.19	25.42	3.99
	6	22.06	19.53	22.44	21.72	1.65
	9	21.85	19.82	21.00	20.98	1.57
Butyrate	4	10.20	10.71	11.51	10.97	1.83
	6	9.65	10.59	11.04	11.38	1.30
	9	11.42	9.62	11.42	10.33	1.26
Valerate	4	1.55	1.29	0.77	2.11	0.77
	6	1.22	1.14	0.84 ^B	1.92 ^A	0.51
	9	1.37	1.20	0.78	1.59	0.59
Concentration in plasma						
BHBA (μmol/l)	3	231.8	158.7	181.7	201.8	69.7
	6	209.4 ^C	303.9 ^{AB}	241.3 ^{BC}	351.1 ^A	41.1
	9	264.5	274.3	255.2	316.8	48.1

SEM: 標準誤差. ^{A,B}: $P < 0.05$ (同列), ^{a,b}: $P < 0.1$ (同列).

第一胃内VFA濃度、VFAの割合、および血漿BHBA濃度

酢酸、プロピオン酸、および酪酸の濃度および割合は、処理区間に有意な差はなかった (表10)。総VFA濃度は、処理区間に有意な差はなかった (表10)。6ヵ月齢の吉草酸の濃度および割合は、15%焼酎粕区が15%対照区より有意に高かった ($P<0.05$ 、表10)。酪酸および吉草酸の合計の濃度は、15%焼酎粕区が、5%対照区より大きい傾向があった ($P=0.06$ 、表10)。6ヵ月齢の血漿BHBA濃度は、15%焼酎粕区が、5%および15%対照区より有意に高かく ($P<0.05$ 、表10)、5%焼酎粕区が5%対照区より有意に高かった ($P<0.05$ 、表10)。

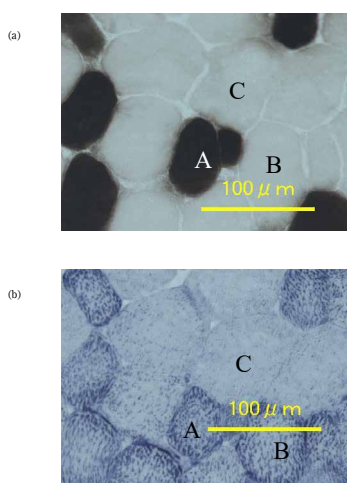


図4 I型 (A)、II A型 (B)、およびII B型 (C) 筋線維の分布

(a) ATP 活性 (pH 4.2)
(b) NADH dehydrogenase 活性

筋線維型構成

I型、II A型、およびII B型筋線維の分類の写真を図4に示した。9ヵ月齢のI型筋線維の割合は、5%および15%焼酎粕区が5%対照区より有意に少なかった ($P<0.05$ 、表11)。9ヵ月齢のII B型筋線維の割合は、15%焼酎粕区が5%対照区より多い傾向があった ($P=0.09$ 、表11)。5%対照区の9ヵ月齢のI型筋線維の割合は、3および6ヵ月齢時より有意に多かった ($P<0.05$ 、表11)。5%対照区の9ヵ月齢のII B型筋線維の割合は、3ヵ月齢より有意に少なかった ($P<0.05$ 、表11)。5%焼酎粕区の9ヵ月齢のII B型筋線維の割合は、6ヵ月齢より有意に少なかった ($P<0.05$ 、表11)。15%対照区の9ヵ月齢のII B型筋線維の割合は、3および6ヵ月齢より有意に少なかった ($P<0.05$ 、表11)。15%焼酎粕区の9ヵ月齢のII B型筋線維の割合は、3ヵ月齢より有意に少なかった ($P<0.05$ 、表11)。

筋線維直径および相対面積

5%および15%焼酎粕区の6ヵ月齢のI型筋線維の直径は、5%対照区より有意に大きかった ($P<0.05$ 、表11)。15%焼酎粕区の6ヵ月齢の直径は、15%対照区より大きい傾向であった ($P=0.086$ 、表11)。5%対照区の9ヵ月齢のI型筋線維の直径は、5%対照区より有意に大きかった ($P<0.05$ 、表11)。15%焼酎粕区の9ヵ月齢のI型筋線維の直径は、5%および15%対照区より有意に大きかった ($P<0.05$ 、表11)。5%焼酎粕区の9ヵ月齢のII A型筋線維の直径は、5%対照区より大きい傾向であつ

表11 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における胸最長筋の筋線維型構成、割合、および相対面積

Months of age		Composition of myofiber types (%)			Myofiber diameter (μm)			Relative area of myofiber type (%)			
		I	II A	II B	I	II A	II B	I	II A	II B	
3	5%	Control	23.3 ^Y	34.4	42.3 ^X	26.3 ^Y	32.9 ^Y	47.8 ^Y	10.7	25.2	64.1
		CBDS	24.1	37.6	38.2 ^{XY}	28.0 ^Y	33.7 ^Y	46.4 ^Y	13.0 ^A	29.8	57.2
	15%	Control	25.8 ^{XY}	33.0	41.2 ^X	25.7 ^Z	32.4 ^Z	45.2 ^Z	12.6 ^A	25.7	61.8
		CBDS	19.6	35.4	45.0 ^X	25.7 ^Z	32.5 ^Y	45.6 ^Z	9.1 ^B	26.1	64.8
	SEM	2.5	3.6	3.4	2.0	1.5	2.5	1.3	3.5	3.8	
6	5%	Control	24.9 ^Y	38.2	36.8 ^{XY}	33.0 ^{BX}	41.4 ^X	58.5 ^X	12.5	30.3	57.3
		CBDS	20.8	34.8	44.4 ^X	38.7 ^{AX}	45.5 ^X	58.0 ^X	12.3	28.4	59.2
	15%	Control	24.1 ^Y	33.6	42.3 ^X	33.9 ^{bY}	40.1 ^Y	56.0 ^Y	13.1	25.2	61.7
		CBDS	23.0	35.9	41.1 ^{XY}	38.9 ^{AaY}	43.9 ^X	58.7 ^Y	14.8	28.0	57.2
	SEM	3.1	4.5	4.4	2.6	3.3	3.9	2.8	4.5	5.5	
9	5%	Control	35.8 ^{AX}	36.2	28.0 ^{BbY}	36.7 ^{CX}	41.8 ^{BbX}	61.6 ^X	22.6	29.2	48.2
		CBDS	23.2 ^B	39.1	37.7 ^{AY}	42.1 ^{ABX}	47.0 ^{aX}	59.5 ^X	15.9	33.0	51.1
	15%	Control	31.1 ^X	37.4	31.5 ^Y	39.5 ^{BCX}	46.8 ^X	64.2 ^X	18.5	31.5	50.1
		CBDS	23.7 ^B	40.3	36.0 ^{aY}	46.3 ^{AX}	49.5 ^{AX}	66.8 ^X	16.5	31.9	51.6
	SEM	4.2	3.4	4.2	2.4	2.7	3.9	3.3	3.0	4.5	

SEM: 標準誤差, ^{A,B,C}: $P<0.05$ (同一月齢内同行), ^{a,b}: $P<0.1$ (同一月齢内同行), ^{X,Y}: $P<0.05$ (同一区内同行).

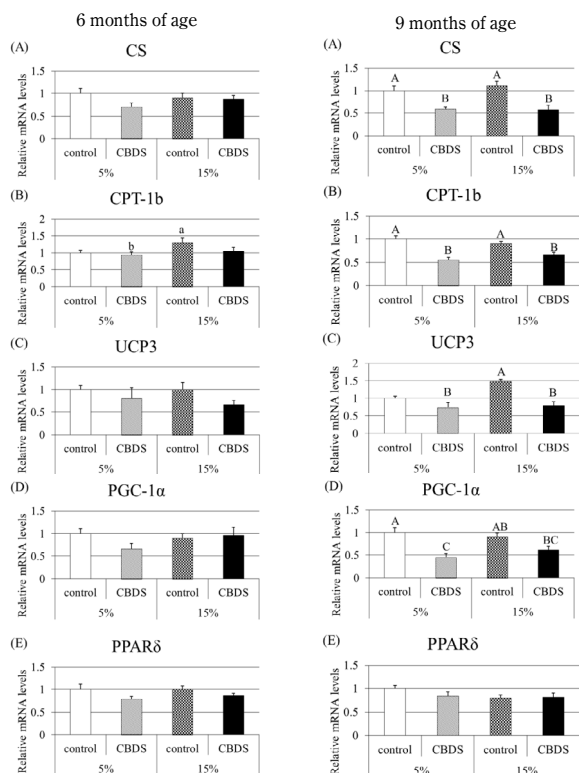


図5 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における胸最長筋でのCS (A)、CPT-1b (B)、UCP3 (C)、PGC-1 α (D)、および PPAR δ (E) の遺伝子発現

A, B, C: $P < 0.05$. a, b: $P < 0.1$. バーは標準誤差。

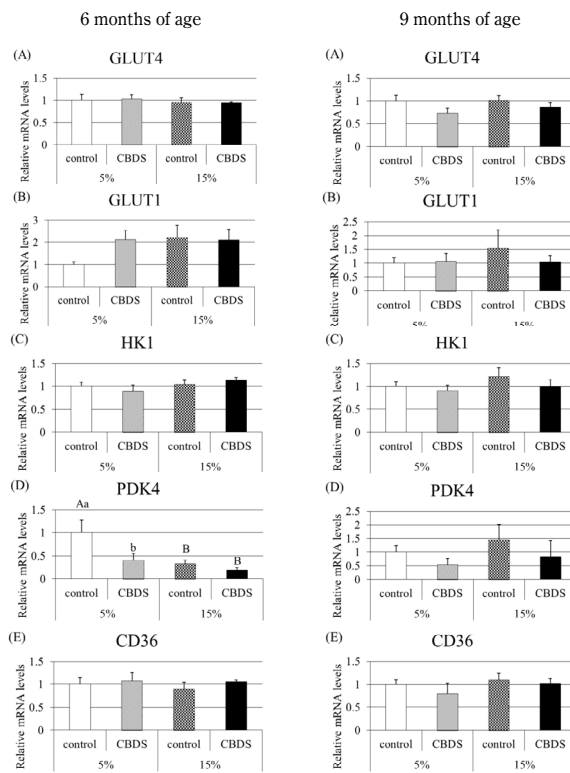


図6 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における胸最長筋でのGLUT4 (A)、GLUT1 (B)、HK1 (C)、PDK4 (D)、および CD36 (E) の遺伝子発現

A, B, C: $P < 0.05$. a, b: $P < 0.1$. バーは標準誤差。

た ($P=0.076$ 、表11)。15%焼酎粕区の9ヵ月齢のII A型筋線維の直径は、5%対照区より有意に大きかった ($P < 0.05$ 、表11)。II B型筋線維の直径は、処理区間に有意な差はなかった (表11)。5%対照区および焼酎粕区のすべての型の筋線維6および9ヵ月齢の直径は、3ヵ月齢より有意に大きかった ($P < 0.05$ 、表11)。15%対照区および15%焼酎粕区のすべての型の筋線維は、9ヵ月齢が最も大きく、3ヵ月齢が最も小さかった ($P < 0.05$ 、表11)。5%焼酎粕区および15%対照区の3ヵ月齢のI型筋線維の相対面積は、15%焼酎粕区より有意に大きかった ($P < 0.05$ 、表11)。

遺伝子発現

5%焼酎粕区の6ヵ月齢のCPT-1b mRNAの発現は、15%対照区より低い傾向があった ($P=0.055$ 、図5)。6ヵ月齢の15%対照区および15%焼酎粕区のPDK4 mRNAの発現は、5%対照区より有意に低く ($P < 0.05$ 、図5)、5%焼酎粕区は5%対照区より低い傾向があった ($P=0.05$ 、図5)。5%および15%焼酎粕区の9ヵ月齢のCSおよびCPT-1b mRNAの発現は、5%および15%対照区より有意に低かつ

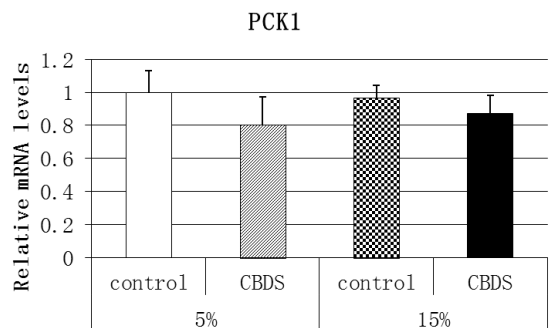


図7 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における肝臓におけるPCK1の遺伝子発現
バーは標準誤差。

た ($P < 0.05$ 、図5)。5%および15%焼酎粕区の9ヵ月齢のUCP3 mRNAの発現は、15%対照区より有意に低かった ($P < 0.05$ 、図5)。9ヵ月齢のPGC-1 α mRNAの発現については、5%焼酎粕区は、5%および15%対照区より有意に低く、15%焼酎粕区は5%対照区より有意に低かった ($P < 0.05$ 、図5)。PPAR δ 、GLUT4、GLUT1、HK1、CD36、およびPCK1の発現は、処理区間に有意な差は無かった (図5、6、7)。

血漿成分

血漿中GOT、GGT、グルコース、Tcho、BUN、およびNEFAの濃度は、処理区間に有意な差はなかった (表

表12 血漿成分濃度

	Months of age	5%		15%		SEM
		Control	CBDS	Control	CBDS	
GOT (IU/l)	3	69.5	69.8	67.7	72.2	7.0
	6	69.2	70.0	63.0	60.8	4.0
	9	68.5	65.5	59.5	61.0	5.5
GGT (IU/l)	3	18.8	25.8	27.0	18.7	19.2
	6	17.3	18.3	15.3	16.7	12.3
	9	20.5	17.7	18.8	20.5	19.4
Glucose (mg/dl)	3	101.5	93.0	96.7	89.7	7.0
	6	99.0	97.8	101.3	102.7	4.0
	9	100.7	91.5	98.3	94.7	5.5
Tcho (mg/dl)	3	99.7	124.0	117.0	99.0	19.2
	6	74.5	80.8	70.8	91.8	12.3
	9	92.0	100.5	101.7	115.7	19.4
BUN (mg/dl)	3	12.9	12.5	8.9	11.8	1.3
	6	11.4	10.7	9.6	12.5	1.5
	9	12.0	12.7	14.1	14.3	1.3
NEFA (μEq/l)	3	269.1	275.0	283.7	193.1	119.7
	6	140.1	120.3	151.6	140.9	25.7
	9	159.2	125.0	135.7	131.4	18.0
IGF-1 (ng/ml)	3	203.5	203.7	202.3	185.7	49.0
	6	312.5	250.3	272.5	278.5	55.9
	9	299.5	264.0	266.3	253.0	41.6
Lactate (μmol/l)	3	2.88	2.48	3.06	2.57	0.9
	6	6.65 ^A	2.29 ^B	2.95 ^B	2.05 ^B	1.0
	9	2.89	1.98	2.46	1.75	0.4

SEM: 標準誤差. ^{A,B}: $P < 0.05$.

12)。5%焼酎粕区、15%対照区、および15%焼酎粕区の6ヵ月齢の血漿中乳酸濃度は、5%対照区より有意に低かった ($P < 0.05$ 、表12)。

4 考察

15%焼酎粕区については、7、8、および9ヵ月齢の体重は、5%対照区より有意に大きく、9ヵ月齢の体重は、15%対照区より大きい傾向であった。15%焼酎粕区の3から9ヵ月齢のDGは、5%対照区より有意に多く、15%焼酎粕区の胸囲の増加率は、5%対照区より有意に大きかった。Uetakeら¹⁶⁹⁾(2005)は、黒毛和種およびホルスタイン牛の交雑種若齢牛では、体重、胸囲、腹囲、体高、および十字部高は、最終的な肉質等級の推定する良い指標であることを報告している。また、Mukaiら¹⁰⁷⁾(1995)は、黒毛和種の肥育試験における中間および最終の胸囲は、肉質成績と高い正の相関があることを報告している。このことから、麦焼酎濃縮液を高い割合で給与された仔牛は、大豆粕を給与された仔牛よりも将来的に良好な肉質成績となることが示唆される。

Weigandら¹⁸⁰⁾(1975)は、第一胃では、酪酸の26~33%および吉草酸の18~24%がBHBAに変換され、第一胃乳頭から吸収されることを報告している。本研究では、6ヵ月齢の第一胃内の酪酸および吉草酸の総濃度は、15%焼酎粕区が5%対照区より高い傾向があり、吉草酸濃度は、15%焼酎粕区が15%対照区より有意に高かった。また、6ヵ月齢の血漿BHBA濃度は、15%焼酎粕区が、5%および15%対照区より有意に高

かった。5%対照区および5%焼酎粕区では、第一胃内酪酸および吉草酸濃度に有意な差はなかったが、6ヵ月齢の血漿BHBA濃度は、5%焼酎粕区が有意に高かった。しかし、9ヵ月齢の血漿BHBA濃度は、処理区間に有意な差はなかった。固形飼料の摂取は、仔牛から反芻動物へ移行していくのに不可欠である (Coverdale *et al.*²⁹⁾, 2004)。また、第一胃の早期発達は、飼料の第一胃での利用性を高める (Berends *et al.*⁸⁾, 2012)。それゆえ、麦焼酎粕濃縮液は、離乳後の第一胃の発達に効果的な飼料であると考えられる。これらのことから、麦焼酎粕濃縮液の給与は、離乳後の第一胃上皮の代謝を活性化し、早期第一胃発達により、仔牛の成長を促進することが示唆された。

筋線維は、収縮特性のみで分類することが可能である。この分類は、主要な代謝特性に基づいて、I型 (slow-twitch oxidative)、II A型 (fast-twitch oxido-glycolytic)、II B型 (fast-twitch glycolytic) の3つの主要な筋線維型に分類する (Reichmann, Pette¹³⁸⁾, 1982; Hocquette *et al.*⁵⁴⁾, 1998)。赤く収縮の遅い筋線維はミトコンドリアを豊富に含み、主要なエネルギー源として酸化的代謝を用いるが、白く収縮の速い筋線維は、グリコーゲンを豊富に含み、主として解糖の代謝を用いる (Schiaffino, Reggiani¹⁴⁵⁾, 2011)。BHBAは、ミトコンドリア内膜で、酸化的リン酸化により多量のエネルギーに変換される。本研究では、I型筋線維の直径は、5%焼酎粕区は、5%対照区より、15%焼酎粕区は、5%および15%対照区より有意に大きかった。これらの結果は、血漿BHBA濃度と関連があると考えられる。しかし、II B型筋線維の直径は、処理区間に有意な差はなかった。このことから、麦焼酎粕濃縮液の給与は、血漿BHBAを増加させることにより、酸化的筋線維の肥大を誘発することが示唆された。

黒毛和種では、成長期の間、II A型およびII B型筋線維が減少し、I型筋線維が増加するとされている (Gotoh⁴⁵⁾, 2003)。本研究では、9ヵ月齢のI型筋線維の割合は、5%および15%焼酎粕区は、5%対照区より有意に低かったが、15%区間に有意な差はなかった。しかし、大豆粕の給与は、6から9ヵ月齢の間にI型筋線維を増加させたが、焼酎粕の給与では有意な変化はなかった。CSはミトコンドリアのマトリックスに局在しており、クエン酸サイクルの第一段階であるアセチルCoAのアセチル基とオキサロ酢酸の収縮を触媒する (Scaini *et al.*¹⁴³⁾, 2011)。また、CSはミトコンドリア量の定量的な酵素マーカーとして使われてお

り (Marco *et al.*⁹⁴⁾, 1974)、筋肉の酸化活性を定性的に特徴付けるために用いられる (Hocquette *et al.*⁵⁴⁾, 1998)。CPT-1はカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ (CPT) 系における律速酵素であり、 β -酸化のために脂肪酸エステルをミトコンドリアに導入する役割を果たす (DeBerardinis *et al.*³⁰⁾, 2006)。Linら⁸⁷⁾ (2012) は、黄色牛では、酸化能力の異なる大腿二頭筋と背最長筋のCPT mRNAレベルに差があるため、脂肪酸酸化状態を評価するのに適切なマーカーであることを報告している。これらのことから、CSおよびCPT-1b mRNAの発現は、筋線維型構成の指標となると考えられる。本研究では、6ヵ月齢では、CSおよびCPT-1b mRNAの発現に有意な差はないが、9ヵ月齢では、焼酎粕区が対照区より有意に低かった。これらの結果は、6から9ヵ月齢のI型筋線維の割合の変化の結果と一致する。このことから、麦焼酎粕濃縮液の給与は、大豆粕の給与よりも解糖的筋線維を増加させることが示唆された。脱共役タンパク質 (UCP1、UCP2、およびUCP3) は、ミトコンドリアにおける細胞エネルギー代謝および活性酸素種の産生を調節する上で重要である (Rousset *et al.*¹⁴¹⁾, 2004; Azzu, Brand⁶⁾, 2010)。UCP3は主に骨格筋で発現され、その正確な機能は未だ解明されていないが、UCP3の発現は、筋肉における脂肪酸酸化の増加と関連しているとされている (Costford *et al.*²⁸⁾, 2007)。本研究では、9ヵ月齢のUCP3 mRNAの発現は、5%および15%焼酎粕区は15%対照区より有意に低かったが、15%対照区との間に有意な差はなかった。高脂肪食の給与はUCP3 mRNAの発現を増加させるとされており (Matsuda *et al.*⁹⁸⁾, 1997)、飼料や脂肪の摂取量がUCP3の発現に影響したのかもしれない。

いくつかの核内受容体とそれらの補因子は、筋収縮と無関係に骨格筋線維型影響を与えるとされている (Mizunoya¹⁰⁴⁾, 2015)。PGC-1 α を過剰発現させたマウスの筋肉は酸化筋線維が増加するとされている (Lin *et al.*⁸⁶⁾, 2002)。また、骨格筋PGC-1 α の遺伝子ターゲティングは速筋特異的MyHC2bの発現を増加させ、遅筋特異的MyHC1の発現は減少するとされている (Handschin *et al.*⁴⁷⁾, 2007)。本研究では、9ヵ月齢のPGC-1 α mRNAの発現は、5%焼酎粕区は5%および15%対照区より有意に低く、15%焼酎粕区は5%対照区より有意に低かったが、15%区間に有意な差はなかった。これらの結果は、I型筋線維の割合の結果と一致するが、割合の変化の結果とは一致しなかった。PGC-1 α は、酸化性筋線維の発達に関連

するが、I型筋線維含有量を決定する主要な因子ではないとされている (Chikuni *et al.*²³⁾, 2005)。いくつかの研究では、飼料エネルギーレベルと牛の解糖系筋線維の割合との間に正の相関があることが明らかにされている (Moody *et al.*¹⁰⁵⁾, 1980; Johnston *et al.*⁶⁷⁾, 1981; Klosowski *et al.*⁸⁰⁾, 1992)。また、成長の促進は、筋肉の代謝をより解糖的に導くとされている (Hocquette *et al.*⁵⁴⁾, 1998)。それゆえ、成長速度や体重当たりのTDN摂取量なども、I型筋線維の割合に影響したのかもしれない。PPAR δ の筋特異的過剰発現は、ミオシンATPaseおよび免疫染色法におけるヒラメ筋および腓腹筋のMyHC1組成を増加させ、すべてのMyHC2アイソフォームを減少させ、PPAR δ が2型からI型へのII型移行を誘導することが示されている (Gan *et al.*⁴¹⁾, 2013)。本研究では、PPAR δ mRNAの発現は、処理区間に有意な差はなかった。これらのことから、麦焼酎粕濃縮液の給与はPGC-1 α mRNAの発現レベルの低下や、成長促進、TND摂取量などにより、筋肉の代謝をより解糖的代謝に導くことが示唆された。

6ヵ月齢の血漿乳酸濃度は、5%焼酎粕区、15%対照区、および15%焼酎粕区が5%対照区より有意に低かった。窒素供給は低質熱帯性粗飼料を給与された牛の、乾物およびNDFの消化率を増加させることが示されている (Souza *et al.*¹⁵³⁾, 2010)。NDF分解に対する窒素供給の刺激効果は、線維素溶解微生物の増殖のための窒素化合物の利用可能性を高めるよう、第一胃が改善されたためである (Detmann *et al.*³²⁾, 2009)。濃厚飼料の給与は、第一胃内の酪酸濃度を増加させ (Bevans *et al.*⁹⁾, 2005)、血漿中濃度を上昇させる (Arai *et al.*³⁾, 2006)。また、血中乳酸塩濃度の増加は、ヒツジにおける急性アシドーシス実験の間に観察されることが報告されている (Patra *et al.*¹³²⁾, 1996; Minuti *et al.*¹⁰²⁾, 2014)。それゆえ、麦焼酎粕濃縮液を乾草に混合して給与することで、乾物およびNDFの消化性を高めているのかもしれない。これらのことから、15%区はタンパク質摂取量が高いこと、また、5%焼酎粕区では、SIP含量が高い麦焼酎粕濃縮液を乾草と混合して飽食給与させていることにより、5%対照区より第一胃の状態がより良好となり、乳酸濃度が減少したことが示唆された。

筋肉における主な促進グルコース輸送体は、GLUT1およびGLUT4である (Mueckler¹⁰⁶⁾, 1994)。GLUT1は基盤的グルコースの取り込みに関連する (Khan, Pessin⁷⁵⁾, 2002; Scheepers *et al.*¹⁴⁴⁾, 2004; Fernyhough *et al.*³⁸⁾, 2007)。高血糖状態では、インスリンが膵臓か

ら分泌され、インスリンは細胞内GLUT4小胞移動を増加させることによって筋細胞のグルコース取り込みを刺激する (Kahn⁶⁸, 1996)。哺乳動物細胞がグルコースを代謝するためには、グルコースに対して高い親和性を有するHK1を含むHKファミリーの4つのメンバーのうちの1つによって、グルコースはグルコース-6-リン酸に迅速に変換される。Yamada¹⁸⁵ら (2010) は、BHBAがマウスの酸化的筋肉におけるインスリン媒介グルコース輸送を阻害することを報告している。しかし、本研究ではGLUT4 mRNAの発現は、処理区間に有意な差はなかった。Hocquetteら⁵³ (1996) は、仔牛および山羊では解糖系筋線維の方が、GLUT4 mRNAの発現が高いことを報告している。本研究では、II B型筋線維の相対面積が最も高い割合を占めている。それゆえ、BHBAはGLUT4 mRNAの発現レベルに影響しなかったのかもしれない。本研究では、血漿グルコース濃度、GLUT1 mRNA発現、およびHK1 mRNA発現にも有意な差はなかった。これらのことから、麦焼酎粕濃縮液の給与は黒毛和種仔牛のグルコースの取り込みには影響しないことが示唆された。CD36は、膜結合タンパク質による脂肪酸取り込みに重要な役割を果たす (Luiken *et al.*⁹⁰, 1999)。CD36は、脂肪の摂取量が高まると増加し (Luiken *et al.*⁸⁹, 2002)、脂肪代謝を改善すると考えられている (Greenwalt *et al.*⁴⁶, 1995)。本研究では、血漿NEFA濃度およびCD36 mRNA発現に有意な差はなかった。このことから、麦焼酎粕濃縮液の給与は脂肪酸の取り込みに影響しないことが示唆された。

6ヵ月齢のPDK4 mRNAの発現は、15%対照区および焼酎粕区が5%対照区より有意に低く、5%焼酎粕区は低い傾向であった。PDK4は、脂質およびグルコース代謝調節の重要な酵素であり、ピルビン酸からアセチル-CoAへの変換を阻害する。その反応は、エネルギー源をグルコースから脂肪酸に変え、代謝を調節する (Wu *et al.*¹⁸², 1998; Sugden, Holness¹⁵⁴, 2003)。PDK4のmRNA発現は、絶食により種々の組織において誘導され、特に、骨格筋において顕著に確認される (Bowker-Kinley *et al.*¹¹, 1998)。また、PDK4は血糖値を維持する働きをする (荒木ら⁴, 2007)。それゆえ、5%対照区は、他区と比較して第一胃の状態が良好でなかったことから、血糖値を維持するためPDK4 mRNAの発現レベルが高かったのかもしれない。

PCK1 mRNAは、乳牛では、プロピオン酸供給の増加に応答して誘導される。プロピオン酸によって制御されるグルコース生成は、糖新生のための重要なフラックス調節酵素であるPCK1の肝臓発現を介して分子

レベルで媒介される (Zhang *et al.*¹⁹¹, 2015)。本研究では、第一胃内プロピオン酸濃度、血漿グルコース濃度、および肝臓でのPCK1 mRNA発現は、処理区間に有意な差はなかった。このことから、麦焼酎粕濃縮液の給与はプロピオン酸を介した糖新生に影響しないことが示唆された。

結論としては、麦焼酎粕濃縮液の給与は、離乳後の黒毛和種仔牛の第一胃上皮の代謝を活性化することが示唆された。骨格筋の低いPGC-1 α 発現レベルおよび成長促進がI型筋線維の割合を増加させずに、筋肉の代謝をより解糖的に導くことが示唆された。また、血漿BHBA濃度の上昇により、酸化的筋線維を肥大させることが示唆された。

II-II 黒毛和種仔牛の成長、第一胃発達、および筋タンパク質分解に関連する遺伝子の発現に及ぼす麦焼酎粕濃縮液の影響

1 はじめに

II-I では、麦焼酎粕濃縮液の給与は、同じタンパク質給与水準では、対照区と比較して、筋線維型構成を変化させ、酸化的筋線維を肥大させることが示された。また、I および II-I では、麦焼酎粕濃縮液の給与により血漿BHBAが増加することが明らかとなった。BHBAはタンパク質合成を促進することが報告されている (Nair *et al.*¹¹²⁾, 1988)。それゆえ、麦焼酎粕濃縮液の給与は黒毛和種仔牛の筋肉の発達に影響するかもしれない。

骨格筋の成長は、骨格筋タンパク質合成と分解の差が正であるときに生じる (Hayashi *et al.*⁵²⁾, 1985)。骨格筋には、リソソーム、カスパーゼ、カルパイン、およびユビキチン-プロテアソーム系の4つのタンパク質分解系がある。ユビキチン-プロテアソーム系およびカルパイン系は、骨格筋における主要なタンパク質画分である筋原繊維タンパク質の代謝を担っている (Goll *et al.*⁴³⁾, 2008)。ユビキチン-プロテアソーム系に関連するatrogin-1 (FBX032) およびカルパインファミリーである μ -calpain (CAPN1) のmRNA発現は、ブロイラーでは、焼酎粕のヘキササン抽出物により減少することが報告されている (Kamizono *et al.*⁷²⁾, 2010)。HPLC分析により、焼酎粕のヘキササン抽出物にはジプトキシブタン (DBB) およびプトキシブチルアルコール (BBA) の2つの成長促進物質が含まれることが明らかにされている (Kamizono *et al.*⁷³⁾, 2013;

Mahfudz *et al.*⁹³⁾, 1997)。培養した筋細胞では、atrogin-1 (FBX032) mRNAの発現がDBBにより低下し、それは、DBBの濃度に依存することが報告されている (Kamizono *et al.*⁷³⁾, 2013)。しかし、牛における麦焼酎粕濃縮液の筋タンパク質分解に及ぼす影響は明らかにされていない。

I では、血漿3MH濃度は、麦焼酎粕濃縮液の給与により減少した。それゆえ、牛への麦焼酎粕濃縮液の給与は筋タンパク質分解を抑制するかもしれないが、麦焼酎粕濃縮液の給与量が影響するかもしれない。そこで、II-II では、4つの給与水準により比較を行い、麦焼酎粕濃縮液の異なる給与水準が、黒毛和種仔牛の成長、第一胃発達、および骨格筋タンパク質分解に関連する遺伝子の発現に及ぼす影響について検討した。

2 材料および方法

試験区および給与飼料

21頭の雄仔牛を供試した。対照区はI-Iの5%対照区、5%および15%焼酎粕区は、I-Iと同様の処理区を用いた。30%焼酎粕区に3頭配置し、乾草に乾物当たり30%麦焼酎粕濃縮液を混合し給与した。その他の条件はI-Iと同様であった。

麦焼酎粕濃縮液のヘキササン抽出物の同定

同定は、Mahfudzら⁹³⁾, 1997)、Kamizonoら⁷²⁾ (2010)、およびKamizonoら⁷³⁾ (2013) の方法を用いて、HPLCにより行った。カラムは、MCIGEL CGM/CO4 column (4.6×150mm) (三菱化学株式会社、東京) を用いた。移動相は、ヘキササン:エタノール (94:6) とし、流速は0.5ml/minとした。紫外線検出波長290nmとした。

表13 プライマー配列

Gene of interest	Gene symbc	Accession No.		Sense Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
F-box protein 32	FBX032	NM_001046155.1	F	ACATGTGGGTGTATCGGATGGA	100
			R	TCTGTGAAGGTGAGGCCCTTG□	
tripartite motif containing TRIM63	TRIM63	NM_001046295.1	F	TGGTGGAGACAGCCATCCAG	191
			R	GATGGTCCTCAGGGTGTGACGCTA	
Ubiquitin B	UBB	NM_174133.2	F	GACTCGGCGTGATTGAATTTG	86
			R	GTCTTGCCGGTCAGGGTTT	
Calpain 1	CAPN1	NM_174259.2	F	GACGGCAATGGCAAATG	197
			R	TCCGAGTAGCGGGTGATAATGAG	
Calpain 2	CAPN2	NM_00110.086.1	F	GTGGCAAATGCGGGTCTGAAGG	172
			R	ATCACTTGGTGGAGCTGACAGG	
Calpain 3	CAPN3	NM_174260.2	F	GCTGCTTTGTCAGGCTGGAG	134
			R	TCGATGTGGCCACTTGGTTC	
Ribosomal protein S18	RPS18	NM_001033614.2	F	AGATATGCTCATGTGGTGTGAGG/	111
			R	GCGTGGATTCTGCATAATGGTG	

F: forward primer, R: reverse primer.

表14 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における飼料および栄養摂取量

	Control	CBDS		
		5%	15%	30%
DM intake(kg)				
Total	873.2	924.3	980.5	934.1
Concentrates	558.3	596.0	651.3	643.9
Formula feed	543.1	580.3	602.6	556.9
CBDS	-	15.7	48.7	87.1
Soybean meal and corn	15.2	-	-	-
Hay	314.9	328.3	329.2	290.2
CP intake	139.6	148.3	168.2	174.0
NFC intake	347.8	369.9	395.7	381.0
NDF intake	329.3	344.8	351.5	317.3
TDN intake	557.9	590.7	634.6	614.6
Percentage of body weight(%)				
Total DM intake	2.66	2.61	2.61	2.75
Concentrates	1.73	1.73	1.78	1.92
Formula feed	1.69	1.68	1.66	1.68
CBDS	-	0.04	0.12	0.24
Soybean meal and corn	0.04	-	-	-
Hay	0.92	0.88	0.83	0.83
CP intake	0.43	0.42	0.45	0.51
NFC intake	1.07	1.06	1.07	1.13
NDF intake	0.99	0.95	0.92	0.91
TDN intake	1.70	1.67	1.69	1.80

CBDS: 麦焼酎粕濃縮液

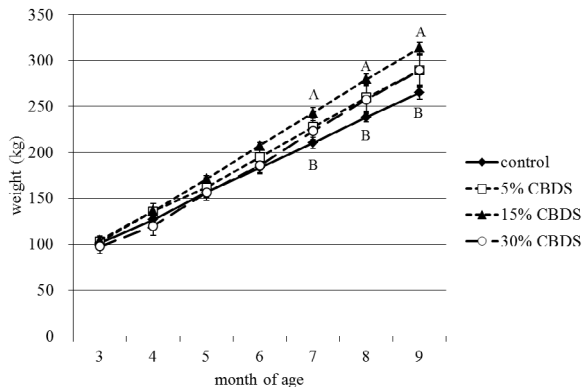


図8 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における体重の変化
A, B: P<0.05. バーは標準誤差.

第一胃液分析

胃液は、4、6、および9ヵ月齢に朝給餌4時間後に採取した。採取および分析方法はIで述べた方法で行った。

血漿分析

血液は3、6、および9ヵ月齢に頸静脈から採取した。採取および分析方法は、IおよびII-Iで述べた方法で行った。

遺伝子発現のための微量組織採取

II-Iと同様の方法で行った。

表15 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における1日当たりの増体量 (DG) および体測値

	Control	CBDS		
		5%	15%	30%
DG (kg/day)				
3-9 mo	0.91 ± 0.03 ^B	1.04 ± 0.06	1.16 ± 0.05 ^A	0.98 ± 0.06
3-6 mo	0.91 ± 0.03 ^B	1.02 ± 0.07	1.14 ± 0.05 ^A	1.06 ± 0.04
6-9 mo	0.91 ± 0.04 ^{Bb}	1.05 ± 0.06	1.18 ± 0.05 ^A	1.15 ± 0.11 ^a
WH (cm)				
Initial	91.3 ± 0.9	92.6 ± 1.3	93.2 ± 0.6	89.6 ± 0.5
Final	114.9 ± 1.1	115.5 ± 2.0	118.4 ± 1.2	117.0 ± 0.6
Gain	23.5 ± 0.1	22.9 ± 1.4	25.2 ± 0.9	27.4 ± 0.4
HH (cm)				
Initial	93.9 ± 0.9	95.1 ± 1.2	96.6 ± 1.1	93.9 ± 2.5
Final	116.7 ± 1.2	117.6 ± 1.9	120.7 ± 1.2	118.5 ± 1.1
Gain	22.8 ± 0.1	22.5 ± 1.3	24.1 ± 0.8	24.7 ± 2.2
BL (cm)				
Initial	92.6 ± 1.1	90.3 ± 2.2	92.6 ± 1.6	90.5 ± 0.9
Final	124.0 ± 1.4 ^B	126.0 ± 2.2	129.6 ± 1.0 ^A	128.6 ± 1.1
Gain	31.3 ± 0.1	35.7 ± 1.0	37.0 ± 2.1	38.1 ± 0.6
CG (cm)				
Initial	105.9 ± 1.2	107.5 ± 1.6	106.5 ± 0.9	104.5 ± 3.2
Final	150.3 ± 1.7	152.3 ± 2.7	155.6 ± 1.0	154.4 ± 2.9
Gain	44.4 ± 1.0 ^B	44.7 ± 1.2 ^B	49.1 ± 1.3 ^A	49.8 ± 0.4 ^A
BG (cm)				
Initial	119.6 ± 1.5	119.1 ± 3.0	119.5 ± 2.4	122.0 ± 5.7
Final	173.3 ± 1.8 ^B	182.8 ± 4.2	187.5 ± 2.7 ^A	183.8 ± 6.1
Gain	53.6 ± 1.3 ^B	63.7 ± 1.7 ^A	67.9 ± 3.4 ^A	61.8 ± 0.5 ^A

SEM: 標準誤差. ^{A, B}: P<0.05 (同列). ^{a, b}: P<0.1 (同列).
mo: months of age. WH: 体高. HH: 十字部高. BL: 体長. CG: 胸囲. BG: 腹囲.

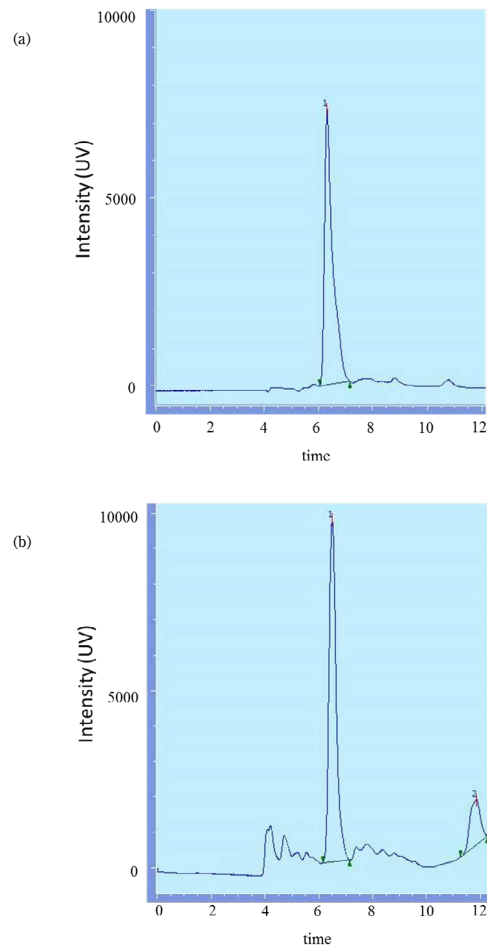


図9 HPLCによる麦焼酎粕濃縮液のヘキサン抽出物のクロマトグラフ
(a) DBBスタンダード. (b) 麦焼酎粕濃縮液のヘキサン抽出物.

RNA単離、cDNA合成、および定量的リアルタイムPCR

F-box protein 32 (FBOX32), tripartite motif containing 63 (TRIM63), ubiquitin B (UBB), calpain 1 (CAPN1), calpain 2 (CAPN2), calpain

表16 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における第一胃内アンモニア態窒素濃度、VFA濃度、およびVFA割合および血漿BHBA濃度

Months of age	Control	CBDS		
		5%	15%	30%
Ruminal Ammonia-N (mg/100ml)	4.1 ± 0.4	4.0 ± 0.3	6.6 ± 1.4	8.7 ± 1.4
VFA concentration (mmol/100ml) in rumen				
Acatate	5.62 ± 0.60	5.70 ± 0.28	5.46 ± 0.47	5.10 ± 0.47
Propionate	5.05 ± 0.31	6.09 ± 0.54	5.98 ± 0.16	4.68 ± 0.16
Butyrate	5.80 ± 0.32	5.42 ± 0.43	5.63 ± 0.43	5.53 ± 0.43
Valerate	1.70 ± 0.11	2.01 ± 0.37	2.37 ± 0.39	2.19 ± 0.39
Total VFA	1.82 ± 0.25	1.79 ± 0.22	2.04 ± 0.08	1.54 ± 0.08
BHBA (μmol/l)	1.89 ± 0.13	1.59 ± 0.15	1.78 ± 0.17	1.97 ± 0.17
VFA composition (% mol) in rumen				
Acatate	4 65.69 ± 2.02	64.52 ± 2.43	60.30 ± 2.30	61.51 ± 2.30
Propionate	6 64.64 ± 2.47	67.38 ± 1.31	63.82 ± 0.66	66.08 ± 0.66
Butyrate	9 64.63 ± 0.44	67.94 ± 0.97	66.28 ± 0.84	64.63 ± 0.84
Valerate	4 20.57 ± 1.90	22.06 ± 2.91	25.42 ± 1.99	25.71 ± 1.99
Total VFA	6 22.63 ± 1.46	19.53 ± 0.72	21.72 ± 0.55	21.66 ± 0.55
BHBA (μmol/l)	9 21.85 ± 1.45	19.82 ± 0.63	20.98 ± 0.71	23.13 ± 0.71
Concentration in plasma				
BHBA (μmol/l)	4 10.20 ± 1.04	10.71 ± 0.98	10.97 ± 0.99	8.16 ± 0.99
	6 9.97 ± 1.08	10.59 ± 0.60	11.38 ± 0.68	10.71 ± 0.68
	9 11.42 ± 1.00	9.62 ± 0.66	10.33 ± 0.21	10.27 ± 0.21
	4 1.55 ± 0.54	1.29 ± 0.33	2.11 ± 0.44	1.94 ± 0.44
	6 1.22 ± 0.28	1.14 ± 0.25	1.92 ± 0.25	1.55 ± 0.25
	9 1.37 ± 0.14	1.20 ± 0.28	1.59 ± 0.34	1.95 ± 0.34

データは平均値±標準誤差。
A,B,C: P<0.05 (同列), Ammonia-N: アンモニア態窒素。

3 (CAPN3) の遺伝子発現を解析した。II-Iと同様の方法で行った。プライマー配列は、表13に示した。

統計処理

II-Iと同様の方法で行った。

3 結果

飼料摂取量と成長

飼料摂取量は表14に示した。体重および体側結果は、図8および表15に示した。15%焼酎粕区の7、8、および9ヵ月齢の体重は、対照区より有意に重かった (P<0.05、図8)。15%焼酎粕区の3から9ヵ月齢、3から6ヵ月齢、および6から9ヵ月齢のDGは対照区より有意に大きかった (P<0.05、表15)。30%焼酎粕区の6から9ヵ月齢のDGは対照区より大きい傾向であった (P=0.06、表15)。15%焼酎粕区の9ヵ月齢の体長は対照区より有意に大きかった (P<0.05、表15)。15%および30%焼酎粕区の胸囲の増加率は、対照区および5%焼酎粕区より有意に大きかった (P<0.05、表15)。15%焼酎粕区の9ヵ月齢の腹囲は対照区より有意に大きかった (P<0.05、表15)。5%、15%、および30%焼酎粕区の腹囲の増加率は対照区より有意に大きかった (P<0.05、表15)。

表17 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における血漿成分濃度

Months of age	Control	CBDS		
		5%	15%	30%
BUN (mg/dl)	12.9 ± 0.6	12.5 ± 0.6	11.8 ± 0.7	10.6 ± 1.5
ammonia (μg/dl)	11.4 ± 1.0	10.7 ± 0.9 ^B	12.5 ± 0.8	15.1 ± 1.6 ^A
TP (g/dl)	12.0 ± 0.7 ^B	12.7 ± 0.7 ^b	14.3 ± 0.8	16.3 ± 1.3 ^{Aa}
IGF-1 (ng/ml)	87.7 ± 12.4	126.3 ± 12.4	140.8 ± 11.3	113.7 ± 23.4
Lactate (μmol/l)	69.8 ± 9.3	76.2 ± 9.6	76.8 ± 6.7	83.3 ± 4.8
	97.0 ± 7.5	121.2 ± 8.6 ^A	86.5 ± 8.1 ^B	92.7 ± 7.5
	6.7 ± 0.2	6.7 ± 0.2	6.3 ± 0.2	6.7 ± 0.5
	6.4 ± 0.1	7.5 ± 0.1	6.5 ± 0.1	6.8 ± 0.1
	6.8 ± 0.1	6.5 ± 0.1	6.8 ± 0.2	6.8 ± 0.2
	203.5 ± 18.2	203.7 ± 18.4	185.7 ± 13.2	201.3 ± 44.9
	312.5 ± 34.9	250.3 ± 38.6	278.5 ± 44.2	294.0 ± 25.0
	299.5 ± 16.2	264.0 ± 13.5	253.0 ± 15.8	285.7 ± 32.4
	2.88 ± 0.74	2.48 ± 0.54	2.57 ± 0.55	2.33 ± 0.35
	6.65 ± 1.06 ^A	2.29 ± 1.20 ^B	2.05 ± 1.38 ^B	2.41 ± 0.06 ^B
	2.89 ± 0.38	1.98 ± 0.40	1.75 ± 0.23	1.88 ± 0.17

データは平均値±標準誤差。
A,B: P<0.05 (同列), a,b: P<0.1 (同列)。

麦焼酎粕濃縮液のヘキササン抽出物の同定

DBBはHPLCにより同定された (図9)。BBAは同定されなかった。

第一胃内アンモニア態窒素濃度およびVFA濃度、および血漿BHBA濃度

第一胃内アンモニア態窒素濃度、VFA濃度、およびVFAの割合に有意な差はなかった (表16)。6ヵ月齢の血漿BHBA濃度は、15%焼酎粕区は対照区および30%焼酎粕区より、5%焼酎粕区は対照区より有意に高かった (P<0.05、表16)。

血漿成分

6ヵ月齢の血漿BUN濃度は30%焼酎粕区が5%焼酎粕区より有意に高かった (P<0.05、表17)。9ヵ月齢の血漿BUN濃度は、30%焼酎粕区は対照区より有意に高く (P<0.05、表17)、5%焼酎粕区より高い傾向があった (P=0.095、表17)。9ヵ月齢の血漿アンモニア濃度は、5%焼酎粕区が15%焼酎粕区より有意に高かった (P<0.05、表17)。6ヵ月齢の血漿乳酸濃度は、5%、15%、および30%焼酎粕区が対照区より有意に低かった (P<0.05、表17)。

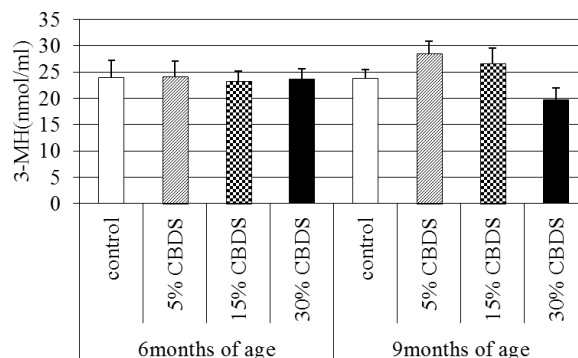


図10 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における血漿3-MH (メチルヒスチジン) 濃度
バーは標準誤差。

表18 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における6ヵ月齢の血漿アミノ酸濃度

	Control				CBDS			
	Control		5%		15%		30%	
Essential amino acid (ng/ml)								
Arginine	132.03 ± 4.54	142.66 ± 5.47	157.77 ± 5.48	143.59 ± 10.16				
Histidine	78.56 ± 1.72	75.35 ± 1.67	83.04 ± 2.49	71.69 ± 2.22				
Isoleucine	161.72 ± 5.42	153.68 ± 5.45	151.78 ± 6.58	149.13 ± 15.19				
Leucine	227.10 ± 9.94	210.54 ± 10.75	211.16 ± 11.42	213.40 ± 15.44				
Lysine	130.69 ± 5.82	154.55 ± 7.27	149.41 ± 10.47	138.35 ± 12.13				
Methionine	34.46 ± 0.97	37.82 ± 1.76	38.57 ± 2.36	35.86 ± 3.73				
Phenylalanine	65.29 ± 3.06	57.71 ± 2.87	61.33 ± 2.58	59.64 ± 3.23				
Threonine	116.12 ± 7.43	119.41 ± 6.10	121.97 ± 8.68	118.44 ± 10.01				
Tryptophan	5.20 ± 0.72	2.45 ± 0.76	3.80 ± 0.83	1.99 ± 0.15				
Valine	428.45 ± 17.51	397.99 ± 16.46	409.31 ± 19.48	431.33 ± 24.57				
Non-essential amino acid (ng/ml)								
Alanine	265.60 ± 11.12	290.18 ± 21.45	254.91 ± 23.31	256.26 ± 17.68				
Aspartic acid	8.96 ± 1.75	8.50 ± 0.37	9.66 ± 0.35	8.56 ± 0.27				
Asparagine	54.42 ± 0.42	54.72 ± 1.73	56.77 ± 3.38	51.87 ± 5.16				
Glutamic acid	56.73 ± 2.07	52.87 ± 2.12	60.47 ± 2.42	56.51 ± 2.37				
Glycine	368.83 ± 8.35	329.86 ± 6.72	342.32 ± 8.75	356.78 ± 16.81				
Proline	101.15 ± 3.56	99.37 ± 3.91	96.99 ± 3.91	94.72 ± 6.34				
Serine	104.02 ± 4.25	94.05 ± 4.41	102.41 ± 4.65	101.07 ± 0.98				
Tyrosine	66.20 ± 3.23	66.19 ± 3.19	74.56 ± 3.65	66.03 ± 4.45				
BCAA	817.27 ± 31.53	762.21 ± 31.43	772.25 ± 36.42	793.86 ± 55.16				

データは平均値±標準誤差。

^{A,B}: P<0.05 (同列), ^{a,b}: P<0.1 (同列)。

表19 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における9ヵ月齢の血漿アミノ酸濃度

	Control				CBDS			
	Control		5%		15%		30%	
Essential amino acid (ng/ml)								
Arginine	117.30 ± 6.34	118.78 ± 5.00	125.50 ± 6.31	114.81 ± 3.34				
Histidine	82.08 ± 2.62	68.47 ± 3.33	77.07 ± 3.60	71.39 ± 4.63				
Isoleucine	148.72 ± 3.69	146.28 ± 2.41	142.02 ± 3.67	140.60 ± 4.10				
Leucine	225.18 ± 12.11	223.61 ± 7.06	215.49 ± 6.85	202.40 ± 6.49				
Lysine	125.95 ± 6.19	135.29 ± 3.48	141.47 ± 3.52	135.01 ± 7.41				
Methionine	33.08 ± 1.24	32.53 ± 1.19	33.01 ± 1.20	30.41 ± 0.42				
Phenylalanine	58.77 ± 2.74	56.66 ± 2.34	54.71 ± 3.75	53.79 ± 0.22				
Threonine	98.31 ± 4.66	100.67 ± 4.29	100.56 ± 4.33	88.12 ± 6.29				
Tryptophan	2.45 ± 0.27	2.56 ± 0.29	2.91 ± 0.29	3.32 ± 1.11				
Valine	411.18 ± 24.04	406.32 ± 12.43	413.05 ± 11.11	401.83 ± 30.17				
Non-essential amino acid (ng/ml)								
Alanine	246.42 ± 4.30	234.32 ± 4.30	243.25 ± 6.54	227.58 ± 3.27				
Aspartic acid	7.16 ± 0.31	7.52 ± 0.37	8.05 ± 0.38	7.24 ± 0.26				
Asparagine	51.17 ± 1.79	49.17 ± 0.90	49.53 ± 1.29	43.35 ± 0.39				
Glutamic acid	47.42 ± 2.82	50.00 ± 2.69	47.23 ± 2.93	49.87 ± 3.94				
Glycine	328.54 ± 11.73	293.00 ± 11.71	335.86 ± 13.72	288.33 ± 25.59				
Proline	100.15 ± 4.34	89.95 ± 4.61	94.40 ± 5.06	82.26 ± 1.42				
Serine	99.71 ± 4.33	93.05 ± 4.32	104.31 ± 5.02	83.63 ± 3.94				
Tyrosine	60.23 ± 3.48	59.72 ± 3.77	58.66 ± 4.19	58.84 ± 4.74				
BCAA	785.08 ± 39.07	776.21 ± 20.45	770.56 ± 19.53	744.82 ± 38.82				

データは平均値±標準誤差。

^{A,B}: P<0.05 (同列)。

血漿遊離アミノ酸濃度

血漿3MH濃度は、処理区間に有意な差はなかった (図10)。6ヵ月齢の血漿アルギニン濃度は、15%焼酎粕区が対照区より高い傾向があった (P=0.05、表18)。6ヵ月齢の血漿トリプトファン濃度は、5%および30%焼酎粕区が対照区より有意に低く (P<0.05、表18)、15%焼酎粕区は対照区より低い傾向であった (P=0.07、表18)。9ヵ月齢の血漿ヒスチジン濃度は5%焼酎粕区が対照区より有意に低かった (P<0.05、表19)。

遺伝子発現

9ヵ月齢のFBXO32 mRNAの発現は30%焼酎粕区が対照区より有意に低かった (P<0.05、図11)。

4 考察

7、8、および9ヵ月齢の体重は、15%焼酎粕区が対照区より有意に大きかったが、30%焼酎粕区と対照区の間には有意な差はなかった。窒素供給が乾物およ

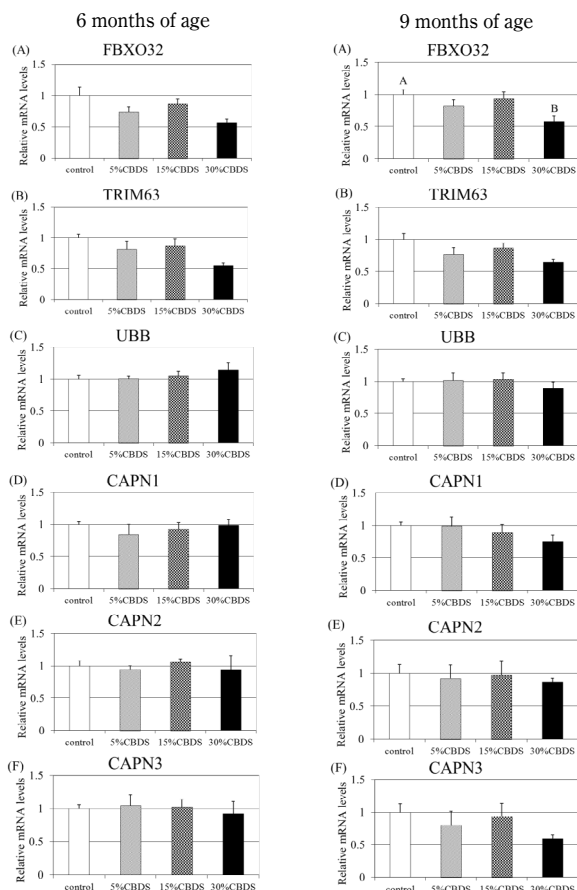


図11 対照区 (control) および焼酎粕区 (CBDS) における胸最長筋でのFBXO32 (A), TRIM63 (B), UBB (C), CAPN1 (D), CAPN2 (E), CAPN3 (F) の遺伝子発現

^{A,B}: P<0.05 (同列), バーは標準誤差。

びNDFの第一胃での消化性を改善することを論じてきた。また、DIPの補給は、第一胃微生物の成長にとっての窒素の主要な供給源である (Allison²⁾, 1969; Tillman, Sidhu¹⁶⁸⁾, 1969)。有意な差はないが、30%焼酎粕区の4および6ヵ月齢の酢酸、酪酸、および総VFA濃度は、処理区間で最も低かった。30%焼酎粕区の6ヵ月齢の血漿BHBA濃度は、15%焼酎粕区より有意に低かった。Zhangら¹⁹²⁾ (2012) は、ヤクにNFCとDIPの最適割合の飼料を給与したときに、窒素利用および微生物効率が最大となったことを報告している。麦焼酎粕濃縮液はDIPおよびSIP含量が高いことから、6ヵ月齢より前の第一胃が発達途中の仔牛ではDIPが過剰で、NFCとのバランスが悪かったのかもしれない。胸囲の増加率は、15%および30%焼酎粕区が対照区および5%焼酎粕区より有意に高く、これは、CPの摂取量が影響したと考えられた。

血漿BUN濃度は6ヵ月齢では、30%焼酎粕区は5%焼酎粕区より有意に高く、9ヵ月齢では対照区より有意に高く、5%焼酎粕区より高い傾向であった。血

漿アンモニアおよびTP濃度に有意な差はなかった。これらは、第1章の結果と一致した。BUN濃度は第一胃発酵における窒素損失を反映することから (Xin *et al.*¹⁸³⁾, 2010)、30%焼酎粕区のDIP摂取量がBUN濃度に影響したと考えられた。

9ヵ月齢のFBX032 mRNAの発現は、30%焼酎粕区が対照区より有意に低かった。TRIM63、UBB、CAPN1、CAPN2、およびCAPN3 mRNAの発現は、有意な差はなかった。Kamizonoら⁷²⁾ (2010) は、ブロイラーでは、血漿3MH、atrogin-1 (FBX032)、ubiquitin、および μ -calpain (CAPN1) mRNAの発現は、焼酎粕のヘキサソ抽出物の給与により有意に減少することを報告している。一方で、培養した鶏筋細胞では、ubiquitinおよび μ -calpain (CAPN1) mRNAの発現は、DBBの添加では減少しないことを報告している (Kamizono *et al.*⁷³⁾, 2013)。UBBおよびUBCは、単量体ユビキチンリボソーム融合遺伝子とともに、ユビキチンをコードする最も保存された真核生物タンパク質の1つである (Wiborg *et al.*¹⁸¹⁾, 1985; Finley *et al.*³⁹⁾, 1989)。ユビキチン-プロテアソーム系は、26Sプロテアソームによる分解のマーカースとしての標的タンパク質のポリユビキチン化を必要とするATP依存性タンパク質分解系である (Ciechanover²⁴⁾, 2006)。標的タンパク質のポリユビキチン化は、ユビキチン分子とタンパク質上の1つ以上のリジン残基との間の共有結合からなる。このプロセスには、E1 (ユビキチン活性化酵素)、E2 (ユビキチン結合酵素、およびE3 (ユビキチンリガーゼ) の3つのタイプのユビキチン化酵素が関わっている。ユビキチンリガーゼは、ユビキチン-プロテアソーム系に特異性を与える酵素である (Mearini *et al.*⁹⁹⁾, 2008)。いくつかの研究では、ユビキチン-プロテアソーム系は、atrogin-1 (FBX032) およびMuRF1 (TRIM63) のような2つの重要なユビキチンリガーゼの発現によって制御されることも示されている (Franch, Price⁴⁰⁾, 2005; Glass⁴²⁾, 2005; Szewczyk, Jacobson¹⁶²⁾, 2005)。カルパイン系では、 μ -カルパイン (CAPN1) およびm-カルパイン (CAPN2) の2つの主要なアイソザイムが知られており、それぞれ、活性化にはマイクロモルおよびミリモル単位のカルシウム濃度が必要である (Reichrath *et al.*¹³⁹⁾, 2003)。本研究では、麦焼酎粕濃縮液中にDBBが同定されており、DBBにより、FBX032 mRNAの発現が低下したことが示唆された。また、UBBおよびCAPN1 mRNAの発現にはDBBは影響しないことが示唆された。30%焼酎粕区の6から9ヵ月齢のDGは対照区より大きい傾向が

あり、筋タンパク質分解抑制による骨格筋発達が影響したことが示唆された。

血漿3MHの濃度は、処理区間に有意な差はなかった。WardおよびButtery¹⁷⁹⁾ (1980) は、高タンパク質飼料を給与された家畜では、体重当たりの3MHの放出が増加する傾向があることを報告している。このことから、麦焼酎粕濃縮液多給により対照区と比較してCP摂取量が多いことが3MHの放出量を増加させたことにより、3MH濃度に差がなかったことが示唆された。

結論として、高水準での麦焼酎粕濃縮液の給与は、DBBの影響による筋タンパク質分解抑制により、黒毛和種仔牛の筋肉の発達を促進することが示唆された。しかし、高水準での麦焼酎粕濃縮液の給与は、DIP過剰により、第一胃上皮の代謝は活性化しないことが示唆された。このことから、NFCとDIPの最適比率を検討する必要があると考えられた。

III 黒毛和種仔牛の成長、第一胃発達、および筋肉発達に及ぼす稲発酵粗飼料の影響

1 はじめに

黒毛和種の肥育では、 β カロテンおよびビタミンAの摂取量を制限することで、脂肪交雑が増加することが報告されている (Oka *et al.*¹²⁵⁾, 1998a)。それゆえ、黒毛和種の肥育期間、特に肥育中期では、ビタミンAは低い濃度に維持される。稲発酵粗飼料は稲わらと比較して、プロビタミンAである β カロテン含量が高いとされている (金谷⁷⁴⁾, 2007)。肥育後期では、稲発酵粗飼料を給与しても肉質等級および脂肪の質に影響しないことが報告されている (篠田¹⁴⁹⁾, 2007)。黒毛和種の肥育期では、予乾して β カロテン含量を減らした稲発酵粗飼料を給与することが良いとされているが (高平¹⁶⁴⁾, 2011)、肥育期前の9ヵ月齢までの稲発酵粗飼料の影響は明らかにされていない。石橋ら⁶⁴⁾ (1999) は、発育不良な仔牛は健康な仔牛と比較して、血漿中のインスリン様成長因子-1 (IGF-1) およびビタミンA濃度が低いことを報告している。血漿IGF-1濃度はビタミンAの制限により減少することも報告されている (Oka *et al.*¹²⁶⁾, 1998b)。一方で、 β カロテンの投与は、IGF-1を介したタンパク質合成を促進し、ユビキチンを介したタンパク質分解を減少させることにより、ヒラメ筋を肥大させることが報告されている (Kitakaze *et al.*⁷⁹⁾, 2015)。それゆえ、稲発酵粗飼料は黒毛和種仔牛の成長を促進するかもしれない。しかし、最近の研究では、飼料中の β カロテンを増加させても牛の成長に影響しないことも報告されている (Condron *et al.*²⁶⁾, 2014)。

IIIでは、黒毛和種仔牛の成長、第一胃発達、血液代謝、骨格筋の組織化学的性質、および骨格筋の代謝およびタンパク質分解に関連する遺伝子の発現に及ぼす麦焼酎粕濃縮液の影響について検討した。

2 材料および方法

試験区および給与飼料

実験区として、発酵粗飼料給与区 (RWCS区) に5頭を配置した。対照区は、2章実験2と同じ牛群6頭で、RWCS区は3頭および2頭の牛群に分けて試験を行った。RWCS区は、乾草の代替として稲発酵粗飼料を飽食で給与し、濃厚飼料は対照区と同様の条件で給与した。その他の条件は、II-Iの方法で行った。

表20 乾草およびRWCS (稲発酵粗飼料) の飼料成分

		Hay	RWCS
DM	(% of FM)	85.7	37.2
CP	(% of DM)	7.9	7.8
DIP	(% of CP)	63.4	71.3
SIP	(% of CP)	25	56.6
UIP	(% of CP)	36.6	28.7
EE	(% of DM)	2.2	1.7
CF	(% of DM)	33.7	26.5
CA	(% of DM)	5.4	18.7
NDF	(% of DM)	66.9	46.4
NFC	(% of DM)	17.6	25.5
β -carotene	(% of DM)	5.6	19.9

稲発酵粗飼料の調製

稲は水田で1mmの長さに細断した。稲発酵粗飼料は、細断型ロールペーラ (MW1010H; タカキタ株式会社) を用いて梱包および密封し、調製した。

飼料分析

β カロテンは、HPLCにより分析した (自給飼料利用研究会⁶⁶⁾, 2009)。試料 (稲発酵粗飼料) 1gとエタノール15ml、10%ピロガロール溶液1ml、および40%水酸化カリウム溶液1mlを加え、1分間攪拌後、56°Cで20分間けん化した。15mlのヘキサンで3回抽出後、ロータリーエバポレーターを用いて、減圧下でヘキサンを留去した。残留物をエタノール5mlで溶解し、HPLC注入用試料とした。HPLCは第2章で述べた方法で行った。その他の分析は、Iに述べた方法で行った。飼料成分は表20に示した。

第一胃液分析

胃液は、4、6、および9ヵ月齢に朝給餌4時間後に採取した。処理および分析方法はIで述べた方法で行った。

血漿分析

血液は3、4、6、および9ヵ月齢に頸静脈から採取した。10分間、冷却遠心 (1500×g、4°C) し、分析まで-80°Cで貯蔵した。ビタミンA (レチノール) および β カロテンの分析は、Yangら¹⁸⁶⁾ (1992) およびKrukら⁸⁴⁾ (2008) の方法により行った。ビタミンE (α トコフェノール) の分析はYangら¹⁸⁷⁾ (2002) の方法で行った。血漿と等量のエタノールと混合し攪拌後、ヘキサンで抽出し、遠心分離した。ヘキサン抽出物を窒素気流下で乾燥させ、移動相に再懸濁させ、HPLC注入用試料とした。カラムは、X Bridge C18

表21 プライマー配列

Gene of interest	Gene symbol	Accession No.	Sense	Primer sequence (5'-3')	Product size (bp)
F-box protein 32	FBXO32	NM_001046155.1	F	ACATGTGGGTGATCGGATGGA	100
			R	TCTGTGAAGGTGAGGCCCTTG	
tripartite motif containing 63	TRIM63	NM_001046295.1	F	TGGTGAGACAGCCATCCAG	191
			R	GATGGTCTCAGGGGTGTCAGCTA	
Ubiquitin B	UBB	NM_174133.2	F	GACTCGGGGTGATTGAATTTG	86
			R	GTCTTGCCGGTCAGGGTTT	
Calpain 1	CAPN1	NM_174259.2	F	GACGGCAATGGCAAACCTGG	197
			R	TCCGAGTAGCGGGTGATAATGAG	
Calpain 2	CAPN2	NM_001110.086.1	F	GTGGCAAACCTGGTCTGAAGG	172
			R	ATCACTGGTGGAGCTGACAGG	
Calpain 3	CAPN3	NM_174260.2	F	GCTGCTTGTGTCAGGCTGGAG	134
			R	TCGATGTGGCCACTTGGTTC	
branched chain amino-acid transaminase 2, mitochondrial	BCAT2	NM_001013593.2	F	CCGTGCACAAATCCTGTACC	161
			R	CCAGCGTAGCCAGAGCATT	
branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide	BCKDHB	NM_174507.2	F	TGTCGGCTTGCAGACAAGTA	132
			R	TCTGCAAACCTGAATTTCTGCTATGG	
branched chain ketoacid dehydrogenase kinase	BCKDK	NM_001045906.2	F	CACTCGCCTGTACCCGAAGA	144
			R	TCCAGTGGCATTGGGATGAA	
Citrate synthase	CS	NM_001044721.1	F	TTAATAGGCCAGCAAACAGGAC	140
			R	GGCCACAGCATCACCAATAG	
Carnitine palmitoyltransferase 1b	CPT-1b	NM_001034349.2	F	ATCCGTATGTTCCACCAAACAA	107
			R	TCACCCGCGATCATGTAGGA	
Uncoupling protein 3	UCP3	NM_174210.1	F	TTCAGGCCAGCATGCACAC	170
			R	GTCATAGTCCACATCTCACACAG	
Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha	PGC1- α	NM_177945.3	F	AACTTGTTCACAGGTCTGCGTTA	109
			R	TTAGTTTGGCGTCCACACAGAGTTA	
Peroxisome proliferator-activated receptor delta	PPAR δ	NM_001083636.1	F	TTGTGCTCACTTACCAGCAGT	128
			R	AGGCCAGCGCGCTTAGTGTT	
Glucose transporter 4	GLUT4	NM_174604.1	F	GCTTCCAACAGATCGGCTCTG	174
			R	CCAGCCAGGTCTCATGTAGC	
Glucose transporter 1	GLUT1	NM_174602.2	F	GTATGTGGAGCAACTGTGC	134
			R	AGCCAGAAGCAATCTCATC	
Hexokinase 1	HK1	NM_001012668.1	F	GGCGGTAACGTAGGGTACAA	150
			R	GAAACGAGCGCCACTAACTTCA	
Pyruvate dehydrogenase lipoamide kinase isozyme 4	PDK4	NM_001101883.1	F	GGGTGCTCTATTCTAAATGTTG	125
			R	AATGTGCTAGACTGCCCTGTCC	
Cluster of differentiation 36	CD36	NM_001278621.1	F	CTACAGATGTGGCTTGAGCGTGA	116
			R	CAGGGTCCAGGATTGTGTAAGAATG	
phosphoenolpyruvate carboxykinase 1	PCK1	NM_174737.2	F	GTGGCCAGAATTGAAAGCAAGAC	181
			R	TGAACGGGATGACATACATGGTG	
Ribosomal protein S18	RPS18	NM_001033614.2	F	AGATATGCTCATGTGGTGTGAGGA	111
			R	GCGTGGATTCTGCATAATGGTG	

F: forward primer, R: reverse primer.

column (4.6×150mm) (Waters Co, USA) を用いた。移動相は、エタノール:水 (98 : 2)、流速は2.0ml/分、波長は325nm (レチノール)、453nm (β カロテン)、292nm (α トコフェノール) とした。その他の分析は、I および II-I で述べた方法で行った。酵素組織化学的解析および遺伝子発現解析用微量組織採取

II-I と同様の方法で行った。

酵素組織化学的解析

II-I と同様の方法で行った。

RNA単離、cDNA合成、および定量的リアルタイムPCR

FBXO32、TRIM63、UBB、CAPN1、CAPN2、CAPN3、branched-chain aminotransferase 2 (BCAT2)、branched chain keto acid dehydrogenase E1, beta polypeptide (BCKDHB)、BCKDH kinase (BCKDK)、CS、CPT-1b、UCP3、PGC-1 α 、PPAR δ 、GLUT4、GLUT1、HK1、PDK4、CD36、およびPCK1の遺伝子発現を解析した。その他はII-Iと同様の方法で行った。プライマー配列は、表21に示した。

統計処理

統計処理は、R version 3.1.4 (The R Foundation

for Statistical Computing, Vienna, Austria) により行った。解析は、lme4パッケージによる一般化線形混合モデル (GLMM) により行った。処理 (給与飼料) を固定効果とし、各処理区内のセットをランダム効果とした。ビタミンA、 β カロテン、ビタミンE、IGF-1、筋線維割合、および筋線維直径の採取時期ごとの平均値の差の検定は、tukeyの多重比較により行った。3MHおよびBCAAの採取時期ごとの平均値の差の検定は、対応あるt検定により行った。 $P < 0.05$ を有意水準とし、 $0.05 \leq P < 0.10$ を傾向があるとした。

3 結果

飼料摂取量および発育

飼料摂取量は表22に示した。体重および体側の結果は図12および表23に示した。7、8、および9ヵ月齢の体重はRWCS区が対照区より有意に重かった ($P < 0.05$, 図12)。3から9ヵ月齢および6から9ヵ月齢のDG、9ヵ月齢の体高および十字部高、および体高、十字部高、体長、および腹囲の増加率は、RWCS区が対照区より有意に大きかった ($P < 0.05$, 表23)。

表22 対照区 (control) およびRWCS区における飼料および栄養摂取量

	Control	RWCS
DM intake(kg)		
Total	873.2	941.3
Concentrates	558.3	611.0
Formula feed	543.1	593.8
Soybean meal and corn	15.2	17.2
Hay	314.9	-
RWCS	-	330.3
CP intake	139.6	151.2
NFC intake	347.8	403.9
NDF intake	329.3	283.2
TDN intake	557.9	586.6
Percentage of body weight(%)		
Total DM intake	2.66	2.54
Concentrates	1.73	1.68
Formula feed	1.69	1.63
CBDS	-	-
Soybean meal and corn	0.04	0.04
Hay	0.92	-
RWCS	-	0.86
CP intake	0.43	0.41
NFC intake	1.07	1.10
NDF intake	0.99	0.75
TDN intake	1.70	1.59

表23 対照区 (control) およびRWCS区における1日当たりの増体量 (DG) および体測値

		control	RWCS
DG (kg/day)	3-9 mo	0.91 ± 0.03 ^B	1.17 ± 0.04 ^A
	3-6 mo	0.91 ± 0.03	1.12 ± 0.08
	6-9 mo	0.91 ± 0.04 ^B	1.22 ± 0.04 ^A
WH (cm)	initial	91.3 ± 0.9	90.1 ± 0.4
	final	114.9 ± 1.1 ^B	118.5 ± 0.9 ^A
HH (cm)	initial	93.9 ± 0.9	93.6 ± 0.8
	final	116.7 ± 1.2 ^B	120.9 ± 1.3 ^A
BL (cm)	initial	92.6 ± 1.1	91.1 ± 1.8
	final	124.0 ± 1.4	129.8 ± 2.0
CG (cm)	initial	105.9 ± 1.2	105.0 ± 1.3
	final	150.3 ± 1.7	156.2 ± 1.1
BG (cm)	initial	119.6 ± 1.5	121.5 ± 4.6
	final	173.3 ± 1.8	183.1 ± 2.6
	gain	53.6 ± 1.3 ^B	61.7 ± 3.2 ^A

データは平均値±標準誤差, ^{A,B}: $P < 0.05$ (同列). mo: months of age. WH: 体高, HH: 十字部高, BL: 体長, CG: 胸囲, BG: 腹囲

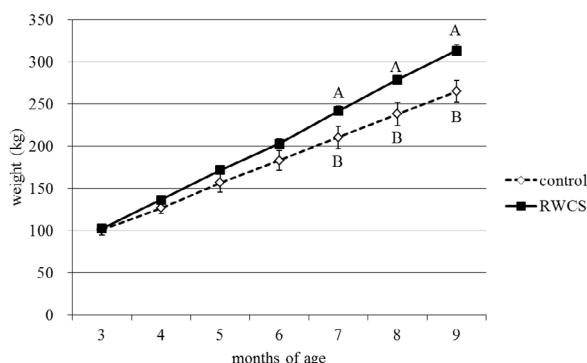


図12 対照区 (control) およびRWCS区における体重の変化

^{A,B}: $P < 0.05$, バーは標準誤差

第一胃内アンモニア態窒素濃度、VFA濃度、およびVFA割合および血漿BHBA濃度

6ヵ月齢のアンモニア態窒素濃度は、RWCS区が対照区より低い傾向があった ($P=0.08$, 表24)。VFA濃度は有意な差はなかった (表24)。9ヵ月齢の酢酸の割合は、RWCS区が高い傾向があり ($P=0.05$, 表24)、プロピオン酸の割合は低い傾向があった ($P=0.09$, 表24)。血漿BHBA濃度は有意な差はなかった (表24)。

血漿中ビタミンA、βカロテン、ビタミンE、およびIGF-1濃度

血漿ビタミンA濃度は、処理区間に有意な差はなかった (表25)。対照区のビタミンA濃度は、6および9ヵ月齢が3ヵ月齢より有意に高く ($P < 0.05$, 表25)、4ヵ月齢は3ヵ月齢より高い傾向であった ($P=0.06$, 表25)。RWCS区は、4、6、および9ヵ月齢の血漿ビタミンA濃度は、3ヵ月齢より有意に高かった ($P < 0.05$, 表25)。血漿βカロテン濃度は、3ヵ月齢は、RWCS区が対照区より高い傾向があり ($P=0.07$, 表25)、4、6、および9ヵ月齢は、RWCS区が対照区より有意に高かった ($P < 0.05$, 表25)。対照区のβカロテン濃度は、9ヵ月齢が3および4ヵ月齢より有意に高く ($P < 0.05$, 表25)、6ヵ月齢より高い傾向であった ($P=0.06$, 表25)。RWCS区のβカロテン濃度は、9ヵ月齢が3、4、および6ヵ月齢より有意に高かった ($P < 0.05$, 表25)。4、6、および9ヵ月齢のビタミンE濃度は、RWCS区が対照区より有意に高かった ($P < 0.05$, 表25)。RWCS区のビタミンE濃度は、9ヵ月齢が4ヵ月齢より有意に高かった ($P < 0.05$, 表25)。対照区の6ヵ月齢のIGF-1濃度は、3ヵ月齢より有意に高く ($P < 0.05$, 表25)、4ヵ月齢より高い傾向であった ($P=0.06$, 表25)。RWCS区の9ヵ月齢のIGF-1濃度は3ヵ月齢より有意に高かった

表24 対照区 (control) およびRWCS区における第一胃内アンモニア態窒素濃度、VFA濃度、およびVFA割合および血漿BHBA濃度

	Months of age	Control		RWCS	
		Value	SE	Value	SE
Ruminal Ammonia-N (mg/100ml)	4	4.1 ± 0.4		4.2 ± 0.9	
	6	5.0 ± 0.3 ^a		4.1 ± 0.4 ^b	
	9	7.2 ± 1.3		4.8 ± 1.0	
VFA concentration (mmol/100ml) in rumen					
Acetate	4	5.62 ± 0.60		5.10 ± 0.51	
	6	4.99 ± 0.31		5.68 ± 0.54	
	9	5.80 ± 0.32		5.61 ± 0.41	
Propionate	4	1.70 ± 0.11		2.08 ± 0.35	
	6	1.69 ± 0.25		2.27 ± 0.63	
	9	1.89 ± 0.13		1.60 ± 0.17	
Butyrate	4	0.90 ± 0.15		0.95 ± 0.28	
	6	0.75 ± 0.12		0.93 ± 0.09	
	9	1.01 ± 0.12		0.93 ± 0.09	
Valerate	4	0.14 ± 0.04		0.18 ± 0.05	
	6	0.10 ± 0.02		0.15 ± 0.09	
	9	0.12 ± 0.02		0.11 ± 0.03	
Total VFA	4	8.52 ± 0.82		8.44 ± 0.89	
	6	7.60 ± 0.67		9.16 ± 1.21	
	9	8.71 ± 0.48		8.49 ± 0.67	
Butyrate+Valerate	4	1.04 ± 0.18		1.14 ± 0.31	
	6	0.85 ± 0.12		1.08 ± 0.14	
	9	1.13 ± 0.13		1.05 ± 0.11	
VFA composition (% mol) in rumen					
Acetate	4	65.69 ± 2.02		60.87 ± 2.66	
	6	66.05 ± 2.47		63.56 ± 3.61	
	9	64.63 ± 0.44 ^b		66.28 ± 0.61 ^a	
Propionate	4	20.57 ± 1.90		24.78 ± 3.23	
	6	22.06 ± 1.46		23.36 ± 3.43	
	9	21.85 ± 1.45 ^a		18.66 ± 0.65 ^b	
Butyrate	4	10.20 ± 1.04		10.75 ± 2.10	
	6	9.65 ± 1.08		10.68 ± 1.33	
	9	11.42 ± 1.00		11.12 ± 0.70	
Valerate	4	1.55 ± 0.54		2.15 ± 0.43	
	6	1.22 ± 0.28		1.26 ± 0.73	
	9	1.37 ± 0.14		1.25 ± 0.32	
Concentration in plasma					
BHBA (μmol/l)	3	231.8 ± 59.1		212.8 ± 42.2	
	6	209.4 ± 16.6		231.1 ± 29.7	
	9	264.5 ± 25.4		322.6 ± 52.4	

データは平均値±標準誤差。^{a,b}: P<0.1 (同列), Ammonia-N: アンモニア態窒素。

表25 対照区 (control) およびRWCS区における血漿中ビタミンA, βカロテン, ビタミンE, およびIGF-1濃度

	Months of age	Control		RWCS	
		Value	SE	Value	SE
Vitamin A (IU/dl)	3	72.3 ± 4.6	^{Yy}	61.2 ± 5.4	^Y
	4	101.8 ± 3.1	^x	105.6 ± 2.9	^x
	6	112.2 ± 2.2	^x	104.9 ± 3.5	^x
	9	114.1 ± 2.0	^x	122.3 ± 3.5	^x
β-Carotene (μg/dl)	3	8.0 ± 0.3	^{by}	12.5 ± 1.0	^{ay}
	4	13.5 ± 1.0	^{BY}	35.0 ± 4.3	^{AY}
	6	26.9 ± 1.3	^{By}	72.8 ± 6.6	^{AY}
Vitamin E (μg/dl)	3	331.3 ± 25.6	^X	338.4 ± 35.5	
	4	108.4 ± 4.3	^{BY}	232.2 ± 21.1	^{AY}
	6	115.6 ± 4.0	^{BY}	343.7 ± 26.8	^A
IGF-1 (ng/ml)	3	203.5 ± 18.2	^{Yz}	186.8 ± 55.6	^y
	4	220.2 ± 29.5	^{yz}	268.2 ± 56.5	
	6	312.5 ± 34.9	^{Xx}	299.2 ± 33.6	
	9	299.5 ± 16.2	^{xy}	369.6 ± 32.4	^x

データは平均値±標準誤差。^{A,B}: P<0.05 (同列), ^{a,b}: P<0.1 (同列), ^{x,y}: P<0.05 (同行), ^{x,y}: P<0.1 (同行)。

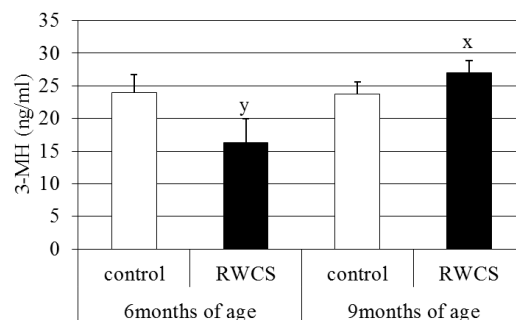


図13 対照区 (control) およびRWCS区における血漿中3-MH (メチルヒスチジン) 濃度

^{x,y}: P<0.1. バーは標準誤差。

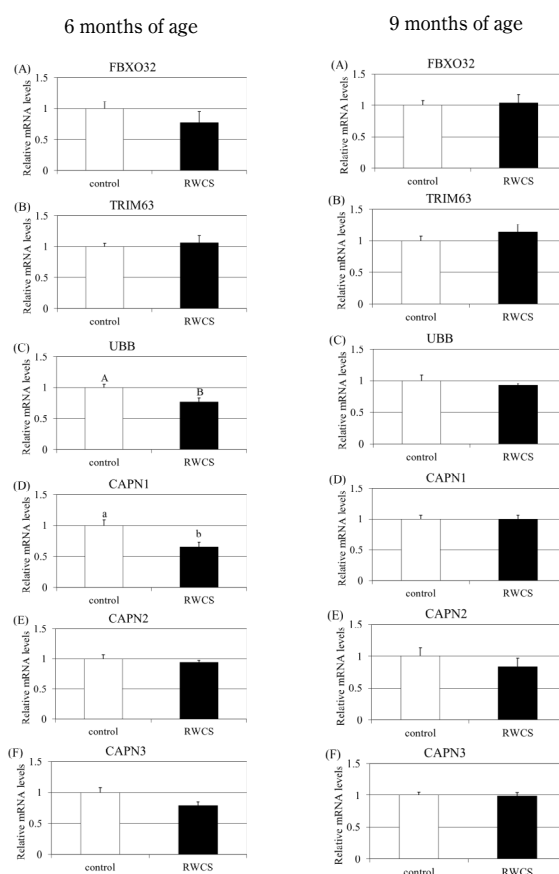


図14 対照区 (control) およびRWCS区における胸最長筋でのFBXO32 (A), TRIM63 (B), UBB (C), CAPN1 (D), CAPN2 (E), およびCAPN3 (F) の遺伝子発現

^{A,B}: P<0.05, ^{a,b}: P<0.1. バーは標準誤差

(P<0.05, 表25)。しかし、処理区間のIGF-1濃度に有意な差はなかった (表25)。

血漿3MH濃度

血漿3MH濃度は、処理区間に有意な差はなかった (図13)。RWCS区の3MH濃度は、6ヵ月齢が9ヵ月齢より低い傾向があった (P=0.07, 図13)。

筋タンパク分解関連遺伝子発現

6ヵ月齢のUBB mRNAの発現は、RWCS区が対照区より有意に低かった (P<0.05, 図14)。6ヵ月齢のCAPN1

表26 対照区 (control) およびRWCS区における血漿中アミノ酸濃度

	6 months of age		9 months of age	
	Control	RWCS	Control	RWCS
Essential amino acid (ng/ml)				
Arginine	132.03 ± 4.54	121.68 ± 6.27	117.30 ± 6.34	121.30 ± 4.64
Histidine	78.56 ± 1.72	65.56 ± 3.87	82.08 ± 2.62	78.91 ± 1.40
Isoleucine	161.72 ± 5.42 ^A	113.27 ± 6.81 ^B	148.72 ± 3.69 ^A	121.76 ± 3.11 ^B
Leucine	227.10 ± 9.94 ^A	146.04 ± 10.48 ^B	225.18 ± 12.11 ^a	163.67 ± 8.02 ^b
Lysine	130.69 ± 5.82 ^A	107.64 ± 12.53 ^B	125.95 ± 6.19	133.86 ± 10.19
Methionine	34.46 ± 0.97 ^a	26.12 ± 1.96 ^b	33.08 ± 1.24	32.19 ± 1.03
Phenylalanine	65.29 ± 3.06 ^A	46.33 ± 2.74 ^B	58.77 ± 2.74 ^a	51.87 ± 0.94 ^b
Threonine	116.12 ± 7.43	80.25 ± 7.09	98.31 ± 4.66	93.92 ± 5.17
Tryptophan	5.20 ± 0.72 ^A	1.97 ± 0.23 ^B	2.45 ± 0.27	2.89 ± 0.21
Valine	428.45 ± 17.51 ^A	287.38 ± 15.44 ^B	411.18 ± 24.04	319.13 ± 19.33
Non-essential amino acid (ng/ml)				
Alanine	265.60 ± 11.12	237.34 ± 14.94	246.42 ± 4.30	241.95 ± 8.73
Aspartic acid	8.96 ± 1.75 ^A	6.58 ± 3.57 ^B	7.16 ± 0.31	6.65 ± 0.66
Asparagine	54.42 ± 0.42	41.13 ± 0.49	51.17 ± 1.79	47.98 ± 1.15
Glutamic acid	56.73 ± 2.07	66.23 ± 6.67	47.42 ± 2.82	49.77 ± 3.75
Glycine	368.83 ± 8.35	386.19 ± 38.52	328.54 ± 11.73	330.95 ± 16.42
Proline	101.15 ± 3.56 ^a	78.67 ± 4.11 ^b	100.15 ± 4.34	85.01 ± 2.87
Serine	104.02 ± 4.25	90.70 ± 5.68	99.71 ± 4.33	94.68 ± 5.38
Tyrosine	66.20 ± 3.23 ^a	46.64 ± 3.75 ^b	60.23 ± 3.48	53.49 ± 1.08
BCAA	817.27 ± 31.53 ^A	546.70 ± 31.90 ^B	785.08 ± 39.07	604.56 ± 29.59

データは平均値±標準誤差。^{A,B}: $P < 0.05$, ^{a,b}: $P < 0.1$.

mRNAおよびCAPN3の発現は、RWCS区が対照区より低い傾向であった ($P=0.097, 0.08$, 図14)。

血漿アミノ酸濃度

6ヵ月齢の血漿アミノ酸濃度は、RWCS区のイソロイシン、ロイシン、リジン、フェニルアラニン、トリプトファン、バリン、アスパラギン酸、およびBCAAの濃度が対照区より有意に低く ($P < 0.05$, 表26)、メチオニン、プロリンおよびチロシンの濃度が低い傾向であった ($P=0.05, 0.09, 0.06$, 表26)。9ヵ月齢のアミノ酸濃度は、RWCS区のイソロイシンの濃度が対照区より有意に低く ($P < 0.05$, 表26)、ロイシンおよびフェニルアラニンの濃度が低い傾向であった ($P=0.099, 0.06$, 表26)。

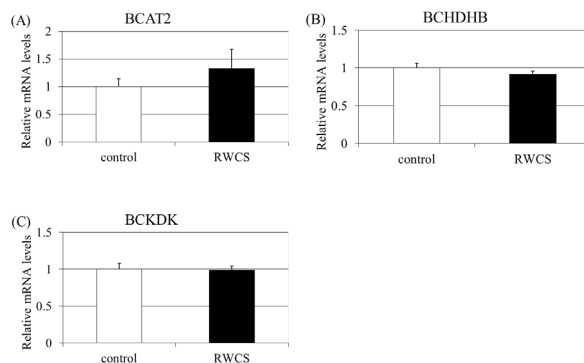


図15 対照区 (control) およびRWCS区における胸最長筋でのBCAT2 (A), BCHDHB (B), およびBCKDK (C) の遺伝子発現

骨格筋BCAA代謝関連遺伝子発現

処理区間に有意な差はなかった (図15)。

表27 対照区 (control) およびRWCS区における胸最長筋の筋線維型構成, 割合, および相対面積

Months of age		Composition of myofiber types (%)				Myofiber diameter (μm)			Relative area of myofiber type (%)			
		I	IIa	IIb		I	IIa	IIb	I	IIa	IIb	
3	Control	23.3 ± 2.2 ^Y	34.4 ± 2.7	42.3 ± 1.9 ^X	26.3 ± 1.8 ^Y	32.9 ± 1.6 ^Y	47.8 ± 1.2 ^Y	10.7 ± 0.7	25.2 ± 1.9	64.1 ± 2.3		
	RWCS	22.4 ± 1.6	32.3 ± 1.8	45.3 ± 2.9	26.8 ± 1.4 ^Z	32.8 ± 0.7 ^Z	45.3 ± 1.1 ^Z	11.2 ± 1.5	24.3 ± 2.5	64.6 ± 3.1		
6	Control	24.9 ± 2.5 ^Y	38.3 ± 2.2	36.9 ± 3.3 ^{XY}	33.0 ± 0.4 ^{BX}	41.4 ± 0.5 ^X	58.5 ± 0.7 ^X	12.5 ± 1.4	30.3 ± 3.9	57.3 ± 4.3		
	RWCS	23.7 ± 1.8	35.7 ± 2.6	40.6 ± 2.3	38.4 ± 0.8 ^{AY}	44.2 ± 1.4 ^Y	58.6 ± 1.2 ^Y	14.4 ± 1.9	28.8 ± 2.4	56.8 ± 3.2		
9	Control	35.8 ± 1.9 ^X	36.2 ± 4.2	28.0 ± 3.6 ^Y	36.8 ± 1.1 ^{BX}	41.8 ± 0.4 ^{BX}	61.6 ± 2.0 ^X	22.6 ± 2.5	29.2 ± 1.9	48.3 ± 3.7		
	RWCS	28.1 ± 3.1	32.6 ± 2.3	39.3 ± 2.9	44.5 ± 1.4 ^{AX}	50.5 ± 1.2 ^{AX}	68.4 ± 2.8 ^X	17.2 ± 1.1	26.1 ± 3.8	56.7 ± 4.1		

データは平均値±標準誤差。^{A,B}: $P < 0.05$ (同一月齢内同行), ^{a,b}: $P < 0.1$ (同一月齢内同行), ^{X,Y}: $P < 0.05$ (同一区内同行).

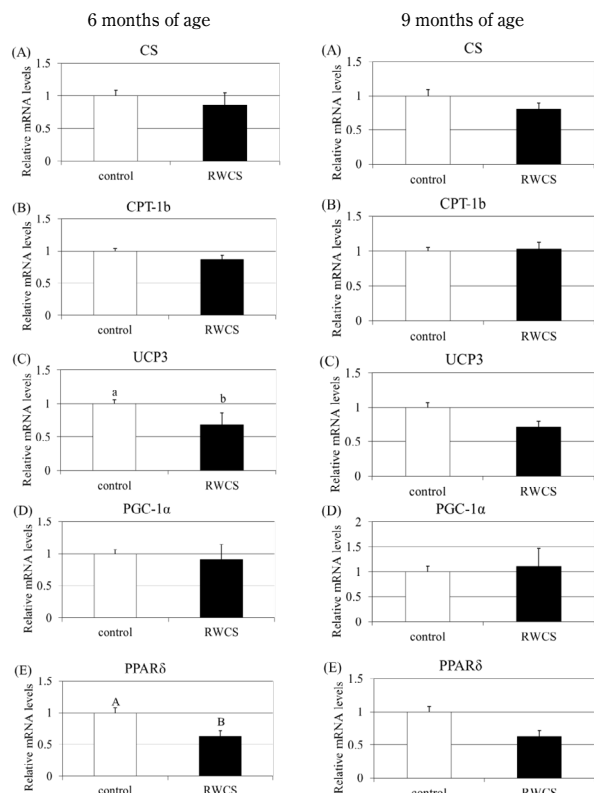


図16 対照区 (control) およびRWCS区における胸最長筋でのCS (A), CPT-1b (B), UCP3 (C), PGC1- α (D), および PPAR δ (E) の遺伝子発現

^{a,b}: $P < 0.05$, ^{a,b}: $P < 0.1$, バーは標準誤差.

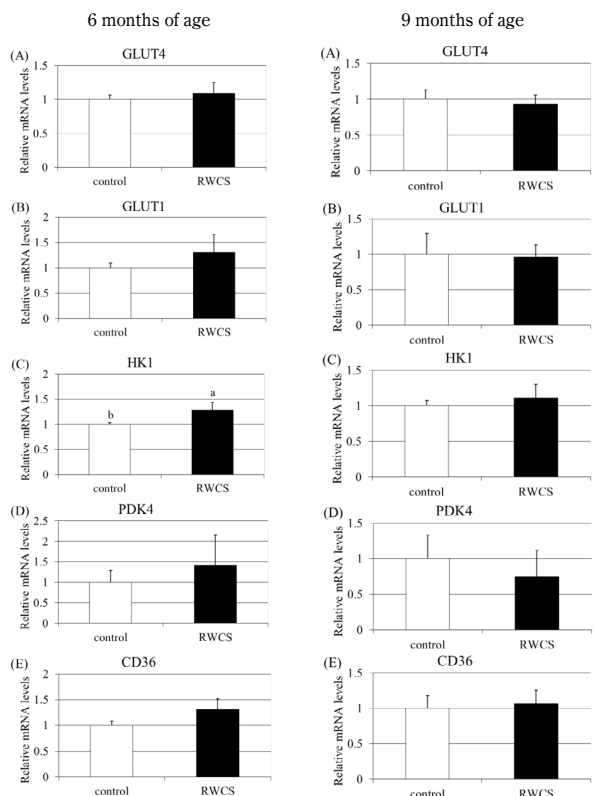


図17 対照区 (control) およびRWCS区における胸最長筋でのGLUT4 (A), GLUT1 (B), HK1 (C), PDK4 (D), および CD36 (E) の遺伝子発現

^{a,b}: $P < 0.1$, バーは標準誤差.

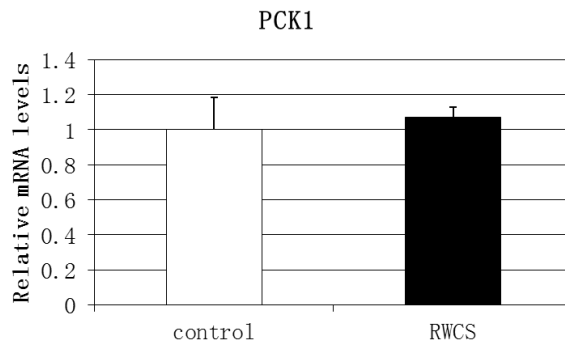


図18 対照区 (control) およびRWCS区における肝臓でPCK1の遺伝子発現

筋線維型構成

筋線維型の割合は、処理区間に有意な差はなかった (表27)。

筋線維直径および相対面積

I型筋線維の直径は、6ヵ月齢はRWCS区が対照区より有意に大きく ($P < 0.05$, 表27)、9ヵ月齢は大きい傾向であった ($P = 0.08$, 表27)。9ヵ月齢のII A型筋線維の直径は、RWCS区が対照区より有意に大きかった ($P < 0.05$, 表27)。RWCS区のすべての筋線維型において、9ヵ月齢の直径が最も大きく、3ヵ月齢が最も小さかった ($P < 0.05$, 表27)。相対面積は、処理区間に有意な差はなかった (表27)。

表28 対照区 (control) およびRWCS区における血漿成分濃度

	Months of age	Control		RWCS	
		Mean	SD	Mean	SD
GOT (IU/l)	3	69.5	5.1	67.8	2.9
	6	69.2	4.5	59.8	3.1
	9	68.5	5.0	51.4	1.3
GGT (IU/l)	3	18.8	2.0	20.4	1.4
	6	17.3	0.9	18.0	0.8
	9	20.5	1.5	18.8	1.6
Glucose (mg/dl)	3	101.5	3.8	97.6	6.9
	6	99.0	1.6	104.0	2.6
	9	100.7	5.4	97.6	2.2
Tcho (mg/dl)	3	99.7	9.6	137.6	18.9
	6	74.5	7.4	88.8	7.4
	9	92.0	7.3	116.0	13.6
BUN (mg/dl)	3	12.9	0.6	13.2	1.6
	6	11.4	1.0	12.8	0.6
	9	12.0	0.7	14.3	1.5
Ammonia (μ g/dl)	3	87.7	12.4	133.2	11.2
	6	69.8	9.3	80.0	10.6
	9	97.0	7.5	103.4	16.9
NEFA (μ Eq/l)	3	269.1	63.6	203.0	60.5
	6	140.1	16.9	133.5	23.5
	9	159.2	14.8	90.7	11.4
Lactate (μ mol/l)	3	2.88	0.74	2.78	0.41
	6	6.65	1.06	3.82	1.62
	9	2.89	0.38	2.16	0.41

データは平均値 \pm 標準誤差.

骨格筋代謝関連遺伝子発現

6ヵ月齢のUCP3 mRNAの発現は、RWCS区が対照区より低い傾向があり ($P=0.09$, 図16)、PPAR δ mRNAの発現は有意に低かった ($P<0.05$, 図16)。6ヵ月齢のHK1 mRNAの発現は、RWCS区が有意に高かった ($P<0.05$, 図17)。9ヵ月齢では、処理区間に有意な差はなかった。

肝臓におけるPCK1 mRNAの発現

処理区間に有意な差はなかった (図18)。

血漿中GOT、GGT、グルコース、Tcho、BUN、アンモニア、NEFA、および乳酸濃度

処理区間に有意な差はなかった (表28)。

4 考察

体重、体高、十字部高、体長、および腹囲は、WCS区が対照区より大きかった。十字部高の骨格の大きさや成長と関連があるとされている (Vargas *et al.*¹⁷³, 1999)。このことから、稲発酵粗飼料の仔牛への給与は、成長を促進し、生産物の成績にもより良い効果があることが示唆された。

本研究では、対照区と比較して、RWCS区は血漿中 β カロテン濃度が有意に高かったが、ビタミンA濃度に有意な差はなかった。Jinら⁶⁵ (2015) は、 β カロテンの給与は、血清レチノール濃度に影響しないことを報告しており、給与された β カロテンの大部分はそのまま吸収され、肝臓に輸送され、一部はレチノールに変換されるが、ビタミンAが欠乏していない状態では、 β カロテンのまま貯蔵されるとしている。本研究でも、ビタミンAが欠乏していないことから、 β カロテンのまま貯蔵され、血漿中ビタミンA濃度に影響しなかったと考えられた。 α トコフェノールおよび β カロテンは、人間および動物にとって重要な抗酸化物質であり、健康や免疫において良い効果をもたらす (Lindqvist *et al.*⁸⁸, 2012)。それゆえ、稲発酵粗飼料の給与は、仔牛の健康や免疫に良い効果をもたらすと考えられた。

6ヵ月齢の血漿3MH濃度は、RWCS区が対照区より低い値を示した ($P=0.12$)。また、稲発酵粗飼料の給与は6から9ヵ月齢の間に血漿3MH濃度を減少させた。 β カロテンは、Atrogin-1 (FBX032) およびMurfl (TRIM63) mRNAの発現に影響することなく、ユビキチン結合を減少させるとされている (Kitakaze *et al.*⁷⁹, 2015)。また、筋萎縮は酸化物の増加と関連があり、酸化ストレスは骨格筋タンパク質分解を促進するとされている (Powers *et al.*¹³⁵, 2007)。タンパク

質酸化の増加は、CAPN1、CAPN2、およびカスパーセ3による筋原繊維タンパク質分解の段階的な増加をもたらす (Smuder *et al.*¹⁵¹, 2010)。これらのことから、抗酸化物質である β カロテンがUBBおよびCAPN1 mRNA発現レベルを低下させ、筋タンパク質分解を抑制したことが示唆された。しかし、9ヵ月齢では、タンパク質分解抑制に関連する遺伝子の発現に差はなかった。高濃度のビタミンEは β カロテンの吸収を妨害する。これは、血液中で輸送されたときに β カロテンと α トコフェノールの両方がリポタンパク質に結合するので、それらはリポタンパク質分子上の結合部位について互いに競合することによるとされている (Pellett *et al.*¹³³, 1994; Yang *et al.*¹⁸⁷, 2002)。本研究では、血漿中ビタミンE濃度は、RWCS区が有意に高く、また、RWCS区では4ヵ月齢から9ヵ月齢の間にビタミンE濃度は有意に増加した。このことから、高濃度の β カロテンが β カロテンの吸収を阻害したことにより、9ヵ月齢では、タンパク質分解抑制効果が消失したことが示唆された。

稲発酵粗飼料の給与は、乾草の給与と比較して、いくつかの血漿アミノ酸濃度を減少させた。Swanepoelら¹⁶¹ (2016) は、腸への微生物タンパク質の流れは、飼料中のタンパク質の供給源によって影響されなかったが、おそらく飼料中タンパク質源の中のUIPのアミノ酸プロファイルの差異に起因して、アミノ酸の腸への通過が異なることを報告している。このことから、稲発酵粗飼料と乾草のUIPの違いが影響したのかもしれない。BCAAの分解は、主に分枝鎖アミノトランスフェラーゼアイソザイム (ミトコンドリアBCATm (BCAT2) および細胞質ゾルBCATc) による可逆的アミノ基転移を介してミトコンドリアで起こり、対応する分枝鎖ケト酸を生成し、分枝鎖ケト酸によって酸化的脱カルボキシル化される。酸性デヒドロゲナーゼ (BCKDH) と反応させて補酵素Aエステルを生成する。これらの2つの反応を触媒する酵素は、3つのBCAAに共通している (Hatazawa *et al.*⁴⁸, 2009)。第二段階酵素BCKDHは、個々の分枝鎖ケト酸をそれぞれの分解経路に受け渡す不可逆反応を触媒し (Shimomura *et al.*¹⁴⁷, 2001)、3つのBCAAの異化作用において最も重要な調節酵素であると考えられている (Shimomura *et al.*¹⁴⁸, 2006)。BCKDH活性は、BCKDHキナーゼ (BCKDK) によって調節され、BCKDHのリン酸化は、その酵素活性を弱める (Shimomura *et al.*¹⁴⁷, 2001)。本研究では、BCAT2、BCKDH、およびBCKDK mRNAの発現は、処理区間に有意な差はなかった。このことから、稲発酵

粗飼料の給与は骨格筋のBCAAの代謝には影響しないことが示唆された。本研究では、血漿BCAA濃度は、6ヵ月齢は、RWCS区が対照区より有意に低かったが、9ヵ月齢では差はなかった。血漿BCAA濃度は、それらの出現速度と消失速度との間のバランスを表し (Lynch *et al.*⁹²⁾, 2015)、BCAA出現率に影響を及ぼす因子には、飼料およびタンパク質分解に起因する組織におけるタンパク質分解が含まれる (Lynch, Adams⁹¹⁾, 2014)。このことから、6ヵ月齢時のタンパク質分解抑制により、血中へのBCAAの放出量が減少したことが示唆された。

稲発酵粗飼料の給与により、I型およびIIA型筋線維が肥大した。Kitakazeら⁷⁹⁾ (2015) は、 β カロテンがマウスのI型筋線維主体のヒラメ筋を肥大させることを報告している。このことから、9ヵ月齢時には、ビタミンEに β カロテンの吸収が阻害しているが、阻害されるまでの間に高い β カロテン濃度の効果により酸化型筋線維が肥大したことが示唆された。対照区は、期間中I型筋線維が有意に増加したが、RWCS区では有意な変化はなかった。RWCS区では、6ヵ月齢においてPPAR δ mRNAの発現が、対照区と比較して低かった。このことから、低いPPAR δ mRNAの発現レベルによりII型からI型への変化が抑制されたことが示唆された。

結論として、稲発酵粗飼料の給与は血漿 β カロテンおよびビタミンE濃度を増加させるが、ビタミンA濃度には影響しない。稲発酵粗飼料給与による血漿 β カロテン濃度の増加によるUBBおよびCAPN1 mRNA発現の低下により、骨格筋タンパク質分解が抑制されることが示唆された。しかし、高濃度の血漿ビタミンE濃度により、9ヵ月齢までの間に、タンパク質分解関連遺伝子の発現に及ぼす影響は消失することが示唆された。

IV 麦焼酎粕濃縮液および稲発酵粗飼料を混合した発酵飼料が黒毛和種仔牛の成長、第一胃発酵、および筋肉発達に及ぼす影響

1 はじめに

麦焼酎粕濃縮液は水分含量が70%程度と高く、単独で利用するよりも、他の飼料と混合することで、給与が容易になる。IIIでは、稲発酵粗飼料を仔牛に給与することで、発育を促進することが明らかにされており、麦焼酎粕濃縮液および稲発酵粗飼料を混合することは、仔牛の発育にとってより効果的であると考えられる。II-IIで、多量の麦焼酎粕濃縮液の給与は、タンパク質分解抑制効果が示唆されたが、成長および第一胃の酪酸の代謝に効果は認められなかった。そのため、最大の窒素利用と微生物効率を得るためには、DIPとNFCのバランスを考慮する必要があると考えられた。そこで、麦焼酎粕濃縮液および稲発酵粗飼料に加えて、麦圧ペン（食用規格外）を混合し、NFC含量を高めた混合発酵飼料を調製した。

IVでは、麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、および麦圧ペンを混合した発酵混合飼料の給与が、黒毛和種仔牛の発育、第一胃発酵、血液代謝、骨格筋の組織化学的性質、および骨格筋の代謝およびタンパク質分解に関連する遺伝子の発現に及ぼす影響について検討した。

2 材料および方法

試験区および給与飼料

実験区として発酵混合飼料給与区（FMR区）に6頭を配置した。対照区は、II-IIと同じ牛群で、FMR区は3頭の牛群2つに分けて行った。FMR区は、発酵混合飼料および配合飼料を給与した。発酵混合飼料中の麦焼酎粕濃縮液および麦圧ペンで配合飼料の一部を代替するため、配合飼料の給与量は、対照区の開始時2.1%から終了時1.4%に対して、FMR区は開始時1.8%から終了時0.8%まで漸減させて給与した。その他の条件は、II-Iの方法で行った。

発酵混合飼料の調製

乾物当たり麦焼酎粕濃縮液15%、稲発酵粗飼料65%、および麦圧ペン20%をコンプリートフィーダーで混合後、細断型ロールペーラ（MW1010H）を用いて梱包および密封し、調製した。

飼料分析

分析は、IおよびIIIで述べた方法で行った。飼料成分は表29に示した。

表29 乾草およびFMRfeedの飼料成分

		Hay	FMR feed
DM	(% of FM)	85.7	42.3
CP	(% of DM)	7.9	13.6
DIP	(% of CP)	63.4	76.7
SIP	(% of CP)	25	68.9
UIP	(% of CP)	36.6	23.3
EE	(% of DM)	2.2	2.9
CF	(% of DM)	33.7	17.4
CA	(% of DM)	5.4	14.3
NDF	(% of DM)	66.9	33.6
NFC	(% of DM)	17.6	35.5
β-carotene	(% of DM)	5.6	7.3

FMRfeed: 麦焼酎粕濃縮液, 稲発酵粗飼料, および麦圧ペンを混合した発酵混合飼料

表30 対照区 (control) およびFMR区における飼料および栄養摂取量

	Control	FMR
DM intake(kg)		
Total	873.2	956.4
Concentrates	558.3	593.1
Formula feed	543.1	391.5
CBDS	-	86.4
barley	-	115.2
Soybean meal and corn	15.2	-
Hay	314.9	-
RWCS	-	363.3
CP intake	139.6	154.9
NFC intake	347.8	407.7
NDF intake	329.3	273.2
TDN intake	557.9	610.7
Percentage of body weight(%)		
Total DM intake	2.66	2.62
Concentrates	1.73	1.67
Formula feed	1.69	1.15
CBDS	-	0.23
barley	-	0.29
Soybean meal and corn	0.04	-
Hay	0.92	-
RWCS	-	0.95
CP intake	0.43	0.43
NFC intake	1.07	1.13
NDF intake	0.99	0.74
TDN intake	1.70	1.68

CBDS: 麦焼酎粕濃縮液, RWCS: 稲発酵粗飼料.

第一胃液分析

胃液は、4、6、および9ヵ月齢に朝給餌4時間後に採取した。処理および分析方法はIで述べた方法で行った。

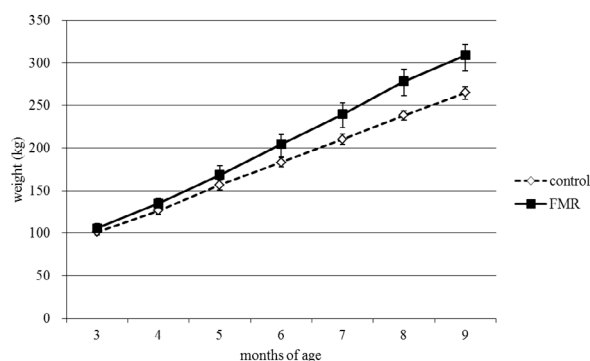


図19 対照区 (control) およびFMR区における体重の変化
バーは標準誤差。

表31 対照区 (control) およびFMR区における1日当たりの増体量 (DG) および体測値

		Control	FMR
DG (kg/day)	3 - 9 mo	0.91 ± 0.03 ^B	1.13 ± 0.07 ^A
	3 - 6 mo	0.91 ± 0.03 ^b	1.10 ± 0.09 ^a
	6 - 9 mo	0.91 ± 0.04 ^B	1.16 ± 0.07 ^A
WH (cm)	initial	91.3 ± 0.9	89.6 ± 1.4
	final	114.9 ± 1.1	117.0 ± 1.3
	gain	23.5 ± 0.1	27.4 ± 0.9
HH (cm)	initial	93.9 ± 0.9	93.9 ± 1.4
	final	116.7 ± 1.2	118.5 ± 1.4
	gain	22.8 ± 0.1 ^b	24.7 ± 0.5 ^a
BL (cm)	initial	92.6 ± 1.1	90.5 ± 2.0
	final	124.0 ± 1.4	128.6 ± 2.1
	gain	31.3 ± 0.1 ^b	38.1 ± 1.1 ^a
CG (cm)	initial	105.9 ± 1.2	104.5 ± 2.5
	final	150.3 ± 1.7	154.4 ± 2.9
	gain	44.4 ± 1.0 ^B	49.8 ± 1.0 ^A
BG (cm)	initial	119.6 ± 1.5	122.0 ± 4.2
	final	173.3 ± 1.8	183.8 ± 5.2
	gain	53.6 ± 1.3 ^B	61.8 ± 1.5 ^A

データは平均値±標準誤差。^{A,B}: $P < 0.05$ (同列), ^{a,b}: $P < 0.1$ (同列). mo: months of age, WH: 体高, HH: 十字部高, BL: 体長, CG: 胸囲, BG: 腹囲

血漿分析

血液は3、4、6および9ヵ月齢に頸静脈から採取した。分析は、I、II、およびIIIで述べた方法で行った。

酵素組織化学的解析および遺伝子発現解析用微量組織採取

II-Iと同様の方法で行った。

酵素組織化学的解析

II-Iと同様の方法で行った。

RNA単離、cDNA合成、および定量的リアルタイムPCR

II-Iと同様の方法で行った。プライマー配列は、表21に示した。

8) 統計処理

IIIと同様の方法で行った。

3 結果

飼料摂取量および発育

飼料摂取量は表30に示した。体側結果は、図19および表31に示した。体重は有意な差は無かった (図19)。3から9および6から9ヵ月齢のDG、胸囲および腹囲の増加率は、FMR区が対照区より有意に大きく ($P < 0.05$, 表31)、3から6ヵ月齢のDG、十字部高および体長の増加率は大きい傾向があった ($P = 0.07$, 表31)。

第一胃内アンモニア態窒素濃度、VFA濃度、およびVFA割合および血漿BHBA濃度

6ヵ月齢の吉草酸濃度、および酪酸および吉草酸の総濃度は、FMR区が対照区より高い傾向があった

表32 対照区 (control) およびFMR区における第一胃内アンモニア態窒素濃度、VFA濃度、およびVFA割合および血漿BHBA濃度

	months of age	Control	FMR
Ruminal ammonia-N (mg/100ml)	4	4.1 ± 0.4	5.1 ± 1.0
	6	5.0 ± 0.3	5.7 ± 1.0
	9	7.2 ± 1.3	6.8 ± 1.1
VFA concentration (mmol/100ml) in rumen			
Acetate	4	5.62 ± 0.60	5.31 ± 0.50
	6	4.99 ± 0.31	5.21 ± 0.33
	9	5.80 ± 0.32	5.35 ± 0.16
Propionate	4	1.70 ± 0.11	1.91 ± 0.15
	6	1.69 ± 0.25	1.45 ± 0.09
	9	1.89 ± 0.13	1.63 ± 0.06
Butyrate	4	0.90 ± 0.15	1.20 ± 0.18
	6	0.75 ± 0.12	1.19 ± 0.17
	9	1.01 ± 0.12	0.92 ± 0.07
Valerate	4	0.14 ± 0.04	0.19 ± 0.02
	6	0.10 ± 0.02 ^b	0.18 ± 0.04 ^a
	9	0.12 ± 0.02	0.16 ± 0.01
Total VFA	4	8.52 ± 0.82	8.76 ± 0.67
	6	7.60 ± 0.67	8.28 ± 0.53
	9	8.71 ± 0.48	8.26 ± 0.22
Butyrate + Valerate	4	1.04 ± 0.18	1.39 ± 0.18
	6	0.85 ± 0.12 ^b	1.36 ± 0.20 ^a
	9	1.13 ± 0.13	1.08 ± 0.07
VFA composition (% mol) in rumen			
Acetate	4	65.69 ± 2.02 ^a	60.32 ± 2.03 ^b
	6	66.05 ± 2.47	63.03 ± 1.49
	9	64.63 ± 0.44	64.72 ± 0.67
Propionate	4	20.57 ± 1.90	22.46 ± 2.49
	6	22.06 ± 1.46 ^A	17.83 ± 1.34 ^B
	9	21.85 ± 1.45	19.75 ± 0.51
Butyrate	4	10.20 ± 1.04	13.35 ± 1.58
	6	9.65 ± 1.08 ^B	13.99 ± 1.33 ^A
	9	11.42 ± 1.00	11.13 ± 0.81
Valerate	4	1.55 ± 0.54	2.23 ± 0.29
	6	1.22 ± 0.28	2.07 ± 0.43
	9	1.37 ± 0.14	1.96 ± 0.15
Concentration in plasma			
BHBA (μmol/l)	3	231.8 ± 59.1	211.7 ± 26.0
	6	209.4 ± 16.6 ^B	447.4 ± 52.3 ^A
	9	264.5 ± 25.4	323.9 ± 45.2

データは平均値±標準誤差。^{A,B}: $P < 0.05$ (同列), ^{a,b}: $P < 0.1$ (同列). Ammonia-N: アンモニア態窒素。

表33 対照区 (control) およびFMR区における血漿中ビタミンA、βカロテン、ビタミンE、およびIGF-1濃度

	Months of age	Control		FMR	
		Mean	SE	Mean	SE
Vitamin A (IU/dl)	3	72.3	4.6 ^{Yy}	71.0	6.1 ^Y
	4	101.8	3.1 ^x	100.1	8.2 ^y
	6	112.2	2.2 ^X	104.1	7.7 ^{Xx}
	9	114.1	2.0 ^X	87.0	8.4 ^{Xy}
β-Carotene (μg/dl)	3	8.0	0.3 ^Y	7.6	0.8 ^Z
	4	13.5	1.0 ^Y	16.6	1.4 ^Z
	6	26.9	1.3 ^y	35.3	2.8 ^Y
	9	52.0	5.2 ^{Xx}	56.2	5.5 ^X
Vitamin E (μg/dl)	3	331.3	25.6 ^X	368.6	31.6 ^x
	4	108.4	4.3 ^Y	217.9	21.7 ^{Yy}
	6	115.6	4.0 ^Y	243.9	44.2 ^Y
	9	121.7	5.5 ^{BY}	450.4	61.4 ^{AX}
IGF-1 (ng/ml)	3	203.5	18.2 ^{Yz}	169.8	27.5
	4	220.2	29.5 ^{yz}	215.3	45.2
	6	312.5	34.9 ^{Xx}	253.5	34.3
	9	299.5	16.2 ^{xy}	282.5	30.6

データは平均値±標準誤差。A,B: P < 0.05 (同列), X,Y: P < 0.05 (同行), x,y: P < 0.1 (同行)。

(P=0.099, 0.05、表32)。4ヵ月齢の酢酸の割合はFMR区が対照区より低い傾向であった (P=0.09、表32)。6ヵ月齢のFMR区は対照区と比較して、プロピオン酸の割合は有意に低く、酪酸の割合は有意に高かった (P<0.05、表32)。6ヵ月齢の血漿BHBA濃度は、FMR区が対照区より有意に高かった (P<0.05、表32)。血漿中ビタミンA、βカロテン、ビタミンE、およびIGF-1濃度

ビタミンA、βカロテン、およびIGF-1濃度は、処理区間に有意な差はなかった (表33)。FMR区のビタミンA濃度は、3ヵ月齢より4ヵ月齢は高い傾向があり (P=0.07、表33)、6ヵ月齢は有意に高かった (P<0.05、表33)。FMR区のβカロテン濃度は、9ヵ月齢は、3、4、および6ヵ月齢より有意に高く、6ヵ月齢は、3および4ヵ月齢より有意に高かった (P<0.05、表33)。9ヵ月齢のビタミンE濃度は、FMR区が対照区より有意に高かった (P<0.05、表33)。FMR区のビタミンE濃度は、9ヵ月齢は、4および

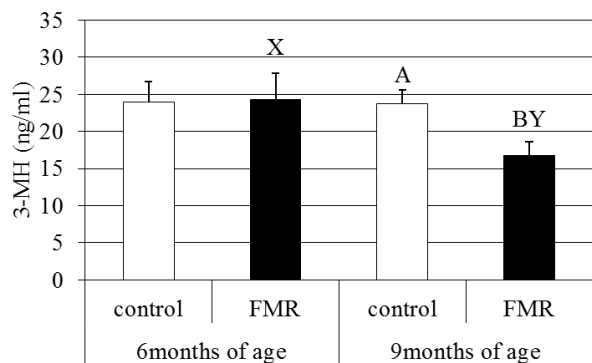


図20 対照区 (control) およびFMR区における血漿3-MH (メチルヒスチジン) 濃度

A,B: P < 0.05, X,Y: P < 0.05.

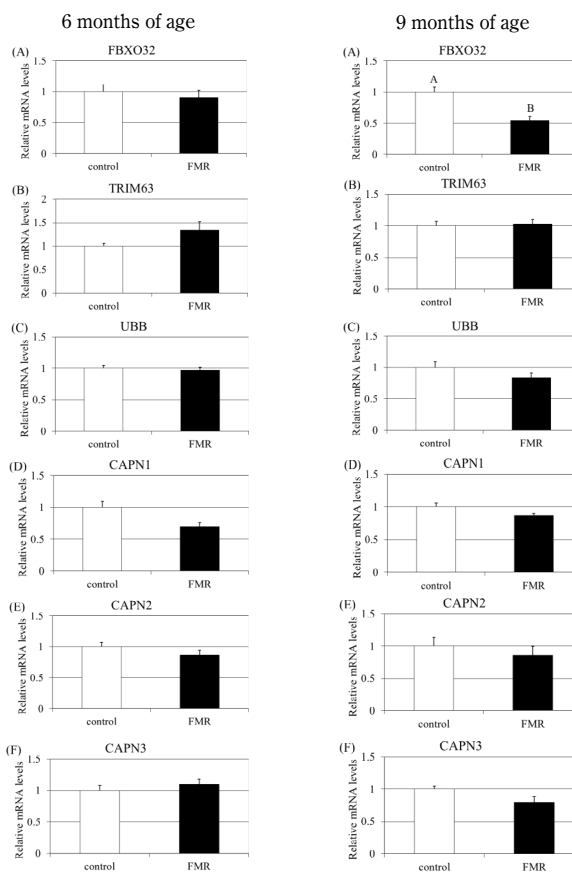


図21 対照区 (control) およびFMR区における胸最長筋でのFBXO32 (A), TRIM63 (B), UBB (C), CAPN1 (D), CAPN2 (E), およびCAPN3 (F) の遺伝子発現

A,B: P < 0.05, バーは標準誤差。

6ヵ月齢より有意に高く (P<0.05、表33)。4ヵ月齢は3ヵ月齢より低い傾向があった (P=0.09、表33)。

血漿3MH濃度

9ヵ月齢の血漿3MH濃度は、FMR区が対照区より有意に低かった (P<0.05、図20)。FMR区の3MH濃度は、9ヵ月齢が6ヵ月齢より有意に低かった (P<0.05、図20)。

タンパク質分解関連遺伝子発現

9ヵ月齢のFBXO32 mRNAの発現は、FMR区が対照区より有意に低かった (P<0.05、図21)。

血漿アミノ酸濃度

6ヵ月齢のアミノ酸濃度では、イソロイシン、ロイシン、リジン、フェニルアラニン、バリン、アルギニン、プロリン、セリン、およびBCAA濃度は、FMR区が対照区より有意に低く (P<0.05、表34)、メチオニン、アラニン、およびアスパラギン酸の濃度は低い傾向があった (P=0.08, 0.09, 0.06、表34)。グルタミン酸濃度は、FMR区が対照区より高い傾向があった (P=0.08、表34)。9ヵ月齢のアミノ酸濃度

表34 対照区 (control) およびFMR区における血漿アミノ酸濃度

	6 months of age		9 months of age	
	Control	FMR	Control	FMR
Essential amino acid (ng/ml)				
Arginine	132.03 ± 4.54	117.33 ± 5.70	117.30 ± 6.34	91.00 ± 7.62
Histidine	78.56 ± 1.72	57.41 ± 5.36	82.08 ± 2.62 ^a	60.47 ± 4.73 ^b
Isoleucine	161.72 ± 5.42 ^A	119.82 ± 7.08 ^B	148.72 ± 3.69 ^A	100.95 ± 8.71 ^B
Leucine	227.10 ± 9.94 ^A	128.98 ± 13.21 ^B	225.18 ± 12.11 ^A	122.43 ± 12.68 ^B
Lysine	130.69 ± 5.82 ^A	113.20 ± 9.06 ^B	125.95 ± 6.19	113.97 ± 9.14
Methionine	34.46 ± 0.97 ^a	27.89 ± 1.30 ^b	33.08 ± 1.24 ^A	25.08 ± 1.94 ^B
Phenylalanine	65.29 ± 3.06 ^A	50.53 ± 3.59 ^B	58.77 ± 2.74 ^A	44.09 ± 3.97 ^B
Threonine	116.12 ± 7.43	89.61 ± 10.71	98.31 ± 4.66 ^a	73.87 ± 6.14 ^b
Tryptophan	5.20 ± 0.72	3.38 ± 0.58	2.45 ± 0.27	5.00 ± 1.39
Valine	428.45 ± 17.51 ^A	279.51 ± 24.81 ^B	411.18 ± 24.04 ^a	242.61 ± 20.98 ^b
Non-essential amino acid (ng/ml)				
Alanine	265.60 ± 11.12 ^a	236.27 ± 11.32 ^b	246.42 ± 4.30 ^A	202.17 ± 13.59 ^B
Aspartic acid	8.96 ± 1.75 ^a	7.59 ± 2.31 ^b	7.16 ± 0.31 ^B	13.22 ± 2.49 ^A
Asparagine	54.42 ± 0.42 ^A	42.69 ± 0.31 ^B	51.17 ± 1.79	38.90 ± 3.32
Glutamic acid	56.73 ± 2.07 ^b	71.58 ± 2.42 ^a	47.42 ± 2.82	51.95 ± 4.55
Glycine	368.83 ± 8.35	383.36 ± 25.50	328.54 ± 11.73	321.40 ± 32.80
Proline	101.15 ± 3.56 ^A	77.48 ± 3.01 ^B	100.15 ± 4.34 ^a	67.96 ± 4.98 ^b
Serine	104.02 ± 4.25 ^A	87.66 ± 3.99 ^B	99.71 ± 4.33	109.58 ± 12.42
Tyrosine	66.20 ± 3.23	57.73 ± 3.00	60.23 ± 3.48	52.76 ± 3.96
BCAA	817.27 ± 31.53 ^A	528.31 ± 44.52 ^{BX}	785.08 ± 39.07 ^A	465.99 ± 41.32 ^{BY}

データは平均値±標準誤差. ^{A,B}: P<0.05 (同一月齢内同列). ^{a,b}: P<0.1 (同一月齢内同列). ^{X,Y}: P<0.05 (同一区内同列). ^{x,y}: P<0.1 (同一区内同列).

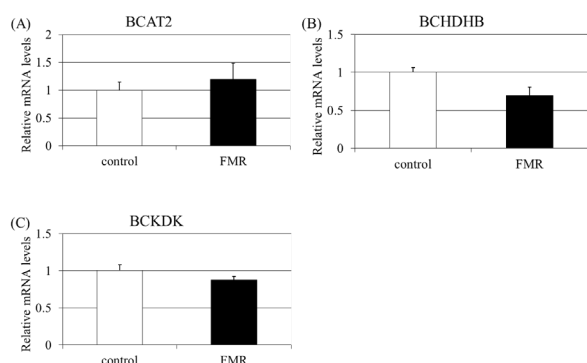


図22 対照区 (control) およびFMR区における胸最長筋でのBCAT2 (A), BCHDHB (B), およびBCKDK (C) の遺伝子発現

バーは標準誤差.

では、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、アラニン、およびBCAA濃度が有意に低く (P<0.05、表34)、ヒスチジン、スレオニン、バリン、およびプロリンの濃度は低い傾向であった

(P=0.06、0.095、0.07、0.07、表34)。9ヵ月齢のアスパラギン酸濃度は、FMR区が対照区より有意に高かった (P<0.05、表34)。FMR区のBCAA濃度は、9ヵ月齢が6ヵ月齢より有意に低かった (P<0.05、表34)。

骨格筋BCAA代謝関連遺伝子発現

処理区間に有意な差は無かった (図22)。

筋線維型構成

9ヵ月齢のI型筋線維の割合は、FMR区が対照区より有意に低かった (P<0.05、表35)。6および9ヵ月齢のII B型筋線維の割合は、FMR区が対照区より有意に高かった (P<0.05、表35)。

9) 筋線維直径および相対面積

6ヵ月齢のI型筋線維の直径は、FMR区が対照区より大きい傾向があり (P=0.05、表35)、9ヵ月齢のI型およびII A型筋線維の直径は、FMR区が対照区より

表35 対照区 (control) およびFMR区における胸最長筋の筋線維型構成, 割合, および相対面積

Month	s	Composition of myofiber types (%)			Myofiber diameter (μm)			Relative area of myofiber type (%)		
		I	II A	II B	I	II A	II B	I	II A	II B
3	Control	23.3 ± 2.2 ^Y	34.4 ± 2.7	42.3 ± 1.9 ^X	26.3 ± 1.8 ^Y	32.9 ± 1.6 ^Y	47.8 ± 1.2 ^Y	10.7 ± 0.7	25.2 ± 1.9	64.1 ± 2.3
	FMR	20.8 ± 0.6	33.4 ± 1.7	45.8 ± 1.8	27.5 ± 1.9 ^Z	31.9 ± 1.6 ^Z	45.7 ± 1.1 ^Z	11.0 ± 1.4	23.4 ± 2.0	65.7 ± 2.5
6	Control	24.9 ± 2.5 ^Y	38.3 ± 2.2	36.9 ± 3.3 ^{BXY}	33.0 ± 0.4 ^{BX}	41.4 ± 0.5 ^X	58.5 ± 0.7 ^X	12.5 ± 1.4	30.3 ± 3.9	57.3 ± 4.3
	FMR	21.8 ± 3.2	33.8 ± 1.3	44.4 ± 2.3 ^A	39.1 ± 1.1 ^{AV}	42.1 ± 1.2 ^V	57.4 ± 2.4 ^V	14.2 ± 2.5	25.1 ± 1.1	60.7 ± 2.5
9	Control	35.8 ± 1.9 ^{AX}	36.2 ± 4.2	28.0 ± 3.6 ^{BY}	36.8 ± 1.1 ^{BX}	41.8 ± 0.4 ^{BX}	61.6 ± 2.0 ^X	22.6 ± 2.5	29.2 ± 1.9	48.3 ± 3.7 ^B
	FMR	23.9 ± 1.6 ^B	33.0 ± 2.8	43.2 ± 2.2 ^A	45.6 ± 1.5 ^{AX}	51.6 ± 2.3 ^{AX}	66.0 ± 2.4 ^X	15.4 ± 1.2	26.9 ± 2.0	57.7 ± 1.7 ^A

データは平均値±標準誤差. ^{A,B}: P<0.05 (同一月齢内同列). ^{a,b}: P<0.1 (同一月齢内同列). ^{X,Y}: P<0.05 (同一区内同列).

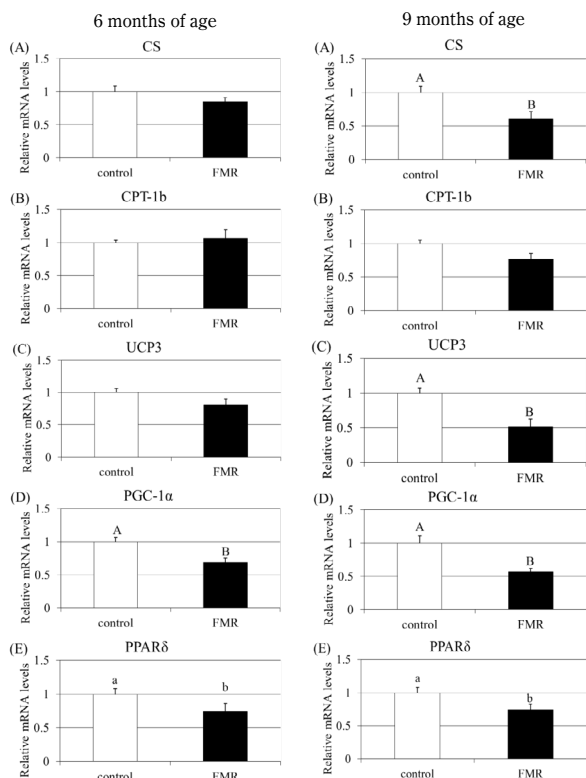


図23 対照区 (control) およびFMR区における胸最長筋でのCS (A), CPT-1b (B), UCP3 (C), PGC-1 α (D), および PPAR δ (E) の遺伝子発現
A,B: $P < 0.05$, a,b: $P < 0.1$, バーは標準誤差.

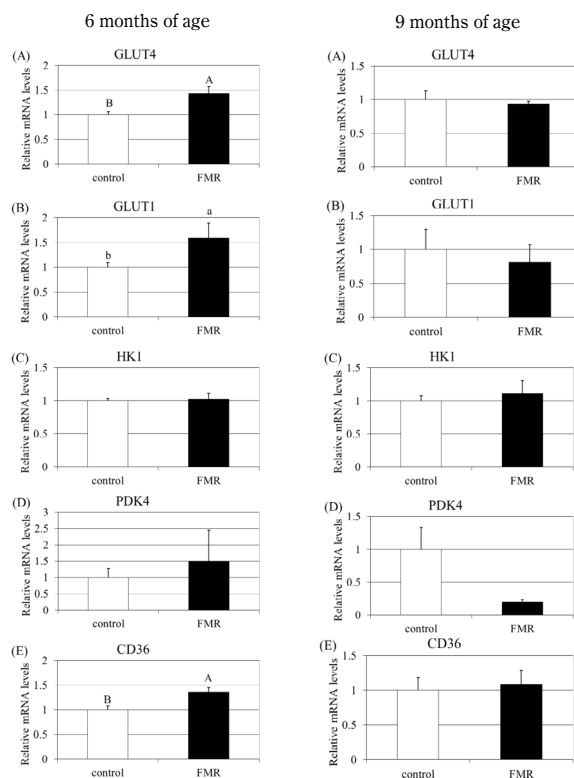


図24 対照区 (control) およびFMR区における胸最長筋でのGLUT4 (A), GLUT1 (B), HK1 (C), PDK4 (D), および CD36 (E) の遺伝子発現
A,B: $P < 0.05$, a,b: $P < 0.1$, バーは標準誤差.

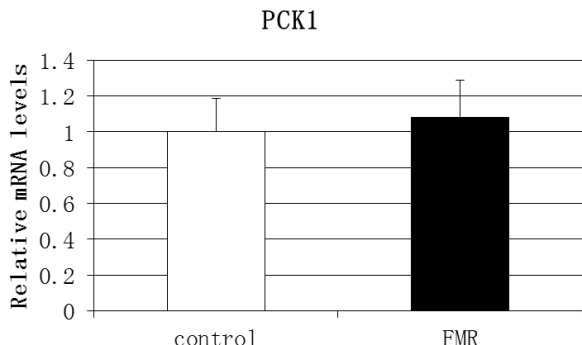


図25 対照区 (control) およびFMR区における肝臓でPCK1の遺伝子発現
バーは標準誤差.

有意に大きかった ($P < 0.05$, 表35)。FMR区はすべての筋線維型において、9ヵ月齢が最も大きく、3ヵ月齢が最も少なかった ($P < 0.05$, 表35)。9ヵ月齢のII B型筋線維の相対面積は、FMR区が対照区より有意に大きかった ($P < 0.05$, 表35)。

骨格筋代謝関連遺伝子発現

6および9ヵ月齢のPGC-1 α mRNAの発現は、FMR区が対照区より有意に低く ($P < 0.05$, 図23)、PPAR δ mRNAの発現は低い傾向があった ($P = 0.09, 0.06$, 図23)。9ヵ月齢のCSおよびUCP3 mRNAの発現は、FMR区が対照区より有意に低かった ($P < 0.05$, 図23)。6ヵ

月齢のGLUT4およびCD36 mRNAの発現は、FMR区が対照区より有意に高く ($P < 0.05$, 図24)、GLUT1 mRNAの発現は低い傾向があった ($P = 0.09$, 図24)。

11) 肝臓におけるPCK1 mRNA発現

処理区間に有意な差はなかった (図25)。

12) 血漿中GOT、GGT、Tcho、BUN、アンモニア、NEFA、および乳酸濃度

6ヵ月齢の血漿乳酸濃度は、FMR区が対照区より有意に低かった ($P < 0.05$, 表36)。

4 考察

FMR区は、発酵混合飼料中の麦焼酎粕濃縮液および麦圧ペンで、期間中の配合飼料給与量の約35%を代替した。9ヵ月齢の体重は、大きい値を示した ($P = 0.17$)。DG、十字部高、体長、胸囲、および腹囲は、FMR区が対照区よりも増加した。このことは、麦焼酎粕濃縮液は、配合飼料の代替として有効であり、発酵混合飼料の給与は、仔牛の成長を促進し、生産物への良い影響をもたらすことが示唆された。

6ヵ月齢では、第一胃内での酪酸および吉草酸の総濃度、および血漿BHBA濃度は、FMR区が有意に高かった。しかし、9ヵ月齢では、有意な差はなかった。こ

表36 対照区 (control) およびFMR区における血漿成分濃度

		months of age	Control		FMR	
GOT	(IU/l)	3	69.5 ± 5.1	63.7 ± 5.4		
		6	69.2 ± 4.5	56.3 ± 4.9		
		9	68.5 ± 5.0	52.0 ± 2.0		
GGT	(IU/l)	3	18.8 ± 2.0	22.7 ± 2.3		
		6	17.3 ± 0.9	17.0 ± 2.2		
		9	20.5 ± 1.5	18.7 ± 0.6		
Glucose	(mg/dl)	3	101.5 ± 3.8	101.7 ± 4.5		
		6	99.0 ± 1.6	97.7 ± 4.0		
		9	100.7 ± 5.4	95.7 ± 2.1		
T-cho	(mg/dl)	3	99.7 ± 9.6	135.2 ± 12.1		
		6	74.5 ± 7.4	83.7 ± 9.7		
		9	92.0 ± 7.3	109.0 ± 10.7		
BUN	(mg/dl)	3	12.9 ± 0.6	12.9 ± 1.2		
		6	11.4 ± 1.0	11.9 ± 1.7		
		9	12.0 ± 0.7	11.3 ± 1.4		
NH ₃	(μg/dl)	3	87.7 ± 12.4	86.5 ± 6.7		
		6	69.8 ± 9.3	117.2 ± 6.2		
		9	97.0 ± 7.5	85.7 ± 12.2		
NEFA	(μEq/l)	3	269.1 ± 63.6	186.0 ± 59.9		
		6	140.1 ± 16.9	96.7 ± 16.7		
		9	159.2 ± 14.8	95.4 ± 12.9		
Lactate	(μmol/l)	3	2.88 ± 0.74	2.96 ± 0.73		
		6	6.65 ± 1.06 ^A	1.98 ± 0.30 ^B		
		9	2.89 ± 0.38	2.44 ± 0.48		

データは平均値±標準誤差。^{A,B}: $P < 0.05$ (同列).

このことから、発酵混合飼料の給与は離乳後の仔牛の第一胃内の酪酸代謝を活性化し、成長を促進することが示唆された。

血漿βカロテン濃度は、処理区間に有意な差はなかった。発酵混合飼料の調製に用いた稲発酵粗飼料の乾物中βカロテン含量は17.7%であり、混合割合から、発酵混合飼料中のβカロテン含量は11.5%と推定されたが、実際には7.3%であった。飼料調製を屋外で行ったことから、飼料調製時にβカロテンが減少したことにより、血漿中濃度も増加しなかったと考えられた。

9ヵ月齢の血漿3MH濃度およびFBX032 mRNAの発現は、FMR区が対照区より有意に低かった。このことから、発酵混合飼料の給与が筋タンパク質分解を抑制し、筋肉の発達を促進させることが示唆された。

発酵混合飼料の給与は、乾草の給与と比較して、いくつかの血漿アミノ酸濃度を減少させた。これは、UIPのアミノ酸組成が影響したのかもしれない。また、骨格筋のBCAA代謝関連遺伝子の発現に有意な差はなかった。このことから、発酵混合飼料の給与は、骨格筋のBCAA代謝に影響しないことが示唆された。FMR区の血漿BCAA濃度は9ヵ月齢が6ヵ月齢より有意に低

かった。このことから9ヵ月齢における筋タンパク質分解抑制により、血中へのBCAAの放出が減少したことが示唆された。

FMR区では、I型およびII A型筋線維が、対照区と比較して有意に大きくなった。血漿βカロテンに有意な差はなく、血漿BHBA濃度の上昇が酸化型筋線維を肥大させたことが示唆された。乾草の給与では、期間中にI型筋線維の割合が増加したが、発酵混合飼料の給与では増加しなかった。また、FMR区ではCS、PGC-1α、およびPPARδ mRNAの発現が対照区より有意に低かった。このことから、PGC-1αおよびPPARδ mRNA発現レベルの低下が、筋線維型構成に影響したことが示唆された。

FMR区では、6ヵ月齢において、GLUT1、GLUT4、およびCD36 mRNAの発現が対照区と比較して高かった。しかし、9ヵ月齢では有意な差はなかった。UCP3は、ホスホイノシチド3-キナーゼ依存性経路を活性化することによって、骨格筋細胞におけるグルコース輸送およびGLUT4の細胞表面への移行を刺激するとされている (Huppertz *et al.*⁵⁸⁾, 2001)。また、GLUT4 mRNAの発現は、解糖系筋線維で高い (Hocquette *et al.*⁵³⁾, 1996)。一方で、GLUT1は酸化型筋線維に多く含まれ (Marette *et al.*⁹⁵⁾, 1992)、ラットではCD36 mRNA発現は解糖系筋線維より酸化型筋線維で高いことが明らかにされている (Chabowski *et al.*²¹⁾, 2006)。FMR区では、9ヵ月齢では、対照区と比較して、UCP3 mRNAの発現は有意に低く、II B型筋線維の相対面積は有意に大きかった。これらのことから、UCP3 mRNAの発現および筋線維型構成がグルコースおよび脂肪酸の取り込みに関連する遺伝子の発現に影響したことが示唆された。また、6ヵ月齢では、遺伝子発現はFMR区が対照区より高く、早期の第一胃発達による栄養吸収の向上が、骨格筋のグルコースや脂肪酸の取り込みを向上させているのかもしれない。

結論として、発酵混合飼料の給与は、黒毛和種仔牛の発育を向上させ、第一胃の酪酸の代謝を活性化することが明らかとなった。筋タンパク質分解により、骨格筋の発達を促進させることが示唆された。組織化学的染色からは、高濃度の血漿BHBAにより、酸化型筋線維が肥大すること、および発酵混合飼料の給与は、筋線維型構成においては、その代謝をより解糖的に導くことが示唆された。発酵混合飼料の給与では、約35%を配合飼料で代替しても、仔牛の成長が促進されたことから、麦焼酎粕濃縮液は、配合飼料の代替として有効な飼料であることが示唆された。

V 総合考察

近年、国際的な食糧不足、食糧安全保障、土地保全に関しては、国内の食糧自給率の改善が重要な課題となっている。食糧自給率を改善する一つの方法は、家畜用の飼料を輸入するのではなく、生産することである (Ogino *et al.*¹²⁴⁾, 2008)。例えば、牛肉生産では輸入飼料の利用を削減し、地元で生産された飼料の利用を拡大することである。国内の飼料自給率は26%と低く、2015年3月31日に閣議決定された食料・農業・農村基本計画では2025年までに40%にすることを目標としている。農林水産省は、飼料自給率向上のための施策として、粗飼料自給率を向上させるためには、稲発酵粗飼料の利用拡大、濃厚飼料の自給率を向上するためには、飼料米およびエコフィードの利用拡大を掲げている。それゆえ、稲発酵粗飼料および麦焼酎粕濃縮液を混合した発酵飼料の利用は、これらの問題解決に役立つと考えられる。

本研究では、この発酵混合飼料により、配合飼料を削減することを一つの目的とした。いくつかの研究で、早期離乳と離乳後の栄養管理により子牛の長期生産性の改善を示したことが報告されている。Metterら¹⁰¹⁾ (2013) は、早期離乳とスターターの給与が、成長期の体重増加および肉質の向上をもたらすことを報告している。Myersら^{108), 109)} (1999a, b) は、早期離乳した仔牛の成長能力は高く、早期に高濃度の濃厚飼料を給与することで、発育および肉質を向上させることを報告している。これらの報告は、初期成長期間中のエネルギー源が、その後の成長に重要な影響を及ぼすことを示唆している。また、初期成長期は、第一胃形成期であり、ミルクから固形飼料や粗飼料による栄養に代謝が変化する。Berendsら⁸⁾ (2012) は、第一胃の発達の遅い牛と比較して発達の早い牛は、飼料の利用性が向上することを報告しており、また第四胃にとっても有益であることを示唆している。それゆえ、麦焼酎粕濃縮液および稲発酵粗飼料を混合した発酵飼料が、離乳後の仔牛の第一胃、血液、および骨格筋の代謝にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることは重要である。

今回の一連の研究では、麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、およびこれらを混合した発酵飼料が3から9ヵ月齢の間の黒毛和種仔牛の成長に及ぼす影響を検討した。

Iでは、黒毛和種成雌牛を用いて、乾草と混合した

麦焼酎粕濃縮液の給与が第一胃の発酵および血液代謝に及ぼす影響を、大豆粕と乾草の給与および乾草のみの給与と比較し、検討した。麦焼酎粕濃縮液の給与は、大豆粕の給与と比較して、第一胃内でのプロピオン酸および酪酸の生成量を増加させ、血漿中BHBA濃度を上昇させた。麦焼酎粕濃縮液給与後に、血漿3MH濃度は減少したことから、麦焼酎粕濃縮液の給与は黒毛和種成雌牛の筋タンパク質分解を抑制する可能性が示唆された。

IIでは、麦焼酎粕濃縮液の給与が黒毛和種仔牛の成長、第一胃発酵、血液代謝、骨格筋の組織化学的性質、および骨格筋の代謝およびタンパク質分解関連遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。麦焼酎粕濃縮液の給与は、離乳後の仔牛の酪酸の代謝を活性化し、酸化型筋線維を肥大させることが示唆された。また、筋線維をより解糖的代謝に導いた。30%焼酎粕区では、対照区と比較してFBX032 mRNAの発現が有意に低く、高水準での麦焼酎粕濃縮液の給与は黒毛和種仔牛の筋タンパク質分解を抑制することが示唆された。

IIIでは、稲発酵粗飼料の給与が黒毛和種仔牛の成長、第一胃発酵、血液代謝、骨格筋の組織化学的性質、および骨格筋の代謝およびタンパク質分解関連遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。期間中、RWCS区は対照区より血漿中βカロテンおよびビタミンEを高濃度に維持した。6ヵ月齢では、RWCS区は対照区と比較して、血漿3MH、およびUBBおよびCAPNI mRNAの発現が低かったが、9ヵ月齢では差はなかった。この結果から、稲発酵粗飼料給与による血漿βカロテン濃度の増加が筋タンパク質分解を抑制し、骨格筋の成長を促進させることが示唆された。しかし、高濃度の血漿ビタミンEにより、βカロテンの吸収が阻害され、9ヵ月齢までの間に、その効果は消失することが示唆された。

IVでは、発酵混合飼料の給与が黒毛和種仔牛の成長、第一胃発酵、血液代謝、骨格筋の組織化学的性質、および骨格筋の代謝およびタンパク質分解関連遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。発酵混合飼料の給与は、離乳後の仔牛の酪酸の代謝を活性化し、筋タンパク質分解抑制により骨格筋の発達を促進することが示唆された。筋線維をより解糖的代謝に導き、高濃度の血漿BHBAにより酸化型筋線維が肥大することが示唆された。発酵混合飼料の給与による効果は、麦焼酎粕濃縮液の給与と同様の効果であることが示された。

麦焼酎粕濃縮液の第一胃発酵に及ぼす影響

第一胃の発達、特に子牛の第一胃上皮におけるその

機能的改善は、栄養の送達、吸収および代謝において重要な役割を果たし、子牛の健康および生産物に重要な影響を及ぼす (Bannink *et al.*⁷⁾, 2008; Martens *et al.*⁹⁷⁾, 2012)。酪酸、およびそれよりも少ないがプロピオン酸および酢酸は、第一胃発達においての主要な物質であることが報告されている (Mentschel *et al.*¹⁰¹⁾, 2001; Gorka *et al.*¹⁴⁴⁾, 2011; Ploger *et al.*¹³⁴⁾, 2012)。それゆえ、麦焼酎粕濃縮液が第一胃にどのような影響を及ぼすかを明らかにすることは重要である。本研究では、まず、黒毛和種成雌牛を用いて、麦焼酎粕濃縮液が第一胃発酵および血液代謝に及ぼす影響を明らかにし、次に麦焼酎粕濃縮液および麦焼酎粕濃縮液を混合した発酵飼料が育成期の黒毛和種仔牛の第一胃発酵および血液代謝に及ぼす影響を明らかにした。

Iでは、大豆粕給与と比較して、第一胃でのアンモニア態窒素の生成は多かったが、血漿BUN濃度に差はなかった。IIIでは、第一胃内アンモニア態窒素濃度に差はなかったが、血漿BUN濃度は、30%焼酎粕区が対照区および5%焼酎粕区より高かった。BUNは第一胃での窒素損失を反映することから、第一胃発達期である育成期の仔牛については、高い水準での麦焼酎粕濃縮液の給与は、窒素損失が起こっていることが示唆された。しかし、IVでは、血漿BUN濃度は、FMR区と対照区間に有意な差はなかった。30%区およびFMR区の麦焼酎粕濃縮液の期間中摂取量は、それぞれ87.1kgおよび86.4kgとほぼ等量であった。濃厚飼料摂取量増加によるNFCの増加は、飼料摂取量、消化率、および微生物態タンパク質合成を向上させる (Ramos *et al.*¹³⁷⁾, 2009)。このことから、粗飼料と高い割合で麦焼酎粕濃縮液を混合するときには、NFC含量を高めることで、窒素損失することなく、発育を向上させることが示唆された。

黒毛和種成雌牛では、麦焼酎粕濃縮液の給与は、大豆粕給与より、第一胃でのプロピオン酸、酪酸、および吉草酸の生成が増加し、血漿BHBA濃度も高くなった (I)。一方で、仔牛への麦焼酎粕濃縮液および発酵混合飼料の給与では、対照区との間に差はなかった (IIおよびIV)。鈴木ら^{157), 159)} (2010a, 2011)は焼酎粕濃縮液を混合したTMRの給与は、乾乳牛および泌乳牛の第一胃発酵に影響しなかったことを報告している。それゆえ、IIおよびIVでは、配合飼料の影響が大きかったと考えられた。しかし、麦焼酎粕濃縮液および発酵混合飼料の給与は、酪酸および吉草酸の総濃度を高めた。Weigandら¹⁸⁰⁾ (1975)は、酪酸の26~33%およ

び吉草酸の18~24%が第一胃上皮でBHBAに変換され吸収されることを報告している。このことから、仔牛への麦焼酎粕濃縮液および発酵混合飼料の給与は、第一胃内での酪酸および吉草酸の生成量を増加させ、その結果として、血漿BHBAを増加させることが示唆された。しかし、9ヵ月齢では、第一胃内VFA濃度および血漿BHBA濃度に有意な差はなかった (IIおよびIV)。固形飼料の摂取は、仔牛が反芻動物に移行するのに不可欠であり (Coverdale *et al.*²⁹⁾, 2004)、炭水化物の第一胃発酵で生成される酪酸の代謝産物である血中のBHBAの変化と第一胃の発達は関連がある (Quigley *et al.*¹³⁶⁾, 1991)。このことから、麦焼酎粕濃縮液および発酵混合飼料の給与は離乳後の仔牛の第一胃発達に有効な飼料であり、第一胃の早期発達を促進するものと考えられた。麦焼酎粕濃縮液は、特に6ヵ月齢までの時期の酪酸代謝に強く影響し、それが9ヵ月齢における仔牛の体格を大きくしていることが示唆された。

骨格筋に及ぼす影響

筋線維は、収縮特性のみで分類することが可能である。この分類は、主要な代謝特性に基づいて、I型 (slow-twitch oxidative)、II A型 (fast-twitch oxido-glycolytic)、II B型 (fast-twitch glycolytic) の3つの主要な筋線維型に分類する (Reichmann, Pette¹³⁸⁾, 1982; Hocquette *et al.*⁵⁴⁾, 1998)。赤く収縮の遅い筋線維はミトコンドリアを豊富に含み、主要なエネルギー源として酸化的代謝を用いるが、白く収縮の速い筋線維は、グリコーゲンを豊富に含み、主として解糖的代謝を用いる (Schiaffino, Reggiani¹⁴⁵⁾, 2011)。

麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、および発酵混合飼料の給与は、いずれも酸化型筋線維を肥大させた。BHBAは、ミトコンドリア内膜の酸化的リン酸化によって大量のエネルギーに変換される。また、BHBAは人では、ロイシンの酸化を減少させ、タンパク質合成を促進することが明らかにされている (Nair *et al.*¹¹²⁾, 1988)。また、牛では、BHBAの筋肉での利用率が、人間やラットよりも高い (Hocquette *et al.*⁵⁴⁾, 1998)。一方で、Kitakazeら⁷⁹⁾ (2015)は、 β カロテンがI型筋線維主体のヒラメ筋を肥大させることを報告している。いくつかの研究では、早期成長期のエネルギー源は、それ以降の成長に強く影響することが報告されている (Meter *et al.*¹⁰¹⁾, 2013; Myers *et al.*^{108), 109)}, 1999a, b)。本研究では、IIおよびIVでは、麦焼酎粕濃縮液および発酵混合飼料の給与により、血漿BHBA濃度

は6ヵ月齢において対照区より有意に高かったが、9ヵ月齢では、有意な差はなかった。また、IIIでは、RWCS区は対照区と比較して、期間中血漿 β カロテン濃度を高い水準で維持した。しかし、血漿ビタミンE濃度も同様に高く、ビタミンEにより β カロテンの吸収が阻害された可能性がある。しかし、麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、および発酵混合飼料の給与により、6ヵ月齢だけでなく、9ヵ月齢においても酸化型筋線維の直径は大きくなった（II、III、およびIV）。このことから、給与飼料の影響による早期の血漿BHBAおよび β カロテン濃度の上昇が、酸化型筋線維の早期発達を促進し、その影響が持続したものと考えられた。

いくつかの研究では、牛では飼料のエネルギー水準と解糖系筋線維の割合との間に正の相関を示している（Moody *et al.*¹⁰⁵ , 1980; Johnston *et al.*⁶⁷ , 1981; Klosowski *et al.*⁸⁰ , 1992）。また、成長の促進は、筋肉をより解糖的代謝に導く（Hocquette *et al.*⁵⁴ , 1998）。本研究では、麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、および発酵混合飼料の給与では、期間中にI型筋線維の割合は増加しなかった（II、III、およびIV）。PGC-1 α はI型筋線維主体の筋肉で発現が多く、筋線維型構成を決定する主要因である（Lin *et al.*⁸⁶ , 2002）。PPAR δ もII型からI型への移行を誘発する（Gan *et al.*⁴¹ , 2013）。IIでは、9ヵ月齢で、5%および15%焼酎粕区は、5%対照区と比較して、I型筋線維の割合、およびPGC-1 α およびミトコンドリアマーカであるCS mRNAの発現が有意に低かった。IIIでは、6ヵ月齢のPPAR δ mRNAの発現はRWCS区が対照区より有意に低かったが、I型筋線維の割合、およびPGC-1 α およびCS mRNAの発現に差はなかった。IVでは、9ヵ月齢のI型筋線維の割合およびCS mRNAの発現は、FMR区が対照区より有意に低かった。PGC-1 α mRNAの発現は、9ヵ月齢で有意に低く、PPAR δ mRNAの発現は、6および9ヵ月齢で低い傾向であった。また、II B型筋線維の割合も6および9ヵ月齢で有意に高かった。これらの結果から、麦焼酎粕濃縮液の摂取量がPGC-1 α mRNAの発現に影響し、摂取量の多かったFMR区は6ヵ月齢時から発現レベルが低くなったことが示唆された。また、FMR区では、麦焼酎粕濃縮液と稲発酵粗飼料の相互作用がPPAR δ mRNAの発現に影響したことも示唆された。これらのことから、混合発酵飼料の給与では、PGC-1 α およびPPAR δ mRNAの発現レベルの低下が、より筋肉を解糖的代謝に導いたことが示唆された。

麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、および発酵混合飼

料の給与は、骨格筋タンパク質分解を抑制することが示唆された。IIでは、ユビキチンプロテアソーム系のユビキチンリガーゼであるFBX032 mRNAの発現が、30%焼酎粕区で対照区より有意に低く、IVでは、FMR区が対照区より有意に低かった。一方で、タンパク質分解抑制の指標である血漿3MH濃度は、30%焼酎粕区と対照区の間で有意な差はなかった。CPの体重当たりの摂取量は、30%焼酎粕区、FMR区、および対照区で、それぞれ、0.51、0.43、および0.43であったことから、タンパク質摂取量が3MHの放出量に影響したと考えられた。HPLC分析により、焼酎粕のヘキサン抽出物にはジプトキシブタン（DBB）およびプトキシブチルアルコール（BBA）の2つの成長促進物質が含まれることが明らかにされている（Kamizono *et al.*⁷³ , 2013; Mahfudz *et al.*⁹³ , 1997）。ブロイラーでは、atrogin-1（FBX032）および μ -calpain（CAPN1）のmRNA発現は、焼酎粕のヘキサン抽出物により減少することが報告されている（Kamizono *et al.*⁷² , 2010）。培養した筋細胞では、atrogin-1（FBX032）mRNAの発現がDBBにより低下し、それは、DBBの濃度に依存することが報告されている（Kamizono *et al.*⁷³ , 2013）。本研究では、HPLC分析により麦焼酎粕濃縮液中にDBBが同定された（II）。5%焼酎粕区、15%焼酎粕区、30%焼酎粕区、およびFMR区の麦焼酎粕濃縮液の期間中の乾物摂取量は、15.7、48.7、87.1、および86.4kg、体重当たりの摂取量は、0.04、0.12、0.24、および0.23%であった（IIおよびIV）。また、Iの黒毛和種成雌牛の体重当たりの摂取量は、0.26%であった。これらの結果から、DBBの乾物摂取量又は体重当たりの摂取量がFBX032 mRNAの発現および血漿3MH濃度に影響したと考えられた。このことから、麦焼酎粕濃縮液の給与は、牛の骨格筋タンパク質分解を抑制するが、その抑制は、麦焼酎粕濃縮液の摂取量に依存することが示唆された。しかし、30%焼酎粕区は対照区と比較して、発育に有意な差はなく、発育向上および骨格筋タンパク質分解抑制の両方の効果を得るためには、DIPとNFCのバランスを考慮する必要があると考えられた。

RWCS区は、対照区と比較して4、6、および9ヵ月齢の血漿 β カロテン濃度が有意に低かったが、FMR区は有意な差はなかった（IIIおよびIV）。また、RWCS区は6ヵ月齢において、対照区と比較して、UBBおよびCAPN1 mRNAの発現が低かったが、FMR区は差がなかった（IIIおよびIV）。また、RWCS区は、9ヵ月齢より、6ヵ月齢の3MH濃度は低かった（III）。Kitakazeら⁷⁹

(2015) は、 β カロテンが、ユビキチンリガーゼである atrogin-1 (FBX032) および Murf1 (TRIM63) mRNA の発現に影響することなく、ユビキチン結合を減少させることを報告している。また、筋萎縮と酸化物の増加は関連があり (Powers *et al.*¹³⁵⁾, 2007)、タンパク質酸化の増加は、CAPN1 および CAPN2 による筋原繊維タンパク質分解を増加させることが明らかにされている (Smuder *et al.*¹⁵¹⁾, 2010)。FMR区でも稲発酵粗飼料を給与しているが、UBB および CAPN1 mRNA の発現レベルは、対照区と差がなく、WCS区における発現レベルの低下は、抗酸化物質である β カロテンの影響であることが示唆された。一方で、9 ヶ月齢では、UBB および CAPN1 mRNA の発現は、RWCS区も対照区との間に有意な差はなかった (III)。高濃度のビタミンEは β カロテンの吸収を妨害することが明らかにされており (Pellett *et al.*¹³³⁾, 1994; Yang *et al.*¹⁸⁷⁾, 2002)、血漿ビタミンE濃度の上昇により、 β カロテンの吸収が阻害された結果であることが示唆された。これらのことから、稲発酵粗飼料を混合する発酵混合飼料では、調製に用いる稲発酵粗飼料の品質および調製方法などにより、骨格筋タンパク質分解抑制は異なると考えられた。

ゆえ、麦焼酎粕濃縮液は黒毛和種仔牛の成長にとって有効な飼料であると考えられる。発酵混合飼料の給与において、稲発酵粗飼料の効果をえるためには、調製時の β カロテンの減少を抑える必要がある。それが可能となれば、さらなる成長促進が期待される。本研究では、麦焼酎粕濃縮液および稲発酵粗飼料を混合した発酵混合飼料の仔牛への給与は、仔牛の成長、特に、第一胃および筋肉の発達に大きな効果があることが明らかとなった。このことから、本飼料は、仔牛の成長に有用であり、輸入飼料の削減に寄与できる技術であると考えられた。

麦焼酎粕濃縮液および稲発酵粗飼料を混合した飼料が仔牛に及ぼす影響

麦焼酎粕濃縮液および稲発酵粗飼料を混合した飼料の黒毛和種仔牛への給与は、その成長を促進させた。この成長促進は、酪酸代謝の活性化による第一胃発達、解糖系筋線維割合の増加、およびタンパク質分解抑制による筋肉の発達促進によるものであると示唆された。これらの効果は、麦焼酎粕濃縮液の影響が大きいと考えられた。つまり、発酵混合飼料の給与は、6 ヶ月齢までの酪酸の代謝に強く影響し、第一胃の発達が9 ヶ月齢における骨格の大きさに影響していることが示唆された。また、血漿BHBAの増加により酸化型筋線維が肥大し、麦焼酎粕濃縮液中のDBBにより筋タンパク質が抑制され、筋肉の成長を促進させることが示唆された。解糖系筋線維割合の増加は、麦焼酎粕濃縮液および稲発酵粗飼料の相互作用であることが示唆された。血漿ビタミンE濃度の増加は、稲発酵粗飼料の影響であると考えられ、仔牛の健康および免疫にとって効果的であると考えられた。

本研究では、発酵混合飼料を給与することにより、それに含まれる麦焼酎粕濃縮液および麦圧パンで配合飼料の35%程度を代替したが、発育は向上した。それ

摘要

国内飼料自給率を向上させるためには、麦焼酎粕濃縮液などのエコフィードおよび稲発酵粗飼料の利用を増加させる必要がある。それゆえ、本研究の目的は、(1) 麦焼酎粕濃縮液が黒毛和種成雌牛の第一胃発酵および血液代謝に及ぼす影響、(2) 麦焼酎粕濃縮液、(3) 稲発酵粗飼料、および(4) 麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、および麦圧ペンを混合した発酵混合飼料が黒毛和種仔牛の成長、第一胃発酵、血液代謝、骨格筋の組織化学的性質、および骨格筋の代謝およびタンパク質分解に関連する遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにすることとした。

麦焼酎粕濃縮液が黒毛和種成雌牛の第一胃発酵および血液代謝に及ぼす影響

黒毛和種成雌牛9頭を用いて、一期35日とした3×3のラテン方各法により行った。乾物当たり麦焼酎粕濃縮液20%および乾草80%を給与する焼酎粕区、大豆粕17.2%および乾草82.8%を給与する大豆粕区、および乾草のみを給与する乾草区の3区を設定した。焼酎粕区および大豆粕区はCP含量が14.4%になるように給与量を設定した。第一胃液および血液は、朝給与前および給与3時間後に採取した。焼酎粕区の第一胃内アンモニア態窒素濃度は給与前より、給与3時間後に有意に高かった ($P<0.05$)。この結果は、麦焼酎粕濃縮液および大豆粕の間のタンパク質の第一胃内での分解性の違いが影響したと考えられた。給与3時間後の第一胃内のプロピオン酸、酪酸、および吉草酸の濃度は、焼酎粕区が大豆粕区より有意に高かった ($P<0.05$)。給与3時間後の血漿BHBA濃度は、焼酎粕区が大豆粕区より有意に高かった ($P<0.05$)。この結果は、NFC、特に、乳酸およびグリセロール含量が高い麦焼酎粕濃縮液の牛への給与は、第一胃内のプロピオン酸、酪酸、および吉草酸の生成量を増加させ、第一胃上皮での酪酸の代謝産物である血漿BHBA濃度を上昇させることを示した。焼酎粕区では、給与3時間後に、血漿3MH濃度は有意に低くなった ($P<0.05$)。この結果から、麦焼酎粕濃縮液の給与は、黒毛和種成雌牛の筋タンパク質分解を抑制することが示唆された。

麦焼酎粕濃縮液が黒毛和種仔牛の成長に及ぼす影響

黒毛和種雄仔牛27頭を次の5つの処理区に配置し、3から9ヵ月齢まで試験を行った。実験区として、

乾物当たり麦焼酎粕濃縮液を5% (5%焼酎粕区、 $n=6$)、15% (15%焼酎粕区)、および30% (30%焼酎粕区、 $n=3$) を混合する3区を、対照区として、大豆粕およびトウモロコシ圧ペンを5%および15%焼酎粕区とCPとNFCの摂取量が同等になるように5%対照区 ($n=6$) および15%対照区 ($n=6$) を配置した。

第一に、5%焼酎粕区、5%対照区、15%焼酎粕区、および15%対照区を比較することにより、麦焼酎粕濃縮液が黒毛和種仔牛の成長、第一胃発酵、血液代謝、骨格筋の組織化学的性質、および骨格筋の代謝および筋タンパク質分解抑制に及ぼす影響を検討した。DGは、15%焼酎粕区が5%対照区より有意に大きく ($P<0.05$)、15%対照区より大きい傾向があった ($P=0.06$)。第一胃内のプロピオン酸および酪酸濃度は有意な差はなかった。しかし、6ヵ月齢の第一胃内吉草酸濃度は、15%焼酎粕区が15%対照区より有意に高く ($P<0.05$)、6ヵ月齢の第一胃内の酪酸および吉草酸の総濃度は、15%焼酎粕区が5%対照区より高い傾向があった ($P=0.06$)。6ヵ月齢の血漿BHBA濃度は、5%焼酎粕区が5%対照区より有意に高く、15%焼酎粕区は5%および15%焼酎粕区より有意に高かった ($P<0.05$)。これらの結果は、麦焼酎粕濃縮液の給与は、黒毛和種仔牛の酪酸の代謝を活性化することを示した。

9ヵ月齢のI型筋線維の5%焼酎粕区が5%対照区より有意に大きく、15%焼酎粕区は、5%および15%対照区より有意に大きかった ($P<0.05$)。この結果から、麦焼酎粕濃縮液の給与は、血漿BHBA濃度の上昇により、酸化型筋線維を肥大させることが示唆された。大豆粕およびトウモロコシ圧ペンの給与では6から9ヵ月齢の間にI型筋線維の割合が増加したが ($P<0.05$)、麦焼酎粕濃縮液の給与では有意な変化はなかった。9ヵ月齢のCSおよびCPT-1b mRNAの発現は、大豆粕区より焼酎粕区が有意に低かった ($P<0.05$)。9ヵ月齢のPGC-1 α mRNAの発現は、5%焼酎粕区が5%および15%対照区より有意に低く、15%焼酎粕区は5%対照区より有意に低かった ($P<0.05$)。これらの結果から、麦焼酎粕濃縮液の黒毛和種仔牛への給与は、低いPGC-1 α mRNA発現レベルや成長促進により、筋肉の代謝をより解糖系に導くことが示唆された。

第二に、5%焼酎粕区、15%焼酎粕区、30%焼酎粕区、および対照区を比較することにより、骨格筋の筋タンパク質分解関連遺伝子の発現に及ぼす影響を検討した。9ヵ月齢のFBX032 mRNAの発現は、30%焼酎粕

区が対照区より有意に低かった。しかし、血漿3MH濃度に有意な差はなかった。血漿3MH濃度は、骨格筋からの放出のみでなく、CPの摂取量の影響も反映することが示唆された。30%焼酎粕区の6から9ヵ月齢のDGは、対照区より大きい傾向であった ($P=0.06$)。これらの結果から、高い割合での麦焼酎粕濃縮液の給与は、骨格筋タンパク質分解抑制により筋肉の成長を促進することが示唆された。

稲発酵粗飼料が仔牛の成長に及ぼす影響

RWCS区 ($n=6$) と対照区 ($n=5$) とを比較することにより、稲発酵粗飼料の給与が黒毛和種仔牛の成長、第一胃発酵、血液代謝、骨格筋の組織化学的性質、および骨格筋の代謝および筋タンパク質分解抑制に関連する遺伝子の発現について検討した。RWCS区の仔牛は、対照区の乾草の代替として稲発酵粗飼料を給与した。9ヵ月齢の体重および期間中のDGは、RWCS区が対照区より有意に大きかった ($P<0.05$)。4、6、および9ヵ月齢の血漿βカロテンおよびビタミンE濃度は、RWCS区が対照区より有意に高かった ($P<0.05$)。WCS区の血漿ビタミンE濃度は4から9ヵ月齢の間に有意に増加したが、対照区は有意な差はなかった ($P<0.05$)。WCS区の血漿3MH濃度は6ヵ月齢が9ヵ月齢より低い傾向であった ($P=0.07$)。WCS区の6ヵ月齢のUBB mRNAの発現は対照区より有意に低く ($P<0.05$)、CAPN1 mRNAの発現は低い傾向であった ($P=0.07$)、9ヵ月齢はいずれも有意な差はなかった。6ヵ月齢のI型筋線維および9ヵ月齢のII A型筋線維の直径は、WCS区が対照区より有意に大きく ($P<0.05$)、9ヵ月齢のI型筋線維の直径は、大きい傾向であった ($P<0.08$)。これらの結果から、稲発酵粗飼料の黒毛和種仔牛への給与は血漿中βカロテン濃度を上昇させ、βカロテンによる筋タンパク質分解抑制によりI型筋線維が肥大することが示唆された。しかし、血漿ビタミンE濃度の増加により、9ヵ月齢までに筋タンパク質分解抑制の効果は消失することが示唆された。

対照区のI型筋線維の割合は、6から9ヵ月齢の間に有意に増加したが ($P<0.05$)、WCS区に有意な差はなかった。6ヵ月齢のPPARδ mRNAの発現はWCS区が対照区より有意に低かった ($P<0.05$)。これらの結果から、PPARδ mRNAの発現レベルが筋線維型構成に影響したことが示唆された。

麦焼酎粕濃縮液および稲発酵粗飼料を混合した発酵混合飼料が仔牛の成長に及ぼす影響

FMR区 ($n=6$) および対照区 ($n=6$) を比較することにより、麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、および麦圧ペンを混合した発酵混合飼料が黒毛和種仔牛の成長、第一胃発酵、血液代謝、骨格筋の組織化学的性質、および骨格筋の代謝および筋タンパク質分解抑制に関連する遺伝子の発現に及ぼす影響について検討した。FMR区の仔牛は、麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、および麦圧ペンを混合した発酵混合飼料および配合飼料を、対照区の仔牛は、乾草および配合飼料を給与した。発酵混合飼料の調製は、乾物当たり稲発酵粗飼料65%、麦焼酎粕濃縮液15%、および麦圧ペン20%をコンプリートフィーダーで攪拌し、細断型ロールペーラ (MW1010H、タカキタ株式会社) で梱包および密封した。FMR区は、発酵混合飼料中の麦焼酎粕濃縮液および麦圧ペンで配合飼料の約35%を代替するため、配合飼料の給与量を体重当たり開始時1.8%から終了時0.8% (対照区2.1%~1.4%) まで漸減して給与した。FMR区の期間中のDGは、対照区より有意に大きかった ($P<0.05$)。FMR区の6ヵ月齢の第一胃内の酪酸および吉草酸の総濃度は対照区より高い傾向があり ($P=0.05$)、血漿BHBA濃度は有意に高かった ($P<0.05$)。FMR区の9ヵ月齢の血漿3MH濃度およびFBX032 mRNAの発現は、対照区より有意に低かった ($P<0.05$)。FMR区の9ヵ月齢のI型筋線維の割合は、対照区より有意に少なく、CS、PGC-1α、およびPPARδ mRNAの発現も有意に低かった ($P<0.05$)。FMR区の9ヵ月齢のI型およびII A型筋線維の直径は、対照区より有意に大きかった ($P<0.05$)。血漿βカロテン濃度は、有意な差はなかった。これらの結果から、麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、および麦圧ペンを混合した発酵混合飼料の給与による仔牛の発育促進効果は、麦焼酎粕濃縮液の影響が大きいことが示唆された。配合飼料の35%を麦焼酎粕濃縮液および麦圧ペンで代替しても、発育は向上しており、麦焼酎粕濃縮液は配合飼料の代替としても仔牛の発育促進に有益な飼料であると考えられた。

これらの一連の実験の結果から、麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、およびこれらを混合した発酵混合飼料は黒毛和種仔牛の成長を促進することが示された。これは、麦焼酎粕濃縮液および稲発酵粗飼料は黒毛和種仔牛の成長にとって有益な飼料であることを示している。麦焼酎粕濃縮液、稲発酵粗飼料、および麦圧ペン

を混合した発酵混合飼料の給与は、配合飼料の約35%を代替しても仔牛の発育は向上した。このことから、この発酵混合飼料は、黒毛和種仔牛の成長を促進させることができるとともに、国内の飼料自給率向上に寄与できる飼料であることが示された。

謝辞

本論文に関する研究全般について、終始懇切丁寧なご指導とご鞭撻を賜りました九州大学農学研究員 後藤貴文准教授に心より感謝いたします。また、本論文をご精読頂き大変有用なコメントを賜りました九州大学農学研究員 飯田弘教授、古瀬充宏教授に厚くお礼申し上げます。

九州大学における研究の機会を与えて頂き、有益な助言と激励を賜った大分県農林水産研究指導センター 金塚秀夫前々センター長、西鶴昌史前センター長、都留嘉治センター長、大竹孝一前々畜産研究部長、中西年治前畜産研究部長に心から感謝申し上げます。

本研究への着手、遂行にあたりましては、九州大学附属農場高原農場実習場の高橋秀幸助教、衛藤哲次氏、塩塚雄二氏、藤野亮一氏をはじめとする農場の職員ならびに学生の皆様には格別のご協力を頂きました。また、大分県農林水産指導センター畜産研究部の職員の皆様には、有益な助言と激励を賜りました。特に、金丸英伸前々チームリーダー、久々宮慶二技師、工藤一雄技師、大塚浩二技師をはじめとする飼料・環境チームの職員の皆様、倉原貴美チームリーダーをはじめとする肉用牛繁殖・酪農チームの皆様、種雄牛チーム井上一之チームリーダーには、いかなる状況においても、給与試験、飼料調製、および家畜飼養において、多大なるご努力とご協力を頂きました。各種分析におきましては、南九州大学の六車三治男教授、竹之山慎一教授、鹿児島大学の塚明教授、源麴研究所の日置久美子氏、大分県産業科学技術センター食品産業担当の職員の皆様より、有益なご助言、ご協力を頂きました。混合飼料の調製におきましては、(株)アグリサポートあじむの菅原維範氏ならびに社員の皆様に多大なるご協力を頂きました。ここに記して心から感謝し、厚くお礼を申し上げます。

なお、本研究の一部は、大分県産業創造機構の「おおい地域資源活性化基金事業」の支援を受けて実施しました。

最後に、本研究の遂行にあたり、心の支えとなり、励ましてくれた妻と子供達に心から感謝致します。

引用文献

- 1) Aiello RJ, Armentano LE, Bertics SJ, Murphy AT. 1989. Volatile fatty acid uptake and propionate metabolism in ruminant hepatocytes. *Journal of Dairy Science*, 72: 942-949.
- 2) Allison MJ. 1969. Biosynthesis of amino acids by ruminal microorganisms. *Journal of Animal Science*, 29: 797-807.
- 3) Arai T., Tanaka Y, Urabe S, Kusaba A, Tazaki H, Ozawa T, Kimura N, Jung KK, Waragaya K, Yuyama T, Hasebe Y, Imai S. 2006. Changes in peripheral leukocytes enzyme activity and plasma metabolite concentrations in growing Holstein calves. *Research in Veterinary Science* 81: 19-23.
- 4) 荒木信, 野崎由佳, 本島清人. 2007. エネルギー代謝調節鍵酵素PDK4の正常時および病態時における発現調節. *Yakugaku Zasshi*, 127: 153-162.
- 5) Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2000. Official of Analysis of the Association of *Official Analytical Chemists*, 17th edn. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA.
- 6) Azzu V, Brand MD. 2010. The on-off switches of the mitochondrial uncoupling proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 35: 298-307.
- 7) Bannink A, France J, Lopez S, Gerrits W, Kebreab E, Tamminga S, Dijkstra J. 2008. Modeling the implications of feeding strategy on rumen fermentation and functioning of the rumen wall. *Animal Feed Science and Technology*, 143: 3-26.
- 8) Berends H, van Reenen CG, Stockhofe-Zurwieden N, Gerrits WJJ. 2012. Effects of early rumen development and solid feed composition on growth performance and abomasal health in veal calves. *Journal of Dairy Science*, 95: 3190-3199.
- 9) Bevans DW, Beauchemin KA, Schwartzkopf-Genswein KS, McKinnon JJ, McAllister TA. 2005. Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *Journal of Animal Science*, 83: 1116-1132.
- 10) Blum JW, Bruckmaier RM, Vacher PY, Munger A, Jans F. 2000. Twenty-four-hour patterns of hormones and metabolites in week 9 and 19 of lactation in high-yielding dairy cows fed triglycerides and free acids. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 47: 43-60.
- 11) Bowker-Kinley MM, Davis WI, Wu P, Harris RA, Popov KM. 1998. Evidence for existence of tissue-specific regulation of mammalian pyruvate dehydrogenase complex. *Biochemical Journal*, 329: 191-196.
- 12) Bretz F, Hothorn T, Westfall P. 2010. Multiple comparisons using R. *CRC Press, Boca Raton*. Brooke MH. 1970. Some comments on neural influence on the two histochemical types of muscle fibers. *The physiology and biology of muscle as food*, Vol. 2 (Briskey EJ, RG. Cassens, BB MARSH, eds.). 131-153. The University of Wisconsin Press. Madison, Milwaukee, and London.
- 13) Brooke MH, Kaiser KK. 1969. Some comments on the histochemical characterization of muscle adenosine triphosphatase. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 17: 431-432.
- 14) Brooke MH, Kaiser KK. 1970a. Muscle fiber types: how many and what kind? *Archives of Neurology*, 23: 369-379.
- 15) Brooke MH, Kaiser KK. 1970b. Three 'myosin adenosine triphosphatase' systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 18: 670-672.
- 16) 蔡義民, 藤田泰仁, 村井勝, 小川増弘, 吉田宣夫, 北村亨, 三浦俊治. 2003. 飼料イネサイレージ調製への乳酸菌の利用. *日本草地学会誌*, 49(5): 477-485.
- 17) Cai Y, Masuda N, Fujita Y, Kawamoto H, Ando S. 2001. Development of a new method for preparation and conservation of tea grounds silage. *Animal Science Journal*, 72: J536-J541.
- 18) Cao Y. 博士論文. 2009. Studies on whole crop rice total mixed ration silage preparation with food by-products and its feed characteristics.
- 19) Cao Y, Cai Y, Takahashi T, Yoshida N, Tohno M, Uegaki R, Nonaka K, Terada F. 2011. Effect of lactic acid bacteria inoculant and beet pulp addition on fermentation characteristics and in vitro ruminal digestion of vegetable residue

- silage. *Journal of Dairy Science*, 94: 3902-3912.
- 20) Carro MD, Ranilla MJ, Martín-García AI, Molina-Alcaide E. 2009. Comparison of microbial fermentation of high- and low-forage diets in rusitec, single-flow continuous-cluture fermenters and sheep rumen. *Animal*, 3: 527-534.
- 21) Chabowski A, Chatham JC, Tandon NN, Calles-Escandon J, Glatz JF, Luiken JJ, Bonen A. 2006. Fatty acid transport and FAT/CD36 are increased in red but not in white skeletal muscle of ZDF rats. *Endocrinology and Metabolism*, 291: 675-682.
- 22) Cherdthong A, Wanapat M, Wachirapakorn C. 2011. Effects of urea-calcium mixture in concentrate containing high cassava chip on feed intake, rumen fermentation and performance of lactating dairy cows fed on rice straw. *Livestock Science*, 136: 76-84.
- 23) Chikuni K, Nakajima I, Muroya S. 2005. Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α) expression and the formation of slow-twitch muscle fibers in porcine and bovine skeletal muscles. *Animal Science Journal*, 76: 375-380.
- 24) Ciechanover A. 2006. The ubiquitin proteolytic system: from a vague idea, through basic mechanisms, and onto human diseases and drug targeting. *Neurology*, 66: S7-S19.
- 25) Clark JH, Murphy MR, Crooker BA. 1987. Supplying the protein needs of dairy cattle from by-product feeds. *Journal of Dairy Science*, 70: 1092-1109.
- 26) Condron KN, Lemenager RP, Claeys MC, Lipkie TE, Schoonmaker JP. 2014. Supplemental β -carotene I: Effect on plasma vitamin A, growth, performance, and carcass characteristics of feedlot cattle. *Meat Science*, 98: 736-743.
- 27) Coppock CE. 1987. Supplying the energy and fiber needs of dairy cows from alternate feed sources. *Journal of Dairy Science*, 70: 1110-1119.
- 28) Costford SR, Seifert EL, B. zaire V, F Gerrits M, Bevilacqua L, Gowing A, Harper ME. 2007. The energetic implications of uncoupling protein-3 in skeletal muscle. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 32: 884-894.
- 29) Coverdale JA, Tyler HD, Quigley JD, Brumm JA. 2004. Effect of various levels of forage and form of diet on rumen development and growth in calves. *Journal of Dairy Science*, 87: 2554-2562.
- 30) DeBerardinis RJ, Lum JJ, Thompson CB. 2006. Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent modulation of carnitine palmitoyltransferase 1A expression regulates lipid metabolism during hematopoietic cell growth. *Journal of Biological Chemistry*, 281: 37372-37380.
- 31) Defrain JM, Hippen AR, Kalscheur KF, Schingoethe DJ. 2004. Feeding lactose increases ruminal butyrate and plasma β -hydroxybutyrate in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87: 2486-2494.
- 32) Detmann E, Paulino MF, Mantovani HC, Valadares Filho SC, Sampaio CB, Souza MA, Lazzarini I, Detmann KSC. 2009. Parameterization of ruminal fiber degradation in low-quality tropical forage using Michaelis-Menten kinetics. *Livestock Science*, 126: 136-145.
- 33) 永西修, 四十万谷吉郎. 1998. 稲ホールクロップサイレージの発酵特性. *Japanese Society of Grassland Science*, 44(2): 179-181
- 34) 永西修, 吉岡勉, 中島一喜, 佐伯真魚, 川島知之. 2004. カボチャならびにニンジンジュース粕の反すう家畜用飼料としての特性. *日本草地学会誌*, 50(4): 360-365.
- 35) 額爾敦巴雅爾, 西田武弘, 松山裕城, 細田謙次, 塩谷繁. 2004. ウシにおける緑茶飲料製造残渣サイレージの栄養価ならびに窒素出納に及ぼすポリエチレングリコール添加の影響. *日本畜産学会報*, 75(4): 559-566.
- 36) 額爾敦巴雅爾, 西田武弘, 松山裕城, 細田謙次, 塩谷繁. 2005. 緑茶飲料製造残渣サイレージの給与水準の違いが採食量および乳生産に及ぼす影響. *日本畜産学会報*, 76: 295-301.
- 37) 額爾敦巴雅爾, 西田武弘, 松山裕城, 細田謙次, 塩谷繁, 野中和久, 山田明央. 2007. 緑茶飲料製造残渣サイレージ混合TMRの泌乳牛における嗜好性に及ぼす主体粗飼料の影響. *日本草地学会誌*, 52: 232-236.
- 38) Fernyhough ME, Okine E, Hausman G, Vierck JL, Dodson MV. 2007. PPAR γ and GLUT-4 expression as developmental regulators/markers for

- preadipocyte differentiation into an adipocyte. *Domestic Animal Endocrinology*, 33: 367-378.
- 39) Finley D, Bartel B, Varshavsky A. 1989. The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis. *Nature*, 338: 394-401.
- 40) Franch HA, Price SR. 2005. Molecular signaling pathways regulating muscle proteolysis during atrophy. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 8: 271-275.
- 41) Gan Z, Rumsey J, Hazen BC, Lai L, Leone TC, Vega RB, Xie H, Conley KE, Auwerx J, Smith SR, Olson EN, Kralli A, Kelly DP. 2013. Nuclear receptor/microRNA circuitry links muscle fiber type to energy metabolism. *Journal of Clinical Investigation*, 12: 2564-2575.
- 42) Glass DJ. 2005. Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37: 1974-1984.
- 43) Goll DE, Neti G, Mares SW and Thompson VF. 2008. Myofibrillar protein turnover: the proteasome and the calpains. *Journal of Animal Science*, 86: E19-E35.
- 44) Gorka P, Kowalski ZM, Pietrzak P, Kotunia A, Jagusiak W, Holst JJ, Guilloteau P, Zabielski R. 2011. Effect of method of delivery of sodium butyrate on rumen development in newborn calves. *Journal of Dairy Science*, 94: 5578-5588.
- 45) Gotoh T. 2003. Histochemical properties of skeletal muscles in Japanese cattle and their meat production ability. *Animal Science Journal*, 74: 339-354.
- 46) Greenwalt ED, Scheck HS, Rhinehart-Jones T. 1995. Heart CD36 expression is increased in murine models of diabetes and in mice fed a high fat diet. *Journal of Clinical Investigation*, 96: 1382-1388.
- 47) Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, LeBrasseur NK, Yan Z, Spiegelman BM. 2007. Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1 α muscle-specific knockout animals. *Journal of Biological Chemistry*, 282: 30014-30021.
- 48) Hatazawa Y, Tadaishi M, Nagaike Y, Morita A, Ogawa Y, Ezaki O, Takai-Igarashi T, Kitaura Y, Shimomura Y, Kamei Y, Miura S. 2009. PGC-1 α -mediated branched-chain amino acid metabolism in the skeletal muscle. *PLoS One*, 9: 10.
- 49) 服部育男, 神谷充, 鈴木知之, 西村和志, 佐藤健次, 加藤直樹. 2012. 焼酎粕濃縮液の混合割合および貯蔵季節, 貯蔵期間が発酵TMRの発酵品質に及ぼす影響. *日本草地学会誌*, 58: 173-182.
- 50) 服部育男, 佐藤健次, 鈴木知之, 神谷充, 加藤直樹. 2010. 原料および産出時期が焼酎粕濃縮液の飼料成分に及ぼす影響. *暖地畜産学会報*, 53: 175-181.
- 51) 林国興. 2012. 焼酎粕の飼料利用. *日本暖地畜産学会報*, 55: 101-107.
- 52) Hayashi K, Tomita Y, Maeda Y, Shinagawa Y, Inoue K, Hashizume T. 1985. The rate of degradation of myofibrillar proteins of skeletal muscle in broiler and layer chickens estimated by N τ -methylhistidine in excreta. *British Journal of Nutrition*, 54: 157-163.
- 53) Hocquette JF, Balage M, Ferr P. 1996. Facilitative glucose transporters in ruminants. *Proceedings of the Nutrition Society*, 55: 221-236.
- 54) Hocquette JF, Ortigues-Marty I, Pethick D, Herpin P, Fernandez X. 1998. Nutritional and hormonal regulation of energy metabolism in skeletal muscles of meat-producing animals. *Livestock Production Science*, 56: 115-143.
- 55) Hosoda K, Eruden B, Matsuyama H, Shioya S. 2012. Effect of anthocyanin-rich corn silage on digestibility, milk production and plasma enzyme activities in lactating dairy cows. *Animal Science Journal*, 83: 453-459.
- 56) Hosoda K, Nishida T, Park W-Y, Eruden B. 2005. Influence of *Mentha* \times *piperita* L. (peppermint) supplementation on nutrient digestibility and energy metabolism in lactating dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 18: 1721-1726.
- 57) Hothorn T, Bretz F, Westfall P. 2008. Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal*, 50: 346-363.
- 58) Huppertz C, Fischer BM, Kim YB, Kotani K, Vidal-Puig A, Sliker L, Sliker LJ, Sloop KW, Lowell BB, Kahn BB. 2001. Uncoupling protein

- 3 (UCP3) stimulates glucose uptake in muscle cells through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 276: 12520-12529.
- 59) 井出忠彦. 2002. 乳牛のTMRにおけるトウフ粕の給与(高水分粕類のサイレージ化と利用(その2)). 日本草地学会誌, 48(1):73-77.
- 60) 家木一、永西修、中島一喜、村上恭彦、佐伯真魚、川島知之. 2006. ケールジュース粕の第一胃内分解特性と栄養価. 日本畜産学会報, 77(2): 215-224.
- 61) 家木一、小池正充、藤岡一彦、2010. モウソウチク (*Phyllostachys pubescens*) とトウフ粕および醬油粕混合ペレットの飼料特性と乳牛への給与. 日本草地学会誌, 56(1): 34-38.
- 62) 今井明夫. 2002. 高水分粕類のサイレージ化と利用(その2)トウフ粕を利用した牛の肥育技術. 日本草地学会, 48: 78-82.
- 63) International Maritime Organization. 2015. Convention on the prevention of marine pollution by dumping of wastes and other matter. Available at <http://www.imo.org/OurWork/Environment/LCLP/Pages/default.aspx>. [Verified 13 May 2015]
- 64) 石橋瑞穂, 牛之浜寛治, 上村俊一, 浜名克己. 1999. 黒毛和種発育不良子牛の血中成長ホルモン, IGF-I, 甲状腺ホルモンおよびビタミンA濃度. 日本獣医師会雑誌, 52(7): 427-430.
- 65) Jin Q, Cheng H, Wan F, Bi Y, Liu G, Liu X, Zhao H, You W, Liu Y, Tan W. 2015. Effects of feeding β -carotene on levels of β -carotene and vitamin A in blood and tissues of beef cattle and the effects on beef quality. *Meat Science*, 110: 293-301.
- 66) 自給飼料利用研究会(編). 2009. 三訂版粗飼料の品質評価ガイドブック. 日本草地畜産種子協会.
- 67) Johnston DM, Moody WG, Boling JA, Bradley NW. 1981. Influence of breed type, sex, feeding systems and muscle bundle size on bovine fibre type characteristics. *Journal of Food Science*, 46: 1760-1765.
- 68) Kahn BB. 1996. Glucose transport: Pivotal step in insulin action. *Diabetes*, 45: 1644-1654.
- 69) 梶川博. 1996. わが国における副産物飼料の利用と特性. 畜産の研究, 50: 599-605.
- 70) 神谷裕子, 神谷充, 服部育男, 佐藤健次, 鈴木知之, 林義朗. 2011. カンショ焼酎粕濃縮液を含む発酵TMRの給与が肥育牛の尿中ミネラル排泄に及ぼす影響. 暖地畜産学会報, 54: 169-175.
- 71) 神谷裕子、野中最子、田中 正仁、神谷充、服部育男、林義朗、板谷真積、西岡俊一郎、浜本 修. 2013. ウシにおける麦焼酎粕濃縮液の栄養価. 暖地畜産学会報, 56: 171-174.
- 72) Kamizono T, Nakashima K, Ohtsuka A, Hayashi K. 2010. Effects of feeding hexane-extracts of a shochu distillery by-product on skeletal muscle protein degradation in broiler chicken. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74: 92-95.
- 73) Kamizono T, Ohtsuka A, Hashimoto F, Hayashi K. 2013. Dibutoxybutane suppresses protein degradation and promotes growth in cultured chicken muscle cells. *Journal Poultry Science*, 50: 37-43.
- 74) 金谷千津子. 2007. 飼料イネの β -カロテンおよび α -トコフェロール含量と肉用牛肥育に対応したサイレージ調製. 日本草地学会誌, 53: 167-171.
- 75) Khan AH, Pessin JE. 2002. Insulin regulation of glucose uptake: a complex interplay of intracellular signaling pathways. *Diabetologia*, 45: 1475-1483.
- 76) Khan MA, Bach A, Castells LI, Weary DM, von Keyserlingk MAG. 2014. Effects of particle size and moisture levels in mixed rations on the feeding behavior of dairy heifers. *Animal*, 8: 1722-1727.
- 77) Khan MA, Lee HJ, Lee WS, Kim HS, Kim SB, Ki KS, Park SJ, Ha JK, Choi YJ. 2007. Starch source evaluation in calf starter: I. Feed consumption, body weight gain, structural growth, and blood metabolites in Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 90: 5259-5268.
- 78) Khan MA, Lee HJ, Lee WS, Kim HS, Kim SB, Park SB, Baek KS, Ha JK, Choi YJ. 2008. Starch source evaluation in calf starter: II. Ruminant parameters, rumen development, nutrient digestibilities, and nitrogen utilization in Holstein calves. *Journal of Dairy Science*, 91: 1140-1149.

- 79) Kitakaze T, Harada Nm, Imagita H, Yamaji R. 2015. β -Carotene increases muscle mass and hypertrophy in the soleus muscle in mice. *Journal Nutritional Science and Vitaminology*, 61: 481-487.
- 80) Klosowski B, Porebska KB, Klosowska D, Piotrowski J. 1992. Microstructure of skeletal muscles of growing calves fed silage-based vs hay-based diets. II. Fibre type distribution. *Reproduction Nutrition Development*, 32: 257-263.
- 81) 国税庁. 2014. <https://www.nta.go.jp/kohyo/tokei/kokuzeicho/sake2014/shuzei.htm>
- 82) Krehbiel CR, Harmon DL, Schnieder JE. 1992. Effect of increasing ruminal butyrate on portal and hepatic nutrient flux in steers. *Journal of Animal Science*, 78: 1990-1996.
- 83) Krishnamoorthy U, Muscato T. V, Sniffen CJ, Van Soest PJ. 1982. Nitrogen fraction in selected feedstuffs. *Journal of Dairy Science*, 65: 217-225.
- 84) Kruk ZA, Bottema CDK, Davis JJ, Siebert BD, Harper GS, Di J, Pitchford WS. 2008. Effects of vitamin A on growth performance and carcass quality in steers. *Livestock Science*, 119: 12-21.
- 85) Lane MA, Baldwin RL, Jesse BW. 2000. Sheep rumen metabolic development in response to age and dietary treatments. *Journal of Animal Science*, 78: 1990-1996.
- 86) Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegeiman BM. 2002. Transcriptional co-activator PGC-1 α drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature*, 418: 797-801.
- 87) Lin YQ, Xu Y0, Yue Y, Jin SY, Qu Y, Dong F, Li YP, Zheng YC. 2012. Differences in mitochondrial gene expression profiles, enzyme activities and myosin heavy chain types in yak versus bovine skeletal muscles. *Genetics and Molecular Research*, 11: 2871-2877.
- 88) Lindqvist H, Nadeau E, Jensen SK. 2012. Alpha-tocopherol and β -carotene in legume-grass mixtures as influenced by wilting, ensiling and type of silage additive. *Grass and Forage Science*, 67: 119-128.
- 89) Luiken JJFP, Dyck DJ, Han XX, Tandon NN, Arumugam Y, Glatz JFC, Bonen A. 2002. Insulin induces the translocation of the fatty acid transporter FAT/CD36 to the plasma membrane. *American Journal of Physiology, Endocrinology and Metabolism*, 282: 491-495.
- 90) Luiken JJFP, Turcotte LP, Bonen A. 1999. Protein-mediated palmitate uptake and expression of fatty acid transport proteins in heart giant vesicles. *Journal of Lipid Research*, 40: 1007-1016
- 91) Lynch CJ, Adams SH. 2014. Branched-chain amino acids in metabolic signaling and insulin resistance. *Nature Reviews Endocrinology*, 10: 723-736.
- 92) Lynch CJ, Kimball SR, Xu Y, Salzberg AC, Kawasawa YI. 2015. Global deletion of BCATm increases expression of skeletal muscle genes associated with protein turnover. *Physiological Genomics*, 47: 569-580.
- 93) Mahfudz LD, Nakashima K, Ohtsuka A, Hayashi K. 1997. Growth factors for a primary chick muscle cell culture from shochu distillery by-products. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 61: 1844-1847.
- 94) Marco R, Pestana A, Sebastian J, Sols A. 1974. Oxaloacetate metabolic crossroads in liver. Enzyme compartmentation and regulation of gluconeogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 3: 53-70.
- 95) Marette A, Richardson MJ, Ramlal T, Balon WT, Vranic M, Pessin EJ, Klip A. 1992. Abundance, localization, and insulin-induced translocation of glucose transporters in red and white muscle. *American Journal of Physiology*, 263: 443-452.
- 96) Marshall SA, Campbell CP, Mandell IB, Wilton JW. 1992. Effects of source and level of dietary neutral detergent fiber on feed intake, ruminal fermentation, ruminal digestion in situ, and total tract digestion in beef cattle fed pelleted concentrates with or without supplemental roughage. *Journal of Animal Science*, 70: 884-893.

- 97) Martens H, Rabbani I, Zanming S, Stumpff F, Deiner D. 2012. Changes in rumen absorption processes during transition. *Animal Feed Science and Technology*, 172: 95-102.
- 98) Matsuda J, Hosoda K, Itoh H, Son C, Doi K, Tanaka T, Fukunaga Y, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y. 1997. Cloning of rat uncoupling protein-3 and uncoupling protein-2 cDNAs: their gene expression in rats fed high-fat diet. *FEBS Letters*, 418: 200-204.
- 99) Mearini G, Schlossarek S, Willis MS, Carrier L. 2008. The ubiquitin proteasome system in cardiac dysfunction. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782: 749-763.
- 100) Mentschel J, Leiser R, Mulling C, Pfarrer C, Claus, R. 2001. Butyric acid stimulates rumen mucosa development in the calf mainly by a reduction of apoptosis. *Archiv für Tierernährung*, 55: 85-102.
- 101) Meter WT, Retallick KM, Faulkner DB, PAS, Adcock JW, Shike DW. 2013. Effects of weaning age and source of energy on beef calf performance, carcass characteristics, and economics. *Professional Animal Scientist*, 29: 469-481.
- 102) Minuti A, Ahmed S, Trevisi E, Piccioli-Cappelli F, Bertoni G, Jahan N, Bani P. 2014. Experimental acute rumen acidosis in sheep: Consequences on clinical, rumen, and gastrointestinal permeability conditions and blood chemistry. *Journal of Animal Science*, 92: 3966-3977.
- 103) 宮崎陽子、濱本修、西岡俊一郎. 2008. 省エネ・高付 加価値型焼酎粕飼料化システムの構築. 三井造船技報, 193: 30-35.
- 104) Mizunoya W. 2015. Nuclear receptors and skeletal muscle fiber type. *Journal of Physical Fitness and Sports Medicine*, 4: 259-270.
- 105) Moody WG, Kemp JD, Mahyuddin M, Johnston DM, Ely DG. 1980. Effect of feeding systems, slaughter weight and sex on histological properties of lamb carcasses. *Journal of Animal Science*, 50: 249-255.
- 106) Mueckler M. 1994. Facilitative glucose transporters. *European Journal of Biochemistry*, 219: 713-725.
- 107) Mukai F, Oyama K, Kohno S. 1995. Genetic relationships between performance test traits and field carcass traits in Japanese Black cattle. *Livestock Production Science*, 44: 199-205.
- 108) Myers SE, Faulkner DB, Ireland FA, Parrett DF. 1999a. Comparison of three weaning ages on cow-calf performance and steer carcass traits. *Journal of Animal Science*, 77: 323-329.
- 109) Myers SE, Faulkner DB, Ireland FA, Berger LL, Parrett DF. 1999b. Production systems comparing early weaning to normal weaning with or without creep feeding of beef steers. *Journal of Animal Science*, 77: 300-310.
- 110) Nagasawa T, Yoshizawa F, Nishizawa N. 1996. Plasma Nt-methylhistidine concentration is a sensitive index of myofibrillar protein degradation during starvation in rats. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 60: 501-502.
- 111) Nagasawa T, Kido T, Yoshizawa F, Ito Y. 2002. Rapid suppression of protein degradation in skeletal muscle after oral feeding of leucine in rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 121-127.
- 112) Nair KS, Welle SL, Halliday D, Cambell RG. 1988. Effect of β -hydroxybutyrate on whole-body leucine kinetics and fractional mixed skeletal muscle protein synthesis in humans. *Journal of Clinical Investigation*, 82: 198-205.
- 113) Nikkhah A, Furedi CJ, Kennedy AD, Crow GH, Plaizier JC. 2008. Effects of feed delivery time on feed intake, milk production, and blood metabolites of dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 91: 4249-4260.
- 114) 西村慶子, 中原高士, 大久津昌治, 川本康博, 中西良孝. 2013. 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. 日本畜産学会報, 84: 341-348.
- 115) 西野直樹, 原田宏明, 坂口英. 2001. 高水分粕類のサイレージ化とその利用(その1) 3. ビール粕と発泡酒粕から調製したサイレージの発酵特性. 日本草地学会誌, 47(3): 318-322.
- 116) 丹羽美次. 2001. 高水分粕類のサイレージ化とその利用(その1) 4. トウフ粕のサイレージ化とその利用. 日本草地学会誌, 47(3): 323-326.

- 117) Nocek JE, Russell JB. 1988. Protein and energy as an integrated system. Relationship of ruminal protein and carbohydrate availability to microbial synthesis and milk production. *Journal of Dairy Science*, 71: 2070-2107.
- 118) 農業・食品産業技術総合研究機構. 2005. <http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/nilgs/2005/nilgs05-02.html>
- 119) 農業・食品産業技術総合研究機構(編). 2008. 日本飼養標準・肉用牛(2008年度版). 中央畜産会.
- 120) 農業・食品産業技術総合研究機構(編). 2009. 日本標準飼料成分表(2009年度版). 中央畜産会.
- 121) 農畜産業振興機構. 2015. 統計情報. <http://lin.alic.go.jp/alic/statis/dome/data2/nstatis.htm>
- 122) 農林水産省. 2009. http://www.maff.go.jp/j/wpaper/w_maff/h20_h/trend/part1/chap1/t2_04.html
- 123) 農林水産省. 2016. <http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1/siryu/attach/pdf/index-15.pdf>
- 124) Ogino A, Ishida M, Ishikawa T, Ikeguchi A, Waki M, Yokoyama H, Tanaka Y, Hirooka H. 2008. Environmental impacts of a Japanese dairy farming system using whole-crop rice silage as evaluated by life cycle assessment. *Animal Science Journal*, 79: 727-736.
- 125) Oka A, Maruo Y, Miki T, Yamasaki T, Saito T. 1998a. Influence of vitamin A on the quality of beef from the Tajima strain of Japanese Black cattle. *Meat Science*, 48: 159-167.
- 126) Oka A, Dohgo T, Juen M, Saito T. 1998b. Effects of vitamin A on beef quality, weight gain, and serum concentrations of thyroid hormones, insulin-like growth factor-I, and insulin in Japanese Black steers. *Animal Science and Technology*, 69: 90-99.
- 127) 岡本全弘. 1979. 反芻行動とその消化生理学的意義に関する研究. 北海道立農業試験場報告, 30: 1-71.
- 128) Okine A, Yimamu A, Hanada M, Izumita M, Zunong M, Okamoto M. 2007. Ensiling characteristics of daikon (*Raphanus sativus*) by-product and its potential as an animal feed resource. *Animal Feed Science Technology*, 136: 248-264.
- 129) rskov ER. 1986. Starch digestion and utilization in ruminants. *Journal of Animal Science*, 63: 1624-1633.
- 130) 逢坂憲政. 2001. 高水分粕類のサイレージ化とその利用(その1) 5. リンゴジュース粕のサイレージ化と利用. 日本草地学会誌, 47(3): 327-331.
- 131) Ozawa S, Mitsuhashi T, Mitsumoto M, Matsumoto S, Itoh N, Itagaki K, Kohno Y, Dohgo T. 2000. The characteristics of muscle fiber types of longissimus thoracis muscle and their influences on the quantity and quality of meat from Japanese Black steers. *Meat Science*, 54: 65-70.
- 132) Patra R. C, Lal S. B, Swarup D. 1996. Biochemical profile of rumen liquor, blood and urine in experimental acidosis in sheep. *Small Ruminant Research*, 19: 177-180.
- 133) Pellett LJ, Andersen HJ, Chen H, Tappel AL. 1994. β -Carotene alters vitamin E protection against heme protein oxidation and lipid peroxidation in chicken liver slices. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 5: 479-484.
- 134) Plöger S, Stumpff F, Penner GB, Schulzke JD, Gabel G, Martens H, Shen Z, Gunzel D, Aschecach JR. 2012. Microbial butyrate and its role for barrier function in the gastrointestinal tract. *Animals of the New York Academy of Sciences*, 1258: 52-59.
- 135) Powers SK, Kavasis AN, McClung JM. 2007. Oxidative stress and disuse muscle atrophy. *Journal of Applied Physiology*, 102: 2389-2397.
- 136) Quigley JD, Caldwell LA, Sinks GD, Heitmann RN. 1991. Changes in blood glucose, nonesterified fatty acids, and ketones in response to weaning and feed intake in young calves. *Journal of Dairy Science*, 74: 250-257.
- 137) Ramos S, Tejido ML, Mrtinez ME, Ranilla MJ, Carro MD. 2009. Microbial protein synthesis, ruminal digestion, microbial populations, and nitrogen balance in sheep fed diets varying in forage- to-concentrate ratio and type of forage. *Journal of Animal Science*, 87: 2924-2934.
- 138) Reichmann H, Pette D. 1982. A comparative microphotometric study of succinate

- dehydrogenase activity levels in type I, IIA and IIB fibers of mammalian and human muscles. *Histochemistry*, 74: 27–41.
- 139) Reichrath J, Welter C, Mitschele T, Classen U, Meineke V, Tilgen W, Seifert M. 2003. Different expression patterns of calpain isozymes 1 and 2 (CAPN1 and 2) in squamous cell carcinomas (SCC) and basal cell carcinomas (BCC) of human skin. *Journal of Pathology*, 199: 506–516.
- 140) Roe MB, Chase LE, Sniffen CJ. 1991. Comparison of in vitro techniques to the in situ technique for estimation of ruminal degradation of protein. *Journal of Dairy Science*, 74: 1632–1640.
- 141) Rousset S, Alves-Guerra MC, Mozo J, Mirouz B, Cassard-Doulcier AM, Bouillaud F, Ricquier D. 2004. The Biology of Mitochondrial Uncoupling Proteins. *Diabetes*, 53: S130–S135.
- 142) Sakata T, Tamate H. 1978. Rumen epithelial cell proliferation accelerated by rapid increase in intraruminal butyrate. *Journal of Dairy Science*, 61: 1109–1113.
- 143) Scaini G, Rochi N, Benedet J, Ferreira GK, Teodorak BP, Comim CM, Constantino LS, Vuolo F, Constantino LC, Quevedo J, Streck EL, Pizzol FD. 2011. Inhibition of brain citrate synthase activity in an animal model of sepsis. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 23: 158–163.
- 144) Scheepers A, Joost H. G, Schurmann A. 2004. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 28: 364–371.
- 145) Schiaffino S, Reggiani C. 2011. Fiber types in mammalian skeletal muscles. *Physiological Reviews*, 91: 1447–1531.
- 146) 清水康、大村健太、北村幸夫、小野田弘士、永田 勝也。2013。焼酎粕の各種飼料プロセスの環境負荷評価，環境資源工学，60: 72–77。
- 147) Shimomura Y, Obayashi M, Murakami T, Harris RA. 2001. Regulation of branched-chain amino acid catabolism: nutritional and hormonal regulation of activity and expression of the branched-chain alpha-keto acid dehydrogenase kinase. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*, 4: 419–423.
- 148) Shimomura Y, Honda T, Shiraki M, Murakami T, Sato J, Kobayahi H, Mawatari K, Obayashi M, Harris RA. 2006. Branched-chain amino acid catabolism in exercise and liver disease. *Journal of Nutrition*, 136: 250S–253S.
- 149) 篠田満，櫛引史郎，新宮博行，上田靖子，村井勝，嶮野英子。2007。黒毛和種の肥育後期におけるイネホールクロップサイレージ給与が増体，血液性状および枝肉性状に及ぼす影響。日本畜産学会報，78: 201–208。
- 150) Shioya S, Cai Y. 2004. Development of whole crop rice silage use for dairy and beef production. Proceedings of the Japan-Korea-China Symposium on Grassland Agriculture and Animal Production. *Japanese Society of Grassland Science*, pp. 51–54.
- 151) Smuder AJ, Kavazis AN, Hudson MB, Nelson WB, Powers SK. 2010. Oxidation enhances myofibrillar protein degradation via calpain and caspase-3. *Free Radical Biology and Medicine*, 49: 1152–1160.
- 152) Sniffen CJ, O'Connor JD, Van Soest PJ, Fox DG, Russell JB. 1992. A net carbohydrate and protein system for evaluating cattle diets: II. Carbohydrate and protein availability. *Journal of Animal Science*, 70: 3562–3577.
- 153) Souza MA, Detmann E, Paulino MF, Sampaio CB, Lazzarini SC, Valadares Filho SC. 2010. Intake, digestibility and rumen dynamics of neutral detergent fiber in cattle fed low-quality tropical forage and supplemented with nitrogen and/or starch. *Tropical Animal Health and Production*, 42: 1299–1310.
- 154) Sugden MC, Holness MJ. 2003. Recent advances in mechanisms regulating glucose oxidation at the level of the pyruvate dehydrogenase complex by PDKs. *American Journal of Physiology. Endocrinology and metabolism*, 284: 855–862
- 155) Sutiak V, Sutiakova I, Rosival I. 1999. The interaction of two forms of glutamic acid with ammonia in sheep. *Veterinary Medicine-Czech*, 44: 229–232.
- 156) Sutoh M, Obara Y, Miyamoto S. 1991. The effect of feeding frequency and dietary sucrose

- on rumen fermentation, plasma metabolites and insulin in sheep. *Animal Science and Technology*, 62: 1120-1128.
- 157) 鈴木知之, 神谷裕子, 田中正仁, 服部育男, 野中最子, 佐藤健次. 2010a. カンショ焼酎粕濃縮液を添加した発酵TMRの発酵品質と乳牛における乳生産成績への影響. 日本畜産学会報, 81: 449-456.
- 158) 鈴木知之, 神谷裕子, 田中正仁, 服部育男, 佐藤健次. 2010b. 大豆粕の米焼酎粕濃縮液への置き換えが乳牛の乳生産成績に及ぼす影響. 日本畜産学会報, 81:443-448.
- 159) 鈴木知之, 神谷裕子, 田中正仁, 服部育男, 野中最子, 佐藤健次. 2011. 米, 麦およびカンショ焼酎粕濃縮液の化学成分および栄養価. 暖地畜産学会報, 54: 79-86.
- 160) Swanepoel N, Robinson PH, Erasmus LJ. 2015. Effects of ruminally protected methionine and/or phenylalanine on performance of high producing Holstein cows fed rations with very high levels of canola meal. *Animal Feed Science and Technology*, 205: 10-22.
- 161) Swanepoel N, Robinson PH, Erasmus LJ. 2016. Rumen microbial protein flow and plasma amino acid concentrations in early lactation multiparity Holstein cows fed commercial rations, and some relationships with dietary nutrients. *Livestock Science*, 190: 58-69.
- 162) Szewczyk NJ and Jacobson LA. 2005. Signal-transduction networks and the regulation of muscle protein degradation. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37: 1997-2011.
- 163) Tabaru H, Kadota E, Yamada H, Sasaki N, Takeuchi A. 1988. Determination of Volatile Fatty Acids and Lactic Acid in Bovine Plasma and Ruminal Fluid by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Veterinary Medical Science*, 50: 1124-1126.
- 164) 高平寧子, 金谷千津子, 吉野英治, 紺博昭, 丸山富美子, 粕谷健一郎. 2011. β -カロテン含量を低減した稲発酵粗飼料の給与が黒毛和種去勢牛肥育全期間の肥育成績におよぼす影響. 日本草地学会誌, 56(4): 245-252.
- 165) 高野香織, 岡本健, 大嶽秀之, 武藤辰雄. 2014. HPLC法による少糖類の一斉定量分析の検討について. 関税分析中央所報, 54: 57-60.
- 166) Tamate H, McGilliard AD, Jacobson NL, Getty R. 1962. Effect of Various Diets on the anatomical development of the stomach in the calf. *Journal of Dairy Science*, 45: 408-420.
- 167) 寺島福秋, 寺下茂, 唐来宣人, 伊藤 宏. 1976. ルーメン液の無機物濃度に対する乳酸投与の影響. 日本畜産学会報, 43: 166-174.
- 168) Tillman AD, Sidhu KS. 1969. Nitrogen metabolism in ruminants: Rate of ruminal ammonia production and nitrogen utilization by ruminants- a review. *Journal of Animal Science*, 28: 689-697.
- 169) Uetake K, Ishiwata T, Abe N, Eguchi Y, Tanaka T. 2005. Differences between carcass grades in some morphological, behavioral and physiological measurements at early and middle stages of fattening in crossbred steers. *Animal Science Journal*, 76: 581-586.
- 170) 浦川修司, 吉村雄志. 2003. 自走式飼料イネ用収穫調製機械の効率的作業法. 日本草地学会誌, 49: 413-418.
- 171) van Kempen TA, Van Heugten E, Moeser AJ, Muley NS, Sewalt VJ. 2006. Selecting soybean meal characteristics preferred for swine nutrition. *Journal of Animal Science*, 84: 1387-1395.
- 172) van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74: 3583-3597.
- 173) Vargas CA, Olson TA, Chase, Jr CC, Hammond AC, Elzo MA. 1999. Influence of frame size and body condition score on performance of Brahman cattle. *Journal of Animal Science*, 77: 3140-3149.
- 174) Wahyono A, Jeon J, Jeong ST, Park HD, Kang WW. 2015. Chemical characteristics of Korean turbid rice wine prepared with partially gelatinized wheat flour brewed using different starters. *International food research journal*, 22: 713-720.
- 175) Wanapat M. 2000. Rumen Manipulation to Increase the Efficient Use of Local Feed Resources and Productivity of Ruminants in the Tropics. *Asian-Australasian Journal Animal Science*,

- 13: 59–67.
- 176) Wanapat M, Cherdthong A, Pakdee P, Wanapat S. 2008. Manipulation of rumen ecology by dietary lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf.) powder supplementation. *Journal of Animal Science*, 86: 3497–3503.
- 177) Wang C, Liu Q, Meng J, Yang WZ, Yang XM, He DC, Dong KH, Huang YX. 2009a. Effects of citric acid supplementation on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89: 2302–2307.
- 178) Wang C, Liu Q, Huo WJ, Yang WZ, Dong KH, Huang YX, Guo G. 2009b. Effects of glycerol on rumen fermentation, urinary excretion of purine derivatives and feed digestibility in steers. *Livestock Science*, 121: 15–20.
- 179) Ward LC, Buttery PJ. 1980. Dietary protein intake and 3-methylhistidine excretion in the rat. *British Journal of Nutrition*, 44: 381–390.
- 180) Weigand E, Young JW, Mcgilliard AD. 1975. Volatile fatty acid metabolism by rumen mucosa from cattle fed hay or grain. *Journal of Dairy Science*, 58: 1294–1300.
- 181) Wiborg O, Pedersen MS, Wind A, Berglund LE, Marcker KA, Vuust J. 1985. The human ubiquitin multigene family: Some genes contain multiple directly repeated ubiquitin coding sequences. *EMBO Journal*, 4: 755–759.
- 182) Wu P, Sato J, Zhao Y, Jaskiewicz J, Popov KM, Harris RA. 1998. Starvation and diabetes increase the amount of pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4 in rat heart. *Biochemical Journal*, 329: 197–201.
- 183) Xin HS, Schaefer DM, Liu QP, Axe DE, Meng QX. 2010. Effects of polyurethane coated urea supplement on in vitro ruminal fermentation, ammonia release dynamics and lactating performance of Holstein dairy cows fed a steam-flaked corn-based diet. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 23: 491–500.
- 184) 徐春城、豊川好司. 2005. 青森県に産出されるリンゴジュース粕およびトウフ粕の飼料特性とその利用. 日本草地学会誌, 51(2): 220–225.
- 185) Yamada T, Zhang S, Westerblad H, Katz A. 2010. β -Hydroxybutyrate inhibits insulin-mediated glucose transport in mouse oxidative muscle. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 299: E364–E373.
- 186) Yang A, Larsen TW, Tume RK. 1992. Carotenoid and retinol concentrations in serum, adipose tissue and liver and carotenoid transport in sheep, goats and cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 43: 1809–1817.
- 187) Yang A, Brewster MJ, Lanari MC, Tume RK. 2002. Effect of vitamin E supplementation on α -tocopherol and β -carotene concentrations in tissues from pasture- and grain-fed cattle. *Meat Science*, 60: 35–40.
- 188) 横山学, 馬場武士, 太田剛, 平井一樹. 2009. 麦焼酎粕濃縮液を混合したTMR サイレージの発酵品質および乾乳牛の嗜好性. 福岡県農業総合試験場研究報, 28: 1–7.
- 189) 吉田宣夫, 富田道則, 武政安一, 高橋哲二. 1987. 飼料用稲のホールクロップ利用技術に関する研究. 1. 飼料用稲の調製方法と貯蔵性の関係. 日本草地学会誌, 33: 109–115.
- 190) Young VR, Munro HN. 1978. Ntau-methylhistidine (3-methylhistidine) and muscle protein turnover: an overview. *Federation Proceedings*, 37: 2291–2300.
- 191) Zhang Q, Koser SL, Bezuette BJ, Donkin SS. 2015. Effect of propionate on mRNA expression of key genes for gluconeogenesis in liver of dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 98: 8698–8709.
- 192) Zhang Y, Zhou JW, Guo XS, Cui GX, Ding LM, Wang HC, Li LW, Long RJ. 2012 Influences of dietary nitrogen and non-fiber carbohydrate levels on apparent digestibility, rumen fermentation and nitrogen utilization in growing yaks fed low quality forage based-diet. *Livestock Science*, 147: 139–147.

書名	大分県農林水産研究指導センター研究報告 第7号
出版者名	大分県農林水産研究指導センター
編集者	編集委員長 都留嘉治
	編集委員 上野通宏、吉松英明、伊藤俊一郎、菊池徳宏、石橋隆史 城井秀幸、清原誠二郎、末吉隆、古川英一
発行年月日	平成30年2月28日
住所	〒879-7111 大分県豊後大野市三重町赤嶺2328-8
連絡先	TEL 0974-28-2074 FAX 0974-28-2052 e-mail : a15082@pref.oita.lg.jp
印刷所	いづみ印刷株式会社
