

抗酸化物質アントシアニン高含量の紫サツマイモ・紫トウモロコシ給与による 黒毛和種での発育および酸化ストレス軽減効果の検証

森脇 潤・靄田洋一^{*1}・西 博巳・坂下邦仁・磯部知弘

要 約

効率的な肉牛生産に向け、哺乳期から肥育期のストレス軽減対策として、県内で栽培可能な抗酸化物質アントシアニンを多く含む紫サツマイモおよび紫トウモロコシを哺乳・育成期並びに肥育期に給与した。哺乳期の紫サツマイモパウダー給与区では、酸化ストレス指標であるSH基およびTBARS値において、SH基濃度で除角後0~1時間で有意に増加し($P<0.05$)、5時間以降でも無給与区より有意に高かった($P<0.05$)。一方、TBARS濃度には、有意な差を認めなかつたが、除角直後から24時間後にかけて、給与区が無給与区より低値であった。育成期の紫サツマイモパウダー給与区では、去勢実施後にSH基濃度の増加傾向が認められた。しかしながら、肥育期では、紫トウモロコシサイレージ給与によるTBARSおよびSH基濃度への影響ならびに枝肉成績への影響は認められなかつた。また、それぞれの給与期間の給与区における増体や体重への影響を認めなかつた。以上より、黒毛和種における抗酸化物質アントシアニン高含量飼料給与は、発育への影響は認められないものの、紫サツマイモパウダーを給与した哺乳期および育成期において酸化ストレスを軽減することが示唆された。

キーワード：アントシアニン、黒毛和種、酸化ストレス、紫サツマイモ、紫トウモロコシ

緒 言

黒毛和種の子牛は下痢や肺炎等の疾病に対する抵抗力が弱く、これらのストレスを受けることによる食欲不振、それに伴う発育不良は多額の損失となる。また、肥育牛における濃厚飼料の急激な増加や、肥育中のビタミンAコントロールなどのストレスは、枝肉の暇広発生要因にもなるため、効率的な肉牛生産には、哺乳期から肥育期のストレス軽減への取り組みが必要である。

近年、ポリフェノール類の抗酸化作用によるストレス軽減作用が注目されており、ポリフェノールを含む食物のヒトのみならず畜産分野への応用が試みられている¹⁹⁾。ポリフェノールの一種であるアントシアニンを豊富に含む作物は、強い抗酸化活性や、病気に対する抵抗性の向上、およびストレス軽減効果が人医領域で示されている³⁾。しかしながら、反芻動物における効果は、第1胃での発酵の影響を考慮する必要があるため不明である。

アントシアニン高含量飼料給与によるストレス軽減の評価は、未だ確立されていない。ただし、現在用いられているストレス評価の一般的な方法は、酸化ストレスマーカーによる核酸、アミノ基および脂質の酸化を定量評価することが普及している¹⁷⁾。反芻類を対象にした酸化ストレスによる評価では、チオール(SH)基測定

やチオバルビツール酸濃度測定(TBARS)の有効性が暑熱ストレスで示されている^{14), 15), 16)}。一方、抗菌薬の使用による薬剤耐性についての対策が国内外で進められている^{2), 8), 9)}。したがって、アントシアニン高含量飼料の給与により、ストレスが軽減されれば、抗生物質に代わりえる飼料として、薬剤耐性菌の出現を抑える一つの方策となると考えられる。

本研究では、県内で栽培可能な抗酸化物質アントシアニンを多く含む紫サツマイモおよび紫トウモロコシを哺乳・育成期並びに肥育期に給与することで、酸化ストレス軽減および発育状況を調査し、効果の検証を行った。

試験材料および方法

1 供試材料

紫サツマイモは、加工が容易で、アントシアニン含量が高いことが知られる‘アヤムラサキ’を選定し²¹⁾、場内圃場(鹿児島県霧島市)で生産したものを、洗浄・カットし、乾燥機で乾燥させてパウダー状に微粉碎した。紫トウモロコシは、長野県畜産試験場から譲り受けた種子‘AX-079’を、紫トウモロコシ代替飼料には、トウモロコシ(‘NS110’, ‘34NS4’, ‘TH680’, ‘タカネスター’, ‘34B39’および‘KE0652’の混蕃)を、それぞれ場内圃場で播種して収穫し、ラップサイレージ調製した。

(連絡先)大家畜部

*1 大隅地域振興局農林水産部農政普及課

自然哺乳	500g × 2回	600g × 2回	500g × 2回	600g × 1回
出生	5日間 5日齢 (母子分離)	7日間 12日齢	14日間	7日間 33日齢
				7日間 40日齢
				47日齢 (離乳)

図1 供試牛の代用乳給与プログラム。

2 アントシアニンの給与試験

(1) 試験1 哺乳期（7～47日齢）での給与試験

本農場で生産された供試牛12頭中6頭に、代用乳（原物中 CP : 28%, EE : 18%, TDN : 105%含有：ミルダッシュ；全農）に1.5～10%（ポリフェノール量に換算して0.03-0.34g）の「紫サツマイモパウダー」を給与した。

代用乳量は、生後5日で母子分離した供試牛に、42°Cの温湯で5倍希釈した代用乳を、生後46日齢までの42日間給与した（図1）。

なお、ポリフェノール量については、日本食品分析センターに定量依頼した。

また、試験期間内に下痢などの疾病治療をした場合には、その治療日数を調査した。さらに、生後30日齢で除角した際に、0, 1, 3, 5および24時間後に酸化ストレス評価測定のため採血した。体重および体高等の測定と採血は、毎週1日実施した。

(2) 試験2 育成期（90～230日齢）での給与試験

生後90日齢に達した雄の子牛育成牛4頭中2頭に、自家配合TMR（乾物中CP:16.2%）に紫サツマイモパウダー100g/日（ポリフェノール量に換算して0.28g）をトップドレス給与した。また、生後150日齢に観血去勢した際に、0, 1, 5および24時間後に酸化ストレス評価測定のため採血した。なお、体重および体高等の測定と採血は、2週間に1度実施した。

(3) 試験3 肥育期（17ヶ月齢～出荷）での給与試験

生後17ヶ月齢の去勢4頭中2頭に、自家配合TMR（乾物中CP:16.2%）に紫トウモロコシサイレージを出荷まで1日当たり0.5～3kg（ポリフェノール量に換算して0.35-2.1g）を、対照区にはトウモロコシサイレージを1日当たり1～3kgトップドレス給与した。紫トウモロコシサイレージでそれぞれ体重および体高等の測定と採血は、月に1度実施した。

なお、試験1～3にはいずれも異なる個体を用いた。

3 測定および分析

採取した頸部静脈血液を、直ちに3,000rpm、10分間で血清分離し、分離した血清5mlをファルコンチューブ内

で分析まで-30°Cで保存し、酸化ストレス指標としてのTBARSおよびSH基の並びにインターフェロンγ（IFN-γ）およびインターロイキン-4（IL-4）の濃度定量に用いた。

なお、TBARS値はTanakaら（2011）¹⁶⁾およびYagi（1984）²⁰⁾の方法に従い、蒸留水で血漿を2倍希釈した液1mlに、0.3%チオバルビタール1ml、15%トリクロロ酢酸1mlを試験管内で混合し、100°C、15分加熱した後に5分間氷冷した。さらに、ピリジン：1-ブタノール1:15の混合液3mlを加えて攪拌し、1分間静置後、3000rpm、15分間遠心分離した上清を、分光光度計を用いて532nmにおける吸光度を測定した。なお、標準曲線は1,1,3,3-テトラメトキシプロパンを用いて作成し、脂質ペルオキシダーゼ濃度は、還元したマロンジアルデヒド量として算出した。SH値は、Tanakaら（2008）¹⁵⁾の方法に従い、血漿0.3mLに、2mmol/LのNa₂EDTAを溶解した0.2mol/L Na₂HPO₄を2.7mL、0.2mol/L Na₂HPO₄を溶解した10mmmol/Lジチオニトロベンゼン（DTNB）60μlを加え、室温で5分間放置した後、空のセルをブランクに、分光光度計（SHIMADZU, UV-1200）を用いて412nmの吸光度を測定した。なお、標準曲線は、0.2M Na₂HPO₄に溶解した還元型グルタチオンを利用して作成した。

また、IFN-γは、ELISA Kit for Interferon Gamma（Cloud-Clone Corp, USA; Product No. SEA049Bo）に記載される方法で、IL-4は、ELISA Kit for Interleukin 4（Cloud-Clone Corp, USA; Product No. SEA077Bo）に記載される測定手順にしたがい処理し、マイクロプレートリーダー（Termo, Multiskan GO）（吸光度450nm）で読み取った。

得られたデータの対比較には、Mann-Whitney U-testを用いて、P値が5%未満を有意差ありとした。

結 果

[試験1] 哺乳期における紫サツマイモパウダー給与区での、体高発育に大きな違いは認められなかった（図2）。

除角実施後のSH基濃度は、紫サツマイモパウダー給与区で、除角後0～1時間に有意に増加し（図3, P<0.05），除角後5時間以降は無給与区よりも有意に高

黒毛和種での発育および酸化ストレス軽減効果の検証

かった ($P<0.05$)。なお、給与区、無給与区それぞれのSH基濃度は、 $369\sim417\text{ }\mu\text{mol}$, $326\sim335\text{ }\mu\text{mol}$ であった(図3)。

一方、TBARS濃度は有意な差は認められなかったが、除角直後から24時間後の調査期間すべてで、紫サツマイモパウダー給与区が無給与区の値を下回る傾向が認められ、給与区、無給与区それぞれ $31.1\sim43.7\text{nmol}$, $38.8\sim46.5\text{nmol}$ で推移した(図3)。

紫サツマイモパウダー給与によるIFN- γ 濃度に有意な差を認めなかった(図4)。一方、IL-4濃度は、無給与区に比べて給与区は、生後8週齢における増加がみられなかった(図4, $P<0.05$)。

なお、個体により差があるが、哺乳期では軟便による治療がいずれの区においても0~21日間認められた。

[試験2] 育成期での紫サツマイモパウダー給与区における体高発育に差は認められなかつた(図5)。

去勢実施後では、TBARS($264\sim281\text{ nmol}$ vs $248\sim253\text{ nmol}$)において、紫サツマイモパウダー給与による濃度上昇は認められなかつたものの、SH基で増加傾向が認められた($264\sim281\text{ }\mu\text{mol}$ vs $248\sim253\text{ }\mu\text{mol}$)(図6)。

また、IFN- γ 濃度($0.34\sim0.38\text{ ng/ml}$ vs $0.33\sim0.42\text{ ng/ml}$)において、給与による有意な差を認めなかつた。

[試験3] 肥育期での紫トウモロコシサイレージ給与区における体重増加、TBARSおよびSH基の濃度に差は認められなかつた(図7, 8)。また、紫トウモロコシサイレージ給与区における肥育成績への影響を認めなかつた(表1)。

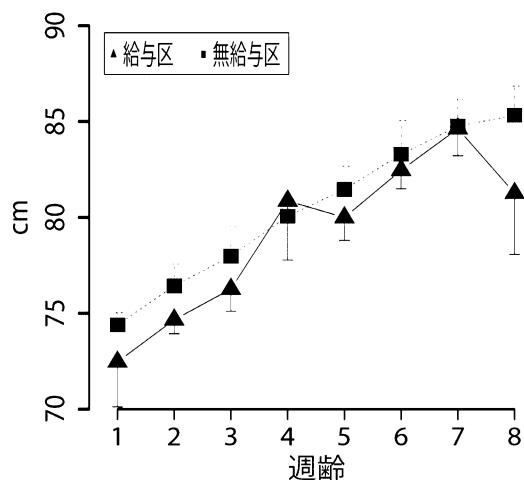


図2 哺乳期給与による体高の推移。

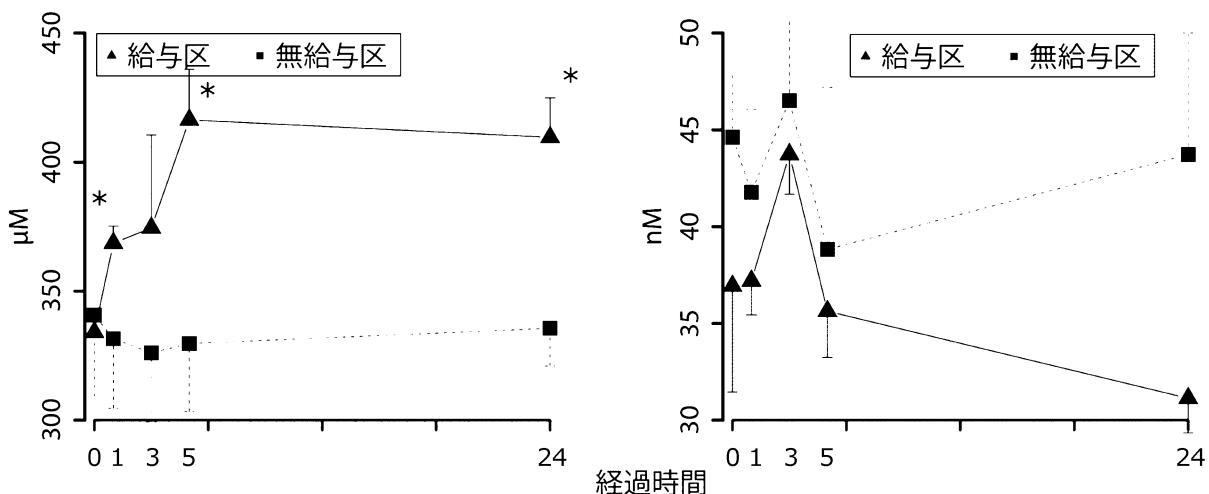


図3 哺乳期給与による除角後のSH基(左), TBARS(右)濃度の推移。

* $P<0.05$

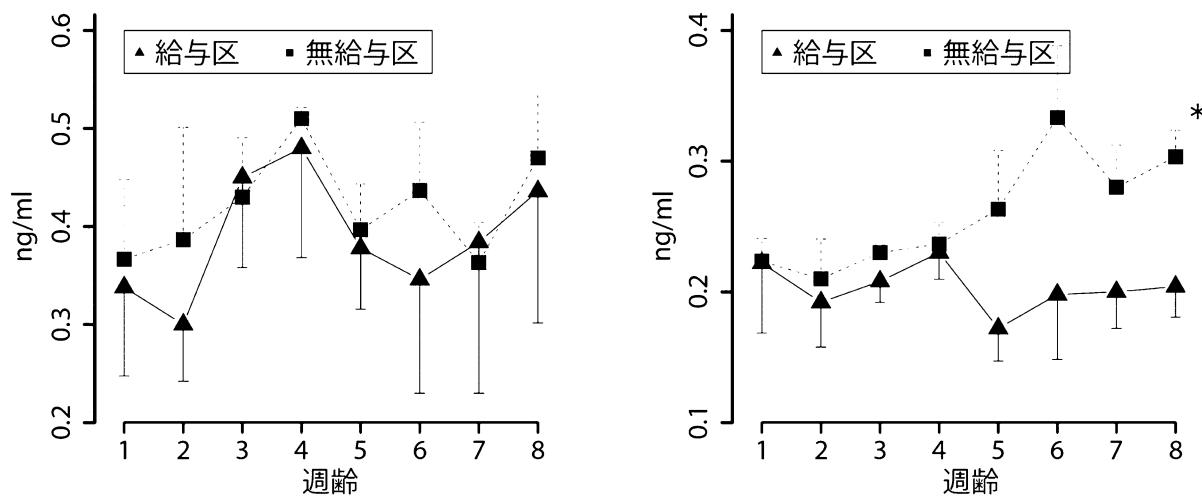
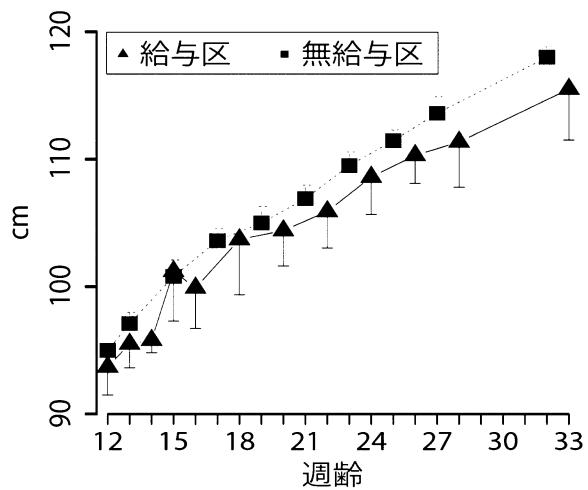
図4 哺乳期給与によるIFN- γ （左）およびIL-4濃度（右）の推移。 $*P<0.05$ 

図5 育成期給与による体高の推移

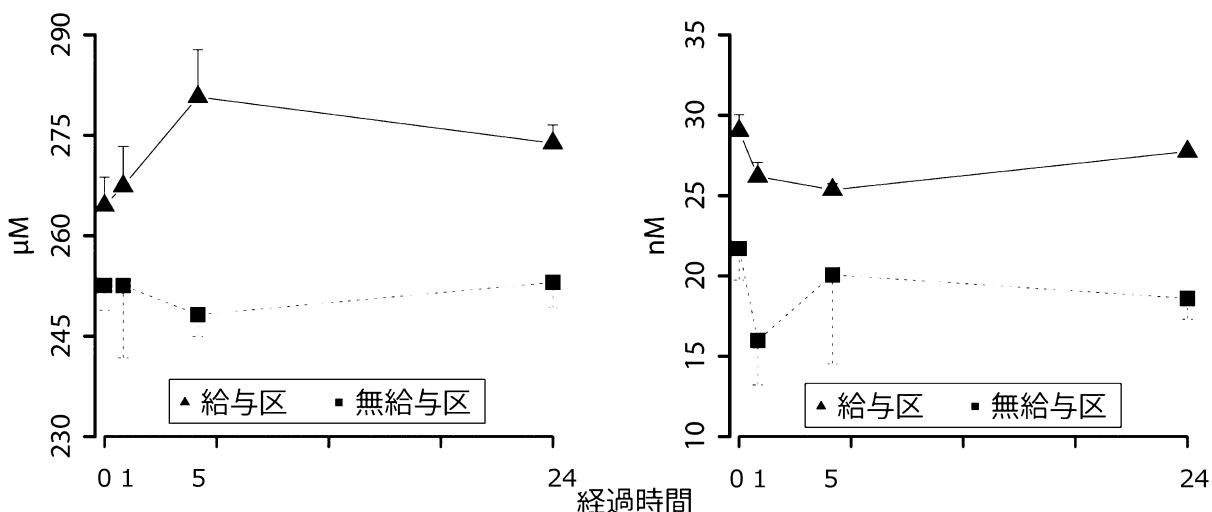


図6 育成期給与による去勢後のSH基（左），TBARS（右）濃度の推移。

黒毛和種での発育および酸化ストレス軽減効果の検証

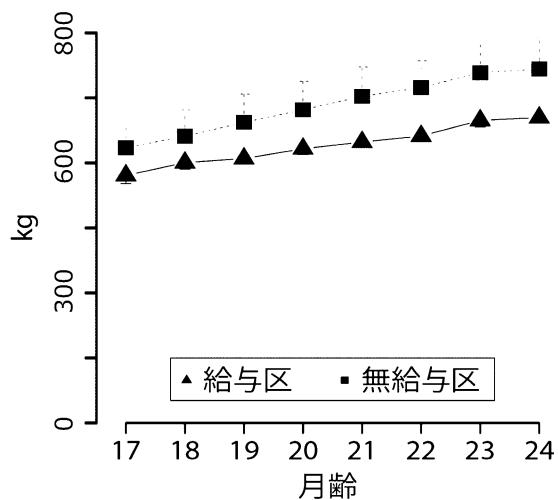


図 7 肥育期給与による体重の推移。

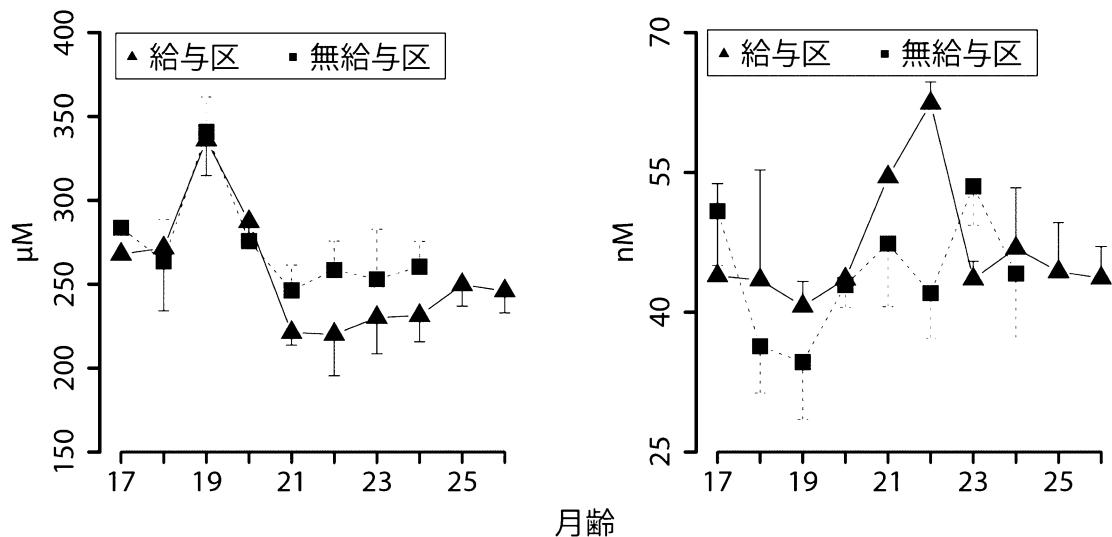


図 8 肥育期給与による SH 基 (左), TBARS (右) 濃度の推移。

表 1 肥育期に紫トウモロコシサイレージを給与した場合の肥育成績。

区分	出荷月齢	体重(Kg)		枝肉重量	格付等級	胸最長筋面積	ばら厚	皮下脂肪厚	BMS	オレイン酸
		開始時	出荷時							
添加区	1号	26	340	722	B-3	52	7.1	4.3	3	52.6
	2号	26	331	756	B-3	47	7.1	3.2	3	49.5
平均		26	336	739	B-3	50	7.1	3.8	3	51.1
無添加区	1号	24	387	904	A-4	74	8.9	3.2	7	45.6
	2号	24	307	729	A-4	52	7.9	2.6	6	53.4
平均		24	347	817	A-4	63	8.4	2.9	6.5	49.5

考 察

本研究では、哺乳期、育成期および肥育期の黒毛和種にアントシアニン高含量飼料である紫サツマイモおよび紫トウモロコシを給与し、血中のタンパク質および脂質に対する酸化反応を定量評価することにより、初めて反芻動物へのアントシアニン給与による酸化ストレス軽減効果を検証した。牛の酸化ストレス反応は、ストレスの種類により反応機序が異なることが示唆されている¹⁴⁾。今回は、機序が明確な手法でそれぞれの酸化ストレス、すなわち、タンパク質側のストレス処理能力として SH 基の濃度を、脂質側での脂質過酸化によるストレス反応産物を TBARS 濃度から評価した。

哺乳期での紫サツマイモパウダーの給与は、子牛の体重および体高に影響せず、除角実施後の SH 基濃度を有意に増加させ、ストレス軽減作用を示した。また、TBARS 濃度においても、低値を示したことから、紫サツマイモパウダー給与によるストレス軽減作用が認められた。血中コルチゾール濃度の評価から推定される除角ストレスは、30 分以内にピークを迎えるが¹²⁾、アントシアニン給与によるストレス軽減作用は、タンパク質および脂質の両者で 8 時間以上持続することが示唆された。

育成期での紫サツマイモパウダーの給与は、子牛の体重および体高に影響しなかったが、去勢実施後に SH 基濃度が増加したことから少なくとも 0~24 時間にわたる酸化ストレス軽減効果が示唆された。ただし、去勢による無給与区および給与区の TBARS 濃度は、除角によるものよりも低く、相違は認められなかった。ストレスの種類により、血中の酸化ストレス指標の反応が異なることが知られており¹⁴⁾、除角による酸化ストレスは、タンパク質側での軽減が示唆されたことから、ストレス機序がタンパク質側のみのストレス反応の可能性がある。

肥育期での紫トウモロコシサイレージの給与は、ビタミンコントロール期間から出荷前までに限って実施したが、体重への影響はなかった。また、枝肉成績への影響はなく、SH 基や TBARS 濃度で認められるようなストレス軽減作用を認めなかった。

給与した紫サツマイモパウダー「アヤムラサキ」のアントシアニン含有量は、既報の 10%よりも低かった⁵⁾。当品種は、高アントシアニン・高デンプン・多収品種として開発され、他の品種‘山川紫’、‘九州 109 号’よりもアントシアニン含有量が高く、天然色素抽出用、ペースト用、パウダー用、ジュース用、醸造用として幅広く利用されているだけでなく^{5), 21)}、耐熱性や色素残存率に優れている¹¹⁾。一方、長野県畜産試験場から譲り受けた紫トウモロコシ‘AX-079’のサイレージのアントシア

ニン含有量は、Hosoda ら (2009)¹⁸⁾ が報告した品種‘Choko C922’よりも低かった。アントシアニン高含量飼料の給与には、作物品種や、加工および貯蔵による色素の消失を考慮しなくてはならない。

本研究で用いた黒毛和種は、品種上、免疫機能発達が不十分とされており、ホルスタイン種に比べて出生後の下痢や肺炎等の疾病に対する抵抗力が弱い¹³⁾。本研究では哺乳期の牛を対象に、免疫指標であるサイトカイン IFN-γ や IL-4 の血中濃度を測定し、紫サツマイモパウダー給与による免疫への効果を検討した。その結果、細胞性免疫指標である IFN-γ には差を認めなかつたものの、液性免疫指標の IL-4 は 8 週齢時に有意な低値が認められた。しかしながら、本研究では、給与区、無給与区の子牛でランダムに軟便が見られたが、給与による効果はなく、供試牛に異常を認めなかつた。また、細胞性免疫の量に差は認められなかつた。一般に、牛は生後 8 週齢頃までは液性免疫を担う B 細胞の割合がリンパ球の中で増加し¹⁰⁾、血中の液性免疫濃度も高まると考えられる。紫サツマイモパウダー給与による酸化ストレス軽減作用は、哺乳牛にとって抗原刺激の低下もたらすことで作用し、その結果、液性免疫機構の成熟が停滞して、IL-4 を低値にとどめた可能性がある。

各期間で給与したアントシアニン量は、哺乳期、育成期、肥育期で 1 頭あたりそれぞれ 0.03~0.34g, 0.28g, 0.35~2.1g と推量される。Hosoda ら (2012)¹⁹⁾ は泌乳牛に紫トウモロコシサイレージを給与した際に、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性の低下やスーパーオキシドジスマターゼ活性の上昇による酸化ストレス軽減作用を報告している。本試験ではこれらの酵素活性について検討を行っていないが、Hosoda ら (2012)¹⁹⁾ の報告では 2 倍量のアントシアニン量を肥育牛に給与して酸化ストレス軽減効果を認めた。今回は給与により採食できた最大量を与えたが、Hosoda ら (2012)¹⁹⁾ の給与量には達しなかつた。アントシアニン給与による酸化ストレス軽減の機序の違いや、給与量、品種によるストレス耐性についてさらなる検討が必要である。

総論として、牛に紫サツマイモおよび紫トウモロコシのアントシアニン高含量飼料を給与し、血中のタンパク質および脂質に対する酸化反応を定量することで、初めて反芻動物へのアントシアニン給与による酸化ストレス軽減効果を検証した。その結果、発育、体重増加および免疫機能には特段影響はしないものの、哺乳期におけるタンパク質、脂質両方の酸化ストレスを低減し、特に育成期におけるタンパク質の酸化ストレス処理能力の向上が認められた。肥育期での給与では酸化ストレス軽減効果が認められなかつた。しかしながら、哺乳期における

黒毛和種での発育および酸化ストレス軽減効果の検証

液性免疫の低下が示唆された。すなわち、アントシアニン高含量飼料の給与は、免疫機能や消化管の発育、成長を抑制しない育成期が望ましいことを意味していると思われる^{4), 7)}。また、アントシアニン色素量の品種差、加工および貯蔵による消失もある。さらには、一般的な飼料用トウモロコシ、サツマイモにおいて、カビによる致死性の高い中毒が牛で報告されている^{*1, 6)}。アントシアニン高含量飼料の給与による酸化ストレス軽減効果は、抗菌剤投与による耐性菌出現抑制の1つの手段となる可能性があるため、今後、アントシアニン高含有飼料の加工・貯蔵性の検討、給与量、反芻胃の消化による色素の影響、酸化ストレス軽減機序についての詳細な研究が必要である。

謝 辞

本試験の実施にあたり、紫トウモロコシ種子を譲渡いただいた長野県畜産試験場、研究計画に際し適切な助言をいただいた鹿児島大学安藤貴朗准教授、乙丸孝之介准教授および永井克尚特任助教、鹿児島県畜産課吉村和敏博士に感謝申し上げる。また、アントシアニン給与に関する情報提供を頂いた九州沖縄農業研究センターの細田謙次上席研究員に感謝申し上げる。

引用文献

- 1) Ellman, G.L. 1959. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 82:70–77
- 2) FAO 2016. The FAO action plan on antimicrobial resistance 2016-2020. Food and agriculture organization of the united nations. Rome.
- 3) 五十嵐喜治 2008. 食品素材によるアントシアニンの成分特性と機能・利用. *日本調理科学会誌* 41巻 3号: 167–175
- 4) Kampen, A.H., I. Olsen, T. Tollersrud, A.K. Storset, A. Lund. 2006. Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 113: 53–63
- 5) 熊谷 亨 2000. 九州農業試験場におけるサツマイモ育種の最近の成果. *育種学研究* 2巻 : 97-104
- 6) 湊 啓子 2012. 飼料用トウモロコシの赤かび病とデオキシニバレノール汚染. *北海道獣医師会誌* 56巻 : 609–614
- 7) Morrill, J.L., W.E. Stewart, R.J. McCormick, and H.C. Fryer 1970. Pancreatic amylase secretion by young calves. *Journal of Dairy Science* 53(1): 72–77
- 8) OECD 2016. Antimicrobial resistance.
- 9) OIE 2016. The OIE strategy on antimicrobial resistance and the prudent use of antimicrobials.
- 10) 大塚浩通 2009. 第3章 哺乳期の生理と管理：日本家畜臨床感染症研究会編 子牛の科学 胎子期から出生、育成期まで. pp111-180 チクサン出版社
- 11) 境 哲史・熊谷 亨・甲斐由美・石黒浩二・山川理・片山健二・中澤芳則・吉永 優 2010. サツマイモ新品種「アケムラサキ」の育成. 九州沖縄農業研究センター報告第53号 : 1-24
- 12) Stafford, K.J. and D.J. Mellor 2005. Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. *The Veterinary Journal* 169(3): 337-349
- 13) 佐野公洋 2009. 第2章 出生時の生理と管理：日本家畜臨床感染症研究会編 子牛の科学 胎子期から出生、育成期まで. pp61-109. チクサン出版社
- 14) 田中正仁 2011. 泌乳牛における高温環境下の酸化ストレス評価とその低減に関する研究. 東北大学博士論文
- 15) Tanaka, M., Y. Kamiya, T. Suzuki, M. Kamiya, and Y. Nakai 2008. Relationship between milk production and plasma concentrations of oxidative stress markers during hot season in primiparous cows. *Animal Science Journal* 79(4): 481–486
- 16) Tanaka, M., Y. Kamiya, T. Suzuki and Y. Nakai 2011. Changes in oxidative status in periparturient dairy cows in hot conditions. *Animal Science Journal* 82(2): 320–324
- 17) 塚原宏一 2012. 酸化ストレスの生体マーカー. 小児感染免疫 24巻 2号 : 181-189
- 18) Hosoda, K., B. Eruden, H. Matsuyama and S. Shioya 2009. Silage fermentative quality and characteristics of anthocyanin stability in Anthocyanin-rich corn (*Zea mays* L.). *Asian-Australian Journal of Animal Science* 22(4): 528-533
- 19) Hosoda, K., B. Eruden, H. Matsuyama and S. Shioya 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
- 20) Yagi, K. 1984. Assay for blood plasma or serum. *Methods in Enzymology* 105: 328–331

*1 日高達太郎・中村 誠・藏前 保・古川雅浩 2017. 黒毛和種繁殖農場で発生した傷害サツマイモ中毒事例. 平成29年度鹿児島県家畜保健衛生業績発表会抄録 pp21

- 21) 山川 理・吉永 優・日高 操・熊谷 亨・小巻克
巳 1997. カンショ新品種“アヤムラサキ”の育成。九州農業試験場報告31号:1-22

Validation of growth and Oxidative Stress Reduction on the Japanese Black cattle by dietary supplements of anti-oxidant anthocyanin-rich purple sweet potato and purple corn

Jun Moriwaki, Yoichi Tsuruta, Hiromi Nishi, Kunihito Sakashita and Tomohiro Isobe

Summary

For more efficient beef production, as a challenge of stress reduction during a milk-fed period to a fattening period, anti-oxidant anthocyanin-rich crops: the purple sweet potato and the purple corn which can grow in Kagoshima Prefecture were supplied to Japanese Black cattle in three periods of a milk-fed, a nursing and a fattening. Sulfhydryl (SH) residue concentration and thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) concentration were examined oxidative stress in the plasma. During a milk-fed period, in a group of which supplied the sweet potato powder, SH residue concentration was significantly increased in 0-1 hour post dehorning ($P<0.05$) and also even after 5 hours, significantly kept in higher than another group of which was not supplied sweet potato powder ($P<0.05$). On the other hand, TBARS concentration was lower in a group of supplied sweet potato powder just after dehorning to 24 hour post dehorning while TBARS concentration was not differed between these groups. During a nursing period, in a group of supplied sweet potato powder, SH residue concentration had entity to increase just after castration. However, a group of supplied purple corn silage was no significant effect was seen among TBARS and SH residue concentration and meat quality during a fattening period. During three periods, there was not significant effect on body height and body mass in anthocyanin treated groups. In conclusion, anti-oxidant anthocyanin-rich crop supplement on Japanese Black cattle was no effect on body growth. However, sweet potato powder supplement could reduce oxidative stress during periods of milk-fed and nursing.

Keywords : anthocyanins, Japanese Black cattle, oxidative stress, purple corn, purple sweet potato