

ヒートダメージ粗飼料給与による反すう家畜の銅欠乏再現試験

仲宗根 一 哉* 千葉 好 夫
長 崎 祐 二 池 田 正 治

I 要 約

ヒートダメージ粗飼料給与により反すう家畜の銅 (Cu) 欠乏が起こりうることを実証するため、アルファルファに密封加熱処理を行い、牧草中の化学成分の変化を調査するとともに、密封加熱処理アルファルファ (H-Alf) を成雌山羊に約6カ月間給与し、血液成分中Cu濃度及び臓器中Cu濃度を測定した。その結果は、次のとおりであった。

- (1) H-Alfの酸性デタージェント繊維 (ADF) 及び Cell-Wall (CW) 中の窒素が未処理アルファルファ (Alf) と比較して有意に増加したが ($p < 0.05, p < 0.01$)、その他の化学成分や、酵素分析の結果から推定した TDN に有意差は認められなかった。
- (2) H-Alf の 1 規定塩酸抽出法により得られた Cu 濃度は湿式灰化法で得られた値の 41.15% と低く、同法から得られた Cu 濃度は 4.06ppm/DM で、モリブデン (Mo) 比が 1.25 となり、Cu 欠乏発生の危険レベル ($Cu/Mo < 2$) となった。
- (3) H-Alf を約 6 カ月間給与した山羊の肝臓中 Cu 濃度は平均 43.5ppm/DM で、 Alf を給与した対照区の平均 126.6ppm/DM に比較して有意に低かった ($p < 0.05$)。また、給与期間中の血清 Cu、血漿 Cu、セルロプラスミン活性も対照区に比較して低下する傾向にあった。

II 緒 言

数年前から県内のいくつかのヘイレージ主体給与農家で舎飼牛に Cu 欠乏症が発生している。同症の牛は、眼周囲・顔面・頸の被毛の退色や脱毛等の症状の外、重症なものでは全身総灰白色となり、削瘦が著しいと共に受胎率の低下や子牛の発育不良等の影響がみられる。しかし、これらの農家で栽培されている牧草を調査したところ、湿式灰化法による Cu 濃度は日本飼養標準の要求量¹⁾(4~10ppm) を満たしており、Cu の吸収を抑制するといわれる Mo の濃度は給与飼料中 1 ppm 以下と低かった。また Cu/Mo 比が 2 以下になると Cu 欠乏症が発生する危険があるが²⁾、Cu/Mo 比は 2 以上あり、危険レベルではなかった。

一方、Cu 欠乏症が発生したこれらの牧場のほとんどが、(1) 気密サイロを所有し通年ヘイレージ主体給与の飼養形態をとっていたこと、(2) サイロ利用 2~3 年後に Cu 欠乏症が発生していること、(3) 繁殖主体の経営で、濃厚飼料の給与量が少ないこと、(4) 同症が舎飼の牛に多く発生し、長期間放牧している牛には全く発症しないこと、(5) 同一の牧場で飼養される牛群の中で、給与飼料全体に占めるヘイレージの割合が高い牛群ほど多く発生していること、(6) 同症の牛を放牧すると数カ月で被毛の退色等の症状が回復すること等の共通点を持つことから、本県で発生した牛の Cu 欠乏症が、Mo 過剰に直接起因して発生したのではなく、ヘイレージが関与する他の新たな要因が介在

* 現 (財) 沖縄県建設技術センター

しているものと考えられた。さらにこれらのヘイレージの多くは貯蔵中に発熱した痕跡があることから、ヒートダメージを受けたヘイレージと牛のCu欠乏症との間に何等かの関連があるものと推察された。

著者らはこれまでの調査研究から、サイロ内での高温発酵により、ヘイレージ中のCuの可溶性が低下することを実験的に確認した³⁾。さらに、飼養形態及び給与飼料の異なる4つの牛群を用いて、1規定塩酸抽出法により抽出される飼料中Cu濃度が牛血清中Cu濃度と密接な関係にあることを明らかにした⁴⁾。

本試験ではサイロ内のヒートダメージを想定して密封加熱処理したアルファルファを山羊に給与し、給与期間中の血液成分中Cu濃度の経時的变化及び屠殺後の臓器中Cu濃度から、ヒートダメージが粗飼料中のCuの利用性に及ぼす影響について検討したので報告する。

Ⅲ 材料及び方法

1. 試験飼料の調製

試験飼料として市販のアルファルファヘイキューブを木づちで砕き、これに蒸留水を加えて水分約50%に調整した。水分調整後、約10kgを厚手のポリ袋に密封し、さらにポリエチレン密閉容器(容積20ℓ、耐熱110℃)に入れ、70℃に設定した循風乾燥機中に4日間置いた。その後内容物を取り出し、乾燥機中で70℃、72時間加熱乾燥し、種々の分析用試料及び給与試験飼料として用いた。給与試験の対照飼料は同じ市販のアルファルファヘイキューブを木づちで砕いたものを用いた。なお給与試験期間中は連続して試験飼料の調製を行った。

2. 供試山羊

供試山羊は表-1のとおりである。

試験飼料給与開始時の試験区及び対照区の平均体重は、23.7kgと25.0kg、平均日齢は389日と348日で、両区間に有意差は認められなかった。

表-1 供試山羊

区	個体No	品 種	性 別	試験開始時 日 齢	試験開始時 体 重 (kg)
対 照 区	1	日本ザーネン種	雌	328	19.4
	2	日本ザーネン種	〃	331	27.1
	3	交 雑 種	〃	327	26.8
	4	交 雑 種	〃	406	26.7
平均				348±39	25.0±3.7
試 験 区	5	交 雑 種	雌	406	21.0
	6	日本ザーネン種	〃	327	24.2
	7	日本ザーネン種	〃	385	24.2
	8	交 雑 種	〃	437	25.4
平均				389±46	23.7±1.9

注) 日齢、体重とも対照区、試験区間に有意差なし

3. 試験期間

- (1) 馴致期間：1990年5月23日～1990年8月23日（3カ月）
- (2) 本試験：1990年8月24日～1991年2月26日（6カ月）

4. 給与方法

- (1) 馴致期間：試験区、対照区とも砕いたアルファルファヘイキューブを単一給与した。
給与量は体重あたり乾物で3%とし、1日1回定時に給与した。
- (2) 本試験：対照区は砕いたアルファルファヘイキューブを2カ月間は体重あたり乾物で3%、3カ月目からは4%給与した。試験区はH-Alfを2カ月間は体重あたり乾物で3%、3カ月目からは4%給与した。

5. 飼養管理

試験期間中は消化試験用ケージで個体管理した。また馴致期間及び試験期間とも自由飲水とし、ビタミン、ミネラル等の飼料添加物は一切用いなかった。

6. 分析用試料の採取

試験飼料及び対照飼料の化学分析用試料採取は給与試験開始から試験終了時まで6回行い、各試料500gを採取した。

また、給与試験開始14日前に全頭静脈血を採血し、血液検査を行った。試験開始後は月1回、定時に採血、採糞及び体重測定を行った。なお採糞及び体重の測定は採血の2時間前に行った。試験終了後は直ちに全頭屠殺し、臓器を摘出、一部病理標本用に数10g取り、残りを全て分析用試料とした。

7. 分析項目及びその方法

(1) 飼料及び糞の化学分析

試験飼料の採取試料はカッティングミルで1mm以下に粉碎し、種々の分析に供した。

一般飼料成分は常法に従い、ADFの定量は堀井・阿部の方法⁵⁾によった。酵素分析は阿部らの方法⁶⁾に従った。ADIN及び、CW中窒素は試料をデタージェント処理及び酵素処理した後、残さ中の窒素をケルダール法により定量した。リン(P)、カルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)、カリウム(K)、鉄(Fe)、Cu、亜鉛(Zn)は試料を硝酸-過塩素酸(2:1)で湿式灰化後、Pはバナドモリブデン酸比色法で、その他の元素は原子吸光法で定量した。水溶性イオウの定量は硫酸バリウム重量法で行い、Moの定量はジチオール比色法で行った。飲水中のミネラルの定量は直接原子吸光法で行った。

糞中Cu濃度の測定は採取した糞を60℃、72時間加熱乾燥後、1mm以下に粉碎し、硝酸-過塩素酸(2:1)で湿式灰化後、原子吸光法で定量した。

(2) 血液及び臓器中Cu濃度の測定

血清Cu、血漿Cuの定量は試料1mlを200mlトールピーカーにとり、硝酸-過塩素酸(2:1)約15mlで湿式灰化した。その後蒸発乾固し、1規定塩酸3mlを加え、1昼夜放置後試料液として直接原子吸光法で測定した。また、セルロプラスミン活性の測定はHouchinの方法⁷⁾に従っ

て行った。

肝臓、心臓、腎臓、ひ臓は屠殺後すぐに臓器全体をステンレスナイフで細切りし、循風乾燥機中で60°C、72時間加熱乾燥した。その後カッティングミルで1mm以下に粉碎し、分析試料として5g採取して、硝酸-過塩素酸(2:1)で湿式灰化後、蒸留水で100mlに希釈、定容して原子吸光法によりCuの定量を行った。

IV 結 果

表-2に試験飼料(H-Alf)及び対照飼料(Alf)の化学成分を示した。なおCa、Mg、K、Fe、Cu、Znの定量は試料を湿式灰化法で前処理し、原子吸光法により行った。試験飼料と対照飼料の一般飼料成分及びミネラル成分等に有意差は認められなかったが、試験飼料のADFは平均34.07%で、対照飼料の30.55%に対し有意に高かった($p<0.05$)。また、牧草のヒートダメージの指標として、ADINがあるが、表-3に示したように、本試験における加熱条件では、ADINの増加は認められなかった。しかし、CW中の窒素は試験飼料が平均1.30%で、対照飼料の平均0.67%より有意に高かった($p<0.01$)。

表-2 試験飼料の一般飼料成分及び無機元素濃度

区 分	水分	粗蛋白	粗脂肪	粗繊維 DM %	粗灰分	NFE	ADF
対照区(n=6)	10.31 注1) (1.25)	16.25 (1.45)	2.29 (0.14)	25.63 (0.73)	16.52 (0.85)	39.31 (2.01)	30.35 (1.64)
試験区(n=6) (70°C、4days)	8.25 (2.32)	16.53 (0.65)	2.28 (0.44)	27.53 (1.92)	13.26 (4.20)	40.41 (2.79)	34.07 (1.77)
t検定	NS 注2)	NS	NS	NS	NS	NS	* 注3)

区 分	N	P	K	Ca	Mg	S	Fe	Cu	Zn	Mo
	DM %						DM ppm			
対照区(n=6)	2.60 (0.23)	0.22 (0.05)	2.79 (0.47)	1.39 (0.03)	0.26 (0.10)	0.51 (0.10)	967 (112)	9.58 (0.66)	23.10 (3.55)	2.98 (1.27)
試験区(n=6) (70°C、4days)	2.64 (0.10)	0.22 (0.02)	2.73 (0.26)	1.41 (0.13)	0.22 (0.05)	0.43 (0.09)	664 (413)	9.93 (0.55)	21.70 (4.73)	3.38 (0.75)
t検定	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

注1) 平均値(標準偏差)

注2) NS: Not significant.

注3) * : $p<0.05$

表-3 試験飼料の密封加熱処理による成分変化

区 分	ADF	N	ADIN	CW-N	ADIN/N	CW-N/N
	DM %					
対照区 (n=6)	30.55 注1)	2.60	0.26	0.67	10.23	25.92
	(1.64)	(0.23)	(0.02)	(0.07)	(1.60)	(0.85)
試験区 (n=6)	34.07	2.64	0.30	1.30	11.49	49.00
(70°C、4days)	(1.77)	(0.10)	(0.07)	(0.10)	(2.63)	(3.26)
t 検定	* 注2)	NS	NS	** 注3)	NS 注4)	**

注1) 平均値 (標準偏差)

注2) * : p<0.05

注3) **: p<0.01

注4) NS: Not significant.

次に酵素分析の結果を表-4に示した。試験飼料中のObの値は平均44.53%で、対照飼料の平均38.03%より有意に高かった (p<0.05)が、その他の成分に有意差は認められなかった。さらに、得られた成分値を用いてTDN推定式からTDNを算出したところ、試験飼料が平均48.36%、対照飼料が平均49.73%でほぼ等しく、両飼料間に有意差は認められなかった。

表-4 試験飼料の酵素分析によるTDNの推定

区 分	OM	OCC	OCW	Oa	Ob	粗脂肪(EE)	推定(TDN注1)
	DM %						
対照区 (n=6)	83.48 注2)	33.03	50.47	12.43	38.03	2.29	49.73
	(1.10)	(0.97)	(0.11)	(0.95)	(1.05)	(0.14)	(1.24)
試験区 (n=6)	86.74	32.42	54.33	9.80	44.53	2.28	48.36
(70°C、4 days)	(4.20)	(4.92)	(5.47)	(3.62)	(3.04)	(0.44)	(4.98)
t 検定	NS 注3)	NS	NS	NS	** 注4)	NS	NS

注1) $TDN = [0.951(OCC + Oa) - 4.9] + 0.266Ob + 1.25[0.619EE - 0.4]$

注2) 平均値 (標準偏差)

注3) NS: Not significant.

注4) **: p<0.01

表-5には1規定塩酸抽出法により両飼料のCu濃度を測定した結果を示した。対照飼料の Alf では、1規定塩酸抽出法により得られたCu濃度の平均が9.69 ppm/DM、そのCu抽出率は101.15%となり、湿式灰化法により得られた値とほぼ等しかった。これに対し、試験飼料の H-Alfは、1規定塩酸抽出法により得られたCu濃度の平均が4.06 ppm/DMであり、Cu抽出率では41.15%とかなり低くなった。上記の結果、対照飼料ではCu/Mo比が、平均3.60でCu欠乏の危険レベル(Cu/Mo<2)から外れていたが、試験飼料では平均1.25と危険レベルの域内であった。

表-5 試験飼料の湿式灰化法で測定したCu値(Dcu)と1規定塩酸抽出法で測定したCu値(Ecu)及び1規定塩酸抽出率(Ecu/Dcu)とCu/Mo比の関係

区 分	Mo (DM ppm)	Cu (DM ppm)		Ecu/Dcu (%)	Cu/Mo	
		Dcu	Ecu		Dcu/Mo	Ecu/Mo
対照区 (n=6)	2.98 (1.27) 注1)	9.58 (0.66)	9.69 (0.78)	101.15 (4.50)	3.59 (1.36)	3.60 (1.24)
試験区 (n=6) (70°C, 4 days)	3.38 (0.75)	9.93 (0.55)	4.06 (0.23)	41.15 (4.26)	3.08 (0.86)	1.25 (0.28)
t 検定	NS 注2)	NS	** 注3)	**	NS	**

注1) 平均値 (標準偏差)

注2) NS: Not significant.

注3) **: p<0.01

試験期間中の飼料の採食率は両区とも97~98%の範囲で推移しており、有意差は認められなかった。体重については図-1に示したように両区とも同様に推移しており、試験期間中の日増体量は対照区で平均40.1g、試験区で平均39.1gとほぼ等しく、有意差は認められなかった。また健康状態についても外見上の異常は特に認められなかった。

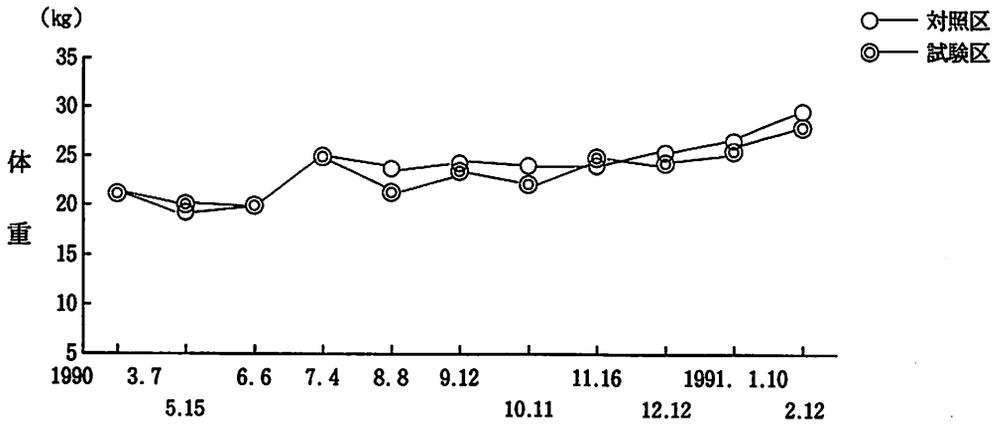


図-1 山羊体重推移

試験期間中の山羊の糞中 Cu濃度を表-6 に示した。馴致期における両区の糞中 Cu濃度は約 19 ppm/DMでほぼ等しく、有意差は認められなかったが、試験開始後は対照区の平均が 16.43~19.60 ppm/DMの範囲で推移したのに対し、試験区では平均 11.90~17.54 ppm/DMと有意に低かった ($p < 0.05$)。

表-6 試験飼料給与以前及び給与期間中の山羊糞中銅濃度

採取期	対照区	試験区
	Cu (DM ppm)	
給与45日前	19.31 ± 0.31 注1)	19.33 ± 0.45
14日 "	19.17 ± 0.74	19.09 ± 0.42
給与19日目	19.60 ± 0.97	17.54 ± 0.79 * 注2)
84日 "	16.43 ± 1.34	12.57 ± 0.87 ** 注3)
110日 "	17.89 ± 1.65	11.90 ± 2.58 **
139日 "	19.01 ± 0.50	15.38 ± 0.97 **
172日 "	17.93 ± 0.80	15.34 ± 1.62 *

注1) 平均値 ± 標準偏差

注2) * : $p < 0.05$

注3) **: $p < 0.01$

血液成分中の Cu濃度を表-7 に示した。試験区の血清 Cu及び血漿 Cu濃度は試験開始約 1 カ月後から対照区に比較して低下する傾向にあり、特に試験開始約 3~4 カ月以降は血漿中 Cu濃度及びセルロプラスミン活性 (Cp) とも対照区に比べ、約 30%程度低い値であった。

表-7 試験飼料給与による山羊血清銅、血漿銅及びセルロプラスミン活性(Cp)の変化

採血日	血清銅 ($\mu\text{g/ml}$)		血漿銅 ($\mu\text{g/ml}$)		Cp (吸光度) 注1)	
	試験区	対照区	試験区	対照区	試験区	対照区
給与14日前	0.65 注2) (0.07)	0.75 (0.13)	1.55 (0.60)	1.49 (0.21)		
給与19日目	0.71 (0.23)	0.88 (0.18)	1.42 (0.22) ^a	2.03 (0.56)		
“ 48 “	0.80 (0.17)	0.79 (0.04) ^a 注5)	1.19* 注3) (0.16)	1.46 (0.14)	0.088 (0.011) ^a	0.078 (0.021)
“ 84 “	0.67 (0.72)	0.86 (0.05)	1.37 (0.32)	1.57 (0.32)	0.051 (0.016) ^b	0.068 (0.016) ^a
“ 110 “	0.72 (0.17)	0.87 (0.05)	0.99**注4) (0.26) ^b	1.64 (0.12)	0.086 (0.037)	0.089 (0.011)
“ 139 “	0.66 (0.19)	0.91 (0.06) ^b	1.06 (0.31)	1.44 (0.25)	0.064* (0.024)	0.095 (0.009) ^b
“ 172 “	0.67 (0.23)	0.92 (0.11)	1.10* (0.32)	1.59 (0.20)	0.064 (0.035)	0.098 (0.037)

注1) 波長 540 nm

注2) 数値は平均値±(標準偏差)

注3) * : 区間の有意差 ($p < 0.05$) を示す。

注4) **: 区間の有意差 ($p < 0.01$) を示す。

注5) 同列の a, b 間に有意差 ($p < 0.05$) あり。

次に臓器中の Cu 濃度を表-8 に示した。Cu 欠乏の指標である肝臓中の Cu 濃度は、対照区の平均が $126.6 \pm 16.1 \text{ ppm/DM}$ であったのに対し、試験区では平均 $43.5 \pm 47.6 \text{ ppm/DM}$ と有意に低かった ($p < 0.05$)。特に試験区の 2 頭は 10 ppm 前後と極端に低い値であり、Cu 欠乏の状態と考えられた。また、心臓、腎臓、ひ臓中の Cu 濃度も試験区が低い傾向にあった。

表-8 給与試験終了後の山羊の臓器中銅濃度

区分	山羊 No	肝 臓	心 臓	腎 臓	脾 臓
		DM ppm			
対 照 区	1	131.7	18.4	17.3	6.2
	2	145.0	16.4	17.2	5.7
	3	122.9	12.8	18.1	5.4
	4	106.6	19.7	18.4	5.7
平均値 ± SD		$126.6^a \pm 16.1$	16.8 ± 3.0	17.8 ± 0.6	5.8 ± 0.3
試 験 区	5	16.1	16.2	14.4	5.2
	6	112.7	18.3	17.9	6.3
	7	9.0	15.0	15.7	4.7
	8	36.1	18.6	20.0	5.1
平均値 ± SD		$43.5^b \pm 47.6$	17.0 ± 1.7	17.0 ± 2.5	5.3 ± 0.7

注) a b 間に有意差有り。 $p < 0.05$ 。

V 考 察

著者らは前報において、(1) ヒートダメージを受けた飼料では、Cuの可溶性が低下すること、(2) 1規定塩酸抽出法により抽出される飼料中Cu濃度は牛血清中Cu濃度と高い相関を持つことを明らかにした。これらのこととCu欠乏症との関連を考える上で検討すべきは、飼料中の1規定塩酸により抽出されるCuあるいは抽出されないCuが家畜体内におけるCuの利用性に影響を与えるかという点にある。

1規定塩酸抽出法は、植物体中のCuを含むいくつかの無機元素を原子吸光法で定量する際、従来行われてきた湿式灰化処理と比較して、ほぼ等しい分析値が精度よく得られる分析方法として確立した^{9, 10)}もので、1規定塩酸で抽出される飼料中Cuと家畜のCu利用性との関係を研究した例は皆無といってよい。著者らは1規定塩酸抽出法が家畜のCu利用性の指標になりうるものと考え、Cu欠乏症の再現試験として本研究を行った。

その結果、70℃、4日間の密封加熱処理により、試験飼料中Cuの1規定塩酸抽出による抽出率は50%以下であった。同法により得られた飼料中Cu濃度は約4ppmであり、日本飼養標準に記載されたCu要求量の下限にある。しかも飼料中のMo濃度が割合高かったことから、Cu/Mo比はCu欠乏症発生の危険レベルの2以下となった。もし、1規定塩酸により抽出されるCuが前述の仮定に従って、Cuの利用性に関与しているとするならば、試験飼料の長期給与によって、山羊の血液成分中及び臓器中のCu濃度が変化する可能性が強い。今回のH-Alf給与試験の結果、実際に肝臓中Cu濃度及び血漿中Cu濃度及びセルロプラスミン活性が低下することが確認された。特に試験区の2頭の山羊の肝臓中Cu濃度が10ppm前後と著しく低かったことは、外見上はCu欠乏症を呈していないものの、Cu欠乏の状態と考えられた。

以上のことから、家畜にとって十分量のCuが含まれているにもかかわらず、ヒートダメージを受けた粗飼料では、家畜に摂取されてもCuの可溶性が低いため、Cu/Mo比が低下してCuの吸収抑制が生じ、その飼料で飼養される家畜ではCuの利用性が低下することが証明された。

最後に、これまで国内で報告された牛のCu欠乏症の事例^{10, 11, 12)}では、全てMoの過剰障害によるものが主要因であり、飼料中のCu濃度が極端に低く、牛の要求量以下であるために起こる、いわゆる原発性のCu欠乏症についてはその発生は否定的であった¹³⁾。しかし近年の畜産経営形態の変化に伴い、どちらにも属さない新たな要因が存在することが明らかとなった。しかも、それが牧草のヒートダメージに起因することから、Cuのみならず、蛋白質、アミノ酸、ビタミン等の他の家畜栄養上重要な成分の欠乏も十分予想され複合的な栄養欠乏となることが懸念される。

VI 引用文献

- 1) 農林水産省農林水産技術会議事務局、1987、日本飼養標準、36～44
- 2) 早川竜雄・小倉幸子、1963、医学と生物、67～127
- 3) 仲宗根一哉、1989、加熱処理による牧草中Cu及びZnの形態的变化、沖畜試研報、27、143～146

- 4) 仲宗根一哉、1989、ヒートダメージサイレージと牛の銅欠乏症との関連、沖畜試研報、27、147～154
- 5) 堀井 聡・阿部 亮、1970、粗飼料の細胞膜構成物質に関する研究、畜産試験場研究報告、23、83～87
- 6) 阿部 亮、1988、炭水化物を中心とした飼料分析法とその飼料栄養評価法への応用、畜産試験場研究資料 (2)、
- 7) Houchin O. B., 1958, clin. chem., 4, 519～523
- 8) Underwood E. J., 1975, 微量元素、丸善、57～72
- 9) 串崎光男、1968、原子吸光分光分析に植物試料抽出法を併用した Mn, Cu, Zn, Mg の定量の簡易迅速化、土肥誌、39、489
- 10) 小倉幸子外 5 名、1965、塩害による牛のモリブデン中毒、家畜試研究報告、50、24～29
- 11) 島田保昭・藤岡荘一郎、1970、和牛における被毛退色の原因調査について、日獣会誌、23、616～625
- 12) 広岡 実外 7 名、1985、黒毛和種繁殖牛における銅欠乏症の発生と要因および治療・対策、獣医畜産新報、No. 771、649～652
- 13) 高橋達児、1978、本邦草地の無機栄養および牧草の無機品質に関する諸問題 4. 銅及びほう素について、日草誌、24(2)、177～184

研究補助：立津政吉、又吉博樹