

CNSL (カシューナッツ殻油) 給与の乳牛へ 及ぼす効果

(株)あかばね動物クリニック
 濱嶋 洋輔 (はまじま ようすけ)・宮島 吉範 (みやじま よしのり)
 鈴木 保宜 (すずき やすのぶ)
 東北大学大学院農学研究所 教授
 北澤 春樹 (きたざわ はるき)
 京都大学生存圏研究所
 准教授 飛松 裕基 (とびまつ ゆうき)
 教授 梅澤 俊明 (うめざわ としあき)
 出光興産(株)アグリバイオ事業部
 田森 航也 (たもり こうや)・犬童 優樹 (いんどう ゆうき)
 疋田 千枝 (ひきた ちえ)・冷牟田 修一 (ひやむた しゅういち)

はじめに

ホルスタイン種乳牛においては育種改良による乳量増加の半面で乳量に見合った栄養摂取が困難な個体が数多く出現しておりその影響で繁殖成績が低下することが問題となっている。代表的な現象として分娩直後から発生する低栄養状態の期間(負のエネルギーバランスの期間)をどのようにして短縮することができるかが直接の解決策として挙げられている。不足する栄養を補う目的で乾物摂取量(DMI)を高める飼料給与法に関しては、容易であるように見えるがさらなる乳量増加が引き起こされるなど低栄養改善について未解決の課題も多く、過去20年間以上検討は続いている¹⁾。著者らはCNSL製剤を給与することにより、DMIの向上と乳量の増産が認められることを報告してきた²⁾。本稿ではCNSLの生化学的性状による代謝に与える影響、腸管内の炎症抑制に対する効果、ルーメン微生物の細胞壁分解に対する効果を解析するとともに、給与牛の血液分析による効果の検証を行った。CNSLの生化学的性状が代謝に与える影響に関しては、脂質、タンパク質の吸収の促進が、腸管内の炎症に対する効果では腸管微生物の分解物による炎症を抑制すること、ルーメン微生物による細胞壁分解では、リグニン分解の促進が、また給与牛の血液分析ではイン

スリン耐性の緩和やストレスマーカー、急性期蛋白質の低減が見られたので報告する。

CNSLとは

カシューナッツ殻液(Cashew Nut Shell Liquid; CNSL)は、カシューナッツを覆う殻から得られる天然物(油脂)であり、一部の細菌に対して抑制的効果を示すことが報告されている。また、CNSLを含む製剤を牛に給与することによって、ルーメン内の発酵が改善され、VFAの産生量が増加することや乳量や増体、産肉成績が向上すること、そして分娩前後に発生する疾病(周産期疾病)を低減させること、並びに肉牛の肝疾患の低減が見出されており²⁾、多くの畜産現場で活用されている。

結果

1. 生化学的性状からみた代謝に与える影響

(1) CNSLの界面活性効果

界面活性効果は脂質を水溶液に可溶化する働きで、胆汁酸などにその働きがあることが知られており、脂質の吸収に大きな役割を果たす。

界面活性効果の指標としてCMC(臨界ミセ

ル形成濃度)が知られており、この濃度が低いほど界面活性化能が高いといわれている。CNSLのCMCは0.003%であった。陽性コントロールSDS(ドデシル硫酸ナトリウム:強い界面活性作用を持つことが知られている)のCMCは0.06%であり、CNSLは高い界面活性化能を有していることがわかった。さらに食用油(アマニ油)を用いてCNSLの持つ可溶化(乳化)能の検証を行った。

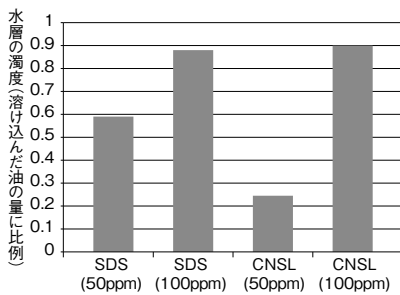


図1 脂質の可溶化(乳化)

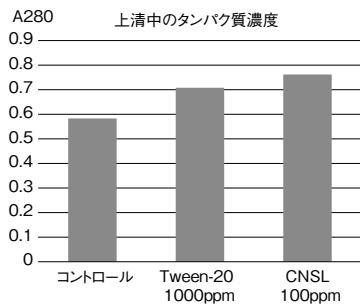
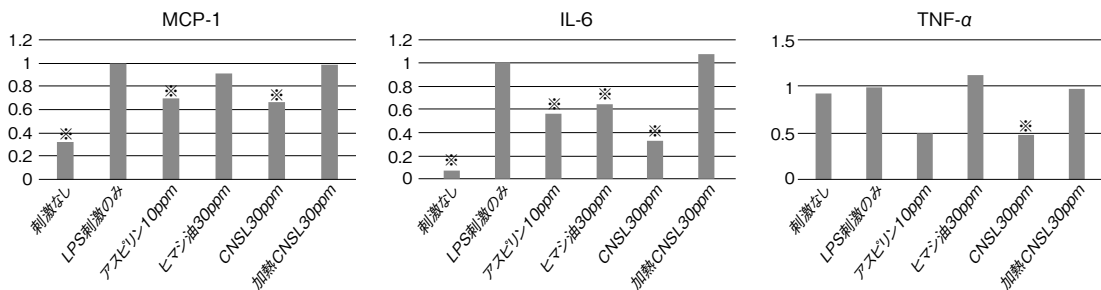


図2 タンパク質の可溶化



※1検定でLPS刺激のみに対し群間有意差あり(p<0.05)

図3 サイトカイン遺伝子の発現解析結果(RT-PCR)

結果を図1に示す。CNSLによる脂質の可溶化(乳化)能が確認できた。このことからCNSL給与による家畜の消化管内での脂質の消化、吸収を促進することが示唆された。

(2) 蛋白質の可溶化

同様に蛋白質の消化、吸収への効果を検証するため、中絶らの方法³⁾を改変して実施した。蛋白質としてソイプロテイン(J-オイルミルズ社製)を用いた。結果を図2に示す。CNSLによる蛋白質の可溶化促進が示唆された。

2. 腸管内の炎症抑制に対する効果(豚腸管細胞を用いた炎症遺伝子の発現解析)

腸管内でのエンドトキシン(グラム陰性菌の外膜を構成するリポ多糖で、炎症性サイトカインの産生を介して強力な炎症反応を惹起する)による炎症反応に対するCNSLの効果を評価するために、被験サンプルをブタ腸管上皮細胞(東北大学麻生、北澤らが樹立⁴⁾)に添加して培養し、サイトカイン遺伝子とサイトカイン蛋白質の定量を行った⁵⁾。

被験サンプルにはCNSL、加熱CNSLの他、陽性コントロールとしてアスピリン、ヒマシ油を用いた。RT-PCRの結果を図3に示す。その結果、CNSLはLPSに誘発されるMCP1(炎症性ケモカイン)、IL-6(炎症誘発性サイトカイン)およびTNF-α(炎症誘発性サイトカイン)の

発現上昇を抑制した。また蛋白質レベルでも、CNSLはLPSに誘発されるMCP1の分泌上昇を抑制した(図4)。上記の結果からCNSLの腸管内での抗炎症作用が示された。

3. ルーメン微生物による飼料中植物の細胞壁分解に与える効果

(1) ウィルルーメン液中でのチモシー分解試験

Forage Fiber Analysis(U.S.D.A.)のIn Vitro Rumen Digestibility Determination⁶⁾を一部改変して実施した。CNSL添加は終濃度50ppmで実施した。

繊維質消化率とクラークソン法⁷⁾で求めた総リグニン含量を図5に示した。CNSLの添加により消化率は向上するが、総リグニン含量に大きな変化はみられなかった。

(2) ウィスナー染色法によるチモシー検体切片の組織観察を行なった(図6)。ウィスナー染色はリグニンを赤紫色に染色するが、CNSL添加した検体切片では赤紫色の呈色が顕著に低減していることから、細胞壁表面のリグニンの分解が促進されていることが示された。さらに上記の組織観察によるリグニン分析の結果を検証する為にチオアシドリシス法によるリグニンの組成分析を行なった。結果を図7に示す。CNSLを添加した検体では、未添加の検体と比較して、S型分解物の比率が相対的に増加し、G型分解物の比率が相対的に減少していることが分かった。

以上よりチモシー細胞壁の微生物分解において、CNSL添加により表面リグニンの構造変化と分解促進が起こり、内部のセルロース、ヘミセルロースの分解が亢進することが強く示唆された。またCNSL添加によって表面リグニンの分解は促進されるものの、図5に示すように、チモシー繊維質の消化、すなわち内部のセルロース、ヘミセルロースの分解はより促進され、

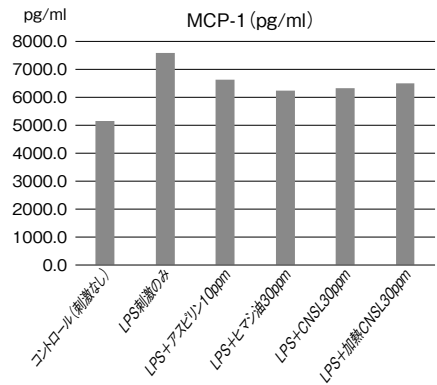


図4 MCP-1の定量結果

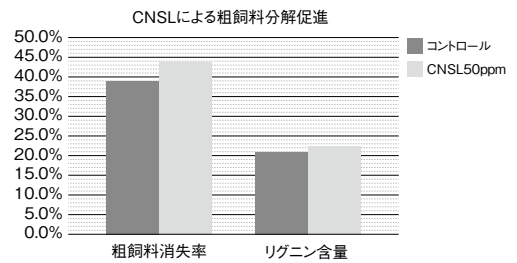


図5 CNSLの粗飼料(繊維質を多く含む)の分解促進とリグニン含量

CNSLの添加により粗飼料分解は促進するが残存物中のリグニン含量に差異はなかった

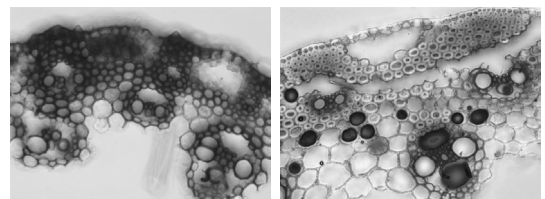


図6 検体細胞壁切片のウィスナー染色による組織観察

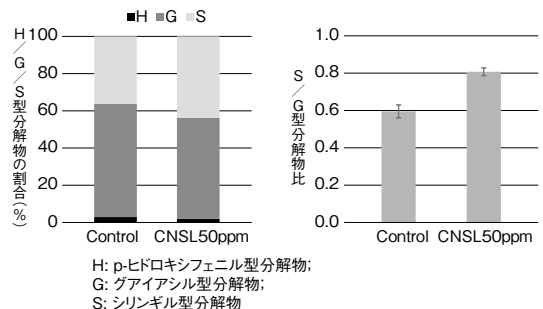


図7 検体細胞壁試料のチオアシドリシス法によるリグニン組成分析

結果として、総リグニン含量(対セルロース、ヘミセルロース)は微増したと考えられる。

4. CNSL給与試験(過肥牛への周産期投与)

対照群5頭、給与群4頭の計9頭を供試し、給与群には分娩前14日からCNSLを5.0g含む飼料を追加給与した。供試牛は肥満度を示すボディコンディションスコア(BCS)が3.75~4.0を示す過肥牛で、周産期疾病リスクの高い個体であった。採血は分娩前14日、分娩後3

日および7日に行い、インスリン抵抗性と、体内炎症に関わる項目を測定した。試験期間中に周産期疾病等の発症は見られなかった。またRQUICKI値は $(1/[\log(\text{Glucose mg/dl}) + \log(\text{Insulin } \mu\text{U/ml}) + \log(\text{NEFA mmol/l})])$ により算出した。

測定値において、分娩後3日目に差異がみられ、給与群にてインスリン抵抗性の指標であるRQUICKI値が有意に高く、対照群と比較してインスリン抵抗性が低いことが明らかと

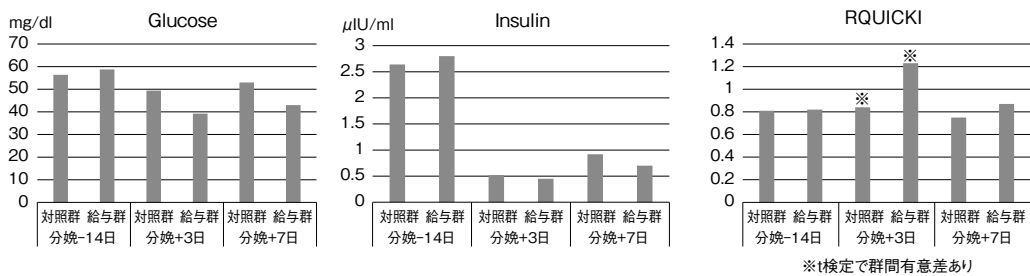


図8 グルコース、インスリン、RQUICKI

RQUICKI: インスリン抵抗性を示す値であり、低値の場合インスリン抵抗性を示す。

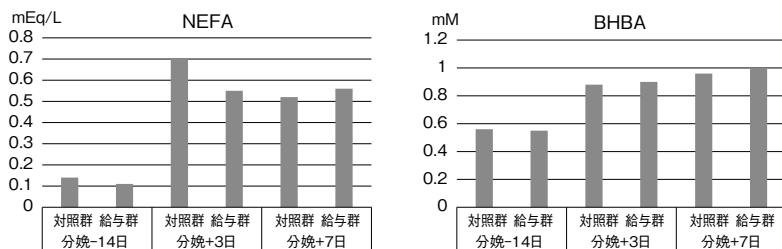


図9 NEFA, BHBA

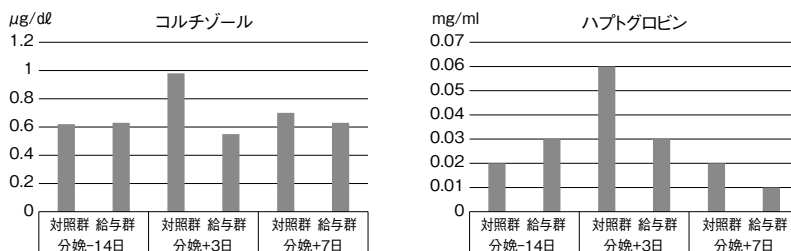


図10 コルチゾール、ハプトグロビン

なった。(図8) NEFA(遊離型脂肪酸)は分娩前後で対照群に比し、給与群で低い傾向であった(図9)。また炎症に関連するコルチゾール(ストレスマーカー)濃度、およびハプトグロビン(急性期蛋白)濃度も分娩後3日目に給与群にて低い傾向を示した(図10)。

考察

CNSLの生化学的性状の解析により脂質、蛋白質の可溶化(乳化)促進が示唆された。

CNSL給与により、脂質、タンパク質の吸収向上が期待される。また、豚腸管上皮細胞へのエンドキシン刺激に対して、CNSLは炎症に関与するケモカイン、サイトカインの産生を抑制することが示されたことから腸管の炎症を抑制し、炎症性疾患の予防に働くことが示唆される⁸⁾。

さらに、ルーメン内での繊維質分解において、CNSL給与により、繊維質表面のリグニンの分解、ならびにそれに伴う繊維質内部セルロースおよびヘミセルロースの分解が促進され、粗飼料の消化が促進されることが示唆される。

このようなリグノセルロースを栄養源とする動物の腸内共生微生物によるリグニンの変質とそれによる多糖分解促進は、シロアリなどの昆虫においても報告されている⁹⁻¹³⁾。

乳牛の妊娠末期には胎子や子宮の栄養要求が増大するのに対して乾物摂取量が低下し、分娩後には泌乳のために栄養要求が増大するのに対して乾物摂取量の増加が遅延する。エネルギーの要求量と摂取量の不均衡に起因した負のエネルギーバランス(NEB)は、脂肪肝やケトosisなどの周産期疾患の発生、その後の泌乳量や発情回帰とも関連がある。妊娠末期にエネルギーが不足すると体

脂肪が動員されて遊離脂肪酸(NEFA)が高値を示す。CNSL給与によりNEBが改善され、NEFAの低減が惹起されたことが予測される。また急性期蛋白であるハプトグロビンの値も非給与群に比し、低値であったことから、CNSL給与によって全身性の炎症も軽減されたことが分かった。

CNSL給与群では、分娩後3日(d3)におけるNEFAの低減傾向がみられた。この原因は今回のデータからは詳細は不明であるが、コルチゾールやハプトグロビンがd3において低減傾向でもあったことから、分娩に伴う代謝性炎症を抑制し、炎症性メディエーターの放出が抑制され、結果的にNEFAの放出抑制につながった可能性がある。

妊娠末期には胎子や乳腺へ優先的に糖を分配させるようインスリン抵抗性(IR)を持つようになる。IRが強い場合や分娩後も長期的に継続する場合は、分娩後の生産性を低下させるだけでなく、子牛の出生時体重やエネルギー状態ならびに肝機能にも影響を与える可能性も示唆されている。本試験の結果はCNSLの給与によるルーメンアシドーシスのリスク低減とDMIの増加による栄養状態の改善により、インスリン抵抗性が改善したことも示唆される。給与群でのd3のRQUICKI値の上昇は、インスリン耐性の緩和を示し、分娩牛の周産期病増悪を抑制する可能性が示唆された結果となった。今回の試験から分娩前後におけるCNSL製剤給与による炎症抑制、NEFA放出抑制、インスリン耐性緩和などの可能性が示された。ただし今回の試験で供試した頭数は少ないため、引き続き調査を継続する予定である。また、今回報告した結果も含め、CNSLの持つさまざまな給与効果とそのメカニズムも詳細が明らかになりつつある。今後はGHG(温

室効果ガス)の削減に関する効果についても検証していきたい。

チモシー検体のチオアシドリス法によるリグニン分析は京都大学生存圏研究所の森林バイオマス評価分析システム(FBAS)を利用して行った。

引用文献

1. Y. Suzuki Journal of the Japan Veterinary Medical Association 66(10), 689-695,(2013)
2. 疋田 千枝 畜産分野におけるカシューナッツ殻液の活用 出光技法 61(1), 92-99(2018)
3. T.Nakano et al. Digestibility and Absorption of Enzymatically Hydrolyzed Whey Protein J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci. 47, 195~201(1994)
4. M. Moue et al. Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Volume 1780, Issue 2, February 2008, Pages 134-44
5. T. Shimazu et al. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* Elicits Anti-Inflammatory Activity in Porcine Intestinal Cells Modulating Negative Regulators of the Toll-Like Receptor Signaling Pathway ASM Journals/ Infection and Immunity volume 80 No.1 276-288(2012)
6. Forage Fiber Analysis (Apparatus, Reagents, Procedures and some Applications) Agriculture Hand book 379 (1970) Agricultural Research Service United States Department of Agriculture.
7. Hatfield, R. D., Jung, H. J. G., Ralph, J., Buxton, D. R. & Weimer, P. J. A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *J. Sci. Food Agric.* **65**, 51-58(1994).
8. Julio Villena and Haruki Kitazawa Modulation of intestinal TLR4-inflammatory signaling pathways by probiotic microorganisms: lessons learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937 Front. Immunol., 14 January 2014
9. Geib SM, Filley TR, Hatcher PG, Hoover K, Carlson JE, Jimenez-Gasco MdM, Nakagawa-Izumi A, Sleighter R.L., Tien M., Lignin degradation in wood-feeding insects. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105:12932-12937(2008)
10. Ke J., Laskar D.D., Singh D., Chen S. In situ lignocellulosic unlocking mechanism for carbohydrate hydrolysis in termites: crucial lignin modification. Biotechnol Biofuel 4:1-12(2011)
11. Tarmadi D., Tobimatsu Y., Yamamura M., Miyamoto T., Miyagawa Y., Umezawa T., Yoshimura T., NMR studies on lignocellulose deconstructions in the digestive system of the lower termite *Coptotermes formosanus* Shiraki. Sci Rep 8:1290(2018)
12. Ceja-Navarro J.A., Karaoz U., Bill M., Hao Z., White III R.A., Arellano A., Ramanculova L., Filley T.R., Berry T.D., Conrad M.E., Blackwell M., Nicora C.D., Kim Y.M., Reardon P.N., Lipton M.S., Adkins J.N., Pett-Ridge J., Brodie E.L. Gut anatomical properties and microbial functional assembly promote lignocellulose deconstruction and colony subsistence of a wood-feeding beetle. Nat Microbiol 4:864-875(2019)
13. Dumond L., Lam P.Y., van Erven G., Kabel M., Mounet F., Grima-Pettenati J., Tobimatsu Y., Hernandez-Raquet G. Termite gut microbiota contribution to wheat straw delignification in anaerobic bioreactors. ACS Sustainable Chem. Eng. 9:2191-2202(2021)