

原著論文

## 黒毛和種肥育導入牛に対するウルソデオキシコール酸投与が 血液性状および疾病発生状況に及ぼす影響

松田敬一<sup>1)</sup>、前田洋佑<sup>2)</sup>、高橋史昭<sup>2)</sup>

所属機関：1) 宮城県農業共済組合 家畜診療研修所

〒 981-3602 宮城県黒川郡大衡村大衡字平林 39-4

2) 北里大学 獣医学部

〒 034-8628 青森県十和田市東二十三番町 35-1

連絡責任者の氏名： 松田敬一

連絡先：981-3602 宮城県黒川郡大衡村大衡字平林 39-4

TEL：022-345-2239 FAX：022-345-0891

E-mail：matsuda@nosaimiyagi.or.jp

### 【要 約】

肥育牛は家畜市場を経て導入されるが、移動によるストレスによって負のエネルギーバランス (NEB) を招き、牛の体調を悪化させている。ウルソデオキシコール酸 (UDCA) は消化吸収を改善させる作用がある。我々は黒毛和種肥育導入牛に UDCA を投与し、牛の血液性状および疾病発生数に及ぼす影響を調査した。調査には約 9 カ月齢の黒毛和種牛 12 頭を供試した。導入後 3 日間 UDCA 製剤 (50 g / 日 / 頭) を経口投与した 6 頭を投与群、無投与の 6 頭を対照群とした。肥育農場に到着直後 (0 日)、3、7、および 14 日後に採血し、血液化学検査、免疫細胞数、サイトカイン mRNA 発現量を調査した。0 日の採血後にビタミン A (VA) 100 万 IU を給与した。調査期間中の疾病発生頭数を (調査した。VA は対照群で 0 日に比べ投与後 3 日以降で有意に減少した (P<0.01)。AST は投与群で 0 日に比べ 3 日後以降で有意に減少し (P<0.01)、対照群の 3 日後が投与群に比べ有意に高かった (P<0.05)。遊離脂肪酸は両群で 0 日に比べ 3 日以降で有意に減少し (P<0.01)、投与群は対照群に比べ有意な低値で推移した (P<0.01)。免疫細胞数に有意な変化は認められなかった。サイトカイン IL-8 の mRNA 発現量では、投与群の投与後 3 日が対照群に比べ有意に低かった (P<0.05)。調査期間中、対照群にのみ呼吸器感染症が 3 頭発生した。UDCA にはビタミン吸収促進作用、消化吸収改善作用、肝細胞保護作用、および炎症性サイトカイン抑制作用があり、これらの作用により輸送後の体調悪化を防ぎ、投与群で疾病が発生しなかったと考えられる。

**キーワード：**黒毛和種肥育導入牛、負のエネルギーバランス、ウルソデオキシコール酸

現在、畜産業界の広域化により肥育農場が素牛を導入する際に長距離を長時間かけて輸送することが珍しく無くなっている。牛は輸送によ

り免疫力が低下することが報告されており [10, 22]、長時間にわたる輸送は牛の免疫力を大きく低下させる [16]。さらに、家畜市場に上場する日は、繁殖農家を出てから肥育農家に到着するまで飼料を与えられず、ほとんどの時間で佇立したままとなる。よって家畜市場への上場

受付：2018年2月5日

受理：2018年4月4日

前後の一連の事象で、牛は負のエネルギーバランス (NEB) になると考えられる。牛はNEBになると血中の遊離脂肪酸 (FFA) 濃度が増加する [20]。FFAは肝臓で処理されエネルギー源として活用されるが [4]、その際に肝臓内で生じた酸化ストレスによって炎症が惹起されることが知られている [13]。また、FFAの増加は免疫細胞の機能を低下させることが報告されており [24]、家畜市場への上場前後におけるNEBは、肝機能および免疫機能の低下を引き起こす可能性がある。特に冬期の輸送は、牛をトラックの荷台で寒風にさらすことになり、その寒冷感作が牛の免疫力をさらに低下させ [16]、移動後に呼吸器疾患などの感染症多発の原因となっていると考えられる。

ウルソデオキシコール酸 (UDCA) は、牛においてケトーシスおよび肝機能減退症に対する効能を有す。利胆作用 [26]、肝血流増加作用 [25]、および肝細胞保護作用 [8] など肝臓に対する様々な作用がある。我々は、黒毛和種肥育牛においてUDCAの長期低用量投与が肥育期間中の肝機能低下および鋸屑肝等の肝臓廃棄につながる肝炎の発生を抑制することを報告した [15]。また、胃液分泌促進作用 [7]、および膵液分泌促進作用 [18] などにより消化吸収促進作用があり、牛の栄養状態を改善する可能性がある。

そこで、家畜市場を経て肥育農場に導入された黒毛和種肥育牛に対し、UDCAの投与によって、消化吸収が促進されることでNEBを改善して、FFAの増加を抑制し、肝臓や免疫機能に及ぼす影響を軽減させる効果を検証する事を

目的として調査した。

### 材料および方法

調査期間は平成28年12月～平成29年1月の2ヶ月間とした。家畜市場から管内1肥育農場に約2時間 (移動距離50km) かけて導入されてきた直後の黒毛和種肥育牛12頭 (約9ヶ月齢、去勢) を供試牛とした。

導入後にUDCA製剤 (ウルソ<sup>®</sup>-5%、DSファーマアニマルヘルス株式会社) を50g/頭/日 (UDCAとして2,500mg) を3日間投与した6頭を投与群、非投与の6頭を対照群とした。試験農場では4頭を1つの牛房で飼育しており、本試験では1つの牛房に投与群2頭、および対照群2頭を入れて、3牛房を用いた。同じ牛房に両群の牛を飼育したため、両群ともに飼育環境や飼料は同一であった (表1)。

両群ともに導入直後に頸静脈より血清分離用凝固促進剤入真空採血管 (ベノジェクトII VP-AS109K、テルモ株式会社)、EDTA加真空採血管 (ベノジェクトII VP-DK052K、テルモ株式会社)、およびヘパリン加真空採血管 (ベノジェクトII VP-H100K、テルモ株式会社) を用いて採血を行った。採血直後にビタミンA (100万単位/頭) を経口給与した。投与群にはビタミンAと同時にUDCA製剤を投与した。導入直後 (0日) に加え、導入3日、7日および14日後に頸静脈より採血した。得られた血液は、血液生化学検査、末梢血単核球サブポピュレーションの解析、およびサイトカインmRNA発現量の解析に供した。血清分離用凝固促進剤入真空採血管では、採血後1時間以内

表1 試験期間中の給与飼料内容および充足率

給与飼料名	給与量	
配合飼料A <sup>1)</sup>	4 kg	
チモシー乾草	3 kg	
稲わら	2 kg	
飼料養分含量	充足率	
乾物量	5.06 kg	92%
可消化養分総量	3.48 kg	92%
粗蛋白質	676.0 g	102%

1) 現物中: DM 88%, TDN 68%, CP 13.5%

に遠心分離して血清を得た。

加えて、農場の疾病記録簿から両群における調査期間中に発生した疾病の内容および疾病発生頭数を調査した。

### 血液化学検査

得られた血清からは、ビタミン A (VA) としてレチノール濃度、ビタミン E (VE) として  $\alpha$ -トコフェノール濃度、コルチゾール (Corti) 濃度、総タンパク質 (TP) 濃度、アルブミン (Alb) 濃度、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) 活性値、 $\gamma$  グルタミルトランスフェラーゼ (GGT) 活性値、総コレステロール (TC) 濃度、尿素窒素 (UN) 濃度、トリグリセリド (TG) 濃度、および FFA 濃度を測定した。血清中 VA および VE 濃度は、逆相高速液体クロマトグラフィー法を用いて測定した。生化学自動分析装置 (Dimension RL Max、シーメンス株式会社) を用いて、血清中 Alb、AST、GGT、TC、BUN、TG および FFA 濃度は酵素法、血清中 TP 濃度は Biuret 法でそれぞれ測定した。血清中 Corti 濃度は、全自動化学発光酵素免疫測定装置 (Access2、ベックマン・コールター株式会社) を用いて、化学発光酵素免疫法で測定した。

### 末梢血単核球サブポピュレーションの解析

総白血球数は EDTA 加血を用いて、自動血球計算装置 (MEK-6450、セルタック  $\alpha$ 、日本光電社) で測定した。末梢血単核球サブポピュレーションの解析は、フローサイトメトリー法により、過去の報告 [9] に準じて実施した。EDTA 血 2ml に 0.83% 塩化アンモニウム溶液を 4ml 加えて溶血した。300g で 3 分間遠心後、沈査を 1/15M リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄し、白血球浮遊液を作製した。約  $1 \times 10^6$  個/ml の白血球浮遊液 100 $\mu$ l に各一次抗体 100 倍希釈液を 10 $\mu$ l 加え、4 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。一次抗体として、抗 CD3 (MM1A、Washington State University Monoclonal Antibody Center (WSU); 総 T 細胞)、CD4 (CACT138A、WSU; ヘルパー T 細胞)、CD8 (BAQ111A、WSU; 細胞傷害性 T 細胞)、抗 TCR1-N12 (CACT61A、WSU;  $\gamma\delta$ T 細胞)、CD335 (AKS1、

Serotec; NK 細胞)、MHC class II (CAT82A、WSU; B 細胞、単球)、および CD14 (MY4、Beckman Coulter; 単球) 抗体を用いた。反応後、PBS で洗浄し、二次抗体として 4000 倍希釈した PE 標識抗マウス IgG1 抗体 (BioLegend) を 100 $\mu$ l または 1500 倍希釈した FITC 標識抗マウス IgM 抗体 (Southern Biotechnology Associates) を 100 $\mu$ l 加え、4 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させ、Cytomics FC500 (Beckman Coulter) で測定した。測定データは Kaluza v1.5a (Beckman Coulter) を用いて解析した。サイトグラムの側方散乱光により、顆粒球および単核球 (単球、リンパ球) に分類した。各表面抗原の陽性率と白血球の実数値を用いて各表面抗原陽性細胞数を算出した。CD3 陽性細胞数を総成熟 T 細胞数、CD4 陽性細胞数をヘルパー T 細胞数、CD8 陽性細胞数を細胞障害性 T 細胞数、MHCclass II 陽性 CD14 陰性細胞数を B 細胞数、TCR1 - N12 陽性細胞数を  $\gamma\delta$ T 細胞数、CD335 陽性細胞数を NK 細胞数、および CD14 陽性細胞数を単球数とした。

### 末梢血単核球サイトカイン mRNA の解析

末梢血単核球サイトカイン mRNA の解析は real-time PCR 法により、過去の報告 [14] に準じて実施した。ヘパリン血から Lymphocyte Separation Medium 1077 (PromoCell GmbH) を用いて単核球を分離した。単核球から TRIzol Reagent (invitrogen) を用いて総 mRNA を抽出した。GoScript<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase (Promega) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。その後、SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて、Step One Plus Real Time PCR System (Applied Biosystems) で測定した。表 2 に示したプライマーにより、IL-4、INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 、および IL-8 を測定し、内部標準遺伝子として  $\beta$ -actin (forward 5'-CCCAGATCATGTTTCGAGACC-3'; reverse 5'-GAGGCATACAGGGACAGCAC-3') を用いた。測定値は  $\Delta\Delta$  CT 法を用いて解析項目ごとに最小値に対する相対発現量で表し、Log 変換による補正を行った。

表2 サイトカイン mRNA 遺伝子のプライマー配列

遺伝子	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')
IL-4	GCCCCAAAGAACACAACACTGA	GAGATTCCTGTCAAGTCCGC
INF- $\gamma$	TCAAATTCGCGTGGATGATCT	CTTCTCTTCCGCTTTCTGAGG
TNF- $\alpha$	CTCTGGTTCAAACACTCAGGTC	GGGCATTGGCATAACGAGTC
IL-8	GTGAAGAGAGCTGAGAAGCAAG	CACCAGACCCACACAGAACA

### 統計解析方法

結果は平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で示した。各検査項目における群間の比較は反復測定二元配置分散分析を用い、群間効果を求めた。また、要因間において交互作用が認められた項目については Bonferroni の方法による単純主効果検定を行い各要因における主効果の検出を行った。各項目の0日とその後の採血日との比較は、反復測定一元配置分散分析を行い Tukey の方法による多重比較を実施した。疾病発生頭数の比較は、Fisher の直接確率計算法を用いた。各統計結果において、危険率5%未満となったものを有意差ありとした。

### 結果

#### 血液生化学検査

血清中 VA 濃度は両群間で有意な差は認められなかった (表3)。しかし、対照群では、0日に比べ投与後3、7、および14日で有意に低下した。血清中 AST 活性値は両群間に有意な交互作用が認められ、単純主効果検定の結果、投与後3日の対照群は、投与後3、7、14日の投与群および投与後14日の対照群に比較して有意に高かった。また、投与群では、0日に比べ投与後3、7、および14日で有意に低下した。血清中 FFA 濃度は、両群間の比較で、投与群は対照群に比べ有意に低い値で推移した。両群ともに0日に比べ投与後3、7、および14日で有意に低下した。血清中 VE、Corti、TC、TP、Alb、BUN、および TG 濃度と GGT 活性値には有意な変化は認められなかった。

#### 末梢血単核球サブポピュレーションの解析

末梢血単核球サブポピュレーションの解析結果は表4に示した。測定したすべての免疫細胞数で、有意な変化は認められなかった。

#### 末梢血サイトカイン mRNA 発現量の解析

末梢血サイトカイン mRNA 発現量の解析結果は表5に示した。TNF- $\alpha$  は両群間で有意な差は認められなかった。投与群では、0日に比べ投与後14日で有意に低下した。IL-8 は両群間に有意な交互作用を認め、単純主効果検定の結果、投与後3日の対照群に比べ、投与後3日の投与群で有意に低い値を示した。IL-4、および INF- $\gamma$  には有意な変化は認められなかった。

#### 疾病発生頭数

調査期間中の疾病発生頭数は投与群0頭 (0/6)、対照群3頭 (3/6) であり、両群間に有意な差は認められなかった。対照群で発生した疾病はすべて呼吸器感染症であった。

### 考察

本研究では、家畜市場から導入直後の黒毛和種肥育牛に UDCA を投与すると、導入後14日間の血清中 VA 濃度および AST 活性値の変動が少なく、導入直後に上昇していた血清中 FFA 濃度が早期に低下し、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  および IL-8 が低下した。また、統計的に有意な差は認められなかったものの、投与群では疾病発生がみられなかった。

本試験を行った冬期の輸送は、寒冷ストレスと輸送ストレスが重なり血清中 VA 濃度が低下したことが報告されている [16]。また、牛における群編成は、順位付け行動や闘争を引き

表3 両群における血液生化学検査結果の推移

		導入直後(0日)	3日後	7日後	14日後
ビタミンA (IU/dl)	投与群	70.3 ± 6.5	60.5 ± 5.3	58.2 ± 7.1	64.3 ± 9.8
	対照群	79.3 ± 6.4	55.1 ± 11.79 **	57.1 ± 15.26 **	62.9 ± 13.46 *
ビタミンE (IU/dl)	投与群	171.5 ± 12.4	161.9 ± 15.9	157.2 ± 11.4	145.9 ± 4.6
	対照群	195.5 ± 20.7	174.4 ± 31.3	163.7 ± 19.4	156.0 ± 20.7
コルチゾール (µg/dl)	投与群	1.83 ± 0.72	3.01 ± 1.23	1.59 ± 0.72	2.57 ± 0.84
	対照群	2.69 ± 3.72	3.72 ± 1.31	1.30 ± 0.89	1.92 ± 0.69
総タンパク質 (mg/dl)	投与群	6.63 ± 0.23	6.62 ± 0.28	6.80 ± 0.35	6.95 ± 0.66
	対照群	6.93 ± 0.34	6.70 ± 0.26	6.87 ± 0.22	6.82 ± 0.42
アルブミン (mg/dl)	投与群	3.92 ± 0.18	3.73 ± 0.20	3.75 ± 0.27	3.62 ± 0.04
	対照群	3.93 ± 0.39	3.77 ± 0.10	3.72 ± 0.18	3.57 ± 0.16
AST (IU/l)	投与群	87.3 ± 9.6	60.3 ± 7.2 a**	64.0 ± 7.8 a*	69.5 ± 16.1 a*
	対照群	88.3 ± 11.4	123.7 ± 74.1 b	72.5 ± 23.9	68.3 ± 15.5 a
GGT (IU/l)	投与群	23.3 ± 3.4	21.0 ± 2.6	21.0 ± 2.5	20.2 ± 2.9
	対照群	25.8 ± 10.7	31.8 ± 12.3	24.2 ± 8.2	23.5 ± 10.6
総コレステロール (mg/dl)	投与群	138.3 ± 23.5	131.7 ± 24.3	118.7 ± 10.7	115.2 ± 7.3
	対照群	200.5 ± 90.7	165.8 ± 92.7	162.0 ± 80.6	138.0 ± 61.0
尿素窒素 (mg/dl)	投与群	11.82 ± 3.32	12.02 ± 2.09	12.93 ± 5.29	13.28 ± 5.56
	対照群	14.95 ± 4.66	10.35 ± 1.11	12.12 ± 5.57	12.65 ± 4.76
トリグリセリド (mg/dl)	投与群	7.55 ± 6.04	14.00 ± 7.58	15.55 ± 7.83	12.40 ± 4.97
	対照群	13.03 ± 8.64	14.30 ± 9.64	13.52 ± 4.21	14.05 ± 5.62
遊離脂肪酸 (µEq/l)	投与群	521.3 ± 241.7	122.2 ± 48.5 **	155.5 ± 43.1 **	129.8 ± 33.7 **
	対照群	599.2 ± 98.9	309.3 ± 48.1 **	168.2 ± 40.8 **	124.7 ± 16.3 **

平均値±SD

\*; P<0.05 vs. 0日., \*\*; P<0.01 vs. 0日.

※※; P<0.01 vs. 対照群.

ㄐㄐ; P<0.01 交互作用. 異符号間に有意差あり

表4 両群における末梢血単核球サブポピュレーション解析結果の推移

		導入直後(0日)	3日後	7日後	14日後
白血球数 (cells/µl)	投与群	12883.3 ± 3168.9	9500.0 ± 2651.8	8400.0 ± 1408.6	9483.3 ± 1579.1
	対照群	10083.3 ± 1667.8	8450.0 ± 2268.7	7600.0 ± 1590.0	8966.7 ± 902.6
総成熟T細胞数 (cells/µl)	投与群	1960.6 ± 488.1	2170.1 ± 492.5	2346.1 ± 591.8	2336.4 ± 568.7
	対照群	1553.3 ± 665.9	1902.0 ± 619.4	2023.5 ± 727.7	2312.7 ± 493.5
ヘルパーT細胞数 (cells/µl)	投与群	446.5 ± 164.7	627.9 ± 139.7	626.5 ± 306.2	667.4 ± 167.3
	対照群	464.1 ± 190.4	536.0 ± 170.9	517.1 ± 204.3	724.5 ± 215.6
キラーT細胞数 (cells/µl)	投与群	404.2 ± 108.0	333.9 ± 141.6	360.3 ± 186.4	377.4 ± 142.7
	対照群	303.1 ± 112.1	324.4 ± 187.5	271.7 ± 125.5	347.3 ± 203.3
B細胞数 (cells/µl)	投与群	1973.2 ± 576.3	1392.3 ± 407.0	1708.1 ± 898.8	1924.3 ± 762.2
	対照群	1837.3 ± 694.8	1368.8 ± 628.9	1496.5 ± 399.0	1778.9 ± 313.0
γδT細胞数 (cells/µl)	投与群	971.4 ± 348.1	1079.6 ± 385.4	1110.3 ± 220.1	1061.5 ± 253.1
	対照群	829.5 ± 462.1	1001.5 ± 346.4	979.4 ± 409.2	972.1 ± 266.0
NK細胞数 (cells/µl)	投与群	331.9 ± 250.2	309.9 ± 275.1	307.9 ± 192.4	289.7 ± 213.3
	対照群	225.3 ± 106.5	162.7 ± 81.5	149.8 ± 62.2	163.1 ± 52.1
単球数 (cells/µl)	投与群	606.5 ± 381.8	727.8 ± 243.8	732.8 ± 292.3	569.0 ± 193.9
	対照群	422.2 ± 354.3	905.1 ± 452.0	805.1 ± 257.0	583.3 ± 362.2

平均値±SD

表5 両群における末梢血サイトカイン mRNA 発現症量 (ΔΔCt値) 解析結果の推移

		導入直後 (0日)	3日後	7日後	14日後
IL-4 mRNA	投与群	8.20 ± 3.25	3.65 ± 2.83	4.59 ± 5.06	4.25 ± 2.26
	対照群	5.23 ± 4.61	3.79 ± 3.01	4.52 ± 2.66	2.29 ± 2.83
IFN-γ mRNA	投与群	8.18 ± 5.51	2.36 ± 3.12	6.21 ± 5.24	3.28 ± 2.39
	対照群	4.82 ± 4.95	4.67 ± 3.72	4.47 ± 3.69	3.65 ± 2.82
TNF-α mRNA	投与群	8.78 ± 5.11	2.41 ± 3.75	5.01 ± 5.54	1.18 ± 2.89 *
	対照群	4.41 ± 5.55	6.02 ± 3.83	2.95 ± 4.66	2.91 ± 4.50
IL-8 mRNA	投与群	10.15 ± 3.77	3.64 ± 2.11 a	8.10 ± 6.41	7.86 ± 2.62
	対照群	7.90 ± 6.68	11.64 ± 1.09 b	10.39 ± 2.43	6.12 ± 4.48

平均値±SD

\*; P<0.05 vs. 0日.

ⓧⓧ; P<0.01 交互作用. 異符号間に有意差あり

起こし、牛に大きなストレスが加わることが知られている [1]。一般的に、肥育素牛を肥育農場に移動させた後は、移動してきた牛同士で新しい群を構成させて、飼育管理を行うことが多い。このような管理では、移動後における免疫応答の回復期に新たなストレスが加わることで、VA が消費される [17]。Adachi らは、肥育農場に導入された黒毛和種去勢牛は導入直後に比べ導入7日後に血清中 VA 濃度が著しく減少し、これはストレスの増加による VA の消費によるものであったと報告している [2]。また、Ribeiro らは、ヒトにおいて入院患者に対する酸化ストレスの増大や感染の存在は、VA の有機的利用を増加させ血清中レチノール濃度が減少すると報告している [21]。Stephensen らは、ヒトにおいて肺炎や敗血症を呈した ICU 患者では、健康な人と比較してレチノールの尿中排泄が増加すると報告している [23]。これらの報告から、本試験でみられた対照群における血清中 VA 濃度の減少は、導入後のストレスにより、レチノールの有機的利用や尿中排泄の増加を招き、結果的に VA の消費量が給与した VA 量を上回ったことが原因と考えられた。UDCA は、胆汁の分泌を増加させて [5]、脂溶性ビタミンの吸収を促進することが知られている。以前我々は、VA 給与量を抑制されて飼育されている黒毛和種肥育牛において、肥育期間中継続的に UDCA を投与すると、無給与の対象牛に比べて血清中 VA 濃度の減少が抑制され、この作用は UDCA がビタミン A の吸収を促進したものと報告した [15]。本試験の結果より、対照群と同じ飼育管

理を行っていたにも関わらず、投与群の血清中 VA 濃度が有意な変化を示さず推移したのは、UDCA の脂溶性ビタミン吸収促進作用により、同じ VA 給与量でも、投与群ではより多くの VA を吸収したことが原因と考えられる。

VA は、免疫機構に関与していると考えられており、黒毛和種肥育牛において血清中 VA 濃度の低下により免疫細胞数が減少することが報告されている [27]。また、VA は腸の粘膜免疫機能に関与しており、マウスにおいて飼料中の VA を欠乏させるとデキストラン硫酸ナトリウム誘発大腸炎が重篤化すると報告があり [3]、粘膜免疫の安定化には VA の代謝産物であるレチノイン酸が重要であると考えられている。本試験では免疫細胞数に変化は認められなかったが、VA が減少した対照群において粘膜免疫が低下していた可能性がある。

家畜市場を経た牛の輸送は、牛を NEB に陥らせ、血清中 FFA 濃度を増加させる [16]。増加した FFA は肝臓に酸化ストレスを加えて肝臓の炎症を引き起こすことが知られている [13]。対照群で認められた投与後3日の血清中 AST 活性値の高値は、NEB による血清中 FFA 濃度の増加が原因と考えられる。UDCA は、ケノデオキシコール酸等の疎水性胆汁酸による肝細胞への細胞障害性を軽減する肝細胞保護作用を示すこと [8, 11] が知られている。また、肝障害による TNF-α や IL-6 等のサイトカインの上昇を抑制するとともに、肝臓での好中球の浸潤を抑制して肝障害抑制作用を示すこと [6]、肝臓において CD4 陽性 T 細胞が関与する標的細胞のアポトーシス誘導を抑制すること [28]

などが知られている。UDCA は、細胞障害性が原因となる肝疾患の予防に有用であると考えられている。本試験の投与群で AST が安定推移したのは、UDCA が有す肝細胞保護作用により、増加した FFA による肝臓への炎症反応が抑制されたこと、対照群に比べ早期に FFA が減少したことが原因と考えられる。

UDCA は、利胆作用 [26]、胃液分泌促進作用 [7]、および膵液分泌促進作用 [18] などにより消化吸収促進作用がある。本試験における投与群の血清中 FFA 濃度が早期に減少した現象は、UDCA の消化吸収促進作用により、摂取した給与飼料をより効率的に吸収した結果、NEB が早期に改善されたためと考えられる。

UDCA には抗炎症作用があり、リポポリサッカライド刺激により誘導される TNF- $\alpha$  等の前炎症性サイトカインを減少させるとの報告がある [12]。また、UDCA には炎症性サイトカイン産生抑制作用があり TNF- $\alpha$  の刺激に伴い単球より放出される IL-8 を特異的に抑制すると報告がある [19]。本試験で認められた投与群における投与後 3 日での IL-8 の mRNA の低値は、UDCA の炎症性サイトカイン抑制作用によるものと考えられる。しかし、投与群における TNF- $\alpha$  の減少は投与後 14 日であり、UDCA の投与期間から日数が経過しているため、UDCA の直接的な影響というよりは疾病の発生が無かったことによるものと示唆された。

本試験の結果より、黒毛和種肥育導入牛に対する UDCA 投与は、消化吸収促進作用による NEB の改善、脂溶性ビタミン吸収促進作用、および炎症性サイトカイン産生抑制作用等の UDCA が有す多くの生理活性作用が相乗効果を示し、牛の体調維持、および免疫機能の安定化に貢献して呼吸器感染症等の疾病発生を予防したものと考えられた。

#### 引用文献

- [1] 阿部憲章, 木戸口勝彰, 菊池文也. 2008. 群編成による子牛の免疫機能の変化. 岩獣会報. 34 : 88-91.
- [2] Adachi, K., Fukumoto, K., Nomura, Y., Katsura, N., Arikawa, A., Tsuji, A. and Onimaru, T. 1998. Significant decrease of serum vitamin A level in Japanese Black beef steers after introduction to a farm. *J. Vet. Med. Sci.* 60 : 101-102.
- [3] Goverse, G., Olivier, B.J., Molenaar, R., Knippenberg, M., Greuter, M., Konijn, T., Cook, E.C., Beijer, M.R., Fedor, D.M., den Haan, J.M., Napoli, J.L., Bouma, G., Mebius, R.E. 2015. Vitamin A metabolism and mucosal immune function are distinct between BALB/c and C57BL/6 mice. *Eur. J. Immunol.* 45 : 89-100.
- [4] Grum, D.E., Drackley, J.K., Younker, R.S., LaCount, D.W. and Veenhuizen, J.J. 1996. Nutrition during the dry period and hepatic lipid metabolism of periparturient dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 79 : 1850-1864.
- [5] 早川富博, 片桐 健二, 白木 茂博, 中井 富夫, 竹島 彰彦, 川村 益生, 大西 勇人, 星野 信, 塚田 勝比古, 宮治 真, 武内 俊彦, 松尾 導昌. N-pyridoxyl-5-methyltryptophan 胆道シンチグラフィに及ぼすウルソデオキシコール酸の影響. *日本消化器病学会雑誌*. 11 : 2389-2395.
- [6] Ishizaki, K., Iwaki, T., Kinoshita, S., Koyama, M., Fukunari, A., Tanaka, H., Tsurufuji, M., Sakata, K., Maeda, Y., Imada, T. and Chiba, K. 2008. Ursodeoxycholic acid protects concanavalin A-induced mouse liver injury through inhibition of intrahepatic tumor necrosis factor- $\alpha$  and macrophage inflammatory protein-2 production. *Eur. J. Pharmacol.* 578 : 57-64.
- [7] 伊藤信也, 明石卓三, 桑子富美江, 松田美知子. 1976 ウルソデオキシコール酸の薬理作用について. *基礎と臨床*. 10 : 24-39.
- [8] Iwaki, T., Ishizaki, K., Kinoshita, S., Tanaka, H., Fukunari, A., Tsurufuji, M. and Imada, T. 2007. Protective effects of ursodeoxycholic acid on chenodeoxycholic acid-induced liver injury in hamsters, *World. J. Gastroenterol.* 13 : 5003-5008.
- [9] Kakinuma, S., Maeda, Y., Ohtsuka, H., Konnai, S. and Oikawa, M. 2014. Bovine Leukemia virus titer and leukocyte population associated with mastitis in periparturient dairy cows. *Intern. J. Appl. Res. Vet. Med.* 12 : 239-244.
- [10] Kegley, E.B., Spears, J.W. and Brown, T.T. Jr. 1997. Effect of shipping and chromium supplementation on performance, immune response, and disease resistance of steers. *J. Anim. Sci.* 75 : 1956-1964.
- [11] 木村恒夫. 1980. 胆汁酸の肝細胞障害性に関する研究. *日消誌*. 77 : 13-22.
- [12] Ko, W.K., Lee, S.H., Kim, S.J., Jo, M.J., Kumar, H., Han, I.B. and Sohn, S. 2017. Anti-inflammatory effects of ursodeoxycholic acid by lipopolysaccharide-stimulated inflammatory responses in RAW 264.7 macrophages. *PLoS. One.* 12 : e0180673.

- [13] Loor, J.J., Dann, H.M., Everts, R.E., Oliveira, R., Green, C.A., Guretzky, N.A., Rodriguez-Zas, S.L., Lewin, H.A. and Drackley J.K. 2005. Temporal gene expression profiling of liver from periparturient dairy cows reveals complex adaptive mechanisms in hepatic function. *Physiol. Genomics*. 23 : 217-226.
- [14] Maeda, Y., Ohtsuka, H., Tomioka, M. and Oikawa, M. 2013. Effect of progesterone on Th1/Th2/Th17 and regulatory T cell-related genes in peripheral blood mononuclear cells during pregnancy in cows. *Vet. Res. Commun.* 37: 43-49.
- [15] 松田敬一 . 2010. 黒毛和種肥育牛に対するウルソデオキシコール酸の長期間低用量投与が血中成分と枝肉成績に及ぼす影響 . 産業動物臨床医学雑誌 . 1 : 184-189.
- [16] 松田敬一 , 大塚浩通 . 2011. 黒毛和種牛の冬季トラック輸送に対する保温ジャケットの効果 . 日本家畜臨床感染症研究会誌 . 6 : 1-8.
- [17] 松田敬一 , 大塚浩通 . 2013. 移動後の飼育環境の違いが子牛の免疫力に与える影響 . 宮城県獣医師会会報 . 66 : 178-182.
- [18] 中村光男 , 今村憲市 , 阿部泰久 , 宮沢正 , 武部和夫 , 菊池弘明 . 1981. 膵内外分泌機能 , 消化吸収機能に及ぼす UDCA の効果 . 臨牀と研究 . 58 : 1670-1674.
- [19] O'Dwyer, A.M., Lajczak, N.K., Keyes, J.A., Ward, J.B., Greene, C.M. and Keely, S.J. 2016. Ursodeoxycholic acid inhibits TNF $\alpha$ -induced IL-8 release from monocytes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* 2016. 311 : 334-341.
- [20] 及川 伸 . 2015. 乳牛の潜在性ケトーシスに関する最近の研究動向 . 日獣会誌 . 68 : 33-42.
- [21] Ribeiro, Nogueira, C., Ramalho, A., Lameu, E., Da Silva Franca, CA., David, C., and Accioly, E. 2009. Serum concentrations of vitamin A and oxidative stress in critically ill patients with sepsis. *Nutr. Hosp.* 24 : 312-317.
- [22] Schaefer, A.L., Jones, S.D. and Stanley, R.W. 1997. The use of electrolyte solutions for reducing transport stress. *J. Anim. Sci.* 75 : 258-265.
- [23] Stephensen, CB., Alvarez, JO., Kohatsu, J., Hardmeier, R., Kennedy, JI., and Gammon, RB. 1994. Vitamin A is excreted in the urine during acute infection. *Am. J. Clin. Nutr.* 60 : 388-392.
- [24] Ster, C., Loiselle, M.C. and Lacasse, P. 2012. Effect of postcalving serum nonesterified fatty acids concentration on the functionality of bovine immune cells. *J. Dairy. Sci.* 95 : 708-717.
- [25] 玉沢佳巳 . 1975. Ursodeoxycholic acid の胆汁流出に及ぼす影響に関する実験的研究 . 基礎と臨床 . 9 : 2371 -2377.
- [26] 戸田安士 , 早川哲夫 , 野田愛司 , 青木勲 , 鈴木敏行 , 竹田武夫 , 中野哲 , 堀口祐爾 , 武市政之 , 中村昌男 , 中江良之 . 1976. Ursodeoxycholic acid に関する基礎的 , 臨床的検討 . 基礎と臨床 . 10 : 103-119.
- [27] Yano, H., Ohtsuka, H., Miyazawa, M., Abiko, S., Ando, T., Watanabe, D., Matsuda, K., Kawamura, S., Arai, T. and Morris, S. 2009. Relationship between immune function and serum vitamin A in Japanese black beef cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 71 : 199-202.
- [28] 吉川正英 , 松為裕二 , 川本 博 , 福井 博 , 辻井正 . 1997. 胆汁酸のリンパ球機能への影響 . 肝胆膵 . 34 : 25-35.

## Influence of ursodeoxycholic acid on blood properties and disease outbreaks on the introduced Japanese Black fattening cattle

Keiichi Matsuda<sup>1)</sup>, Yousuke Maeda<sup>2)</sup>, Fumiaki Takahashi<sup>2)</sup>

1) Miyagi Prefecture Agricultural Mutual Aid Associations Livestock Medicine Training Center  
39-4 Hirabayashi, Oohira, Kurokawagun, Miyagi, 981-3602, Japan

2) School of Veterinary Medicine, Kitasato University  
35-1 Higashi23, Towada, Aomori, 034-8628, Japan

### **[Abstract]**

While fattening cattle are introduced through a cattle market, the transfer process may generate negative energy balance (NEB) resulted in deterioration of physical condition of cattle. Ursodeoxycholic acid (UDCA) has an effect to improve digestion and absorption. In introduced Japanese Black fattening cattles, we have examined the impacts of UDCA on their blood chemical parameters, immune system and disease incidence. The examination was performed for 12 Japanese Black cattle at around 9 months old. UDCA preparation (50g/day) was orally administered for 3 days in the administration group (n=6) and not administered in the control group (n=6). All cattle took blood samples just after arrived at a fattening farm (day 0), day 3, 7 and 14 after administered UDCA. By used blood samples, the number of immune cells, cytokine mRNA expression levels and blood chemical parameters were examined. Vitamin A (VA) was fed by 1 million IU on day 0. In addition, number of cattle which developed any disease during the examination was investigated. In control group, blood VA concentration significantly decreased on day 3 or later compared with day 0 ( $P<0.01$ ). Blood AST concentration in administration group significantly decreased on day 3 or later compared with day 0 ( $P<0.01$ ). Whereas it at day 3 in control group showed higher compared with at days 3, 7 and 14 in administration group ( $P<0.05$ ). Free fatty acid significantly decreased on day 3 or later in both groups compared with that on day 0 ( $P<0.01$ ) and the administered group remained at a significantly lower value than the control group ( $P<0.01$ ). No significant change was observed in number of immune cells. The mRNA of IL-8 in administration group was significantly lower compared with that in control group. During the examination, respiratory disease were showed in 3 cattle in the only control group. It was concluded that UDCA avoided deterioration of physical condition after transportation by its vitamin absorption promoting effect, digestion absorption improving effect, liver cell protective effect and inflammatory cytokine inhibitory effect. Therefore UDCA may prevent respiratory disease induced by transportation.

**Keywords:** Japanese Black fattening cattle, Negative energy balance, Ursodeoxycholic acid