

乳牛における Difructose Anhydride (DFA) III の飼料添加が

骨密度および骨代謝に及ぼす影響に関する研究

2020年

岐阜大学大学院

連合獣医学研究科

(帯広畜産大学)

前谷文美

乳牛における Difructose Anhydride (DFA) III の飼料添加が

骨密度および骨代謝に及ぼす影響に関する研究

前谷文美

目次

緒言.....	3
第 I 章 泌乳後期の乳牛に対する DFAⅢ給餌が骨密度に与える影響.....	7
1. はじめに.....	8
2. 材料と方法.....	8
3. 結果.....	12
4. 考察.....	13
5. 小括.....	16
6. 図表.....	17
第 II 章 泌乳後期から分娩後までの乳牛に対する長期の DFAⅢ給餌が骨および Ca 代謝 に与える影響.....	22
1. はじめに.....	23
2. 材料と方法.....	24
3. 結果.....	27
4. 考察.....	29
5. 小括.....	33
6. 図表.....	35
総括.....	45
謝辞.....	48
引用文献.....	49

略語一覧

1,25-(OH) ₂ D	活性化ビタミン D
BAP	骨型アルカリホスファターゼ
BCS	ボディ・コンディション・スコア
BMD	骨密度
BW	体重
Ca	カルシウム
CT	カルシトニン
DCAD	飼料中陽イオン—陰イオン差
DFA III	ダイフラクトースアンハイドライド III
DMI	乾物摂取量
ECLIA	電気化学発光免疫測定法
ELISA	酵素結合免疫吸着測定法
ICP	誘導結合プラズマ
iP	無機リン
K	カリウム
Mg	マグネシウム
NTX	I 型コラーゲン架橋-N-テロペプチド
OC	オステオカルシン
PTH	上皮小体ホルモン
RA	X 線撮影吸光光度法
TJ	タイトジャンクション
ucOC	低カルボキシル化オステオカルシン
TMR	完全混合飼料
TRAP5b	酒石酸耐性酸ホスファターゼ 5b

緒言

乳牛は産次を重ねるごとに乳量が増加し、骨密度が低下することが報告されている[2, 32, 67]。これは、乳牛の泌乳各期で発生するカルシウム (Ca) 代謝動態に起因する。まず、泌乳初期は乳量が増加することから、血中 Ca 濃度が低下しやすい[11]。泌乳初期の乳牛では血中 Ca 濃度を維持するために、十二指腸からの Ca 吸収および尿細管からの Ca 再吸収に加えて、骨吸収が活性化される[11, 58]。次に、泌乳後期から乾乳期は乳量が減少かつ泌乳が停止することから、血中 Ca 濃度が上昇し、骨形成が活性化される[2, 21, 32, 67]。最後に、分娩後は大量の Ca が初乳に排出され一過性に血中 Ca 濃度が低下するので、骨吸収が活性化される[11, 12]。以上より、泌乳後期から乾乳期にかけて飼料に Ca を添加し多給することが骨密度低下を抑制すると示唆される。泌乳後期から乾乳期にかけてカリウム (K) を飼料に添加し、骨密度を測定した報告は存在するが[2]、泌乳後期から分娩までの長期間 Ca を飼料に添加し、乳牛の骨密度値を調査した報告は存在しない。

ヒトでは、閉経後の高齢女性が骨密度低下による骨粗しょう症を発症することが報告されている[19]。骨粗しょう症は骨折を招きやすい疾患であることから、治療にはビスフォスフォネート製剤、デノスマブおよびラロキシフェンなどの骨折抑制治療薬が使用されている。しかし、これらの骨折抑制治療薬はそれぞれ作用機序も異なり、治療に長期間を有するので、日頃から骨密度低下を最小限に抑制する生活に努めることが重要視されている。したがって、成長期に骨密度を高めることが骨密度低下を最小限にすることに繋がり[19]、そのために日頃から Ca を積極的に摂取することが推奨されている。

Ca は神経の伝達刺激や骨格筋ならびに心筋の収縮刺激に関与するミネラルである[33]。牛の十二指腸における Ca 吸収経路として、腸上皮細胞内を介する能動輸送ならびに腸上皮細胞間隙を介する受動輸送の 2 種類が存在する[3]。能動輸送は細胞質内の Ca 結合タンパク質 (CaBP9K) が Ca イオンに結合し、基底

部へ移動することで成立する。CaBP9Kは1,25-ジヒドロキシビタミンD(1,25-(OH)₂D)が上皮細胞内の1,25-(OH)₂D受容体に結合することで発現する。しかし、ラット[57]および牛[23]では加齢に伴い、1,25-(OH)₂D受容体数が減少することから、能動輸送によるCa吸収能力は低下する。高齢の乳牛にとって1,25-(OH)₂D受容体数の減少は低Ca血症を招きやすい要因の一つである。一方、受動輸送は腸管内と血液間の濃度勾配を利用した単純拡散であるので、加齢による1,25-(OH)₂D受容体数減少の影響[18]を受けない利点がある。しかし、細胞間隙に存在する密着結合(タイトジャンクション:TJ)は膜内タンパク質によって構成されていて、細胞間を強く結合するバリアであり、小分子以外の物質の移動を制限している[7]。

Difructose anhydride (di-D-fructofuranose-1,2':2,3'-dianhydride: DFA)Ⅲはフラクトース 2 分子が結合した難消化性のオリゴ糖である。ラットの小腸を用いた *in vitro* 試験において、DFAⅢが小腸上皮細胞間隙の TJ に作用し、細胞間隙経路から Ca の受動吸収を促進することが確認されている[54]。牛の *in vitro* 試験においても、同様に、DFAⅢが十二指腸上皮細胞間隙からの受動的な吸収を促進し、Ca の吸収率を増加させることが報告されている[59]。これは、DFAⅢが TJ の構成タンパク質であるクローディン 1 とアクチンフィラメントの分布を変化させ、経上皮電気抵抗を下げることにより、細胞間透過マーカの移動を促進させるためである[55]。DFAⅢは、チコリの根などに含まれるイヌリンがフルクトシルトランスフェラーゼ処理され、フラクトース 2 分子が 2 箇所でもフルクトシド結合することで生成される[27, 49]。DFAⅢを摂取すると、乳酸菌および *Bifidobacterium* 属には資化されず[37]、*Ruminococcus* 属のみに資化される特徴を持つ[38]。乳牛において DFAⅢは第一胃微生物による分解を受けにくい性質を有すること[52]が知られており、去勢牛に経口投与した試験では 2 時間後に十二指腸内で検出され[41]、乾乳牛に給餌した試験では 4 時間後に摂取量の約

70%が十二指腸に到達すること[59]が示されている。分娩前後乳牛への DFAIII 給餌試験では、腸管からの Ca の受動輸送の促進に起因して、分娩後の血中 Ca 濃度が早期に回復したことが示唆された[60]。これらの報告以外にも、出生子牛に対する DFAIII の経口投与は初乳からの IgG 吸収を高め[51]、出生子牛の健康を強化することが報告されている[35, 56]。

以上より、乳牛の泌乳後期から分娩直後にかけて DFAIII を飼料添加することは、骨ミネラルを増加させ、分娩前後の Ca 負荷状態（低 Ca 血症）を軽減する可能性があると考えた。しかし、乳牛の泌乳後期ならびに乾乳期に骨ミネラルを増加させる飼養技術に関する学術情報は少なく、泌乳後期から分娩直後まで連続した期間の Ca 代謝に関する知見も不明な点が多い。そこで、本研究では、泌乳後期ならびに乾乳期に DFAIII を飼料添加した場合の骨ミネラルと骨代謝動態を明らかにすることを目的とし、第 I 章では泌乳後期牛に対する DFAIII 給餌が骨密度と骨代謝に与える影響について、第 II 章では泌乳後期から分娩直後にかけて長期間にわたる乳牛への DFAIII 給餌が骨代謝および Ca 代謝に与える影響について検討した。

第 I 章

泌乳後期の乳牛に対する DFAⅢ 給餌が 骨密度に与える影響

1. はじめに

泌乳初期の乳牛は乳量が急激に増加することから、血中 Ca 濃度が低下しやすい。血中 Ca 濃度を維持するために生体内の恒常性が作用し、十二指腸からの Ca 吸収、尿細管からの Ca 再吸収に加えて、骨吸収が活性化する。一方、泌乳後期から乾乳期にかけての乳牛では乳量が減少することから、血中 Ca 濃度が上昇しやすい。余剰の Ca は尿中へ排出され、骨形成が活性化する。また、分娩後は泌乳再開に伴って再び骨吸収が活性化する[11, 12]。乳牛は分娩を重ねるごとに乳量が増加し、上記のような Ca 代謝を繰り返した結果、骨密度が低下する[2, 32, 67]。したがって、泌乳後期に Ca を多給し骨のミネラルを増加できれば、分娩後の骨密度の減少を緩和できると考えられる。そこで本章では、泌乳後期の乳牛に DFAIII を給餌した際の骨密度と骨代謝への影響を検討した。

2. 材料および方法

2-1 供試牛ならびに採材計画

北海道帯広市一般酪農家 7 軒で飼養されている泌乳後期妊娠牛 24 頭（泌乳日数 199-319 日、妊娠日数 131~157 日）を供試牛とし、給餌飼料により対照群（n=12）および DFA 群（n=12）に分けた。対照群には、乳量を 32~36 kg に維持するために設計した完全混合飼料（TMR）を自由採食させた。DFA 群には、各農家で対照群と同じ TMR の自由採食に加えて、DFAIII を 20%含有するペレット（日本甜菜製糖株式会社、東京）を 1 日当たり 200g 添加して（DFAIII として 40 g）[59]、試験開始 1 日目から 28 日間継続的に給餌させた。Table 1 に TMR の 1 日当たりの Ca, リン（P）, マグネシウム（Mg）給与量ならびに Dietary cation-anion difference（DCAD）値[2]を示した。全ての供試牛は、獣医師による診療を要さず、臨床的に健康であった。なお、対照群および DFA 群の産次数（ 3.2 ± 0.1 および 3.2 ± 0.1 ）、月齢（ 50.8 ± 1.0 および 49.1 ± 1.5 ）、体重（ $829 \pm$

4.6 kg および 829 ± 4.3 kg), 1 日乳量 (38.1 ± 0.6 kg および 38.3 ± 0.66 kg) ならびにボディコンディションスコア(BCS)[15] (3.29 ± 0.01 および 3.29 ± 0.01) に有意差はみられなかった。全ての供試牛に対して、骨密度測定、採血、採尿および乳汁採取を試験開始日 (0 日) から 1 週間毎 (0, 7, 14, 21, 28 日目) に行った。本実験計画は帯広畜産大学実験動物委員会より承認された (#28-160)。

2-2 骨密度評価

骨密度測定は、Keene ら[26]および Maetani ら[34]の方法に基づき X 線撮影吸光光度法 (Radiographic Absorptiometry : RA) により、右中手骨と第 4 および 5 尾椎を評価対象として実施した。中手骨および尾椎の撮影条件は、それぞれ 70 kV, 1.0 mAs, 照射距離 70 cm ならびに 70 kV, 0.5 mAs, 照射距離 70 cm とした。標準参照体としてアルミニウム(Al)ステップウェッジを同時撮影し、画像の読取は Computed Radiography (CR) 装置 (FCR XL-2 ; 富士フィルム, 東京) を使用した。デジタル画像は画像処理ソフトウェア(ImageJ ; National Institute of Health, [https:// imagej.nih.gov/ij/](https://imagej.nih.gov/ij/), 1997–2016)に取り込み、関心領域 (ROI) における骨密度の解析を行った。中手骨の ROI は、遠位中手管を中心とし皮質骨を含むように設定した (Fig1-1a)。尾椎の ROI は、皮質骨および海綿骨を含む尾椎全体とした (Fig1-1b)。中手骨と尾椎の骨密度値は、各 Al ステップ厚 (3, 6, 9, 12, 15, 18 mm) の ROI における骨密度値を計測し、その骨密度値と各 Al ステップ厚から検量線を作成することで算出した[34]。

2-3 血液生化学解析

採血 (血清用 8 mL, 血漿用 7 mL) は、採血用ホルダー (ベノジェクト II ホルダーD, テルモ株式会社, 東京), 採血針 (ベノジェクト II 採血針 S 21G, テルモ株式会社, 東京), 血清用真空採血管 (インセパック II -D, 徳山積水工業株

式会社, 東京)および血漿用真空採血管(ベノジェクト II 真空採血管 VP-H070K, テルモ株式会社, 東京)を用いて頸静脈から行った。血液サンプルは 4°C 下で運搬し, 37°C, 30 分の条件でインキュベートした。採血後, 1 時間以内に遠心分離 (2,000×g, 10 分間) を行い, 血清と血漿を分離した。血清および血漿は解析時まで冷凍保存 (-30°C ならびに -80°C) した。

(1) 血清 Ca 濃度の測定

自動血液生化学分析装置 (AU680 ; ベックマンコールター, USA) を用いて, アルセナゾ III 法により測定した。

(2) 血清骨型アルカリフォスファターゼ (BAP) 活性値の測定

市販のキット (Access Ostase ; ベックマンコールター) を用いて, 化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA ; chemiluminescent enzyme immunoassay) により測定した。本キットは検体, 磁性粒子結合抗マウス IgG ヤギポリクロナール抗体および抗ヒト BAP マウスモノクロナール抗体を免疫反応させた後, 更にルミジェン 4-メトキシ-4-(3-フォスフェイトフェニル)スピロ [1,2-ジオキセタン-3,2'-アダマンタン]ジナトリウム塩 (PPD) を加え酵素反応させた。ルミジェン PPD の分解による発光量から, 検体中の BAP 濃度を測定した。測定内 (Intra-CV) および測定間変動誤差 (Inter-CV) は, それぞれ 2.3% および 3.0% であった。

(3) 血漿骨型酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ 5b (TRAP5b) 活性値の測定

ナフトール-ASBI-リン酸 (和光純薬) を基質とした酵素反応による蛍光測定法 [36, 65] により測定した。

(4) 血清低カルボキシル化オステオカルシン (ucOC) 濃度の測定

市販のキット (Picolumi-ucOC ; Eisai, Japan) を用いて, 電気化学発光免疫測定法 (ECLIA) により測定した。本キットは抗 ucOC 抗体結合ビーズを固相として, 検体中の ucOC をビーズとルテニウム (Ru) 標識抗 OC 抗体に結合させた後, 電極上にて電気エネルギーを加えることで結合した Ru 標識抗 OC 抗体

量に応じて Ru 錯体が発光する。発光量を標準抗原液の発光量を対比することで検体中の ucOC 濃度を測定した。Intra-CV および Inter-CV は 1.0% および 1.9% であった。

(5) 血清オステオカルシン (OC) 濃度の測定

市販のキット (Elecsys ; Roche Diagnostic, Switzerland) を用いて, ECLIA 法により測定した。本キットは検体, ビオチン化抗 OC 抗体およびトリス Ru 標識抗 OC 抗体を免疫反応させた後, 更にストレプトアビジン (SA) コーティング磁性マイクロパーティクル (MP) を加えインキュベートした。反応混合液を吸引し, 磁力により SA 磁性 MP を電極に引きつけ, SA 磁性 MP に結合したトリス Ru 標識抗 OC 抗体のトリス Ru が発光する。発光量を標準抗原液の発光量を対比することで検体中の OC 濃度を測定した。Intra-CV および Inter-CV は 0.7% および 1.3% であった。

(6) ucOC/OC 比の算出

ucOC/OC 比は, 上記の方法で測定した ucOC 値および OC 値より算出した [20]。

2-4 乳中 Ca 濃度の分析

採材日の朝の搾乳後, スピッツ管(日水製薬株式会社, 東京)に乳汁 10 mL を採取した。乳汁サンプルは, 解析まで -30°C 下で保存した。前処理として, るつぼに入れた乳サンプル 1 ml にセルロース (和光純薬工業株式会社, 大阪) を 0.5 g 加えたものを, 電気マッフル炉(アドバンテック東洋株式会社, 東京)で 600°C , 2 時間湿式灰化した。灰化後, 塩酸で再溶解し, 高周波誘導結合プラズマ発光分光分析法 (ICPE-9000, 島津製作所, 京都) で分析した [10]。

2-5 尿生化学分析

尿道カテーテル（富士平工業，日本）を用いて導尿を行い，尿を採取した。尿サンプルは解析まで-30℃下で保存した。自動血液生化学分析装置（AU680）を用いて，尿中 Ca 濃度はアルセナゾⅢ法，尿中クレアチニン（Cre）濃度は酵素法により測定し，尿中 Ca/Cre 比を算出した。

2-6 統計学的解析

統計学的解析には SAS enterprise guide ver.7.1（SAS institute Inc.）を使用した。全測定値の推移に関して，固定効果（群，時間，群×時間），酪農家および供試牛を変量効果とした混合モデルを用いて反復測定分散分析を行った。有意差が見られた場合は，Turkey の多重比較検定により群間および群内比較を行った。有意水準は 5%とした。

3. 結果

Fig1—2 に中手骨と尾椎における骨密度の変化を示した。中手骨の骨密度は，DFA 群において 0 日目と比較して試験開始 14, 21 および 28 日目に有意に増加した（それぞれ $P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.001$ ）。一方，対照群において中手骨の骨密度は 7 日目および 14 日目に一過性の有意な増加を示した（それぞれ $P<0.001$, $P<0.01$ ）。第 4 尾椎の骨密度は，DFA 群において 0 日目と比較して 28 日目に有意に増加し（ $P<0.01$ ），対照群より有意な高値を示した（ $P<0.05$ ）。第 5 尾椎の骨密度には，群内および群間での有意差はなかった。

Fig1—3 に血中の Ca 濃度，BAP および TRAP5b 活性値，ucOC および OC 濃度ならびに ucOC/OC 比の推移を示した。血中 Ca 濃度，血清 BAP および血漿 TRAP5b 活性値には，群内および群間の有意差は見られなかった。対照群の血中 OC 濃度は，0 日目と比較して 28 日目に有意に減少した（ $P<0.05$ ）。さらに対照群の血中 ucOC 濃度は，DFA 群と比較して 7, 14 および 21 日目に有意

な高値を示した（それぞれ $P<0.01$, $P<0.05$, $P<0.05$ ）。DFA 群の ucOC/OC 比は、0 日目と比較して 21 および 28 日目に有意に減少し（それぞれ $P<0.01$, $P<0.05$ ）、対照群よりも有意な低値を示した（ともに $P<0.001$ ）。

Fig1—4 に乳中 Ca 濃度ならびに尿中 Ca/Cre 比の変移を示した。DFA 群の乳中 Ca 濃度は 0 日目より 28 日目に有意に増加し（ $P<0.05$ ）、14, 21 および 28 日目に対照群より有意な高値を示した（それぞれ $P<0.01$, $P<0.01$, $P<0.001$ ）。尿中 Ca/Cre 比には群内および群間の有意差は見られなかった。

4. 考察

本章では、泌乳後期の乳牛に対して 28 日間継続的に DFAIII を給餌し、骨密度ならびに骨代謝へ及ぼす影響について検証した。

医療分野では、非観血的骨密度の評価法として、本章で用いた RA 法以外に、二重エネルギー X 線吸収測定法（DXA）や定量コンピューター断層法（QCT）が臨床応用されている[9, 14]。RA 法は単位面積当たりの骨密度で表されるのに対し、QCT 法は単位体積当たりの骨密度で表される。また、RA 法は一種類の X 線を使用することで骨密度を測定するのに対し、DXA 法は二種類の X 線を使用する[62]。これらの特徴から RA 法で測定した骨密度値は、骨の体積と軟部組織の影響を受ける可能性があるが[13]、DXA 法ならびに QCT 法に必要な装置を、一般酪農家で使用することは現実的ではない。一方、RA 法の実施のためには、装置を携帯し、農場内で実施可能であることから、本研究では RA 法を選択した。DFA 群の第 4 尾椎および中手骨の骨密度値は、0 日目と比較して 28 日目に有意に増加した。さらに第 5 尾椎の骨密度値も 0 日目と比較して 28 日目に増加する傾向を示した($P<0.1$)。第 4 尾椎と中手骨の骨密度値が同時に増加したことから、DFAIII の給餌が骨のミネラルを増加させたと示唆される。過去のラットを用いた研究においても、卵巣摘出後に DFAIII を給与すると大腿骨の骨塩量が

増加したとの報告[39]や DFAⅢ給与後の運動によって大腿骨および脛骨の骨塩量と骨密度が増加したとの報告[53]もあり, DFAⅢの給餌が骨へのミネラル蓄積を惹起し, 骨密度を増加させたことが推察された。

一方, 対照群では 7 および 14 日目において, DFA 群では 14 および 21 日目において中手骨の骨密度が一時的に増加した。しかし, 尾椎の骨密度は, 両群ともに中手骨の骨密度が増加した日において有意な増加は見られなかった。乳牛の中手骨は尾椎と比較して体積が大きい。また RA 法で測定した骨密度値は体積の影響を受けやすいので, 本試験牛の 7, 14 および 21 日目の中手骨の骨密度値は, 過大に算出した可能性がある[13]。したがって, 本章において RA 法は成乳牛の中手骨と比較して尾椎の骨密度測定に適していたと考えられる。

骨は骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収から成る骨代謝回転を繰り返している。骨形成は骨芽細胞の増殖・分化の過程で, 増殖期, マトリックス形成期ならびに石灰化期に分類され, 各過程の骨状態を特異的に反映する血中の骨形成マーカーが知られている[1]。一方, 血中の骨吸収マーカーとして, 破骨細胞から分泌される酵素や骨基質が破壊される際に産生されるコラーゲン架橋の断片が知られている[1]。本試験では骨代謝動態を評価するために, RA 法による骨密度の測定以外に血中の BAP, TRAP5b, OC および ucOC といった骨代謝マーカーの測定も行った。BAP は骨芽細胞からマトリックス形成期に分泌される骨形成マーカーである[1, 25, 50]。TRAP5b は破骨細胞の数を反映する骨吸収マーカーである[47]。本章において, 両群ともに血中の BAP および TRAP5b 活性値に有意な群間および群内差は見られなかったため, DFA は破骨細胞と骨芽細胞の増殖に影響を与えなかったことが示唆された。

OC は石灰化期に成熟した骨芽細胞で合成され, ビタミン K 依存性カルボキシラーゼの作用によりヒドロキシアパタイトと強い親和性を有するため[28, 40, 43, 44], 骨化の指標とされる[50]。ucOC は骨粗しょう症の指標として知

られ[42], 成熟骨芽細胞から血中へ放出される。また, ucOC はカルボキシル化を受ける proOC であることから, ucOC/OC 比はビタミン K 濃度の指標として用いられている[40]。本試験では, 対照群において, 血清 ucOC 濃度が 7, 14 および 21 日目において DFA 群より有意な高値を, 血清 OC 濃度が 0 日目と比べて 28 日目に有意な低下を示した。対照群では ucOC から OC への変移が進まなかったため, 対照群の ucOC/OC 比が 21 日目および 28 日目において, DFA 群よりも有意な高値を示したと考えられた。また DFA 群の OC および ucOC 濃度が経時的に有意な変化を示さなかったが, 21 および 28 日目において ucOC/OC 比が 0 日目と比較して有意に低下した。以上のことから, DFA 群では骨芽細胞内で proOC である ucOC から OC へ定常的に変換され, OC が骨の石灰化基質に取り込まれていたことが考えられた。したがって, DFA 給餌は骨の石灰化を促進させたと考えられた。しかし, 本章では血中のビタミン K 濃度の測定を行っていないため, DFAIII と OC 分泌の関係性を明らかにするためには, 今後, DFAIII を給餌した泌乳後期乳牛のビタミン K 濃度の変化を明らかにすることが必要と考えられた。

本章の試験では, 対照群と DFA 群の両群において, 血清 Ca 濃度に群間および群内の有意差は見られなかった。生体には Ca 恒常性を維持し, 血中 Ca 濃度を一定に保つ機構が存在する。DFA 群では Ca が十二指腸で吸収促進されたが, 恒常性によって血清 Ca 濃度が調整されていたことが推察された。一般に妊娠牛が過剰摂取した Ca は, 骨, 尿, 乳および胎子へ移行する[46]。本試験で, DFA 群の尿中 Ca/Cre に有意な変化がなかったにもかかわらず, 乳中 Ca 濃度は 28 日目に有意に増加し, 14, 21 および 28 日目では対照群よりも有意に高値であった。妊娠 190 日目以下の乳牛では, 胎子に対する Ca 要求量は 0 に等しいと考えられている[22]。なお, 全供試牛は試験期間中, 妊娠 190 日目以下であった(妊娠 159 日~185 日目)。以上のことから, DFAIII によって十二指腸で吸収促

進された過剰な Ca は、腎臓よりもむしろ乳腺において排出されたことが推察された。この現象の詳細な過程については、本試験では解明できなかったが、一つの推察としてカルシトニン (CT) が関与していた可能性が考えられる。CT は高 Ca 食の摂取時に甲状腺の C 細胞から分泌促進される[8, 33]。CT は破骨細胞の活動を抑制し、骨への Ca 沈着促進ならびに尿へ排出する Ca 量を増加させることで血中 Ca 濃度を調節する[33]。骨や腎臓に CT 受容体が存在することは一般的であるのに対し、乳腺の CT 受容体に関しては妊娠ラットにおける報告しか見当たらない[61]。さらに牛において乳腺に CT 受容体が分布するという過去の報告がない。以上のことから DFAIII を摂取した泌乳後期牛の Ca 代謝動態に関して更なる調査が必要と考えられる。

本章の結論として、DFAIII を 28 日間泌乳後期牛に給餌した結果、骨の石灰化が促進され、骨のミネラルを増加させた。また DFAIII によって吸収促進された Ca は乳腺に排出され、乳中 Ca 濃度を増加させた。

5. 小括

泌乳後期の乳牛に対して 28 日間継続的に DFAIII を給餌し、骨密度ならびに骨代謝へ及ぼす影響について検証した。DFA 群では、28 日目に第 4 尾椎ならびに中手骨の骨密度の増加と ucOC/OC 比の減少が同時に認められたことから、ucOC から変換された OC が定常的に骨の石灰化基質に取り込まれ、石灰化が促進した結果、骨のミネラルが増加したと考えられた。また、DFAIII によって吸収促進された Ca が乳腺に排出され、乳中 Ca 濃度が 28 日目に増加すると考えられた。

6. 図表

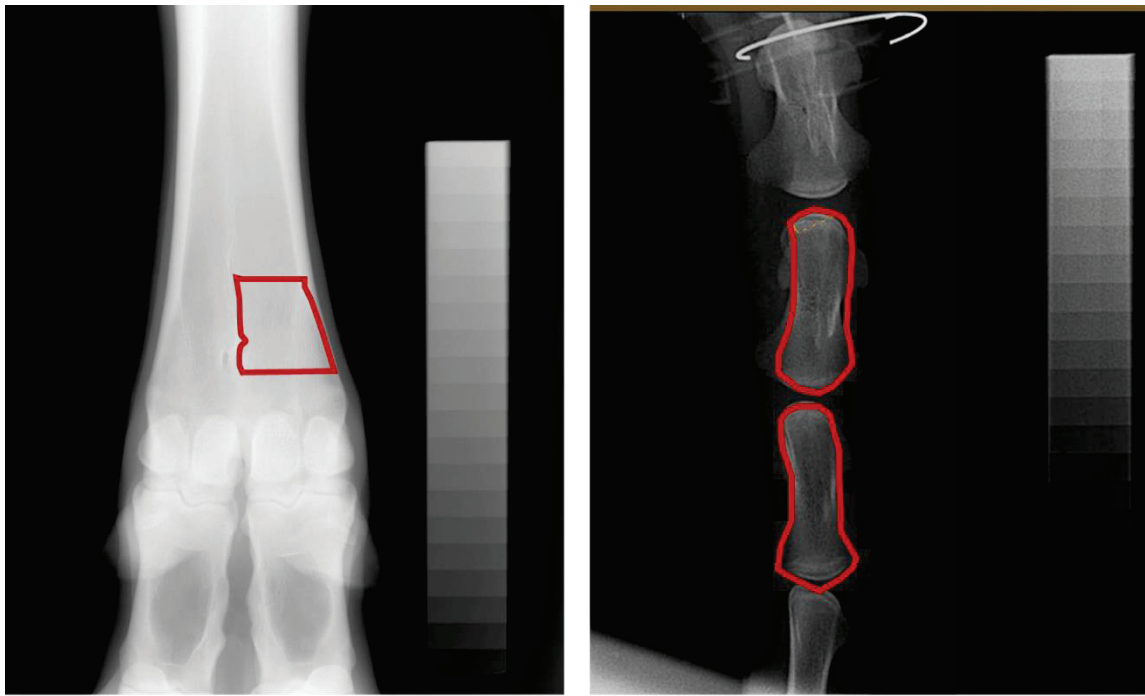
Table1：各群におけるカルシウム（Ca）、無機リン（P）およびマグネシウム（Mg）の
1日当たり供給量と Dietary cation-anion difference (DCAD) 値¹⁾

群	Ca (g/kg DM ²⁾)	P (g/kg DM ²⁾)	Mg (g/kg DM ²⁾)	DCAD ³⁾ (mEq/100g)
DFA (n=12)	10.9±0.23	5.1±0.32	2.5±0.07	16.2±0.9
対照 (n=12)	11.0±0.22	4.3±0.06	2.6±0.06	16.9±0.8

1) 全て平均値±標準誤差

2) 乾物量

3) DCAD (mEq/100 g 乾物(DM)) = (Na %DM/0.023 + K %DM/0.039) - (Cl %DM/0.0355 + S %DM/0.016)



a:中手骨

b:尾椎

Fig1-1: 骨密度の関心領域 (ROI)

- (a) 赤い線で囲まれた部分が中手骨の関心領域
- (b) 上の赤い線で囲まれた部分が第4尾椎の関心領域
下の赤い線で囲まれた部分が第5尾椎の関心領域

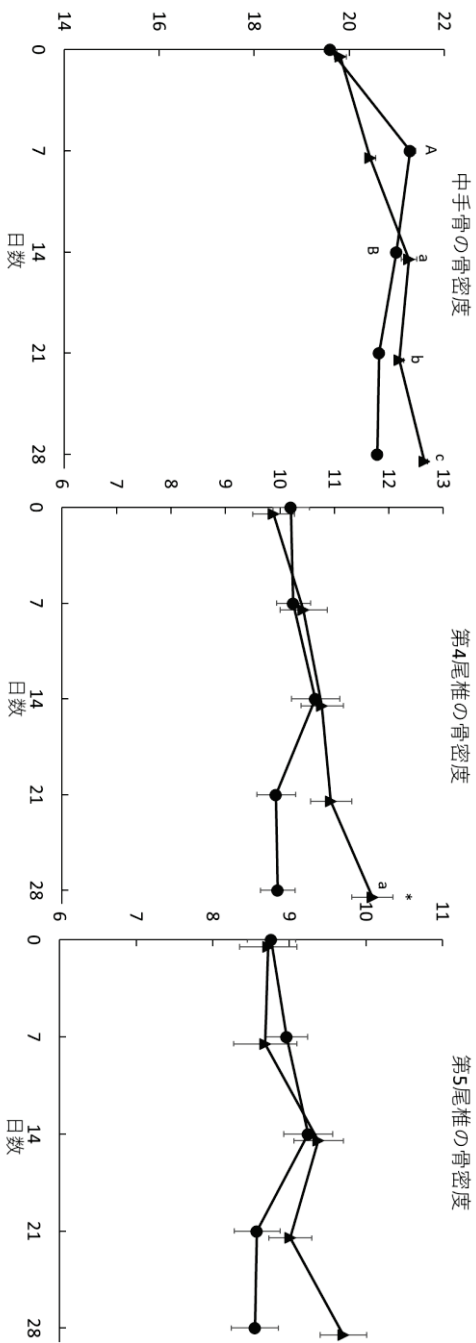


Fig1-2. 試験0日目から試験28日目までの中手骨と第4および5尾椎の骨密度 (平均値 ± 標準誤差) 推移
 DFA群 (▲: n=12) の群内差 (0日目との比較) a: $P < 0.01$, b: $P < 0.05$, c: $P < 0.001$
 対照群 (●: n=12) の群内差 (0日目との比較) A: $P < 0.001$, B: $P < 0.01$
 DFA群と対照群の群間差 *: $P < 0.05$

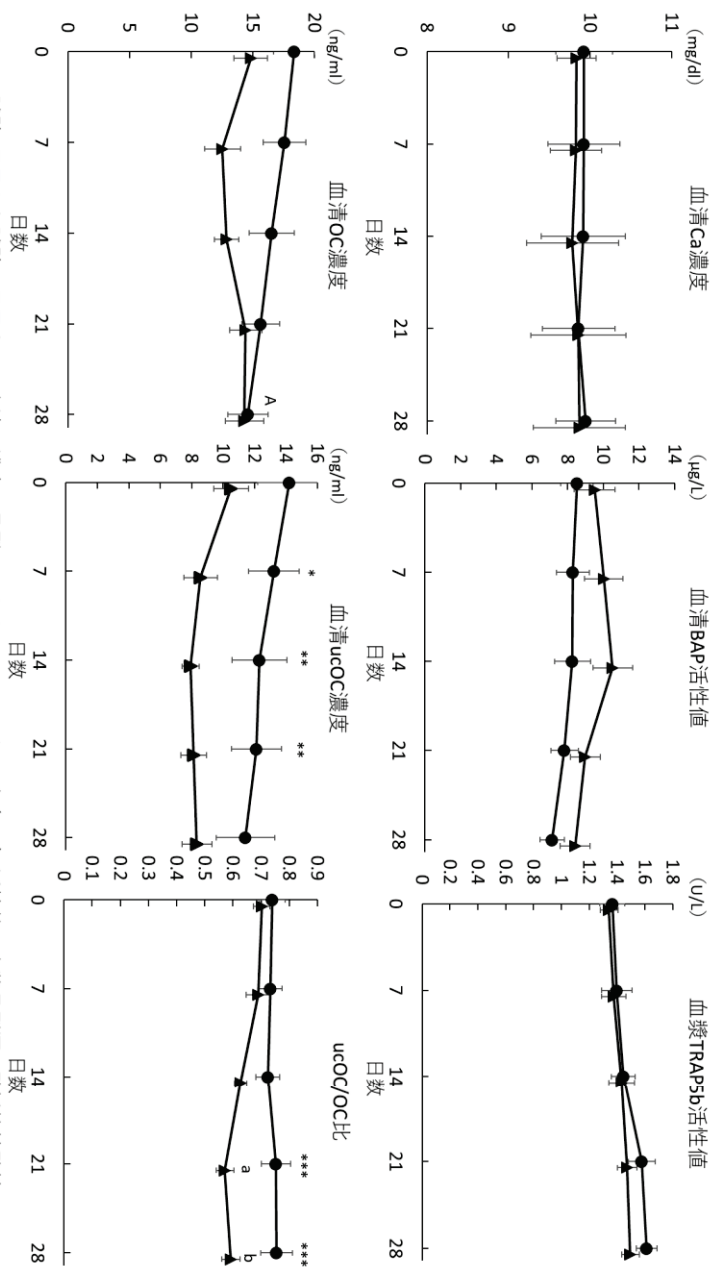


Fig1-3.試験0日目から試験28日目までの血清Ca濃度、骨型アルカリホスファターゼ (BAP) 活性値、血漿骨型酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP5b) 活性値、血清オステオカルシン (OC) 濃度、低カルボキシシル化オステオカルシン (ucOC) 濃度およびucOC/OC比 (平均値±標準誤差) の推移
 DFA群 (▲: n=12) の群内差 (0日目との比較) a: P<0.01, b: P<0.05
 対照群 (●: n=12) の群内差 (0日目との比較) A: P<0.05
 DFA群と対照群の群間差 *: P<0.01, **: P<0.05, ***: P<0.001

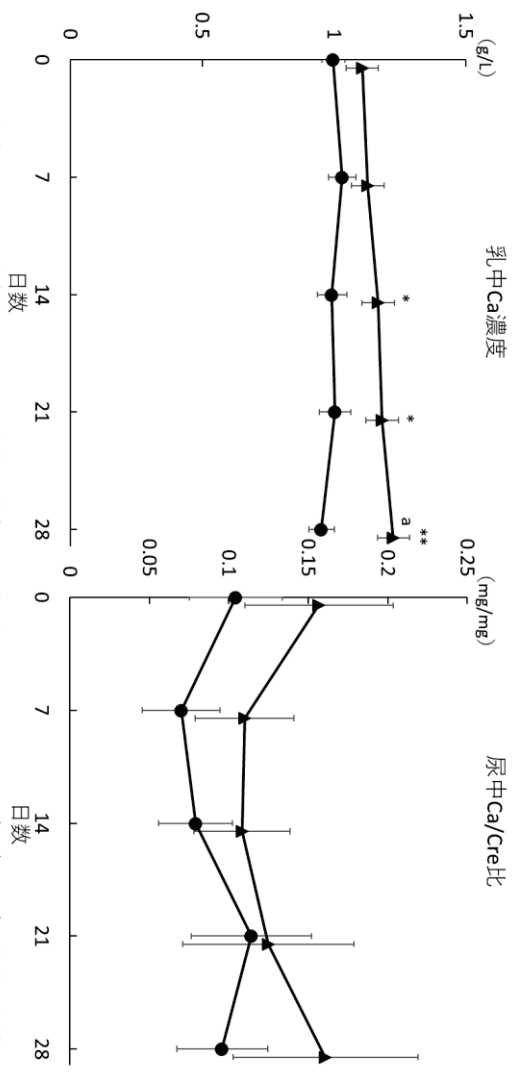


Fig1-4:試験0日目から試験28日目までの乳牛Ca濃度および尿中Ca/クレアチニン (Cre) 比 (平均値±標準誤差) の推移
 DFA群 (▲: n=12) の群内差 (0日目との比較) a: P<0.05
 DFA群と対照群 (●: n=12) の群間差*: P<0.01, **: P<0.001

第Ⅱ章

泌乳後期から分娩後までの乳牛に対する長期の
DFAⅢ給餌が骨および Ca 代謝に与える影響

1. はじめに

妊娠中の乳牛では十二指腸で吸収された Ca は胎子、乳、尿、糞および骨へ移行する[46]が、妊娠日数によって生体内の Ca 代謝、とくに Ca の組織への移行状態は変化すると考えられている。妊娠 190 日以前の乳牛の体内では消化管で吸収された Ca の多くは乳、尿、糞および骨へ移行する。妊娠 190 日以降の乳牛では乳、尿、糞および骨に加え徐々に胎子にも移行し始め[22]、乾乳期には胎子、尿、糞ならびに骨への移行が主となる[45, 46]。第 I 章の供試乳牛は妊娠 190 日以前の泌乳後期牛であり、胎子に供給される Ca 量は少ないため、DFAIII の給餌により消化管で吸収された Ca は、主に乳および骨に移行したと考えられた。さらに、泌乳後期から乾乳期にかけて継続的に妊娠乳牛に DFAIII を給餌すると、①骨へ移行する Ca 量を増やすことで分娩前に利用可能な Ca 量を増加させ、②産次の増加とともに起きるとされる骨密度の低下[2, 32, 67]を緩和することも期待される。現在、分娩前に生体内で利用可能な Ca 量を増加させる飼養技術として、乾乳後期の飼料中の DCAD 値調整[2, 11, 30]、マグネシウム (Mg) [63] およびカリウム (K) [17]濃度の適正化などの技術が広く普及している。これらの技術には、生体内を代謝性アシドーシス状態へ導くことで骨吸収ならびに尿細管からの Ca 再吸収を活性化するというメリット[18, 48]がある一方で、DCAD 値調整に使用する陰イオン塩の嗜好性が低く、低 Ca 血症に対する効果が十分に発揮されない[30]とのデメリットも存在する。分娩前後における乳牛への DFAIII 給餌が Ca 代謝に及ぼす効果を検討した過去の報告では、分娩直後の血中 Ca 濃度は低下した[60]。この現象は乾乳後期の飼料が高 DCAD 値で、分娩時の骨吸収が抑制されたためであると考えられた。以上のことから、泌乳後期から分娩まで長期の DFAIII の飼料添加を行いながら、乾乳後期飼料の DCAD 値を適正範囲に調整することが、分娩乳牛の利用可能な Ca 量の増加に繋がると考えられる。本章では、乳牛に対して泌乳後期から分娩までの長期にわたる DFA

Ⅲの飼料添加と乾乳後期飼料の DCAD 値の適正調整を行い、試験期間中の骨および Ca 代謝の変化を解析した。

2. 材料および方法

2-1 供試牛ならびに採材計画

北海道帯広市一般酪農家で飼養されているホルスタイン種泌乳後期妊娠牛 16 頭（泌乳日数：211～420 日，妊娠日数 157～160 日）を供試牛とし，給餌飼料により対照群（n = 8）および DFA 群（n = 8）に無作為に振り分けた。対照群において，泌乳期は泌乳期用 TMR の自由採食とし，乾乳前期は乾乳期用 TMR の自由採食と乾乳期用配合（2 kg/回）の給餌を行った。乾乳後期は乾乳期用 TMR 自由採食と乾乳期用配合（4 kg/回）を与え，分娩後 7 日間は泌乳期用 TMR とチモシー乾草の自由採食とした（Table2）。DFA 群には，全期とも対照群と同じ飼料内容に，第 I 章と同様，DFAⅢを 20%含有するペレット（日本甜菜製糖株式会社，東京）を 1 日当たり 200 g 添加して（DFAⅢとして 40 g）[59]，分娩予定 119 日前から分娩 7 日後まで継続的に給餌させた。乾乳後期の DCAD 値調整には，硫酸マグネシウム（馬居化成工業株式会社，日本）を使用した。対照群および DFA 群の分娩前産次数（ 3.25 ± 0.05 および 3.00 ），年齢（ 3.87 ± 0.04 および 3.5 ± 0.06 ），体重（ 611 ± 4.49 kg および 587 ± 2.7 kg），1 日乳量（ 40.3 ± 0.48 kg および 41.0 ± 0.52 kg）ならびに BCS [15]（ 3.19 ± 0.01 および 3.19 ± 0.01 ）に有意差はなかった。全ての供試牛に対して，採血および採尿を分娩予定日の 120, 90, 60, 30, 7 日前と分娩当日，分娩後 24 時間および 7 日に行った。分娩当日および分娩 24 時間後以外の採血は採食後，分娩当日は胎子娩出後 6 時間以内，分娩 24 時間後は胎子娩出後から 22～24 時間後とした。分娩直後と分娩 12 時間後に，Ca 補給を目的にリン酸 Ca を 100 g（Ca として 27 g）経口投与した。

2-2 血液生化学解析

採血（8 mL）は、採血用ホルダー（ベノジェクト II ホルダーD, テルモ株式会社, 東京）、採血針（ベノジェクト II 採血針 S 21G, テルモ株式会社, 東京）および血清用真空採血管（インセパック II-D, 徳山積水工業株式会社, 東京）を用いて、尾静脈より行った。採取血液は、第 I 章と同様、インキュベート後に遠心分離（2,000×g, 10 分間）を行い、血清を分離した。血清は解析時まで-30℃下で冷凍保存した。

(1) 血清 Ca, 無機リン (iP) および Mg 濃度の測定

第 I 章と同様に自動血液生化学分析装置（AU680, ベックマンコールター, USA）を用いて測定した。血清 iP 濃度と Mg 濃度は酵素法により、Ca 濃度と同様に自動血液生化学分析装置を用いて測定した。

(2) 血清 ucOC 濃度の測定

第 I 章の方法を用いて測定を行った。

(3) 血清 OC 濃度の測定

第 I 章の方法を用いて測定を行った。

(4) 血清 I 型コラーゲン架橋 N-テロペプチド (Type I collagen cross-linked N-telopeptide, NTx) の測定

市販のキット（Osteomark NTx Serum, アーリアメディカル株式会社, 東京）を用いて、競合酵素結合免疫吸着測定法（ELISA : Enzyme-linked immunosorbent assay）により測定した。本キットはあらかじめ固相化された NTx 抗体に対し、検体中の NTx とペルオキシダーゼにより標識された抗体を加え、免疫反応を（25℃、90 分）させた。発色基質（Tetramethylbenzidine）を免疫反応終了 5 分前に添加し、30 分間反応後、速やかに 450 nm の吸光度測定によりペルオキシダーゼ活性を検出し、検体中の NTx 濃度を算出した。

Intra-CV および Inter-CV は 6.2% および 4.0% であった。

(5) ucOC/OC 比の算出

第 I 章の方法と同様に算出した。

(6) OC/NTx 比の算出

OC/NTx 比は、上記の方法で測定した OC 値および NTx 値より算出した [66]。

(7) 血清総コレステロール (T-Cholesterol, T-cho) 濃度の測定

自動血液生化学分析装置 (AU680; ベックマンコールター, USA) を用いて、コレステロールオキシダーゼ法により測定した。

2-3 尿生化学分析

第 I 章と同様の方法で採取し、尿は -30°C 下で保存した。第 I 章と同様に、尿中 Ca 濃度と Cre 濃度を測定後、尿中 Ca/Cre 比を算出した。

2-4 ルーメンフィルスコア (RFS) の測定

Burfeind ら [4] の方法に基づいて RFS をスコア化した。本章では RFS の各スコア (1 から 5) 状態を 1.0 刻みでスコア化し、5 段階でスコアリングした。

2-5 統計学的解析

統計学的解析には SAS enterprise guide ver.7.1 (SAS institute Inc.) ならびに JMP15.1.0 (SAS Institute Japan 株式会社, 東京) を使用した。なお、乳牛の生体内の Ca の組織移行状態は妊娠日数、泌乳および乾乳の影響を受ける [22, 45, 46] と考えられることから、下記の通り試験期間を三期間に分けて統計学的解析を行った。

試験期間を期間 I (分娩予定 120 日前~90 日前)、期間 II (分娩予定 90 日前

～60 日前) および期間 III (分娩予定 60 日前～分娩 7 日後) に分けて統計学的解析を行った。期間 I および II の測定値について, Shapiro-Wilk normal 検定による正規性の確認後, 群内比較を Paired *t* 検定あるいは Wilcoxon 順位和検定により, 群間比較を Student *t* 検定あるいは Mann-Whitney U 検定により行った。期間 III の測定値については, 固定効果 (群, 時間, 群×時間), 供試牛ならびに泌乳ステージを変量効果とした混合モデルを用いて反復測定分散分析を行い, 有意差が見られた場合に Turkey の多重比較検定による群間および群内比較を行った。各統計処理における有意水準は 5%とした。

3. 結果

(1) 期間 I における推移

Fig2—1 に血中 Ca, P および Mg 濃度の推移を示した。両群において血中 Ca および P 濃度には群内および群間での差はなかった。DFA 群の血中 Mg 濃度は, 対照群と比較して分娩予定 120 および 90 日前に有意な高値を示した ($P<0.05$)。

Fig2—2 に血中 OC, NTx, OC/NTx 比, ucOC および ucOC/OC 比の推移を示した。血中 OC および ucOC 濃度には群内および群間の有意差は見られなかった。血中 NTx 濃度は, 両群ともに分娩予定 120 日前と比較して分娩予定 90 日前に有意に減少した (それぞれ $P<0.05$, $P<0.01$)。DFA 群の OC/NTx 比は, 分娩予定 120 日前と比較して分娩予定 90 日前に有意に増加した ($P<0.01$)。分娩予定 90 日前の ucOC/OC 比は, 対照群よりも DFA 群の方が有意に高値であった ($P<0.05$)。

Fig2—3 に血中 T-cho 濃度, 尿中 Ca/Cre 比および RFS の推移を示した。分娩予定 120 日前の血中 T-cho 濃度は対照群よりも DFA 群の方が有意に高値であった ($P<0.01$)。尿中 Ca/Cre 比および RFS には, 群内および群間での有意差は見られなかった。

(2) 期間 II における推移

Fig2—4 に血中 Ca, P および Mg 濃度の推移を示した。これらの項目には、群内および群間の有意差は見られなかった。

Fig2—5 に血中 OC, NTx, OC/NTx 比, ucOC および ucOC/OC 比の推移を示した。血中 OC, NTx, OC/NTx 比および ucOC 濃度には群内および群間での有意差は見られなかった。分娩予定 90 日目の ucOC/OC 比は、対照群よりも DFA 群の方が有意に高値であった ($P<0.05$)。

Fig2—6 に血中 T-cho 濃度, 尿中 Ca/Cre 比および RFS の推移を示した。血中 T-cho 濃度および RFS には、群内および群間での有意差はなかった。対照群の尿中 Ca/Cre 比は、分娩予定 90 日目の比較して分娩予定 60 日目に有意に増加した ($P<0.05$)。

(3) 期間 III における推移

Fig2—7 に血中 Ca, P および Mg 濃度の推移を示した。DFA 群において、分娩当日の血中 Ca 濃度は分娩予定 60 日目の期間と比較して有意に減少 ($P<0.001$) したが、分娩 7 日後に有意に上昇した。対照群において、分娩当日の血中 Ca 濃度は分娩予定 60 日目の期間と比較して有意に減少 ($P<0.001$) し、分娩 24 時間後に有意に上昇した。なお、分娩当日の血中 Ca 濃度は、対照群よりも DFA 群の方が有意に高値であった ($P<0.01$)。両群ともに、血中 P および Mg 濃度には群内および群間の差はなかった。

Fig2—8 に血中 OC, NTx, OC/NTx 比, ucOC および ucOC/OC 比の推移を示した。両群ともに、これらの項目には群内および群間の差は見られなかった。

Fig2—9 に血中 T-cho 濃度, 尿中 Ca/Cre 比および RFS の推移を示した。DFA 群において、血中 T-cho 濃度は分娩予定 60 日目の比較して分娩予定 30 日目に

有意な減少を示した ($P<0.001$)。また、分娩当日および分娩 24 時間後には、血中 T-cho 濃度は分娩予定 30 日前と比較して有意に減少した ($P<0.05$)。対照群において、血中 T-cho 濃度は分娩予定 60 日前と比較して分娩予定 30 日前に有意に減少した ($P<0.001$)。また、分娩当日および分娩 24 時間後には、血中 T-cho 濃度は分娩予定 30 日前と比較して有意に減少した ($P<0.05$)。尿中 Ca/Cre 比および RFS には、両群ともに群内および群間の差はなかった。

4. 考察

本章では泌乳後期から分娩まで長期の DFAⅢ 給餌を行い、乳牛の骨代謝および Ca 代謝に与える影響について検証した。乳熱の危険因子として、品種、年齢、飼料中 Ca および K 濃度、飼料中 DCAD 値ならびに低 Mg 血症などが挙げられる [6, 17]。本供試牛の品種、年齢に差はなく、また本試験の飼料中の Ca および K 濃度、飼料中の DCAD 値は同一飼料であったので差はなかったと考えられる。さらに試験期間中の両群の血中 Mg 濃度に有意差は見られなかった。したがって本試験ではこれらの危険因子は対照群と DFA 群間で有意差がなく、群間の相違点は DFAⅢ 給餌の有無であったと考えられた。

本章では、第 I 章と同様に骨代謝動態を評価するために、血中の OC、ucOC および NTx といった骨代謝マーカーの測定も行った。NTx は骨吸収の際に産生される I 型コラーゲン架橋の N テロペプチドであり、骨特異性の高い骨吸収マーカーである [1]。OC/NTx 比は骨形成マーカーと骨吸収マーカーの比であり、骨代謝動態を診断するために利用されている [66]。

期間 I (分娩予定 120 日前～90 日前) の解析において、対照群および DFA 群の分娩予定 90 日前の血中 NTx 濃度は 120 日前と比較して有意に減少した。DFA 群の分娩予定 90 日前の OC/NTx 比は 120 日前と比較して有意に増加したが、血中 OC 濃度は有意な変化を示さなかった。OC は成熟した骨芽細胞で合成

される骨形成マーカーである[28, 50]。NTx は骨特異性の高い骨吸収マーカーであり、CT によって制御されている[1]。CT は高 Ca 食の摂取時に分泌され[8, 33]、破骨細胞の活動を抑制する。今回、血中 CT 濃度の測定は行っていないが、供試牛は期間 I において Ca を要求量以上に摂取していたため、CT の分泌促進による骨吸収の抑制が推察された。さらに、DFA 群では DFA III 摂取による Ca の吸収促進[60]も重なり、骨形成が優位になったことが示唆された。

一方、両群ともに分娩予定 120 日前～90 日前の血中 OC および ucOC 濃度に群内の有意差は見られなかったが、DFA 群の分娩 90 日前の ucOC/OC 比が対照群より有意な高値を示した。ucOC はビタミン K 依存性カルボキシラーゼの作用を受ける proOC として、OC はビタミン K 依存性カルボキシラーゼの作用後 γ -カルボキシル化 OC としてともに成熟骨芽細胞から血中へ放出される[40, 43]。DFA 群では ucOC および OC の分泌は一定であったが、対照群と比較して ucOC から OC への変移が進展しなかったことが考えられる。反芻動物ではビタミン K は第一胃の細菌叢によって合成され[5]、下痢やアシドーシス等により細菌叢の変化する場合に要求量を満たすビタミン K の合成が難しくなる。したがって、DFA 群では何かの原因で ucOC から OC への変換に必要なビタミン K の合成が困難になったことが示唆されたが、今後、DFA III を給餌した泌乳後期乳牛の血中ビタミン K 濃度の変化も併せて検証する必要があると考えられた。

期間 I において、対照群および DFA 群の尿中 Ca/Cre 比に群内および群間の有意差は見られなかった。妊娠牛が摂取した Ca は、骨、尿、乳および胎子へ移行する[46]が、期間 I の供試牛は妊娠 160 日から 190 日目であり、胎子へ移行する Ca はほぼ無視できることから、消化管吸収された Ca の多くは骨へ移行したことが示唆された。

期間 II（分娩予定 90 日前～60 日前）の解析において、両群ともに血中 OC、ucOC および NTx 濃度、OC/NTx 比に群間および群内差は見られなかったが、

分娩予定 90 日前の ucOC/OC 比は対照群よりも DFA 群の方が有意な高値を示した。分娩予定 90 日前において DFA 群では何かの原因で ucOC から OC への変換に必要なビタミン K の合成が困難になっていたが、分娩予定 60 日前において、その原因が解消され、ucOC から OC への変換に必要なビタミン K の合成が可能になったと示唆された。

対照群と比較して尿中 Ca/Cre 比において群間差は見られなかったが、対照群では分娩予定 60 日前の尿中 Ca/Cre 比は 90 日前より有意に増加した。乳牛の体内では、分娩予定 90 日前から乳へ移行する Ca 量は減少し、胎子へ移行する Ca 量は経時的に増加する[22]。したがって、対照群では消化管吸収された Ca が乳へ移行する割合が減少し、尿排出の割合が増えたことが推察された。一方、DFA 群では消化管吸収された Ca の多くが胎子へ移行し、骨と尿へ移行する量が減少したことが推察された。

期間Ⅲ（分娩予定 60 日前～分娩 7 日後）の解析において、両群ともに分娩予定 60 日前から分娩直前までの血中 Ca 濃度に群間および群内の有意差は見られなかった。DFA 群では Ca が十二指腸で吸収促進されたが、生体内の恒常性によって血中 Ca 濃度が調整されたことが示唆された。分娩当日の血中 Ca 濃度は両群ともに有意に低下したが、DFA 群の血中 Ca 濃度は対照群と比較して有意な高値を示した。DCAD は陰イオン塩の給与で乳牛の生体内を代謝性アシドーシス状態へ導き、各器官の上皮小体ホルモン (PTH) 受容体の反応性を向上させることで、生体内の Ca 量を増加させる[18]。この生体内のアシドーシス状態を確認する方法として、尿 pH の測定があげられる[30]。乾乳後期飼料の DCAD 値が $-5 \sim 5$ mEq/100 g の場合、尿 pH は 6.8～7.0 と報告されている[31]が、分娩予定 7 日前における尿 pH 値は対照群および DFA 群でそれぞれ、 6.93 ± 0.05 および 6.78 ± 0.06 であった。したがって、分娩予定 7 日前の全供試牛は DCAD によって代謝性アシドーシス状態へ導かれていたことが推察された。過去に乾

乳牛に DFAⅢを給餌した試験では、給餌 1 時間後から 12 時間後まで DFAⅢが十二指腸内で検出されたことが報告されている[59]が、本試験では、DFA 群に対して 1 日 2 回 DFAⅢを給餌していた。したがって、DFA 群では DCAD による効果に加えて DFAⅢが Ca を吸収促進させた結果、対照群と比較して有意な高値を示したと考えられた。一方、対照群の分娩当日の血中 Ca 濃度は軽度の低 Ca 血症であった ($6.7 \pm 0.1 \text{ mg/dL}$) が、乳熱発症牛はなかった。分娩 24 時間後の血中 Ca 濃度は、分娩当日と比較して有意に増加した。PTH は血中 Ca 濃度が低下した時に上皮小体から分泌され、腎臓での $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ の合成を促進する[33]。乾乳後期の飼料が低 DCAD 値の場合、 $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ が十二指腸からの Ca の吸収を促進し、低 Ca 血症の状態から回復するために要する時間は高 DCAD 値の場合に比較して早く、おおむね 15~24 時間と言われている[33]。対照群では分娩当日に $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}$ によって十二指腸からの Ca の吸収が促進されたものと推察された。

対照群と DFA 群の血中 OC, ucOC および NTx 濃度, OC/NTx 比, ucOC/OC 比, さらに尿中 Ca/Cre 比には群間および群内差は見られなかった。したがって、両群において、消化管吸収された Ca の多くは胎子へ移行したことが示唆された。

本章において、DFA 群の分娩予定 120 日前の血中 T-cho 濃度は、対照群と比較して有意な高値を示した。血中 T-Cho 濃度は総合的なエネルギーの摂取状況を反映し[16, 29], 泌乳日数, 泌乳量および採食量に影響を受けやすい[16, 64]。対照群および DFA 群における分娩予定 120 日前の泌乳日数はそれぞれ 308.75 ± 7.03 日および 278.13 ± 6.15 日, 1 日当たりの泌乳量はそれぞれ $40.3 \pm 0.5 \text{ kg}$ および $41.0 \pm 0.5 \text{ kg}$ であり, 差はなかった。採食量を反映するルーメンフィルスコア (RFS) [4]において, 分娩予定 120 日前の対照群と DFA 群のスコアはそれぞれ 3.50 ± 0.06 および 3.63 ± 0.06 で差はなかった。健常な泌乳牛の血中 T-

cho 濃度の基準範囲は 130~300 mg/dL[24]であり、両群の分娩予定 120 日前の血中 T-cho 濃度はその範囲内であった。したがって、本章の試験において、供試牛の群分けに大きな問題はなかったと考えられた。

結論として、泌乳後期から分娩まで長期間の DFAIII 給餌と乾乳後期飼料の DCAD 値調整の併用を行った本章の試験結果から、分娩予定 120 日前から 90 日前の泌乳後期の乳牛では飼料からの Ca 吸収が増加し、骨吸収が抑制され、骨形成が優位な状態になることが示唆された。分娩予定 90 日前以降では、消化管吸収された Ca の多くが胎子へ移行すると考えられた。さらに DFAIII の給餌によって、分娩当日に生体内で利用可能な Ca 量が増加し、血中 Ca 濃度の低下が緩和されることが推察された。

5. 小括

乳牛に対して泌乳後期から分娩まで長期の DFAIII 給餌と乾乳後期飼料の DCAD 値調整を行い、骨代謝および Ca 代謝に与える影響について検証した。分娩予定 120 日前~90 日前の DFA 群において血中 OC/NTx 比は有意に増加したため、DFAIII 摂取による Ca の吸収促進と骨吸収の抑制により、骨形成優位の状態になったと考えられた。分娩予定 90 日前以降、血中の骨代謝マーカー値に変化はないが、尿中 Ca/Cre 比は対照群でのみ有意に増加した。このことは Ca の乳への移行が減少し胎子への移行量が増加するこの時期において、尿への Ca 排出が増加したことが推察された。一方、DFA 群で尿中 Ca/Cre 比の変化がなかったことは、消化管吸収された Ca の多くが胎子へ移行したため、骨への移行量が減少したと考えられた。分娩当日の血中 Ca 濃度は両群ともに有意に低下したが、DFA 群の血中 Ca 濃度は対照群と比較して有意な高値を示した。すなわち、DFA 群では泌乳後期からの DFAIII 給餌と乾乳後期飼料の DCAD 値調整によって、分娩当日に生体内で利用可能な Ca 量が増加し、血中 Ca 濃度の低下が

緩和されたことが示唆された。

6. 図表

Table2：泌乳期TMR、乾乳期TMR、乾乳期配合およびチモシー乾草の化学組成

項目 ¹⁾	泌乳TMR	乾乳TMR	乾乳期配合	チモシー乾草
NDF	43.7	61.7	23.2	70.4
ADF	24.6	36.8	8.1	39.4
CP	17	9.7	20	11
EE	5.9	3.1	6	1.4
Ash	7.9	7.2	6.6	7.7
Ca	0.84	0.26	0.43	0.26
P	0.34	0.21	0.52	0.24
Mg	0.33	0.15	1	0.11
K	1.06	1.64	0.75	2.06
Na	0.35	0.01	0.19	0.02
Cl	0.33	0.44	0.33	0.43
S	0.11	0.08	0.32	0.07
DCAD (mEq/100 gDM)	26.22	25.09	-1.8	37.2

1) DCAD以外は全て (%DM)

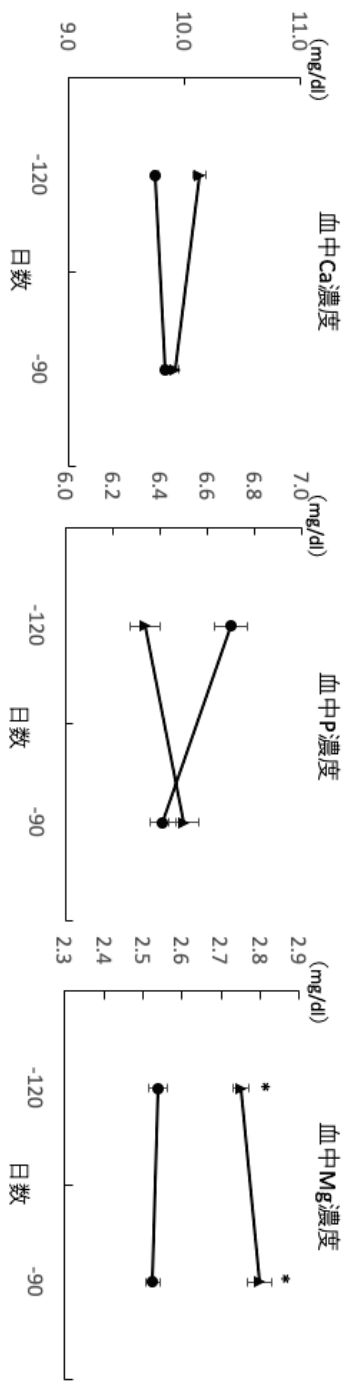


Fig2-1:分娩予定120日前から分娩予定90日前までの血中Ca濃度、P濃度およびMg濃度 (平均値±標準誤差) の推移
 DFA群 (▲: n=8)、対照群 (●: n=8)
 DFA群と対照群の群間差*: P<0.05

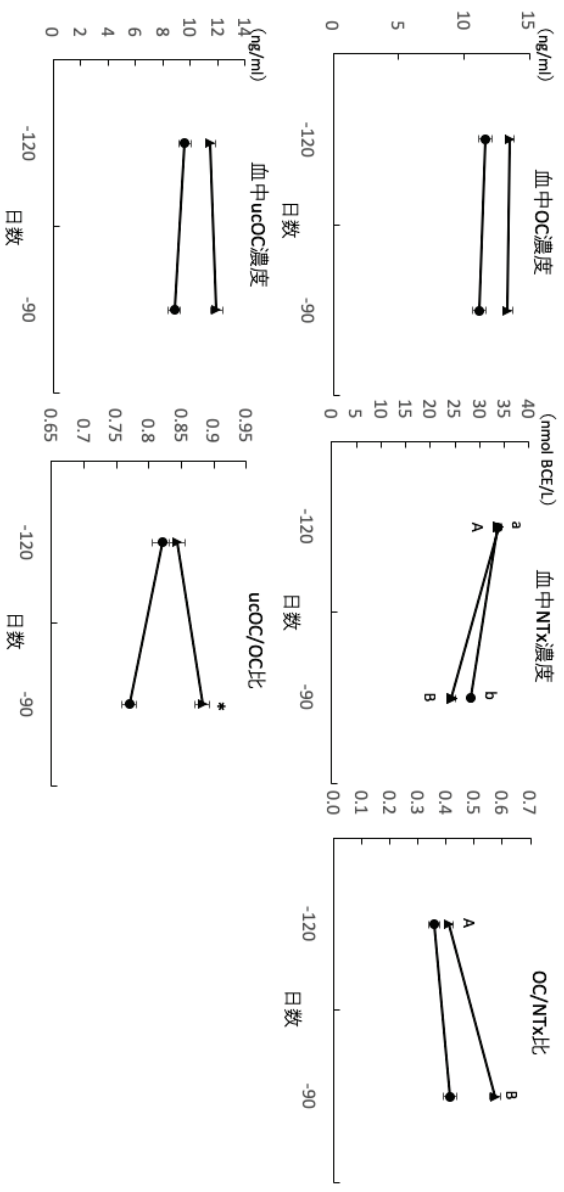


Fig2-2:分娩予定120日前から分娩予定90日前までの血中OC濃度、NTX濃度、OC/NTX比、uOC濃度およびuOC/OC比(平均値±標準誤差)の推移
 DFA群 (▲: n=8) の群内差 AB間: P<0.01
 対照群 (●: n=8) の群内差 ab間: P<0.05
 DFA群と対照群の群間差 *: P<0.05

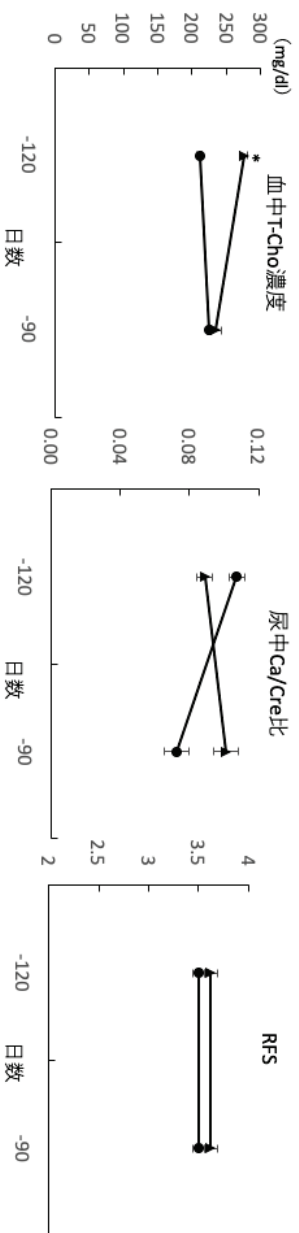
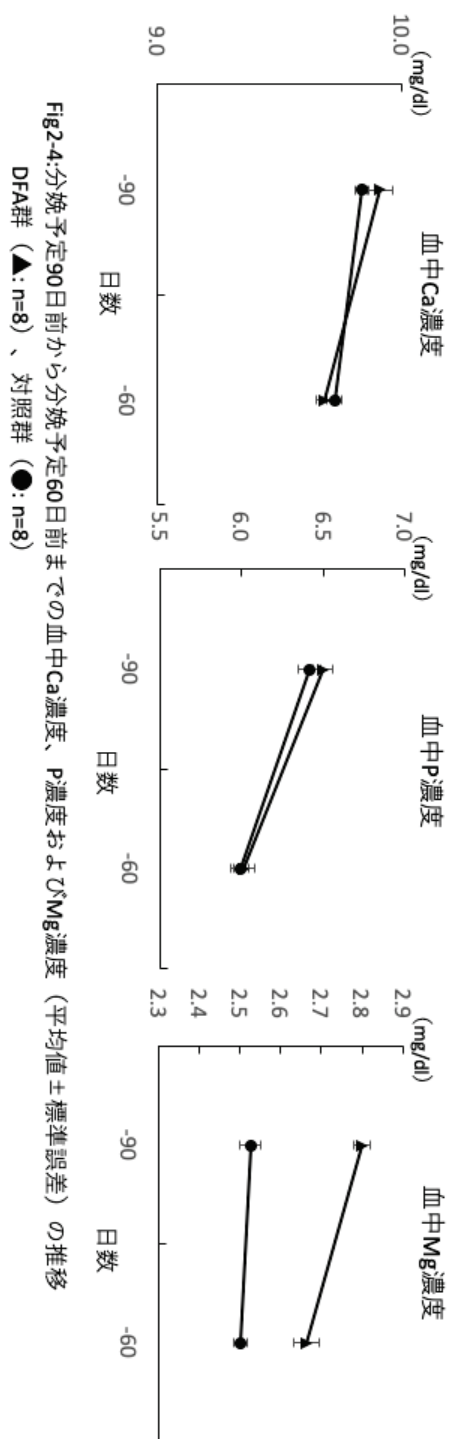


Fig2-3:分娩予定120日前から分娩予定90日前までの血中総コレステロール (T-Cho) 濃度、尿中Ca/Cr比およびRFRS (平均値±標準誤差) の推移
 DFA群 (▲: n=8) と対照群 (●: n=8) の群間差 *: $P < 0.01$



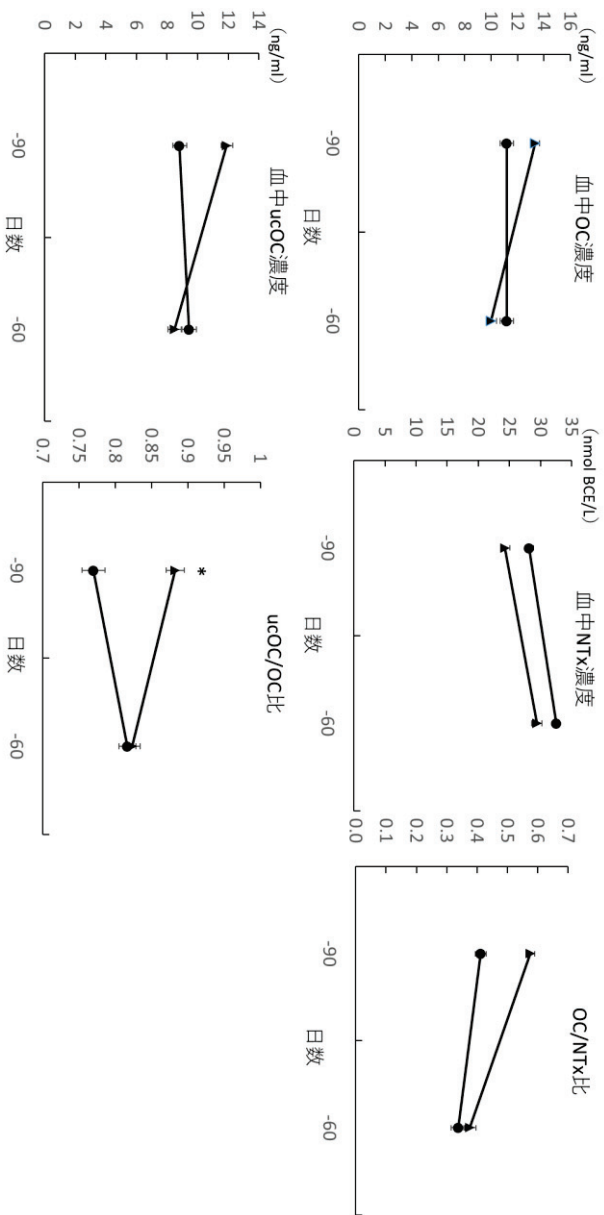


Fig2-5:分娩予定90日前から分娩予定60日前までの血中OC濃度、NTx濃度、OC/NTx比、uOC濃度およびuOC/OC比(平均値±標準誤差)の推移
 DFA群 (▲: n=8)、対照群 (●: n=8)
 DFA群と対照群の群間差*: P<0.05

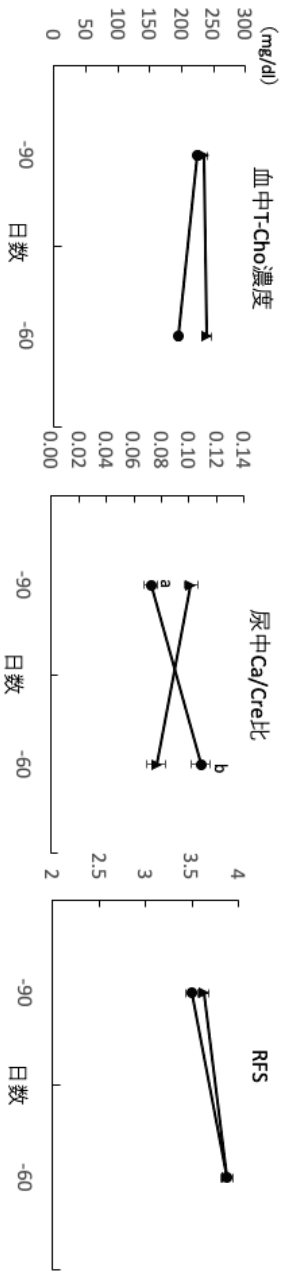


Fig2-6:分枝予定90日前から分枝予定60日前までの血中総コレステロール (T-Cho) 濃度、尿中Ca/Cre比およびRFS (平均値±標準誤差) の推移
 DFA群 (▲: n=8)、対照群 (●: n=8) の群内差ab間: $p < 0.05$

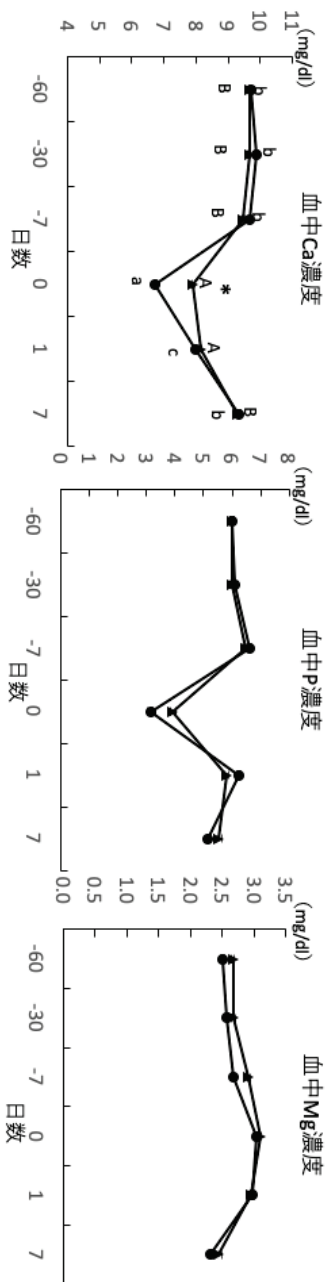


Fig2-7:分娩予定60日前から分娩7日後までの血中Ca濃度、P濃度およびMg濃度(平均値±標準誤差)の推移
 DFA群 (▲: n=8) の群内差 AB間: $P<0.001$
 対照群 (●: n=8) の群内差 abcの異なる文字間: $P<0.001$
 DFA群と対照群の群間差*: $P<0.01$

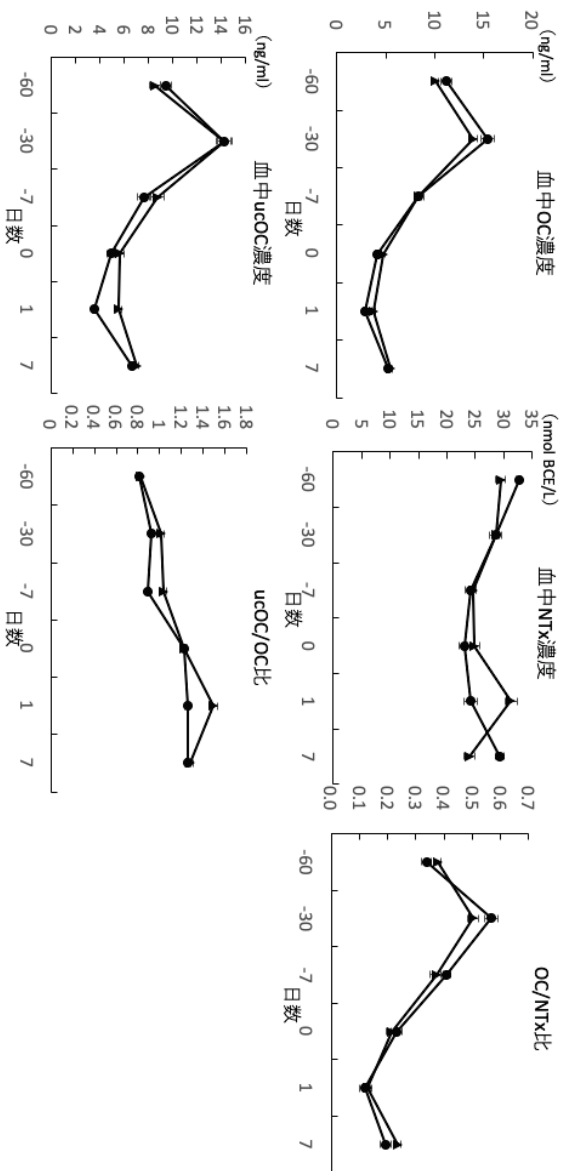


Fig2-8:分娩予定90日前から分娩予定60日前までの血中OC濃度、NTX濃度、OC/NTx比、uOC濃度およびuOC/OC比(平均値±標準誤差)の推移
 DFA群 (▲: n=8)、対照群 (●: n=8)

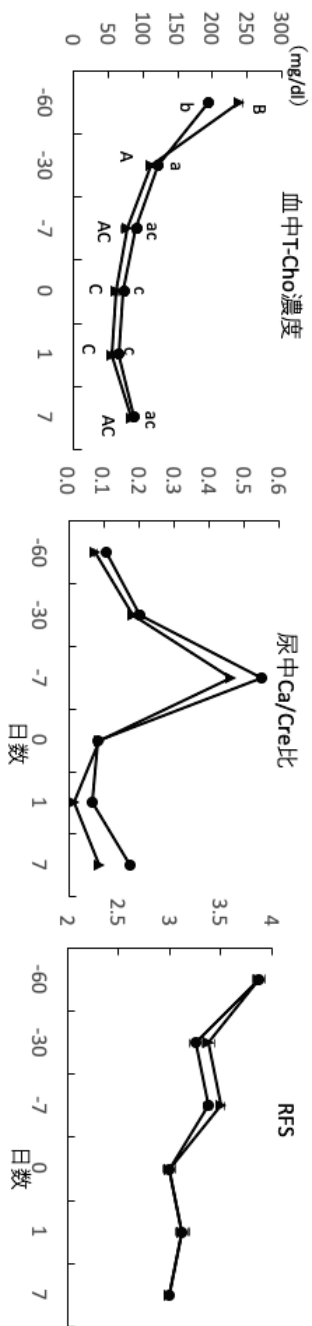


Fig2-9:分娩予定60日前から分娩7日後までの血中総コレステロール (T-Chol) 濃度、尿中Ca/Cr比およびRFS (平均値±標準誤差) の推移
 DFA群 (▲: n=8) の群内差 ABおよびBC間: $P<0.001$, AC間: $P<0.05$
 対照群 (●: n=8) の群内差 abおよびbc間: $P<0.001$, ac間: $P<0.05$

総括

乳牛では産次を重ねるごとに乳量は増加するが、骨密度は低下することが報告されている。これは、乳量が増加する泌乳初期では生体内の Ca 量が減少するが、消化管から吸収される Ca 量では補充が間に合わず、骨吸収によって補填することに起因する。一方、泌乳後期もしくは乾乳期では乳量が減少または停止することから、生体内の Ca 量が増加して骨形成が活性化する。したがって、乳牛の骨密度の低下を抑制するためには、泌乳後期から乾乳期にかけて Ca を供給することが一つの方法と考えられる。しかし、泌乳後期から分娩までの乳牛に長期間にわたり Ca を飼料添加し、骨密度、骨代謝ならびに Ca 代謝の面から検証した学術報告はほとんど見当たらない。

DFAIIIはフラクトース 2 分子が結合した難消化性のオリゴ糖であり小腸上皮細胞間隙の TJ に作用し、Ca の受動吸収を促進することで Ca の吸収率を増加させる。分娩前後の乳牛に対する DFAIII 給餌では、消化管からの受動輸送を伴う Ca 吸収が促進され、マウスでは DFAIII 給与と荷重を組み合わせることで骨密度が増加することが知られている。

本研究では、泌乳後期ならびに乾乳期に DFAIII を飼料添加した場合の骨ミネラルと骨代謝動態を明らかにするために、最初に泌乳後期牛に対する DFAIII 給餌が骨密度と骨代謝に与える影響について検討し、次に泌乳後期から分娩直後にかけて長期間にわたる乳牛への DFAIII 給餌が骨代謝および Ca 代謝に与える影響について検討した。得られた知見は以下の通りである。

1. 泌乳後期の乳牛に対する DFAIII 給餌が骨密度に与える影響

泌乳後期の乳牛に対して 28 日間継続的に DFAIII を給餌し、骨密度ならびに骨代謝へ及ぼす影響について検証した。DFA 給餌によって、28 日目に第 4 尾椎ならびに中手骨の骨密度の増加と血中 ucOC/OC 比の減少が認められたことから、骨の石灰化の促進による骨ミネラル増加が示唆された。また、DFAIII 給餌に

よって乳中 Ca 濃度が 28 日目に増加したことから、消化管吸収された Ca の多くが乳腺に排出されたことが示唆された。

2. 泌乳後期から分娩後までの乳牛に対する長期の DFAIII 給餌が骨および Ca 代謝に与える影響

乳牛に対して泌乳後期から分娩まで長期の DFAIII 給餌と乾乳後期飼料の DCAD 値調整を行い、骨代謝および Ca 代謝に与える影響について検証した。DFAIII の給餌によって分娩予定 120 日前～90 日前の血中 OC/NTx 比は有意に増加したため、Ca の消化管吸収の促進と骨吸収の抑制により、骨形成優位の状態になったと考えられた。分娩予定 90 日前以降、DFAIII 給餌では血中骨代謝マーカー値と尿中 Ca/Cre 比に変動はなかった。したがって、Ca の乳への移行が減少し胎子への移行量が増加するこの時期において、DFA 給餌で吸収促進された Ca の多くが胎子へ移行したことが示唆された。分娩当日の血中 Ca 濃度はすべての供試牛で低下したが、DFAIII 給餌した乳牛はその低下が軽度であった。これは泌乳後期からの DFAIII 給餌と乾乳後期飼料の DCAD 値調整により利用可能な Ca 量が増加したことで、分娩当日の血中 Ca 濃度の低下が緩和されたものと考えられた。

以上より、乳牛の泌乳後期から分娩直後にかけて DFAIII 飼料添加は泌乳や妊娠のステージにより骨や乳汁、胎子への Ca 供給を促し、さらに乾乳後期飼料の DCAD 値調整との併用によって分娩当日の血中 Ca 濃度の低下を緩和することが示唆された。とくに、泌乳後期における DFAIII の給餌は骨密度の増加を助長し、産次の増加に伴う骨密度低下を予防する可能性があることから、乳牛の長命連産に貢献する新しい飼養技術として期待される。

謝辞

本研究は筆者が岐阜大学大学院獣医学研究科博士課程において行った実験をまとめたものであり、全実験は帯広市内の一般酪農家にて実施させて頂きました。主指導教員である元帯広畜産大学教授（現大阪府立大学教授）・山岸則夫先生，第1副指導教員である帯広畜産大学准教授・松本高太郎先生ならびに元帯広畜産大学客員研究員・羽立薫博士には，終始，励ましと手厚いご指導・ご援助を賜りましたことに深く御礼申し上げます。また，帯広畜産大学教授・南保泰雄先生，岩手大学教授・木崎景一郎先生，東京農工大学教授・田中知己先生，岐阜大学教授・大場恵典先生には，本学位論文の完成のために大変有意義なご指導とご助言を賜り，厚く御礼申し上げます。最後に，本研究の機会を与えていただき，ご指導ご鞭撻を賜りました日本甜菜製糖株式会社総合研究所ならびに飼料事業部の皆様に心より深謝申し上げます。

引用文献

1. Allen, M. J. (2003). Biochemical markers of bone metabolism in animals: uses and limitations. *Vet. Clin. Pathol.* 32, 101 ~ 113.
2. Bhanugopan, M. S., Fulkerson, W. J., Fraser, D. R., Hyde, M. and McNeill, D. M. (2010). Carryover effects of potassium supplementation on calcium homeostasis in dairy cows at parturition. *J. Dairy Sci.* 93, 2119~2129.
3. Bronner, F. (1998). Calcium absorption—A paradigm for mineral absorption. *J. Nutr.* 128, 917~920.
4. Burfeind, O., Sepúlveda, P., von Keyserlingk, M. A. G., Weary, D. M., Veira, D. M. and Heuwieser, W. (2010). Technical note: Evaluation of a scoring system for rumen fill in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 93, 3635~3640.
5. Clark, J. H., Beede, D. K., Erdman, R. A., Goff, J. P., Grummer, R. R., Linn, J. G., Pell, A. N., Schwab, C. G., Tomkins, T., Varga, G. A. and Weiss, W. P. (2001). Vitamin K, *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th ed., pp. 168 ~169, National Academy Press, Washington, D.C.
6. Clark, J. H., Beede, D. K., Erdman, R. A., Goff, J. P., Grummer, R. R., Linn, J. G., Pell, A. N., Schwab, C. G., Tomkins, T., Varga, G. A. and Weiss, W. P. (2001). MILK FEVER RISK FACTORS, *Nutrient Requirements of Dairy Cattle*. 7th ed., pp. 106, National Academy Press, Washington, D.C.
7. Claude, P. (1978). Morphological factors influencing transepithelial permeability: A model for the resistance of the Zonula Occludens. *J. Memb. Biol.* 39, 219~232.
8. Cooper, G. W., Schwesinger, W. H., Ontjes, D. A., Mahgoub, A. M. and Munson, P. L. (1972). Stimulation of secretion of pig thyrocalcitonin by

- gastrin and related hormonal peptides. *Endocrinology* 91, 1079~1089.
9. Cosman, F., Herrington, B., Himmelstein, S. and Lindsay, R. (1991). Radiographic absorptiometry: a simple method for determination of bone mass. *Osteoporos. Int.* 2, 34~38.
 10. Cunniff, P. (1996). *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 16th ed., AOAC official methods 985.01, chapter 3, pp. 4, AOAC International, Arlington.
 11. Degaris, P. J., and Lean, I. J. (2009). Milk fever in dairy cows: A review of pathophysiology and control principles. *Vet. J.* 176, 58~69.
 12. Devkota, B., Takahashi, M., Sato, S., Sasaki, K., Ueki, A., Osawa, T., Takahashi, M. and Yamagishi, N. (2015). Plasma fluctuation in estradiol-17 β and bone resorption markers around parturition in dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 77, 875 ~ 878.
 13. Donald, E. T. (2012). *Textbook of Veterinary Diagnostic Radiology*, 6th ed., pp. 74~75, Elsevier Saunders, St. Louis.
 14. Ebbesen, E. N., Thomsen, J. S., Beck-Nielsen, H., Nepper-Rasmussen, H. J. and Mosekilde, L. (1999). Lumbar vertebral body compressive strength evaluated by dual-energy X-ray absorptiometry, quantitative computed tomography, and ashing. *Bone* 25, 713~724.
 15. Edmonson, A. J., Lean, I. J., Weaver, L. D., Farver, T. and Webster, G. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* 72, 68~78.
 16. 江口理香, 山岸則夫, 李仁炯, 大星健治, 高木光博, 中川昭 (2005). 乳牛の移行期における臨床検査成績とその後の繁殖成績との関係, *家畜臨床誌*. 28, 34~41.

17. Goff, J. P. and Horst, R. L. (1997). Effects of the addition of potassium or sodium, but not calcium, to prepartum ratios on milk fever in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80, 176~186.
18. Goff, J. P., Horst, R. L. Mueller, F. J. Miller, J. K. Kiess, G. A. and Dowlen, H. H. (1991). Addition of chloride to a prepartal diet high in cations increases 1,25dihydroxyvitamin D response to hypocalcemia preventing milk fever. *J. Dairy Sci.* 74, 3863~3871.
19. Hernandez, C. J., Beaupré, G. S. and Carter, D. R. (2003). A theoretical analysis of the relative influences of peak BMD, age-related bone loss and menopause on the development of osteoporosis. *Osteoporos. Int.* 14, 843~847.
20. Hirao, M., Hashimoto, J., Ando, W., Ono, T. and Yoshikawa, H. (2008). Response of serum carboxylated and undercarboxylated osteocalcin to alendronate monotherapy and combined therapy with vitamin K2 in postmenopausal women. *J. Bone Miner. Metab.* 26, 260~264.
21. Holmberg, T., Berglund, B., Ral, G. and Ahman, B. (1985). Long term studies on bone mineral changes during different lactations in Swedish dairy cattle. *Acta Vet. Scand.* 26, 49~60.
22. House, W. A. and Bell, A. W. (1993). Mineral accretion in the fetus and adnexa during late gestation in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 76, 2999~3010.
23. Horst, R. L., Goff, J. P. and Reinhardt, T. A. (1990). Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor. *Endocrinology* 126, 1053~1057.
24. 猪熊壽, 北川均, 内藤善久 (2014). 獣医内科学—大動物編—. 佐藤繁 臨床

検査項目の基準範囲, 第2版 pp.388. 文永堂出版, 東京

25. John, P. B., Lawrence, G. R. and Gideon, A. R. (2002). Basic Principles. Principles of Bone Biology, 2nd ed., pp. 352, Academic Press, San Diego.
26. Keene, B. E., Knowlton, K. F., McGilliard, M. L., Lawrence, L. A., Nickols-Richardson, S. M., Wilson, J. H., Rutledge, A. M., McDowell, L. R. and Van Amburgh, M. E. (2004). Measures of bone mineral content in mature dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 3816~3825.
27. Kikuchi, H., Nagura, T., Inoue, M., Kishida, T., Sakurai, H., Yokota, A., Asano, K., Tomita, F., Sayama, K. and Senba, Y. (2004). Physical, chemical and physiological properties of difructose anhydride III produced from inulin by enzymatic reaction. *J. Appl. Glycosci.* 51, 291~296.
28. Kim, S. M., Kim, K. M., Kim, B. T., Joo, N. S., Kim, K. N. and Lee, D. J. (2010). Correlation of undercarboxylated osteocalcin (ucOC) concentration and bone density with age in healthy Korean women. *J. Korean Med. Sci.* 25, 1171-1175.
29. Kronfeld, D.S., Donoghue, S., Copp, R. L., Stearns, F. M. and Engle, R.H. (1982). Nutritional status of dairy cows indicated by analysis of blood. *J. Dairy Sci.* 65, 1925~1933.
30. Kurosaki, N., Yamato, O., Mori, F., Imoto, S. and Maede, Y. (2007). Preventive effect of mildly altering dietary cation-anion difference on milk fever in dairy cows. *J. Vet Med Sci.* 69, 185~192.
31. Kurosaki, N., Yamato, O., Sato, J., Naito, Y., Mori, F., Imoto, S. and Maede, Y. (2007). Biomarkers for the activation of calcium metabolism in dairy cows: elevation of tartrate – resistant acid phosphatase activity by lowering dietary cation – anion difference is associated with prevention of

- milk fever. *J. Vet Med Sci.* 69, 265~270.
32. Liesegang, A., Eicher, R., Sassi, M. L., Risteli, J., Kraenzlin, M., Riond, J. L. and Wanner, M. (2000). Biochemical markers of bone formation and resorption around parturition and during lactation in dairy cows with high and low standard milk yields. *J. Dairy Sci.* 83, 1773~1781.
33. Littledike, E. T. and Goff, J. (1987). Interactions of calcium, phosphorus, magnesium and vitamin D that influence their status in domestic meat animals. *J. Anim. Sci.* 65, 1727~1743.
34. Maetani, A., Itoh, M., Nishihara, K., Aoki, T., Ohtani, M., Shibano, K., Kayano, M. and Yamada, K. (2016). Experimental assessment of bone mineral density using quantitative computed tomography in holstein dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 78, 1209~1211.
35. Matsumoto, D., Takagi, M., Hasunuma, H., Fushimi, Y., Ohtani, M., Sato, T., Okamoto, K., Shahada, F., Tanaka, T. and Deguchi, E. (2009). Effects of oral administration of difructose anhydride III on selected health and blood parameters of group-housed japanese black calves during the preweaning period. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22, 1640~1647.
36. Matsuo, A., Togashi, A., Sasaki, K., Devkota, B., Hirata, T. and Yamagishi, N. (2014). Diurnal variation of plasma bone markers in Japanese black calves. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 1029~1032.
37. Minamida, K., Asakawa, C., Sujaya, I. N., Kaneko, M., Abe, A., Sone, T., Hara, H., Asano, K. and Tomita, F. (2006). Effects of long-term ingestion of difructose anhydride III (DFA III) on intestinal bacteria and bile acid metabolism in humans. *J. Biosci. Bioeng.* 101, 149~156.
38. Minamida, K., Kaneko, M., Ohashi, M., Sujaya, I. N., Sone, T., Wada, M.,

- Yokota, A., Hara, H., Asano, K. and Tomita, F. (2005). Effect of difructose anhydride III (DFA III) administration on bile acid and growth of DFA III-assimilating bacterium *Ruminococcus productus* on rat intestine. *J. Biosci. Bioeng.* 99, 548~554.
39. Mitamura, R. and Hara, H. (2005). Prolonged feeding of difructose anhydride III increases strength and mineral concentrations of the femur in ovariectomized rats. *Br. J. Nutr.* 94, 268~274.
40. Nagata, Y., Inaba, M., Imanishi, Y., Okazaki, H., Yamada, S., Mori, K., Shoji, S., Koyama, H. and Okuno, S. (2015). Increased undercarboxylated osteocalcin/intact osteocalcin ratio in patients undergoing hemodialysis. *Osteoporos. Int.* 26, 1053~1061.
41. 中井朋一, 村田暁, 菊地裕人, 佐藤忠, 佐渡谷裕朗, 大谷昌之, 花田正明, 岡本明治 (2007). 去勢牛に給与した Difructose Anhydride III の十二指腸内容物中における検出, *日本畜産学会報.* 78, 57~61.
42. Pastoureau, P., Vergnaud, P., Meunier, P.J. and Delmas, P. D. (1993). Osteopenia and bone-remodeling abnormalities in warfarin-treated lambs. *J. Bone Miner. Res.* 8, 1417~1426.
43. Price, P. A., Poser, J. W. and Raman, N. (1976). Primary structure of the gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bovine bone. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 3374~3375.
44. Price, P. A., Williamson, M. K. and Lothringer, J. W. (1981). Origin of the vitamin K-dependent bone protein found in plasma and its clearance by kidney and bone. *J. Biol. Chem.* 256, 12760~12766.
45. Ramberg, C. F. Jr., Johnson, E. K., Fargo, R. D. and Kronfeld, D. S. (1984). Calcium homeostasis in cows, with special reference to parturient

- hypocalcemia. *Am. J. Physiol.* 246, R698~R704.
46. Ramberg, C. F. Jr., Mayer, G. P., Kronfeld, D. S., Phang, J. M. and Berman, M. (1970). Calcium kinetics in cows during late pregnancy, parturition, and early lactation. *Am. J. Physiol.* 219, 1166~1177.
47. Rissanen, J. P., Suominen, M. I., Peng, Z. and Halleen, J. M. (2008). Secreted tartrate-resistant acid phosphatase 5b is a marker of osteoclast number in human osteoclast cultures and the rat ovariectomy model. *Calcif. Tissue Int.* 82, 108~115.
48. Rodríguez, E. M., Bach, A., Devant, M. and Aris, A. (2016). Is calcitonin an active hormone in the onset and prevention of hypocalcemia in dairy cattle? *J. Dairy Sci.* 99, 3023~3030.
49. Sakurai, H., Yokota, A., Sumita, Y., Mori, Y., Matsui, H. and Tomita, F. (1997). Metabolism of DFA III by *Arthrobacter* sp. H65-7: purification and properties of a DFA III hydrolysis enzyme (DFA IIIase). *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 989~993.
50. Sato, R., Onda, K., Kato, H., Ochiai, H., Kawai, K., Iriki, T., Kaneko, K., Yamazaki, Y. and Wada, Y. (2013). An evaluation of the effect of age and the peri-parturient period on bone metabolism in dairy cows as measured by serum bone-specific alkaline phosphatase activity and urinary deoxypyridinoline concentration. *Vet. J.* 197, 358~362.
51. Sato, T., Hanada, M., Ohtani, M., Nakai, T., Teramura, M., Sadoya, H., Takahashi, T. and Hongo, A. (2012). Effect of difructose anhydride III on serum immunoglobulin G concentration in newborn calves. *J. Dairy Sci.* 95, 5336~5339.
52. Sato, T., Kikuchi, H., Nakai, T., Sadoya, H., Hanada, M. and Okamoto, M.

- (2006). Effect of ruminal bacteria on degradability of difructose anhydride III. *Nihon Chikusan Gakkaiho* 77, 395~399.
53. Shiga, K., Hara, H., Okano, G., Ito, M., Minami, A. and Tomita, F. (2003). Ingestion of difructose anhydride III and voluntary running exercise independently increase femoral and tibial bone mineral density and bone strength with increasing calcium absorption in rats. *J. Nutr.* 133, 4207~4211.
54. Suzuki, T., Hara, H., Kasai, T. and Tomita, F. (1998). Effects of difructose anhydride III on calcium absorption in small and large intestines of rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 62, 837~841.
55. Suzuki, T. and Hara, H. (2006). Difructose anhydride III and sodium caprate activate paracellular transport via different intracellular events in Caco-2 cells. *Life Sci.* 79, 401~410.
56. Takagi, M., Hasunuma, H., Matsumoto, D., Obi, T., Takase, K., Ohtani, M., Sato, T., Watanabe, U., Okamoto, K., Tanaka, T., Tshering, C. and Deguchi, E. (2011). Effect of daily oral administration of difructose anhydride III on health status, blood parameters and faecal shedding of coliform bacteria of Japanese black calves during the preweaning period. *Animal Nutrition and Feed Technology* 11, 147~158.
57. Takamoto, S., Seino, Y., Sacktor, B. C. and Liang, T. (1990). Effect of age on duodenal 1,25-dihydroxyvitamin D-3 receptors in Wistar rats. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1034, 22~28.
58. Taylor, M. S., Knowlton, K. F., McGilliard, M. L., Swecker, W. S., Ferguson, J. D., Wu, Z. and Hanigan, M. D. (2009). Dietary calcium has little effect on mineral balance and bone mineral metabolism through twenty weeks

- of lactation in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 92, 223~237.
59. Teramura, M., Nakai, T., Itoh, M., Sato, T., Ohtani, M., Kawashima, C. and Hanada, M. (2015). Difructose anhydride (DFA) III promotes calcium absorption from the duodenum in cattle. *J. Dairy Sci.* 98, 2533~2538.
60. Teramura, M., Wynn, S., Reshalaitihan, M., Kyuno, W., Sato, T., Ohtani, M., Kawashima, C. and Hanada, M. (2015). Supplementation with difructose anhydride III promotes passive calcium absorption in the small intestine immediately after calving in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 98, 8688~8697.
61. Tverberg, L. A., Gustafson, M. F., Scott, T. L., Arzumanova, I. V., Provost, E. R., Yan, A. W. and Rawie, S. A. (2000). Induction of calcitonin and calcitonin receptor expression in rat mammary tissue during pregnancy. *Endocrinology* 141, 3696~3702.
62. Vaccaro, C., Busetto, R., Bernardini, D., Anselmi, C. and Zotti, A. (2012). Accuracy and precision of computer-assisted analysis of bone density via conventional and digital radiography in relation to dual-energy x-ray absorptiometry. *Am. J. Vet. Res.* 73, 381~384.
63. Van Mosel, M., Van't Klooster, A. T. and Wouterse, H. S. (1991). Effects of a deficient magnesium supply during the dry period on bone turnover of dairy cows at parturition. *Vet. Q.* 13, 199~208.
64. 山田恭嗣, 中尾敏彦, 園中篤, 南繁, 宮野正章, 中尾茂, 森好政晴, 河田啓一郎. (1994). 乳牛の栄養状態と周産期疾病および受胎成績, *日獣会誌.* 47, 322~326.
65. Yamagishi, N., Takehana, K., Kim, D., Miura, M., Hirata, T., Devkota, B., Sato, S. and Furuhashi, K. (2009). Fluorometric method for measuring

- plasma tartrate-resistant acid phosphatase isoform 5b and its application in cattle. *J. Vet. Med. Sci.* 71, 1637~1642.
66. Wilson, A. N., Schmid, M. J., Marx, D. B. and Reinhardt, R. A. (2003). Bone turnover markers in serum and periodontal microenvironments. *J. Periodont. Res.* 355, 355~361.
67. Zetterholm, R. (1978). Bone mineral changes in growing, pregnant and lactating cattle. *Acta Vet. Scand.* 19, 18~29.