



Title	丸大豆しょうゆ醸造副産物“しょうゆ油”の乳牛用飼料としての評価
Author(s)	昆野, 大次
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13927号
Issue Date	2020-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13927
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77868
Type	doctoral thesis
File Information	Daiji_konno.pdf



丸大豆しょうゆ醸造副産物“しょうゆ油”の
乳牛用飼料としての評価

北海道大学 大学院農学院
生物資源科学専攻 博士後期課程

昆野 大次

目次

第Ⅰ章	緒言	1
第Ⅱ章	泌乳牛におけるしょうゆ油の ルーメン内大量・長期投与による影響〔試験 1〕	5
1.	目的	5
2.	材料と方法	5
3.	結果	9
4.	考察	21
第Ⅲ章	泌乳牛におけるしょうゆ油のルーメン内投与量の 違いによる影響〔試験 2〕	25
1.	目的	25
2.	材料と方法	25
3.	結果	28
4.	考察	38
第Ⅳ章	乳牛におけるしょうゆ油の経口摂取による影響	41
Ⅳ-1	泌乳牛におけるしょうゆ油の 経口摂取による影響〔試験 3〕	41
1.	目的	41
2.	材料と方法	41
3.	結果	44

4. 考察	53
IV-2 しょうゆ油の摂取が	
成分消化率におよぼす影響〔試験 4〕	56
1. 目的	56
2. 材料と方法	56
3. 結果	58
4. 考察	59
第 V 章 総合考察	61
摘要	66
謝辞	69
引用文献	70

第 I 章 緒言

乳牛の泌乳能力は育種改良、飼養管理技術の向上により高まり、2018 年における 1 頭あたり乳量 (9,626 kg) は 1975 年の約 1.5 倍に増加している (年間検定成績、北海道酪農検定検査協会)。泌乳能力の向上により、泌乳初期には栄養を充足できず負のエネルギーバランスになりやすく、その程度が大きく、期間が長くなると、繁殖成績に影響しその後の生産性に大きく影響する (Butler と Smith 1989 ; Britt 1992)。泌乳量の増加に伴い乳牛の栄養要求量も高まるが、それを充足させるには乾物摂取量 (DMI) を高め、飼料中の濃厚飼料割合を高める方法が考えられる。しかしながら、乳牛の飼料摂取量には物理的な上限があること、また反芻動物である乳牛には一定割合の粗飼料給与が必須であることから、エネルギー充足を図るためには飼料構成を工夫する必要がある。エネルギー摂取量を高める方法として、次に考えられるのは油脂の給与である。油脂のエネルギー含量は他の栄養素に比べて大きく、ルーメン内微生物のエネルギー源とはならないことから、乳牛のエネルギー摂取量を高めるうえで油脂の給与は非常に効果的と考えられるが、その油脂源の多くは食用油脂と競合する。

しょうゆ油は、丸大豆しょうゆの製造副産物であり、丸大豆しょうゆのもろみを圧搾後に分離された油脂分画である。しょうゆ油の脂肪酸組成はミスチリン酸 (C14:0) 0.1%、パルミチン酸 (C16:0) 16.3%、パルミトレイン酸 (C16:1) 0.3%、ステアリン酸 (C18:0) 3.7%、オレイン酸 (C18:1) 20.6%、リノール酸 (C18:2) 54.8%、リノレン酸 (C18:3)

4.2%（田淵と野崎 2011）と大豆油に類似し（Sultana ら 2008；日本食品標準成分表 2015）主にリノール酸で構成される。Shibata ら（2011）によるしょうゆ油の乳牛への利用に関する研究以前は、しょうゆ油の大部分は重油の代替として利用されてきた。Shibata ら（2011）は、乳牛にしょうゆ油 400g /d 給与により、ルーメン内の総揮発性脂肪酸（VFA）濃度および乳脂肪率は低下するものの、DMI に影響することなく、乳脂肪中の *cis*-9 *trans*-11 共役リノール酸（CLA）割合は増加することを示した（以後、特に明記しない限り CLA は *cis*-9 *trans*-11 CLA を意味する）。これらの結果は、しょうゆ油には生乳中の CLA を高める作用があることを示唆している。しかしながら、Shibata ら（2011）は、しょうゆ油の給与量を一水準として研究を実施しており、最適な給与水準は実験的に明らかにされていない。

CLA は反芻動物由来の食品に比較的多く含まれる（O'Shes ら 1998）。CLA はルーメン微生物の水素添加によってリノール酸から生成され（Jenkins 1993）、生成された CLA はルーメンから流出し、下部消化管において吸収され最終的には牛乳中に移行する（Kepler と Tove 1967）。また、CLA 生成には、水素添加過程における中間物質の一つである *trans*-11 オクタデカン酸（バクセン酸）が乳腺組織において CLA へと変換される経路もある（Griinari ら 2000）。乳中脂肪酸、特に CLA の生理学的重要性については 2000 年代初頭から取り組みが強化された（Lock と Bauman 2004）。CLA は抗動脈硬化、抗肥満および抗発癌性作用（Parodi 1997；Chilliard ら 2001）などの機能性を有するため、適

切に摂取されるならば人間の健康に良い影響をもたらす可能性がある。

乳中の CLA は主にリノール酸とその代謝産物に由来するので、CLA 含量の高い生乳を生産するには、CLA の前駆体となる脂肪酸を供給することが主要な問題となる。乳中 CLA 含量はエクストルード大豆 (Chouinard ら 2001)、加熱大豆 (Dhiman ら 2000)、大豆油 (Rodrigues ら 2017) の給与、および放牧 (Kelly ら 1998) で高まることが報告されており、これらは全てリノール酸供給源である。同様にリノール酸割合の高いしょうゆ油の乳牛への給与により、生乳中 CLA 割合は高まる可能性が考えられる。すなわち、本未利用油脂素材の乳牛用飼料としての有効利用により、乳牛生体内での CLA 生成量を高め、生産物である生乳の付加価値を高める可能性がある。加えて、しょうゆ油は安価なエネルギー飼料源となるだけでなく、その飼料化が推進されれば、資源循環だけでなく飼料自給率の向上、飼料費の低減も期待できる。

しかしながら、油脂の給与とルーメン内微生物の水素添加 (Sklan と Budowski 1974)、およびルーメン内発酵に及ぼす影響について (Doreau ら 1991 ; Bateman と Jenkins 1998 ; Avila ら 2000) 検討がなされ、油脂の給与は腸管ホルモンの分泌、肝臓における脂肪の酸化の減少 (Allen 2000)、ルーメン内発酵の抑制 (Chalupa ら 1984; 1986)、繊維消化率の低下 (Palmquist と Jenkins 1980) によって、DMI に負の影響を及ぼす可能性があることが指摘されている。さらに、脂質の消化性は、脂質摂取量が大きくなると低下し (Weisbjerg ら 1992; Palmquist 1991)、非保護脂肪 (ルーメン内代謝を受けないように特別の保護処理がされて

いない脂肪)の給与量増加は、十二指腸の不飽和脂肪酸流量を増加させ (Jenkins と Bridges 2007)、脂肪酸の小腸における吸収量は十二指腸流量の一次関数で表され (Glasser ら 2008)、十二指腸流量は様々な脂肪酸の消化率に負の影響を及ぼす (Boerman ら 2015)。また、特定の長鎖脂肪酸の小腸における吸収が乳脂肪率に影響する可能性が指摘されており (Moate ら 2004)、遊離の不飽和脂肪酸やエステル化した不飽和脂肪酸の摂取量が増加すると乳脂肪率が低下する可能性があるので、飼料中のエーテル抽出物 (EE) 含量は 6~7%未満とすべきとされる (NRC 2001)。それゆえ、乳牛へ油脂を正しく適用するには、その給与量が重要な検討事項となる。

以上の観点から本研究では、乳牛用の油脂飼料源としてしょうゆ油の利用について多角的に検討した。第Ⅱ章では、しょうゆ油のルーメン内大量 (1 kg /d) かつ長期間投与 (6 weeks) が乳牛の飼料摂取量、ルーメン内発酵、血液パラメーター、乳量、および乳成分に及ぼす影響について検討した。第Ⅲ章では、しょうゆ油の最適な給与量を明らかにするために、乳牛のルーメン内へのしょうゆ油投与量を 4 水準設けた試験を実施し、投与量の違いが DMI、ルーメン内発酵、および乳生産に及ぼす影響について検討した。第Ⅳ章では、脂肪酸組成の類似するしょうゆ油あるいは大豆油の給与が飼料摂取量、ルーメン内発酵および乳生産、さらに飼料の成分消化率に及ぼす影響について比較検討した。

第Ⅱ章 泌乳牛におけるしょうゆ油のルーメン内大量・長期投与による 影響 [試験 1]

1. 目的

油脂の給与はルーメン内発酵を阻害する可能性が高いとされるが、しょうゆ油の影響については明らかではない。本章では、しょうゆ油の飼料特性を明らかにするため、泌乳牛のルーメンへの大量、長期投与が、飼料摂取量、ルーメン内発酵、および乳生産に及ぼす影響について検討した成果について論述する。

2. 材料と方法

供試家畜と飼料

本動物実験は、地方独立行政法人北海道立総合研究機構動物実験指針に基づいて行った。

ルーメンに内径 10 cm のソフトプラスチック製カニューレ (Bar Diamond Inc., Parma, ID, USA) を装着したホルスタイン種初産泌乳牛 4 頭 (体重 587 ± 93 kg、分娩後日数 213 ± 23 日) を 56 日間の飼養試験に供試した。乾物ベースで、牧草サイレージ 75.4%、とうもろこし 13.7%、大豆粕 9.9%、炭酸カルシウム 0.7%、第二リン酸カルシウム 0.3% からなる混合飼料 (TMR) を給与した (Table 1)。原物での飼料設計のために、牧草サイレージの乾物率を週 1 回測定した。TMR は不断給餌とし、予想摂取量の約 110% 量を 1 日 1 回 (10.00 h) 給与し、給与量と残食量を毎

日記録した。乳牛はおが屑を敷いたゴムマットのタイストールで飼養した。新鮮水を常時飲水可能とした。1日2回搾乳し（09.00と19.00 h）、乳量を毎搾乳時に記録した。飼養試験期間中、1週間毎に体重を計測した。

試験処理として、試験8日目から49日目にかけて、総摂取飼料乾物中のEE含量が約10%となるように、しょうゆ油（Meiji Feed Co. Ltd., Tokyo, Japan）1 kg/d をカニューレ経由で乳牛のルーメン内に直接投与した。しょうゆ油は1日2回（08.30と17.30 h）、1日量の半量を投与した。したがって、朝のしょうゆ油投与はTMR給与の1.5時間前に行った。試験の初めの7日間と終わりの7日間は、しょうゆ油を投与せず、投与前および投与後の期間とした。

Table 1. Formulation and chemical composition of the experimental total mixed ration

Proportion (% of dry matter)	
Grass silage	75.4
Corn	13.7
Soybean meal	9.9
Calcium carbonate	0.7
Dicalcium phosphate	0.3
Chemical composition (% of dry matter)	
Crude protein	17.3
Ether extract	3.4
Neutral detergent fiber	47.3
Non fiber carbohydrate [†]	22.5
Total digestible nutrients	64.5

[†]: Organic matter - (Crude protein + Ether extract + Neutral detergent fiber)

採材

牛乳サンプルは試験の 2、5、8、28、30、37、44、51、および 54 日目に採取し、長鎖脂肪酸分析のため、プラスチックチューブに移し -30°C で保存した。ルーメン内容液と血液試料は、ルーメンカニューレと尾静脈経由で、試験の 5、6、8、9、11、13、16、19、23、26、30、37、44、51 および 54 日目の 08.00 h に採取した。加えて、ルーメン内発酵パラメーターの日内変動を測定するため、試験 39 日目に、ルーメン内容液を朝のしょうゆ油投与 -0.5 、 0 、 0.5 、 1 、 2 、 3 、 4 、 5 、 6 、 7 、 8 、および 9 時間後に採取した。

ルーメン背囊と腹囊から手で内容物を採材後、内容物を混合し 4 重にした医療用ガーゼでろ過し、プラスチックバイアルにろ液を得た。ろ液の pH をガラス電極 pH メーター (HM-50G, TOA-DKK, Tokyo, Japan) で計測し、後の分析まで -30°C で保存した。血液試料は遠心分離により血清を得て、後の分析まで -30°C で保存した。

牧草サイレージ、とうもろこし、および大豆粕の飼料サンプルは週 1 回採材し、乾物率を計測するため 60°C の通風乾燥機で 48 時間乾燥した。乾燥した飼料サンプルは、1 mm メッシュのカッティングミルで粉碎し、化学分析に供した。

化学分析および統計分析

飼料サンプルは、常法 (NARO 2009) により、DM、粗タンパク質 (CP)、粗脂肪 (EE)、中性デタージェント繊維 (NDF) を分析した。

乳試料は、フーリエ変換赤外分析型乳成分測定装置 (Milko-Scan FT120; Foss Electric, Hillerod, Denmark) により、脂肪、乳タンパク質、乳糖を分析した。

ルーメン内容液および血清の凍結試料は 4℃ で解凍し、分析に供した。アンモニア態窒素はインドフェノール法 (Weatherburn 1967) で分析した。VFA は内部標準としてクロトン酸を用い、ガスクロマトグラフ (GC-14B; Shimadzu Co., Kyoto, Japan) で分析した (Suto 1973)。脂肪酸の分析は、Aii ら (1988) の方法を一部変更した方法で、脂肪酸を脂肪酸メチルエステル (FAME) へ変換後に分析した。すなわち、ヘキサンで乳脂肪を抽出した後、Christie (1982) の方法に従ったトランスメチル化により FAME を得た。メチルエステル化した試料を、シリカキャピラリーカラム (SP-2560, 100 m × 0.25 mm (i.d.) with 0.20 μm film thickness; Spelco, Bellefonte, PA, USA) を用い、水素炎イオン化検出器を装着したガスクロマトグラフ (GC-14B; Shimadzu Co., Kyoto, Japan) で分析した。血清の生化学分析は、自動生化学分析装置 (SYNCHRON CX5, Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) を用いて行った。

データは平均し、各週の代表値として示した (すなわち、week 1 から week 8 と示されるデータは、対応する週に得られた全データの平均値である)。全てのデータについて、JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用い、対応のある t 検定として分析した。 $P < 0.05$ を有意と定義した。

3. 結果

Table 2 にしょうゆ油のルーメン内投与が試験期間中の栄養摂取量におよぼす影響について示す。総 DMI は、しょうゆ油投与による影響を受けず、12.9～14.0 kg/d の範囲であった。しょうゆ油投与により、総 DMI 中の EE、総可消化養分総量 (TDN) 摂取量は増加したが、総 DMI 中の牧草サイレージ割合、CP 割合は低下した。

Table 2. Effect of ruminal administration of soy sauce oil on nutrient intake in dairy cows

	Week of experiment [†]								SE ^{††}
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Dry matter intake, kg	13.9	14.0	12.9	13.0	13.9	14.0	13.7	13.6	0.21
Grass silage / dry matter intake, %	75.4	70.0 *	69.5 *	69.5 *	69.9 *	70.0 *	69.9 *	75.4	0.45
Ether extract / dry matter intake, %	3.3	10.2 *	10.8 *	11.0 *	10.6 *	10.4 *	10.6 *	3.5	0.57
Crude protein / dry matter intake, %	17.0	15.8 *	15.7 *	15.9 *	16.4 *	16.4 *	16.4 *	17.7	0.11
Total digestible nutrient / dry matter intake, %	64.5	75.0 *	75.9 *	75.8 *	75.1 *	75.0 *	75.2 *	64.5	0.87

[†] : Administration period of soy sauce oil is from 2 to 7 week.

^{††} : Pooled standard error.

* : Significantly different from the value in 1st week ($P < 0.05$).

乳量および乳成分を Table 3 に示す。乳量はしょうゆ油投与による影響を受けず、19.3～20.8 kg/d の範囲であった。しかし、しょうゆ油投与により乳脂肪率は低下し、それにともない 4%脂肪補正乳量（FCM）も低下し、これら低下はしょうゆ油の投与を停止した試験 8 週目も持続した。乳タンパク質、乳糖、および無脂固形分含量は、しょうゆ油のルーメン内投与による影響を受けなかった。

Table 3. Effect of ruminal administration of soy sauce oil on milk yield and composition in dairy cows

	Week of experiment [†]								SE ^{††}
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Milk yield, kg / d	20.8	20.8	19.7	19.3	20.4	20.0	19.9	19.5	0.43
4% fat corrected milk, kg / d	21.4	21.7	18.9 *	17.3 *	17.3 *	16.9 *	17.1 *	17.2 *	0.54
Fat, %	4.21	4.29	3.73 *	3.31 *	2.95 *	2.97 *	3.04 *	3.22 *	0.10
Protein, %	3.23	3.12	3.12	3.08	2.99	3.00	2.98	3.00	0.04
Lactose, %	4.31	4.34	4.30	4.28	4.27	4.31	4.33	4.33	0.02
Solid non fat, %	8.46	8.45	8.43	8.36	8.23	8.28	8.30	8.31	0.05

[†] : Administration period of soy sauce oil is from 2 to 7 week.

^{††} : Pooled standard error.

* : Significantly different from the value in 1st week ($P < 0.05$).

しょうゆ油をルーメン内投与した乳牛における、ルーメン内 pH、アンモニア態窒素濃度、および VFA 濃度を含むルーメン内発酵パラメーターの変化を Table 4 に示す。ルーメン内 pH とアンモニア態窒素濃度はしょうゆ油による影響を受けなかった。ルーメン内総 VFA 濃度、酢酸割合、プロピオン酸割合、および酪酸割合は、しょうゆ油による影響を一部受けたが、その値は正常範囲内であり、ルーメン内発酵を阻害することとはなかった。

Table 4. Effect of ruminal administration of soy sauce oil on ruminal pH, ammonia nitrogen concentration, total volatile fatty acid (VFA) concentration, and proportions of acetic acid, propionic acid and n-butyric acid

	Week of experiment [†]								SE ^{††}
	1	2	3	4	5	6	7	8	
pH	6.5	6.5	6.5	6.6	6.6	6.5	6.5	6.7	0.03
Ammonia-N, mg/dl	7.8	7.7	8.2	6.7	9.0	9.6	12.2	8.6	0.46
Total VFA, mmol/dl	9.8	9.3	10.9	8.1 *	7.6	10.5	10.3	8.3 *	0.28
Acetic acid, mol%	69.2	67.8	65.5	68.0	70.6	68.1	67.4	71.0 *	0.37
Propionic acid, mol%	16.6	17.5	18.6	18.2 *	18.1	18.2	18.9 *	15.7	0.25
n-Butyric acid, mol%	11.4	11.4	12.5	10.9	8.2 *	10.4	10.2 *	10.4	0.31

[†] : Administration period of soy sauce oil is from 2 to 7 week.

^{††} : Pooled standard error.

* : Significantly different from the value in 1st week ($P < 0.05$).

試験 39 日目 (week 6) におけるルーメン内発酵パラメーターの日内変化を Table 5 に示す。飼料給与 3 時間後以降 (しょうゆ油投与 1.5 時間後以降)、ルーメン内 pH は低下し、アンモニア態窒素濃度は上昇した。しかし、総 VFA 濃度、酢酸割合、プロピオン酸割合、および酪酸割合は比較的安定していた。

Table 5. Effect of ruminal administration of soy sauce oil on diurnal changes in ruminal pH, total volatile fatty acid (VFA) concentration, and proportions of acetic acid, propionic acid and n-butyric acid

	Hours after administration of soy sauce oil [†]												SE ^{††}
	-0.5	0	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
pH	6.7	6.6	6.6	6.6	6.4	6.1 *	6.3 *	6.2 *	6.1 *	6.2 *	6.2 *	6.2 *	0.03
Ammonia-N, mg/dl	7.9	9.6	10.0	8.7	14.4	20.2 *	15.0 *	14.6 *	15.6 *	13.4	9.6	12.3	0.64
Total VFA, mmol/dl	8.5	8.8	8.8	8.4	10.0	11.1	10.2	10.2 *	10.8 *	10.7	10.0	10.3	0.20
Acetic acid, mol%	68.2	67.5	67.1	67.4	66.2	66.0	67.6	67.8	66.8	67.3	68.0	66.5	0.17
Propionic acid, mol%	17.4	17.9	18.0	17.8	18.8	18.4	16.9	16.3 *	17.1	17.0	16.9	17.9	0.14
n-Butyric acid, mol%	11.2	11.0	11.1	11.0	11.2	11.1	10.9	11.1	11.3	11.3	11.3	11.6	0.12

[†] : TMR is fed at 1.5 hours after ruminal administration of soy sauce oil.

^{††} : Pooled standard error.

* : Significantly different from the value before administration (average of values at -0.5 and 0 hours) ($P < 0.05$).

Table 6 に乳中の脂肪酸組成と CLA 含量を示す。しょうゆ油の投与により、酪酸 (C4:0)、カプロン酸 (C6:0)、カプリル酸 (C8:0)、カプリン酸 (C10:0)、ラウリン酸 (C12:0)、ミリスチン酸 (C14:0)、パルミチン酸 (C16:0)、およびマルガリン酸 (C17:0) 割合は低下した。その一方、ステアリン酸 (C18:0)、オレイン酸 (C18:1)、バクセン酸 (trans-11 C18:1)、および CLA 割合は増加した (Table 6)。cis-10 trans-12 CLA や trans-9 cis-11 CLA など、その他の異性体は検出されなかった。バクセン酸と CLA 割合の増加は、しょうゆ油投与期間 (week 2~7) と投与中止後 (week8) を通じて一貫していた。しょうゆ油投与による乳中の CLA 含量の増加は week5 に最大となり、212.3 mg/100 g まで増加した。

Table 6. Effect of ruminal administration of soy sauce oil on milk fatty acid composition in dairy cows

Fatty acid composition, %	Week of experiment [†]								SE ^{††}
	1	2	3	4	5	6	7	8	
C 4:0 (butyric acid)	4.1	4.3	3.6 *	3.4	3.1	3.3 *	3.4	3.6 *	0.07
C 6:0 (caproic acid)	2.0	1.7 *	1.2 *	1.1 *	1.0 *	1.0 *	1.0 *	1.4 *	0.07
C 8:0 (caprylic acid)	1.1	0.8 *	0.5 *	0.4 *	0.4 *	0.4 *	0.4 *	0.6 *	0.05
C10:0 (capric acid)	2.3	1.6 *	0.9 *	0.8 *	0.7 *	0.7 *	0.7 *	1.2 *	0.10
C12:0 (lauric acid)	2.7	1.9 *	1.1 *	1.1 *	1.0 *	1.1 *	1.0 *	1.6 *	0.11
C14:0 (myristic acid)	11.1	8.1 *	5.7 *	5.6 *	5.7 *	6.1 *	5.7 *	8.6	0.00
C14:1 (myristoleic acid)	0.9	0.7 *	0.4 *	0.5 *	0.6	0.6	0.5	0.9	0.04
C15:0 (pentadecylic acid)	1.2	1.0	0.9 *	0.9 *	1.0	1.1	1.0	1.2	0.02
C16:0 (palmitic acid)	33.0	25.9 *	20.7 *	20.9 *	22.3 *	21.7 *	21.0 *	26.6 *	0.80
C16:1 (palmitoleic acid)	1.7	1.5 *	1.6	1.9 *	2.1 *	1.8	1.9	1.9	0.04
C17:0 (margaric acid)	0.8	0.5 *	0.4 *	0.4 *	0.4 *	0.4 *	0.4 *	0.5 *	0.03
C18:0 (stearic acid)	9.7	11.1	12.8 *	11.1 *	10.2	10.6	10.5	9.5	0.28
C18:1 (oleic acid)	20.9	21.2	25.0 *	25.4 *	24.2	25.4 *	25.7 *	26.2 *	0.45
<i>trans</i> -11 C18:1 (trans-vaccenic acid)	1.4	9.9 *	14.4 *	14.7 *	14.2 *	13.3 *	13.5 *	5.4 *	0.91
C18:2 (linoleic acid)	1.4	1.4	1.3	1.4	1.5	1.8	1.8	1.7 *	0.06
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 CLA (conjugated linoleic acid)	0.6	3.4 *	5.4 *	6.3 *	7.2 *	6.1 *	6.5 *	3.1 *	0.40
C18:3 (linolenic acid)	0.6	0.4 *	0.3 *	0.3 *	0.4 *	0.5	0.5	0.4 *	0.02
Others (unidentified)	4.5	4.6	3.8 *	3.8	4.0	4.1	4.5	5.6 *	0.15
<i>cis</i> -9 <i>trans</i> -11 CLA content, mg/milk 100 g	24.2	143.6 *	200.0 *	207.0 *	212.3 *	182.0 *	198.4 *	98.5 *	11.97

[†] : Administration period of soy sauce oil is from 2 to 7 week.

^{††} : Pooled standard error.

* : Significantly different from the value in 1st week ($P < 0.05$).

血液パラメーターを Table 7 に示す。しょうゆ油の投与により、非エステル化脂肪酸、3-ヒドロキシ酪酸、総コレステロール、遊離コレステロール、エステル化コレステロール、トリグリセリド、およびリン脂質は増加したが、グルコース、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ、 γ -グルタミルトランスぺプチダーゼ、無機リン、およびマグネシウムに影響はなかった。血中尿素窒素、総タンパク質、コレステロールエステル比、およびカルシウム濃度は、試験期間を通じて安定した値であった。

Table 7. Effect of ruminal administration of soy sauce oil on blood parameters in dairy cows

	Week of experiment [†]								SE ^{††}
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Energy metabolism									
Glucose, mg/dl	63	61	61	63	63	63	65	59	0.47
non-esterified fatty acid, μEq/L	142	201	264	239 *	275 *	184 *	276	251	13.04
3-Hydroxybutyric acid, μmol/L	616	493	443 *	377	282 *	494 *	444	457	19.96
Protein metabolism									
Blood urea nitrogen, mg/dl	14.2	14.1	13.9	12.6	14.4	16.6 *	14.9	14.0	0.37
Total protein, g/dl	6.2	6.6	6.8	6.1	5.7	5.7	5.6 *	5.6	0.10
Albumin, g/dl	2.7	2.8 *	2.8 *	2.6 *	2.5 *	2.6	2.7	2.7	0.02
Lipid metabolism									
Total cholesterol, mg/dl	179	193 *	234 *	257 *	269 *	299 *	317 *	306 *	9.44
Free cholesterol, mg/dl	32	34	40 *	46 *	47 *	50 *	51 *	49 *	1.42
Esterified cholesterol, mg/dl	147	159 *	194 *	212 *	222 *	249 *	265 *	257 *	8.06
Cholesterol ester ratio, %	82.5	82.5	82.9	82.2	82.6	83.3	83.8	84.1 *	0.15
Triglyceride, mg/dl	5.9	7.9	13.6 *	10.5 *	14.0 *	16.0 *	15.0 *	13.0	0.81
Phospholipid, mg/dl	215	246 *	292 *	314 *	322 *	348 *	366 *	328 *	9.07
Hepatic function									
Aspartate aminotransferase, IU/L	54	58	107	65	52	50	52	51	6.57
Gamma-glutamyl transpeptidase, IU/L	24	25	26	25	24	24	24	25	0.58
Mineral metabolism									
Inorganic phosphorus, mg/dl	5.7	5.9	5.8	5.5	5.1	6.1	6.4	5.9	0.10
Calcium, mg/dl	10.1	10.5 *	10.9 *	10.4 *	10.0	10.3	10.6	10.8 *	0.07
Magnesium, mg/dl	2.4	2.5	2.2	2.2	2.4	2.6	2.6	2.5	0.06

[†] : Administration period of soy sauce oil is from 2 to 7 week.

^{††} : Pooled standard error.

* : Significantly different from the value in 1st week ($P < 0.05$).

4. 考察

本研究は、新しい飼料源であるしょうゆ油の特性を把握するため、しょうゆ油のルーメン内への大量投与が、乳牛の生理、特にルーメン内発酵に及ぼす影響を評価することを目的とした。乳牛に対する脂質の大量給与は、ルーメン内発酵に影響が少ない脂質であっても、DMIは低下することが指摘されている（Schauff と Clark 1992）。本試験におけるしょうゆ油の投与は、飼料中 EE 含量が推奨値（6～7%）（NRC 2001）を超過していても飼料摂取量に負の影響を及ぼさなかった（Table 2）。飼料中の EE 含量が 10.2～11.0%であっても、飼料摂取量の低下をとまなわない今回の結果は、しょうゆ油が反芻動物用飼料の代替脂質エネルギー源となる可能性を示唆している。

本研究におけるルーメン内 pH は、主要なルーメン内微生物の増殖に最適な範囲（6.1～6.7）（Obara 2006）内であり、アンモニア態窒素や VFA を含む他のルーメン内発酵パラメーターは、しょうゆ油 1 kg/d の投与による大きな影響を受けなかった（Table 4）。しかし、Shibata ら（2011）は、しょうゆ油を低水準で給与したものの（0.4 kg/d）、VFA 濃度が低下したので、ルーメン内発酵はわずかに阻害されると報告している。本研究と Shibata ら（2011）の間で反応が異なった理由は明確ではない。しかし、しょうゆ油に十分に馴致した試験 6 週目におけるルーメン内発酵パラメーターの日内変化によると、しょうゆ油の投与は、ルーメン内発酵を急激に変化させないと考えられる（Table 5）。飼料摂取量への影響は直接ルーメン内に投与せず、給与試験で調べる必要があり、

しょうゆ油の飼料利用のために許容できる給与水準を示す必要がある。

一般的に、乳脂肪率の低下は、飼料中の粗飼料不足に起因するルーメンにおける酢酸生成量の減少によって説明されてきた（Woodford ら 1986）。本研究において、しょうゆ油の投与にともなうルーメン内の酢酸生成に見かけ上の障害がない（Table 4）にも関わらず、乳脂肪率は明らかに低下した（Table 3）。それゆえ、乳脂肪率の低下は、以下に述べる水素添加説（Bio-hydrogenation theory）に起因すると考えられた。

水素添加説（Bauman と Griinari 2003）は、リノール酸がルーメン内で水素添加によって生成される特定の間代謝物質が下部消化管で吸収され、乳腺組織において乳脂肪の合成を阻害する（Bauman と Griinari 2003）、という事実に基づいている。trans-10 cis-10 CLA は乳脂肪の合成を阻害する間代謝物質の 1 つとされ（Baumgard ら 2000）、この trans-10 cis-10 CLA 割合が高まるにつれ、乳脂肪量は減少することが示されている（de Veth ら 2004）。さらに、cis-10 trans-12 CLA（Sæbø ら 2005）と trans-9 cis-11 CLA（Perfield II ら 2007）も乳脂肪の合成を阻害することが示されている。本試験で用いたしょうゆ油は C18 の不飽和脂肪酸に富み（83%）、乳腺組織において乳脂肪の合成に負の影響を与える上記脂肪酸の前駆物質となりうる。このことは、本試験における乳脂肪の低下の一因であろう。

ルーメンにおけるバクセン酸と CLA 合成の基質として、多価不飽和脂肪酸に富む飼料を給与することは、乳中 CLA 含量を高める実用的な方法である。これまで、泌乳牛に大豆油を 5%含む飼料を給与し乳中の CLA

含量が 2 倍になったとする報告 (Huang ら 2008)、また、TMR の給与と比較して放牧でそれ以上(2.3 倍)になったとする報告(Kelly ら 1998)がある。リノール酸に富むしょうゆ油を乳牛に投与した本試験では、乳脂肪中の CLA 割合と乳中の CLA 含量は、それぞれ最大で 12.0 倍と 8.8 倍に増加した (Table 6)。こうした乳中 CLA の増加は、これまでに報告された値よりはるかに大きい。

他の油脂給与で観察されたように (Moallem ら 2007 ; Looor ら 2005 ; Viswanadha ら 2003)、しょうゆ油のルーメン内投与により、血清中の非エステル化脂肪酸 (NEFA)、3 ヒドロキシ酪酸 (THB)、コレステロール、トリグリセリド、およびリン脂質含量は高まった (Table 7)。本試験における血中脂質の増加は、供試牛に体重減少がなかったので (平均 590 kg (範囲 582 – 597 kg)) 体脂肪の動員によるものではなく、しょうゆ油の投与が原因であろう。これらの値は、乳脂肪率および乳脂肪酸組成で観察されたように (Tables 3 および 7)、投与中止後 1 週間で投与開始前の水準には戻らず、しょうゆ油投与の残存効果を示唆している。肝機能やミネラル代謝に関する他の血液パラメーターは、試験期間を通じて正常な水準で安定していた。それゆえ、しょうゆ油は乳牛の健康に悪影響を及ぼさないであろうと考えられた。

以上、本試験においてしょうゆ油をルーメン内に直接投与する条件で行った結果ではあるが、しょうゆ油の投与により飼料中の EE 含量が 10%となっても、DMI、乳量、およびルーメン内発酵パラメーターに明確な負の影響を及ぼさないが、乳脂肪率は低下し、乳脂肪中の CLA 割合、

生乳中 CLA 含量は著しく高まることを示した。

これらの結果は、しょうゆ油が反芻動物用飼料の代替エネルギー源になるとともに乳中の CLA 含量を増強する可能性を示唆するものである。

第Ⅲ章 泌乳牛におけるしょうゆ油のルーメン内投与量の違いによる 影響 [試験 2]

1. 目的

前章ではしょうゆ油の飼料特性の概要を記した。すなわち、泌乳牛へしょうゆ油 1000 g/日をルーメン内に投与することにより、乾物摂取量、乳量、およびルーメン内発酵は著しい負の影響を受けないが、乳脂肪率は低下することを示した。本章では、しょうゆ油の最適な給与量を明らかにするために、乳牛のルーメン内へのしょうゆ油を異なる水準で投与した試験の成果について論述する。

2. 材料と方法

供試家畜と飼料

動物実験に関する手順は、地方独立行政法人北海道立総合研究機構動物実験指針に従った。

ホルスタイン種初産泌乳牛 8 頭（体重 574 ± 29 kg、分娩後日数 116 ± 22 日）を供試した。乳牛はゴムマットを設置し、その上におが屑を敷いたタイストールで飼養した。実験開始前にルーメンカニューレ（soft plastic cannulas with a 10 cm internal diameter; Bar Diamond Inc., Parma, ID, USA）を供試牛に装着した。実験は、21 日間の馴致期間とその後 7 日間を採材とデータ取得を行う本期間からなる 1 期 28 日間の 4×4 ラテン方格法で実施した。乳牛は、しょうゆ油の投与量の違いによ

る 4 処理区（0、200、400、600 g/d）のいずれかに無作為に配置した。しょうゆ油は、1 日 2 回（08.30 および 17.30 h）に等量をカニューレ経由でルーメン内に直接投与した。

供試家畜には、DM ベースで牧草サイレージ 50.0%、とうもろこし 37.0%、大豆粕 11.0%、第二リン酸カルシウム 2.0%からなる混合試料（TMR）を給与した（Table 8）。原物ベースでの飼料設計のため、牧草サイレージの乾物率を週 1 回計測した。TMR は不断給餌とし、予測摂取量の 110%相当を 1 日 1 回（10.00 h）給与した。給与量と残飼量を毎日記録した。新鮮な水を常時飲水可能とした。搾乳は 1 日 2 回（09.00 および 19.00 h）行い、各搾乳時の乳量を記録した。

Table 8. Formulation and chemical composition of the experimental total mixed ration

Proportion (% of dry matter)	
Grass silage	50.0
Corn	37.0
Soybean meal	11.0
Dicalcium phosphate	2.0
Chemical composition (% of dry matter)	
Crude protein	15.0
Ether extract	4.2
Neutral detergent fiber	41.3
Non fiber carbohydrate [†]	33.5
Total digestible nutrients	69.9

[†]: Organic matter - (Crude protein + Ether extract + Neutral detergent fiber)

採材

各期の終わりに乳牛の体重を計測した。乳試料は、本期に連続 4 日間採取し、乳量に応じて合乳し代表サンプルを得た。乳試料はプラスチックバイアルに入れ、長鎖脂肪酸の分析のために -30℃ で保存した。

ルーメン内容液および血液は、各期 28 日目、朝のしょうゆ油投与ー 0.5、0、0.5、1、2、3、4、5、6、7、8 および 9 時間後に、ルーメンカニューレと頸静脈カテーテル経由で採取した。血液カテーテルは、初めてのサンプリングの 12 時間前以前に挿入し、各サンプリング日の最終サンプリング後に取り外した。ルーメン内容液は背囊と腹囊から手で採取し、混合したのちに 4 重の医療用ガーゼで漉してろ液を得た。その後、速やかにろ液の pH をガラス電極 pH メーター (HM-50G, TOA-DKK; Tokyo, Japan) で計測し、その後の分析のため -30℃ で保存した。血液サンプルを遠心分離して得た血清は、分析まで -30℃ で保存した。

牧草サイレージ、とうもろこし、および大豆粕を含む飼料サンプルは各期に採取し、DM を計測するため 60℃ の通風乾燥機で 48 時間乾燥した。乾燥した飼料サンプルは 1mm のスクリーンを設置したカッティングミルで粉碎し、化学分析に供した。

化学分析と統計分析

飼料サンプルは DM、CP、EE、および NDF を常法 (NARO 2009) で分析した。乳脂肪率、乳タンパク質率、および乳糖率をフーリエ変換赤外分析型乳成分測定装置 (Milko-Scan FT120; Foss Electric, Hillerod, Denmark) で分析した。

凍結した乳試料および血清試料は 4℃ で解凍し、以下の化学分析に供した。アンモニア態窒素はインドフェノール法 (Weatherburn 1967) で分析した。VFA は内部標準としてクロトン酸を用いたガスクロマトグ

ラフ (GC-14B; Shimadzu Co., Kyoto, Japan) で分析した (Suto 1973)。

生乳の脂肪酸分析は前章に記載した方法で実施した。ルーメン内容液と血清の脂肪酸は、FAME への変換に水酸化ナトリウムメタノールと 3 フッ化ホウ素メタノール試薬を用いる修正液液抽出法で FAME を得た。FAME 試料の分析は生乳の脂肪酸分析と同様前章に記載した方法で実施した。

データは反復のある 4×4 ラテン方格法として、JMP (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて分析した。処理の効果が有意であった場合、Tukey の多重比較検定により平均値の差を検定した。 $P < 0.05$ の場合を有意と定義した。

3. 結果

Table 9 に、しょうゆ油のルーメン内投与にともなう栄養摂取量の変化を示す。しょうゆ油投与量の増加にともない、有意ではないものの、総 DMI および牧草サイレージ摂取割合は数値的に低下した。一方、EE と TDN 摂取割合は増加し ($P < 0.05$)、CP 摂取割合は低下した ($P < 0.05$)。

Table 9. Effect of ruminal administration of soy sauce oil on feed intake of dairy cows

	Soy sauce oil (g/d)				SEM [†]
	0	200	400	600	
Dry matter intake, kg	18.1	18.4	17.6	17.0	0.531
Grass silage / dry matter intake, %	50.0	49.5	48.9	48.2	0.036
Ether extract / dry matter intake, %	3.9 ^d	5.0 ^c	6.1 ^b	7.3 ^a	0.070
Crude protein / dry matter intake, %	15.6 ^a	15.4 ^b	15.3 ^c	15.1 ^d	0.011
Total digestible nutrient / dry matter intake, %	71.3 ^d	73.3 ^c	75.0 ^b	76.9 ^a	0.105

[†] : Standard error of the mean.

^{a,b,c,d} Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

しょうゆ油をルーメン内に投与した乳牛における乳量と乳成分を Table 10 に示す。乳量はしょうゆ油による影響を受けず、24.6～26.0 kg/d の範囲であった。さらに、しょうゆ油を最も多く投与した 600 g 区で FCM の値はわずかに低くなったが、有意なものではなかった。乳脂肪率はしょうゆ油の投与により低下傾向 ($P = 0.06$) を示し、600 g 区が最も低い値となった。乳タンパク質率、乳糖率、および無脂固形分率はしょうゆ油のルーメン内投与による影響を受けなかった。

Table 10. Effect of ruminal administration of soy sauce oil on milk yield and composition in dairy cows

	Soy sauce oil (g/d)				SEM [†]
	0	200	400	600	
Milk yield, kg / d	24.6	25.4	26.0	24.8	1.253
4% Fat corrected milk, kg / d	24.8	25.5	25.3	22.1	1.516
Fat, %	4.20	4.06	3.94	3.36	0.312
Protein, %	3.60	3.52	3.39	3.38	0.114
Lactose, %	4.51	4.53	4.55	4.57	0.070
Solid not fat, %	9.13	9.08	8.98	8.98	0.162

[†] : Standard error of the mean.

しょうゆ油の投与が pH、アンモニア態窒素、および VFA などのルーメン内発酵パラメーターに及ぼす影響を Figure 1 に示す。ルーメン内 pH、アンモニア態窒素、総 VFA 濃度、酢酸濃度、および酪酸濃度は、しょうゆ油投与後に、各区ともほぼ同様の変化を示したが、pH 以外の項目は最も高い投与水準の 600 g 区が、他 3 区の値よりも常に低い値を示し、pH は常に高い値を示した。とりわけ、600 g 区の酢酸濃度は、サンプリング期間を通じて常に最も低く推移した。プロピオン酸濃度は、しょうゆ油の投与による明確な変化を示さなかった。それゆえ、600g 区を除いた 3 区において、しょうゆ油の投与はルーメン内発酵に負の影響を及ぼさなかった。

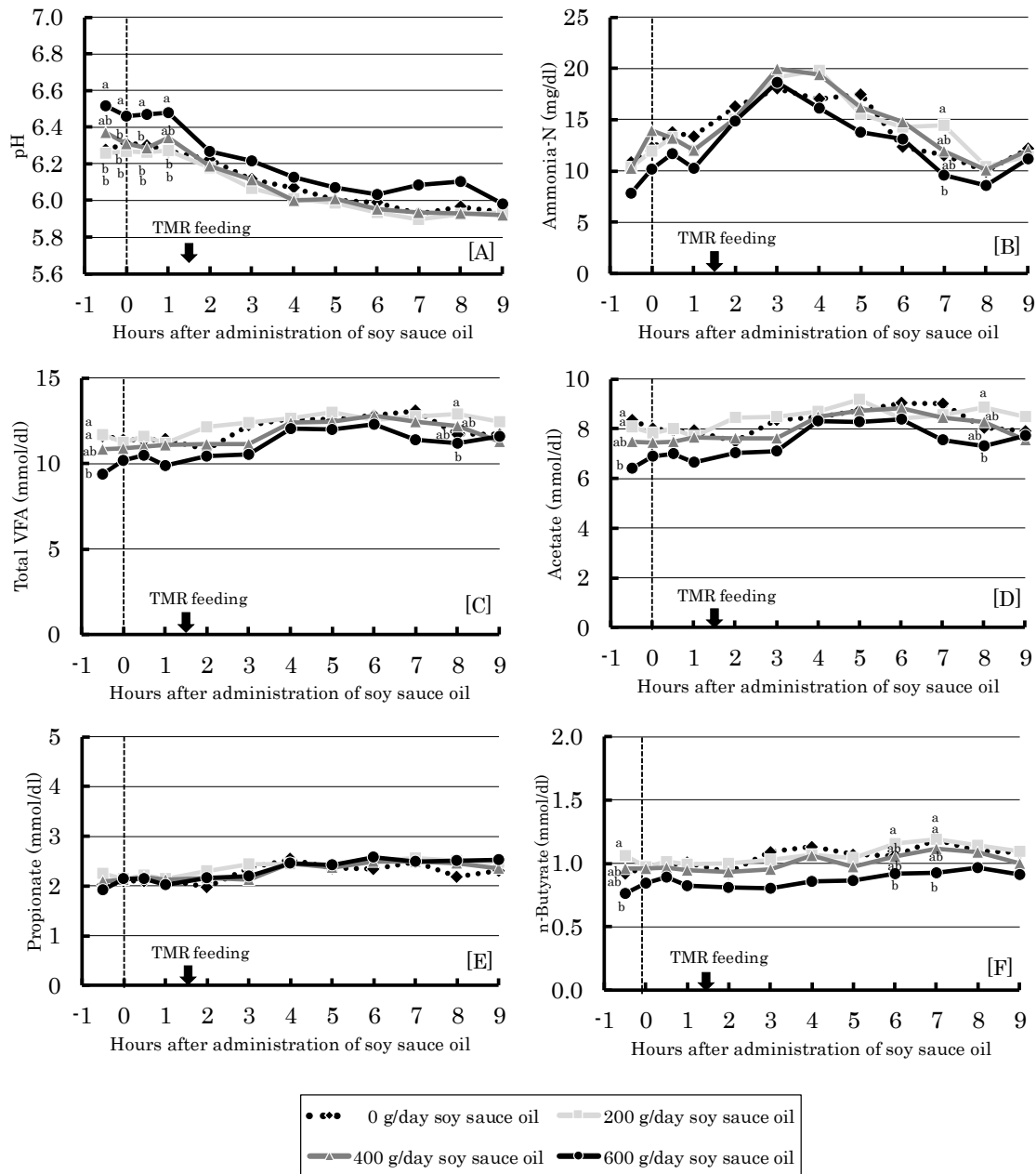


Figure 1. Effect of ruminal administration of soy sauce oil on ruminal pH [A], ruminal concentration of ammonia nitrogen [B], total volatile fatty acid [C], acetate [D], propionate [E] and n-butyrate [F] in dairy cows. (a, b : Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$))

乳牛へしょうゆ油を異なる水準で投与した際のルーメン内リノール酸、バクセン酸、および CLA 濃度の推移を Figure 2 に示す。しょうゆ油の投与後に各脂肪酸は最大値を示し、リノール酸は投与 0.5 時間後、バクセン酸は 4～5 時間後、そして CLA は 0.5 時間後に最大値となった。加えて、しょうゆ油の投与水準の増加に伴い、最大値は大きくなった。

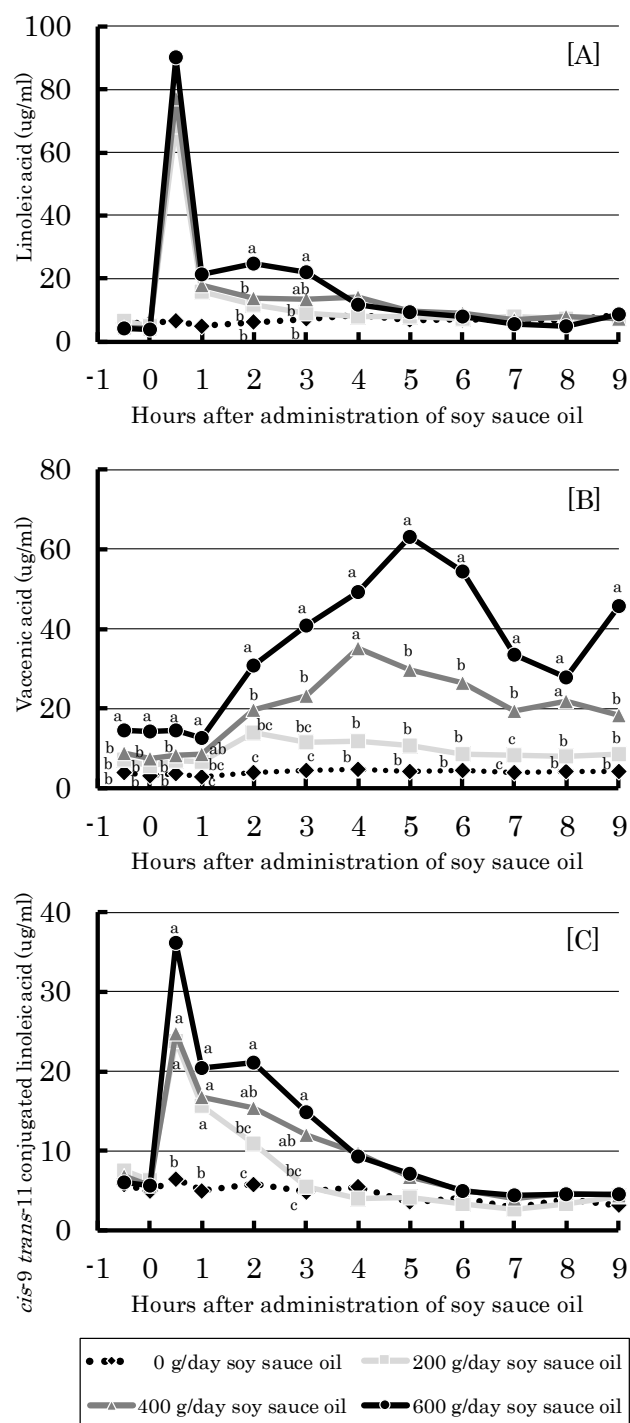


Figure 2. Effect of ruminal administration of soy sauce oil on ruminal concentration of linoleic acid [A], vaccenic acid [B] and *cis-9 trans-11* conjugated linoleic acid [C] in dairy cows. (a, b, c : Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$))

しょうゆ油の投与が、血清中リノール酸、バクセン酸、および CLA 濃度の推移に及ぼす影響を Figure 3 に示す。リノール酸濃度が最も高く（およそ 150～250 $\mu\text{g/ml}$ ）、次いでバクセン酸（およそ 2～10 $\mu\text{g/ml}$ ）と CLA（およそ 0～1.6 $\mu\text{g/ml}$ ）が続いた。これら脂肪酸はしょうゆ油による影響を受け、その投与量が多いほど値は大きかった。

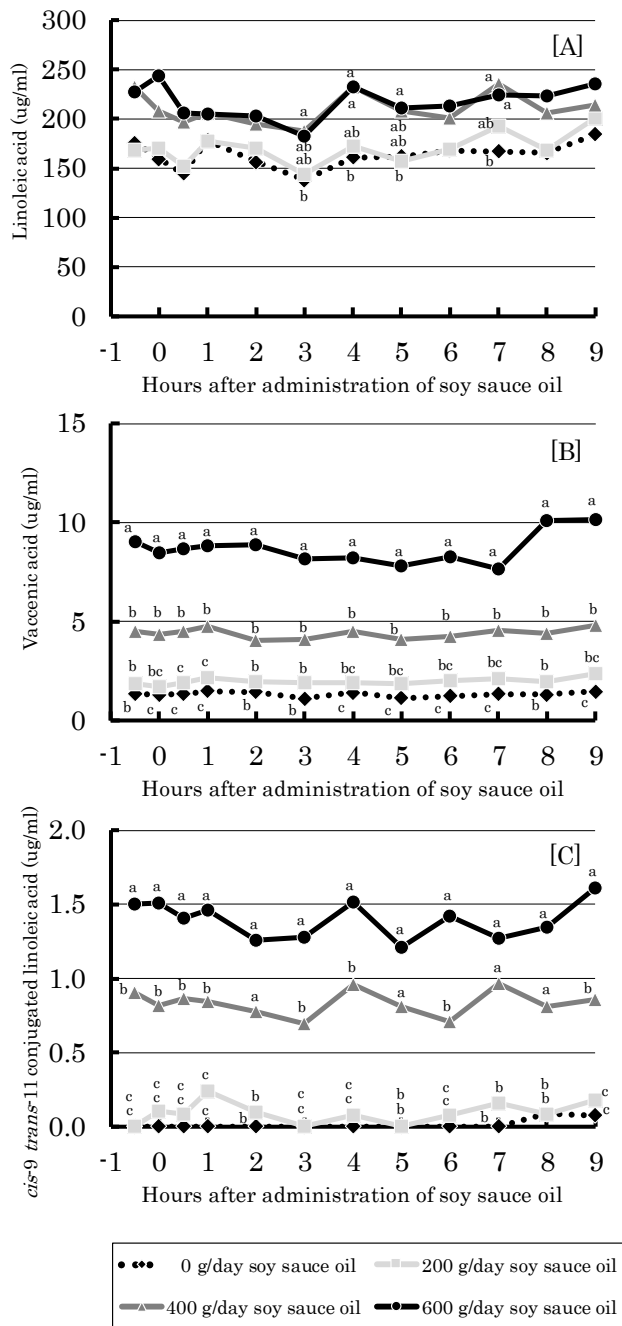


Figure 3. Effect of ruminal administration of soy sauce oil on blood serum concentration of linoleic acid [A], vaccenic acid [B] and *cis*-9 *trans*-11 conjugated linoleic acid [C] in dairy cows. (a, b, c : Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$))

Figure 4に乳牛へ異なる水準でしょうゆ油を投与した場合の乳中脂肪酸におけるリノール酸割合、バクセン酸割合、および CLA 割合を示す。しょうゆ油の投与水準の違いでリノール酸割合は変化しなかったが、バクセン酸と CLA 割合は投与水準の上昇とともに増加し、0 g 区や 200 g 区よりも 400 g 区と 600 g 区で高い値を示した。乳中 CLA 含量は、しょうゆ油投与 0、200、400、および 600 g/d それぞれで、17.5、26.0、45.6、および 57.0 mg/100 g milk と算定できた。

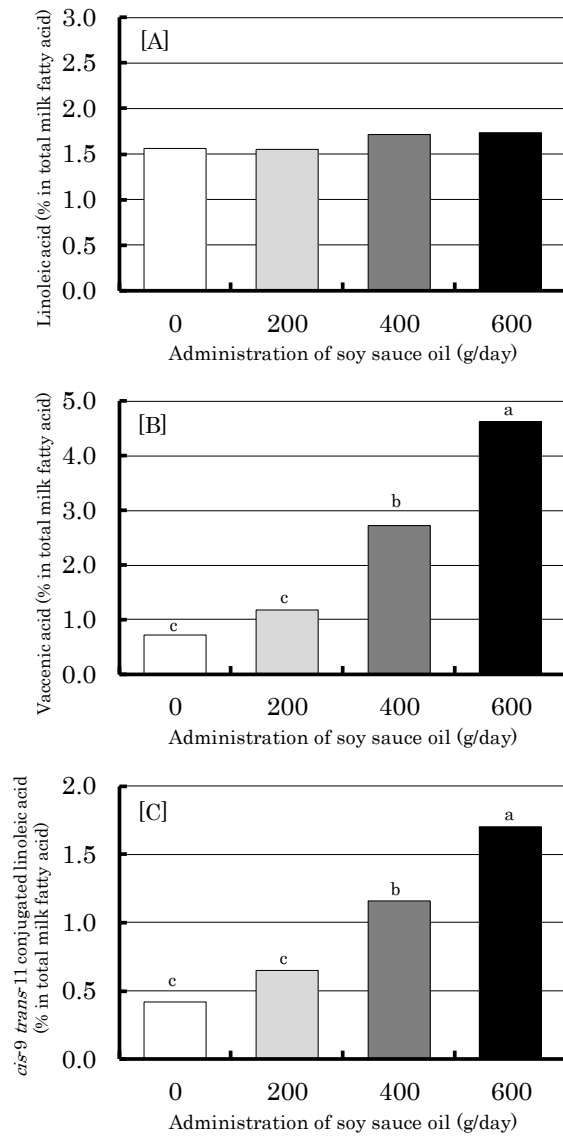


Figure 4. Effect of ruminal administration of soy sauce oil on proportion of linoleic acid [A], vaccenic acid [B] and *cis*-9 *trans*-11 conjugated linoleic acid [C] in total milk fatty acid in dairy cows. (a, b, c : Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$))

4. 考察

DMI は乳牛の生産能力において重要な要因なので、しょうゆ油のような新飼料素材は飼料摂取量に負に影響しないことが期待される。一般的に、油脂量と脂肪酸組成、特に小腸に達する内容物中の脂肪酸組成は飼料摂取量の決定要因として知られている (Drackley ら 1992)。本試験では 600 g/d までのしょうゆ油のルーメン内投与は、乳牛の DMI を有意に低下させず (Table 9)、このことはしょうゆ油 400 g/d を給与しても DMI に影響はないことを報告した Shibata ら (2011) とよく一致する。さらに重要なことは、乳量と 4%脂肪補正乳は、しょうゆ油のいずれの投与水準でも影響を受けなかったことである (Table 10)。これらのことは、しょうゆ油の投与による乳脂肪率の低下傾向が認められたとしても、将来的なしょうゆ油の利用において有利な点と言えるだろう。

しょうゆ油投与後 2 時間での総 VFA 濃度の低下がこれまでに報告されているが (Shibata ら 2011)、本試験では 400 g/d の水準まで、そのような低下は観察されなかった (Figure 1)。しょうゆ油の投与量が最も多い 600 g 区は、総 VFA 濃度、酢酸濃度、および酪酸濃度が常に低い値であった (Figure 1)。一般に、酢酸と酪酸の減少が乳脂肪の減少をもたらすと認識されている (Urrutia ら 2019)。それゆえ、飼料摂取量とルーメン内発酵に関して、乳牛の生産能力を考慮すると、しょうゆ油の投与量は 400 g/d までとすることが適切と判断される。

本試験結果で最も特徴的なことは、しょうゆ油投与時におけるルーメン内容液、血液および乳中の CLA 濃度が用量依存的に増加したことであ

る (Figure 2~4)。このことは、しょうゆ油の給与が CLA の健康増進作用を介して、乳牛および消費者に有益な影響をおよぼすことを示唆する (Lock と Bauman 2004)。ルーメン内における CLA の経時変化によると、リノール酸からの CLA 生成は急速に起こり (しょうゆ油投与後 1 時間以内)、その後にバクセン酸が生成される (Figure 2)。これらは異性化や特有のルーメン微生物による水素添加を通じて起こる (Tanaka 2004)。その一方で、血清中の CLA、バクセン酸、およびリノール酸濃度は、9.5 時間のサンプリング時間に関係なく極めて安定しており (Figure 3)、これら脂肪酸が乳腺を含む家畜の組織全体に分配される可能性を示唆している。このことは乳中の CLA とバクセン酸がしょうゆ油の投与量に依存して増加する要因となっている (Figure 4)。バクセン酸は乳腺および他の体組織 (Griinari ら 2000) において Δ -9 不飽和化酵素によって CLA に変換されるので、乳中 CLA の一部はバクセン酸に由来する (Torral 2018) と考えられる。

乳中の総脂肪酸における CLA 割合 (Figure 4) と乳脂肪含量 (Table 10) から算出すると、本試験で推奨するしょうゆ油投与量 (400 g/d) における乳中 CLA 含量は 45.6 mg/100 g であった。本試験において、しょうゆ油の投与にともない乳量は低下傾向 (Table 10) であったにもかかわらず、実際には、乳中 CLA の増加が観察された。つまり、しょうゆ油の給与は、機能的な生乳の生産手段となりうることが確認された。消化物中 (Ueda ら 2003; Loo 2004)、生乳や肉を含む畜産物中 (Dhiman ら 2000; Torral 2018) の CLA 濃度を高めるため植物油を利用した添加飼

料の給与が試みられている。しかしながら、しょうゆの製造副産物であるしょうゆ油は、本試験で評価されたように、生乳中の CLA を増加させる効果的な方法のひとつだろう。

しょうゆ油の飼料利用に向けては、給与水準が最大 400 g/d であることが、本試験でのルーメン内投与で判明したが、より現実的には、適切に配合した飼料を用いた給与試験を実施し評価すべきであろう。

第Ⅳ章 乳牛におけるしょうゆ油の経口摂取による影響

Ⅳ-1 泌乳牛におけるしょうゆ油の経口摂取による影響 [試験 3]

1. 目的

第Ⅱ章および第Ⅲ章においては、しょうゆ油の給与が飼料摂取や乳生産におよぼす影響とその給与水準について論述した。その結果、乳脂肪率を大きく低下させずに乳脂肪中の CLA を高めるしょうゆ油の給与量は 400 g/日であることを示した。しかしながら、この給与水準の検討はしょうゆ油をルーメン内へ直接投与して実施しており、より正確には、しょうゆ油を経口摂取させる現実的な飼養試験によって確認する必要がある。

本章第一節では脂肪酸組成の類似する、しょうゆ油あるいは大豆油 400 g/日を経口摂取させ、飼料摂取量および乳生産におよぼす影響を検討することにより、しょうゆ油の飼料利用に向けての検討を行った成果について論述する。

2. 材料と方法

供試家畜と供試飼料

動物実験は、地方独立行政法人北海道立総合研究機構動物実験指針に基づいて行った。

ルーメンフィステル(内径 10cm, Bar Diamond Inc., Parma, ID, USA)を装着したホルスタイン種初産泌乳牛 9 頭(体重 587 ± 93 kg、分娩後日数 213 ± 23 日)を、1 期 28 日間(予備期 21 日間、本期 7 日間)の 3×3

ラテン方格法に供試した。乾物ベースで牧草サイレージ 50.0%、とうもろこし 37.0%、大豆粕 11.0%、および炭酸カルシウム 2.0%からなる混合飼料（TMR）を基礎飼料として給与した（Table 11）。原物ベースの飼料構成比を調整するため、週 1 回、牧草サイレージの乾物率を計測した。TMR は不断給餌とし、予想摂取量の 110%相当量を 1 日 1 回（10.00 h）給与した。給与量と残飼量を毎日計測した。供試牛はラバーマットを設置し、その上におが屑を敷料として利用したタイストールで飼養した。飲水は自由とした。搾乳は 1 日 2 回（09.00 および 19.00 h）行い、各搾乳時の乳量を計測した。試験期間中、供試牛の体重を週 1 回計測した。

Table 11. Formulation and chemical composition of the experimental total mixed ration

Proportion (% of dry matter)	
Grass silage	50.0
Corn	37.0
Soybean meal	11.0
Calcium carbonate	2.0
Chemical composition (% of dry matter)	
Crude protein	14.1
Ether extract	4.2
Neutral detergent fiber	39.4
Non fiber carbohydrate [†]	34.6
Total digestible nutrients	78.0

[†] : Organic matter - (Crude protein + Ether extract + Neutral detergent fiber)

試験処理は TMR 不断給餌におけるトップドレス給与物構成の違いとし、しょうゆ油 400 g/日＋アルファルファミール 1600 g/日としたしょうゆ油区、大豆油 400 g/日＋アルファルファミール 1600 g/日とした大豆油区、アルファルファミール 1600 g/日とした対照区の 3 区設けた（Table 12）。油脂類はあらかじめアルファルファミールに吸着させ、

1 日 2 回（10:00 および 17:00 h）に半分量をトップドレス給与した。

Table 12. Formulation and chemical composition of the additive feed

	Treatment		
	Soy sauce oil	Soybean oil	Control
Proportion (g fresh matter / day)			
Soy sauce oil	400	-	-
Soybean oil	-	400	-
Alfalfa meal	1600	1600	1600
Sum	2000	2000	1600
Chemical composition			
Dry matter (% of fresh matter)	90.7	90.6	88.4
Crude protein (% of dry matter)	14.6	14.6	18.7
Ether extract (% of dry matter)	23.7	23.6	2.1
Neutral detergent fiber (% of dry matter)	33.3	33.4	42.7
Non fiber carbohydrate (% of dry matter) [†]	18.9	18.9	24.2
Total digestible nutrients (% of dry matter)	94.7	95.5	61.5

[†] : Organic matter - (Crude protein + Ether extract + Neutral detergent fiber)

採材

乳牛の体重は試験各期の最終日に計測した。牛乳サンプルは本期に 4 日間連続で採取し、乳量割合に応じて混合したものを長鎖脂肪酸分析用試料として、プラスチックチューブに入れて -30℃ で保存した。

ルーメン内容液は朝の飼料給与の -0.5、1、2、3、4、5、6、および 7 時間後に、ルーメンフィステル経由で背囊と腹囊から手で採取し、4 重の医療用ガーゼで漉してろ液を得た。その後、速やかにろ液の pH をガラス電極 pH メーター（HM-50G, TOA-DKK, Tokyo, Japan）で計測し、後の分析まで -30℃ で保存した。

グラスサイレージ、トウモロコシ、大豆粕はサンプルを毎週採取した。グラスサイレージは 60℃ の通風乾燥機で 48 時間乾燥し DM を計測した。飼料は 1mm のスクリーンを装着したカッティングミルを用いて粉碎し、

化学分析に供した。

化学分析および統計分析

飼料サンプルは、常法（NARO 2009）で DM、CP、EE、および NDF を分析した。乳試料は近赤外分光分析器（Milko-Scan FT120; Foss Electric, Hillerod, Denmark）を用いて、乳脂肪率、乳タンパク質率、および乳糖率を測定した。

ルーメン内容液のアンモニア態窒素、VFA、およびルーメン内容液、血液、生乳の脂肪酸の分析は第Ⅲ章に記載の通りである。

データは反復のある 3×3 ラテン方格法として JMP(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて解析した。処理の効果が有意な場合、Tukey の多重比較検定により平均値の差を検定した。 $P < 0.05$ を有意と定義した。

3. 結果

しょうゆ油、あるいは大豆油の添加給与が DMI、および栄養摂取量に及ぼす影響を Table 13 に示す。DMI および粗飼料摂取割合に有意な差は認められなかった。しょうゆ油あるいは大豆油の添加給与により、EE および TDN 摂取割合は有意に高まり、CP 摂取割合は有意に低下した。

Table 13. Effect of feeding soy sauce oil or soybean oil on nutrient intake in dairy cows

	Treatment			SEM [†]
	Soy sauce oil	Soybean oil	Control	
Dry matter intake, kg	16.5	17.1	17.5	0.552
Grass silage / dry matter intake, %	44.4	44.7	45.9	0.171
Ether extract / dry matter intake, %	6.4 ^a	6.3 ^a	4.0 ^b	0.060
Crude protein / dry matter intake, %	14.2 ^b	14.2 ^b	14.5 ^a	0.006
Total digestible nutrient / dry matter intake, %	79.8 ^a	79.8 ^a	76.6 ^b	0.055

[†] : Standard error of the mean.

^{a,b} : Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

しょうゆ油、あるいは大豆油の添加給与が乳量、および乳成分に及ぼす影響を Table 14 に示す。乳量、4%脂肪補正乳、乳脂肪率、乳糖率、および無脂固形分率に有意差は認められなかった。その一方、乳蛋白質率はしょうゆ油、あるいは大豆油の添加給与により有意に低下した。

Table 14. Effect of feeding soy sauce oil or soybean oil on nutrient intake in dairy cows

	Treatment			SEM [†]
	Soy sauce oil	Soybean oil	Control	
Milk yield, kg / d	24.9	26.3	24.5	0.967
4% Fat corrected milk, kg / d	23.9	25.1	24.6	1.068
Fat, %	3.70	3.67	3.99	0.131
Protein, %	3.06 ^b	3.05 ^b	3.23 ^a	0.054
Lactose, %	4.58	4.60	4.57	0.037
Solid not fat, %	8.65	8.65	8.79	0.067

[†] : Standard error of the mean.

^{a,b} : Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

Figure 5 に、しょうゆ油あるいは大豆油の添加給与がルーメン内発酵のパラメーターである pH、アンモニア態窒素、および VFA に及ぼす影響を示す。pH は、各区とも飼料給与後に低下し、給与 7 時間後までに給与前の水準に戻ることはなかった。pH は有意差の認められた時間も

あったが、各区の値の推移は概ね類似していた（Figure 5-A）。アンモニア態窒素濃度の推移は試験区間で類似し、有意差は認められなかった。飼料給与 1～2 時間後にピークを示し、その後徐々に低下し給与 6～7 時間後には給与前の水準となった（Figure 5-B）。総 VFA、酢酸および酪酸濃度の値は、各区とも飼料給与後やや増加し、給与 3 時間後まで処理区間の違いは認められなかったが、給与 4 時間後以降の値はしょうゆ油区が最も低い値で推移した（Figure 5-C, D, F）。プロピオン酸濃度は有意差の認められた時間もあったが、いずれの区も経時的な変化は非常に小さく、その推移は安定していた（Figure 5-E）。

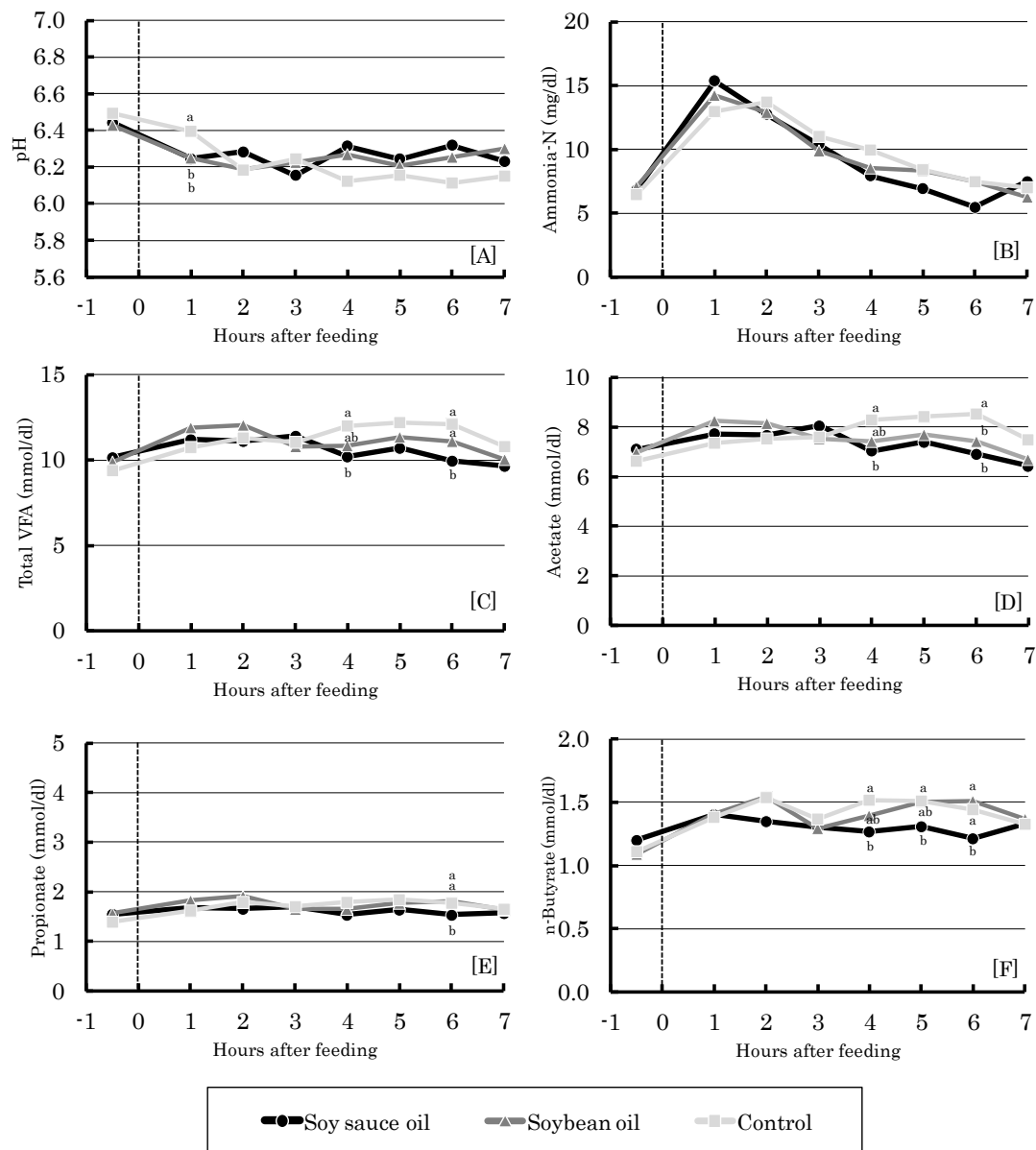


Figure 5. Effect of feeding soy sauce oil or soybean oil on ruminal pH [A], ruminal concentrations of ammonia nitrogen [B], total volatile fatty acid [C], acetate [D], propionate [E] and n-butyrate [F] in dairy cows. (a, b : Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$))

しょうゆ油あるいは大豆油の添加給与がルーメン内溶液中のリノール酸、バクセン酸、および CLA 濃度の推移に及ぼす影響を Figure 6 に示す。対照区のリノール酸、バクセン酸、および CLA 濃度の推移に明瞭なピークは認められなかったが、しょうゆ油区と大豆油区は飼料給与 1～2 時間後にピークを示し、その後徐々に低下した (Figure 6-A, B, C)。

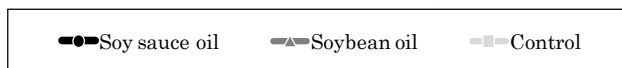
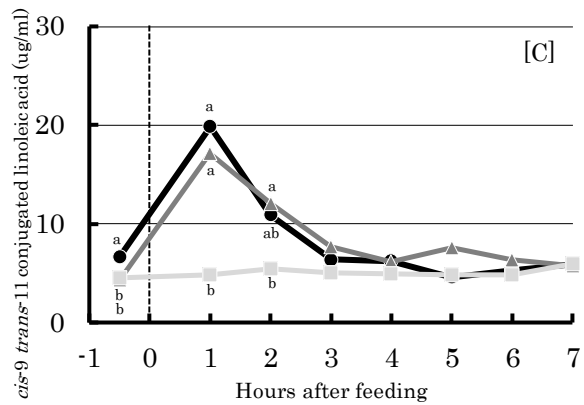
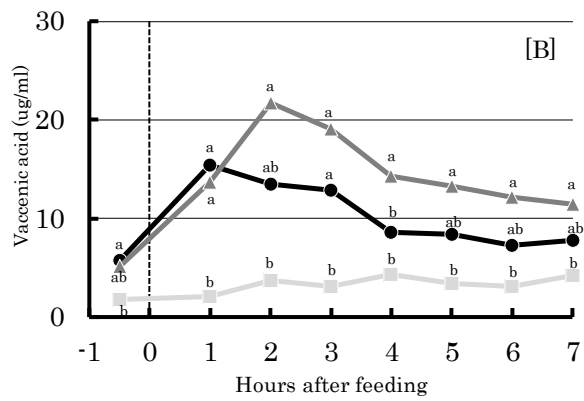
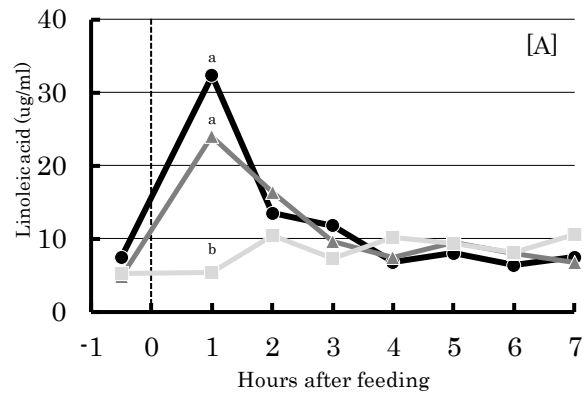


Figure 6. Effect of feeding soy sauce oil or soybean oil on ruminal concentrations of linoleic acid [A], vaccenic acid [B] and *cis*-9 *trans*-11 conjugated linoleic acid [C] in dairy cows. (a, b : Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$))

Figure 7 に、しょうゆ油あるいは大豆油の添加給与時における血清中のリノール酸、バクセン酸、および CLA 濃度の推移を示す。リノール酸濃度は給与前から給与後 1 時間までの推移は各区類似していたが、給与後 2 時間以降は油脂給与の 2 区がやや高い値で推移した。バクセン酸は油脂給与の 2 区が高い値で推移し、常に大豆油区が最も高く、次いでしょうゆ油区、対照区の順番で推移した。CLA は、検出されずに推移した対照区に対し、油脂給与の 2 区が高い値で推移し、飼料給与後は大豆油区が最も高く、次いでしょうゆ油区、対照区の順番で推移した。

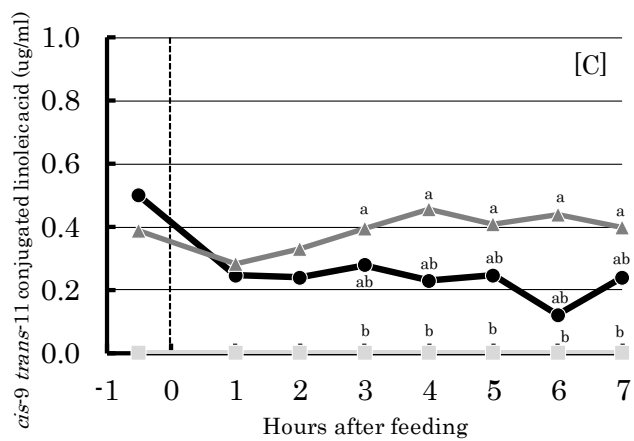
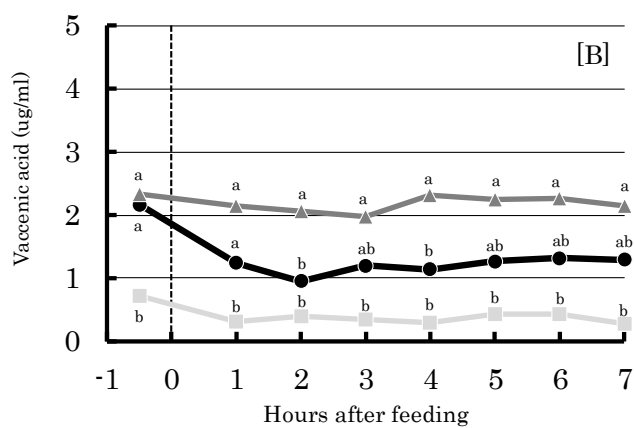
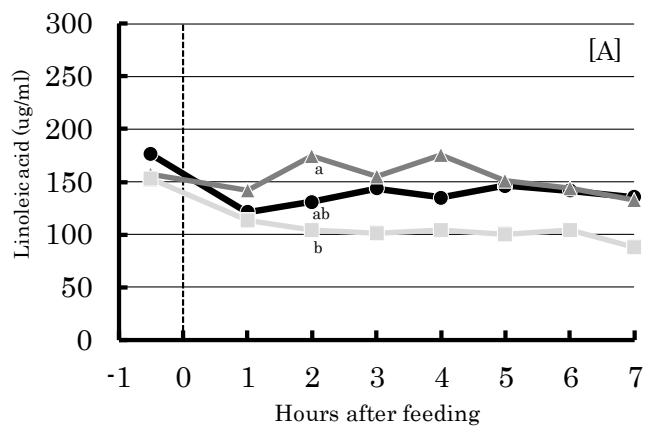


Figure 7. Effect of feeding soy sauce oil or doybean oil on blood serum concentrations of linoleic acid [A], vaccenic acid [B] and *cis*-9 *trans*-11 conjugated linoleic acid [C] in dairy cows. (a, b : Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$))

しょうゆ油あるいは大豆油の添加給与が生乳中の脂肪酸組成におけるリノール酸割合、バクセン酸割合、および CLA 割合に及ぼす影響を Figure 8 に示す。油脂を添加給与した 2 区のリノール酸、バクセン酸、および CLA の生乳中脂肪酸割合は、対照区に比べて有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。一方、しょうゆ油区と大豆油区との間に差はなかった。

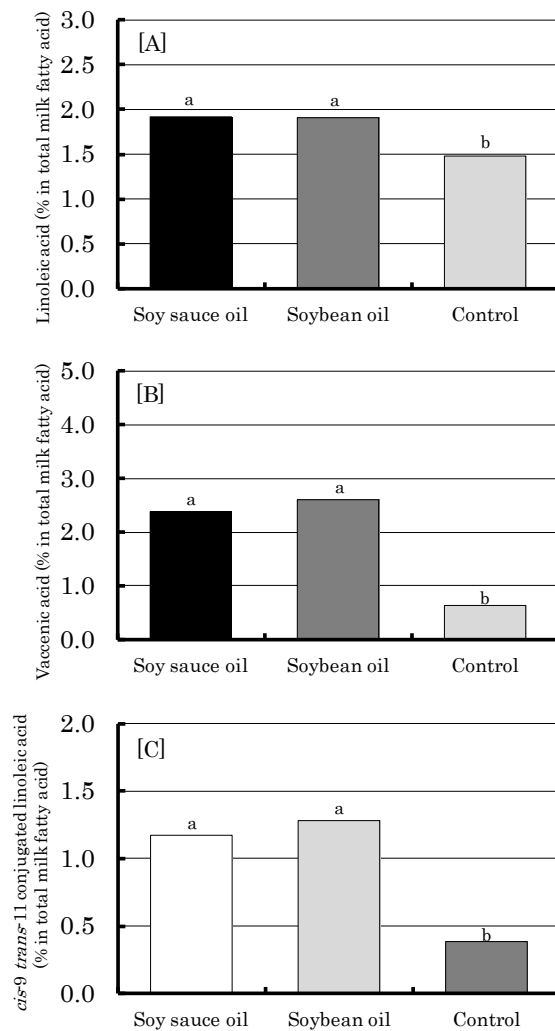


Figure 8. Effect of feeding soy sauce oil or soybean oil on proportion of linoleic acid [A], vaccenic acid [B] and *cis*-9 *trans*-11 conjugated linoleic acid [C] in total milk fatty acid in dairy cows. (a, b : Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$))

4. 考察

しょうゆ油を 400 g/日 給与した本試験において、DMI は影響を受けなかった。このことはしょうゆ油をルーメン内に直接投与した試験 1 や 2 と同じ結果であるとともに、乳牛へしょうゆ油を 400 g/日 給与し DMI は変化しないことを示した Shibata ら (2011) の結果とも同様であった。

Shibata ら (2011) は、乳牛へしょうゆ油 400 g/日を給与し、DMI や乳生産に負の影響はないが、給与 2 時間後に総 VFA 濃度が有意に低下 (対照区 10.4 に対し 8.0 mmol/dl) したことからルーメン内発酵がやや抑制されることを示している。本研究においてもしょうゆ油給与による DMI や乳量への負の影響は認められなかったが、総 VFA 濃度は給与 4 時間後に有意に低下し、乳タンパク質率も有意に低下した。脂肪の添加により乳タンパク質率が低下することが指摘されている (NRC 2001 ; Wu と Huber 1994)。Cant ら (1993a,b) は乳脂肪合成のための脂肪酸利用の増加は、乳糖合成のためのグルコース利用を制限し控えさせ、乳腺における血流とアミノ酸の取り込み量が増加することなく乳量と泌乳効率が高まるため、乳タンパク質率が低下することを示している。このことが本試験における乳タンパク質率低下の原因かもしれない。一方、Rabiee ら (2012) は、脂肪の給与により乳タンパク質率は低下する可能性があるものの、乳タンパク質量は変化しないことを報告している。本試験においても乳タンパク質量に有意差は認められず、しょうゆ油区、大豆油区および対照区で、それぞれ 0.76、0.80、0.79 kg/d となり、処理区間に差は認められなかった。

ルーメン内発酵パラメーターの推移は、時間によって有意差の認められた項目もあったが、各区の推移は類似し、しょうゆ油および大豆油 400 g/日の給与はルーメン内発酵を激変させないことが確認された。

ルーメン内容液中のリノール酸、バクセン酸および CLA 含量の推移パターンは前章で記載した試験結果と同様であった。しかし、しょうゆ油区および大豆油区のリノール酸、バクセン酸および CLA の値は、前章の試験における 400 g 区の値に較べて低い値で推移した。このことは経口摂取によるしょうゆ油摂取が、ルーメン内投与に較べてより長い時間をかけて行われることが一因であり、さらにしょうゆ油をアルファルファミールに吸着させていたため、より緩やかに代謝されたことも要因として考えられる。

血清中のリノール酸、バクセン酸、および CLA 含量の推移には、明瞭なピークは出現せず、前章の試験と同程度の変動幅で推移した。しかしながら、バクセン酸および CLA の値は、大豆油区、しょうゆ油区、対照区の順番で概ね推移したが、大豆油としょうゆ油で違いが生じた理由については不明である。

乳脂肪中のリノール酸、バクセン酸、および CLA 割合も油脂を給与した 2 区で高まり、その値は前章の試験の 400 g 区と同程度であった。対照区を基準とするとしょうゆ油区と大豆油区における CLA の増加割合はそれぞれ 200%、230%であり、前章の試験における 400 g/日ルーメン内投与時の増加割合 180%と概ね近似した。Shibata ら（2011）は、乳牛へしょうゆ油を 400 g/日を給与することにより、乳脂肪中の CLA 割

合は、本試験とほぼ同水準の 1.01%（対照区 0.46%）へと増加することを示し、本試験の結果を支持するものである。さらに、Dhiman ら（2000）は、リノール酸に富む油脂の給与により乳脂肪中の CLA 含量が増加することを報告しており、リノール酸に富むしょうゆ油および大豆油を投与した本試験結果を支持するものである。本試験の結果から生乳 100 g 中に含まれる CLA 含量を試算すると、しょうゆ油区、大豆油区、対照区は、それぞれ、41.5、45.9、15.3 mg となり、前章の試験の 0 g 区（対照区に相当）および 400 g 区（本試験のしょうゆ油区や大豆油区に相当）の値と近似した。これらのことからしょうゆ油は経口摂取の場合でもルーメン内投与時と同等の CLA 増強効果があること、また、その増強効果は大豆油給与時と同等であることが明らかとなった。

IV-2 しょうゆ油の摂取が成分消化率におよぼす影響 [試験 4]

1. 目的

第Ⅱ章、第Ⅲ章、第Ⅳ章第一節においてしょうゆ油の給与は飼料摂取量、ルーメン内発酵、および乳量に明確な負の影響を及ぼさなかった。油脂の給与はルーメン内発酵を阻害する可能性が高いとされるが、醸造過程を経ている油脂、しょうゆ油給与時の成分消化率については未検討である。本章第二節では乳牛へのしょうゆ油の給与が、飼料の成分消化率におよぼす影響を検討した結果について論述する。

2. 材料と方法

供試家畜と供試飼料

動物実験は、地方独立行政法人北海道立総合研究機構動物実験指針に基づいて行った。

ルーメンフィステル(内径 10cm、Bar Diamond Inc., Parma, ID, USA)を装着したホルスタイン種非妊娠乾乳牛 6 頭(体重 736 ± 132 kg)を、1 期 28 日間(予備期 24 日間、本期 4 日間)の 3×3 ラテン方格法で全糞採取法による消化試験を実施した。給与飼料は前項と同じく、乾物ベースで牧草サイレージ 75.4%、とうもろこし 13.7%、大豆粕 9.9%、炭酸カルシウム 0.7%、および第 2 リン酸カルシウム 0.3%からなる混合飼料(TMR)を基礎飼料として給与した(Table 11)。原物ベースの飼料構成比を調整するため、週 1 回、牧草サイレージの乾物率を計測した。TMR

は不断給餌とし、予想摂取量の 110%相当量を 1 日 1 回 (10.00 h) 給与した。給与量と残飼量を毎日計測した。供試牛は初めの 3 週間はラバーマットを設置し、その上におが屑を敷料として利用したタイストールで飼養し、最後の 1 週間を代謝試験用ストールで飼養した。飲水は自由とした。なお、全頭とも代謝試験ストールでの飼養経験はあり、十分馴致したものであった。

試験処理は前節と同じく、TMR 不断給餌におけるトップドレス給与物の違いとし、しょうゆ油 400 g/日 + アルファルファミール 1600 g/日としたしょうゆ油区、大豆油 400 g/日 + アルファルファミール 1600 g/日とした大豆油区、アルファルファミール 1600 g/日とした対照区の 3 区設けた (Table 12)。油脂類はあらかじめアルファルファミールに吸着させ、1 日 2 回 (10.00 および 17.00 h) に半分量をトップドレス給与した。

採材

牧草サイレージ、トウモロコシ、大豆粕はサンプルを毎週採取した。牧草サイレージは 60℃ の通風乾燥機で 48 時間乾燥し DM を計測した。飼料は 1 mm のスクリーンを装着したカッティングミルを用いて粉碎し、その後の化学分析に用いた。

糞は全量を計量し、攪拌後その一部を分析試料とした。

化学分析および統計分析

飼料および糞のサンプルは、常法（NARO 2009）で分析し、各飼料成分の消化率および可消化養分を算出した。

データは反復のある 3×3 ラテン方格法として JMP(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて解析した。処理の効果が有意な場合、Tukey の多重比較検定により平均値の差を検定した。 $P < 0.05$ を有意と定義した。

3. 結果

しょうゆ油、あるいは大豆油の添加給与が DMI、および栄養摂取量に及ぼす影響を Table 15 に示す。DMI および粗飼料摂取割合に有意な差は認められなかった。しょうゆ油あるいは大豆油の添加給与により、EE 摂取割合は有意に高まり、CP 摂取割合は有意に低下した。

Table 15. Effect of feeding soy sauce oil or soybean oil on nutrient intake in dairy cows

	Treatment			SEM [†]
	Soy sauce oil	Soybean oil	Control	
Dry matter intake, kg	14.8	16.2	15.6	0.96
Grass silage / dry matter intake, %	43.5	44.3	45.4	0.59
Ether extract / dry matter intake, %	6.8 ^a	6.4 ^a	4.0 ^b	0.26
Crude protein / dry matter intake, %	14.2 ^b	14.2 ^b	14.5 ^a	0.01

[†] : Standard error of the mean.

^{a, b} : Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

しょうゆ油、あるいは大豆油の添加給与が成分消化率、および可消化養分総量に及ぼす影響を Table 16 に示す。しょうゆ油あるいは大豆油の添加給与により、EE 消化率は有意に高まった ($P < 0.05$)。その他の成分消化率に有意差は認められなかったものの、非繊維性炭水化物消化率

は油脂の添加給与で低下する傾向であった ($P = 0.06$)。しょうゆ油あるいは大豆油の添加給与により、可消化養分総量は有意に高まった ($P < 0.05$)。

Table 16. Effect of feeding soy sauce oil or soybean oil on component digestibility and total digestive nutrient in dairy cows

	Treatment			SEM [†]
	Soy sauce oil	Soybean oil	Control	
Digestibility, %				
Dry matter	70.2	70.6	70.5	0.88
Organic matter	73.0	73.5	73.3	0.89
Crude protein	66.0	66.0	67.2	0.97
Ether extract	88.4 ^a	88.7 ^a	83.1 ^b	0.43
Neutral detergent fiber	59.0	59.8	59.2	1.79
Non fiber carbohydrate ^{††}	88.0	88.4	90.1	0.58
Total digestible nutrient, %DM	74.3 ^a	74.3 ^a	71.1 ^b	0.83

[†] : Standard error of the mean.

^{††} : Organic matter - (Crude protein + Ether extract + Neutral detergent fiber).

^{a, b} : Means with different superscripts differ significantly ($P < 0.05$).

4. 考察

油脂の給与により飼料全体の炭水化物消化率、特に繊維消化率への悪影響が懸念されたが、中性デタージェント繊維消化率に油脂摂取による影響は認められなかった。一方、粗脂肪消化率は油脂の摂取により有意に高まり、可消化養分含量も有意に高まった (Table 16)。

Ueda ら (2003) は乳牛へ亜麻仁油 (リノール酸以外に α リノレン酸を多量に含有) を給与し、消化率に負の影響がなかったことを報告しており、しょうゆ油あるいは大豆油 (いずれもリノール酸含量が高い) の給与により消化率に負の影響が認められなかった本試験の結果を支持するものである。

一方、Ferlay と Doreau (1992) はナタネ油を乳牛のルーメン内に投与し、NDF 消化率の低下によって OM 消化率が低下することを報告している。脂質の給与がルーメン内発酵を阻害する理由としては、微生物に利用されないよう繊維質が脂質により物理的に覆われてしまう「コーティング説」と、微生物に対して脂質が直接阻害的に作用し微生物を減少させる説の 2 つが一般的である (小野寺ら 2004)。本試験においてルーメン内消化率は未検討であるが、試験 1、試験 2、試験 3 におけるルーメン内容液性状、すなわち発酵産物の大幅な減少がなかったとの結果から、しょうゆ油あるいは大豆油給与による明確な負の影響はなかったと推察される。これらは他の飼料油脂源と比較して、しょうゆ油の大きな優位性を示すものである。

大豆油など、一般的な植物性油脂はその大部分がトリグリセライドであるのに対し、しょうゆ油は脂肪酸エチルエステルや遊離脂肪酸の割合が高く、乳牛による利用性向上が考えられたが、しょうゆ油と大豆油の粗脂肪消化率および可消化養分総量を算出すると、しょうゆ油がそれぞれ 95.4、214%、大豆油がそれぞれ 97.4、219%となり、この値は日本標準飼料成分表における植物性油脂の値と同程度であった (NARO、2009)。これらのことから、しょうゆ油は EE 消化率と TDN 含量が高く、その値は大豆油と遜色ないことが確認され、乳牛用飼料として十分利用できると考えられた。

第 V 章 総合考察

乳牛の栄養要求量は泌乳能力の向上により高まり、乳量の多い泌乳初期は負のエネルギーバランスになりやすく、その程度が大きいと繁殖成績への負の影響を通じ、その後の生産性にも大きく負に影響する。高い要求量を充足する方法としては、DMI の向上や飼料の濃厚飼料割合を高めることが考えられる。しかしながら、乳牛の DMI には物理的な上限があり、反芻動物は一定割合の粗飼料を給与する必要がある。

乳牛のエネルギー摂取量を高めるうえで油脂給与が効果的ではあるが、その油脂源の多くは食用油脂と競合することから、丸大豆しょうゆの醸造副産物であるしょうゆ油に本研究では着目し、その乳牛用飼料としての特性について検討した。

油脂の給与はルーメン内発酵の抑制（Chalupa ら 1984; 1986）や繊維消化率の低下（Palmquist と Jenkins 1980）などの影響により DMI に負の影響を及ぼす可能性が考えられる。そこで第 II 章では、泌乳牛のルーメン内へしょうゆ油を大量投与が、乳牛の栄養生理、主にルーメン内発酵におよぼす影響について検討した〔試験 1〕。その結果、①乾物摂取量および乳量はしょうゆ油の投与による影響を受けないこと、②脂肪補正乳および乳脂肪率はしょうゆ油投与により低下すること、③ルーメン内発酵はしょうゆ油投与による明らかな阻害を受けないこと、④しょうゆ油の投与により乳脂肪中の CLA 割合、生乳中の CLA 含量は高まることを明らかにした。

これらの知見は、しょうゆ油が反芻動物用飼料の代替脂質エネルギー源になるとともに機能性脂肪酸として知られる乳中の CLA 含量を増強する可能性を示唆している。

一方しょうゆ油の投与により飼料摂取量は低下しなかったものの、乳脂肪率は低下した。一般的に、乳脂肪率の低下は、飼料中の粗飼料不足に起因するルーメンにおける酢酸生成量の減少によって説明されてきた (Woodford ら 1986)。本研究において、しょうゆ油の投与にともなうルーメン内の酢酸生成に見かけ上の障害がないにも関わらず、乳脂肪率は明らかに低下した。それゆえ、乳脂肪率の低下は、Bauman と Griinari (2003) が提唱する水素添加説 (Bio-hydrogenation theory) に起因すると考えられた。我が国の酪農産業において乳脂肪率の低下は乳代の低下を招き酪農経営の逼迫につながるため、乳脂肪率を大きく低下させないしょうゆ油の給与方法、すなわち適正な給与水準について検討をすすめる必要が提示された。

そこで第Ⅲ章では、乳脂肪率を大きく低下させずに乳中の CLA 含量を高めるしょうゆ油の投与量について、0 g、200 g、400 g あるいは 600 g/日という 4 水準を設け、反応を比較することで検討した [試験 2]。その結果、①しょうゆ油投与量の増加にともない、有意ではないものの、DMI は小さくなること、②乳量にしょうゆ油投与量の違いによる影響は認められなかったが、乳脂肪率はしょうゆ油の投与により低下傾向 ($P = 0.06$) を示し、投与量 600 g/日における低下は大きくなること、③しょうゆ油

投与量を 600 g/日まで高めるとルーメン内容液の酢酸濃度は低く推移すること、④ルーメン内容液、血液、および乳中のバクセン酸および CLA 濃度はしょうゆ油投与量の増加に伴い高まることを明らかにした。

これらのことからしょうゆ油の給与量を 400 g/日までとすれば乳脂肪率に大きな低下はなく、乳中の CLA 含量を高めることが可能であることが示唆された。

本試験結果で最も特徴的なことは、しょうゆ油投与時におけるルーメン内容液、血液および乳中の CLA 濃度が用量依存的に増加したことである。このことは、しょうゆ油の給与が CLA の健康増進作用を介して、生産物である生乳の消費者に有益な影響をおよぼすことを示唆する (Lock と Bauman 2004)。加えて、血清中の CLA、バクセン酸、およびリノール酸濃度は、サンプリング時間に関係なく極めて安定しており、これら脂肪酸が乳腺を含む家畜の組織全体に分配される可能性を示唆し、さらには乳中の CLA とバクセン酸がしょうゆ油の投与量に依存して増加する要因と考えられる。

試験 1 および 2 を通じて、しょうゆ油の乳牛用飼料としての利用には給与水準を 400 g/日以下とすることを明らかにしたが、いずれもルーメン内への直接投与条件での検討であった。そこで、第 IV 章では乳牛にしょうゆ油を経口摂取させた場合の飼料摂取量、ルーメン内発酵、乳量と乳成分、血液性状への影響を評価するとともに、栄養成分の消化率について、しょうゆ油の脂肪酸組成と類似する大豆油経口摂取時と比較する

ことを目的に、泌乳牛を用いた泌乳試験〔試験 3〕と乾乳牛を用いた消化試験〔試験 4〕を行った。

しょうゆ油あるいは大豆油 400 g/日をアルファルファミールに吸着させ、TMR へのトップドレス給与した結果、①しょうゆ油のルーメン内投与時と同様に、DMI、乳量および乳脂肪率に有意な差は認められないこと、②ルーメン内投与時と同様に、ルーメン内発酵への明確な負の影響はないこと、③乳脂肪中の CLA 割合および生乳中 CLA 含量はルーメン内投与した場合、また、同量の大豆油を経口摂取した場合と同程度になること、④しょうゆ油と大豆油の違いにかかわらず、油脂給与により EE 消化率は向上し、その他の成分消化率には影響せず、TDN 含量が高まること、⑤しょうゆ油と大豆油の EE 消化率および TDN 含量に違いはなく、その値は日本標準飼料成分表における植物性油脂（NARO 2009）と遜色ない値となることを明らかにした。

Shibata ら（2011）は、乳牛へしょうゆ油を 400 g/日を給与することにより、乳脂肪中の CLA 割合は、本試験とほぼ同水準の 1.01%（対照区 0.46%）へと増加することを示し、本試験の結果を支持するものである。さらに、Dhiman ら（2000）は、リノール酸に富む油脂の給与により乳脂肪中の CLA 含量が増加することを報告しており、同じくリノール酸に富むしょうゆ油および大豆油を投与した本試験結果を支持するものである。これらのことから、丸大豆しょうゆの副産物であるしょうゆ油はより安価でありながら、リノール酸含量の高い他の代表的な植物油と同様に、乳牛のルーメンおよび体内代謝をうけ、機能性脂肪酸の生成に貢献

する飼料源であることが明らかとなった。また摂取量を抑制することのない飼料エネルギー源としても評価されるものであった。しかしながら本研究においては、しょうゆ油給与により摂取飼料中 TDN 含量は高まったものの乳量の明確な増加は認められなかった。このことは、経産牛に比べて乳量水準の低い初産牛を供試したことが影響していた可能性が考えられる。より乳量水準が高く、エネルギーの摂取量が乳量の制限要因となりやすい条件において検討する必要があるかもしれない。

本研究では、しょうゆ油は EE 消化率および TDN 含量が高く、新たな乳牛用飼料源として利用できることを示したが、油脂給与時の乳タンパク質率の低下については留意する必要がある。事実、試験 3 においてはしょうゆ油あるいは大豆油の給与により乳タンパク質率は有意に低下した。乳脂肪合成のための脂肪酸利用の増加は、乳糖合成のためのグルコース利用を制限し、乳腺における血流とアミノ酸の取り込み量の増加を経ずに乳量と泌乳効率を高める (Cant ら、1993a,b)。したがって、油脂飼料給与時における CP 水準やバイパスタンパク質の利用についても検討する必要があるかもしれない。

摘 要

本研究は、丸大豆しょうゆ醸造副産物であるしょうゆ油を、新たな乳牛用油脂飼料源としてとらえ、その利用を図るため、乳牛へのしょうゆ油給与が乳牛の栄養生理におよぼす影響とその特性を明らかにすることを目的に実施した。得られた成果は以下のように要約される。

1. しょうゆ油の大量投与が乳牛におよぼす影響

摂取飼料中の EE 含量が 10%程度となるよう、しょうゆ油 1000 g/日を乳牛のルーメン内に投与し、DMI、乳生産、ルーメン内発酵、および血液性状におよぼす影響について検討した。

しょうゆ油の投与により乾物摂取量および乳量は影響を受けないこと、ルーメン内発酵は明らかな阻害を受けないこと、脂肪補正乳および乳脂肪率は低下するが乳脂肪中の CLA 割合および生乳中の CLA 含量は高まることを明らかにした。

このことからしょうゆ油は反芻動物用飼料の脂質エネルギー源として利用でき、乳中機能性脂肪酸 CLA を高めうると考えられた。

2. しょうゆ油の異なる水準での投与が乳牛におよぼす影響

しょうゆ油のルーメン内投与量を 4 水準設け (0、200、400 および 600 g/日)、DMI、乳生産、ルーメン内発酵、および血液性状におよぼす影響について検討した

しょうゆ油の投与量の増加にともない、乳量は影響を受けないが乳脂肪率は低下傾向を示すこと、投与量 600 g/日での乳脂肪率の低下は大きくルーメン内容液中の酢酸濃度が低く推移すること、ルーメン内溶液、血液および乳中の CLA 濃度はしょうゆ油の量に依存して高まることを明らかにした。

これらのことから、しょうゆ油の給与量を 400 g/日以下とすれば、乳脂肪率に大きな低下はなく、乳中の CLA 含量を高めうると考えられた。

3. 経口摂取させたしょうゆ油が乳牛および成分消化率におよぼす影響

アルファルファミールに吸着させたしょうゆ油あるいは大豆油を経口摂取させ泌乳試験と消化試験を行い、DMI、乳生産、ルーメン内発酵、血液性状、および消化率への影響について検討した

しょうゆ油の経口摂取が、飼料摂取量、乳生産、ルーメン内発酵、および血液性状におよぼす影響は CLA 増強効果も含めてルーメン内投与時と同様であること、その影響は大豆油経口摂取においても同程度であること、しょうゆ油の EE 消化率 TDN 消化率は大豆油と遜色ないことを明らかにした。

4. 以上から、しょうゆ油は EE 消化率および TDN 含量が高く、新たな乳牛用飼料源として利用できるものと評価した。乳牛へのしょうゆ油の給与はルーメン内発酵を著しく阻害しないものの、乳脂肪率を低下させるが、しょうゆ油の給与量を 400 g/日までとすれば、乳脂肪率に大きな

低下はなく、乳中 CLA 含量を高められる。つまり、エネルギー源としてばかりでなく、生産物（生乳）の機能性の向上を期待できる新しい飼料素材になりうると評価した。

謝 辞

本研究をとりまとめるにあたり、終始懇切なるご指導を賜り、かつご校閲の労をお取りいただいた北海道大学大学院農学研究院教授小林泰男博士には衷心からの感謝の意を表する。また、北海道大学大学院農学研究院教授上田宏一郎博士、同准教授小池聡博士には、ご校閲の労をお取りいただき、有益な助言を賜った。ここに深甚なる謝意を表する。

本研究は、北海道立総合研究機構酪農試験場で実施されたものであり、研究機関に在任された前田善夫氏、扇勉氏、三木直倫氏、大坂郁夫氏、高橋雅信氏、西村和行氏、本郷泰久氏から多大なるご助言およびご協力をいただいた。本研究で用いたしょうゆ油については、明治飼糧株式会社からご提供いただいた。供試牛の管理については、酪農試験場の研究支援職員諸氏、飼料分析については酪農試験場契約職員諸氏、予算執行等の事務手続きについては酪農試験場総務課職員諸氏に甚大なるご協力をいただいた。ここに、各位と供試された全ての動物に深く感謝の意を表する。

引用文献

- Aii T, Takahashi S, Kurihara M, Kume S. 1988. Fatty acid composition of milk during a hot summer. *Jpn J Zootech Sci.* 59: 278-284.
- Allen MS. 2000. Effects of diet on short-term regulation of feed intake by lactating dairy cattle. *J Dairy Sci.* 83: 1598-1624.
- Avila CD, DePeters EJ, Perez-Monti H, Taylor SJ, Zinn RA. 2000. Influences of saturation ratio of supplemental dietary fat on digestion and milk yield in dairy cows. *J Dairy Sci.* 83: 1505-1519.
- Bateman HG, Jenkins TC. 1998. Influence of soybean oil in high fiberdiets fed to nonlactating cows on ruminal unsaturated fatty acids and nutrient digestibility. *J Dairy Sci.* 81: 2451-2458.
- Bauman DE, Griinari JM. 2003. Nutritional regulation of milk fat synthesis. *Annu Rev Nutr.* 23: 203-227.
- Baumgard LH, Corl BA, Dwyer DA, Sæbø A, Bauman DE. 2000. Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 278: R179-R184.
- Boerman JP, Firkins JL, St-Pierre NR, Lock A. 2015. Intestinal digestibility of long-chain fatty acids in lactating dairy cows: A meta-analysis and meta-regression. *J Dairy Sci.* 98: 8889-8903.
- Britt JH. 1992. Reproductive performance as affected by nutrition

- and environment. Proc. For 3rd Florida ruminant nutrition symposium. pp 93-101.
- Butler WR, Smith RD. 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproductive function in dairy cattle. J Dairy Sci. 72: 767-783.
- Cant JP, Depeters EJ, Baldwin RL. 1993a. Mammary amino acid utilization in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. J Dairy Sci. 76: 762-774.
- Cant JP, Depeters EJ, Baldwin RL. 1993b. Mammary uptake of energy metabolites in dairy cows fed fat and its relationship to milk protein depression. J Dairy Sci. 76: 2254-2265.
- Chalupa W, Rickabaugh B, Kronfeld DS, Sklan D. 1984. Rumen fermentation in vitro as influenced by long chain fatty acids. J Dairy Sci. 67: 1439-1444.
- Chalupa W, Vecchiarelli B, Elser AE, Kronfeld DS, Sklan D, Palmquist DL. 1986. Ruminal fermentation in vivo as influenced by long-chain fatty acids. J Dairy Sci. 69: 1293-1301.
- Chilliard Y, Ferlay A, Doreau M. 2001. Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diet on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. Livest Prod Sci. 70: 31-48.
- Chouinard PY, Corneau L, Butler WR, Chilliard Y, Drackley JK,

- Bauman DE. 2001. Effect of dietary lipid source on conjugated linoleic acid concentrations in milk fat. *J Dairy Sci.* 84: 680-690.
- Christie WW. 1982. A simple procedure for rapid transmethylation of glycerolipids and cholesteryl esters. *J Lipid Res.* 23: 1072-1075.
- de Veth MJ, Griinari JM, Pfeiffer AM, Bauman DE. 2004. Effect of CLA on milk synthesis in dairy cows: comparison of inhabitation by methyl esters and free fatty acids, and relationships among studies. *Lipids.* 39: 365-372.
- Dhiman TR, Satter LD, Pariza MW, Galli MP, Albright K, Tolosa MX. 2000. Conjugated linoleic acid (CLA) content of milk from cows offered diets rich in linoleic and linolenic acid. *J Dairy Sci.* 83: 1016-1027.
- Drackley JK, Klusmeyer TH, Trusk AM, Clark JH. 1992. Infusion of long-chain fatty acids varying in saturation and chain length the abomasum of lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 75: 1517-1526.
- Doreau M, Legay F, Bauchart D. 1991. Effect of source and level of supplemental fat on total and ruminal organic matter and nitrogen digestion in dairy cows. *J Dairy Sci.* 74: 2233-2242.
- Ferlay A, Doreau M. 1992. Influence of method of administration of rapeseed oil in dairy cows. 1. Digestion of nonlipid components. *J Dairy Sci.* 75: 3020-3027.
- Glasser F, Schmidely P, Sauvant D, Doreau M. 2008. Digestion of

- fatty acids in ruminants: a meta-analysis of flows and variation factors: 2. C18 fatty acids. *Animal*. 2: 691-704.
- Griinari JM, Corl BA, Lacy SH, Chouinard PY, Nurmela KVV, Bauman DE. 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by $\Delta 9$ -desaturase. *J Nutr*. 130: 2285-2291.
- 北海道酪農検定検査協会. 年間検定成績
- Huang Y, Schoonmaker JP, Bradford BJ, Beitz DC. 2008. Response of milk fatty acid composition to dietary supplementation of soy oil, conjugated linoleic acid, or both. *J Dairy Sci*. 91: 260-270.
- Jenkins TC. 1993. Lipid metabolism in the rumen. *J Dairy Sci*. 76: 3851-3863.
- Jenkins TC, Bridges WC. 2007. Protection of fatty acids against ruminal biohydrogenation in cattle. *European journal of lipid science and technology*. 109: 778-789.
- Kelly ML, Kolver ES, Bauman DE, Van Amburgh ME, Muller LD. 1998. Effect of intake of pasture on concentrations of conjugated linoleic acid in milk of lactating cows. *J Dairy Sci*. 81: 1630-1636.
- Kepler CR, Tove SB. 1967. Biohydrogenation of unsaturated fatty acids. *J Biol Chem*. 242: 5686-5692.
- Lock AL, Bauman DE. 2004. Modifying milk fat composition of dairy cows to enhance fatty acids beneficial to human health. *Lipids*. 39: 1197-1206.

- Loor JJ, Ferlay A Ollier A, Doreau M, Chilliard Y. 2005. Relationship among trans and conjugated fatty acids and bovine milk fat yield due to dietary concentrate and linseed oil. J Dairy Sci. 88: 726-740.
- Loor JJ, Ueda K, Ferlay A, Chilliard Y, Doreau M. 2004. Biohydrogenation, duodenal flow, and intestinal digestibility of trans fatty acids and conjugated linoleic acids in response to dietary forage:concentrate ratio and linseed oil in dairy cows. J Dairy Sci. 87: 2472-2485.
- Moallem U, Katz M, Arieli A, Lehrer H. 2007. Effect of peripartum propylene glycol or fats differing in fatty acid profiles on feed intake, production, and plasma metabolites in dairy cows. J Dairy Sci. 90: 3846-3856.
- Moate PJ, Chalupa W, Jenkins TC, Boston RC. 2004. A model to describe ruminal metabolism and intestinal absorption of long chain fatty acids. Anim Feed Sci Technol. 112: 79-105.
- 文部科学省. 2015. 日本食品標準成分表（七訂）脂肪酸成分表編.
- National Agriculture and Food Research Organization (NARO). 2009. Standard Tables of Feed Composition in japan (2009). Tokyo: Japan livestock industry association.
- Obara Y. 2006. Foundation and Application of Ruminology. Tokyo: Rural Culture Association.

- 小野寺良次．2004．新ルーメンの世界．微生物生態と代謝制御 第3章
ルーメン内における栄養素の代謝と栄養生理 4.脂質の代謝と栄養
生理 (5)ルーメン発酵に及ぼす飼料中脂質の影響．P373-376．農山
漁村文化協会．東京．
- O'Shea M, Lawless F, Stanton C, Devery R. 1998. Conjugated linoleic
acid in bovine milk fat: a food-based approach to cancer
chemoprevention. Trends Food Sci Technol. 9: 192-196.
- Palmquist DL. 1991. Influence of source and amount of dietary fat on
digestibility in lactating cows. J Dairy Sci. 74: 1354-1360.
- Palmquist DL, Jenkins TC. 1980. Fat in lactation rations. J Dairy Sci.
63: 1-14.
- Parodi PW. 1997. Cows' milk fat components as potential
anticarcinogenic agents. J Nutr. 127: 1055-1060.
- Perfield II JW, Lock AL, Griinari JM, Sæbø A, Delmonte P, Dwyer DA,
Bauman DE. 2007. Trans-9, cis-11 conjugated 328 linoleic acid
reduced milk fat synthesis in lactating dairy cows. J Dairy Sci.
90: 2211-2218.
- Rabiee AR, Breinhild K, Scott W, Golder HM, Block E, Lean IJ. 2012.
Effect of fat additions to diets of dairy cattle on milk production
and components: A meta-analysis and meta-regression. J Dairy
Sci. 95: 3225-3247.
- Rodrigues JPP, de Paul RM, Rennó LN, Fontes MMS, Machado AF,

- Valadares Filho SC, Huhtanen P, Marcondes MI. 2017. Short-term effects of soybean oil supplementation on performance, digestion, and metabolism in dairy cows fed sugarcane-based diets. *J Dairy Sci.* 100: 4435-4447.
- Sæbø A, Sæbø PC, Griinari JM, Shingfield KJ. 2005. Effect of abomasal infusion of geometric isomers of 10, 12 conjugated linoleic acid on milk fat synthesis in dairy cows. *Lipids.* 40: 823-832.
- Schauff DJ, Clark JH. 1992. Effects of feeding doets containing calcium salts of long-chain fatty acids to lactating dairy cows. *J Dairy Sci.* 75: 2990-3002.
- Shibata H, Hashizume N, Gazi MR, Sera K, Kato E, Ohmori T, Kanbe M, Obara Y, Kanda S, Kurokawa Y, Itabashi H. 2011. Effect of supplementation of soy sauce oil and Ca salts of fatty acids on rumen fermentation, milk production and conjugated linoleic acid in milk of dairy cows. *Anim Sci J.* 82: 554-559.
- Sklan D, Budowski P. 1974. Desaturation and saturation of fatty acids by sheep rumen bacteris: Optimal conditions and cofactor requirements. *J Dairy Sci.* 57: 56-60.
- Subcommitee on Dairy Cattle Nutrition, National Research Council. Nutrient requirements of dairy cattle. 7th ed. 2001. Washington, DC: National Academy Press.

- Sultana H, Ishida T, Shintaku T, Kanda S, Itabashi H. 2008. Effect of feeding Ca-salts of fatty acids from soybean oil and linseed oil on c9, t11-CLA production in ruminal fluid and milk of Holstein dairy cows. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 21: 1262-1270.
- Suto T. 1973. *The Clinical Investigation of the Bovine*. Nosangyoson Bunka Kyokai, Tokyo. Japan.
- 田淵賢治, 野崎宏. 2011. 醬油油 5%添加飼料給与が肥育豚の発育と肉質に及ぼす影響. *香川畜試報告*. 46: 19-23.
- Tanaka K. 2004. Lipid metabolism and nutritional physiology, pp.355-387. In *The World of the Rumen*, Onodera R & Itabashi H eds, Nosan Gyoson Bunka Kyokai. Tokyo.
- Toral PG, Monahan FJ, Hervás G, Frutos P, Moloney AP. 2018. Review: Modulating ruminal lipid metabolism to improve the fatty acid composition of meat and milk. Challenges and opportunities. *Animal*. 12: s272-s281.
- Ueda K, Ferlay A, Chabrot J, Looor JJ, Chilliard Y, Doreau M. 2003. Effect of linseed oil supplementation on ruminal digestion in dairy cows fed diets with different forage:concentrate ratios. *Journal of Dairy Science*. 86: 3999-4007.
- Urrutia N, Bomberger R, Matamoros C, Harvatine KJ. 2019. Effect of dietary supplementation of sodium acetate and calcium butyrate

- on milk fat synthesis in lactating dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 102: 5172-5181.
- Viswanadha S, Giesy JG, Hanson TW, McGuire MA. 2003. Dose response of milk fat to intravenous administration of the trans-10, cis-12 isomer of conjugated linoleic acid. *J Dairy Sci*. 86: 3229-3236.
- Weatherburn MW. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Anal Chem*. 39: 971-974.
- Weisbjerg MR, Børsting R, Hvelplund T. 1992. Fatty acid metabolism in the digestive tract of lactating cows fed tallow in increasing amounts at two feed levels. *Acta Agric Scand, Sect A, Animal Sci*. 42: 106-114.
- Woodford JA, Jorgensen NA, Barrington GP. 1986. Impact of dietary fiber and physical form on performance of lactating dairy cows. *J Dairy Sci*. 69: 1035-1047.
- Wu Z, Huber JT. 1994. Relationship between dietary fat supplementation and milk protein concentration in lactating cows: A review. *Livest Prod Sci*. 39: 141-155.