泌乳牛における産次・乳期の違いがインスリンの分泌 反応および抵抗性に及ぼす影響

五箇大成・戸田克史¹・野中最子²・樋口浩二³・
Agung PURNOMOADI⁴・永西 修²・寺田文典⁵

富山県技術推進課, 富山市 930-8501

¹ 愛媛県畜産課, 松山市 790-8570

² 畜産草地研究所, 茨城県筑波農林研究団地 305-0901

³ 秋田経済法科大学短期大学部, 秋田市 010-8515

⁴ Faculty of Animal Science, Diponegoro University, Tembalang Campus, Semarang, 50275, Indonesia

⁵ 農業技術研究機構本部, 茨城県筑波農林研究団地 305-8517

(2002. 11. 7 受付, 2003. 6. 3 受理)

要 約 乳牛における産次・乳期による乳生産量の違いに対するインスリンの調節作用について検討するため, 泌乳初期 (5 週) の初産牛 (5 頭) および経産牛 (9 頭), 泌乳後期 (30~33 週) の経産牛 (4 頭) を供試し, グルコース (0.1 g/kgBW), インスリン (0.2 IU/kgBW) を頸静脈より投与し, 投与前後の血漿インスリン, グルコース濃度を測定した. その結果, 泌乳初期の乳量は, 初産で経産より有意に少なく ($P<0.01$), 経産牛の乳量は, 泌乳後期で初期より有意に少なかった ($P<0.01$). グルコース刺激インスリン分泌反応は, 初産泌乳初期で, 経産泌乳初期より有意に大きく ($P<0.01$), インスリン基礎濃度も, 初産泌乳初期および経産泌乳後期で, 経産泌乳初期より有意に高かった ($P<0.05$). また, インスリン刺激グルコース減少反応は, 経産泌乳後期で初産および経産泌乳初期より有意に大きかった ($P<0.05$). 以上の結果から, 産次・乳期による乳生産量の違いに, インスリンによる調節が働いている可能性が示唆された.

日本畜産学会報, 74 (3) : 349-354, 2003

乳牛は, 産次によって乳量に差があり, 初産牛では乳量が少なく, 経産牛では乳量が多いことが知られている. また, 乳期によっても乳量に差があり, 泌乳初期では, 乾物摂取量は少ないものの, 乳量が最大になり, 泌乳中期では, 乾物摂取量は増えるが, 乳量は減少し, 泌乳後期には, さらに乳量が減少する (Hart ら 1978 ; Vasilatous と Wangsness 1981) ことが知られている.

こうした産次・乳期による乳生産量の違いには, 代謝を調節するホルモンによる栄養素配分の調節作用が関係している可能性がある.

この栄養素配分の調節において, インスリンが重要な役割をする可能性がある. インスリンは, 代謝において同化作用を持ち, 反芻動物においては, 糖新生と肝臓からのグルコースの放出に対する抑制効果 (Prior と Christenson 1978), および脂肪合成の促進と脂肪分解抑制効果を持つ (Bauman 1976). また, 脂肪組織における酢酸の利用を強く刺激すること (Yang と Baldwin 1973) が報告されている.

さらに, インスリン濃度と乳量は負の相関を示し

(Kaprowski と Tucker 1973), 乳量の多いウシでは血中のインスリン濃度が低く, 乳量の少ないウシでは高いこと (Hart ら 1978), 泌乳開始にともないインスリン濃度およびグルコース刺激インスリン分泌反応が低下すること (Sartin ら 1985), 泌乳牛へのインスリン投与は乳量を減少させること (Kronfeld ら 1963) が報告されている.

しかし, インスリン分泌反応, 基礎濃度, 抵抗性について産次間および産次・乳期間の両方で比較した報告は無い.

そこで, 産次・乳期の異なる泌乳牛のインスリン分泌反応, 基礎濃度, 抵抗性を調べ, 産次・乳期による乳生産量の違いに対するインスリンの調節作用の可能性について検討した.

材料および方法

独立行政法人畜産草地研究所繋養のホルスタイン種で, 泌乳初期 (分娩後 5 週 : 37~39 日) の初産牛 (5 頭) および経産牛 (9 頭 : 2~5 産), 泌乳後期 (分娩後 30~33 週 : 212~233 日) の経産牛 (4 頭 : 2~7 産) を供試した.

連絡者 : 五箇大成 (fax : 076-444-4409, e-mail : taisai.goka@pref.toyama.lg.jp)

経産泌乳後期牛については乳量（乳量 20 kg/日以上，乳脂肪率 3.0%以上）が減少傾向にあり，体重が増加傾向にある個体を選んだ．供試牛はスタンション牛舎にて飼育した．

試験は 1998 年 10 月 23 日～12 月 18 日，1999 年 10 月 1 日～12 月 23 日の 2 期間に行った．

泌乳初期の供試牛には分娩後 TMR（1998 年：濃厚飼料＋コーンサイレージ＋チモシー乾草，1999 年：濃厚飼料＋コーンサイレージ＋イタリアンライグラスサイレージ）を 9：00，11：30，18：30 に給与し自由採食させた．泌乳後期の供試牛には試験開始 4 日前から日本飼養標準（農林水産技術会議事務局編 1999）により算出した TDN 要求量の 110% 量の濃厚飼料，コーンサイレージ，ヘイキューブ（2 kg/日）を 9：00，18：30 に給与した．搾乳は 2 回/日，8：30，18：00 に行った．

少なくとも試験開始の前日までに採血・注入用のカテーテルを頸静脈に挿入し，試験終了まで保持した．注入試験当日は 3：30 に残飼を除去した．グルコースの注入は 5：00 とし，採血は 4：30 から 8：00 まで行った．採血は，グルコースの注入時刻を 0 分とすると，－30，－15，0，5，10，15，20，30，45，60，90，120，150，180 分に行った．グルコースは 50% 溶液（大塚製薬，東京）を用い，0.1 g/kg BW 量を 4 分間かけて頸静脈カテーテルから注入した．体重は 8：30 の搾乳直後，毎日測定し，グルコース注入量は試験前日までの 3 日間の平均体重を用いて計算した．採血は 1 回 5 ml/行い，ヘパリンナトリウムを添加した試験管に採り，速やかに冷却した．血液は冷却遠心（3000 rpm，4℃，10 分）して血漿を分離し，分析まで－40℃で保存した．

インスリンの注入試験はグルコース注入試験日から少なくとも 2 日間空けて行った．インスリン（h-insulin：ノボリン R 注 山之内製薬，東京）は 0.2 IU/kg BW を滅菌した生理食塩水で 3 ml に希釈し，頸静脈カテーテルより速やかに注入した．その他の試験方法はグルコース注入時と同様とした．

血漿グルコース濃度はグルコースオキシダーゼを用いた酵素法（1998 年：グルコーステスト II-HA テストワコー 和光純薬工業，大阪，1999 年：グルコース B-テストワコー 和光純薬工業）で測定した．血漿インスリン濃度は 1998 年のサンプルは EIA 法（INSULIN-MP「三井」(株)カynos，東京）で，1999 年のサンプルは RIA 法（インスリンキット 栄研化学工業，沼津）で測定した．なお，インスリン濃度測定時の EIA 法，RIA 法については，本試験の測定値の範囲において，その相関が高い（ $r=0.9887$ ）（(株)カynos）．

グルコース刺激インスリン分泌反応とインスリン刺激グルコース減少反応は，グルコース，インスリン注入前の－30～0 分の血漿インスリン，グルコース濃度を基礎濃度として，それぞれ血漿中の濃度が基礎濃度に戻るま

での注入後 45 分，180 分までに増加あるいは減少した部分の面積（AUC, area under curve）を算出し，比較した．

体重，乳量，TDN 充足率，血漿インスリンおよびグルコースの基礎濃度，注入前後の各時間の血漿インスリンおよびグルコース濃度，AUC のデータの統計解析は，SAS の GLM プロシジャを利用し（SAS インスティテュートジャパン 1990），産次・乳期を処理因子とし，年次をブロックとした乱塊法により行い（応用統計ハンドブック編集委員会編 1980），年次の違いに由来する効果（分析法，環境，飼料条件など）を排除した．さらに，F 検定により有意な場合については，産次・乳期間の差を SAS Contrast Statement を用いて検討した．

結 果

体重，乳量，TDN 充足率

試験時の平均体重は，初産泌乳初期で経産泌乳初期および泌乳後期と比較して有意に小さかった（ $P<0.01$ ）．また，試験時の乳量は，各区間に有意な差があり，泌乳初期では，初産で経産と比較して有意に少なく（ $P<0.01$ ），経産牛では，泌乳後期で泌乳初期と比較して有意に少なかった（ $P<0.01$ ）．

日本飼養標準（農林水産技術会議事務局編 1999）に基づいて求めた試験時の TDN 充足率は，各区間に有意な差は無かった（表 1）．

血漿インスリンおよびグルコース基礎濃度

グルコースおよびインスリン注入の両試験における血漿インスリン基礎濃度は，初産泌乳初期および経産泌乳後期で経産泌乳初期と比較して有意に高かった（ $P<0.05$ ）（表 1）．

同じく両試験における血漿グルコース基礎濃度は，初産泌乳初期および経産泌乳後期で経産泌乳初期と比較して有意に高かった（ $P<0.01$ ）（表 1）．

グルコース注入が血漿インスリン濃度に及ぼす影響

グルコース注入後，血漿インスリン濃度は速やかに上昇し，初産および経産泌乳初期で注入 5 分後に，経産泌乳後期で注入 10 分後に最高値に達した．その後，血漿インスリン濃度は減少し，各区とも注入 45 分後には，ほぼグルコース注入前のレベルに回復した．

血漿インスリン濃度を注入前後の各時間で比較すると，注入前－30～0 分では，各区間で有意な差は無かった．注入後 5～10 分には，初産泌乳初期で経産泌乳初期および泌乳後期と比較して，注入後 15 分には，初産泌乳初期で経産泌乳初期と比較して有意に高かった（ $P<0.05$ ）．また，注入後 20～45 分では，初産泌乳初期および経産泌乳後期で経産泌乳初期と比較して有意に高かった（ $P<0.05$ ）（図 1）．

グルコース刺激インスリン分泌反応を AUC で比較したところ，初産泌乳初期で経産泌乳初期と比較して有意に大きかった（ $P<0.01$ ）（表 1）．

インスリン注入が血漿グルコース濃度に及ぼす影響

インスリン注入後、血漿グルコース濃度は速やかに減少し、初産泌乳初期で注入 30 分後に、経産泌乳初期および泌乳後期で注入 45 分後に最低値に達した。その後、血漿グルコース濃度は増加し、初産泌乳初期では注入 150 分後に、経産泌乳初期および泌乳後期では注入 180 分後にそれぞれインスリン注入前のレベルに回復した。

血漿グルコース濃度を注入前後の各時間で比較すると、注入前-30～-15 分では、初産泌乳初期および経産泌乳後期で経産泌乳初期と比較して有意に高く、0 分には、経産泌乳後期で経産泌乳初期と比較して有意に高かった ($P<0.05$)。注入後 5 分では、経産泌乳後期で経産泌乳初期と比較して、注入後 10 分には、初産泌乳初期および経産泌乳後期で経産泌乳初期と比較して、注入後

Table 1. Number of dairy cows, weeks of postpartum, body weight, milk yield, basal concentration of plasma insulin and glucose, insulin AUC (area under curve) and glucose AUC

Parity Lactation	Primiparous Early	Multiparous		Pr>F
		Early	Late	
n=(1998,1999)	5 (3, 2)	9 (4, 5) ¹⁾	4 (4, 0) ²⁾	—
Week (postpartum)	5	5	30~33	—
Body weight (kg)	507±9 ^{A3),4)}	579±10 ^B	635±25 ^B	0.001>
Milk yield (kg/day)	26.5±1.8 ^{Aa}	36.0±2.2 ^B	19.0±1.4 ^{Ab}	0.001>
TDN intake/requirement (%)	93.8±2.8	101.0±2.8	109.1±8.7	0.257
Insulin (μ IU/m)	9.09±2.05 ^a	6.11±0.61 ^b	8.35±1.25 ^a	0.045
Glucose (mg/dl)	67.73±1.63 ^A	58.68±0.88 ^B	64.73±1.34 ^A	0.001
Insulin AUC (μ IU/m $\cdot$ min)	1492±199 ^A	610±120 ^B	880±157 ^{AB}	0.004
Glucose AUC (mg/d $\cdot$ min)	3227±241 ^a	3259±128 ^a	4414±520 ^b	0.023

¹⁾ 2nd parity (n=3 (0, 3)), 3rd (n=3 (3, 0)), 4th (n=2 (0, 2)), 5th (n=1 (1, 0)).

²⁾ 2nd parity (n=1 (1, 0)), 4th (n=1 (1, 0)), 6th (n=1 (1, 0)), 7th (n=1 (1, 0)).

³⁾ Mean±SEM.

⁴⁾ Different superscripts are statistically significant at 1% (A, B) or 5% (a, b) level.

Fig. 1. Effects of intravenous glucose injection on plasma insulin concentration in dairy cows ($\blacktriangle$: primiparous early lactation, $\bullet$: multiparous early lactation, $\blacksquare$: multiparous late lactation). Vertical lines are representative SEM.

Peak concentration of insulin in response to glucose injection was 88.6, 39.3, 44.1 μ IU/m in primiparous early lactation, multiparous early lactation and multiparous late lactation, respectively.

Different superscripts are statistically significant ($P<0.05$).

Fig. 2. Effects of intravenous insulin injection on plasma glucose concentration in dairy cows (▲ : primiparous early lactation, ● : multiparous early lactation, ■ : multiparous late lactation). Vertical lines are representative SEM.

Minimum concentration of glucose in response to insulin injection was 29.4, 25.6, 23.1 mg/dl in primiparous early lactation, multiparous early lactation and multiparous late lactation, respectively.

Different superscripts are statistically significant ($P < 0.05$).

45～60 分には、初産泌乳初期で経産泌乳初期と比較して有意に高かった ($P < 0.05$) (図 2)。

インスリン刺激グルコース減少反応を AUC で比較したところ、経産泌乳後期で初産および経産泌乳初期と比較して有意に大きかった ($P < 0.05$) (表 1)。

考 察

試験の結果、TDN 充足率については、産次・乳期で有意な差はなかったものの、乳量については、産次・乳期で有意な差があり、泌乳初期では、初産で経産と比較して有意に少なく、経産牛では、泌乳後期で泌乳初期と比較して有意に少なかった。

また、グルコース刺激に対するインスリン分泌反応は、初産泌乳初期で経産泌乳初期と比較して有意に大きく、血漿インスリン基礎濃度も、初産泌乳初期および経産泌乳後期で経産泌乳初期と比較して有意に高く、インスリン刺激に対するグルコースの減少反応は、経産泌乳後期で初産および経産泌乳初期と比較して有意に大きかった。

本試験結果は、産次・乳期によるインスリンの分泌反応、基礎濃度、抵抗性の違いによって、初産泌乳初期および経産泌乳後期における乳生産量が少なくなる可能性を示唆している。

つまり、泌乳初期における初産と経産を比較すると、初産では、経産と比較してインスリン分泌反応が大きくなり、血漿インスリン基礎濃度も高いため、栄養素の配分

が体蓄積（同化）の方向へ促進されるとともに、体組織の動員が抑制され、結果として、乳生産に配分される栄養素が少なくなるため、経産と比較して乳生産量が少なくなった可能性がある。

また、経産における泌乳初期と泌乳後期を比較すると、泌乳後期では、泌乳初期と比較してインスリン分泌反応に差はないが、血漿インスリン基礎濃度が高く、インスリンに対する抵抗性も小さいため、栄養素の配分が体蓄積（同化）の方向へ促進されるとともに、体組織の動員が抑制され、結果として、乳生産に配分される栄養素が少なくなるため、泌乳初期と比較して乳生産量が少なくなった可能性がある。

本試験においては、BCS (Body condition score) や血中 NEFA 濃度を測定しなかったため、経産泌乳初期において、乳生産のために体組織が動員されたかは考察できない。

しかし、乳牛において、初産と経産では泌乳初期の体組織の動員に差があり、乳量の少ない初産では、BCS の減少が小さく、乳量の多い 2 産目以降の経産では、BCS の減少は大きいこと (Gallo ら 1996)、泌乳初期は乳生産量が多いため大量の栄養が必要になる (Young 1977 ; Bauman と Currie 1980 ; Mepharm 1982) もの、養分摂取量が十分ではないため、栄養出納が負になり、これを補うため体組織から栄養を動員すること (Belyea ら 1978 ; Bauman と Currie 1980 ; Bines と Hart 1982)、産次に関係なく、補正乳量の大きいものほど BCS の減少

が大きいこと (Gallo ら 1996) が報告されており, 本試験においても, 経産泌乳初期において, 体組織の動員により栄養素が供給され, 結果として, 乳生産量が多くなったものと考えられる。

このような経産泌乳初期における体組織の動員には, 体組織の動員の抑制作用を持つインスリンが関与すると考えられるが, 体組織の動員を積極的に促進する因子も関与することが推察される。

この体組織の動員を促進する因子のひとつとして, 成長ホルモンが考えられる。成長ホルモンは脂肪分解を促進し, 糖新生を強く刺激する作用を持つ (Bines と Hart 1982) ことが知られている。さらに, 成長ホルモンは, 乳生産と正の相関を持ち, 低泌乳牛に比べ, 高泌乳牛では成長ホルモン濃度が高く (Hart ら 1978), 乳生産の大きい泌乳初期には濃度が上昇し (Smith ら 1975 ; Hart ら 1978 ; Vasilatos と Wangsness 1981 ; Sartin ら 1985), 乳期が進むと減少すること (Kaprowski と Tucker 1973 ; Smith ら 1975 ; Hart ら 1978 ; Vasilatos と Wangsness 1981), 成長ホルモンの投与によって採食量の変化なしに乳生産量を増加させること (Machlin 1973) が報告されている。

こうした報告から考えると, 本試験で検証したインスリン以外に成長ホルモンも, 栄養素配分と体組織の動員を調節し, 泌乳牛の産次・乳期による乳生産量の違いに関係しているものと考えられ, 今後, インスリン以外に, 成長ホルモンの動態, インスリンとの相互作用を含めた研究が重要であると考えられる。

謝 辞

本研究を進めるにあたり, 実験動物の飼養管理に協力を頂いた独立行政法人畜産草地研究所業務第 1 科の職員各位に深く感謝いたします。

文 献

Bauman DE. 1976. Intermediary metabolism of adipose tissue. *Federation Proceedings*, 35 : 2308-2313.
 Bauman DE, Currie WB. 1980. Partitioning of nutrients during pregnancy and lactation. *Journal of Dairy Science*, 63 : 1514-1529.
 Belyea RL, Frost GR, Martz FA, Clark JL, Forkner LG. 1978. Body composition of dairy cattle by potassium-40 liquid scintillation detection. *Journal of Dairy Science*, 61 : 206-211.

Bines JA, Hart IC. 1982. Metabolic limits to milk production, especially roles of growth hormone and insulin. *Journal of Dairy Science*, 65 : 1375-1389.
 Gallo L, Carnier P, Mantovani R, Bailoni L, Contiero B, Bittante G. 1996. Change in body condition score of Holstein cows as affected by parity and mature equivalent milk yield. *Journal of Dairy Science*, 79 : 1009-1015.
 Hart IC, Bines JA, Morant SV, Ridley JL. 1978. Endocrine control of energy metabolism in the cow : comparison of the levels of hormones. (prolactin, growth hormone, insulin, and thyroxine) and metabolites in high- and low-yielding cattle at various stage of lactation. *Journal of Endocrinology*, 77 : 333-345.
 Kaprowski JA, Tucker HA. 1973. Bovine serum growth hormone, corticoids and insulin during lactation. *Endocrinology*, 93 : 645-651.
 Kronfeld DS, Mayer GP, Robertson JM, Raggi F. 1963. Depression of milk secretion during insulin administration. *Journal of Dairy Science*, 46 : 559-564.
 Machlin LJ. 1973. Effect of growth hormone on milk production and feed utilization in dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 56 : 575-580.
 Mepharm TB. 1982. Amino acid utilization by lactating mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 65 : 287-298.
 農林水産技術会議事務局編. 1999. 日本飼養標準・乳牛 (1999 年版). 中央畜産会. 東京.
 応用統計ハンドブック編集委員会編. 1980. 応用統計ハンドブック. 養賢堂. 東京. 202-210.
 Prior RL, Christenson RK. 1978. Insulin and glucose effects on glucose metabolism in pregnant and nonpregnant ewes. *Journal of Animal Science*, 46 : 201-210.
 Sartin JL, Cummins KA, Kemppainen RJ, Marple DN, Rahe CH, Williams JC. 1985. Glucagons, insulin, and growth hormone responses to glucose infusion in lactating dairy cow. *American Journal of Physiology*, 248 : 108-114.
 SAS インスティテュートジャパン. 1995. SAS/STAT ユーザーズガイド, Release 6.03 ed. 569-666. SAS 出版局. 東京.
 Smith RD, Hansel W, Coppock CE. 1975. Plasma growth hormone and insulin during early lactation in cows fed silage based diets. *Journal of Dairy Science*, 59 : 248-254.
 Vasilatos R, Wangsness PJ. 1981. Diurnal variations in plasma insulin and growth hormone associated with two stage of lactation in high producing dairy cows. *Endocrinology*, 108 : 300-304.
 Yang YT, Baldwin RL. 1973. Preparation and metabolism of isolated cells from bovine adipose tissue. *Journal of Dairy Science*, 56 : 350-365.
 Young JW. 1977. Gluconeogenesis in cattle : Significance and Methodology. *Journal of Dairy Science*, 60 : 1-15.

Effect of Parity and Stage of Lactation on Insulin Secretion and Insulin Tolerance in Dairy Cows

Taisei GOKA, Katsufumi TODA¹, Itoko NONAKA², Kouji HIGUCHI³, Agung PURNOMOADI⁴,
Osamu ENISHI² and Fuminori TERADA⁵

Agricultural Technology Promotion Division, Toyama Prefecture, Toyama-shi 930-8501, Japan

¹ Livestock Industry Division, Ehime Prefecture, Matsuyama-shi 790-8570, Japan

² National Institute of Livestock and Grassland Science, Tsukuba Nourin Kenkyu Danchi,
Tsukuba-shi 305-0901, Japan

³ Akita Keizaihoka University, Akita-shi 010-8515, Japan

⁴ Faculty of Animal Science, Diponegoro University, Tembalang Campus, Semarang, 50275, Indonesia

⁵ National Agricultural Research Organization, Tsukuba Nourin Kenkyu Danchi, Tsukuba-shi 305-8517, Japan

Corresponding : Taisei GOKA (fax : +81 (0) 76-444-4409, e-mail : taisei.goka@pref.toyama.lg.jp)

The effect of parity and stage of lactation on insulin secretion and resistance to insulin in dairy cows was studied. Glucose (0.1 g/kgBW) and insulin (0.2 IU/kgBW) were injected intravenously to five primiparous cows during early lactation (wk 5), nine multiparous cows during early lactation (wk 5) and 4 multiparous cows during late lactation (wk 30-33). Blood samples were collected at regular intervals. Insulin secretion in response to glucose injection was significantly lower in multiparous cows during early lactation than in primiparous cows during early lactation. The basal insulin level also was significantly lower in multiparous cows during early lactation than in primiparous cows during early lactation and multiparous cows during late lactation. Glucose uptake in response to insulin injection was significantly lower in primiparous and multiparous dairy cows during early lactation than in multiparous dairy cows in late lactation. The results demonstrated that parity and stage of lactation have the effect on insulin secretion and tolerance, and suggested that changes in insulin secretion and tolerance are related to milk yield in dairy cow.

Nihon Chikusan Gakkaiho, 74 (3) : 349-354, 2003

Key words : Insulin, Parity, Stage of lactation, Dairy cow, Milk yield