

福岡県農業総合試験場特別報告

第35号

交雑種牛における初期成長期の体質制御と
耕作放棄地を活用した放牧肥育に関する研究

平成24年3月

福岡県農業総合試験場

(福岡県筑紫野市大字吉木)

SPECIAL BULLETIN
OF
THE FUKUOKA AGRICULTURAL RESEARCH CENTER
NO. 35

Studies on Nutritional Regulation of Constitution during an Early
Growth Period and Fattening by Grazing in Abandoned Farmlands in
Crossbred Wagyu Cattle

by
Sunao Inada

THE FUKUOKA AGRICULTURAL RESEARCH CENTER

Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan

March 2012

交雑種牛における初期成長期の体質制御と
耕作放棄地を活用した放牧肥育に関する研究

稲田 淳

2 0 1 2

序

肉用牛生産は本県のみならず我が国の主要な産業の一つである。しかし、その穀物飼料のほとんどを海外からの輸入に頼っている。近年、大量の肉用牛飼料の国内搬入は、口蹄疫をはじめとした食の安全に関する問題、大量に排出される糞尿処理問題を引き起こしており、国内草資源を活用した資源循環型の肉用牛生産システムの構築が重要な課題となっている。

本研究は、肉用牛の初期成長期における体質制御を活用し、耕作放棄地での放牧肥育による資源循環型の新しい牛肉生産システムの提案を試みたものである。肉用牛に対する体質制御は初期成長期の発育を加速し、骨格筋の成長過程における筋細胞の成熟と維持に影響を及ぼすことが、形態学、生理学および分子生物学的に明らかとなった。さらに、耕作放棄地での放牧肥育により生産された牛肉は、旨味成分や機能性成分に優れる特徴的な牛肉であることが明らかとなった。これらの知見は、我が国における草資源を活用した高品質牛肉生産にとって、有用かつ効果的な成果であることから、ここに特別報告として公表することとした。本研究で得られた成果は、輸入飼料に過度に依存せず、耕作放棄地の活用による持続可能な資源循環型の新しい牛肉生産システムの構築に寄与するものと期待される。

なお、本研究は福岡県農業総合試験場および九州大学大学院生物資源環境科学府において 2006～2008 年に実施した試験成績をとりまとめたものである。

本研究の遂行にあたり、御指導、御鞭撻を頂いた九州大学大学院農学研究院准教授後藤貴文博士、同教授服部眞彰博士、同教授田畑正志博士ならびに同教授古瀬充宏博士に厚くお礼を申し上げます。

平成 24 年 3 月

福岡県農業総合試験場長

大神 良弘

目 次

第I章 緒 論	1
第II章 強化哺育が交雑種雄子牛の発育性と骨格筋性状に及ぼす影響	7
第III章 育成期における交雑種去勢牛への給与飼料栄養水準の違いが発育と筋特性に及ぼす影響	24
第IV章 耕作放棄地における放牧肥育が交雑種去勢牛の発育性に及ぼす影響	39
第V章 初期成長期の体質制御と耕作放棄地における放牧肥育が交雑種去勢牛の産肉性と肉質性状に及ぼす影響	56
第VI章 総合考察	73
総 括	80
謝 辞	81
引用文献	82
Summary	93

第 I 章 緒 論

第1節 我が国の肉用牛生産の特異性と近年の諸問題

我が国の畜産業は、海外からの輸入穀物に依存することによって省力化を図り、経営規模を拡大することで発展的な方向をたどってきた加工型農業の最たるものである。特に肉用牛生産では、著しい筋肉内脂肪蓄積能力を有した黒毛和種を中心とした和牛肥育に重点が置かれている (Gotoh *et al.*, 2009)。和牛に関しては脂肪交雑を第一とした育種選抜が実施されているが、この日本固有の和牛肥育も加工型農業の例外ではない。国内肥育牛に対する飼料自給率はわずか 20% 程度にしか過ぎず、トウモロコシを中心とした穀物のほとんどを海外からの輸入に依存している (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, 2005)。近年、この加工型農業に付随した多くの問題が発生しており、緊急な対応が必要である。大量の家畜飼料の国内搬入は、口蹄疫、BSE (牛海綿状脳症) 等の発生に見られる家畜衛生および食の安全に関する問題、集約的経営形態から排出される糞尿処理問題、それに関連する環境問題および家畜福祉等の多くの問題を抱える。家畜衛生と食の安全に関しては、反芻家畜であるウシの本質を無視し、短期的な経済性を追求した結果引き起こされた BSE が記憶に新しいが、今後、未知の伝染病の進入の危険性も存在する。また、糞尿処理問題は狭義の環境問題であり、我が国全体に関わる窒素収支不均衡をもたらす最大要因の一つとして指摘されている。具体的には、国内に輸入される農作物全体の窒素総量は 1997 年の年間合計で 998 千トンであり、このうちの約 72% が家畜飼料で占められている。国内において農作物等によって吸収される窒素量は 564 千トンと試算され、畜産の排出量だけで、既に農作物の吸収量を上回っている (Oda, 2006)。その他にも、不安定な世界情勢を反映した原油価格の高騰やバイオ燃料への穀物生産転換は、輸入穀物価格の高騰を引き起こし、肉用牛生産の経済性を大きく揺るがしている。また、ヨーロッパを中心とした家畜福祉の概念も近年急速に拡大し、国内においても家畜福祉基準の策定が進行している (Sato, 2005)。このような状況下で、我が国の肉用牛生産システムは、破綻の危険性があり資源循環型畜産あるいは環境保全型畜産への転換が急務である。

第2節 我が国における新しい草資源の活用

ウシはブタやニワトリとは異なり、ヒトが消化できない粗い繊維質成分 (セルロースおよびヘミセルロース) を分解し、草資源から蛋白質源としての生乳や食肉を生産し、それをヒトに供給するという重要な物資循環機能を担った草食動物 (反芻動物) である。この基本概念に立脚し、国内肉用牛生産の資源循環型畜産への転換を考えた場合、国内の草資源を効率良く生産しつつ、肉用牛へ給与することで資源循環を図る牛肉生産システムである放牧肥育に到達する。放牧肥育による肉用牛生産は、阿蘇地方の褐毛和種 (Okamoto *et al.*, 2001)、東北地方の日本短角種 (Muramoto *et al.*, 2005) が有名であり、安全・安心、ヘルシーな食品に対する消費者ニーズの高まりを受けて、現在注目を集めている。しかし、このような流れに反して、牧草地を含めた国内の農地面積は年々減少傾向にある。これは、我が国の農業全般における

問題であり、農業従事者の高齢化、後継者等の労働力不足、海外からの安価な農作物流入等による経営圧迫を主要因とした離農が、農地の荒廃を年々加速させている。耕作放棄地は過去 5 年間で倍増し、2005 年における国内耕作放棄地総面積は 385,791ha に拡大しており (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan. 2005)、農地荒廃、景観悪化および鳥獣害増加等の諸問題をも引き起こしている (Yamanaka *et al.*, 2008)。国はこの課題解決への施策として“食料・農業・農村基本計画”に基づき、食料自給率の大幅な向上とともに、農業の持続的な発展を目的とした耕作放棄地の有効利用の増進を掲げている。耕作放棄地の農地再生へ向けた最初の課題は、省力的かつ環境負荷をかけずに耕作放棄地の雑草を駆除することである。しかし、この雑草でさえも見方を変えれば、反芻動物としてのウシの有効な飼料資源であると同時に、ウシの物質循環機能を活用することで、活力ある農地の再生が可能である。Hayashi *et al.* (2006) は、果樹園耕作放棄地で 2 年間の放牧により黒毛和種雌牛を飼養することで、高い放牧圧が急激な植生の変化を引き起こすことを明らかにしている。つまり、国内の農地が減少するなかで、耕作放棄地の雑草をウシの粗飼料として活用することは、日本の食料自給率向上と環境保全、資源循環型の新しい農業システムの開発に向けて重要である。

第3節 肉用牛の初期成長期における体質制御

肉用牛の初期成長期における飼養管理に関しては、フレームサイズの発育を最大限に促進し、皮下脂肪、内臓脂肪等の余剰な沈着を抑制しつつ肉質を向上させることが、肥育期の発育性および牛肉の市場評価を向上させることはもちろん、経済性および出荷時廃棄脂肪低減の面からも重要と考えられる。Schoonmaker *et al.* (2003; 2004) は、交雑種去勢牛 (Angus × Simmental) の育成期 (119–218 日齢) に高栄養飼料を飽食させることで、濃厚飼料を制限あるいは粗飼料を多給した場合よりも日増体量に優れ、皮下への脂肪蓄積が亢進されることを報告した。しかし、育成期におけるエネルギー摂取量を制限すると、皮下脂肪の沈着が抑制され、枝肉の赤肉割合は増加するものの、日増体量が減少し、脂肪交雑度は低下する (Plegge, 1987; Hicks *et al.*, 1990; Murphy and Loerch, 1994; Myers *et al.*, 1999; Schoonmaker *et al.*, 2002)。さらに、育成期の発育性は哺育期の栄養条件にも大きく左右される。Abdelsamei *et al.* (2005) は、ホルスタイン種雄子牛に対して長期間 (200 日齢) におよぶ代用乳給与量の違いが発育性と肉質性状に及ぼす影響について調査しており、代用乳の長期多給は発育性向上による肥育日数の短縮が可能であると同時に、枝肉における筋肉内脂肪含有率は低下しないことを報告した。これらの結果は、哺育期あるいは育成期における栄養条件の違いが、肥育牛の発育性と屠畜時の肉質に大きな影響を及ぼすことを示している。しかし、哺育期から育成期を通した初期成長期における高栄養条件が、肉用牛の骨格筋を中心とした発育性に及ぼす影響は明らかでない。

一方、管理草地における放牧肥育を含め一般的に粗飼料のみによる肥育では、現在の濃厚飼料多給の肥育体系と比較して、その肉量および脂肪交雑に劣る。しかも耕作放棄地における草資源を活用した肉用牛生産いわゆる“耕作放棄地放牧肥育”の実証を目指した場合、その産肉性の低下を極力抑制する新しい技術の確立が必要不可欠である (Hayashi, 2009)。近年、この障害を克服する一つの手段として、初期成長期の環境、特に栄養環境における代謝生理的な効果が記憶 (体質制御) される現象 DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease) (Gluckman *et*

al., 2008) が注目されている。ヒトやラットでは、生後あるいは成熟後に発生する疾病や肥満等の生活習慣病のいくつかは、遺伝だけではなく妊娠末期の母胎や初期成長期の栄養環境が大きく影響していることが報告されている (Levin, 2000)。初期成長期の栄養環境により、その後の代謝生理機能が制御されていく現象は、代謝生理的インプリンティング (Metabolic Imprinting) 効果とも呼ばれるが、Imprinting という概念は Lorenz (1970) が初期成長期に起因する特定の動物行動に関して用いた有名な用語である。Waterland and Graza (1999) は、代謝生理的インプリンティングを 1) 初期のある限られた時期の感受性に起因し、2) 生涯持続する効果であり、3) 定量しうる特定の効果である。また、4) その効果が特定の刺激の曝露の程度に依存していること、あるいはその曝露とその効果の間に限定的な関係があるという点で特徴付けられるとした。この生物学的な機構は、初期成長期の環境、特に栄養環境における代謝生理的な効果を記憶 (刷込) することである。具体的には、初期成長期のインスリン曝露の影響に関する報告として、胎児期や初期成長期における過度なインスリン分泌あるいはインスリン欠乏は、細胞の代謝活性の低下や異常糖代謝を引き起こし、成人時における肥満症発生の一つの要因となる可能性が報告されている (Plagemann *et al.*, 1999a, b, c; Dörner and Plagemann, 1994)。また、肥満と密接に関連した食欲に関するインプリンティングの研究も報告されており (McMillen *et al.*, 2005; Muelhaeusler, 2006)、さらに、インプリンティング機構を DNA のメチレーションレベルから解析し、エピジェネティック遺伝子制御機構の解明についても報告がなされている (Waterland, 2006; Lillycrop *et al.*, 2005; Godfrey *et al.*, 2007)。

以上のように、ヒトでは胎児期および初期成長期における体質制御に関連した報告が、近年多数見受けられるが、反芻家畜に関する知見は、ヒトのモデルとしてヒツジ等で見られるものの、詳細について不明な点が多い。Gotoh *et al.* (2005; 2008) は、ホルスタイン種去勢牛を用いて育成期に濃厚飼料を多給した後、乾草飽食で肥育することで、乾草のみで育成肥育した場合と比較して、出荷時体重および骨格筋内の脂肪細胞分化制御因子の発現が向上し、筋肉内脂肪含量に優れることを明らかにしている。また、黒毛和種の哺育期を含む初期成長期 (1–10 月齢) に高栄養飼料を給与した後、放牧あるいは牧草のみを給与することで肥育 (11–30 月齢) した場合、と畜時 (31 月齢) の体重は 576kg、胸最長筋内の脂肪含有率は 13%であり、初期成長期に乾草のみを給与した場合と比較して、体重で 49kg、脂肪含有率で 3.6%高い値を示した (Gotoh *et al.*, 2010a, b)。これらの結果は、初期成長期の濃厚飼料多給による体質制御の影響は、粗飼料からの十分な栄養摂取が可能な肥育条件下において、と畜時の枝肉重量と脂肪含有率に認められることを示している。

第4節 肉用牛の骨格筋における筋線維型構成、筋分化制御因子 (MRFs) とインスリン様成長因子 (IGFs) の関連

筋線維型構成; 肉用牛の筋線維型構成および筋線維サイズは、牛肉の特徴を決定する大きな要因の一つであり、骨格筋形成過程において様々な要因により変化する (Klont *et al.*, 1998)。黒毛和種の筋線維型構成に関する多くの形態学的調査が報告されている (Gotoh, 2003)。ほ乳類や鳥類は、運動、姿勢保持および呼吸等に必要不可欠な機能を有する 200 種以上の骨格筋を保有しており、それぞれ相乗的あるいは対立的に収縮伸長運動することで、一連の動作を成立させる。また、骨格筋は形態学的および生理学的に特徴づけられるいくつかの筋線維型により構成される。運動の多様性に応じて筋線維性状は劇的に変化し、その変化

は多くの神経系および内分泌系によって支配されている (Peter *et al.*, 1972; Pette and Staron, 1990)。筋線維はそのエネルギー代謝の違いにより、酸化系酵素活性が高く持続的に活動する遅筋線維、解糖系酵素活性が高く瞬発的に大きな力を発揮する速筋線維に分類される (Peter *et al.*, 1972; Pette and Staron, 1990)。さらに、おもに脂肪をエネルギー源として酸化的代謝を行う I 型筋線維、グリコーゲンをエネルギー源として嫌氣的代謝を行う IIB 型筋線維、I 型と IIB 型の両方の代謝系をもつ IIA 型筋線維に区分される (Brooke and Kaiser, 1970a, b; Suzuki, 1971a, b; 1973; 1976; Ashmore *et al.*, 1972; Peter *et al.*, 1972; Khan, 1976)。骨との結合部位に位置し、姿勢の保持に関わる骨格筋は主に I 型筋線維によって構成されている (Smith *et al.*, 1977; Walmsley *et al.*, 1978; Zajac and Faden, 1985; Totland and Kryvi, 1991)。逆に、体幹の表層に位置し、瞬発的に大きな力をともなった運動に関わる骨格筋は、主に IIB 型筋線維によって構成されている (Suzuki and Tamate, 1988; Totland and Kryvi, 1991)。ニューロン近傍では、形態的および機能的に同様の特性をもつ筋線維が広く層状に結合することでモーターユニットが構成される (Buller *et al.*, 1960a, b; Burke *et al.*, 1971; 1973)。I 型モーターユニットは、有酸素条件下において姿勢保持のような持続的な運動を可能とする。さらに、移動のような日常的な運動を IIA 型モーターユニットが、瞬発的な運動を IIB 型モーターユニットが担っている (Vøllestad, 1987)。骨格筋性状はこれらの異なる筋線維がどのような割合で含まれているかによって決定する (Winters and Woo, 1990)。一般に肉用牛の骨格筋における筋線維型構成は、品種、月齢、性別、筋肉部位および飼養環境等により異なり、牛肉の特徴を左右する大きな要因の一つである (Gotoh, 2003)。

MRFs; 骨格筋の発育亢進は、肉用牛の産肉性にとって重要である。一般に骨格筋を構成する筋細胞あるいは筋線維の分化には、おもに Myogenic Regulatory Factors ; MRFs (MyoD, Myf5, myogenin および MRF4) が筋分化誘導能を有し、骨格筋のマスタージーンとして MyoD family が報告されている (Wright *et al.*, 1989; Hinterberger *et al.*, 1991; Weintraub, 1993; Megeney and Rudicki, 1995)。MyoD family は、共通構造として bHLH (basic helix-loop-helix) モチーフを持つ二量体で、E-box を介して転写を活性化する転写因子である (Murre *et al.*, 1989)。マスター遺伝子としての MyoD family の機能の一部は、骨格筋特異的遺伝子の転写活性化によると考えられる。筋節において骨格筋系譜の細胞が現れると、MyoD, Myf5 が発現し、この系譜細胞を筋芽細胞へと決定させ維持する。その後、myogenin が筋芽細胞から筋管への分化の段階や筋管細胞の維持に働き、MRF4 は、筋管成熟の維持、最終分化制御を担う。Shibata *et al.* (2006) は、筋芽細胞増殖の抑制的調節因子である myostatin について黒毛和種の初期成長期 (2–10 月齢) における発現状況を調査した。その結果、2 月齢時に最も高い値を示した myostatin 発現量は、10 月齢時までゆっくり減少しながら推移し、半分程度まで低下することを報告した。また、MRFs は MyoD, Myf5, myogenin, MRF4 の順で活性化され、筋管形成初期過程の上流で MyoD と Myf5 が、下流で myogenin と MRF4 が段階に応じて役割を分担しながら筋管形成を調節すると考えられている (Muroya *et al.*, 2002)。

IGFs; Insulin-like growth factors (IGFs) は、体内のほとんどの組織において成長ホルモンの影響を受け、多様な反応性を示す成長因子の一つであり、インスリンと配列が高度に類似したポリペプチドである (Cohen *et al.*, 1991)。IGFs の中でも、IGF-I および IGF-II は骨格筋形成過程の下流および上流において、それぞれ骨格筋分化形成に影響を及ぼす (Adams, 2002)。Matsuzaki *et al.* (2001) は、ホルスタイン種去勢牛の育成期 (5–8 月齢) に同一飼料を飽食 (飽食区) あるいは

制限 (1.5%/体重:制限区) 給与した後、肥育期 (9–18 月齢) は全ての試験牛に同一飼料を飽食させた場合の血漿中 IGF-I 濃度の変化状況を調査した。その結果、育成終了時 (8 月齢) には、育成期間の蛋白摂取量の影響を反映し、飽食区で制限区より有意に高い血漿中 IGF-I 濃度を示したが、肥育期では試験区間に差は認められず、両試験区とも 11 月齢時に 300ng/ml 程度で最高値を示した後、加齢および肥育の進行にともない摂取エネルギー量の増加にもかかわらず、血漿中 IGF-I 濃度が減少することを報告した。血漿中の IGF-I は、その大部分がいくつかの結合蛋白質 (IGFBPs) と結合し、それらにより IGF-I 機能が調節されている (Hossner *et al.*, 1997)。特に IGFBP-2 は肉用牛の初期成長期の成長、同化作用に関与し、低エネルギー飼養下での蛋白栄養に反応し、血漿中 IGF-I 濃度を調節しながら、成長段階に応じて IGFBP-3 及び IGFBP-4 の構成比を変化させることで血漿中 IGF-I 濃度を調節していると考えられている (McGuire *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2000)。さらに、初期成長期の栄養条件は、第二次性徴発現にも影響を及ぼし、高栄養条件下において第二次性徴発現を早期化する (Yelich *et al.*, 1995)。逆に、低栄養条件下において、第二次性徴発現は遅延する (Day *et al.*, 1986)。また、第二次性徴発現時を契機に、血漿 IGF-I 濃度は、肥育の進行にともない低下すると考えられている (Breier *et al.*, 1986; Yambayamba *et al.*, 1996; Yelich *et al.*, 1995)。また、Kamiya *et al.* (2009) は、ホルスタイン種雄子牛に対する代用乳多給による強化哺育が、哺育終了時 (6 週齢) の肝臓や脾臓といった内分泌器官の重量を増加させ、その後の肝機能および免疫機能を向上させる可能性について報告した。このことは、哺育期における高栄養代用乳給与による体質制御が、IGF-I 合成の主要器官である肝臓を物理的に大きくし、その合成レベルに影響したと考えられる。このように IGFs は肉用牛の発育性に影響を及ぼす主要な要素のひとつである。

第5節 本研究の目的

Hayashi *et al.* (2006) は、果樹園跡地で放牧肥育した黒毛和種の発育性と胸最長筋における脂肪含有率および脂肪酸組成について調査した。その結果、放牧肥育した黒毛和種の発育性は、濃厚飼料多給により肥育した場合と比較して有意に低下した。また、胸最長筋における脂肪含有率はわずか 3%程度であったものの、その脂肪酸組成に関して、多様な機能性を有する共役リノール酸 (conjugated linoleic acid; CLA) 割合は、濃厚飼料多給により肥育した場合と比較して有意に高かった。このことは、濃厚飼料多給の肥育と比較して耕作放棄地での放牧肥育は、栄養摂取量低下にともない発育性と脂肪蓄積が低下するものの、脂肪酸組成等に特徴を持った牛肉生産の可能性を示している。Gotoh *et al.* (2010a, b) が報告したように、初期成長期における高栄養飼料給与による体質制御は、肉用牛の発育性および筋肉内脂肪蓄積を亢進する。このことは、初期成長期の体質制御が耕作放棄地での放牧肥育における発育性および筋肉内脂肪蓄積低下を改善する有効な手段の一つであることを示している。この体質制御は、初期成長期のより早い段階での処理が効果的であると考えられる。哺育期における代用乳多給による強化哺育については、乳用種雌子牛の発育性向上および初産月齢の早期化による繁殖性の向上等について報告されているものの、肉用牛の発育性および肉質性状に及ぼす報告は少ない (Tikofsky *et al.*, 2001; Blome *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 2005; Bartlett *et al.*, 2006)。Gotoh *et al.* (2010a, b) は、哺育期に高蛋白高脂肪代用乳を多給し、育成期 (一

10月齢) に高栄養飼料を多給する体質制御を施した黒毛和種去勢牛を粗飼料のみを飽食させて肥育した場合、慣行的な哺育後、粗飼料を飽食させて育成および肥育した場合と比較して、出荷枝肉中の脂肪交雑および脂肪含量が優れることを報告している。ただし、国内の耕作放棄地での放牧といった未利用草資源を肥育飼料として長期間にわたり利活用する場合、耕作放棄地の立地条件、野草植生および季節的条件の影響を受け、肉用牛の栄養条件は著しく変動することが予想される。

そこで、本研究では黒毛和種由来の優れた脂肪交雑能力にホルスタイン種の高い発育性を合わせ持つ交雑種（黒毛和種雄 × ホルスタイン種雌）牛に対して、哺育期での高栄養代用乳多給および育成期における高栄養飼料多給による体質制御が、骨格形成を中心とした発育性および骨格筋における筋分化形成と筋線維性状に及ぼす影響を調査した。また、耕作放棄地を活用した放牧肥育の実証を目的とし、体質制御を施した交雑種牛の耕作放棄地での放牧肥育が、出荷時の枝肉構成と肉質の理化学的性状に及ぼす影響を調査することで、耕作放棄地における草資源を活用した新しい資源循環型の肉用牛生産システムの提案を試みた。

第Ⅱ章 強化哺育が交雑種雄子牛の発育性と骨格筋性状に及ぼす影響

2.1 緒言

肉用牛における筋肉の量的または質的制御を図ることで、その発育性を最大限に発揮させ、良質な牛肉を生産することは、肥育期間短縮や肉質改善による肥育経営向上に対する効果だけではなく、畜産環境レベルでの消費穀物や排出糞尿の低減等も期待できる。特に初期成長期の発育を向上させることは、最終的な産肉性を高めるために重要であり、近年、肉用牛の発育性を大きく向上させる技術のひとつとして初期成長期の成長加速を目的とした強化哺育が注目されている (Abdelsamei *et al.*, 2005)。哺育期の栄養の多くは代用乳と人工乳から供給されており、第一胃をバイパスし下部消化管により直接消化吸収される代用乳は、初期発育性に対する最大のエネルギー供給源である。代用乳の主要なエネルギー源は、脂肪、蛋白質および乳糖等の炭水化物で構成されており、代用乳からの蛋白質および脂肪摂取量の違いが、哺育期における子牛の発育性および下部消化管形成に及ぼす影響等に関して多くの報告がなされている (Tikofsky *et al.*, 2001; Brown *et al.*, 2005; Bartlett *et al.*, 2006; Quigley *et al.*, 2006; Velayudhan *et al.*, 2008)。特に Blome *et al.* (2003) は、代用乳における適正な蛋白質含量の調査を目的として、エネルギー濃度が等しく、蛋白濃度が 16–26%まで異なる 4 種類の代用乳を 2–6 週齢のホルスタイン種雄牛に給与した結果、蛋白質含量が高い代用乳を給与された子牛の方が、増体量に優れ、体組織中の蛋白質量が多く、脂肪蓄積が少なかったことを報告している。これらの報告は、哺育期における代用乳からの蛋白質摂取が子牛の発育性に大きく影響を及ぼすことで一致しており、近年、蛋白質を強化した哺育プログラムによる強化哺育が、雌仔牛発育性向上および初産月齢の早期化等による経済性向上を目的として提唱されている (Tozer and Heinrichs, 2001)。この技術は肉用牛に対しても応用可能であると考えられ、肉用牛の初期成長期において、その発育性を最大限に発揮させ、肥育期に十分な骨格筋の発達を可能にするフレームサイズを獲得することは経済的にも有効な手段となる。このことについて Abdelsamei *et al.* (2005) は、ホルスタイン種雄子牛に対して長期間 (200 日間) におよぶ代用乳給与量の違いが発育性と肉質性状に及ぼす影響について調査しており、代用乳の長期多給は発育性向上による肥育日数の短縮が可能であると同時に、枝肉における筋肉内脂肪含有率は低下しないことを報告した。また、Kamiya *et al.* (2009) は、ホルスタイン種雄子牛に対する強化哺育により、肝臓や脾臓といった内分泌器官重量が増加することを報告した。本章では交雑種雄子牛を用いて、高蛋白低脂肪代用乳を長期間多量給与する強化哺育が、哺育期の飼料摂取状況と発育性に及ぼす影響を調査した。また、肉用牛の産肉性に密接に関連した骨格筋について、成長の著しい哺乳期の体質制御が MRFs の発現および筋線維の形態に及ぼす影響についても検討した。

2.2 材料および方法

2.2.1 供試牛および試験設計

国内で生産された交雑種 (黒毛和種雄 × ホルスタイン種雌) 雄子牛 21 頭 (生後日齢 29.0 ± 1.3 日齢; 体重 50.0 ± 1.3 kg) に対して同一の代用乳, 人工乳, 牧乾草を定量給与することで試験牛の斉一性を図ると同時に、哺育ロボット (Calf-Feeders TAP5-SA2-30-P, KFA3-MA3; Forster Technik[®]) への馴致を行った。56.0 $\pm$ 1.3 日齢に達した試験牛は試験開始時の体重、種雄牛、馴

致期間中の日増体量 (DG) により, 2 つの試験区に区分し, 約 90 日間 (2006/11/1–2007/1/31) の哺育試験を実施した。試験区の設定は, 乾物 (DM) 当たりの可消化養分総量 (TDN) : 110%, 粗蛋白質 (CP) : 29%, 粗脂肪 (CF) : 19%の代用乳を1日最大 1.92DMkg 給与する H 区に 7 頭, TDN:119%, CP:26%, CF:24%の代用乳を1日最大 0.48DMkg 給与する C 区に 14 頭を配置し, 人工乳 (TDN:83%, CP:26%) は各区同様のものを給与した。Table 1 に各試験区で給与した代用乳および人工乳の栄養成分値をそれぞれ示した。H 区の自動哺乳装置における代用乳給与プログラムは, 56–75 日齢にかけて 0.77–1.92DMkg まで漸増後, 130 日齢まで最大給与量 1.92DMkg を維持し, 131–147 日齢にかけて無給まで漸減した。C 区では, 56–138 日齢まで最大給与量 0.48DMkg を維持した後, 139–147 日齢にかけて無給まで漸減した。離乳開始時までの人工乳給与プログラムは H 区 および C 区で同様とし, 56–81 日齢まで 0.43DMkg を維持し, 82–101 日齢にかけて 1.3DMkg まで漸増後, 129 日齢まで 1.3DMkg を維持した。離乳期 (130–147 日齢) の人工乳給与プログラムは, H 区で 3.48DMkg, C 区で 2.09DMkg を上限に漸増した。全試験牛は自動哺乳装置 2 基, 自動給餌装置 1 基を備えた同一パドック内で群飼し, 給与牧乾草は一定量のチモシー乾草 (TDN:60%, CP:10%) を飽食させ, 飲水は自由とした。

2.2.2 調査項目

2.2.2.1 飼料摂取状況および発育状況

哺育試験期間中の各試験区における代用乳, 人工乳からの栄養摂取量および体重, 体測尺値の変化状況を調査した。代用乳および人工乳からの栄養摂取量は, 試験期間を 4 期間 (Period 1: 56–71, Period 2: 72–99, Period 3: 100–125, Period 4: 126–147 日齢) に区分することで, 哺乳ロボットのデータから各期間の DM, TDN, CP および CF 摂取量 (DMI, TDNI, CPI および CFI) をそれぞれ算出した。発育状況については, 試験開始時および各期間終了時に体重を, 試験開始時, 84 日齢, 113 日齢および終了時 (147 日齢) に体測尺値 (体長, 体高, 十字部高, 腹囲および胸囲) を, 試験開始および終了時に寛幅をそれぞれ測定した。

2.2.2.2 血漿中 IGF-I およびアルカリフォスファターゼ (ALP) 濃度

各試験区における血漿中 IGF-I 濃度変化および骨形成のサブマーカーとして血漿中 ALP 濃度変化状況をそれぞれ調査した。哺育試験開始時および各期間終了時 (56, 72, 99, 126 および 148 日齢) に頸静脈より真空採血管で血液を採取し, ただちに遠心分離 (3,000rpm, 20min, 4°C) により血漿を分離した後, 測定まで–40°C で凍結保存した。血漿中 IGF-I 濃度の測定は外部分析機関 (株式会社 SRL) において, 結合蛋白を除去した後, ヒト IGF-I マウスモノクローナル抗体をビーズ固相とトレーサーに使用した RIA 固相法 (IGF-I (Somatomedin-C) IRMA “Daiichi”) により測定した。また, 血漿中 ALP 濃度の測定は Spot ChemII Auto Analysis System (SP-4410, Arkray) によって測定した。

2.2.2.3 筋線維型構成および筋線維直径

哺育試験開始時 (41 日齢) および終了時 (148 日齢) に, 胸最長筋よりニードルバイオプシー (カーディナルヘルス製, 14 G) により骨格筋サンプルを採取した。バイオプシーの前処理として, 切開部位の剃毛, 全身および局所麻酔を事前に施した。ニードルバイオプシーは第一腰椎から頭方に向かい, 胸最長筋の筋線維の走行に沿って挿入し, 第 12 胸椎に相当する部位から幅 2 mm, 長さ 1.5–2.0 cm の筋材料 10 本程度を同様の筋線維走行に束ねて包埋剤で包埋した後, 速やかに液体窒素中にて急速凍結させ–80°C で冷凍保存した。凍結保

存された骨格筋サンプルは、酵素組織化学的染色による筋線維型構成（I 型，IIA 型および IIB 型）の同定，筋線維直径の測定を目的として，クリオスタット（CM 1850, Leica）を用いて厚さ 8 μ m の連続凍結切片を作製し，30–60 分間風乾した後，以下の 2 種類の染色を施した。筋線維内のミオシン ATPase 活性の検出は，pH4.3 の酢酸・酢酸ナトリウム緩衝液で 5 分間の酸性前処理した後，0.1M バルビタールナトリウム溶液および 0.18M 塩化カルシウム溶液に ATP を基質として加えた反応液（pH9.4）を濾過し，前者では 5 分間，後者では 45 分間浸漬させて行った。これらの処理はすべて 21°C で行った。その後，1%塩化カルシウムで 3 回洗い，蒸留水により水洗した。次に，0.05%バルビタールナトリウム溶液に 2–3 分間浸漬させ，蒸留水で水洗後，2% 塩化コバルト溶液により 5 分間処理した。蒸留水で水洗した後，1%硫化アンモニウム溶液で 2–3 分間発色させ，蒸留水で水洗した後，水溶性封入剤で封入した（Brooke and Kaiser, 1969）。また，筋線維内の NADH 脱水素酵素活性は pH7.4 の 0.2M リン酸緩衝液に還元型 β -ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドとニトロブルーテトラゾリウム塩を溶かした反応液に 30°C で 20 分間浸漬し，検出した（Okamoto *et al.*, 1976）。その後水洗し，pH4.3 の acetate buffer に 5 分間浸漬し，さらに水洗した後，封入した。ミオシン ATPase 活性および NADH 脱水素酵素活性の反応の特異性に基づき，筋線維を I 型，IIA 型および IIB 型の 3 つの筋線維型に分類した後（Brooke and Kaiser, 1970a, b），各型筋線維の直径の測定をそれぞれ行った。筋線維型の判別と筋線維直径の計測は，250 倍の顕微鏡写真を撮影して行った。筋線維型は，個体ごとに筋線維 300 個以上を目安として判別し，その割合を求めた。筋線維の直径は筋線維が斜断されると楕円形あるいは長多角形の断面が得られ，その長軸は凍結切片作成時の影響を受けやすいため，長軸に対して垂直に交わる短軸のうち最大のものをその筋線維の直径とした（Brooke, 1970）。

2.2.2.4 MRFs 発現定量解析

各試験区の骨格筋における MRFs (MyoD, Myf5, myogenin, MRF4, myostatin, IGF-I および IGF-I receptors (IGF-Ire)) の mRNA 発現状況を調査した。哺育試験開始時（41 日齢）および終了時（148 日齢）に，胸最長筋よりバイオブシー法により骨格筋サンプルを採取した。生体からの筋材料の採取はニードルバイオブシーによって実施した。バイオブシーの前処理等は，筋線維型構成および筋線維直径測定用サンプル採取方法と同様とした。採取した骨格筋サンプルは速やかに液体窒素中にて急速凍結させ，以下の手順により解析を実施するまで -80°C で冷凍保存した。ニードルバイオブシーにより採取した長さ約 8 cm の凍結保存筋サンプルは 3D ミキサー (Micro Smash™ MS-100, TOMY) による粉碎を行った。その後，ISOGEN (Nippon Gene)，クロロホルムおよびイソプロパノールを用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA は，濃度測定および品質検定を行った後，-80°C で保存した。逆転写反応は，First strand cDNA 合成キット (ReverTra Ace- α -®, TOYOBO) を用いた。1 μ g に調整した total RNA に，キットに含まれる RNase Free H₂O, 5 $\times$ RT Buffer, 各 10mM の dNTP Mixture, Random Primer (10U/ μ l) および RNase Inhibitor (10U/ μ l) を加え，30°C で 10 分間のプレインキュベーションを行った。引き続き 42°C で 20 分間保温して逆転写反応を行い，99°C で 5 分間の熱処理の後，4 °C で 5 分間冷却させた。リアルタイム RT-PCR は Line Gene Real-Time PCR System (BioFlux) を用いて行った。反応は，2 μ l の逆転写反応産物に各 10 μ M のプライマーおよび 5 μ l の SYBR Green Dye (SYBR® Green Realtime PCR Master Mix, TOYOBO) を加え，10 μ l の至適反応液中において 95°C で 1 分間の加熱処理後，95°C で 15 秒間，59°C で 15 秒間，72°C で 30 秒間の増幅サイクルを 42 回繰り返した。反応終了後，

引き続き 92°C で 2 分間, 65°C で 1 分間の融解曲線解析を行った後, 30°C で 30 秒間保温した。内部標準遺伝子として, ハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を採用し, 標的遺伝子の発現定量と併せて行うことで, 鋳型量および逆転写効率の補正を行った。プライマーは, Table 2 に示したようにウシの各遺伝子に対して設定した。配列は, 各遺伝子の mRNA 配列ならびにゲノム配列を基に, プライマー設計ソフトウェア DNASIS[®] Pro (Hitachi Software Engineering) を用いて設計した。

2.2.2.5 統計処理

調査結果は各試験区の平均値±SE で示した。統計処理は, Student's *t*-test により試験区間における有意差の検定を行った。

2.3 結果

2.3.1 飼料摂取状況および発育状況

哺育試験全期間における各試験区の代用乳および人工乳からの DMI, TDNI, CPI および CFI を Table 1 に示した。さらに, 各期間別の代用乳および人工乳からの DMI (Fig. 1, A; B) と代用乳と人工乳からの総 CPI (Fig. 1, C) の推移を Fig. 1 にそれぞれ示した。各試験区とも代用乳はほぼ設定値通り摂取され, 試験全期間について H 区における代用乳の DMI は C 区より有意に多くなった ($P<0.01$) (Table 1; Fig. 1, A)。人工乳に関しては, 試験期間中を通して, C 区ではほぼ設定値通りに摂取されたものの, H 区の摂取量は設定値を下回って推移した。H 区の人工乳摂取量は 130 日齢以降の代用乳摂取量減少にともなって増加し, 試験終了時には約 3.0kg/日に達した。全試験期間を通した人工乳からの栄養摂取状況について試験区間に有意な差は認められなかったが, 試験期間別には, period 3 において C 区の人工乳摂取量が H 区より有意に多かった ($P<0.01$) (Fig. 1, B)。代用乳と人工乳から摂取された総 CPI の推移は, period 4 における H 区の代用乳摂取量の減少にともなって低下した。その他の period において, 各試験区の総 CPI は増加しながら推移し, 全ての period において H 区の総 CPI が C 区より有意に多くなった ($P<0.01$) (Fig. 1, C)。試験期間中の各試験区の体重推移を Fig. 1, E に示した。各試験区の体重は, 72 日齢時に H 区で 77.1 ± 3.8 kg, C 区で 65.8 ± 1.5 kg となり, 既に H 区の体重が C 区より有意に重くなった ($P<0.01$)。その後も period 3 まで H 区の期間別 DG は C 区よりも高い値を示し, 試験終了時の体重は H 区で 185.3 ± 7.2 kg, C 区で 154.5 ± 4.8 kg となり, H 区の体重が C 区より有意に重くなった ($P<0.01$) (Fig. 1, E)。各試験区における体測尺値 (体長, 体高, 十字部高, 腹囲, 胸囲および寛幅) の変化状況について Fig. 2 に示した。50–84 日齢時における H 区の体長, 体高, 十字部高および胸囲の日増加量 (cm/日) は C 区より有意に大きな値を示し ($P<0.05$), 84–113 日齢時における H 区の腹囲の日増加量は C 区より有意に大きな値を示した ($P<0.05$)。また, 試験終了時において H 区の体長, 体高および腹囲が C 区よりも有意に大きな値を示した ($P<0.05$)。試験期間中における H 区の寛幅の日増加量および試験終了時の測定値は, C 区より有意に大きな値を示した ($P<0.01$)。

2.3.2 血漿中 IGF-I および ALP 濃度変化

哺育試験期間中の各試験区における血漿中 IGF-I 濃度の推移を Fig. 1, D に, 血漿中 ALP 濃度の推移を Fig. 3 にそれぞれ示した。各試験区の血漿中 IGF-I 濃度は, 72 日齢時に H 区で 289 ± 25.7 ng/ml, C 区で 107 ± 6.1 ng/ml となり, 既に H 区の血漿中 IGF-I 濃度が C 区より有意に高か

った ($P<0.01$)。その後、代用乳摂取量が減少する 126 日齢程度まで有意差を維持しながら各試験区の血漿中 IGF-I 濃度は推移したものの、147 日齢時には、H 区で $310\pm31.5\text{ng/ml}$ 、C 区で $270\pm22.2\text{ng/ml}$ となり、試験区間に有意な差は認められなかった。各試験区の血漿中 ALP 濃度は、99 日齢時に最高値を示した後、試験終了まで減少しながら推移した。72 日齢時における H 区の血漿中 ALP 濃度 ($211\pm35.8\text{IU/L}$) は C 区より有意に高い値を示し ($P<0.05$)、99 日齢時においても H 区の血漿中 ALP 濃度が C 区より高い傾向を示した ($P<0.10$) (Fig. 3)。

2.3.3 筋線維型構成および筋線維直径

哺育試験開始 (41 日齢) および終了時 (148 日齢) にバイオブシーにより採取した試験牛の胸最長筋における筋線維型 (I 型, IIA 型および IIB 型) の構成割合および筋線維直径を Table 3 に示した。各試験区における試験終了時の筋線維型構成割合に関して試験区間に有意な差は認められなかった。また、各筋線維型の筋線維直径についても試験区間に有意な差は認められなかったものの、試験前後において C 区における全ての筋線維型の直径が有意に増大し ($P<0.05$)、H 区では IIA 型筋線維直径のみ有意に増大した ($P<0.01$)。

2.3.4 骨格筋遺伝子発現定量解析

哺育試験開始 (41 日齢) および終了時 (148 日齢) にバイオブシーにより採取した試験牛の胸最長筋における MRFs (MyoD, Myf5, myogenin, MRF4, myostatin, IGF-I および IGF-Ire) の mRNA 発現状況について Fig. 4 に示した。試験終了時における MRFs の mRNA 発現状況について、H 区の myogenin 発現量が C 区よりも有意に低い値を示したものの ($P<0.05$)、その他の項目について試験区間に有意な差は認められなかった。また、試験前後において、両試験区の MyoD と IGF-Ire の発現量が有意に低下し ($P<0.05$)、H 区では myogenin および myostatin の発現量も有意に低下した ($P<0.05$)。逆に H 区における MRF4 発現量は、試験前後において有意に上昇した ($P<0.01$)。

2.4 考察

2.4.1 代用乳摂取と人工乳摂取の関係

近年の哺育期における子牛への強化哺育に関する知見として、CP 水準を高めた代用乳の給与により子牛の筋肉量が増加することが報告されている。Bartlett *et al.* (2006) は、ホルスタイン種雄仔牛 59 頭を用いて、エネルギー含量が等しく CP 含量が 14–26% の 4 段階で異なる代用乳を、体重の 1.25%あるいは 1.75%給与する試験を行い、その発育性および体構成を調査した。その結果、代用乳中の CP 含量の増加により発育性は向上し、空体重中の蛋白質蓄積量は増加するが脂肪蓄積量は低下した。また、代用乳の給与量増加により、空体重中の脂肪蓄積量は増加するが蛋白質蓄積量は低下した。代用乳の CF 水準に関連して、Tikofsky *et al.* (2001) は、CF 含量が 15%, 22%および 31%の代用乳を用いて試験を実施した結果、CFIの違いによる子牛の増体成績への影響は認められないものの、高脂肪代用乳を給与した子牛の体脂肪蓄積量が増加し、体蛋白蓄積量が減少することを報告した。さらに、Hill *et al.* (2008) は、24 頭のホルスタイン種雌仔牛を用いて、低蛋白低脂肪 (CP:20%, CF:21%, 給与量:441g/日)、高蛋白低脂肪 (CP:28%, CF:20%, 給与量:951g/日)、高蛋白高脂肪 (CP:27%, CF:

28%, 給与量:951g/日) の代用乳を給与する 3 試験区に加え, 高蛋白高脂肪を多給する試験区 (CP:27%, CF:28%, 給与量:1,431g/日) を設定し, その発育性, 体構成等について調査した。その結果, Tikofsky *et al.* (2001) と同様に, 高蛋白低脂肪の代用乳を給与した試験牛の DG は, 高蛋白高脂肪の代用乳を給与した場合と違いがないものの, 体脂肪蓄積量は有意に低下した。さらに, 代用乳の多給により人工乳の摂取量が抑制された。これらの結果は, 代用乳の給与量の増加および高脂肪代用乳の給与は, 体脂肪蓄積を促すと同時に, 人工乳の摂取にとって大きな制限要因となることを示唆した。

本試験では, 哺育期における交雑種雄子牛の高い発育性を発揮させることを目的とし, H 区の代用乳は, C 区と比べ CP 含量を 3% 高く, CF 含量を 5% 低く設定した。同時に, 自動哺乳装置により各試験区の代用乳摂取量を人為的にコントロールすることで, 試験期間中における H 区の代用乳からの CPI と CFI は, C 区よりそれぞれ 30kg および 16kg 程度増加した。H 区における人工乳からの DMI が period 3 において C 区より有意に低い値を示したことは, 低脂肪代用乳であってもそれらを多給することで, H 区の脂肪摂取が過剰となり, 人工乳の摂取量が抑制されたと考えられた。さらに, 哺育期における子牛の人工乳摂取とその消化吸收に関しては, 第一胃を含めた消化器官の発育を考慮する必要がある。一般に, 第一胃は 14–56 日齢時の乾燥した飼料の摂取刺激により急速に発達すると考えられており, 第一胃の発達には細菌の存在, 水環境, 運動性, 粘膜上皮の人工乳摂取とその吸収能力が影響を及ぼす。Kristensen *et al.* (2007) は, ホルスタイン種雄子牛の哺乳量の違いが人工乳摂取量と第一胃内環境, 前胃の発育に及ぼす影響を調査した。その結果, 哺乳量増加にともない人工乳摂取は抑制されると同時に, 人工乳からの DMI の違いは第一胃前囊および腹囊における半絨毛の発育に影響を及ぼさないものの, 人工乳からの DMI が多い試験牛の反芻胃と第三胃の空重量が増加することを報告した。

本試験では, 人工乳からの DMI とその変動パターンが試験区間で異なった。人工乳からの DMI については, period 2 まで両区に差異は認められなかったが, period 3 では C 区の DMI が H 区よりも有意に増加したことから, この時期から C 区の反芻胃の容積 (重量) が, H 区より先行して増加したと推察された。period 4 において, H 区では代用乳からの DMI の減少に伴い, 人工乳からの DMI の急激な上昇が認められ, この時期に反芻胃の容積 (重量) の増加が引き起こされたと推察された。第一胃内における分解速度と粘膜上皮からの吸収性に関して, 乾草摂取の影響は人工乳と比較して小さい (Anderson *et al.*, 1987) と考えられるが, 本試験において, 各試験区における乾草摂取量の把握が困難であったため, 乾草摂取が反芻胃に及ぼす影響の詳細については今後検討が必要である。

2.4.2 代用乳と人工乳摂取バランスが血漿中 IGF-I 濃度と発育性に及ぼす影響

IGFs はインスリンと配列が高度に類似したポリペプチドである。IGF-I は主に肝臓で成長ホルモンによる刺激で分泌され, 多くの動物細胞の発育に関与し, 特に筋肉, 骨の細胞は IGF-I の影響を強く受ける (Cohen *et al.*, 1991)。強化哺育と血漿中 IGF-I 濃度の関係について, Bartlett *et al.* (2006) は, 哺育期における血漿中 IGF-I 濃度が代謝エネルギー量よりも CPI に高い正の相関があることを報告しており, 本試験における血漿中 IGF-I 濃度の推移 (Fig. 1, D) が, 代用乳と人工乳からの総 CPI の変化状況 (Fig. 1, C) と酷似したことは, 既報の結果を裏付けた。一般に血漿中の循環 IGF-I は, その大部分が IGFBPs と結合し, それらにより IGF-I 機能が調節されている (Hossner *et al.*, 1997)。特に IGFBP-2 はウシ初期成長期の成長・同化作用に関与し, 低

エネルギー条件下での蛋白栄養に反応し、成長段階に応じて IGFBP-2 及び IGFBP-3 の構成比を変化させながら血漿中 IGF-I 濃度を調節していると考えられている (McGuire *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2000)。このことから、哺育期における代用乳による下部消化管からのスムーズな蛋白質吸収は、IGFBP-2 を中心とした結合蛋白質合成に影響を及ぼし、血漿中 IGF-I 濃度を向上させると考えられた。しかし、本試験において目的変数 y を IGF-I 濃度、説明変数 x を総 CPI とした場合、両者の間には $y=1507.5092X-1005.7685X^2-161.4552$ ($R^2=0.6209$) の二次相関が認められた (Fig. 5)。このことは、哺育期の単純な CPI の過剰が、肝臓における効率的な IGF-I 合成を必ずしも促進させないことを示唆した。反芻胃機能および濃厚飼料の消化吸収能力が十分に発達していないと推察される H 区において、period 4 の代用乳摂取量の急激な減少に伴う人工乳摂取量の急増は、見かけ上の CPI を 0.6kg 以上の高い水準で推移させた (Fig. 1, C)。しかし、第一に消化吸収利用効率のよい代用乳由来の CPI が大幅に減少したこと、第二に発達途中の反芻胃での人工乳のトラップ、第三に第四胃における消化機能が十分に発達していないため人工乳の消化に時間を要することにより、下部消化管からすみやかに吸収される蛋白質量が大きく低下させたものと推察される。その結果、代用乳摂取が終了した 147 日齢時点で比較すると、人工乳からの DMI は H 区 ($3.03 \pm 0.29\text{kg}$) で C 区 ($2.29 \pm 0.18\text{kg}$) よりも有意に高い値を示したものの ($P<0.01$)、血漿中 IGF-I 濃度に差は認められなかった。このことから、効率的な IGF-I の合成と成長のためには、反芻胃を含む消化吸収器官の発達に合わせて、摂取蛋白源を代用乳から人工乳へよりスムーズに移行させることで、離乳時期の CPI を高位に維持し、効率的に蛋白質成分を吸収利用させることが重要であると考えられた。本試験では H 区における代用乳からの蛋白質を主とするエネルギー摂取量の増加が、肝臓での IGF-I 合成を促進することで、試験牛の体重とフレームサイズを向上させたと考えられた。特に試験開始直後の 75 日齢時まで H 区の体重と各体測尺値の日増加量が著しく優れたことから、より初期のステージにおいて、その効果が大きくなることが示唆された。H 区における腹囲以外の体測尺値の日増加量は、哺育初期に急激に促進され、以降の各日増加量について試験区間に差異は認められなかった。一方、期間別 DG は period 3 (125 日齢) まで H 区が C 区より優れた。Hammond (1932) は、家畜の器官別成長曲線において、神経系と骨格の成長が筋肉や脂肪よりも優先されることを明らかにした。本試験においても強化哺育により骨格の形成が優先され、その後骨格筋の発達と脂肪蓄積等が促進され、体重が増加したと推察された。腹囲の日増加量だけが他の体測尺値の成長から遅れて、試験中期 (84–113 日齢) に強化哺育の影響が認められた。このことは、H 区で多量摂取された代用乳による第四胃でのカード形成の影響が、C 区における人工乳摂取による反芻胃容積増加よりも、腹囲の増加に及ぼす影響が大きかったことを示唆した。このことは、離乳時期 (113–154 日齢) の H 区における腹囲の日増加量が、急速に減少したことから推察された。また、血漿中の ALP の多くは、肝臓および骨由来であり、成長期の血漿中 ALP 濃度は骨成長の指標の一つとなる (Charles *et al.*, 1985)。72 日齢時における H 区の血漿中 ALP 濃度が、C 区より有意に高く ($P<0.05$)、99 日齢時においても高い傾向 ($P<0.10$) を示したことは、強化哺育が初期成長期における骨形成を促進し、フレームサイズを向上させたことを裏付けた。

2.4.3 初期成長期骨格形成にともなう筋線維型構成および筋線維直径の変化

一般に肉用牛の骨格筋における筋線維型構成は、品種、月齢、性別、筋肉部位および飼養環境等により異なる (Gotoh, 2003)。交雑種牛の初期成長期における筋線維型構成に関する報告は少ないものの、Greenwood *et al.* (2009) は、離乳後に体重を 10% 減少させるような摂取エネルギー

一制限を加えた育成牛について、115 日齢時における胸最長筋の筋線維型構成および断面積比率等を調査した。その結果、離乳後の DG が 0.2–0.6kg/日程度の育成牛と比較して、筋線維型構成に差異は認められないものの、I 型筋線維の面積比率が多くなることを報告している。この結果は、本試験終了時における胸最長筋の筋線維構成および直径について試験区間に差は認められないものの、試験前後において C 区の I 型および IIA 型筋線維直径の拡大が認められた結果と同様であった。この低栄養条件下での筋線維直径の拡大という現象は、前述した骨格の形成が筋成長より優先されることに起因すると考えられた。つまり、強化哺育により骨格形成が促進されることで、骨格筋は筋線維の走行方向に引き延ばされる力を受けながら筋分化と成長を繰り返す。特に本試験において体長の発育は著しく、胸最長筋では、その断面積を太くする方向よりも、フレームサイズに適応して長さを保持するために伸長が優先されたと考えられた。さらに、試験終了時の H 区における寛幅が C 区より長かったことは、寛骨に接着した胸最長筋の筋幅拡張を示唆しており、これら骨格形成にともなう骨格筋の拡張は、将来的な肉量確保の重要な要素と考えられた。また、11 月齢時における黒毛和種去勢牛の胸最長筋の筋線維型構成について、Gotoh *et al.* (1999) は、I 型:23.8%、IIA 型:24.1%および IIB 型:52.1%程度であり、肥育にともなう II 型筋線維の I 型筋線維への移行を報告している。本試験において初期成長にともなう筋線維型構成の変化は認められなかったことから、胸最長筋の筋線維型構成の発育にともなう変化は、育成期以降の肥育条件により影響されることが考えられた。

2.4.4 初期成長期における MRFs 動態

骨格筋の発育亢進は、牛肉の産肉性にとって重要である。本試験では、産肉性の向上を目的として、成長が著しい初期成長期における栄養環境の差異が、これらの骨格筋細胞の分化に関わる遺伝子群に及ぼす影響について調査した。MyoD および IGF-Ire の mRNA 発現量が、両試験区で低下したことは、これらの因子が栄養条件の影響を受けることなく筋分化レベルの低下および骨格筋内 IGF-Ire の発現レベルの低下が、初期成長にともない急速に進行していることを示唆した。さらに、Myf5 および骨格筋内 IGF-I の mRNA 発現量に哺育期の栄養条件および発育過程にともなう変化が認められなかった。これらの結果から、哺育期の筋細胞分化は MyoD を中心にコントロールされ、骨格筋での IGF-I 活性は、内因性ではなく循環 IGF-I の取り込みを調整することでバランスが保持されていると考えられた。Shibata *et al.* (2006) は、筋芽細胞増殖の抑制的調節因子である myostatin について黒毛和種の初期成長期 (2–10 月齢) における発現状況を調査した。その結果、2 月齢時に最も高い値を示した myostatin 発現量は、10 月齢時までゆっくり減少しながら推移し、半分程度まで低下することを報告した。本試験における H 区の myostatin 発現量は、試験終了時 (148 日齢) において既に試験開始時 (41 日齢) の発現量の約半分まで低下した。Shibata *et al.* (2006) の報告と比較した場合、加齢に伴う myostatin 発現の減少が、本試験の H 区において加速されたことが示唆された。MRFs は MyoD, Myf5, myogenin, MRF4 の順で活性化され、筋管形成初期過程の上流で MyoD と Myf5 が、下流で myogenin と MRF4 が段階に応じて役割を分担しながら筋管形成を調節すると考えられている (Muroya *et al.*, 2002)。本試験終了時で H 区における myogenin の mRNA 発現量が、C 区より有意に低い値を示したことから、筋芽細胞から筋管への分化過程の下流域で強化哺育の影響が顕著であると考えられた。試験開始時の MRF4 の mRNA 発現量は、C 区での個体によるバラツキが大きく、試験区間に有意な差異はないものの、平均値に大きな差が認められた。試験開始時の C 区において MRF4 発現量が 0.3 (relative

to GAPDH) 以上を示した2個体を除いた場合, その値は 0.113 ± 0.016 となる。この場合, C区での試験前後における MRF4 発現量は増加傾向が認められるものの, 有意な変化ではなかった ($P=0.068$)。しかし, これらのことは, 本試験のH区でのみ試験前後での MRF4 の mRNA 発現量が増加したことが, 強化哺育の影響によるものである可能性を示唆した。つまり, 強化哺育は myogenin 発現量を急激に減少させることで筋分化を制御しつつ, 同時に myostatin 発現量の減少と MRF4 発現量の増加を促すことで, 筋管形成の促進に急速に移行していると考えられた。

Table 1. Composition and nutritional intake from the milk replacer and dry calf starter in the experiment.

Item	group H	group C
Composition (% DM)		
milk replacer		
DM (%)	96.0	96.0
TDN	110.4	119.0
CP	29.2	26.0
CF	18.8	24.0
dry calf starter		
DM (%)	86.9	86.9
TDN	82.9	82.9
CP	25.6	25.6
CF	4.3	4.3
Intake (DM kg)		
milk replacer		
DMI	139.4 ± 1.19	41.6 ± 0.04 **
TDNI	153.9 ± 1.32	49.5 ± 0.05 **
CPI	40.7 ± 0.35	10.8 ± 0.01 **
CFI	26.2 ± 0.22	10.0 ± 0.01 **
dry calf starter		
DMI	84.5 ± 12.09	94.0 ± 3.03
TDNI	70.0 ± 10.02	77.9 ± 2.51
CPI	21.6 ± 3.10	24.1 ± 0.77
CFI	3.6 ± 0.52	4.04 ± 0.13

group H: n = 7, group C: n = 14.

Data are mean ± SE. ** Significant difference between groups H and C (P < 0.01).

Table 2. Sequence of primer pairs used for determining the relative abundance of mRNA for MRFs in LT muscle of crossbred Wagyu steers.

Gene	Forward	Reverse	Amplification size (bp)
MyoD	5'-GAACACTACAGCGGCGACTC-3'	5'-TAGTAAGTGCGGTCGTAGCAG-3'	122
Myf5	5'-GCTCTGATGG CATGCCTGA-3'	5'-GCTCTGAGTTGGTGATCCG-3'	168
myogenin	5'-CAGAGGCTGCCCAAAGTGGAG-3'	5'-CCAAACTCCAGTGCGCTGC-3'	200
MRF4	5'-CATCGTGGACAGCATTTCTCTCG-3'	5'-TCATCCGAGCGTGACACAGCA-3'	241
myostatin	5'-GGAAGACGATGACTACCACGC-3'	5'-TGCACAAACACTGTCGCAGG-3'	198
IGF-I	5'-CATCACATCCTCCTCGCATCTC-3'	5'-GTACATCTCCAGCCTCCTCAG-3'	250
IGF-Ire	5'-GTGACGTCCTGCACTTCACC-3'	5'-CCATGTTCCAGCTGTTGGAGC-3'	186
GAPDH	5'-GCCGTAACCTTCTGTGCTGTGCC-3'	5'-TCTCTGCCTTGACTGTGCCG-3'	226

Table 3. Percentage distributions and diameters of myofiber types I, IIA and IIB in LT muscle of groups H and C at the start and the end of the experiment.

The age of the start and end of the experiment: 41 d and 148 d of age, respectively.

Data are mean $\pm$ SE. ^{a, b, A, B} Significant difference between 41 and 148 d of age ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

group	Percentage distribution (%)						Diameter of myofibers (μm)					
	Type I		Type IIA		Type IIB		Type I		Type IIA		Type IIB	
	41d	148d	41d	148d	41d	148d	41d	148d	41d	148d	41d	148d
H	25.1 $\pm$ 1.7	23.1 $\pm$ 2.7	27.3 $\pm$ 2.8	25.1 $\pm$ 3.9	47.6 $\pm$ 3.1	51.7 $\pm$ 4.0	23.7 $\pm$ 1.3	30.0 $\pm$ 2.3	27.6 $\pm$ 2.6A	40.7 $\pm$ 2.1B	38.4 $\pm$ 3.0	51.4 $\pm$ 5.9
C	23.5 $\pm$ 1.3	22.3 $\pm$ 1.8	24.6 $\pm$ 1.5	27.3 $\pm$ 2.5	51.8 $\pm$ 1.4	50.4 $\pm$ 1.9	22.8 $\pm$ 1.1A	27.8 $\pm$ 1.1B	30.0 $\pm$ 2.3A	37.5 $\pm$ 1.1B	37.7 $\pm$ 2.5a	47.9 $\pm$ 2.6b

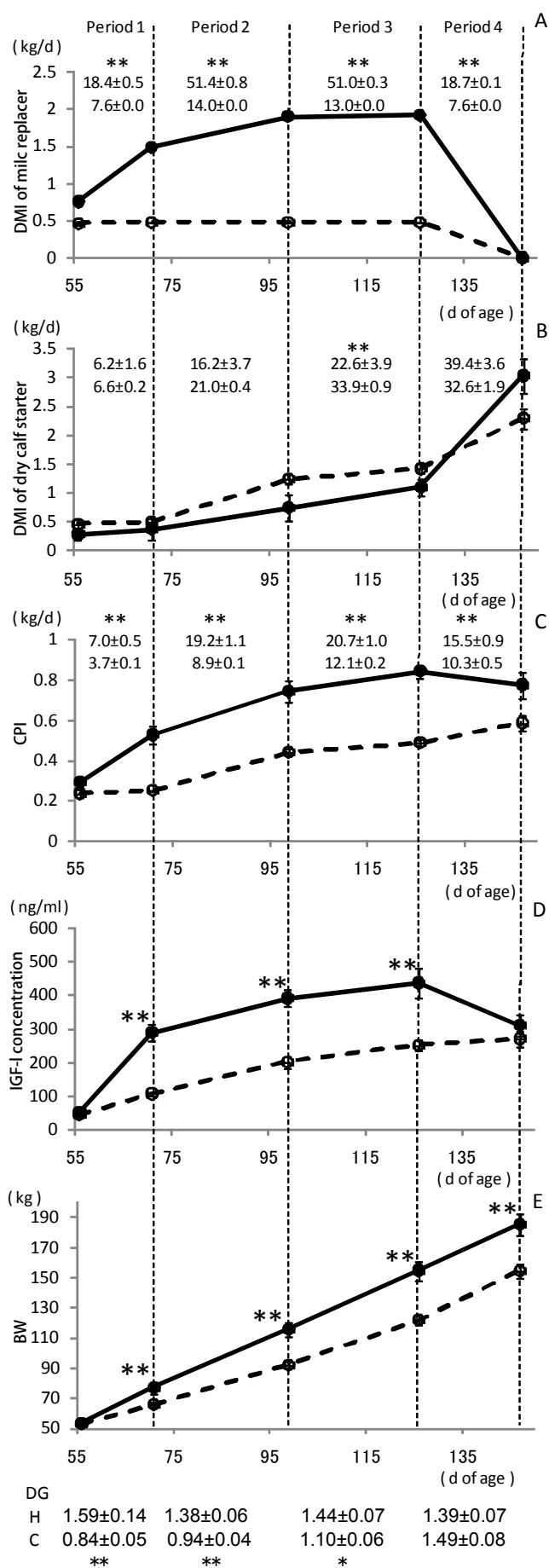


Figure 1. Changes in the DMI of milk replacer (A), dry calf starter (B), total CPI of experimental diets (C), concentrations of plasma IGF-I (D) and BW (E) of groups H (●) and C (○). The examination period was divided into four (Period 1: 56 – 71 d, Period 2: 72 – 99 d, Period 3: 100 – 125 d and Period 4: 126 – 147 d of age). Data are mean ± SE. *, ** Significant difference between groups H and C ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

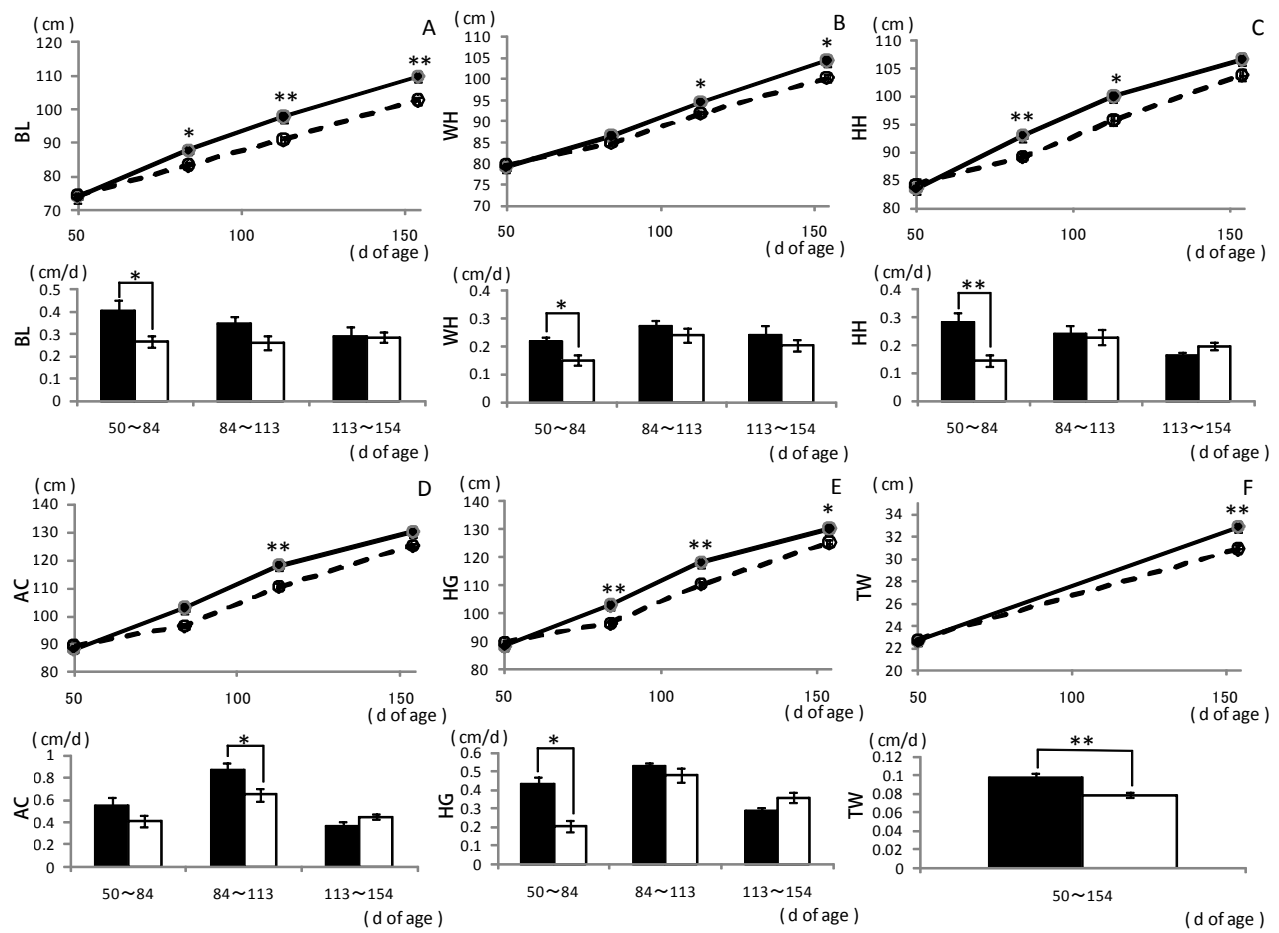


Figure 2. Changes in the distributions of body frame measurements (BL (A), WH (B), HH (C), AC (D), HG (E) and TW (F)) of groups H (●) and C (○), and growth rate at 3 periods of groups H (■) and C (□). Data are mean ± SE. * ** Significant difference between groups H and C ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

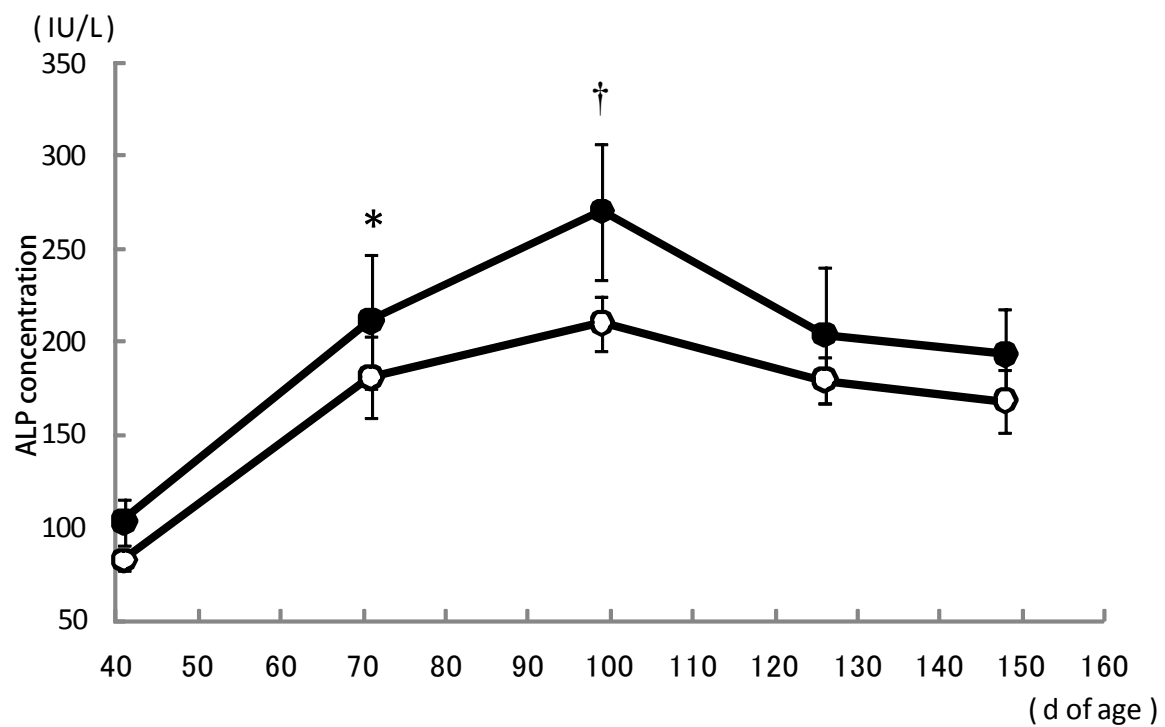


Figure 3. Changes in plasma ALP concentration of groups H (●) and C (○). Data are mean $\pm$ SE. * Significant difference between groups H and C at the same d of age ($P < 0.05$). †; $P < 0.10$.

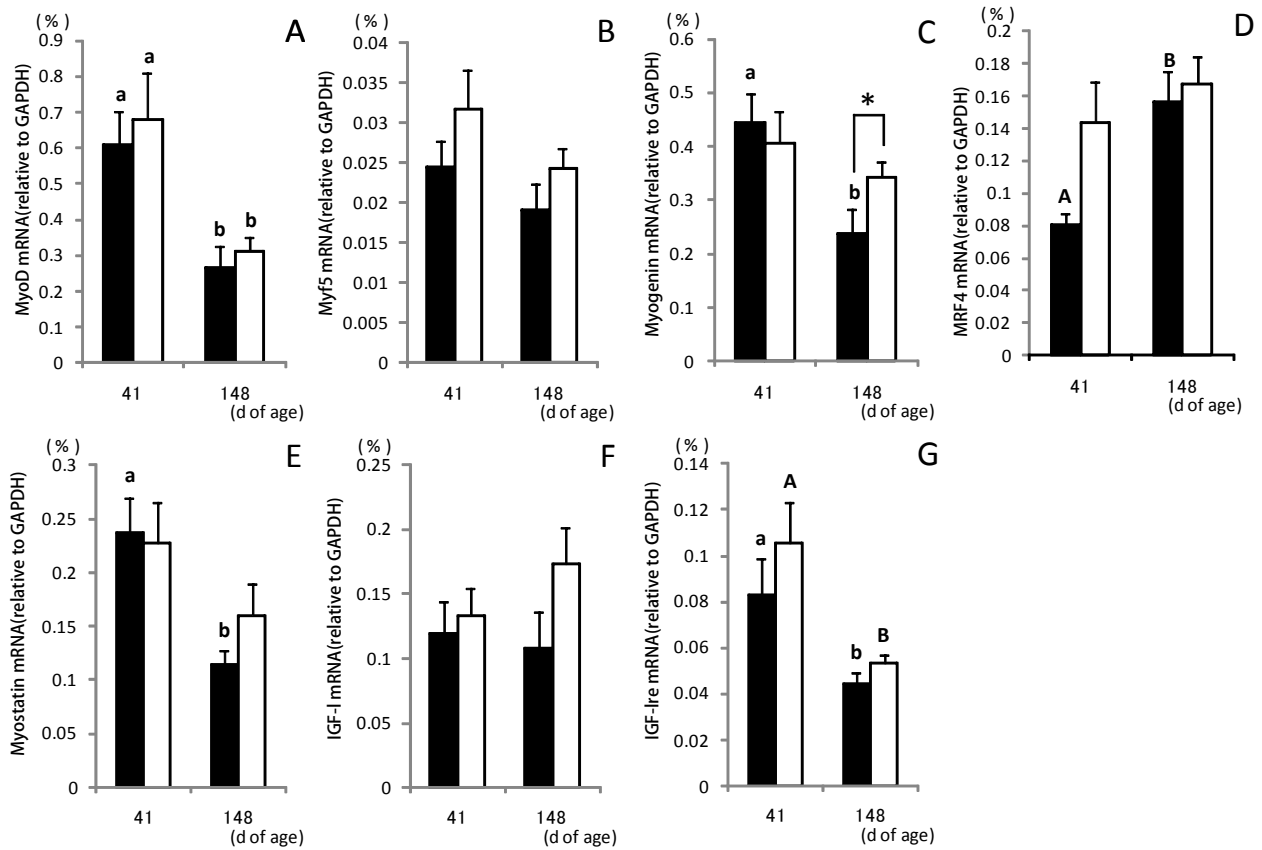


Figure 4. Fold difference in the expressions of mRNA of MyoD (A), Myf5 (B), myogenin (C), MRF4 (D), myostatin (E), IGF-I (F) and IGF-Ire (G) in LT muscle relative to the endogenous reference gene (GAPDH) of groups H (■) and C (□) at the start and the end of the experiment. The age of the start and end of the experiment: 41 d and 148 d of age. Data are mean $\pm$ SE. ^{a, b, A, B} Significant difference between 41 and 148 d of age in the same group ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). * Significant difference between groups H and C ($P < 0.05$).

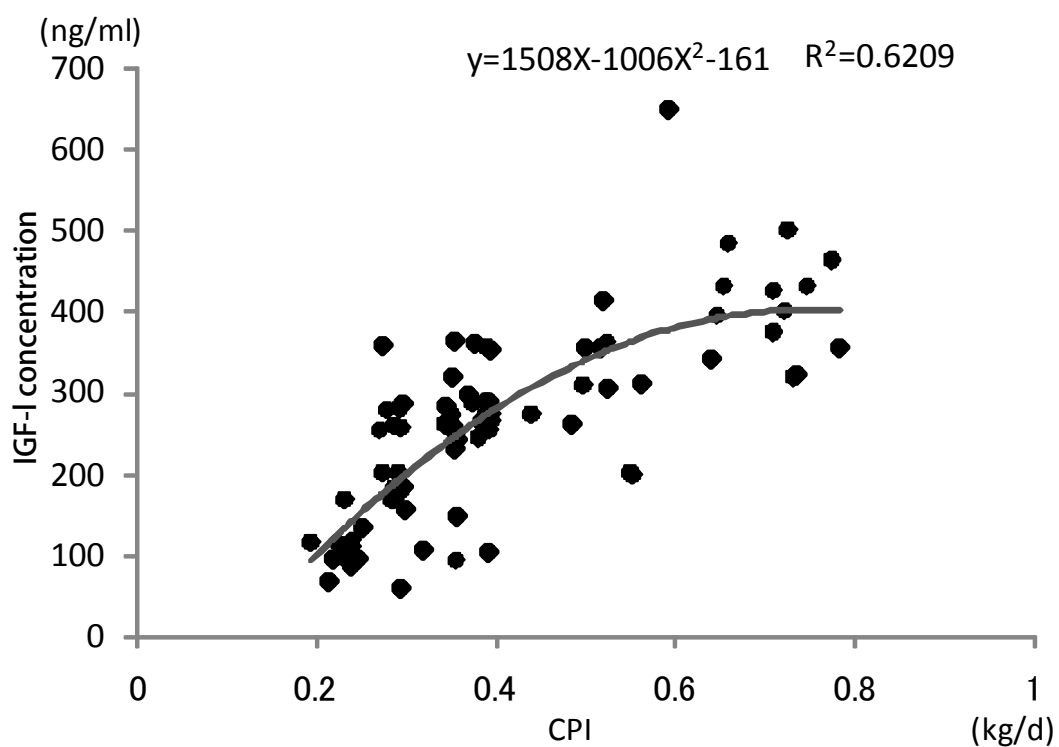


Figure 5. Relationship between total daily CPI and concentration of plasma IGF-I plotted for individual crossbred Wagyu steers at 56 d, 71 d, 99 d, 126 d and 147 d of age.

第Ⅲ章 育成期における交雑種去勢牛への給与飼料栄養水準の違いが 発育と筋特性に及ぼす影響

3.1 緒言

第Ⅱ章において、交雑種雄子牛に高蛋白低脂肪代用乳を多給する強化哺育は、血漿中 IGF-I 濃度を高位に維持することで、体長を中心としたフレームサイズの向上を可能とすると同時に、加速的に発育する骨格に基づいた骨格筋の形態的变化および MRFs 動態を示すことが明らかとなった。さらに、離乳時における第一胃のスムーズな発育と下部消化管の消化吸収能とのバランスが、離乳後の育成牛の発育を大きく左右することが示唆された。Abdelsamei *et al.* (2005) は、ホルスタイン種雄子牛に対する代用乳の長期多給は、発育性向上による肥育日数の短縮が可能であると同時に、枝肉における筋肉内脂肪含有率は低下しないことを報告した。さらに、Schoonmaker *et al.* (2003; 2004) は、交雑種去勢牛 (Angus × Simmental) の育成期 (119–218 日齢時) に高栄養飼料を飽食させることで、濃厚飼料を制限あるいは粗飼料を多給した場合よりも DG に優れ、皮下への脂肪蓄積が亢進されることを報告した。逆に、育成期におけるエネルギー摂取量を制限すると、皮下脂肪の沈着が抑制され、枝肉の赤肉割合は増加するものの、日増体量が減少し、脂肪交雑度は低下する (Plegge, 1987; Hicks *et al.*, 1990; Murphy and Loerch, 1994; Myers *et al.*, 1999; Schoonmaker *et al.*, 2002)。これらの結果は、哺育育成期における摂取栄養条件の違いは、フレームサイズと骨格筋の発育および脂肪蓄積に大きな影響を及ぼすことを示唆している。特に哺育期における代用乳摂取の質と量は骨形成に、育成期での濃厚飼料は脂肪蓄積に対する反応性が高いと考えられる。

そこで本章では、育成期における給与栄養水準の違いが、交雑種去勢牛の発育性に及ぼす影響を明らかにするために、血液および第一胃内溶液性状を中心とした生理的变化および肉用牛の産肉性に密接に関連した骨格筋線維の形態学的変化および MRFs 発現に及ぼす影響について検討した。

3.2 材料および方法

3.2.1 供試牛および試験設計

哺育試験 (第Ⅱ章) に供試した交雑種 (黒毛和種雄 × ホルスタイン種雌) 去勢牛 20 頭 (生後日齢 154.2 ± 1.3 日齢) を用いて育成試験 (2007/2/8–2007/6/27) を実施した (Fig. 6)。哺育育成期に高栄養飼料給与による体質制御を実施する試験区として、哺育期に高蛋白低脂肪代用乳を多給した交雑種去勢牛 7 頭 (H 区; 第Ⅱ章) (体重 185 ± 7.2 kg, 生後日齢 154.3 ± 2.0 日齢) に対し、乾物当たりの TDN:73–76%, CP:19–17%, 中性デタージェント繊維 (NDF):29–30% 程度の高栄養 TMR を飽食させた (H 区)。また、哺育期において日本の慣行的哺育を実施した 13 頭 (C 区; 第Ⅱ章) (1 頭は肺炎に罹患したため試験から除外) を哺育終了時の体重、種雄牛、哺育期 DG により 2 つの試験区に区分した。草食獣本来の発育レベルを示す試験区として、アルファアルファーサンミール (TDN:56%, CP:19%, NDF:44%) 原物 0.5kg/日を制限給餌およびチモシー乾草 (TDN:60%, CP:10%, NDF:64%) を飽食させる R 区に 7 頭 (体重 157 ± 4.7 kg, 生後日齢 157.3 ± 2.4 日齢) の試験牛を配置した。さらに、日本の標準的な哺育育成条件を示す試験区として、乾物当たりの TDN:70–72%, CP:18–16%, NDF:37–38% 程度の TMR を飽食させる JS

区に6頭(体重 153 ± 10.1 kg, 生後日齢 153.8 ± 2.7 日齢)を配置した。ただし, H区およびJS区の試験期間における各給与栄養水準は, 日本の慣行的な交雑種育成基準に準じて, 試験開始時から終了時にかけてTDN割合を漸増, CP割合を漸減させた。また, R区については離乳直後の14日間のみ人工乳現物1kgを制限給餌させた。Table 4に各試験区における試験開始時(154日齢), 中間時(210日齢)および終了時(294日齢)の給与飼料配合割合と飼料栄養成分値を示した。全試験牛は個体ごとに繋留舎飼いし, 舐塩および飲水は自由とした。

3.2.2 調査項目

3.2.2.1 飼料摂取状況および発育状況

育成試験期間中の各試験区における試験飼料の栄養摂取量および体重, 体測尺値の変化状況を調査した。試験飼料の栄養摂取量(DMI, TDNI, CPIおよびNDFI)は, 各試験牛における毎日の給与量および残飼量を計測することにより毎日算出した。発育状況については, 試験開始時(154日齢), 中間時(225日齢)および終了時(294日齢)に体重および体測尺値(体長, 体高, 十字部高, 腹囲および胸囲)を, 試験開始および終了時に寛幅と腰角幅をそれぞれ測定した。

3.2.2.2 第一胃内容液性状

育成試験終了時(294日齢)における試験牛の第一胃内容液中pH, アンモニア態窒素および揮発性脂肪酸(VFAs)濃度を調査した。第一胃内容液は経口カテーテル法により採取した。採取日の朝8:30に全試験牛の給与飼料を取り除いた後, 採取時刻の13:30まで試験牛は飲水および舐塩のみとした。採取した第一胃内容液は直ちにデジタルpHメーター(DPH-1, ATAGO)によりpHを測定した後, 2重ガーゼで濾過し, 遠心分離(3,000rpm, 30min, 4°C)により得られた上澄み液について, アンモニア態窒素濃度をケルダール法(Broderick and Kang, 1980)により, VFAs濃度をガスクロマトグラフ(GC-15A, Shimadzu)によりそれぞれ測定した(Vanzant and Cochran, 1994)。

3.2.2.3 血漿中IGF-I濃度

育成試験期間中の各試験区における血漿中IGF-I濃度変化状況を調査した。約28日ごと(148, 182, 210, 238, 266および294日齢)に頸静脈および尾静脈より真空採血管で血液を採取し, ただちに遠心分離(3,000rpm, 20min, 4°C)により血漿を分離した後, 測定まで-40°Cで凍結保存した。血漿中IGF-I濃度の測定方法は, 第II章と同様とした。

3.2.2.4 筋線維型構成および筋線維直径

育成試験終了時(278日齢)に, 胸最長筋よりショットバイオブシー(ドイツ家畜生物研究所製)により骨格筋サンプルを採取した。バイオブシーの前処理は第II章と同様とした。ショットバイオブシーは第12-13胸椎に相当する部位の体表面に垂直に固定した後, 胸最長筋の筋線維の走行に垂直にサンプルを採取した。筋サンプルは筋線維走行と平行に分割し, 包埋剤で包埋した後, 速やかに液体窒素中にて急速凍結させ-80°Cで冷凍保存した。連続凍結切片の作成, 酵素組織化学的染色による筋線維型の同定, 筋線維直径の測定方法は, 第II章と同様とした。

3.2.2.5 MRFs発現定量解析

各試験区の骨格筋におけるMRFs(MyoD, Myf5, myogenin, MRF4, myostatin, IGF-IおよびIGF-Ire)のmRNA発現状況を調査した。育成試験終了時(278日齢)に, 胸最長筋よりバイオブシー法により骨格筋サンプルを採取した。生体からの筋材料の採取およびバイオブシーの前処

理等は、筋線維型構成および筋線維直径測定用サンプル採取方法と同様とした。また、採取した骨格筋サンプルの保存、total RNA 抽出、逆転写反応による cDNA 合成、リアルタイム RT-PCR 解析およびプライマー設計 (Table 2) は、第 II 章と同様とした。

3.2.2.6 統計処理

調査結果は各試験区の平均値±SE で示した。統計処理は、統計処理ソフト (Ekuseru-Toukei 2008; Social Survey Research Information Co., Ltd. Tokyo, Japan) により分散分析を実施し、Bonferroni 検定により試験区間における有意差の検定を行った。

3.3 結果

3.3.1 飼料摂取状況

育成試験期間を 2 期 (前期:148–210 日齢, 後期:211–294 日齢) に区分した場合の各期および通算における各試験区の一あたり DMI, TDNI, CPI および NDFI を Fig. 7 にそれぞれ示した。R 区における試験期間通算の DMI, TDNI および CPI は、他の試験区より有意に低い値を示し ($P<0.05$)、特に TDNI と CPI については、前期および後期ともに有意に低く推移した ($P<0.01$)。逆に NDFI に関しては、前期において各試験区間に差は認められなかったものの、後期の DMI の増加に伴い、R 区の NDFI が他の試験区より有意に多くなり ($P<0.01$)、全育成期間を通じて他の試験区より有意に多くなった ($P<0.05$)。また、飼料摂取状況に関して、H 区と JS 区の間に顕著な差異は認められなかった。

3.3.2 発育状況

育成試験開始時 (154 日齢)、中間時 (225 日齢) および終了時 (294 日齢) における体重および体測尺値の変化状況について Fig. 8 に示した。

体長; 各試験区の体長は、試験開始時の差異を維持したまま、終了時まで推移した。H 区の体長は、試験期間を通じて他の試験区より常に高い値を示した ($P<0.01$)。JS 区と R 区の間に顕著な差は認められず、同様の発育パターンを示した。

体高; 試験開始時および中間時において、H 区の体高が他の試験区より高い値を示したが ($P<0.01$)、終了時には試験区間に有意差は認められなかった。また、JS 区と R 区の間に顕著な差は認められず、同様の発育パターンを示した。

十字部高; 試験中間時における H 区の十字部高は、他の試験区より高い値を示したが ($P<0.01$)、終了時には R 区との間にのみ、有意な差が認められた ($P<0.01$)。また、JS 区と R 区の間に顕著な差は認められなかった。

腹囲; 試験開始時において各試験区の腹囲に有意な差は認められなかったものの、終了時の H 区および JS 区の腹囲は、R 区より有意に大きかった ($P<0.01$)。また、H 区と JS 区の腹囲の間に有意な差異は認められなかった。

胸囲; H 区の胸囲は、試験開始時において既に JS 区より高い値を示し ($P<0.05$)、中間時および終了時点においても H 区の胸囲は、JS 区より有意に大きかった ($P<0.01$)。また、中間時および終了時において、JS 区の胸囲は、R 区よりも有意に大きかった ($P<0.05$)。

寛幅および腰角幅; H 区の寛幅と腰角幅は、試験開始時において既に他の試験区より有意に高い値を示した ($P<0.05$)。終了時における腰角幅について H 区と JS 区の間に有意な差は認められ

ず、R 区の腰角幅は他の試験区より有意に小さかった ($P<0.01$)。また、終了時において H 区の寛幅が R 区より有意に大きくなり ($P<0.01$)、JS 区の寛幅は H 区より小さく ($P<0.06$)、R 区より大きくなる ($P<0.07$) 傾向が認められた。

体重;H 区の体重は、試験開始時点における JS 区との有意差を保持しながら終了時まで推移した ($P<0.01$)。また、試験期間を通じて JS 区と R 区の区間差は広がりながら推移し、中間時および終了時において JS 区の体重は R 区より有意に重かった ($P<0.01$)。

3.3.3 第一胃内容液性状

育成試験終了時 (294 日齢) における試験牛の第一胃内容液中 pH, アンモニア態窒素および VFAs 濃度を Table 5 にそれぞれ示した。R 区のアンモニア態窒素濃度および VFAs のうち酪酸、イソ吉草酸、吉草酸濃度は、他の試験区より有意に低い値を示した ($P<0.01$)。酢酸濃度および酢酸/プロピオン酸比について試験区間に顕著な差異は認められなかったものの、R 区のプロピオン酸と総 VFAs 濃度は、H 区より有意に低かった ($P<0.01$)。

3.3.4 血漿中 IGF-I 濃度変化

育成試験期間中の各試験区における血漿中 IGF-I 濃度の変化状況を Fig. 9, A に、育成試験期間を 2 期 (前期:148–210 日齢, 後期:211–294 日齢) に区分した場合の Fig. 9, A から算出される各期および通算における X 軸との積分値 (分泌面積比) を IGF-I 分泌量の指標として Fig. 9, B にそれぞれ示した。前期には H 区および JS 区の血漿中 IGF-I 濃度は上昇傾向で推移したものの、R 区の血漿中 IGF-I 濃度は試験開始直後 (182 日齢) に $198 \pm 7.5 \text{ ng/ml}$ まで低下した後、上昇傾向で推移し、H 区>JS 区>R 区の順に有意差を持って推移した ($P<0.01$)。また、前期における分泌面積比についても同様の傾向が認められた ($P<0.05$)。後期において H 区および JS 区の血漿中 IGF-I 濃度は低下しながら推移し、試験区間の有意な差は消失した。また、R 区の血漿中 IGF-I 濃度は上昇しながら推移し、他の試験区との有意差を一部保持しながら推移したものの (238 日齢:H 区, JS 区>R 区 $P<0.01$) (266 日齢:H 区>R 区 $P<0.01$)、終了時 (294 日齢) には全ての試験区間に有意差は認められなかった。また、後期における分泌面積比について、R 区は他の試験区より有意に低い値を示したものの ($P<0.05$)、H 区と JS 区の間には有意な差は認められず、試験期間通算の総分泌面積比については、H 区が R 区より有意に高い値を示した ($P<0.05$)。

3.3.5 筋線維型構成および筋線維直径

育成試験終了時 (278 日齢) にバイオプシーにより採取した試験牛の胸最長筋における筋線維型 (I 型, IIA 型および IIB 型) の構成割合および筋線維直径を Fig. 10 に示した。試験終了時における各試験区の筋線維型構成割合に有意な差は認められなかった。また、H 区および JS 区の I 型および IIA 型筋線維直径は、R 区よりも有意に大きな値を示した ($P<0.05$)。

3.3.6 骨格筋遺伝子発現定量解析

育成試験終了時 (278 日齢) にバイオプシーにより採取した試験牛の胸最長筋における MRFs (MyoD, Myf5, myogenin, MRF4, myostatin, IGF-I および IGF-Ire) の mRNA 発現状況について Fig. 11 に示した。R 区における MRF4 の mRNA 発現量は、他の試験区よりも有意に低い値を示した ($P<0.05$)。しかし、その他の MRFs の mRNA 発現状況について、各試験区間で有意な差は認

められなかった。

3.4 考察

3.4.1 離乳前後の栄養条件が発育性に及ぼす影響

育成試験期間における H 区の給与飼料栄養成分値は、JS 区よりも高く設定されたにも関わらず (Table 4; Fig. 6)，前期 (148–210 日齢)，後期 (211–294 日齢) および試験期間通算における各試験区の一あたり DMI, TDNI, CPI および NDFI に関して、H 区と JS 区の間に顕著な差異は認められなかった (Fig. 7)。さらに、試験終了時 (294 日齢) における試験牛の第一胃内容液中 pH, アンモニア態窒素および VFAs 濃度についても、H 区と JS 区の間に違いは認められなかった (Table 5)。これらの結果は、H 区と JS 区における摂取栄養条件と第一胃内環境が同等であったことを示した。しかし、H 区の体重、体長および胸囲は、試験開始時点における JS 区との有意差を保持しながら終了時まで推移した (Fig. 8)。体長の変化は、おもに椎骨の伸長が要因である。また、胸囲の変化は、椎骨と胸骨を近位と遠位の柱として肺や心臓を納める胸腔を囲む肋骨の発達にもっとも影響を受け、さらに、それを包む前肢帯筋群、その最外側にある皮下脂肪厚にも影響される。体長と胸囲は、産肉量に大きく影響する体軸の長さや太さを規定する。第 II 章で述べたように、哺育期における H 区と JS 区の代用乳からの摂取栄養条件は大きく異なり、H 区の TDNI, CPI および CFI は、JS 区のそれぞれ 3.1 倍、3.8 倍および 2.6 倍となった。これらことは、椎骨や肋骨の伸長は、哺育期の代用乳からの摂取栄養条件に強く影響を受けるものの、育成期の摂取栄養条件が高レベルで維持された場合、哺乳終了時の体格をそのまま反映して成長することを示した。

次に、育成試験終了時の体高に関して、試験区間に有意な差異が認められなかったことは (Fig. 8)，体高の変化が育成期の摂取栄養条件の影響を受けないことを示した。体高は上腕骨および前腕骨を中心とした骨伸長の影響を第一に受けるが、前肢は間接を介さず前肢帯筋で体幹をつつような形で支持している。体幹重量の増加は、前肢帯筋を発育させると同時に、体幹が沈むことから、前肢の伸長と体幹の発達のバランスから体高を引き下げる収縮力を生じさせる可能性が示唆された。試験終了時の腹囲と腰角幅に関して、H 区と JS 区の間に差は認められなかったものの、R 区は他の試験区より有意に低い値を示した (Fig. 8)。腹囲の測定部位は骨格を含まず、第一胃を中心とした内臓、腹腔内と皮下脂肪および腹筋等の発育の影響を受ける。特に、R 区の NDFI が他の試験区より有意に増加した後期で、R 区と他の各試験区の腹囲の差が顕著であったことから、腹囲に影響を及ぼす腹腔内容積の増加は、粗飼料を中心とした摂取飼料の体積 (NDFI) よりも、濃厚飼料を含めた重量 (DMI) の影響を顕著に受けると考えられた。また、H 区と JS 区については、後期の消化器周囲への脂肪の沈着が腹囲に及ぼす影響も示唆された。腰角幅は寛骨における左右寛結節間の距離を、寛幅は左右寛骨臼間の距離をそれぞれ示している。このことは、育成期の濃厚飼料給与が、寛骨幅の拡張に影響を及ぼすことを示した。寛骨は腸骨、恥骨および坐骨で構成され、両側の寛骨は腹位正中面で骨盤結合により結ばれる。つまり、寛骨幅の成長も骨成長の影響を強く受けると考えられた。体長や体高と異なり、育成期の濃厚飼料摂取による寛骨の拡張が認められたことは、本来、反芻獣として粗飼料から摂取されるエネルギーは、育成期の体躯の幅 (体幹) よりも長さや高さを優先的に発育させ、濃厚飼料から摂取された過剰なエネルギーが、体躯の幅を拡大し、その体幹を支持するために必要な骨格 (肋骨、寛骨) の拡張に利用されると考えられた。

3.4.2 離乳時の栄養条件と血漿中 IGF-I 濃度の関係

第 I 章で述べたように、IGFs は体内のほとんどの組織において成長ホルモンの影響を受け、多様な反応性を示す成長因子の一つであり、インスリンと配列が高度に類似したポリペプチドである (Cohen *et al.*, 1991)。IGFs の中でも、IGF-I および IGF-II は骨格筋形成過程の下流および上流において、それぞれ骨格筋分化形成に影響を及ぼす (Adams, 2002)。また、第 II 章で述べたように、高蛋白代用乳多給による強化哺育は血漿中 IGF-I 濃度を高位に維持するものの、離乳時における消化吸収器官の発達に合わせて、摂取蛋白源を代用乳から人工乳へよりスムーズに移行させることで、効率的に蛋白質成分を吸収利用させることが重要である。また、Kamiya *et al.* (2009) は、ホルスタイン種雄子牛に対する高蛋白代用乳多給による強化哺育が、哺育終了時 (6 週齢) の肝臓や脾臓といった内分泌器官重量を増加させ、その後の肝機能および免疫機能を向上させる可能性について報告した。試験前期 (148–210 日齢) における H 区と JS 区の摂取栄養状況に違いは認められなかったものの、H 区の血漿中 IGF-I 濃度は JS 区より高い水準で推移し、H 区の分泌面積比が JS 区より有意に高い値を示した (Fig. 9)。これらの結果は、強化哺育を実施した H 区において、哺育期に IGF-I 合成の主要器官である肝臓が物理的に大きくなると同時に、育成前期に固形物からの蛋白吸収効率が充実したことで、育成期の摂取栄養条件が同等であった JS 区より、H 区の血漿中 IGF-I 濃度が高く維持されたことを示唆した。

3.4.3 育成期における筋線維型構成、筋線維直径および MRFs 発現の変化

第 II 章で述べたように、哺育期における交雑種雄子牛への栄養条件と加齢は、胸最長筋の形態学的変化に影響を及ぼさないと考えられ、育成試験開始時の筋線維型構成と筋線維構成に関して、各試験区間に差異は認められなかった。また、育成試験終了時の筋線維型構成についても各試験区間に差異は認められなかった (Fig. 10)。この結果は、育成期を含めた初期成長期 (–10 月齢) における栄養条件は、胸最長筋の筋線維型構成に影響を及ぼさないことを示した。一方、育成試験終了時の筋線維 (I 型および IIA 型) 直径に関しては、高栄養条件下で飼養した H 区および JS 区が R 区より有意に大きな値を示した (Fig. 10)。これらの筋線維に認められた直径の拡張は、離乳後における蛋白質を中心とした摂取栄養量の増加によるものである。一般的に、骨との結合部位に位置し、姿勢の保持に関わる骨格筋は主に I 型筋線維によって構成されている (Smith *et al.*, 1977; Walmsley *et al.*, 1978; Zajac and Faden, 1985; Totland and Kryvi, 1991)。さらに、持続的な運動に負荷が生じることで、IIA 型モーターユニットが活性化する。I 型および IIA 型筋線維は多くのミトコンドリアを保有することで、酸化系酵素活性が高く持続的に活動する赤色筋線維として区分される。つまり、酸化系酵素活性が高い赤色筋線維の直径は、解糖系酵素活性が高い IIB 型筋線維よりも、育成期における栄養条件の影響を強く受け、高蛋白飼料摂取により、筋線維の拡張が促進されたと考えられた。

MRFs (MyoD, Myf5, myogenin および MRF4) は筋分化誘導能を有し、骨格筋のマスターゲーンとして MyoD family が報告されている (Wright *et al.*, 1989; Hinterberger *et al.*, 1991; Weintraub, 1993; Megeney and Rudicki, 1995)。一般に、筋節において骨格筋系譜の細胞が現れると、MyoD, Myf5 が発現し、この系譜細胞を筋芽細胞へと決定させ維持する (Weintraub, 1993)。その後、myogenin が筋芽細胞から筋管への分化の段階や筋管細胞の維持に働き、MRF4 が筋管成熟の維持、最終分化制御を担う。その他、IGF-I が骨格筋の主要な成長因子として知られている。試験終了時において、全試験区における Myf5 と IGF-Ire の mRNA 発現量は、他の MRFs

よりも明らかに低レベルであった (Fig. 11) 。このことは、交雑種去勢牛の MRFs 動態が、育成期において筋管形成初期過程の上流から下流へ移行することを示唆した。試験終了時の胸最長筋において、筋管成熟の維持、最終分化制御を担う MRF4 の mRNA 発現量について R 区で他の試験区よりも有意に低い値を示したものの ($P<0.05$) ，その他の MRFs の発現状況に各試験区間で有意な差は認められなかった。このことは、育成期の濃厚飼料給与が、MRF4 の発現に影響していることを示すと同時に、MRF4 の発現量の増加が、赤色筋線維拡張の一要因である可能性を示唆した。

Table 4. Ingredients and nutrient composition of experimental diets fed *ad libitum* to groups H, R and JS of crossbred Wagyu steers at 3 time points during the experiment.

Item	154 d of age			210 d of age			294 d of age		
	H	R	JS	H	R	JS	H	R	JS
Ingredients (% DM)									
Timothy hay	21.7	100.0	30.1	22.7	100.0	35.9	16.7	100.0	32.8
Alfalfa meal	8.8	(0.5kg) ^a	10.1	11.0	(0.5kg) ^a	8.6	11.0	(0.5kg) ^a	8.6
Corn	8.5	—	6.3	21.3	—	15.2	28.9	—	18.3
Barley	1.7	—	2.0	9.5	—	9.5	10.1	—	9.5
Soybean meal	3.5	—	4.8	12.4	—	8.0	10.3	—	8.1
Wheat bran	13.7	—	15.9	14.4	—	14.4	14.3	—	14.4
Brewer's grains	9.6	—	11.1	8.7	—	8.3	8.7	—	8.3
Dry calf starter	32.5	(1.0kg) ^a	19.7	—	—	—	—	—	—
Nutrient composition (% DM)^b									
TDN	73.0	59.8	70.0	74.0	59.8	71.0	76.0	59.8	72.0
CP	19.0	9.8	18.0	18.0	9.8	16.0	17.0	9.8	16.0
NDF	29.0	64.3	36.6	33.9	64.3	40.0	30.4	64.3	38.2

Group H: n = 7, group R: n = 6. **a:** Timothy hay and limited diet (FM kg) fed to group R as alfalfa meal (DM: 89.3%, TDN: 55.5%, CP: 18.5%, NDF: 43.8%) and dry calf starter (DM: 86.9%, TDN: 82.9%, CP: 25.6%, NDF: 13.8%). **b:** Calculated value.

Table 5. pH levels, concentration of ammonia-N, and principal VFAs in rumen juice for groups H, R and JS in crossbred Wagyu steers at the end of the experiment.

Item	group H	group R	group JS
pH	6.6 ± 0.1	6.8 ± 0.0	6.8 ± 0.1
Ammonia-N (mg/dl)	9.6 ± 0.6 ^A	1.5 ± 0.5 ^B	8.2 ± 0.6 ^A
VFAs (mM/l)			
acetic	29.2 ± 2.0	23.4 ± 0.6	27.5 ± 2.5
propionic	9.8 ± 0.7 ^A	3.3 ± 0.1 ^B	6.1 ± 0.8 ^{AB}
butyric	7.4 ± 0.7 ^A	3.3 ± 0.1 ^B	6.1 ± 0.8 ^A
isovaleric	1.0 ± 0.1 ^A	0.7 ± 0.0 ^B	0.9 ± 0.0 ^A
valeric	0.9 ± 0.1 ^A	0.5 ± 0.0 ^B	0.8 ± 0.1 ^A
total VFAs	48.8 ± 3.2 ^A	35.6 ± 0.9 ^B	44.4 ± 3.9 ^{AB}
VFAs A/P ratio	2.0 ± 0.1	3.3 ± 0.0	3.2 ± 0.1

The age of the end of the experiment: 294 d of age.

Data are mean ± SE. ^{A, B} Significant difference between groups ($P < 0.01$).

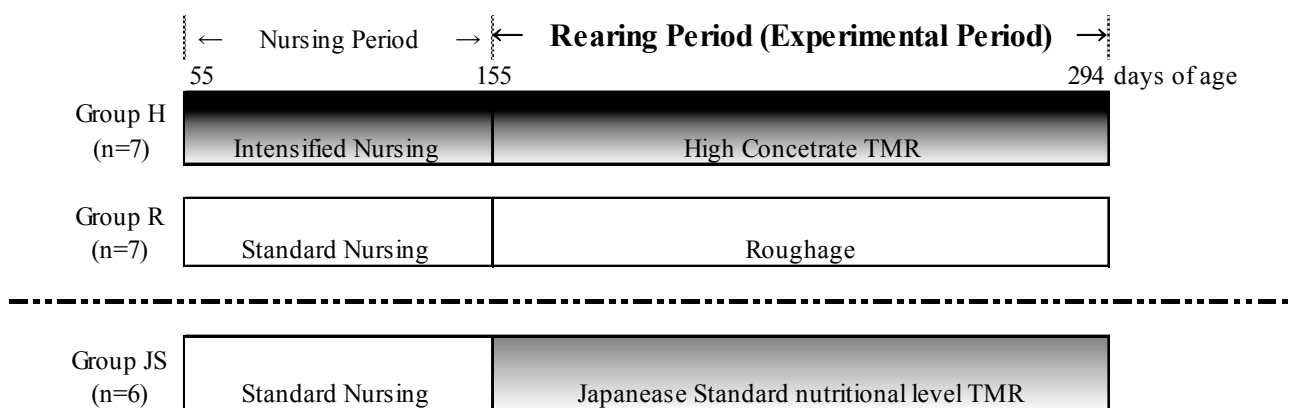


Figure 6. Pattern diagrams of experimental design.

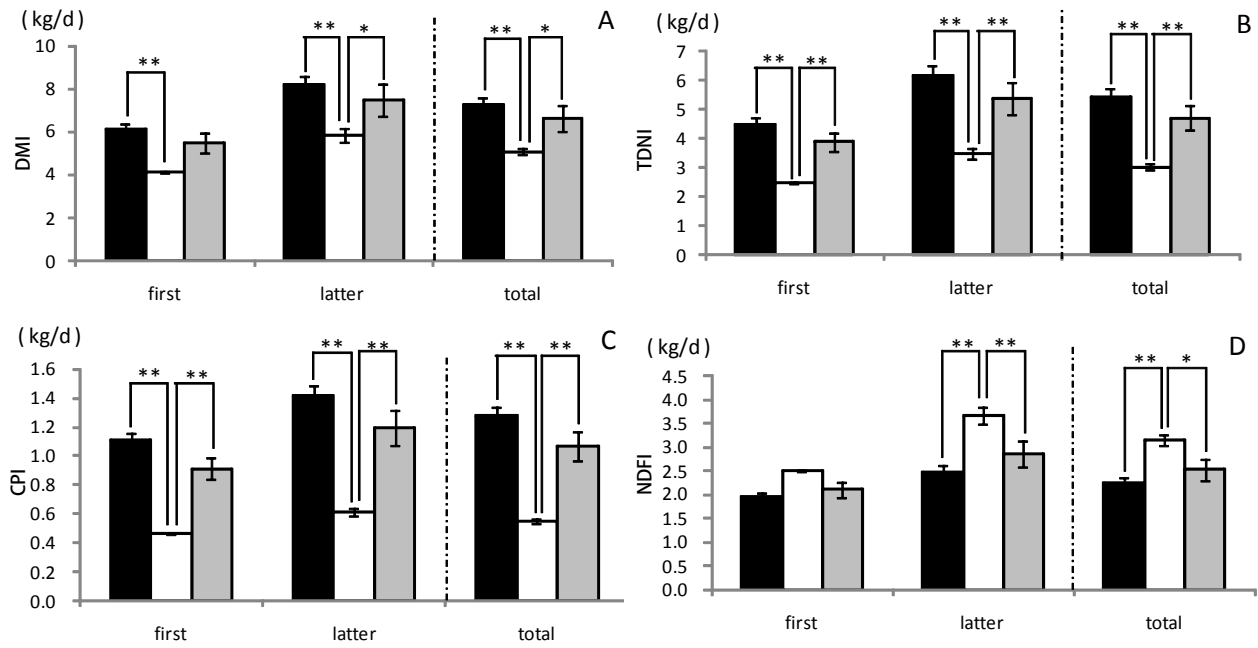


Figure 7. Changes in DMI (A), TDNI (B), CPI (C) and NDFI (D) resulting from the experimental diets of groups H (■), R (□) and JS (▒), of crossbred Wagyu steers during the first and latter periods, and for the entire experiment. The first period: 148 – 210 d of age, and the latter period: 211 – 294 d of age. Data are mean $\pm$ SE. *, ** Significant difference between groups ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

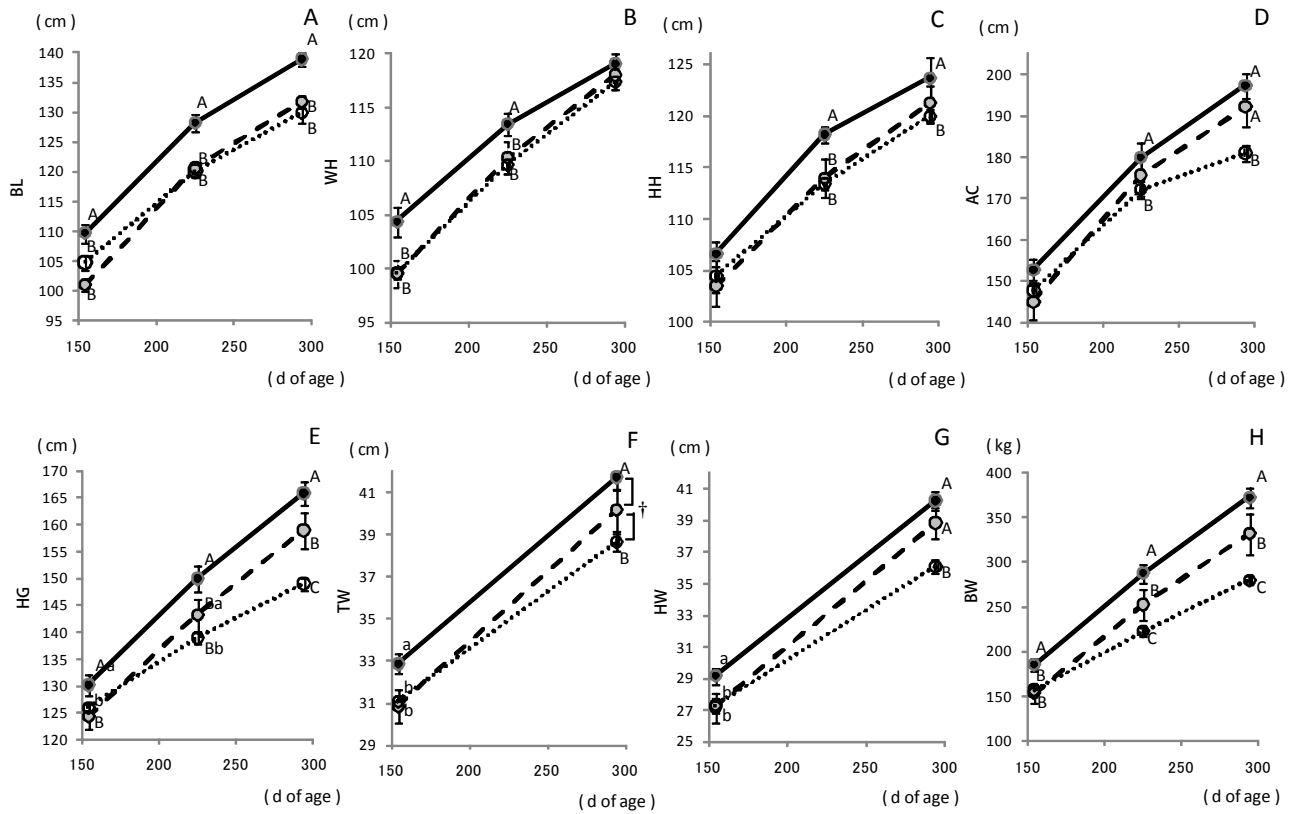


Figure 8. Changes in the distribution of frame measurements (BL (A), WH (B), HH (C), AC (D), HG (E), TW (F) and HW (G)) and BW (H) of groups H (●), R (○) and JS (◐). Data are mean ± SE. ^{a, b, A, B, C} Significant difference between groups at the same d of age (P < 0.05 and P < 0.01, respectively). †; P < 0.07

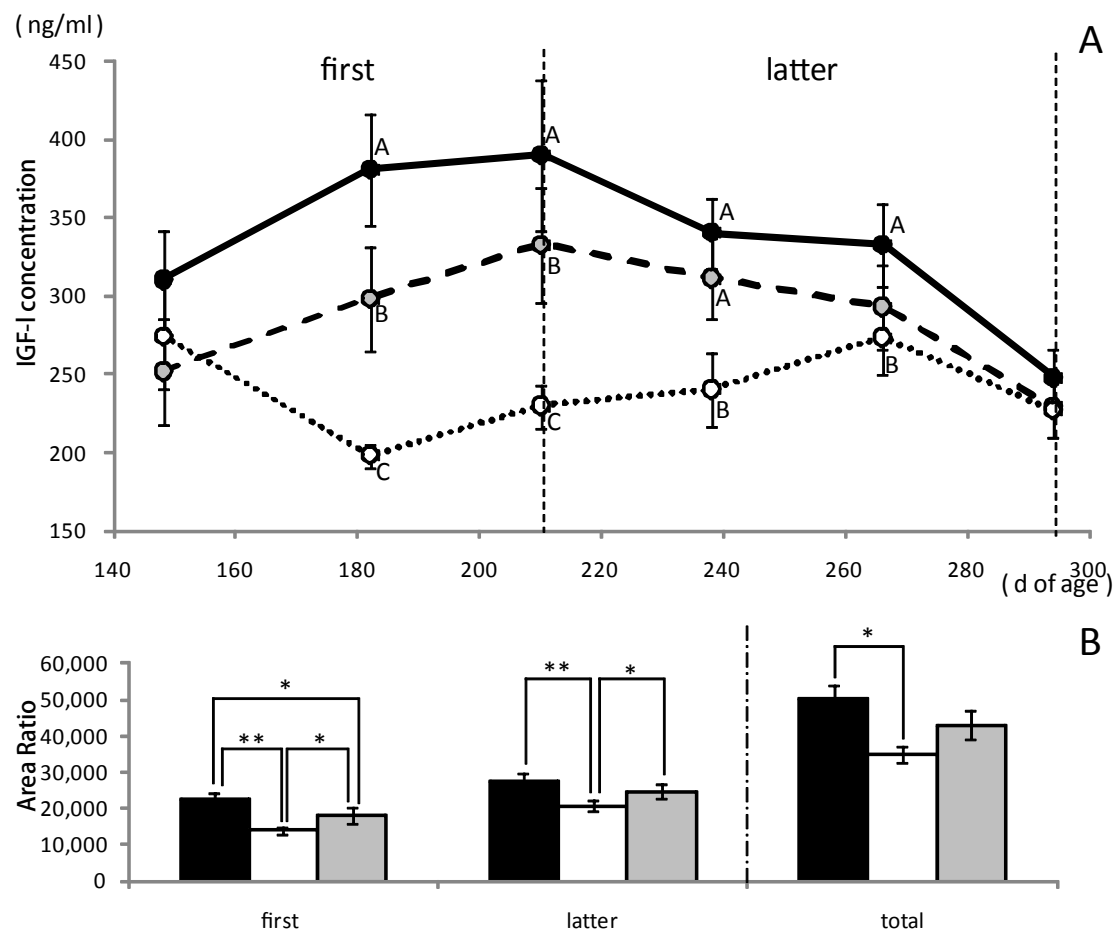


Figure 9. Changes in the concentration (A) and calculated secretion area ratio (B) of plasma IGF-I of groups H, R and JS. A: Changes in plasma IGF-I concentration in groups H (●), R (○) and JS (◐). B: Calculated secretion area ratio of groups H (■), R (□) and JS (◐) during the first and latter periods and for the entire experiment. The first period: 148 – 210 d of age, and the latter period: 211 – 294 d of age. Data are mean $\pm$ SE. ^{A, B, C} Significant difference between groups at the same d of age ($P < 0.01$). *, ** Significant difference between groups ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

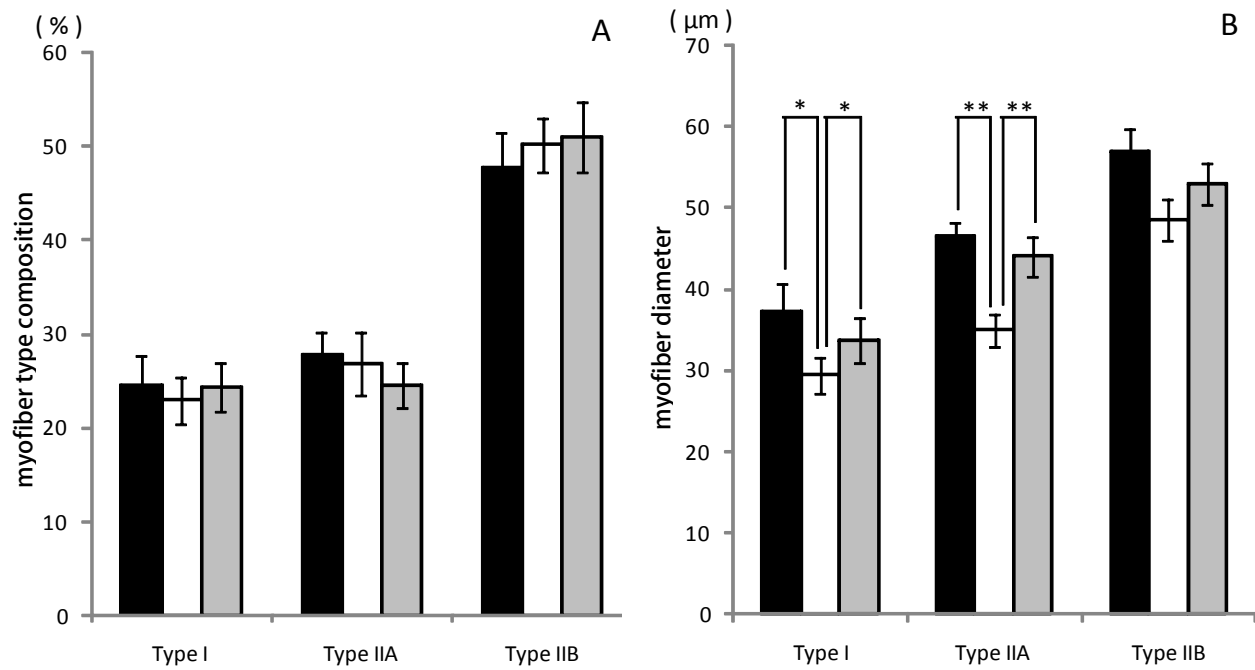


Figure 10. Percentage distributions (A) and diameters (B) of myofiber types I, IIA and IIB in LT muscle of groups H (■), R (□) and JS (▤) at the end of the experiment. The LT biopsy samples were obtained from the steers at 278 d of age. Data are mean $\pm$ SE. * ** Significant difference between groups for the same variables ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

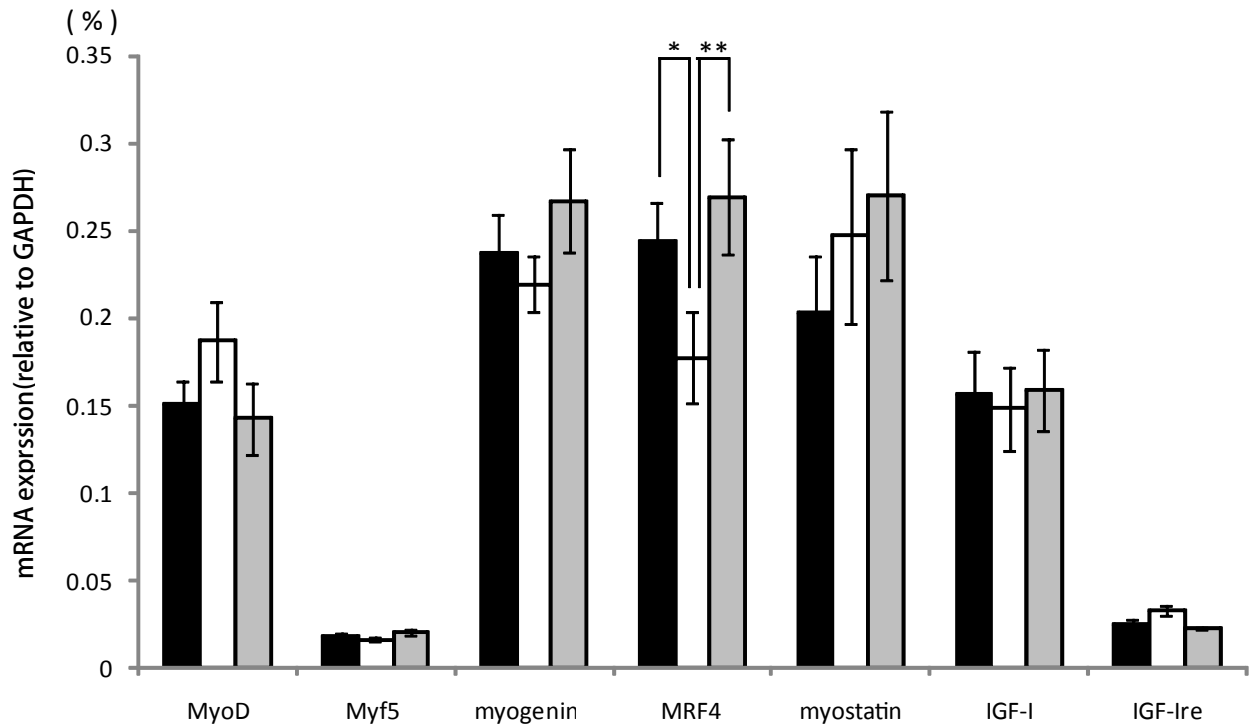


Figure 11. Fold differences in the expressions of mRNA of MyoD, Myf5, myogenin, MRF4, myostatin, IGF-I and IGF-Ire in LT muscle relative to the endogeneous reference gene (GAPDH) of groups H (■), R (□) and JS (▒) at the end of the experiment. The LT samples were obtained from the steers at 278 d of age. Data are mean $\pm$ SE. *, ** Significant difference between groups for the same variables ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

第Ⅳ章 耕作放棄地における放牧肥育が交雑種去勢牛の発育性に及ぼす影響

4.1 緒言

近年、日本国内では、海外からの安価な食料の輸入増加および農業従事者の高齢化による離農や労働力不足等により、耕作放棄地が増加しており、食料自給率の低迷はもちろん、農地荒廃や鳥獣害増加等の大きな要因の一つとなっている。一方、耕作放棄地の草資源は、反芻家畜の粗飼料として有効に活用することが可能であり、全国の耕作放棄地を放牧利用により活用した場合の潜在生産力は少なくないことも報告されている (Sasaki *et al.*, 2007; Hayashi, 2009)。耕作放棄地における野草種は地域、気候、立地条件により大きく異なり、九州本土においては、セイタカアワダチソウ (*Solidago altissima* L.)、クズ (*Pueraria lobata* Ohwi. *S. altissima*) といった野草が優勢種となる場合が多く、セイタカアワダチソウの栄養価は良好であるが嗜好性に低く、クズは嗜好性や栄養価が高いが再生力が低い (Hayashi, 2009)。耕作放棄地の植生は、年間を通して安定的に栄養価の高い牧草を生産できる管理放牧地と比較して、牧養力の面で劣るため、耕作放棄地での長期放牧による肉用牛生産については、放牧牛の高い発育性の維持が重要である。

日本における管理放牧地を利用した放牧肥育による肉用牛生産は、阿蘇地方の褐毛和種 (Okamoto *et al.*, 2001)、東北地方の日本短角種 (Muramoto *et al.*, 2005) が有名である。これらの放牧肥育により生産された牛肉は、安全安心、ヘルシーな食品に対する消費者ニーズの高まりを受けて、現在注目を集めている。放牧肥育により生産された牛肉は、その運動量の増加に基づく骨格筋における筋線維断面積の向上が特徴的である (Kido, 2010)。さらに、放牧牛肉の特徴として、有酸素運動増加による赤色筋線維型割合の向上 (Ozutsumi and Okada, 1981)、牧草採食による筋肉中ビタミン類の蓄積 (Muramoto *et al.*, 2005) と脂肪酸組成の変化 (Tsuneishi *et al.*, 1988a, b; Hayashi, 2009) が報告されている。

Gotoh *et al.* (2010a, b) は、黒毛和種の哺育期を含む初期成長期 (1–10 月齢) に高栄養飼料を給与した後、管理放牧地での放牧および牧草を給与することで肥育 (11–30 月齢) した場合の発育性と肉質性状について調査した。その結果、初期成長期に高栄養飼料を給与した黒毛和種の屠畜時 (31 月齢) の体重は 576kg、胸最長筋内脂肪含有率は 13%であり、初期成長期に乾草のみを給与した場合と比較して、体重で 49kg、胸最長筋内脂肪含有率で 3.6%高い値を示した (Gotoh *et al.*, 2010a, b)。これらの結果は、黒毛和種の初期成長期における濃厚飼料多給による体質制御の影響は、粗飼料を十分量給与する肥育条件下において、屠畜時の体重と筋肉内脂肪含有率に認められることを示している。また、第Ⅱ章および第Ⅲ章において、交雑種雄子牛に対する高蛋白低脂肪代用乳の多給 (哺育期 2–5 月齢) と高栄養飼料多給による育成 (育成期 5–10 月齢) は、血漿中 IGF-I 濃度を高く維持することでフレームサイズを劇的に向上させる。さらに、Ebara *et al.* (2010) は、その脂肪細胞の形態的変化および分化を制御する遺伝子の動態を明らかにした。これらの結果は、初期成長期における高栄養飼料給与による体質制御が、耕作放棄地での放牧肥育による肉用牛の発育性と肉質向上のための有効な手段の一つであることを示している。

そこで本章では、長期間におよぶ耕作放棄地での放牧肥育が肉用牛の発育性に及ぼす影響を明らかにすると同時に、初期成長期における体質制御が、耕作放棄地での放牧肥育条件下における骨格筋の筋分化に及ぼす影響をボトムアップ的に抽出することを目的とした。第Ⅲ章において育成試験を実施した交雑種去勢牛を用いて試験を実施し、耕作放棄地での放牧肥育が肉用牛のフレームサイズを中心とした発育性および産肉性に密接に関連した骨格筋線維の MRFs 発現

に及ぼす影響について検討した。

4.2 材料および方法

4.2.1 供試牛および試験設計

育成試験（第Ⅲ章）に供試した交雑種（黒毛和種雄 × ホルスタイン種雌）去勢牛 15 頭（生後日齢 294 ± 1.3 日齢）を用いて肥育試験（2007/6/28－2008/10/28）を実施した。哺育育成期における体質制御と耕作放棄地での放牧肥育の関係を示す試験区として、哺育期に高蛋白低脂肪代用乳を多給し、育成期に高栄養 TMR を飽食させた交雑種去勢牛 5 頭（H 区；第Ⅲ章）（体重 $376.6 \pm 14.9\text{kg}$ ，生後日齢 294.6 ± 2.5 日齢）に対し、耕作放棄地での放牧肥育を実施した（H 区）。草食獣本来の発育レベルを示す試験区として、日本の慣行的哺育を実施した後、育成期にアルファルファルーサンミール原物 0.5kg/日 を制限給餌およびチモシー乾草を飽食させた交雑種去勢牛 5 頭（R 区；第Ⅲ章）（体重 $282.9 \pm 6.41\text{kg}$ ，生後日齢 294.4 ± 2.9 日齢）に対し、耕作放棄地での放牧肥育を実施した（R 区）。日本の慣行的な交雑種の哺育育成および肥育体系に準じた試験区として、日本の慣行的哺育育成条件で飼養した交雑種去勢牛 5 頭（JS 区；第Ⅲ章）（体重 $347.0 \pm 20.2\text{kg}$ ，生後日齢 293.8 ± 3.1 日齢）に対し、乾物当たりの TDN:72－74%，CP:16－14%，NDF:38－30%程度の TMR を飽食させた（JS 区）。

H 区および R 区の試験牛は、耕作放棄地での放牧肥育を開始するにあたって、放牧馴致期間（2007/6/28－2007/9/2）を設定し、放牧馴致を実施した。H 区は、飼料栄養水準を漸減させることで、高栄養 TMR 飽食給与からチモシー乾草制限給与への移行を実施した（2007/6/28－2007/7/25:28 日間）。その後、放牧資材（電牧線，給水器，連動スタンチオン等）および集団行動の馴致を目的として屋内パドック（ $14\text{m} \times 7\text{m}$ ）において群飼（2007/7/26－2007/8/5:11 日間）した後、野外環境への馴致を目的として、バヒアグラスが優勢する管理放牧地（約 50a）内で昼夜放牧を実施した（2007/8/6－2007/8/28:23 日間）。R 区は、屋内パドックにおいて群飼することで放牧資材等への馴致（2007/6/28－2007/7/15:18 日間）を実施した後、管理放牧地内での昼夜放牧を実施した（2007/7/16－2007/8/5:21 日間）。馴致終了後、全ての試験牛は耕作放棄地での放牧肥育試験開始（2007/9/3）まで、繋留舎飼いによりチモシー乾草および配合飼料を制限給与した。また、この馴致期間において、JS 区の試験牛に対する給与飼料を日本の慣行的な交雑種肥育前期飼料の栄養水準（TDN:74%，CP:14%，NDF:30%）へ漸増させた。各試験区に供試した試験牛の馴致期間における試験飼料からの栄養摂取状況を Table 6 に示した。

哺育育成期における高栄養飼料給与による体質制御が肥育期の発育性に及ぼす影響を、耕作放棄地での放牧条件下でボトムアップ的に把握するために、H 区および R 区の試験牛は、福岡県豊前市内の耕作放棄地（総面積約 7.5ha）1 カ所において放牧肥育試験を実施した（2007/11/3－2008/10/28:422 日間）。試験期間中の補助飼料給与は、各試験牛を連動スタンチオンにて捕獲繋留後、配合飼料（TDN:86%，CP:20%） $1\text{kg/日} \cdot \text{頭}$ のみとし、飲水および放牧地内の移動，生草採食等は昼夜自由とした。放牧肥育試験を実施した耕作放棄地（約 7.5ha）の概要および試験期間中の放牧強度の推移等について Fig. 12 に示した。また、耕作放棄地での放牧肥育と日本の慣行的な交雑種去勢肥育の発育性を比較するために、JS 区の試験牛は個体ごとに繋留舎飼いし、日本の慣行的な交雑種肥育基準に準じた栄養水準の TMR（TDN:74－80%，CP:14－12%，NDF:30－20%）を飽食させた。また、舐塩および飲水は自由とした。Table 7 に JS 区における試験前期

(360－588 日齢) および後期 (589－788 日齢) の給与飼料配合割合と飼料栄養成分値を示した。

4.2.2 調査項目

4.2.2.1 飼料摂取状況および発育状況

肥育試験期間中の各試験区における発育状況について、試験開始時 (294 日齢)、放牧馴致終了時 (359 日齢)、試験中間時 (588 日齢) および試験終了時 (783 日齢) に体重および体測尺値 (体長、体高、十字部高、腹囲、胸囲、寛幅および腰角幅) をそれぞれ測定した。また、JS 区における試験飼料からの栄養摂取量 (DMI, TDNI, CPI および NDFI) は、各試験牛における毎日の給与量および残飼量を計測することにより毎日算出した。

4.2.2.2 第一胃内容液性状

肥育試験開始時 (294 日齢)、放牧馴致終了時 (359 日齢)、試験中間時 (588 日齢) および試験終了時 (783 日齢) における試験牛の第一胃内容液中アンモニア態窒素および VFAs 濃度を調査した。第一胃内容液は経口カテーテル法により採取した。H 区および R 区の試験牛は、朝 11:00 に連動スタンションにより捕獲繫留した後、速やかに第一胃内容液を採取した。また、JS 区は、採取日の朝 8:30 に全試験牛の給与飼料を取り除き、採取時刻の 13:30 まで飲水および舐塩のみとした条件で、第一胃内容液を採取した。採取した第一胃内容液は直ちにデジタル pH メーター (DPH-1, ATAGO) により pH を測定した後、2 重ガーゼで濾過し、遠心分離 (3,000rpm, 30min, 4°C) により得られた上澄み液について、アンモニア態窒素濃度をケルダール法 (Broderick and Kang, 1980) により、VFAs 濃度をガスクロマトグラフ (GC-15A, Shimadzu) によりそれぞれ測定した (Vanzant and Cochran, 1994)。

4.2.2.3 血漿中総コレステロール (T-Cho)、尿素態窒素 (BUN) およびビタミン類濃度

肥育試験期間中の各試験区における血液一般性状として血漿中 T-Cho, BUN 濃度およびビタミン類としてレチノール、 α -トコフェロールおよび β -カロテン濃度の変化状況を調査した。肥育試験期間中、約 28 日間隔で頸静脈および尾静脈より真空採血管で血液を採取した。H 区および R 区では、採取した血液は遠心分離 (3,000rpm, 20min, 4°C) による血漿の分離を実施するまでの約 4 時間程度、保冷剤を満たした保冷ボックス内で静置した。JS 区では採取後速やかに、遠心分離 (3,000rpm, 20min, 4°C) により血漿を分離した。分離した全ての血漿は、測定まで -40°C で凍結保存した。血漿中 T-Cho および BUN 濃度は、Spot CemII Auto Analysis System (SP-4410, Arkray) により測定した。また、肥育試験開始時 (294 日齢)、放牧馴致終了時 (359 日齢)、試験中間時 (588 日齢) および試験終了時 (785 日齢) に採取した血液については血漿中のレチノール、 α -トコフェロールおよび β -カロテン濃度を測定した。ビタミン類の測定は、エタノールにより蛋白を除いたサンプルを n-ヘキサンにより抽出し、イソプロパノールに置換したものを高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) により解析した。各濃度の算出は、それぞれ市販の標準試料により検量線を作成することで実施した。HPLC 条件は Column: Finepak SIL C18T, 移動相: Methanol : Tetrahydrofuran = 9 : 1, 流速: 1.0ml/min, オープン温度: 40°C, 検出吸光度: レチノール 325 nm, α -トコフェロール 292 nm, β -カロテン 453 nm とした。

4.2.2.4 MRFs 発現定量解析

各試験区の骨格筋における MRFs (MyoD, Myf5, myogenin, MRF4, myostatin, IGF-I および IGF-Ire) の mRNA 発現状況を調査した。肥育試験開始時 (278 日齢)、中間時 (518 日齢) およ

び終了時 (694 日齢) に、胸最長筋よりバイオプシー法により骨格筋サンプルを採取した。生体からの筋材料の採取とバイオプシーの前処理、採取した骨格筋サンプルの保存、total RNA 抽出、逆転写反応による cDNA 合成、リアルタイム RT-PCR 解析およびプライマー設計 (Table 2) は、第 II 章と同様とした。

4.2.2.5 統計処理

調査結果は各試験区の平均値±SE で示した。統計処理は、統計処理ソフト (Ekuseru-Toukei 2008; Social Survey Research Information Co., Ltd. Tokyo, Japan) により分散分析を実施し、Bonferroni 検定により試験区間における有意差の検定を行った。

4.3 結果

4.3.1 発育状況

肥育試験開始時 (294 日齢)、放牧馴致終了時 (359 日齢)、試験中間時 (588 日齢) および試験終了時 (783 日齢) における体重と体測尺値 (体長、体高、十字部高、腹囲、胸囲、寛幅および腰角幅) の変化状況、さらに放牧馴致期 (294–359 日齢)、肥育試験前期 (360–588 日齢) および後期 (589–783 日齢) の各日増加量について Fig. 13 にそれぞれ示した。なお、本章における各試験区の供試頭数を各 5 頭に減少させたために (第 III 章: H 区 7 頭, R 区 7 頭, JS 区 6 頭)、本章の肥育試験開始時と第 III 章の育成試験終了時における各試験区の平均値±SE は、多少異なった。

体重; 試験開始時において、既に H 区と JS 区の体重は、R 区より有意に重かった ($P<0.05$) (Fig. 13)。放牧馴致期間の DG に関して、各試験区間で有意な差が認められ (JS 区>R 区>H 区, $P<0.01$)、放牧馴致終了時の体重は JS 区>H 区>R 区の順に重かった。肥育試験前期における JS 区の DG は、他の試験区より有意に高い値を示した ($P<0.01$)。肥育試験後期における R 区の DG は、JS 区より有意に高い値を示し ($P<0.05$)、試験終了時において JS 区の体重が最も重かった ($P<0.01$)。

体長; 試験開始時において、既に H 区の体長は、他の試験区より長い傾向があった ($P<0.08$)。放牧馴致期間中における JS 区の日増加量は、他の試験区より有意に大きく ($P<0.01$)、放牧馴致終了時には R 区の体長は、他の試験区より有意に短かった ($P<0.05$)。肥育試験前期と後期の日増加量について各試験区間に有意な差は認められなかったものの、試験終了時において JS 区の体長は他の試験区より有意に長かった ($P<0.01$)。

体高; 放牧馴致期間における体高およびその日増加量について各試験区間に有意な差は認められなかった。また、肥育試験前期と後期における日増加量についても各試験区間に有意差は認められなかったものの、前期終了時には JS 区の体高は、R 区より有意に高く ($P<0.01$)、試験終了時において JS 区の体高は、他の試験区より有意に高かった ($P<0.05$)。

十字部高; 肥育試験期間中における十字部高の日増加量について、試験区間に有意な差は認められず、試験終了時の JS 区の十字部高は、R 区より有意に高かったが ($P<0.01$)、H 区との間に有意な差は認められなかった。

腹囲および胸囲; 胸囲の発育パターンは、体重と酷似した。また、肥育試験開始時において既に R 区の胸囲は他の試験区より有意に小さい値を示した ($P<0.01$)。放牧馴致期間における腹囲の日増加量は JS 区>R 区>H 区の順に高い値を示し ($P<0.01$)、放牧馴致終了時において JS 区の

腹囲が他の試験区より有意に大きかった ($P<0.01$)。肥育前期における JS 区の腹囲の日増加量は、他の試験区より有意に高い値を示したが ($P<0.01$)、後期では逆に JS 区が他の試験区より有意に低い値を示し ($P<0.01$)、試験終了時の JS 区の腹囲は他の試験区より有意に大きかった ($P<0.01$)。

寛幅および腰角幅；放牧馴致期間における寛幅の日増加量に関して、JS 区が H 区より有意に高い値を示し ($P<0.05$)、試験終了時において JS 区の寛幅は、他の試験区より有意に大きかった ($P<0.01$)。放牧馴致期間および肥育試験前期での JS 区における腰角幅の日増加量は、他の試験区より有意に高い値を示し ($P<0.01$)、肥育試験前期および後期終了時には、JS 区の腰角幅は他の試験区より有意に大きかった ($P<0.01$)。

日本の慣行的な交雑種去勢肥育基準に基づいた JS 区における肥育試験前期 (360–588 日齢) および肥育試験後期 (589–788 日齢) の栄養摂取状況 (DMI, TDNI, CPI および NDFI) を Table 7 に示した。JS 区における体重と栄養摂取の変化状況は、交雑種去勢牛の肥育に要する養分量とほぼ同レベルを示した (National Agriculture and Food Research Organization, 2008a)。

4.3.2 第一胃内容液性状

肥育試験開始時 (294 日齢)、放牧馴致終了時 (359 日齢)、試験中間時 (588 日齢) および試験終了時 (783 日齢) における試験牛の第一胃内容液中アンモニア態窒素および VFAs (酢酸、プロピオン酸、酪酸) 濃度の変化状況を Fig. 14 にそれぞれ示した。肥育試験開始時において、既に H 区の酢酸濃度は他の試験区より有意に高い値を示し ($P<0.05$)、H 区のプロピオン酸濃度は R 区より有意に高い値を示した ($P<0.01$)。さらに、肥育試験開始時における R 区のアンモニア態窒素濃度は、他の試験区より有意に低い値を示した ($P<0.01$)。放牧馴致終了時において、JS 区の酢酸、酪酸および総 VFAs 濃度は、他の試験区より有意に高く ($P<0.05$)、JS 区のプロピオン酸濃度は、R 区より有意に高い値を示した ($P<0.05$)。試験中間時において、R 区の酢酸濃度は JS 区より有意に高く ($P<0.05$)、JS 区のアンモニア態窒素濃度は、他の試験区より有意に低い値を示した ($P<0.01$)。試験終了時のアンモニア態窒素および VFAs 濃度に関して、各試験区間に有意な差は認められなかった。

4.3.3 血漿中 T-Cho, BUN およびビタミン類濃度変化

肥育試験期間中を通じた血漿中の T-Cho および BUN 濃度の変化状況、肥育試験開始時 (294 日齢)、放牧馴致終了時 (359 日齢)、試験中間時 (588 日齢) および試験終了時 (785 日齢) における血漿中のレチノール、 α -トコフェロールおよび β -カロテン濃度の変化状況を Fig. 15 にそれぞれ示した。

血漿中 T-Cho 濃度；肥育試験開始時において R 区の血漿中 T-Cho 濃度は、既に他の試験区より有意に低く ($P<0.05$)、放牧馴致終了時には H 区と R 区の血漿中 T-Cho 濃度は、JS 区より有意に低かった ($P<0.01$)。JS 区の血漿中 T-Cho 濃度は、肥育試験開始から 448 日齢時にかけて約 136mg/dl まで漸増した後、試験終了時にかけて約 94mg/dl まで漸減しながら推移した。肥育試験前期において、H 区と R 区の血漿中 T-Cho 濃度は増加しながら推移したものの、450–550 日齢時において、H 区と R 区の間には有意な差は認められなかった。肥育試験後期の 600–700 日齢時において、H 区と R 区の血漿中 T-Cho 濃度は、JS 区より低く推移し ($P<0.05$)、560 日齢時点 (2008/3/19) において、R 区の血漿中 T-Cho 濃度は H 区より有意に高い値を示した ($P<0.05$)。

血漿中 BUN 濃度；肥育試験開始時において R 区の血漿中 BUN 濃度は、既に他の試験区より有意に低く ($P<0.01$)，放牧馴致終了時には H 区と R 区の血漿中 BUN 濃度は、JS 区より有意に低かった ($P<0.01$)。JS 区の血漿中 BUN 濃度は、肥育試験開始から 420 日齢時にかけて約 13mg/dl まで漸増した後、試験終了時にかけて約 9.8mg/dl まで漸減しながら推移した。肥育試験前期において、H 区と R 区の血漿中 BUN 濃度は 6–9mg/dl 程度で推移し、JS 区より有意に低い値を維持した ($P<0.05$)。試験終了時において、H 区と R 区の血漿中 BUN 濃度は JS 区より有意に高い値を示した ($P<0.05$)。391 日齢 (2007/10/2) と 560 日齢 (2008/3/19) 時点において、R 区の血漿中 BUN 濃度は、H 区より有意に高い値を示した ($P<0.05$)。

血漿中レチノール、 α -トコフェロールおよび β -カロテン濃度；肥育試験開始時において H 区の血漿中レチノール濃度は、既に R 区より有意に高く ($P<0.05$)，放牧馴致終了時には JS 区の血漿中レチノール濃度は、H 区より有意に高かった ($P<0.01$)。JS 区の血漿中レチノール濃度は、肥育試験終了時にかけて約 55IU/dl まで漸減しながら推移した。H 区と R 区の血漿中レチノール濃度は、肥育試験前期において約 80IU/dl 程度で推移した後、肥育試験後期において増加しながら推移し、試験終了時には約 135IU/dl 程度を示した。試験終了時において、H 区と R 区の血漿中レチノール濃度は、JS 区より有意に高い値を示した ($P<0.01$)。放牧馴致期において、全試験区の血漿中 α -トコフェロールおよび β -カロテン濃度は減少しながら推移した。JS 区の血漿中 α -トコフェロールおよび β -カロテン濃度に関して、肥育試験前期および後期を通じて大幅な変動は認められなかった。肥育試験前期と後期において、H 区と R 区の血漿中 α -トコフェロールおよび β -カロテン濃度は急激に上昇し、試験終了時にはそれぞれ約 900 μ g/dl および約 700 μ g/dl に達し、JS 区より有意に高い値を示した ($P<0.01$)。

4.3.4 骨格筋遺伝子発現定量解析

肥育試験開始時 (278 日齢)，中間時 (518 日齢) および終了時 (694 日齢) にバイオプシーにより採取した試験牛の胸最長筋における MRFs (MyoD, Myf5, myogenin, MRF4, myostatin, IGF-I および IGF-Ire) の mRNA 発現状況について Fig. 16 に示した。H 区と R 区の胸最長筋における MRFs の mRNA 発現状況について、肥育試験期間中を通じて顕著な差異は認められなかった。肥育試験中間時における JS 区の Myf5 と MRF4 の mRNA 発現量は、他の試験区より有意に高い値を示し ($P<0.05$)，myostatin の mRNA 発現量は、H 区より有意に高い値を示した ($P<0.05$)。肥育試験前期において、H 区の MRF4 発現量は、R 区と比較して有意に減少した ($P<0.05$)。

4.4 考察

4.4.1 耕作放棄地での放牧肥育における栄養摂取状況の推定

放牧馴致期において、H 区の平均体重 369kg，DG-0.24kg/日，R 区の平均体重 285kg，DG0.07kg/日を維持可能な養分要求量は、交雑種去勢牛のエネルギー要求量の推定式から、H 区で TDN: 2.92kg，CP: 0.32kg，R 区で TDN: 3.18kg，CP: 0.42kg と推定された (National Agriculture and Food Research Organization, 2008a)。この推定値と Table 6 に示した馴致期の TDNI および CPI を比較した場合、それぞれ H 区で TDNI: 1.2kg，CPI: 0.5kg，R 区で TDNI: 0.4kg，CPI: 0.2kg 程度、推定値が低い値を示し、野外馴致における移動等に消費されるエネルギー等を

考慮しても、H区での摂取エネルギーと増体量の不均衡は顕著であった。この大きな要因の一つとして、H区において育成期まで給与していた穀物飼料から粗飼料への短期間での移行が、第一胃内における微生物の繊維分解能への要求を急激に高めさせたことによる栄養吸収システムの変換およびそれに伴う代謝効率の低下が考えられた。本試験に使用した耕作放棄地の植生は、野草の種類および分布状況が場所によって大きく異なり (Fig. 12) , 肥育期におけるH区およびR区の栄養摂取状況を的確に把握することが困難であった。そこで、交雑種去勢牛のエネルギー要求量の推定式に山地傾斜野草地での維持エネルギー要求量の増加割合を30%加算した場合のH区およびR区の栄養摂取量について推定を試みた (National Agriculture and Food Research Organization, 2008a) 。肥育試験前期 (360–588日齢) におけるH区の平均体重352kg, DG-0.08kg/日, R区の平均体重298kg, DG0.10kg/日を維持可能な養分要求量は、H区でTDN:3.29kg, CP:0.40kg, R区でTDN:3.37kg, CP:0.45kgと推定された。同様の手法により推定した肥育試験後期 (589–788日齢) におけるH区の養分要求量は、TDN:5.96kg, CP:0.81kg, R区でTDN:5.80kg, CP:0.74kgであった。また、補助飼料給与による栄養摂取を差し引いたうえで、この養分要求量を満たすために必要な野草のDMIは、肥育試験前期でH区:4.21kg/日, R区:4.85kg/日, 肥育試験後期でH区:8.15kg/日, R区:7.26kg/日程度と推定された (National Agriculture and Food Research Organization, 2008b) 。肥育試験前期 (2007/8/30–2008/4/16) における、H区とR区の体重変化と野草摂取量の推定値から、本試験の条件下において秋から冬期の顕著な野草量の不足とともに、H区の野草摂取量がR区より少なく推移したことが推察された。逆に肥育試験後期 (2008/4/17–2008/10/28) では、H区とR区の推定TDNIは、JS区のTDNIとほぼ同レベルであり、春から夏期にかけて十分な野草量の摂取が可能であり、H区でR区より野草摂取量がやや多くなったことが示唆された。

4.4.2 耕作放棄地での放牧肥育と交雑種去勢牛発育パターンの関係

摂取栄養源が濃厚飼料から粗飼料へ急激に変化するとともに、第一胃内における微生物の繊維分解能への要求が急激に高まったH区の放牧馴致期において、その体重、腹囲および胸囲は急激に減少した (Fig. 13) 。このことは、肥育開始時期において、交雑種去勢牛の体重、腹囲および胸囲といった体幹の太さの発育が、濃厚飼料摂取量の影響を顕著に受けることを示した。また、放牧馴致期においてJS区の体長の日増加量が、他の試験区より顕著に高い値を示したことは、体長の伸長が肥育期より早い成長段階において、濃厚飼料からの摂取栄養に対する反応性が高いことを示唆した。肥育試験前期と後期における体長、体高および十字部高に関して、極端な野草摂取量の差異が予想されるH区とR区の体長は、直線的な成長パターンを示し、JS区の日増加量と他の試験区との間に顕著な差異が認められなかった。これらの結果は、これら測定部位における骨形成が、肥育期間中の摂取栄養条件の変動に左右されないことを示した。また、肥育期における摂取栄養は、これら骨格の成長に対して優先的に動員される可能性が示唆された。寛幅と腰角幅の発育パターンは、体幹の太さ (体重、腹囲および胸囲) と体幹の長さ (体長、体高および十字部高) の中間的な発育パターンを示した。また、JS区の寛幅と腰角幅の発育パターンは多少異なり、肥育期における濃厚飼料由来のエネルギーは、前期に腰角幅、後期に寛幅の拡張に大きく影響を及ぼすことが明らかになった。これら各骨格部位の発育パターンの違いは、本来、反芻獣として粗飼料から摂取されるエネルギーは、肥育期の体躯の幅よりも長さ (体高) を優先的に発育させ、肥育牛として濃厚飼料から摂取された過剰なエネルギーが、体躯の幅を拡大し、その体幹を支持する

ために必要な骨格（肋骨，寛骨）の拡張に利用されることを示唆した。

肥育試験開始時，放牧馴致終了時においてH区とR区との間に認められた体重，体長，腰角幅および胸囲の差異は，試験終了時において消失した。また，放牧馴致期におけるH区の体重，胸囲および腹囲の日増加量は，R区より有意に低かった。これらのことは，初期成長期の体質制御により加速された骨形成と体幹の発育性を耕作放棄地での放牧肥育といった低栄養条件下において維持するためには，体幹の萎縮を抑制するためのよりスムーズな放牧馴致と一定レベル以上の放牧肥育期の栄養摂取が必要であることを示唆した。

4.4.3 耕作放棄地での放牧肥育が第一胃内環境に及ぼす影響

一般に反芻家畜の第一胃内 VFAs 濃度に関して，濃厚飼料由来の易分解性炭水化物を多給することによりプロピオン酸の合成が，粗飼料由来のセルロースを中心とした炭水化物の第一胃内分解により酢酸合成が促進されることが知られている (Schwartz and Gilchrist, 1975)。濃厚飼料多給の肥育体系においては，肥育の進行と濃厚飼料摂取割合の増加にともない，プロピオン酸の合成量が増加することで，酢酸プロピオン酸比 (A/P) を低下させながら総 VFAs 濃度が一定に保持される。JS 区における第一胃内容液中の各 VFAs 濃度変化は，濃厚飼料多給の肥育体系の典型的な変動パターンを示した。

放牧馴致期間におけるH区とR区の第一胃内溶液中の VFAs (酢酸，プロピオン酸，酪酸) 濃度は，JS 区と比較して急激に低下した (Fig. 14)。この VFAs 濃度の急激な低下の要因は，H 区における濃厚飼料から粗飼料への摂取栄養源の急変と，R 区における摂取粗飼料の質と量の低下である。この放牧馴致期におけるH区の第一胃内環境の急変は，第一胃内微生物叢の変化と飼料分解能の低下を引き起こすことが予想され，このことが，前述した下部消化管における栄養吸収および代謝効率の低下の要因と考えられた。一般に，放牧牛における第一胃内容液の A/P は，牧草摂取の影響により酢酸量が増加することで4程度を示すが，H区とR区の A/P は3-2程度と低く推移した (Oshio and Tahata, 1981; Oshio *et al.*, 1982)。また，肥育試験中間時には，R区の酢酸濃度がJS区より高い値を示し ($P<0.05$)，H区の A/P がJS区より高い値を示したものの ($P<0.01$)，試験終了時における総 VFAs 濃度および A/P について，各試験区間に差異は認められなかった。このH区とR区におけるプロピオン酸量の増加と A/P の低下は，1) 肥育中間時におけるスプリングフラッシュの影響により，栄養価の高い生草が多く摂取されたこと，2) 試験終了時において生草摂取量が減少傾向にあったこと，が大きな要因と考えられた。

第一胃内のアンモニア態窒素濃度は，反芻家畜が摂取した飼料中の非蛋白態窒素や蛋白質が溶解，もしくは第一胃内微生物による分解を受けて生じ，微生物体蛋白質合成の基質となる (Broderick and Kang, 1980)。つまり，第一胃内のアンモニア態窒素濃度は試験飼料からの窒素摂取量を直接的に反映し，本試験におけるH区とR区における肥育中間時での急激な上昇は，生草摂取量および生草中の窒素含量が非常に多かったことを示した。

4.4.4 血液性状の季節的变化

コレステロールは生体内の代謝過程において主要な役割を果たしており，動物細胞においては，脂質二重構造を持つ細胞膜の重要な構成物質である。コレステロールは肝臓および皮膚で生合成され，脂肪酸エステル体に変換され血液中のリポ蛋白により全身に輸送される。血漿中 T-Cho 濃度は，肉用牛の品種やその血統等の影響を多岐に受けることが報告されてい

るが、一般に摂取栄養が充足した肉用牛において、その栄養摂取量を反映する (Watanabe, 1993; Hayashi *et al.*, 2003b)。本試験の JS 区においても、TDNI が上昇傾向で推移した 450 日齢まで、血漿中 T-Cho 濃度は増加しながら推移し、その後、TDNI 減少とともに試験終了時までに 100mg/dl 程度まで漸減した (Fig. 15)。また、Nakanishi *et al.* (1986) は、周年放牧を実施した黒毛和種雌牛の血清中 T-Cho 推移を調査した結果、冬期に高く、夏期に低くなることを指摘しており、本試験における H 区と R 区の血漿中 T-Cho 濃度推移は同様の傾向を示した。この結果は、冬期の低栄養条件下において、放牧牛は体温を中心とした体内の恒常性維持のために、摂取および蓄積エネルギーを動員する必要がある、体脂肪の代謝が活性化されることで血漿中 T-Cho 濃度が向上することを示唆した。逆に、夏期に摂取草量が比較的充足された条件下では、次の冬期に備えた体脂肪蓄積が優先されると同時に、脂質代謝により体内を循環する T-Cho 濃度が減少すると考えられた。

反芻家畜の血漿中 BUN 濃度は、飼料からの CPI の影響を強く受ける (Claypool *et al.*, 1980)。飼料の CP、特に窒素化合物の過剰給与は、その他の摂取エネルギーのアンバランスにより第一胃内での微生物体蛋白合成が十分に実施されなくなると、過剰分は尿素態の形で体内に取り込まれ、尿中窒素態として排泄される (Ferguson and Chalupa, 1989)。本試験における各試験区の BUN 濃度推移は、明らかに CPI の影響を強く受けた。JS 区では充足した栄養条件下において、約 420 日齢まで、血漿中 BUN 濃度は増加しながら推移し、肥育の進行にともない CPI が減少したことにより、試験終了時には 9.8mg/dl まで減少した (Fig. 15)。また、放牧馴致期における H 区の CPI 激減の影響により、H 区の血漿中 BUN 濃度は、放牧馴致終了時には 5mg/dl 程度まで急激に低下した。その後、H 区と R 区の血漿中 BUN 濃度は、季節変化に伴う放牧牛の摂取草量の影響を明確に反映した。また、391 日齢時 (2007/10/2) と 560 日齢時 (2008/3/19) において、R 区の血漿中 BUN 濃度が H 区より有意に高い値を示した ($P < 0.05$)。このことは、肥育試験前期において R 区の野草摂取量が、H 区より多かった可能性を示しており、前述した耕作放棄地での栄養摂取量の推定結果を支持した。

脂肪交雑に重点を置いた日本の肉用牛飼養体系においては、筋肉内の脂肪含有率と交雑度の向上を目的として血液中のレチノール含量のコントロールが黒毛和種を中心に実施され、肥育中期において 50IU/dl 以下に制限することが重要と考えられている (Hayashi *et al.*, 2003a)。そのため、肥育期に給与される濃厚飼料中にはビタミン類がほとんど含まれず、粗飼料もカロテンを極力含まない稲わら等が給与される。レチノールを抑制する飼料給与体系の影響を受け、肥育試験期間を通じて JS 区の血漿中レチノール含量は減少しながら推移し、試験終了時には 55IU/dl 程度を示した。一般に、生牧草には乾物中トコフェロールが 100–420 mg/kg、全カロテンが 50–300 mg/kg 程度含まれている (National Agriculture and Food Research Organization, 2008b)。肥育試験後期を中心に野草中に含まれる α -トコフェロールおよび β -カロテンの摂取量の増加が、H 区と R 区における血漿中の濃度上昇の大きな要因の一つである。放牧牛の血漿中レチノール含量の増加についても、野草から摂取された β -カロテンが肝臓によって合成された結果であると推察された。しかし、肥育試験前期において β -カロテン含量が増加したにもかかわらず、レチノール含量に大きな変化が認められなかったことは、冬期ストレスによる肝機能の低下およびレチノール消費量の増加が要因と考えられた。これらの結果は、耕作放棄地での放牧肥育により生産された牛肉中へのビタミン類の高濃度蓄積の可能性を示した。

4.4.5 耕作放棄地での放牧肥育牛における MRFs 発現の変化

本試験において、交雑種去勢牛の胸最長筋における MRFs 発現動態は、肥育期の成長亢進と栄養条件の影響を受けることで、いくつかの注目すべき変動パターンを示した (Fig. 16)。

MRFs は MyoD, Myf5, myogenin, MRF4 の順で活性化され、筋管形成初期過程の上流で MyoD と Myf5 が、下流で myogenin, MRF4 が段階に応じて役割を分担しながら筋管形成を調節すると考えられている (Muroya *et al.*, 2002)。しかし、生体における MyoD と Myf5 の相互機序は明確でない。本試験における MyoD および Myf5 の変化は、JS 区と他の試験区において摂取栄養状況が顕著に異なる試験中間時点において有意な差が認められ、特に Myf5 は低栄養条件下で顕著にその発現量が減少した。この結果は、交雑種去勢牛の肥育期において、これらの遺伝子発現が栄養依存的に調整されることを示した。特に Myf5 は高栄養条件下で発現が活性化され、MyoD は逆に抑制を受けながら、骨格筋系譜細胞の筋芽細胞への分化と筋管形成の初期段階を制御していると考えられた。myogenin 発現について試験区間に差異が認められなかったことから、肥育期における myogenin の発現が、栄養条件と成長の亢進による影響を受けないことが明らかになった。また、肥育期における MRF4 発現は、摂取栄養条件の支配下でコントロールされているものの、成長に伴ってその発現量は急速に低下した。つまり、交雑種去勢牛の肥育期における骨格筋の筋管形成と成熟は、myogenin よりも摂取栄養に依存した MRF4 の活性化と、成長の亢進による反応性の鈍化によりコントロールされる可能性を示唆した。

4.4.6 初期成長期における体質制御と耕作放棄地での放牧肥育の関係

肥育試験開始または放牧馴致終了時において、H 区と R 区との間に認められた体重、体測尺値および第一胃内容液の差異は、試験終了時において消失した。また、H 区と R 区における骨格筋の MRFs 発現動態と血液性状について、肥育試験期間中に顕著な差異は認められなかった。これらの結果は、初期成長期の高栄養飼料給与による体質制御で特徴付けられた体幹の発育性、第一胃環境、骨格筋の筋分化能については、放牧馴致および耕作放棄地での低栄養条件下において、急速に消失することを示唆した。Gotoh *et al.* (2008) は、初期成長期に体質制御を施した後、肥育期に粗飼料を飽食させた黒毛和種の胸最長筋の MRFs 発現動態について調査した。その結果、22 月齢時点の MRFs 発現量は、本試験の H 区より高い値を示した (Gotoh *et al.*, 2008)。これらのことは、初期成長期の体質制御により特徴付けられた MRFs 動態を発現させるためには、肥育期の栄養条件が一定水準以上に維持されることが重要であることを示唆した。さらに、Gotoh *et al.* (2010a, b) は、初期成長期に体質制御を施した後、肥育期に粗飼料を飽食させた黒毛和種去勢牛の 26 月齢時の体重は 552kg であり、体質制御を施さなかった場合と比較して約 73kg 重く、と畜時の骨格筋内脂肪含有率も優れることを報告した。本試験における 26 月齢時の H 区の体重は 476kg であり、Gotoh *et al.* (2010a, b) の報告と比較して 100kg 程度低い値を示した。これらのことから、初期成長期の体質制御による高い発育性を維持しつつ耕作放棄地において放牧肥育するためには、短期間での急激な摂取エネルギーの量と質の変動を伴わない馴致と一定レベルの摂取草量の確保が重要である。

Table 6. Nutritional intake conditions in three experimental diets during the acclimation period.

	Group H	Group R	Group JS
Nutrient intake (DM kg/d)			
DMI	5.72 ± 0.04	5.47 ± 0.00	9.02 ± 0.28
TDNI	4.08 ± 0.03	3.61 ± 0.00	6.67 ± 0.21
CPI	0.83 ± 0.01	0.66 ± 0.00	1.29 ± 0.04
NDFI	2.40 ± 0.02	2.91 ± 0.00	2.84 ± 0.09

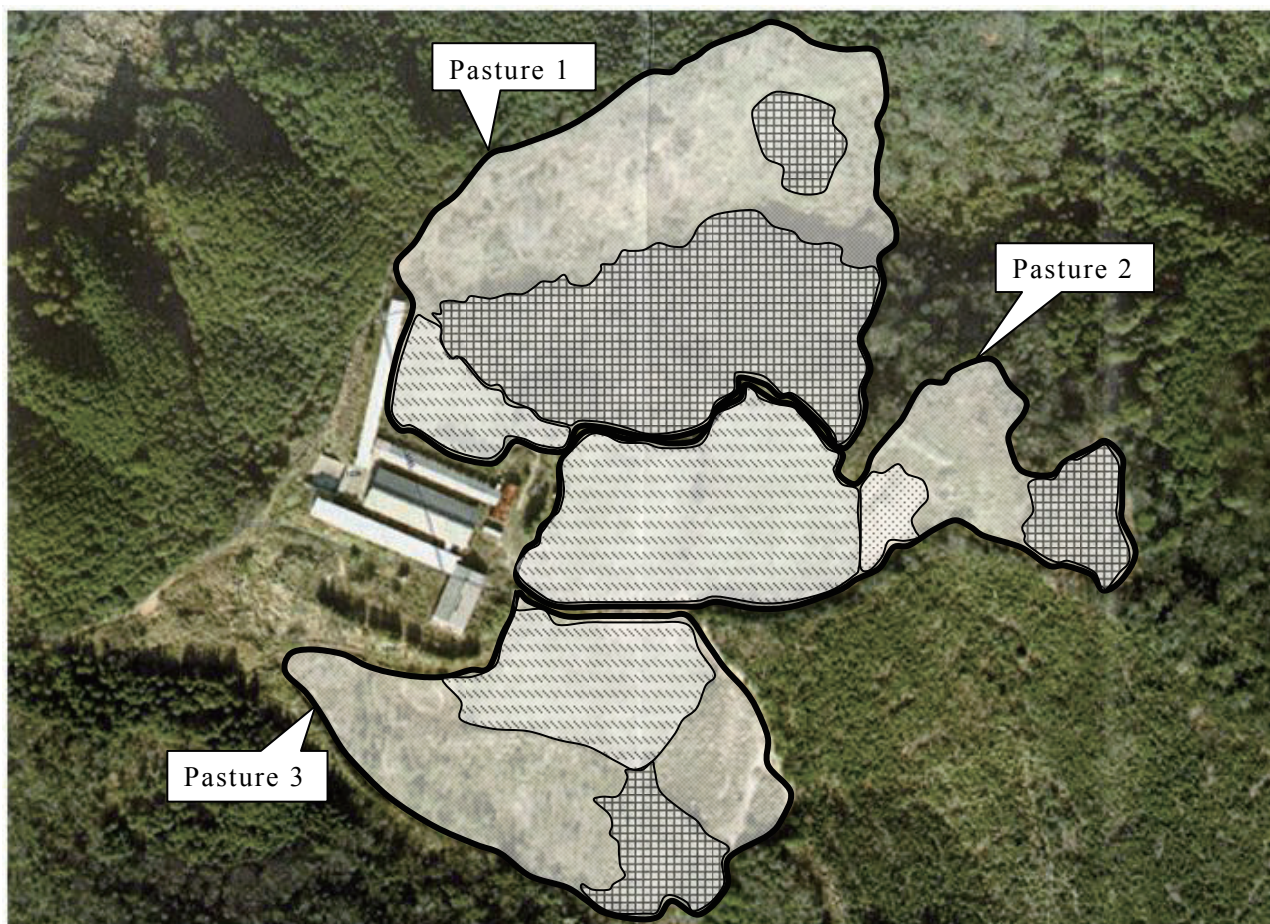
Group H: n = 5, group R: n = 5 and group JS: n = 5.

Data are mean $\pm$ SE.

Table 7. Ingredients and nutrient composition of experimental diet for group JS and nutritional intake during first and latter period of the experiment.

Item	First period (360 – 588 d of age)	Latter period (589 – 788 d of age)
Ingredients (% DM)		
Rice straw	8.6	11.5
Tall fescue straw	12.1	—
Alfalfa meal	5.2	1.9
Corn	36.6	49.5
Barley	8.4	20.3
Soybean meal	6.4	2.8
Wheat bran	16.0	13.0
Brewer's grains	5.7	—
Calcium carbonate	1.0	1.0
Nutrient composition (% DM)		
TDN	74.2	80.0
CP	13.5	11.7
NDF	30.3	19.8
Nutrient intake (DM kg/d)		
DMI	8.91 ± 0.17	7.37 ± 0.33
TDNI	6.74 ± 0.13	5.80 ± 0.26
CPI	1.17 ± 0.02	0.88 ± 0.04
NDFI	2.48 ± 0.05	1.56 ± 0.07

Data are mean ± SE.



-  : Plain dominated by goldenrod (*Solidago altissima* L.); 20,190m².
 : Sloping land and plain dominated by bush and weedy species; 33,071m².
 : Sloping land dominated by bristly trees; 20,573m².
 : Bare land; 947m².
 : Outer three pastures (1~3) were surrounded by electric fences.
 Pasture 1:35,840m²; Pasture 2:18,563m²; Pasture 3:20,378m².

Date (d of age)		Pasture area	Stocking rate (head/ha)
30. August. 2007 (360 d of age)	~ (487 d of age)	Regular movement of grazing steers among three areas.	7.0
6. January. 2008 (488 d of age)	~ (616 d of age)	All grazing steers were freely grazed on all pastures.	1.9
14. May. 2008 (617 d of age)	~ (701 d of age)	Regular movement of grazing steers among three pastures.	1.3
7. August. 2008 (702 d of age)	~ (784 d of age)	All grazing steers were freely grazed on all pastures.	1.3

Figure 12. Farmland abandoned approximately 15 years ago, movement of steers, and stocking rates used in this experiment.

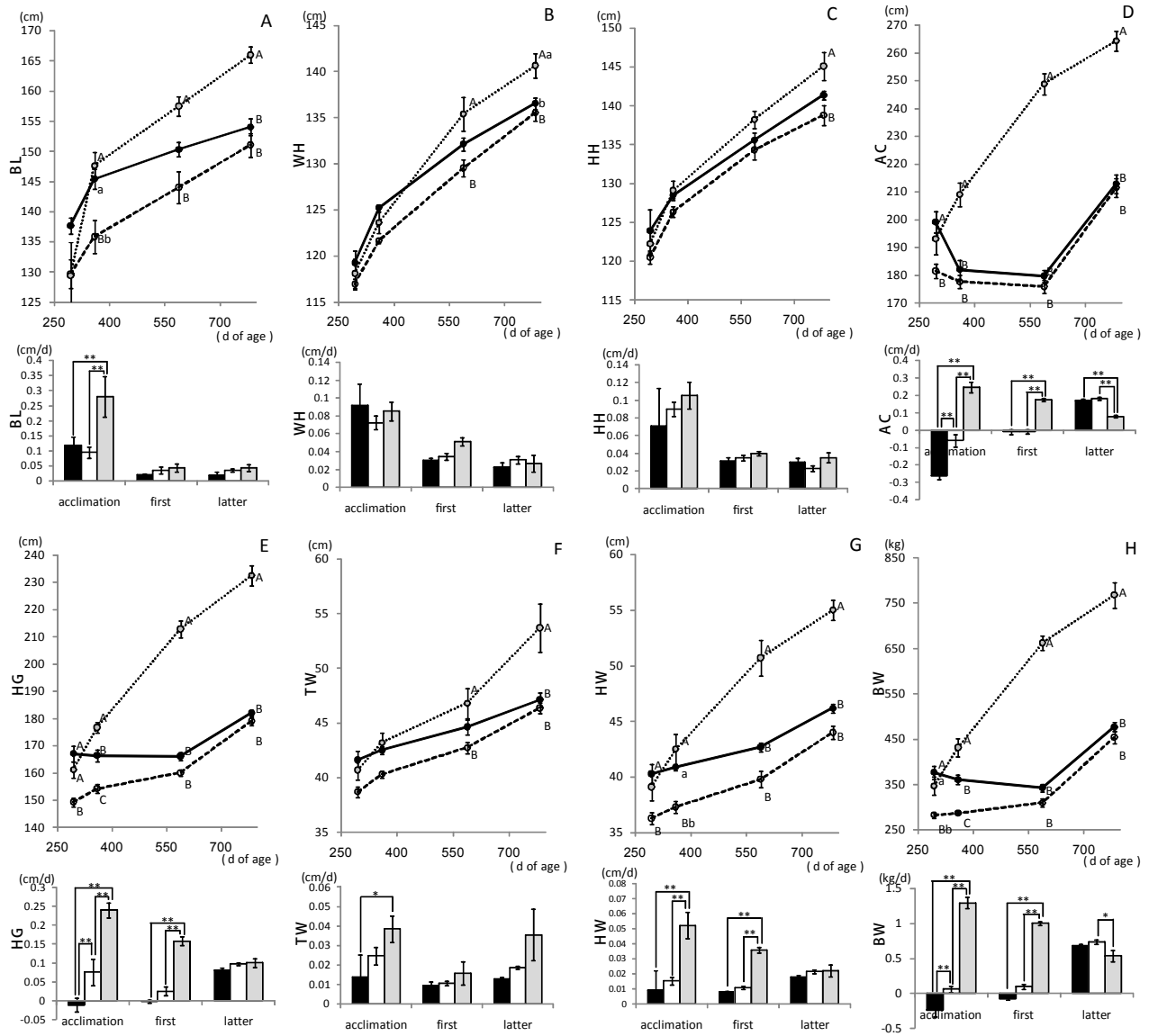


Figure 13. Changes in the distribution of frame measurements (BL (A), WH (B), HH (C), AC (D), HG (E), TW (F) and HW (G)) and BW (H) of groups H (●), R (○) and JS (○), and growth rate during three periods of groups H (■), R (□) and JS (▨). The acclimation period: 294 – 359 d of age, the first fattening period: 359 – 588 d of age and the latter fattening period: 589 – 783 d of age. Data are mean $\pm$ SE. ^{a, b, A, B, C} Significant difference between groups at same d of age ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively). * * Significant difference between groups ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

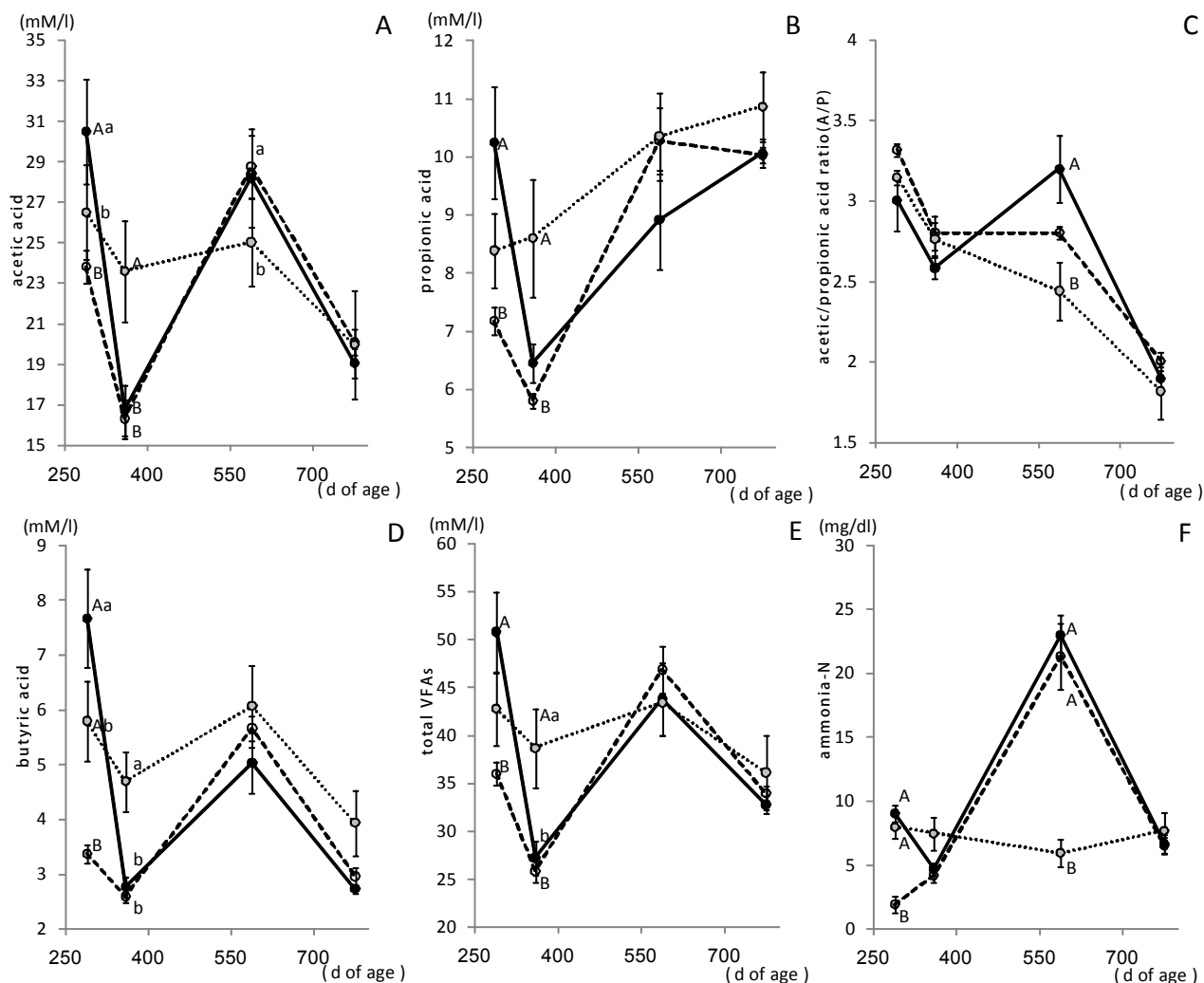


Figure 14. Changes in acetic acid (A), propionic (B), acetic/propionic acid ratio A/P (C), butyric acid (D), total VFAs (E) and ammonia-N (F) concentrations in ruminal juice of groups H (●), R (○) and JS (○). Data are mean $\pm$ SE. ^{a, b, A, B} Significant difference between groups at the same d of age ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

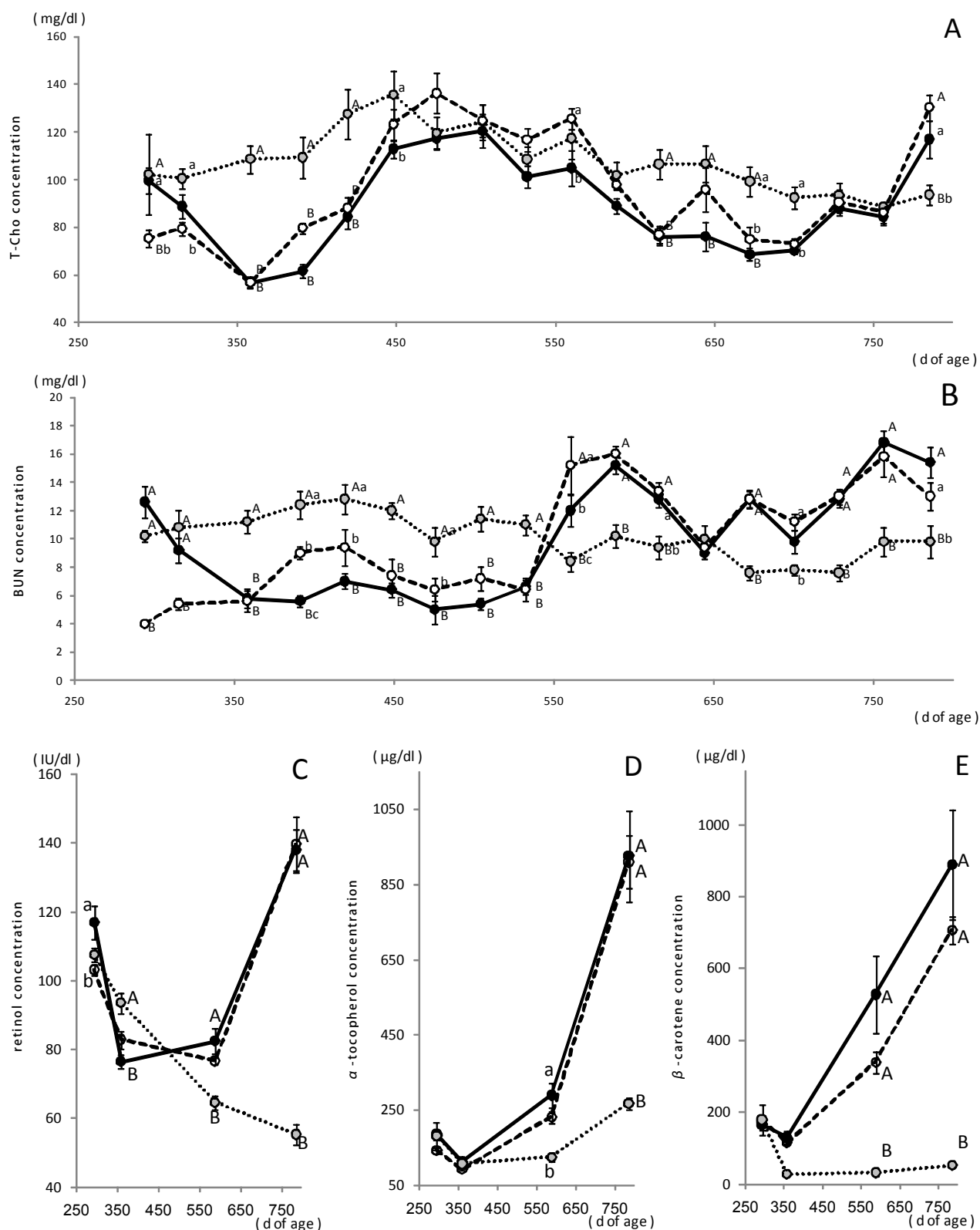


Figure 15. Changes in plasma T-Cho (A), BUN (B), retinol (C), α -tocopherol (D) and β -carotene (E) concentrations of groups H (●), R (○) and JS (○). Data are mean $\pm$ SE. ^{a, b, A, B} Significant difference between groups at the same d of age ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

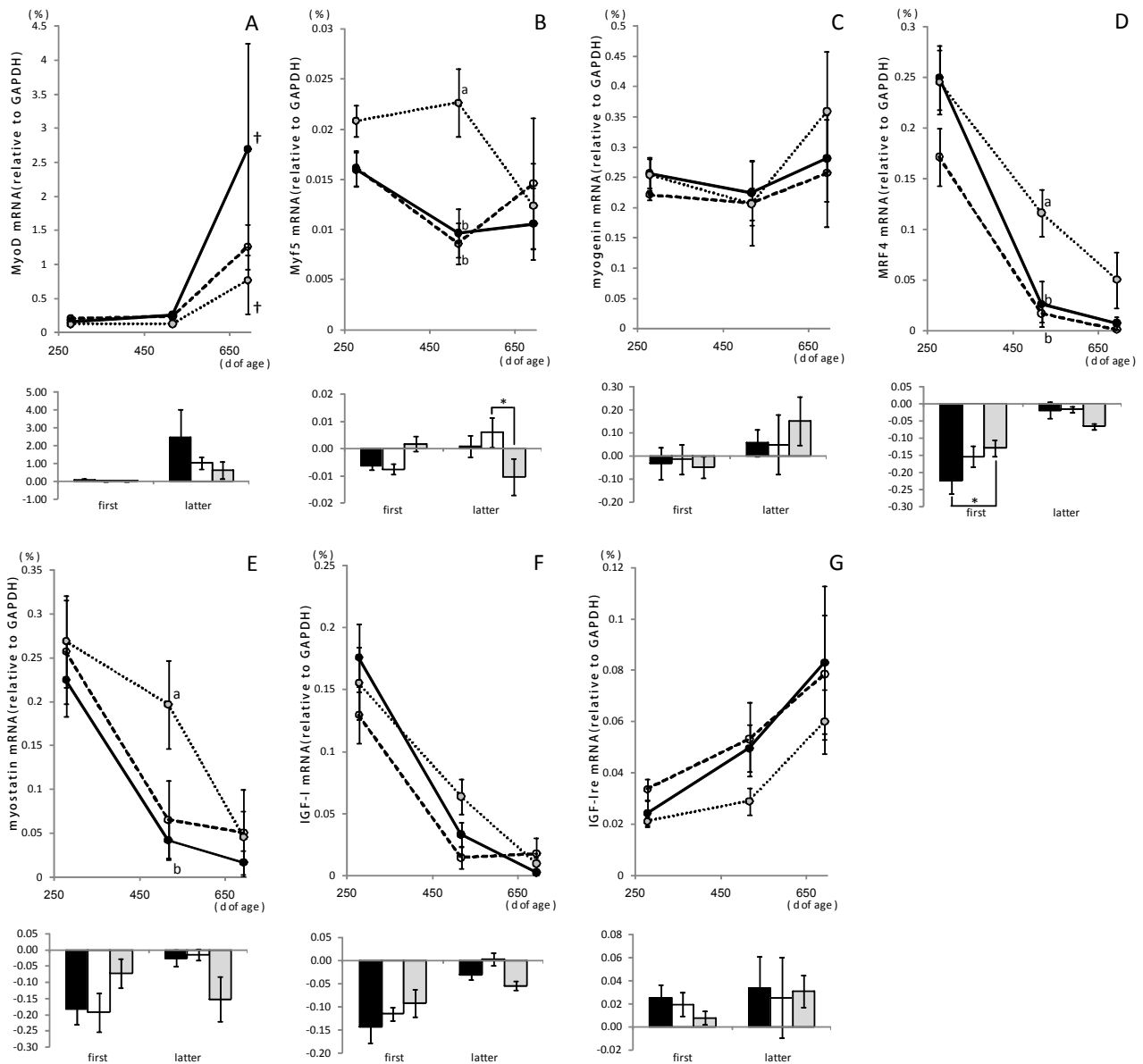


Figure 16. Changes in fold differences in expressions of mRNA of MyoD (A), Myf5 (B), myogenin (C), MRF4 (D), myostatin (E), IGF-I (F) and IGF-Ire (G) in LT muscle relative to the endogenous reference gene (GAPDH) of groups H (●), R (○) and JS (○). Change rate during two periods of groups H (■), R (□) and JS (▨). The first fattening period: 278 – 518 d of age and the latter fattening period: 519 – 694 d of age. Data are mean $\pm$ SE. ^{a, b} Significant difference between groups at the same d of age ($P < 0.05$). * Significant difference between groups ($P < 0.05$). [†]; $P < 0.10$

第Ⅴ章 初期成長期の体質制御と耕作放棄地における放牧肥育が 交雑種去勢牛の産肉性と肉質性状に及ぼす影響

5.1 緒言

Hayashi *et al.* (2006) は、果樹園跡地で放牧肥育した黒毛和種の発育性および胸最長筋における脂肪含有率と脂肪酸組成について調査した。その結果、放牧肥育した黒毛和種の発育性は、濃厚飼料多給により肥育した場合と比較して有意に低下した。また、胸最長筋における脂肪含有率はわずか 3%程度であったものの、胸最長筋内 CLA 含有率は、濃厚飼料を多給により肥育した場合と比較して有意に高かった。このことは、濃厚飼料多給の肥育と比較して耕作放棄地での放牧肥育は、栄養摂取量低下にともない発育性と脂肪蓄積が低下するものの、脂肪酸組成等の特徴を持った牛肉生産の可能性を示している。また、Zembayashi (1990) は、肉用牛における様々な骨格筋と発育バランスの関係を明らかにするために、黒毛和種およびホルスタイン種去勢牛の解体調査を実施した。その結果、調査した全ての品種において、筋肉成長は四肢筋肉から始まり、肥育の進行に伴い前方上部筋肉の発育に移行することを報告した (Zembayashi, 1990)。このことは、肉用牛への初期成長期における体質制御が、骨格筋の発育を加速することで、屠畜枝肉の骨格筋構成に影響を及ぼす可能性があることを示唆している。第Ⅳ章において、耕作放棄地で放牧肥育された交雑種去勢牛の発育性、第一胃内溶液性状、血液性状および胸最長筋における MRFs 発現動態は、濃厚飼料多給により肥育した場合と比較して大きく異なることが明らかになった。さらに、初期成長期の体質制御により特徴付けられた体幹の発育性、第一胃環境、骨格筋の筋分化能については、放牧馴致および耕作放棄地での低栄養条件下において、急速に消失した。しかし、初期成長期における体質制御と耕作放棄地での放牧肥育が、交雑種去勢牛の出荷時の枝肉特性に及ぼす影響は明確でない。

そこで本章では、初期成長期における体質制御と耕作放棄地における放牧肥育が、交雑種去勢牛の屠畜時の枝肉構成、赤身肉特性および骨格筋筋線維構成に及ぼす影響について検討した。

5.2 材料および方法

5.2.1 供試牛および試験設計

肥育試験 (第Ⅳ章) に供試した交雑種 (黒毛和種雄 × ホルスタイン種雌) 去勢牛 15 頭 (生後日齢 798 ± 1.3 日齢) を用いて、屠畜解体調査および肉質性状分析を実施した。また、屠畜前約 100 日 (693 日齢時) にバイオプシーにより採取した胸最長筋について筋線維構成割合および筋線維直径を測定した。調査に供した交雑種去勢牛は、初期成長期における体質制御 (第Ⅱ, Ⅲ章) の後、耕作放棄地での放牧肥育 (第Ⅳ章) を実施した 5 頭 (H 区)、慣行哺育および乾草のみの給与による育成 (第Ⅱ, Ⅲ章) の後、耕作放棄地での放牧肥育 (第Ⅳ章) を実施した 5 頭 (R 区)、日本の慣行的な交雑種哺育育成 (第Ⅱ, Ⅲ章) および肥育体系 (第Ⅳ章) に準じて飼養された 5 頭 (JS 区) とした。

5.2.2 調査項目

5.2.2.1 枝肉構成

福岡食肉市場臨界市場株式会社において出荷（2007/11/10；797 日齢）および屠畜（2007/11/11；798 日齢）を実施した。屠畜後 4℃ で約 7 日間冷蔵保存した H 区および R 区の各 3 頭ずつの右体側半丸枝肉について、解体調査を実施した。枝肉を筋肉、脂肪および骨に区分することで各構成重量を比較した。また、枝肉中の筋肉重量は胸最長筋、大腿二頭筋、大腰筋を測定し、全筋肉中における各筋肉構成割合を、脂肪重量は内臓、皮下、筋間および腎臓脂肪に区分し、全脂肪中における各脂肪構成割合をそれぞれ比較した。なお、各試験区からの調査個体の選抜は、出荷時における体重の上位各 3 頭（平均屠畜前体重：H 区：446±8.9kg，R 区：427±7.8kg， $P<0.20$ ）とした。

5.2.2.2 胸最長筋における CP 含有率，イノシン酸（IMP），遊離アミノ酸および α -トコフェロール含量

出荷した全ての試験牛の左体側第 7 肋骨近傍の胸最長筋および僧帽筋を約 10cm 厚で採取した。枝肉は、と畜後 4℃ で約 30 時間保存された状態であり、採取した胸最長筋は速やかに筋肉外周の脂肪および筋膜を取り除いた。筋線維と垂直になるように全面カットした約 300g 程度の筋サンプルをフードプロセッサによりミンチ状にホモジナイズしたものについて CP 含有率，IMP 含量，遊離アミノ酸含量および α -トコフェロール含量を以下の手順で調査した。さらに、胸最長筋における CP 含有率と粗脂肪含有率，IMP 含量，各遊離アミノ酸含量および α -トコフェロール含量の関係を調査するため、各試験牛の粗脂肪含有率は既報より引用した（Ebara *et al.*, 2010）。

CP 含有率；筋サンプルを濃硫酸および分解促進剤とともにケルダール分解フラスコ内で加熱処理することにより、筋蛋白の窒素分解を実施した。分解した窒素量をケルダール法（Julius and Cohen, 1910）により計測することで現物重量当たりの CP 含有率を算出した。

IMP 含量；核酸関連物質として IMP 含量を高速液体クロマトグラフ法（HPLC）により解析した。サンプルの前処理として、5% HClO_4 を加えホモゲナイズしたサンプルの上澄みに 2N KOHを加えた。さらに遠心分離により得られた上澄みをメンブランフィルターにより濾過し分析用サンプルとした。濃度の算出は、市販の標準試料により検量線を作成することで実施した。HPLC 条件は Column：Finepak SIL C18T，移動相：0.01M $\text{Na-H}_2\text{-PO}_4$ buffer，流速：1.0ml/min，オーブン温度：30℃，検出吸光度：265nm とした。

遊離アミノ酸含量；旨味を呈するアミノ酸としてアスパラギン酸，グルタミン酸，甘みを呈するアミノ酸としてグルタミン，セリン，プロリン，グリシン，アラニン，苦みを呈するアミノ酸としてバリン，メチオニン，イソロイシン，ロイシン，チオシン，フェニルアラニン，ヒスチジン，アルギニンの計 15 種の遊離アミノ酸を自動アミノ酸分析計（ALC-1000，SHIMADZU）により計測した。サンプルの前処理として、筋サンプルに 2%スルホサリチル酸を加えホモゲナイズした。さらに遠心分離により得られた上澄みをメンブランフィルターにより濾過したものを分析用サンプルとした。

5.2.2.3 僧帽筋における剪断応力値

クッキングロス測定後の僧帽筋サンプルを用いて、RHEO METER（NRM-2010D-D，HUDOH）により剪断応力値を計測した。筋線維に対し垂直断面積が 5mm×5mm の正方形になるよう、直方体状のサンプルを切り出し、筋線維に対して垂直に負荷をかけた状態で剪断応力値を計測した。

5.2.2.4 筋線維型構成および筋線維直径

屠畜前約 100 日時点（694 日齢）に、胸最長筋よりニードルバイオプシー（カーディナルヘルス製，14 G）により骨格筋サンプルを採取した。バイオプシーの前処理は第 II 章と同様とした。ニードルバイオプシーは第一腰椎から頭方に向かい、胸最長筋の筋線維の走行に沿っ

て挿入し、第 12 胸椎に相当する部位から幅 2 mm、長さ 1.5–2.0 cm の筋材料 10 本程度を同様の筋線維走行に束ねて包埋剤で包埋した後、速やかに液体窒素中にて急速凍結させ－80℃で冷凍保存した。連続凍結切片の作成、酵素組織化学的染色による筋線維型の同定、筋線維直径の測定方法は、第 II 章と同様とした。

5.2.2.5 統計処理

調査結果は各試験区の平均値±SE で示した。枝肉構成に関する統計処理は、Student's *t*-test により試験区間における有意差の検定を行った。その他の調査項目に関する統計処理は、統計処理ソフト (Ekuseru-Toukei 2008; Social Survey Research Information Co., Ltd. Tokyo, Japan) により分散分析を実施し、Bonferroni 検定により試験区間における有意差の検定を行った。

5.3 結果

5.3.1 枝肉重量と枝肉構成

屠畜時 (798 日齢) における各試験区の平均体重は、H 区:477kg、R 区:454kg および JS 区:768kg であった。H 区および R 区の各 3 頭ずつの右体側半丸枝肉を筋肉、脂肪および骨に分割した場合の各重量を Fig. 17 に、その脂肪重量に対する部位別 (内臓、皮下、筋間および腎臓脂肪) 重量割合を Fig. 18 に、筋肉重量に対する主要骨格筋 (胸最長筋、大腿二頭筋および大腰筋) 重量割合を Fig. 19 にそれぞれ示した。H 区および R 区の枝肉重量および枝肉中の筋肉、骨の重量について、試験区間に有意な差異は認められなかった。しかし、H 区における枝肉中の脂肪重量は、R 区より有意に重かった ($P<0.05$)。H 区の枝肉全筋肉中に占める大腿二頭筋および大腰筋の重量割合は、R 区より有意に高い値を示した ($P<0.05$)。

5.3.2 胸最長筋における赤身肉特性

各試験区の胸最長筋における CP 含有率を Fig. 20, IMP 含量を Fig. 21, 総遊離アミノ酸含量および旨味・甘み・苦みに区分した各遊離アミノ酸含量を Fig. 22, α -トコフェロール含量を Fig. 23 にそれぞれ示した。H 区と R 区の CP 含有率は現物中 20%程度を示し、JS 区より有意に高い値を示した ($P<0.01$)。また、H 区と R 区の IMP 含量は JS 区より有意に多かった ($P<0.01$)。H 区と R 区における総遊離アミノ酸と甘みを呈する遊離アミノ酸含量は、JS 区より有意に多かった ($P<0.01$)。逆に、JS 区における旨味を呈する遊離アミノ酸含量は、他の試験区より有意に多く ($P<0.01$)、R 区における苦みを呈する遊離アミノ酸含量は、JS 区より有意に多かった ($P<0.05$)。H 区と R 区における α -トコフェロール含量は、JS 区より有意に多かった ($P<0.01$)。

また、胸最長筋における CP 含有率と粗脂肪含有率、IMP 含量、 α -トコフェロール含量および旨味・甘み・苦みに区分した各遊離アミノ酸含量の関係を Fig. 24 にそれぞれ示した。胸最長筋中の CP 含有率に対する粗脂肪含有率は負の相関 ($y=-5.4337x+1.1452$, $R^2=0.95419$)、IMP 含量は正の相関 ($y=19629.7x-2182.6$, $R^2=0.7577$)、遊離アミノ酸のうち旨味を呈する遊離アミノ酸は負の相関 ($y=-145.0770x+37.2424$, $R^2=0.6499$)、甘みを呈する遊離アミノ酸は正の相関 ($y=1659.9027x-158.5964$, $R^2=0.7672$) をそれぞれ示した。しかし、胸最長筋中の CP 含有率と苦みを呈する遊離アミノ酸含量および α -トコフェロール含量に顕著な相関は認められなかった。

5.3.3 僧帽筋における剪断応力値

各試験区の僧帽筋における剪断応力値を Fig. 25 に示した。R 区の剪断応力値が他の試験区より有意に高い値を示したものの ($P<0.05$) , H 区と JS 区の剪断応力値に顕著な差異は認められなかった。

5.3.4 筋線維型構成および筋線維直径

屠畜前約 100 日時点 (694 日齢) にバイオプシーにより採取した試験牛の胸最長筋における筋線維型 (I 型, IIA 型および IIB 型) の構成割合および筋線維直径を Fig. 26 に示した。筋線維型構成割合について試験区間に有意な差は認められなかった。また, JS 区における I 型および IIA 型筋線維直径が, 他の試験区より有意に大きな値を示した ($P<0.01$) 。

5.4 考察

5.4.1 枝肉構成

本試験において H 区と R 区の屠畜前体重および枝肉重量について有意な差は認められなかった。しかし, H 区における枝肉中の総脂肪重量は, R 区より有意に重く ($P<0.05$) , 枝肉重量に対する総脂肪重量割合は H 区:15%, R 区:12%程度であった。これらの結果は, 交雑種去勢牛に対する初期成長期における体質制御が体脂肪の蓄積を促進すること, さらに, その影響は耕作放棄地放牧により低栄養条件下で肥育した場合, 屠畜時の脂肪蓄積量に反映されることを示した。

黒毛和種去勢牛の場合, 初期成長期における体質制御を実施後, 31 月齢まで粗飼料のみを飽食させた肥育牛の枝肉重量に対する総脂肪重量割合は約 24%, また, 4 月齢以降, 粗飼料のみを飽食させた肥育牛の総脂肪重量割合は約 20%であった (Gotoh *et al.*, 2010b) 。本試験と Gotoh *et al.* (2010b) の報告との差異は, 品種の違いに加え, 本試験において耕作放棄地での放牧肥育という低栄養条件下で, 体脂肪の代謝消費が活性化されたことを示唆した。また, Ebara *et al.* (2010) は交雑種去勢牛に対する初期成長期の給与栄養条件の違いが, 脂肪細胞の形態的变化およびその分化を制御する遺伝子の動態を明らかにした。しかし, 本試験の H 区と R 区の間において, 総脂肪重量に対する内臓, 皮下, 筋間および腎臓脂肪重量割合に有意な差異は認められず (Fig. 18) , 胸最長筋内脂肪含有率についても H 区:3.01%, R 区:2.39%程度を示し, 試験区間に有意な差異は認められなかった (データ非表示) 。一般に, 肉用牛における脂肪蓄積は, 発育にとまって腹腔内, 皮下の順に蓄積部位が変動し, 最終的に筋肉内に蓄積される (Sainz and Hasting, 2000) 。これらのことは, 耕作放棄地での放牧肥育においても, 十分な摂取草量と放牧期間の確保により, 初期成長期における体質制御を活用した筋肉内脂肪含有率に優れる牛肉生産の可能性を示唆した。

牛枝肉における胸最長筋, 大腿二頭筋および大腰筋は, その大きさと肉質の面から市場価値が高い。本試験において, H 区の枝肉全筋肉中に占める大腿二頭筋および大腰筋の重量割合は, R 区より有意に高い値を示した ($P<0.05$) 。しかし, 胸最長筋の重量割合に関して H 区と R 区の間に顕著な差異は認められなかった (Fig. 19) 。これらの結果は, 交雑種去勢牛に対する初期成長期における体質制御が大腿二頭筋および大腰筋の発育に影響を及ぼすことを示した。Zembayashi (1990) は, 品種の違いが肉用牛の骨格筋成長に及ぼす影響を明らかにするために, 黒毛和種およびホルスタイン種去勢牛の解体調査を実施した。その結果, 全筋肉量に対する胸最長筋, 大腿二頭筋および大腰筋割合は, 黒毛和種で 7.35%, 6.50%および 1.71%程度であり, ホルスタイン種で

6.20%, 6.69%, 1.53%程度であった (Zembayashi, 1990)。Zembayashi (1990) の報告と本試験の H 区および R 区を比較した場合、H 区および R 区の胸最長筋割合がやや低いものの、各骨格筋割合の合計は 15%程度とほぼ同レベルを示し、濃厚飼料多給による肥育においても、これら骨格筋の発育パターンが大幅に変動しないことが明らかになった。さらに、Zembayashi (1990) は各骨格筋の相対成長係数を調査しており、調査した全ての品種において、筋肉成長は四肢筋肉から始まり、肥育の進行に伴い前方上部筋肉の発育に移行することを報告した。胸最長筋、大腿二頭筋および大腰筋は全て相対成長係数 1 以下の初期成長筋群である (Zembayashi, 1990)。これらの報告は、本試験において大腿二頭筋や大腰筋といった骨格筋について、初期成長期における体質制御の影響が部分的に維持された結果を支持した。初期成長期における体質制御は、市場価値の高い枝肉生産のための有効な手段の一つと考えられた。

5.4.2 耕作放棄地における放牧肥育により生産された牛肉の特性

胸最長筋における CP 含有率、IMP 含量、総遊離アミノ酸含量および遊離アミノ酸含量に関して、H 区と R 区の間に有意な差異は認められなかった。しかし、H 区と R 区の胸最長筋性状と JS 区を比較した場合、多くの顕著な差異が認められた。H 区と R 区の胸最長筋内における CP 含有率は、JS 区より約 5%高い値を示し ($P<0.05$)、胸最長筋中の CP 含有率に対する粗脂肪含有率は負の相関を示した (Fig. 24)。これらの結果は、耕作放棄地での放牧という低栄養条件下での肥育により、体脂肪の代謝と消費が活性化すると同時に、筋肉内への脂肪蓄積が抑制されたことにより、筋肉内脂肪含有率が低下したことを示唆した。従来、牛肉中の粗脂肪含有率は水分含有率の減少にともない増加し、CP 含有率は一定である (Savell *et al.*, 1986; Park *et al.*, 2000; Kim and Lee, 2003)。しかし、Ueda *et al.* (2007) は、現物中の粗脂肪含有率が 4.8–39%程度異なる黒毛和種牛の胸最長筋の CP 含有率を調査した結果、CP 含有率は粗脂肪含有率が 23%まではほぼ一定であるが ($CP\%=-0.048CF\%+19.082$, $4.8<CF\%<22.867$)、粗脂肪含有率が 23%以上の場合、CP 含有率が顕著に低下 ($CP\%=-0.288CF\%+24.578$, $22.867<CF\%<39.0$) することを報告した (Ueda *et al.*, 2007)。本試験の各試験区における粗脂肪含有率は H 区:3.01%, R 区:2.39%, JS 区:25.95%程度であり(データ非表示)、CP 含有率に対して負の一次相関 ($y=-5.4337x+1.1452$, $R^2=0.95419$) を示したことから、胸最長筋内の粗脂肪および CP 含有率の関係は品種と飼養条件によって異なる可能性が示唆された。

牛肉の旨味成分として代表的な IMP および遊離アミノ酸含量に関しては、屠畜後の熟成条件により大きく変動し (Nishimura *et al.*, 1988)、脂肪交雑状況や筋線維型の違い等、様々な要因の影響を受けることが明らかになっている (Cornet and Bousse, 1999)。また、これら水溶性の呈味成分は牛肉中の粗脂肪含有率と負の相関があることが報告されている (Tsuneishi *et al.*, 2006)。本試験において H 区と R 区の胸最長筋内 IMP および総遊離アミノ酸含量が、JS 区より高い値を示したことは、筋肉内脂肪含有率の低下が大きな要因の一つである。牛肉中の IMP 含量については、一般に屠畜後 48 時間程度で筋肉内 ATP が枯渇し、最大硬直期に達すると考えられている (Busch *et al.*, 1967)。本試験で供試した胸最長筋サンプルは、と畜後 4°C で約 30 時間保存され、ATP から ADP への脱リン酸化および AMP から IMP への脱アミノ化といった ATP 分解経路 (Kasssesarn *et al.*, 1963) の途中にあったと考えられた。本試験における牛肉中の IMP 含量と CP 含有率の関係には正の相関 ($y=19629.7x-2182.6$, $R^2=0.7577$) が認められ、放牧飼養による脂肪含有率の低下、CP 含有率の増加、IMP 含量の増加が関連づけられた。

Tsuneishi *et al.* (2006) は、放牧飼養の褐毛和種の半棘筋中遊離アミノ酸含量について、アスパラギン酸、セリン、グルタミン、アラニン、メチオニンが通常肥育の場合よりも多くなるものの、グルタミン酸、リジンは減少することを報告した。本試験において、H 区と R 区のグルタミン酸を中心とした旨味を呈する遊離アミノ酸含量は、JS 区より減少し、逆にグルタミンを中心とした甘みを呈する遊離アミノ酸含量に関しては、H 区と R 区が JS 区より増加した (Fig. 22)。これらの結果は、Tsuneishi *et al.* (2006) の報告を支持した。また、旨味、甘みおよび苦みを呈する遊離アミノ酸含量と CP 含有率の関係を比較した場合、旨味は負の相関、甘みは正の相関、苦みには顕著な関係が認められなかった (Fig. 24)。これらの結果から、遊離アミノ酸含量はその種類によって、筋肉中の CP 含有率との間に異なった関係を保持しながら変動することが示唆された。Ueda *et al.* (2007) も遊離アミノ酸含量と脂肪含有率の間には負の相関が認められるものの、その変化は CP 含有率以外の他の要因によるものであることを指摘した。

脂溶性ビタミンの一つである α -トコフェロールの牛肉中含量は、放牧や牧草の給与により増加することが知られている (Tanimoto *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2002)。また、Mitsumoto *et al.* (1998) は、牛筋肉中の α -トコフェロール含量が 0.35mg/100g 以上含まれることにより、脂質酸化が抑制され、ドリップ量が減少し、筋線維構造が安定化することを報告しており、 α -トコフェロールは肉質保持に関与する重要な成分の一つである。第 IV 章において、H 区と R 区の肥育試験終了時における血中 α -トコフェロール濃度は 900 μ g/dl 以上に達し、JS 区の 3 倍以上の高値を示した (Fig. 15)。生牧草には乾物中トコフェロールが 100–420mg/kg 程度含まれており (National Agriculture and Food Research Organization, 2008b)、放牧牛肉中の α -トコフェロール含量の増加は、野草中に含まれる α -トコフェロールの摂取量増加による筋肉内への移行蓄積が大きな要因の一つである。これらの結果は、耕作放棄地での放牧肥育による α -トコフェロール含量に富んだ高付加価値牛肉生産の可能性を示唆した。

剪断力価は、食肉としての硬さを直接的に示す指標の一つである。牛肉の剪断力価を左右する要因は様々で、品種、月齢、部位、屠畜条件、筋線維構造、コラーゲンおよび脂肪の量、構造、溶解性など多岐に及ぶ (Boleman *et al.*, 1996; Shiba *et al.*, 2004)。本試験では、屠畜後約 30 時間経過した僧帽筋を使用し、レオメータによる剪断応力値を調査した。僧帽筋内の粗脂肪含有率は調査していないものの、胸最長筋内の粗脂肪含有率とほぼ同様の傾向が推測可能であり、JS 区の剪断応力値が、R 区より低い値を示した要因として、その脂肪含有率および脂肪組織の構造の違いが示唆された。また、R 区の僧帽筋と同等の粗脂肪含有率と考えられる H 区の僧帽筋の剪断応力値が、R 区より有意に低い値を示したことは、初期成長期における体質制御により、軟らかい低脂肪牛肉生産が可能であることを示唆した。その要因の一つとして、初期成長期における体質制御による骨格筋構造の変化が考えられたが、胸最長筋における筋線維構成および直径について、H 区と R 区の間に差異は認められなかったことから、骨格筋コラーゲン構造および骨格筋部位における骨格筋構造の違いについても今後詳細を検討する必要がある。

胸最長筋における筋線維型構成割合について、試験区間に有意な差は認められなかったが、R 区の IIA 型筋線維割合は JS 区より高い傾向 ($P<0.09$) を示した (Fig. 26)。これは耕作放棄地での採食物確保のための長時間の起立、移動といった筋肉の有酸素運動を主体とした個体維持行動が増加したことにより、これに適応した筋線維として収縮に持久力を持ち好氣的代謝が盛んな赤色筋線維の割合が増加したと考えられた。本試験の結果と同様に、Ozutsumi and Okada (1981) も放牧により赤色筋線維割合が増加することを報告した。さらに、赤色筋線維割合が高い牛肉は柔ら

かく、ジューシーであることが報告されている (Melton *et al.*, 1974; Calkins *et al.*, 1981)。このことは、耕作放棄地での放牧肥育による筋線維割合に特徴を持った良質な牛肉生産の可能性を示唆した。また、筋線維直径について、H 区と R 区の I 型および IIA 型筋線維直径が、JS 区より有意に小さい値を示した (Fig. 26)。このことは、耕作放棄地での放牧肥育という過酷な栄養条件下において、筋蛋白合成のためのエネルギー摂取が不足することを示した。また、第 IV 章において肥育試験中間時の MRFs の発現動態を調査した結果、H 区と R 区における Myf5 と MRF4 の発現が、JS 区より有意に低い値を示した (Fig. 16)。これらの MRFs 動態は、低栄養条件および持続的な運動が必要な条件下で、骨格筋における筋芽細胞増殖および筋管成熟が抑制されたことを示唆した。さらに、これらのことは、H 区と R 区の I 型および IIA 型筋線維直径が、JS 区より小さい値を示した結果を裏付けた。

以上の結果から、初期成長期に体質制御を施した交雑種去勢牛を、耕作放棄地での放牧という過酷な栄養条件下で肥育することにより、これらに特徴付けられる枝肉および赤身肉の特性について次の点が明らかになった。第一に、初期成長期の体質制御により、成長初期段階において発育が優先される一部の骨格筋（大腿二頭筋、大腰筋）の成長が加速されることで、出荷時においても、それらの筋肉割合を高く維持すると考えられた。さらに、初期成長期における体質制御は、胸最長筋における CP 含有率、IMP 含量、遊離アミノ酸含量、 α -トコフェロール含量および筋線維形態に影響を及ぼさないものの、僧帽筋における剪断応力値を低下させたことから、体質制御による軟らかい低脂肪牛肉生産の可能が示唆された。第二に、耕作放棄地での放牧という過酷な栄養条件下での肥育は、持続的運動の必要性和野草摂取の影響により、その枝肉中の内臓脂肪蓄積量を顕著に低下させ、骨格筋中の CP 含有率、IMP 含量、総遊離アミノ酸含量、 α -トコフェロール含量を増加させることが明らかになった。

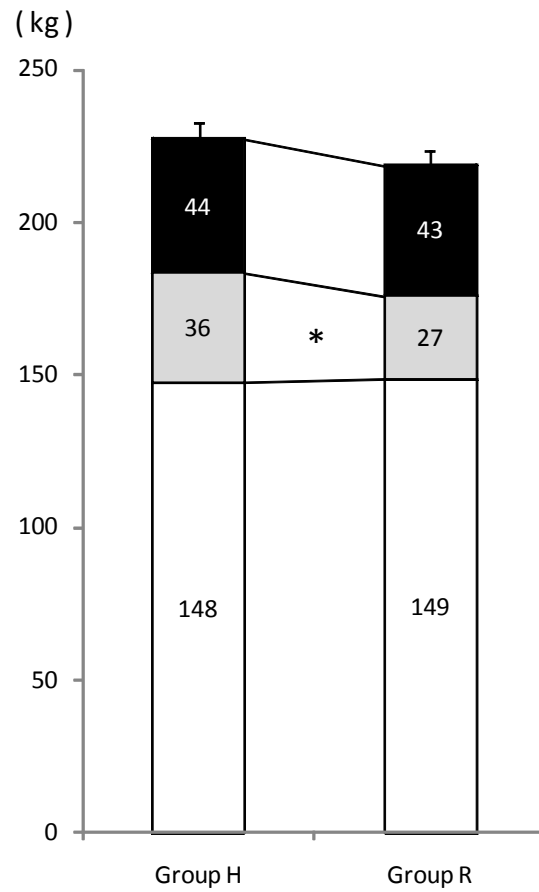


Figure 17. Carcass weight, total muscle (□), fat (▒) and bone (■) weight of groups H and R. Data are mean $\pm$ SE. * Significant difference between groups ($P < 0.05$).

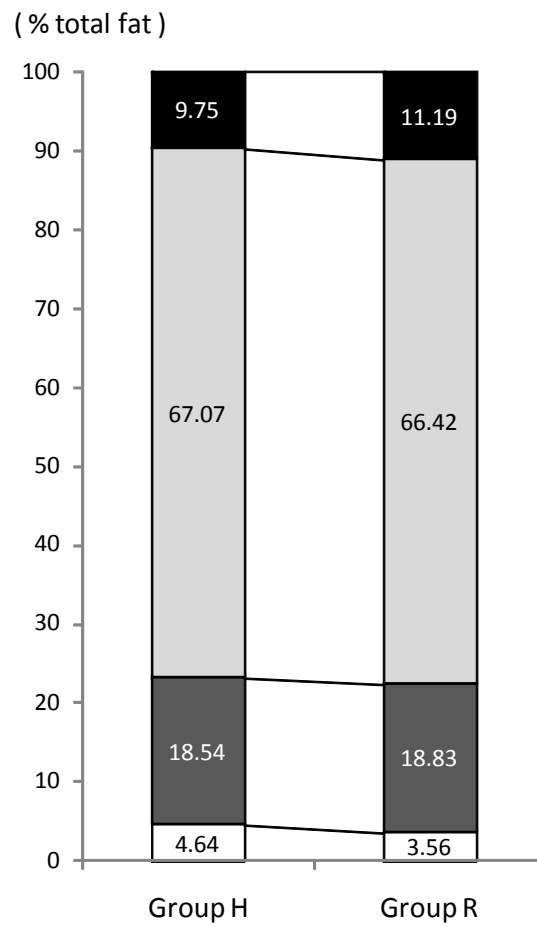


Figure 18. Visceral (□), subcutaneous (■), intermuscular (▨) and renal (■) fat composition in the right side of the carcass for groups H and R.

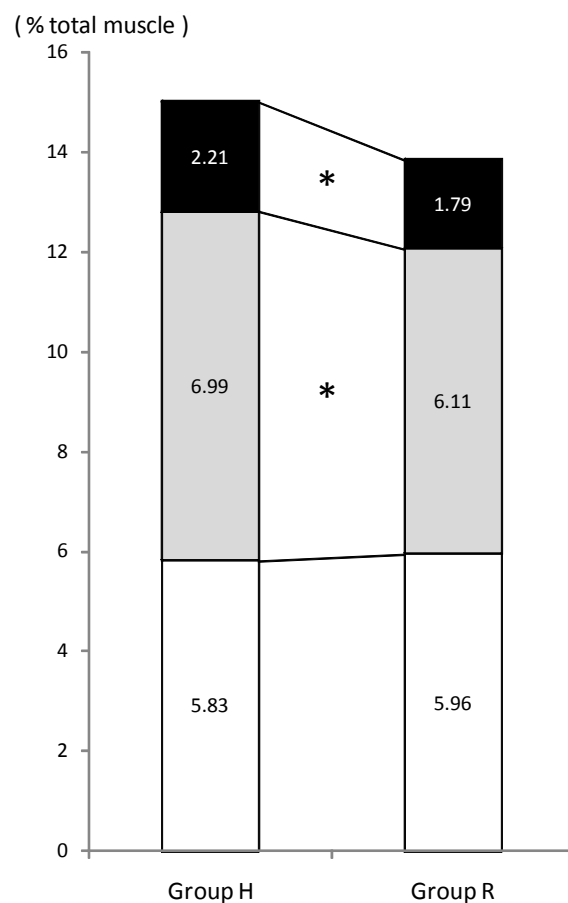


Figure 19. Carcass composition of weights of LT (□), BF (▒) and PM (■) muscles to total muscle weight of groups H and R. * Significant difference between groups ($P < 0.05$).

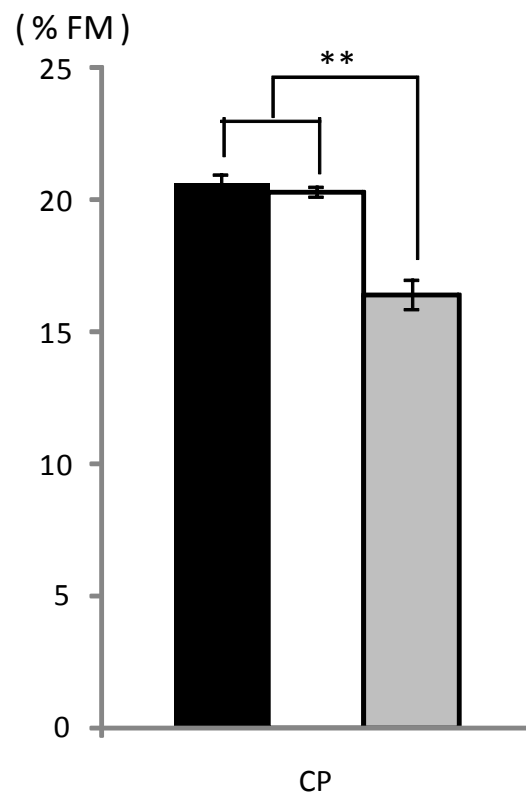


Figure 20. Composition of CP in LT muscle of groups H (■), R (□) and JS (▒). LT muscle: section at 6th - 7th rib. Data are mean $\pm$ SE. ** Significant difference between groups ($P < 0.01$).

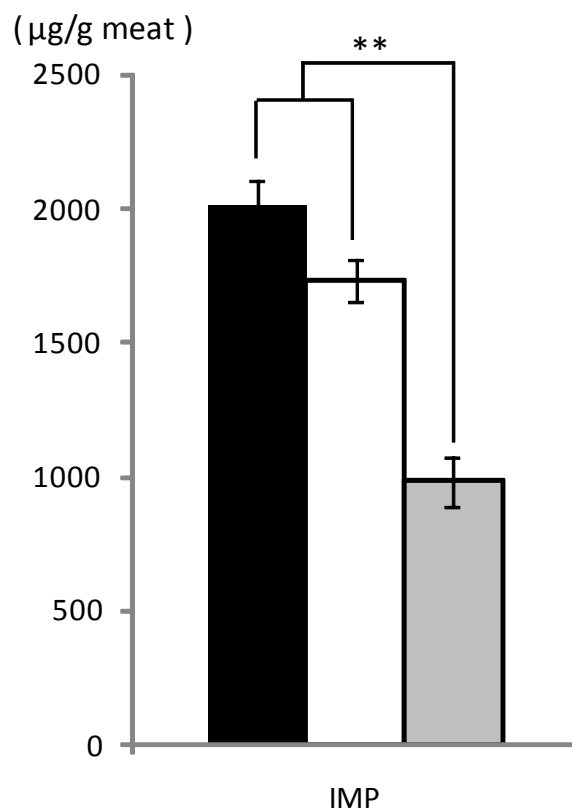


Figure 21. IMP content in LT muscle of groups H (■), R (□) and JS (▒). LT muscle: section at 6th - 7th rib. Data are mean $\pm$ SE. ** Significant difference between groups ($P < 0.01$).

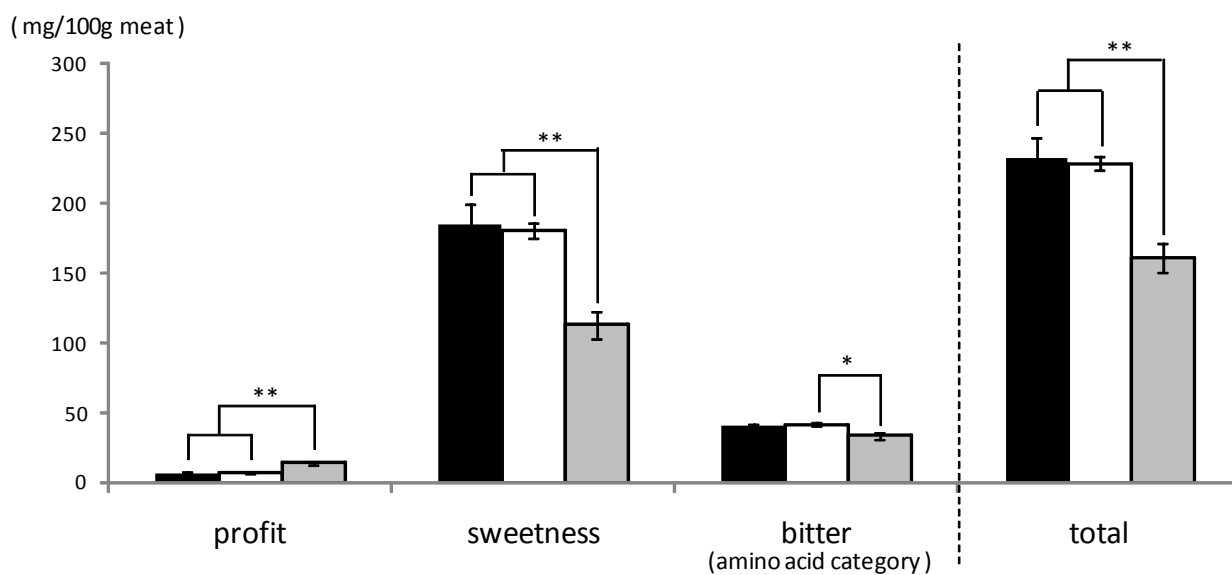


Figure 22. The free amino acid content of total and each category (profit, sweetness and bitter) in LT muscle of groups H (■), R (□) and JS (▒). LT muscle: section at 6th - 7th rib. Profit: aspartic acid + glutamic acid, Sweetness: glutamine + serine + proline + glycine + alanine, and Bitter: valine + methionine + isoleucine + leucine + tyrosine + phenylalanine + histidine + arginine. Data are mean $\pm$ SE. *, ** Significant difference between groups ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

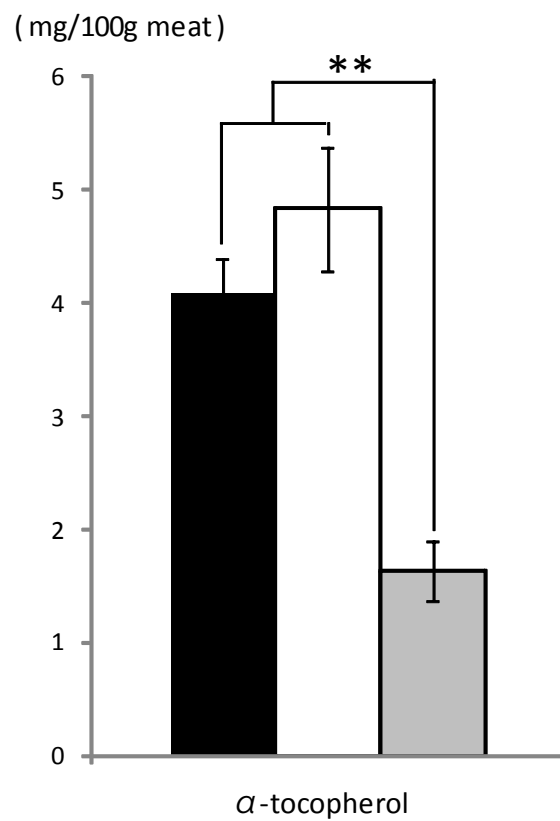


Figure 23. α -tocopherol content in LT muscle of groups H (■), R (□) and JS (▒). LT muscle: section at 6th - 7th rib. Data are mean $\pm$ SE. ** Significant difference between groups ($P < 0.01$).

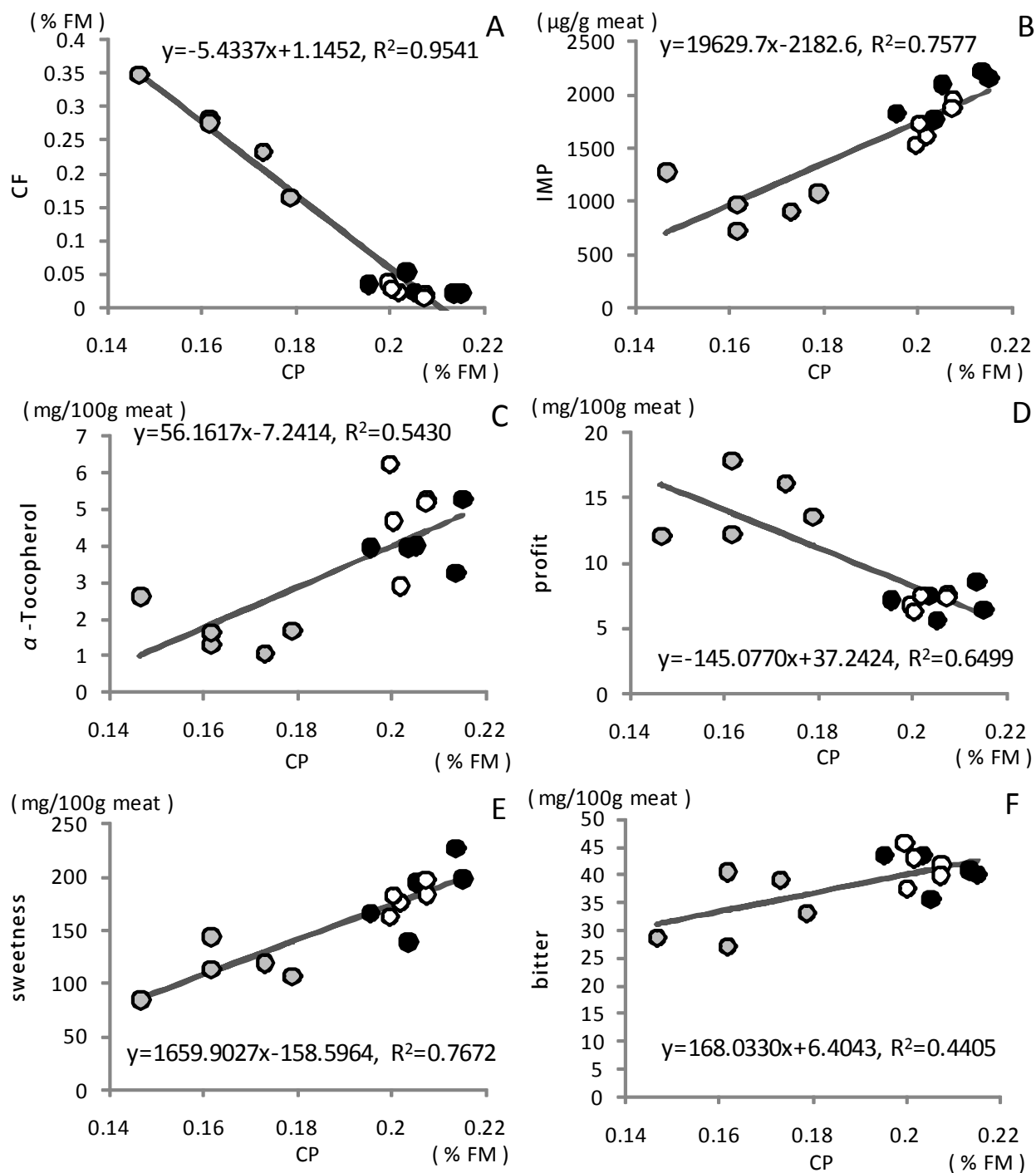


Figure 24. Correlation between CP percentage and CF percentage (A), IMP (B), α -tocopherol (C) and the three free amino acid categories (free amino acid related to profit (D), sweetness (E) and bitter (F) taste) content in LT muscle of groups H (●), R (○) and JS (◐). LT muscle: section at 6th - 7th rib.

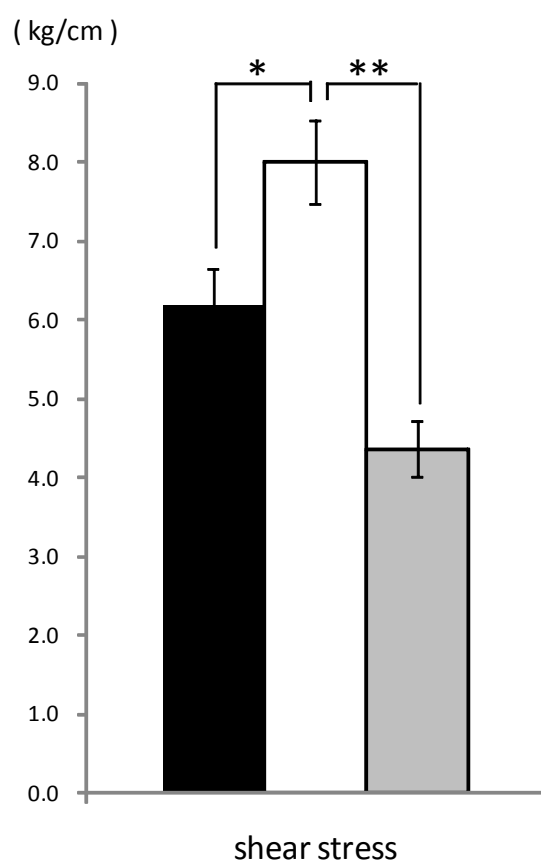


Figure 25. Shear stress in TP muscle for groups H (■), R (□) and JS (▒). TP muscle: section at 6th - 7th rib. Data are mean $\pm$ SE. *, ** Significant difference between groups ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively).

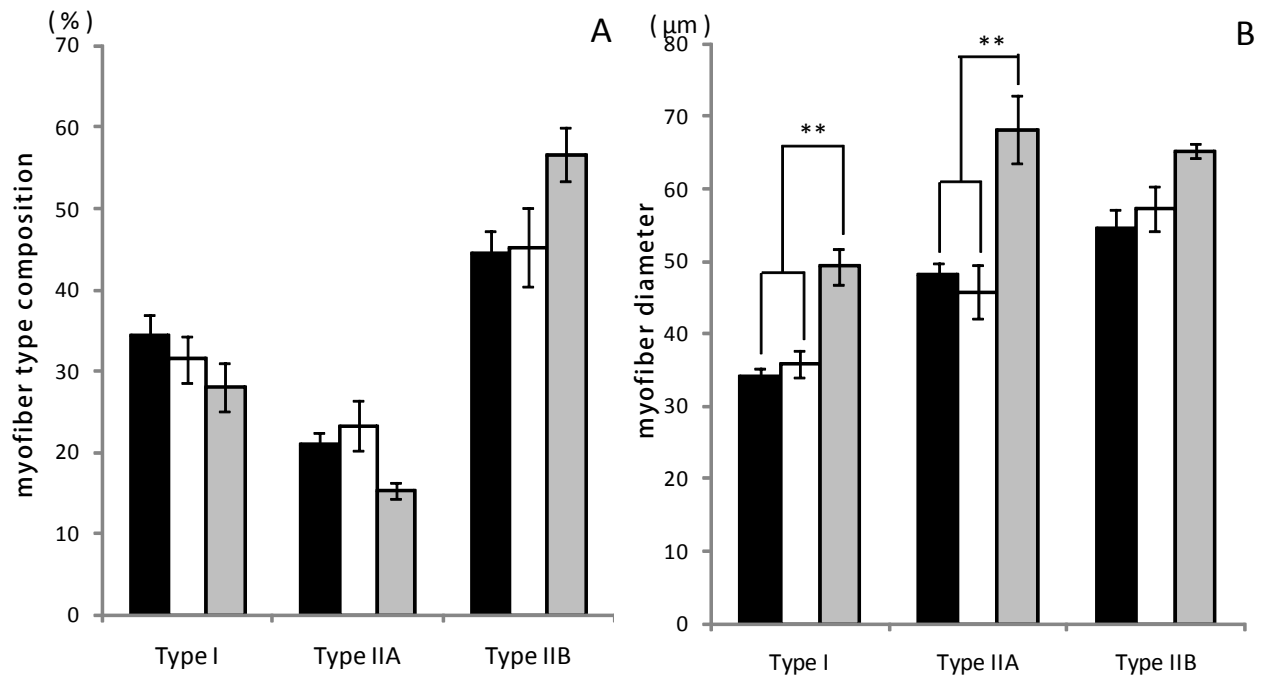


Figure 26. Percentage distribution (A) and diameters (B) of myofiber types I, IIA and IIB in LT muscle of groups H (■), R (□) and JS (▒) at the conclusion of the experiment. The LT biopsy samples were obtained from the steers at 694 d of age. Data are mean $\pm$ SE. ** Significant difference between groups for the same variables ($P < 0.01$).

第VI章 総 合 考 察

第1節 耕作放棄地の草資源を活用した牛肉生産

ウシはブタやニワトリとは異なり、ヒトが消化できない粗い繊維質成分（セルロースおよびヘミセルロース）を分解し、草資源から蛋白質源としての食肉や生乳を生産し、それをヒトに供給するという重要な物資循環機能を担った草食動物（反芻動物）である。しかし、我が国の肉用牛生産は、大量の穀物飼料（4,000－5,000kg/頭）を給与する飼養管理のもと、高い脂肪交雑能力を有する黒毛和種の生産体系が中心である（Gotoh *et al.*, 2009）。また、肉用牛へ給与される濃厚飼料の90%以上が海外から輸入されている。近年、この加工型農業に付随した多くの問題が発生している。大量の家畜飼料の国内搬入は、口蹄疫、BSE等の発生に見られる家畜衛生および食の安全に関する問題、集約的経営形態から排出される糞尿処理問題、それに関連する環境問題および集約的な飼養システムによる家畜福祉等の多くの問題を抱える。2004年、農林水産省は畜産農家に対して、家畜排泄物の適正処理を義務づける法律を制定したが、家畜排泄物処理施設の整備に係る経費支出は、農業経営を強く圧迫している。また、国際連合食料農業機関（FAO）（2010）は、世界の開発途上国において9億2,500万人が飢餓状態であり、毎年500万人の子供達が餓死している現状を報告している。先進国である日本は、世界的な食糧バランスを考慮したうえで、国内における農産物生産を環境保全、資源循環型の新しい農業システムへ変換させていくことが重要である。

ヒトやラットでは、生後あるいは成熟後に発生する疾病や肥満等の生活習慣病のいくつかは、遺伝だけではなく、妊娠末期の母胎や初期成長期の栄養環境が大きく影響していることが報告されている（Levin, 2000）。この初期成長期の環境、特に栄養環境における代謝生理的な効果が記憶（体質制御）される現象は“代謝生理的刷込”あるいは“DOHaD (Developmental Origins of Health and Disease)”と呼ばれ、注目されている（Gluckman *et al.*, 2008）。肉用牛に対する“代謝生理的刷込”は、日本の牛肉生産を環境保全、資源循環型の新しい農業システムへ変換させる有効な一つの手段と考えられる。しかし、初期成長期の肉用牛に対する高栄養飼料給与による体質制御に関する報告は少ない。

近年、農業従事者の高齢化による離農や労働力不足等により、中山間地域を中心に耕作放棄地が増加しており、農地荒廃、景観悪化および鳥獣害増加等への対応が重要な課題になっている。繁殖雌牛を活用した耕作放棄地での短期間の移動放牧に関しては、飼料コスト低減効果に加えて、景観改善効果や鳥獣害の拡大防止効果が認められる。しかし、長期間にわたる耕作放棄地での放牧効果についての報告は少ない（Hayashi, 2009）。そこで、国内の農地が減少するなかで、新しい草資源として耕作放棄地の雑草を肉用牛の粗飼料として活用することに関する基礎的な情報を収集することは重要である。さらに、耕作放棄地での牛肉生産の可能性を明らかにするために、耕作放棄地放牧により生産された牛肉について、その理化学的性状を調査することが必要不可欠である。

そこで、本研究では耕作放棄地における草資源を活用した資源循環型の肉用牛生産システムの提案を目的として、初期成長期における高栄養飼料多給による体質制御が、肉用牛の発育性と産肉性に及ぼす影響を明確にすると同時に、耕作放棄地での放牧肥育が屠畜時の枝肉構成と肉質の理化学的性状に及ぼす影響を検討した。

交雑種牛に対する初期成長期の体質制御は、屠畜時の総脂肪蓄積量、枝肉中の大腿二頭筋

と大腰筋重量割合を増加させ、僧帽筋における剪断応力値を低下させた（第Ⅴ章）。このことは、初期成長期の体質制御により、産肉量を向上させると同時に肉質性状に特徴をもった牛肉生産が可能であることを示唆している。さらに、本研究では耕作放棄地での放牧肥育により、赤身肉に特徴を持った健康的な牛肉の生産が可能であることが明らかになった（第Ⅴ章）。第Ⅳ章において、耕作放棄地での放牧肥育終了時の交雑種去勢牛（H区、R区）の体重は、濃厚飼料多給により肥育した場合（JS区）と比較して約290kg軽かった。この最大の要因は、耕作放棄地における冬期の野草摂取量が極端に抑制されたことである。スプリングフラッシュにより野草摂取量が増加した春期から夏期にかけて、H区とR区のDGはJS区と同等の値を示した。このことは、耕作放棄地における放牧肥育では、冬期の摂取栄養不足量についての的確に把握し、補助飼料を供給することで、耕作放棄地において十分な発育性を保持した放牧肥育が可能であることを示している。特に耕作放棄地での放牧肥育により生産された牛肉は、脂肪含有率が低く、CP含有率が高い特徴をもつことが明らかになった。さらに本研究において、H区とR区の枝肉の肉質性状をJS区と比較した場合、主要な旨味成分の一つであるIMP含量が約2倍、総遊離アミノ酸含量が約1.4倍、甘みを呈する遊離アミノ酸含有量が約1.6倍まで増加し、耕作放棄地での放牧肥育により生産される枝肉は、呈味成分が豊かで旨味の深い肉質性状を有することが明らかになった。さらに、抗酸化活性による細胞の老化防止作用がある α -トコフェロール含量は約2.6倍に達し、健康的な牛肉であるともいえる。また、H区とR区の胸最長筋の脂肪酸組成をJS区と比較した場合、n3系不飽和脂肪酸である α -リノレン酸（C18:3）割合は約6倍程度高い値を示した（データ非表示）。栄養学的な側面から、食品中の脂肪酸バランスとしてのn6/n3比を5以下にすることが推奨されている（Tsuji, 1991）。本研究においてH区とR区の胸最長筋のn6/n3比は4以下に低減されたことから、耕作放棄地での放牧肥育により生産される牛肉は、栄養学的に好ましい脂肪酸組成を有する（データ非表示）。草食動物の肉やミルクに特異的に多く含まれる脂肪酸の一つであるCLA（*cis*-9, *trans*-11 C18:2）は、抗発ガン作用や抗肥満作用をもつとされる生理活性物質である（Ha *et al.*, 1990; Ip *et al.*, 1994）。このCLA割合に関してもH区とR区の胸最長筋においてJS区より2倍程度高い値を示した（データ非表示）。耕作放棄地での放牧肥育により生産される牛肉では、これらの脂肪酸組成の特徴を維持したまま、筋肉内脂肪含有率を増加させることが重要である。本研究における耕作放棄地での放牧肥育により生産された牛肉に特徴的に認められた肉質性状および脂肪酸組成に関しては、一般的な管理草地において放牧飼養で肥育された放牧牛肉でも同様の傾向が報告されている（Yang *et al.*, 2002; Tsuneishi *et al.*, 1988b; Tsuneishi *et al.*, 2006）。このことから、春期から夏期にかけて草量が豊かな時期には耕作放棄地での放牧肥育を実施し、冬期には管理草地での放牧肥育、あるいは自給粗飼料多給肥育を実施することで、肉用牛の高い発育性を維持すると同時に、放牧牛肉の旨味成分、機能性成分および脂肪酸組成の特徴を維持したまま筋肉内への適度な脂肪蓄積を図ることが可能と考えられる。さらに、耕作放棄地での放牧肥育には、環境保全といった多面的効果をも合わせ持つことから、地域環境に対するストーリー性を保持した新しい牛肉としてのアピールも可能と考える。

第2節 牛肉生産に対する体質制御技術の応用

本研究の大きな目的の一つは、ヒトやラットで報告される初期成長期の栄養環境における代謝生

理的な応答が“記憶”される生物学的機構である DOHaD の効果を肉用牛の初期成長期に対して応用することで体質制御をおこなうことにある。しかし、肉用牛に対する初期成長期での高栄養飼料給与による体質制御が、発育性および産肉性に及ぼす影響は明らかにされていない。

そこで本研究では、黒毛和種由来の優れた脂肪交雑能力にホルスタイン種の高い発育性を合わせ持つ交雑種牛に対して、哺育期での高栄養代用乳多給および育成期における高栄養飼料多給による体質制御が、骨格形成を中心とした発育性および骨格筋における筋分化形成および筋線維性状に及ぼす影響を調査した（第Ⅱ章、第Ⅲ章）。さらに第Ⅳ章では、長期間の耕作放棄地での放牧肥育という低栄養条件下において、体質制御が交雑種の発育性と産肉性に対して天賦的に及ぼす影響を調査した。

第一に、高蛋白低脂肪代用乳多給による強化哺育は、交雑種雄子牛の骨格形成を中心とした発育性を劇的に向上させた。代用乳からの過剰な脂肪摂取は体脂肪蓄積を、蛋白摂取は体蛋白増加の要因となる（Brown *et al.*, 2005; Blome *et al.*, 2003; Bartlett *et al.*, 2006; Tikofsky *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 2008）。そこで本試験では、哺育期における交雑種雄子牛の高い発育性を発揮させることを目的とし、高蛋白低脂肪代用乳の多給による強化哺育（最大 DMI 1.92 kg/日；110% TDN/DM, 29% CP/DM, 19% FAT/DM）を実施した。強化哺育による代用乳からの CPI は 40kg/DM 程度に達し、一般的な水準の約 4 倍程度となった。この高い CPI は、IGFBPs の合成に影響を及ぼすことで IGF-I の分泌および体蛋白合成を促進したと考えられた。また、強化哺育による体長、体高、寛幅および胸囲の発育向上が認められた。さらに、胸最長筋における MRFs の発現動態は、myogenin の低下と MRF4 の上昇が顕著であり、強化哺育により骨格筋における筋芽細胞から筋管への分化が抑制される反面、筋管の成熟や維持を向上させる方向に MRFs の動態が変動することが示唆された。このことは、筋芽細胞および筋管の分化および絶対的な量を増加させるためには、さらに早い発育ステージあるいは胎児期での栄養環境における体質制御が効果的であることを示唆した。

第二に、育成期における高栄養 TMR 多給による体質制御の影響は、その高い CPI が第一胃内環境および血液性状に影響を及ぼした。特に血漿中 IGF-I 濃度が育成期を通して高位に維持されることで、発育の向上を可能にした。強化哺育を実施した交雑種雄子牛の血漿中 IGF-I 濃度は、離乳時期に一時的に低下し、慣行哺育を実施した交雑種雄子牛と同レベルに達した（第Ⅱ章）。これは、強化哺育の離乳時において消化吸收効率が大きく異なる代用乳と人工乳の摂取バランスが急激に変動したことが大きな要因である。IGF-I の合成と骨格形成促進のためには、反芻胃を含む消化吸收器官の発達に合わせて、摂取蛋白源を代用乳から人工乳へよりスムーズに移行させることで、離乳時期の CPI を高位に維持し、効率的に蛋白質成分を吸収利用させることが重要である。また、育成試験前期（148–210 日齢）において強化哺育を実施した交雑種去勢牛（H 区）と慣行哺育を実施した交雑種去勢牛（JS 区）の摂取栄養状況に違いは認められなかったものの、H 区の血漿中 IGF-I 濃度は JS 区より高い水準で推移し、分泌面積比についても H 区が JS 区より有意に高い値を示した（Fig. 9）。第Ⅱ章で述べたように、これら結果は、強化哺育は哺育期に IGF-I 合成の主要器官である肝臓の発育を促進すると同時に、育成前期に固形物からの蛋白吸収効率が充実することで血漿中 IGF-I 濃度を高位に維持すると考えられた。

第三に、体質制御により特徴付けられた体幹の発育性、第一胃環境、骨格筋の筋分化能は、長期間の耕作放棄地での放牧肥育という低栄養条件下において消失することが明らかになった。第Ⅳ章において、放牧馴致期間における H 区と R 区の第一胃内溶液中の VFAs 濃度は、JS 区と比

較して急激に低下した (Fig. 14)。また、放牧馴致開始時に認められた H 区と R 区の体測尺値の差異は、肥育試験終了時には認められなかった。Gotoh *et al.* (2010a, b) は、初期成長期に体質制御を施した後、肥育期に粗飼料を飽食させた黒毛和種去勢牛の 26 月齢時の体重は 552kg であり、体質制御を施さなかった場合と比較して約 73kg 重く、屠畜時の骨格筋内脂肪含有率も優れることを報告した。本研究における 26 月齢時の H 区の体重は 476kg であり、Gotoh *et al.* (2010a, b) の報告と比較して 100kg 程度低い値を示した。これらの結果は、初期成長期の体質制御により加速された骨形成と体幹の発育性を耕作放棄地での放牧といった低栄養条件下の肥育において維持するためには、体幹の萎縮を抑制するためのよりスムーズな放牧馴致と一定レベル以上の放牧肥育期の栄養摂取が必要であることを示唆した。さらに、第 IV 章において、H 区と R 区の MRFs 発現動態に顕著な差異は認められず、体質制御により特徴付けられた骨格筋の筋分化能は消失した。しかし、JS 区の MRFs 発現動態と比較した場合、交雑種去勢牛の肥育期において、MyoD と Myf5 発現が栄養依存的に調整されることが明らかとなった。これらのことは、初期成長期の体質制御により特徴付けられた MRFs 動態を発現させるためには、肥育期の栄養条件が一定水準以上に維持されることが重要であることを示唆した。

第3節 耕作放棄地における放牧肥育が保持する多面的機能

近年、農業従事者の高齢化による離農や労働力不足等により、中山間地域を中心に耕作放棄地が増加しており、農地荒廃、景観悪化および鳥獣害増加等への対応が重要な課題になっている (Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan, 2005)。耕作放棄地を電気牧柵で小さな牧区に囲い、短期間に繁殖雌牛を移動しながら放牧する技術は、景観改善効果、鳥獣害の拡大防止効果等を保持している (Higashiyama *et al.*, 2004; Ide *et al.*, 2005; Kojima *et al.*, 2008; Otsuki *et al.*, 2004)。しかし、肉用牛生産を考慮した場合、放牧期間は長期間におよび、耕作放棄地面積も広域となる。このように長期間かつ広域におよぶ耕作放棄地での放牧を実施した場合の周辺地域に対する環境負荷および鳥獣害防止効果等については明確でない。そこで本研究では、第 V 章における耕作放棄地の周辺地域の水質について、肥育試験期間を通して継続的に調査した。放牧地周辺の水源 4 カ所 (放牧地内井戸水、放牧地隣接貯水池、他) における放牧実施前および放牧期間中の生物化学的酸素要求量 (BOD) および大腸菌群数の変化状況を調査した (データ非表示)。放牧前の BOD、大腸菌群数はそれぞれ 1.5mg/l および 100 個/ml 程度であり、放牧期間中も放牧前と同等の水準で推移した。これらのことから、本研究における耕作放棄地面積および放牧強度等の条件下 (Fig. 12) では、周辺地域における水質への悪影響はないことが明らかになった。

さらに、第 V 章における耕作放棄地の野草量および野草種の植生状況について、肥育試験期間を通して継続的に調査した。放牧開始時には 0.8DMkg/m² 程度に繁茂した野草の約 90%をセイタカアワダチソウが占めたが、放牧 1 ヶ月後には約 0.2DMkg/m² まで減少し、未放牧地である対照区と比較して約 1/3 程度まで抑制された (データ非表示)。その後、対照区において冬期の野草量は約 0.15DMkg/m² まで減少したものの、放牧 1 年後には、放牧前と同レベルまで野草量が急増した。放牧地区において、放牧 1 年後の野草量は約 0.13DMkg/m²、野草種はセイタカアワダチソウ; 約 45%、ススキを中心としたイネ科植物; 約 20%、その他; 約 29%を占め、その多様性が認められると同

時に、良好な景観が維持された (Fig. 27)。

次に、第 V 章における耕作放棄地に確認された野生鳥獣の獣痕数の変動状況について、肥育試験期間を通して継続的に調査した。放牧地外周 (長さ約 1,000m×幅約 3m) において確認された獣痕 (生体確認、掘り返し痕、糞および足跡他) 数を調査した結果、秋から冬期にかけて獣痕数は急激に増加し、春までに放牧開始前のレベルまで減少した後、低い水準で推移した (データ非表示)。冬期における獣痕数の急激な増加については、確認された獣痕の多くがイノシシによる掘り返し痕であった。一般に耕作放棄地での放牧による獣害の抑制効果については、集落と山間部との間の耕作放棄地にヒトと野生獣の境界となる緩衝地帯を設置することで獣害を回避するゾーニングが報告されている (Ide *et al.*, 2005)。これはイノシシやシカ、サルが放牧牛を恐れるのではなく、牛が耕作放棄地の雑草を採食、踏倒することによって見通しがよくなり、警戒心の強い野生獣がそこを移動しづらくなるためと考えられている。また、Ide *et al.* (2005) は、耕作放棄地での放牧がイノシシの掘り返し行動に及ぼす影響を調査した。その結果、イノシシはクズの主根部に蓄積された炭水化物の摂取を目的として、秋から春期にかけて集中して掘り返し行動を行うことを明らかにしている。本試験の冬期における獣痕数の急激な増加についても、耕作放棄地内に多く確認されたクズを中心としたツル性植物の主根部の採食のために、秋から春期にかけてイノシシの掘り返し行動が頻繁に確認されたためと考えられた。

これら放牧牛が悠然として草を食べる美しい景観は、人々を引きつける魅力を有する。本研究においても、地域育成会が主体となった“放牧ふれあい体験”が開催された。地元小学生とその保護者を中心に約 30 名が、放牧牛への給餌体験等により直接放牧牛を身近に接することでその温かみを感じると同時に、近い将来、食肉として我々の糧となる命について様々な思いを巡らせた。

このように、肉用牛生産を前提した場合の耕作放棄地での放牧肥育は、周辺地域の水質に対して負荷を及ぼすことなく、景観保全や癒しといった多面的効果を保持することが実証された。

第4節 我が国における新しいフードチェーン構築に向けて

本研究を通じた試験牛の生産コストについて調査した。哺育育成期における体質制御のため給与した代用乳および飼料コストの上昇分として、H 区の飼料費が JS 区より約 57 千円/頭高くなった。逆に肥育期は、耕作放棄地の野草を粗飼料として活用することにより、H 区の飼料費が JS 区より約 220 千円/頭安くなった。これら飼料費に労働費、敷料費、諸材料費および放牧資材費等を加算した場合の 1 頭当たりの生産コストは、H 区:436 千円、JS 区:627 千円、R 区:366 千円であった。1 頭当たりの生産コストを出荷平均枝肉重量で除した枝肉 1kg 当たりの生産コストは H 区:1,888 円/kg, JS 区:1,317 円/kg, R 区:1,648 円/kg となった。2008 年 4 月から 2009 年 3 月までの東京市場における交雑種去勢牛 B-3 等級の平均単価は 1,216 円/kg であった。JS 区の枝肉 1kg 当たりの生産コストが、東京市場の平均単価を上回った最大の要因は、原油価格の乱高下および飼料穀物のバイオ燃料原料への転換等による輸入飼料価格高騰であり、このことは、今日における日本の肉用牛生産農家の厳しい経営状況を示している。耕作放棄地での放牧肥育により飼料コストの低減は可能であった。しかし、その発育性低迷により H 区の枝肉重量は約 230kg と低迷し、このことが枝肉 1kg 当たりの生産コストを上昇させた。熊本県産山村における上田尻牧野組合では、1983 年以降、食肉業者 1 社と産直委託契約を締結し、褐毛和種の粗飼料多給型肥育による牛肉生産販売を実

施している。上田尻牧野組合では、褐毛和種の放牧と補助飼料給与をバランス良く組み合わせた 4 タイプの肥育形態を提示している。放牧牛肉の特徴をアピールした“産山さわやかビーフ”消費拡大により、2007 年における出荷頭数は 108 頭程度まで拡大している。2004 年における“産山さわやかビーフ”の平均枝肉重量は 374kg、枝肉格付は A-2、食肉業者の引き取り価格は 1,432 円/kg 程度である (Rural Culture Association Japan, 2008)。体質制御を活用した耕作放棄地での放牧肥育技術においても、生産コストの上昇を抑えつつ、枝肉重量 370kg 程度を確保することで、枝肉 1kg 当たりの生産コストを 1,150 円まで低減することが重要である。この生産コスト低減は、前述した冬期における放牧牛の発育性向上技術の確立と体質制御期間の短縮による飼料コスト低減により十分可能である。耕作放棄地での放牧肥育により生産された牛肉は筋肉内脂肪含有率が少なく、国内の牛肉格付け評価および枝肉価格は極端に低い (Sithyphone *et al.*, 2010)。しかし、“産山さわやかビーフ”のような産直による安定供給体制の確立と赤身肉の独自認証および価格形成により、耕作放棄地での放牧肥育牛肉の生産流通は可能となると考える。

現在の我が国の牛肉生産における諸問題や、農業全般における耕作放棄地増加の問題を解決するための一つの方策として、本研究では、肉用牛への体質制御と耕作放棄地での放牧肥育を組み合わせた新しい牛肉生産システムの構築を目指して実証的試験を実施した。今後、検討しなければならない課題は多いが、反芻家畜のもつ物質循環機能を最大限に発揮させた、持続可能な牛肉生産システムの構築は緊急の課題である。本研究では、交雑種牛に対する体質制御と耕作放棄地での放牧肥育が、骨格形成を中心とした発育性および骨格筋分化に及ぼす影響性を中心に検討した。しかし、体質制御は脂肪細胞分化関連因子をはじめ、牛体を構成する種々の組織・器官でも多様な影響を及ぼしていることが考えられる。耕作放棄地での放牧肥育により生産される牛肉の市場性についても調査を行うことで、今後はさらに多角的なアプローチを実施することが重要である。ヨーロッパの農業系大学では、“フードチェーン”という概念を基盤とした農学の再構築が行われている。このフードチェーンとは、これまでの農業や食料生産で最重要視された生産性や集約性ではなく、自然化学、食品工学、栄養学および社会科学といった広域におよぶ研究分野が強固に連携して、農業を循環可能な持続的産業としてとらえることである。部分的な生産効率の上昇ではなく、農業を環境保全に立脚した第一の産業と位置づけ、生産から消費に至る全ての連鎖のなかで農業を考えることが重要である。本研究において、牛肉という“もの造り”のなかでフードチェーンをとらえた場合、自然環境から始まり、生産技術、品質評価管理、消費流通体系、マーケットそして自然環境に終息する全ての連鎖の中で、持続可能で安心できる牛肉生産を構築する必要性が明確になった。今日まで断片的であったフードチェーンの各要素を接着可能とするような新技術の開発が、これからの研究者に求められる重要な役割であり、本研究における体質制御技術の試みはその第一歩に過ぎない。また、我々の子供達の食卓に胸を張って並べることができる農産物提供の為には、フードチェーンの概念に基づいた日本農業の再構築に対する新しい研究が必要不可欠であり、本研究の意義は大きいと確信する。



Figure 27. Photographs where change of scenery in the abandoned farmland in this study before (A) and after pasturing (B), and the crossbred Wagyu steers were grazing tall goldenrod (C). A: Land where tall goldenrod (*Solidago altissima* L.), B: pasturing begins and it in 9 mo, May in 2008, and C: picture that crossbred Wagyu steers were grazing tall goldenrod (*Solidago altissima* L.), October in 2007.

総 括

近年、輸入穀物飼料に過度に依存する日本の肉用牛生産は、食の安全性に関わる問題、排出される大量の糞尿処理に関わる環境負荷等の多くの問題を抱える。一方、安価な食料輸入による農家の経営破綻等から中山間地域における耕作放棄地は、急激に増加している。農地保全は、食料安全保障と関連した重要な課題である。環境保全の視点からも持続可能な資源循環型の新しい牛肉生産システムの構築は緊急の課題である。本研究は、交雑種牛（黒毛和種雄 × ホルスタイン種雌）における初期成長期の栄養調節による体質制御効果および、それらの処理を受けた牛群の耕作放棄地における実証的な放牧肥育が、発育性および産肉性に及ぼす影響について形態学、生理学および分子生物学的に検討した。

哺育期（0－5 月齢）に高蛋白低脂肪代用乳を多給し、育成期（6－10 月齢）に高栄養飼料を飽食させることで体質制御を実施した交雑種牛の 10 月齢時における体重は、日本の慣行的な哺育後、乾草のみで育成した交雑種牛の 1.3 倍程度に達し、有意に高い値を示した。特に体長および胸囲で著しい発育が認められた。日本の慣行的な哺育および育成条件で飼養された交雑種牛と比較しても、体重、体長および胸囲で著しい発育効果を示した。これらのことから、初期成長期の発育性に対する摂取栄養の重要性が示唆された。初期成長期に体質制御を実施した交雑種牛の血漿中のインスリン様成長因子-I (IGF-I) 濃度が、慣行的な哺育後、乾草のみで育成あるいは慣行的な育成を実施した交雑種牛よりも有意に高く維持された。また、初期成長期における体質制御は、骨格筋の筋線維型構成やその直径には影響を及ぼさないものの、骨格筋中の筋分化制御因子群の動態に関して、myogenin 発現量の早期低下、MRF4 および myostatin 発現量の上昇が認められた。これらのことから哺育育成期における高栄養飼料多給による体質制御は、初期成長期の発育に著しい効果を及ぼし、骨格筋の成長過程における筋細胞の成熟や維持の亢進が示唆された。

初期成長期に体質制御を実施した交雑種牛および日本の慣行的な哺育後、乾草のみで飼養した交雑種牛を用いて放牧馴致後、耕作放棄地での実証的な放牧肥育（12－26 月齢）試験を実施した。冬期の可食草量不足により全ての交雑種牛の発育が停滞したが、春期以降、草量の増加により発育の向上が認められた。このことから、耕作放棄地での放牧肥育に関して、冬期の栄養供給技術の必要性が示唆された。放牧肥育期間に、骨格筋中の筋分化制御因子群の動態および筋線維性状に対する体質制御の顕著な影響は認められなかった。初期成長期に体質制御を実施した交雑種牛の屠畜枝肉における大腿二頭筋（ランブ、そとモモ）および大腰筋（ヒレ肉）重量が、より有意に重かった。牛枝肉格付け部位である胸最長筋（ロース）の筋内脂肪含有率には、試験区間に有意な差は認められなかったものの、体質制御を実施した交雑種牛枝肉中の体脂肪割合が有意に高かった。また、体質制御を実施した交雑種牛の骨格筋（僧帽筋）で剪断応力値が有意に低い値を示し、肉の柔らかさが増すことが示唆された。さらに、日本の慣行的な飼養水準により哺育、育成および肥育された交雑種牛と比較した場合、耕作放棄地での放牧肥育により飼養された交雑種牛の産肉量は低下したが、屠畜後の牛肉中イノシン酸、遊離アミノ酸および α -トコフェノール含有量が上昇した。これらのことは、耕作放棄地での放牧肥育による旨味や機能性に優れる牛肉生産の可能性を示唆した。

本研究で得られた成果は、輸入飼料に過度に依存せず、耕作放棄地の活用による持続可能な資源循環型の新しい牛肉生産システムの構築に寄与するものと期待される。

謝 辞

本研究の遂行，学会誌への論文投稿および本論文の作成からとりまとめにあたりまして，終始，懇切丁寧なご指導と心からの激励を賜った九州大学大学院農学研究院 後藤貴文准教授に心から感謝し，厚くお礼を申し上げます。本論文の作成にあたり御校閲と貴重な御示唆を賜った九州大学大学院農学研究院 服部眞彰教授，田畑正志教授ならびに古瀬充宏教授に厚くお礼を申し上げます。九州大学における研究の機会を与えて頂き，有益な助言と激励を賜った前福岡県農業総合試験場長 松江勇次博士，福岡県農林水産部畜産課長 古賀康弘氏，福岡県農業総合試験場の磯崎良寛氏，浅田研一氏および浅岡壮平氏に心から感謝申し上げます。また，本研究への着手，遂行にあたりましては，全国酪農業協同組合連合会の齋藤昭氏，福岡県農業総合試験場の先輩，同僚諸氏および九州大学農学部附属農場高原農業実験実習場の衛藤哲次氏，塩塚雄二氏，江原史雄氏，松田謙一郎氏より，終始，適切な御指導を賜りました。本研究における耕作放棄地での放牧実証試験の遂行にあたりましては，豊前市山内地域の皆様方より，多大なるご協力と援助を頂きました。ここに記して心から感謝し，厚くお礼を申し上げます。最後に，本研究遂行にあたり，心の支えとなり励ましてくれた妻と子供達に心から感謝致します。

なお，本特別研究報告の内容は，九州大学 審査学位論文(博士：農学)「Studies on Nutritional Regulation of Constitution during an Early Growth Period and Fattening by Grazing in Abandoned Farmlands in Crossbred Wagyu Cattle」を和文訳したものである。

審査学位論文(農学博士)データ

URL: http://mars.lib.kyushu-u.ac.jp/infolib/meta_pub/G0000002GAKUISYOSI_19077)

引用文献

- Abdelsamei A.H., D.G. Fox, L.O. Tedeschi, M.L. Thonney, D. J. Ketchien and J. R. Stouffer. 2005. The effect of milk intake on forage intake and growth of nursing calves. *Journal of Animal Science*. 83: 940-947.
- Adams G.R. 2002. Exercise effects on muscle insulin signaling and action, Invited review: autocrine/paracrine IGF-I and skeletal muscle adaptation. *The Journal of Applied Physiology*. 93: 1159-1167.
- Anderson K.L., T.G. Nagaraja and J.L. Morrill. 1987. Ruminant Metabolic Development in Calves Weaned Conventionally or Early. *Journal of Dairy Science*. 70: 1000-1005.
- Ashmore C.R., G. Tompkins and L. Doerr. 1972. Postnatal development of muscle fiber types in domestic animals. *Journal of Animal Science*. 34: 37-41.
- Bartlett K.S., F.K. McKeith, M.J. VandeHaar, G.E. Dahl and J.K. Drackley. 2006. Growth and body composition of dairy calves fed milk replacers containing different amounts of protein at two feeding rate. *Journal of Animal Science*. 84: 1454-1467.
- Blome R.M., J.K. Drackley, F.K. McKeith, M.F. Hutjens and G.C. McCoy. 2003. Growth, nutrient utilization, and body composition of dairy calves fed milk replacers containing different amounts of protein. *Journal of Animal Science*. 81: 1641-1655.
- Boleman S.J., R.K. Miller, M.J. Buyck, H.R. Cross and J.W. Savell. 1996. Influence of realimentation of mature cows on maturity, color, collagen solubility, and sensory characteristics. *Journal of Animal Science*. 74: 2187-2194.
- Breier B.H., J.J. Bass, J.H. Butler and P.D. Gluckman. 1986. The somatotrophic axis in young steers: Influence of nutritional status on pulsatile release of growth hormone and circulating concentrations of insulin-like growth factor 1. *The Journal of Endocrinology*. 111: 209-215.
- Broderick G.A. and J.A. Kang. 1980. Automated simultaneous determination of ammonia and total amino acids in ruminal fluid and in vitro media. *Journal of Dairy Science*. 63: 64-75.
- Brooke M.H. 1970. Some comments on neural on the two histochemical types of muscle fibers. In: *The Physiology and Biochemistry of Muscle as a Food*, vol. 2 (eds. E. J. Brisckey, R. G. Cassens and B. B. Marsh). The University of Wisconsin Press, Madison, Milwaukee, and London. pp.131-153.
- Brooke M.H. and K.K. Kaiser. 1969. Some comments on the histochemical characterization of muscle adenosine triphosphatase. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 17: 431-432.
- Brooke M.H. and K.K. Kaiser. 1970a. Muscle fiber types: how many and what kind? *Archives of Neurology*. 23: 369-379.
- Brooke M.H. and K.K. Kaiser. 1970b. Three 'myosin adenosine triphosphatase' systems: the nature of their pH lability and sulfhydryl dependence. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. 18: 670-672.

- Brown E.G., M.J. Vandehaar, K.M. Daniels, J.S. Liesman, L.T. Chapin, D.H. Keisler and M.S. Nielsen. 2005. Effect of increasing energy and protein intake on body growth and carcass composition of heifer calves. *Journal of Dairy Science*. 88: 585-594.
- Buller A.J., J.C. Eccles and R.M. Eccles. 1960a. Differentiation of fast and slow muscles in the cat hindlimb. *The Journal of Physiology*. 150: 399-416.
- Buller A.J., J.C. Eccles and R.M. Eccles. 1960b. Interactions between motoneurone and muscles in respect of the characteristics speed of their responses. *The Journal of Physiology*. 150: 417-439.
- Burke R.E., D.N. Levine, F.E.III. Zajac, P. Tsairis and W.K. Engel. 1971. Histochemical profiles of three physiologically defined types of motor units in cat gastrocnemius muscle. *Science* 174: 709-712.
- Burke R.E., D.N. Levine, P. Tsairis and F.E.III. Zajac. 1973. Physiological types and histochemical profiles in motor units of the cat gastrocnemius. *The Journal of Physiology*. 234: 723-748.
- Busch W.A., F.C. Parrish and D.E. Goll. 1967. Molecular properties of post-mortem muscle. 4. Effect of temperature on adenosine triphosphate degradation, isometric tension parameters, and shear resistance of bovine muscle. *Journal of Food Science*. 32: 390-394.
- Calkins C.R., T.R. Dutson, G.C. Smith, Z.L. Carpenter and G.W. Davis. 1981. Relationship of fiber type composition to marbling and tenderness of bovine muscle. *Journal of Food Science*. 46: 708-710.
- Charles P., J.W. Poser, L. Mosekilde and F.T. Jensen. 1985. Estimation of bone turnover evaluated by ⁴⁷Ca-kinetics efficiency of serum bone gamma-carboxyglutamic acid-containing protein, serum alkaline phosphatase, and urinary hydroxyproline excretion. *The Journal of Clinical Investigation*. 76: 2254-2258.
- Claypool D.W., M. C. Pangborn and H.P. Adams. 1980. Effect of dietary protein on high-producing dairy cows in early lactation. *Journal of Dairy Science*. 63: 833-837.
- Cohen P., D.M. Peehl, G. Lamson and R.G. Rosenfeld. 1991. "Insulin-like growth factors (IGFs), IGF receptors, and IGF-binding proteins in primary cultures of prostate epithelial". *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 73: 401-407.
- Cornet M. and J. Bousse. 1999. Free amino acid and dipeptides in porcine muscles: differences between red and white muscles. *Meat Science*. 51: 215-219.
- Day M.L., K. Imakawa, D.D. Zalesky, R.J. Kittok and J.E. Kinder. 1986. Effects of restriction of dietary energy intake during the prepubertal period on secretion of luteinizing hormone and responsiveness of the pituitary to luteinizing hormone-releasing hormone in heifers. *Journal of Animal Science*. 62: 1641-1648.
- Dörner G. and A. Plagemann. 1994. Perinatal hyperinsulinism as a possible predisposing factor for diabetes mellitus, obesity and enhanced cardiovascular risk in later life. *Hormone and Metabolic Research*. 26: 213-221.
- Ebara F., S. Inada, S. Asaoka, Y. Isozaki, A. Saito, T. Etoh, Y. Shiotsuka and T. Gotoh. 2010.

- Intensive nursing and feeding during the early growth period altered intramuscular adipogenesis in crossbred steers (Japanese Black male × Holstein female). *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 9: 982-989.
- Ferguson J.D. and W. Chalupa. 1989. Impact of protein nutrition on reproduction in dairy cow. *Journal of Dairy Science*. 72: 746-766.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2010. The State of Food Insecurity in the world, addressing food insecurity in protracted crises. Publishing Policy and Support Branch, Rome, Italy.
- Gluckman P.D., M.A. Hanson, C. Cooper and K.L. Thornburg. 2008. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England Journal of Medicine*. 359: 61-73.
- Godfrey K.M., K.A. Lillycrop, G.C. Burdge, P.D. Gluckman and M.A. Hanson. 2007. Epigenetic mechanisms and the mismatch concept of the developmental origins of healthy and disease. *Pediatric Research*. 61: 5R-10R.
- Gotoh T. 2003. Histochemical properties of skeletal muscles in Japanese cattle and their meat production ability. *Animal Science Journal*. 74: 339-354.
- Gotoh T., E. Albrecht, F. Teuscher, K. Kawabata, K. Sakashita, H. Iwamoto and J. Wegner. 2009. Differences in muscle and fat accretion in Japanese Black and European cattle. *Meat Science*. 82: 300-308.
- Gotoh T., K. Etoh, K. Saitoh, K. Metoki, S. Kaneda, T. Abe, T. Etoh, Y. Shiotsuka, R. Fujino, K. Matsuda, H. Suzuki, H. Hasebe, F. Ebara, J. Wegner and S. Tabata. 2010a. Metabolic imprinting effect in beef production: Influence of Nutrition manipulation during an early growth stage on carcass characteristics and intramuscular fat content of longissimus muscle in Wagyu (Japanese Black). The proceeding of the 3rd EAAP (European Federation of Animal Science) International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition (ISBN :978-90-8686-153-8), 6-10th September in Parma, Italy.
- Gotoh T., K. Etoh, K. Saitoh, K. Sakuma, S. Kaneda, T. Abe, T. Etoh, Y. Shiotsuka, R. Fujino, K. Matsuda, H. Suzuki, H. Hasebe, F. Ebara, S. Tabata and J. Wegner. 2010b. Metabolic imprinting effect in beef production: Effects of nutrition manipulation during an early growth stage on the meat quantity in Wagyu (Japanese Black). The proceeding of the International conference on developmental origins of health and disease “the power of programming”, 6th-8th May in Munich, Germany.
- Gotoh T., S. Imamura, H. Iwamoto and Y. Ono. 1999. Comparative study on the myofiber type composition and the fat deposit in M. longissimus thoracis between young heifer groups of Japanese Black fed freely on concentrate and roughage. Proceedings 45th International Congress of Meat Science and Technology, 1-6 August 1999, Vol, 1, pp. 278-297. Yokohama, Japan.
- Gotoh T., T. Etoh, Y. Shiotsuka, K. Hayashi and T. Fumita. 2008. A novel feeding system mainly utilized by domestic grass resources and grazing in beef cattle. *Japanese Journal of Grassland Science*. 54: 182-194 (in Japanese with English title).

- Gotoh T., T. Fumita and K. Hayashi. 2005. Reconstruction of good quality and safe beef production system by regulating the constitution and feeding grass. *Proceedings of Japanese Society for Animal Nutrition and Metabolism* 49: 33-48.
- Greenwood P.L., N.W. Tomkins, R.A. Hunter, P.G. Allingham, S. Harden and G.S. Harper. 2009. Bovine myofiber characteristics are influenced by post-weaning nutrition. *Journal of Animal Science*. 87: 3114-3123.
- Ha Y.L., J. Storkson and M.W. Pariza. 1990. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia by conjugated dienoic derivatives of linoleic acid. *Cancer Research*. 50: 1097-1101.
- Hammond M.A. 1932. Growth and the development of mutton qualities in the sheep. Oliver and Boyd, Edinburgh, Tweeddale Court London.
- Hayashi K. 2009. Studies on the cattle grazing on abandoned farmlands for conservative beef production. Ph.D. Thesis, Kyushu University.
- Hayashi K., K. Ikeda, A. Ueda, T. Fumita, T. Etoh and T. Gotoh. 2006. Short-term Response of Vegetation to Cattle Grazing in an Abandoned Orchard in Southwestern Japan. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 19: 514-520.
- Hayashi K., S. Miyakawa, T. Etoh, T. Gotoh and Y. Masuda. 2003a. The pattern of grazing behavior and blood condition of the Japanese Black Cattle in the abandoned groves. *Bulletin of Kyusyu University Farm*. 11: 36-45.
- Hayashi T., K. Hodate, N. Nakanishi, A. Abe, M. Sato, Y. Fujita and H. Yasutome. 2003b. Relation between beef carcass traits and various blood plasma constituents during fattening period. *Nihon Chikusan Gakkaiho*. 74: 537-545 (in Japanese with English summary).
- Hicks R.B., F. N. Owens, D.R. Gill, J.J. Martin and C.A. Strasia. 1990. Effects of controlled feed intake in performance and carcass characteristics of feedlot steers and heifers. *Journal of Animal Science* 68: 233-244.
- Higashiyama M., T. Kondo, T. Muramoto and S. Takahashi. 2004. Winter grazing of Japanese Shorthorn utilizing a coastal region in Iwate, Japan. *Bulletin of the National Agricultural Research Center for Tohoku Region*. 57: 123-124 (in Japanese with English summary).
- Hill S.R., K.F. Knowlton, K.M. Daniels, R.E. James, R.E. Pearson, A.V. Capuco and R.M. Akers. 2008. Effects of milk replacer composition on growth, body composition, and nutrient excretion in preweaned Holstein heifers. *Journal of Dairy Science*. 91: 3145-3155.
- Hinterberger T.J., D.A. Sassoon, S.J. Rhodes and S.F. Konieczny. 1991. Expression of the muscle regulatory factor MRF4 during somite and skeletal myofiber development. *Developmental Biology*. 147: 144-156.
- Hossner K.L., R.H. McCusker and M.V. Dodson. 1997. Insulin-like growth factors and their binding proteins in domestic animals. *Animal Science*. 64: 1-15.
- Ide Y., N. Koyama, Y. Takahashi and H. Kobayashi. 2005. Effect of cattle grazing on the rooting by wild boars in abandoned cultivated land. *Bulletin of the National Agricultural*

- Research Center for West Region*. 4: 173-181 (in Japanese with English summary).
- Ip C., M. Singh, J.J. Thompson and J.A. Scimeca. 1994. Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. *Cancer Research*. 54: 1212-1215.
- Julius B. and J.B. Cohen. 1910. Practical organic chemistry. Macmillan and Co. limited St. Martin's street, London.
- Kamiya M., M. Matsuzaki, H. Orito, Y. Kamiya, Y. Nakamura and E. Tsuneishi. 2009. Effects of feeding level of milk replacer on bodygrowth, plasma metabolite and insulin concentrations, and visceral organ growth of suckling calves. *Animal Science Journal*. 80: 662-668.
- Kasssesarn B.O., B.S. Perez, J. Murray and N.R. Jones. 1963. Nucleotide degradation in the muscle of Iced Haddock (*Gadus aeglefinus*), Lemon Sole (*Pleuronectes microcephalus*), and Plaice (*Pleuronectes platessa*). *Journal of Food Science*. 28: 28-37.
- Khan M.A. 1976. Histochemical characteristics of vertebrate striated muscle: a review. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*. 8: 1-48.
- Kido K. 2010. Ph.D. Thesis, Tohoku University (in Japanese).
- Kim C.J. and E.S. Lee. 2003. Effects of quality grade on the chemical, physical and sensory characteristic of Hanwoo (Korean native cattle) beef. *Meat Science*. 63: 397-405.
- Klont R.E., L. Brocks and G. Eikelenboom. 1998. Myofiber type and meat quality. *Meat Science*. 49: S219-S229.
- Kojima T., F. Murata and K. Sasaki. 2008. Grazing management technology of Japanese Black breeding cow in the cultivation abandonment farmland. *Bulletin of the Fukui Experiment Station of Domestic Animal Industry*. 21: 39-43 (in Japanese with English title).
- Kristensen N.B., J. Sehested, S.K. Jensen and M. Vestergaard. 2007. Effect of milk allowance on concentrate intake, ruminal environment, and ruminal development in milk-fed Holstein calves. *Journal of Dairy Science*. 90: 4346-4355.
- Lee H., R.S.A. Vega, L.T. Phung, N. Matsunaga, H. Kuwayama and H. Hidari. 2000. Changes in plasma insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF binding protein (IGFBP)-2 and IGFBP-3 during fasting in Holstein adult steers and calves. *Animal Science Journal*. 71: 178-188.
- Levin B.E. 2000. The obesity epidemic: metabolic imprinting on genetically susceptible neural circuits. *Obesity Research*. 8: 342-347.
- Lillicrop K.A., E.S. Phillips, A.A. Jackson, M.A. Hanson MA and G.C. Burdge. 2005. Dietary protein restriction of pregnant rats induces and folic acid supplementation prevents epigenetic modification of hepatic gene expression in the offspring. *Journal of Nutrition*. 135: 1382-1386.
- Lorenz K. 1970. Studies in animal and human behavior. Cambridge, MA: Harvard University press.
- Matsuzaki M., T. Sato, N. Shiba, S. Hara, E. Tsuneishi and T. Yamaguchi. 2001. Effects of restricted concentrate feeding during the early growing phase on growth performance, carcass characteristics and the somatotrophic axis in Holstein steers. *Animal Science*

Journal. 72: 483-493.

- McGuire M.A., J.L. Vicini, D.E. Bauman and J.J. Veenhuizen. 1992. Insulin-like growth factors and binding proteins in ruminants and their nutritional regulation. *Journal of Animal Science*. 70: 2901-2910.
- McMillen C., C.L. Adam and B.S. Muehlhaeusler. 2005. Early origins of obesity: programming the appetite regulatory system. *The Journal of Physiology*. 565: 9-17.
- Megeney L.A. and M.A. Rudicki. 1995. Determination versus differentiation and the MyoD family of transcription factors. *Biochemistry and Cell Biology*. 73: 723-732.
- Melton C., M. Dikeman, H.J. Tuma and R.R. Schalles. 1974. Histological relationships of muscle biopsies to bovine meat quality and carcass composition. *Journal of Animal Science*. 38: 24-31.
- Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan. 2005. Abstract of Statistics on Agriculture, Forestry and Fisheries Census. Tokyo, Japan (in Japanese).
- Mitsumoto M., S. Ozawa, T. Mitsuhashi and K. Koide. 1998. Effect of dietary vitamin E supplementation for one week before slaughter on drip, color and lipid stability during display in Japanese Black steer beef. *Meat Science*. 49: 165-174.
- Muelhaeusler B.S. 2006. Programming of the appetite-regulating neural network: a link between maternal overnutrition and the programming of obesity? *Journal of Neuroendocrinology*. 19: 67-72.
- Muramoto T., M. Higashiyama and T. Kondo. 2005. Effect of pasture finishing on beef quality of Japanese Shorthorn steers. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 18: 420-426.
- Muroya S., I. Nakajima and K. Chikuni. 2002. Sequential expression of myogenic regulatory factors in bovine skeletal muscle and the satellite cell culture. *Animal Science Journal*. 73: 375-381.
- Murphy T.A. and S.C. Loerch. 1994. Effects of restricted feeding of growing steers on performance, carcass characteristics, and composition. *Journal of Animal Science*. 72: 2497-2507.
- Murre C., P.S. McCaw and D. Baltimore. 1989. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56: 777-783.
- Myers S.E., D.B. Faulkner, F.A. Ireland, L.L. Berger and D.F. Parrett. 1999. Production systems comparing early weaning to normal weaning with or without creep feeding for beef steers. *Journal of Animal Science*. 77: 300-310.
- Nakanishi Y., K. Yanagita and K. Ogawa. 1986. Effect of underfeeding in winter season on blood constituents of nursing Japanese Black cattle in year long grazing. *Bulletin of the Experimental Farm Faculty of Agriculture, Kagoshima University*. 11: 7-17 (in Japanese with English summary).
- National Agriculture and Food Research Organization (NARO). 2008a. Japanese Feeding Standard for Beef Cattle. Japan Livestock Industry Association. Tokyo, Japan (in Japanese).

- National Agriculture and Food Research Organization (NARO). 2008b. Standard Tables of Feed Composition in Japan. Japan Livestock Industry Association. Tokyo, Japan (in Japanese).
- Nishimura T., M.R. Rhue, A. Okitani and H. Kato. 1988. Components contributing to the improvement of meat taste during storage. *Agricultural and Biological Chemistry*. 52: 2323-2330.
- Oda K. 2006. Trends in Nitrogen Flow since the 1980s in the Food and Feed System in Japan. *Journal of Science Soil and Manure, Japan*, 77: 517-524 (in Japanese with English summary).
- Okamoto C., K. Kabata, N. Hattori, T. Koutaka and M. Kikuchi. 2001. Energy Intake and Retention of Suckling Japanese Brown Calves on Pasture. *Japanese Journal of Grassland Science*. 47: 16-20 (in Japanese with English summary).
- Okamoto K., U. Ueda, R. Maeda, A. Mizutani and T. Sugiyama. 1976. Microscopic histochemistry. Vol.1. Igaku Shoin, Tokyo.
- Oshio S. and I. Tahata. 1981. Studies on the method of adaptation to grazing environment II. Influence of various feeds before grazing on the microbial populations in the rumen of calves grazed on pasture. *Bulletin of the National Grassland Research Institute*. 20: 132-144 (in Japanese with English summary).
- Oshio S., I. Tahata, H. Kobayashi and T. Ami. 1982. Studies on the method of adaptation to grazing environment III. Influence of various feeds before grazing on the some properties and movement of rumen fluid of grazing calves. *Bulletin of the National Grassland Research Institute*. 24: 71-79 (in Japanese with English summary).
- Otsuki K., S. Yamaki, Y. Watanabe and A. Ebata. 2004. Grazing application technology of Japanese Black breeding cow in the cultivation abandonment paddy field. *Bulletin of the Fukushima Animal Husbandry Experiment Station*. 12: 66-71 (in Japanese with English title).
- Ozutsumi K. and M. Okada. 1981. The effects of mountainous grazing on type and cross-sectional area of muscle fiber in Holstein steers. *The Japanese Journal of Zootechnical Science*. 52: 741-748.
- Park B.Y., S.H. Cho, Y.M. Yoo, J.H. Kim, J.M. Lee, S.K. Joung and Y.K. Kim. 2000. Effect of intramuscular fat contents on the physicochemical properties of beef *Longissimus dorsi* from Hanwoo. *Journal of Animal Science and Technology*. 42: 189-194.
- Peter J.B., R.J. Barnard, V.R. Edgerton, C.A. Gilespeie and K.E. Stempel. 1972. Metabolic profiles of three fiber types of skeletal muscle in guinea-pigs and rabbits. *Biochemistry* 11: 2627-2633.
- Pette D. and R.S. Staron. 1990. Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Reviews of Physiology, Biochemical Pharmacology*. 116: 1-76.
- Plagemann A., T. Harder, A. Rake, K. Melchior, W. Rohde and G. Doener. 1999a. Increased number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. *Brain Research*. 818: 160-163.

- Plagemann A., T. Harder, A. Rake, M. Voits, H. Fink, W. Rohde and G. Doener. 1999b. Perinatal elevation of hypothalamic insulin, acquired malformation of hypothalamic galaninergic neurons, syndrome X-like alterations in adulthood of neonatally overfed rats. *Brain Research*. 836: 146-155.
- Plagemann A., T. Harder, U. Janert, A. Rake, F. Rittel, W. Rohde and G. Doener. 1999c. Malformations of hypothalamic nuclei in hyperinsulinemic offspring of rats with gestational diabetes. *Developmental Neuroscience*. 21: 58-67.
- Plegge S.D. 1987. Restricting intake of feedlot cattle. F. N. Owens, ed. Oklahoma Agric. Exp. Sta. 121: 297-301.
- Quigley J.D., T.A. Wolfe and T.H. Elsasser. 2006. Effects of additional milk replacer feeding on calf health, growth, and selected blood metabolites in calves. *Journal of Dairy Science*. 89: 207-216.
- Rural Culture Association Japan. 2008. Nenban Nougyou Gijyutu. Chikusan: 241-254. Tokyo. Japan (in Japanese).
- Sainz R.D. and E. Hasting. 2000. Simulation of the development of adipose tissue in beef cattle. In: Modeling nutrient utilization in farm animals (eds. J. P. McNamara, J. France and D. E. Beever). CABI International, New York. pp.175-182.
- Sasaki Y., H. Hirooka and M. Tsuji. 2007. Systems analysis applied to animal husbandry. *Journal of the Japanese Agricultural Systems Society*. 20: 125-137 (in Japanese with English summary).
- Sato S. 2005. Perspectives on the grazing system in Japan. *Japanese Journal of Grassland Science*. 51: 27-31.
- Savell J.W., H.R. Cross and G.C. Smith. 1986. Percentage ether extractable fat and moisture content of beef *longissimus* muscle as related to USDA marbling score. *Journal of Animal Science*. 51: 838.
- Schoonmaker J.P., M.J. Cecava, D.B. Faulkner, F.L. Fluharty, H.N. Zerby and S.C. Loerch. 2003. Effect of source of energy and rate of growth on performance, carcass characteristics, ruminal fermentation, and serum glucose and insulin of early-weaned steers. *Journal of Animal Science*. 81: 843-855.
- Schoonmaker J.P., M.J. Cecava, F.L. Fluharty, H.N. Zerby and S.C. Loerch. 2004. Effect of source and amount of energy and rate of growth in the growing phase on performance and carcass characteristics of early- and normal-weaned steers. *Journal of Animal Science*. 82: 273-282.
- Schoonmaker J.P., S.C. Loerch, F.L. Fluharty, H.N. Zerby and T.B. Turner. 2002. Effect of age at feedlot entry on performance and carcass characteristics of bulls and steers. *Journal of Animal Science*. 80: 2247-2254.
- Schwartz H.M. and F.M.C. Gilchrist. 1975. Microbial interactions with the diet and the host animal. In: McDonald IW, Warner ACI (eds), Digestion and Metabolism in the Ruminant, 165-179. The University of New England Publishing Unit, Armidale, N. S. W, Australia

- Shiba N., M. Matsuzaki and E. Tsuneishi. 2004. Effects of pre-slaughter nutritional condition on intramuscular collagen, collagen solubility, pyridinoline cross-links and meat tenderness in aged goats. *Animal Science Journal*. 75: 319-324.
- Shibata M., K. Matsumoto, K. Aikawa, T. Muramoto, S. Fujimura and M. Kadowaki. 2006. Gene expression of myostatin during development and regeneration of skeletal muscle in Japanese Black Cattle. *Journal of Animal Science*. 84: 2983-2989.
- Sithyphone K., M. Yabe, H. Horita, K. Hayashi, F. Tomiko, Y. Shiotsuka, T. Etoh, F. Ebara, O. Samadmanivong, J. Wegner and T. Gotoh. 2010. Comparison of feeding systems: feed cost, palatability and environmental impact among hay fattened beef, consistent grass-only fed beef and conventional marbled beef in Wagyu (Japanese Black cattle). *Animal Science Journal*. 82: 352-359.
- Smith J.L., V.R. Edgerton, B. Betts and T.C. Collatos. 1977. EMG of slow and fast ankle extensors of cat during posture, locomotion, and jumping. *Journal of Neurophysiology*. 40: 503-513.
- Suzuki A. 1971a. Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers in the sheep; I. On *M. semitendinosus*, *M. longissimus dorsi*, *M. psoas major*, *M. latissimus dorsi* and *M. Gastrocnemius*. *The Japanese Journal of Zootechnical Science*. 42: 39-54.
- Suzuki A. 1971b. Histochemical classification of individual skeletal muscle fibers in sheep; II. On *M. serratus ventralis*, *M. supraspinatus*, *M. infraspinatus*, *M. semimembranosus* and *M. triceps brachii*. *The Japanese Journal of Zootechnical Science*. 42: 463-473.
- Suzuki A. 1973. Histochemical observations of individual skeletal muscle fibers in starved sheep. *The Japanese Journal of Zootechnical Science*. 44: 50-58.
- Suzuki A. 1976. The pH stability of myofibrillar adenosine triphosphatase of five fiber types in skeletal muscles of the sheep and cattle. *The Japanese Journal of Zootechnical Science*. 47: 95-103.
- Suzuki A. and H. Tamate. 1988. Distribution of myofiber type in the hip and thigh musculature of sheep. *The Anatomical Record*. 221: 494-502.
- Tanimoto Y., M. Senda and N. Koyama. 2004. Meat quality of Japanese Black multiparous cows grazed on abandoned fields and evaluation of their meat by means of consumer survey questions. *Bulletin of the National Agricultural Research Center for West Region*. 3: 1-14 (in Japanese with Japanese summary).
- Tikofsky J.N., M.E. Van Amburgh and D.A. Ross. 2001. Effect of varying carbohydrate and fat content of milk replacer on body composition of Holstein bull calves. *Journal of Animal Science*. 79: 2260-2267.
- Totland G.K. and H. Kryvi. 1991. Distribution patterns of muscle fibre types in major muscles of the bull (*Bos taurus*). *Anatomy and Embryology*. 184: 441-450.
- Tozer P.R. and A.J. Heinrichs. 2001. What affects the costs of raising replacement dairy heifers: A multiples-component analysis. *Journal of Dairy Science*. 84: 1836-1844.
- Tsuji E. 1991. Nutritional physiology and clinical nourishment of EPA DHA. 79: 644-649.
- Tsuneishi E., K. Nishimura and Y. Takimoto. 1988a Changes in fatty acid composition of depot

- fat and muscle in steers fattened by concentrate feeding after grazing. *The Japanese Journal of Zootechnical Science*. 60: 315-320 (in Japanese with English summary).
- Tsuneishi E., Y. Nakanishi, K. Hirano, A. Shoji, M. Matsuzaki and N. Shiba. 2006. The contents of functionality element and free amino acid of *Musculus Semispinalis* from grazing cattle. *The West Japan Journal of Animal Science*. 49: 103-105 (in Japanese with English summary).
- Tsuneishi E., Y. Takimoto, K. Nishimura, A. Watanabe and H. Takeda. 1988b Fatty acid composition of depot fat and muscle from grazing cattle. *The Japanese Journal of Zootechnical Science* 59: 614-618 (in Japanese with English summary).
- Ueda Y., A. Watanabe, M. Higuchi, H. Shingu, S. Kushibiki and M. Shinoda. 2007. Effects of intramuscular fat deposition on the beef traits of Japanese Black steers (Wagyu). *Animal Science Journal*. 78: 189-194.
- Vanzant E.S. and R.C. Cochran. 1994. Performance and forage utilization by beef cattle receiving increasing amounts of alfalfa hay as a supplement to low-quality, tallgrass-prairie forage. *Journal of Animal Science*. 72: 1059-1067.
- Velayudhan B.T., K.M. Daniels, D.P. Horrell, S.R. Hill, M.L. McGilliard, B.A. Corl, H. Jiang and R.M. Akers. 2008. Developmental histology, segmental expression, and nutritional regulation of somatotrophic axis genes in small intestine of preweaned dairy heifers. *Journal of Dairy Science*. 91: 3343-3352.
- Vøllestad N.K. 1987. Motor unit recruitment. In: *Medicine and Sport Science*. Vol. 26 (eds. P. Marconnet and P.V. Komi), Karger, Basel, New York. pp.128-141.
- Walmsley B., J.A. Hodgson and R.E. Burke. 1978. Forces produced by medial gastrocnemius and soleus muscles during locomotion in freely moving cats. *Journal of Neurophysiology*. 41: 1203-1216.
- Watanabe T. 1993. Metabolism profile test of Fattening Cattle. The Volume of Production Brute Medical System of Beef Cattle, 195-202. National livestock and production health instruction association, Tokyo (in Japanese).
- Waterland R.A. 2006. Epigenetic mechanisms and gastrointestinal development. *The Journal of Pediatrics*. 149: S137-S142.
- Waterland R.A. and C. Garza. 1999. Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 69: 179-197.
- Weintraub H. 1993. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell* 75: 1241-1244.
- Winters J.M. and SL-Y. Woo. 1990. Multiple Muscle Systems: Biomechanics and Movement Organization. Springer-Verlag, New York, USA.
- Wright W.E., D.A. Sassoon and V.K. Lin. 1989. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* 56: 607-617.
- Yamanaka S., E. Ueda and Y. Fujii. 2008. Multiple Effects of Zoning-by-Grazing in Reducing Agricultural Damage by Wild Boars. *Bulletin of Shiga Agricultural Research Center Experiment Station*. 47:51-60 (in Japanese with English title).

- Yambayamba E.S., M.A. Price and G.R. Foxcroft. 1996. Hormonal status, metabolic changes, and resting metabolic rate in beef heifers undergoing compensatory growth. *Journal of Animal Science*. 74: 57-69.
- Yang A., M.J. Brewster, M.C. Lanari and R.K. Tume. 2002. Effect of vitamin E supplementation on alpha-tocopherol and beta-carotene concentrations in tissues from pasture and grain-fed cattle. *Meat Science*. 60: 35-40.
- Yelich J.V., R.P. Wettemann, H.G. Dolezal, K.S. Lusby, D.K. Bishop and L.J. Spicer. 1995. Effects of growth rate on carcass composition and lipid partitioning at puberty and growth hormone, insulin-like growth factor I, insulin, and metabolites before puberty in beef heifers. *Journal of Animal Science*. 73: 2390-2405.
- Zajac F.E. and J.S. Faden. 1985. Relationship among recruitment order, axonal conduction velocity, and muscle-unit properties of type-identified motor units in cat plantaris muscle. *Journal of Neurophysiology*. 53: 1303-1322.
- Zembayashi M. 1990. Breed difference of individual muscle growth and their weight distribution in fattening steers. *The Japanese Journal of Zootechnical Science*. 61: 308-314 (in Japanese with English summary).

Studies on Nutritional Regulation of Constitution during an Early Growth Period and Fattening by Grazing in Abandoned Farmlands in Crossbred Wagyu Cattle

Summary

It is important to utilize the wild grass on abandoned farmlands as new feed resources for cattle. This utilization is important for an improved food self-sufficiency ratio, environment conservation, and a shift to resource circulation in the livestock industry. Alterations in foetal and early postnatal nutrition and endocrine statuses that may result in developmental adaptations that permanently change the structure, physiology, and metabolism in the adult lives of domestic species and humans (Levin, 2000) are observed by nutritional treatment during not only the foetal, but also the neonatal early growth period. This phenomenon is referred to as “metabolic imprinting” or “metabolic programming” and is based on medical research regarding “DOHaD.” In this study, an experiment was designed to investigate the effects of the regulation of constitution during the early growth stage and fattening by grazing on abandoned farmlands after nursing on growth performance (*i.e.*, measuring the size of the body frame and the plasma IGF-I concentration related to growth), mRNA expression of MRF genes, morphology of myofibers, and characteristics of the lean meat of carcasses. Crossbred Wagyu steers (Japanese Black male × Holstein female) were used in this study.

At first, the regulation of constitution was executed according to the following procedures. Crossbred Wagyu steers were fed high-protein milk replacer (110% TDN/DM, 29% CP/DM and 19% CF/DM, maximum DMI 1.92 kg/d (intensified nursing)) during the nursing period, and were fed high-concentrate TMR (TDN 73 – 76%, CP 17 – 19%) during the rearing period. I compared these steers (group H) with those fed only roughage (group R) and conventional grain feeds (group JS). The main findings are summarized as follows: (1) The intensified nursing improved the synthesis of IGF-I in the liver and accelerated skeletal development by maintaining high levels of plasma IGF-I and ALP concentrations, which were highly controlled by dietary CPI during the nursing period. The plasma IGF-I concentrations were maintained at high levels during the first rearing period after weaning, and high growth was observed. (2) The intensified nursing during the nursing period influenced the increases in BL, HG and TW. The differences in these body frame measurements at weaning did not change, even when the steers were fed a concentrate diet during the growth period. These results suggest that increases in the length and thickness of the body trunk were affected by feed quality during nursing and the later growth period, which would be the most important factor for producing high meat yields. (3) Intensified nursing increases myofiber length rather than thickness, according to the increase in the size of the body frame during the nursing period. The myofiber type composition and size in the LT muscle was not influenced by the nutritional condition and aging

during the nursing period. The expressions of MyoD and IGF-I receptors in the LT muscle decreased in the early stage of the nursing period without the influence of the nutritional condition. During the rearing period, the changes in the expressions of MRF4 and enlargement of type I and IIA myofibers in the LT muscle were observed. This suggests these changes control the level of differentiation from the myoblast to the myocyte during the early growth stage.

Second, the crossbred Wagyu steers processed by constitution control were fattened by grazing on abandoned farmlands with wild grass such as *Solidago altissima* L. to investigate the effects of pasturing on such lands on growth performance and myogenic regulation in skeletal muscle during the fattening stage. The nutritional condition on the abandoned farmlands was quite severe in autumn and winter. The rumen juice and blood properties in experimental steers were influenced by changes in wild grass intake, which was based on seasonal factors. The main findings are summarized as follows: (1) The growth pattern of the length, height and thickness of the body trunk suggests that energy intake from the roughage diet (of original ruminants) did not strongly affect the length or height of the body trunk, and excessive energy intake from the concentrate diet developed the width of the body trunk and expanded the bone to support the body trunk. (2) Myf5 and MRF4 expressions were activated and MyoD expression was inhibited under the high nutritional condition, and these relationships controlled myotube formation and maturation during the fattening period. In addition, when I consider the effect of constitution control, the change in BW, high growth performances, and peculiar trends of MRFs expressions acquired by constitution control were lost under the severe nutritional condition. The maintenance of rumen and nutritional conditions at constant levels during the fattening period is important, and might activate MRFs expression in crossbred Wagyu steers.

Finally, I investigated the effects of fattening on abandoned farmlands on carcass composition, myofiber type composition of LT muscle, and characteristics of lean meat of steers in which their constitution was regulated during the early growth period. There was no significant difference in carcass weight, total muscle or bone weight. However, the BF (proximal part) and PM (fillet) weights to total muscle weights in the half carcass in constitution-regulated steers (group H) were higher than those in steers fed only roughage (group R). The shear stress of TP of the constitution-regulated group was significantly lower than that of the control. In addition, when I consider the effect of pasturing on abandoned farmlands, the diameters of Types I and IIA were smaller in group H than in the conventional group (group JS). The CP composition, contents of IMP, total and sweetness categories of free amino acids, and α -tocopherol were significantly higher in groups H and R than in group JS. These results suggest that soft, healthy beef can be produced by regulation of constitution during the early growth stage and by pasturing on abandoned farmlands.

I believe that the production and marketing of beef of cattle fattened by grazing on abandoned farmlands may become possible by the establishment of a system of stable supply with an original attestation. I executed this study as one strategy for resolve problems in Japan's beef production system in the face of increased abandoned

farmlands. My aim was to construct a production system for high-quality, lean, safe beef by the combination of regulating constitution and fattening by pasturing on abandoned farmlands. Many aspects of this system remain to be examined; however, the construction of a new, sustainable beef production system based on ruminants' abilities of resource circulation in Japan is an urgent problem. I mainly investigated whether regulating constitution during the early growing phase affects the growth performance and mRNA expression of MRFs of skeletal muscle in crossbred Wagyu cattle and the practicality of fattening by pasturing on abandoned farmlands. It is thought that manipulating the constitution of animals has various influences on tissues, organs and the adipocyte differentiation factors of skeletal muscle. In future studies, I want to execute a more diversified approach by investigating the merchantability of beef of cattle fattened by grazing on abandoned farmlands.

福岡県農業総合試験場特別報告
第35号

交雑種牛における初期成長期の体質制御と
耕作放棄地を活用した放牧肥育に関する研究

発 行 平成24年 3月

福岡県農業総合試験場
〒818-8549 福岡県筑紫野市吉木 587
TEL 092-924-2971

著 書 稲 田 淳

印刷所 株式会社 星光社
〒812-0042 福岡県博多区豊1丁目5-26
TEL 092-475-7711