

冬季屋外飼育への移行時における血中免疫、抗酸化能および代謝関連成分の推移

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター 公開日: 2019-03-22 キーワード: 冬季屋外飼育, 黒毛和種繁殖雌牛, 免疫, 抗酸化能 作成者: 深澤, 充, 小松, 篤司, 東山, 由美, 佐藤, 繁 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001282

冬季屋外飼育への移行時における血中免疫、 抗酸化能および代謝関連成分の推移

深澤 充^{*1)}・小松 篤司^{*1)}・東山 由美^{*1)}・佐藤 繁^{*2)}

抄 録：黒毛和種繁殖雌牛の血中の免疫、抗酸化能および代謝に関連する成分について、寒冷下での屋内飼育から屋外飼育への移行に伴う変化を明らかにした。黒毛和種妊娠牛8頭を2群に分け、屋内および屋外飼育の2期の反転試験を行った。試験開始日（0日目）、1、4、8、11日目に採血を行い、血中の免疫関連成分（血漿中イムノグロブリンG、白血球数、好中球／リンパ球比率（N/L比）、好中球貪食能）、抗酸化能関連成分（酸化度、抗酸化力）および代謝関連成分（血漿中グルコース、総コレステロール、遊離脂肪酸、総蛋白質、コルチゾル）を測定した。平均気温は屋外では屋内に比べて4-8℃低かった。免疫関連成分は、いずれの成分でも飼育方法間に有意な差は認められなかった。抗酸化能関連成分は、酸化度は飼育方法間で有意な差はなかった。一方、抗酸化力は屋外で有意に高かった。抗酸化力が上昇した理由として運動の影響が考えられた。代謝関連成分は、グルコース、遊離脂肪酸、コルチゾルが屋外飼育で高く、代謝が亢進していたと考えられた。

キーワード：冬季屋外飼育、黒毛和種繁殖雌牛、免疫、抗酸化能

Changes in Immunity-, Antioxidative Potential- and Metabolism-Related Blood Composition with the Transition to an Outdoor Rearing System during the Winter Season : Michiru FUKASAWA^{*1)}, Tokushi KOMATSU^{*1)}, Yumi HIGASHIYAMA^{*1)} and Shigeru SATO^{*2)}

Abstract : We investigated changes in the blood composition of Japanese Black cows associated with the transition to an outdoor rearing system during the winter season. Eight pregnant Japanese Black cows were divided into 2 groups. We compared blood compositions during indoor and outdoor rearing using a 2-term reversal test design. We collected blood sample at 0, 1, 4, 8, and 11 days after the test started. Immunoglobulin G, white blood cell counts, neutrophil phagocytosis, and the ratio of neutrophils to lymphocytes were measured as immunity-related factors; degree of oxidation and antioxidative ability were measured as antioxidative potential factors; and glucose, cholesterol, non-esterified fatty acids, total protein, and cortisol were measured as metabolism-related factors. Outdoor temperatures during the period of the test were approximately 4-8 degrees centigrade lower than those indoors. There were no significant differences between indoor- and outdoor-reared cows with respect to any of the immunity-related blood factors. The antioxidative ability of outdoor-reared cows was significantly higher than that of indoor-reared cows. In contrast, the degree of oxidation showed no significant difference between indoor and outdoor rearing. The higher antioxidative ability under outdoor conditions could be attributable to an increase in activity. Glucose, non-esterified fatty acids, and cortisol were all higher under outdoor conditions. These results indicate that cows reared under outdoor conditions have an enhanced energy metabolism to cope with the lower temperature environment.

Key Words : Outdoors, Winter, Japanese Black Cows, Immunity, Antioxidative Potential

*1) 農研機構東北農業研究センター (NARO Tohoku Agricultural Research Center, Morioka, Iwate 020-0198, Japan)

*2) 岩手大学農学部 (Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka, Iwate 020-8550, Japan)

2014年11月25日受付、2015年1月26日受理

I 緒 言

飼養戸数の減少にともない1戸あたりの黒毛和種繁殖雌牛の飼養頭数は全国的に増加している。東北地方においても、1戸あたりの飼養頭数は2003年から2013年の間に8.5頭から14.4頭と約6頭増加している(農林水産省 2013)。しかし、1戸あたりの飼養頭数は他の地域よりも少なく、規模拡大の余地があると考えられる。

東北地方における黒毛和種繁殖雌牛飼育農家での飼養頭数増加を制限する要因の一つとして、冬期間の牛舎利用が挙げられる。春から秋にかけては公共牧場などへの放牧が行われるものの、寒冷な積雪地域では冬季にはすべての牛を牛舎に収容する機会が多く、その収容頭数が飼養頭数の制限要因となっている。九州などの温暖な地域では、周年放牧の利用によって増頭を実現している経営事例が報告されている(九州地域飼料増産推進協議会 2004)。それらの経営では、周年放牧により牛舎での飼育を子牛や分娩前後の母牛のみにするこことで、牛舎建設コストの削減や糞尿処理などの作業の省力化を可能にしている。

これまで東北地方の寒冷積雪地帯においても、冬季の屋外飼育による肥育牛や子牛の発育の検討がされている(西村ら 1981、常石ら 1985、常石ら 1986、豊田ら 1986)。しかし、冬季に黒毛和種雌牛を屋外飼育している農家の数は多くない。農家が冬季に屋外飼育をしない理由として、出生した子牛の低成長や母牛の発情回帰の遅れなどの生産への悪影響に加えて、健康など牛の福祉状態についての懸念を挙げている。竹田(2007)は、飼育動物の福祉状態については、「5つの自由」の観点からの検討が必要であるとしている。家畜福祉の基本原則である5つの自由とは、「飢えと渇きからの自由」「不快環境からの自由」「痛み、怪我、病気からの自由」「正常行動を発現する自由」および「恐怖、苦悩からの自由」である。

そこで本研究では、5つの自由の一つである「痛み、怪我、病気からの自由」に関連すると考えられる、黒毛和種繁殖雌牛の血中の免疫、抗酸化能および代謝に関連する成分について、寒冷下での屋内飼育から屋外飼育への移行に伴う変化を明らかにした。

II 材料と方法

1. 供試家畜および飼養環境

試験は農研機構東北農業研究センター内にある試験牛舎および建物に隣接するパドック(24.5m×10.5m)で行った。供試牛の詳細を表1に示す。妊娠した黒毛和種雌牛8頭を体重と年齢が同程度の2群(AおよびB群)に分け、屋内および屋外飼育の2期の反転試験を行った。

表1 供試牛の体重(kg)、月齢、授精後日数

群	頭数	試験開始時平均			飼育方法	
		体重	月齢	授精後日数	1期	2期
A	4	494	71.2	94	屋外	屋内
B	4	508	66.1	64	屋内	屋外

試験期間中は飼育方法に関わらず配合飼料を体重の2%量給与し、グラスサイレージを飽食とした。給餌は8:30と16:00に行った。屋内飼育時には給餌と同時に除糞を行い、8:30の除糞後にバークリナーを稼働して糞尿を屋外へ搬出した。コンクリート製の牛床(1.3m×1.7m)にゴムマットを設置し、その上におがくずを散布した。牛舎の南北壁にある窓は終日閉めきり、東西壁にある出入り口は、日中開放した(8:00-16:30)。牛舎内に暖房設備は無かった。屋外飼育を行ったパドックは床面がアスファルトで、期間中除糞および除雪は行わなかった。また屋外の給餌場には雨雪除けの屋根が設置されていた。

ロガー付き温湿度計(HOBO-U12-012、Onset、Massachusetts、アメリカ)を用いて、調査時の牛舎内およびパドックの気温および湿度を10分間隔で測定・記録した。測定機器は屋内ではチェーンストールの前方の空き牛房(高さ約2.0m)に設置した。屋外では雨雪除けの屋根の庇下のパイプ(高さ約2.0m)に設置した。いずれも風通しが良く、直射日光の当たらない場所であった。屋内のアンモニア濃度の測定は、除糞前に屋内で飼育する牛の前方0.7m、高さ約1.2mの位置で、ガス採取器(AP20、光明理化学工業(株)、神奈川)および検知管(105SD、光明理化学工業(株)、神奈川)を用いて行った。屋外パドックでは任意の4地点において、高さ約1.2mの位置で同様にアンモニア濃度を測定

した。積雪量および風速については東北農業研究センター内の気象観測施設の記録を用いた。

2. 試験のスケジュール

10日間以上の予備期間と屋内および屋外飼育の11日間の試験期間を1つの期とした。予備期間には屋内で8頭一列のコンフォースタイル牛床に繋留飼育した。試験期間中は、屋内飼育では採血などの作業をしやすいように、左右のストールに牛を配置しない状態で繋留した（牛間の間隔は約2m）。一方屋外飼育では牛をパドックに24時間放飼した。1期目の試験期間は2013年1月7日から1月18日、2期目の試験期間は同年1月28日から2月8日であった。

採血は試験開始日（0日目）、1、4、8、11日目に行った。採血はそれぞれの日の午前10時に実施した。速やかな保定後に熟練者がシリンジ（30ml、テルモ、東京）と採血針（18G1/2、テルモ、東京）を用いて、頸静脈から手早く10–25ml採血した。血液は測定項目にあわせ、それぞれヘパリンもしくはEDTA-2Na入りの真空採血管に分注し、氷冷または常温保存した。採取した血液の一部は採取後2時間以内に遠心分離をして血漿を得た。血漿は測定まで-40℃で凍結保存した。

3. 測定

血中の免疫関連成分、抗酸化能関連成分および代謝関連成分については、以下の通り測定を行った。

1) 免疫関連成分

血漿中イムノグロブリンG (IgG) はヘパリン加血漿を用いて、ウシIgGプレート（メタボリックエコシステム研究所、大崎市、宮城）により測定した。白血球数はEDTA-2Na加全血を用いて、採取後24時間以内に自動血球計測装置（pocH-100iV DIFF, シスメックス、兵庫）により測定した。好中球貪食能はヘパリン加全血を用いて、採取後24時間以内に市販のキット（Fluoresbrite YG Carboxylate Microspheres 2.00μm, Polysciences, Inc., Pennsylvania, アメリカ）を用い、貪食陽性率をFACSCalibur (Becton Dickinson, New Jersey, アメリカ) により測定した。好中球/リンパ球比率 (N/L比) はEDTA-2Na加血を用いて血液塗抹標本を作成し、ギムザ染色後、検鏡してリンパ球と好中球（分節核球と桿状核球）の比率を求めた。

作業の都合のため、白血球数については、0、1、4、11日目に、好中球貪食能については、0、1、11日目に測定を行った。

2) 抗酸化能関連成分

血液の酸化度と抗酸化力の測定はフリーラジカル評価装置（F.R.E.E. : Free Radical Elective Evaluator、ウイスマー、東京）を使用した。測定にはヘパリン加血漿を用いた。酸化度測定はDiacron-reactive oxygen metabolites（以下、d-ROMs）によった（Cornelli *et al.* 2001）。本テストは生体における活性酸素の代謝産物であるヒドロペルオキシド濃度をクロモゲンによる呈色反応で計測する。血中ヒドロペルオキシド量（過酸化された脂質、蛋白質、アミノ酸、核酸など）=生体内活性酸素・フリーラジカル量であるため、生体内の酸化ストレス度を総合的に評価する値である。抗酸化力の測定はOXY吸着テストによった（Vassalle *et al.* 2004）。次亜塩素酸は生体内の白血球が異物を攻撃する際に産生する最も強力な活性酸素の一種であり、総抗酸化バリア測定値（以下、OXY-adsorbent）は次亜塩素酸を消去する能力を測定する。OXY-adsorbentは有機液体の抗酸化力を総合的に示した値である。

3) 代謝関連成分

ヘパリン加血漿を用いて、グルコース（GLU）、総コレステロール（TC）、遊離脂肪酸（NEFA）、総蛋白質（TP）について自動分析装置（7070、（株）日立製作所、東京）を用いて、市販試薬（テストワコー、和光純薬、大阪）を使用し、常法により測定した。また、ヘパリン加血漿を用いて血漿中コルチゾル濃度（COLT）をEIA法（クオルタス、カインス、東京）により測定した。

4. 統計解析

血中の免疫関連成分、抗酸化能関連成分および代謝成分について、飼育方式の比較をSASのMIXEDプロシージャを用いた混合モデルの分散分析により行った（SAS Institute 2008）。分析モデルには、変量効果として群内の個体の効果を加え、母数効果として試験期、試験日、飼育方式および群を加えた。交互作用については予備分析でいずれの効果にも有意差が認められなかったためモデルから除外した。有意な効果については、Tukey法によって水準間の比較を行った。

Ⅲ 結 果

1. 環境

試験期間中の気象環境を表2に示した。試験期間

表2 試験期間中の気温、湿度、風速、日照時間、日射量および積雪深

飼育方式	試験期 採取日	1					期間 平均	2				
		1	4	8	11	1		4	8	11	期間 平均	
屋内	平均気温 (°C)	4.1	2.2	3.9	2.7	3.2	5.1	5.8	4.8	4.0	4.9	
	最高気温 (°C)	6.2	3.5	5.3	5.7	5.2	6.3	6.7	6.7	5.3	6.2	
	最低気温 (°C)	1.9	0.8	2.3	-0.8	1.0	3.0	3.1	3.3	2.3	2.9	
屋外	平均気温 (°C)	-5.0	-5.1	-2.7	-6.1	-4.7	0.2	-1.6	-0.4	-1.5	-0.8	
	最高気温 (°C)	2.6	0.4	1.6	4.6	2.3	9.6	9.9	3.9	1.6	6.2	
	最低気温 (°C)	-10.1	-10.4	-6.3	-13.3	-10.0	-5.5	-9.2	-4.6	-5.2	-6.1	
	平均湿度 (%)	73.7	66.2	81.3	78.3	74.9	70.3	83.9	78.2	94.1	81.6	
	平均風速 (m/s)	1.9	2.5	3.9	1.6	2.5	1.8	1.3	3.8	3.9	2.7	
	日照時間 (h)	4.9	7.8	2.0	6.3	5.3	5.5	4.7	4.3	0.3	3.7	
	日射量 (MJ/m ²)	8.8	10.8	3.4	11.0	8.5	10.7	8.9	9.2	3.6	8.1	
	10:00時点の積雪深 (cm)	18	20	24	23	21.3	37	34	32	45	37.0	

中の屋外飼育の気温は1期で-4.7°C、2期で-0.8°Cであり、屋内飼育の気温は1期で3.2°C、2期で4.9°Cであった。両方式の間には調査日の平均気温で4.9度から9.0度の差があり、期間平均で1期に7.9°Cおよび2期に5.7°Cの気温差があった。1期と2期では、屋外の平均、最高および最低気温は1期の方が4°C程度低かった。一方、屋内の平均気温は1期で1°C程度低かったが、最高および最低気温はほぼ同じだった。屋外で相対湿度は70.3-94.1%と日間差が大きかった。平均風速は1期で2.5m/s、2期で2.7m/sであり、比較的風いだ状態だった。日照時間および日射量は日間差が大きかったが、平均では両期に大きな差は無かった。積雪深は2期において1期よりも10cmほど深くなった。空気中のアンモニア濃度は、屋内飼育では平均1.85ppmであり、屋外飼育では検出されなかった。

2. 免疫関連成分

各飼育方式における血漿中IgG、白血球数、好中球貪食能、N/L比の試験期間中の推移を図1に示した。血漿中IgG (図1-1) は飼育方式間に有意な差は認められず、期間中15.1から18.2mg/mlの間で推移した。試験期の効果に有意性が認められ、1期は2期に比べて有意にIgG濃度が低かった (1期: 15.4mg/ml、2期: 17.4 mg/ml)。白血球数 (図1-2) は飼育方式間に有意な差は認められず、期間中9000から10175個/mlの間で推移した。好中球貪食能 (図1-3) は飼育方式間に有意な差は認められず、44.3から45.5%の間で推移した。N/L比 (図1-4) は飼育方式間に有意な差は認められなかったが、試験

期および採取日の効果に有意性が認められた。試験期については、1期は2期に比べて有意に高かった (1期: 0.77、2期: 0.45)。

3. 抗酸化能関連成分

各飼育方式におけるd-ROMsおよびOXY-adsorbentの試験期間中の推移を図2に示した。d-ROMs (図2-1) は、飼育方式間に有意な差は認められなかったが、採取日に有意な効果が認められた。OXY-adsorbent (図2-2) は、屋外飼育において、屋内飼育よりも有意に高かった (屋外飼育: 210.0 μ mol、屋内飼育198.2 μ mol)。また、試験期および採取日についても有意な効果が認められた。試験期については、2期において、1期よりも有意に高かった (1期: 143.2 μ mol、2期: 265.0 μ mol)。

4. 代謝関連成分

各飼育方式におけるGLU、TC、NEFA、TPおよびCOLTの試験期間中の推移を図3に示した。GLU (図3-1) は、飼育方式間に有意差が認められ、屋外飼育は屋内飼育に比べ高かった (屋外飼育: 63.8 mg/dL、屋内飼育: 60.8 mg/dL)。また、試験期に有意な効果が認められ、2期において、1期よりも有意に低かった (1期: 64.1mg/dL、2期: 60.5mg/dL)。TC (図3-2) は、飼育方式間では差が認められなかったが、群、試験期および採取日に有意な効果が認められた。試験期については、2期において、1期よりも有意に高かった (1期: 83.5 mg/dL、2期: 90.0 mg/dL)。NEFA (図3-3) は飼育方式間に有意な差が認められ、屋外飼育は屋内飼育に比べて有意に高かった (屋外: 127.8 μ

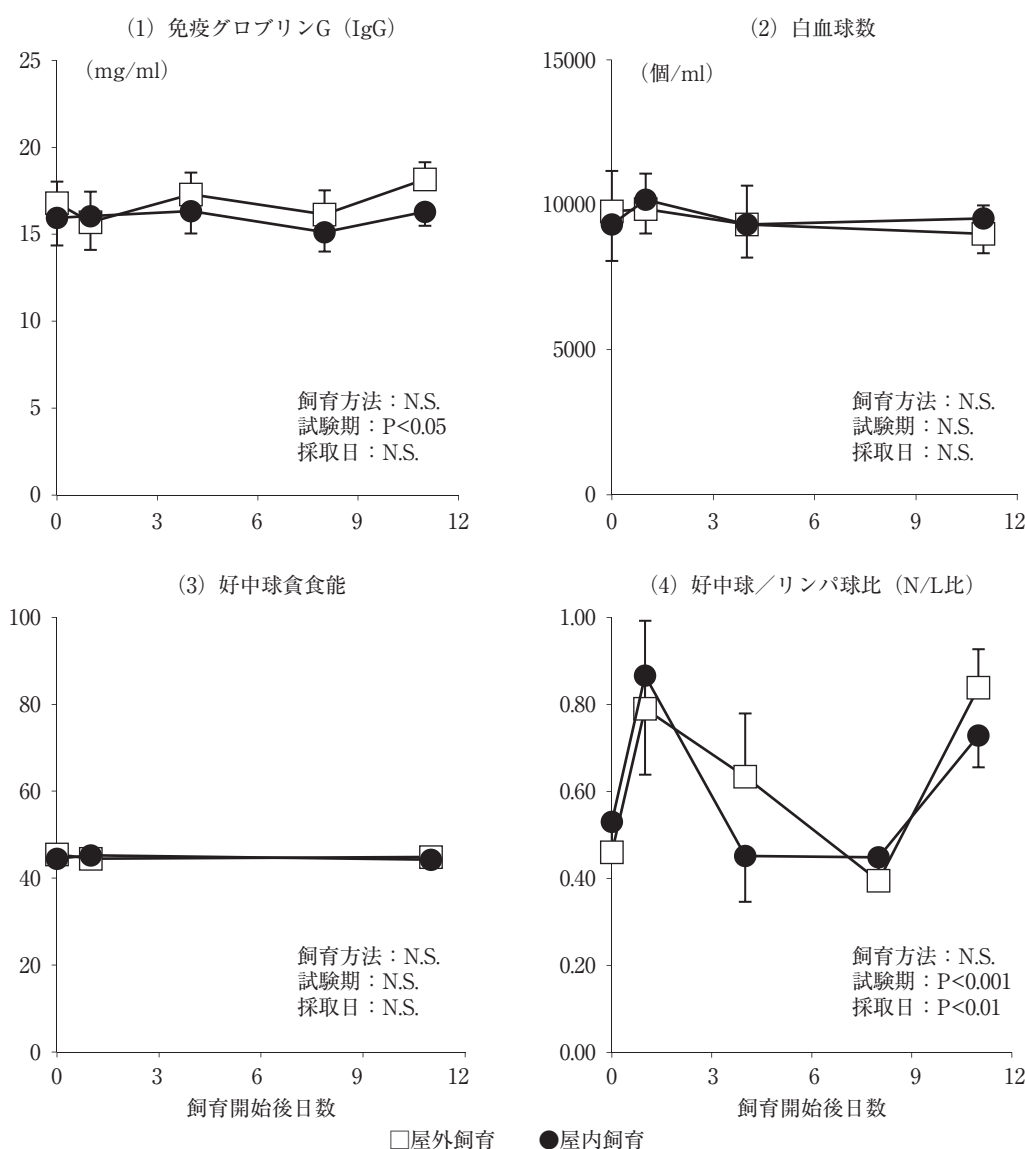


図1 試験期間中の屋内飼育および屋外飼育における血中免疫関連成分の推移 (誤差線は標準誤差を示す)

Eq/L、屋内：74.5 μ Eq/L)。TP (図3-4) は、飼育方式間には有意な差は認められなかった。試験期および採取日に有意な効果が認められた。試験期については、2期において1期よりも高かった (1期：8.02mg/dL、2期：8.16mg/dL)。COLT (図3-5) は、飼育方式間に有意な差が認められた。屋外飼育は屋内飼育よりも有意に高かった (屋外：1.10 μ g/ml、屋内：0.83 μ g/ml)。試験期および採取日にも有意な効果が認められた。試験期については、2期において1期よりも有意に低かった (1期：1.08 μ g/ml、屋内：0.85 μ g/ml)。

IV 考 察

一般的に成牛は寒さに強いと言われる (Van laer *et al.* 2014)。環境温度は生存のための体温調節に重要であり、著しい低温もしくは高温になると動物は疲弊、死亡する。黒毛和種雌牛では、最小限の代謝量で体温を維持できる熱的中性圏は5 - 30℃とされている (農林水産省農林水産技術会議事務局 2000)。本試験期間中は、平均気温は屋内、屋外ともに5℃以下であり、どちらの飼育方式においても体温維持のために代謝を亢進させる必要がある状態だった。しかし、屋内と屋外の間には大きな気温差

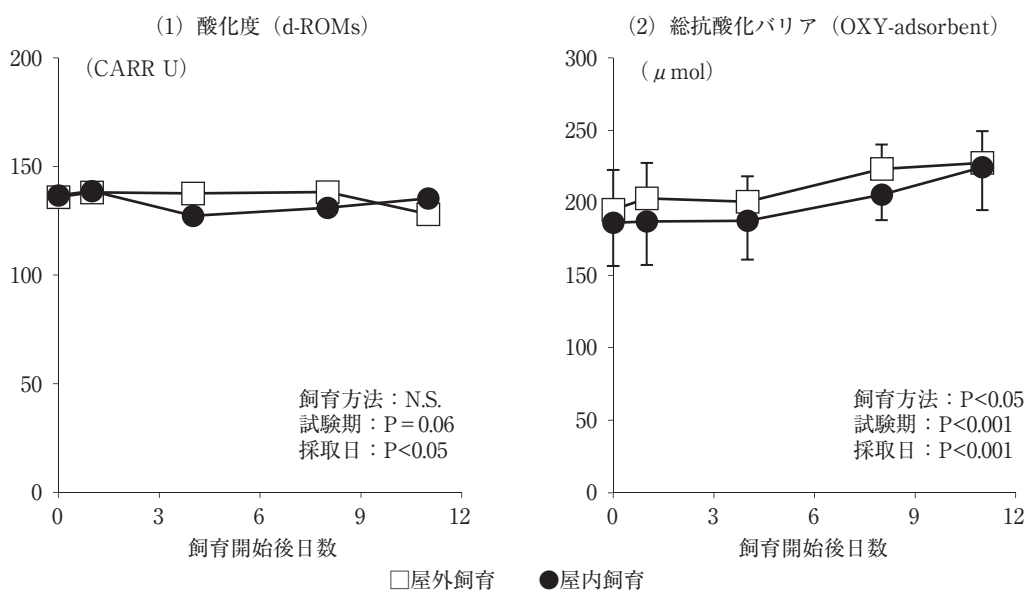


図2 試験期間中の屋内飼育および屋外飼育における血中抗酸化関連成分の推移
(誤差線は標準誤差を示す)

があり、調査日の平均気温で4.9度から9.0度の差があった。また、1期は2期よりも気温が低かった。そのため、いくつかの測定項目について飼育方式や試験期に有意な差が認められたものと考えられた。気温以外の気象項目については極端な悪条件ではなく、測定項目への影響は小さい、もしくは無かったものと考えられた。アンモニアは有害な物質で高い濃度で目や喉に炎症を起こすため、その濃度は多くの国で25ppm以下にすることを義務付けられている (Groot Koerkamp *et al.* 1998)。本研究での畜舎内の濃度はそれを大きく下回り、影響は無かったと考えられた。

本研究では、馴致することなく一年のうちでも最も寒さが厳しくなる時期に屋外方式に移行したものの、短期的なIgGや白血球の動態への影響は認められなかった。これは飼料が変化しなかったこと、平均気温が屋内でも熱的中性圏以下であったことなど、環境の変化の程度が比較的小さかったことも影響していると考えられる。ただし、仮屋ら (2003) は、放牧時には飼養環境が急変するため、気象環境や飼料にあらかじめ馴致を行うことで呼吸器病や消化器病による損耗が少なくなることを明らかにしている。そのため、一般農家での実施の際には、寒さが厳しくない時期から屋外飼育を始めることや、あらかじめ群飼育をするなどの馴致を行うことが望ま

しい。

試験期間中、屋外飼育では屋内飼育に比べて有意に高いCOLTを示した。COLTは環境変化などの刺激に対する視床下部-下垂体-副腎系の反応の指標とされるホルモンであり、糖新生や脂肪分解を亢進させる (津田 1994)。本研究においても、エネルギー代謝に関連するGLUおよびNEFAは屋外飼育で屋外飼育に比べて有意に高くなった。このことから、屋外の寒冷環境下において牛は体温を維持するために代謝を亢進していたものと考えられた。しかし、GLU、NEFAについては屋外飼育の牛について黒毛和種雌牛の乾乳期における血清成分の標準値 ± 2 SDの範囲内であり、正常な反応の範囲内での変動であると言える (岡田 1999)。また、0日目には屋内外ともに高いGLU、NEFAおよびCOLTを示したが、一度にまとめて全頭を取り扱うことに加え、処理開始初日で行動測定のための機器の装着などの作業が立て込んでいたことが供試牛にとってストレスとなり、どちらの飼育方式においても代謝が亢進したためではないかと推察される。

抗酸化能関連物質については、d-ROMsは飼育方式で違いが認められなかった。一方、体内の抗酸化力を示すOXY-adsorbentは屋外飼育によって高くなった。Piccione *et al.* (2011a) は、ヒツジは毛刈り作業によって酸化度 (d-ROMs) と抗酸化力

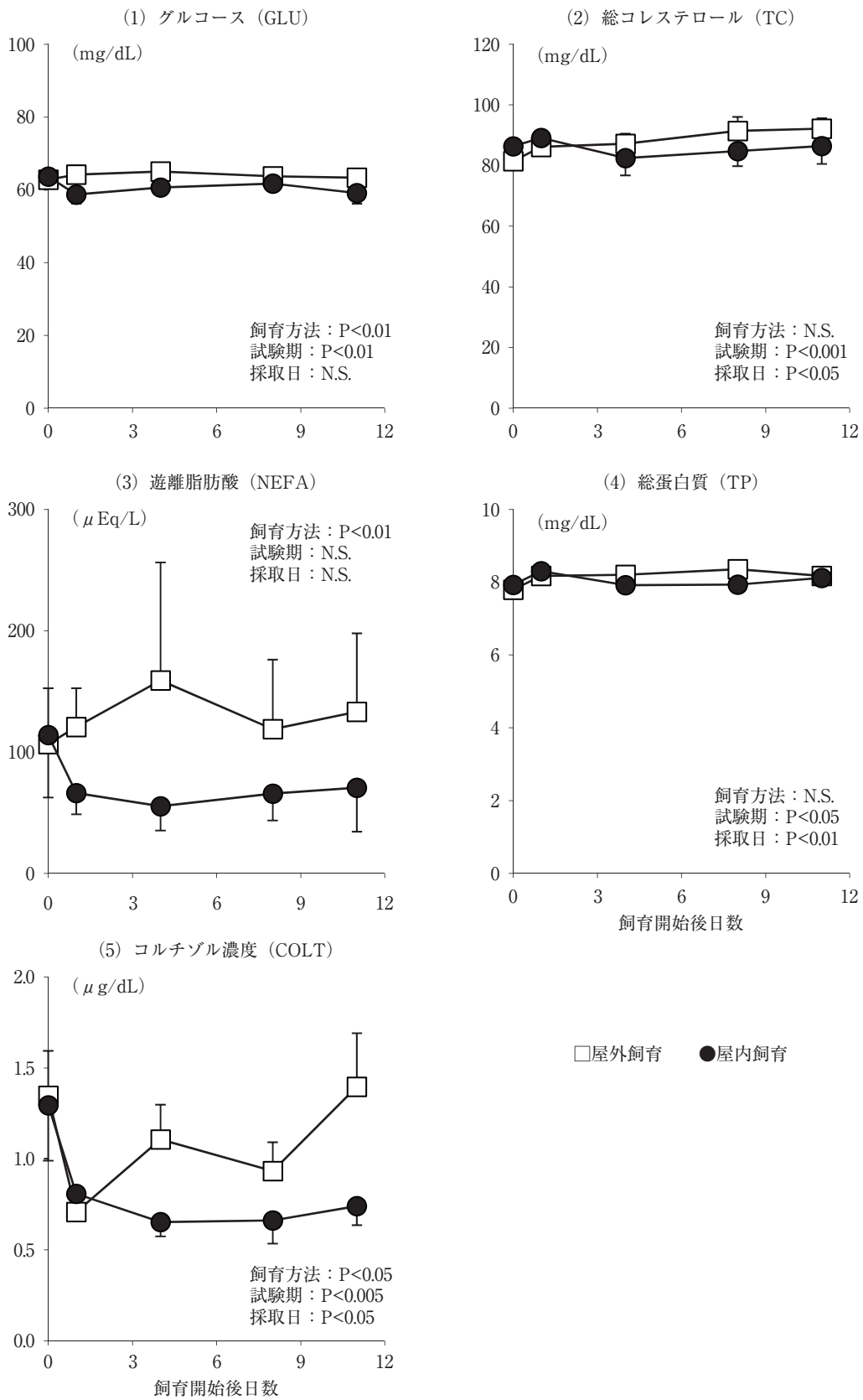


図3 試験期間中の屋内飼育および屋外飼育における血中代謝関連成分の推移 (誤差線は標準誤差を示す)

(OXY-adsorbent) の両方が上昇することを報告している。その際の抗酸化力の上昇については、酸化度の上昇に対する代償的な反応であるとしている。本研究では寒冷な屋外での飼育への移行によって抗酸化力のみが上昇した。サラブレッド種においては、継続的な運動によってd-ROMsの上昇を伴わずに、OXY-adsorbentの上昇が見られる (Piccione *et al.* 2011b)。本研究では屋内飼育時には繋留によって動きが制限されており、OXY-adsorbentの上昇は放飼状態への移行により運動量が増加した可能性が考えられる。しかし、運動強度との関係や他の要因による影響については不明である。また、本実験で確認された程度の屋内外のOXY-adsorbentの差が牛に与える影響は不明であり、今後さらなる検討が必要である。

COLTと同様にN/L比やd-ROMsはストレスの指標として用いられる。N/L比は輸送や離乳などの飼育ストレスによって変化する (Stockman *et al.* 2011, O'Loughlin A *et al.* 2011)。またd-ROMsやOXY-adsorbentも毛刈り作業によって変化的ことが明らかにされている (Piccione *et al.* 2011a)。本試験ではN/L比とd-ROMsについては、飼育方式間では差が認められなかった。本試験における寒冷刺激は、COLTの上昇を通じてGLUやNEFAの上昇を引き起こした。しかし、GLUやNEFAの上昇は正常な範囲内での反応であり、他のストレス指標であるN/L比や酸化度の影響を与えるような強度のストレスでは無かったことが考えられる。

以上の結果から、屋外の平均気温が -5°C の寒冷環境下で、屋内外の温度差が 5°C 程度の場合、屋外飼育では屋内飼育に比べてCOLTが上昇し代謝が亢進している状態ではあるものの、GLUやNEFAは正常値の範囲内であり、IgGや白血球の動態などには影響が認められなかった。屋外飼育によって、血中のOXY-adsorbentが上昇したが、この点については、変動を与える要因や牛体に与える影響について更なる精査が必要である。今後は屋外飼育による中・長期的な疾病・怪我の発生や生産への影響についての検討に加えて、喜びやリラックスなどの正の情動の評価も必要であると考えられる (竹田 2007)。

引用文献

- 1) Cornelli, U.; Terranova, R.; Luca, S.; Cornelli, M.; Alberti, A. 2001. Bioavailability and antioxidant activity of some food supplements in men and women using the D-Roms test as a marker of oxidative stress. *J. Nutr.* 131: 3208-3211.
- 2) Groot Koerkamp, P. W. G.; Metz, J. H. M.; Uenk, G. H.; Phillips, V. R.; Holden, M. R.; Sneath, R. W.; Short, J. L.; White, R. P. P.; Hartung, J.; Seedorf, J.; Schröder, M.; Linkert, K. H.; Pedersen, S.; Takai, H.; Johnsen, J. O.; Wathes, C. M. 1998. Concentrations and Emissions of Ammonia in Livestock Buildings in Northern Europe. *J. Agric. Eng. Res.* 70 : 79-95.
- 3) 仮屋喜弘, 石崎 宏, 花房泰子. 2003. 放牧馴致と呼吸器病などの疾病や日増体量との関係. 畜産草地研究所成果情報 3 : 109-110.
- 4) 九州地域飼料増産推進協議会. 2004. 九州地域における放牧事例集. 熊本, 103p.
- 5) 西村宏一, 常石英作, 吉田正三郎, 竹下 潔, 西田 朗, 佐藤 博. 1981. 屋外飼養が肥育牛の成長及び枝肉正常に及ぼす影響. 東北農業研究 29 : 141-142.
- 6) 農林水産省. 2013. 畜産統計調査. <http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tikusan/index.html> (最終閲覧日 : 2013年10月25日)
- 7) 農林水産省農林水産技術会議事務局編. 2000. 日本飼養標準肉用牛. 農林水産省農林水産技術会議事務局. 221p.
- 8) 岡田啓司. 1999. 第5章代謝プロファイルテスト. 生産獣医療システム肉牛編 (全国家畜畜産物衛生指導協会企画). 農山漁村文化協会. 東京. p.181-194.
- 9) O'Loughlin, A.; McGee, M.; Waters, S. M.; Doyle, S.; Earley, B. 2011. Examination of the bovine leukocyte environment using immunogenetic biomarkers to assess immunocompetence following exposure to weaning stress. *BMC Vet. Res.* 7 : 45-57.
- 10) Piccione, G.; Fazio, F.; Casella, S.; Pennisi, P.; Caola, G. 2011a. Influence of shearing on oxidative stress and some physiological parameters in ewes. *Anim. Sci. J.* 82 : 481-485.

- 11) Piccione, G.; Giannetto, C.; Marafioti, S.; Faggio, C.; Alberghina, D.; Fazio, F. 2011b. Training-induced modifications of circadian rhythmicity of peroxidative parameters in horses. *Anim. Physiol. Anim. Nutr.* 96 : 978-984.
- 12) SAS Institute. 2008. SAS/STAT 9.2 User's Guide. NC, USA. 7861p.
- 13) Stockman, C. A.; Collins, T.; Barnes, A. L.; Miller, D.; Wickham, S. L.; Beatty, D. T.; Blache, D.; Wemelsfelder, F.; Fleming, P. A. 2011. Qualitative behavioural assessment and quantitative physiological measurement of cattle naïve and habituated to road transport. *Anim. Prod. Sci.* 51 : 240-249.
- 14) 竹田謙一. 2007. 畜産における環境エンリッチメントの活用によるアニマル・ウェルフェアの向上. *北信越畜産学会報* 94 : 1-15.
- 15) 豊田吉隆, 吉川恵郷, 山田和明. 1986. 冬期飼養管理法の差が子牛の発育に及ぼす影響. *東北農業研究* 39 : 201-202.
- 16) 津田恒之. 1994. *家畜生理学*. 養賢堂. 310p.
- 17) 常石英作, 佐藤 博, 滝本勇治, 西村宏一, 武田尚人. 1985. 寒冷期における哺乳子牛の育成に伴う血液性状の変化. *東北農業研究* 37 : 203-204.
- 18) 常石英作, 滝本勇治, 武田尚人, 西村宏一. 1986. 寒冷期におけるホルスタイン種哺乳子牛の血しょう成分. *東北農業研究* 39 : 193-194.
- 19) Van laer, E.; Moons, C.P.H.; Sonck, B.; Tuytens, F.A.M. 2014. Importance of outdoor shelter for cattle in temperate climates. *Livest. Sci.* 159 : 87-101.
- 20) Vassalle, C.; Masini, S.; Carpeggiani, C.; L'Abbate, A.; Boni, C.; Zucchelli, G. 2004. In vivo total antioxidant capacity: comparison of two different analytical methods. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42 : 84-89.