

【原 著】 産業動物

鉄剤投与がホルスタイン種雌子牛の
血中IGF-1濃度に及ぼす影響山手 智行^{1)*} 小松 勝一¹⁾ 大西 光徳¹⁾

1) みなみ北海道農業共済組合 いぶり支所 東部家畜診療センター

*現所属：みなみ北海道農業共済組合 道南支所 北部家畜診療センター

要 約

哺乳期子牛は筋肉や骨の発育が盛んな時期であり、この時期の成長に重要な役割を果たすインスリン様成長因子-1 (IGF-1) は、成長の指標となり得る。近年、実験動物において血清鉄 (Fe) 濃度と IGF-1 濃度の相互作用の重要性が報告されている。そこで本研究は、7 日齢子牛における鉄剤投与が離乳時の IGF-1 濃度に及ぼす影響を調査した。Fe 濃度と血中 IGF-1 濃度は 7 日齢および離乳時ともに正の相関関係がみられた。7 日齢における鉄欠乏子牛に鉄剤を投与すると離乳時の Fe 濃度は対照群と同等まで上昇したが血中 IGF-1 濃度は上昇せず、さらに鉄剤を投与しても 1 日増体量 (DG) および離乳日齢は改善しないことが確認された。結論として、7 日齢における Fe のモニタリングで鉄欠乏を呈している子牛には、鉄剤投与を行うことが離乳時の IGF-1 産生能の改善、DG の向上および離乳日数の短縮に有効であると考えられた。

キーワード：子牛、血清鉄 (Fe)、インスリン様成長因子-1 (IGF-1)、1 日増体量 (DG)、離乳日齢

-----北獣会誌 64, 317~322 (2020)

鉄は地球上で 4 番目に多い元素で 2 番目に豊富な金属であり^[1]、乳酸菌を除くすべての生物は、その代謝に鉄を必要とすると考えられている^[2]。あらゆる生物が鉄に依存する理由は、土壌および水域すべてに存在するその豊富さと、鉄が可逆的に酸化される容易さに関係している可能性がある。周知の通り、子牛にとっても鉄は重要な微量ミネラルであり、成長および発達を支えるために必要である^[3]。しかし、鉄の吸収量は生後 1 カ月齢子牛に必要な赤血球生成のためには十分ではなく^[3]、出生時または出生直後に 18 $\mu\text{mol/l}$ ($\approx 100 \mu\text{g/dl}$) より低い血清鉄 (Fe) を示す子牛は鉄欠乏であると考えられている^[4]。哺乳期の子牛は筋肉や骨の発育が盛んな時期であり、子牛の成長を促進する内分泌因子のひとつにインスリン様成長因子-1 (IGF-1) がある^[5]。IGF-1 は 70 のアミノ酸残基からなる 1 本鎖ポリペプチドで、ヒトおよび牛で構造が同一である。その構造はプロインスリンに類似しており、IGF-1 は主に肝臓で成長ホルモン (GH) による刺激の結果分泌される^[6]。IGF-1 の作用

は、骨成長の促進、細胞増殖や分化促進およびタンパク質同化など多岐にわたる^[7]。さらに、乳用牛では春機発動前の乳腺細胞や卵巣機能の発育に IGF-1 が深く関与していることが報告されている^[8]。現在のところ、IGF-1 産生能の決定要因および決定時期は十分に解明されていないが、子牛における血中 IGF-1 濃度の決定要因として、栄養状態が関与しているという報告がある^[9-11]。さらに、筆者は初乳および移行乳の集中的な授乳プログラムが子牛の血中 IGF-1 濃度に関与すること、新生子牛の飼養管理は離乳時の IGF-1 産生能に影響を与えることを報告した^[12]。近年、ラットを用いた研究では、胎児期からの Fe と IGF-1 の相互作用を示す報告^[13]があるが、乳用子牛における GH-IGF システムの活性を調べた報告は筆者の知る限り数少なく^[14,15]、IGF-1 産生能の決定時期までは調査されていない。そこで本研究は、7 日齢における鉄剤投与が離乳時の IGF-1 濃度に及ぼす影響を調査し、IGF-1 産生能の決定時期について知見を得たので報告する。

連絡責任者：山手 智行 みなみ北海道農業共済組合 道南支所 北部家畜診療センター
〒049-4514 久遠郡せたな町北檜山区豊岡86-7
TEL : 0137-84-5042 E-mail : yamate_tomoyuki@minami-hkd-nosai.or.jp

材料および方法

1. 調査農場における子牛の飼養管理概要

調査農場は、ホルスタイン種経産牛約80頭を飼養し、毎月の出生頭数は平均7頭、フリーストール牛舎、オーチャード主体のグラスサイレージとデントコーンサイレージによるTMR給与で管理されていた。2017年の305日乳量は10,518 kgであった。当該酪農場での子牛の飼養管理は、初乳中のIgG値と相関がある糖度(Brix)値^[16]をポケット初乳濃度計(PAL初乳: ATAGO、東京)で測定し、初乳品質の推定を行っていた。出生後、哺乳欲を示した子牛に対してBrix値20%以上の初乳または凍結初乳^[16]を、生後6時間以内に3~4 lを目安に給与していた。初乳が確保できない場合は初乳粉末製剤(ヘッドスタート: バイエル薬品、大阪)を用法に従い3~4袋給与していた。初乳給与後はカーフハッチにて、離乳までペアを変更せず、1~2頭で飼養されていた。代用乳(現物中%: 可消化養分総量105%以上、粗タンパク質26%以上、粗脂肪17%以上)の哺乳量は、1日に2 l(代用乳: 250 g)を3回とし、人工乳(現物中%: 可消化養分総量75%以上、粗タンパク質25%以上)は2週齢より給餌開始し、摂取量2 kgを離乳日の目安としていた。早期離乳法^[17]は行わず、離乳は個体ごとの人工乳摂取量をモニターしながら2~3カ月齢に設定し、哺乳回数を徐々に減らし、離乳直前の時期には哺乳瓶にて温湯を給与していた。水はバケツにて自由飲水とし、乾草(オーツヘイ)は飼槽にて不断給与していた。離乳後は7頭前後の群を編成し、群を入れ替えることなく未經産フリーストール群まで移動させていた。

2. 供試牛および調査項目

供試牛は、当該酪農場にて2017年10月~2019年8月に出生し、初乳粉末製剤を使用せず、加熱や凍結が行われてなく、Brix値20%以上の初乳を6時間以内に3~4 l給与され、離乳まで診療履歴のない臨床的に健康なホルスタイン種雌子牛24頭とした。Fe濃度、血中IGF-1濃度および体尺(体重)測定を7日齢と離乳時に行った。頸静脈より採血を行い、Fe濃度は比色法を用いて測定した。血中IGF-1濃度測定は免疫放射定量測定法(IRMA法)にて、東北大学病院検査部に検査を依頼した。また体重の測定は、体重推定尺(体重推定尺乳牛用A: 富士平工業、東京)を用いた。Bostedtらの報告^[4]をもとに、7日齢Fe濃度が100 $\mu\text{g/dl}$ ($\approx 18 \mu\text{mol/l}$) 以下の子牛を鉄欠乏子牛と定義し、鉄欠乏を呈していない対照群(対照群: 12頭)、鉄欠乏を呈し鉄剤を投与しない非投与群

(鉄剤非投与群: 6頭) および鉄欠乏を呈し鉄剤を投与した投与群(鉄剤投与群: 6頭)の3群に分類した。鉄剤投与群には7日齢時にデキストラン鉄液を6 ml(トネテツB12注「明治」: Meiji Seika ファルマ、東京)単回投与した。また3群の7日齢から離乳時までの1日増体量(DG)および離乳日齢を比較した。

3. 統計処理

統計学的有意差検定は統計解析ソフトEZR version 1.36を用い^[18]、得られた結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。正規性の検定にはShapiro-wilk検定、等分散性の検定にはBartlett検定を行い、各検査項目における相関係数の検定にはピアソンの積率相関係数の検定、群間の比較には一元配置分散分析および反復測定二元配置分散分析を用いて、危険率が5%未満となった項目を有意差ありと判定した。また、交互作用の認められた要因についてはBonferroniの方法による事後検定を行い、危険率が5%未満となった要因を有意差ありと判定した。

成 績

供試牛のFe濃度は7日齢で $206.6 \pm 192.9 \mu\text{g/dl}$ 、離乳時で $200.0 \pm 40.2 \mu\text{g/dl}$ 、血中IGF-1濃度は7日齢で $123.9 \pm 29.2 \text{ ng/ml}$ 、離乳時で $226.8 \pm 35.5 \text{ ng/ml}$ であった。体重は7日齢で $46.0 \pm 5.1 \text{ kg}$ 、離乳時で $118.1 \pm 10.6 \text{ kg}$ であった。1日増体量(DG)は $0.92 \pm 0.15 \text{ kg/日}$ 、離乳日齢は $86.2 \pm 5.9 \text{ 日}$ であった。Fe濃度と血中IGF-1濃度は7日齢($r=0.685$, $p<0.05$)および離乳時($r=0.584$, $p<0.05$)ともに有意な相関関係がみられた(図1)。

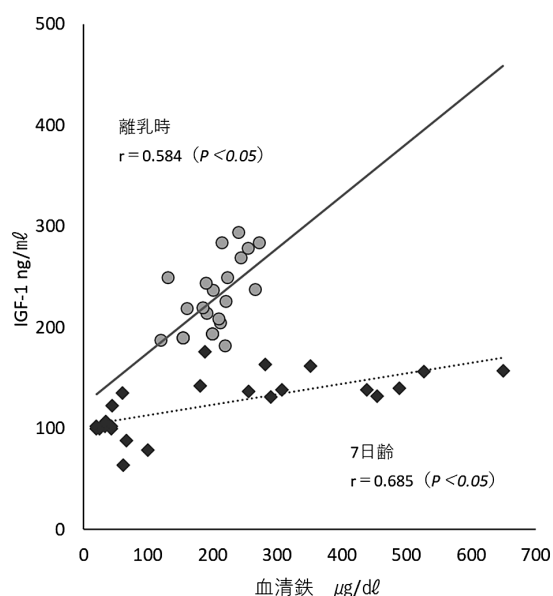


図1. Fe濃度と血中IGF-1濃度の相関図

◆: 7日齢 ●: 離乳時

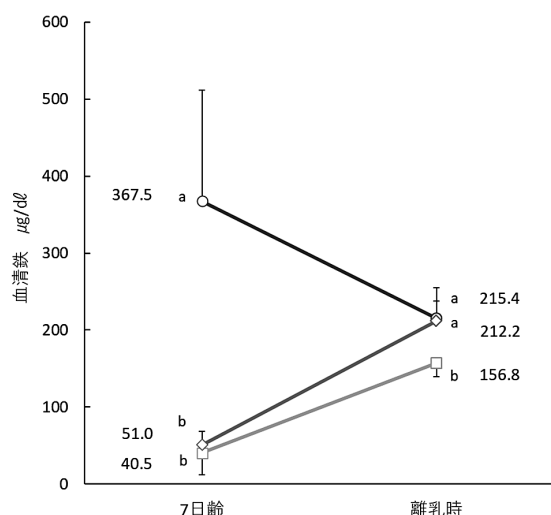


図2. Fe濃度の推移：平均値±SDを示す
○：対照群 □：鉄剤非投与群 ◇：鉄剤投与群
a・b：異なる文字の群間には有意差あり ($p<0.05$)

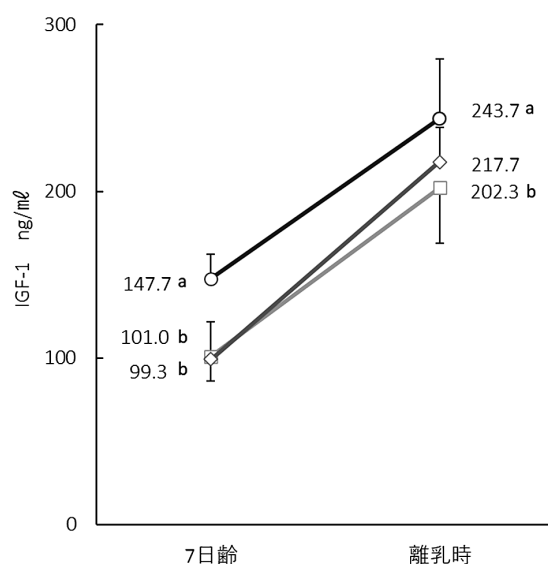


図3. 血中IGF-1濃度の推移：平均値±SDを示す
○：対照群 □：鉄剤非投与群 ◇：鉄剤投与群
a・b：異なる文字の群間には有意差あり ($p<0.05$)

7日齢および離乳時Fe濃度の推移を対照群、鉄剤非投与群および鉄剤投与群と比較すると、7日齢Fe濃度はそれぞれ 367.5 ± 144.3 、 40.5 ± 17.4 、 51.0 ± 28.1 $\mu\text{g/dl}$ であり、対照群はその他2群より有意に ($p<0.05$) 高値を示した。離乳時のFe濃度はそれぞれ 215.4 ± 39.8 、 156.8 ± 25.8 、 212.2 ± 17.7 $\mu\text{g/dl}$ であり、鉄剤非投与群はその他2群より有意に ($p<0.05$) 低値を示した (図2)。7日齢および離乳時血中IGF-1濃度の推移を対照群、鉄剤非投与群および鉄剤投与群と比較すると、7日齢血中IGF-1濃度はそれぞれ 147.7 ± 14.5 、 101.0 ± 22.6 、 99.3 ± 15.0 ng/ml であり、対照群はその他2群より有意に ($p<0.05$) 高値を示した。離乳時の血中IGF-1濃

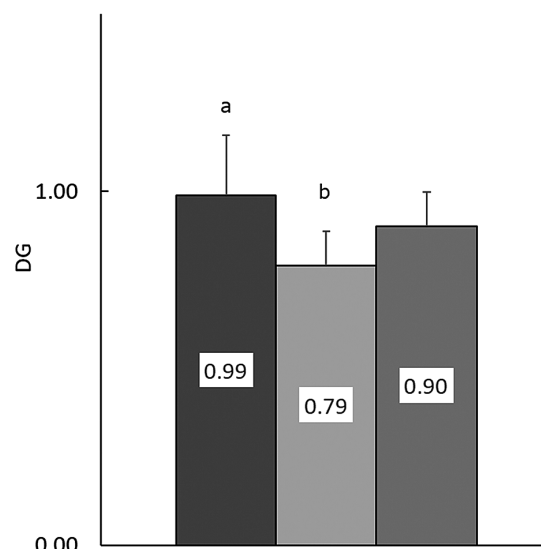


図4. 1日増体量 (DG) の比較：平均値±SDを示す
■：対照群 ■：鉄剤非投与群 ■：鉄剤投与群
a・b：異なる記号の群間には有意差あり ($p<0.05$)

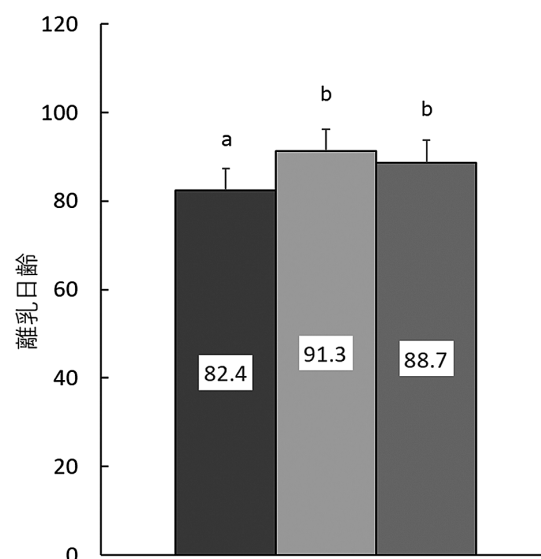


図5. 離乳日齢の比較：平均値±SDを示す
■：対照群 ■：鉄剤非投与群 ■：鉄剤投与群
a・b：異なる記号の群間には有意差あり ($p<0.05$)

度はそれぞれ 243.7 ± 35.5 、 202.3 ± 20.7 、 217.7 ± 33.2 ng/ml であり、対照群は鉄剤非投与群より有意に ($p<0.05$) 高値を示した (図3)。DGを対照群、鉄剤非投与群および鉄剤投与群と比較すると、それぞれ 0.99 ± 0.17 、 0.79 ± 0.10 、 0.90 ± 0.06 kg/日 であり、対照群は鉄剤非投与群より有意に ($p<0.05$) 高値を示した (図4)。離乳日齢を対照群、鉄剤非投与群および鉄剤投与群と比較すると、それぞれ 82.4 ± 5.0 、 91.3 ± 5.0 、 88.7 ± 2.4 日であり、対照群はその他2群より有意に ($p<0.05$) 短縮した (図5)。

考 察

乳用牛において遺伝能力を十分発揮するためには、子牛を健康に飼養し、感染症を未然に防ぐことが重要である^[19]。そのために、牛の予防医療の分野では、適切な初乳摂取、飼養環境の改善およびワクチネーションなどが行われている。一方、近年、ヒトの予防医療の分野においては、胎児期や乳児期の環境因子が、成長後の健康や様々な疾病の発症リスクに影響を及ぼすという概念（Developmental Origin of Health and Disease : DOHaD）が提唱されており、エピジェネティクス研究分野と関連して代謝プログラミングあるいは代謝インプリンティングとも呼ばれる^[11]。ヒトにおいて、胎児期や乳児期からのより良い食育や育成環境を通して将来の疾病リスクを減ずること、さらに個々の遺伝的背景をもとに疾病リスクに対して早期から介入していく、いわゆる「先制医療」の概念が注目されている。このDOHaD概念は牛の予防医療にも十分応用可能であり、胎子期から離乳前までの栄養の質と環境が、子牛の体質に著しい影響を与えることを示唆している。

今回の調査より、7日齢および離乳子牛の血中IGF-1濃度がFe濃度と相関することが確認された。血中のIGF-1はタンパク質をはじめとする五大栄養素の供給を通じて、主に肝臓で産生されるが、非栄養素によっても産生されることが示唆されている^[20]。また鉄は代謝・細胞増殖などの生命現象に必須の元素であり、その多くは赤血球のヘモグロビンの構成元素として使われ、酸素運搬に機能している。過去の報告では鉄欠乏性貧血は肝細胞に低酸素状態をもたらす、IGF結合タンパク質-1（IGFBP-1）、特にリン酸化IGFBP-1を増加させることによってIGF-1を阻害することが知られている^[21]。またラットの鉄欠乏症においてFeはIGF-1調節の重要な決定因子とされ^[13]、鉄欠乏症が神経発生を抑制しGHを介したIGF-1分泌を低下させることも示されている^[14]。さらに、出生後早期の子牛への鉄剤投与は、鉄欠乏を呈していない子牛の血中IGF-1濃度の上昇をもたらすことが報告^[22]されており、鉄欠乏子牛で観察された血中IGF-1濃度の有意な低値は、おそらくFe濃度の変化の結果であると考えられる。正の相関関係は原因と結果を示唆するものではないが、IGF-1の正常な分泌には十分なFeが必要であると考えられる。しかし今回の調査では、供試牛の7日齢Fe濃度の標準偏差は大きく個体差が認められた。7日齢のFe濃度が初乳から吸収された外因性Feなのか、または出生時にすでに蓄積さ

れた内因性Feなのかについては不明である。過去の報告では、出生直後の母牛と子牛のFeには相関が認められないこと^[23]、新生子牛の肝臓の鉄貯蔵のみで正常な造血機能が維持することは困難といわれること^[24]より、供試牛のFe濃度の差は初乳から吸収された外因性Feの可能性が示唆される。初乳中には常乳と比較するとタンパク質、ビタミン類とミネラルが多く含まれている^[25]。また栄養素だけでなく、免疫グロブリン、ラクトフェリン（Lf）、ラクトペルオキシダーゼやリゾチームなどの感染防御因子、ホルモン、成長因子、サイトカインなどの生理活性因子も多く含まれている^[25]。Lfは乳腺の防御に重要な役割を果たす乳腺由来のカチオン性鉄結合糖タンパク質であり、鉄との親和性が非常に強く、トランスフェリンと同様に鉄の輸送に関与している^[26]。Lfは常乳と比較して30～100倍多く含まれることが知られており^[27,28]、新生子牛のFe濃度に関与することが知られている^[29]。しかし初乳中のLf含有量は個体差が多いこと^[26]、泌乳量や体細胞数によっても変動すること^[30]が知られており、本調査においても供試牛のFe濃度には個体差が多く散見されたことより、本調査においても初乳中のLf含有量に個体差があった可能性が考えられる。供試牛は初乳粉末製剤を使用せず、加熱や凍結が行われてなく、Brix値20%以上の初乳を6時間以内に3～4 l給与され、その後も同一の飼養管理者によって管理されているが、初乳中のLfや鉄含有量などの詳細な分析は行われていないので、Fe濃度が初乳由来の外因性であることを証明するにはさらなる調査が必要である。

また本調査では、7日齢のFe濃度が低い鉄剤投与群では、離乳時のFe濃度は改善したが、血中IGF-1濃度、DGおよび離乳日齢は改善しないことが確認された。これらを考慮すると、新生子牛のFe濃度が子牛への代謝プログラミングにおいて重要な役割を果たし、長期的な遺伝子の活性化を促し、離乳期における有意なDG増加、離乳日齢の短縮につながったことが示唆された。離乳期までの低値の血中IGF-1濃度は発育不良を招き、筋肉量の減少と脂肪蓄積を招く^[31]ことが知られ、慢性炎症、グルコース耐性異常、およびインスリン抵抗性を招く可能性がある^[32,33]。よって本調査の結果より7日齢におけるFeのモニタリングで鉄欠乏を呈している子牛には、鉄剤投与を行うことが、離乳期子牛のIGF-1産生能の改善、DGの向上および離乳日数の短縮に有効であると考えられた。適正なFeの管理は造血機能の活性化だけでなく、将来の血中IGF-1産生能に影響し、発育過程に長期的な影響を及ぼす可能性がある。さらに近年では、個

体の体質決定だけでなく世代を超えたエピジェネティックな遺伝をすることも示唆され始めている^[34]。しかし今回の調査では出生直後から7日齢にいたるまでのFe濃度の推移は分析されていないので、子牛の血中IGF-1産生能の活性化を決定する子牛の日齢についてはさらなる調査が必要である。

最後に、成長や生産性などの体質形成に関して、今後は、DOHaD概念に基づく胎子期のプログラミングやインプリンティングといった考え方が、獣医療にも応用できると考えられる。子牛の潜在能力を十分に発揮させ、効率的な生産を行うためには、出生以前の母牛の栄養および衛生管理、これに続く初乳の摂取や新生子牛の適正なFeの管理がその後の成長に大きくかかわっており、基本に忠実な飼養管理が重要性であると考えられた。

引用文献

- [1] 不破敬一郎：人体における微量元素の役割、鉄と銅、79、716-720 (1993)
- [2] Mohri M, Sarrafzadeh F, Seifi HA : Effects of oral iron supplementation on haematocrit, live weight gain and health in neonatal dairy calves, Iran J Vet Res, 7, 34-37 (2006)
- [3] Mohri M, Poorsina S, Sedaghat R : Effects of parenteral supply of iron on RBC parameters, performance, and health in neonatal dairy calves, Biol Trace Elem Res, 136, 33-39 (2010)
- [4] Bostedt H, Jekel E, Schramel P : The development of iron and copper concentrations in blood plasma of calves in the first days and weeks of life, equally a contribution to the larvaceous neonatal iron deficiency anemia, Dtsch Tierarztl Wochenschr, 97, 400-403 (1990)
- [5] Styne D : Basic & Clinical Endocrinology, 6th ed, Greenspan FS and Gardner DG eds, 163-200, McGraw-Hill, New York (2001)
- [6] 大地陸男：内分泌、生理学テキスト、第4版、389-394、文光堂、東京 (2003)
- [7] 高橋伸一郎、竹中麻子、野口 忠：動物の成長を司るホルモン、インスリン様成長因子1、蛋白質核酸酵素、41、267-280 (1996)
- [8] Zulu VC, Nakao T, Sawamukai Y : Insulin-like growth factor-1 as a possible hormonal mediator of nutritional regulation of reproduction in cattle, J Vet Med Sci, 64, 657-665 (2002)
- [9] 石橋瑞穂、牛之浜寛治、上村俊一、浜名克己：黒毛和種発育不良子牛の血中成長ホルモン、IGF-1、甲状腺ホルモンおよびビタミンA濃度、日獣会誌、52、427-430 (1999)
- [10] 高須正規、大場恵典、荒井宏幸、河島孝典、西飯直仁、前田貞俊、宮澤清志、北川 均：黒毛和種の発育不良牛における発育と血清インスリン様成長因子-1濃度、日獣会誌、59、603-606 (2006)
- [11] 後藤貴文：代謝インプリンティングを基盤とした子牛の成長と産肉性、家畜感染症学会誌、3、129-138 (2014)
- [12] 山手智行、小松勝一、大西光徳：初乳および移行乳の給与状況がホルスタイン種雌子牛の血中IGF-1濃度に及ぼす影響、北獣会誌、63、135-141 (2019)
- [13] Tran PV, Fretham SJB, Wobken J, Miller BS, Georgieff MK : Gestational-neonatal iron deficiency suppresses and iron treatment reactivates IGF signaling in developing rat hippocampus, Am J Physiol Endocrinol Metab, 302, 316-324 (2012)
- [14] Ceppi A, Blum JW : Effects of growth hormone on growth performance, haematology, metabolites and hormones in iron-deficient veal calves, J Vet med A, 41, 443-458 (1994)
- [15] Blum JW, Hammon H : Endocrine and metabolic aspects in milk-fed calves, Domest Anim Endocrinol, 17, 219-230 (1999)
- [16] Quigley JD, Lago A, Chapman C, Erickson P, Polo J : Evaluation of the Brix refractometer to estimate immunoglobulin G concentration in bovine colostrum, J Dairy Sci, 96, 1148-1155 (2013)
- [17] 岡本全弘：子牛の栄養と代謝、子牛の科学、家畜感染症学会編、124-130、チクサン出版、東京 (2009)
- [18] Kanda Y : Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZ' for medical statistics, Bone Marrow Transpl, 48, 452-458 (2013)
- [19] 山手智行、大西光徳：哺乳期乳用子牛の飼養管理改善による受胎日齢と初産乳量の向上、家畜診療、65、711-717 (2018)
- [20] Kirovski D, Lazarević M, Baricević-Jones I, Nedić O, Masnikosa R, Nikolic JA : Effects of peroral insulin and glucose on circulating insulin-like growth factor-1 its binding proteins and thyroid hormones in neonatal calves, Can J Vet Res, 72, 253-258 (2008)
- [21] Tsunawaki T, Sakai K, Momomura M, Wachi Y,

- Matsuzawa Y, Iwashita M: Hypoxia alters phosphorylation status of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 and attenuates biological activities of IGF-1 in HepG2 cell cultures, *J Obstet Gynaecol Res*, 39, 1367-1373 (2013)
- [22] Moosavian HR, Mohri M, Seifi HA: Effects of parenteral over-supplementation of vitamin A and iron on hematology, iron biochemistry, weight gain, and health of neonatal dairy calves, *Food Chem Toxicol*, 48, 1316-1320 (2010)
- [23] 渡辺栄次、小形芳美: 子牛の疾患とミネラル、栄養生理研報、56、101-108 (2012)
- [24] Radstis OM, Gray CC, Hinchcliff KW, Constable PD: Diseases associated with deficiencies of mineral nutrients, *Veterinary Medicine* 10th ed, 1698-1770 WB Saunders, Philadelphia (2007)
- [25] 遠藤 洋: 新生子牛における抗病性と初乳の役割、子牛の科学、家畜感染症学会編、81-85、チクサン出版、東京 (2009)
- [26] 鈴木 隆、野中真弓、清沢 功、小笠勝啓: 各泌乳期における牛乳中のラクトフェリン含量、栄養と食糧、30、317-322 (1977)
- [27] Reiter B: Review of the progress of dairy science, antimicrobial systems in milk, *J Dairy Res*, 45, 131-147 (1978)
- [28] Indyk HE, Filonzi EL: Determination of lactoferrin in bovine milk, colostrum and infant formulas by optical biosensor analysis, *Int Dairy J*, 15, 429-438 (2005)
- [29] Kume S, Tanabe S: Effect of supplemental lactoferrin with ferrous iron on iron status of newborn calves, *J Dairy Sci*, 79, 459-464 (1996)
- [30] Cheng JB, Wang JQ, Bu DP, Liu GL, Zhang CG, Wei HY, Zhou LY, Wang JZ: Factors affecting the lactoferrin concentration in bovine milk, *J Dairy Sci*, 91, 970-976 (2008)
- [31] Greenwood PL, Cafe LM, Hearnshaw H, Hennessy DW, Thompson JM, Morris SG: Long-term consequences of birth weight and growth to weaning on carcass, yield and beef quality characteristics of Piedmontese- and Wagyu-sired cattle, *Aust J Exp Agric*, 46, 257-269 (2006)
- [32] Hotamisligil GS: Inflammation and metabolic disorders, *Nature*, 444, 860-867 (2006)
- [33] Suganami T, Ogawa Y: Adipose tissue macrophages; their role in adipose tissue remodeling, *J Leukoc Biol*, 88, 33-39 (2010)
- [34] Feeney A, Nilsson E, Skinner MK: Epigenetics and transgenerational inheritance in domesticated farm animals, *J Animal Sci Biotechnol*, <https://doi.org/10.1186/2049-1891-5-48> (2014)