

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19315

研究課題名(和文)反芻家畜の代謝性疾患を予見するためのバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Exploration of microbial marker for prediction of metabolic disorder in ruminants

研究代表者

小池 聡 (Koike, Satoshi)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：90431353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ウシは第一胃(ルーメン)に共生する微生物に飼料の分解を委ねており、ルーメン微生物の働きは乳肉生産に大きく影響する。本研究では、ウシの生産性と関連するルーメン微生物を特定し、これをバイオマーカーとして利用する可能性について検討した。まず、ウシや作業者の負担を軽減するために、ルーメン内容物の代替として口腔内の反芻残渣が利用可能であることを確認し、サンプリング手法の簡便性を大きく改善した。この手法を応用して、黒毛和種肥育牛においてはPrevotella属細菌群の分布量と体重に正の相関がある可能性を明らかにした。今後、本属細菌を体重増加のバイオマーカーとして活用できるかもしれない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウシは過去30年の遺伝改良で乳肉の生産能力が飛躍的に向上した。一方、生産能力を最大限に引き出すためには穀物飼料の多給が不可欠であり、これによる消化管疾病等の代謝障害の発生とそれに伴う生産性の低下が生産現場で大きな問題となっている。そこで、生産性の低下を予見するためのバイオマーカーとして、ウシ第一胃に共生する微生物に着目した。本研究では第一胃内に広く分布する細菌群を体重増加のバイオマーカー候補として特定した。今後、このバイオマーカーを利用してウシの体重増加ポテンシャルを予測することで、飼養管理の改善でバイオマーカー微生物の増加を図るなどの対応が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Rumen microbes play a pivotal role in cattle productivity. The aim of this study was to identify the microbe(s) showing positive correlation with host productivity as a biomarker for prediction of productivity. As the first step, buccal swab as a proxy of rumen digesta was validated. This alternative sample enable to avoid laborious and time consuming sample collection by using stomach tube. Then, buccal swab samples were collected from Japanese Black cattle and employed for microbial analyses. Population size of Prevotella spp. seemed to have a positive correlation with the body weight of Japanese Black cattle. Therefore, Prevotella spp. can be used as a biomarker for prediction of body weight gain in the future.

研究分野：家畜栄養学、消化管微生物学

キーワード：ルーメン 代謝障害 生産性 バイオマーカー 黒毛和種

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ウシを飼養して得られる乳肉は日常的に食卓に並ぶ肉類や乳製品に加え、安全性が厳格に求められる乳児用の粉ミルクや高付加価値で輸出される霜降り牛肉などその用途は多岐にわたり、我が国の重要な農業生産物である。

本来、ウシは人間や他の家畜が直接エネルギー源として利用出来ない牧草で生育することが可能である。この特異な栄養獲得システムはウシの第一胃（ルーメン）に共生する微生物に大きく依存している。過去30年の遺伝改良によりウシの乳肉生産性は飛躍的に向上した一方で、高い生産能力を最大限に引き出すためにエネルギー効率が良い穀物飼料の給与量も増加している。穀物飼料の多給はルーメン微生物生態系のバランスを崩す要因となり、時として消化管疾病や代謝障害が誘発される。穀物飼料多給によるルーメン発酵異常に端を発する代謝性疾患は「生産病」と定義され、反芻家畜の生産現場では経営に打撃を与える深刻な問題とされている。一般的に生産病は散発的に発生し、同じ牧場で同じ飼料を給与してもすべての個体が発症するわけではないため、予見や早期発見が困難である。生産病の発端はルーメン発酵異常であることから、ルーメン発酵異常の予兆となる微生物相を特定することで、生産病の予防につながる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

生産病をはじめとするウシの生産性に影響を与えうるルーメン微生物をバイオマーカーとして活用することを念頭に、多個体のルーメン微生物相を迅速に実施するための手法確立とその応用について検討した。

3. 研究の方法

(1) 多個体のルーメン微生物相を迅速に実施するためのサンプリング手法の確立

既報にて、ウシ口腔内の反芻残渣を用いることでルーメン微生物相、特に細菌叢を推定できることが示されているが、具体的なサンプリング手法については記載がなく、使用する器具、試薬またはサンプル採取時間については不明であった。そこで、反芻残渣の採取手技と解析サンプルとしての有効性を確認するために、ルーメンカニューレ装着済みのホルスタイン種乾乳牛6頭（粗飼料多給条件で飼養）および黒毛和種肥育牛3頭（濃厚飼料多給条件で飼養）から反芻残渣およびルーメン内容物を採取した。サンプリングは朝の給餌後3~5時間を実施し、反芻残渣は綿棒を用いて口腔内より、ルーメン内容物はカニューレよりそれぞれ採取した。採取した反芻残渣およびルーメン内容物を16S rRNA遺伝子配列に基づく菌叢解析(MiSeqおよびreal-time PCR)に供し、両サンプルの菌叢構成を比較することで反芻残渣を用いたルーメン菌叢タイピングの有効性を検討した。

(2) 反芻残渣を用いたルーメン菌叢タイピング手法の応用

黒毛和種肥育牛48頭を対象に、15ヶ月齢および18ヶ月齢の時点で口腔内より反芻残渣を採取した。得られた反芻残渣より総細菌DNAを抽出し、黒毛和種ルーメンの重要細菌群（コア澱粉分解菌群）についてreal-time PCRによる定量を実施した。コア澱粉分解菌群を構成する5菌群の分布量に基づいてルーメン菌叢タイプを特定し、増体との関係を検討した。これにより、ウシの生産性と関連するルーメン細菌の特定を試みた。

4. 研究成果

(1) 多個体のルーメン微生物相を迅速に実施するためのサンプリング手法の確立

MiSeqによる網羅的菌叢解析では、反芻残渣あるいはルーメン内容物中で総細菌に占める割合が平均0.5%以上だった菌群が39であった。これら39菌群の合計分布量は飼料条件に関わらず約90%であり、反芻残渣とルーメン内容物で同様の結果であった(図1)。また、39菌群のうち23菌群は飼養条件による分布量変動(有意に増減あり、または変動なし)がルーメン内容物と反芻残渣で一致し、これらには*Prevotella*属、*Ruminococcus*属、*Fibrobacter*属、*Treponema*属または*Selenomonas*属といった既知のルーメン細菌群も含まれていた。これら23菌群の合計分布量は飼料条件に関わらず約70%であった。また、選ばれた39菌群について、反芻残渣での分布量とルーメン内容物での分布量の相関を調べたところ、反芻残渣の分布量とルーメン内容物の分布量の相関係数は $r=0.92$ ($P < 0.001$)であり、 $y=0.994x+0.002$ の回帰直線を得た(図2)。Bray-Curtis距離に基づく階層型クラスター解析の結果を図3に表す。飼養条件に基づく明確なクラスターが確認された一方、いずれの個体においても反芻残渣とルーメン内容物の菌叢タイプは個体ごとに近

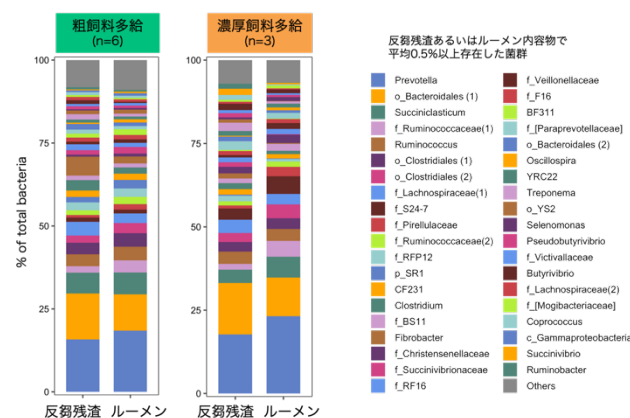


図1. 反芻残渣およびルーメン内容物の菌叢構成（属レベル）

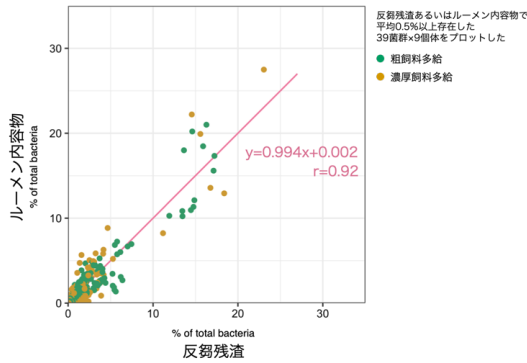


図2. 反芻残渣およびルーメン内容物における各菌群の分布量 (属レベル)

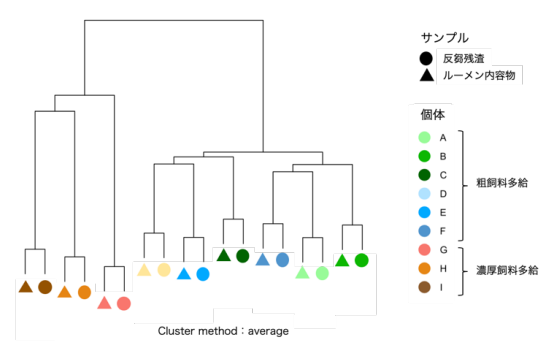


図3. Bray-Curtis距離に基づく細菌叢の類似度比較 (クラスター解析)

傍に位置していた。反芻残渣とルーメン内容物の菌叢構成と飼養条件の変化にともなう構成変動は概ね一致した (図1~図3)。さらに、反芻残渣とルーメン内容物で各菌群の分布量に高い相関 (相関係数 $r=0.92$ $P < 0.001$) が認められ、先行研究 (Tapio et al., 2016) と一致する結果が得られた。また本試験の相関解析から得られた回帰直線は $y=0.994x+0.002$ であり、 $y=x$ に近似していたことから反芻残渣とルーメン内容物で各菌群の分布量は概ね一致することが確認できた。したがって、反芻残渣をルーメン内容物の代替として用いることで、ルーメン菌叢を正確に把握することが可能であると判断した。Bray-Curtis 距離に基づく階層型クラスター解析により菌叢の類似度を比較したところ、飼養条件に基づく明確なクラスターが形成された。ルーメン菌叢構成が給与飼料によって影響を受けることは広く知られており、濃厚飼料を増給した際にルーメン菌叢構成が変動することも報告されている (Tajima et al., 2001; Khafipour et al., 2009; Mao et al., 2016)。本試験の結果はこれらの報告に一致するものであり、反芻残渣の菌叢がルーメン菌叢の変動を反映していることを確認した。濃厚飼料多給区は粗飼料多給区に比べてルーメン菌叢構成の個体差が大きかった (図3)。Maoら (2016) の研究では、濃厚飼料を多給した場合、ルーメン菌叢の個体差が大きくなることが確認されている。濃厚飼料の増給に伴い黒毛和種肥育牛のルーメン菌叢構成の個体差が大きくなることも観察されている (本研究室未発表データ)。本研究では、ルーメン内容物と反芻残渣のいずれを用いても過去の研究と一致する結果 (濃厚飼料多給条件下でのルーメン菌叢の個体差増大) が得られたことから、反芻残渣を用いることで、異なる飼養条件におけるルーメン菌叢構成の変化を検出可能であることが確認された。

Real-time PCRを用いて、反芻残渣およびルーメン内容物中の総細菌、ルーメン内重要菌群および総メタン生成古細菌を定量したところ、14 菌群のうち 10 菌群 (総細菌、*Prevotella*属細菌、*Prevotella*属細菌、新規細菌群U4、*Butyrivibrio*グループ、*R. bromii*近縁グループC1、*S. ruminantium*、*S. dextrinosolvens*、*F. succinogenes*、新規細菌群U2 および *S. bovis*) においてルーメン内容物と反芻残渣で同じ結果が得られた (図4)。そのうち、総細菌、*Prevotella*属細菌、新規細菌群U4、*Butyrivibrio*グループ、*R. bromii*近縁グループC1、*S. dextrinosolvens* および *S. bovis* では飼養条件間で分布量に変動が

見られず、*F. succinogenes* および新規細菌群U2は粗飼料多給区で分布量が多く、*S. ruminantium*は濃厚飼料多給区で分布量が多かった。したがって、real-time PCRによる高精度定量においても、飼料変化に伴うルーメン菌叢の変動を反芻残渣によって把握できることが確認できた。一方で *R. flavefaciens*、*R. albus*、*Treponema*属細菌および総メタン生成古細菌については飼養条件間の分布量変動がルーメン内容物と反芻残渣で一致しなかった。*R. flavefaciens*、*R. albus* および *Treponema*属細菌はいずれも飼料に付着して植物繊維の分解に関与する菌群であり (Koike et al., 2003a, 2003b)、ルーメン内容物においては粗飼料多給区で濃厚飼料多給区に比べて分布量が多かった (図4)。一方、これらの反芻残渣における分布量はルーメン内容物のそれとは一致せず、濃厚飼料多給区での分布量が多かった。この結果は濃厚飼料多給時の反芻残渣には、より多くの繊維分解関連菌が付着していたことを示唆している。繊維飼料の乏しい濃厚飼料多給区では繊維分解関連菌群が基質獲得のためにより高い密度で繊

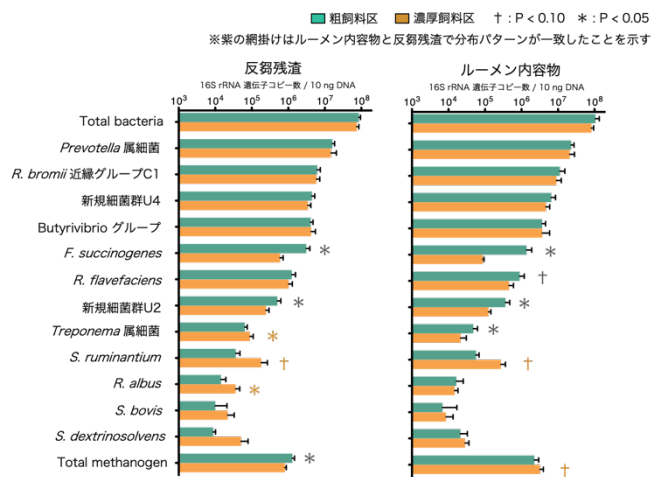


図4. ルーメン内容物および反芻残渣による飼養条件間の菌叢比較 (Real-time PCR)

維片上に局在していたものと考えられる。本試験で繊維付着性細菌群の一部が反芻残渣で過大評価されたのは、反芻時に粗飼料片が選択的に吐き戻されたために、反芻残渣での分布密度がルーメン内容物のそれに比べて相対的に高かったことに起因すると推察される。

(2) 反芻残渣を用いたルーメン菌叢タイピング手法の応用

反芻残渣を採取した 48 個体のうち、15 ヶ月齢では 25 個体、18 ヶ月齢では 19 個体においてコア澱粉分解菌群の分布量が過去の研究と同程度（5 菌群の総細菌に占める割合が合計で 10%~30%）であったが、残りの個体についてはこの数字を下回っていた。これは肥育の進行に伴い、飼料中の粗飼料割合が減少したことに加え、飼料摂取の時間帯が個体ごとにばらついたことで、反芻活動に個体差が生じたために、十分な反芻残渣が採取できなかったことに起因すると推察される。この点については、サンプリング手法のさらなる検討、微量サンプルからの DNA 抽出法の見直しなどで今後改善する必要がある。

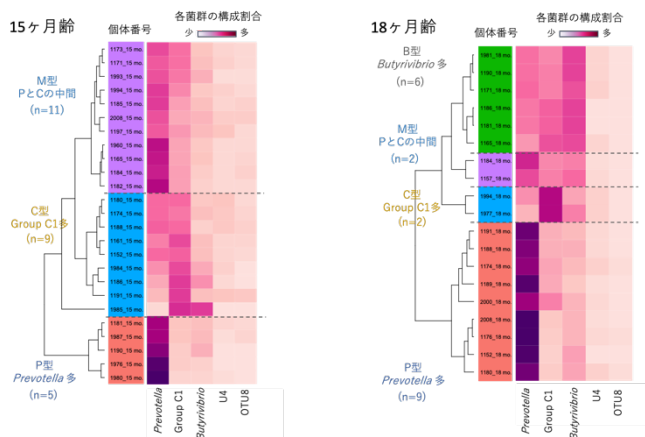


図5. コア澱粉分解菌群の構成割合に基づくルーメン菌叢タイピング

コア澱粉分解菌群の分布量に基づいてルーメン菌叢を類型化（タイピング）したところ、15 ヶ月齢においては、*Prevotella* 属細菌優勢型（P型）、Ruminococcaceae Group C1 優勢型（C型）またはそれらの中間型（M型）に別れた（図5左）。一方、18 ヶ月齢においては、C型とM型の個体が減少し、*Butyrivibrio* グループ細菌優勢型（B型）が新たに出現した（図5右）。肥育ステージの進行に伴うコア澱粉分解菌群の分布量変動は過去の研究でも確認されており（当研究室未発表データ）、反芻残渣を用いても同様の傾向をモニタリングが可能であった。一方で、本試験で用いた黒毛和種牛は、いずれの個体も同一の肥育ステージで同一の飼料条件下において飼養されていた。Weimer ら（2010）は、2頭のホルスタイン牛を用いて個体間でルーメン内容物を全て入れ替えたところ、日数の経過とともにルーメン細菌叢構成が元に戻ることを報告した。このことは宿主であるウシ自身がルーメン細菌叢構成を制御している可能性を示唆している。宿主特有のルーメン菌叢が維持される要因は特定されていないが、Weimer ら（2010）は唾液の分泌や発酵産物のルーメンからの吸収に個体差があり、これらによるルーメン環境の違いが菌叢の個体差を導く要因と推察している。一方、宿主の遺伝子型とルーメン菌叢構成との関連を示唆する報告もある。Roche ら（2016）はアバディーンアンガス種の雄ウシおよびリムーザン種の雌ウシから生まれたウシと、リムーザン種の雄ウシおよびアバディーンアンガス種の雌ウシから生まれたウシとでルーメン菌叢を比較したところ、細菌と古細菌の分布量の比は、飼料条件よりも親ウシの組み合わせによる影響を強く受けていたことを報告している。Gonzalez-Recio ら（2017）はホルスタイン種牛およびブラウンスイス種牛のルーメン菌叢を比較し、*Butyrivibrio* 属細菌や *Prevotella* 属細菌および *Methanobrevibacter* 属古細菌の分布量の違いが遺伝子型の違いに起因している可能性を報告している。また、Difford ら（2018）はメタン産生量とルーメン菌叢および宿主の遺伝子型の関連を調べ、宿主の遺伝子型がルーメン菌叢構成に影響を与え、その結果メタン産生量に影響を及ぼしている可能性があることを指摘した。本試験に供試した黒毛和種牛が、いずれも同一の月齢・飼養条件下にあったにも関わらず異なる菌叢型を示したのは、宿主の遺伝子型の違いに起因するのかもしれない。黒毛和種牛は肉質重視の育種選抜によって遺伝的な多様性が低下したと考えられている（向井、2013）が、一方で産肉特性に基づく明確な血統（種雄牛）の維持が全国的になされており、クローズドな環境で血統による遺伝子型の違いが保持されている（Nishimaki et al., 2013）。したがって本品種のルーメン菌叢は宿主の遺伝子型の影響を受け、個体差が明確に現れる可能性が考えられる。こうした宿主の遺伝子型とルーメン菌叢の関係性、ひいてはそれらと生産性の関連性を検証するには、可能な限り多くの個体でルーメン菌叢タイピングを実施し、法則性の有無を探索する必要がある。

菌叢データが 15 ヶ月齢、18 ヶ月齢ともに取得できた 11 個体について、ルーメン菌叢タイプと体重データを比較したところ、18 ヶ月齢で P 型のルーメン菌叢タイプを示した個体は B 型の個体に比べ、10 ヶ月齢以降の体重が高い傾向が認められた（図6）。本研究では P 型のルーメン菌叢タイプと高体重の因果関係については不明であるが、P 型もしくは B 型のルーメン菌叢タイプが生産性（増体）の指標となる可能性が明らかと

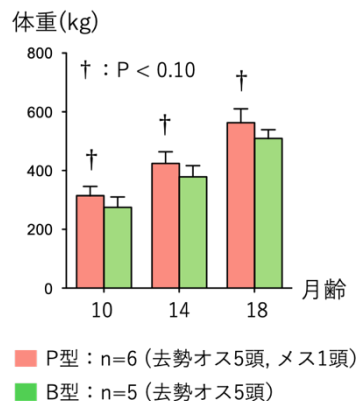


図6. ルーメン菌叢タイプと体重の関係

なった。Tong ら (2018) は乳量の多いウシは乳量の少ないウシに比べて特徴的なルーメン菌叢を保有していることを報告している。Kamke ら (2016) は、メタン産生量の低いヒツジのルーメンでは *Sharpea* 属細菌の分布量が多く、効率的な乳酸の生成および酪酸への代謝が行われるような菌叢を保有している可能性を指摘している。黒毛和種牛においても、ルーメン菌叢型と生産性の関連を大規模に調査することで、高生産性を導くような特定の菌叢型の存在の確認が期待される。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1 件)

三浦広卓、ウシ口腔内の反芻残渣を用いた簡易ルーメン菌叢モニタリング手法の検討、北海道畜産草地学会第7回大会、2018

6. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名：竹田 将悠規 (家畜改良センター)

ローマ字氏名：TAKEDA, Masayuki

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。