

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02322

研究課題名(和文) 機能性アルキルフェノール含有植物の多面的活用による反すう家畜由来メタンガスの削減

研究課題名(英文) Methane mitigation from ruminants by wide range application of alkylphenol-containing plants

研究代表者

小林 泰男 (Kobayashi, Yasuo)

北海道大学・農学研究院・教授

研究者番号：50153648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：アルキルフェノール含有の植物素材(ギンナン果肉およびカシュー殻液)の飼料や排泄物への添加による発生メタンガス低減可能性について評価した。素材の確保至便性の観点から、ギンナン果肉は日本国内の牛に、カシュー殻液はタイ在来牛と沼沢水牛に活用する仮定の下で試験した。両素材とも糞便への直接添加によりメタン生成ポテンシャルが下がり、その作用は選択的な抗菌作用にもとづく微生物相の変化であることがわかった。カシュー殻液については、タイの両畜種への給与試験も実施し、ルーメンでのメタン生成を抑えるのみならず、糞便のメタン生成能も低減すること、糞便菌叢の明瞭な変化がともなうことを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

畜産分野の主たる温室効果ガスであるウシからのメタンは、その削減が喫緊の課題となっている。ウシルーメンのみならず、排泄物からのメタンも無視できない量であり、この低減も講じる必要がある。選択性の高い抗菌作用を有するアルキルフェノールはルーメンの菌叢を変えメタン低減を導くが、本研究で初めて糞便の菌叢にも影響し、メタン生成を抑制することを証明した。アルキルフェノール含有植物は稀な存在であり量的確保可能なものが限られるが、ギンナン果肉とカシュー殻液が有力候補である。ただし、分布に地域性があるため、前者は日本国内で、後者はタイで、各々代表家畜の糞便に活用する方向で評価し、有益な成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Methane mitigation potential of alkylphenol-containing plants such as ginkgo fruit (GF) and cashew nut shell liquid (CL) was evaluated by the application as manure and/or feed additive. Considering local availability of each material, GF was supposed to use for Japanese cattle, while CL was for native cattle and swamp buffaloes in Thailand. The evaluations were made by monitoring changes of fermentation products and microbiota in in vitro culture systems and also in feeding studies.

Both materials decreased methane production potential by the direct addition to feces with significant alteration of fecal microbial community, based on the selective anti-microbial actions. CL was further evaluated by feeding studies using Thai animals and was found to decrease methane production not only from the rumen fluid but also from feces. This accompanied with apparent changes in fecal microbiota.

研究分野：動物生産科学

キーワード：アルキルフェノール ギンナン果肉 カシュー殻液 メタン 温室効果 糞便 ルーメン

## 1. 研究開始当初の背景

地球温暖化の原因となるメタンガスは、反芻家畜の消化管内発酵(おもにルーメン発酵)に加え、排せつ物からも発生する。ウシ糞便からのメタンは全世界で年間約 750 万トン排出されている(FAO, 2006)が、これはルーメン由来メタンのおよそ 1/9~1/10 に及ぶ量であり(FAO, 2006)決して少なくない。そのため糞便からのメタン低減も不可欠である。例えば、ウシおよび水牛の飼養頭数が多い東南アジア地域においては、屋外に放置された糞便が顕著にみられ、長期的なメタン発生源として重要な低減対象といえる。

## 2. 研究の目的

メタン低減剤の候補として着目されているギンナン果肉やカシュー殻液は、アルキルフェノールと呼ばれる希少なフェノール成分を有する。このアルキルフェノールの選択的抗菌作用によりルーメン微生物相と発酵様式が変化した結果、メタン低減が導かれることがこれまでの研究で明らかにされてきた。しかしながら、糞便における抗菌作用やメタンに代表される発酵産物におよぼす影響は未解明である。

そこで、ウシ糞便へのギンナン果肉添加やカシュー殻液給与が、糞便の微生物相および発酵様式にいかん影響を及ぼすかを査定し、放置糞便からのメタン低減にこれら素材が有用か否かについて基礎的知見を得ることを目的とし、一連の試験を実施した。評価素材であるギンナン果肉とカシュー殻液は各々の素材確保の利便性から、今後の活用を見すえて、日本国内での牛糞便にギンナン果肉を施用、タイ在来牛および沼沢水牛にカシュー殻液を給与し、各々評価することとした。

## 3. 研究の方法

### ギンナン果肉添加糞便の発酵ポテンシャル

北海道大学生物生産研究農場で飼養されているホルスタイン種泌乳牛の新鮮糞便をプラスチック容器に分け入れ、ギンナン果肉を添加した方をギンナン果肉区、無添加の方を対照区とした。ギンナン果肉区にはギンナン果肉を 6.4% (糞便 200 g に対しギンナン果肉 12.8 g) 加え混合した。これらの容器を 30 日のインキュベーターに入れて 0、30、60、90、180 日間を放置し、各放置期間終了時に、糞便を緩衝液で希釈しハンゲートチューブに入れ、30 分で 168 時間嫌気培養した。培養後は発酵産物(ガスと短鎖脂肪酸の量と組成および微生物相)の分析を行った。

### カシュー殻液給与糞便の発酵ポテンシャル

カセサート大学キャンペンセーン校実験農場のタイ在来牛 4 頭および沼沢水牛 4 頭を配合飼料と稲わらで飼養し、配合飼料にカシュー殻液製剤を混合添加した。添加給与前(対照期)と添加給与後 4 週目(カシュー殻液期)にルーメン液および糞便を採取し、上記試験と同様の手順で発酵産物の量と組成、ならびに微生物相について分析した。

## 4. 研究成果

### ギンナン果肉の添加培養試験

糞便のメタン生成ポテンシャルは 30 日以降 180 日まで全期間においてギンナン果肉区で減少した(表 1)。ギンナン果肉の添加によって全期間を通して酢酸モル比が低下し、プロピオン酸モル比は上昇した。これら発酵様式の変化は、メタン古細菌(特に *Methanocorpusculum*)、*Ruminococcaceae* や *Clostridiaceae* の減少、および *Bacteroidaceae* や *Porphylloromonadaceae* の増加と関連していた。以上より、ギンナン果肉のウシ糞便への直接添加は、糞便からのメタン削減に有効であり、メタン低減は菌叢の変化と連動していることが示唆された。

### カシュー殻液の給与試験

ルーメンではメタンガス生成ポテンシャルがおおむね 50%低下し、同時にプロピオン酸モル比が高まった(タイ在来牛)。沼沢水牛では作用がより明確で、メタン生成ポテンシャルは、無添加飼料給与時(対照期)に比べ 73%低下する一方、プロピオン酸のモル比は 31%増加した。これらはルーメン内での代謝性水素の処理系がメタン生成からフマル酸還元シフトした結果、ひきおこされたものと推察できた。微生物相の解析結果はこの推察を明瞭に裏付けていた。すなわち、カシュー殻液製剤給与により、水素やギ酸を生成する菌群(*Treponema* や *Ruminococcus*)が検出率を下げ一方、コハク酸(プロピオン酸前駆体)やプロピオン酸の生成に關与する菌群(*Prevotella* および *Succinivibrantia*)が検出率を上げた。さらに新しい知見として、メタン生成古細菌の構成も変化し、*Methanomassiliicoccaceae* (*Vadin CA11*)が減少、*Methanomicrococcus*が増加した。

糞便でもメタン生成ポテンシャルが70-80%程度低下し、ルーメンと同様に糞便でもカシュー殻液給与時にプロピオン酸モル比が高くなった(表2)。この糞便からのメタン減少は、微生物相の変化に対応したものと推測され、沼沢水牛ではUnclassified Ruminococcaceae および Vadin CA11 の減少が認められた。

3種のアルキルフェノールの比率は、原液の比率とルーメンおよび糞便でみられる比率とに大きな違いはなく、いずれの畜種の消化管の中でも、脱炭酸を受けずに糞に排泄されるものと推定された。アルキルフェノール分子種のうち、最も抗菌作用の高いアナカルド酸がほぼインタクトのまま糞便へ移行するならば、糞便の微生物相、ひいては発酵様式にも変化が期待できることになる。本試験結果は、カシュー殻液の給与は、ルーメンのみならず糞便からのメタン生成を低減できる可能性を示すものである。以上より、カシュー殻液製剤給与によるルーメンおよび糞便からのメタン減少は、沼沢水牛では在来牛よりも明確に生じること、それは微生物相の変化と連動していることがわかった。これら4年にわたる研究成果より、ギンナン果肉およびカシュー殻液の両素材において、糞便からのメタン低減にむけて高い応用インパクトが期待できることがわかった。

表1 ギンナン果肉の糞便への添加とその放置期間がインビトロガス生成能におよぼす影響

Incubation period	Treatment	Gases from feces (ml/g feces)			
		Total gas	CO <sub>2</sub>	CH <sub>4</sub>	H <sub>2</sub>
0 day	Control	0.62	0.50	0.12	-
	Ginkgo	1.04 *	0.90 *	0.14 *	-
30 day	Control	0.43	0.28	0.15	-
	Ginkgo	0.29 *	0.23 *	0.06 *	-
60 day	Control	0.57	0.22	0.35	-
	Ginkgo	0.22 **	0.18 *	0.03 **	-
90 day	Control	0.37	0.27	0.1	-
	Ginkgo	0.24 **	0.22 †	0.02 **	-
180 day	Control	0.39	0.35	0.04	-
	Ginkgo	0.37	0.35	0.02 **	-

表2 カシュー殻液給与が糞便の発酵産物およびガス生成能におよぼす影響

Item	Thai native cattle		Swamp buffaloes	
	Control	CNSL	Control	CNSL
Fermentation parameters				
pH	6.89	7.45 *	6.84	7.12 **
Total SCFA (mmol/g feces)	0.068	0.073	0.057	0.046
Acetate (molar %)	76.5	60.9 **	78	68.4 **
Propionate (molar %)	12.5	22.5 **	12.9	19.6 **
Butyrate (molar %)	7.0	8.8	4.9	8.3 *
Ammonia (mg/g feces)	0.040	0.039	0.038	0.032
Gas production potential				
Total gas (ml/g feces)	0.058	0.018 **	0.027	0.017 **
CO <sub>2</sub> (ml/g feces)	0.046	0.016 **	0.022	0.015 **
CH <sub>4</sub> (ml/g feces)	0.011	0.002 **	0.0043	0.0011 **
H <sub>2</sub> (ml/g feces)	0.0012	0.0008 **	0.0012	0.0009 **

\*, \*\*, 対照に対し有意 ( $P < 0.05$ ;  $P < 0.01$ ).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 小林泰男	4. 巻 91
2. 論文標題 環境調和をみずえる家畜栄養学の展開：温暖化ガスの低減に向けて	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本畜産学会報	6. 最初と最後の頁 304-306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2508/chikusan.91.304	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Okuhira, K., Koike, S., Ito, S., Kobayashi, Y.	4. 巻 91
2. 論文標題 The bio surfactant mannosylerythritol lipid acts as a selective antibacterial agent to modulate rumen fermentation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13464
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13464.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Konda, S., Onodera, R., Kanchanasatit, E., Boonsaen, P., Sawanon, S., Nagashima, K., Suzuki, Y., Koike, S., Kobayashi, Y.	4. 巻 226
2. 論文標題 Effect of cashew nut shell liquid feeding on fermentation and microbiota in the rumen of Thai native cattle and swamp buffaloes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Livestock Science	6. 最初と最後の頁 99-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.livsci.2019.06.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kang S, Suzuki R, Suzuki Y, Koike S, Nagashima K, Kobayashi Y	4. 巻 89
2. 論文標題 Rumen responses to dietary supplementation with cashew nut shell liquid and its cessation in sheep	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 1549-1555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/asj.13100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Su, C., Shinkai, T., Miyazawa, N., Mitsumori, M., Enishi, O., Nagashima, K., Koike, S., Kobayashi, Y.	4. 巻 92
2. 論文標題 Microbial community structure of the bovine rumen as affected by feeding cashew nut shell liquid, a methane inhibiting and propionate enhancing agent	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13503
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13503	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tamori, K., Matsunaga, B., Boonsaen, P., Khongpradit, A., Sawanon, S., Nagashima, K., Koike, S., Kobayashi, Y.	4. 巻 92
2. 論文標題 Feeding cashew nut shell liquid decreases methane production from feces by altering fecal bacterial and archaeal communities in Thai local ruminants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13569
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13569	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Wakai, M., Hayashi, S., Chiba, Y., Koike, S., Nagashima, K., Kobayashi, Y.	4. 巻 92
2. 論文標題 Growth and morphologic response of rumen methanogenic archaea and bacteria to cashew nut shell liquid and its alkylphenol components	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13598
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13598	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shintani, R., Oh, S., Suzuki, Y., Koike, S., Kobayashi, Y.	4. 巻 92
2. 論文標題 Addition of ginkgo fruit to cattle feces and slurry suppresses methane production by altering the microbial community structure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13620
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Narabe, C., Kamiyama, S., Saito, M., Boonsaen, P., Khongpradit, A., Sawanon, S., Suzuki, Y., Koike, S, Kobayashi, Y.	4. 巻 92
2. 論文標題 Cashew nut shell liquid potentially mitigates methane emission from the feces of Thai native ruminant livestock by modifying fecal microbiota	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13614
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13614	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yasuo Kobayashi
2. 発表標題 Recent challenges for mitigation of methane emission from ruminants
3. 学会等名 Korean Society of Rumen Function Studies (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林泰男
2. 発表標題 消化管環境の制御による家畜生産性の向上と代謝障害の予防
3. 学会等名 家畜感染症学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林泰男
2. 発表標題 第一胃微生物からみたウシの疾病と栄養制御
3. 学会等名 大動物臨床研究会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林泰男
2. 発表標題 ルーメン微生物研究グループからの発表
3. 学会等名 第2回畜産分野での温室効果ガス排出削減に向けた研究ネットワーク会合（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kobayashi, Y.
2. 発表標題 Rumen methane suppression toward low carbon ruminant production
3. 学会等名 International webinar on rumen methane suppression Online operated by Seoul National University (September 17) (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kobayashi, Y.
2. 発表標題 Mitigation of methane from cattle through controlling gut microbiota and Fermentation.
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2021. Pacifico Yokohama. (December 13) (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小林泰男 他9名	4. 発行年 2021年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 184
3. 書名 畜産学概論	

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://anim-func-nutr.agr.hokudai.ac.jp/  
動物機能栄養学研究室  
https://www.agr.hokudai.ac.jp/r/lab/animal-function-and-nutrition?from=us

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	鈴木 裕  (Suzuki Yutaka)  (10793846)	北海道大学・農学研究院・助教    (10101)	
研究分担者	小池 聡  (Koike Satoshi)  (90431353)	北海道大学・農学研究院・准教授    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
タイ	Faculty of Agriculture	Kasetsart University	