

平成23年 6月1日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究B

研究期間：2008～2010

課題番号：20380147

研究課題名(和文)反芻動物における温室効果ガス抑制効果を有する天然素材インベントリー

(英文) Inventory of natural manipulators to mitigate greenhouse gases emission from ruminants

研究代表者

高橋 潤一 (TAKAHASHI JUNICHI)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：20111198

研究成果の概要(和文)：

本研究は畜産に起因する温室効果ガスの制御と利用に関する技術開発を目的とし、農畜産系温室効果ガスとしてメタンと亜酸化窒素に焦点を絞り、発酵ガス解析とルーメンフローラ解析により反芻家畜から発生する温室効果ガスに対して天然素材を材料としたプレバイオティクス及びプレバイオティクスを応用した有効かつ安全な制御技術を開発し、制御法インベントリーの構築を行った。

研究成果の概要(英文)：

To develop a technology for the mitigation and utilization of greenhouse gases which are methane and nitrous oxide attributed to animal agriculture, *in vitro* rumen fermentation trials using *in vitro* continuous incubation system and analyses of rumen micro flora ecosystem including methanogens using PCR method were conducted. In consequence, some prebiotics and probiotics were nominated for the inventory of natural manipulators to mitigate greenhouse gases from ruminant animals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2010年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	13,800,000	3,510,000	17,130,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：(1)メタン (2)亜酸化窒素 (3)反芻動物 (4)プロバイオティクス

(5)プレバイオティクス

1. 研究開始当初の背景

反芻動物の第一胃から発生するメタンあるいは摂取飼料粗タンパク質の排泄物中の不消化窒素に由来する亜酸化窒素は強力な温室効果ガスであり、農畜産から発生する主要な温室効果ガスとしてEU、ニュージーランド、カナダ等の京都議定書批准主要畜産国の標的温室効果ガスである。メタンは二酸化炭素の21～23倍及び亜酸化窒素は310倍の温室効果を有し、メタン全体の地球温暖化への寄与率は18%及び亜酸化窒素では6%にも達する。安全

な天然素材としてプロバイオティクスあるいはプロバイオティクス代謝生成物、植物素材等のプレバイオティクスの開発が食の安全と環境保全に緊要な課題である。これまでプロバイオティクス及びプレバイオティクスのメタン抑制効果について *in vivo* 及び *in vitro* 代謝試験において詳細に検討した。しかし、対応するルーメンフローラの解析は未解明で実用性の実証において重要な課題となっている。

本研究はこれまで開催した「畜産における

温室効果の制御と利用」に関する国際会議 (GGAA2001 帯広, GGAA2005 チューリッヒ)における参加国共通の主要課題として農畜産系の強力な温室効果ガスメタンと亜酸化窒素低減法について独自の開発を進めている。しかし、それらのインベントリーについては整備されていない状況にあり、国際的に技術的情報の共有が進められていない。本研究はこれまでの研究成果を基盤にして、さらにルーメンフローラの解析を加えた学術的評価を特徴とし、安全な制御法のインベントリーの開発を目指す。この技術開発によって得られた成果は2008~2012年京都議定書評価年に適用するためのソリューションの相対的評価を可能にし、農畜産系温室効果ガス削減目標に寄与すると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は畜産における温室効果ガスの制御と利用に関する技術開発を目的とし (GGAA2001: eds. Takahashi and Young, 2002; GGAA2006 eds. Soliva et al., 2006)、農畜産系温室効果ガスとしてメタンと亜酸化窒素に焦点を絞り、50%低減を目標値にして「反芻胃モデルによるセルロースからの水素製造技術の開発研究」(平成18年度~平成20年度萌芽研究)成果を応用した発酵ガス解析とルーメンフローラ解析により反芻家畜から発生する温室効果ガスの有効かつ安全な制御技術を開発し、2008~2012年京都議定書評価年に向けた制御法インベントリーを確立する。

3. 研究の方法

農畜産系ターゲット温室効果ガスであるメタン及び亜酸化窒素について安全かつ有効な低減法のソリューションを開発するために、これまで *in vivo* 及び *in vitro* 代謝試験から有効性開発を進めてきた数種のプロバイオティクス及びプレバイオティクスのルーメンフローラ代謝に対する影響を解析した。すなわち、評価系に連続ルーメン発酵リアクターガス計測システムを用い、家畜糞尿のバイオガスプラント発酵消化液中の窒素再循環工程を原理とするアンモニアストリッピング法によって作出するセルロースバイオマス飼料を反芻家畜ルーメン消化・発酵の基質として培養し、ガス代謝変化の解析と同時に真正細菌、古細菌及び真核生物を対象にルーメン内のフローラを解析した。

本研究の最終的な目標は反芻家畜から発生するメタン及び亜酸化窒素低減を目的とした資源循環に重点を置いたソリューション開発であるが、まずインベントリーの効力評価及び安全性確認をルーメンフローラ解析評価システムモデルの構築のために次の基礎実験を実施した。

(1). インベントリーの培養評価系を平準

化するための消化・発酵基質とする低質セルロースバイオマスのアンモニアストリッピング法による高品質飼料作出

まず、東北北海道地域の代表的なソフトセルロース系バイオマスとして小麦稈を用い、高温発酵型バイオガスプラント(既設)に併設したセルロースバイオマスアンモニア処理実験設備(図1:既設)によって亜酸化窒素ソリューション相対評価のための培養基質とした。アンモニアによる小麦稈のアンモノリシス(加安分解)効果はGC-MAS、NMR、IR分析等によるアミド化合物結合の有無を指標として把握した。

(2). インベントリーの培養評価系

次に、以下のプロバイオティクス及びプレバイオティクスをインベントリー候補とし、ルーメン発酵リアクターガス計測システムを用い、ルーメンフィスチュラ装着乳牛のルーメン液をイノキュラム及びアンモニア処理小麦稈を基質としてメタン、亜酸化窒素、二酸化炭素、水素及び窒素発生ガス代謝解析を行った。

- ①枯草菌、乳酸菌、酵母等を主要構成菌とする混合生菌剤
- ②乳酸菌の生産するプロテアーゼ耐性抗菌性物質
- ③βガラクトオリゴ糖
- ④高サポニン含有植物: *Yucca schidigera* 及び *Quillaja saponaria*
- ⑤ネガティブコントロール: モネンシン

(3). ルーメンフローラ解析

①真正細菌、古細菌、真核生物のPCR

PCRに以下のプライマーを用いて変性グラジエントゲル電気泳動(DGGE)法で解析した。真正細菌については341F、907R、341FGC、古細菌は534R、46F、1100R、340F、519R、真核生物はNS1、ITS4、NS7-GC、F1Ra

②真正細菌の定量

PCRに以下のプライマーを用い、制限酵素末端断片長解析(T-RFLP)法で解析した。

FAM-27F、1492r

③古細菌の定量

PCRに以下のプライマーを用い、主に水素酸化性メタン生成菌を標的にして最確PCR

(MPN-PCR)法により解析した。
109F、MB1179R、MC1109R、MG120R、MS821R、MX825R

(4). 試験結果に基づいて安全な反芻家畜からのメタン低減法の確立と窒素資源再循環による亜酸化窒素抑制対策の機能を有するソリューションの検討。

①インベントリー開発のためのメタン及び亜酸化窒素低減効果評価

インベントリーの培養評価系を用い、候補としてあげたプロバイオティクス及びプ

レババイオティクスの温室効果ガス抑制効果を解析するとともに、ルーメンフローラ DNA シークエンス解析を実施し、ソリューションの相対評価を行った。とくに生成ガス、有機酸及び酸化還元電位の変化を中心にルーメンフローラ代謝系の物理・化学性状について影響を評価した。

4. 研究成果

(1) ルーメンメタンマニピュレータとしてのプレバイオティクス及びプロバイオティクス

①混合生菌剤 (BLCS)

BLCS (日本エメラル 静岡) は米ぬか、小麦フスマ、大豆粕などを基質に枯草菌、乳酸菌、酵母、硝化細菌、硫酸還元細菌などの微生物を混合発酵させて製造されている。

構成菌種

・ *Bacillus* 属、*Lactobacillus* 属、*Candida* 属、硝化細菌、メタン酸化菌、硫酸還元細菌、光合成細菌

ルーメンフィスチュラ装着めん羊 4 頭に BLCS 給与し、累積メタン発生量に対する BLCS 給与の影響を評価した。給与 14 日目に 9.3% の減少傾向を示した。また VFA は給与 14 日目の培養試験において、BLCS 給与によって 10.3% 増加する傾向を示した。

BLCS 給与した乾乳牛のルーメン液をイノキュラムとした培養試験において、BLCS 給与はメタン発生量を 33% 減少した。

②乳酸菌の生産するプロテアーゼ耐性抗菌性物質 (PRA)

PRA1: *Lactobacillus plantarum* TUA1490L
PRA2: *Leuconostoc citreum* JCM9698

トマト表面から単離した乳酸菌株 *Lactobacillus plantarum* TUA1490L の生産するプロテアーゼ耐性抗菌性物質 PRA-1 はメタン生成を 98% 低減する効果を示した。

-300mV 以下の高い還元状態で賦活化するメタン生成菌が PRA-1 により抑制されたと推察される。

③βガラクトオリゴ糖

βガラクトオリゴ糖 (GOS) は単独添加の場合でもメタン生成を低減する傾向を示した。

④高サポニン含有植物: ユッカ (*Yucca schidigera*) 及びキラヤ (*Quillaja saponaria*)

ステロイドサポニンの豊富なユッカはプロピオン酸産生を促進し、ルーメンメタン産生

の低減効果を示した。その効果は容量応答を示した。テルペノイドサポニンの豊富なキラヤはルーメン性状においてメタン以外はユッカと同様の効果を示したが、メタンの抑制効果は認められなかった。

(2) PCR-DGGE 法によるルーメンフローラ解析

BLCS ルナシータに含まれる細菌は投与区においてルーメン液から検出されず、ルーメン内において中心的に機能している可能性は低いことが示された。しかし、他の細菌の活性化を通して機能を発揮している可能性は残されている。BLCS ルナシータ投与区においては、*Clostridium thermosuccinogenes*、*Clostridium leptum*、*Succiniclasticum ruminis* が増加しており、いずれの細菌も水素を消費する代謝経路を有することから、メタン発生の低減と関係している可能性があると考えられる。

BLCS 投与区においては多くの場合、対照区と比較してメタン生成菌数の低下が認められた。

(3) 乳酸菌の産生するプロテアーゼ耐性抗菌性物質 (PRA) の影響

まとめ

抗菌物質は真正細菌のグラム陰性菌に対して抗菌効果を有している可能性が高い。抗菌物質によるメタン抑制のメカニズムはモネンシンとは異なると推察される。抗菌物質による抗菌効果だけでなく、抗菌物質添加により増加し *Streptococcus* 属または *Butyrivibrio* 属が産生するバクテリオシンがグラム陽性のメタン生成菌に対して抗菌効果を有している可能性もある。*Streptococcus bovis* は投与によりルーメンアシドーシスを引き起こす危険性があり、プロバイオティクスとして使用する場合には投与方法に注意を払う必要があると考えられる。グラム陰性菌の中で主に *Prevotella* 属の減少によりプロピオン酸の低下が生じている可能性がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

① J. Takahashi. (2011) Some Prophylactic Options to Mitigate Methane Emission from Animal Agriculture in Japan. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 24. 85-94

② O, Hamamoto, J, Takahashi, K, Umetsu. (2010) A new concept of biogas systems for sustainable animal agriculture. *Anim Feed Sci Tech.* in press.

③ S, Kaneko, J, Takahashi. (その他 4 名, 6 番目) (2010). Two-step Saccharification of

rice straw with ammonia-stripping ammonia from the digested slurry of dairy manure in the biogas plant and Clostridium cellulovorans. Proc. GGAA2010. p61

④K, Hirakawa. J, Takahashi. (その他 5 名, 7 番目) (2010). Effect of hydrogen peroxide administration on rumen fermentation of sheep. Proc. GGAA2010. p126.

⑤K, Hirakawa. J, Takahashi. (その他 4 名, 6 番目) (2010). Effect of hydrogen peroxide on ruminal fermentations in vitro. Proc. GGAA2010. p125

⑥T, Nishida. J, Takahashi. (その他 4 名, 6 番目) (2010). Effect of lactose ureide on methane emission and ruminal fermentation in vitro. Proc. GGAA2010. p143

⑦H, Kasuya. J, Takahashi. (2010) Effects of NDF and NFC digestibility on methane emission by lactating Holstein cows fed grass silage-based total mixed ration. Proc. GGAA2010. 129

⑧高橋潤一, 上村正昭, (2009) 畜産バイオマスのアンモニアストリッピングによる燃料電池開発研究, 燃料電池, 9(2), 93-96

⑨高橋潤一, 他 3 名, (2009) 高性能バイオガスシステム-持続型農業に向けた高機能バイオガスシステム, 198, 27-33

⑩J. Takahashi, (2009) Perspective on Greenhouse Gases for Sustainable Animal Agriculture in Developing Countries. SAADC2009, pp30-37,

[学会発表] (計 17 件)

①O, Hamamoto. J, Takahashi. A new concept of biogas systems for sustainable animal agriculture. GGAA2010 2010 年 10 月 4 日

②S, Kaneko. J, Takahashi. (その他 4 名) Two-step Saccharification of rice straw with ammonia-stripping ammonia from the digested slurry of dairy manure in the biogas plant and Clostridium cellulovorans. GGAA2010 2010 年 10 月 4 日

③K, Hirakawa. J, Takahashi. (その他 4 名) Effect of hydrogen peroxide administration on rumen fermentation of sheep. GGAA2010 2010 年 10 月 4 日

④K, Hirakawa. J, Takahashi. (その他 4 名) Effect of hydrogen peroxide on ruminal fermentations in vitro. GGAA2010 2010 年 10 月 4 日

⑤T, Nishida. J, Takahashi. (その他 4 名) Effect of lactose ureide on methane emission and ruminal fermentation in vitro. GGAA2010 2010 年 10 月 5 日

⑥H. Kasuya, J. Takahashi, Effects of NDF and NFC digestibility on methane emission by lactating Holstein cows fed grass

silage-based total mixed ration. GGAA2010 2010 年 10 月 5 日

⑦J. Takahashi, Effects of supplementing β 1-4 galactooligo- saccharides, Yucca shidigera and nisin on methanogenesis, The 3rd ISEP, 2010 年 9 月 6 日

⑧J. Takahashi, Perspective on Carbon and Nitrogen Recycling to Abate GHG For Sustainable AAAP. The 14th AAAP. 2010 年 8 月 26 日

⑨J. Takahashi, Some Prophylactic Options to Mitigate Methane Emission from Animal Agriculture in Japan. The 14th AAAP. 2010 年 8 月 23 日

⑩J. Takahashi, Advanced Biogas Systems for a Renewable Energy Source. Renewable Energy 2010. 2010 年 7 月 2 日

⑪金子志保, 他 3 名, 高橋潤一, アンモニアストリッピング及び微生物を用いる低投入型ソフトセルロースバイオマスの糖化. 日本畜産学会第 112 回大会 2010 年 3 月 28 日

⑫松本哲朗, 他 5 名, 高橋潤一, ルーメンメタン生成に及ぼす過酸化水素の影響. 日本畜産学会第 111 回大会 2009 年 9 月 29 日

⑬金子志保, 他 2 名, 高橋潤一, 農産系セルロースバイオマスとしてのビートトップの高度エネルギー資化, 日本畜産学会第 111 回大会 2009 年 9 月 29 日

⑭J. Takahashi, Possible Uses of Biomass toward, International Symposium of Tropical Agriculture on the Sustainable Utilization and Development Sustainable Animal Agriculture 2009. 2009 年 5 月 15 日

⑮金子志保, 他 3 名, 高橋潤一, 農畜産系未利用バイオマス資源の低インプットによる糖化, 日本畜産学会第 110 回大会, 2009 年 3 月 29 日

⑯J. Takahashi, C. Sar, B. Mwenya, B. Pen, K. Takaura, R. Morikawa-Asa, Effect of nitrate and /or nisin on rumen methanogenesis *in vitro*. The 13th AAAP (2008), 2008 年 9 月 24 日 Hanoi, Vietnam

⑰J. Takahashi, R. Asa, A Tanaka, Uehara., I. Shinzato, Y. Toride and N. Usui, Effects of antibacterial substances derived from lactic acid bacteria on rumen methanogenesis. 2008 年 11 月 26 日, The 10th WCAP Cape Town, South Africa

[図書] (計 2 件)

①高橋潤一, 2010. シーエムシー出版, エコバイオリファイナー-脱石油社会へ移行するための環境ものづくり戦略-, 監修 植田 充美, 田丸浩. シーエムシー出版, バイオガスプラント脱離液のアンモニアストリッピングとセルロースバイオマスのアンモノリシス pp55-64.

②J. Takahashi, 2009. Rural Development Administration Korea. Prespective on GHG control and Agriculture Biomass for Sustainable Animal Agriculture. International Workshop in Apec Member Economies, pp87-97.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 19 件)

①名称：施肥方法、液肥の製造方法、灌漑用水の改質方法及び各方法を実施する装置
発明者：高橋潤一、梅津一孝、浜本修、三崎卓也

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許 PCT/JP2009/001511

出願年月日：2009 年 3 月 31 日

国内外の別：外国

②名称：有機性廃棄物の処理システムおよび方法、有機性廃棄物由来の発酵液の改質方法
発明者：高橋潤一、梅津一孝、宮崎陽子、浜本修、三崎卓也

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許 PCT/JP2009/001510

出願年月日：2009 年 3 月 31 日

国内外の別：外国

③名称：有機性廃棄物処理システム
発明者：高橋潤一、梅津一孝、宮崎陽子、浜本修、三崎卓也

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許 PCT/JP2009/001509

出願年月日：2009 年 3 月 31 日

国内外の別：外国

④名称：メタン発酵システム、飼料製造装置および飼料製造方法

発明者：高橋潤一、梅津一孝、宮崎陽子、浜本修

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許 PCT/JP2009/001461

出願年月日：2009 年 3 月 30 日

国内外の別：外国

⑤名称：施肥方法、液肥の製造方法、灌漑用水の改質方法及び各方法を実施する装置
発明者：高橋潤一、梅津一孝、浜本修、三崎卓也

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許 P2009-047314

出願年月日：2009 年 2 月 27 日

国内外の別：国内

⑥名称：メタン発酵システムおよびそれを利用した肥料製造装置

発明者：高橋潤一、梅津一孝、浜本修、三崎

卓也、久芳良則

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許特願 2009-047312

出願年月日：2009 年 2 月 27 日

国内外の別：国内

⑦名称：植物栽培システム及び水耕栽培システム

発明者：高橋潤一、梅津一孝、浜本修、三崎卓也、

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許特願 2009-046322

出願年月日：2009 年 2 月 27 日

国内外の別：国内

⑧名称：水耕栽培システム

発明者：高橋潤一、梅津一孝、浜本修、三崎卓也、

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許特願 2009-046323

出願年月日：2009 年 2 月 27 日

国内外の別：国内

⑨名称：有機性廃棄物由来の発酵液の改質方法

発明者：高橋潤一、梅津一孝、浜本修、宮崎陽子、三崎卓也、

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許特願 2008-286637

出願年月日：2008 年 11 月 7 日

国内外の別：国内

⑩名称：ガス処理システム

発明者：高橋潤一、梅津一孝、浜本修、三崎卓也、

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許特願 2008-286630

出願年月日：2008 年 11 月 7 日

国内外の別：国内

⑪名称：有機性廃棄物の処理システムおよび方法

発明者：高橋潤一、梅津一孝、宮崎陽子、浜本修、三崎卓也、

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許特願 2008-286299

出願年月日：2008 年 11 月 7 日

国内外の別：国内

⑫名称：水監視システム

発明者：高橋潤一、梅津一孝、宇田津富美子、齊藤政宏、宮崎陽子、浜本修、三崎卓也、

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許特願 2008-286759

出願年月日：2008 年 11 月 7 日

国内外の別：国内

⑬名称：有機性廃棄物の処理システムおよび方法

発明者：高橋潤一、梅津一孝、宮崎陽子、浜本修、三崎卓也、

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許特願 2008-286306

出願年月日：2008年11月7日

国内外の別：国内

⑭名称：有機性廃棄物の処理システム

発明者：高橋潤一、梅津一孝、宮崎陽子、浜本修、三崎卓也、

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許特願 2008-286628

出願年月日：2008年11月7日

国内外の別：国内

⑮名称：メタン発酵システム

発明者：高橋潤一、梅津一孝、宮崎陽子、浜本修、

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許特願 2008-286760

出願年月日：2008年11月7日

国内外の別：国内

⑯名称：非揮発性有機ハロゲン化合物の検出方法

発明者：高橋潤一、梅津一孝、宮崎陽子、浜本修、中村幸夫

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許特願 2008-286758

出願年月日：2008年11月7日

国内外の別：国内

⑰名称：一酸化二窒素の測定方法及び発生制御方法

発明者：高橋潤一、梅津一孝、宮崎陽子、浜本修、中村幸夫

権利者：国立大学法人帯広畜産大学
三井造船株式会社

番号：特許特願 2008-217157

出願年月日：2008年8月26日

国内外の別：国内

⑱名称：一酸化二窒素の測定方法及び発生制御方法

発明者：嘉藤徹、加藤健、根岸明、野崎健、内山俊一、渡邊浩昭、梅津一孝、高橋潤一、濱本修、三崎卓也、丸本隆之

権利者：三井造船株式会社、
独立行政法人産業技術総合研究所、埼玉工業大学、国立大学法人帯広畜産大学

番号：特許特願 2008-118391

出願年月日：2008年7月22日

国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：燃料電池発電プロセス、および燃料電池システム

発明者：高橋潤一、梅津一孝、松本奈美

権利者：高橋潤一、梅津一孝、三井造船株式会社

番号：特許 4605992 号

取得年月日：平成 22 年 10 月 15 日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://tech.obihiro.ac.jp/~takahashikaken/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 潤一 (TAKAHASHI JUNICHI)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：20111198

(2) 研究分担者

梅津 一孝 (UMETSU KAZUTAKA)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：20203581

(3) 研究分担者

小田 有二 (ODA YUJI)

帯広畜産大学・畜産学部・教授

研究者番号：80224244