

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292156

研究課題名(和文) 離乳期子牛における潜在性ルーメンアシドーシスの病態生理解明と制御

研究課題名(英文) Effects of dietary forage and calf starter on ruminal fermentation, microbiota and epithelial adaptation in calves during weaning transition

研究代表者

佐藤 繁 (Sato, Shigeru)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：50455755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：離乳期子牛における潜在性ルーメンアシドーシス(SARA)の発症リスク、免疫および代謝・内分泌機能に及ぼす影響を明らかにする目的で、ルーメンフィステルを装着したホルスタイン種雄子牛を用いて試験を行った。その結果、乾草給与子牛では非給与牛に比べて、ルーメン液pHが離乳後に高値で推移、VFA濃度と末梢血リンパ球機能は高値傾向を示した。また、乾草給与牛のルーメン液細菌叢は、非給与牛に比べて多様性に富むことが明らかとなった。以上のことから、離乳期子牛における栄養管理は、ルーメン発酵および免疫・代謝機能と密接な関連のあることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to investigate the effects of dietary forage and calf starter on the risks for subacute ruminal acidosis (SARA), immune ability, and metabolic capacity in weaning calves. The ruminal pH was significantly higher in the HAY group, and total VFA concentration was not significant between the two groups. The 454 pyrosequencing analysis revealed that the bacterial diversity was significantly higher, and recovered more rapidly from damages during weaning transition in the HAY group compared with the CON group. Ruminal bacterial communities of the two groups distinctly separate from each other after weaning in the PCoA analysis. Meanwhile, 212 DEGs ($P < 0.05$, fold change > 2) could be mapped to a known molecular function in the top upstream regulator and top network analyses by the IPA software, and the proliferation of the rumen epithelium cells was suggested to be regulated by growth factors (TGFB1) and signaling pathways (EGF and IGFBP).

研究分野：産業動物内科学

キーワード：潜在性ルーメンアシドーシス 子牛 ルーメン 離乳 エンドトキシン 代謝・内分泌機能 免疫機能

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、濃厚飼料多給によって乳牛の潜在性ルーメンアシドーシス (SARA) が増加している。ルーメンアシドーシスは、濃厚飼料などの易発酵性飼料の多給により揮発性脂肪酸 (VFA; 乳酸含む) の産生量と吸収量のバランスが崩れてルーメン液 pH が低下し、ルーメン内細菌の死滅によって細胞壁からのエンドトキシン (LPS) 遊離が亢進する病態である。ルーメンアシドーシスの病態が臨床症状として顕在化する急性アシドーシスに比べ、SARA は一過性のルーメン液 pH の低下が繰り返されるため臨床症状が潜在化しやすく、周産期における SARA は代謝病や繁殖障害の原因となることが示唆されている。

(2) 周産期における SARA は臨床現場でも重要視されており、栄養管理と SARA 発症に関する報告が増えている。しかし、子牛の離乳期も易発酵性飼料を多給する時期である。実際、申請者らの予備試験でも離乳期子牛のルーメン液 pH は頻繁に 5.8 以下を示すことを確認している。離乳をスムーズにしながら発育を停滞させないために人工乳 (スターター飼料) や子牛用配合飼料を多給せざるを得ないことから、離乳期の SARA 発症リスクは極めて高いと考えられる。しかし、この時期の SARA が生体機能に及ぼす影響、免疫機能はもとより飼料管理や代謝・内分泌機能についても関連する知見は少ない。

2. 研究の目的

(1) これまで全くアプローチすることができなかったルーメン液 pH について、申請者らが開発した無線伝送式 pH センサーを用い、離乳期の栄養管理による子牛の SARA 発症リスクを明らかにし、免疫および代謝・内分泌機能への影響を解析して、SARA 発症の制御を目指すことを目的とする。

(2) 具体的には、給与飼料の粗濃比、すなわち乾草給与の有無がルーメン液の pH 変動、エンドトキシン産生および発酵性 (VFA、乳酸) に及ぼす影響、また、ルーメン内の細菌叢構成、ルーメンエンドトキシン移行による免疫反応に及ぼす影響を解析する。さらに、離乳期子牛のルーメン細菌叢の不安定化を予防して正常なルーメン発酵機能を維持するために、酵母製剤による離乳期 SARA の制御効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 離乳期飼料の成分構成と SARA 発症との関連

本試験では、ホルスタイン種哺乳雄子牛 20 頭を供試した。6 週齢から離乳を開始して 7 週齢には完全に断乳した。4 週齢時に小径型ルーメンフィステルを装着し、無線伝送式 pH センサーは 6 週齢にルーメンフィステルから投入し、pH と温度データを 10 分間隔で連続

測定し、離乳前 3 週 (4 週齢) から 8 週間 (12 週齢まで) の変動を解析した。SARA 発症の基準は、ルーメン液 pH が 5.6 以下を示す時間が 1 日当たり 3 時間以上とした。給与飼料は 3 週齢から子牛用固形飼料 (スターター) と細切したチモシー乾草を給与し、両飼料への馴致を開始した。子牛は 6 週齢時に乾草給与牛と非給与牛に区分した。離乳前後に 1 週間隔でルーメン液と血液を採材し、VFA (乳酸含む) の濃度と組成割合、エンドトキシン濃度および細菌叢構成 (次世代シークエンス法) のほか、末梢白血球のサブポピュレーションとサイトカイン mRNA 発現を検索した。また、離乳後 3 週にルーメン粘膜上皮を採取し、マイクロアレイ法によって網羅的遺伝子解析を行った。その他、血漿中の炎症関連物質としてエンドトキシン、炎症性サイトカイン、LPS 結合タンパク (LBP) および急性期タンパク濃度を測定中である。なお、血漿中エンドトキシン濃度の測定は、定量的に正確性の高い多血小板血漿を用いた。内分泌機能では血漿中成長ホルモン (GH)、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) およびインスリン濃度の変化を調べ、SARA 発症における炎症反応とインスリン抵抗性の変化について、ルーメン液および血漿中エンドトキシン濃度との関連から解析中である。

(2) SARA 発症子牛におけるルーメンエンドトキシン・カスケードと病態生理の解明

本試験の供試牛と測定項目は、課題 (1) と同様である。特に、実験的離乳期 SARA によってルーメンエンドトキシンが血中に吸収され、免疫機能が低下するか、炎症誘導インスリン抵抗性が亢進するか、そして成長関連ホルモン (GH、IGF-1、甲状腺ホルモン) 分泌が抑制されるかについて検討した。

(3) 離乳期子牛における SARA 制御作用の検証

ある種の酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) にルーメン内の細菌と VFA 産生のバランスを整え、かつ乳酸産生を抑制する作用のあることが報告されている。従って本試験では、酵母製剤によるルーメン発酵調整作用を検討した。本試験の供試牛は課題 (1) で用いた子牛のうち、離乳後の 5 頭を用いて実施した。予め酵母製剤を投与した子牛に対して濃厚飼料を多給して SARA を誘発し、課題 (1) と同様の項目を解析した。

4. 研究成果

(1) 離乳期子牛のルーメン液 pH および VFA 濃度に及ぼす給与飼料の影響: 離乳期子牛のルーメン液 pH は乾草給与牛で離乳後しだいに上昇したが、非給与牛では低値のまま推移した (図 1、図 2)。離乳後におけるルーメン液 pH の日内変動は、給与牛で朝の給仕後に著しく低下したが、非給与牛では低値のまま推移する傾向が見られた。また、ルーメン液 VFA

濃度は給与牛で非給与牛に比べて高値傾向を示した。これらのことから、離乳前後の子牛に対する乾草給与（日量 400-600g）は、ルーメン発酵を促進させる作用があり、ルーメン液 pH の日内変動の出現により pH の 1 日平均値が高値で推移することが示唆された。

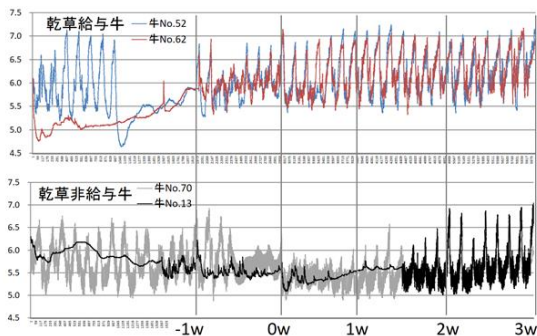


図1. 離乳期子牛における第一胃液pHの変化(個体別)

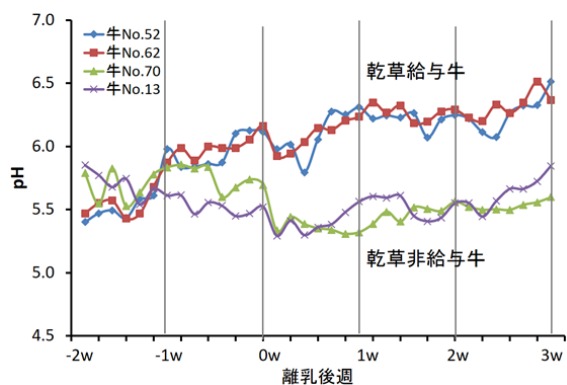


図2. 離乳期子牛における第一胃液pHの変化(個体別・1日平均値)

(2) 離乳期子牛のルーメン液細菌叢構成に及ぼす給与飼料の影響：離乳期子牛におけるルーメン液の細菌叢は、シークエンス解析により乾草給与牛と非給与牛との間で数種類の細菌門 (*Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Firmicutes*) と細菌属 (*Prevotella*) において有意差が認められた(図3)。また、RT-PCR法により乾草給与牛では非給与牛に比べて *Ruminococcus flavefaciens* や *Ruminococcus albus* などの繊維分解菌が有意な高値を示した。これらのことから、離乳期の給与飼料によるルーメン液 pH の低下は、細菌叢の構成と多様性に影響を及ぼすとともに、離乳期のルーメン発酵に影響することが示唆された。

(3) 離乳期子牛のルーメン粘膜上皮における遺伝子発現に及ぼす給与飼料の影響：離乳期子牛におけるルーメン粘膜上皮の遺伝子発現は、マイクロアレイ法による網羅的遺伝子解析の結果、乾草給与牛と非給与牛との間で転移制御(SREBP1)、インスリン様成長因子結合タンパク(IGFBP7、CTGF)、ケトン産生酵素(HMGCL、BDH1、BDH2)および SLC16A3 などの遺伝子発現に差異が認められた。また、成

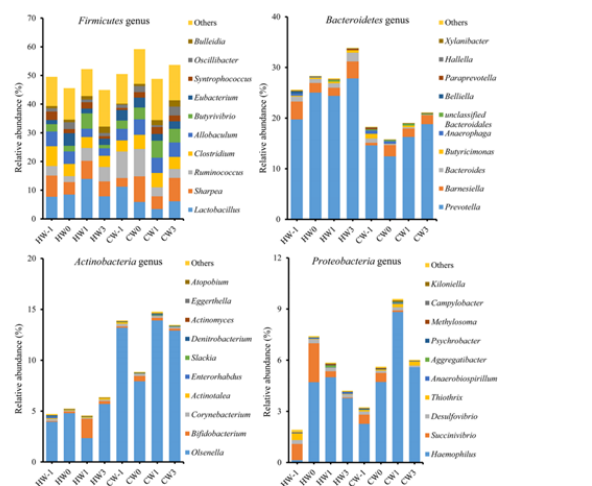


図3. 乾草給与(H)および非給与子牛(C)における離乳前後(W-1~W3)の第一胃液細菌叢構成の変化

長因子(TGFB1)とシグナル経路(EGF、EGFR)遺伝子が upstream regulator として活性化されていた。これらのことから、離乳期の給与飼料によるルーメン液 pH 低下は、粘膜上皮に傷害を引き起こし、これら傷害の回復に関連する遺伝子変動の原因になると考えられた。また、粘膜上皮における成長因子およびシグナル経路遺伝子は、離乳期の給与飼料へ適応し、ルーメンの発達に重要な役割を果たすことが示唆された。

(4) 離乳期子牛の末梢血リンパ球機能に及ぼす給与飼料の影響：離乳期子牛の末梢血リンパ球の CD3、CD8 および WC1 陽性細胞数は、乾草給与牛で離乳 2 週後にわずかな高値傾向を示したが、CD14、CD21 および CD45 に差異はみられなかった。IL-1、IL-6、TNF- α および IFN- γ 濃度は乾草給与牛と非給与牛との間で差異がみられなかった。これらのことから、離乳前後の子牛に対する乾草などの給与飼料は、細胞性免疫機構に影響を及ぼす可能性のあることが示唆された。

(5) 実験的 SARA 誘発子牛の第一胃液 pH に及ぼす酵母製剤投与の影響：予め酵母製剤を投与した子牛では、濃厚飼料多給による SARA 誘発後に無投与対照牛に比べてルーメン液 pH がわずかな低値を示し、SARA 誘発翌日に有意差が認められた。ルーメン液の総 VFA、アンモニア態窒素および乳酸濃度は投与牛と対照牛との間に差異がみられなかったが、酪酸割合は、SARA 誘発翌日に投与牛で有意な高値を示した。これらのことから、供試した酵母製剤は、SARA 誘発直後のルーメン液 pH 低下を軽減する作用はみられないが、pH の回復と発酵を促進する効果のあることが示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kim, Y. H., Nagata, R., Ohtani, N., Ichijo, T., Ikuta, K., and Sato, S. (2016). Effects of dietary forage and calf starter diet on ruminal pH and bacteria in Holstein calves during weaning transition. *Frontiers in microbiology*, 7.
doi: 10.3389/fmicb.2016.01575
- ② Kim, Y. H., Toji, N., Kizaki, K., Kushibiki, S., Ichijo, T., and Sato, S. (2016). Effects of dietary forage and calf starter on ruminal pH and transcriptomic adaptation of the rumen epithelium in Holstein calves during the weaning transition. *Physiological Genomics*, physiolgenomics-00086.
doi:10.1152/physiolgenomics.00086.2016

[学会発表] (計 3 件)

- ① Kim, Y., 渡部祐未, 田路矩之, 木崎景一郎, 一條俊浩, 佐藤 繁 (2016). Effects of dietary forage and calf starter on ruminal pH and transcriptomic adaptation of rumen epithelium in Holstein calves during weaning transition. 第159回日本獣医学会学術集会講演要旨: 443.
- ② Kim, Y., Ohtani, N., Watanabe, Y., Okada, K. and Sato, S. (2015). Effects of dietary forage and calf starter on ruminal pH and bacterial community in Holstein calves during weaning transition. 第158回日本獣医学会学術集会講演要旨: 389.
- ③ Sato, S., Nagata, R., Ikuta, K., Kushibiki, S. and Okada, K. (2014). Effect of hay feeding on pH and volatile fatty acid (VFA) in the ruminal fluid of Holstein calves at weaning. Proceedings of the World Congress on Controversies, Debates and Consensus in Veterinary Medicine, 55-56.

[その他]

特記事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 繁 (SATO Shigeru)
岩手大学・農学部・教授
研究者番号: 5 0 4 5 5 7 5 5

(2) 研究分担者

櫛引 史郎 (KUSHIBIKI Shiro)
農業・食品産業技術総合研究機構・畜産
研究部門・研究員
研究者番号: 3 0 3 5 5 2 1 8