

機関番号：10101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20380146

研究課題名 (和文) メタンの革新的削減をめざしたルーメン発酵制御物質の開発

研究課題名 (英文) Development of innovative rumen modifier to reduce methane production

## 研究代表者

小林 泰男 (KOBAYASHI YASUO)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：50153648

研究成果の概要 (和文)：新規メタン低減物質候補であるカシューナッツ殻油の反芻家畜への給与効果と作用機序について検討した。殻油はルーメン内の細菌の増殖を選択的に抑制することで菌叢が変化し、低メタン・高プロピオン酸生成型の発酵が導かれた。その結果、飼料消化や健康をがい阻害することなく、20%以上のメタン低減が可能となった。このように効果的な天然物質は初めてのもので今後の実用化が期待される。

研究成果の概要 (英文)：Cashew nut shell liquid, a novel rumen modifier, was evaluated for its potential to reduce methane from ruminant animals and possible mechanisms involved in it. The shell liquid selectively inhibited growth of several species of rumen bacteria to lead a dramatic shift of rumen microbiota. This resulted in rumen fermentation changes with less methane and more propionate production but without adverse effects on feed digestion and animal health. The feeding of shell liquid allowed more than 20% reduction of methane that had not been realized by any other modifiers. Therefore, future application of the shell liquid is highly expected.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：家畜栄養学

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：ルーメン、メタン、発酵、微生物、栄養

## 1. 研究開始当初の背景

反芻家畜からのメタン放出は全地球放出量の 15-20%と見積もられ、その 95%が第一胃 (ルーメン) 発酵由来とされる。地球温暖化の緩和にむけて、全世界で 31 億頭にのぼる反芻家畜からのメタン放出の削減は不可欠である。これまで飼料構成の再考慮や、飼料添加物の利用でメタン生成の低減および飼料エネルギーの有効利用がはかられてき

た。最もメタン低減に効果的であったイオノフォア抗生物質モネンシンは、耐性微生物の出現などの懸念を通じた食の安全・安心志向の高まりから、その使用を禁止する地域 (EU) や、今後の継続使用に慎重な地域 (日本他) がある。現在は、天然物由来の安全な抗菌性物質などが注目を浴び、早晚モネンシンに置き換わるものが見出されることに期待が寄せられている。

欧州ではハーブ由来の精油からなる添加物が商業ベースにのっている。また日本では中鎖脂肪酸もしくはそれを含む植物油がモネンシン様の作用を有することが見出されてきた。精油については、モネンシンの作用のうち脱アミノ反応抑制を介した飼料タンパク質節約作用のみが顕著である。後者にはメタン低減・プロピオン酸増強というモネンシン様作用がみられるものの、モネンシンには及ばない。このように現在流通中もしくは開発中の物質はいずれも効果においてモネンシンに劣り、代替物にはなりえていない。それゆえ、メタン低減を革新的に進める資材の探索をさらに活発に継続すべきである。

ルーメンでのメタンは繊維分解微生物の代謝産物である水素やギ酸を基質にメタン菌が合成する。したがってメタンを削減するには、水素やギ酸生成を抑制するか、メタン菌を抑制するのが常道と思われがちだが、これでは繊維消化自体が低下するため意味がない。もっとも大切なのは、繊維分解で生じた水素やギ酸をメタン生成以外の経路で代謝することである。このためにはメタン生成以外の水素処理経路であるプロピオン酸合成（フマル酸還元）、還元的酢酸生成、硝酸・亜硝酸還元などを増強する必要がある。中でも実用的とされるのが「プロピオン酸生成の増強」であり、これにはプロピオン酸生成にかかわるルーメン細菌の占有率をあげ、それ以外の細菌を選択的に阻害する抗菌効果を有する天然物を探索することが肝要である。

研究代表者のグループは、2007年度よりこれまで塗料などの用途としての実績しかない特殊植物油（カシューナッツ殻油）の選択的抗菌作用に着目し、ルーメンからのメタン削減効果を有するかについて予備評価してきた。一連の *in vitro* 試験により、カシューナッツ殻油はメタン生成を約 50% から最大で 98% も抑制する一方で、飼料消化を阻害しないことを発見した。同時にプロピオン酸生成を 1.5-2.0 倍に高めることも観察している。これらの値はモネンシンのそれを凌ぐもので、革新的なメタン削減を期待させる天然物質と言える。

しかし本物質の最終応用の場は肉・乳牛の生産現場である。試験管内現象としての効果のみならず、生体内での作用機序の解明と効果の持続性、さらに家畜やその生産物における安全性を評価したあとで、普及試験に移るべきで、より実際の状況に近い中での作用機序の特定と安全性の検証は欠かせない。代表者は 80 年代に国産のイオノフォア抗生物質サリノマイシンについて同様な検討を精力的にこなし、飼料添加物としての使用認可に貢献した経緯がある。当時よりもルーメン微生物の解析技法に著しい進展がある今、より迅速かつ精密な評価が期待できる。

以上を総合すると、カシューナッツ殻油の給与により、1) メタンの削減による温暖化緩和への貢献、2) メタン低減とプロピオン酸増強による飼料利用効率の改善、が期待できる。

## 2. 研究の目的

(1) カシューナッツ殻油の抗菌作用の検証を、主要ルーメン菌を用いて純菌レベルで実施する。これにより抗菌スペクトラムを作成し、主要反芻家畜への活用の基礎情報とする。一方、カシューナッツ殻油を投与した人工ルーメンや実際の家畜ルーメンにおける菌構成をモニタリングし、菌叢の変化をとらえる。これらにより殻油の効果発現機序について推定する。

(2) カシューナッツ殻油を投与した人工ルーメンおよび実際の家畜（ヒツジ、ヤギおよびウシ）を材料に、メタン生成の減少を精密定量するとともに、プロピオン酸生成の増加の程度を知る。これらにより、殻油の給与効果のインパクトを知る。

(3) ルーメン上皮細胞の分裂増殖におよぼす影響を細胞培養系で査定するとともに、殻油を給与した家畜の血液性状や臨床所見から、安全性についての基盤情報を得る。

以上の(1)～(3)を通して、カシューナッツ殻油の有する選択的抗菌作用、発酵改善作用およびその安全性について、多角的な検証を試みることを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 選択的抗菌作用

カシューナッツ殻油のルーメン菌に対する抗菌スペクトラムを決定した。すなわち、13種のルーメン菌を純粋培養し、そこに殻油を段階的に添加することで、生育を抑制する最小濃度(MIC)を測定した。これにより抗菌作用の選択性について明らかにした。

またカシューナッツ殻油投与および非投与の人工ルーメンおよび家畜（ヒツジおよびウシ）からルーメン内容物を採取し、そこからDNAまたはRNAを抽出した。これらを用い、PCR/DGGEによる菌叢変動や16SrDNA（真正細菌）およびメチルコエンザイムレダクターゼA遺伝子（古細菌）のライブラリー塩基配列解析を実施した。これらを通して菌叢構成メンバーの殻油給与前後の違いについて精査した。

### (2) 発酵改善作用

カシューナッツ殻油を投与もしくは非投与の家畜（ヒツジ、ヤギおよびウシ、各々4頭使用）のメタン放出量を定量した。ただし、

ヒツジについては間接定量となるルーメン液培養積算法で、ヤギおよびウシについては直接精密定量となるチャンパー法によった。カシューナッツ給与期間は2-3週で、給与レベルは体重100kg当たり4gとした。同時にルーメン内の主要発酵産物や消化率も測定し、穀油の給与がルーメン発酵および飼料消化に及ぼす影響を査定した。

### (3) 安全性

ルーメン上皮細胞初代培養系へカシューナッツ殻油を段階的に異なる量で加え、3日間の培養後の細胞数(トリパンプルー色素排除法とMTT変法)と細胞形態を解析した。比較にはモネンシンを用い、増殖やアポトーシスについて観察することで、急性毒性について検討した。また殻油給与牛(3頭)の血液一般成分を分析するとともに、臨床症状などから健康への影響について判断した。

## 4. 研究成果

### (1) 選択的抗菌作用

カシューナッツ殻油のルーメン菌に対する抗菌スペクトラムから、水素やギ酸を生成するルーメン菌を阻害し、プロピオン酸やコハク酸(プロピオン酸前駆体)を生成するルーメン菌を生育阻害しないことが明らかだった。また殻油投与および非投与の人工ルーメンから内容物を採取し、Real-time PCR定量による主要菌群(種)の動態について精査したところ、殻油投与により菌叢は顕著に変化し、上記抗菌スペクトラムを反映する菌叢構成に変わることが確認できた(図1)。特にプロピオン酸生成に貢献する *Megasphaera* が殻油給与時に優勢となった。

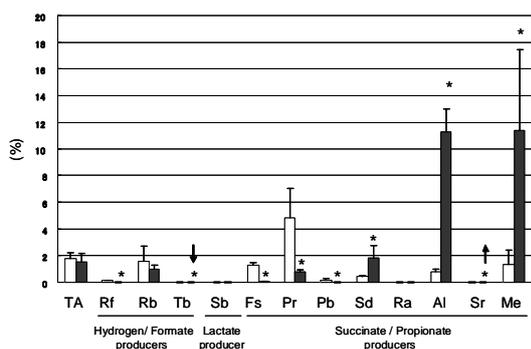


図1. カシューナッツ殻油投与にともなう人工ルーメン内の各種菌種(菌群)の相対比率の変化(リアルタイムPCRによって定量した各菌種の16S rDNAコピー数を総細菌のそれと比べて求めた%として図示した)

TM, total methanogenic bacteria; Rf, *Ruminococcus flavefaciens*; Rb, *Ruminococcus albus*; Tb, *Treponema bryantii*; Sb, *Streptococcus bovis*; Fs, *Fibrobacter succinogenes*; Pr, *Prevotella ruminicola*; Pb, *Prevotella bryantii*; Sd, *Succinivibrio dextrinosolvens*; Ra, *Ruminobacter amylophilus*; Al, *Anaerovibrio lipolytica*; Sr, *Selenomonas ruminantium*; Me, *Megasphaera elsdenii*. □, Control; ■, Raw cashew nut shell oil. 矢印は有意な増加または減少を示す。

実際に殻油を給与したヒツジやウシのルーメンでも菌叢構成の変化は顕著であった。すなわち、ヒツジにおいては、真正細菌のうち *Treponema* に代表される水素やギ酸生成

菌検出頻度の減少、*Selenomonas* や *Megasphaera* に代表されるプロピオン酸生成関連菌の検出頻度の増加が明確にみられた。一方で、古細菌においては、通常ルーメンでよく検出される *Methanobrevibacter smithii* や *Methanobrevibacter ruminantium* が減少し、稀少種である *Methanobrevibacter wolinii* や *Methanobrevibacter woesei* が大きく検出頻度を上げた。総古細菌数はカシューナッツ殻油給与で変化がないことから、主要種が、おそらくメタン生成能が低い稀少種におきかわったのであろうと推察された。

殻油を給与したウシにおいては、プロピオン酸生成に関連する *Succinivibrio dextrinosolvens* や *Ruminobacter amylophilus* の増加が明確であった。古細菌では、カシューナッツ殻油の給与にともない *Methanomicorobium mobile* の増加が顕著だった。これらの情報は、カシューナッツ殻油が真正細菌ばかりでなく、メタン生成古細菌にも選択的に作用し、菌叢を変化させていることを強く示唆している。

### (2) 発酵改善作用

ヤギを用いた試験では、殻油投与により個体間変動は大きいものの、最大で27%のメタン低減が認められた。

ウシを用いた試験では、殻油給与により平均で38%、最大で55%のメタン低減が実測された。その際、大幅なプロピオン酸比の増加も確認できた。ただし、消化率の減少が同時に観察されたため、消化に負の影響を及ぼさない殻油給与法(馴致期間など)について、確定させる必要が感じられた。

そこで、別途開発したカシューナッツ殻油製剤を用い、上記と同じ殻油給与レベルではあるものの、長期(3週間)馴致して同様な測定を実施したところ、消化率を低下させることなくメタン生成量が平均で21%低減した(表1)。このことから、カシューナッツ殻油給与(殻油原物換算で4g/100kg体重)はメタン低減に有効であること、適切な馴致を設けると消化阻害を起こすことなく、2割以上のメタン削減を期待できることがわかった。

表1. カシューナッツ殻油を給与したウシのメタン生成

	対照区	3g/100kg体重 添加区	4g/100kg体重 添加区
メタン/乾物摂取量 kg	38.3 <sup>b</sup> (100)	35.1 <sup>ab</sup> (91.6)	30.9 <sup>a</sup> (80.7)
メタン/可消化乾物 摂取量kg	54.1 <sup>b</sup> (100.0)	47.1 <sup>ab</sup> (87.1)	42.4 <sup>a</sup> (78.4)
メタン/可消化有機物 摂取量kg	55.5 <sup>b</sup> (100)	48.5 <sup>ab</sup> (87.4)	43.7 <sup>a</sup> (78.7)

a, b: 異符号間に有意差あり ( $P < 0.05$ )

### (3) 安全性

ルーメン上皮細胞培養系に殻油を加え、細胞の形態、生存性などを指標に安全性の評価をしたところ、モネンシンでは 5ppm の添加濃度でやや細胞毒性が認められたのに対し、同レベルの殻油添加はまったく悪影響を及ぼさなかった。

カシューナッツ殻油を給与したウシの血液検査を実施したが、中性脂肪、コレステロール、グルコース、3-ヒドロキシ酪酸、アルカリ性フォスファターゼなど、主要 20 項目の一般検査値に違いはなく、臨床的には問題がないと判断された。

以上から、カシューナッツ殻油のメタン低減作用機序がほぼ特定できた。さらに、ウシへの殻油給与により 20%以上のメタンを削減できること、血中指標値は正常範囲にあり、ウシの健康に問題はないことがわかった。ルーメン上皮に対する急性毒性はないが、最終的には長期継続給与にともなう観察を経た判断が妥当と思われる。

本課題で評価したカシューナッツ殻油は既存のメタン低減剤（抗生物質）の 2 倍以上の効果をもつ革新的なものであることを明らかにできた。

### 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 3 件)

- ① 小林泰男. 家畜からのメタン生成を低減する天然物質の探索 (ミニレビュー). 日本農薬学会誌. 36:124-126. 2011. 査読有.
- ② Watanabe, Y., R. Suzuki, S. Koike, K. Nagashima, M. Mochizuki, R. J. Foster and Y. Kobayashi. In vitro evaluation of cashew nut shell liquid as a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent for ruminants. Journal of Dairy Science. 93: 5258-5267. 2010. 査読有.
- ③ Kobayashi, Y. Abatement of methane production from ruminants: trends in the manipulation of rumen fermentation (総説). Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 23:410-416. 2010. 査読有.

[学会発表] (計 13 件)

- ① Kobayashi, Y. Methane reduction from ruminants by using cashew nut shell liquid containing rare phenolic compounds. GRA -Rumen Microbial Genomics Workshop, Palmerston North, New Zealand. Feb. 25-26, 2011.

- ② Kobayashi, Y., R. Suzuki, Y. Watanabe, S. Koike, M. Mochizuki and K. Nagashima. Cashew nut shell liquid, a novel candidate feed additives for ruminants: potency as a methane-reducing agent. Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference, Banff, Canada, October 3-8, 2010.

- ③ Hayashi, S., Y. Watanabe, R. Suzuki, S. Koike, K. Nagashima, M. Mochizuki and Y. Kobayashi. Bacterial and archaeal community shifts by feeding of the novel methane-reducing agent cashew nut shell liquid. Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference, Banff, Canada, October 3-8, 2010.

- ④ Su, C., T. Shinkai, M. Mitsumori, O. Enishi, K. Nagashima, M. Mochizuki, S. Koike and Y. Kobayashi. Effect of cashew nut shell liquid on bacterial and archaeal community in the rumen of cattle. Greenhouse Gases and Animal Agriculture Conference, Banff, Canada, October 3-8, 2010.

- ⑤ 林秀輔・渡部優・鈴木亮・小池聡・長嶋協・望月正己・小林泰男. 新規メタン低減剤カシューナッツ殻液によるヒツジルーメン内細菌叢の変動. 第 65 回北海道畜産学会. 道立総合研究機構畜産試験場 (新得). 2010 年 9 月 9 日 (講演要旨 p21).

- ⑥ Kobayashi, Y. Methane reduction and associated microbial changes in the rumen. 2nd International Symposium on Gastrointestinal Microbiology. Nanjing, China, May 23-25, 2010.

- ⑦ 渡部 優・鈴木 亮・小池 聡・長嶋 協・望月 正己・小林 泰男. カシューナッツ殻液給与がヒツジルーメンの真性細菌およびメタン細菌叢におよぼす影響. 日本畜産学会第 112 回大会. 明治大学. 2010 年 3 月 28-29 日 (講演要旨 P12).

- ⑧ 嵩 千里・真貝 拓三・三森 真琴・永西 修・長嶋 協・望月 正己・小池 聡・小林泰男. カシューナッツ殻液給与がウシルーメン菌叢に及ぼす影響. 日本畜産学会第 112 回大会. 明治大学. 2010 年 3 月 28-29 日 (講演要旨 P12).

- ⑨ Kobayashi, Y. Abatement of methane production from ruminants: trends in the manipulation of rumen fermentation. International Symposium on Improvement of Feed Efficiency through Biotechnology, Beijing, China, Nov. 16, 2009.

- ⑩ 林秀輔・鈴木亮・小池聡・小林泰男・長嶋協・望月正己・伊藤真治・金田晃一. 新規天然抗菌物質が各種ルーメン細菌の増殖

に及ぼす影響. 北海道畜産学会第 64 回大会. 道立根釧農業試験場. 2009 年 9 月 8-9 日 (講演要旨P24).

⑪嵩千里・鈴木康之・小池聡・小林泰男・長嶋協・望月正巳・伊藤真治・金田晃一. 新規天然抗菌物質によるルーメン発酵制御作用の評価. 北海道畜産学会第 64 回大会. 道立根釧農業試験場. 2009 年 9 月 8-9 日 (講演要旨P24).

⑫Watanabe, Y., R. Suzuki, S. Koike, K. Nagashima, M. Mochizuki and Y. Kobayashi. Potency of cashew nut shell liquid as a methan-reducing and propionate-enhancing agent for ruminants. The 7th Korea-Japan-China Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology, Seoul, Korea, Aug. 5-8, 2009.

⑬Kobayashi, Y. Anaerobic rumen microbes involved in methane reduction by dietary manipulations. The 6th International Symposium on Anaerobic Microbiology, Liblice, Czech Republic, Jun. 19, 2009.

[図書] (計 1 件)

小林泰男. 第 3 章「家畜の消化機能」および第 6 章「家畜と温暖化」, 気象ブックス (畜産と気象), 柴田正貴・寺田文典編, 成山堂, 東京, 2010. 31-49, 123-127, 150-158.

[その他]

報道関係

世の中面白研究所. NHK ラジオ第一, 2008 年 7 月 7 日.

Touch Eco 2008, NTV. 2008 年 6 月 20 日  
エコアイデアツアーメタンガス編, National. 山手線トレインチャンネル, 2008 年 6 月 2 日.  
ネイチャー特集, 読売新聞. 2008 年 5 月 19 日

What's up Japan?. NHK 国際ラジオ. 2008 年 5 月 5 日.

ゲップ減らして地球を守れ. ゆうどきネットワーク (NHK 東京), 2008 年 4 月 4 日.

牛ゲップ対策で新発明. ワイド! ス克蘭ブル, TV 朝日, 2008 年 4 月 3 日.

メタンガス削減新物質発見. まるごとニュース北海道 (NHK 札幌), 2008 年 3 月 27 日.  
牛のゲップ減らす物質発見. (NHK ニュース、朝ズバ、特ダネ、スッキリ他), 2008 年 3 月 25 日.

牛の餌にカシューナッツの油でメタン 9 割抑制. 北海道新聞 (他 7 紙), 2008 年 3 月 25 日.

ホームページ等

<http://www.agr.hokudai.ac.jp/anim/nutr/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 泰男 (KOBAYASHI YASUO)  
北海道大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号: 50153648

(2) 研究分担者

小池 聡 (KOIKE SATOSHI)  
北海道大学・大学院農学研究院・助教  
研究者番号: 90431353  
永西 修 (ENISHI OSAMU)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・チーム長  
研究者番号: 20355069  
竹中 昭雄 (TAKENAKA AKIO)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・チーム長  
研究者番号: 40155031  
(H20 のみ。H21 からは異動につき外れる)