

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580376

研究課題名(和文) マイコトキシンの牛ルーメン内代謝機構の解明とプロバイオテックスによる制御

研究課題名(英文) Mycotoxin effect on bovine rumen fermentation and its control by probiotics

研究代表者

板橋 久雄 (Itabashi, Hisao)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・客員教授

研究者番号：00280991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：牛用飼料のマイコトキシンのルーメン発酵に及ぼす影響とプロバイオテックスなどによるその制御について培養実験により検討した。添加したデオキシニバレノール(DON)またはゼアラレノン(ZEN)はルーメン内の揮発性脂肪酸(VFA)濃度などを低下させ、ルーメン発酵を抑制したが、その影響はZENの方がDONよりも大きかった。DONとZENの一部はルーメン微生物により代謝され、培養20時間では約50%が分解された。この分解には、ルーメン細菌よりもプロトゾアの方が大きく関わっていた。

二糖類や酵母などの生菌剤はDONとZENの分解を促進することが明らかとなり、畜産現場で実用可能なことが示された。

研究成果の概要(英文)：Effects of deoxynivalenol(DON) and zearalenone(ZEN) on in vitro ruminal fermentation and their breakdown in the rumen were conducted. These mycotoxins suppressed volatile fatty acid production and rumen fermentation. The effects by ZEN were greater than that by DON. A part of these mycotoxins was degraded by rumen microorganisms, being protozoa are more active than bacteria.

Degradation of mycotoxins was increased by the addition of some probiotics or prebiotics, such as trehalose and yeast. This indicates that these supplements could be used as anti-mycotoxin reagents in the field of ruminant production.

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：ルーメン微生物 カビ毒 デオキシニバレノール ゼアラレノン 揮発性脂肪酸 プロバイオテックス
トレハロース プロトゾア

1. 研究開始当初の背景

マイコトキシンは、カビが産生する二次代謝産物のうちヒトや動物に有害な化合物の総称であり、飼料に含まれるマイコトキシンを家畜が摂取した場合、飼料摂取量の低下、下痢や繁殖障害などの中毒症状発生により、家畜生産性に甚大な影響を及ぼすことが明らかとなっている。

300種類もあるマイコトキシンのうち、アフラトキシン B1、デオキシニバレノール (DON)、ゼアラレノン (ZEN) の3種類については、飼料安全法において対象家畜・飼料の種類ごとの許容基準値が定められており、飼料流通と使用にあたり特に注意を要する。(独)農林水産消費安全技術センター (FAMIC)による輸入飼料原料モニタリング検査の最近の結果からは、頻繁に DON, ZEN が検出されており、健康被害のリスクに対して適切に対処する必要性が高まっている。

牛でのマイコトキシンによる中毒の多くは慢性的なものであり、給与飼料の変更や気象環境などのストレス要因と複合して顕在化しやすい特徴があり、一種の生産病として今後も重要な問題となっている。全国の乳牛で1%がこの被害をうけ10%の生産乳量の低下が起こるとすると、その損失規模は年間約 8,000 t となり、約 7 億円規模の損失が発生すると試算される。

最近、特に DON を対象とした無毒化法について検討されているが、市販のマイコトキシン吸着剤 (鉱物類を主成分とする) の使用では DON はほとんど吸着されず、効果が期待できないとされている。つまり DON と ZEN については、混入リスクが極めて高いにもかかわらず、動物消化管内におけるその無毒化のための方法は確立されていない。

我々は、DON の一部がルーメン微生物によって分解されることを最近明らかにした

(Jeong et al., Anim. Feed Sci. Technol., 2010、) 代謝中間物質の一つとしては de-epoxy-DON が考えられ、また、ZEN も一部分解されると予想される。しかし、分解のメカニズム、代謝中間産物、分解に関与する微生物については解明されていない。また、これらのルーメン内分解に及ぼす飼料の影響も不明であり、腸内細菌による分解も考えられる。

近年、これらの消化管内での分解を促進し、解毒に有効なものとしてプロバイオテックス (生菌剤) が注目され、家禽ではその効果が明らかにされた (Food Additives and Contaminants, 27, 510, 2010)。しかし、反芻家畜についてはほとんど検討されていない。

2. 研究の目的

牛でのカビ毒マイコトキシンへの対処法としては鉱物類を主成分とする各種の吸着剤の利用があるが、その効果は明確でなく、飼養現場では適切な対応ができていないのが現状である。DON と ZEN の一部はルーメン微生物によって分解されることが明らかにされているが、その機序等は解明されていない。

本研究では、試験管内培養実験により、モデル的に DON と ZEN がルーメン発酵に及ぼす影響を調べ、ルーメンでの分解機序と関与する微生物を検索し、その後、数種のプロバイオテックスおよびプレバイオテックスの添加によるマイコトキシンの分解・無毒化の促進効果を明らかにすることを目的とする。

本研究は学術面での特色だけでなく、畜産業界において喫緊の課題である飼料マイコトキシン汚染による家畜生産性低下への対処についての指標を提供できる実用的意義も有しており、研究成果の応用利用の余地が十分存在する点でも大きなインパクト

を持つと考えられる。生産現場レベルにおいて、飼料給与・添加技術によりルーメン微生物群を活性化させることにより、中毒を軽減・無毒化させ飼料効率を向上させる取り組みは、酪農・肉牛農家に抵抗なく受け入れられ普及するものと期待される。

3. 研究の方法

本研究では、マイコトキシンの中で重要な DON と ZEN について、初めにルーメン発酵と微生物に及ぼす影響を検討した。次に、DON と ZEN のルーメン内での分解・消失の様相を継時的に調べるとともに、分解に関与する微生物について検討した。さらに、各種のプロバイオテックスやプレバイオテックスの添加がルーメン発酵・微生物とマイコトキシンの分解・消失に及ぼす影響について検討した。

培養実験では、牛ルーメン液をバッファーで希釈し（1：2）培養瓶に 30 ml ずつ入れ、38℃ で 10～20 時間、嫌氣的に培養した。基質は乾草および濃厚飼料単独、および乾草 + 濃厚飼料とし（各 200 mg）、DON または ZEN を 0.5ppm 添加し培養した。

培養終了後、発酵産物をガスクロ、高速液クロ等により分析し、マイコトキシンとその分解中間産物を高感度液体クロマト質量分析計により分析した。

(1) ルーメン発酵に及ぼす DON と ZEN の影響

培養液に DON または ZEN を 0.5 ppm 添加し、ルーメン発酵に及ぼす影響を検討した。添加する基質は乾草 + 濃厚飼料とした。20 時間まで嫌氣的に培養し、終了後、総ガス・メタン発生量、揮発性脂肪酸（VFA）濃度、pH、アンモニア濃度、プロトゾア数を測定した。

(2) DON と ZEN の分解パターンとそれに及ぼす微生物の影響

上記(1)と同様な培養系で、DON と ZEN の濃度変化を培養 20 時間後まで調べた。また、新鮮なルーメン液より、混合細菌と混合プロト

ゾアの懸濁液、および無細胞ルーメン液を調製し、分解に及ぼす微生物の影響を調べた。

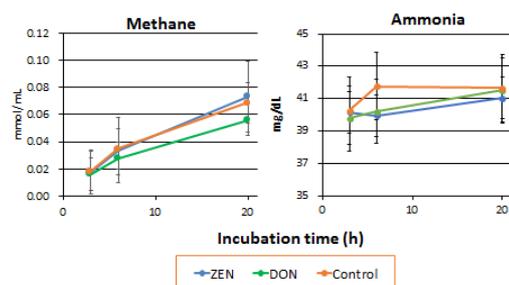
(3) DON と ZEN の分解に及ぼすプロバイオテックスとプレバイオテックスの影響

ルーメン微生物を活性化、DON と ZEN の分解を促進すると考えられるプロバイオテックスとプレバイオテックスを培養液に添加し、ルーメン発酵とマイコトキシンの分解に及ぼす影響を検討した。プロバイオテックスとしては、(A) 乳酸菌・糖化菌・酪酸菌の混合物、(B) 酵母の 2 種類を用い、プレバイオテックスとしては、(a) トレハロース、(b) セロピオースの 2 種類を用いた。これらの添加濃度は培養液基質の 3% とした。

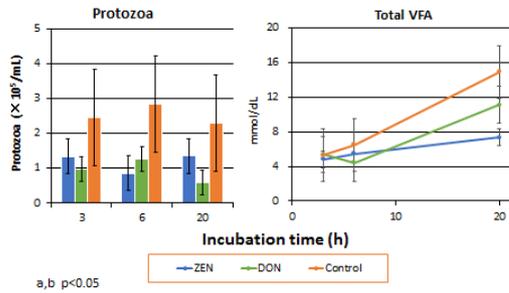
4. 研究成果

(1) ルーメン発酵に及ぼす DON と ZEN の影響

DON または ZEN の添加により、ルーメン pH は大きく変化せず、培養期間中ほぼ正常に維持された。総ガス発生量とメタン発生量は DON 添加により抑制された。アンモニア濃度は培養の初期に DON と ZEN の低下により低下した（下図）。



総 VFA 濃度とプロトゾア数は培養の初期から DON と ZEN の添加により低下した。培養 20 時間後での総 VFA 濃度は、DON 添加よりも ZEN 添加の方が低かった。



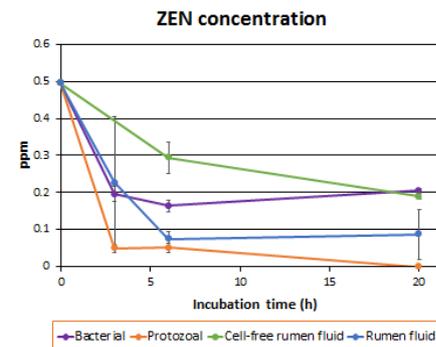
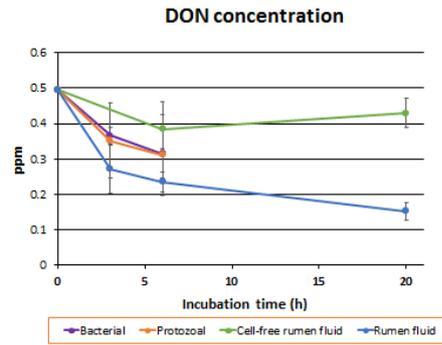
これらの結果は、マイコトキシンの添加によりプロトゾアの活性が抑制され、基質（飼料）の分解が低下したことを示している。今回の試験では細菌に及ぼす影響は検討できなかったが、プロトゾアと同様に細菌の活性もマイコトキシンにより影響されたと考えられる。

(2) DON と ZEN の分解パターンとそれに及ぼす微生物の影響

DON 濃度は培養 3 時間までに混合微生物系では約 50% に低下したが、無細胞ルーメン液系ではほとんど低下しなかった。細菌系とプロトゾア系では、DON の濃度変化はほぼ同様であり、培養 6 時間後では初期濃度の約 60% に低下した。

ZEN 濃度は培養 3 時間までに混合微生物系では約 40% に低下し、無細胞系でも約 80% に低下した。細菌系では培養 3 時間後から約 40% の濃度となり、20 時間後まで大きく変化せず推移した。プロトゾア系では 3 時間後では約 40% となり、6 時間後には約 20% に低下し、以後 20 時間後まで大きく変化せず推移した。

これらの結果は、DON は ZEN に比べ分解されにくく、これらの分解には細菌よりもプロトゾアの方が寄与の程度が高いことを示している。

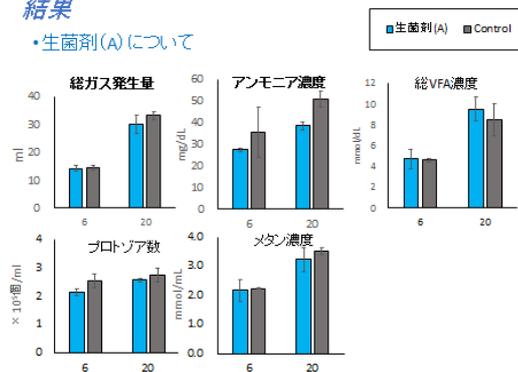


(3) DON と ZEN の分解に及ぼすプロバイオテックスとプレバイオテックスの影響

生菌剤 (A) (乳酸菌・糖化菌・酪酸菌の混合物) の添加により、総ガス発生量、メタン発生量、プロトゾア数には大きな変化は認められなかったが、アンモニア濃度は低下し、VFA 濃度は増加した。

結果

・生菌剤 (A) について



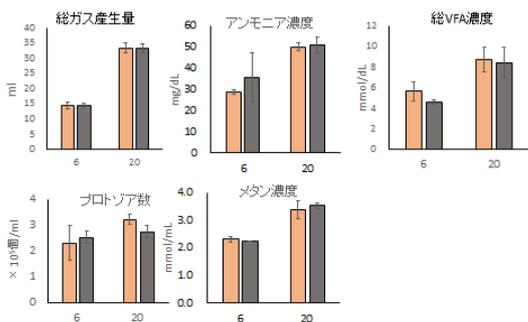
生菌剤 (B) (酵母) の添加により、総ガス発生量、メタン発生量、アンモニア濃度には大きな変化は認められなかったが、VFA 濃度は培養 3 時間目から増加し、20 時間後でも高かった。プロトゾア数は培養初期から増加し始

め、20 時間後では約 15% 増加した。

これらの結果は、生菌剤の添加により、微生物の活性が高まり、発酵産物の中で有用な VFA の生成が促進されたと考えらえる。

結果

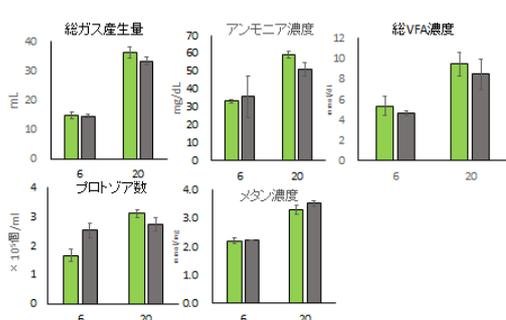
・生菌剤 (b) について



次に、二糖類 (a) (トレハロース) の添加により、総ガス発生量、アンモニア濃度、総 VFA 濃度、プロトゾア数が顕著に増加し、メタン発生量はやや低下した。

結果

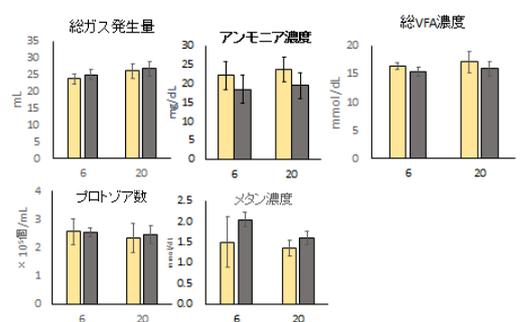
二糖類 (a) について



二糖類 (b) (セロビオース) の添加により、総ガス発生量、プロトゾア数は変化しなかったが、アンモニア濃度と VFA 濃度は上昇し、メタン発生量は低下した。

結果

二糖類 (b) について



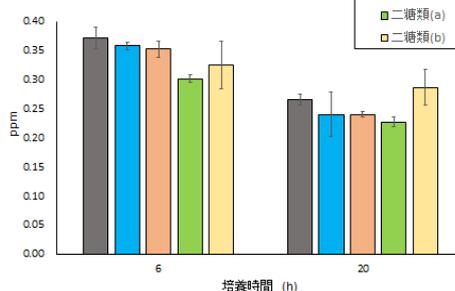
以上より、これらの 2 糖類は微生物の活

性を高め、ルーメン発酵を促進し、VFA などの発酵産物の生成が高まったと考えられる。

次に、DON 濃度は培養 6 時間において、無添加の対照区では 0.35ppm であり、二糖類 (a) (トレハロース) 添加区では 0.30ppm と最も低下した。また、培養 20 時間においては、トレハロース添加区では 0.22ppm まで低下したが、対照区では 0.26ppm であった

結果

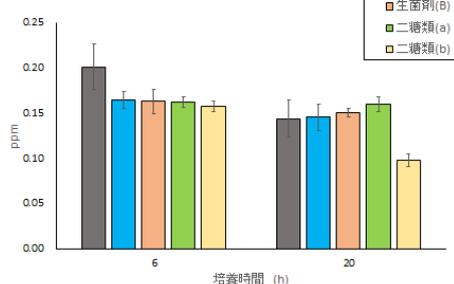
DON の消失について



ZEN 濃度は培養 6 時間で無添加対照区において 0.21ppm であったが、全ての飼料添加剤区で 0.16ppm まで低下した。培養 20 時間後では二糖類 (b) (セロビオース) の添加効果が認められ、0.1ppm まで低下した。

結果

ZEN の消失について



これらの結果は、プロバイオテックスやプレバイオテックスの添加により、VFA 濃度の上昇にみられるようにルーメン微生物の活性が高まり、マイコトキシンの分解が促進されたと考えられる。

カビ毒の被害が特に注目されている酪農の現場では、主な対策として各種のカビ毒吸着剤の利用が進められているが、それらの効

果については判然としない面があり、さらなる対策の向上が求められている。

本研究では、ルーメン微生物とくにプロトゾアがカビ毒の分解に大きくかかわっていることを初めて明らかにし、数種のプロバイオテックスやプレバイオテックスの飼料添加でプロトゾアの増殖が高まり、マイコトキシンの分解・消失が促進されることが明らかとなった。

これらの添加物は、すでに畜産の現場で実用化されているものであり、今後、これらの使用によりカビ毒の被害軽減に寄与できると考えられる。

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 5件)

青木直人、佐藤幹、神田修平、小原嘉昭、板橋久雄、トレハロース給与による乳牛の抗酸化能の改善、栄養生理研究会報、栄養生理研究会報、査読有、Vol.57, No.1, 2013、32-45.

Y.Kurokawa, Shibata, S.Kanda, K.Takaura, S.Ishida, H.Itabashi. Rumen fermentation, milk production and conjugated linoleic acid in the milk of cows fed high fiber diets added with dried distillers with solubles. Animal Science Journal, 査読有、Vol 84, 2012, 106-112.

Y.Ozutsumi, K.Tajima, A.Takenaka, H.Itabashi. The mcrA gene and 16S rRNA gene in the phylogenetic analysis of methanogens in the rumen of faunated and unfaunated cattle. Animal Science Journal, 査読有、Vol 83, 2012, 727-734.

上野豊、板橋久雄、分子生物学的手法による子牛の下部消化管細菌叢の解析、栄養生理研究会報、査読有、Vol.56, No.1, 2012、13-24.

〔学会発表〕(計 6件)

大和田尚、佐藤幹、鎌田夏実、撫年浩、板橋久雄、ルーメンでのマイコトキシン消失に及ぼすプロバイオ・プレバイオ添加の影響、日本畜産学会第118回大会、2014.3、つくば国際会議場。

.H.Owada, Y.Ueno, T.Nade, N.Koyama, K.Sato, H.Itabashi. The effect of deoxynivalenol and zearalenone on rumen

fermentation and their degradation by rumen microorganism in vitro. The 9th China-Korea-Japan Joint Symposium on Rumen Metabolism and Physiology, 2013.10, Changsha, China.

青木直人、浜田周磨、佐藤幹、小原嘉昭、板橋久雄、乳牛へのトレハロース給与による酸化ストレス低減メカニズム解明、日本畜産学会第116回大会、2013.3、安田女子大学。

大和田尚、佐藤幹、齊藤邦彦、鈴木英敏、岩崎智夏子、鈴木愛里紗、撫年浩、板橋久雄、易分解性デンプン飼料による黒毛和種鼻肩牛のルーメン発酵と血液成分の経時的变化、日本畜産学会第117回大会、2013.9、新潟大学。

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

板橋久雄(ITABASHI, Hisao)
日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・
客員教授
研究者番号：00280991

(2)研究分担者

撫年浩(NADE, Toshihiro)
日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・
准教授
研究者番号：60434148

(3)連携研究者

なし()
研究者番号：