

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15020

研究課題名(和文) 乳組成改善を目指した新規セルロース系資材によるルーメン内酢酸生成の促進

研究課題名(英文) Promotion of rumen acetate production by novel cellulosic material for improving milk quality

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) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ルーメン内の微生物相制御を通じた酢酸増をもたらす新規飼料素材として、酢酸セルロースの利用可能性について検討した。インビトロ試験において、水溶性酢酸セルロース(WSCA)の添加培養時に、ルーメン内の酢酸増とともにPrevotella属菌の増加を観察した。一方で、本素材添加は飼料消化やガス生成を阻害しなかった。さらにヒツジを用いた給与試験でも同様の結果が得られた。したがって、WSCAは消化を滞らせることなくルーメン微生物相を変化させ、酢酸増をもたらす発酵制御物質と考えられた。将来の泌乳牛への適用で、乳組成の改善、とりわけ酢酸増を介した乳脂率の改善に資するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the possible use of cellulose acetate as feed supplement for ruminants to enhance ruminal acetate level, focusing on changes of rumen microbiota. In in vitro evaluations, water-soluble cellulose acetate (WSCA) significantly increased acetate production with concomitant increase of bacteria belonging to Genus Prevotella, one of the predominant genera in the rumen. In the meantime, more importantly, feed digestibility and total gas production were not affected by WSCA supplementation. These results were confirmed in in vivo feeding study using sheep. Therefore, it is expected that WSCA can modulate rumen fermentation toward more acetate production through microbial alteration without negative effect on feed digestion. The results suggest future application of WSCA to dairy cows to improve milk quality, especially milk fat content.

研究分野：家畜栄養学

キーワード：ルーメン 酢酸セルロース 繊維消化 微生物 Prevotella アセチル基 アセチルエステラーゼ 乳脂肪

1. 研究開始当初の背景

TPP 締結後の日本酪農の優位性を保つには、高品質の生乳を安定生産することが必要であるが、夏季および泌乳最盛期の乳脂肪率低下が指摘されて久しい。乳脂肪合成には第一胃（ルーメン）で生成される酢酸が関与するため、酢酸生成の安定維持が鍵である。しかし酢酸の基質となる繊維質（粗飼料）摂取の維持増進は簡単ではなく、特に高温多湿の環境下では困難を極める。

本研究では、酢酸生成促進素材候補として、工業製品素材である酢酸セルロースに注目した。セルロース誘導体の酢酸セルロースは多くの日用品（写真などのフィルムやたばこフィルター）の素材であるが、構成糖であるグルコース残基の有する水酸基の一部がアセチル基で置換されたものである（図1）。化学および物理特性がセルロースとは異なり、アセチル基の置換度によっては水溶性となる。さらに生分解性を示すため、飼料として給与した場合、ルーメン内分解性に秀で、共生微生物や発酵様式を酢酸生成促進の方向へ導くことが期待される。本課題では、この工業用素材の飼料化に対する評価を行い、畜産業への応用技術シーズとして利用可能か否かについて考察する。

2. 研究の目的

工業製品の素材として生産される酢酸セルロースの数種類（アセチル基の置換度などが異なるもの）をルーメン液でインビトロ培養し、最も酢酸生成能に秀でた素材を選抜するとともに、主飼料への最適添加比率などについて特定した。さらに、選抜素材を適正な条件で動物（ヒツジ）に給与し、生体内でも酢酸生成の促進が生じるかを検証した。同時に酢酸生成増が生じる機序（経路）を推定すべく、ルーメン微生物相の解析に注力し、現象に科学的説明を与えることで、将来の活用 に資する基盤情報を得ることを目的とした。

酢酸セルロース

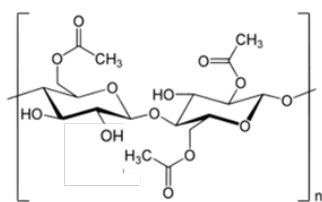


図1. 酢酸セルロースの構造式

3. 研究の方法

セルロース産業からの有力飼料候補素材として選んだ酢酸セルロースのうち、物理性（水溶性・不溶性）や化学特性（アセチル基置換度）をもとに、最も有効と思われるものを初年度にスクリーニングした。多くの素材を同時評価するため、インビトロ培養法（バッチ培養および人工ルーメン）を駆使した。最も酢酸生成能が高く、かつ安定的な飼料消化率を示した素材については、主飼料への最

適な添加量について特定した。2年目には、選抜素材を適正な添加レベルのもとヒツジへ給与し、実際の生体内での有用性と健康への影響について検討した。すなわち、ルーメン内容物の分析から、発酵様式や微生物相の反応、とくに酢酸生成量とそれに関わる微生物の特定、さらに給与期間中の日常の観察から、動物の健全性を確認した。

(1) 有効素材の選抜と適性添加量の評価

乳牛のルーメン液を人工唾液（緩衝液）で希釈しバッチ培養に供した。培養基質にはセルロースパウダーを対照とし、試験素材として酢酸セルロース（アセチル基置換度ならびに水溶性が異なるもの、ダイセル社）を使用した。

ハンゲートチューブに粉碎飼料（乾草と濃厚飼料を2:1の比率で混合）と供試セルロース素材を秤量採取後（全飼料中に各素材を10%で添加）、人工唾液で2倍に希釈したルーメン液を入れた。ヘッドスペースを窒素ガスで置換後プチルゴム栓とプラスチックキャップで密栓し、嫌気培養（24時間）した。培養後のガスおよび短鎖脂肪酸ほか発酵産物の生成量をモニタリングし、酢酸生成により有効な酢酸セルロース素材を特定した。

その後、選抜した素材のみを用いて、ルーメン発酵、とくに酢酸生成におけるドーズレスポンスを評価した。すなわち、上記と同じ培養系で、素材の添加レベルを全飼料に対し0、7.5、15、22.5 および30%に設定し、培養終了後の発酵産物等を分析することで、酢酸増をはかるうえで有効な添加レベルを特定した。

(2) 人工ルーメンでの評価

スクリーニングでより有効と判断された酢酸セルロース素材とその適正添加レベルを用い、より生体に近い連続培養法（人工ルーメン RUSITEC 使用）で効果を検証した。吸収のおこらないバッチ培養や人工ルーメンで検出される酢酸は精密に量的把握が可能であり、化学量論的な計算から、酢酸セルロースのアセチル基遊離に由来する酢酸が、主鎖セルロースや併給粗飼料分解発酵に由来する酢酸が、あるいはそれらに由来する酢酸が各々の程度あるか、などの推定がおおよそ可能となる。微生物データを合わせれば、生成経路の推定にもつながることになる。

RUSITEC 稼働については Watanabe et al., JDS. 93:5258-5267(2010) に準じた。すなわち、RUSITEC（発酵槽×8）に乳牛由来のルーメン液を人工唾液とともに満たし、嫌気条件下で攪拌連続培養しつつ、24時間ごとに飼料をナイロンバッグにて投入した。その際、選抜した酢酸セルロース素材（WSCA-80）を、同様に特定した最小有効添加レベル（10%）で補給した。対照には

セルロースパウダー（旭化成 PH101）を酢酸セルロースと同レベルで補給した。人工ルーメンは5日間の予備運転後、6および7日目に試料採取を実施した。人工唾液は0.50vol/日で流入させ、飼料容器は発酵槽内を1分間当たり4往復上下運動するように攪拌した。運転開始5日後の給餌時を試験期開始0時間とし、以降3時間毎に発酵槽サンプルを採取し、各種発酵産物およびDNAレベルの微生物分析に供した。ガスは発酵槽に取り付けたテドラバッグより回収し、毎日総容量を量り、一部をガスクロマトグラフでメタンや二酸化炭素などの分析に用いた。飼料の乾物消化率を48時間浸漬したナイロンバッグからの消失率で算定した。

（3）給与試験による評価

ヒツジ2頭（ルーメンカニューレ装着）に乾草および濃厚飼料（2:1の比率）を維持レベル（乾物で体重の1.4%）で定量制限給与した。2週間の馴致を経て、次の3週間をセルロースパウダー給与期（対照期）とし、セルロースパウダーを全飼料中10%レベルになるよう濃厚飼料に混合し、給与した。その後の3週間を酢酸セルロース給与期（処理期）とし、選抜した酢酸セルロースを全飼料中10%レベルで濃厚飼料に混合し、給与した。この後、再度2週間の馴致期をおき（この間は上記馴致期と同様、乾草と濃厚飼料給与のみでセルロースも酢酸セルロースも与えない）、上記の対照期（3週）と処理期（3週）を再度繰り返し、計16週間にわたる給与試験を完了した。

各期最終週に、全ヒツジからルーメン液を採取するとともに、ナイロンバック法にて飼料消化率を測定した。ルーメン液は発酵産物と微生物相の分析に供し、データをもとに酢酸生成促進の検証とそのメカニズムの推定を行った。微生物、とくに各種細菌群の変動を定量的PCRでとらえることで、酢酸生成経路をおおよそ推定した。各種ルーメン微生物の定量については Koike et al., AEM, 76: 1887-1894 (2010) および Koike et al., ASJ, 78: 135-141 (2007) に準じた。

4. 研究成果

初年度の検討は、各種の酢酸セルロース（アセチル基の置換率により物性が異なる）の中から、より酢酸生成率の高い素材を選抜し、その最適添加レベルを知ることが目的であった。一連のインビトロ試験で、水溶性酢酸セルロース（WSCA-80）が不溶性のものに比べ、高い酢酸生成能を有していた（表1）。その後のドーズレスポンス評価により、全飼料中に10-15%の添加でおおよそ最大の酢酸生成が可能なが分かった。

人工ルーメン（連続培養槽）は閉鎖培養系よりも実際のルーメンに環境が近いため、より実践的な検証ができる。選素材（WSCA-80）10%添加の効果をもたところ、

閉鎖培養時と同様に明瞭な酢酸生成増大が認められ、それとともにルーメン菌叢の変化が確認された。とりわけ *Prevotella* 属菌が人工ルーメン内で大幅に増加した。*Prevotella* はアセチルエステラーゼを保有するため、酢酸生成増の一部は、これら *Prevotella* 属菌の有するアセチルエステラーゼにより、酢酸セルロースからアセチル基が遊離したものかもしれない。ただし、閉鎖培養系での物質収支から計算すると、アセチル基が100%解離したとしても、観察された酢酸増加分の約2/3に相当するにすぎず、酢酸セルロースの炭素骨格や主飼料の炭水化物（繊維質）に由来する酢酸増が少なくとも総増加分の約1/3を説明すると推定された。つまり、酢酸セルロースは保有するアセチル基の解離ばかりでなく、酢酸セルロースおよび飼料（おそらく乾草）の炭素骨格の分解発酵をも促進すること、それらには *Prevotella* 属菌の活性化が関わっているらしいことが推測された。つまり酢酸セルロースはルーメンプレバリオティクスとも呼べる作用を有し、有益な発酵様式を導く効果をもつことが示唆された。

表1 酢酸セルロース添加が発酵様式におよぼす影響

Parameter	Control	Treatment ¹		SEM	P-value
		ISCA	WSCA		
Total gas (mL)	15.2	15.2	14.4	0.3	0.189
CO ₂ (mL)	11.6	11.6	11.0	0.2	0.120
CH ₄ (mL)	3.6	3.6	3.4	0.1	0.693
H ₂ (mL)	ND	ND	ND	-	-
Total VFA (mmol/dL)	9.5 ^b	9.1 ^b	10.0 ^a	0.1	0.001
Acetate (mmol/dL)	6.0 ^b	5.8 ^b	6.5 ^a	0.1	<0.001
Propionate (mmol/dL)	2.1 ^{ab}	2.0 ^b	2.2 ^a	0.0	0.008
n-Butyrate (mmol/dL)	0.9	0.9	0.9	0.0	1.000
Acetate (molar %)	63.3 ^b	63.8 ^b	65.1 ^a	0.2	<0.001
Propionate (molar %)	22.5 ^a	21.7 ^b	22.2 ^{ab}	0.1	0.039
n-Butyrate (molar %)	9.7 ^a	9.8 ^a	9.1 ^b	0.1	<0.001

ND: Not Detected

^{a,b}Means within a row with different superscripts differ (P < 0.05).

¹Supplementation of each substrate was set at 10% in final culture.

酢酸セルロース添加飼料給与時には、摂食時に酢酸セルロースが口腔内で粘性を呈することから、当初ヒツジは摂食に時間を必要としていた。しかしヒツジは酢酸セルロースの給与開始後、数日でその物理性に適応し、以降はなんら問題なく30分以内で給与飼料を完食した。また本素材給与期に下痢他の症状は観察されず、健康上の問題は観察した限り皆無であった。ルーメン液の酢酸濃度は給与3時間目に有意に上がり、一連の *in vitro* 試験の結果が生体内でも再現された。また *Prevotella* 属菌も *in vitro* 試験結果と同様に増加した。

以上の *in vitro* および *in vivo* 試験成果より、酢酸セルロースはルーメン内の *Prevotella* 占有率をあげ菌叢を変化させ、酢酸生成を促進することが明らかになり、

今後の飼料素材として利用可能と思われた。本研究は、工業製品素材を飼料素材として評価し、その有用機能を明らかにした初めての検討例である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計8件)

- (1) Boonsaen P, Kinjo M, Sawanon S, Suzuki Y, Koike S, Kobayashi Y. Partial characterization of phylogeny, ecology and function of the fibrolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens* OS14, newly isolated from the rumen of swamp buffalo. Anim Sci J. (査読有) 89:377-385. 2018. doi: 10.1111/asj.12927.
- (2) Oh S, Suzuki Y, Hayashi S, Suzuki Y, Koike S, Kobayashi Y. Potency of cashew nut shell liquid in rumen modulation under different dietary conditions and indication of its surfactant action against rumen bacteria. J. Anim. Sci. Technol. (査読有) 24:59:27. 2017. doi: 10.1186/s40781-017-0150-8.)
- (3) Myint H, Iwahashi Y, Koike S, Kobayashi Y. Effect of soybean husk supplementation on the fecal fermentation metabolites and microbiota of dogs. Anim Sci J. (査読有) 88:1730-1736. 2017. doi: 10.1111/asj.12817.
- (4) Oh S, Koike S, Kobayashi Y. Effect of ginkgo extract supplementation on in vitro rumen fermentation and bacterial profiles under different dietary conditions. Anim Sci J. (査読有) 88:1737-1743. 2017. doi: 10.1111/asj.12877.
- (5) Weimar MR, Cheung J, Dey D, McSweeney C, Morrison M, Kobayashi Y, Whitman WB, Carbone V, Schofield LR, Ronimus RS, Cook GM. Development of multiwell-plate methods using pure cultures of methanogens to identify new inhibitors for suppressing ruminant methane emissions. Appl Environ Microbiol. (査読有) 83: e00396-17. 2017. doi: 10.1128/AEM.00396-17.
- (6) Oh S, Shintani R, Koike S, Kobayashi Y. Ginkgo fruit extract as an additive to modify rumen microbiota and

fermentation and to mitigate methane production. J Dairy Sci. (査読有) 100:1923-1934. 2017. doi: 10.3168/jds.2016-11928.

- (7) Kobayashi Y, Oh S, Myint H, Koike S. Use of Asian selected agricultural byproducts to modulate rumen microbes and fermentation - Review-. Journal of Anim. Sci. Biotech. (査読有) 7:70. 2016. doi: 10.1186/s40104-016-0126-4.
- (8) Myint H, Kishi H, Koike S, Kobayashi Y. Effect of chickpea husk dietary supplementation on blood and cecal parameters in rats. Anim. Sci. J. (査読有) 88:372-378. 2016. doi: 10.1111/asj.12651.

〔学会発表〕(計20件)

- (1) 小林泰男. ルーメン微生物研究グループからの発表, 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. 2018年3月30日, 東京大学(東京).
- (2) 中光大輔, 小池聡, 鈴木裕, 小林泰男. 黒毛和種ルーメン由来新規澱粉分解菌の増殖因子の探索. 日本畜産学会第124回大会, 2018年3月28-30日, 東京大学(東京).
- (3) Watabe Y, Imagawa T, Koike S, Suzuki Y, Shimamoto S, Kobayashi Y. Use of cellulose acetate as a feed additive candidate for tuminants. Joint rumen symposium 2017, October 26-27. 2017, Centrair Hall, Chubu International Airport, Tokoname (Japan).
- (4) Miura H, Koike S, Mukai K, Suzuki Y, Kobayashi Y. Influence of trehalose feeding on fecal microbiota in preweaned calves. Joint rumen symposium 2017, October 26-27. 2017, Centrair Hall, Chubu International Airport, Tokoname (Japan).
- (5) Murazumi Y, Taketa H, Fukuma N, Koike S, Inamura Y, Yamano M, Aizawa T, Suzuki Y, Kobayashi Y. Utilization of saccharides by non-fibolytic ruminal bacteria constituting a fibrolytic consortium. Joint rumen symposium 2017, October 26-27. 2017, Centrair Hall, Chubu International Airport,

Tokoname (Japan).

- (6) Shintani R, Oh S, Suzuki Y, Koike S, Kobayashi Y. Mitigation of methane emission from feces and slurry of Holstein cattle by applying ginkgo fruit: in vitro study. Joint rumen symposium 2017, October 26-27. 2017, Centrair Hall, Chubu International Airport, Tokoname (Japan).
- (7) Myint H, Koshi H, Iwahashi Y, Suzuki Y, Koike S, Kobayashi Y. Bean husk, an agricultural byproduct having functionality in animal nutrition and health. 家畜栄養生理研究会秋季集談会 2017年9月8日,信州大学(伊那市).
- (8) Oh S, Suzuki Y, Koike S, Kobayashi Y. Potency of ginkgo fruit for modulation of rumen microbiota and fermentation. 家畜栄養生理研究会秋季集談会, 2017年9月8日, 信州大学(伊那市).
- (9) 小林泰男・Phoom Boonsaen²・金城円花・Suriya Sawanon・鈴木裕・小池聡・沼沢水牛ルーメンから分離した繊維分解菌 *Ruminococcus flavefaciens* の系統、生態および機能. 日本畜産学会第123回大会, 2017年9月6-7日, 信州大学(伊那市).
- (10) 小池聡・秋山瑤子・鈴木裕・小林泰男. 黒毛和種牛から分離したデンブン分解性ルーメン細菌の特性評価. 日本畜産学会第123回大会, 2017年9月6-7日, 信州大学(伊那市).
- (11) Kobayashi Y. New feed additives for mitigating methane from ruminant livestock JIRCAS-NARO International Symposium on Agricultural Greenhouse Gas Mitigation, August 31, 2017. Epochal Tsukuba, Tsukuba (Japan).
- (12) Myint H, Kishi H, Iwahashi Y, Saburi W, Koike S, Kobayashi Y. Functional properties of lab bean husk and soybean husk in hindgut fermentation and microbiota of rats. Congress on Gastrointestinal Function, 10-12 April, 2017, Chicago (USA).
- (13) 小林泰男, ルーメンの代謝障害: 緒論, 第50回ルーメン研究会, 2017年3月27日. 神戸大学(神戸市).
- (14) 渡部結人・今川達也・小池聡・島本周・小林泰男. 水溶性酢酸セルロースの給与が綿羊のルーメン発酵と微生物相に及

ぼす影響. 日本畜産学会第122回大会, 2017年3月28-30日. 神戸大学(神戸市).

- (15) 三浦広卓・小池聡・鈴木裕・向井和久・小林泰男. トレハロースの給与が哺乳子牛の腸内環境に与える影響. 日本畜産学会第122回大会, 2017年3月28-30日. 神戸大学(神戸市).
- (16) 秋山瑤子・小池聡・小林泰男, 黒毛和種牛ルーメン由来澱粉分解菌の分離培養および生理機能解析. 第49回ルーメン研究会, 2016年10月14日. 馬事会館(東京).
- (17) 岸宏之・佐分利巨・岩橋悠・Htun Myint・小池聡・小林泰男. 新規飼料候補マメ外皮に含まれるオリゴ糖の分離と特定. 第49回ルーメン研究会, 2016年10月14日. 馬事会館(東京).
- (18) Myint H, Kishi H, Iwahashi Y, Koike S, Kobayashi Y. Functional properties of bean husks on cecal fermentation and microbiota in rats. 17th AAAP Animal Science Congress, August 22-25, 2016, Fukuoka (Japan).
- (19) Koike S, Kawanishi Y, Hashimoto T, Kobayashi Y. A core microbiome and its compositional changes during fattening period in the rumen of Japanese Black cattle. Symposium mINRA-ROWETT 2016, June 20-23, 2016. Clermont-Ferrand (France).
- (20) Oh S, Shintani R, Koike S, Kobayashi Y. Effect of ginkgo fruit on rumen modulation toward methane mitigation. Symposium mINRA-ROWETT 2016, June 20-23, 2016. Clermont-Ferrand (France).

[その他]

ホームページ等

<https://www.agr.hokudai.ac.jp/r/lab/animal-function-and-nutrition?from=us>

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