

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780238

研究課題名（和文）反すう家畜の代謝障害予防をめざしたアシドーシス誘発高リスク菌株の特定

研究課題名（英文）Identification of high risk bacterial strains in rumen acidosis for the prevention of metabolic disorder in ruminants

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：本研究では、反芻動物第一胃（ルーメン）細菌・ストレプトコッカス・ボビスは遺伝的・生理的に多様であることを明らかにした。また、穀物飼料を多給すると特定のストレプトコッカス・ボビス菌株が優勢となること、またその他の乳酸産生菌/利用菌のバランスが変化することが判明した。この菌叢変化が乳酸の蓄積、pH の低下といったルーメン環境の悪化につながる可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：The present research revealed that genotypically and physiologically heterogeneous strains of *S. bovis* were distributed in the rumen. The specific genotypes of *S. bovis* strains are predominant when the animal is fed a high-grain diet. In addition, the balance of lactate producer/utilizer was altered by high-grain diet. This bacterial community shift might result in lactate accumulation and lower pH.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：ルーメンアシドーシス、*Streptococcus bovis*

## 1. 研究開始当初の背景

近年、乳牛や肉牛の生産において量的・質的に優れた生産物を得るために濃厚飼料を多給する傾向にある。濃厚飼料を増給するとルーメン発酵のバランスが崩れ、ルーメンアシドーシスを引き起こす事がある。ルーメンアシドーシスは代謝性疾患の原因となり、これによる淘汰は肉牛死廃用頭数の20%を占めると報告されている。したがって、反すう家畜生産においてルーメンアシドーシスを予防する事は経済的損失を防ぐために極めて

重要な課題といえる。

ルーメンアシドーシスは乳酸産生デンプン分解菌・*Streptococcus bovis* の急速な増殖に起因すると言われており、濃厚飼料多給下でこの菌の増殖を抑制することがルーメンアシドーシス予防の鍵を握る。しかし、本細菌の遺伝的・生理的多様性については不明な部分が多い。

## 2. 研究の目的

本申請課題ではルーメンアシドーシス予

防の鍵となる *S. bovis* について以下の3点を明らかにする。(1) 菌株が何種類ぐらいいるのか(2) それらがどのような生理的・遺伝的特徴を持つのか(3) 濃厚飼料多給時にルーメン内分布量が高まる菌株があるか。

以上により濃厚飼料多給時に優勢になる菌株を絞り込み、ルーメンに常在する *S. bovis* の中でもアシドーシス誘発のリスクが高い菌株を特定することを目的とする。

### 3. 研究の方法

各種反芻動物ルーメンより *S. bovis* 菌株の分離を行い、各菌株の純粋培養 *in vitro* 試験により増殖速度やデンプン分解活性の差異など生理的特徴を明らかにした。また、DNAフィンガープリンティング解析により遺伝的多様性を把握した。次に飼料中の粗飼料/濃厚飼料比(粗濃比)を変えた際の *S. bovis* 菌株多様性変化をモニターした。粗濃比 8:2、5:5 および 2:8 で飼養したヒツジルーメンより、*S. bovis* 菌株を分離し、PCR ゲノムフィンガープリンティングによる分類を実施した。

### 4. 研究成果

(1) ウシ(肥育後期の黒毛和種およびホルスタイン乾乳牛)、ヒツジ(濃厚飼料多給および粗飼料多給)および野生エゾシカ(冬季の知床地域に生息)から採取したルーメン液から各サンプル 10 菌株、合計 53 菌株のグラム陽性球菌を得た。各菌株の 16S rDNA 塩基配列を解読し、簡易同定を行ったところすべて *Streptococcus bovis* と同定され、菌株間の塩基配列相同性は 98~100%であった。これらの菌株について、PCR によるゲノムフィンガープリンティング解析を行ったところ、菌株間で遺伝的に多様であることが明らかとなった。一方、遺伝子型をもとに作成した系統樹において、供試菌株は宿主の動物種ごとにクラスターを形成した。これは本菌種の遺伝子型は動物種ごとに異なる可能性を示している。

アミラーゼ活性および乳酸生産量は分離源の動物種を問わず供試菌株ごとに異なり、特にアミラーゼ活性においては活性の最高値と最低値の間に 10 倍以上の開きがあった。このことから、デンプン分解への関与の程度は菌株により異なるものと考えられる。以上の結果は宿主動物種ごとに遺伝子型の異なる *S. bovis* が分布し、アミラーゼ活性は菌株間で異なることを示している。

異なる分離源から得た *S. bovis* について、50 菌株以上の比較を行った研究は過去になく、*S. bovis* の抑制に向けた貴重な基礎データを取得したといえる。

(2) 飼料中の粗飼料/濃厚飼料比(粗濃比)を変えた際の *S. bovis* 菌株多様性変化をモニターした。粗濃比 8:2、5:5 および 2:8 で飼養したヒツジルーメンより、*S. bovis* 菌株を 85 菌株(それぞれの飼料条件より 25~30 菌株ずつ)分離し、PCR ゲノムフィンガープリンティングによる分類を実施した。その結果、粗飼料多給時では 7 パターン、中間設定時では 4 パターン及び濃厚飼料多給時では 2 パターンのバンドパターンが検出された。クラスター解析により分離菌株は 7 つのグループに大別され、濃厚飼料多給時に分離した菌株はそのうち 2 つのクラスターに集中していた(図 1)。以上より、濃厚飼料多給時には特定の *S. bovis* 菌株が優勢となることを明らかにした。

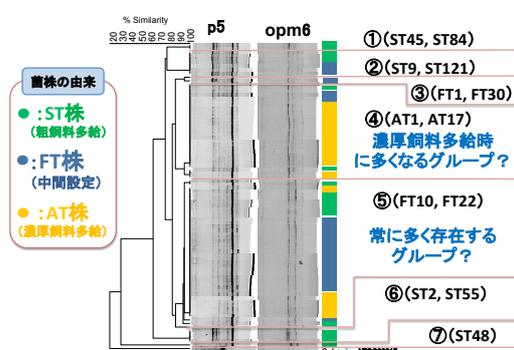


図1 異なる飼料条件由来 *S. bovis* 株のゲノムフィンガープリントに基づくクラスター解析

濃厚飼料を多給すると過去の報告通り、*S. bovis* のルーメン内密度が増加し(約 10 倍)、ルーメン内の乳酸蓄積と pH 低下も見られた。しかし、これらのパラメータ変化には個体差が見られた(図 2、3)。供試した 3 頭のヒツジのうち 1 頭(個体 B)で特

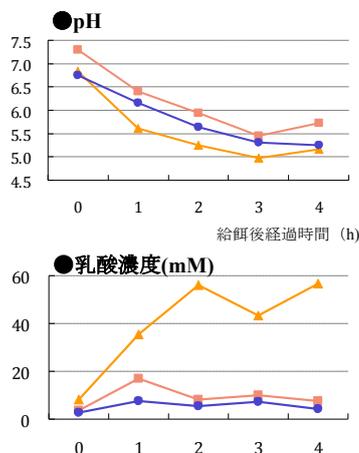


図2 濃厚飼料多給ヒツジのルーメン内 pH と乳酸濃度

■ 個体A ▲ 個体B ● 個体C

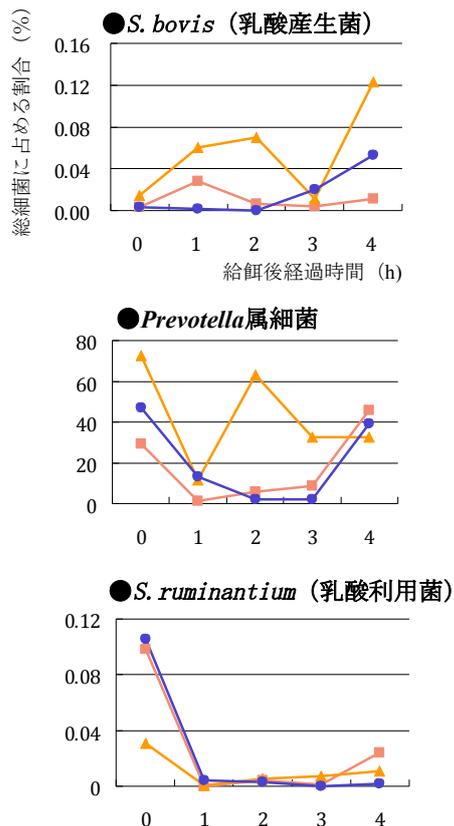


図3 濃厚飼料多給ヒツジのルーメン内の各種ルーメン細菌分布密度

—■— 個体A —▲— 個体B —●— 個体C

に顕著な乳酸蓄積と *S. bovis* の増加が見られた。変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法で飼料変化に伴う総細菌叢の変動をモニターした結果、濃厚飼料多給時には個体Bのみ他の個体とは明確に異なる菌叢を示した。主要細菌について real-time PCR 定量を行ったところ、他の個体に比べて個体Bでは *Prevotella* 属細菌の分布量が多く、*Selenomonas ruminantium* が少ないことが明らかとなった。*Prevotella* 属細菌は多様な機能を有する細菌種で構成されるが、中には乳酸を産生する菌株も存在する。一方、*S. ruminantium* は乳酸利用菌として知られている。したがって、個体Bでは乳酸産生菌と乳酸利用菌のバランスが他のヒツジと異なり、それが乳酸蓄積と pH 低下を招いた可能性が考えられた。

以上、ルーメンアシドーシス発症に伴い *S. bovis* 多様性の変化、すなわち特定の菌株が優勢となること、また乳酸産生菌/利用菌のバランスもルーメン内乳酸蓄積に関与する可能性があることを突き止めた報告はこれまでになく、今後のアシドーシス予防策を講じる上で重要な基盤情報を取得できたといえる。

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 1 件)

- ① Bekele AZ., Koike, S., Kobayashi, Y. Phylogenetic diversity and dietary association of rumen *Treponema* revealed using group-specific 16S rRNA gene-based analysis. FEMS Microbiology Letters, 査読有り, 316, 2011, 51-60.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 加藤泰基, 小池聡, 小林泰男. 濃厚飼料多給とルーメン細菌 *Streptococcus bovis* 菌株多様性の関連, 日本畜産学会第115回大会, 2012年3月29日, 名古屋大学 (名古屋).
- ② Koike, S., Kato, H., Sakaki, M., Iisaka, S., Sawabe, Y., Kobayashi, Y. Genotyping of *Streptococcus bovis* isolated from the rumen of wild deer and domesticated animals, 2011 Congress on Gastro-intestinal Function, 2011年4月19日, シカゴ (アメリカ).
- ③ 加藤泰基, 榊真由子, 飯坂詩史, 沢辺佳彦, 小池聡, 小林泰男. rep-PCR法による *Streptococcus bovis* 菌株の遺伝子型解析, 第41回ルーメン研究会, 2010年9月17日, 筑波大学法科大学院 (秋葉原).
- ④ Sakaki M, Koike, S., Kobayashi, Y. Genetic and phenotypic diversity of streptococci from the rumen of wild deer and domesticated sheep. Gut Microbiology, 2010年6月24日, アバディーン (イギリス).

[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

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