

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23658213

研究課題名（和文） 反芻家畜の繊維消化を促進する繊維サプリメントの開発

研究課題名（英文） Development of a fiber supplement to improve fiber digestion in ruminants

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）：稲わらに代表される難分解性繊維の消化に関わるルーメン細菌を賦活化できる天然の易分解性繊維を見つけ出し、それを稲わらに少量補給することで繊維消化の起爆剤（ブースター）とできるかどうかの仮説検証を行った。稲わらの消化を主導しているのは *Fibrobacter succinogenes* であり、供した補給繊維源のうち、この菌種を活性化したのはフジ豆外皮およびヒヨコ豆外皮であると特定できた。また稲わら給与ヒツジへこれら外皮を 10% 補給することで、酸性デタージェント繊維の消化率が 3-6% 向上した。以上より、豆外皮が反芻家畜の繊維サプリメントとして活用できることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：A series of studies to explore natural fiber sources were carried out for leading activation of fibrolytic rumen bacteria and concomitant improvement of main forage digestion in ruminants. We have successfully identified that the ruminal bacterium *Fibrobacter succinogenes* plays a prominent role in digestion of rice straw and this bacterium is significantly activated by supplementing lablab bean and chickpea husks. The following feeding experiment using sheep has revealed that 10% supplementation of each husk to rice straw diet improves digestibility of acid detergent fiber by 3-6%. From these it is apparent that these husks could be a booster fiber supplement in ruminants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

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、繊維消化、サプリメント、細菌、ブースター

1. 研究開始当初の背景

易消化性繊維を添加物として利用することで、主粗飼料（稲わらなどの難分解性のもの）の消化向上をはかろうとする研究がこれまでいくつか報告されている。そのメカニズムは主要なルーメン内繊維分解菌の賦活化（増殖量と増殖速度の増大）を通じたものと推察されるが、詳細は不明のままである。適切な易消化性繊維源をその作用機序とともに特定できれば、低品質の粗飼料の更なる利用性を向上させるための有用な手段となると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 適切な易消化性繊維源の選抜、(2) 賦活化されるルーメン細菌の特定、(3) 主粗飼料との適正な併用法などについて検討し、新しい飼養技術提言のための基盤情報取得を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 易消化性繊維源の選抜 (in situ)

ルーメンカニューレ装着ヒツジに、国産稲わら主体飼料（細切稲わら 1400 g + 濃厚飼料

300g (現物重量/日)) を給与し、in situ 培養用の試験動物とした。ナイロンバックに8種類の繊維源 (稲わら、ミャンマー産ヒヨコ豆 (*Cicer arietinum*) 外皮、エジプト産ヒヨコ豆外皮、ミャンマー産フジ豆 (*Dolichos lablab*) 外皮、ビートパルプ、バナナ皮、麦茶粕およびコーヒー粕) を約 3.5g 封入後、ルーメン内で培養し、乾物および中性デタージェント繊維 (NDF) 消失率測定および走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察用サンプルとした。培養時間は、8、16、24、48、72、96 時間とし、カイネティクス解析や付着細菌の定量等を実施した。

(2) 易消化性繊維併用時の消化改善検証 (in vitro)

上記ヒツジからのルーメン液を人工唾液で2倍に希釈し、以下の培養試験に用いた (消化率、発酵産物および細菌数について分析)。同時併給試験では、希釈ルーメン液 (400ml) をフラスコに入れ、基質として粉碎稲わら (対照区) 4g、稲わらの5%を粉碎ヒヨコ豆外皮またはフジ豆外皮で置き換えたもの (ヒヨコ豆区およびフジ豆区) を加え、24、48 時間培養した。時間差併給試験では希釈ルーメン液 (10ml) をハンゲートチューブにとり、基質として 0.2 g の粉碎稲わら (対照区)、同様に粉碎したヒヨコ豆外皮またはフジ豆外皮 (ヒヨコ豆区およびフジ豆区) を加え、24 時間培養した (1次培養)。この時、尿素液を添加することで培養液の CP 含量を均一化した。一次培養終了後、基質に付着したルーメン細菌を遊離させるために氷冷し (10 分)、遠心分離後の上澄み (含細菌) を2次培養の培養液として用いた。2次培養時には、粉碎稲わらのみを共通基質とし、再度尿素液で CP 含量を均一化し、48 時間培養した。

(3) 易消化性繊維併用時の消化改善検証 (in vivo)

ルーメンカニューレ装着ヒツジを4頭用いた。稲わら主体飼料 (稲わら 800g と配合飼料 100g) (RS)、RS の10%をヒヨコ豆外皮 (ミャンマー産) で置き換えたもの (CHM)、同 (エジプト産) で置き換えたもの (CHE)、フジ豆外皮で置き換えたもの (LH)、の計4種の飼料での飼養試験を4×4のラテン方格法で実施した。なお、飼料は尿素を適量添加して同じ CP 含量 (9.0%) になるよう調製した。各処理を24日間とし、10日を馴致期、次の5日を消化試験期 (全糞採取)、次の1日をルーメン内容物採取期、6日間をナイロンバック試験期、1日において最終日を全ルーメン内容採取期 (給餌前) とした。消化率、ルーメン発酵産物およびルーメン内飼料分解特性、ルーメン内粒度分布などについて検討した。

4. 研究成果

(1) 易消化性繊維源の選抜 (in situ)

供試繊維源の構成成分、微小形態、ルーメン内分解特性を解析し、有望なもの2品目 (ヒヨコ豆外皮とフジ豆外皮) を最終的に特定できた。これらは、分解カイネティクス上、溶解性繊維画分よりも遅分解性画分が多く、その画分の分解速度が比較的速かった。さらに両者には、稲わらと比べより多くの *Fibrobacter succinogenes* や *Ruminococcus flavefaciens* が集積・増殖し、これらの菌群が確かに両繊維源により賦活化されていることがわかった。またこの賦活化の程度はヒヨコ豆外皮よりもフジ豆外皮でより顕著であった。さらに両豆外皮において、細菌による繊維束へのアクセスを容易にする微小構造が観察された (図1)。易消化性繊維として一般的に用いられているビートパルプは、ルーメン内分解度は高かったものの、上記繊維分解菌群の増殖をほとんど促進しなかった。

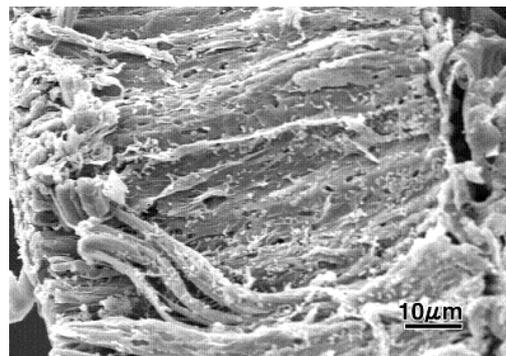
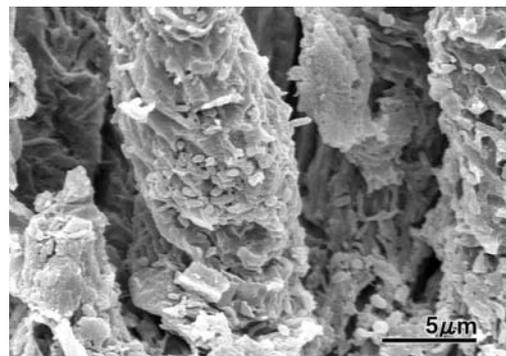


図1. 細菌のアクセスが容易な構造を有するヒヨコ豆外皮 (上) とフジ豆外皮 (下)

(2) 易消化性繊維併用時の消化改善検証 (in vitro)

同時併給時 (ヒヨコ豆区とフジ豆区) には酸性デタージェント繊維 (ADF) の消化率はいずれも24時間目で7-8%、48時間目で10%単位高くなった。同時に主要な繊維分解菌数はいずれも増加していた。NDF 消化の向上はフジ豆区でのみ有意で、10%単位程度の

向上が認められた。総 VFA 濃度の上昇や pH の低下もフジ豆区の 24 時間目でみられ、48 時間目には酢酸比の上昇とプロピオン酸比の減少が観察された。時間差併給の 1 次培養後はヒヨコ豆区のみ乾物消化率が低いものの、稲ワラを共通基質とした 2 次培養では、ヒヨコ豆区およびフジ豆区とも対照区よりも 5-6% 単位高い消化率を記録した。豆外皮を施用した区は試験を通して対照区より酢酸比の高い発酵を維持しており、主要繊維分解菌の増殖促進が示唆された。

(3) 易消化性繊維併用時の消化改善検証 (in vivo)

稲わら主体飼料の乾物、有機物、粗タンパク質および NDF 消化率は CHE で低いものの、残りの 3 つの飼料ではほとんど差がなかった。一方、ADF 消化率は有意差ではないものの、CHM や LH で RS より 3.1-5.5% 単位高くなった (各々 64.2, 61.8 vs. 58.7%)。CHE の消化率はすべての成分で 4 飼料間での最低値を示し、特に粗タンパク質、NDF および ADF では有意に低い値であった。これはエジプト産外皮のタンニン含量の高さ (3.7%) によるものと推察された。一方、ミャンマー産外皮のタンニン含量は 2.7% と低いものであった。ADF 消化率改善の認められた LH では、ルーメン発酵産物の濃度や組成が繊維消化改善を明確に反映するものであった。すなわち、総 VFA 濃度は LH で給餌 2, 4 および 6 時間後に有意に高まり、2, 6 および 10 時間後の pH も有意に低かった。VFA 組成においても酢酸比が給餌後 0, 4 および 10 時間後に有意に高くなっており、繊維消化が促進されていたものと思われる。CHM では、有意でなく、変化程度も小さいが、総じて同様の傾向にあった。48 時間培養後のナイロンバックからの乾物および NDF 消失率はいずれの豆外皮を補給しても高くなる傾向にあったが、有意なものではなかった。分解カイネティクス指標値を算定したところ、乾物および NDF の遅分解性画分 b の値が CHM で最も高くなった (ただし有意差なし)。湿式篩別で全ルーメン内容の粒度分布を調べたところ、LH で微細粒子が増す傾向にあった。

本研究結果から、主粗飼料の分解を主導するルーメン細菌の起爆剤としての易消化性繊維の応用は、組み合わせの事前検討を綿密に行なえば、十分可能であると判断した。実際、2 つの易消化性繊維 (特にフジ豆外皮) が、稲わらの消化に貢献する *F. succinogenes* の増殖を顕著に促進できることを明らかにできた。また培養実験で稲わらとこれら繊維源を同時または時間差で併用することで、いずれも明確な消化率向上が示され、その際の貢献細菌種はやはり *F. succinogenes* であった。最後に実施した実際の動物への併給試験

でも消化率の改善傾向がみられ、易消化性繊維の添加による主粗飼料の消化改善は技術シーズとして有望と考えられた。

豆外皮の少量併給効果を検証できたものの、それらはヒツジでの知見であり、ウシでの実証が強く望まれる。また豆外皮のうち、ヒヨコ豆については国内生産されてはいるが外皮の量的確保には程遠いバイオマスであり、フジ豆外皮にいたっては皆無なため輸入に頼るほかない。国内での同系統の豆は北海道を中心に生産されており、それらで代用が効くかの検討が急がれる。

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)

(1) Fuma R, Oyaizu S, Nukui Y, Tin Ngwe, Shinkai T, Koike S, and Kobayashi Y. Use of bean husk as an easily digestible fiber source for activating the fibrolytic rumen bacterium *Fibrobacter succinogenes* and rice straw digestion. *Animal Science Journal* (査読有), 83:697-707. 2012. DOI: 10.1111/j.1740-0929.2012.01017.x.

(2) Tin Ngwe, Nukui Y, Oyaizu S, Takamoto G, Koike S, Ueda K, Nakatsuji H, Kondo S, and Kobayashi Y. Bean husks as a supplemental fiber for ruminants: potential use for activation of fibrolytic rumen bacteria to improve main forage digestion. *Animal Science Journal* (査読有), 83: 43-49. 2012. DOI: 10.1111/j.1740-0929.2011.00916.x.

(3) Fukuma N, Koike S, and Kobayashi Y. Involvement of recently cultured group U2 bacterium in ruminal fiber digestion revealed by coculture with *Fibrobacter succinogenes* S85. *FEMS Microbiology Letters* (査読有), 336: 17-25. 2012. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2012.02649.x.

(4) Shinkai T, Enishi O, Mitsumori M, Higuchi K, Kobayashi Y, Takenaka A, Nagashima K, Mochizuki M, and Kobayashi Y. Mitigation of methane production from cattle by feeding cashew nut shell liquid. *Journal of Dairy Science* (査読有), 95: 5308-5316. 2012. DOI: 10.3168/jds.2012-5554.

(5) Kobayashi Y., Shinkai T, and Koike S. Agricultural by-products as modulators of

rumen microbiota. In: International Colloquium on Rumen Microbiology (査読有) (ISBN 978-85-63273-12-3, ISSN 1983-4357), pp. 49-60. 2012. DOI/URL: なし

〔学会発表〕 (計 3 件)

(1) Kobayashi, Y. Mitigation of methane gas from cattle: toward greener, healthier and more efficient animal production. International Conference on Agricultural Biodiversity and Sustainability. August 27-29. 2012, Hokkaido University, Sapporo, Japan.

(2) Kobayashi Y., Shinkai T, and Koike S, Agricultural by-products as modulators of rumen microbiota. International Colloquium on Rumen Microbiology, 49th Annual Meeting of the Brazilian Animal Society, July 22-27. 2012, National Convention Center, Brasilia, Brazil.

(3) Koike, S. and Y. Kobayashi. Ecology and function of ruminal fibrolytic consortia revealed by culture-dependent and independent approaches. The 3rd International Symposium on Gastrointestinal Microbial Ecology and Function. May 23-25. 2012, Zhejiang University, Hangzhou, China.

〔その他〕

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