

プロテアーゼ耐性バクテリオシン様物質（PRB）が去勢羊のルーメンメタン生成及び糞尿由来亜酸化窒素発生に及ぼす影響

阿 佐 玲 奈

畜産学研究科畜産衛生学専攻環境衛生学講座（博士後期課程2年）

1. 目 的

農畜産由来の温室効果ガスの中で、反芻家畜のルーメン内で生成されるメタンガスが、そのインベントリーの中で特に影響の大きいものとして挙げられている。反芻家畜のルーメン内には、細菌、原生動物などの嫌気性微生物が多数生息しており、反芻家畜の摂取した飼料は、これら微生物のはたらきにより分解され、この時生じた代謝性水素から二酸化炭素が還元され、メタンが生成される。メタンガスの標準状態における燃焼熱は $890\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ であるが、嘔気として排出される際に呼気と混合し、約100倍希釈される。従って、エネルギーとしての回収は不可能であるが、メタンガスは二酸化炭素の23倍の温室効果を示すので（IPCC, 2003）、反芻家畜が排出するメタンガスは、二酸化炭素換算で、温室効果ガス総排出量の4～5%にも相当する。反芻家畜からのメタンガス排出量の低減は、地球温暖化問題の重要課題の一つである。十勝は日本を代表する有数の酪農地域であり、乳牛・肉牛等の反芻家畜から排出されるメタン及び亜酸化窒素ガスの温室効果ガス削減は緊要な課題である。乳酸菌から生成される抗菌性バクテリオシン様物質（PRB）は予備試験においてルーメン内微生物のプロテアーゼに耐性を持つことが明らかにされ、*in vitro* でルーメンメタン生成に持続効果を有することを報告した（日本畜産学会109回大会，2008）。

本研究は畜産分野に由来する主要な温室効果ガスであるルーメンメタン及び亜酸化窒素の低減を目的としてプロテアーゼ耐性乳酸菌生産バクテリオシン様物質の効果を反芻家畜の代表供試動物としてめん羊を用いたガス代謝試験によって評価した。

2. 方 法

ルーメンフィステル装着去勢羊4頭を供試し、基礎飼料として濃厚飼料、アルファルファヘイキューブ及びチモシー乾草（乾物当たり1：1：1）を代謝体重あたり55g維持量給与する。4×4のラテン方格法に従い、処理区を（1）対照区（非PRB生産菌 *Lactococcus lactis* ATCC19435培養上清液500ml/日）；（2）PRB1区（PRB生産菌 *Lactobacillus* sp.1490L培養上清液500ml/日）；（3）PRB2区（PRB生産菌 *Lactobacillus* sp.1490L培養上清液1000ml/日）；（4）Nisin区（Nisin）の4処理設定した。試験は、馴致期10日間、消化試験5日間、呼吸試験2日及びルーメン液採取1日の計18日間を1期として4期設定し、 CH_4 発生量を中心に、飼料消化率、エネルギー出納、窒素出納及びルーメン発酵性状について計測した。

1) ガス代謝試験

開放式フード法による呼吸試験を行った。飼料給与30分前から呼気の測定を開始し、一頭当たり15分のローテーションで、連続24時間メタン生産量について測定した。

測定した15分のうちの最後の5分間の平均を計算し、そこから一日当たりのメタン生成量を求め、その後4期分の4頭のデータの平均を求めた。

2) ルーメン液性状

第1胃内容液を、ガス代謝試験終了後、朝の飼料給与直前の8:30に第1回目を採取し、それを0時間として0, 2, 4, 6, 8及び24時間の計7回、フイステルよりシリンジを用いて、約20ml採取した。内容液採取後、直ちにpHメーター（東亜ポータブルpH計）を用い、pHおよびORPを測定し、凍結保存した。低級脂肪酸濃度（VFA）は凍結保存したルーメン液を解凍し、遠心分離（18,000×g, 15分間）した。上澄液0.8mlに25%メタリン酸0.2mlを加え、一晚凍結保存した。解凍後、遠心分離（8,000×g, 15分間）した。その上澄み液0.5mlに内部標準液10mM 2-エチル-ブチルを0.5ml加え、分析用サンプル液として調製した。校正用標準液として、50mM酢酸、50mMプロピオン酸、50mM酪酸、10mMイソバレリアン酸、10mMバレリアン酸及び5mMカプロン酸の混合液を用い、サンプル液と同様に調製した。VFAの分析はキャピラリーガスクロマトグラフィ（GC-2014 SHIMADZU）によりTakahashi et al.（1989）による内部標準液法で行った。各VFA濃度の定量演算はGCワークステーション（GC-Solution）の自動演算プログラムで行った。

3. 結 果

1) メタン、酸素、二酸化炭素及び熱発生量に及ぼすPRBの影響

表1にエネルギー代謝試験の結果を示す。から表3に、熱発生量を表4に示した。

表1より、PRB1区及び2区において1日当たりのメタン生成量で有意差は認められず、モネンシン区ほどの抑制は示されなかった。酸素消費量と二酸化炭素生産量が対照区と比べて高い傾向を示したが、代謝体重当たりの熱発生量では有意差は認められなかった。

表1 エネルギー代謝試験成績

	対照区	モネンシン	PRB1	PRB2
O ₂ 消費量 (l/day)	403.7	413.3	426.6	427.1
CO ₂ 生成量 (l/day)	405.7	397.1	441.1	434.4
CH ₄ 生成量 (l/day)	27.9	29.7	36.3	37.1
熱発生量 (MJ/day)	9	9.1	9	7.8

2) ルーメン性状に及ぼすPRBの影響

表2にはルーメン性状に及ぼすPRBの影響を示した。メタン抑制の指標の一つであるAP比を見ると、モネンシン区、PRB1区及び2区では対照区と比べるとAP比が低くなる傾向が見られ、プロピオン酸を生成する過程で優先して水素が使われていることが示唆された。ルーメン菌の活性の指標の一つである総VFA濃度を見ると、対照区と比べてモネンシン区、PRB1区及び2区では

対照区より高い値が示されていることから、PRB がルーメン菌全体の活動を抑えるものではないことが示唆された。

表2 ルーメン液性状

	対照区	モネンシン	PRB1	PRB2
pH	6.7	6.9	7.0	6.6
ORP	218.3	213.5	260.0	243.5
酢酸 (mM)	41.7	52.6	46.6	47.3
プロピオン酸 (mM)	10.5	15.0	13.8	13.7
酪酸 (mM)	6.5	7.4	9.0	9.0
総 VFA (mM)	61.2	74.7	70.9	73.8
AP 比	4.1	3.5	3.6	3.4

4. 考 察

1) メタン生成に及ぼす PRB の影響

メタン生成量は対照区と比べて PRB 添加区でメタン抑制効果は示されなかった。また代謝体重 1 kg 当たり及び乾物摂取量 1 kg 当たりのいずれにおいても、PRB 添加区ではメタン抑制効果は認められなかった。しかし、本試験では供試飼料のタンパク含有量が、通常の供試飼料よりも高かったため対照区のメタン発生量が通常の50%前後の値を示していた。このため、本研究における高タンパク飼料条件下では、PRB のメタン抑制効果が示されなかったと推察される。このことは、対照区と比べ、PRB 添加区で呼気中の酸素濃度及び二酸化炭素濃度が高い傾向が示されたことから供試動物の呼吸総量が増えたことが推察された。

2) ルーメン発酵性状に及ぼす PRB の影響

VFA 生成において、総 VFA 濃度をはじめ全ての VFA 濃度で、対照区と比べ、PRB 添加区で高い濃度を示した。また、PRB 添加区で酢酸の濃度以上にプロピオン酸の濃度が上昇したため、モネンシンの場合と同様、A/P 比も減少する結果となった。この結果から、PRB にもモネンシン同様のメタン抑制作用があることが推察されるが、メタン生成菌に対する直接的な作用か、あるいは他のルーメンフローラを通しての間接的な作用かどうかの解明のためにはルーメン細菌叢の質的・量的解析が必要であると考えられる。

従って、本研究では、めん羊への乳酸菌由来のプロテアーゼ耐性抗菌物質 (PRB) 投与によってルーメンメタン生成が減少する傾向は示されなかった。しかし、VFA 生成を促進する傾向を示し、酢酸生成の増加がプロピオン酸生成の増加濃度を下回ったため、A/P 比が低くなる傾向を示した。

これらの結果から、PRB は反芻家畜のルーメン性状の安定化に有用に働き、メタン生成を抑制する可能性が示唆された。しかし、その抑制メカニズムについては代謝性水素の制御の関与を含め、さらに詳細な検討が必要である。

キーワード：メタン，ルーメン，バクテリオシン，モネンシン