

氏名	パンティアー アルビンダ PANTHEE, Arvinda
本籍（国籍）	ネパール
学位の種類	博士（農学）
学位記番号	連研第700号
学位授与年月日	平成29年9月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当課程博士
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学
学位論文題目	<b>Methane emission and plasma nutrients metabolism in sheep fed garlic diets（ニンニク添加飼料給与ヒツジにおけるメタン放出および血漿栄養素代謝）</b>
学位審査委員	主査 岩手大学 教授 佐野 宏明 副査 喜多 一美(岩手 教授),堀口 健一(山形 教授),松崎 正敏(弘前 教授)

## 論文の内容の要旨

### Background

The animal agriculture is a vital part of food industry but it raises environmental concerns due to its contribution on greenhouse gas. Manipulating the rumen ecosystem to enhance the digestibility of fibrous feeds, and reduce methane emission by ruminants to improve animal performance are the major goals for animal nutritionists. Feed additives such as organic acids, ionophores, halogen compound and other antibiotics were used to modify ruminal fermentation, affect ruminal methanogenesis and improve animal performance. However, the use of antibiotics as feed additives due to the concerns of wide spread antibiotic resistant bacteria and residues in dairy and meat products have shifted the research towards use of safe alternatives such as plants containing secondary metabolites. Garlic contains a complex mixture of many secondary metabolites which include allicin, diallyl sulfide, diallyl disulfide and allyl mercaptan. These secondary metabolites present in garlic have been tested for rumen fermentation and methane emission; but studies on use of garlic on plasma glucose, leucine and phenylalanine kinetics have not been studied, thus through a series a experiment, we tried to see the role of garlic on plasma glucose and amino acid kinetics along with rumen fermentation and nitrogen utilization in sheep.

## **Experiment 1**

It is well discussed that rate of CH<sub>4</sub> emission are influenced by a range of diet and animal factors, such as feed intake, diet quality, and nutrient utilization efficiency. Thus, an experiment was conducted to see the methane emission in sheep fed iso-energetic diet (100kcal) of mixed hay (MH) (57 g/kg<sup>0.75</sup>/d of feed, 7 g/kg<sup>0.75</sup>/d CP) diet and mixed hay and concentrate (Conc.) diet (40:60 ratio, 45 g/kg<sup>0.75</sup>/d of feed,) on methane emission, rumen fermentation characteristics, nitrogen utilization, microbial protein synthesis and microbial diversity in rumen of sheep. Experiment was carried out in crossover design of 21 days period with 14 days of adaptation to diet. Conc. diet lowered rumen pH (P<0.01). Rumen ammonia, total volatile fatty acid, acetic acid and propionic acid did not differ between the diets however butyric acid was higher (P<0.01) in Conc. diet. Acetic to propionic acid ratio was lower (P=0.01) in Conc. diet. Total methane emission during the 24 h period did not differ between the diets. The nitrogen intake, fecal nitrogen excretion and urinary nitrogen were higher (P<0.05) in MH diet. Nitrogen digestibility was higher (P<0.01) in Conc. diet. Urinary derivatives namely allantoin, uric acid, and xanthine and hypoxanthine were higher (P<0.05) in Conc. diet and thus total microbial nitrogen supply was also higher (P<0.01) in Conc. diet. Microbial diversity measured using Shannon index, Dominance index and Evenness index by DGGE gels did not differ between the diets. Thus, from the present experiment, we can conclude that in iso-energetic diets, concentrate diet have higher nitrogen digestibility and higher microbial nitrogen supply to the animal thus might have positive impact on productivity. Although methane emission and rumen fermentation characteristics did not differ did not differ between the diets, concentrate diet might be beneficial from environmental aspect due to less loss of nitrogen into the environment as nitrogen retention from both the diets was comparable in an iso-energetic condition. Better utilization of nitrogen in diet might can be correlated to faster body growth and thus lesser emission of methane.

## **Experiment 2**

In our second experiment, we tried to find if secondary metabolites present in garlic could influence the rumen fermentation, methane emission and dry matter digestibility. The experiment was carried out using Rumen Simulation

Technique (RUSITEC) as invitro methods are easy, cheap and faster to compare multiple samples. Control (Con.) diet was 15 g DM of mixed hay (orchardgrass and reed canarygrass). Four levels of freeze dried garlic leaves (10, 20, 40% and 60% DM respectively added to Con. diet) and four levels of freeze dried garlic bulbs (3, 6, 12, 18% DM respectively added to Con. diet). Rumen pH did not differ between the diets. Total VFA was lower ( $P<0.05$ ) in 40% and 60% garlic leaves added diets and 12 % and 18% garlic bulb added diets. Ammonia concentration did not differ between the diets except for 40% garlic leaves added diet tended to be higher ( $P=0.07$ ). Dry matter digestibility lower ( $P<0.05$ ) in 20%, 40%, 60% garlic leaves added diets and 6%, 12%, 18% garlic bulb added diets. Total methane collected was lower ( $P<0.05$ ) in 20%, 40% and 60% garlic leaves added diets and 12% and 18% garlic bulb added diets. Methane collected per g DMD was lower ( $P<0.05$ ) in 20%, 40% and 60% garlic leaves added diet and 12 % and 18 % garlic bulb added diets. In the present experiment, garlic leaves or bulb at higher concentration lowered methane emission which was desirable but consequently lowered the dry matter digestibility also which was undesirable, thus garlic leaves (around 10 to 20%) or bulb (3% to 6%) concentration seems to be appropriate and more experiments using garlic at these lower concentration could give us appropriate dose to use as a diet additive based on this study on the parameters studied.

### **Experiment 3**

Although in-vitro methods are cheap, easier and faster, but its significance cannot be validated until they are further verified on in-vivo conditions, thus in the third experiment we fed garlic leaves to sheep to see the effects on rumen fermentation, methane emission, plasma glucose kinetics and nitrogen utilization in sheep. Six sheep were fed freeze dried garlic leaves at 2.5 g/kg  $BW^{0.75}/d$  (about 5% DM of diet) (FDGL diet) added to control diet using a crossover design. Control diet (GLCon. diet) consisted of mixed hay and concentrate at 60:40 ratio. Plasma glucose turnover rate was measured using primed continuous infusion of  $[U-^{13}C]$ glucose. No significant differences in rumen fermentation parameters were noticed except for rumen ammonia tended to be higher for FDGL diet. Methane emission per animal per day did not differ between the diets but methane emission per kg dry matter ingested and methane emission per kg dry matter digested was lower ( $P<0.05$ ) for FDGL

diet. Plasma glucose concentration was similar between the diets but plasma glucose turnover rate tended ( $P<0.10$ ) to be higher in FDGL diet. Nitrogen intake was higher ( $P<0.01$ ) in FDGL diet due to extra N available due to addition of garlic leaves. Fecal nitrogen was lower ( $P<0.05$ ) in FDGL diet and thus nitrogen absorption was higher ( $P<0.01$ ). Nitrogen retention and nitrogen digestibility were also higher ( $P<0.05$ ) in FDGL diet. Purine derivatives namely allantoin tended ( $P<0.10$ ) to be higher in FDGL diet and thus total microbial nitrogen supply also tended ( $P<0.10$ ) to be higher in FDGL diet. Inclusion of FDGL as feed supplement had no negative effects on ruminal fermentation characteristics and had positive N utilization. However, further research seems necessary to explain its potential on methane reduction as well as glucose turnover.

#### **Experiment 4**

In the fourth experiment, we examined the effect of feeding garlic oil to sheep on rumen fermentation characteristics, methane emission, nitrogen utilization, plasma glucose, leucine, phenylalanine and tyrosine kinetics. Primed continuous infusion of [U- $^{13}\text{C}$ ]glucose, [1- $^{13}\text{C}$ ]leucine, [ $^2\text{H}_5$ ]phenylalanine and [ $^2\text{H}_2$ ]tyrosine were carried out followed by hyperinsulinemic euglycemic clamp. Control (GOCon.) diet consisted of mixed hay and concentrate (70:30) and experimental (GO) diet consisted of garlic oil added at 30 mg/kgBW<sup>0.75</sup>/d to GOCon diet. Rumen pH, ammonia, VFA concentration and methane emission did not differ between the diets. Glucose concentration was lower ( $P<0.05$ ) in GO diet and glucose turnover rate was higher ( $P<0.05$ ) in GO diet. Nitrogen intake did not differ between the diets. Fecal nitrogen was lower ( $P<0.05$ ) in GO diet and thus nitrogen absorption was higher ( $P<0.05$ ) in GO diet. Urinary nitrogen excretion did not differ between the diets and thus nitrogen retention also was similar between the diets. The leucine, phenylalanine and tyrosine turnover rates did not differ within the diets. The whole body protein synthesis and degradation based on phenylalanine tyrosine model did not differ between the diets. The hyperinsulinemic euglycemic clamp did not differ between two diets in rate of glucose production and utilization and exogenous glucose infusion despite the lower blood glucose concentration and tendency of increased glucose turnover rate. Based on these the effect of garlic oil on ruminant feedstuff use is still debatable and further studies are necessary.

## Conclusion

Based on the above experimental findings we can thus conclude that garlic leaves, garlic bulb or garlic oil failed to mitigate methane emission; and positive effects on nitrogen utilization and glucose metabolism are still debatable. Feeding garlic leaves or garlic oil in ruminants could be a potential feed additive in future, however further research is recommended.

畜産は農業の重要な分野であるが、温室効果ガス(GHG)への寄与による環境に対する懸念が増大している。反芻家畜は消化吸収器官である第一胃を持ち、第一胃内に棲息する微生物による発酵作用により本来は乳動物が利用できないセルロース等の栄養素を利用できる。しかし、この過程でメタンを生成して大気中に放出してしまうため、メタン放出の抑制は解決すべき重要な課題である。これまで、イオノフォアや抗生物質などの飼料添加物は第一胃発酵を変化させて動物の成績を向上させるために使用されてきた。しかしながら、広範な耐性菌や畜産物への残留の懸念から飼料添加物としての抗生物質は二次代謝産物を含む植物のような安全な代替物の研究に移行してきた。ニンニクは *allicin*、*diallyl sulfide*、*diallyl disulfide* および *allyl mercaptan* など多くの二次代謝産物を含んでいる。ニンニクの二次代謝産物は第一胃発酵やメタン放出の研究で使用されているが、血漿グルコース、ロイシン、フェニルアラニン、チロシンに関する代謝に及ぼすニンニクの影響は研究されていない。したがって、一連の研究を通じて我々はヒツジにおいて第一胃発酵性状、窒素出納とともに血漿グルコースおよびアミノ酸代謝に及ぼすニンニクの役割を明らかにしようとした。

### 【実験 1】

メタン放出量は飼料摂取量、飼料の品質、栄養素の利用効率のような要因の影響を受ける。そこで、ヒツジを用いてメタン放出量に及ぼす給与飼料の影響を明らかにしようとした。飼料は混播乾草(MH 飼料、 $57 \text{ g/kg}^{0.75}/\text{日}$ )および混播乾草と濃厚飼料の混合飼料(粗濃比 40:60、HC 飼料、 $45 \text{ g/kg}^{0.75}/\text{日}$ )とし、いずれも ME エネルギー給与量を  $100 \text{ kcal/kg}^{0.75}/\text{日}$  とした。HC 飼料は第一胃 pH を低下させた( $P < 0.01$ )。第一胃アンモニア、全 VFA、酢酸およびプロピオン酸濃度は飼料間に差がなかったが、酪酸濃度、酢酸：プロピオン酸比は HC 飼料が高かった( $P < 0.01$ )。24 時間のメタン放出量は飼料間に差がなかった。窒素摂取量、糞中および尿中窒素排泄量は MH 飼料で高かった( $P < 0.05$ )。窒素消化率および微生物態窒素供給量は HC 飼料で高かった( $P < 0.01$ )。DGGE 測定による第一胃内微生物叢は飼料間に差がなかった。以上の結果から、濃厚飼料は窒素消化率および微生物態窒素供給量が高いため、生産性に好影響をもたらすと結論される。メタン放出量および第一胃発酵性状は飼料間に差が認められなかったが、濃厚飼料は環境への窒素損失が少ないことから有益であるかもしれない。飼料の優れた窒素利用は高成長やメタン放出量の削減と関連しているのかもしれない。

### 【実験 2】

ニンニクに存在する二次代謝産物が第一胃発酵性状、メタン放出量や DM 消化率に影響を与えるか否かを明らかにしようとした。実験には多数のサンプルを迅速、簡便かつ精度高く比較できる *in vitro* の実験装置である Rumen Simulation Technique (RUSITEC)を使用した。

対照飼料(Con. diet)は混播乾草とした。ニンニクの添加量は凍結乾燥したニンニク茎葉(10、20、40、60%飼料乾物(DM))とニンニク球根(3、6、12、18%飼料 DM)とした。第一胃 pH は飼料間で差がなかった。総 VFA は 40、60%茎葉添加飼料、12、18%球根添加飼料が Con. 飼料より低かった( $P < 0.05$ )。アンモニア濃度は飼料間に差がなかった。DM 消化率は 20、40、60%茎葉添加飼料および 6、12、18%球根添加飼料で低かった( $P < 0.05$ )。メタン生成量および可消化 DM あたりのメタン生成量は 20、40、60%茎葉添加飼料および 12、18%球根添加飼料で低かった( $P < 0.05$ )。以上の結果から、高水準の茎葉あるいは球根では DM 消化率の低下に伴いメタン生成量が低下することが示された。

### 【実験 3】

*in vitro* で得られた結果は *in vivo* と必ずしも一致しない。そこで、実験 3 では凍結乾燥したニンニク茎葉を添加した飼料をヒツジに給与し、第一胃発酵性状、メタン放出量、血漿グルコース代謝動態および窒素利用率を明らかにしようとした。ヒツジ 6 頭を用い、対照 (GLCon. diet) 飼料は混播牧草と濃厚飼料の給与比率を 60:40 とした。CON 飼料に 2.5g/kg<sup>0.75</sup>/日の凍結乾燥ニンニク茎葉(GL 飼料、5%飼料 DM)を給与した。血漿グルコース代謝回転速度は[U-<sup>13</sup>C]グルコースの同位元素希釈法を用いて測定した。第一胃発酵性状は飼料間に差が認められなかった。1 頭あたりのメタン放出量は飼料間に差はなかったが、DM 摂取量あたりおよび DM 消化量あたりのメタン放出量は GL 飼料で低かった( $P < 0.05$ )。血漿グルコース代謝回転速度は GL 飼料で高い傾向を示した( $P < 0.10$ )。窒素蓄積は GL 飼料で高く( $P < 0.05$ )、微生物態窒素供給量は高い傾向を示した( $P < 0.10$ )。したがって、飼料へのニンニク茎葉添加はメタン放出量を低下させ、窒素蓄積を増加させることにより環境に好影響を与え、炭水化物代謝を促進することが示唆された。

### 【実験 4】

ガーリックオイルは活性含硫物質の割合が高く、容易に入手できるのためガーリックオイルを用い、ヒツジの飼料利用率、第一胃発酵性状、メタン放出量、栄養素(グルコース、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン)代謝動態およびインスリン作用を明らかにしようとした。ヒツジ 6 頭を用い、対照(oCON)飼料は混播牧草と濃厚飼料の給与比率を 70:30 とした。oCON 飼料に 30mg/kg<sup>0.75</sup>/日のガーリックオイル(GO 飼料)を投与した。血漿グルコース、ロイシン、フェニルアラニン、チロシン)代謝動態は同位元素希釈法([U-<sup>13</sup>C]グルコース、[1-<sup>13</sup>C]ロイシン、[<sup>2</sup>H<sub>5</sub>]フェニルアラニン、[<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]チロシン)、インスリン作用はグルコースクランプ法により測定した。第一胃 pH、アンモニア、VFA 濃度およびメタン放出量は飼料間に差がなかった。血漿グルコース濃度は GO 飼料が低かったが( $P < 0.05$ )、血漿グルコース代謝回転速度は高かった( $P < 0.05$ )。糞中窒素排泄量は GO 飼料が低く( $P < 0.05$ )、窒素吸収量は高かった( $P < 0.05$ )。血漿アミノ酸代謝回転速度および血漿フェニルアラニンとチロシンの代謝動態から算出した全身のタンパク質合成速度は飼料間に差がなかった。GO 飼料においてグルコースクランプ法実施中における血糖値は低く、血漿グルコース代謝回転速度は低い傾向を示したにもかかわらず、グルコース利用速度およびグルコース注入速度は差がなかった。したがって、反芻家畜におけるガーリックオイルの使用には議論の余地があり、さらなる研究が必要である。

### 【結論】

本実験で得られた結果から、ニンニク茎葉、ニンニク球根あるいはガーリックオイルはメタン放出を抑制しないが、家畜の生産性を改善する窒素利用およびグルコース代謝には有効であると結論された。したがって、ニンニクは将来的に反芻家畜における有力な飼料添加物になり

得ることが示された。

## 論文審査の結果の要旨

反芻家畜は、第一胃内に棲息する微生物による発酵作用によりセルロース等を栄養素として利用できる。しかし、この過程で強力な温室効果ガスであるメタンが生成されるため、メタン放出の抑制は解決すべき重要な課題である。ニンニクは allicin、diallyl sulfide など多くの二次代謝産物を含んでいる。そこで本研究では、ヒツジにおける飼料の利用性、メタン放出量、第一胃発酵性状とともに血漿栄養素代謝および内分泌機能に及ぼすニンニク添加の影響を明らかにすることを目的とした。

(実験 1) ヒツジを用いて第一胃発酵性状およびメタン放出量に及ぼす給与飼料の影響を明らかにしようとした。飼料は混播乾草(MH 飼料)および混播乾草と濃厚飼料の混合飼料(粗濃比 40:60、HC 飼料)とし、いずれも維持エネルギー量を給与した。メタン放出量は連続的に測定した。第一胃 pH および酢酸：プロピオン酸比は HC 飼料が低く ( $P < 0.01$ )、酪酸濃度は高かった ( $P < 0.01$ )。メタン放出量は飼料間に差がなかった。窒素(N)消化率および微生物態 N 供給量は HC 飼料で高く ( $P < 0.01$ )、DGGE 測定による第一胃内微生物叢は飼料間に差がなかった。以上の結果から、メタン放出量は飼料間に差がなかったが、第一胃発酵性状が変化し、濃厚飼料多給は N 損失が少ないため環境に有益であることが示唆された。

(実験 2) *in vitro* 実験を用い、乾物(DM)消失率、第一胃発酵性状およびメタン放出量に及ぼすニンニク添加の影響を明らかにしようとした。MH 飼料を対照とし、添加量はそれぞれ凍結乾燥ニンニク茎葉では 10、20、40、60%乾物(DM)、ニンニク球根では 3、6、12、18%DM とした。DM 消失率、総 VFA およびメタン産生量はニンニク茎葉およびニンニク球根の添加量が増加するに従い低下した ( $P < 0.01$ )。

(実験 3) ヒツジを用い、飼料利用性、第一胃発酵性状、メタン放出量および血漿グルコース代謝動態に及ぼす凍結乾燥ニンニク茎葉添加の影響を明らかにしようとした。ヒツジ 6 頭を用い、対照区の飼料の粗濃比を 60:40 とし、実験区は対照飼料に凍結乾燥ニンニク茎葉(5%飼料 DM)を添加して給与した。血漿グルコース代謝回転速度は[U- $^{13}C$ ]グルコースの同位元素希釈法を用いて測定した。メタン放出量は実験区で低く ( $P < 0.05$ )、血漿グルコース代謝回転速度は高い傾向を示した ( $P = 0.09$ )。N 蓄積量は実験区で高く ( $P < 0.05$ )、微生物態 N 供給量は高い傾向 ( $P = 0.07$ )を示した。したがって、凍結乾燥ニンニク茎葉添加によってメタン放出量の低下など飼料の利用効率が向上し、血漿グルコース代謝が亢進することが示唆された。

(実験 4) ガーリックオイルは活性含硫物質の割合が高く、容易に入手できる。そこで、ヒツジの飼料利用性、第一胃発酵性状、メタン放出量、グルコース、アミノ酸代謝およびインスリン抵抗性に及ぼすガーリックオイル投与の影響を明らかにしようとした。ヒツジ 6 頭を用い、給与飼料の粗濃比を 70:30 とし、実験区では 30mg/kg<sup>0.75</sup>/日のガーリックオイルを経口投与した。血漿グルコース、ロイシン、フェニルアラニン、チロシンの代謝動態は同位元素希釈法、インスリン抵抗性はグルコースクランプ法により測定した。N 消化率は実験区が高く ( $P < 0.05$ )、第一胃発酵性状およびメタン放出量は差がなかった。血漿グルコース代謝回転速度は実験区が高く ( $P < 0.05$ )、血漿ロイシン、フェニルアラニン、チロシン代謝回転速度および全

身のタンパク質合成速度は差がなかった。グルコースクランプ法実施中における血漿グルコース代謝回転速度および内因性グルコース産生速度は実験区の違いに差がなかった。したがって、反芻家畜においてガーリックオイルはメタン放出量およびインスリン抵抗性を抑制に影響を及ぼさなかったものの、N利用性および血漿グルコース代謝を亢進することが示された。

(結論) ニンニク茎葉、ニンニク球根およびガーリックオイルはメタン放出量に対する抑制効果は明確ではなかったが、窒素の利用性および血漿グルコース代謝を亢進することを明らかにした。

以上、本審査委員会は「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士（農学）の学位論文として十分価値あるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

主論文

1. Panthee, A., A. Matsuno, M. Al-Mamun, and H. Sano (2017) Effect of feeding garlic leaves on rumen fermentation, methane emission, plasma glucose kinetics, and nitrogen utilization in sheep. *Journal of Animal Science and Technology* (<https://janimscitechnol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40781-017-0139-3>).

参考論文

1. Liang, X., K. Yamazaki, Md. Kamruzzaman, X. Bi, A. Panthee, and H. Sano (2013) Effect of Chinese herbal medicine on plasma glucose, protein and energy metabolism in sheep. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2013, **4** : 51.
2. Vinitchaikul, P., M. M. Rahman, A. Panthee, X. Liang, X. Bi, and H. Sano (2015) Effect of replacing soyabean meal with urea and negative energy balance on ruminal fermentation characteristics, kinetics of plasma glucose and urea in sheep. *Research Opinions in Animal & Veterinary Sciences*, **5** : 247-255.
3. Rahman, M. M., P. Vinitchaikul, A. Panthee, X. Bi, and H. Sano (2017) Effect of feeding whole-crop corn silage as dietary roughage on physiological and digestive response of sheep under heat exposure. *Animal Production Science*, **57** : 505-512.