

黒毛和種牛の肥育後期における第一胃内細菌叢構成と 肥育および枝肉成績の関係

石塚直樹¹⁾ Kim Yohan¹⁾ 岩本英治²⁾ 正木達規²⁾
木村 淳³⁾ 一條俊浩¹⁾ 佐藤 繁^{1)†}

- 1) 岩手大学農学部共同獣医学科 産業動物内科学
2) 兵庫県立農林水産技術総合センター 畜産技術センター
3) 岩手県北基幹家畜診療所 葛巻家畜診療

(2020年2月26日受付・2020年5月18日受理)

要 約 黒毛和種牛の肥育後期における第一胃液の性状、液相・固相の細菌叢構成と枝肉成績との関係を明らかにする目的で、第一胃液の pH、揮発性低級脂肪酸 (VFA)、アンモニア態窒素 (NH₃-N)、乳酸 (LA)、リポポリサッカライド (LPS) および液相と固相の細菌叢構成を解析し、肥育および枝肉成績との関係を検討した。第一胃フィステルを装着した黒毛和種去勢牛9頭を供試し、第一胃液 pH は無線伝送式 pH センサを用いて測定した。29 カ月齢時に第一胃内容物を採取し、二重滅菌ガーゼを用いて液状部 (液相) と食渣部 (固相) に区分した。液相の各種性状のほか、液相と固相の細菌叢構成を次世代シーケンシング法により解析した。また、屠殺解体 (平均 30.5 カ月齢) 後、胸最長筋内脂肪を採取し、ガスクロマトグラフ法により脂肪酸組成を測定した。

その結果、第一胃液 pH は平均 5.67 と低値を示し、LPS 活性値は平均 6.62×10^4 EU/ml と高値を示した。細菌叢構成では、液相と固相のいずれも *Firmicutes* 門、*Bacteroidetes* 門および *Actinobacteria* 門の構成比が高かった。種レベルでは *Lactonifactor longoviformis* と *Olsenella umbonata* の構成比が高く、固相では液相に比べて、*Succiniclasticum ruminis* と *Mogibacterium neglectum* の構成比が高値を示した。脂肪酸組成は C18:1、C16:0、C18:0、C16:1 の順に多く、一価不飽和脂肪酸 (MUFA) は 57.46 %、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) は 2.22 %、飽和脂肪酸 (SFA) は 40.32 % であった。第一胃液 pH と C16:1 および C18:1 組成比との間に有意な正の相関が認められ、高 MUFA 群では低 MUFA 群に比べて第一胃液 pH が高値で推移する傾向がみられた。

以上のことから、黒毛和種去勢牛の肥育後期における第一胃細菌叢構成は、液相と固相で差異があり、また、固相の細菌叢構成は液相に比べて筋肉内脂肪中 MUFA 組成や皮下脂肪厚との間で有意な相関が多いことが示唆された。

——キーワード: 肥育成績, 脂肪酸組成, 黒毛和種牛, 肥育後期, 第一胃液細菌叢

産業動物臨床医誌 11(2): 66-76, 2020

はじめに

黒毛和種肥育牛では、増体を促進するために長期間にわたって濃厚飼料が多給され、さらに、脂肪交雑基準 (BMS) を向上させるため肥育中期にビタミン A の制限給餌が行われている [1]。また、牛肉のおいしさに焦点を当てた筋肉内脂肪の脂肪酸組成の評価が行われており [2]、脂肪の口どけや芳香を生み出すオレイン酸 (C18:1)

など一価不飽和脂肪酸 (MUFA) の含有割合が多い牛肉が高く評価されている [3, 4]。さらに、脂肪酸組成は肥育後期の給与飼料の影響を受けると報告されている [5]。

肥育牛の第一胃内細菌叢構成については、乳牛と異なる構成を示して飼料効率と関連があり [6, 7]、肥育後期の濃厚飼料多給により繊維分解菌が減少したとの報告 [8] はあるが、黒毛和種肥育牛を対象とした研究は少な

† 連絡責任者: 佐藤 繁 (岩手大学農学部共同獣医学科 産業動物内科学)
〒020-8550 岩手県盛岡市上田3丁目18-8 ☎/FAX 019-621-6203
E-mail: sshigeru@iwate-u.ac.jp

い。既に Ogata *et al.* [9] は、黒毛和種牛の第一胃液の各種性状と細菌叢構成の変化を検討し、肥育の進行に伴い第一胃液の pH と揮発性低級脂肪酸 (VFA) 濃度はしだいに低下、これに伴って細菌叢の構成が大きく変動するとともに多様性も低下することを明らかにしている。

一方、牛の第一胃に存在する細菌は、第一胃液性、第一胃粘膜上皮付着性および食渣付着性に分類され、それぞれ細菌叢構成が異なっている [10, 11]。第一胃液性の細菌叢は代謝に関係しないとの報告 [12] もあるが、可溶性栄養素を代謝する細菌種が優勢であるとの報告 [11] もある。また、食渣付着性の細菌叢は複雑多様で、第一胃発酵において最も重要な役割を果たし、セルロース分解性の細菌種が優勢であると報告されている [11]。しかし、黒毛和種牛において第一胃の部位別に細菌叢構成を比較した研究は見られず、さらに第一胃細菌叢と肥育成績との関係を検討した報告 [13] は少ない。

本試験では、黒毛和種去勢肥育牛の肥育後期における第一胃液性状、第一胃液 (液相)・食渣 (固相) の細菌叢構成と肥育および枝肉成績との関係を明らかにする目的で、関連項目の解析を行った。

材料および方法

本試験で供試した黒毛和種肥育牛の飼養管理、第一胃液の採材と各種性状の測定法および細菌叢の解析法は、すでに公表された Ogata *et al.* [9] の報告と同様である。Ogata *et al.* [9] は第一胃液性状を解析しているが、本報告では第一胃内の固相における細菌叢構成、肥育および枝肉成績のデータを追加し、これらの関係を検討した。なお、本試験は岩手大学動物実験委員会の承認 (A201720) を得たうえで、兵庫県立農林水産技術総合センター動物実験指針に基づいて実施した。

供試牛および飼養管理

10 カ月齢時に第一胃フィステル (Bar Diamond, ID, USA) を装着した黒毛和種去勢牛 9 頭を供試した (表 1)。給餌は 9:30 と 15:30 の 2 回行い、粗飼料を給餌した 1 時間後に濃厚飼料を給餌した。粗飼料は稲ワラ、濃厚飼料は圧片トウモロコシ (配合割合 44%)、圧片大麦 (25%)、一般ふすま (18%)、大豆粕 (5%) および大豆皮 (6%) で構成され、粗濃比は 1.0:7.5 で飽食給餌し、自由に飲水させた。

第一胃液 pH の測定

第一胃液 pH は、無線伝送式 pH センサ (山形東亜 DKK, 山形) を用いて測定した。pH センサは第一胃フィステル孔から第一胃腹囊底部に留置し、試験期間中 10 分間隔で連続測定した。

第一胃内容物の採材と揮発性低級脂肪酸 (VFA)、アンモニア態窒素 (NH₃-N)、乳酸 (LA) およびリポポリサッカライド (LPS) 測定

採材は 29 カ月齢時に朝の給餌後 3~4 時間に行った。第一胃液はフィステルを介し、先端にチューブをつけたシリンジを用いて、第一胃腹囊底部の無線伝送式 pH センサ付近から採材し、二重滅菌ガーゼを用いて濾過して得られた濾液を液相サンプルとした。第一胃内の固相は第一胃液相と同様、腹囊底部から採取し、二重滅菌ガーゼを用いて軽く絞り、残った残渣を固相サンプルとし、-80℃で凍結保存した。また、VFA 測定にはガスクロマトグラフィー (HITACHI-163 型, 日立, 東京)、NH₃-N 測定には窒素自動蒸留装置 (ケルティックオート 1035 型, アクタック, 東京)、LA 測定には市販キット (F キット D-/L-乳酸: R-Biopharm, Darmstadt, ドイツ)、LPS 測定には市販キット (Pyrochrome with Glucashield Buffer, 東京) を用いた。

表 1. 供試牛

牛 No.	体重 (kg)			DG ²⁾ (kg)	枝肉		等級
	10 カ月齢	29 カ月齢	出荷時 ¹⁾		重量 (kg)	歩留 (%)	
1	317	636	604	0.40	353	58.4	A4
2	341	746	736	0.82	453	61.5	A5
3	326	682	664	0.08	402	60.5	A4
4	321	724	732	0.45	442	60.4	A5
5	347	738	754	0.46	449	59.5	A4
6	348	750	730	0.38	463	63.4	A4
7	326	614	636	0.16	383	60.2	A4
8	341	756	758	0.74	469	61.9	A4
9	353	766	774	0.67	468	60.5	A5

¹⁾ 30.5 カ月齢, ²⁾ 1 日増体重の平均値 (肥育後期: 23~29 カ月齢)

細菌叢解析

第一胃の液相と固相の細菌叢構成は、既報 [9] と同様の方法で解析した。すなわち、サンプルから DNA 溶液を抽出し、16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, CA, USA) に従って次世代シーケンシング法を実施した。抽出した DNA から 16S rRNA の V3-V4 領域で増幅するための PCR を行った。PCR 産物についてはアガロースゲル電気泳動を行い、均一濃度および 330 bp 付近のバンドを確認した後、次世代シーケンサー (Illumina MiSeq : Illumina) によるシーケンシングを行った。得られた配列データは MOTHUR プログラム (version 1.41.1; University of Michigan; <http://www.mothur.org/wiki/Schloss>) により解析した。97% 相同性をカットオフ値として operational taxonomic unit (OUT) を決定する際、他のサンプルよりも極端にリード数の少なかった 2 つのサンプル (液相と固相の No.4) の結果は除外し、以降の解析には使用しなかった。

枝肉性状および脂肪酸組成分析

供試牛は試験終了後、平均 30.5 カ月齢時に屠畜した。枝肉成績は日本食肉格付協会が牛枝肉取引規格 (JMGA, 1988) に従って評価した値を用いた。脂肪は屠畜後 2 日目に第 6, 7 肋間枝肉断面の胸最長筋内脂肪から採取した。採取した脂肪はサンプルチューブ入れた後、分析するまで -30℃ で保存した。脂肪酸組成は Oka ら [2] の方法に準じて測定した。すなわち、脂肪からナトリウムメチレート法により脂肪酸メチルエステルを調整し、ガスクロマトグラフ (Shimadzu GC-14A, 島津製作所, 京都) により分析した。検出には水素炎イオン化検出器を用いた。

統計解析

細菌叢解析により得られたデータは、正規分布している場合には対応のある *t* 検定、正規分布していない場合にはウィルコクソンの符号順位検定により解析した。肥育および枝肉成績は平均値、中央値、標準偏差、最小値および最大値で表した。歩留基準値は、 $[歩留基準値 = 67.37 + [0.130 \times \text{ロース芯面積 (cm}^2)] + [0.667 \times \text{バラ厚 (cm)}] - [0.025 \times \text{枝肉重量 (kg) / 2}] - [0.896 \times \text{皮下脂肪厚 (cm)}] + 2.049]$ (日本食肉格付協会, <http://www.jmga.or.jp/standard/beef/>) により算出した。また、第一胃液 pH と枝肉中の MUFA 組成の相関係数を算出した。さらに、MUFA (ミリストレイン酸 (C14:1), パルミトレイン酸 (C16:1), ヘプタデセン酸 (C17:1), C18:1, イコセン酸 (C20:1)) の割合が低い牛 (牛 No.1, No.2, No.3; $55.0 \pm 1.3\%$) および高い牛 (牛 No.5, No.6, No.9; $59.8 \pm 0.8\%$) に分け、群間の第一胃液 pH を GraphPad Prism ver. 5.01 (La Jolla, CA, USA) を用いて Two-way repeat-measure-ANOVA および Post-test として Bonferroni 法により比較した。加えて、細菌叢構成と肥育および枝肉成績との相関係数を算出した。相関係数は Shapiro-Wilk normality test により正規分布を確認した後、Pearson の積率相関係数もしくは Spearman の順位相関係数を算出した。いずれも $p < 0.05$ を有意な相関とした。

結果

第一胃液性状

第一胃液性状は表 2 に示した。第一胃液 pH は平均 5.67, pH 5.6 未満時間は平均 11.6 時間であった。総 VFA,

表 2. 第一胃液 pH, VFA, NH₃-N および LA 濃度並びに LPS 活性値

	平均	中央値	標準偏差	最小値	最大値
pH ¹⁾	5.67	5.67	0.22	5.13	6.38
VFA (mmol/dl)					
総 VFA	9.77	10.19	2.27	6.50	12.99
酢酸	5.72	6.11	1.36	3.71	7.72
プロピオン酸	2.64	2.84	0.82	1.17	3.65
酪酸	1.11	1.08	0.40	0.54	1.88
VFA (%)					
酢酸	58.61	59.16	4.49	51.11	66.62
プロピオン酸	27.08	27.86	6.63	15.87	38.62
酪酸	11.23	10.57	2.55	7.02	14.52
A/P	2.34	2.15	0.85	1.32	4.20
NH ₃ -N (mg/dl)	7.17	6.53	3.34	2.17	10.85
LA (mg/dl)	14.14	16.01	4.44	5.19	18.66
LPS ($\times 10^4$ EU/ml)	6.62	5.34	6.72	1.17	22.66

¹⁾ 採材日前後 1 週間の値, $n = 9$

NH₃-N および LA 濃度は、それぞれ平均 9.77 mmol/dl, 7.17 mg/dl および 14.14 mg/dl で、特に総 VFA と酢酸の濃度と割合は個体間の差異が大きい傾向がみられた。また、LPS 活性値は平均 6.62 × 10⁴ EU/ml を示した。

第一胃細菌叢の構成比

第一胃の液相と固相における主な細菌門における細菌属の構成比は図 1 に示した。構成比が 0.5% 以上の細菌属に着目すると、液相と固相のいずれも *Firmicutes* 門と *Bacteroidetes* 門および *Actinobacteria* 門での構成比が高く、3つの細菌門で全体の約 85% を占めていた。特に *Firmicutes* 門の *Unclassified Lachnospiraceae* 属と *Unclassified Ruminococcaceae* 属および *Succiniclasticum* 属の構成比が高く、3つの細菌属で全体の 40% 以上を占めていた。また、固相では液相に比べて *Succiniclasticum* 属、*Unclassified Clostridiales* 属および *Mogibacterium* 属の構成比が有意な高値を示した。

第一胃の液相と固相を合計した構成比について、上位 20 の OTUs 構成比は表 3 に示した。液相と固相の合計では *Lactonifactor longoviformis* と *Olsenella umbonata* の構成比が高く、液相では 6.45% と 9.57%、固相では 8.76% と 5.34% を示した。また、固相では液相に比べて、OTU0003 *Succiniclasticum ruminis* および OTU0006 *Mogibacterium neglectum* の構成比が有意な高値を示した。なお、上位 20 を占める OTUs のうち *S. ruminis* は 3つの OTUs (OTU0003, OTU0007, OTU0013) に分類され、固相における構成比は計 14.6% を占めていた。

肥育および枝肉成績

肥育および枝肉成績は表 4 に示した。出荷時体重は平均 709.8 kg、枝肉重量は平均 431.3 kg、脂肪交雑基準 (BMS No.) は平均 7.7 であった。胸最長筋内脂肪酸の組成は C18:1 が 50.97% と最も多く、次いでパルミチン酸 (C16:0) が 25.74%、ステアリン酸 (C18:0)

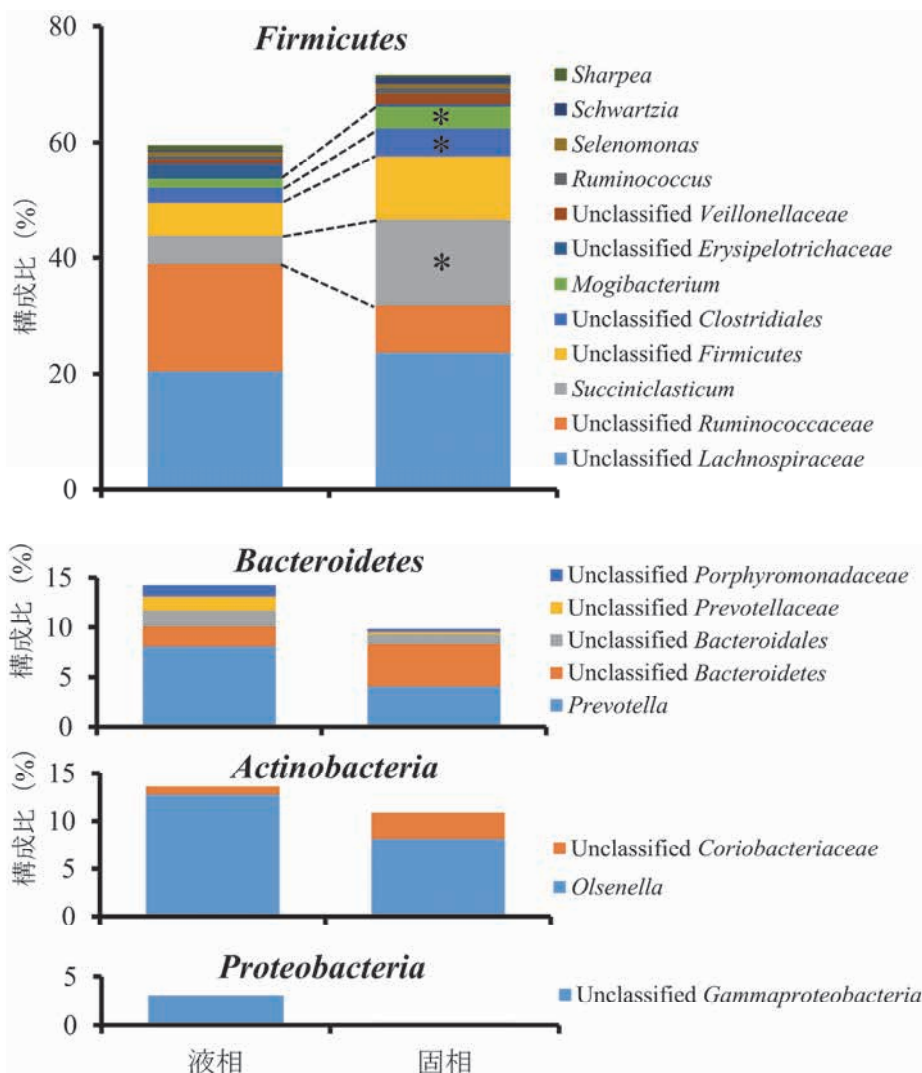


図 1. 第一胃の液相と固相における主な細菌門および細菌属の構成比
細菌属は構成比が平均 0.5% 以上、平均値 (n = 8), * p < 0.05 (液相との有意差)

表 3. 第一胃の液相および固相における OTUs 構成比 (上位 20 OTUs)

OTUs		液相	固相	p 値
Otu0001	<i>Lactonifactor longoviformis</i>	6.45 ± 2.53	8.76 ± 3.50	0.450
Otu0002	<i>Olsenella umbonata</i>	9.57 ± 4.31	5.34 ± 2.91	0.477
Otu0003	<i>Succiniclasticum ruminis</i>	2.86 ± 1.01	9.09 ± 2.77	0.030
Otu0004	<i>Ruminococcus bromii</i>	6.83 ± 2.81	2.22 ± 0.52	0.143
Otu0005	<i>Clostridiales bacterium 2PG-426-CC-42</i>	2.14 ± 0.63	5.19 ± 1.63	0.130
Otu0006	<i>Mogibacterium neglectum</i>	1.48 ± 0.44	3.67 ± 0.76	0.018
Otu0007	<i>Succiniclasticum ruminis</i>	1.17 ± 0.95	3.53 ± 2.38	0.401
Otu0008	<i>Prevotella sp. Marseille-P3114</i>	1.21 ± 1.19	3.27 ± 3.26	0.587
Otu0009	<i>Chelonobacter oris</i>	2.97 ± 2.65	0.26 ± 0.17	0.347
Otu0010	<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>	1.91 ± 0.46	1.26 ± 0.26	0.308
Otu0011	<i>Ruminococcus bromii</i>	2.26 ± 1.19	0.80 ± 0.29	0.299
Otu0012	<i>Ruminococcus lactaris ATCC 29176</i>	1.71 ± 0.58	0.97 ± 0.45	0.397
Otu0013	<i>Succiniclasticum ruminis</i>	0.72 ± 0.30	1.95 ± 0.57	0.053
Otu0014	<i>Ruminococcus bromii</i>	2.10 ± 1.08	0.37 ± 0.16	0.122
Otu0015	<i>Acetatifactor muris</i>	1.91 ± 0.88	0.50 ± 0.26	0.145
Otu0016	<i>Prevotella ruminicola</i>	1.40 ± 0.40	0.82 ± 0.39	0.435
Otu0017	<i>Blautia sp. SJ18</i>	1.07 ± 0.40	1.15 ± 0.44	0.879
Otu0018	<i>Ruminococcus faecis JCM 15917</i>	0.72 ± 0.32	1.44 ± 0.53	0.063
Otu0019	<i>Kandleria vitulina DSM 20405</i>	2.02 ± 1.91	0.08 ± 0.06	0.345
Otu0020	<i>Selenomonas bovis</i>	0.50 ± 0.24	1.55 ± 0.66	0.159

平均値 ± 標準誤差 (n = 8)

表 4. 肥育および枝肉成績

	平均	中央値	標準偏差	最小値	最大値
屠殺月齢	30.5	30.4	0.2	30.2	30.8
出荷時体重 (kg)	709.8	732.0	59.9	604.0	774.0
枝肉形質					
枝肉重量 (kg)	431.3	449.0	41.8	353.0	469.0
枝肉歩留 (%)	60.7	60.5	1.4	58.4	63.4
ロース芯面積 (cm ²)	54.2	57.0	8.1	41.0	63.0
バラ厚 (cm)	7.0	7.0	0.5	5.9	7.7
皮下脂肪厚 (cm)	1.9	1.9	0.3	1.3	2.3
歩留基準値 (%) ¹⁾	74.0	73.8	1.0	72.7	75.1
肉質形質					
脂肪交雑基準 (BMS)	7.7	7.0	1.2	6.0	10.0
牛肉色基準 (BCS)	3.6	4.0	0.5	3.0	4.0
牛脂肪色基準 (BFS)	3.0	3.0	0.0	3.0	3.0
締まり	4.6	5.0	0.5	4.0	5.0
きめ	4.9	5.0	0.3	4.0	5.0
脂肪酸組成 (%)					
C14 : 0	2.83	2.84	0.17	2.60	3.06
C14 : 1	1.03	1.03	0.18	0.79	1.34
C16 : 0	25.74	25.16	1.35	24.20	28.08
C16 : 1	4.39	4.42	0.42	3.65	4.97
C18 : 0	10.27	10.03	1.14	9.13	12.70
C18 : 1	50.97	51.07	1.77	48.38	53.87
C18 : 2	1.96	1.77	0.66	1.35	3.38
一価不飽和脂肪酸 (MUFA)	57.46	57.54	2.22	53.69	60.62
多価不飽和脂肪酸 (PUFA)	2.22	1.92	0.83	1.52	3.99
飽和脂肪酸 (SFA)	40.32	40.53	2.33	37.40	44.80
MUFA/SFA	1.43	1.42	0.13	1.20	1.62

¹⁾ 67.37 + [0.130 × ロース芯面積 (cm²)] + [0.667 × バラ厚 (cm)]
 - [0.025 × 枝肉重量 (kg) / 2] - [0.896 × 皮下脂肪厚 (cm)] + 2.049 平均値 (n = 9)

が10.27%, C16:1が4.39%の順に多く、これらの脂肪酸で全体の90%以上を占めていた。また、MUFAは57.46%, 多価不飽和脂肪酸(PUFA)は2.22%, 飽和脂肪酸(SFA)は40.32%であった。

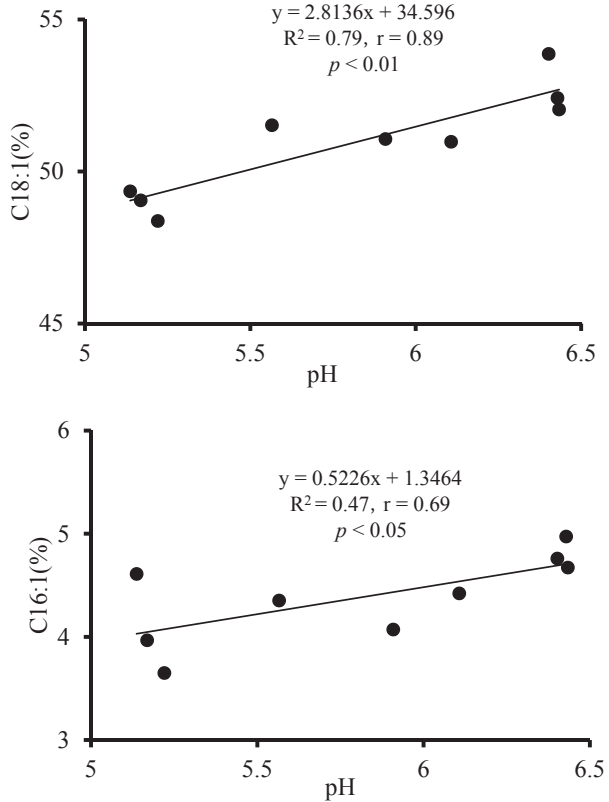


図2. 第一胃液 pH と一価不飽和脂肪酸組成 (C18:1, C16:1) との相関
pH は牛個体ごとの採材日における 24 時間平均値, n = 9

第一胃液 pH と胸最長筋の MUFA との関係

枝肉採材日における第一胃液 pH と C16:1 および C18:1 組成比との間に有意な正の相関が認められた (図2)。MUFA 組成比が高値を示した高 MUFA 群と低値を示した低 MUFA 群に区分して第一胃液 pH の推移を比較した結果、高 MUFA 群では低 MUFA 群に比べて高値で推移する傾向がみられた (図3)。

第一胃細菌叢構成と第一胃液性状, 増体, 肥育および枝肉成績との関係

第一胃の液相と固相のそれぞれ上位 10 の OTUs 構成比と主な第一胃液性状, 肥育および枝肉成績との相関係数のヒートマップは図4に示した。液相では, OTU0009 *Chelonobacter oris* と酪酸との間に有意な負の相関, LPS との間に有意な正の相関が見られた。また, 固相では, OTU0005 *Clostridiales bacterium 2PG-426-CC-42* と酢酸との間, OTU0008 *Prevotella sp. Marseille-P3114* と総 VFA との間に, いずれも有意な負の相関が認められた。

一方, 肥育および枝肉成績との間において, 液相では, OTU0009 *Chelonobacter oris* と C18:0 および SFA との間に有意な負の相関が認められた。固相では, OTU0003 *Succiniclasicum ruminis* と脂肪交雑基準との間に有意な負の相関, OTU0001 *Lactonifactor longoviformis* と皮下脂肪厚, OTU0005 *Clostridiales bacterium 2PG-426-CC-42* と C18:2 や PUFA および OTU0006 *Mogibacterium neglectum* と皮下脂肪厚との間に, いずれも有意な正の相関が, OTU0007 *Succiniclasicum ruminis* と皮下脂肪厚, C18:2 および PUFA との間に有意な負の相関が認められた。また,

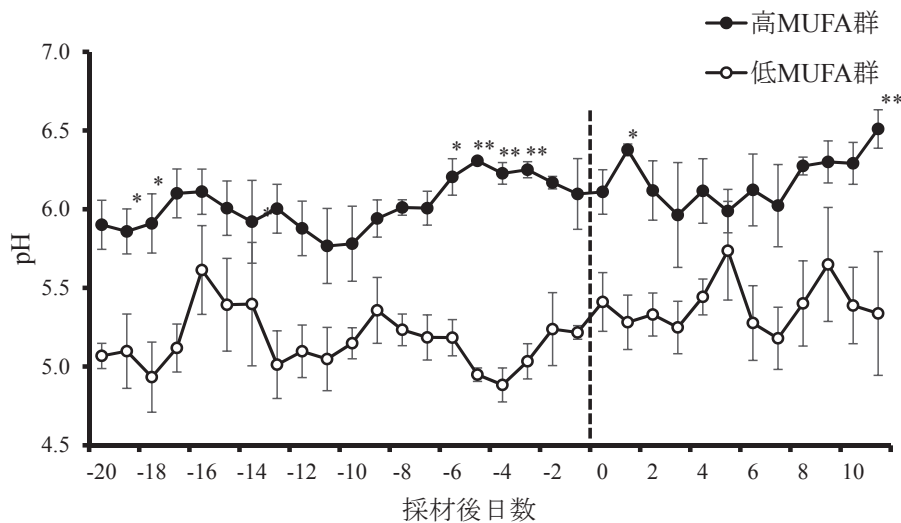


図3. 高 MUFA 群と低 MUFA 群における第一胃液 pH の変化 (24 時間平均値)
MUFA: 一価不飽和脂肪酸 (C14:1, C16:1, C17:1, C18:1, C20:1)
低 MUFA 群 (n=3, 55.0 ± 1.3%), 高 MUFA 群 (n=3, 59.8 ± 0.8%)
*p < 0.05, **p < 0.01 (低 MUFA 群との有意差)

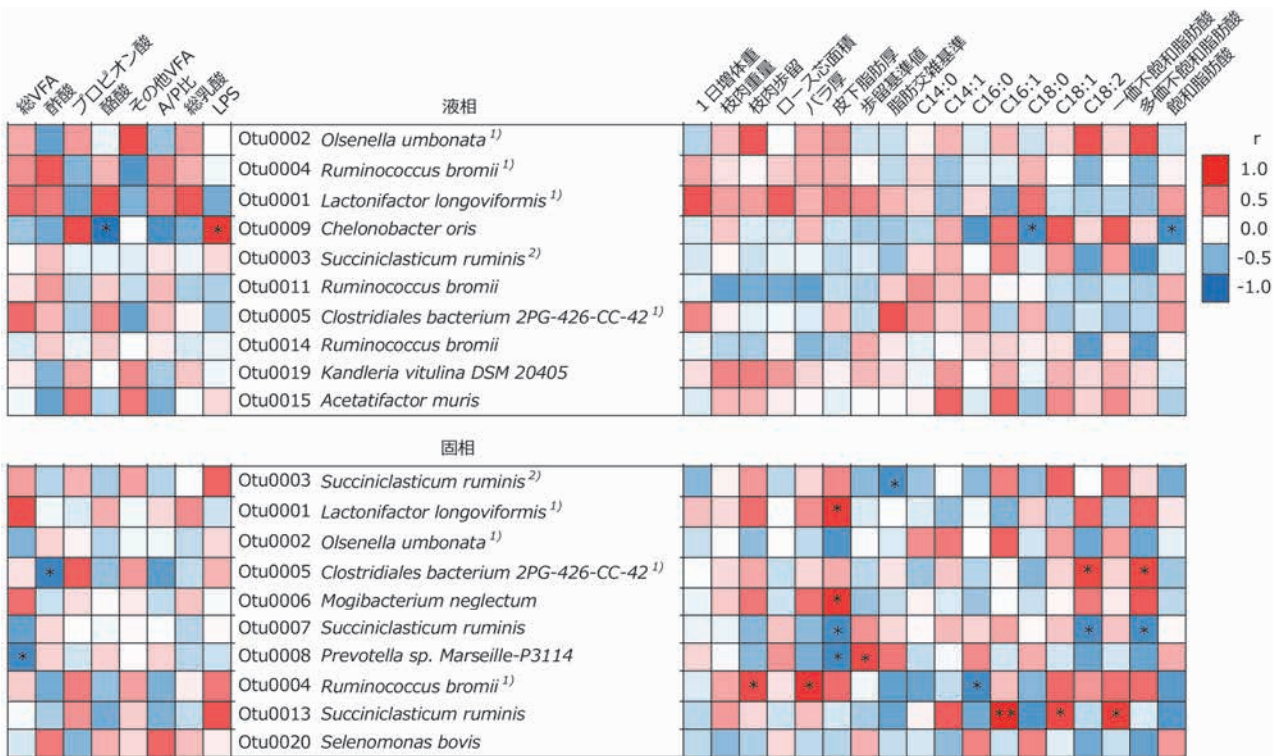


図4. 第一胃の液相と固相における細菌叢構成比（各上位10 OTUs）と第一胃液性状（左），増体，肥育および枝肉成績（右）との相関係数（ヒートマップ）

液相と固相の OTUs 構成比に ¹⁾ 有意差なし，²⁾ 有意差あり，* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ， $n = 8$

OTU0008 *Prevotella sp. Marseille-P3114* と皮下脂肪厚との間に有意な負の相関および歩留基準値との間に有意な正の相関，OTU0004 *Ruminococcus bromii* と枝肉歩留やバラ厚との間に有意な正の相関およびC16:0との間に有意な負の相関が認められた。さらに，OTU0013 *Succiniclasticum ruminis* とC16:1，C18:1およびMUFAとの間に有意な正の相関が認められた。

考 察

本試験の黒毛和種肥育牛において，第一胃液 pH は平均 5.67 と低値を示した。乳牛における亜急性第一胃アシドーシス (SARA) の基準は，pH 5.6 以下の時間が1日3時間以上 [14] と定義されており，実験的な SARA 誘発牛では pH の1日平均値が 6.16 と報告 [15] されている。今回供試した肥育後期の黒毛和種牛は，第一胃液 pH の1日平均値が著しい低値を示し，5.6 以下を呈した時間も長時間に及んでいたことから，SARA 状態にあると考えられた。

岩本ら [13] は，肥育中期 (22 カ月齢) の黒毛和種去勢牛において経口的に採取した第一胃液 pH は平均 6.8 で，A/P は平均 3.1 と報告している。今回の試験において，第一胃液 pH は平均 5.67，A/P は平均 2.34 であり，測定法が異なるので単純には比較できないが，岩本らの報告 [13] に比べていずれも低値を示した。こ

のことは，今回の供試牛が肥育後期 (30.5 カ月齢) で易発酵性飼料が多給されており，そのために VFA 産生が増加して pH が低値，また，プロピオン酸産生が増加して A/P も低値を示したと考えられた。また，SARA 誘発ジャージー種去勢牛では，第一胃液の LPS 活性値が 3,715 EU/ml から 12,589 EU/ml に増加したと報告されている [14]。今回の試験において第一胃液 LPS 活性値は，平均 66,200 EU/ml と著しい高値を示した。このことから，供試した肥育後期の黒毛和種牛では，第一胃液 pH が著しく低下し，グラム陰性菌の破壊によって多量の LPS が産生されたものと考えられた。

第一胃の細菌叢構成では，液相と固相のいずれにおいても Unclassified *Lachnospiraceae* 属と Unclassified *Ruminococcaceae* 属の構成比が最大であった。*Lachnospiraceae* 科の一部はペクチン発酵に関与している [16]。また，*Ruminococcaceae* 科には *R. albus* や *R. flavefaciens* など繊維消化に関与する細菌が分類されるが，*R. bromii* などのデンプン分解菌も含まれており機能的多様性が高い細菌科である [17]。一方，液相と固相では細菌叢構成比が異なり，特に *Firmicutes* 門で有意差が認められた。そのうち *Clostridiales* 属には *C. polysaccharolyticum* や *C. lochheadii* など第一胃に存在するセルロース分解菌が含まれていた。本試験において，固相では液相に比べて Unclassified *Clostridiales* 属

の構成比が有意な高値を示したことから、固相は液相に比べてセルロース分解に対応した細菌叢構成を示すことが示唆された。

第一胃の液相と固相の合計の OTUs では、OTU0001 *Lactonifactor longoviformis* の構成比が最大であった。OTU0001 が含まれる *Lactonifactor* は、ヒトで腸内細菌として植物リグナンの代謝物質であるエンテロジオールをエンテロラクトンに変化させる作用があると報告されている [18, 19]。エンテロジオールとエンテロラクトンはマンリアンリグナンとも呼ばれ、エストロゲン様作用や抗酸化、抗炎症および抗がん作用を有しており [19, 20]、マンリアンリグナンの抗酸化能力はビタミン E より強い [20] との報告もある。牛においてもマンリアンリグナンは生理活性をもち、新生子牛や育成牛、成乳牛の酸化ストレスを低下させると報告されている [21]。今回供試した黒毛和種牛の第一胃内において *Lactonifactor* がリグナン代謝を担っているかどうかは不明であるが、黒毛和種牛には第一胃内の特有の細菌が産生する生理活性物質が存在する可能性のあることが示唆された。

一方、固相では液相に比べて OTU0006 *Succiniclasticum ruminis*、OTU0005 *Mogibacterium neglectum* の構成比が有意な高値を示した。*S. ruminis* は第一胃内でコハク酸からプロピオン酸を産生する主要なグラム陰性細菌であり、濃厚飼料給与による SARA 乳牛で増加する [22]。本試験において、*S. ruminis* は固相において3つの OTUs の構成比が最大であり、産生されるプロピオン酸は肝臓で糖新生の基質となることから、*S. ruminis* は黒毛和種肥育牛のエネルギー産生に重要な役割を果たしていると考えられた。また、*M. neglectum* はグラム陽性嫌気性桿菌で、口腔内細菌として単離される [23]。*Mogibacterium* 属はヒツジの第一胃で見つかった [24] が、第一胃発酵に及ぼす影響は不明である。

細菌叢構成と第一胃液性状との相関関係を検討した結果、固相の第一胃細菌叢は液相に比べて多くの項目で有意な相関が認められた。飼料付着性細菌は複雑多様な細菌叢を示し [25]、飼料表面や内部にバイオフィルムを形成し、多様な酵素により植物組織を消化して第一胃消化の起点となる [10] ほか、固相の食渣である飼料は液相に比べて第一胃に長く滞留する [26] ことから、固相の細菌叢構成は第一胃発酵や増体および枝肉肉質に影響することが示唆された。また、液相では、OTU0009 *Chelonobacter oris* と酪酸との間に有意な負の相関、LPS との間に有意な正の相関、さらに、固相では OTU0005 *Clostridiales bacterium 2PG-426-CC-42* と酢酸との間に有意な負の相関が認められた。一部 OTUs と酪酸や酢酸、LPS との間に密接な関連のあることが

示唆されたが、この点については、さらに例数を重ねて検討する必要がある。

一方、屠畜解体後の枝肉成績では、供試した全ての牛で等級 A4 または A5 と評価され、脂肪交雑基準 (BMS No.) は平均 7.7 であった。これは農林水産省の定める特定農林水産物等登記簿に登録される但馬牛としての基準を満たしていた。枝肉脂肪中の脂肪酸組成では、オレイン酸が約半分の割合を占めていた。また、第一胃液 pH と C16 : 1 および C18 : 1 との間に有意な正の相関が認められ、第一胃液 pH は高 MUFA 群で低 MUFA 群に比べ有意な高値を示した。このことは、第一胃液 pH が低下すると、多価不飽和脂肪酸 (PUFA) に H⁺ を添加する細菌が減少して MUFA 割合が増加するとの報告 [27] とは異なっていた。

細菌叢構成と増体、肥育および枝肉成績との相関関係を検討した結果、固相では、OTU0013 *Succiniclasticum ruminis* と C16 : 1、C18 : 1 および MUFA との間に有意な正の相関がみられた。肥育中期の但馬牛を用いた試験では、第一胃液の A/P が MUFA と負の相関を示すと報告されている [13]。このことから、*S. ruminis* がコハク酸からプロピオン酸を産生する作用と MUFA 割合の増加は、互いに関係があると考えられた。反芻類の食餌に含まれる脂肪は、第一胃内で微生物由来のリパーゼによって遊離脂肪酸となり、微生物による水素添加により最終的に飽和脂肪酸として下部消化管で吸収される [28]。コハク酸は前駆体のフマル酸が水素還元されて産生するため、*S. ruminis* が優勢な第一胃内では H₂ が消費されて脂肪酸に添加できる H₂ が減少し、そのために不飽和脂肪酸のまま吸収された可能性がある。これらのことから、第一胃の細菌叢構成と筋肉脂肪中の脂肪酸組成との間に関連のあることが示唆された。

固相の OTU0004 *Ruminococcus bromii* と枝肉歩留およびバラ厚との間に有意な正の相関がみられた。*R. bromii* は反芻類とヒトから分離される重要なデンプン分解菌であり、牛では大麦などの濃厚飼料給餌によって優勢となり、デンプンの利用を高める細菌種である [29]。本試験においても大麦飼料を給餌したことから、*R. bromii* が第一胃内の優勢な細菌種として分類され、これがデンプン消化を高めてバラ厚および枝肉歩留を増加させた可能性がある。

以上のように、本試験において黒毛和種去勢牛の肥育後期における第一胃細菌叢構成は、液相と固相で差異があり、固相の細菌叢には牛肉の食味に関わる枝肉脂肪中の MUFA 割合を増加させ、デンプン消化効率を高めて肉質の向上に寄与する細菌種が存在する可能性のあることが示唆された。今回の結果から、黒毛和種肥育牛の第一胃性状や細菌叢構成と肥育成績との関係の一部が明ら

かになった。今後、さらに黒毛和種牛の第一胃細菌叢に関するデータを集積し、本研究の結果を検証する必要がある。

引用文献

1. Oka A, et al : Effects of Vitamin A on beef quality, weight gain, and serum concentrations of thyroid hormones, insulin-like growth factor-1, and insulin in Japanese Black steers, *Anim Sci Technol (Jpn)*, 69, 90-99 (1998)
2. Oka A, et al. : Genetic effects on fatty acid composition of carcass fat of Japanese Black Wagyu steer, *J Anim Sci*, 80, 1005-1011 (2002)
3. Zembayashi M, et al. : Effect of breed type and sex on the fatty acid composition of subcutaneous and intramuscular lipids of finishing steers and heifers, *J Anim Sci*, 73, 3325-3332 (1995)
4. Yang A, et al. : A comparison of fat composition of Japanese and long-term grain-fed Australian steers, *Meat Sci*, 51, 1-9 (1999)
5. 木村信熙, 他 : 黒毛和種去勢牛の肥育後期における粗飼料給与水準が枝肉性状および枝肉脂肪の脂肪酸組成に及ぼす影響, *日畜会報*, 67, 554-560 (1996)
6. Paz HA, et al. : Rumen bacterial community structure impacts feed efficiency in beef cattle, *J Anim Sci*, 96, 1045-1058 (2018)
7. Li F, et al. : Comparative metagenomic and metatranscriptomic analyses reveal the breed effect on the rumen microbiome and its associations with feed efficiency in beef cattle, *Microbiome*, 7, 6 (2019)
8. Fernando SC, et al. : Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet, *Appl Environ Microbiol*, 76, 7482-7490 (2010)
9. Ogata T, et al. : Long-term high-grain diet altered the ruminal pH, fermentation, and composition and functions of the rumen bacterial community, leading to enhanced lactic acid production in Japanese Black beef cattle during fattening, *PLOS ONE*, doi.org/10.1371/journal.pone.0225448 (2019)
10. McAllister TA, et al. : Microbial attachment and feed digestion in the rumen, *J Anim Sci*, 72, 3004-3018 (1994)
11. De Mulder T, et al. : Exploring the methanogen and bacterial communities of rumen environments: solid adherent, fluid and epimural, *FEMS Microbiol Ecol*, 93, doi: 10.1093/femsec/fiw251 (2017)
12. Leng J, et al. : Molecular diversity of bacteria in Yunnan yellow cattle (*Bos taurus*) from Nujiang region, China, *Mol Biol Rep*, 39, 1181-1192 (2011)
13. 岩本英治, 他 : カシューナッツ殻液給与および肥育初期の濃厚飼料増給が黒毛和種去勢牛の産肉性に及ぼす影響, *兵庫県農技総研報 (畜産)*, 5, 27-13 (2016)
14. Gozho GN, et al. : Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response, *J Dairy Sci*, 88, 1399-1403 (2005)
15. Sato S, et al. : Diagnosis of subacute ruminal acidosis (SARA) by continuous reticular pH measurements in cows, *Vet Res Commun*, 36, 85-89 (2012)
16. Sun XZ, et al. : Degradation of forage chicory by ruminal fibrolytic bacteria, *Appl Microbiol*, 105, 1289-1297 (2008)
17. Emmanuelle H, et al. : Mechanistic insights into the cross-feeding of *Ruminococcus gnavus* and *Ruminococcus bromii* on host and dietary carbohydrates, *Front Microbiol*, 9, 2558 (2018)
18. Clavel T, et al. : *Clostridium saccharogumia* sp. nov. and *Lactonifactor longoviformis* gen. nov., sp. nov., two novel human faecal bacteria involved in the conversion of the dietary phytoestrogen secoisolariciresinol diglucoside, *Syst Appl Microbiol*, 30, 16-26 (2007)
19. 陳 琮湜 : 腸内フィトエストロゲン-リグナンを中心に, *腸内細菌誌*, 26, 171-181 (2012)
20. Prasad K, et al. : Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone, *Int J Angiol*, 9, 220-225 (2000)
21. Rajesha J, et al. : Antioxidant potentials of flaxseed by in vivo model, *J Agric Food Chem*, 54, 3794-3799 (2006)
22. Hook SE, et al. : Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation and recovery on the density and diversity of bacteria in the rumen of dairy cows, *FEMS Microbiol Ecol*, 78, 275-284 (2011)
23. Nakazawa F, et al. : Taxonomic characterization of *Mogibacterium diversum* sp. nov. and *Mogibacterium neglectum* sp. nov., isolated from human oral cavities, *Int J Syst Evol Microbiol*, 52 (Pt1), 115-122 (2002)
24. Belanche A, et al. : A multi-kingdom study reveals the plasticity of the rumen microbiota in response to a shift from non-grazing to grazing diets in sheep, *Front Microbiol*, 10, 122 (2019)
25. Larue R, et al. : Novel microbial diversity adherent to plant biomass in the herbivore gastrointestinal

- tract, as revealed by ribosomal intergenic spacer analysis and rrs gene sequencing, *Environ Microbiol*, 7, 530-543 (2015)
26. 三森眞琴：亜急性ルーメンアシドーシスにおけるルーメン微生物の動態，*日獣会誌*，65, 503-510 (2012)
27. 三橋忠由，他：黒毛和種去勢牛の脂肪組織における脂肪酸組成並びに色調に及ぼす給与飼料の影響，*中国農試研報*，3, 71-79 (1988)
28. Vasta V, et al. : Invited review: Plant polyphenols and rumen microbiota responsible for fatty acid biohydrogenation, fiber digestion, and methane emission: Experimental evidence and methodological approaches, *J Dairy Sci*, 102, 3781-3804 (2019)
29. Klieve AV, et al. : *Ruminococcus bromii*, identification and isolation as a dominant community member in the rumen of cattle fed a barley diet, *J Appl Microbiol*, 103, 2065-2073 (2007)

Relationship between the rumen bacterial community and meat quality in Japanese Black beef cattle at late fattening stages

N. Ishizuka¹⁾, Y-H. Kim¹⁾, E. Iwamoto²⁾, T. Masaki²⁾, A. Kimura³⁾, T. Ichijo¹⁾, S. Sato^{1)†}

- 1) *Laboratory of Farm Animal Internal Medicine, Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University*
- 2) *Livestock Technology Center, Hyogo Prefectural Technology Center for Agriculture, Forestry and Fisheries*
- 3) *Kuzumaki Branch, Iwate Prefectural Agricultural Mutual Aid Association*

ABSTRACT We investigated rumen fermentation parameters, such as rumen pH, volatile fatty acid (VFA), ammonia nitrogen (NH₃-N), lactic acid (LA), lipopolysaccharide (LPS) and the rumen bacterial community to elucidate relationships among rumen fermentation, bacterial composition in the liquid and solid fractions of rumen content and meat quality in Japanese Black beef cattle in the late fattening stages. Nine castrated (5 to 6 months old) and subsequently fistulated (at 12 months old) Japanese Black beef cattle were used. Rumen pH was measured continuously every 10 minutes using a radio transmission pH measurement system. Rumen content samples were collected at 29 months of age and filtered through two layers of cheesecloth to separate the liquid and solid fractions. Rumen fermentation parameters were measured using liquid rumen samples. Total bacterial DNA was extracted from the liquid and solid samples for paired-end sequencing of the V4 hypervariable region using an Illumina MiSeq platform. Fatty tissues in the thoracic longissimus muscle were collected after slaughter (on average 30.5 months old), and the fatty acid profile was analyzed by gas chromatography.

The mean rumen pH was low (5.67) and the rumen LPS activity was high (6.62×10^4 EU/ml) during the late fattening stage. At the phylum level, *Firmicutes* had the greatest relative abundance, followed by *Bacteroidetes* and *Actinobacteria*, for both liquid and solid fractions. At the species level, *Lactonifactor longoviformis* had the greatest relative abundance, followed by *Olsenella umbonata*, for both liquid and solid fractions, while *Succiniclasticum ruminis* and *Mogibacterium neglectum* were relatively more abundant in the solid fractions than in the liquid fractions. In the fatty acid analysis, C18 : 1 was most abundant, followed by C16 : 0, C18 : 0 and C16 : 1. Monounsaturated fatty acids (MUFA) accounted for 57.46% of the total fatty acids, polyunsaturated fatty acids (PUFA) for 2.22% and saturated fatty acids (SFA) for 40.32%. Rumen pH was significantly positively correlated with the proportions of C16 : 1 and C18 : 1, and a relatively higher rumen pH was observed in the high MUFA group compared with the low MUFA group.

Collectively, these results suggest that the bacterial composition is different between the liquid and solid fractions of ruminal content at the species level and that the bacterial composition of the solid fraction may affect the proportion of MUFA and thus meat quality in Japanese Black beef cattle at the late fattening stage.

—**Key Words** : Fattening score, Fatty acid proportion, Japanese Black beef cattle, Late fattening stage, Rumen bacterial community

† Correspondence to : Shigeru Sato (Laboratory of Farm Animal Internal Medicine, Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University)
18-8 Ueda, Morioka, 020-8550, Japan
E-mail : sshigeru@iwate-u.ac.jp