

# 黒毛和種牛の肥育時期による第一胃細菌叢構成の変化 及び枝肉成績との関係

佐藤 繁<sup>†</sup>

岩手大学農学部 (〒020-8550 盛岡市上田3-18-8)

(2020年6月15日受付・2020年8月3日受理)

## Changes in Composition of Rumen Bacterial Community and Relationship to Meat Quality in Japanese Black Beef Cattle During Fattening Stages

Shigeru SATO<sup>†</sup>

\* Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University,  
3-18-8 Ueda, Morioka, 020-8550, Japan

### 1 はじめに

黒毛和種肥育牛は、成長促進や体重増加を目的として肥育初期から長期間にわたって多量の濃厚飼料が給与され、さらに、枝肉成績を向上させる目的で肥育中期にビタミンAの給与制限が行われている[1]。このように、黒毛和種肥育牛では長期間にわたる濃厚飼料多給と粗飼料不足のために亜急性(潜在性)第一胃アシドーシス(subacute rumen acidosis: SARA)が発生し、さらに、極端なビタミンAの給与制限のためにビタミンA欠乏症が多発している。

SARAは、第一胃液pHが低下するが、明らかな臨床症状を伴わない状態であり、乳牛では第一胃液pHが1日に3時間以上にわたって5.6以下を呈する状態と定義されている[2]。SARA牛では第一胃液pHの低下によってグラム陰性菌が死滅し、リポポリサッカライド(LPS)が放出される[2-5]。LPSは第一胃粘膜上皮から吸収され、体内でTNF- $\alpha$ などの炎症性サイトカインの産生を促進する[6-8]。このように、第一胃内で過剰に産生されたLPSは、第一胃粘膜損傷や肝機能障害の原因になっている。一方、乳牛においてSARAは採食量、ボディコンディションスコア及び乳脂率の低下、蹄葉炎、第四胃変位、肝膿瘍、第一胃炎の発生[9-13]と関連があり、生産阻害要因としてきわめて重要であるこ

とから、病態解明や予防対策に関する研究が精力的に行われている。しかし、肥育牛では、SARAの病態は不明な点が多い。

第一胃内の細菌叢構成は給与飼料によって異なり、第一胃液pHの変化にも影響される[14-17]。乳牛では、粗飼料多給状態でFirmicutes門やBacteroidetes門の細菌叢構成比がほぼ同様であるが[18, 19]、濃厚飼料多給によるSARA誘発牛では、Bacteroidetes門やProteobacteria門などのグラム陰性菌が死滅・溶菌するとともに、Firmicutes門の構成比が増加する[20, 21]。一方、肥育牛では、第一胃細菌叢構成についての報告は少ないが、交雑種肥育牛[22]、黒毛和種の子牛[23]や育成牛[24]の報告、短期間に濃厚飼料を増給した黒毛和種牛での報告[25]などがある。また、肥育牛の細菌叢構成は乳牛と異なるが、飼料効率と関連があり[26, 27]、さらに、肥育後期の濃厚飼料多給により繊維分解菌が減少すると報告されている[14]。しかし、肥育牛における第一胃細菌叢構成については不明な点が多く、さらに、黒毛和種牛の肥育時期進行に伴う変化を検討した研究はみられない。

黒毛和種肥育牛では、牛肉の食味に焦点を当てた筋肉内脂肪中の脂肪酸組成の評価が行われており[28]、脂肪の口どけや芳香を生み出すオレイン酸など一価不飽和脂肪酸の含有割合が多い牛肉が高く評価されている

<sup>†</sup> 連絡責任者: 佐藤 繁 (岩手大学農学部)

〒020-8550 盛岡市上田3-18-8 ☎・FAX 019-621-6203 E-mail: sshigeru@iwate-u.ac.jp

<sup>†</sup> Correspondence to: Shigeru SATO (Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University)

3-18-8 Ueda, Morioka, 020-8550, Japan

TEL・FAX 019-621-6203 E-mail: sshigeru@iwate-u.ac.jp

黒毛和種肥育牛の第一胃細菌叢構成の変化と枝肉成績との関係

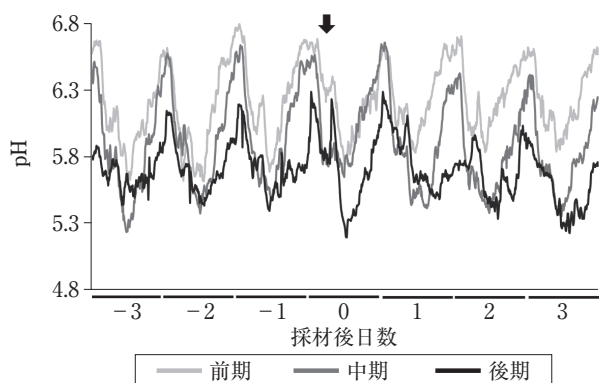


図1 肥育時期による第一胃液 pH の変化  
採材日 (↓) の前後における 10 分間隔データの平均値 (n=9)

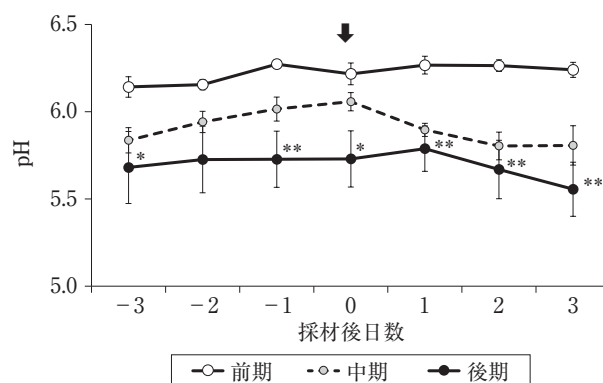


図2 肥育時期による第一胃液 pH の変化 (24 時間平均値)  
平均値 ± 標準誤差 (n=9)  
\* :  $P < 0.05$   
\*\* :  $P < 0.01$  (同日における肥育前期との有意差)  
採材日 : ↓

[29, 30]. また、筋肉内脂肪中の脂肪酸組成には、肥育後期の給与飼料が影響すると報告されており [31]、オレイン酸割合を増加させるための飼料給与の効果が検討されている。しかし、肥育後期牛における第一胃細菌叢構成に関する報告が少なく、細菌叢構成と枝肉成績との関係については不明点が多い。

著者は、長期間にわたって濃厚飼料が多給されている黒毛和種肥育牛では、分娩後の一定期間に濃厚飼料が多給される乳牛と異なり、独特の飼養管理に適応した第一胃性状を呈するのではないかと考えた。今回は、この仮説を明らかにするために実施した、黒毛和種去勢牛の肥育時期進行に伴う第一胃液の各種性状と細菌叢構成の変化を中心に、第一胃粘膜上皮における遺伝子発現の変化、肥育後期における細菌叢構成と枝肉成績との関係について、著者らの試験結果を概説する。なお、以下の試験における供試牛は、通常の飼養管理状態にある 1 牛群 9 頭の黒毛和種去勢牛で、肥育前期 (14 カ月齢)、中期 (21 カ月齢) 及び後期 (29 カ月齢) に第一胃液 pH を 7 日間連続測定し [32]、第一胃液と食渣及び粘膜上皮を採材し、各種性状を解析したものである [33, 34]。

## 2 第一胃液 pH と各種性状の変化

黒毛和種肥育牛では、濃厚飼料の多給と粗飼料の不足により第一胃内で多量の揮発性脂肪酸 (VFA) が産生され、これが蓄積されて第一胃液 pH が低下し、SARA が発生する [35, 36]。また、第一胃液 pH の低下とグラム陰性菌の死滅・溶菌によって過剰に産生された LPS は、第一胃粘膜上皮から吸収されて種々の炎症性サイトカインを産生し、急性肝炎 [35] など各種疾病の要因となっている。はじめに、黒毛和種牛の肥育時期進行に伴う第一胃液の pH と各種性状の変化、さらに pH と各種性状との関係を検討した。

### (1) 第一胃液 pH

第一胃液 pH は、肥育時期の進行に伴い、次第に低値で推移する傾向が認められた (図 1)。第一胃液 pH の 24 時間平均値 (1 日平均値) は、後期には前期に比べて有意な低値を示し、中期に比べてわずかな低値を示した (図 2)。また、1 時間平均値 (日内変動) は、肥育時期により異なる様相を示しており、中期と後期には前期に比べて、いずれも有意な低値で推移した。

第一胃液 pH は、肥育時期の進行に伴い濃厚飼料が増給されたため、第一胃内で VFA 産生が増加して低値で推移した [34] と考えられた。また、飼料摂取後の第一胃液 pH の低下は、第一胃発酵に伴う VFA 産生の増加によって起こるので、給与飼料の易発酵性に依存している。一方で、低下した第一胃液 pH の回復には、第一胃内への  $\text{HCO}_3^-$  の取込みと血中への解離型短鎖脂肪酸 (SCFA) の放出及び拡散、第一胃粘膜上皮から唾液と同レベルの  $\text{HCO}_3^-$  の分泌、モノカルボン酸供輸送体を介した乳酸と水素イオンの排泄などの pH 緩衝作用が関与すると報告されている [37]。

### (2) 第一胃液 VFA, アンモニア態窒素 ( $\text{NH}_3\text{-N}$ ) 及び乳酸 (LA) 濃度並びに LPS 活性値

総 VFA 濃度は後期には前期と中期に比べて有意な低値、酢酸濃度は前期から後期にかけて有意に低下し、酢酸/プロピオン酸 (A/P) 比は中期と後期には前期に比べて有意な低値を示した (図 3)。LA は中期に前期に比べて有意な低値を示したが、後期には前期や中期に比べて有意な高値を示し、LPS は中期と後期に前期に比べて有意に増加したが、中期と後期との間に有意差はみられなかった。

第一胃液 pH の低下は、VFA 蓄積によって起こると考えられるが、後期には前期に比べて第一胃液 pH が有

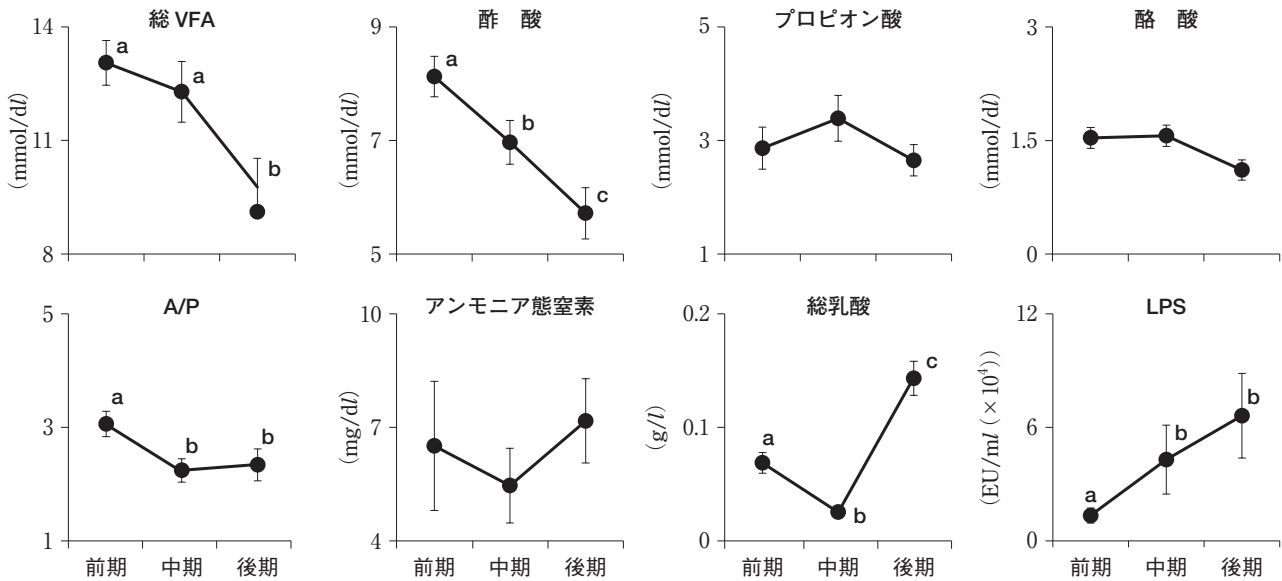


図3 肥育時期による第一胃液性状の変化

平均値±標準誤差 (n=9), a-b-c:  $P < 0.05$  (異符号間に有意差あり)

意に低下し、前期や中期に比べて総VFAも有意に低下していた。粗飼料多給牛では唾液が第一胃の $\text{HCO}_3^-$ の約半分を占めるが、濃厚飼料多給牛では唾液による $\text{HCO}_3^-$ は35%まで低下し[38]、プロピオン酸や酪酸は酢酸に比べて第一胃上皮を介した受動的な吸収速度が早いと報告されている[39]。したがって、後期にpHと総VFA濃度が低値を示したことは、濃厚飼料多給によってVFA産生は増加するが、粘膜上皮からのプロピオン酸や酪酸吸収が亢進して第一胃内のVFA濃度が低下し、同時にpH緩衝作用のある唾液の流入量が減少したことによると考えられた。一方、第一胃液pHが著しく低下(6.0以下)するとLAが蓄積し、pHがさらに低下する[40]。後期には前期や中期に比べてLA濃度が有意な高値を示したことから、後期のpH低下はLA濃度の上昇とも関連があると考えられた。

### 3 第一胃細菌叢構成の変化

濃厚飼料多給牛ではBacteroidetes門に属する細菌数が多く、粗飼料から濃厚飼料への変更によって*Megasphaera elsdenii*, *Streptococcus bovis*, *Selenomonas ruminantium*及び*Prevotella bryantii*が増加し、*Butyrivibrio fibrisolvens*や*Fibrobacter succinogenes*は減少する[14]。また、黒毛和種牛では肥育時期進行によって第一胃の細菌叢構成が大きく変動し、細菌叢の多様性も低下する[24]と報告されている。

牛の第一胃に存在する細菌は、第一胃液(液相)、第一胃食渣(固相)及び第一胃粘膜上皮付着性に分類され、それぞれ細菌叢構成が異なっている[41, 42]。液相の細菌叢は、代謝に関係しないとの報告[43]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

[41]もある。また、固相の細菌叢は、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[42, 44]。さらに、最近では粘膜上皮付着性細菌の構成比に注目した報告[45-47]もみられる。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や肥育時期の進行に伴う第一胃細菌叢を検討した研究はみられない。したがって、次に、肥育時期の進行に伴う第一胃の液相と固相における細菌叢構成の変化を次世代シーケンズ法により検討した。

#### (1) 第一胃の液相と固相における細菌門構成比

時期別には、液相ではFirmicutes門が前期と比べて中期に、Chloroflexi門が前期と比べて中期及び後期に、いずれも有意な低値を示した。固相ではProteobacteria門が前期に比べて中期に有意な高値、Chloroflexi門が前期に比べて後期に有意な低値を示した。また、部位別には、液相で固相に比べて、前期にBacteroidetes門が高値傾向、Euryarchaeota門が有意な高値、Planctomycetes門、Chloroflexi門が有意な低値、中期にFirmicutes門が低値傾向、後期にはChloroflexi門、Candidatus Saccharibacteria門が有意な高値を示した。

乳牛の第一胃内では、Actinobacteria門の構成比が最大でも3%程度と報告[48]されているが、黒毛和種肥育牛では10%以上を示したことから、肥育牛では乳牛と異なる細菌叢構成を示すことが明らかになった。

#### (2) 第一胃の液相と固相における細菌属構成比

全体として液相ではUnclassified *Lachnospiraceae*属、Unclassified *Ruminococcaceae*属及び*Prevotella*

黒毛和種肥育牛の第一胃細菌叢構成の変化と枝肉成績との関係

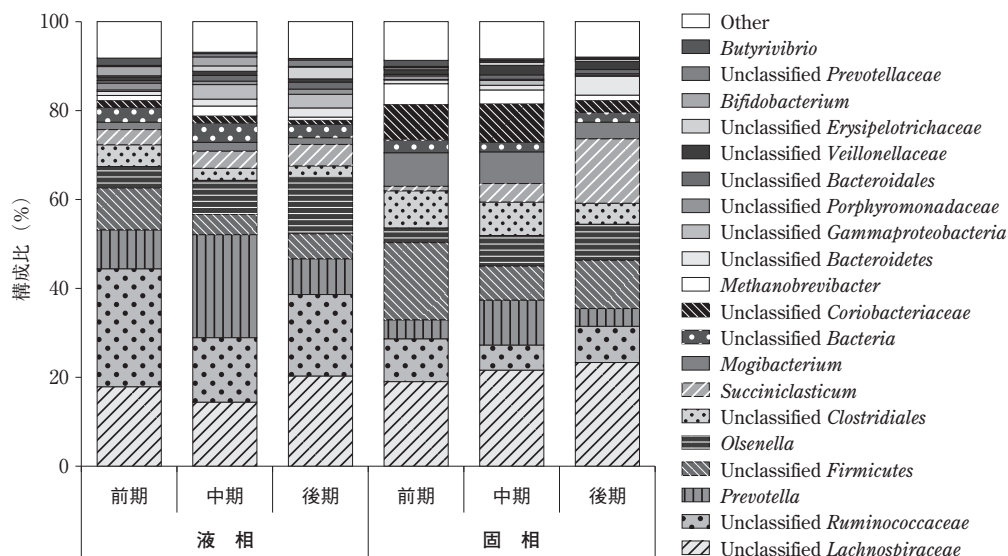


図4 肥育時期による第一胃液（液相）と第一胃食渣（固相）の細菌属構成比（上位20属），平均（n=9）

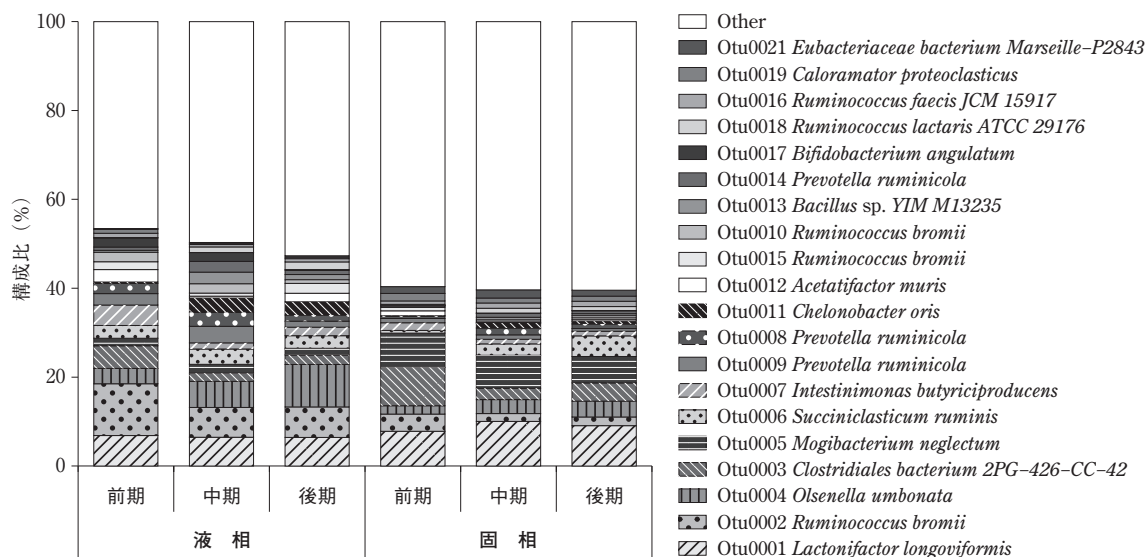


図5 肥育時期による第一胃液（液相）と第一胃食渣（固相）のOTUs構成比（上位20 OTUs）平均（n=9）

属，固相ではUnclassified *Lachnospiraceae*属，Unclassified *Ruminococcaceae*属及びUnclassified *Firmicutes*属の構成比が高かった（図4）。時期別では前期に比べて，液相ではUnclassified *Ruminococcaceae*属とUnclassified *Firmicutes*属が中期に，Unclassified *Clostridiales*属が後期に，*Butyrivibrio*属は中期と後期に，いずれも有意な低値を示した。また，固相では前期に比べて，Unclassified *Firmicutes*属が中期に，Unclassified *Clostridiales*属とUnclassified *Coriobacteriaceae*属は後期に有意な低値を示し，*Succiniclacticum*属は時期の進行により有意に増加した。一方，部位別では，液相で固相に比べて前期にUnclassified *Ruminococcaceae*属を含む3細菌属が有意な高値，

Unclassified *Firmicutes*属を含む5細菌属が有意に低値，中期には*Bifidobacterium*属が有意な高値，Unclassified *Clostridiales*属を含む2細菌属が有意な低値，後期にはUnclassified *Ruminococcaceae*属が有意な高値，Unclassified *Clostridiales*属を含む3細菌属が有意な低値を示した。

Actinobacteria門には*Olsenella*属，*Bifidobacterium*属及びUnclassified *Coriobacteriaceae*属などが含まれるが，*Bifidobacterium*属は液相に，Unclassified *Coriobacteriaceae*属は固相に特徴的な細菌と考えられた。これら細菌属は肥育時期の進行に伴って変動するが，黒毛和種肥育牛ではActinobacteria門の細菌属による特有の細菌叢が形成されている可能性がある。



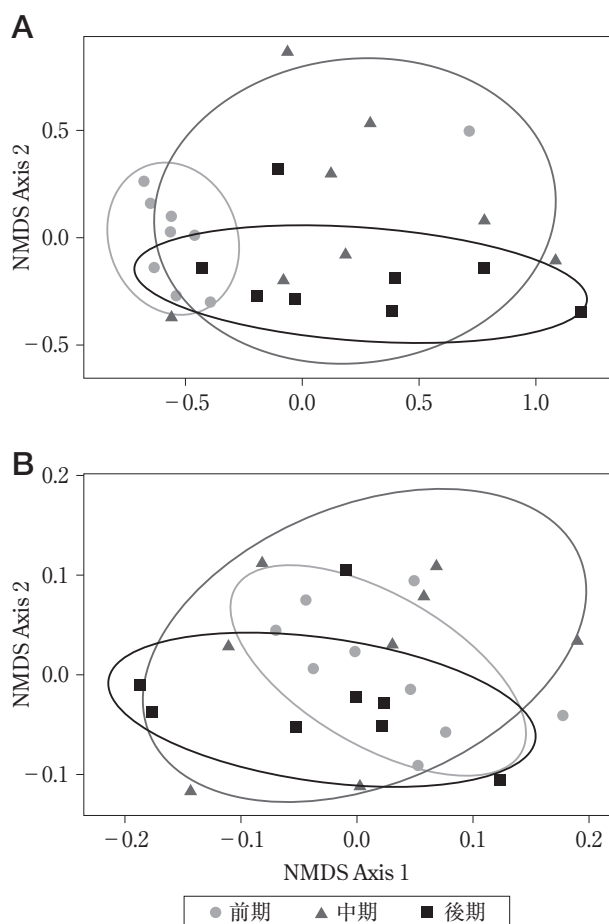


図6 肥育時期による第一胃細菌叢の非計量的多次元尺度法 (Non-metric multidimensional scaling : NMDS) プロット  
 A : OTUs  
 B : Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) パスウェイ

### (3) 第一胃の液相と固相における Operational taxonomic units (OTUs) 構成比

全体として液相では *Ruminococcus bromii*, *Lactinifactor longoviformis* と *Olsenella umbonata*, 固相では *L. longoviformis*, *Mogibacterium neglectum* 及び *Clostridiales bacterium 2PG-426-CC-42* の構成比が高かった (図5)。時期別では前期に比べて、液相では *C. bacterium 2PG-426-CC-42* と *Intestinimonas butyriciproducens* が中期と後期に、*R. bromii* は後期に有意な低値を、*Prevotella ruminicola* は中期に、*Ruminococcus lactaris ATCC 29176* は中期と後期に有意な高値を示した。また、固相では前期に比べて *C. bacterium 2PG-426-CC-42* が中期に有意な低値を、*Succinoclasticum ruminis* と *P. ruminicola* は中期と後期に、*Chelonobacter oris*, *Bacillus sp. YIM M13235* 及び *R. lactaris ATCC 29176* は中期に、いずれも有意な高値を示した。一方、部位別では液相で固相に比べて、前期には

*R. bromii* を含む 13 OTUs, 中期には *P. ruminicola* を含む 9 OTUs, 後期には *S. ruminis* を含む 3 OTUs が有意に変動した。なお、*M. neglectum* と *Eubacteriaceae bacterium Marseille-P2843* はすべての時期において、固相で液相に比べて有意な高値を示した。

液相と固相のいずれにおいても *L. longoviformis* の構成比が高値を示した。黒毛和種肥育牛の第一胃において、*L. longoviformis* がリグナン代謝 [49, 50] が行っているか否か不明であるが、牛で酸化ストレスの低減作用があり [51], 抗酸化及び抗炎症作用を有するエンテロジオールやエンテロラクトンなどの生理活性物質を産生し [50, 52], 第一胃環境に影響を与えている可能性のあることが示唆された。

### (4) 細菌叢の多様性

細菌叢の多様性の指標 (OUT, Chao1 及び Abundance-based coverage estimator (ACE)) は、前期から後期にかけて低下し、後期には前期に比べて有意な低値を示した。また、OTUs と Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) の非計量的多次元尺度法 (NMDS) によるプロットは、前期にクラスターを形成していたが、中期にはクラスターが拡散する傾向が認められた (図6)。

SARA 乳牛では、第一胃液 pH の低下により細菌叢の多様性が低下すると報告されている [20, 53, 54]。黒毛和種肥育牛においても後期には、濃厚飼料多給により細菌叢の多様性が低下すると考えられた。

### 4 第一胃粘膜上皮における遺伝子発現の変化

第一胃粘膜上皮は吸収、代謝、pH 調節、免疫及びバリア機能として重要な役割を担っており、第一胃内環境の変化に伴って遺伝子発現が変化している。SARA 乳牛では、第一胃粘膜上皮において輸送体、成長因子、ケトン体生合成、コレステロール生合成、免疫及び細胞接着に関する遺伝子発現が変化すると報告されている [55-58]。しかし、黒毛和種肥育牛では第一胃粘膜上皮の遺伝子発現を解析した報告は少ない [59, 60]。前記のように肥育後期には、第一胃液の pH が低下して VFA 濃度も低下することから、粘膜上皮における VFA 吸収も変化すると推察されるが、その本態は不明である。したがって、黒毛和種牛の肥育時期による第一胃粘膜上皮の遺伝子発現の変動を明らかにする目的で、マイクロアレイ法による網羅的遺伝子解析を行った。

IPA ソフトウェアによる発現遺伝子の解析では、前期～中期、中期～後期においてアポトーシス、酸化ストレス、細胞増殖、コレステロール生合成、エネルギー代謝及び炎症性サイトカイン産生に関わるパスウェイの変動が認められた。また、第一胃粘膜上皮に存在する VFA

黒毛和種肥育牛の第一胃細菌叢構成の変化と枝肉成績との関係

表 肥育時期による第一胃粘膜上皮のトランスポーターをコードする発現遺伝子

遺伝子	ホールドチェンジ			P 値			遺伝子名
	中期 vs. 前期	後期 vs. 中期	後期 vs. 前期	中期 vs. 前期	後期 vs. 中期	後期 vs. 前期	
<i>SLC5A12</i>	2.24	-2.54		1.84.E-03	1.18.E-04		solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 12
<i>SLC6A8</i>	-2.01			1.28.E-03			solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8
<i>SLC7A6OS</i>		-2.05			3.23.E-03		solute carrier family 7, member 6 opposite strand
<i>SLC9A6</i>	-4.08	4.08		7.87.E-04	1.64.E-05		solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 6
<i>SLC10A5</i>	2.72			2.05.E-04			solute carrier family 10, member 5
<i>SLC22A5</i>		-3.68			1.89.E-08		solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 5
<i>SLC22A8</i>	-3.50	6.75		2.73.E-03	5.26.E-07		solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8
<i>SLC22A18</i>	-2.49	2.20		2.05.E-04	8.00.E-06		solute carrier family 22, member 18
<i>SLC23A3</i>		-2.32			1.46.E-04		solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 3
<i>SLC25A5</i>	-3.30	2.99		4.76.E-04	2.17.E-04		solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5
<i>SLC25A6</i>	-5.59	4.80		5.10.E-04	5.40.E-05		solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6
<i>SLC25A11</i>	-2.48	2.38		6.02.E-04	3.30.E-05		solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11
<i>SLC25A17</i>		2.10			1.19.E-04		solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; peroxisomal membrane protein, 34kDa), member 17
<i>SLC26A3</i>	-6.38	10.80		3.45.E-03	6.37.E-05		solute carrier family 26, member 3
<i>SLC28A3</i>	-6.71	10.20		1.35.E-03	9.92.E-06		solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 3
<i>SLC29A4</i>		2.45	2.32		7.62.E-07	1.60.E-03	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4
<i>SLC35A5</i>	-2.73	2.52		8.02.E-03	3.88.E-03		solute carrier family 35, member A5
<i>SLC35C1</i>		-2.09			2.44.E-06		solute carrier family 35, member C1
<i>SLC35F5</i>	-2.63	3.83		6.84.E-04	5.55.E-06		solute carrier family 35, member F5
<i>SLC39A7</i>		-2.46			2.03.E-08		solute carrier family 39 (zinc transporter), member 7
<i>SLC39A11</i>		-2.17	-2.92		7.98.E-06	9.93.E-05	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 11
<i>SLCO2A1</i>			-2.08			4.90.E-04	solute carrier organic anion transporter family, member 2A1

輸送体のうち、SCFA<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 交換輸送体である *SLC26A3* 遺伝子の発現は前期に比べて中期にダウンレギュレート、中期に比べて後期にアップレギュレートと判定された (表)。発現遺伝子の主成分分析 (PCA) によるプロットは、時期別に明確に異なる傾向が認められた (図 7)。一方、肥育後期には第一胃液 pH の個体差が大きいため、第一胃粘膜上皮の SCFA<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 交換体の発現にも個体差があると考えられたため、後期

の第一胃液 pH により高 pH 群 (平均 pH>5.8, n=4) と低 pH 群 (平均 pH<5.5, n=4) とに分け、*SLC26A3* 遺伝子の発現量を比較した結果、高 pH 群では発現量が中期に比べて後期に増加していた。

発現遺伝子のネットワーク解析結果から、第一胃粘膜上皮の適応について以下のような機序が推測された。前期～中期には、濃厚飼料多給により VFA が蓄積、第一胃液 pH が低下するとグラム陰性菌が死滅して LPS 産

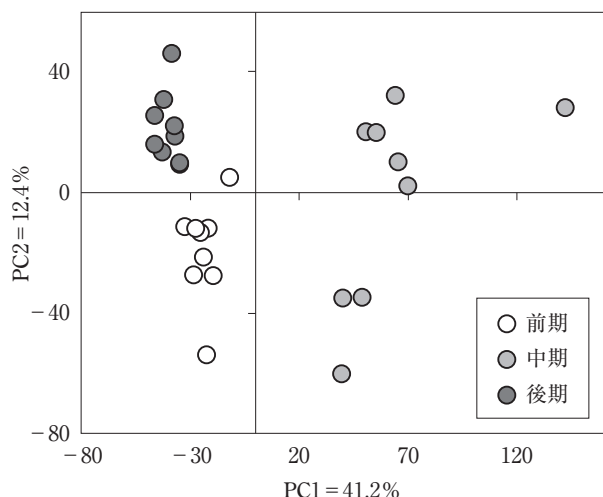


図7 肥育時期による第一胃粘膜上皮発現遺伝子の Principal component analyses (PCA) プロット  
PC1とPC2は、それぞれ principal components 1 及び 2 を示す。

生が増加する。そのため、粘膜上皮において酸化ストレスが増大し [61]、アポトーシスが誘導される。また、中期～後期には濃厚飼料割合がさらに増加し、第一胃液 pH がさらに低下して LPS が増加するが、粘膜上皮は酸化ストレスや抗菌ペプチド (AMP) などの防御機構を獲得し、アポトーシスが抑制される。さらに、粘膜上皮では細胞増殖や細胞生存の遺伝子発現が増加し、第一胃乳頭の成長や回復を促進して VFA 吸収を増加させ、VFA を用いたコレステロールの生合成やエネルギー代謝が増加する。この仮説については、今後、詳細な追加試験によって全容が解明されることが期待される。なお、*SLC26A3* 遺伝子の発現量は、高 pH 群において後期に中期に比べて増加していたが、第一胃液 pH の変動には VFA のほか LA 濃度なども関与しているため、これらの要因を考慮して検討する必要がある。

一方、*PAT1* と *SLC26A3* は、第一胃粘膜上皮において細胞内  $\text{HCO}_3^-$  を第一胃内に放出し、解離型 VFA を粘膜上皮内に輸送する主要な輸送体遺伝子である [62, 63]。乳牛では、7 日間の濃厚飼料多給試験で *PAT1* 発現が変動したが、*SLC26A3* 発現は変動しないとの報告がある [64]。今回は、前期に比べて中期に *PAT1* の発現が増加し、中期に比べて後期に *SLC26A3* の発現が増加していた。黒毛和種肥育牛において *PAT1* 発現は、乳牛で短期間の濃厚飼料多給によって変動したのと同様に、前期～中期は第一胃液 pH 低下に適応して増加したのに対し、*SLC26A3* 発現は前期～後期の長期間にわたる第一胃液 pH の低下に適応して増加したと考えられた。これらのことから、黒毛和種牛は肥育時期の進行に伴い VFA 輸送体の遺伝子発現が変化し、長期間にわたる濃厚飼料多給に適応している可能性のあることが示唆

された。また、肥育後期に第一胃液 pH が低値を示し、同時に第一胃液 VFA 濃度も低下していたことは、第一胃液 pH が高値で推移した牛で *SLC26A3* の遺伝子発現が増加していたことから、輸送体を介した第一胃内からの VFA 吸収と重炭酸イオンの第一胃への供給が効率よく行われていたためと考えられた。

## 5 肥育後期における細菌叢構成と枝肉成績の関係

肥育後期牛における給与飼料は、枝肉成績と関連があると考えられるが、肥育後期牛の第一胃細菌叢構成 [14, 21, 22] や第一胃細菌叢と枝肉成績との関係を検討した報告は少なく、細菌叢構成と枝肉成績との関係は不明な点が多い。したがって、黒毛和種牛の肥育後期における第一胃細菌叢構成と第一胃液性状、肥育及び枝肉成績との関係を検討した。

### (1) 肥育及び枝肉成績

出荷時体重は平均 709.8kg、枝肉重量は平均 431.3kg、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オレイン酸 (C18:1, 50.97%) が最も多く、次いでパルミチン酸 (C16:0, 25.74%)、ステアリン酸 (C18:0, 10.27%)、パルミトレイン酸 (C16:1, 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、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。

### (2) 第一胃液 pH と胸最長筋の一価不飽和脂肪酸との関係

第一胃液 pH と C16:1 及び C18:1 組成比との間に有意な正の相関が認められた。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、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 8)。

### (3) 第一胃細菌叢構成と第一胃液性状、肥育及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 OUTs 組成比と第一胃液性状、肥育及び枝肉成績との相関は図 9 に示した。液相では *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、固相では *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。また、組成比と増体及び枝肉成績との間で、液相では *Chelonobacter oris* と C18:0 及び SFA との間のみ有意な負の相関が、固相では *Clostridiales bacterium 2PG-426-CC-42* と C18:2 及び PUFA との間に有意な正の相関、*Succinicla-*

黒毛和種肥育牛の第一胃細菌叢構成の変化と枝肉成績との関係

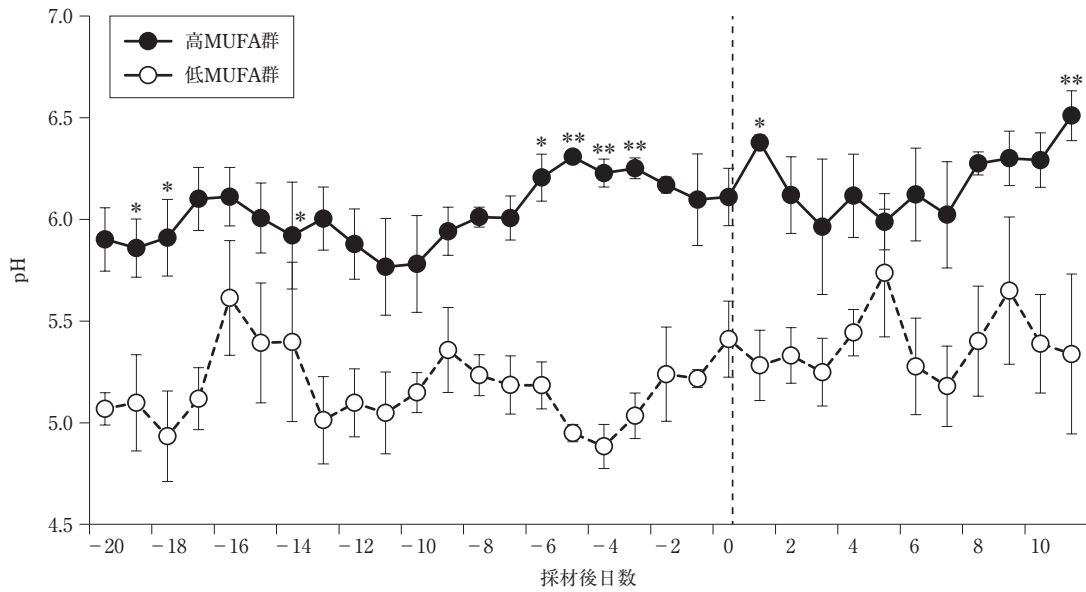


図8 高 MUFA 群と低 MUFA 群における第一胃液 pH の変化 (24 時間平均値)  
 MUFA : 一価不飽和脂肪酸 (C14:1, C16:1, C17:1, C18:1, C20:1)  
 低 MUFA 群 (n=3, 55.0±1.3%), 高 MUFA 群 (n=3, 59.8±0.8%)  
 \* : P<0.05, \*\* : P<0.01 (低 MUFA 群との有意差)

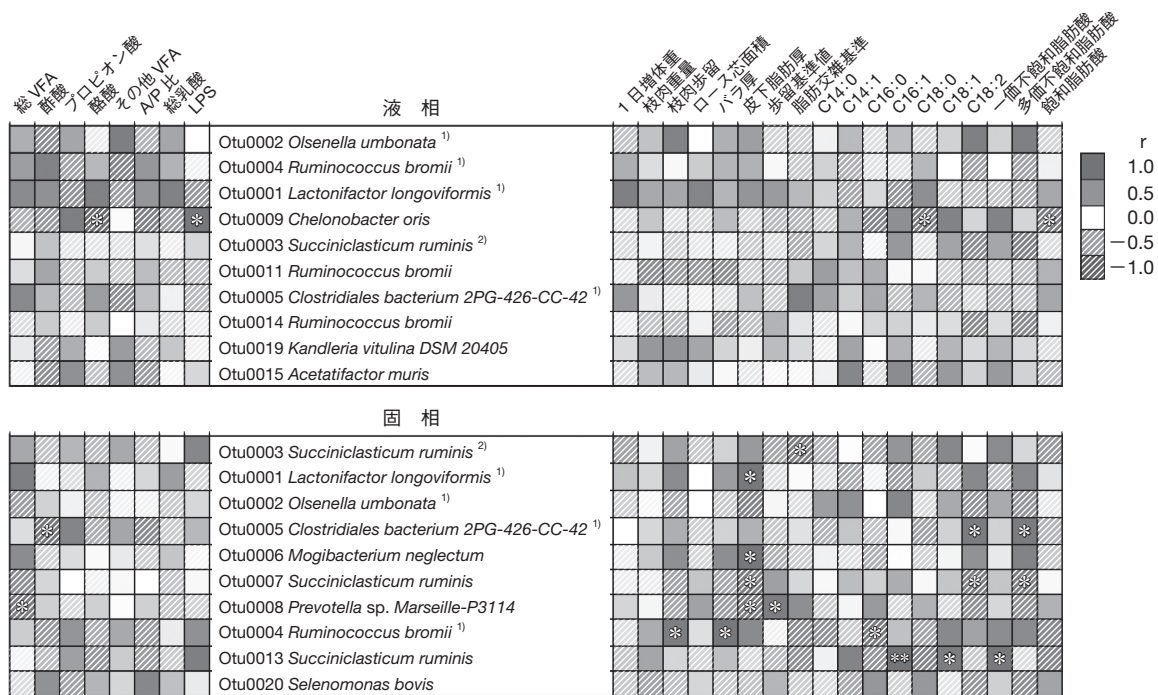


図9 第一胃の液相と固相における細菌叢構成比 (各上位 10 OTUs) と第一胃液性状, 増体及び枝肉成績との相関 (ヒートマップ)  
 液相と固相の OTUs 構成比に, 1) : 有意差なし, 2) : 有意差あり  
 \* : P<0.05, \*\* : P<0.01, n=9

*sticum ruminis* と C18:2 及び PUFA との間に有意な負の相関が認められた。一方, *Ruminococcus bromii* と枝肉歩留及びバラ厚との間に有意な正の相関, C16:0 との間に有意な負の相関が, さらに, *Succiniclasicum ruminis* と C16:1, C18:1 及び MUFA との間に有意な

正の相関が認められた。

以上のように, 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るが, 固相の細菌叢構成は液相に比べて筋肉脂肪中 MUFA 組成や皮下脂肪厚との間に有意な相関が多いことが示唆された。



## 6 お わ り に

長期間にわたって濃厚飼料が多給される黒毛和種肥育牛では、給与飼料などの飼養管理状態に適応し、第一胃性状が変動するのではないかと仮説を明らかにするために、黒毛和種去勢牛の肥育時期進行に伴う第一胃液の各種性状と細菌叢構成及び第一胃粘膜上皮における遺伝子発現の変化を検討した。その結果、黒毛和種肥育牛の特徴と考えられる、いくつかの興味ある点が明らかとなった。

第1点は、肥育後期には前期や中期に比べて濃厚飼料の給与割合が増加しているため、第一胃液 pH が低下していたにもかかわらず、総 VFA 濃度が低値を示したことである。このことは、濃厚飼料多給によって VFA 産生は亢進するが、一方で粘膜上皮からの VFA 吸収が増大して VFA 濃度が減少し、さらに反芻の減少により pH 緩衝作用のある唾液の流入量が減少したことによると考えられた。また、後期には LA 濃度も上昇していたので、後期における第一胃液 pH の低下に LA も関与していると考えられた。

第2点は、肥育時期の進行に伴い、健康乳牛や SARA 誘発牛とまったく異なる第一胃細菌叢構成を示したことである。液相と固相のいずれも Firmicutes 門、Bacteroidetes 門、Actinobacteria 門の構成比が多く、上位 20 細菌属で全体の 70% 以上を占めていた。また、部位別の細菌叢構成は、いずれの肥育時期においてもわずかに差異がみられた。これらのことから、黒毛和種肥育牛では Actinobacteria 門の細菌属を主とした特有の細菌叢が形成されており、液相では *Bifidobacterium* 属など、固相では Unclassified *Coriobacteriaceae* 属などが各部位に特徴的な細菌と考えられた。

第3点は、肥育時期の進行に伴い、第一胃粘膜上皮における遺伝子発現が変動し、中期には前期に比べて *PAT1* の発現が増加、後期には中期に比べて *SLC26A3* の発現が増加したことである。*PAT1* 発現は短期間の濃厚飼料多給によって変動することから、前期～中期の間の第一胃液 pH の低下に適応して増加し、*SLC26A3* 発現は前期～後期の長期間にわたる第一胃液 pH の低下に適応して増加したものと推察された。これらのことから、黒毛和種牛は肥育時期の進行に伴い、第一胃粘膜上皮における VFA 輸送体の遺伝子発現が変化し、長期間にわたる濃厚飼料多給に適応している可能性があると考えられた。

第4点は、肥育後期における第一胃性状と肥育及び枝肉成績との間に密接な関連がみられたことである。第一胃液 pH は高 MUFA 群で低 MUFA 群に比べて高値で推移し、固相の細菌叢構成と筋肉脂肪中 MUFA 組成や皮下脂肪厚との間に有意な相関が認められた。これらのこ

とから、黒毛和種肥育牛の枝肉成績は、長期間の濃厚飼料多給に適応して形成された第一胃内での VFA 産生や粘膜上皮による吸収機構が影響すると考えられた。

以上のように、黒毛和種牛の肥育時期の進行に伴う第一胃性状や細菌叢構成及び第一胃粘膜上皮における遺伝子発現について、その一部が明らかになった。しかし、今回の結果は、わが国の一部の地域における、特定血統の黒毛和種牛を対象とした試験によって得られたものである。今回提示した知見は、多くの地域や他の血統の黒毛和種肥育牛においても普遍的な所見と考えられるが、各地域において本研究の結果を検証することが望まれる。

## 引用文献

- [1] Oka A, Maruo Y, Miki T, Yamasaki T, Saito T : Influence of vitamin A on the quality of beef from the Tajima strain of Japanese Black cattle, *Meat Sci*, 48, 159-167 (1998)
- [2] Gozho GN, Plaizier JC, Krause DO, Kennedy AD, Wittenberg KM : Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response, *J Dairy Sci*, 88, 1399-1403 (2005)
- [3] Nagaraja TG, Titgemeyer EC : Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook, *J Dairy Sci*, 90, E17-E38 (2007), (online), (doi: 10.3168/jds.2006-478)
- [4] Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, McBride BW : Subacute ruminal acidosis in dairy cows: The physiological causes, incidence and consequences, *Vet J*, 176, 21-31 (2008), (online), (doi: 10.1016/j.tvjl.2007.12.016), (accessed 2008-3-10)
- [5] Hua C, Tian J, Tian P, Cong R, Luo Y, Geng Y, Tao S, Ni Y, Zhao R : Feeding a high concentration diet induces unhealthy alterations in the composition and metabolism of ruminal microbiota and host response in a goat model, *Front Microbiol*, 8, 138 (2017), (online), (doi: 10.3389/fmicb.2017.00138), (accessed 2017-2-2)
- [6] Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC : CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein, *Science*, 249, 1431-1433 (1990)
- [7] Dobrovolskaia MA, Vogel SN : Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS, *Microbes Infect*, 4, 903-914 (2002)
- [8] Mani V, Weber TE, Baumgard LH, Gabler NK : Growth and development symposium: endotoxin, inflammation, and intestinal function in livestock, *J Anim Sci*, 90, 1452-1465 (2012)
- [9] Nocek JE : Bovine acidosis: implication on laminitis, *J Dairy Sci*, 80, 1005-1028 (1997)
- [10] Kleen JL, Hooijer GA, Rehage J, Noordhuizen JPTM : Subacute ruminal acidosis (SARA): a Review, *J Vet Med A*, 50, 406-414 (2003)
- [11] Enemark JMD : The monitoring, prevention and treat-

- ment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review, *Vet J*, 176, 32-43 (2008)
- [12] Plaizier JC, Krause DO, Gozho GN, McBride BW : Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences, *Vet J*, 176, 21-31 (2008)
- [13] Ametaj BN, Zebeli Q, Saleem F, Psychogios N, Lewis MJ, Dunn SM, Xia J, Wishart DS : Metabolomics reveals unhealthy alterations in rumen metabolism with increased proportion of cereal grain in the diet of dairy cows, *Metabolomics*, 6, 583-594 (2010)
- [14] Fernando SC, Purvis II HT, Najjar FZ, Sukharnikov LO, Krehbiel CR, Nagaraja TG, Roe BA, DeSilva U : Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet, *Appl Environ Microbiol*, 76, 7482-7490 (2010)
- [15] Chen Y, Penner GB, Li M, Oba M, Guan LL : Changes in bacterial diversity associated with epithelial tissue in the beef cow rumen during the transition to a high-grain diet, *Appl Environ Microbiol*, 77, 5770-5781 (2011)
- [16] Wetzels SU, Mann E, Metzler-Zebeli BU, Pourazad P, Kumar M, Klevenhusen F, Pinior B, Wagner M, Zebeli Q, Schmitz-Esser S : Epimural indicator phylotypes of transiently-induced subacute ruminal acidosis in dairy cattle, *Front Microbiol*, 7, 274 (2016), (online), (doi: 10.3389/fmicb.2016.00274), (accessed 2016-4-4)
- [17] Khafipour E, Li S, Plaizier JC, Krause DO : Rumen microbiome composition determined using two nutritional models of subacute ruminal acidosis, *Appl Environ Microbiol*, 75, 7115-7124 (2009), (online), (doi:10.1128/AEM.00739-09), (accessed 2009-9-25)
- [18] Mohammed R, Stevenson DM, Weimer PJ, Penner GB, Beauchemin KA : Individual animal variability in ruminal bacterial communities and ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period, *J Dairy Sci*, 95, 6716-6730 (2012)
- [19] Zebeli Q, Ghareeb K, Humer E, Metzler-Zebeli BU, Besenfelder U : Nutrition, rumen health and inflammation in the transition period and their role on overall health and fertility in dairy cows, *Res Vet Sci*, 103, 126-136 (2015)
- [20] Tsuchiya Y, Chiba E, Sugino T, Kawashima K, Hasunuma T, Kushibiki S, Kim YH, Sato S : Changes in rumen fermentation, bacterial community, and predicted functional pathway in Holstein cows with and without subacute ruminal acidosis during the periparturient period, *J Dairy Sci*, 103, 4702-4716 (2020), (online), (doi.org/10.3168/jds.2019-17546), (accessed 2020-3-12)
- [21] Nagata R, Kim YH, Ohkubo A, Kushibiki S, Ichijo T, Sato S : Effects of repeated subacute ruminal acidosis challenges on the adaptation of the rumen bacterial community in Holstein bulls, *J Dairy Sci*, 101, 4424-4436 (2018), (online), (doi: 10.3168/jds.2017-13859), (accessed 2018-2-22)
- [22] Kaewpila C, Sommart K, Mitsumori M : Dietary fat sources affect feed intake, digestibility, rumen microbial populations, energy partition and methane emissions in different beef cattle genotypes, *Animal*, 12, 2529-2538 (2018)
- [23] Nakamura SI, Kim YH, Takashima K, Kimura A, Nagai K, Ichijo T, Sato S : Composition of the microbiota in forestomach fluids and feces of Japanese Black calves with white scours, *J Anim Sci*, 95, 3349-3960 (2017), (online), (doi: 10.2527/jas2017-1431), (accessed 2017-9-14)
- [24] Kido K, Tejima S, Nagayama H, Uyeno Y, Ide Y, Kushibiki S : Effects of supplementation with cellooligosaccharides on growth performance of weaned calves on pasture, *Anim Sci J*, 87, 661-665 (2016)
- [25] Ogata T, Kim YH, Masaki T, Iwamoto E, Ohtani Y, Orihashi T, Ichijo T, Sato S : Effects of an increased concentrate diet on rumen pH and the bacterial community in Japanese Black beef cattle at different fattening stages, *J Vet Med Sci*, 81, 968-974 (2019), (online), (doi: 10.1292/jvms.19-0077), (accessed 2019-4-22)
- [26] Paz HA, Hales KE, Wells JE, Kuehn LA, Freetly HC, Berry ED, Flythe MD, Spangler ML, Fernando SC : Rumen bacterial community structure impacts feed efficiency in beef cattle, *J Anim Sci*, 96, 1045-1058 (2018)
- [27] Li F, Hitch TCA, Chen Y, Creevey CJ, Guan LL : 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), (online), (doi: 10.1186/s40168-019-0618-5), (accessed 2019-1-14)
- [28] Oka A, Iwaki F, Dohgo T, Ohtagaki S, Noda M, Shiozaki T, Endoh O, Ozaki M : Genetic effects on fatty acid composition of carcass fat of Japanese Black Wagyu steer, *J Anim Sci*, 80, 1005-1011 (2002)
- [29] Zembayashi M, Nishimura K, Lunt DK, Smith SB : 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)
- [30] Yang A, Larsen TW, Powell VH, Tume RK : A comparison of fat composition of Japanese and long-term grain-fed Australian steers, *Meat Sci*, 51, 1-9 (1999)
- [31] 木村信熙, 木村聖二, 小迫孝実, 井村 毅 : 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)
- [32] Sato S, Mizuguchi H, Ito K, Ikuta K, Kimura A, Okada K : Development and testing of a radio transmission pH measurement system for continuous monitoring of ruminal pH in cows, *Prev Vet Med*, 103, 274-279 (2012)
- [33] Ogata T, Kim YH, Makino H, Ishizuka N, Iwamoto E, Masaki T, Ikuta K, Sato S : 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 Japa-

- nese Black beef cattle during fattening, PLoS One, 14, e0225448 (2019), (online), (doi.org/10.1371/journal.pone.0225448), (accessed 2019-11-26)
- [34] Ogata T, Makino H, Ishizuka N, Iwamoto E, Masaki T, Kizaki K, Kim YH, Sato S : Long-term high-grain diet alters ruminal pH, fermentation, and epithelial transcriptomes, leading to restored mitochondrial oxidative phosphorylation in Japanese Black cattle, Scientific Reports, 10, 6381 (2020), (online), (doi.org/10.1038/s41598-020-63471-0), (accessed 2020-4-14)
- [35] Nagaraja TG, Chengappa MM : Liver abscesses in feedlot cattle: a review, J Anim Sci, 76, 287-298 (1998)
- [36] Hook SE, Steele MA, Northwood KS, Dijkstra J, France J, Wright ADG, McBride BW : 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), (online), (doi: 10.1111/j.1574-6941.2011.01154), (accessed 2011-5-31)
- [37] Aschenbach JR, Penner GB, Stumpff F, Gäbel G : Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH, J Anim Sci, 89, 1092-1107 (2011)
- [38] Dijkstra J, Ellis JL, Kebreab E, Strathe AB, López S, France J, Bannin A : Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH, Anim Feed Sci Tech, 172, 22-33 (2012)
- [39] Storm AC, Kristensen NB, Hanigan MD : A model of ruminal volatile fatty acid absorption kinetics and rumen epithelial blood flow in lactating Holstein cows, J Dairy Sci, 95, 2919-2934 (2012)
- [40] 三森真琴 : 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)
- [41] McAllister TA, Bae HD, Jones GA, Cheng KJ : Microbial attachment and feed digestion in the rumen, J Anim Sci, 72, 3004-3018 (1994)
- [42] De Mulder T, Goossens K, Peiren N, Vandaele L, Haegeman A, De Tender C, Ruttink T, de Wiele TV, De Campeneere S : Exploring the methanogen and bacterial communities of rumen environments: solid adherent, fluid and epimural, FEMS Microbiol Ecol, 93 (2017), (online), (doi: 10.1093/femsec/fiw251), (accessed 2016-12-23)
- [43] Leng J, Cheng YM, Zhang CY, Zhu RJ, Yang SL, Gou X, Deng WD, Mao HM : Molecular diversity of bacteria in Yunnan yellow cattle (*Bos taurus*) from Nujiang region, China, Mol Biol Rep, 39, 1181-1192 (2011)
- [44] Petri RM, Pourazad P, Khiaosa-Ard R, Klevenhusen F, Metzler-Zebeli BU, Zebeli Q : Temporal dynamics of in-situ fiber-adherent bacterial community under ruminal acidotic conditions determined by 16S rRNA gene profiling, PLoS One, 12, e0182271 (2017), (online), (doi: 10.1371/journal.pone.0182271), (accessed 2017-8-1)
- [45] Petri RM, Neubauer V, Humer E, Kröger I, Reisinger N, Zebeli Q : Feed additives differentially impact the epimural microbiota and host epithelial gene expression of the bovine rumen fed diets rich in concentrates, Front Microbiol, 11, 119 (2020), (online), (doi: 10.3389/fmicb.2020.00119), (accessed 2020-2-19)
- [46] Wetzels SU, Mann E, Pourazad P, Kumar M, Pinior B, Metzler-Zebeli BU, Wagner M, Schmitz-Esser S, Zebeli Q : Epimural bacterial community structure in the rumen of Holstein cows with different responses to a long-term subacute ruminal acidosis diet challenge, J Dairy Sci, 100, 1829-1844 (2017), (online), (doi: 10.3168/jds.2016-11620), (accessed 2016-12-29)
- [47] Petri RM, Kleefisch MT, Metzler-Zebeli BU, Zebeli Q, Klevenhusen F : Changes in the rumen epithelial microbiota of cattle and host gene expression in response to alterations in dietary carbohydrate composition, Appl Environ Microbiol, 84, e00384-18 (2018), (online), (doi: 10.1128/AEM.00384-18), (accessed 2018-6-15)
- [48] Pandya PR, Singh KM, Parnerkar S, Tripathi AK, Mehta HH, Rank DN, Kothari RK, Joshi CG : Bacterial diversity in the rumen of Indian Surti buffalo (*Bubalus bubalis*), assessed by 16SrDNA analysis, J Appl Genet, 51, 395-402 (2010)
- [49] Clavel T, Lippman R, Gavini F, Doré J, Blaut M : *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)
- [50] 陳 琮湜 : 腸内フィトエストロゲン —リグナンを中心に—, 腸内細菌学雑誌, 26, 171-181 (2012)
- [51] Rajesha J, Kotamballi N, Murth C, Kumar MK, Madhusudhan B, Ravishankar GA : Antioxidant potentials of flaxseed by in vivo model, J Agr Food Chem, 54, 3794-3799 (2006)
- [52] Prasad K : Antioxidant activity of secoisolariciresinol diglucoside-derived metabolites, secoisolariciresinol, enterodiol, and enterolactone, Int J Angiol, 9, 220-225 (2000)
- [53] Mao SY, Zhang RY, Wang DS, Zhu WY : Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing, Anaerobe, 24, 12-19 (2013), (online), (doi: 10.1016/j.anaerobe.2013.08.003), (accessed 2013-8-29)
- [54] Petri RM, Schwaiger T, Penner GB, Beauchemin KA, Forster RJ, McKinnon JJ, McAllister TA : Characterization of the core rumen microbiome in cattle during transition from forage to concentrate as well as during and after an acidotic challenge, PLoS one, 8, e83424 (2013), (online), (doi: 10.1371/journal.pone.0083424), (accessed 2013-12-31)
- [55] Steele MA, Croom J, Kahler M, AlZahal O, Hook SE, Plaizier K, McBride BW : Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis, Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 300, R1515-R1523 (2011)

- [56] Naeem A, Drackley JK, Stamey J, Looor JJ : Role of metabolic and cellular proliferation genes in ruminal development in response to enhanced plane of nutrition in neonatal Holstein calves, *J Dairy Sci*, 95, 1807-1820 (2012)
- [57] Schlau N, Guan LL, Oba M : The relationship between rumen acidosis resistance and expression of genes involved in regulation of intracellular pH and butyrate metabolism of ruminal epithelial cells in steers, *J Dairy Sci*, 95, 5866-5875 (2012)
- [58] McCann JC, Luan S, Cardoso FC, Derakhshani H, Khafipour E, Looor JJ : Induction of subacute ruminal acidosis affects the ruminal microbiome and epithelium, *Front Microbiol*, 7, 701 (2016), (online), (doi: 10.3389/fmicb.2016.00701), (accessed 2016-5-18)
- [59] Nishihara K, Kato D, Suzuki Y, Kim D, Nakano M, Yajima Y, Haga S, Nakano M, Ishizaki H, Kawahara-Miki R, Kono T, Katoh K, Roh SG : Comparative transcriptome analysis of rumen papillae in suckling and weaned Japanese Black calves using RNA sequencing, *J Anim Sci*, 96, 2226-2237 (2018)
- [60] Kato D, Suzuki Y, Haga S, So K, Yamauchi E, Nakano M, Ishizaki H, Choi K, Katoh K, Roh SG : Utilization of digital differential display to identify differentially expressed genes related to rumen development, *Anim Sci J*, 87, 584-590 (2016)
- [61] Memon MA, Wang Y, Xu T, Ma N, Zhang H, Roy AC, Aabdin ZU, Shen X : Lipopolysaccharide induces oxidative stress by triggering MAPK and Nrf2 signalling pathways in mammary glands of dairy cows fed a high-concentrate diet, *Microbiol Pathog*, 128, 268-275 (2019)
- [62] Bilk S, Huhn K, Honscha KU, Pfannkuche H, Gäbel G : Bicarbonate exporting transporters in the ovine ruminal epithelium, *J Comp Physiol B*, 175, 365-374 (2005)
- [63] Connor EE, Li RW, Baldwin RL, Li C : Gene expression in the digestive tissues of ruminants and their relationships with feeding and digestive processes, *Animal*, 4, 993-1007 (2010)
- [64] Oba M, Mewis JL, Zhining Z : Effects of ruminal doses of sucrose, lactose and corn starch on ruminal fermentation and expression of genes in ruminal epithelial cells, *J Dairy Sci*, 98, 586-594 (2015)