

## 学 術

## 牛の亜急性第一胃アシドーシスの病態に関する研究

— 解明できたこと、そして解明できなかったこと —

佐 藤 繁

岩手大学農学部共同獣医学科 産業動物内科学分野

## 1. はじめに

乳牛では高泌乳と乳成分を維持するため、また、肥育牛では成長促進と肉質向上を目指して濃厚飼料が多給され、結果として亜急性（潜在性）第一胃アシドーシス（subacute rumen acidosis; SARA）の発生が問題となっている。SARAは濃厚飼料など易発酵性飼料の多給により揮発性脂肪酸（VFA）の産生量と吸収量のバランスが崩れて第一胃液pHが低下し、第一胃内グラム陰性菌の死滅によって細胞壁からリポポリサッカライド（LPS）が遊離して生体機能に種々の悪影響を及ぼす病態である<sup>36,47</sup>。SARAの病態では、第一胃内におけるLPS産生の亢進から生体内での炎症反応へ至るカスケードが最も重要である。第一胃内で過剰に産生されたLPSは、消化管から肝臓へ移行して代謝・内分泌および免疫機能<sup>13</sup>に影響を及ぼしている。

SARA牛は第一胃液pHが反復して低下することが特徴で<sup>10,47</sup>、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<sup>13</sup>。また、SARA牛では明らかな臨床症状を伴わず、牛群レベルで蹄病、食欲の減退や不定、ボディ・コンディション・スコアの低下、低乳脂肪症候群、第四胃の変位や潰瘍、第一胃炎などの発生が増加し<sup>10,47</sup>、さらに、泌乳量や乳脂肪分率が低下するなど、SARAは乳牛の生産阻害要因として極めて重要であることが認識されるようになった。

著者らは、牛の第一胃液pHをリアルタイムでモニターし、SARAを早期に摘発して予防する目的で、無線伝送式pHセンサを第一胃内に留置し、pHと温

度のデータを体外で受信するシステムを開発した<sup>52,53</sup>。本システムを用いて実験的なSARA誘発牛や野外のSARA牛を対象として、病態解明と予防対策に関する研究を進めてきた。初期の研究成果は、すでに本会誌第66巻4号（2013）に「乳牛の亜急性第一胃アシドーシスの病態と評価」として紹介した<sup>51</sup>。今回は、著者らが実施してきたSARA牛の病態解明と予防対策に関する研究を総括し、一定の成果が得られたこと、また、十分な成果が得られなかったことについて言及する。

## 2. 離乳期子牛における第一胃液pH、VFAおよび細菌叢構成

子牛の離乳期は、液状飼料から固形飼料に変更される時期で、第一胃の成長と発達にとって重要な時期である。炭水化物を給与された子牛では第一胃内VFAと乳酸（LA）産生が増加してpHが低下する<sup>27</sup>が、VFA、特に酪酸産生の増加は、第一胃粘膜上皮の発達に重要である。しかし、過剰の炭水化物給与によって第一胃液pHが急激に低下すると、免疫抑制や炎症が引き起こされるなど、子牛の離乳ストレスは免疫機能に影響することが明らかにされている<sup>12,25</sup>。すなわち、第一胃内で産生されたLPSの刺激によって末梢血中のコルチゾールとTNF- $\alpha$ 濃度が増加し、さらに、離乳ストレスによって血清コルチゾール、急性相タンパク、炎症性サイトカインの増加などストレスレベルや全身性の炎症反応に影響する。一方、最近の研究から、第一胃内の細菌叢は出生直後からの給与飼料や第一胃環境の影響を受け

ることが明らかにされている<sup>16,49)</sup>。また、離乳期子牛に対する乾草給与は、第一胃液pHの急激な低下を軽減すると報告されているが<sup>16,49)</sup>、第一胃液pHと細菌叢に及ぼす影響は不明である。従って、著者らは、離乳前後の子牛において乾草給与の有無による第一胃液のpH、VFAおよび細菌叢構成の変化を比較検討した<sup>22)</sup>。

試験には4週齢時に第一胃フィステルを装着したホルスタイン種雄子牛16頭を供試した。離乳1週前（7週齢）まで代用乳とスターターおよび乾草を給与し、その後11週齢までスターターと乾草（日量400-600g）を給与した子牛8頭（乾草給与牛）とスターターのみを給与した子牛8頭（対照牛）に区分した。第一胃液pHは無線伝送式pHセンサを用いて離乳2週前から3週後まで10分間隔で連続測定し、第一胃液と血液は離乳1週前、離乳日、離乳1および3週後に採取した。

(1) 第一胃液pH

第一胃液pHの1日平均値は、離乳後に乾草給与牛でしだいに上昇したが、対照牛では低値のまま推移し、両群間に有意差が認められた（図1）。また、第一胃液pHの1時間平均値の変化では、離乳後に乾草給与牛で明らかな日内変動が認められたのに対し、対照牛では低値で推移して日内変動がみられなかった。

(2) 第一胃液VFA、アンモニア態窒素 (NH<sub>3</sub>-N) およびLA濃度並びにLPS活性値

乾草給与牛では対照牛に比べて、離乳前後に第一胃液総VFAおよび酪酸濃度で差異がみられなかったが、酢酸濃度は有意な高値、プロピオン酸濃度は有意な低値を示した（表1）。

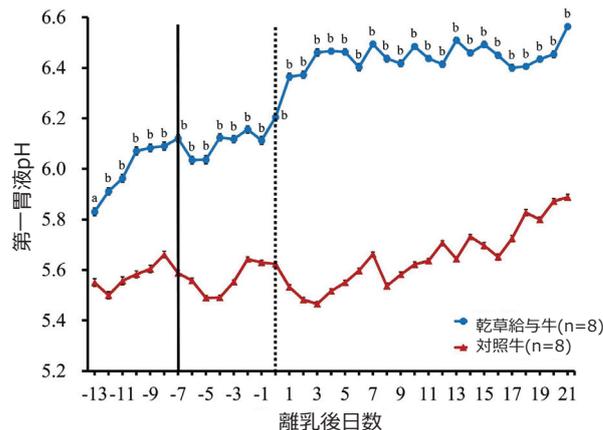


図1 乾草給与牛と対照牛の離乳前後における第一胃液pHの変化（1日平均値）

平均±標準誤差。実線は試験開始時、破線は離乳時を示す  
<sup>a,b</sup>P<0.05, P<0.01 (同日における対照牛との有意差)

(3) 第一胃液の細菌叢構成

主要な4つの細菌門（Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria）で、全体の構成比の88.6%を占めていた。細菌種は全体として341種が検出され、乾草給与牛に特異的なものは72種、対照牛に特異的なものは47種であった。Prevotellaは乾草給与牛と対照牛のいずれでも最も主要な細菌種で、乾草給与牛ではPrevotella (22.84%), Lactobacillus (9.48%) および Ruminococcus (5.41%), また、対照牛ではPrevotella (18.16%), Olsenella (10.50%) および Lactobacillus (7.38%) の構成比が高値を示した（図2）。

以上のように、離乳期子牛に対する乾草給与（日量400-600g）は、第一胃液pHの急激な低下を軽減する可能性のあることが示唆された。今後、第一胃液pH変動の機序や細胞性免疫機構に及ぼす影響、

表1 乾草給与牛と対照牛の離乳前後における第一胃液VFA濃度の変化

項目	乾草給与牛 (n=8)				対照牛 (n=8)				標準偏差	時間 (T)	P値	
	-1週	0週	1週	3週	-1週	0週	1週	3週			餌 (D)	T×D
総VFA, mM	72.62	83.09	92.44	103.68	98.35	85.54	105.20	104.40	5.16	0.115	0.599	0.609
VFA, mol/100mol												
酢酸	57.39	56.12	63.47 <sup>a</sup>	59.93 <sup>b</sup>	56.05	53.58	49.13 <sup>a</sup>	50.02 <sup>b</sup>	0.86	0.471	0.005	0.000
プロピオン酸	29.43	29.43	22.71 <sup>a</sup>	24.25 <sup>b</sup>	30.01	35.07	38.10 <sup>a</sup>	37.24 <sup>b</sup>	1.04	0.520	0.006	0.000
酪酸	8.43	8.79	8.87	10.39	9.76	7.30	7.46	7.83	0.32	0.261	0.279	0.050
その他 <sup>1)</sup>	4.74	5.66 <sup>a</sup>	4.96	5.43	4.18	4.05 <sup>a</sup>	5.32	4.92	0.16	0.175	0.192	0.065
A/P比	2.08	2.08	2.93 <sup>a</sup>	2.65 <sup>b</sup>	2.12	1.60	1.33 <sup>a</sup>	1.45 <sup>b</sup>	0.11	0.395	0.015	0.000

1: 酢酸、プロピオン酸および酪酸以外のVFA  
 a, b: 各群内および各項目ごとの有意差 (P<0.05)

離乳期に多発する下痢症との関係について検討する必要がある。

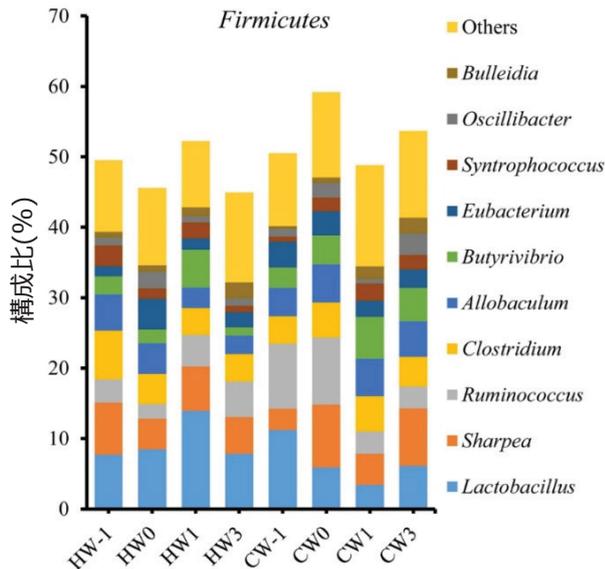


図2 乾草給与牛と対照牛の離乳前後における第一胃液細菌叢構成の変化

最も構成比の多いFirmicutes門の細菌属。HW-1, HW0, HW1, HW3は乾草給与牛 (n=8) およびCW-1, CW0, CW1, CW3は対照牛 (n=8) の、前3週、後0, 1, 3週を示す。

### 3. SARA乳牛の分娩前後における第一胃液pH, VFAおよび細菌叢構成の変化

分娩後の乳牛では、飼料中の濃厚飼料割合の増加により第一胃発酵が促進し、VFA産生が増加するとともにVFA蓄積が増えて粘膜上皮による吸収や緩衝能力を上回ると、第一胃液pHが低下してSARAが発生する<sup>25,26,42)</sup>。分娩前後の乳牛における第一胃細菌叢は、Bacteroidetes門、Proteobacteria門およびFirmicutes門が優勢で<sup>9,46)</sup>、分娩後には粗飼料主体飼料から易発酵性飼料への変更によって細菌叢構成が大きく変化し、セルロース分解菌のRuminococcus属が減少してデンプン分解菌のPrevotella属が増加する<sup>31,46,59)</sup>。また、分娩後には第一胃細菌叢の多様性が低下する<sup>9,31,33)</sup>。さらに、SARA牛ではグラム陰性菌の死滅によってLPSが増加し<sup>20,30,32)</sup>、細菌叢の多様性が低下する<sup>32,48)</sup>。しかし、分娩後SARA牛の分娩前における第一胃液性状を検討した報告はみられない。従って、分娩後2週以内に2日以上にわたってSARAを発症した牛 (SARA群) とSARA発症が1日

以内か全くみられない牛 (非SARA群) について、第一胃液中の各種性状と細菌叢構成の変化を検討した。

#### (1) 前胃液pH

前胃液pHは、両群とも分娩後に分娩前に比べて低値を示し、SARA群では非SARA群に比べて分娩後5~10日に有意な低値または低値傾向を示した (図3)。また、SARA群では非SARA群に比べて、1日あたりの前胃液pH<5.6以下の時間が有意に延長した。

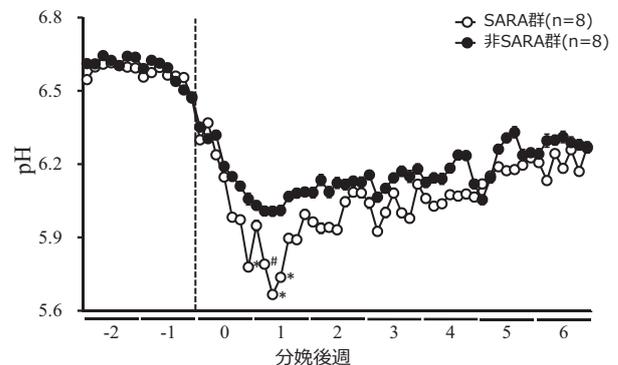


図3 SARA群と非SARA群の分娩前後における第一胃液pHの変化 (24時間平均値)

#,\*P<0.1, P<0.05 (同日における非SARA群との有意差)

#### (2) 第一胃液VFA, NH<sub>3</sub>-NおよびLA濃度並びにLPS活性値

SARA群では非SARA群に比べて、総VFA濃度は分娩後2週と6週に有意な低値を示した。しかし、他の項目では両群間に有意な差異がみられなかった。なお、分娩後の血液成分ではSARA群で非SARA群に比べて、NEFA値と総ケトン体濃度が有意な低値または低値傾向、カルシウムおよび無機リン濃度とGGT値が有意な高値または高値傾向を示した。

#### (3) 第一胃液の細菌叢構成

細菌門構成比では、分娩前後にBacteroidetes門、Firmicutes門およびProteobacteria門の割合が多く、これら3細菌門でいずれの時期でも全体の約90%を占めていた。また、SARA群は非SARA群に比べて、分娩前3週にBacteroidetes門が低値傾向、Actinobacteria門とSpirochaetes門が有意な高値を示した。

細菌科および細菌属構成比では、分娩前後にPrevotella属、未分類のLachnospiraceae科および未

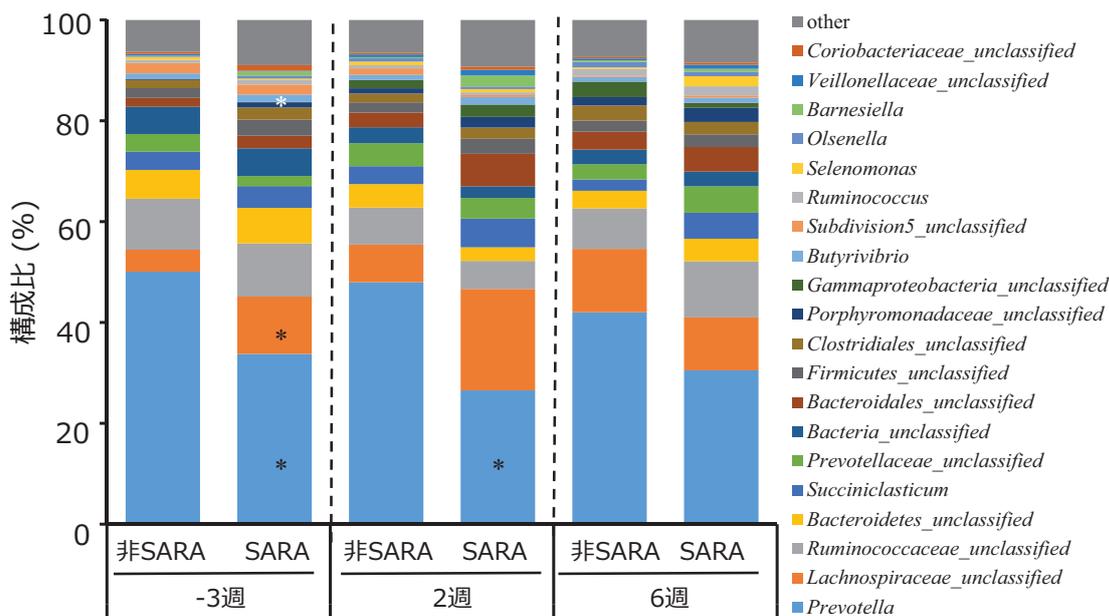


図4 非SARA群 (n=8) とSARA群 (n=8) の分娩前後における前胃液の細菌属構成比 (上位20属)

\* $P < 0.05$  (同採材日における非SARA群との有意差)

分類の *Ruminococcaceae* 科の割合が多く、これら3細菌科・属でいずれの時期でも全体の約50%を占めていた。また、SARA群は非SARA群に比べて、分娩前3週に *Prevotella* 属と未分類の *Veillonellaceae* 科が有意な低値、未分類の *Lachnospiraceae* 科、未分類の *Porphyromonadaceae* 科、*Barnesiella* 属および未分類 *Coriobacteriaceae* 科が有意な高値を示した。さらに、分娩後2週に *Prevotella* 属が有意な低値、*Barnesiella* 属が有意な高値を示した (図4)。

細菌種 (Operational taxonomic units; OTUs) 構成比では、分娩前後に *Prevotella ruminicola* と *Succiniclasticum ruminis* の割合が多く、これら2細菌種でいずれの時期でも全体の約15%を占めていた。また、SARA群は非SARA群に比べて、分娩前3週に *P. ruminicola* が低値傾向、*Prevotella sp. Marseille-P3114* が高値傾向、分娩後2週に *P. ruminicola* が低値傾向、分娩後6週に *Prevotella oralis* が有意な高値を示した。

なお、細菌叢の多様性は、両群とも分娩前3週に高く、分娩後に低下したが、非SARA群で分娩前後に変動が少ないのに対し、SARA群では分娩後に低下する傾向がみられた。また、分娩前3週にはSARA群で非SARA群に比べて多様性の指標が有意

な高値を示した。

SARA群と非SARA群における前胃液pHの差異は、牛個体間の第一胃緩衝作用の差異<sup>2)</sup>、分娩後における咀嚼時間<sup>4)</sup>や唾液分泌の減少などの要因によると考えられた。また、通常、第一胃液pHとVFA濃度との間に負の相関が認められる<sup>50)</sup>が、本試験の結果は逆の関係であった。SARA群において前胃液pHと第一胃液VFA濃度がいずれも低値を示したことは、第一胃粘膜のVFA吸収速度<sup>1)</sup>などの要因が関与していることが示唆された。

SARA群では非SARA群に比べて、*Prevotella* 属の構成比が分娩前3週と分娩後2週に有意な低値を示したが、これは分娩前にデンプン分解能が低下していること、また、*Prevotella* 属構成比はSARAの短期誘発牛で増加する<sup>48)</sup>が、長期誘発牛では減少する<sup>30)</sup>と報告されていることから、分娩後に連日濃厚飼料が多給されたSARA牛では、デンプン分解能が低下することが示唆された。同様に、SARA群では非SARA群に比べて、分娩前3週と分娩後2週に *P. ruminicola* が有意な低値を示した。*P. ruminicola* はタンパクの分解、ペプチドの取込みなどに重要な細菌で、飼料中の未消化繊維が多いとタンパクへの細菌や酵素の付着が減少し、タンパク分解率が減少す

る<sup>6,8)</sup>。また、第一胃内でLPSが増加すると繊維およびタンパク分解能が低下するとの報告もある<sup>17)</sup>。従って、SARA群で非SARA群に比べて*P. ruminicola*が低値を示したことは、SARA群では繊維およびタンパク質分解能が低下しており、これにLPSが関与している可能性があるかと推察された。

以上のように、SARA群では非SARA群に比べて、分娩前から前胃液細菌叢構成が異なることから、分娩前の細菌叢構成は分娩後SARAの発生と関連があり、また、分娩後SARAによる前胃液pHの低下は細菌叢の多様性低下と関連のあることが示唆された。分娩前にSARA群と非SARA群との間で細菌叢構成に差異がみられた原因は不明であるが、移行期における給与飼料ばかりでなく、乾乳時や乾乳前の給与飼料、さらに、前回の分娩後におけるSARA発症の有無なども関与している可能性がある。

#### 4. 黒毛和種牛の肥育時期による第一胃液性状と粘膜上皮遺伝子発現の変化

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SARAが発生し、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産生を誘発し、急性肝炎<sup>35)</sup>などの疾病発生の要因となっている。肥育牛の第一胃液性状や細菌叢構成についての報告は少ないが、交雑種肥育牛<sup>18)</sup>、黒毛和種育成牛<sup>21)</sup>、短期間に濃厚飼料を増給した黒毛和種牛での報告<sup>40)</sup>などがある。また、肥育牛の細菌叢構成は飼料効率と関連があり<sup>29,41)</sup>、肥育後期には繊維分解菌が減少すると報告されている<sup>11)</sup>。一方、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）およ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<sup>7)</sup>。液相<sup>28)</sup>や固相<sup>7,45)</sup>の細菌叢構成について多くの研究があり、最近では粘膜上皮付着性細菌の構成比に注目した報告<sup>43,44,56)</sup>が増えている。

一方、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<sup>38)</sup>、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>57,58)</sup>。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<sup>24)</sup>、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。さらに、SARA乳牛では第一胃粘膜上皮において輸送体、成長因子、ケトン体合成、コレステロール合成、免疫およ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<sup>34,54)</sup>。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<sup>19,37)</sup>。

著者らは、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。この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の変化、第一胃粘膜上皮における遺伝子発現の変化<sup>39,40)</sup>、肥育後期における細菌叢構成と枝肉成績との関係<sup>15)</sup>を検討した。

(1) 第一胃液pH, VFA, NH<sub>3</sub>-NおよびLA濃度並びにLPS活性値

第一胃液pHは、肥育時期の進行に伴いしだいに低値で推移した（図5）。第一胃液pHの24時間平均値は、後期（29ヵ月齢）には前期（14ヵ月齢）に比べて有意な低値を示し、中期（21ヵ月齢）に比べてわずかな低値を示した。また、総VFA濃度は後期に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な低値を示した（図6）。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。

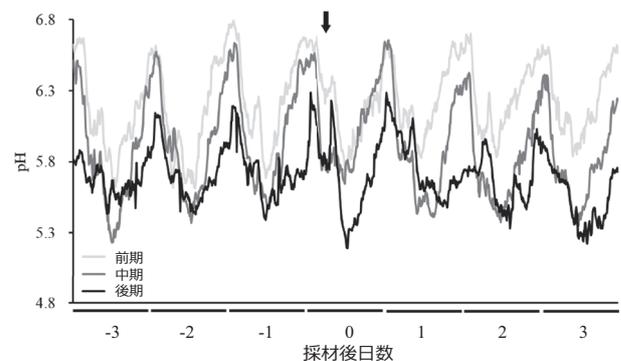


図5 黒毛和種牛の肥育時期による第一胃液pHの変化  
採材日(↓)の前後における10分間隔データの平均値(n=9)

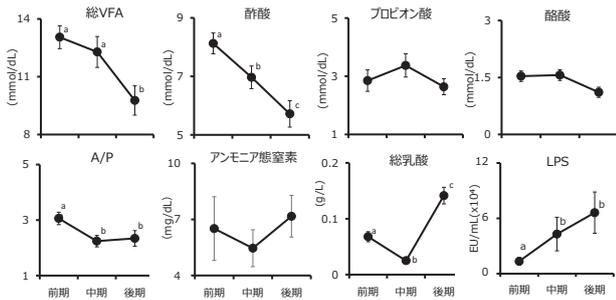


図6 黒毛和種牛の肥育時期による第一胃液性状の変化  
 平均値±標準誤差 (n=9), <sup>a-b-c</sup>P<0.05 (異符号間に有意差あり)

(2) 第一胃細菌叢構成

1) 液相と固相における細菌属構成比

時期別では、液相で前期に比べて未分類の *Ruminococcaceae* 属と未分類の *Firmicutes* 属が中期に、未分類の *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 (図7)。また、固相では前期に比べて、未分類の *Firmicutes* 属が中期に、未分類の *Clostridiales* 属と未分類の *Coriobacteriaceae* 属は後期に有意な低値を示し、*Succinivibrio* 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未分類の *Ruminococcaceae* 属を含む3細菌属が有意な高値、未分類の *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、

未分類の *Clostridiales* 属を含む2細菌属が有意な低値、後期には未分類の *Ruminococcaceae* 属が有意な高値、未分類の *Clostridiales* 属を含む3細菌属が有意な低値を示した。

2) 液相と固相におけるOperational taxonomic units (OTUs) 構成比

時期別では、液相で前期に比べて *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、*Succinivibrio 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* は全ての時期において、固相で液相に比べて有意な高値を示した。

(3) 第一胃粘膜上皮における遺伝子発現

マイクロアレイ法による網羅的遺伝子解析を行い、IPAソフトウェアによる発現遺伝子の解析を行った。

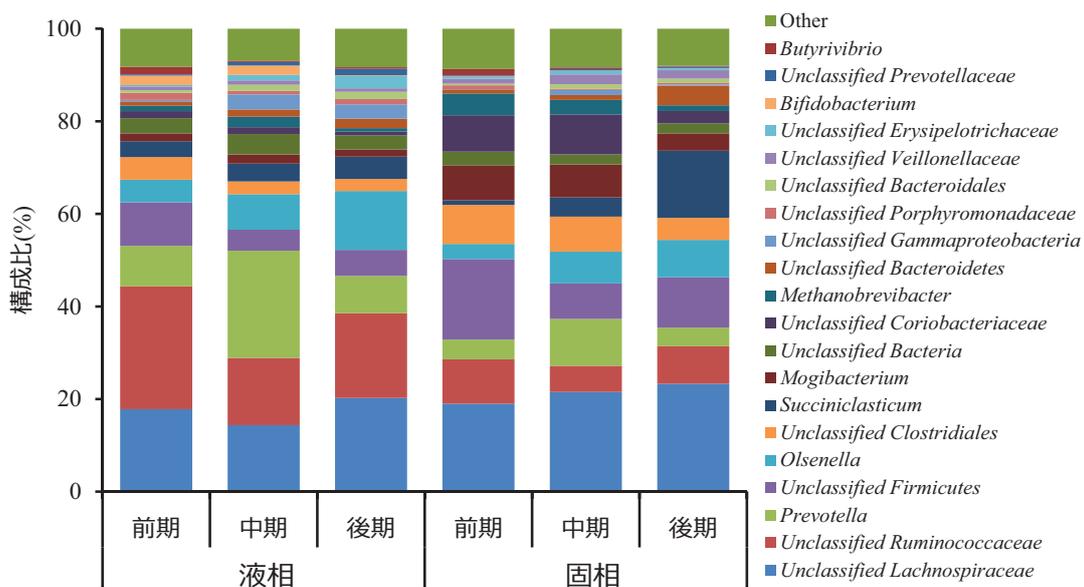


図7 黒毛和種牛の肥育時期による第一胃液 (液相) と食渣 (固相) の細菌属構成比 (上位20属)  
 平均値 (n=9)

その結果、前期から中期、中期から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、エネルギー代謝およ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、VFA輸送体のうち、SCFA<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>交換輸送体である *SLC26A3* 遺伝子の発現は中期に前期に比べて低下し、後期には中期に比べて増加した（図8）。一方、後期における第一胃液pHの個体差の要因が、第一胃粘膜上皮のSCFA<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>交換体発現の差異によるのではないかと考え、後期の第一胃液pHにより高pH群（平均pH>5.8）と低pH群（平均pH<5.5）に区分し、遺伝子発現を比較した結果、高pH群では*SLC26A3* の発現量が後期に中期に比べて増加していた。

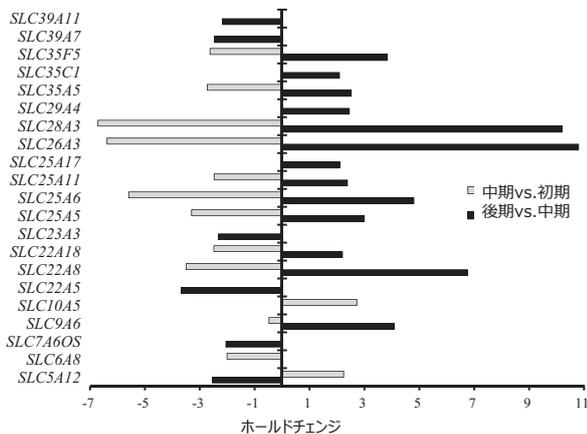


図8 黒毛和種肥育牛の第一胃粘膜上皮におけるトランスポーター・コード遺伝子の発現有意(p<0.05)かつホールドチェンジ2倍以上の遺伝子

#### (4) 肥育後期における細菌叢構成と枝肉成績の関係

##### 1) 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とパルミトレイン酸 (C16:1) およびオレイン酸 (C18:1) 組成比との間に有意な正の相関が認められた。一価不飽和脂肪酸 (MUFA) 組成比が高値を示した高MUFA群では低値を示した低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。

##### 2) 第一胃細菌叢構成と第一胃液性状、肥育および枝肉成績との関係

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、構成比と増体および枝肉成績との間で、液相では *Chelonobacter oris* とステアリン酸 (C18:0) および飽和脂肪酸 (SFA) との間に有意な負の相関、固相では *Clostridiales bacterium 2PG-426-CC-42* リノール酸 (C18:2) および多価不飽和脂肪酸 (PUFA) との間に有意な正の相関、*Succiniclasticum ruminis* とC18:2およびPUFAとの間に有意な負の相関が認められた。さらに、*Ruminococcus bromii* と枝肉歩留およびバラ厚との間に有意な正の相関、パルミチン酸 (C16:0) との間に有意な負の相関、*Succiniclasticum ruminis* とパルミトレイン酸 (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。

以上のように、肥育後期に前期や中期に比べて第一胃液pHが低下し、総VFA濃度も低値を示したことは、後期には、反芻の減少によってpH緩衝作用のある唾液の流入量が低下し、濃厚飼料多給によってVFA産生が亢進、粘膜上皮からのVFA吸収が増大してVFA濃度が減少したことによると考えられた。後期にはLA濃度も上昇したので、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。一方、黒毛和種牛では肥育時期の進行に伴い、健康乳牛やSARA誘発牛と異なる第一胃細菌叢構成を示し、細菌叢の多様性は前期から後期にかけて低下した。また、液相と固相のいずれも上位20細菌属で全体の70%以上を占め、部位別の細菌叢構成はいずれの肥育時期においても差異がみられた。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、固相では未分類の *Coriobacteriaceae* 属などが各部位に特徴的な細菌と考えられた。

第一胃粘膜上皮の遺伝子発現解析の結果、肥育時期の進行に伴い遺伝子発現が変動し、中期に前期に比べて *PATI* 発現が増加、後期には中期に比べて *SLC26A3* 発現が増加した。*PATI* と *SLC26A3* は、第一胃粘膜上皮において細胞内HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>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<sup>3,5)</sup>。*PATI* 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、前期から中期までの間の第一胃液pHの低下に適応して増加、*SLC26A3*発現は前期から後期まで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、黒毛和種牛で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。

肥育後期における第一胃性状と肥育および枝肉成績との間に密接な関連がみられ、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には、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VFA調節機構が影響すると考えられた。

## 5. 解明に至らなかったSARA関連研究

乳牛や肥育牛におけるSARAの病態解析および予防対策に関する一連の研究によって、従来の研究では解明することのできなかつた第一胃液pHのリアルタイムでの変化、さらには第一胃発酵の動的変化を観察することが可能となり、多くの新たな知見を得ることができた。一方で、SARAの確実な予防法、乳牛と肥育牛におけるSARAと疾病発生との関係などについては、主にマンパワーの問題でアプローチすることができなかつた。

### (1) SARAの確実な予防法

SARA予防のために、乳牛では移行期における給与飼料など飼養管理の改善が最も重要であることは言うまでもない。一方、現実的には、各種製剤給与によるSARAの予防を考慮しながら、乳牛の泌乳量や乳成分を維持・向上させることも重要な課題である。

乳牛のSARA予防に関する著者らの試験の結果、従来から用いられている重曹については、重曹含有食塩ブロッカー剤として舐食給与すると、同量の重曹粉末を経口給与した場合に比べて、第一胃液pHの低下が軽減されることが明らかになった<sup>14)</sup>。また、

予め活性型酵母製剤を給与した牛では、急激にSARAが誘発された場合でも第一胃発酵に対する影響が少なく、繊維分解菌の速やかな順応などにより第一胃発酵が維持・促進されることが示唆された<sup>55)</sup>。さらに、濃厚飼料や粗飼料の代替として利用が期待されているクラフトパルプ(KP)は、コーン圧片と同等の第一胃発酵性を示し、コーン圧片多給時に比べて第一胃粘膜上皮における免疫機能と炎症反応が抑制される傾向が伺えたことから、KPは穏やかな発酵性を示し、第一胃内のVFA増加やpH低下による粘膜上皮への刺激も少ないことが示唆された<sup>23)</sup>。

今後、SARAの確実な予防法については、給与飼料など飼養管理の改善を主体としながら、SARA誘発牛や野外のSARA牛を用いた実証研究など、更なる多くの研究が必要である。

### (2) 乳牛と肥育牛におけるSARAと疾病発生との関係

SARAは、乳牛では周産期疾病や蹄病、第四胃変位などの疾病、黒毛和種肥育牛では急性肝炎などの疾病と関連のあることが示唆されている。しかし、SARAは乳牛では明らかな症状を呈することが少なく、また、肥育牛では長期間の飼養管理に第一胃の発酵と粘膜機能が適応・順応しているため、SARAと各疾病との関係を明らかにすることはできなかつた。今後は、疾病発症牛を用いた症例研究を行うとともに、疾病発生機序についてエンドトキシン・カスケードを考慮して研究を進める必要がある。さらに、黒毛和種肥育牛の急性肝炎については、ビタミンA欠乏症の影響を考慮する必要がある。

## 6. おわりに

前記のように、乳牛の分娩後にみられるSARAでは、分娩前に第一胃細菌叢構成が健康牛と異なることが明らかになった。今後、分娩後SARA牛の分娩前における細菌叢構成については、前回分娩時からの長期的な給与飼料状況を考慮し、分娩後SARAの発症がその後の泌乳量など生産性に及ぼす影響を検討する必要がある。

一方、離乳期子牛における研究結果から、離乳期子牛の管理と初産分娩後におけるSARA発生との間

に密接な関連があると推察される。この観点で実証研究を行うことができれば、SARA研究は、乳牛の健康維持と酪農業の振興に大いに貢献することができると考えられる。いずれにしても、乳牛の健康維持と泌乳量や乳成分の維持・向上は、将来にわたって酪農業の大きな課題になるので、この課題に対して現場の最前線で対応する臨床獣医師、さらには関連分野の研究者の奮闘努力が期待される。

## 引用文献

- Allen MS: Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber, *J Dairy Sci*, 80, 1447-1462 (1997)
- Aschenbach JR, Penner GB, Stumpff F: Ruminant nutrition symposium: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH, *J Anim Sci*, 89, 1092-1107 (2011)
- 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)
- Calamari L, Soriani N, Panella G, Petrera F, Minuti A, Trevisi E: Rumination time around calving: an early signal to detect cows at greater risk of disease, *J Dairy Sci* 97, 3635-3647 (2014)
- 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, 010.93-1007 (2010)
- Dai X, Paula EM, Lelis ALJ, Silva LG, Brandao VLN, Monteiro HF, Fan P, Poulson SR, Jeong KC, Faciola AP: Effects of lipopolysaccharide dosing on bacterial community composition and fermentation in a dual-flow continuous culture system *J Dairy Sci*, 102, 334-350 (2019)
- 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), doi: 10.1093/femsec/fiw251 (2017)
- Devant M, Ferret A, Gasa J, Calsamiglia S, Casals R: Effects of protein concentration and degradability on performance, ruminal fermentation, and nitrogen metabolism in rapidly growing heifers fed high-concentrate diets from 100 to 230 kg body weight, *J Anim Sci*, 78, 1667-1676 (2000)
- Dieho K, Van den Bogert B, Henderson G, Bannink A, Ramiro-Garcia J, Smidt H, Dijkstra J: Changes in rumen microbiota composition and in situ degradation kinetics during the dry period and early lactation as affected by rate of increase of concentrate allowance, *J Dairy Sci*, 100, 2695-2710 (2017)
- Enemark JMD: The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review, *Vet J* 176, 32-43 (2008)
- 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)
- 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)
- Hulbert LE, Cobb CJ, Carroll JA, Ballou MA: Effects of changing milk replacer feedings from twice to once daily on Holstein calf innate immune responses before and after weaning, *J Dairy Sci*, 94, 2557-2565 (2011)
- 一條俊浩, 長濱克徳, 大久保成ら: 牛第一胃液のpHと揮発性脂肪酸濃度に及ぼす重曹含有食塩ブロック剤飼料給与の影響, *日獣会誌*, 67, 844-849 (2014)
- 石塚直樹, Kim Yohan, 岩本英治, 正木達規, 木村 淳一, 一條俊浩, 佐藤 繁: 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, *産業動物臨床誌*, 11, 66-76 (2020)
- Jami E, Israel A, Kotser A, Mizrahi I: Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood, *ISME J.* 7: 1069-1079, doi: 10.1038/ismej.2013.2 (2013)
- Jing L, Zhang R, Liu Y, Zhu W, Mao S: Intravenous lipopolysaccharide challenge alters ruminal bacterial microbiota and disrupts ruminal metabolism in dairy cattle, *Br J Nutr*, 112, 170-182 (2014)
- 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 (2016)
- 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)
- Khafipour E, Krause DO, Plaizier JC: A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation, *J Dairy Sci*, 92, 1060-1070 (2009)
- 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)
- Kim YH, Nagata R, Ohtani N, Ichijo T, Ikuta K, Sato S: Effects of dietary forage and calf starter on ruminal pH and bacteria in Holstein calves during weaning transition, *Front Microbiol*, 7: 1575. doi: 10.3389/fmicb.2016.01575 (2016)
- Kim YH, Takahashi C, Kurosu K, Kushibiki S, Ikuta K, Kizaki K, Sato S: Wood kraft pulp supplementation alters the rumen fermentation characteristics and epithelial transcriptomes in Holstein cattle during the continuous high-grain diet challenge, *Anim Feed Sci Tech*, 257, 114292. doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.114292 (2019)

- 24) 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)
- 25) Kleen JL, Hooijer GA, Rehage J, Noordhuizen JPTM: Subacute ruminal acidosis (SARA): a Review, J Vet Med, 50, 406-414 (2003)
- 26) Krause KM and Oetzel GR: Inducing subacute ruminal acidosis in lactating dairy cows, J Dairy Sci, 88, 3633-3639 (2005)
- 27) Laarman AH, Oba M: Effect of calf starter on rumen pH of Holstein dairy calves at weaning, J Dairy Sci, 94, 5661-5664 (2011)
- 28) 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)
- 29) 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. doi: 10.1186/s40168-019-0618-5. (2019)
- 30) Li S, Khafipour E, Krause DO, Kroeker A, Rodriguez-Lecompte JC, Gozho GN, Plaizier JC: Effects of subacute ruminal acidosis challenges on fermentation and endotoxins in the rumen and hindgut of dairy cows, J Dairy Sci, 95, 294-303 (2012)
- 31) Lima FS, Oikonomou G, Lima SF, Bicalho MLS, Ganda EK, de Oliveira Filho JC, Lorenzo G, Trojacek P, Bicalho RC: Prepartum and postpartum rumen fluid microbiomes: characterization and correlation with production traits in dairy cows, Appl Environ Microbiol, 81, 1327-1337 (2015)
- 32) 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)
- 33) 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)
- 34) 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)
- 35) Nagaraja TG, Chengappa MM: Liver abscesses in feedlot cattle: a review, J Anim.Sci, 76, 287-298 (1998)
- 36) Nagaraja TG, Titgemeyer EC: Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook, J Dairy Sci, 90, E17-E38 (2007)
- 37) 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)
- 38) 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)
- 39) 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)
- 40) Ogata T, Makino T, Ishizuka N, Iwamoto E, Masaki T, Ikuta K, Kim YH, 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 Japanese Black beef cattle during fattening, PLoS One, 14: e0225448. doi.org/10.1371/journal.pone.0225448 (2019)
- 41) 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)
- 42) Penner GB, Beauchemin KA, Mutsvangwa T: Severity of ruminal acidosis in primiparous Holstein cows during the periparturient period, J Dairy Sci, 90, 365-375 (2007)
- 43) 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, 31, 84(12):e00384-18. doi: 10.1128/AEM.00.384-18 (2018)
- 44) 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, 19;11:119. doi: 10.3389/fmicb.2020.00119 (2020)
- 45) 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, 1, 12(8):e0182271. doi: 10.1371/journal.pone.0182271 (2017)
- 46) Pitta DW, Kumar S, Vecchiarelli B, Shirley DJ, Bittinger K, Baker LD, Ferguson JD, Thomsen N: Temporal dynamics in the ruminal microbiome of dairy cows during the transition period, J Anim Sci, 92, 4014-4022 (2014)
- 47) 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)
- 48) Plaizier JC, Li S, Danscher AM, Derakhshani H, Andersen PH, Khafipour E: Changes in microbiota in rumen digesta and feces due to a grain-based subacute ruminal acidosis (SARA) challenge, Microb Ecol 74, 485-495 (2017)
- 49) Rey M, Enjalbert F, Combes S, Cauquil L, Bouchez O, Monteils V: Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential, J Appl Microbiol, 116, 245-257 (2014)
- 50) Sato S: Pathophysiological evaluation of subacute ruminal acidosis (SARA) by continuous ruminal pH monitoring, Anim

- Sci J, 87, 168-177 (2016)
- 51) 佐藤 繁: 乳牛の亜急性第一胃アシドーシスの病態と評価. 宮獣会報, 66(4), 166-173 (2013)
- 52) 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)
- 53) Sato S, Kimura A, Anan T, Yamagishi N, Okada K, Mizuguchi H, Ito K: A radio transmission pH measurement system for continuous evaluation of fluid pH in the rumen of cows, *Vet Med Commun*, 36, 85-89 (2012)
- 54) 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)
- 55) Watanabe Y, Kim YH, Kushibiki S, Ikuta K, Ichijo T, Sato S: Effects of active dried *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and bacterial community during the short-term subacute ruminal acidosis challenge in Holstein calves, *J Dairy Sci*, 102, 6518-6531 (2019)
- 56) Wetzels SU, Mann E, Pourazad P, Kumar M, Piniar 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)
- 57) 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)
- 58) 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)
- 59) Zhu Z, Kristensen L, Difford GF, Poulsen M, Noel SJ, Abu Al-Soud W, Sørensen SJ, Lassen J, Løvendahl P, Højberg O: Changes in rumen bacterial and archaeal communities over the transition period in primiparous Holstein dairy cows, *J Dairy Sci*, 101, 9847-9862 (2018)