

## 反芻残渣を用いた低侵襲性ルーメン菌叢タイピングに関する研究

生物資源科学専攻 家畜生産生物学講座 動物機能栄養学 三浦広卓

### 1. 背景と目的

近年ウシのルーメン内に共生する細菌と宿主の健康または生産性との関連が明らかになりつつある。ウシの健康維持や生産性向上を図る上で、これらの現象と深く関わるルーメン細菌群を特定することが重要と考えられる。そのためにはルーメン菌叢の把握、すなわちルーメン菌叢タイピングを可能な限り多くの個体で実施し、特定菌群の分布量と健康/生産性との関連について法則性を見いだす必要がある。通常、ルーメン菌叢タイピングを実施するには、ルーメンカニューレやストマックチューブを介したルーメン内容物の採取が必須となる。しかし、ルーメン内容物のサンプリングには労力や動物への負担といった制約があり、大規模試験や生産現場での活用が難しい。この課題を解消するアプローチとして、口腔内の反芻残渣（吐き戻されたルーメン内容物）を用いたルーメン菌叢タイピング手法が近年提唱されている。しかし、反芻残渣の採取手技や採取後のサンプルの取り扱いに関する具体的な情報は十分に提供されていない。そこで本研究では、反芻残渣を用いたルーメン菌叢タイピング手法の活用に向けて各種検討を行った。

### 2. 方法

反芻残渣の採取手技と解析サンプルとしての有効性を確認するために、ルーメンカニューレ装着済みのホルスタイン種乾乳牛6頭（粗飼料多給条件で飼養）および黒毛和種肥育牛3頭（濃厚飼料多給条件で飼養）から反芻残渣およびルーメン内容物を採取した。サンプリングは朝の給餌後3～5時間に実施し、反芻残渣は綿棒を用いて口腔内より、ルーメン内容物はカニューレよりそれぞれ採取した。採取した反芻残渣およびルーメン内容物を16S rRNA遺伝子配列に基づく菌叢解析（変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法、MiSeqおよびreal-time PCR）に供し、両サンプルの菌叢構成を比較することで反芻残渣を用いたルーメン菌叢タイピングの有効性を検討した。ついで、黒毛和種肥育牛25頭から反芻残渣を採取し、コア澱粉分解菌群のreal-time PCR定量によるルーメン菌叢タイピングを実施した。

### 3. 結果と考察

スティックに綿棒を連結した自作の採取器具により、1頭あたり30秒程度で低侵襲的に反芻残渣の採取が可能であることを確認した。採取した反芻残渣は核酸分解抑制バッファーを用いることで、常温にて1週間の保存が可能であった。ルーメン内容物と反芻残渣の菌叢を比較したところ、両サンプルの菌叢構成は一致した。また、粗飼料もしくは濃厚飼料を多給した際の菌叢構成変化は、ルーメン内容物と反芻残渣いずれにおいても同様に認められた。これらの結果より、反芻残渣を用いることでルーメン菌叢タイピング、すなわち構成メンバーの特定と飼料変化に伴うそれらの分布量変動のモニタリングが可能であることを確認した。続いて本手法を応用して、反芻残渣を用いた黒毛和種肥育牛のルーメン菌叢タイピングを実施したところ、ルーメン菌叢は大きく3つの菌叢型に類型化された。この結果は、ルーメン内容物を用いて同様の解析を行った先行研究の結果と一致するものであった。以上、本研究では反芻残渣を用いたルーメン菌叢タイピング手法について検討し、その有効性を確認した。本手法を活用することで、大規模試験や生産現場での簡便かつ低侵襲的なルーメン菌叢タイピングが可能になると期待できる。