2. 離乳期子牛の第一胃機能解析へのアプローチ —第一胃液のpHと細菌叢, 第一胃粘膜上皮の遺伝子発現の変化—

○Kim Yohan^{1, 2)}

(¹⁾岩手大農学部 産業動物内科学, ²⁾岐阜大大学院 連合獣医学研究科)

離乳期には, 揮発性脂肪酸 (VFA) 産生を促進し, エネルギー摂取量を増加させることを目的として易発酵性飼料が給与されることがある。しかし, 離乳期子牛では第一胃の発達が十分でなく, 易発酵性炭水化物の過剰給与によって第一胃は恒常性の維持が困難となる。今回は, 離乳期子牛の第一胃機能解析へのアプローチとして, 離乳期子牛に離乳期飼料 (スターター) と乾草を給与した場合の第一胃液pHの変化が第一胃の細菌叢および上皮の遺伝子発現に及ぼす影響について, 研究結果を紹介する。

1. 離乳期子牛への乾草・スターター給与が第一胃液のpH, VFA濃度および細菌叢に及ぼす影響

【材料と方法】 供試牛は4週齢のホルスタイン種子牛16頭で, スターターに加えて乾草を給与した乾草給与群 (n=8) およびスターターのみを給与した濃厚飼料給与群 (n=8) の2群に分けた。第一胃フィステルを介して第一胃液を採取し, 第一胃液pHは第一胃内に留置した無線伝送式pHセンサーにより継続的に測定した。抽出した細菌DNAから増幅した16S rRNAの次世代シーケンス解析の結果をもとに, MOTHURソフトを用いて第一胃液細菌叢を解析した。また, 定量的リアルタイムPCR法により16S rRNA遺伝子のコピー数を調べた。

【結果】 乾草給与群では濃厚飼料給与群に比べて第一胃液pHの24時間平均値が有意な高値を示した。また, 第一胃液pHの日内変動 (1時間平均

値) は, 乾草給与群で離乳前1週, 離乳日, 離乳後1および3週に観察されたのに対し, 濃厚飼料給与群では離乳日および離乳後1週にはみられなかった。さらに, 乾草給与群では濃厚飼料給与群に比べて第一胃液総VFA中の酢酸およびプロピオン酸の割合が有意な低値, 酢酸/プロピオン酸比 (A/P) が有意な高値を示した。

一方, 細菌叢の多様性指数には2群間で有意な差異が認められた。また, 細菌門では*Bacteroidetes*, *Actinobacteria*および*Tenericutes*の構成比と*Firmicutes/Bacteroides*比, 細菌属では*Prevotella*の構成比で両群間に有意差が認められた。さらに, 乾草給与群では濃厚飼料給与群に比べて*Ruminococcus flavefaciens*および*Ruminococcus albus*のコピー数が有意な高値を示した。

【考察】 乾草給与群では給餌後に低下した第一胃液pHが数時間後に再び上昇し, 第一胃液pHの日内変動が早期に認められ, これにより第一胃液pHの24時間平均値が高値を示したと考えられた。また, 濃厚飼料給与群では乾草給与群に比べて第一胃液pHが低値を示し, そのために細菌叢の多様性が低下したと考えられた。

2. 離乳期子牛への乾草・スターター給与が第一胃粘膜上皮の遺伝子発現に及ぼす影響

【材料と方法】 前記の供試牛のうち, 子牛7頭を乾草給与群 (n=3) と乾草非給与群 (n=4) の2群に分けた。第一胃上皮は離乳後3週に採取し, Total RNAを抽出してマイクロアレイ法により

mRNA発現解析を行った。また、2群間で発現の異なる遺伝子（differentially expressed genes : DEG）について、経路解析（IPA）ソフトを用いた上流制御遺伝子およびネットワーク解析を行った。

【結果】乾草給与群では乾草非給与群に比べて、第一胃液pHの平均値と最大値、総VFAに占める酢酸の割合およびA/Pが有意な高値、第一胃液pH（5.8未満）の時間が有意な低値を示した。

マイクロアレイ解析により1,024個のDEG（ $p < 0.05$ ）が検出され、そのうち446遺伝子の発現が亢進、577遺伝子の発現が抑制されていた。また、IPAでは成長因子（TGFB1およびEGF）が検出された。

【考察】乾草給与により第一胃液pHの低下が抑制され、さらに、離乳期におけるスターターおよび乾草の給与に適応するための第一胃の発達は成長因子によって制御されている可能性が示唆された。

以上のように、離乳期にスターターとともに乾草を給与することによって、第一胃液pHの低下が軽減されるが、スターターのみを給与した場合、第一胃液pHが低下し、細菌叢の構成と多様性および第一胃粘膜上皮の発達を制御する成長因子の遺伝子発現に影響を与えることが明らかとなった。

図. 第一胃液中の主要な4細菌属の細菌叢構成比（左図）、上流制御遺伝子および成長因子の情報伝達に与関する遺伝子のmRNA相対的発現量（右図）