

氏名(本籍)	北 満 夫 (石川県)
学位の種類	博士(獣医学)
学位記番号	乙第372号
学位授与の要件	学位規則第3条第3項該当
学位論文題名	新生子牛における成牛ルーメン微生物の早期定着技術とその有用性に関する研究
論文審査委員	(主査) 小林 好 作 (副査) 松 浦 健 二 阿 部 又 信 田 淵 清 湊 一

### 論 文 内 容 の 要 旨

酪農および肉用牛経営の規模拡大にともない、子牛の育成も集団化、多頭化したきている。そのため、より経済的で手間のかからない育成法が求められている。そのひとつが子牛を早い時期に離乳させ、固形飼料主体の飼養に移行させる方法である。この早期離乳法は、飼料費の節約と育成効果を両立させようという経営の観点から研究が積み重ねられてきている。したがって、その多くは飼料の種類や摂取量とルーメンの発達または増体量との関係に注目したものであり、ルーメン内微生物の動態に焦点をあてた研究は少ない。

筆者は、子牛の生涯の早い時期に、成牛ルーメン内微生物叢を定着させることが早期離乳を可能にし、ひいては増体促進および病原微生物の排除に役立つのではないかと考えた。そこで第一に新生子牛に成牛ルーメン液を与えて成長過程を観察するとともに、子牛ルーメン内微生物叢の変化を調べた。次いで無菌ヤギに特定のルーメン内細菌を与え、どのような細菌がどこにどのくらい定着するのかを観察した。最後に、新生子牛に成牛ルーメン液を投与した後、大腸菌で攻撃し、ルーメン液投与の効果を判定した。以下にこれらの実験の概要を説明する。

#### 実験1. 新生子牛ルーメン微生物叢の発達と子牛の発育におよぼす成牛ルーメン液経口投与の影響

健康な成牛の新鮮ルーメン液あるいは加圧滅菌処理したルーメン液(AT-R)を、生後数時間以内の子牛に経口投与し、子牛のルーメン微生物叢および発育に与える影響を調べた。

試験方法：健康な成牛の新鮮ルーメン液を生後3日齢まで1日100ml投与した試験区1、新鮮ルーメン液を試験区1同様に与え、あわせてAT-Rを42日齢まで1日500mlづつ毎日投与した試験区2、AT-Rのみを42日間与えた試験区3、および何も与えない試験区4(対照区)を設定した。各試験区にはホルスタイン種5頭とジャージー種1頭を配した。試験牛には3日齢まで初乳を、4日齢から42日齢までは代用乳を、それぞれ体重の10%を上限として与え、43日齢で離乳させた。市販の人口乳、乾草、水は試験期間を通じて自由に摂取させた。ホルスタイン種は90日齢までルーメン内容の、その後は182日(26週)齢まで発育観察に供した。ジャージー種は10日齢で安楽殺し、ルーメン内への細菌付着状況の観察に供した。

成績：1. 45日齢までの乾物およびTDN摂取量は、対照区より試験区で有意に高かった。46-90日齢のそれ

には群間で差がなかった。体重は、観察終了時まで、試験区1で平均140、試験区2で130、試験区3で136kgの増体があり、いずれも対照区の平均118.2kgより大きかった。体高、体長、胸囲も対照区と比較し、ほぼ同じ成績であった。

2. 試験期間を通じて、ルーメン内乳酸菌数は対照区にくらべ、各試験区で高く推移した。試験区2および3では、*Streptococcus*属菌群の数が他の試験区より高く推移した。機能別細菌群のうち、乳酸利用菌数は試験期間を通じて対照区と試験区の違いがなかった。しかしペクチンおよびキシラン分解菌、セルロース分解菌、メタン生成菌群は、子牛のルーメン内に早期に定着していることが確認された。対照区では50日齢まで、AT-Rのみを与えた試験区3では30日齢まで、ルーメン内にプロトゾアが検出されなかったのに対し、新鮮ルーメン液を投与した試験区2および3では10日齢から出現し、特に試験区3のプロトゾア数は以降も安定して試験区1より高いレベルで推移した。10日齢のジャー種種のルーメン壁を走査電子顕微鏡で観察したところ、対照区にくらべ試験区では多数の細菌が付着していた。

3. 試験区1および2のルーメンVFA濃度は、早い時期からのルーメン細菌の定着を反映して、50日齢までは対照区より高いレベルで推移した。試験区3のそれは、他の試験区より10日早く対照区の値に近づいた。組成をみると、プロピオン酸が高い比率を占めていた。

結論：新鮮ルーメン液およびAT-Rの投与はルーメン内偏性嫌気性菌の早期定着を促し、それが乾物摂取量を増加させ、結果として発育促進効果を発揮した。

## 実験2. 無菌ヤギの消化管内へのルーメン細菌の定着試験

実験1で、新生子牛に健康な成牛の新鮮ルーメン液を経口投与すると、成牛ルーメン微生物叢の早期確立に有効であることがわかった。そこで、このことをさらに明確に立証する目的で、無菌シバヤギに特定の単離ルーメン細菌を経口投与し、それらが消化管のどの部位にどれくらい定着するのかを調べた。

試験方法：無菌ブタの作出方法に準じ、子宮切開術で1頭のシバヤギの胎子を取り出し、改良アイソレーター内で56日間飼育した。飼料と水はすべて滅菌して与えた。この間、35日齢から5日間かけて次の9種類の細菌、*S. bovis*、*L. plantarum*、*V. alcalescens*、*M. elsdenii*、*B. fibrisolvens*、*P. ruminicola* ss. *brevis*、*E. faecium*、*R. amylophilus*および*R. albus*を投与した。最初の投与後3週目に安楽殺し、ルーメン、盲腸および直腸内における定着状況を、選択培地と非選択培地で検索した。

成績：シバヤギのルーメン内pHは6.98、VFA濃度は2.59mM/dlで、VFA組成比は健康なヤギのそれに似ていた。投与した9種類の細菌のうち、8菌種がルーメン内に定着していた。とくに*S. bovis*、*P. ruminicola*、*R. amylophilus*、*B. fibrisolvens*、*L. plantarum*はルーメン内で多数を占め、*V. alcalescens*は下部消化管内にくらべ約1,000倍の濃度で存在した。一方、*M. elsdenii*および*E. faecium*はルーメン内にくらべ下部消化管で2-4倍高いレベルで定着していた。セルロース分解菌*R. albus*はどの部位にも定着していなかった。

結論：無菌ヤギに主要なルーメン細菌を経口投与すると、ルーメン内はもちろん、盲腸や直腸などの下部消化管にも定着する。ルーメン内のVFA濃度や構成比を調べたが、通常飼育のヤギや子牛のそれと近似していた。したがって、このシバヤギのルーメン内に定着した群菌が、子牛のVFA産生に寄与していると考えられる。

### 実験3. ルーメン液早期投与による、新生子牛腸管内への病原性大腸菌の定着阻止試験

新生子牛下痢症は病原性大腸菌の感染が原因で、生後0-3日以内に水様下痢便を排泄し、脱水状態となって敗血症死する。いったん牛群内に発生すると死亡、発育遅延などによる経済的損失が大きい。ワクチン接種による予防が試みられているが、血清型が多岐にわたること、免疫能が未発達な時期に発症することなどのため、必ずしもよい成績が得られていない。そこで、子牛のルーメン細菌叢を早い時期に成牛のそれに近づければ、病原大腸菌の定着を阻止できるのではないかと考え、この実験を行った。

試験方法：(1) 生後48時間の無処置対照牛1頭、(2) 生後24時間目に*E. coli* NAS-10で攻撃した1頭、(3) 生後2-3時間以内にルーメン液を投与した2頭、および(4) ルーメン液投与後21時間目に*E. coli* NAS-10で攻撃した3頭、計4群を設定した。ここで用いたルーメン液は、採取後のろ過液を-80℃で保存したものである。

成績：ルーメン液を投与しなかった1頭は、攻撃により水様下痢便を排泄し死亡した。ルーメン液投与後に攻撃した群では、軽度の軟便を排泄したものの、その後は回復した。十二指腸の*E. coli* NAS-10の菌数は、ルーメン液非投与の子牛より、投与した子牛で著しく低く、時間とともに増加することもなかった。被攻撃群のリンパ節、脳、心、肺、腎、肝、脾からは攻撃菌が検出されたが、ルーメン液投与後の攻撃群では検出できなかった。ルーメン液投与群およびルーメン液投与後の攻撃群では、ルーメン、十二指腸、直腸に形態的に多様な細菌が定着していた。これに対応して下部消化管のVFA濃度も対照牛にくらべて著しく高かった。

結論：新生子牛への保存ルーメン液投与は、病原性大腸菌の腸管定着を抑制することが明らかとなった。

以上の成績を総合し、次の結論を得た。

1. 新生子牛への新鮮ルーメン液の経口投与は、成牛のルーメン微生物叢の早期確立および子牛の発育促進に有効であった。
2. 無菌ヤギへのルーメン主要細菌の経口投与試験により、セルロース分解菌以外の細菌が、ルーメン内はもちろん、下部消化管内にも定着することを確認した。
3. ここで作出したノトバイオート・シバヤギは、ルーメン微生物および下部消化管の正常細菌叢と病原微生物との関係を研究するために有用な実験動物となる。
4. 新生子牛への保存ルーメン液の投与は、病原性大腸菌の腸管内定着を抑制する。

## 論文審査の結果の要旨

乳牛にせよ、肉牛にせよ、哺乳期の飼養管理がその後の発育に大きく影響する。とくにこの時期における下痢と肺炎による損耗は経営を圧迫している。著者は、子牛の生涯の早い時期に、そのルーメン内に成牛ルーメン微生物叢を定着させることが、子牛の増体促進および病原微生物の排除に重要と考えた。このことを証明する目的で以下の3つの実験を行い、その成績を中心に本論文は構成されている。

### 実験1. 新生子牛のルーメン微生物叢の発達と子牛の発育におよぼす成牛ルーメン液経口投与の影響

次のような実験を設定した。

	新生子牛数	新鮮ルーメン液	加圧滅菌ルーメン液
試験区1	H5, J1	100ml/day×3	
2	H5, J1	100ml/day×3	500ml/day×42
3	H5, J1		500ml/day×42
対照区	H5, J1	無投与	無投与

出生後数時間以内に1回目を投与。ルーメン内微生物に関する観察気管はホルスタイン種 (H) で90日、ジャージー種 (J) で10日とした。

成績：(1) 飼料摂取量 45日齢までの人工乳摂取量は試験区2および3で対照区より多かった。乾物摂取量とTDN摂取量すべての試験区で対照区を超えていた。しかし46日齢から90日齢の間では有意差がなくなっている。(2) 試験期間終了までの体重、体高、体長、胸囲増は、おおむね対照区より大きかった。(3) ルーメン内微生物叢のうち、乳酸菌数は対照区にくらべ各試験区で観察期間を通じて高く推移した。試験区2-3では *Streptococcus* 属菌群の菌数が、他の試験区より高かった。ペクチンおよびキシラン分解菌、セルロース分解菌、メタン産生菌類は、早い時期に子牛ルーメン内に定着していた。新鮮ルーメン液を投与した試験区1-2では、10日齢でプロトゾアが確認されたが、試験区3では30日齢、対照区では50日齢まで出現しなかった。試験区のルーメン内VFA濃度は、早い時期に定着した細菌群の活動を反映し、対照区にくらべ、50日齢まで高いレベルで推移した。その組成は酢酸の比率が低く、プロピオン酸の比率が高かった。90日齢になると各試験区とも、対照区との間で差がなくなった。

この実験から著者は、新生子牛に健康成牛の新鮮ルーメン液100mlを生後3日間投与すると、そのルーメン内に早期に成牛微生物叢を定着させることができ、子牛の発育に良好な影響を与えると結論している。加圧滅菌ルーメン液の投与は細菌の定着に有効であったが、プロトゾアの早期出現に役立たないようにみえた。

## 実験2. 無菌ヤギの消化管内へのルーメン細菌の定着試験

成牛の新鮮ルーメン液にはさまざまな微生物が存在し、相互に影響しあっている。子牛ルーメン内への定着にも、これらの相互関係が関与していると考えられる。そこで著者は、単離した主要ルーメン細菌を無菌の反芻動物に経口投与し、どの菌が、消化管のどこにどのくらい定着するか観察することを試みた。

無菌ブタの作出方法に準じて子宮切断術で1頭のシバヤギの胎子を取り出し、改良アイソレーター内で飼育した。生後35日目から5日間かけて9種類のルーメン細菌を経口投与した。菌投与後3週目に安楽死させ、ルーメン、盲腸および直腸内における細菌の定着状況を、非選択培地と選択培地を用いて検索している。

成績：投与した9菌種のうち8菌種がルーメン内に定着していた。とくに① *Streptococcus bovis* ② *Prevotell ruminicola* ③ *Ruminobacter amylophilus* ④ *Butyrivibrio fibrisolvens* ⑤ *Lactobacillus plantarum* はルーメン内で多数を占め、⑥ *Veillonella alcalesces* は下部消化管内にくらべ約1,000倍の濃度で存在した。一方、⑦ *Megasphaera elsdenii* ⑧ *Enterococcus faecium* はルーメン内にくらべて下部消化管で2-4倍高いレベルで定着

していた。セルロース分解菌⑩*Ruminococcus albus* はどの部にも定着していなかった。

この実験から、著者は次の結論を導いている。すなわち無菌ヤギに主要なルーメン細菌を経口投与すると、ルーメン内はもちろん、盲腸や直腸など下部消化管にも定着する。ルーメン内VFA濃度や構成比も調べているが、通常の子牛のそれに近似している。したがって、このシバヤギのルーメン内に定着した菌群が、子牛のルーメン内においてもVFA産生に寄与している。

### 実験3. ルーメン液早期経口投与による新生子牛の腸管内への病原性大腸菌の定着阻止試験

新生子牛への成牛ルーメン液の投与は、発育により影響を与えるだけでなく、この時期の病原大腸菌感染による下痢症を防止できるのではないかと考えた。すなわち生後早い時期に消化管正常細菌叢を確立させれば、病原大腸菌の定着を阻止できるのではないかという仮説を立てた。そして生後2-3時間以内の子牛に、-80℃で保存していた成牛ルーメン液を経口投与し、病原性大腸菌の定着と増殖の様子を観察している。

1群	1頭	生後48時間	無処置
2群	1頭	生後24時間	<i>E.coli</i> NAS-10で攻撃
3群	2頭	生後2-3時間	ルーメン液投与
4群	3頭	生後2-3時間	ルーメン液投与+21時間後攻撃

3群の2頭は48時間と96時間に、4群の3頭は24,48および72時間後に解剖し菌検索に供している。

成績：2群の牛は水様下痢便を排泄して死亡した。4群は軽度の軟便になっただけで、24時間後に回復した。十二指腸における*E.coli* NAS-10の菌数は、2群にくらべて4群で著しく低く、観察時間の長い個体においても増加していなかった。2群の子牛のリンパ節、脳、心、肺、肝、腎、脾からは攻撃菌が検出されたが、4群では検出されなかった。3および4群では、ルーメン、十二指腸、直腸に、形態的に多種類の細菌が定着していた。これに対応して下部消化管のVFA濃度も対照群にくらべ著しく高かった。

上の成績から、新生子牛へ、凍結保存していた成牛ルーメン液を投与すると、病原性大腸菌の腸管内定着を抑制することが明らかとなった。

著者のこの研究は、乳牛あるいは肉牛飼育農家の抱える問題を解決するために着眼されたものである。新鮮ルーメン液、加圧滅菌したルーメン液、凍結保存ルーメン液が使われているけれども、実際に応用しやすいのは凍結保存液であろう。この技術はすでに一部飼育農家で利用されており、また2-3の試験研究機関で追試されつつある。したがってこの研究成果は、子牛の飼養、衛生管理におおいに益するものであり、博士(獣医学)の学位を授与するに値すると判定した。