

黒毛和種牛の肥育時期による第一胃液性状と細菌叢構成
および第一胃粘膜上皮の遺伝子発現に関する研究

2020 年

岐阜大学大学院
連合獣医学研究科
(岩手大学)

尾形 透

目次

略語説明	1
緒論	3
第1章 黒毛和種牛の肥育時期による第一胃液性状および細菌叢構成の変化	
1. 序論	8
2. 材料および方法	
(1) 供試牛と飼養管理	9
(2) 実験スケジュールと採材	9
(3) 測定項目および方法	
1) 第一胃液 pH	10
2) 第一胃液揮発性低級脂肪酸 (VFA), アンモニア態窒素 (NH ₃ -N) および乳酸濃度並びに LPS 活性値	10
3) 細菌叢構成	10
4) 血液生化学検査	12
(4) 統計解析	13
3. 結果	
(1) 採食量および第一胃液 pH	14
(2) 第一胃液 VFA, NH ₃ -N および乳酸濃度並びに LPS 活性値	14
(3) 主成分分析	15
(4) 第一胃液の細菌叢構成	

1) 多様性解析	15
2) 類似性解析	15
3) 細菌門および細菌属構成比	15
4) 主要な OTU 構成比	16
(4) 主要な OTUs と第一胃液性状の相関関係	16
(5) 血液生化学検査所見	17
4. 考察	17
5. 小括	21
図表	23

第2章 黒毛和種牛における肥育時期別の第一胃液，第一胃食渣および第二胃液性状と細菌叢構成の比較

1. 序論	36
2. 材料および方法	
(1) 供試牛と飼養管理	37
(2) 第一胃液，第一胃食渣および第二胃液の採材	37
(3) 測定項目および方法	
1) 第一胃液および第二胃液 pH	37
2) 第一胃液および第二胃液 VFA, NH ₃ -N および乳酸濃度並びに LPS 活性値	38
3) 細菌叢構成	38
(4) 統計解析	38
3. 結果	
(1) 第一胃液および第二胃液 pH	39

(2) 第一胃液および第二胃液の VFA, $\text{NH}_3\text{-N}$ および 乳酸濃度並びに LPS 活性値	39
(3) 第一胃液, 第一胃食渣および第二胃液の細菌叢構成	
1) 多様性解析	40
2) 類似性解析	40
3) 細菌門および細菌属構成比	40
4) 主要な OTU 構成比	41
(4) 第一胃液と第二胃液の主要な OTUs と第一胃および 第二胃性状の相関関係	42
4. 考察	43
5. 小括	45
図表	47

第3章 黒毛和種牛の肥育中期と後期における第一胃液性状および細菌叢構成 に及ぼす濃厚飼料増給の影響

1. 序論	54
2. 材料および方法	
(1) 供試牛と飼養管理	55
(2) 実験スケジュールと採材	56
(3) 測定項目および方法	
1) 第一胃液 pH	56
2) 第一胃液 VFA, $\text{NH}_3\text{-N}$ および乳酸濃度並びに LPS 活性値	56
3) 細菌叢構成	56
(4) 統計解析	57

3. 結果	
(1) 第一胃液 pH	58
(2) 第一胃液 VFA, NH ₃ -N および乳酸濃度並びに LPS 活性値	58
(3) 第一胃液の細菌叢構成	
1) 多様性解析	59
2) 類似性解析	59
3) 細菌門および細菌属構成比	59
4) 主要な OTU 構成比	59
4. 考察	60
5. 小括	63
図表	64

第4章 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化

1. 序論	72
2. 材料および方法	
(1) 供試牛と飼養管理	73
(2) 採材	73
(3) 測定項目および方法	
1) マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析	74
2) リアルタイム PCR 法による特定遺伝子発現解析	75
(4) 統計解析	75
3. 結果	
(1) マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現	
1) 主要変動遺伝子	76

2) 輸送関連遺伝子の発現	76
3) 主座標分析	77
4) 発現変動遺伝子の機能とネットワーク解析	77
(2) リアルタイム PCR 法による特定遺伝子発現	78
4. 考察	78
5. 小括	81
図表	83
総括	91
謝辞	96
引用文献	97
補足図表	113

略語説明

ACE : Abundance-based coverage estimator

AST : アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ, Aspartate aminotransferase

ARA : 急性第一胃アシドーシス, Acute ruminal acidosis

AUC : 曲線下面積, Area under the curve

BUN : 尿素窒素, Blood urea nitrogen

Ca : カルシウム, Calcium

DEG : 発現変動遺伝子, Differential expressed genes

DM : 乾物摂取量, Dry matter intake

GGT : γ -グルタミルトランスフェラーゼ, γ -glutamyltransferase

IPA : Ingenuity pathway analyses

KEGG : Kyoto encyclopedia of genes and genomes

LA : 乳酸, Lactic acid

LBP : リポ多糖結合タンパク質, Lipopolysaccharide binding protein

LPS : リポポリサッカライド, Lypopolysaccharide

NDF : 中性デタージェント繊維, Neutral detergent fiber

RDP : Ribosomal Database Project

NH₃-N : アンモニア態窒素, Ammonia nitrogen

NMDS : 非計量多次元尺度構成解析, Non-metric multidimensional scaling

OTU : Operational taxomic unit

PCA : 主成分分析, Principal component analysis

PCoA : 主座標分析, Principal coordinate analysis

PD whole tree : Phylogenetic diversity whole tree

qPCR : quantative polymerase chain reaction

SARA : 亜急性第一胃アシドーシス, Subacute ruminal acidosis

TCHO : 総コレステロール, Total cholesterol

TDN : 可消化養分総量, Total detergent nutrient

TMR : Total mixed ration

TP : 総タンパク, Total protein

VFA : 揮発性低級脂肪酸, Volatile fatty acid

緒論

我が国固有の品種である黒毛和種は、軟らかい肉質、独特の芳香、細やかな筋間脂肪などの特徴を持ち、他の品種と比較して筋間脂肪を蓄積する能力が特に高いことが知られている (103)。我が国では約 250 万頭の肉用牛が飼養され、黒毛和種はその内約 160 万頭を占めている (Table1)。また、近年では世界各地で「Wagyu」として認識され、中国やオーストラリア等では受精卵移植で生産された黒毛和種の肥育が行われている。

黒毛和種肥育牛は飼養形態が独特であり、通常 10 か月齢から 30 か月齢までの肥育期を通して高濃厚飼料、低粗飼料の給与を行うが (35)、特に肥育中期の一時期 (20~22 か月齢) に血中ビタミン A 濃度を 30~50 IU/l という低値に保つことで脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化の抑制を下方制御し、筋肉内の高い脂肪交雑を獲得することを目的としたビタミン A 制限飼料および稲わらの給与が行われる (83, 93)。しかし、黒毛和種肥育牛ではこれらの特殊な飼養方法により様々な代謝性疾患が発生する。我が国の農業共済保障制度に加入している肉用牛は全体の 9 割程度 (2,184,655 頭, 平成 27 年度) であり、加入牛の病傷事故および死亡、廃用の発生頭数を示す農業災害補償制度家畜共済統計表 (平成 27 年度) では肉用牛の第一胃疾患、肝炎、尿石症、第四胃変位、およびビタミン A 欠乏症の発生数および死亡、廃用となった頭数は多く (Table 2)、多額の経済損失を招いている。また、濃厚飼料の多給による第一胃内での VFA の蓄積、および乳酸の過剰な産生により第一胃液 pH が 5.0 を下回ると ARA、pH が 5.6 を下回る時間が一日 3 時間以上となると SARA と診断される (89, 94)。SARA は乳牛の代表的な潜在性の代謝性疾患であり、臨床症状を伴わないが、採食量の低下、第四胃変位、乳房炎、肝膿瘍等の発生と関連している (5, 28, 89)。過去の報告では、乳牛の 40% が SARA を発症し (31)、肥育牛で

は2農場のSARA発症率が32.5～37.7%であった(7)。一方、ARAは主に乳酸の過剰産生による代謝性疾患であり、第一胃液pHが4.5以下になることもあり、ARAの発症により食欲の低下、下痢などの臨床症状を呈し、死に至ることもある。

第一胃内には第一胃液1 mlあたり100億にのぼる細菌、10万のプロトゾアおよび真菌が常在し(14)、多様な細菌により構成される細菌叢は発酵の重要な役割を担っている(72)。また、細菌にはそれぞれの至適pHがあり(19)、第一胃液pHの変動により細菌叢構成が変化し、特に穀物等の過剰給与によるSARA発症牛では著しい変化が認められる(78)。また、細菌叢の解析に近年では変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法や次世代シーケンス法、およびリアルタイムPCR法が用いられている(26, 68, 86)。加えて、第一胃内の細菌は第一胃液性、第一食渣付着性および第一胃粘膜上皮付着性の細菌叢に分類され(60, 74)、相互に作用して第一胃内環境を形成し、恒常性を保っている(16)。また、第一胃内細菌は代謝活性により繊維分解菌、デンプン分解菌、タンパク質分解菌、脂肪分解菌、乳酸産生菌および乳酸利用菌等に分類される(8, 30, 57)。SARA誘発による第一胃内細菌叢の変化は乳牛の報告が多く(15, 110, 121)、肥育牛では肥育末期に繊維分解菌の減少が報告されているが(30)、一方で黒毛和種肥育牛の長期的な濃厚飼料多給に伴う第一胃液pH、性状および第一胃内細菌叢の変化は報告されていない。また、第二胃は第一胃と類似した細菌叢構成および発酵機能を有するが(44, 84)、反芻により混和される唾液の緩衝作用や飲水による希釈作用の影響で第二胃液pHは第一胃液pHと比較し高値を示すことが知られている(20, 25)。しかしながら、黒毛和種肥育牛の長期的な濃厚飼料多給に伴う第一胃液および第二胃液pH、性状および細菌叢の変化を比較した報告は見られない。

第一胃粘膜上皮は第一胃内の恒常性維持に重要な役割を担っている。例として、第一胃粘膜上皮は重炭酸イオンの分泌により第一胃液pHを調節し、平常時は第一胃内プロトン除去の約50%を担うが、濃厚飼料多給に伴う第一胃液pH低下により

重炭酸イオンの分泌が増加し、緩衝作用が促進される (23)。また、第一胃粘膜上皮乳頭は給与飼料組成の影響を強く受け、SARA 誘発試験では第一胃液 pH の低下および第一胃内 VFA 濃度の増加による化学的刺激に反応し、上皮乳頭の表面積が拡大して VFA の吸収効率を促進することが報告されている (104)。一方、濃厚飼料多給による第一胃液 VFA 濃度の増加に伴い第一胃粘膜上皮のバリア機能が破綻し (116)、第一胃液 pH 低下により死滅溶菌したグラム陰性菌由来の LPS が血中に移行することで全身性の炎症を惹起することが知られている (58, 67, 85)。また、飼料組成の変化が第一胃粘膜上皮に及ぼす影響について、従来は組織形態学的検査 (104) が主体だったが、近年では分子生物学的手法であるマイクロアレイ法 (64, 118) やリアルタイム PCR 法 (39, 62, 120) を用いた第一胃粘膜上皮の遺伝子発現の詳細な検索が行われている。子牛や乳牛を用いた SARA 誘発試験では輸送体、成長因子、コレステロール生合成、免疫および細胞接着因子等に関連した遺伝子発現の変化が報告されているが (69, 75, 97, 105)、一方で黒毛和種肥育牛の長期的な濃厚飼料多給に伴う第一胃粘膜上皮の遺伝子発現の変化は報告されていない。

本研究では、濃厚飼料多給が行われる黒毛和種肥育牛の飼料給与の問題点を第一胃性状の観点から解析する目的で、通常管理下の黒毛和種牛を用い、肥育前期 (10 - 14 カ月齢)、中期 (15 - 22 カ月齢) および後期 (23 - 30 カ月齢) の第一胃液および第二胃液 pH、VFA、NH₃-N および乳酸濃度並びに LPS 活性値、加えて細菌叢の変化および第一胃粘膜上皮の遺伝子発現を比較検討した。第 1 章では黒毛和種牛の長期的な濃厚飼料多給に対する第一胃の適応能力およびその作用機序を明らかにする目的で、肥育時期の進行に伴う第一胃液 pH、その他第一胃液性状および細菌叢構成の変化を比較した。次に第 2 章では黒毛和種肥育牛の肥育時期による第一胃液と第二胃液の性状および部位別の細菌叢構成を比較し、黒毛和種肥育牛の濃厚飼料多給に対する適応能力の理解を深めることを目的とした。また、第 3 章では肥育中期および後期の黒毛和種牛の濃厚飼料増給に対する第一胃の適応能力の作用機序

を解明することを目的とした。最後に、第4章では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化を明らかにする目的で第一胃粘膜上皮における網羅的遺伝子解析を行った。これら一連の研究により黒毛和種肥育牛の肥育前期、中期および後期の第一胃液および第二胃液性状並びに第一胃粘膜上皮の遺伝子発現の変化を明らかにすること、及び濃厚飼料多給が行われる黒毛和種肥育牛の飼料給与の問題点を第一胃性状の観点から解析することで黒毛和種肥育牛の健康維持、代謝性疾患の予防、および生産性の向上に寄与するため本試験を実施した。

Table 1. The number of beef cattle in Japan in 2015

Items	Number
Total	2,489,000
Fattening	1,568,000
Japanese Black	740,700
Cross-breed	481,500
Holstein	345,800
Breeding	
Japanese Black	579,600
Calf	
Japanese Black	340,700

Table 2. Factor of death or disuse and develop of disease of beef cattle joined the Japan's Agricultural Insurance Scheme in Japan in 2015

Items	Factor of death or disuse		Develop of disease	
	Proportion (%)	Number	Proportion (%)	Number
Total	100	30,933	100	725,910
Ruminal disease	10.3	3,187	2.90	24,721
Rumen tympany	9.39	2,904	0.52	7,466
Rumen impaction	0.61	189	2.11	15,315
Rumen acidosis	0.30	94	0.27	1,940
Hepatitis	3.27	1,011	3.95	28,639
Urolithiasis	1.05	324	0.64	4,646
Abmasal displacement	0.87	269	0.17	1,260
Vitamin A deficiency	0.18	57	0.84	6,122

第1章 黒毛和種肥育牛の肥育時期による第一胃液性状および細菌叢構成の変化

1. 序論

肥育牛や乳牛は増体や肉質、産乳量等の生産性向上を目的とした濃厚飼料の多給が行われるが、発酵性の炭水化物の多給により第一胃内に VFA、乳酸等の有機酸が過剰に産生されて蓄積し (2, 76)、第一胃内 pH が低下することで SARA や ARA を発症する (76)。乳牛を用いた短期的、中期的な SARA および ARA 誘発実験では、第一胃液細菌叢と第一胃液 pH は互いに影響し、第一胃環境の変化に適応することが報告されている (49, 78, 86)。例として、濃厚飼料多給による第一胃液 pH の低下に伴い、第一胃液内細菌叢の主要な細菌門である Firmicutes の構成比の増加及びグラム陰性菌の死滅に伴う Bacteroidetes の構成比の減少が報告されている (68, 78)。また、近年では無線伝送式 pH センサーが第一胃液 pH の測定に用いられる。無線伝送式 pH センサーは経口的な投与が可能であり、第一胃液の pH と温度を正確に同時計測することが可能である。無線伝送式 pH センサーの計測値と第一胃フィステルから採取した第一胃液 pH は極めて強い正の相関 ($r = 0.968$) があることが報告されており、臨床分野での利用が期待されている (53)。

黒毛和種は他の品種と比べ筋間脂肪を多く蓄積する機能を有する (13)。黒毛和種肥育牛は通常 10 カ月齢から 30 カ月齢まで継続して濃厚飼料が多給され、高い脂肪交雑を獲得する目的で肥育中期にビタミン A 制限飼料を給与し、血中ビタミン A 濃度を低値に保つ飼養形態をとることが特徴的である (82)。しかしながら、黒毛和種牛における長期的な濃厚飼料多給による肥育期間中の第一胃性状の経時的変

化，第一胃の適応能力およびその作用機序は不明瞭である。そのため，本章では黒毛和種牛の長期的な濃厚飼料多給に対する第一胃の適応能力およびその作用機序を明らかにする目的で，通常管理下の黒毛和種肥育牛を用いて肥育前期，中期および後期の第一胃液性状および細菌叢構成の変化を比較した。

2. 材料および方法

(1) 供試牛と飼養管理

全ての実験手順は岩手大学動物実験委員会による承認を受け (A201720)，実験は全て兵庫県立農林水産技術総合センターの動物実験指針に則り行われた。

本試験では黒毛和種去勢牛 9 頭を用いた。実験牛は 12 カ月齢時に第一胃フィステル (BAR DIAMOND 社, Idaho, USA) を装着し，兵庫県立農林水産技術総合センター・畜産技術センター (加西市) で 20 カ月間 (10 カ月齢 - 30 カ月齢) の肥育試験を行い，肥育期は日本の一般的な分類に従い肥育前期，中期および後期とした。濃厚飼料および粗飼料 (稲わら) は肥育前期では一日増体量を 0.8 kg/day とし給与量を算出し，肥育中期，後期では飽食給与とした (Table 1-1)。肥育前期の残渣飼料割合は濃厚飼料および粗飼料でそれぞれ 12.6% および 12.2% であった。各肥育期の粗飼料 - 濃厚飼料比は 26:74 (前期)，13:87 (中期) および 14:86 (後期) であり，日本飼養標準 (79) に基づく栄養充足率，濃厚飼料の成分構成および体重の平均値は Table 1-1 に示した。なお，粗飼料の給餌は 09:30 および 15:30 に行い，濃厚飼料は粗飼料給与 1 時間後に給与し，水は自由飲水とした。

(2) 実験スケジュールと採材

第一胃液 pH の測定は各肥育期の最終 14 日間に行い，測定日の 4 日目から 10 日目の 7 日間を試験期間とした。第一胃液は測定日の 7 日目に第一胃フィステルを介し，チューブを接続したシリンジを用いて腹囊より 100 ml 採材し，二重の滅菌ガ

ーゼを用いて濾過した後-80℃で保存した。

(3) 測定項目および方法

1) 第一胃液 pH

第一胃液 pH は Kimura et al. (53) の方法に基づき、第一胃フィステルを介して第一胃腹囊に留置した無線伝送式 pH センサー (YCOW-s, 山形東亜 DKK (株), 新庄市) を用いた。10 分間隔で連続測定を行った。

2) VFA, $\text{NH}_3\text{-N}$ および乳酸濃度並びに LPS 活性値

第一胃液の処理および測定方法は Hirabayashi et al. (41) の方法に従った。すなわち VFA 測定用サンプルとして、25%メタリン酸加 3 N 硫酸 1 ml を第一胃液 5 ml に添加し、転倒混和後 24 時間室温にて静置した。静置後 3,000 g, 15 分間遠心を行い、上清を-80℃で保存した。総 VFA 濃度、各 VFA(乳酸、プロピオン酸、酪酸) 濃度測定はパックドカラム (Thermon-3000; 3%, Shimadzu, 京都) を用いたガスクロマトグラフィー (GC-2014; Shimadzu, 京都) により行った。また、乳酸測定用サンプルとして第一胃液 5 ml を 2,000 g, 4℃, 15 分間遠心し、上清を-80℃で保存した。乳酸濃度の測定には市販の乳酸分析用試薬キット (F キット, D-/L-乳酸, R-Biopharm, Bergstraße, Germany) を用いた。LPS 測定用サンプルとして第一胃液 5ml をエンドトキシンプリーのチューブ (BioPure, Eppendorf, Hamburg, Germany) に分注し、11,000 g, 4℃, 30 分間遠心した後上清をエンドトキシンプリーのチューブに分注し、-80℃で保存した。LPS 活性値の測定には市販のキット (Pyrochrome with Glucashield Buffer, 東京) を用いた。

3) 細菌叢構成

DNA 抽出は Kim et al. (50) の手法に行った。すなわち、解凍した 250 μl の第一胃液サンプルに 100 μl のリゾチーム (750 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) を加え 37℃で 90 分間インキュベートした。その後アクロモペプチダーゼ

(和光純薬工業, 大阪) を 10 μ l (10,000 U/ml) 加えた後 37°C で 30 分間インキュベートした。その後懸濁液に 60 μ l の 1% ドデシル硫酸ナトリウムおよびプロテinkinase K (1 mg/ml, Merck Japan Ltd., 東京) を加え, 55°C, 5 分間インキュベートした。溶菌液はフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (25:54:1) (和光純薬工業, 大阪) およびクロロホルム (和光純薬工業, 大阪) を用い 3 度洗浄を行った。抽出液に 5 M 塩化ナトリウム溶液と 100% エタノールを加え, 21,900 g, 4°C, 15 分間遠心した後, 上清を除去した。次に沈殿物を 70% エタノールにより洗浄し, 乾燥させた後トリス塩酸バッファーにて再溶解した。精製した DNA 溶液はライフサイエンス分光光度計 (Biospec-nano 260-26300-31, Shimadzu, 京都) で濃度及び純度を測定し, 純度については吸光度比 (260 nm/280 nm) が 1.8~2.1 になることを確認した。

次世代シーケンス法は 16S Metagenomic Sequencing Library preparation guide (Illumina, 2013, USA) に従い実施した。すなわち, 抽出した DNA 溶液は 16S rRNA の V3-V4 領域を増幅するため, ユニバーサルプライマーである 341F (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') 及び 805R (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') を用いた。PCR に用いる反応組成液は 12.5 μ l の 2 \times KAPA HiFi HotStart ReadyMix (KapaBiosystems Ltd., UK), 5 μ l の各プライマー (1 μ M) および 2.5 μ l の標準 DNA (10 ng/ μ L) を混和し 25 μ l として調整し, PCR チューブに DNA 希釈液を含めて 40 μ l となるよう分注した。PCR プロトコルはサイクル 1 (95°C 3 分間) を 1 回, サイクル 2 (95°C 30 秒間, 55°C 30 秒間および 72°C 30 秒間) を 25 回, サイクル 3 (72°C 5 分間) を 1 回とした。増幅産物は AMPure XP beads (Beckman Coulter, High Wycombe, UK) を用い精製し, ライブラリーは Nextera XT Sample Preparation Kit (Illumina, San Diego, Ca, USA) を用いて構築した。Paired-end (2 \times 150 bp) は Illumina MiSeq platform を用い定法により解析した。解析結果は Sequence Read Archive of the National Center for Biotechnology Information へ登録し, SRA accession number は PRJNA548210 であ

った (<http://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/sra/>)。

すべてのリードは MOTHUR program (version 1.41.1; University of Michigan; <http://www.mothur.org/wiki/Schloss>) により解析を行い，解析方法は MiSeq (https://mothour.org/wiki/MiSeq_SOP) の標準操作手順に修正を加えた方法を用いた。得られたリードは SILVA リファレンスデータベース (SSURef release 128; (90)) を用いて非反復配列を識別し，マッピングした。得られた配列に対し “Chimera.vsearch” コマンドを用いキメラ配列を排除し，Mothur RDP training set (version 16) を用いて属レベルまでの系統解析を行った。更に，OTUs を 97% 相同性をカットオフ値として配列をクラスタリングすることで決定した。すべてのサンプルは “sub. sample” コマンドを用いて標準化した。その際，極端にリード数の少なかったサンプルを肥育中期および後期より 1 つずつ排除し，以降の解析には用いなかった。得られた OTU に対し，“summary. single” コマンドを用いて細菌種の豊富さの指数である Chao1，ACE，および細菌種の多様性の指数である Shannon，Simpson，Heip について解析を行った。各 OTU の代表配列は “get.oturep” コマンドを用いて決定し，BLASTn プログラム (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) の 16SrRNA シークエンスデータベース (Bacteria and Archaea; May 2019) により属種名を分類した。さらに，ウェブサイト上にある piphillin (<http://piphillin.secondgenome.com/>; 47) を使用してデータを変換した。機能分類分析について，97% をカットオフ値とし，メタゲノム機能は KEGG database (October 2018) を用い割り当てた。

4) 血液生化学検査

血液は第一胃液採取と同時にヘパリンナトリウム加採血管 (テルモ株式会社，東京) と血清分離剤入り採血管 (日本ベクトンデッキンソン社，東京) を用いて頸静脈から採血した。採血後，ヘパリンナトリウム加採血管は 1,500 g, 20 分間遠心し，得られた血漿を -80°C で保存した。血清分離剤入り採血管は 37°C で 15 分間保温後，1,500 g, 15 分間遠心して得られた血清を -80°C で保存した。血清は TP, BUN, TCHO,

Ca, AST, GGT, Vitamin A, β -carotene および Vitamin E の測定に用い、ヘパリンナトリウム加血漿は、LBP の測定に供した。LBP の測定には、市販のキット (LBP for a wide variety of species ELISA KIT, Hycult biotech, Uden, Netherlands) を用いた。

(4) 統計解析

各データは Shapiro-Wilk normality test により正規分布を確認した。第一胃液 pH, 一日中で pH が 5.6 および 5.8 以下となった時間 (pH < 5.6 時間, pH < 5.8 時間; min/d), AUC (pH < 5.6, pH < 5.8), VFAs および乳酸濃度, LPS 活性値並びに血液生化学検査所見の肥育期間の比較は、正規分布の場合は paired *t*-test を用い、非正規分布のデータはウィルコクソンの順位符号検定を用いて解析した。細菌門, 細菌属, OTUs, 細菌種の豊富さおよび多様性の肥育期間の比較は正規分布の場合は paired *t*-test を用い、非正規分布のデータには Mann-Whitney U test を用いて解析した。24 時間平均 pH, pH < 5.6 時間, pH < 5.8 時間, AUC (pH < 5.6, pH < 5.8) を含む PCA 解析 は R package ggbiplot (R software version 3.3.2; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いた。細菌叢解析により得られた OTUs や KEGG パスウェイカテゴリーおよび末梢血の生化学検査所見の NMDS 解析には R package ggplot を用いた。OTUs と第一胃性状 (24 時間平均, 最低および最高 pH, 総 VFA および乳酸濃度, 各 VFA の構成比並びに LPS 活性値) および末梢血 LBP 濃度の間で Pearson's correlation coefficients を行い、結果に基づいたヒートマップを Prism software (version 8.10; GraphPad Software Inc., La Jolla, Ca, USA) を用いて作成した。全てのデータは各肥育期の平均値と標準誤差 (SEM) で表し、Prism を用いて解析を行った。いずれも $P < 0.05$ を有意差ありとし、 $P < 0.10$ を有意な傾向ありとした。

3. 結果

(1) 採食量および第一胃液 pH

実験期間中に食欲不振，発熱などの臨床症状は全ての牛で認められなかった。体重は肥育前期と中期および中期と後期でそれぞれ有意 ($P < 0.05$) な増加が認められた (Table 1-1)。濃厚飼料の採食量は肥育中期で前期，後期と比べ有意 ($P < 0.05$) な高値を示し，稲わらの採食量は前期で中期，後期と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した (Table 1-1)。栄養充足率では，肥育後期の DM，TDN は前期および中期と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示し，NDF は中期で前期，後期と比べ有意 ($P < 0.05$) な高値を示した (Table 1-1)。

第一胃液 pH では，24 時間の pH データから最低 pH，平均 pH，最高 pH および pH < 5.6 時間，pH < 5.8 時間および AUC (pH < 5.6，pH < 5.8) を算出した (Table 1-2)。肥育後期の最低 pH および平均 pH は前期と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示した。24 時間平均 pH の低値に伴い，肥育前期と比較して後期の pH < 5.6 時間および AUC (pH < 5.6) は有意 ($P < 0.05$) な高値を示した (Table 1-2)。Figure 1-1 は 10 分ごとの平均第一胃液 pH を示し，肥育ステージの進行に従う平均第一胃液 pH の低下が認められた。

(2) 第一胃液 VFA，NH₃-N および乳酸濃度並びに LPS 活性値

肥育後期の総 VFA 濃度は前期および中期と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示し，前期の酢酸-プロピオン酸比は中期と比べ有意 ($P < 0.05$) な高値を示した (Table 1-3)。また，肥育後期の乳酸濃度は前期および中期と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示し，中期の乳酸濃度は前期と比べ有意 ($P < 0.05$) な低値を示した。肥育前期の LPS 活性値は中期および後期と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示した (Table 1-3)。

(3) 主成分分析

肥育前期では 24 時間平均 pH および最低 pH が第一胃液 pH に影響を与える主要な因子であり、 $\text{pH} < 5.6$ 時間、 $\text{pH} < 5.8$ 時間および AUC ($\text{pH} < 5.6$, $\text{pH} < 5.8$) は後期の第一胃 pH に最も影響を与える因子であった (Figure 1-2-A)。また、肥育前期では VFA 中の酢酸および酪酸の構成比が第一胃内発酵に影響を与える主要な因子であり、乳酸濃度および LPS 活性値は後期の第一胃内発酵に最も影響を与える因子であった (Figure 1-2-B)。

(4) 第一胃液の細菌叢構成

1) 多様性解析

OTUs および細菌種の数に基づき細菌種の豊富さを示す指数 (Chao1 および ACE) は肥育ステージの進行に従い有意 ($P < 0.05$) に減少したが、細菌種の個体数の均一性に基づき多様性を示す指数 (Shannon, Simpson および Heip) は肥育前期、中期、および後期の間に有意差は認められなかった (Figure 1-3)。

2) 類似性解析

NMDS 解析では肥育中期および後期と比較し前期の OTUs の集約が認められ、一方で中期の OTUs が最も分散していた (Figure 1-4-A)。また、KEGG パスウェイカテゴリーは前期および後期と比べ中期で最も分散していた (Figure 1-4-B)。

3) 細菌門および細菌属構成比

各肥育期の第一胃液の細菌門構成は全ての肥育期で Firmicutes 門および Bacteroidetes 門の構成比が高く、全体の約 80% であった (Figure 1-5)。Firmicutes 門および Bacteroidetes 門に属する主要な細菌属の構成比は Figure 1-5 に示した。図表中の「unclassified」の細菌は示した分類階級より下位の分類が未分類であることを示している。Firmicutes 門に属する unclassified Ruminococcaeae および unclassified Firmicutes は肥育前期と比較し中期で有意 ($P < 0.05$) な低値を示し、unclassified

Clostridiales は前期と比べ後期で有意 ($P < 0.05$) な低値を示した (Figure 1-5)。

4) 主要な OTUs 構成比

OTU1 (unclassified Ruminococcaceae) および OTU2 (unclassified Lachnospiraceae) は各肥育期の第一胃液細菌叢の OTUs で最も構成比率が高かった。肥育前期の OTU5 (unclassified Firmicutes), OTU8 (unclassified Ruminococcaceae), OTU26 (*Butyrivibrio*), OTU30 (unclassified Firmicutes), OTU37 (unclassified Clostridiales Incertae Sedis 13), OTU110 (unclassified Clostridiales), OTU189 (unclassified Firmicutes) および OTU238 (unclassified Lachnospiraceae) は中期と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示し, OTU43 (unclassified Lachnospiraceae), OTU55 (unclassified Firmicutes) および OTU62 (*Ruminococcus*) は中期と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示した (Table 1-4)。また, 肥育後期の OTU26, OTU30, OTU37, OTU43 および OTU199 (unclassified Lachnospiraceae) は前期と比べ有意 ($P < 0.05$) な低値, OTU55 および OTU167 (*Intrestinimonas*) は前期と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した (Table 1-4)。肥育中期の OTU30, OTU167 および OTU238 は後期と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示し, 一方で OTU62, OTU199 は後期と比べ有意 ($P < 0.05$) な高値を示した (Table 1-4)。

(4) 主要な OTUs と第一胃液性状の相関関係

第一胃性状と有意な相関関係を示した OTUs のうち, OTU1 (unclassified Ruminococcaceae), OTU8 (unclassified Ruminococcaceae) および OTU26 (*Butyrivibrio*) が 24 時間平均 pH ($r = 0.416, 0.427$ および 0.476) および 24 時間最低 pH ($r = 0.458, 0.454$ および 0.435) と有意 ($P < 0.05$) な正の相関関係を示し, pH < 5.6 時間 ($r = -0.476, -0.472$ および -0.432) および pH < 5.8 時間 ($r = -0.509, -0.476$ および -0.473) と有意 ($P < 0.05$) な負の相関関係を示した (Figure 1-6)。一方, OTU68 (unclassified Lachnospiraceae) の構成比は 24 時間平均 pH ($r = -0.530$), 最低 pH ($r = -0.531$) およ

び最高 pH ($r = -0.499$) と有意 ($P < 0.05$) な負の相関関係を示し、pH < 5.6 時間 ($r = 0.453$) および pH < 5.8 時間 ($r = 0.417$) と有意 ($P < 0.05$) な正の相関関係を示した。総 VFA 濃度は OTU167 ($r = -0.412$) と有意 ($P < 0.05$) な負の相関関係を示し、乳酸濃度は OTU34 (unclassified Firmicutes; $r = 0.521$), OTU68 ($r = 0.503$), OTU167 ($r = 0.556$) および OTU238 ($r = 0.587$) と有意 ($P < 0.05$) な正の相関関係を示し、一方 OTU6 (*Prevotella*; $r = -0.449$) および OTU62 ($r = -0.453$) と有意 ($P < 0.05$) な負の相関関係を示した。また、LPS 活性値は OTU125 (unclassified Ruminococcaceae; $r = 0.519$) と有意 ($P < 0.05$) な正の相関関係を示し、OTU5 ($r = -0.413$), OTU8 ($r = -0.440$), OTU13 (*Mogibacterium*; $r = -0.414$) および OTU37 ($r = -0.470$) と有意 ($P < 0.05$) な負の相関関係を示した (Figure 1-6)。

(5) 血液生化学検査所見

肥育後期の血清 AST 濃度およびビタミン A 濃度は前期および中期と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示し、 β カロテンおよびビタミン E 濃度は有意 ($P < 0.05$) な低値を示した (Table 1-5)。血液生化学的代謝に関する PCA では、肥育前期および中期では TCHO, ビタミン E, β カロテン, BUN, GGT, および Ca 濃度が末梢血代謝に最も影響的を与え、後期ではビタミン A および AST 濃度が末梢血代謝に最も影響を与える因子であった (Figure 1-7)。

4. 考察

本試験では、第一胃液の 24 時間平均 pH は肥育ステージの進行に伴い低下し、第一胃液 pH < 5.6 時間は肥育中期および後期でそれぞれ 4 時間強, 11 時間強と、一般的な SARA の診断基準である一日当たりの第一胃液 pH < 5.6 時間が 3~5 時間 (4), または 3 時間以上 (36) を満たしていることから、SARA と診断され、特に後期では重度の SARA であることが示唆された。SARA は採食量の低下, 下痢, 肝臓

瘍、蹄葉炎などの疾病の原因となるが (89), 本試験では全ての肥育期で発熱などの症状や疾病の発生はなく, 肥育ステージの進行に伴い体重は有意 ($P < 0.05$) に増加した。以前の試験では濃厚飼料割合の増加に従い, 飼料給与後に低下した第一胃液 pH の正常値への回復が遅くなることが報告されているが (24, 50), 本試験の肥育中期および後期の飼料中の濃厚飼料割合は同程度 (87% および 86%) であったにもかかわらず, 後期の第一胃液 pH は中期と比較し低値を示した。また, 本試験の 24 時間平均 pH は肥育時期の進行に伴い徐々に低下し, 肥育前期および中期の 24 時間平均第一胃液 pH の低値 (6.22 および 6.06) はホルスタインを用いた 1 週間および 6 週間の SARA 誘発試験での 24 時間平均第一胃液 pH の低値 (6.10 および 5.97) と類似していたが (77, 49), 一方で後期の 24 時間平均 pH (5.73) は以前の試験を大きく下回る結果であった。また, VFA は第一胃における最も主要な有機酸であり (77), 第一胃液 pH と負の相関があることが報告されている (53)。しかしながら, 本試験では総 VFA 濃度と第一胃液 pH の間に相関関係は認められず ($r = 0.258$, $P > 0.05$), 肥育ステージの進行に伴い徐々に減少していた。それに加え, 肥育後期では VFA (pKa 4.9) と比較し 10 倍程度の強酸である乳酸 (pKa 3.9; 76) の濃度が有意 ($P < 0.05$) な高値を示し, また, PCA により後期の乳酸濃度および LPS 活性値が第一胃性状に最も影響を与える要因であった。これは肥育後期では第一胃液の発酵機能が VFA 産生から乳酸産生への一部移行があること, または第一胃粘膜上皮での sodium hydrogen exchanger isoform 3 (NHE3; 97) や monocarboxylate transporter isoform 4 (SLC16A3 ; 51) 等の輸送機能の促進に伴う VFA 吸収の増加によるものと考えられた。これらのことから, 肥育後期における第一胃液 pH の低下は乳酸濃度の増加が一因となっていることが示唆された。しかしながら, 肥育後期では第一胃液 pH が著しい低値を示し, LPS 活性値が有意 ($P < 0.05$) に増加したが, 末梢血中の LBP 濃度は各肥育期の間に有意差は認められず, 第一胃粘膜上皮のバリア機能の破綻 (1, 39) が生じていないことが示唆された。

一般的に第一胃液 pH と細菌種の豊富さおよび多様性との間には正の相関関係があり、第一胃液 pH の低下による細菌種の豊富さおよび多様性の減少が知られている (49, 68, 77)。本試験では、第一胃液 pH の低下に伴い肥育後期の OTUs および細菌種の豊富さを示す指数 (Chao1 および ACE) が有意 ($P < 0.05$) に減少したが、細菌種の多様性を示す指数 (Shannon, Simpson および Heip) に有意差は認められなかった。肥育前期の細菌種の豊富さおよび多様性の平均値はホルスタインを用いた短期間の SARA 誘発試験のサンプルサイズと類似していた (4,623 サンプル; (77))。これは肥育前期の第一胃液 pH の低値に伴い、細菌種の豊富さおよび多様性は短期間の SARA 誘発試験モデルと同等に減少し、その後の長期的な濃厚飼料多給による第一胃液 pH の低下に伴い細菌種の豊富さは更に減少するが、一方で多様性は変化しないことを示している。これらのことから、黒毛和種肥育牛は高濃厚飼料の給与に伴う第一胃液 pH の低下に対して細菌種の多様性を保つことで第一胃液細菌叢の恒常性を維持しているものと考えられた。

本試験の NMDS プロットは OTUs および KEGG パスウェイカテゴリーに基づいた第一胃液細菌叢の分類的および遺伝子的な特徴を示している。以前のホルスタインを用いた試験では、短期的な濃厚飼料多給に伴う第一胃液 pH の低下および VFA 濃度の増加に伴う PCA プロットの分散が報告されている (80, 109, 119)。本試験では肥育中期の OTU および KEGG に基づく NMDS プロットが他の肥育期と比較し分散しており、黒毛和種肥育牛の第一胃液細菌叢は中期では長期的な濃厚飼料多給への適応過程であることが示唆された。

第一胃液の細菌門は Firmicutes 門および Bacteroidetes 門の構成比が最も大きく、全体の約 80%であった。Firmicutes 門はグラム陽性菌を主体とした 200 以上の細菌属を含み (30), Bacteroidetes 門は第一胃液細菌叢を構成するグラム陰性菌では最も割合の大きい細菌門とされている (76)。本試験では肥育中期の第一胃液細菌叢の Firmicutes 門は前期と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示した。これは濃厚飼料多給

に伴う第一胃液 pH の低下によりセルロース分解菌を含む unclassified Ruminococcaceae および unclassified Clostridiales の有意 ($P < 0.05$) な減少が一因と考えられ、この結果は第一胃液 pH の低下 ($\text{pH} < 6.0$) に伴いセルロース分解菌が減少するという以前の報告と一致する (102)。

本試験では 35 の OTUs が全ての肥育ステージの全てのサンプルで認められた。OTU の分類は RDP training set を用い、更なる分類は GenBank database を用いて行った。本試験の第一胃液細菌叢の細菌属では unclassified Ruminococcaceae の構成比が最も大きく、次いで unclassified Lachnospiraceae および *Prevotella* の構成比が大きかったが、以前のホルスタインを用いた試験の第一胃液細菌叢では *Prevotella* が最も構成比が大きい細菌属だった (33, 50, 68, 77)。この相違は、品種による違い、および乳牛は長期的な生産性および健康の維持を目的として給与量を調節した濃厚飼料多給を行うが (92)、肥育牛では肉質の向上や体重の増加を目的として可能な限りの濃厚飼料多給を行うという飼養方法の違いによるものと考えられた。また、OTU8 (unclassified Ruminococcaceae) と OTU26 (*Butyrivibrio*) は肥育前期で中期および後期と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示し、これらの OTUs は Pearson's correlation analysis により第一胃液 24 時間平均 pH と正の相関関係が認められた。unclassified Ruminococcaceae および unclassified Lachnospiraceae は消化管の状態を正常に保つ機能があり (11)、*Ruminococcus* はデンプン分解との関連が報告されている (77)。また、*Butyrivibrio* は多岐にわたる基質を分解する能力があり、第一胃内発酵の重要な役割を担っている (43)。加えて、OTU167 (*Intestinimonas*; *Merdimonas faecis* strain BR31) および OTU238 (unclassified Lachnospiraceae; *Intestinimonas butyriciproducens* strain SRB-521-5-I) は乳酸濃度との間に有意 ($P < 0.05$) な正の相関関係が認められた。また、*Merdimonas faecis* strain BR31 は第一胃の乳酸産生との関連性が示唆されており (100)、産生された乳酸は *Intestinimonas butyriciproducens* strain SRB-521-5-I にエネルギーおよび炭素源として用いられている (55) 可能性

が示唆された。

血液生化学検査では肥育後期に肝細胞障害 (87) や肝臓への脂質の蓄積を示す指標である血中AST濃度が前期および中期と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示し、PCA では後期の血中AST濃度が血中代謝産物に対して強い影響を与えることが示された。また、肥育後期では前期および中期と比べ抗酸化物質である (45, 46) β カロテンおよび Vitamin E が有意 ($P < 0.05$) な低値を示した。肝障害と第一胃液 LPS は密接に関係しており (37)、肥育後期の第一胃液 LPS は前期および中期と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示したが、血中 LPS の増加に伴い高値を示す LBP (37) は有意差が認められなかった。また、内因性 LPS の増加により酸化ストレスが惹起されることが報告されている (70)。これらのことから、肥育後期では第一胃液 LPS は増加するが、第一胃粘膜上皮のバリア機能により血中への LPS 放出が妨げられ、また、一部血中へ放出された LPS により惹起された酸化ストレスに対しビタミン E、 β カロテン等の抗酸化作用が働いた結果、臨床症状を伴わない程度の肝機能障害が発生したものと考えられた。

5. 小括

本試験では黒毛和種肥育牛の濃厚飼料多給に対する第一胃の適応能力およびその作用機序を明らかにする目的で、通常管理下の黒毛和種去勢牛9頭を用いて肥育前期、中期および後期の第一胃液性状および細菌叢構成の変化を比較した。その結果、すべての肥育期で発熱や食欲不振などの臨床症状は認められず、第一胃液 pH は肥育ステージの進行に従い低下し、肥育中期では中程度、および後期では重度の SARA を発症していた。また、肥育後期では第一胃内乳酸濃度の増加が第一胃液 pH 低下の一因であることが示唆され、黒毛和種肥育牛の特徴であると考えられた。加えて、肥育中期と後期では前期と比べ LPS 活性値が有意 ($P < 0.05$) に増加し、第一胃液細菌叢構成は前期と比べ中期でセルロース分解菌構成比の低下による

Firmicutes 門構成比の減少が見られ、これは肥育時期の進行に伴う濃厚飼料の増給と第一胃液 pH の低下に伴う変化と考えられた。しかしながら細菌種の多様性に第一胃液 pH の低下に伴う変化は見られず、これは黒毛和種牛の長期的な濃厚飼料多給に対する第一胃の適応能力であると考えられた。これらのことから、黒毛和種牛の肥育中期や後期には、第一胃液 pH の低下、LPS の産生増加、セルロース分解菌構成比の減少等の濃厚飼料多給に伴う第一胃内環境の変化が明らかとなり、一方で第一胃液細菌叢は細菌種の多様性を保つことで環境の変化に適応していることが示唆された。

Table 1-1. Body weight, dietary composition, components of concentrate diet, and chemical analysis of diet in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages

Items	Fattening stage ¹			SEM
	Early	Middle	Late	
Body weight (kg)	439.1 ^a	561.8 ^b	712.4 ^c	12.6
Daily intake amount (kg)				
Concentrate	6.0 ^a	7.6 ^b	6.1 ^a	0.32
Rice straw	2.1 ^a	1.1 ^b	1.0 ^b	0.13
Components of concentrate diet (%)				
Corn	42	42	44	
Barley	0	14	25	
Bran	27	21	18	
Corn gluten feed	10	5	0	
Soybean cake	6	8	5	
Soybean hull	7	8	6	
Saline	1	1	1	
Clay	2	1	1	
Soypass [®]	5	0	0	
Sufficient rate (%)				
DM	88.7 ^a	96.1 ^a	75.4 ^b	3.48
TDN	91.2 ^a	102.4 ^a	74.2 ^b	3.85
NDF	43.9 ^a	36.8 ^b	31.5 ^c	0.54

^{a,b,c}Mean within a row, different superscripts significantly differ ($P < 0.05$)

¹The age of cattle in the Early, Middle, and Late stages were 14, 21, and 29 months, respectively.

Table1-2. The 24 h mean rumen pH, duration of time, and area under curve (for pH <5.6 and 5.8) in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages

Item	Fattening stage			SEM
	Early	Middle	Late	
24-h mean rumen pH				
Minimum	5.43 ^a	5.30 ^{ab}	4.98 ^b	0.10
Mean	6.22 ^a	6.06 ^{ab}	5.73 ^b	0.03
Maximum	6.79	6.76	6.69	0.09
Duration of rumen pH (min/d)				
pH <5.6	139 ^a	287 ^a	688 ^b	105
pH <5.8	226 ^a	460 ^{ab}	802 ^b	110
Area under curve (pH × min/d)				
pH <5.6	4.29 ^a	7.68 ^{ab}	13.7 ^b	5.17
pH <5.8	5.24 ^a	12.7 ^{ab}	24.0 ^b	1.51

^{a,b}Mean within a row, different superscripts significantly differ ($P < 0.05$)

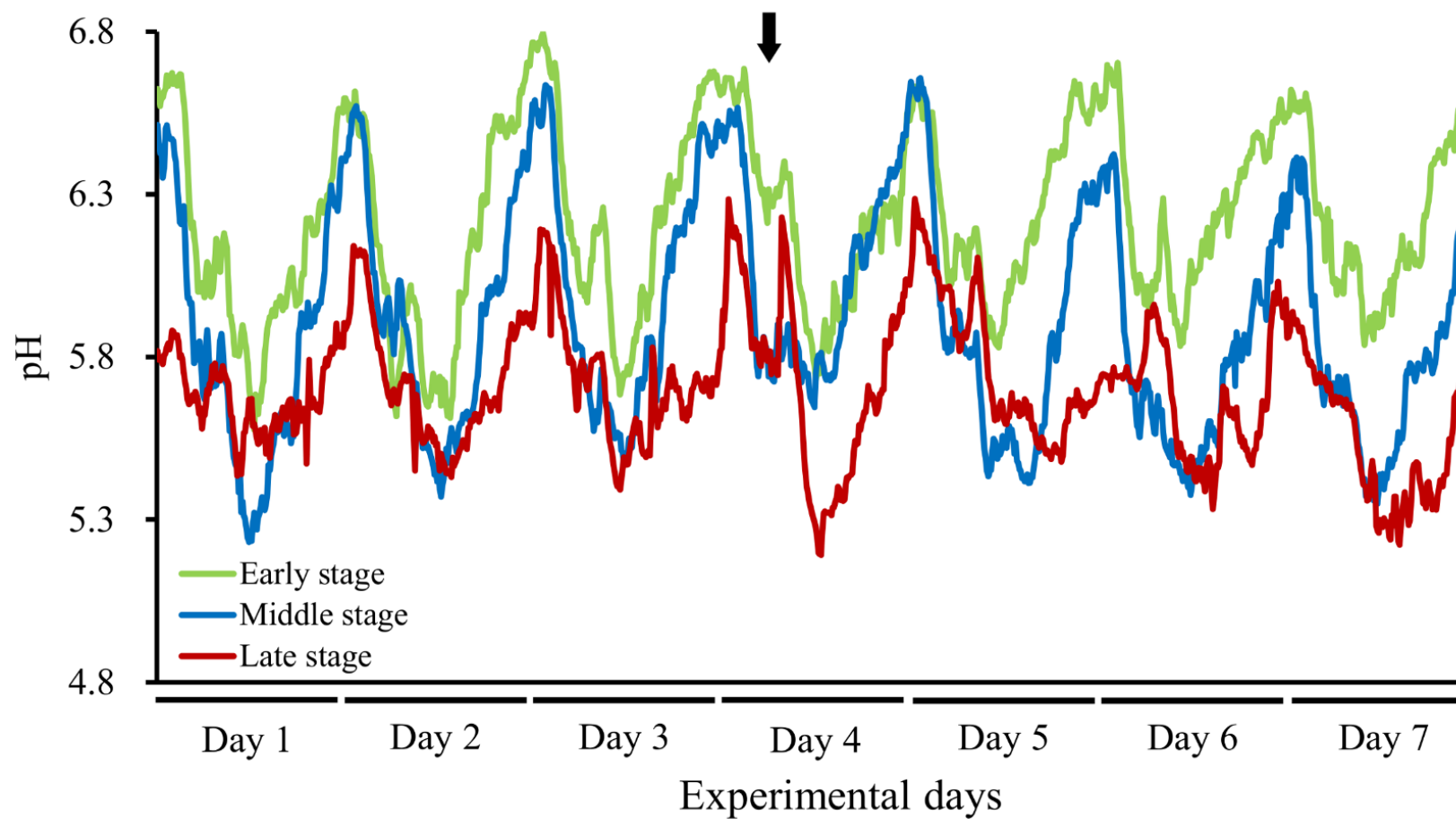


Figure 1-1. Changes in the 10-min mean rumen pH in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages. Days 1 to 7 denote observation during the latter 7 days of each fattening stage. Arrow indicates timing of sample collection (1300 h).

Table 1-3. Total volatile fatty acid (VFA), individual VFA proportions, acetic acid to propionic acid (A/P) ratio, lactic acid concentrations, and lipopolysaccharide (LPS) activity in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages.

Item	Fattening stage			SEM
	Early	Middle	Late	
Total VFA (mmol/dl)	13.1 ^a	12.3 ^a	9.77 ^b	0.72
Acetic acid (%)	62.5	57.1	58.6	1.69
Propionic acid (%)	21.4	27.1	27.1	2.08
Butyric acid (%)	11.9	12.8	11.2	0.92
Other (%)	4.20	3.04	3.08	0.53
A/P ratio	3.06 ^a	2.24 ^b	2.34 ^{ab}	0.24
Lactic acid (mg/dl)	6.80 ^a	2.50 ^b	14.1 ^c	0.89
LPS ($\times 10^4$ EU/ml)	1.34 ^a	4.29 ^b	6.62 ^b	1.49

^{a,b,c}Mean within a row, different superscripts significantly differ ($P < 0.05$)

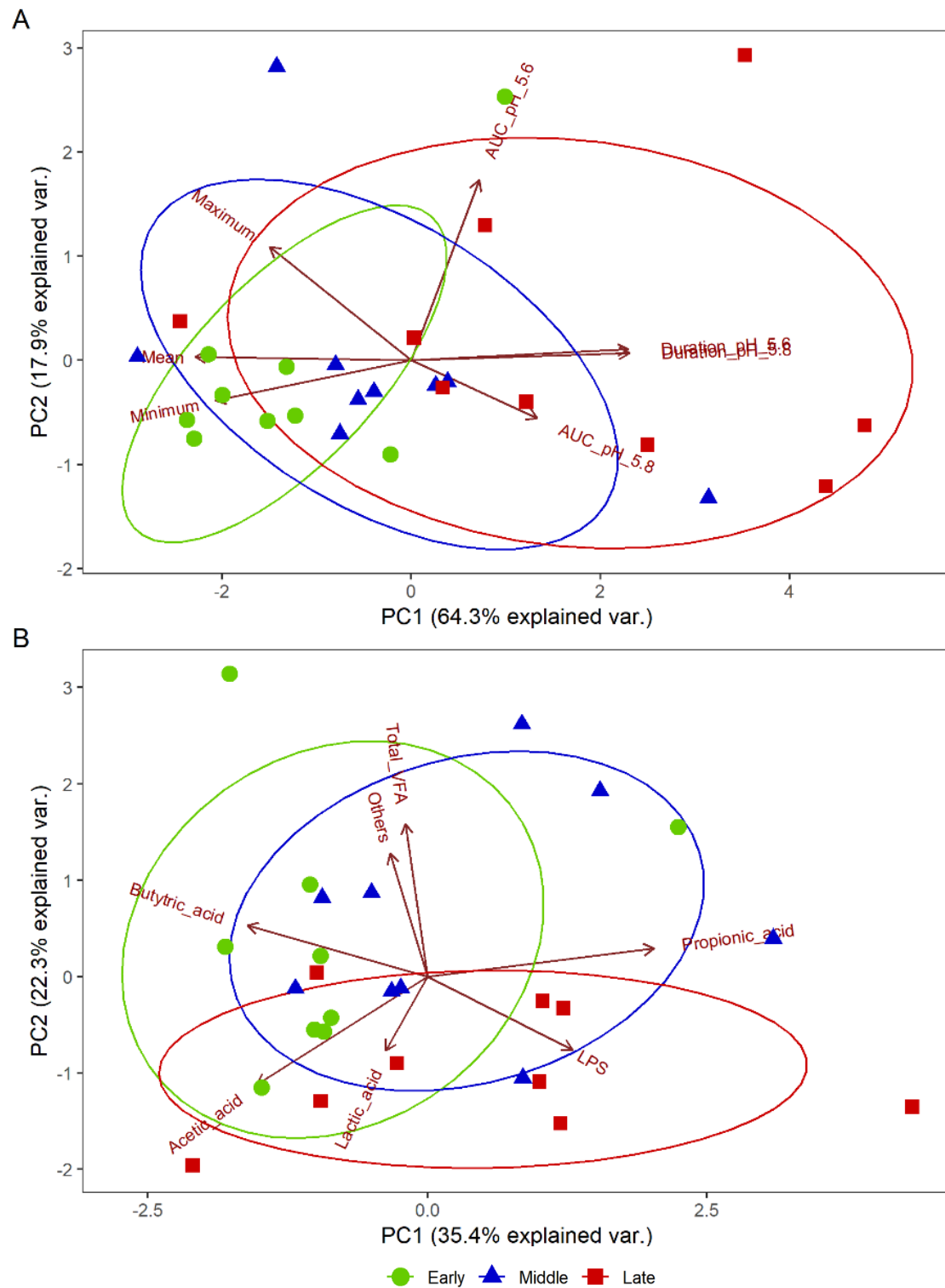


Figure 1-2. Principal component analysis (PCA) plots in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages. PCA plots were generated from the ruminal pH, duration of time and area under curve (for pH <5.6 and 5.8) (A), rumen fermentation parameters (B) PC1 and PC2 represent principal components 1 and 2, respectively.

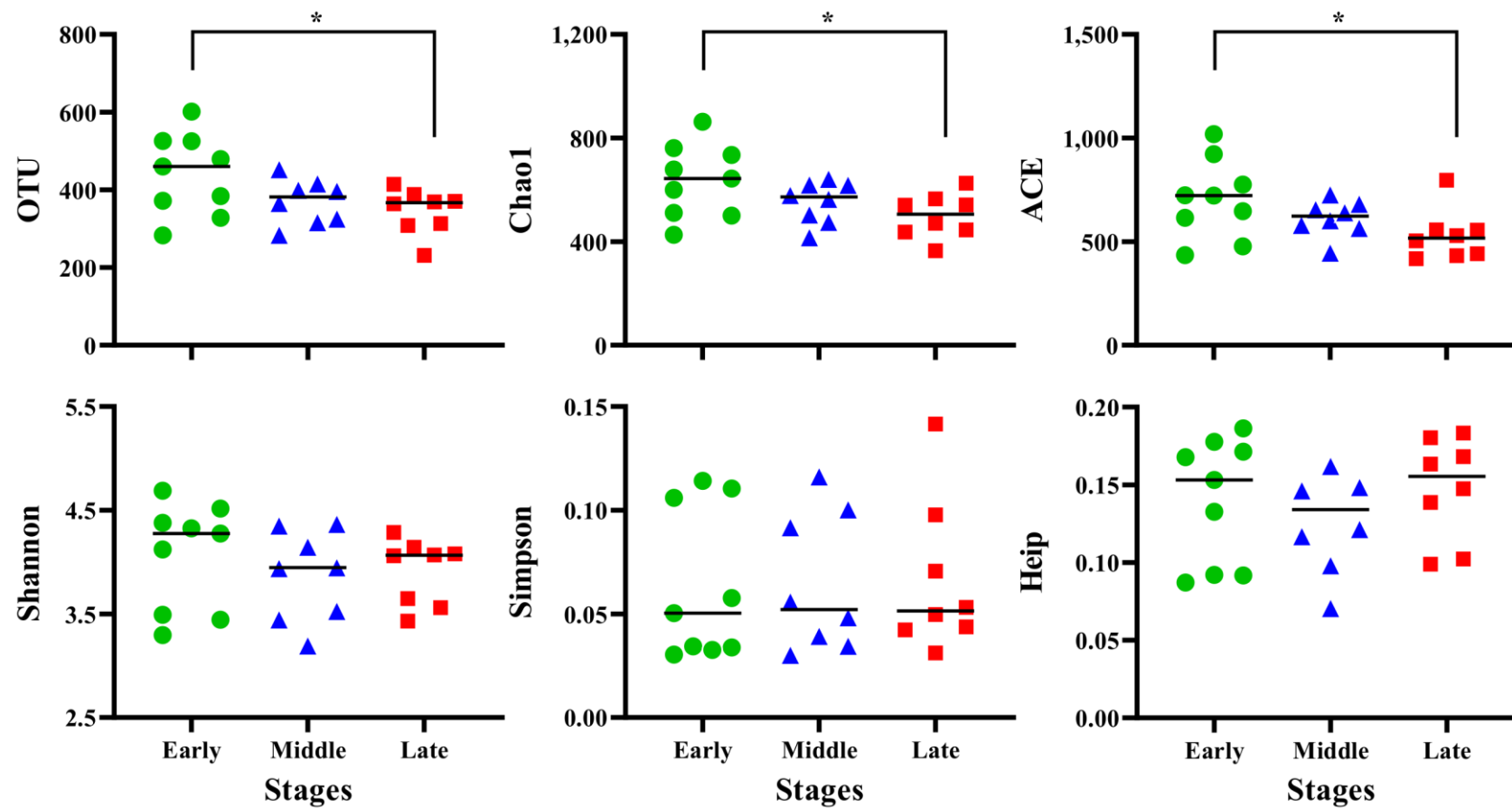


Figure 1-3. Column scatter plots of bacterial diversity indices in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages.

* indicates significantly ($P < 0.05$) differ. OTU = operational taxonomic unit; ACE = abundance-based coverage estimator

Relative abundances of major bacterial phyla and genera in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages.

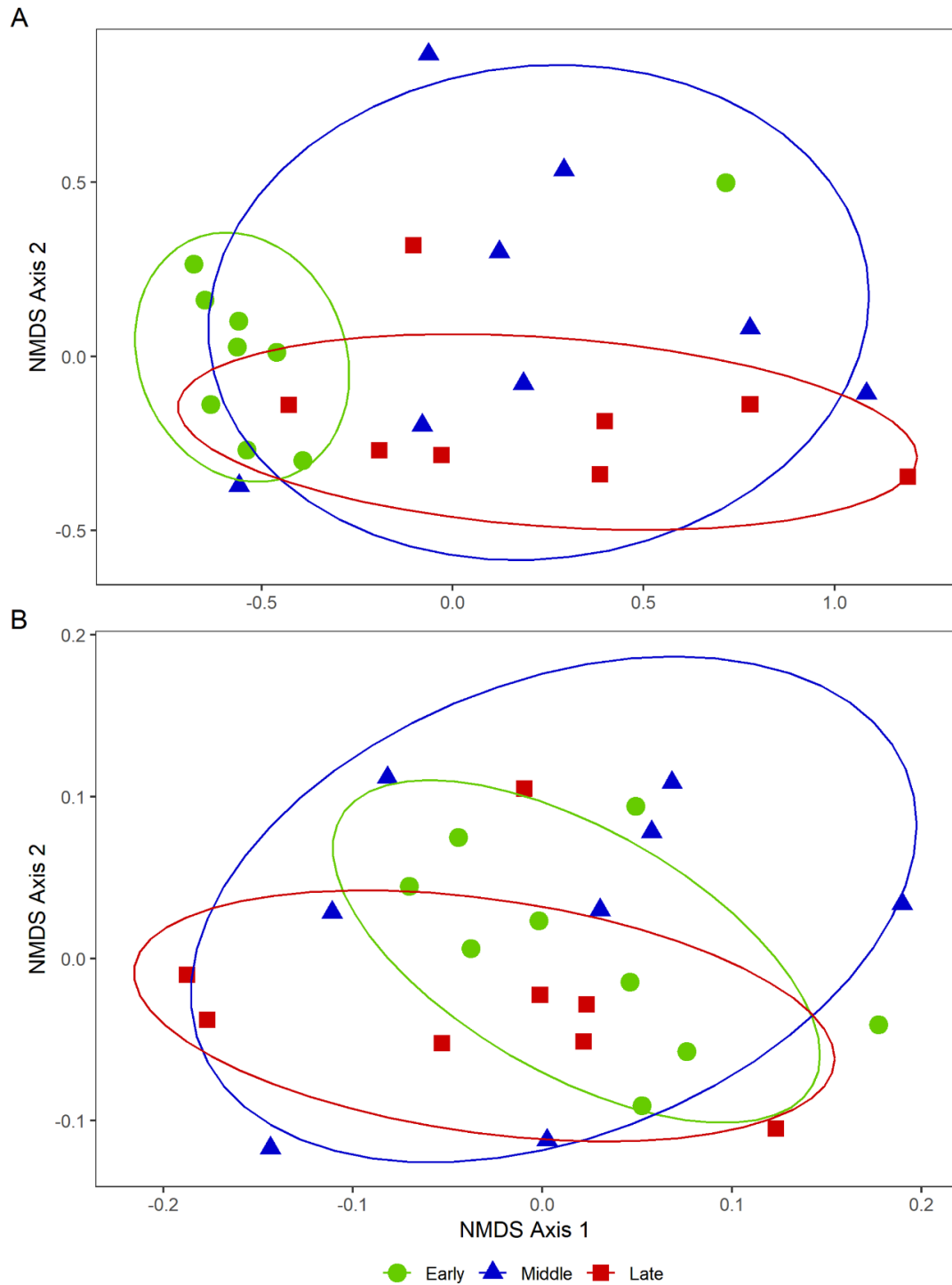


Figure 1-4. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plots in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages. NMDS plots were generated from the operational taxonomic units (OTU) (A) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis (B). The stress was 0.10 and 0.14 for the OTU- and for the KEGG pathway-based ordinations, respectively.

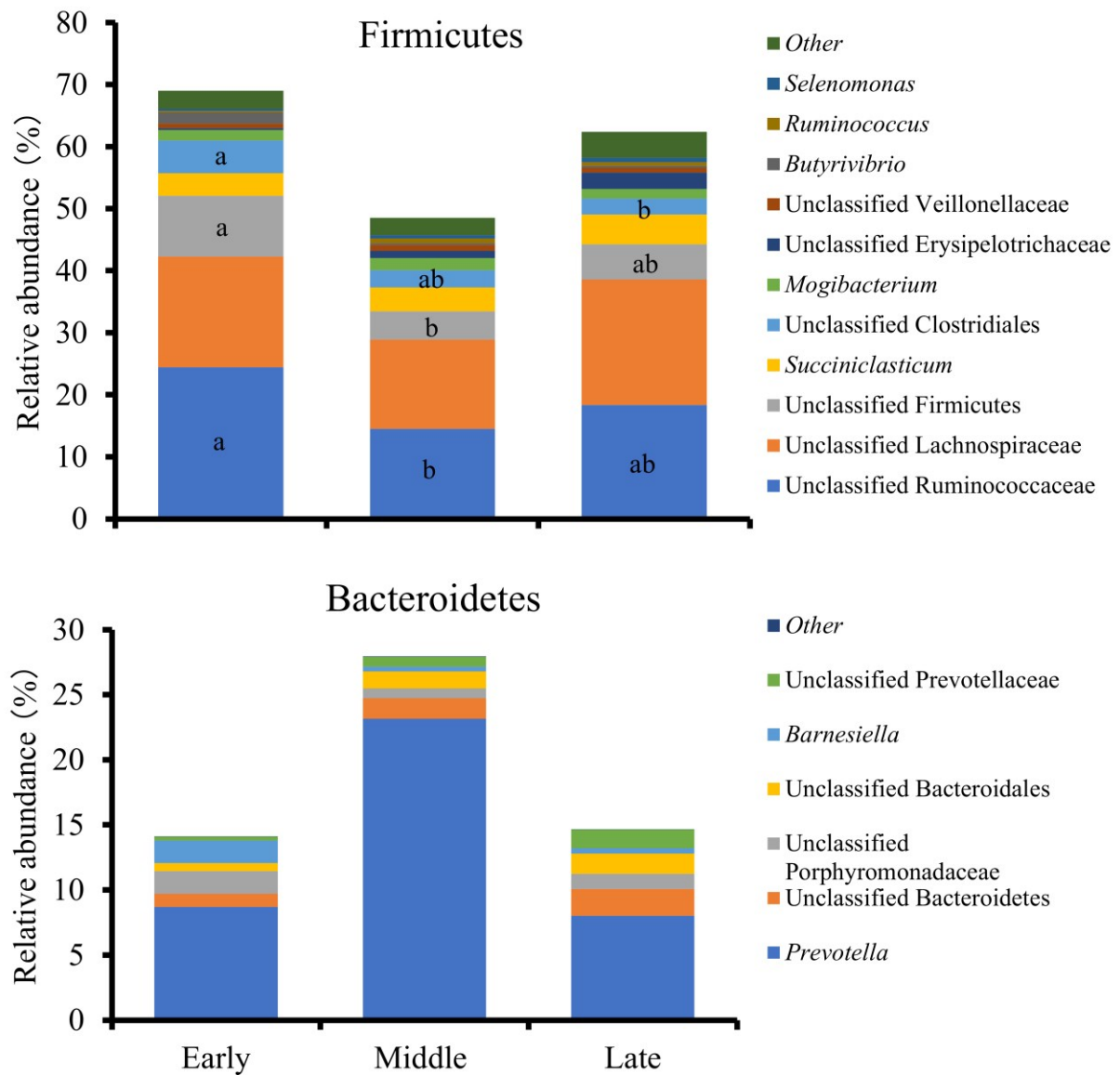


Figure 1-5. Relative abundance of bacterial genera belonged to major bacterial phyla Firmicutes and Bacteroidetes in the rumen liquid in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages.

^{a,b} Mean different superscripts significantly differ ($P < 0.05$) during the fattening stages.

Table 1-4. Relative abundances and taxonomic classification of core operational taxonomic units (OTU; shared by all samples) in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages.

OTU	Stage			SEM	RDP classification (genus level)	BLASTn classification	Percent to BLASTn identity	Accession no.
	Early	Middle	Late					
OTU1	11.7	6.73	6.84	3.05	Unclassified <i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus bromii</i> strain ATCC 27255	97.8	NR_025930.1
OTU2	6.85	6.47	6.46	2.31	Unclassified <i>Lachnospiraceae</i>	<i>Faecalimonas umbilicata</i> strain EGH7	95.2	NR_156907.1
OTU4	2.89	3.46	2.86	1.42	<i>Succiniclasticum</i>	<i>Succiniclasticum ruminis</i> strain SE10	95.9	NR_026205.1
OTU5	5.14 ^a	1.85 ^b	2.14 ^{ab}	0.77	Unclassified <i>Firmicutes</i>	<i>Thermotalea metallivorans</i> strain B2-1	88.6	NR_044503.1
OTU6	2.31	3.16	1.40	0.84	<i>Prevotella</i>	<i>Prevotella ruminicola</i> strain Bryant 23	98.9	NR_102887.1
OTU8	4.62 ^a	1.37 ^b	1.91 ^b	0.45	Unclassified <i>Ruminococcaceae</i>	<i>Pseudoflavonifractor phocaeensis</i> strain Marseille-P3064	92.2	NR_147370.1
OTU10	2.10	2.04	0.80	0.57	Unclassified <i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus bromii</i> strain ATCC 27255	95.6	NR_025930.1
OTU13	1.66	2.01	1.48	0.42	<i>Mogibacterium</i>	<i>Mogibacterium neglectum</i> strain P9a-h	94.8	NR_027203.1
OTU15	1.77	0.69	2.26	0.66	Unclassified <i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus bromii</i> strain ATCC 27255	94.5	NR_025930.1
OTU24	0.98	0.53	0.72	0.27	Unclassified <i>Lachnospiraceae</i>	<i>Faecalicatena orotica</i> strain JCM 1429	93.3	NR_114392.1
OTU26	0.97 ^a	0.17 ^b	0.20 ^b	0.14	<i>Butyrivibrio</i>	<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i> strain B316	99.3	NR_102893.1
OTU30	1.13 ^a	0.13 ^b	0.35 ^c	0.11	Unclassified <i>Firmicutes</i>	<i>Novibacillus thermophilus</i> strain SG-1	87.4	NR_136797.1
OTU34	0.65	0.28	0.71	0.17	Unclassified <i>Firmicutes</i>	<i>Monoglobus pectinilyticus</i> strain 14	90.0	NR_159227.1
OTU35	0.56	0.62	0.77	0.29	<i>Olsenella</i>	<i>Olsenella profusa</i> DSM 13989	98.5	NR_116938.1
OTU37	0.70 ^a	0.14 ^b	0.34 ^b	0.10	Unclassified <i>Clostridiales</i> <i>Incertae Sedis XIII</i>	<i>Emergencia timonensis</i> strain SN18	93.3	NR_144737.1
OTU43	0.38 ^a	0.48 ^b	0.20 ^b	0.13	Unclassified <i>Lachnospiraceae</i>	<i>Acetatifactor muris</i> strain CT-m2	91.5	NR_117905.1
OTU54	0.26	0.38	0.19	0.10	<i>Schwartzia</i>	<i>Schwartzia succinivorans</i> strain S1-1	99.3	NR_029325.1
OTU55	0.12 ^a	0.59 ^b	0.57 ^b	0.17	Unclassified <i>Firmicutes</i>	<i>Salinithrix halophila</i> strain R4S8	87.0	NR_134171.1
OTU58	0.20	0.46	0.21	0.12	Unclassified <i>Firmicutes</i>	<i>Gracilibacter thermotolerans</i> JW/YJL-S1	89.6	NR_115693.1
OTU62	0.09 ^a	0.45 ^b	0.12 ^a	0.06	<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> strain C94	98.9	NR_025931.1
OTU64	0.19	0.41	0.36	0.15	Unclassified <i>Planctomycetaceae</i>	<i>Thermostilla marina</i> strain SVX8	84.8	NR_148598.1
OTU68	0.23	0.24	0.89	0.19	Unclassified <i>Lachnospiraceae</i>	<i>Blautia glucerasea</i> strain JCM 17039	93.0	NR_113231.1
OTU79	0.21	0.27	0.30	0.09	Unclassified <i>Clostridiales</i>	<i>Ihubacter massiliensis</i> strain Marseille-P2843	93.7	NR_144749.1
OTU80	0.24	0.28	0.12	0.07	Unclassified <i>Firmicutes</i>	<i>Geosporobacter ferrireducens</i> strain IRF9	88.6	NR_148302.1
OTU86	0.14	0.21	0.23	0.08	Unclassified <i>Clostridiales</i>	<i>Vallitalea pronyensis</i> strain FatNI3	90.4	NR_125677.1

Table 1-4 continued for next page

Continued Table 1-4							
OTU90	0.27	0.13	0.24	0.07	<i>Atopobium</i>	<i>Atopobium parvulum</i> DSM 20469	95.5 NR_102936.1
OTU103	0.14	0.12	0.22	0.07	Unclassified <i>Ruminococcaceae</i>	<i>Sporobacter termitidis</i> strain SYR	93.0 NR_044972.1
OTU110	0.23 ^a	0.04 ^b	0.10 ^{ab}	0.05	Unclassified <i>Clostridiales</i>	<i>Anaerobacterium chartisolvans</i> strain T-1-35	89.3 NR_125464.1
OTU125	0.09	0.12	0.23	0.05	Unclassified <i>Ruminococcaceae</i>	<i>Ruminococcus flavefaciens</i> strain C94	94.1 NR_025931.1
OTU167	0.08 ^a	0.06 ^a	0.17 ^b	0.02	<i>Intestinimonas</i>	<i>Intestinimonas butyriciproducens</i> strain SRB-521-5-I	96.7 NR_118554.1
OTU183	0.09	0.04	0.07	0.02	Unclassified <i>Clostridiales</i>	<i>Eubacterium nodatum</i> ATCC 33099	91.8 NR_118781.1
OTU184	0.03	0.09	0.08	0.02	<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus albus</i> 7 = DSM 20455	98.5 NR_074399.1
OTU189	0.09 ^a	0.04 ^b	0.09 ^{ab}	0.02	Unclassified <i>Firmicutes</i>	<i>Caloramator fervidus</i> strain RT4. B1	89.6 NR_025899.1
OTU199	0.07 ^a	0.06 ^a	0.02 ^b	0.01	Unclassified <i>Lachnospiraceae</i>	[<i>Clostridium</i>] <i>aminophilum</i> strain F	93.3 NR_118651.1
OTU238	0.07 ^a	0.02 ^b	0.08 ^a	0.02	Unclassified <i>Lachnospiraceae</i>	<i>Merdimonas faecis</i> strain BR31	91.1 NR_157642.1

^{a,b,c}Means within a row, different superscripts differ (P < 0.05)

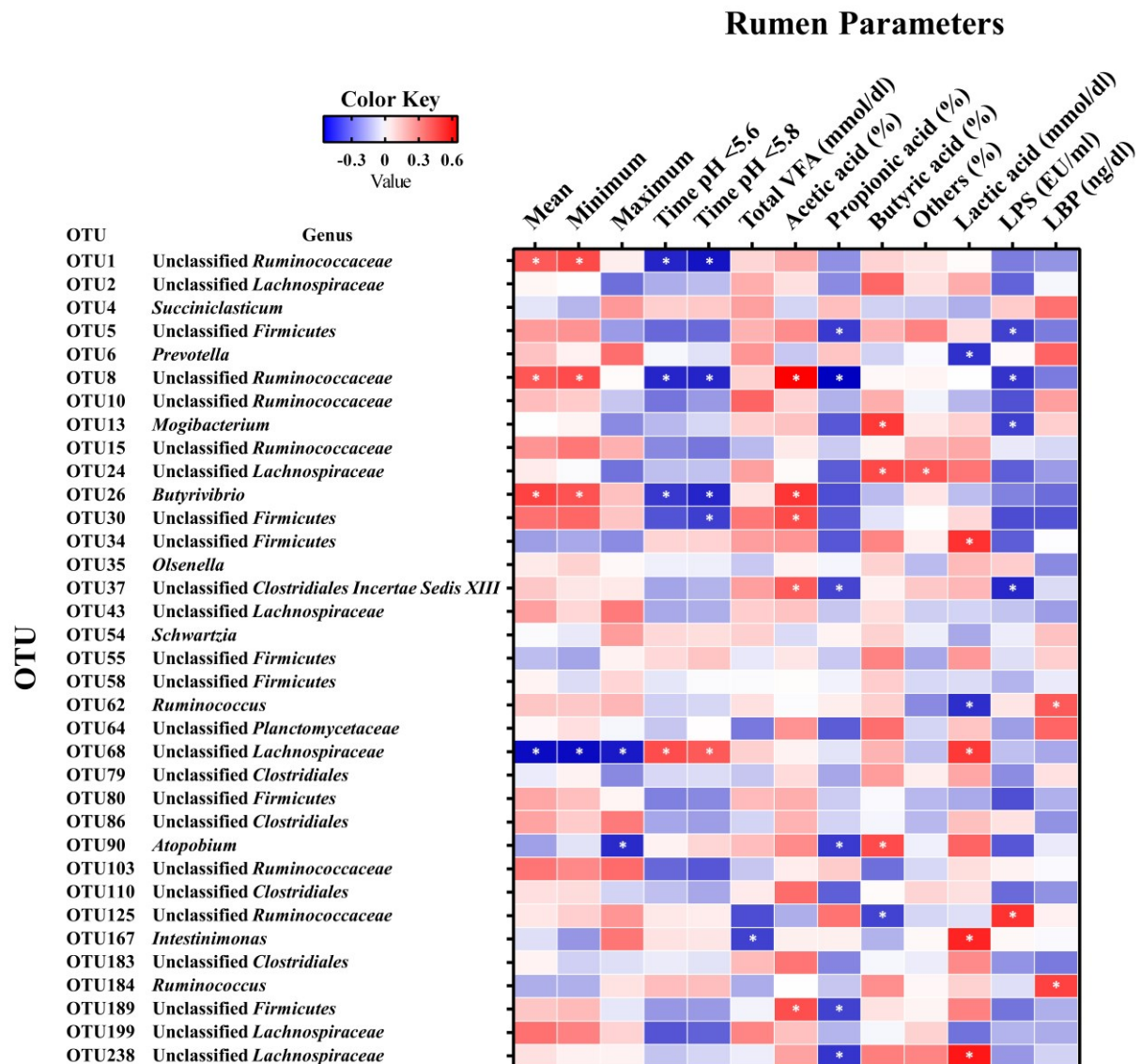


Figure 1-6. Correlation analyses between the relative abundances of core operational taxonomic units (OTUs; shared by all samples) and rumen parameters in Japanese Black beef cattle. Cells are colored based on Pearson's correlation coefficient analyses. Blue represents a negative correlation and red represents a positive correlation.

*Significant correlation ($P < 0.05$) between the OTUs and rumen parameters.

Table 1-5. Blood metabolites in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages.

Item	Fattening stage			SEM
	Early	Middle	Late	
TP (g/dl)	6.68	6.89	6.96	0.18
BUN (mg/dl)	12.1	14.5	11.3	0.98
TCHO (mg/dl)	106	109	93.0	7.31
AST (IU/l)	69.2 ^a	71.3 ^a	100 ^b	10.1
GGT (IU/l)	27.7	26.9	25.5	3.18
Ca (mg/dl)	9.97	9.84	9.72	0.12
Vitamin A (IU/dl)	40.2 ^a	35.5 ^a	62.4 ^b	3.67
β-carotene (μg/dl)	0.48 ^a	0.33 ^a	0.11 ^b	0.06
Vitamin E (μg/dl)	122 ^a	171 ^a	92.6 ^b	12.5
LBP (ng/ml)	283	493	389	67.3

^{a,b,c}Means within a row, different superscripts differ ($P < 0.05$)

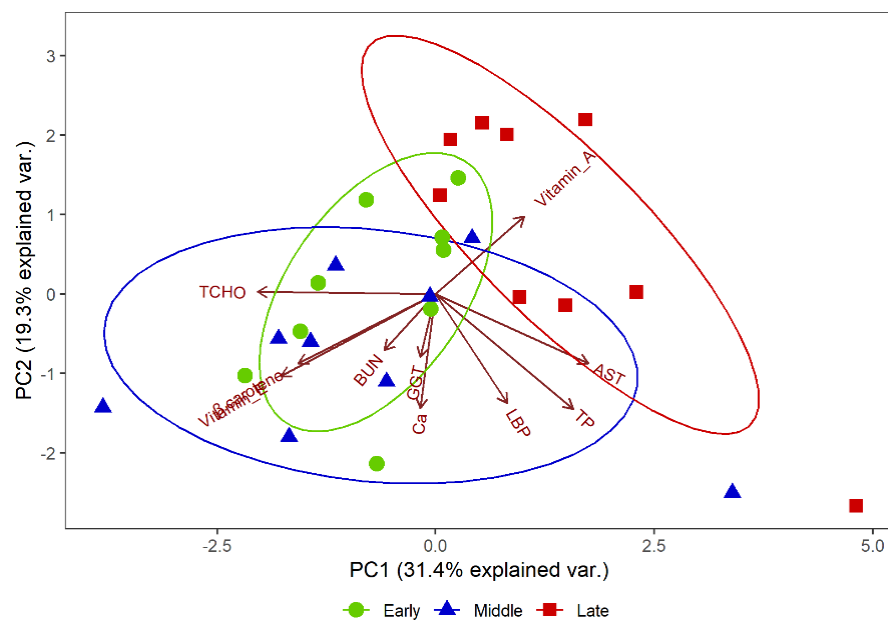


Figure 1-7. Principal component analysis (PCA) plots in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages. PCA plots were generated from peripheral blood metabolites. PC1 and PC2 represent principal components 1 and 2, respectively.

第2章 黒毛和種牛における肥育時期別の第一胃液，第一胃食渣および第二胃液性状と細菌叢構成の比較

1. 序論

肥育牛や乳牛は高い生産性を獲得するために濃厚飼料の多給が行われるが，そのことにより第一胃内での VFA や乳酸が蓄積することで第一胃液 pH の低下を招く (76, 95)。加えて，消化管 pH の変動に伴い消化管細菌叢構成が変化することが知られており (52, 78, 86)，第一胃液 pH 低下に伴い第一胃内細菌叢のグラム陰性菌が死滅溶菌することで第一胃内 LPS が増加し，血中へ放出されることで肝炎，第四胃変位，蹄葉炎等の代謝性疾患が発生する (7, 36)。さらに，第一胃液，第一胃食渣および第一胃粘膜上皮の細菌叢構成や代謝機能には相違がみられることが報告されている (21)。例として，第一胃食渣細菌叢の細菌門では第一胃液細菌叢と比較し *Proteobacteria* の構成比が *Firmicutes* および *Bacteroidetes* と比べ大きいことが報告されている (17, 96)。また，前胃液 pH の低下に対する緩衝作用として，反芻の際の唾液の混和，第一胃粘膜上皮からの重炭酸イオンの分泌などがあり，濃厚飼料多給によりそれぞれの緩衝作用の割合が変化することが報告されている (23)。加えて，第二胃液 pH は飲水および唾液の緩衝作用により第一胃液 pH と比較して高値となるが (20, 25)，第二胃液細菌叢構成や発酵機能は第一胃液と類似していることが報告されている (25, 44)。例として，第一胃液および第二胃液細菌叢は細菌の多様性が類似し，*Firmicutes*, *Bacteroidetes* および *Actinobacteria* 門, *Prevotella*, *Ruminococcus* および *Clostridium* 属が共通して高い構成比を占めることが報告されている (52)。黒毛和種は日本固有の品種であり，第1章では各肥育期の第一胃液 pH，性状およ

び細菌叢の変化について検討し、肥育後期における乳酸濃度の増加による SARA の重症化等、黒毛和種肥育牛の各肥育期における特徴的な所見が得られたが、濃厚飼料多給による前胃液 pH の低下に伴う第一胃および第二胃の緩衝作用の変化については不明瞭である。そのため、本試験では第一胃液および第二胃液 pH、性状並びに第一胃液、第一胃食渣および第二胃液細菌叢構成を肥育期毎に比較することで黒毛和種肥育牛の濃厚飼料多給に対する適応能力の理解を深めることを目的とした。

2. 材料および方法

(1) 供試牛および飼養管理

供試牛および飼養管理は第 1 章と同様である。

(2) 第一胃液、第一胃食渣および第二胃液の採材

第一胃液の採材は第 1 章と同じスケジュールで行い、処理方法も同様の方法であった。第二胃液の採材は第一胃フィステルを介し、第二胃内に留置した無線伝送式 pH センサー周囲の第二胃液を採取した。その後の処理方法は第一胃液と同様である。第一胃食渣は腹囊底部より約 25g 採取し、滅菌ガーゼを用いて用手にて軽く絞り、残渣を保存バッグへ封入し、細菌叢解析用サンプルとして -80℃ で保存した。

(3) 測定項目および方法

1) 第一胃液および第二胃液 pH

第一胃液および第二胃液 pH の測定には無線伝送式 pH センサー（山形東亜 DKK (株)、新庄）を用い、第一胃フィステルを介し第一胃腹囊底部および第二胃内に留置した。測定方法は第 1 章と同様であり、試験期間は採材日 (day0) の前後それぞれ 6 日間とした。

2) 第一胃液、第二胃液 VFA、NH₃-N および乳酸濃度並びに LPS 活性値

第一胃液, 第二胃液 VFA, $\text{NH}_3\text{-N}$ および乳酸濃度並びに LPS 活性値の測定方法は第 1 章の第一胃液に用いた手技と同様である。

3) 細菌叢構成

DNA 抽出方法は第一胃液および第二胃液の処理は第 1 章における第一胃液の処理と同様である。第一胃食渣の洗浄について, 第一胃食渣 5 g に TE バッファー 50 ml を加えミキサー (タイガー魔法瓶 (株), 大阪) で攪拌した後 1,600 g, 4°C, 15 分間遠心した。その後上清を 11,000 g, 4°C, 25 分間遠心し, 沈殿物を TE バッファーで一回洗浄した。以後の処理は第 1 章の第一胃液の処理方法と同様である。

次世代シーケンス法には MOTHUR program (version 1.41.1; University of Michigan; <http://www.mothur.org/wiki/>; 98) を用い, シーケンス方法は第 1 章と同様である。細菌種の豊富さ, 多様性についての解析には“summary.single” コマンドを用い, OTUS, 細菌種の豊富さを示す指数である Chao1, ACE, および細菌の多様性を示す指数である Shannon, Simpson を算出した。また, PCoA には Lozupone and Knight (65) が報告した非加重 UniFrac distance 法を用い, 各肥育期における第一胃液, 第一胃食渣および第二胃液の細菌叢の類似性を評価した。

(4) 統計解析

統計解析には Prism (GraphPad Prism ver. 5.01, La Jolla, Ca, USA) を用いた。各データは Shapiro-Wilk normality test により正規分布を確認した。第一胃液および第二胃液 pH の測定値から 24 時間平均 pH および採材前日の 1 時間平均 pH を算出した。また, 各肥育期の第一胃液および第二胃液の 24 時間平均 pH, 1 時間平均 pH, VFAs, $\text{NH}_3\text{-N}$ および乳酸濃度並びに LPS 活性値の比較は正規分布のデータには paired *t*-test を用い, 非正規分布のデータにはウィルコクソンの順位符号検定により解析を行った。各肥育期の第一胃液, 第一胃食渣および第二胃液の細菌門, 細菌属, OTUs, 細菌種の豊富さおよび多様性の比較は正規分布の場合は one-way analysis of

variance (ANOVA) with Bonferroni post-hoc analysis を用い、非正規分布の場合は Kruskal-Wallis test with a Dunnett's post-hoc analysis により解析を行った。第一胃液および第二胃液 OTUs と第一胃液および第二胃液性状 (24 時間平均 pH, 総 VFA 濃度, 各 VFA の構成比, 乳酸および NH₃-N 濃度並びに LPS 活性値) 間で Pearson's correlation coefficient を行い、結果に基づいたヒートマップを作成した。いずれも $P < 0.05$ を有意差ありとし、各データは平均値および標準誤差 (SEM) で表した。

3. 結果

(1) 第一胃液および第二胃液 pH

実験期間中に発熱、食欲不振、下痢などの臨床症状を呈する牛は認められなかった。24 時間平均 pH は肥育前期では全ての試験期間で第二胃液 pH が第一胃液 pH と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示し、中期では day 6 を除き、第二胃液 pH が第一胃液 pH と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。一方、肥育後期の day -3, -1, 0, 5 では第二胃液 pH が第一胃液 pH と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示した (Figure 2-1)。採材前日の一時間平均 pH は、肥育前期では 0:00–6:00 に第二胃液 pH が第一胃液 pH と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。また、肥育中期では 12:00–16:00, 23:00 および 2:00 に第二胃液 pH が第一胃液 pH と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。一方、肥育後期では 8:00–18:00, 23:00 および 2:00 に第二胃液 pH が第一胃液 pH と比べ有意 ($P < 0.05$) な低値を示した (Figure 2-2)。

(2) 第一胃液, 第二胃液 VFA, NH₃-N および乳酸濃度並びに LPS 活性値

全ての肥育期で第一胃液の総 VFA 濃度は第二胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した (Table 2-1)。肥育中期と後期の第一胃液の VFA 中の酢酸構成比は第二胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示し、プロピオン酸構成比は第二胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。また、肥育前期と中期の第一胃液の VFA 中

の酪酸構成比は第二胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示し、全ての肥育期で第一胃液の酢酸-プロピオン酸比は第二胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示した (Table 2-1)。肥育中期の第一胃液 $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度は第二胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示した (Table 2-1)。

(3) 第一胃液、第一胃食渣および第二胃液の細菌叢構成

1) 多様性解析

肥育中期では、第一胃食渣の Chao1 は第一胃液および第二胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示し、後期では第一胃食渣の ACE は第一胃液および第二胃液と比べ有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。しかしながら、OTUs、多様性の指数である Shannon および Simpson は全ての肥育期で第一胃液、第一胃食渣および第二胃液の間に有意差は認められなかった (Table 2-2)。

2) 類似性解析

PCoA では、全ての肥育期で第一胃液および第二胃液のプロットが近似した分布を示したが、肥育中期および後期の第一胃液、第一胃食渣および第二胃液のプロットは前期と比較し分散していた (Figure 2-3)。

3) 細菌門および細菌属構成比

全ての肥育期において、Firmicutes および Bacteroidetes 門が第一胃液、第一胃食渣および第二胃液細菌叢の細菌門で最も構成比が大きかった。Firmicutes 門に属する細菌属の中で、肥育前期では第一胃食渣の unclassified Ruminococcaceae が第一胃液および第二胃液と比較して有意 ($P < 0.05$) な低値を、Succiniclasicum が第一胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示し、unclassified Firmicutes, unclassified Clostridiales および Mogibacterium は第一胃液および第二胃液と比べ有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。また、肥育前期では Bacteroidetes 門に属する細菌属の中で、第一胃食渣の unclassified Porphromonadaceae および unclassified Bacteroidetes が第二

胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示した (Figure 2-4)。また, Firmicutes 門に属する細菌属のうち, 肥育中期では第一胃食渣の unclassified Clostridiales および *Mogibacterium* が第一胃液および第二胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示し, unclassified Lachnospiraceae が第一胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。また, 肥育中期では Bacteroidetes 門に属する細菌門のうち, 第一胃食渣の unclassified Porphyromonadaceae が第二胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した (Figure 2-4)。一方肥育後期では Firmicutes 門に属する細菌属の中で, 第一胃食渣の *Succiniclasicum* が第一胃液および第二胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示し, unclassified Clostridiales および *Mogibacterium* が第一胃液と比べ有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。一方, 肥育後期の第一胃食渣における unclassified Ruminococcaceae は第一胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示した (Figure 2-4)。

4) 主要な OTU 構成比

第一胃液および第二胃液では, OTU1 (*Ruminococcus bromii* strain ATCC 27255), OTU2 (*Faecalimonas umbilicate* strain EGH7) および OTU3 (*Olsenella umbonate*) が最も高い構成比を占めていた。また, 第一胃液では OTU5 (*Thermotalea metallivorans* strain B2-1), OTU8 (*Pseudoflavonifractor phocaeensis* strain Marseille-P3064) が肥育前期で中期と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示していた。また, 第二胃液では, 肥育前期の OTU3 は中期と比較して有意 ($P < 0.05$) な高値を示し, OTU5 は中期と比べ有意 ($P < 0.05$) な低値を示した。第二胃液の OTU8 は肥育前期と比べ中期および後期で有意 ($P < 0.05$) な低値を示し, OTU16 (*Prevotella ruminicola*) は前期と比較し後期で有意 ($P < 0.05$) な低値を示した (Figure 2-5)。

(4) 第一胃液と第二胃液の主要な OTUs と第一胃液および第二胃液性状の相関関

係

第一胃液と第二胃液の主要な OTUs と第一胃液および第二胃液性状の相関関係は Figure 2-5 に示した。第二胃液では総 VFA 濃度が OTU2 ($r=0.42$) および OTU10 (*Ruminococcus bromii* strain ATCC 27255; $r=0.44$) と有意 ($P<0.05$) な正の相関を示し、VFA における酢酸の構成比は OTU1 ($r=0.43$), OTU2 ($r=0.49$), OTU5 ($r=0.49$), OTU8 ($r=0.46$) および OTU10 ($r=0.47$) と有意 ($P<0.05$) な正の相関を、OTU11 (*Chelonobacter oris*; $r=-0.48$) と有意 ($P<0.05$) な負の相関を示した。VFA 中のプロピオン酸の構成比は第一胃液では OTU9 (*Acetatifactor muris*; $r=0.57$) と有意 ($P<0.05$) な正の相関を示し、第二胃液では OTU6 (*Prevotella ruminicola* strain Bryant 23; $r=0.41$) および OTU9 ($r=0.57$) と有意 ($P<0.05$) な正の相関を示した。VFA 中の酪酸の構成比は第一胃液では OTU2 ($r=0.40$) と有意 ($P<0.05$) な正の相関を示し、第二胃液では OTU2 ($r=0.67$), OTU13 (*Mogibacterium reglectum* stain P9a-h; $r=0.49$) および OTU10 ($r=0.57$) と有意 ($P<0.05$) な正の相関を示したが、一方で OTU11 ($r=-0.55$) は有意 ($P<0.05$) な負の相関を示した。酢酸-プロピオン酸比は第一胃液では OTU5 ($r=0.42$) および OTU8 ($r=0.67$) と有意 ($P<0.05$) な正の相関を示し、第二胃液では OTU1 ($r=0.44$), OTU5 ($r=0.52$), OTU8 ($r=0.74$), および OTU13 ($r=0.45$) と有意 ($P<0.05$) な正の相関を示した。一方、酢酸-プロピオン酸比は第一胃液の OTU9 ($r=-0.41$) および第二胃液の OTU4 ($r=-0.41$) および OTU11 ($r=-0.59$) と有意 ($P<0.05$) な負の相関を示した。NH₃-N 濃度は第一胃液では OTU10 ($r=0.41$) と有意 ($P<0.05$) な正の相関を示し、第二胃液では OTU2 ($r=0.54$), OTU5 ($r=0.41$), OTU13 ($r=0.57$) および OTU10 ($r=0.44$) と有意 ($P<0.05$) な正の相関を示した。また、乳酸濃度は第一胃液では OTU6 ($r=-0.45$) と有意 ($P<0.05$) な負の相関を示し、第二胃液では OTU13 ($r=0.50$) と有意 ($P<0.05$) な正の相関を示した。

4. 考察

本試験では、肥育前期および中期の 24 時間平均および 1 時間平均第一胃液 pH は第二胃液 pH と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示したが、この結果はホルスタイン種を用いた試験において第二胃液 pH が第一胃液 pH と比較し高値を示すという以前の報告 (52, 29) と一致し、これは第二胃液における飲水による希釈および反芻に伴う唾液の混和による緩衝作用が要因であると考えられた (20, 25)。しかしながら、肥育後期では 24 時間平均および 1 時間平均第一胃液 pH は第二胃液 pH と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。また、総 VFA 濃度は全ての肥育期において第一胃液と比較し第二胃液で有意 ($P < 0.05$) な低値を示し、この結果は肥育前期および中期では総 VFA 濃度の増加により第一胃液 pH が低下するという第 1 章の結果と一致する。一方、肥育後期では第一胃液の総 VFA 濃度が第二胃液よりも高値を示しているにもかかわらず第一胃液 pH が第二胃液 pH と比較し高値を示した。また、第 1 章では肥育後期の第一胃液 pH の低下は乳酸濃度の高値が一因であることが示唆されたが、後期の乳酸濃度は第一胃液および第二胃液の間に有意差は認められなかった。一方、前胃液 pH の緩衝作用には反芻に伴う唾液の混和や第一胃粘膜上皮からの重炭酸の分泌などがあり、第一胃液 pH が正常な水準に保たれている際は唾液の混和による中和作用が主な緩衝作用であることに対し、第一胃液 pH の低下に伴い第一胃粘膜上皮からの重炭酸の分泌による緩衝作用の割合が増加することが知られている (23)。そのため、肥育後期では長期的な濃厚飼料の多給により唾液による第二胃での緩衝作用が減少し、一方で第一胃粘膜上皮からの重炭酸の分泌が増加し、第一胃での緩衝作用が増加したことが考えられ、その結果として第二胃液 pH が第一胃液 pH と比較して低値を示したことが示唆された。しかしながら、黒毛和種肥育牛の肥育後期における第一胃液 pH と第二胃液 pH の関係性についてのメカニズムを解明するためには更なる試験が必要であると考えられた。

細菌叢の PCoA では、各肥育期、特に肥育前期の第一胃液細菌叢と第二胃液細菌叢の類似性が明らかになった。一方、第一胃食渣の PCoA プロットは第一胃液およ

び第二胃液と解離しており，これらの結果は第一胃液と第二胃液の細菌叢構成が類似するという以前の報告 (52) および第一胃液と第一胃食渣の細菌叢構成は相違が認められるとする報告 (17, 96) と一致する。しかしながら，第 1 章では肥育期間の経時的変化により第一胃液 pH が低下したにもかかわらず細菌種の多様性に有意差は認められず，本試験の第二胃液細菌叢も各肥育期で第一胃液細菌叢と同様な多様性の変化を示した。これは濃厚飼料多給による pH の低下に伴い細菌種の豊富さおよび多様性が減少するという以前の報告 (52, 78) とは異なるものであった。このことから，第 1 章の結果と類似し，第二胃液細菌叢は第一胃液細菌叢と同様に細菌種の多様性を保つことで第二胃液 pH の低下に適応していることが示唆された。

細菌叢構成では，Firmicutes および Bacteroidetes 門の構成比は第一胃液，第一胃食渣および第二胃液の細菌叢で最も大きく，これは以前の報告と一致する (84)。また，主要な細菌門，細菌属の構成比は全ての肥育期で第一胃液および第二胃液細菌叢の間に有意差は認められなかった。第一胃液 pH と第二胃液 pH の間には有意 ($P < 0.05$) な差が認められたが，一方で第一胃液および第二胃液細菌叢構成に相違は認められず，これは pH の変化により第一胃液細菌叢が変化するという以前の報告 (86) とは異なるものであった。また，第一胃液と第一胃食渣の細菌叢構成には相違が認められ，これは，乳牛の第一胃における液相部と固相部では代謝機能や細菌叢構成が大きく異なるという以前の報告 (71) と一致する。例として，*Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae*, *Succiniclasicam*, *Clostridiales* および *Mogibacterium* は各肥育期の第一胃液と第一胃食渣で構成比の有意差 ($P < 0.05$) が認められ，このことから以前の報告 (21, 71) と同様に黒毛和種肥育牛では第一胃液と第一胃食渣それぞれの細菌叢が担っている機能が異なることが示唆された。

Ruminococcus bromii はデンプンを分解する細菌であり，濃厚飼料の多給により第一胃液細菌叢内での構成比が大きくなることが報告されている (27, 56)。本試験では *R. bromii* は第一胃液および第二胃液の OTUs の中で高い構成比を占めており

(OTU1, OTU10 および OTU15), 第二胃液では総 VFA 濃度, VFA 中の酢酸および酪酸の構成比, 並びに $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度と有意 ($P < 0.05$) な正の相関が認められた。この結果は, 全ての肥育期で第二胃液の VFA 中の酢酸の構成比および酢酸-プロピオン酸比が第一胃液と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示したことに関連するものと考えられた。これらのことから, *R. bromii* は黒毛和種肥育牛の第二胃液における発酵機能に重要な役割を果たしていることが示唆された。加えて, 第一胃液と比較し, 第二胃液では複数の OTUs が第二胃液性状と正の相関があり, 例として総 VFA 濃度 (OTU2 および OTU10), VFA 中の酢酸構成比 (OTU 1, OTU, OTU5, OTU8 および OTU10) および $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度 (OTU2, OTU5, OTU13 および OTU10) で複数の OTUs と有意 ($P < 0.05$) な正の相関が認められた。これらのことから, 第一胃液と比較し第二胃液細菌叢の主要な OTUs は, より密接に発酵機能に関連していることが示唆された。

5. 小括

本試験では第一胃液および第二胃液 pH, 性状並びに第一胃液, 第一胃食渣および第二胃液細菌叢構成を肥育期毎に比較することで黒毛和種肥育牛の濃厚飼料多給に対する適応能力の理解を深めることを目的として, 第一章で供試した黒毛和種肥育牛 9 頭を用いた長期的な濃厚飼料多給試験を行った。その結果, 肥育前期および中期の第一胃液 pH は第二胃液 pH と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示した。一方で肥育後期の第一胃液 pH は第二胃液 pH と比べ有意 ($P < 0.05$) な高値を示し, これは長期的な濃厚飼料多給による前胃液 pH の低下に伴い, 第一胃粘膜上皮からの重炭酸イオンの分泌が促進されたことによると考えられた。また, 第一胃液および第二胃液では肥育期の進行に伴う細菌叢の多様性の現象が認められず, 黒毛和種肥育牛は長期的な濃厚飼料多給に対し第一胃液および第二胃液細菌叢は多様性を保つことで適応し, 発酵機能を維持していると考えられた。細菌叢構成は全ての肥

育期で第一胃液および第二胃液細菌叢に類似性が認められたが、第一胃食渣細菌叢は第一胃液および第二胃液細菌叢と構成の相違が認められ、これは第一胃内の液相部と固相部の担っている代謝機能が異なることによると考えられた。しかしながら、構成比の大きい OTUs では、第一胃液と比較し第二胃液の OTUs が発酵機能により密接に関連していることが示唆された。例として *Ruminococcus bromii* (OTU1, OTU10 および OTU15) は第二胃液における総 VFA 濃度、VFA 中の酢酸および酪酸の構成比および $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度と有意 ($P < 0.05$) な正の相関が認められた。これらのことから、肥育後期の黒毛和種牛では、長期的な濃厚飼料多給による第一胃液 pH の低下に対して緩衝作用を促進して適応しており、第一胃液および第二胃液細菌叢はその多様性を保つことで pH の変化に適応していることが示唆された。

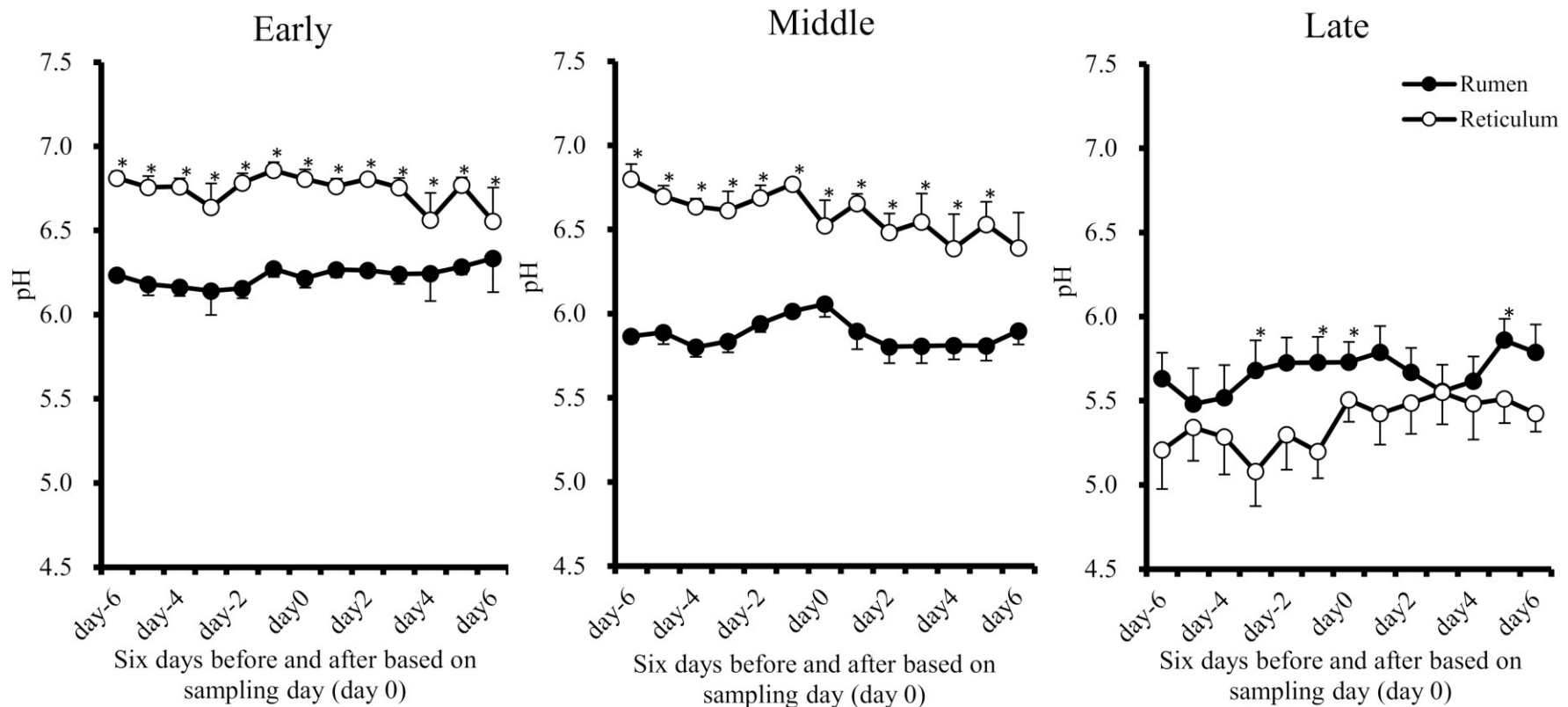


Figure 2-1. Changes in the 24hr mean rumen and reticulum pH within six days before and after based on sampling day (day0) in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages.

*Indicate the significant ($P < 0.05$) difference versus reticulum pH at the same time point in each fattening stage.

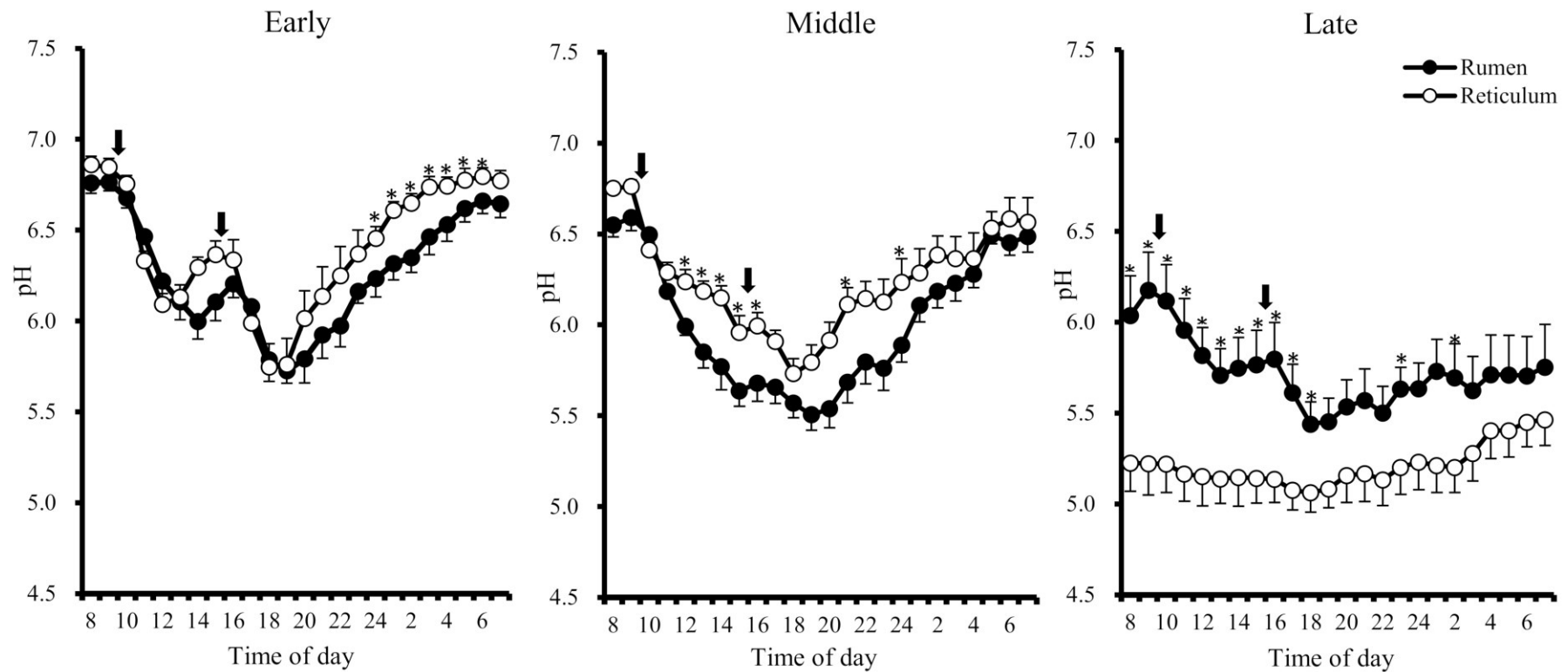


Figure 2-2. Changes in the 1hr mean rumen and reticulum pH at a day before the sampling day in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages. The black arrow indicates the time point of feeding.

*Indicate the significant ($P < 0.05$) difference versus the reticulum pH at the same time point in each fattening stage.

Table 2-1. Total volatile fatty acid (VFA) concentration and VFA proportions, ammonia nitrogen (NH₃-N), and lactic acid (LA) concentration, and lipopolysaccharide (LPS) activity in the rumen and reticulum liquids fractions in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages.

Items	Early			Middle			Late		
	Rumen	Reticulum	SEM	Rumen	Reticulum	SEM	Rumen	Reticulum	SEM
Total VFA (mmol/dl)	13.1 [*]	12.2	0.29	12.3 [*]	12.2	0.48	9.77 [*]	8.36	0.50
Acetic acid (%)	62.3	65.1	0.06	56.7 [*]	58.3	0.21	58.6 [*]	59.5	0.32
Propionic acid (%)	21.8	22.1	0.05	27.5 [*]	26.6	0.16	27.1 [*]	26.3	0.28
Butyric acid (%)	11.8 [*]	10.5	0.09	12.7 [*]	12.0	0.09	11.2	11.0	0.07
Others (%)	4.20	2.20	0.10	3.10	3.20	0.01	3.08	3.14	0.02
Acetate-Propionate	3.05 [*]	3.22	0.17	2.24 [*]	2.41	0.06	2.34 [*]	2.44	0.04
NH ₃ -N (mg/dl)	6.51	6.02	0.06	5.46 [*]	7.13	0.59	7.17	7.06	0.04
Lactic acid (mg/dl)	6.79	7.42	0.83	2.50	2.92	0.48	14.1	13.7	1.53
LPS (×10 ³ EU/ml)	13.4	13.9	0.20	42.9	45.1	13.4	66.4	84.1	6.40

* Indicate the significant (P < 0.05) difference versus reticulum fluid in each fattening stage.

Table 2-2. Bacterial diversity of the rumen liquid, rumen solid, and reticulum liquid fractions in Japanese Black beef cattle during the early, middle and late fattening stages.

Items	Early				Middle				Late			
	Rumen		Reticulum	SEM	Rumen		Reticulum	SEM	Rumen		Reticulum	SEM
	Liquid	Solid	Liquid		Liquid	Solid	Liquid		Liquid	Solid	Liquid	
OTUs ¹	938	885	1009	49	846	730	937	37	453	454	583	24
Chao1 ²	1162	1052	1052	52	1061 ^{ab}	858 ^a	1156 ^b	45	632	584	749	31
Ace ³	1227	1016	1025	49	1130	1029	1013	44	600 ^{ab}	739 ^a	659 ^b	31
Shannon ⁴	4.12	4.37	4.15	0.10	3.92	4.15	4.13	0.08	3.93	4.18	3.91	0.09
Simpson ⁵	0.063	0.062	0.04	0.06	0.064	0.051	0.044	0.05	0.065	0.047	0.067	0.06

¹ Operational taxonomic units; ² Chao indicate the species richness; ³ Abundance-based coverage estimator, indicate the species richness; ⁴ Shannon index represents the species diversity; ⁵ Simpson indicate the species diversity.

^{a,b}Mean within a row different superscripts significantly differ ($P < 0.05$) in each fattening stage.

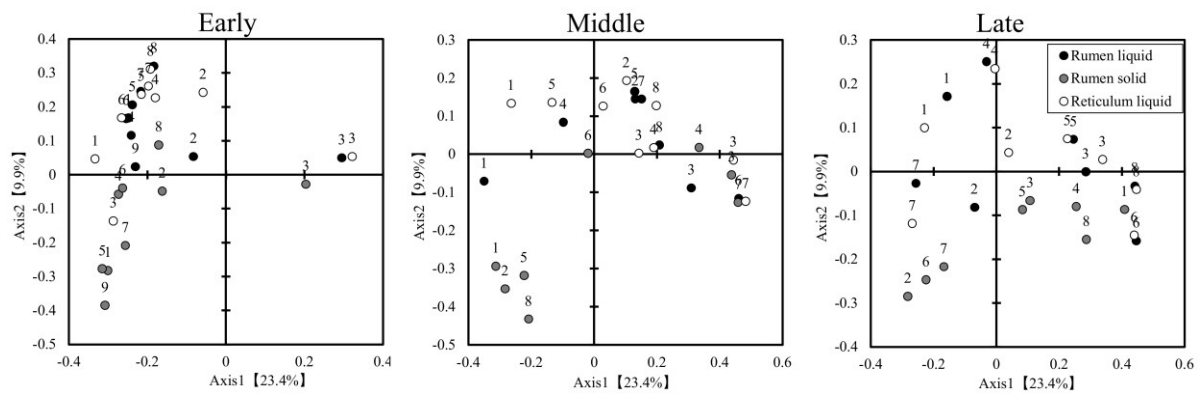


Figure 2-3. Principal coordinate analysis plots generated of the rumen liquid, rumen solid, and reticulum liquid fractions in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages. PC1 and PC2 are principal components 1 and 2, respectively.

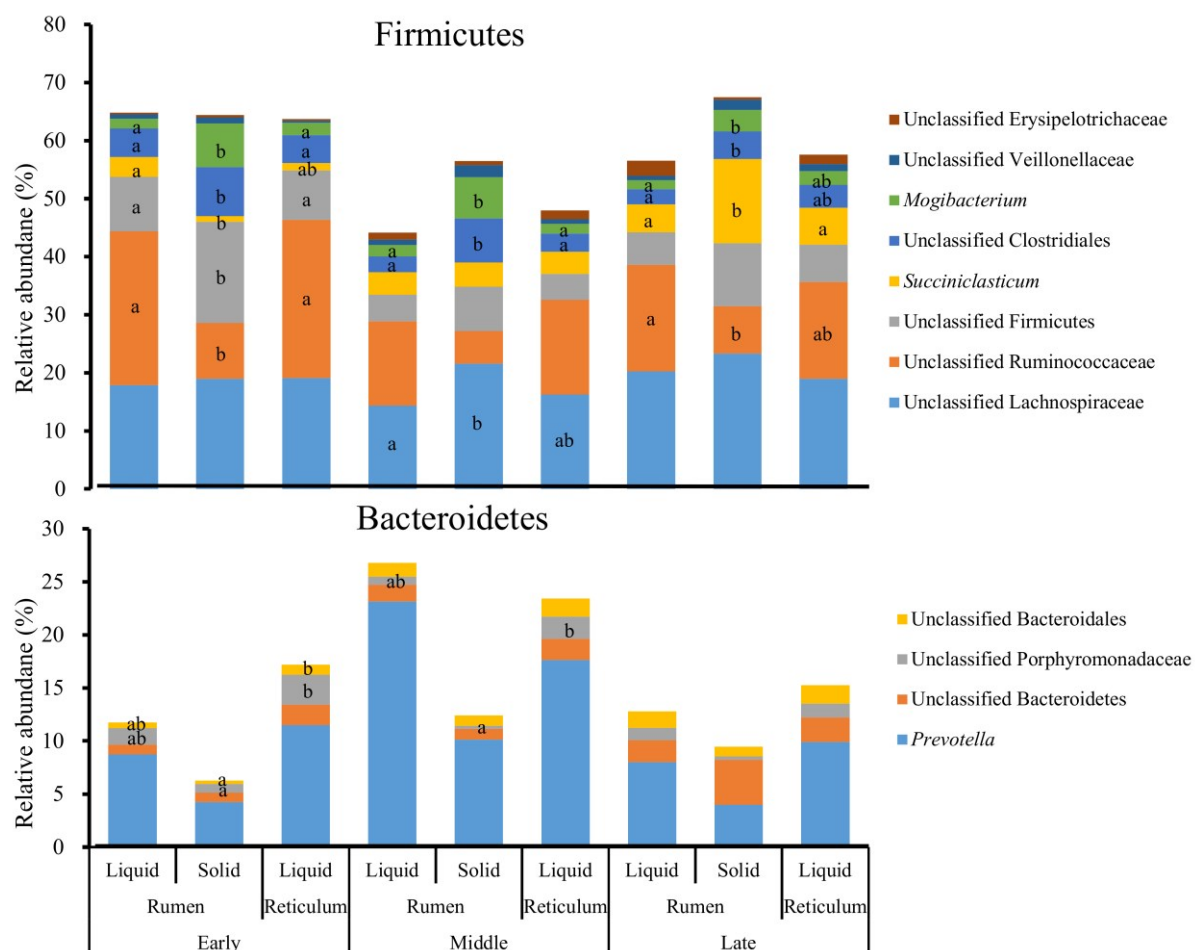


Figure 2-4. Relative abundance of bacterial genera belonged to major bacterial phyla *Firmicutes* and *Bacteroidetes* in the rumen liquid, rumen solid, and reticulum liquid fractions in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages.

^{a,b}Mean within the rumen liquid, rumen solid, and reticulum liquid different superscripts significantly differ ($P < 0.05$) in each fattening stage.

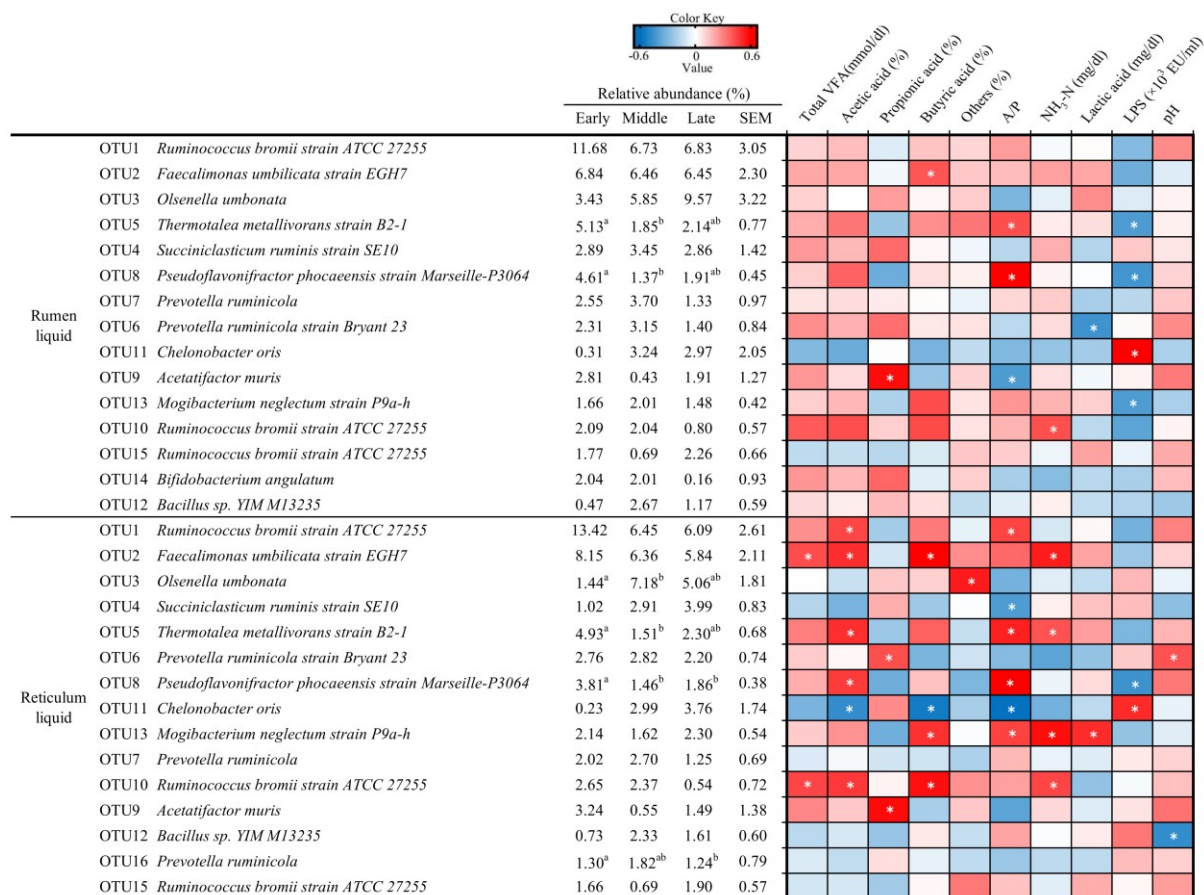


Figure 2-5. Correlation analyses between the major operational taxonomic units (OTUs) and fermentative parameters of rumen and reticulum liquids fractions in Japanese Black beef cattle through the early, middle, and late fattening stages. Cells are colored based on Pearson correlation analyses. Red represents a positive correlation and Blue represents a negative correlation.

^{a,b}Mean within the fattening stages different superscripts significantly differ ($P < 0.05$) in rumen liquid and reticulum liquid.

*significant correlation between OTUs and parameters of rumen liquid and reticulum liquid at $P < 0.05$

第3章 黒毛和種牛の肥育中期と後期における第一胃液性状および細菌叢構成に及ぼす濃厚飼料増給の影響

1. 序論

肥育牛は高い生産性を得るために濃厚飼料の多給が長期的に行われ (114), それに伴い第一胃液 pH の低下や第一胃内 VFA の増加が認められる (76, 95)。その結果として第一胃液 pH の継続した低下により SARA を発症し, 第一胃液細菌叢の変動や第一胃内への LPS の放出を招くことで (36) 肝炎や肝膿瘍, 第四胃変位などの代謝性疾患の発生が惹起される (7, 36, 88)。以前の試験では, 肥育牛に濃厚飼料を多給した際に第一胃細菌叢の多様性やセルロース分解菌の構成比が減少することが報告されている (30, 88)。また, 黒毛和種は日本固有の品種であり, 高い脂肪交雑を獲得する目的で肥育中期の一期間に血中ビタミン A 濃度を低値に保ち, 継続したビタミン A を制限した濃厚飼料の多給および稲わらの給与を行うことが特徴的である。第1章の試験では, 黒毛和種肥育牛は肥育中期では中程度の SARA, および後期では重度の SARA を発症しており, 原因として中期では従来 of 報告 (76, 95) のように総 VFA 濃度の増加が要因と考えられたが, 後期では第一胃内乳酸濃度の増加が第一胃液 pH 低下の一因である可能性が示唆された。また, 第1章および第2章の試験により肥育中期および後期では前期と比較し第一胃液および第二胃液細菌叢の多様性の減少は認められず, これは長期的な濃厚飼料多給に伴う前胃液 pH の低下に対する黒毛和種肥育牛の適応機能であることが示唆された。しかしながら, 第1章および第2章の試験は各肥育期の最後に試験期間を設けており, 濃厚飼料を増給した際の第一胃液 pH および細菌叢の変化並びに適応能力についての知

見は不十分であった。乳牛を用いた試験では濃厚飼料の増加により発生した第一胃液 pH の低下および細菌叢構成および多様性の変化に対し第一胃は 1, 2 週間程度で適応する能力があるとされている (104)。そのため, 本試験では黒毛和種肥育牛の肥育中期および後期に濃厚飼料を増給した際の第一胃液 pH の変化, 細菌叢構成および多様性の変化を明らかにすることで, 中期および後期の黒毛和種肥育牛の濃厚飼料増給に対する第一胃の適応能力の作用機序を解明することを目的とした。

2. 材料および方法

全ての実験手順は岩手大学動物実験委員会による承認 (A201720) を受け行った。

(1) 供試牛と飼養管理

本試験では黒毛和種肥育牛 6 頭を用い, 実験牛には第一胃フイステル (BAR DIAMOND 社) を装着した。肥育中期の牛 ($n=3$, Middle, 21–22 カ月齢) は明治飼糧・水戸研究所 (茨城県茨城町) で試験を行い, 肥育後期の牛 ($n=3$, Late, 31 カ月齢) は兵庫県立農林水産技術総合センター・畜産技術センター (兵庫県加西市) で試験を行った。肥育中期および後期の試験牛の体重はそれぞれ 436 ± 7 kg および 685 ± 24 kg (平均 \pm 標準誤差) であった。試験期間は通常管理下での黒毛和種肥育牛に用いられる濃厚飼料割合に設定した対照区 (CON 区) および濃厚飼料割合を増加した濃厚飼料多給区 (HC 区) とし, 粗飼料は稲わらを用い, 分離給与とした。粗飼料-濃厚飼料割合は肥育中期牛の CON 区および HC 区でそれぞれ 14:86 および 6:94 であり, 後期牛の CON 区および HC 区でそれぞれ 16:84 および 5:95 であった。肥育中期牛で使用した濃厚飼料は CON 区および HC 区で同様であったが, 後期では非繊維性炭水化物の割合は CON 区および HC 区でそれぞれ 59.3% および 49.7% であった。各肥育期の詳細な飼料構成および日本飼養標準 (79) に基づく栄養充足率について Table 3-1 に示した。

(2) 実験スケジュールと採材

実験スケジュールは肥育中期牛および後期牛の CON 区および HC 区をそれぞれ 14 日間とし、CON 区終了後直ちに HC 区を開始した。第一胃液 pH は試験期間中 10 分間隔で連続測定を行った。第一胃液は各試験区の最終日の 13:00 に第一胃フィステルを介して腹囊から約 100 ml 採取した。採取した第一胃液は二重の滅菌ガーゼを用いて濾過後-80℃にて凍結保存した。

(3) 測定項目および方法

1) 第一胃液 pH

第一胃液 pH の測定は Kimura et al. (50)の方法に従い、無線伝送式 pH センサー (YCOW-s, 山形東亜 DKK (株)) を第一胃フィステルを介して第一胃腹囊に留置し、試験期間中 10 分間隔で連続測定を行った。

2) 第一胃液 VFA, NH₃-N および乳酸濃度並びに LPS 活性値

第一胃液は Goto et al. (35) の方法に従い処理し、解析を行った。すなわち、第一胃液 VFA はガスクロマトグラフィー (Hitachi-163, 日立, 東京), 第一胃 LPS 活性値の測定には市販のキット (Pyrochrome with Glucashield Buffer, 生化学工業 (株), 東京) を用いた。乳酸濃度の測定には市販の乳酸分析用試薬キット (F キット, D-/L-乳酸, R-Biopharm, ドイツ) を用い、NH₃-N の測定には NH₃-N analyzer (Kjeltec Auto 1035; Actac, 東京) を用いた。

3) 細菌叢構成

第一胃液からの DNA の抽出は Kim et al. (50) の方法を用いて行った。精製した DNA 溶液はライフサイエンス分光光度計 (Biospec-nano 260-26300-31, Shimadzu, 京都) で濃度及び純度を測定し、純度は吸光度比 (260 nm/280 nm) が 1.8 - 2.1 になることを確認した。DNA の pyrosequencing について, forward primer 357F (5'-CCATCTCATCCCTGCGTGTCCGACTCAGNNNNNNNNNAGRGTTTGATYMTGG

CTCAG-3') および reverse primer 518R (5'-CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTCTCAGTGCTGCCTCCCGTAGGAGT-3') と PCR プレミックス試薬として EmeraldAmp® PCR MaPeriod9 (TaKaRa, 草津, 群馬) を用いた。PCR はサーマルサイクラー (MyCycler; Bio-Rad, 東京) を用いて所定のプロトコルに従って行った。PCR 終了後、アガロースゲルを用いた電気泳動法により一連の操作に不備がないことを確認した。次世代シーケンス法は 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina; San Diego, Ca, USA) を用い、16S RNA の V3/V4 領域を増幅するため、forward primer (5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3') および reverse primer (5'-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3') を用いた。PCR 反応液の調整には Nextra XT index Kit (Illumina, USA) を使用し、PCR を行った。増幅産物についてはアガロースゲル電気泳動法にて一連の操作に不備がないことを確認した後、次世代シーケンサー (Illumina MiSeq; Illumina) によるシーケンスを行った。

次世代シーケンスの結果は BaseSpace® Sequence Hub の 16S Metagenomics を用いて細菌門、細菌属系統解析および 97% 相同性をカットオフ値とした OTUs の配列を決定した。また、細菌種の類似性および多様性解析には非加重 UniFrac distance 法を用い、PCoA 解析および PD whole tree, Chao1 および Shannon を算出した。

(4) 統計解析

24 時間平均、最高および最低 pH, AUC 並びに pH < 5.6 時間は各肥育期間の CON 区および HC 区の試験期間の 8 日目 (day 1) から 14 日目 (day 7) の平均値を求めた。AUC (pH × hour, pH < 5.6) および pH < 5.6 時間 (h/day) は YcowReport software (山形東亜 DKK (株)) を用いて算出した。

AUC および pH < 5.6 時間は SARA の発症および重症度の指標として用い、第一胃液 pH, AUC および pH < 5.6 時間は平均値および標準誤差 (SEM) を算出した。統

計解析には Prism (Graph Pad Prism er. 5.01, La Jolla, CA, USA) を用い, 各肥育期の第一胃液 pH, VFAs, NH₃-N および乳酸濃度並びに LPS 活性値, 加えて細菌種の多様性, 細菌の構成比の CON 区と HC 区との比較には paired *t*-tests を用いた。VFAs, NH₃-N および乳酸濃度, LPS 活性値, 細菌種の多様性および細菌の構成比は平均値および標準誤差 (SEM) を算出した。全てのデータで $P < 0.05$ を有意差ありと判断した。

3. 結果

(1) 第一胃液 pH

肥育中期牛の両試験区の給与飼料に残渣は認められなかった。一方, 肥育後期牛では給餌量から残渣量を除することで採食量および栄養充足量を算出した (Table 3-1)。各肥育期間の両試験区では発熱, 下痢などの臨床症状は認められなかった。

肥育中期牛では HC 区の 24 時間平均 pH および最低 pH が CON 区と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示した。また, HC 区の AUC および pH < 5.6 時間が CON 区と比べ有意 ($P < 0.05$) な高値を示した (Table 3-2)。一方, 肥育後期牛の第一胃液 pH, AUC, pH < 5.6 時間は両区間で有意差は認められなかった (Table 3-2)。肥育中期牛では CON 区および HC 区は pH < 5.6 時間がそれぞれ 3.79 および 10.86 h/day であり, 後期牛の CON 区および HC 区は 17.43 および 16.53 h/day であった。

(2) 第一胃液 VFA, NH₃-N および乳酸濃度並びに LPS 活性値

肥育中期牛では総 VFA 濃度, NH₃-N 濃度および LPS 活性値に両区間の有意差は認められなかった。しかしながら, 肥育後期牛では, HC 区の総 VFA 濃度および乳酸濃度は CON 区と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した (Table 3-3)。

(3) 第一胃液の細菌叢構成

1) 多様性解析

OTUs, 細菌の豊富さを示す指数である Chao1 および多様性を示す指数である PD whole tree, および Shannon について, 各肥育期の両区間で有意差は認められなかった (Table 3-4)。

2) 類似性解析

PCoA では, 肥育中期牛の CON 区および HC 区のプロットは類似していたが, 後期の CON 区および HC 区のプロットは分散していた (Figure 3-1)。

3) 細菌門および細菌属構成比

第一胃液からは 25 種類の細菌門が検出された。肥育中期牛では最も構成比の大きい細菌門は Firmicutes (73.0%), Bacteroidetes (12.2%), Proteobacteria (5.3%) および Euryarchaeota (4.4%) であった。また, 肥育後期牛では Firmicutes (86.3%), Actinobacteria (5.0%), Proteobacteria (2.7%) および Bacteroidetes (2.6%) が最も構成比の大きい細菌門であった (Figure 3-2)。細菌属の中で, 肥育中期牛では *Ruminococcus* (13.1%), *Butyriibrio* (9.0%), *Caloramator* (8.1%) および *Prevotella* (7.9%) が最も構成比の大きい細菌属であり, 肥育後期牛では *Butyriibrio* (20.0%), *Olsenella* (11.9%), *Sharpes* (8.9%) および *Caloramator* (7.4%) が最も構成比の大きい細菌属であった。肥育中期牛の HC 区における *Caloramator* は CON 区と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示し, *Succiniclasticum* は CON 区と比べ有意 ($P < 0.05$) な高値を示した (Table 3-5)。

4) 主要な OTU 構成比

肥育中期牛の主要な OTU は OTU1 (*Caloramator mitchellensis*, 18.5%), OTU3 (*Oscillospira eae*, 13.3%), OTU5 (*Butyriibrio proteoclasticus*, 8.15%) および OTU6 (*Dysgonomonas wimpennyi*, 6.49%) であり, 一方で後期牛の主要な OTU は OTU2 (*Olsenella uli*, 27.1%), OTU1 (18.1%), OTU4 (*Sharpea azabuensis*, 13.4%) および OTU3

(8.01%) であった。加えて、肥育後期牛では HC 区の OTU1 および OTU15 (*Slackia faecicanis*) は CON 区と比較し低値である傾向 ($P < 0.10$) が認められた (Table 3-6)。

4. 考察

肥育牛およびホルスタインでは飼料中の濃厚飼料割合を急増した (40% から 90%) 際に継続した第一胃液 pH の低値と高 AUC が認められたとする報告 (10) や濃厚飼料の多給による第一胃液 pH の低下に伴う総 VFA 濃度の増加が報告されている (32, 95)。一方、ホルスタインを用いた濃厚飼料多給による SARA 誘発実験では、試験 2 週間目に第一胃液 pH の低下幅は最小となり、濃厚飼料増給に対する第一胃環境の適応が認められたと報告されている (104, 105)。今回の試験では肥育中期牛の HC 区で CON 区と比較して 24 時間平均 pH, 最低 pH の有意 ($P < 0.05$) な低値および AUC, pH < 5.6 時間の有意 ($P < 0.05$) な高値が認められたが、後期牛では CON 区と HC 区の間には有意な差は認められず、中期牛では濃厚飼料割合の増加に対し第一胃液 pH の低下および AUC の増加等の反応性の変化が認められたことが示唆された。しかしながら、肥育中期牛の CON 区と HC 区の総 VFA 濃度に有意差は認められなかった。また、本試験では肥育後期牛の CON 区および HC 区の間で第一胃液 pH に有意な変化は認められなかったが、HC 区では CON 区と比較して総 VFA 濃度および乳酸濃度の有意 ($P < 0.05$) な高値が認められた。この結果は Sato (95) の濃厚飼料の多給により総 VFA 濃度および乳酸濃度の増加が認められたとする報告と一致するものであった。また、肥育後期牛では CON 区と HC 区の乳酸濃度に 10 倍程度の大きな差が認められた。本試験の結果より、黒毛和種肥育牛の肥育後期牛では長期的な濃厚飼料多給による酸性基質である VFA や乳酸の産生増加が認められるものの、第一胃液 pH を低値ではあるが安定化する適応能力が機能しているものと考えられた。

細菌叢の多様性について、濃厚飼料を多給した際の第一胃液 pH の低下は細菌叢

の多様性を減少させることが報告されている (30, 88)。しかしながら、本試験では肥育中期牛の CON 区と HC 区を比較した第一胃液 pH の低下 (6.00 – 5.76) は第一胃液 pH の低下により細菌叢多様性が低下したとする以前の報告 (6.52 – 6.10; (78)) と比較し十分な低下であったが、OTUs、細菌叢の豊富さを示す指数である Chao1 および細菌叢の多様性を示す指数である PD whole tree および Shannon は中期牛および後期牛の両区間で有意差が認められなかった。このことから、第 1 章の結果と一致し黒毛和種肥育牛は長期的な高濃厚飼料の給与に対し、細菌叢の多様性を保つことで適応しているものと考えられた。

細菌門構成では Firmicutes が肥育中期牛および後期牛で最も構成比の大きい細菌門であり、次いで肥育中期牛では Bacteroidetes, Proteobacteria および Euryarchaeota の構成比が大きく、後期牛では Actinobacteria, Proteobacteria および Bacteroidetes の構成比が大きかった。過去の報告では乳牛を用いた SARA 誘発試験により第一胃液細菌叢の Firmicutes の構成比が増加したこと (49), およびホルスタインの第一胃液細菌叢では Bacteroidetes が最も、または 2 番目に構成比の大きい細菌門であったと報告している (76)。また、乳牛を用いたアルファルファペレットや穀類の多給による SARA の誘発試験による pH の低下に伴い、Bacteroidetes 等のグラム陰性菌の溶解、減少が認められ (76), 第一胃液細菌叢の Bacteroidetes の構成比が減少したこと (49, 108) が報告されている。それゆえ、本試験では肥育中期牛と比べ SARA がより重度であった後期牛において、Firmicutes の構成比の高値および Bacteroidetes の低値が認められたものと考えられた。しかしながら、以前の SARA 誘発試験 (49, 108) と比較し肥育中期牛および後期牛では両区間の細菌門構成に大きな変化はなく、これは黒毛和種肥育牛における長期的な濃厚飼料多給に対する適応能力であると考えられた。

第一胃液細菌叢の細菌属について、肥育中期牛では *Ruminococcus* が最も構成比が大きく、次いで *Butyrivibrio*, *Caloramator* および *Prevotella* の構成比が大きかつ

た。一方、肥育後期牛では *Butyrivibrio* が最も構成比が大きく、次いで *Olsenella*, *Sharpea* および *Caloramator* の構成比が大きかった。*Ruminococcus* はセルロース分解菌を多く含むが、乳牛では粗飼料主体の給与をした場合と比較し、濃厚飼料を多給した際に構成比が高値を示すことが報告されている (86, 95)。本試験では、肥育中期牛は粗飼料給与が少なく、濃厚飼料多給であったにもかかわらず *Ruminococcus* が最も構成比の大きい細菌属であった。これは *Ruminococcus* が *Ruminococcus bromii* 等のデンプン発酵能を持つ細菌種を含んでおり、ホルスタイン肥育牛では濃厚飼料多給によりそれらの細菌種の割合が増加に伴い *Ruminococcus* の構成比が増加するという報告と一致する (56, 78)。一方、肥育後期牛では *Butyrivibrio* が最も構成比が大きい細菌属であった。*Butyrivibrio* は第一胃内の酪酸の産生 (83)、セルロースやデンプンの利用 (30) および乳酸産生の調節 (48) など、多岐にわたる機能を持つ。本試験では *Butyrivibrio* の構成比に有意差は認められなかったものの、肥育中期牛では HC 区で CON 区と比較し *Butyrivibrio* の構成比が増加し、後期牛では HC 区で CON 区と比べ構成比が減少した。これらのことから、黒毛和種肥育牛の各肥育期における *Butyrivibrio* の役割を理解するためには、より多くの試験を重ねる必要があると考えられた。

Caloramator は Firmicutes 門に属し、グルコース、フルクトース、マルトース、ガラクトースおよびスクロースなどの炭水化物の発酵に関わる細菌属である (88)。本試験では肥育中期牛の *Caloramator* の構成比は CON 区と比較し HC 区で有意 ($P < 0.05$) な低値を示した。第一胃内での *Caloramator* の役割は不明瞭ではあるものの、肥育中期牛の黒毛和種肥育牛の主要な細菌属である可能性が示唆された。

Succiniclasicum はコハク酸の発酵およびプロピオン酸へ変換する作用があることが知られている(107)。本試験では、肥育中期牛において HC 区の *Succiniclasicum* の構成比が CON 区と比べ有意な高値を示し、これは中期でプロピオン酸の構成比が CON 区と比較し HC 区で高値を示したことと関連していると考えられた。この

ことから肥育中期牛の黒毛和種肥育牛では *Succiniclasticum* が濃厚飼料給与量増加に伴うプロピオン酸の産生に関わっている可能性が示唆された。

5. 小括

本試験では黒毛和種肥育牛の肥育中期および後期に濃厚飼料を増給した際の第一胃液 pH の変化、細菌叢構成および多様性の変化を明らかにすることで、中期および後期の黒毛和種肥育牛の濃厚飼料増給に対する第一胃の適応能力の作用機序を解明することを目的とした。本試験では肥育中期および後期の黒毛和種肥育牛をそれぞれ 3 頭ずつ用い、濃厚飼料割合の増給に伴う第一胃液 pH および第一胃液細菌叢の変化について比較した。その結果、肥育中期牛では対照区 (CON 区; 14 日間) と比較し、濃厚飼料多給区 (HC 区; 14 日間) で第一胃液の 24 時間平均 pH および最低 pH の有意 ($P < 0.05$) な低下が認められた。一方肥育後期牛では CON 区および HC 区の第一胃液 pH に有意差は認められなかったが、継続した重度の SARA が両区で認められた。また、肥育後期牛の HC 区では総 VFA 濃度および乳酸濃度が CON 区と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。加えて、肥育中期牛および後期牛の第一胃液細菌叢構成および多様性は類似していたが、中期牛では HC 区の *Prevotella* および *Caloramator* の構成比が CON 区と比較し有意 ($P < 0.05$) に増加、および低下していた。これらのことから、黒毛和種牛は肥育中期と比較し、後期で濃厚飼料割合の増加による第一胃液 pH の変動が制御されていることが示唆された。

Table 3-1. Components of the control and hi-concentrate diet and nutrient supply fed to the Japanese Black beef cattle during the middle and late fattening stages fed control (CON) and high-concentrate (HC) diets.

Items	Middle		Late	
	CON	HC	CON	HC
Components of diet				
Concentrate (kg)	6.0	8.0	6.8	6.3
Rice straw (kg)	1.0	0.5	1.3	0.4
Crude protein (%)	13.3	14.1	13.3	14.0
Total digestible nutrients (%)	76.8	80.1	74.8	81.8
Neutral detergent fiber (%)	30.8	27.0	34.8	20.8
Acid detergent fiber (%)	13.1	10.5	17.2	8.1
Non fibers carbohydrate (%)	46.4	50.3	42.6	58.0
Nutrient supply (%)				
Dry matter	86	111	96	79
Crude protein	130	172	149	126
Total digestible nutrients	109	142	97	87
Calcium	99	127	53	21
Phosphorus	227	301	118	111

Table 3-2. Rumen pH, area under the curve (AUC) and duration of time (pH < 5.6) in Japanese Black beef cattle during the middle and late fattening stages fed control (CON) and high-concentrate (HC) diets.

Items	Middle			Late		
	CON	HC	SEM	CON	HC	SEM
pH						
Maximum	6.58	6.64	0.01	6.43	5.98	0.09
Mean	6.00	5.76*	0.03	5.48	5.48	0.01
Minimum	5.44	5.14*	0.04	4.89	5.09	0.04
AUC (pH × hour, pH < 5.6)	0.64	3.38*	0.29	4.10	3.78	0.28
Duration of time (pH < 5.6, h/day)	3.79	10.86*	1.15	17.43	16.53	1.16

*Indicates the significant ($P < 0.05$) difference between the LC and HC periods in each group.

Table 3-3. Total volatile fatty acid (VFA) concentration and VFA proportions, ammonia nitrogen (NH₃-N), and lactic acid concentration, and lipopolysaccharide (LPS) activity in the rumen liquid fraction in Japanese Black beef cattle during the middle and late fattening stages fed control (CON) and high-concentrate (HC) diets.

Items	Middle			Late		
	CON	HC	SEM	CON	HC	SEM
VFA						
Total VFA (mmol/dl)	6.86	7.25	0.20	12.6	15.3*	0.59
Acetate (%)	66.9	62.9	1.26	57.2	49.7	3.18
Propionate (%)	17.1	20.8	1.49	26.7	36.7	3.80
Butyrate (%)	12.6	12.0	0.61	12.9	9.57	0.94
Others (%)	3.21	4.16	0.26	2.96	3.96	0.35
Acetate : Propionate	3.94	3.17	0.28	2.37	1.47	0.34
NH ₃ -N (mg/dl)	8.85	9.73	0.80	10.4	12.9	1.81
Lactic acid (g/l)	0.013	0.014	0.00	0.018	0.146*	0.03
LPS ($\times 10^3$ EU/ml)	10.01	16.21	2.65	7.63	5.80	3.13

*Indicates the significant ($P < 0.05$) difference between the LC and HC periods in each group.

Table 3-4. Bacterial diversity of the rumen liquid fraction in Japanese Black beef cattle during the middle and late fattening stages fed control (CON) and high-concentrate (HC) diets.

Items	Middle			Late		
	CON	HC	SEM	CON	HC	SEM
OTUs ¹⁾	203	160	10	100	81	12
PD whole tree ²⁾	21.5	17.8	0.8	13.3	10.8	1.2
Chao1 ³⁾	384	300	20	179	137	22
Shannon index ⁴⁾	6.66	6.15	0.11	4.95	4.09	0.33

¹⁾ operational taxonomic units, ²⁾ phylogenetic diversity whole tree, indicate the species diversity, ³⁾ Chao1 indicate the species richness, ⁴⁾ Shannon index represents the species evenness

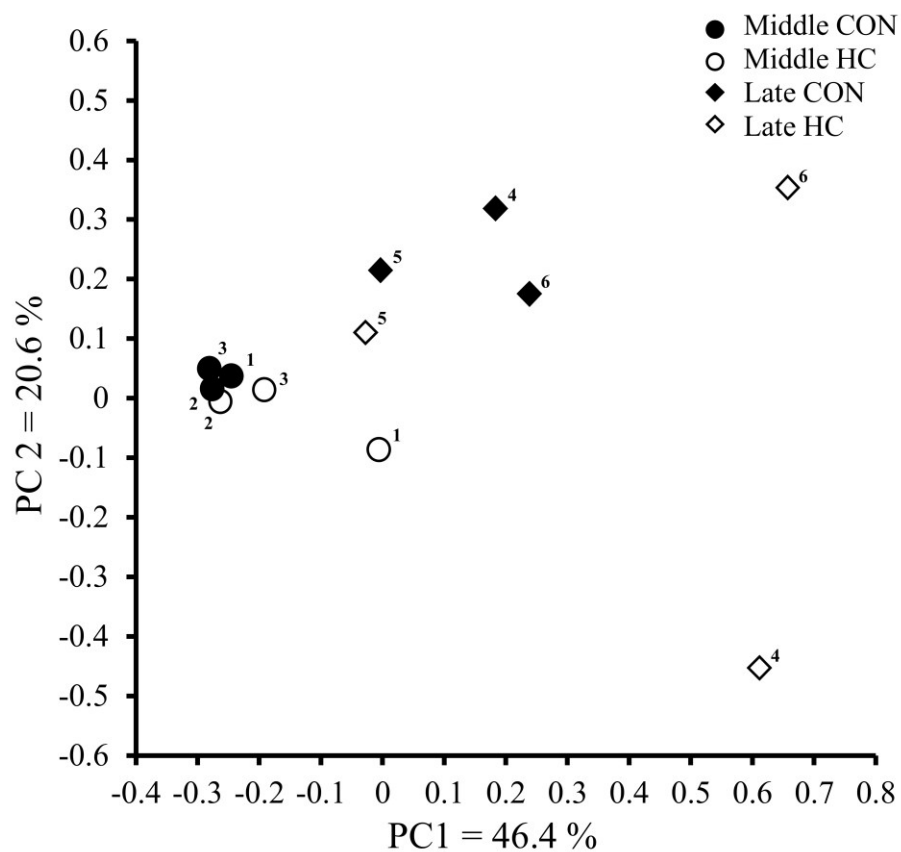


Figure 3-1. Principal coordinate analysis plots generated from the QIIME visualizations of the rumen liquid fraction of Japanese Black beef cattle during the middle and late fattening stage fed control (CON) and high-concentrate (HC) diets. PC1 and PC2 are principal components 1 and 2, respectively.

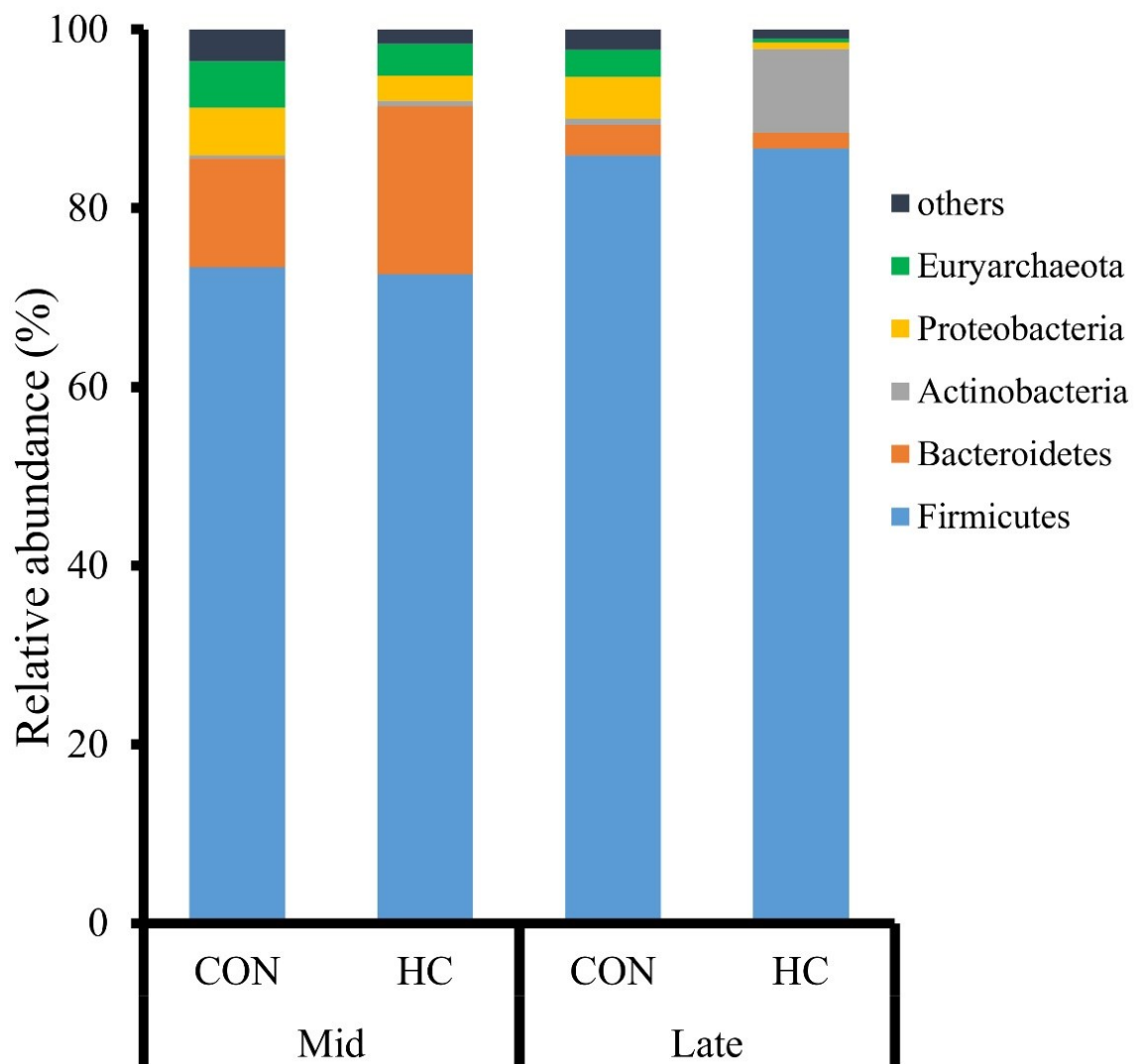


Figure 3-2. Relative abundances of the major bacterial phyla in the ruminal liquid fraction in Japanese Black beef cattle during the middle and late fattening stages fed control (CON) and high-concentrate (HC) diets.

Table 3-5. Mean relative abundances (> 1% of total sequences) of the major bacterial genera in Japanese Black beef cattle during the middle and late fattening stages fed control (CON) and high-concentrate (HC) diets.

Items		Middle			Late		
		CON	HC	SEM	CON	HC	SEM
Genus	<i>Butyribivrio</i>	6.25	11.7	1.35	21.8	18.1	2.84
	<i>Ruminococcus</i>	14.2	11.9	1.70	4.44	7.05	2.06
	<i>Caloramator</i>	10.6	5.52 [*]	0.32	12.4	2.34	2.88
	<i>Olsenella</i>	0.08	1.01	0.40	11.0	12.7	3.25
	<i>Sharpea</i>	0.80	0.82	0.37	0.61	17.2	7.43
	<i>Prevotella</i>	5.60	10.1 [†]	1.50	2.72	0.40	1.08
	<i>Oscillospira</i>	6.08	6.13	0.66	3.38	2.48	0.81
	<i>Mogibacterium</i>	4.18	3.02	0.43	8.39	2.49 [†]	1.74
	<i>Succiniclasticum</i>	4.25	7.20 [*]	0.97	0.25	0.86	0.18
	<i>Methanobrevibacter</i>	5.19	3.61	0.79	3.01	0.43	0.77
	<i>Slackia</i>	1.47	1.41	0.15	6.46	3.56	1.15
	<i>Blautia</i>	2.73	2.43	0.19	2.15	2.61	0.46
	<i>Thermicanus</i>	3.97	1.92	0.52	1.80	0.78 [†]	0.37
	<i>Clostridium</i>	2.98	2.45	0.26	0.88	1.33	0.31
	<i>Bifidobacterium</i>	0.09	0.37	0.16	0.60	9.11	4.02
	<i>Dysgonomonas</i>	1.75	3.56	0.84	0.09	0.29	0.06
	<i>Alkaliphilus</i>	2.23	0.36	0.25	1.75	0.89	0.26

*Indicates the significant ($P < 0.05$) difference between the LC and HC periods in each fattening stage.

[†]Indicates the trend ($P < 0.10$) towards significance between the LC and HC periods in each fattening stage.

Table 3-6. Mean relative abundances (> 1% of total sequences) of the major bacterial OTUs in Japanese Black beef cattle during the middle and late fattening stages fed control (CON) and high-concentrate (HC) diets.

Items		Middle			Late		
		CON	HC	SEM	CON	HC	SEM
OTU1	<i>Caloramator mitchellensis</i>	24.8	12.2	7.56	29.1	7.01 [†]	7.37
OTU2	<i>Olsenella uli</i>	0.23	2.41	0.54	27.4	26.7	11.0
OTU3	<i>Oscillospira eae</i>	13.1	13.3	5.41	8.68	7.33	3.27
OTU4	<i>Sharpea azabuensis</i>	0.03	1.62	0.34	1.23	25.5	5.46
OTU5	<i>Butyrivibrio proteoclasticus</i>	6.05	10.2	3.33	1.12	1.71	0.58
OTU6	<i>Dysgonomonas wimpennyi</i>	4.46	8.52	2.65	0.27	0.78	0.21
OTU7	<i>Alkaliphilus crotonatoxidans</i>	4.00	3.26	1.48	0.55	2.22	0.56
OTU8	<i>Parabacteroides goldsteinii</i>	3.28	4.08	1.50	0.07	1.53	0.33
OTU9	<i>Sedimentibacter hydroxybenzoicus</i>	2.83	3.77	1.35	0.62	0.31	0.19
OTU10	<i>Prevotella ruminicola</i>	0.40	6.17	1.34	0.25	0.22	0.10
OTU11	<i>Blautia wexlerae</i>	1.88	1.12	0.61	1.94	0.76	0.55
OTU12	<i>Longilinea arvoryzae</i>	4.32	0.84	1.05	0.20	0.31	0.11
OTU13	<i>Selenomonas infelix</i>	1.04	3.48	0.92	0.45	0.57	0.21
OTU14	<i>Clostridium alkalicellulosi</i>	2.29	1.63	0.80	0.67	0.45	0.23
OTU15	<i>Slackia faecicanis</i>	0.82	0.74	0.32	2.89	0.54 [†]	0.70
OTU16	<i>Blautia coccoides</i>	1.75	1.03	0.57	0.67	1.22	0.39
OTU17	<i>Catonella morbi</i>	0.00	0.02	0.00	0.24	4.30	0.93
OTU18	<i>Eggerthella sinensis</i>	0.82	0.54	0.28	2.48	0.62	0.63

*Indicates the significant ($P < 0.05$) difference between the LC and HC periods in the Mid group.

第4章 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化

1. 序論

濃厚飼料の多給は肥育牛や乳牛における生産性の向上を目的とした飼養方法である。しかしながら、発酵性の炭水化物の多給により第一胃内の VFA および乳酸などの有機酸の産生が増加し (2, 76) , その結果として第一胃液 pH が低下することで SARA や ARA が発生する (76)。第一胃液 pH を一定の水準に保つことは安定した発酵、細菌叢構成、吸収機能などを維持するために重要であり (76, 78, 109) , 第一胃液 pH は微生物による有機酸などの産生および第一胃細菌叢の相互作用による吸収、中和、除去作用等によりバランスが保たれている (2, 6, 18, 23)。また、短期間および中期間の SARA 誘発試験により、第一胃粘膜上皮の構造、遺伝子発現に変化が認められたことが報告されており (51, 105, 106), 加えて、乳牛を用いた3週間の高濃厚飼料 (65%) 給与試験には、第一胃乳頭の構造不整や角質層における未分化細胞の出現が報告されている (104)。また、TMR を給与した泌乳初期の乳牛では第一胃粘膜上皮の脱落が認められ、加えて適応機能として乾乳期と比較した上皮成長因子 (*EGF*) シグナリング、トランスフォーミング増殖因子 β (*TGFB*) シグナリングおよびインスリン様成長因子 (*IGF*) 等の DEGs が認められた (106)。また、Kim et al. (51) は離乳期の子牛にカーフスターターのみを給与したことで第一胃は重度の酸性環境となり、第一胃粘膜のバリア機能に障害を生じるとともに、第一胃粘膜上皮細胞の分化に関係する *TGFB1* などの成長因子およびシグナリングパスウェイ (*EGF* および *IGF* 結合タンパク質) などに変動が認められたと報告して

いる。

黒毛和種肥育牛は日本固有の品種であり，筋間脂肪を蓄積する能力が他の品種よりも著しく高いことが特徴である (13)。黒毛和種肥育牛は通常 10 カ月齢から 30 カ月齢までの 20 カ月間肥育され，乳牛での中程度の濃厚飼料（濃厚飼料割合 40% - 70%）または TMR の給与と比較し継続した濃厚飼料の多給（濃厚飼料割合 70% - 90%）が行われる (81, 106)。第 1 章，第 2 章および第 3 章の試験により黒毛和種肥育牛の長期的な高濃厚飼料に伴う前胃液 pH，前胃液性状，細菌叢構成の変化および適応能力等について知見が認められたものの，第一胃環境の変化が第一胃粘膜上皮における遺伝子発現量に与える影響についての知見は得られていない。

それゆえ，本試験では黒毛和種肥育牛を用いて各肥育期における第一胃粘膜上皮の遺伝子発現量の変化および第一胃液 pH，第一胃液性状との交互作用を明らかにし，第一胃環境の変化に対する第一胃粘膜の適応能力の分子機構を解明するために，第一胃粘膜上皮の遺伝子発現量を解析した。

2. 材料および方法

(1) 供試牛と飼養管理

供試牛および飼養管理方法は第 1 章と同様である。

(2) 採材

第一胃粘膜上皮は肥育前期 (15 カ月齢)，中期 (21 カ月齢) および後期 (29 カ月齢) に生検トレパン (BP-80F, カイインダストリーズ, 岐阜) を用いて第一胃腹囊底部の無線伝送式 pH センサー付近の複数箇所より採取した。第一胃粘膜上皮は採材後ただちに冷却したリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を用いて 3 回洗浄し，-80℃で保存した。

(3) 測定項目および方法

1) マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現解析

総 RNA は Kim et al. (51)の方法を用いて抽出した。すなわち、破碎したサンプル 50 ~ 100 mg に対し約 2 ml の RNA 抽出試薬 (TRIzol; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を加えホモジナイズした後、室温で 5 分間静置した。その後 TRIzol 試薬付属説明書の手順に従い総 RNA を抽出し、遺伝子発現解析に用いた。抽出した RNA は RNeasy RNA Clean-up Kit (QIAGEN, Valencia, CA, USA) を用いて増幅した。総 RNA は NanoDrop ND-1000 分光光度計 (NanoDrop Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて定量し、2100 Bioanalyzer および RNA 6000 Nano LabChip Kits (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) を用いて品質の確認を行った。RNA Integrity Number (RIN) は 7.4 ± 0.4 (平均値および標準誤差) であった。

マイクロアレイ法は Kizaki et al. (54) の方法に従い行った。すなわち、15,268 のウシ遺伝子を搭載したウシ・オリゴ DNA マイクロアレイ (GPL22092, Agilent Technologies, USA) を使用し、蛍光標識 (cyanine 3) した相補的 cRNA プローブを Gene Expression Hybridization Kit and Gene Expression Wash Pack Kit (Agilent Technologies) を用いサンプルへハイブリダイゼーションし、また洗浄を行った。配列は Agilent Microarray scanner (Agilent Technologies) を用いてスキャンを行った。Feature Extraction ver 9.5 (Agilent Technologies) を用いて画像解析およびデータ抽出を行った。マイクロアレイのデータは正規化アルゴリズムを用いる目的で GeneSpring 12.0 (Agilent Technologies, USA) へインポートした。本試験のマイクロアレイのデータは Gene Expression Omnibus (GEO) データベースに保存した。GEO の登録番号は Platform, GPL22092; samples, GSM 3901089 – GSM3901115; series, GSE133152 であった。

DEGs のパスウェイおよびネットワーク解析には IPA ソフトウェア (Ingenuity System, Redwood City, CA, USA) を用いた。DEGs のリストは GeneSpring 12.0 (Agilent Technologies) を用いて作成し, fold changes (FC) ≥ 2.0 以上の遺伝子を IPA へアップロードした。DEG 解析には IPA knowledge base を用い, 標準経路および上流調節因子を解析した。

2) リアルタイム PCR 法による特定遺伝子発現解析

マイクロアレイ解析により up-regulated または down-regulated と判定された遺伝子のうち 9 遺伝子を抽出し, qPCR を用いた確証性の検証を行った。総 RNA サンプルは TUBRO DNase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて混入した DNA を除去した。総 RNA (800 ng) は High-Capacity cRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) を用いて逆転写を行い, cDNA を合成した。qPCR には iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA) および StepOne™ Plus Real-Time PCR system (Applied Biosystems) を用い, Kim et al. (51) の方法に従い実施した。プライマーは Primer Express software (Applied Biosystems) を用いてデザインした (Table 4-1)。qPCR の結果はグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (*GAPDH*), リボソームタンパク質 L27 (*RPL27*) および β アクチン (*ACTB*) を参照遺伝子に設定し the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (63) を用いて相対発現量として算出した。本試験の qPCR において参照遺伝子とした *GAPDH*, *RPL27* および *ACTB* について, それぞれの発現量に差異は認められなかった。全ての qPCR は MIQE ガイドライン (The minimum information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments, (12)) に従い行った。

(4) 統計解析

第一胃液 pH および第一胃液 VFA, $\text{NH}_3\text{-N}$ および乳酸濃度並びに LPS 活性値についての統計解析方法は第 1 章と同様である。

マイクロアレイにより得られたデータの肥育期間についての比較は paired Student's *t*-tests with the Benjamini-Hochberg FDR multiple testing correction (FDR 補正 $P < 0.05$) により行い, GeneSpring 12.0 (Agilent Technologies) を用いて集計した。Fold change (FC) は肥育中期と前期 (first period) , 後期と中期 (second period) および後期と前期 (total period) それぞれで算出した。PCA プロットは devtools package with microarray data in R ver. 3.3.2 ([http:// www.r -project.org](http://www.r-project.org); R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) を用いて解析した。各データは $P < 0.05$ を有意差ありとし, $P < 0.10$ を有意な傾向ありとした。

3. 結果

(1) マイクロアレイ法による網羅的遺伝子発現

1) 主要変動遺伝子

各肥育期間の第一胃粘膜上皮における DEGs (FDR 補正 $P < 0.05$) はそれぞれ 3,570 (first period) , 3,856 (second period) および 2,477 (total period) であり, そのうち $|FC| > 2$ であったものはそれぞれ 873DEGs (315 upregulated, first period) , 1,216DEGs (656 upregulated, second period) および 115DEGs (34 upregulated, total period) であった。22 の主要遺伝子が全ての period で変動 (FDR 補正 $P < 0.05$, $|FC| > 2$) しており, first period で upregulated または downregulated であった遺伝子は second period および total period ではそれぞれ downregulated または upregulated と判定された (table 4-2)。

2) 輸送関連遺伝子の発現

第一胃粘膜上皮における輸送関連遺伝子の変動は 22 の soluble carrier (SLC) family メンバーで認められ, first period (2 upregulated, 11 downregulated) , second period (12 upregulated, 7 downregulated) および total period (1 upregulated, 2 downregulated) それぞれで変動が認められた (Table 4-3)。

3) 主座標分析

PCA ではそれぞれの肥育期におけるプロットは類似していたが、肥育中期と比較して前期および後期のプロットは分散していた。(Figure 4-1)。

4) 発現変動遺伝子の機能とネットワーク解析

DEGs の標準経路は IPA ソフトウェアを用い同定した ($P < 0.05$, $z\text{-score} \geq 2$ or ≤ -2)。First period では活性化した標準経路はなかったが、酸化的リン酸化 (Oxidative Phosphorylation) パスウェイが最も抑制 ($z\text{-score} = -3.32$, $P = 3.72 \times 10^{-3}$) されていた (Table 4-4, Figure 4-2A)。一方, second period では酸化的リン酸化パスウェイが最も活性化 ($z\text{-score} = 2.50$, $P = 6.61 \times 10^{-3}$) されており, 抑制されたパスウェイは認められなかった (Table 4-4)。Table 4-5 は first period (11 downregulated) および second period (11 upregulated, 2 downregulated) における酸化的リン酸化パスウェイに組み込まれている遺伝子を示している。

上流制御因子解析には first period, second period および total period において有意な活性化または抑制された DEGs ($P < 0.05$, $z\text{-score} \geq 2$ or ≤ -2) を用いた (Figure 4-3)。First period では, *CD437* ($z\text{-score} = 3.67$, $P = 2.69 \times 10^{-6}$) が最も活性化された上流制御因子であり, nuclear factor, erythroid 2 like 2 (*NFE2L2*; $z\text{-score} = -3.99$, $P = 8.71 \times 10^{-6}$) が最も抑制された上流制御因子であった。Second period では genistein ($z\text{-score} = 4.61$, $P = 6.93 \times 10^{-5}$) および immunoglobulin G (*IgG*; $z\text{-score} = -3.84$, $P = 2.64 \times 10^{-4}$) が最も活性化および抑制された上流制御因子であった。また, total period では *PD98059* ($z\text{-score} = 2.82$, $P = 2.78 \times 10^{-3}$) および MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor (*MYC*; $z\text{-score} = -2.39$, $P = 2.97 \times 10^{-2}$) が最も活性化および抑制された上流制御因子であった。First period で有意に活性化および抑制された上流制御因子は second period ではそれぞれ抑制および活性化していた (Figure 4-3)。

(2) リアルタイム PCR 法による特定遺伝子発現

マイクロアレイ法と qPCR 法による 9 遺伝子の遺伝子発現量の比較は Supplementary Figure S1 に示した。全ての遺伝子で発現量の増加および減少方向は一致していた。

4. 考察

第 1 章では黒毛和種肥育牛の長期的な濃厚飼料多給による第一胃液 pH, 第一胃性状の変化が明らかになった。本試験では同試験牛で第一胃粘膜上皮の遺伝子発現の変化について調査を行った。人では胃酸の低酸状態は急性および慢性炎症並びに胃体部および幽門部の上皮化生と有意な相関があると報告されており (66), 牛では第一胃液 pH が生理的な水準 (5.8-6.5; (23)) よりも低値になることにより炎症反応が惹起され (88), 第一胃粘膜上皮の構造および遺伝子発現の変化が認められることが報告されている (51, 104, 106)。第 1 章では長期的な濃厚飼料多給により, 肥育期の進行に伴い第一胃液 pH が徐々に低下し, pH < 5.6 時間, pH < 5.8 時間が増加することが明らかになり, 肥育中期および後期での SARA の発症が確認された。また, 肥育後期では第一胃内で VFA と比較し 10 倍程度の強酸である乳酸 (pKa 4.9 vs. 3.9; 76) の濃度が他の肥育期と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。それゆえ, 肥育後期における第一胃液 pH の低下は乳酸濃度の増加が一因であることが示唆された。

輸送関連遺伝子 (SLC family) は第一胃粘膜上皮の吸収機能を制御し, 第一胃液 pH を制御する要素と考えられており, 高濃厚飼料の給与に起因する第一胃液 pH の低下により monocarboxylate transporter (*MCT1*; 6), sodium hydrogen exchanger isoform 3 (*NHE3*; 120) および downregulated in adenoma (*DRA*; 9) などの遺伝子発現が増加することが報告されている。しかしながら, 本試験では 22 の SLC family 遺伝子の有意 ($P < 0.05$) な変動が認められたものの, first period では SLC family

遺伝子の多くが downregulated (11/13) と判定され、一方で second period では多くが upregulated (12/19) と判定された。例として、first period では *SLC9A6* (*NHE6*) および *SLC26A3* (*DRA*) が downregulated (FC = -4.08, -6.71) と判定されたが、second period では upregulated (FC = 4.08, 10.80) と判定された。これらの結果により first period では第一胃粘膜上皮の吸収機能は SARA 環境により機能障害を呈し、second period では第一胃粘膜上皮の修復機能により輸送関連遺伝子の発現が増加したものと考えられた。

興味深いことに、SARA の要因が異なる first period (肥育前期 vs. 中期) と second period (中期 vs. 後期) において、DEGs および解析結果である標準経路、上流制御遺伝子の変動は全く逆の結果であった。それに加え、PCA では肥育中期が前期および後期から離散していることから、長期的な濃厚飼料多給の影響が最も強いことが示唆された。LaMonte et al (59) はアシドーシスによる活性酸素 (ROS) 由来のストレス増加を緩和するためにペントースリン酸経路、グルタミノリシスなどの細胞代謝に変動が認められることを報告している。また、高デンプン飼料の給与により酸化ストレスが増加した結果、ROS の毒性を緩和するために酸化的リン酸化の活性が変動することが報告されている (38)。それに加え、VFA、特に酪酸は酸化経路により第一胃粘膜上皮細胞内で異化され、ROS を產生することが知られている (85)。しかしながら、活性酸素除去作用を担うスーパーオキシドジスムターゼ (38) に関わる mitochondrial superoxide dismutase 2 (*SOD2*; FC = -2.29, $P = 2.16 \times 10^{-4}$) が first period において downregulated と判定され、一方 second period では *SOD1* (FC = 1.52, $P = 1.77 \times 10^{-3}$) と共通し upregulated (FC = 2.32, $P = 5.24 \times 10^{-5}$) と判定された。これらの結果は有意 ($P < 0.05$) な変動が認められた標準経路である "Mitochondrial Dysfunction" ($P = 2.69^{-7}$; データ非掲載) に関連する NADH dehydrogenase subunit 6 (*ND6*; 115) が first period において最も有意な upregulated と判定されたことから裏付けされる。以前の報告より、SARA を発

症している肥育中期では過度の酸化ストレスがかかることが予測されるが (1, 85, 101) , 本試験の中期では第一胃粘膜上皮細胞の酸化ストレスに対しての反応性が、以前の乳牛を用いた短期間 (17 日間) の SARA 誘発試験の結果 (38) と比較し微弱であることが示唆された。また、これらの結果から肥育中期では酸化ストレスの処理等のミトコンドリアの代謝障害が予測され、黒毛和種肥育牛における、前期と比較した中期の第一胃粘膜上皮細胞の酸化傷害に対する脆弱性が示唆された (42)。また、DEGs のデータ解析結果についてもミトコンドリアの機能障害を示唆するものであった。例として、*firsto period* において上流制御因子である *PPARGC1A* (*PGC-1 α* ; 73) の抑制を調節する機能をもつ標準経路である “Oxidative Phosphorylation” が最も抑制された経路であった。それに加え、*PGC-1* の発現量の低下 (40) および *PCG-1 α -responsive* 遺伝子の低下 (73) に伴う酸化的リン酸化機能の低下は強いインスリン抵抗性をもたらすことが報告されており、これは本試験において標準経路である “Insulin Receptor Signaling” が抑制された結果と一致するものであった。それゆえ、長期間の濃厚飼料多給による強い酸性環境および VFA 代謝が第一胃粘膜上皮における過度の酸化ストレスを誘発し、ミトコンドリアにおける酸化的リン酸化の機能障害および細胞の生存因子である (115) *ubiquinone oxidoreductase subunits* の発現量低下を引き起こしたものと考えられた。これらの結果より肥育中期では酸性刺激による細胞生存機能に関する機能障害および細胞傷害に対する脆弱性が示唆された。

Second period では SARA 誘発の要因の変化に伴い第一胃粘膜上皮のトランスクリプトームによる細胞機能の修復が認められた。また、肥育後期での乳酸濃度の有意 ($P < 0.05$) な増加に伴い、第一胃粘膜上皮細胞の酸性刺激に対する反応性が中期とは異なることが示唆された。Riemann et al (91) は細胞外アシドーシスにより継続した細胞内 pH (*pHi*) の低下および組織の低酸素状態が認められ、腫瘍細胞の転写調節因子および転写活性化因子のリン酸化が増加することを報告してい

る。乳酸と腫瘍の関係性について注目され始めたのは近年のことではあるが、乳酸は腫瘍への酸素供給、血管新生および転移を促進することで腫瘍の増殖、進行に直接的に関与していることが知られている (22)。例として、細胞外の乳酸アシドーシスは pH の低下および細胞内乳酸濃度の増加を招き、さらに 4T1 (マウス乳癌) 細胞に対するグルコース除去作用を阻害することが報告されている (111)。それに加え、乳酸アシドーシス下では非乳酸アシドーシスの状態と比較し複数の細胞系における ATP 産生の酸化的リン酸化割合の増加を招くことが知られており (113) , これは second period において “Oxidative Phosphorylation” が活性化したことと一致する。本試験の結果から第一胃内および細胞内乳酸濃度間の正の相関関係を明らかにするためには更なる検証が必要ではあるが、第一胃内乳酸濃度の有意 ($P < 0.05$) な増加が第一胃粘膜上皮細胞の遺伝子発現量に少なくとも一部は影響を与え、ミトコンドリア内の酸化的リン酸化パスウェイを修復することで細胞生存能力を向上させていることが示唆された。

また、上流制御因子である *PD98059* (a mitogen-activated protein kinases kinase inhibitor; 3) , *sirolimus* (immunosuppressant that inhibits cell cycle progression; 99) , *bexarotene* (anti-cancer action by inducing T-cell lymphoma cell apoptosis; 117) および *KDM5B* (critical regulator of genome stability and DNA repair; 61) の活性化および *MYC* (transcription regulator suppressed by intracellular butyrate; 112) の抑制が全ての period で認められ、これらのことにより黒毛和種肥育牛の全ての肥育期で長期的な濃厚飼料多給に対する中程度の細胞修復機能が働いていることが示唆された。

5. 小括

本試験では黒毛和種肥育牛を用いて各肥育期における第一胃粘膜上皮の遺伝子発現量の変化および第一胃液 pH、第一胃液性状との交互作用を明らかにし、第一胃環境の変化に対する第一胃粘膜の適応能力の分子機構を解明するために、第一胃

粘膜上皮の遺伝子発現量を解析した。本試験では9頭の黒毛和種肥育牛を用いてマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子解析を行った。その結果、輸送関連遺伝子である SLC family 遺伝子は、肥育中期に前期に比べて down-regulated(11/13) , 後期中期に比べ up-regulated(12/19) と判定されるものが多く、VFA 輸送体および SCFA-/HCO₃⁻交換輸送体である *SLC26A3* 遺伝子の発現量は、中期に前期に比べて有意 (P < 0.05) に低下し、後期には中期に比べて有意 (P < 0.05) に増加した。また、肥育前期および中期では第一胃粘膜上皮の酸化的リン酸化パスウェイが抑制され、一方後期では乳酸を基質とした酸化的リン酸化パスウェイおよび細胞生存機能の修復が認められた。これらのことから、肥育後期の黒毛和種牛では第一胃粘膜上皮からの VFA 吸収と第一胃内への重炭酸イオン分泌が促進され、長期間の濃厚飼料多給に適応している可能性が示唆された。

Table 4-1. Gene symbols and sequences of the primers used for quantitative real-time PCR.

Gene Product	GenBank access No.	Primer (5'-3')	
		Forward	Reverse
<i>GAPDH</i>	NM_001034034	GCCGATGCCCCCATGT	CAGGAGGATTGCTGACAAATC
<i>ACTB</i>	NM_173979	GGCCGAGCGGAAATCG	GCCATCTCCTGCTCGAAGTC
<i>PRL27</i>	NM_001034051	GCCCGACGAGAGGCAAA	AACCGCAGCTTCTGGAAGAA
<i>PRL21</i>	NM_001191412.1	GCACACTTTGTGAGGACCAATG	TACACCCATCAGGCCATGAA
<i>LAMP3</i>	NM_001102135	GATCCCTGCAGTGGTGATGTC	TGCTTGCATGTGACTGTTGTAATG
<i>ENPP3</i>	NM_001075923	GACTGCTGCTGGGACTTTGAA	GTCTCCCCACAGCGAAATTTAT
<i>BNIP1</i>	NM_001079621	TCAAGGTGACAGGAAGACTTGTGA	CTCCTTGATGCCGAGATCCA
<i>DHTKD1</i>	NM_001205838	GTACCGGCTGTGGGAATCG	GGACGTCATGGGTTGAAGGT
<i>PRSI9</i>	NM_001037467.2	ATGTCAACCAGCAGGAGTTCGT	CACCCATTGAGGGACTTTTCAG
<i>POLR2K</i>	NM_001037623.3	TTTGGAGAGGCCTAGAGATTTCTC	TCATTGGCTGCTGCTTTGG
<i>SLC26A3</i>	NM_001083676	AAAAGTTGTCCGCTGTTCTG	TGCTGGCAACCAAGATGCTA
<i>ZNF33B</i>	NM_001075810	AGATGACACCACCTTATGACAGA	CCAACCTTTTCACTCTTCTTTCACTTT

Table 4-2. Common differentially expressed genes (fold change ≥ 2 , FDR corrected $P < 0.05$) identified in comparisons of the early and middle, middle and late, and early and late stages.

Gene Symbol	Fold Change			Gene Name	Accession No.
	Middle vs. Early	Late vs. Middle	Late vs. Early		
<i>ND6</i>	5.84	-11.9	-2.04	NADH dehydrogenase subunit 6	
<i>FNDC5</i>	4.07	-10.1	-2.47	fibronectin type III domain containing 5	NM_001105421
<i>DHTKD1</i>	3.68	-15.8	-4.29	dehydrogenase E1 and transketolase domain containing 1	NM_001205838
<i>NBN</i>	3.09	-7.87	-2.55	nibrin	BC102801
<i>RPL3</i>	3.03	-6.66	-2.20	ribosomal protein L3	AB098822
<i>IPO5</i>	3.00	-8.95	-2.98	importin 5	NM_001037817
<i>LRFN2</i>	2.72	-15.8	-5.82	leucine rich repeat and fibronectin type III domain containing	NM_001192595
<i>UBE2E3</i>	2.64	-5.32	-2.01	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 3	NM_001079783
<i>TLR2</i>	2.63	-6.96	-2.65	toll-like receptor 2	NM_174197
<i>YARS2</i>	2.61	-8.66	-3.32	tyrosyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial	NM_001098088
<i>RHOU</i>	2.38	-44.9	-18.9	ras homolog gene family, member U	NM_001098147
<i>PRNP</i>	2.32	-4.69	-2.02	prion protein	NM_001271626
<i>CHRM3</i>	2.19	-5.32	-2.42	cholinergic receptor, muscarinic 3	NM_174270
<i>ESF1</i>	2.10	-4.76	-2.27	ESF1, nucleolar pre-rRNA processing protein, homolog (S. cerevisiae)	NM_001192772
<i>TOX2</i>	2.09	-4.28	-2.05	TOX high mobility group box family member 2	NM_001206688
<i>HNRNPU</i>	2.05	-4.21	-2.05	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)	NM_001076920
<i>CYP46A1</i>	-2.21	8.92	4.03	cytochrome P450, family 46, subfamily A, polypeptide 1	NM_001076810
<i>NOV</i>	-2.31	4.89	2.11	nephroblastoma overexpressed gene	NM_001102382
<i>SMPD2</i>	-2.52	5.24	2.08	sphingomyelin phosphodiesterase 2, neutral membrane	NM_001075383
<i>RAB19</i>	-3.04	7.11	2.34	RAB19, member RAS oncogene family	NM_001035040
<i>SLA2</i>	-4.11	10.9	2.65	Src-like-adaptor 2	NM_001035294
<i>LAMP3</i>	-5.16	11.8	2.28	lysosomal-associated membrane protein 3	NM_001102135

Table 4-3. Differentially expressed genes (FDR corrected $P < 0.05$, fold change ≥ 2) encoding rumen epithelial transporters in the comparisons in Japanese Black beef cattle during the early, middle, and late fattening stages.

Gene Symbol	Fold Change			Gene Name	Accession No.
	Middle vs. Early	Late vs. Middle	Late vs. Early		
<i>SLC5A12</i>	2.24	-2.54		solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 12	NM_001101059
<i>SLC6A8</i>	-2.01			solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, creatine), member 8	NM_174611
<i>SLC7A6OS</i>		-2.05		solute carrier family 7, member 6 opposite strand	NM_001075567
<i>SLC9A6</i>	-4.08	4.08		solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 6	NM_001101146
<i>SLC10A5</i>	2.72			solute carrier family 10, member 5	XM_005194549
<i>SLC22A5</i>		-3.68		solute carrier family 22 (organic cation/carnitine transporter), member 5	BT025403
<i>SLC22A8</i>	-3.50	6.75		solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8	NM_001206246
<i>SLC22A18</i>	-2.49	2.20		solute carrier family 22, member 18	NM_001083374
<i>SLC23A3</i>		-2.32		solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 3	NM_001191386
<i>SLC25A5</i>	-3.30	2.99		solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 5	NM_174659
<i>SLC25A6</i>	-5.59	4.80		solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; adenine nucleotide translocator), member 6	NM_174660
<i>SLC25A11</i>	-2.48	2.38		solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; oxoglutarate carrier), member 11	NM_174671
<i>SLC25A17</i>		2.10		solute carrier family 25 (mitochondrial carrier; peroxisomal membrane protein, 34kDa), member 17	NM_001045948
<i>SLC26A3</i>	-6.38	10.8		solute carrier family 26, member 3	NM_001083676
<i>SLC28A3</i>	-6.71	10.2		solute carrier family 28 (sodium-coupled nucleoside transporter), member 3	NM_001192167
<i>SLC29A4</i>		2.45	2.32	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4	NM_001193196
<i>SLC35A5</i>	-2.73	2.52		solute carrier family 35, member A5	NM_001076025
<i>SLC35C1</i>		-2.09		solute carrier family 35, member C1	NM_001101210
<i>SLC35F5</i>	-2.63	3.83		solute carrier family 35, member F5	NM_001101242
<i>SLC39A7</i>		-2.46		solute carrier family 39 (zinc transporter), member 7	NM_001076237
<i>SLC39A11</i>		-2.17	-2.92	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 11	NM_001076390
<i>SLCO2A1</i>			-2.08	solute carrier organic anion transporter family, member 2A1	NM_174829

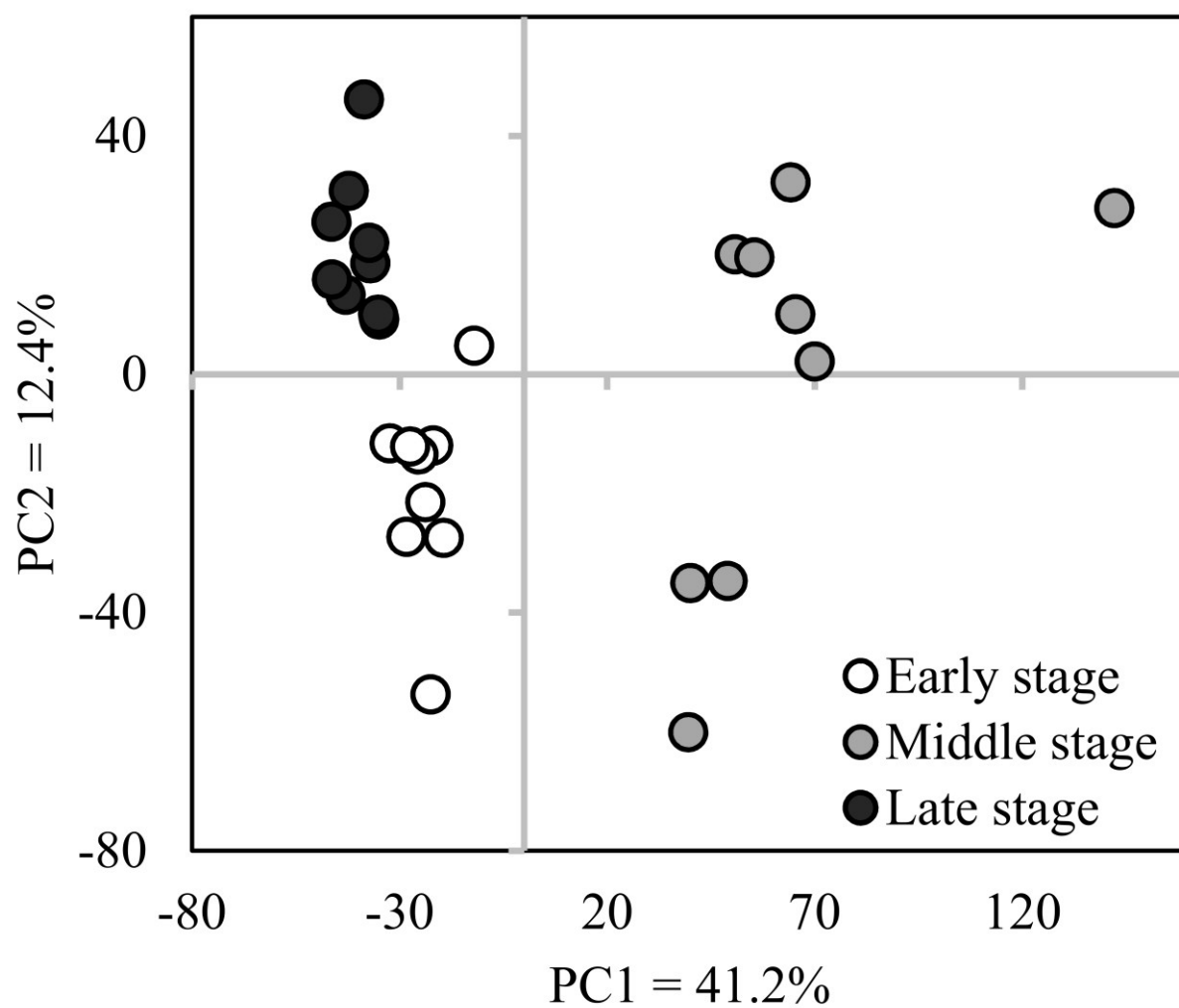


Figure 4-1. Principal component analyses plots of Japanese Black beef cattle during the early (white), middle (gray), and late (black) fattening stages. PC1 and PC2 are principal components 1 and 2, respectively.

Table 4-4. Canonical pathways activated (z-score ≥ 2) and inhibited (z-score ≤ -2) generated by Ingenuity Pathway Analysis (IPA) in comparisons of the early and middle fattening stages and late and middle fattening stages.

Canonical Pathways	-log(p-value)	zScore ¹	Ratio	Molecules
Middle vs. Early stages				
iNOS Signaling	2.10	-2.00	0.133	FOS, IFNGR1, IFNGR2, CALML5, JAK1, LBP
CCR5 Signaling in Macrophages	1.93	-2.00	0.096	GNAI1, FOS, GNG5, CCL5, CD3G, GNG7, CALML5, GNB1, CACNG1
IL-22 Signaling	1.87	-2.00	0.167	IL10RB, AKT1, IL22RA1, JAK1
NRF2-mediated Oxidative Stress Response	3.39	-2.11	0.094	SQSTM1, ABCC4, AKT1, UBE2E3, NQO2, HSPB8, MAP2K1, PPIB, FOS, AKR7A2, SOD2, CCT7, ACTB, PTPN11, CAT, EPHX1, AKR1A1, VCP, HERPUD1
Insulin Receptor Signaling	1.51	-2.11	0.075	AKT1, PTPN11, PPP1R12A, PPP1CA, PPP1CB, PRKAR1B, JAK1, SCNN1A, MAP2K1, SYNJ1, PPP1R11
Oxidative Phosphorylation	2.43	-3.32	0.101	SDHB, UQCRC1, NDUFA9, SDHA, NDUFV3, NDUFS6, ATPAF1, ATP5F1C, ATP5F1B, SDHC, NDUFS1
Late vs. Middle stages				
Oxidative Phosphorylation	2.18	2.50	0.119	COX11, UQCRC1, SDHA, NDUFV3, NDUFAB1, NDUFS1, SDHB, UQCRQ, ATP5PO, NDUFA6, ATPAF1, ATP5F1C, SDHC
Role of p14/p19ARF in Tumor Suppression	1.46	2.45	0.133	SENP3, FGFR1, UBTF, PTPN11, MDM2, TTF1
Endocannabinoid Cancer Inhibition Pathway	1.57	2.32	0.095	MAP2K5, GNAI1, FGFR1, SMPD2, MAP2K1, RHOA, PTPN11, CREB3, SPTLC1, TWIST2, PRKAR1B, DDIT3, VEGFB, CASP8, PRKAR2A

¹Values indicate a statistically significant match between up- and down-regulation patterns.

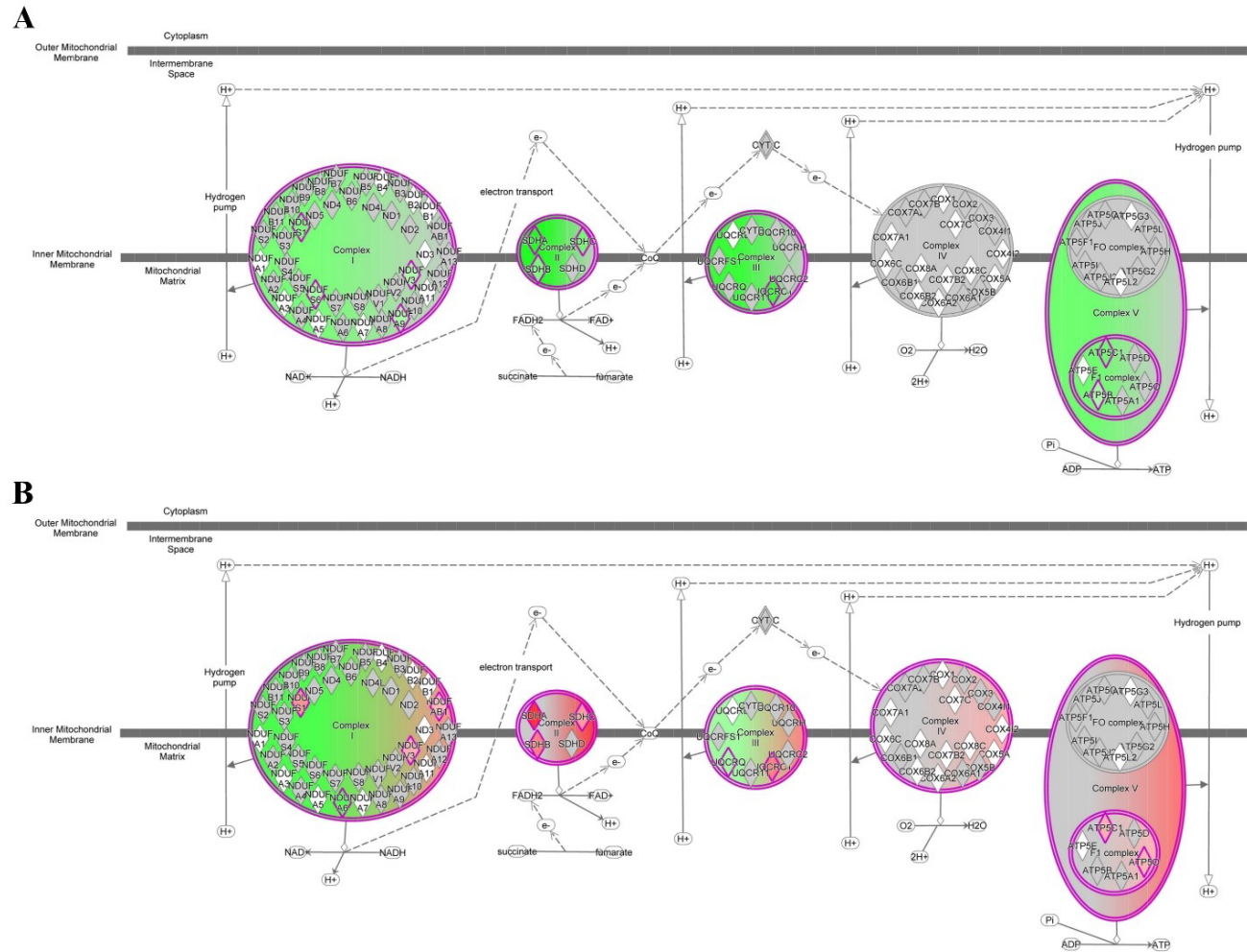


Figure 4-2. Oxidative phosphorylation in the canonical pathway analyses of Japanese Black beef cattle using IPA software. The IPA knowledge base was used to analyze DEGs with raw estimated fold changes ≥ 2 by comparing the (A) middle and early (z-score = -3.32 , $P = 3.72 \times 10^{-3}$), and (B) late and middle (z-score = 2.50 , $P = 6.61 \times 10^{-3}$) fattening stages. Green represents the downregulation of integrated genes and red represents upregulation of genes.

Table 4-5. Genes (raw estimated fold change ≥ 2 , FDR corrected $P < 0.05$) integrating the oxidative phosphorylation canonical pathway generated by Ingenuity Pathway Analysis (IPA) in comparisons of the early and middle fattening stages and late and middle fattening stages.

Gene Symbol	Fold change		Gene Name	Location	Type
	Middle vs. Early	Late vs. Middle			
ATP5F1C	-3.39	2.16	ATP synthase F1 subunit gamma	Cytoplasm	Transporter
ATP5F1B	-2.16	N/A	ATP synthase F1 subunit beta	Cytoplasm	Transporter
ATP5PO	N/A	2.05	ATP synthase peripheral stalk subunit OSCP	Cytoplasm	Transporter
ATPAF1	-3.40	3.94	ATP synthase mitochondrial F1 complex assembly factor 1	Cytoplasm	Other
COX11	N/A	2.33	cytochrome c oxidase copper chaperone COX11	Cytoplasm	Enzyme
NDUFA6	N/A	-4.22	NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A6	Cytoplasm	Enzyme
NDUFA9	-2.06	N/A	NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit A9	Cytoplasm	Enzyme
NDUFAB1	N/A	2.02	NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit AB1	Cytoplasm	Enzyme
NDUFS1	-3.20	3.07	NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit S1	Cytoplasm	Enzyme
NDUFS6	-2.22	N/A	NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit S6	Cytoplasm	Enzyme
NDUFV3	-2.06	2.18	NADH: ubiquinone oxidoreductase subunit V3	Cytoplasm	Enzyme
SDHA	-7.32	7.18	succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A	Cytoplasm	Enzyme
SDHB	-3.18	3.57	succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit B	Cytoplasm	Enzyme
SDHC	-3.42	2.78	succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit C	Cytoplasm	Enzyme
UQCRC1	-4.71	3.57	ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1	Cytoplasm	Enzyme
UQCRQ	N/A	-2.25	ubiquinol-cytochrome c reductase complex III subunit VII	Cytoplasm	Enzyme

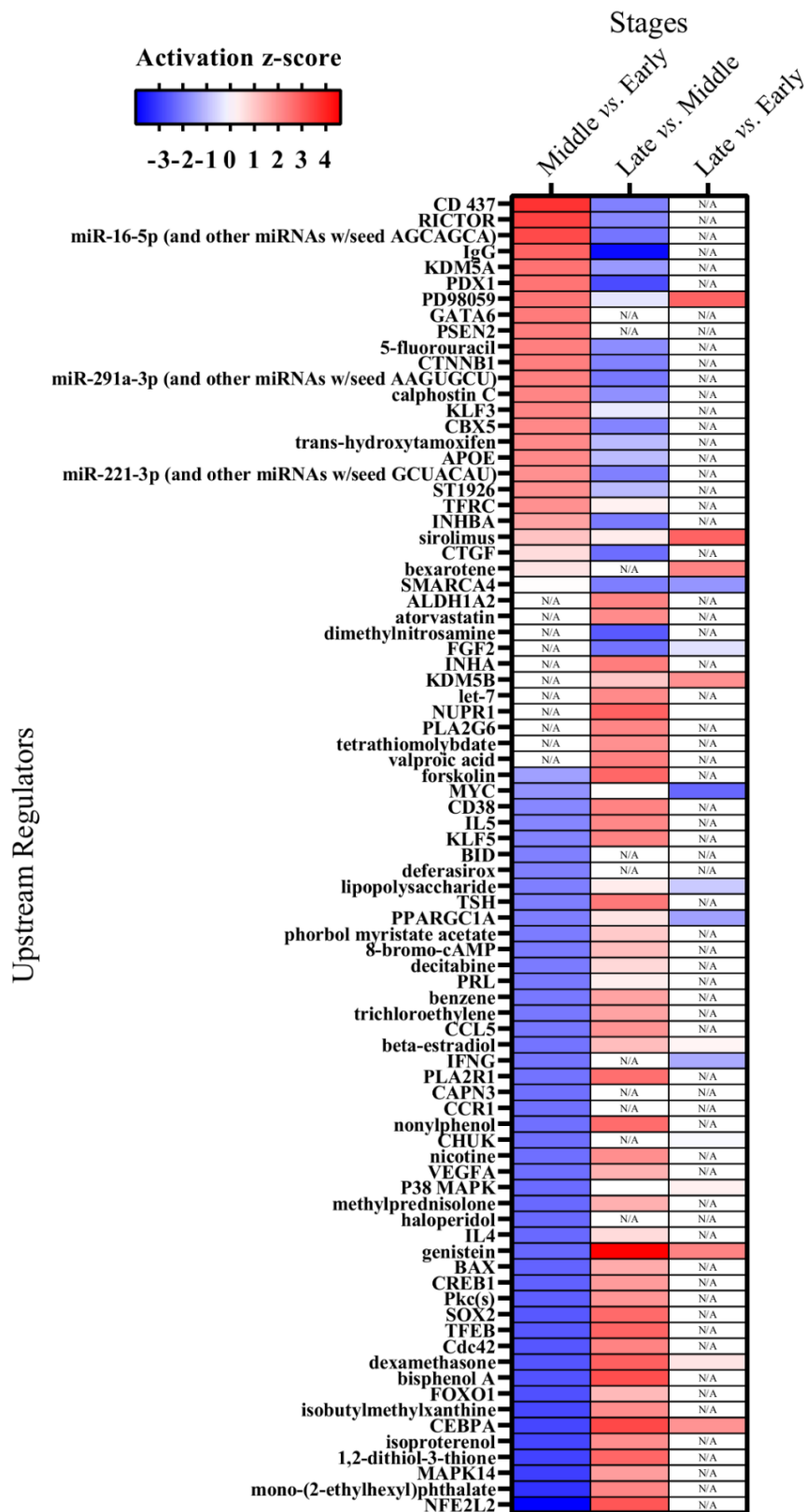


Figure 4-3. Heatmap of upstream regulators ($P < 0.05$) generated by IPA in comparisons of the early, middle, and late fattening stages in Japanese Black beef cattle. Cell colors are based on the activation z-score. Blue represents a negative z-score and red represents a positive z-score. N/A, not applicable.

総括

肥育牛は肉質の向上および体重の増加による生産性の向上を目的とした長期的な濃厚飼料の多給が行われる。その結果、第一胃液 pH の低下による ARA, SARA の発症が認められ (76), SARA は第四胃変位, 肝膿瘍および蹄葉炎などの代謝性疾患の原因となることが知られている (5, 28, 88)。また、第一胃内の細菌叢は交互に作用することで第一胃内の恒常性を保っているが (78, 86), 第一胃液 pH の変動に伴い細菌叢構成が変化し (68, 78), 同様に第一胃粘膜上皮細胞における遺伝子発現も変動する (51, 106)。乳牛を用いた SARA 誘発試験による第一胃性状の変化についての報告は多くみられるが (15, 110), 一方で黒毛和種肥育牛を用いた試験は少なく、特に長期的な濃厚飼料多給による第一胃液性状の変化について検討した報告は全くみられない。

本研究では黒毛和種肥育牛の肥育時期進行に伴う前胃液性状、細菌叢および第一胃粘膜上皮の遺伝子発現の変化を明らかにし、濃厚飼料多給が行われる黒毛和種肥育牛の飼料給与の問題点を第一胃性状の観点から解析する目的で、通常の飼養方法に則り濃厚飼料多給を行った黒毛和種肥育牛を用いて肥育前期、中期および後期の第一胃液および第二胃液 pH, VFA, $\text{NH}_3\text{-N}$ および乳酸濃度並びに LPS 活性値、そのほか第一胃液、第一胃食渣および第二胃液細菌叢並びに第一胃粘膜上皮の遺伝子発現の変化について検討した。

第 1 章では黒毛和種牛の長期的な濃厚飼料多給に対する第一胃の適応能力およびその作用機序を明らかにする目的で、通常管理下の黒毛和種肥育牛を用いて肥育前期、中期および後期の第一胃液性状および細菌叢構成の変化を比較した。本試験では第一胃フისტルを装着した黒毛和種去勢牛 9 頭を用いた。試験牛は兵庫県立農林水産技術総合センター・畜産技術センター (加西市) で 20 カ月間 (10 カ月齢

- 30 カ月齢) の肥育試験を行った。肥育期は肥育前期 (10 - 14 カ月齢), 中期 (15 - 22 カ月齢) および後期 (23 - 30 カ月齢)とし, 試験期間は各肥育期の最終 14 日目とした。第一胃液 pH は試験期間中 10 分間隔で連続測定を行い, 採取した第一胃液から VFA, $\text{NH}_3\text{-N}$ および乳酸濃度並びに LPS 活性値を測定するとともに, 次世代シーケンサーを用いた第一胃液細菌叢の解析を行った。

その結果, 第一胃液 pH は肥育期の進行に伴い有意 ($P < 0.05$) に低下し, 肥育中期では中程度, および後期では重度の SARA を発症していることが明らかとなった。特に肥育後期では前期および中期と比較して総 VFA 濃度の有意 ($P < 0.05$) な減少および第一胃内乳酸濃度の有意 ($P < 0.05$) な増加が認められ, 加えて PCA では後期の乳酸濃度が第一胃性状に最も影響を与える要因であったことから, 乳酸濃度の増加が肥育後期における第一胃液 pH 低下の一因であり, 黒毛和種肥育牛の特徴であると考えられた。また, 肥育中期と後期では前期と比べ LPS 活性値が有意 ($P < 0.05$) に増加し, 第一胃液細菌叢構成は前期と比べ中期でセルロース分解菌構成比の低下による Firmicutes 門構成比の減少が見られた。このことは肥育時期の進行に伴う濃厚飼料の増給と第一胃液 pH の低下による変化と考えられた。しかしながら細菌種の多様性に第一胃液 pH の低下に伴う変化は見られず, これは黒毛和種牛の長期的な濃厚飼料多給に対する第一胃の適応能力であると考えられた。これらのことから, 黒毛和種牛の肥育中期や後期には, 第一胃液 pH の低下, LPS の産生増加, セルロース分解菌構成比の減少等の濃厚飼料多給に伴う第一胃内環境の変化が明らかとなり, 一方で第一胃液細菌叢は細菌種の多様性を保つことで環境の変化に適応していることが示唆された

第 2 章では第一胃液および第二胃液 pH, 性状並びに第一胃液, 第一胃食渣および第二胃液細菌叢構成を肥育期毎に比較することで黒毛和種肥育牛の濃厚飼料多給に対する適応能力の理解を深めることを目的とし, 第 1 章で供試した黒毛和種

肥育牛を用いて試験を行った。第一胃液 pH および第二胃液 pH は試験期間中連続測定を行い、採取した第一胃液および第二胃液から VFA, $\text{NH}_3\text{-N}$ および乳酸濃度並びに LPS 活性値を測定し、また第一胃液、第一胃食渣および第二胃液その細菌叢構成について次世代シーケンサーを用いて解析を行った。

その結果、肥育前期および中期の第一胃液 pH は第二胃液 pH と比較し有意 ($P < 0.05$) な低値を示したが、一方で後期の第一胃液 pH は第二胃液 pH と比べ有意 ($P < 0.05$) な高値を示し、これは長期的な濃厚飼料多給による前胃液 pH の低下に伴い、第一胃粘膜上皮からの重炭酸イオンの分泌が促進されたことによると考えられた。また、第一胃液および第二胃液では肥育期の進行に伴う細菌叢の多様性の減少が認められず、黒毛和種肥育牛は長期的な濃厚飼料多給に対し第一胃液および第二胃液細菌叢の多様性を保つことで適応し、発酵機能を維持していると考えられた。細菌叢構成は全ての肥育期で第一胃液および第二胃液細菌叢に類似性が認められたが、第一胃食渣細菌叢は第一胃液および第二胃液細菌叢と構成の相違が認められ、これは第一胃内の液相部と固相部の担っている代謝機能が異なることによるものと考えられた。また、構成比の大きい OTUs では、第一胃液と比較し第二胃液の OTUs が発酵機能により密接に関連していることが示唆された。例として *Ruminococcus bromii* (OTU1, OTU10 および OTU15) は第二胃液における総 VFA 濃度、VFA 中の酢酸および酪酸の構成比および $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度と有意 ($P < 0.05$) な正の相関が認められた。これらのことから、肥育後期の黒毛和種牛では、長期的な濃厚飼料多給による第一胃液 pH の低下に対して緩衝作用を促進して適応しており、第一胃液および第二胃液細菌叢はその多様性を保つことで pH の変化に適応していることが示唆された。

第 3 章では黒毛和種肥育牛の肥育中期および後期に濃厚飼料を増給した際の第一胃液 pH の変化、細菌叢構成および多様性の変化を明らかにすることで、中期お

よび後期の黒毛和種肥育牛の濃厚飼料増給に対する第一胃の適応能力の作用機序を解明することを目的とした。供試牛は黒毛和種肥育牛 6 頭を用い、肥育中期牛 ($n=3$, 21 - 22 カ月齢) は明治飼糧・水戸研究所 (茨城町) で試験を行い、肥育後期牛 ($n=3$, 31 カ月齢) は兵庫県立農林水産技術総合センター・畜産技術センター (加西市) で試験を行った。試験期間は対照区 (CON 区) および濃厚飼料割合を増加した濃厚飼料多給区 (HC 区) とし、各試験期間は 14 日間行い CON 区終了後直ちに HC 区を開始した。第一胃液 pH は試験期間中継続した測定を行い、各試験区の最終日に第一胃液を採取し、VFA, $\text{NH}_3\text{-N}$ および乳酸濃度並びに LPS 活性値を測定するとともに、次世代シーケンサーを用いた第一胃液細菌叢の解析を行った。

その結果、肥育中期牛では対照区 (CON 区; 14 日間) と比較し濃厚飼料多給区 (HC 区; 14 日間) で第一胃液の 24 時間平均 pH および最低 pH の有意 ($P < 0.05$) な低下が認められた。一方肥育後期牛では CON 区および HC 区の第一胃液 pH に有意差は認められなかったが、継続した重度の SARA が両区で認められた。また、肥育後期牛の HC 区では総 VFA 濃度および乳酸濃度が CON 区と比較し有意 ($P < 0.05$) な高値を示した。加えて、肥育中期牛および後期牛の第一胃液細菌叢構成および多様性は類似していたが、中期牛では HC 区の *Prevotella* および *Caloramator* の構成比が CON 区と比較し有意 ($P < 0.05$) に増加、および低下していた。これらのことから、黒毛和種牛は肥育中期と比較し、後期で濃厚飼料割合の増加による第一胃液 pH の変動が制御されていることが示唆された。

第 4 章では第 1 章および第 2 章で供試した黒毛和種肥育牛を用いて本試験では黒毛和種肥育牛を用いて各肥育期における第一胃粘膜上皮の遺伝子発現量の変化および第一胃液 pH, 第一胃液性状との交互作用を明らかにし、第一胃環境の変化に対する第一胃粘膜の適応能力の分子機構を解明するために、第一胃粘膜上皮の遺伝子発現量を解析した。本試験では 9 頭の黒毛和種肥育牛を用いてマイクロアレ

イを用いた網羅的遺伝子解析を行った。

その結果、輸送関連遺伝子である SLC family 遺伝子は、肥育中期に前期に比べて down-regulated (11/13) , また、後期に中期に比べ up-regulated (12/19) と判定されるものが多く、VFA 輸送体および SCFA⁻/HCO₃⁻交換輸送体である *SLC26A3* 遺伝子の発現量は、中期に前期に比べて有意 ($P<0.05$) に低下し、後期には中期に比べて有意 ($P<0.05$) に増加した。また、肥育前期および中期では第一胃粘膜上皮の酸化的リン酸化パスウェイが抑制され、一方後期では乳酸を基質とした酸化的リン酸化パスウェイおよび細胞生存機能の修復が認められた。これらのことから、肥育後期の黒毛和種牛では第一胃粘膜上皮からの VFA 吸収と第一胃内への重炭酸イオン分泌が促進され、長期間の濃厚飼料多給に適応している可能性が示唆された。

本研究の結果から、黒毛和種牛では肥育時期の進行に伴い第一胃液 pH と VFA 濃度が低下し、多くのセルロース分解菌を含む Firmicutes 門の構成比が低下することが明らかになった。また、肥育後期には中期に比べて *SLC26A3* 等の VFA や重炭酸イオンの輸送に関連する遺伝子の発現量が増加することから、後期には第一胃粘膜上皮から第一胃内への重炭酸イオン供給が増加し、この緩衝作用により濃厚飼料多給に順応している可能性が示唆された。これらのことから黒毛和種肥育牛の肥育期の進行に伴う第一胃液および第二胃液性状並びに第一胃粘膜上皮における遺伝子発現の変化および適応能力の違いが明らかになった。本研究によって得られた所見は、黒毛和種肥育牛における健康の維持と代謝性疾患の予防に寄与するものであり、黒毛和種肥育牛を飼養する際は肥育時期による第一胃の濃厚飼料多給に対する適応能力の変化を考慮した飼料給与を行う必要があると考えられた。

謝辞

本稿を終えるにあたり，ご指導およびご検閲を賜りました岩手大学農学部共同獣医学科産業動物内科学研究室 佐藤 繁教授，同 一條 俊浩准教授に深甚なる謝意を表します。また，マイクロアレイ法による解析にご協力頂いた岩手大学農学部共同獣医学科獣医生理学研究室 木崎 景一郎教授，VFA および $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度測定にご協力頂いた兵庫県立淡路農業技術センター 生田 健太郎先生，乳酸濃度解析にご協力頂いた明治飼糧株式会社 大谷 喜永さん，エンドトキシン活性解析にご協力頂いた農研機構畜産草地研究所 櫛引 史郎先生，次世代シーケンス法にご協力頂いた岩手大学農学部 長井 和哉さんに深く感謝いたします。さらに，本研究における採材および検査にご協力くださいました兵庫県立農林水産技術総合センター・畜産技術センター 正木 達規先生，岩本 英治先生，明治飼糧株式会社 折橋 毅典先生，産業動物内科学研究室 Kim Yohan 先生，NOSAI 岩手 木村 淳先生，岐阜大学連合獣医学研究科 加藤 淳郎先生，岩手大学大学院獣医学研究科 黒岩 朋子先生，土谷 佳之先生，産業動物内科学研究室 卒業生 北 勇一朗先生，牧野 博生先生，石塚 直樹先生，小材 怜子先生および千葉 恵樹先生，同研究室 6 年 金子 紘野さん，田内 瞬一さん，堀中 あさひさんをはじめ関係者各位に衷心より感謝いたします。

引用文献

- 1) Abaker JA., Xu TL., Jin D., Chang GJ., Zhang, K. and Shen, XZ. (2017). Lipopolysaccharide derived from the digestive tract provokes oxidative stress in the liver of dairy cows fed a high-grain diet. *J. Dairy Sci.* 100, 666 ~ 678.
- 2) Allen, MS. (1997). Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber. *J dairy Sci.* 80, 1447 ~ 1462.
- 3) Al-Shanti, N. and Stewart, C. E. (2008). PD98059 enhances C2 myoblast differentiation through p38 MAPK activation: a novel role for PD98059. *J. Endocrinol* 198, 243 ~ 252.
- 4) AlZahal, O., Kebreab, E., France, J. and McBride, B. W. (2007). A mathematical approach to predicting biological values from ruminal pH measurements. *J Dairy Sci.* 90, 3777 ~ 3785.
- 5) Ametaj, B. N., Zebeli, Q., Saleem, F., Psychogios, N., Lewis, M. J., Dunn, S. M., Xia, J. and Wishart, D. S. (2010). Metabolomics reveals unhealthy alterations in rumen metabolism with increased proportion of cereal grain in the diet of dairy cows. *Metabolomics.* 6, 583 ~ 594.
- 6) Aschenbach JR., Bilk S., Tadesse G., Stumpff, F. and Gabel, G. (2009). Bicarbonate-dependent and bicarbonate-independent mechanisms contribute to nondiffusive uptake of acetate in the ruminal epithelium of sheep. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 296, G1098 ~ G1107.
- 7) Attia, N. E. (2016). Subacute ruminal acidosis in feedlot: incidence, clinical alterations and its sequelae. *Adv. Anim. Vet. Sci.* 4, 513 ~ 517.
- 8) Belanche, A., Doreau, M., Edwards, J. E., Moorby, J. M., Pinloche, E. and Newbold, C. J. (2012). Shifts in the rumen microbiota due to the type of carbohydrate and level of

protein ingested by dairy cattle are associated with changes in rumen fermentation. *J. Nutr.* 142, 1684 ~ 1692.

- 9) Benedeti, P. D. B., de Castro Silva, B., Pacheco, M. V. C., Serão, N. V. L., Carvalho Filho, I., Lopes, M. M., Marcondes, M. I., Mantovani, H. C., Filho, S. C. V., Detmann, E. and de Souza Duarte, M. (2018). Effects of grain processing methods on the expression of genes involved in volatile fatty acid transport and pH regulation, and keratinization in rumen epithelium of beef cattle. *PloS one.* 13, e0198963
- 10) Bevans, D. W., Beauchemin, K. A., Schwartzkopf-Genswein, K. S., McKinnon, J. J. and McAllister, T. A. (2005). Effect of rapid or gradual grain adaptation on subacute acidosis and feed intake by feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 83, 1116 ~ 1132.
- 11) Biddle A., Stewart L., Blanchard, J. and Leschine S. (2013). Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by Lachnospiraceae and Ruminococcaceae in diverse gut communities. *Diversity* 5, 627 ~ 640.
- 12) Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Wittwer, C. T. and Vandesompele, J. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* 611 ~ 622.
- 13) Cameron, P. J., Zembayashi, M., Lunt, D. K., Mitsuhashi, T., Mitsumoto, M., Ozawa, S. and Smith, S. B. (1994). Relationship between Japanese beef marbling standard and intramuscular lipid in the *M. longissimus thoracis* of Japanese Black and American Wagyu cattle. *Meat science*, 38, 361 ~ 364.
- 14) Chaucheyras-Durand, F. and Ossa, F. (2014). The rumen microbiome: Composition, abundance, diversity, and new investigative tools. *The Professional Animal Scientist.* 30, 1 ~ 12.
- 15) Chen, Y., Penner, G. B., Li, M., Oba, M. and Guan L. L. (2011). 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.
- 16) Cheng, K. J., McCowan, R. P. and Costerton, J. W. (1979). Adherent epithelial bacteria in ruminants and their roles in digestive tract function. *Am J Clin Nutr.* 32, 139 ~ 148.
 - 17) Cho, S. J., Cho, K. M., Shin, E. C., Lim, W. J., Hong, S. Y., Choi, B. R., Kang, J. M., Lee, S. M., Kim, Y. H, Kim, H. and Yun, H. D. (2006). 16S rDNA analysis of bacterial diversity in three fractions of cow rumen. *J Microbiol Biotechnol.* 16, 92 ~ 101.
 - 18) Contreras, A. V., Cocom-Chan, B., Hernandez-Montes, G., Portillo-Bobadilla, T. and Resendis-Antonio, O. (2016). Host-microbiome interaction and cancer: potential application in precision medicine. *Front. Physiol.* 7, 606. 10.3389/fphys.2016.00606.
 - 19) Creevey, C. J., Kelly, W. J., Henderson, G. and Leahy, S. C. (2014). Determining the culturability of the rumen bacterial microbiome. *Microbial Biotechnology.* 7, 467 ~ 479
 - 20) Dado, R. G. and Allen, M. S. (1993). Continuous computer acquisition of feed and water intakes, chewing, reticular motility, and ruminal pH of cattle. *J. Dairy Sci.* 76, 1589 ~ 1600.
 - 21) De Mulder, T., Goossens, K., Peiren, N., Vandaele, L., Haegeman, A., De Tender, C., Ruttink, T., de Wiele, TV., and De Campeneere, S. (2017). Exploring the methanogen and bacterial communities of rumen environments: solid adherent, fluid and epimural. *FEMS Microbiol Ecol.* 93, fiw251.
 - 22) Dhup, S., Kumar Dadhich, R., Ettore Porporato, P. and Sonveaux, P. (2012). Multiple biological activities of lactic acid in cancer: influences on tumor growth, angiogenesis and metastasis. *Curr. Pharm. Des.* 18, 1319 ~ 1330.
 - 23) Dijkstra, J., Ellis, J. L., Kebreab, E., Strathe, A. B., López, S., France, J. and Bannink, A. (2012). Ruminal pH regulation and nutritional consequences of low pH. *Animal Feed*

Science and Technology. 172, 22 ~ 33.

- 24) Dohme, F., DeVries, T. J. and Beauchemin, K. A. (2008). Repeated ruminal acidosis challenges in lactating dairy cows at high and low risk for developing acidosis: ruminal pH. *J. Dairy Sci.* 91, 3554 ~ 3567
- 25) Duffield, T., Plaizier, J.C., Fairfield, A., Bagg, R., Vessie, G., Dick, P., Wilson, J., Aramini, J. and McBride, B. (2004). Comparison of techniques for measurement of rumen pH in lactating dairy cows. *J. Dairy Sci.* 87, 59 ~ 66
- 26) Edwards, J. E., Huws, S. A., Kim, E. J. and Kingston-Smith, A.H. (2007). Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of nonconserved forage in the bovine rumen. *FEMS microbiol ecol.* 62, 323 ~ 335.
- 27) Emmanuelle. H., Le Gall, G., Laverde-Gomez, J. A., Mukhopadhy, I., Flint, H. J. and Juge, N. (2018). Mechanistic insights into the cross-feeding of *Ruminococcus gnavus* and *Ruminococcus bromii* on host and dietary carbohydrates. *Frontiers in microbiology.* 9, 2558.
- 28) Enemark, J. M. D. (2008). The monitoring, prevention and treatment of sub-acute ruminal acidosis (SARA): A review. *The Veterinary Journal.* 176, 32 ~ 43.
- 29) Falk, M., Münger, A. and Dohme-Meier, F. (2016). A comparison of reticular and ruminal pH monitored continuously with 2 measurement systems at different weeks of early lactation. *Journal of dairy science.* 99, 1951 ~ 1955.
- 30) Fernando, S. C., Purvis, H. T., Najjar, F. Z., Sukharnikov, L. O., Krehbiel, C. R., Nagaraja, T. G., Roe, U. and DeSilva, U. (2010). Rumen microbial population dynamics during adaptation to a high-grain diet. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7482 ~ 7490.
- 31) Garrett, E. F., Nordlund, K. V., Goodger, W. J. and Oetzel, G. R. (1997). A cross-sectional field study investigating the effect of periparturient dietary management on ruminal pH in early lactation dairy cows. *J. Dairy Sci.* 80, 169

- 32) Goad, D. W., Goad, C. L., and Nagaraja, T. G. (1998). Ruminant microbial and fermentative changes associated with experimentally induced subacute acidosis in steers. *J. Anim. Sci.* 76, 234 ~ 241.
- 33) Golder, H. M., Denman, S. E., McSweeney, C., Celi, P. and Lean, I. J. (2014). Ruminant bacterial community shifts in grain-, sugar-, and histidine-challenged dairy heifers. *Journal of Dairy Sci.* 97, 5131 ~ 5150.
- 34) Gotoh, Takafumi., and Seon-Tea, Joo. (2016). Characteristics and Health Benefit of Highly Marbled Wagyu and Hanwoo Beef. *Korean J. Food Sci.* 36, 709 ~ 718.
- 35) Gotoh, T., Nishimura, T., Kuchida, K., and Mannen, H. (2018). The Japanese Wagyu beef industry: current situation and future prospects—a review. *Asian-australas. J. Anim. Sci.* 31, 933.
- 36) Gozho, G. N., Plaizier, J. C., Krause, D. O., Kennedy, A. D. and Wittenberg, K. M. (2005). Subacute ruminal acidosis induces ruminal lipopolysaccharide endotoxin release and triggers an inflammatory response. *J Dairy Sci.* 88, 1399 ~ 1403.
- 37) Gozho, G. N., Krause, D. O., Plaizier, J. C. (2006). Rumen lipopolysaccharide and inflammation during grain adaptation and subacute ruminal acidosis in steers. *J Dairy Sci.* 89, 4404 ~ 4413
- 38) Guo, Y., Xu, X., Zou, Y., Yang, Z., Li, S. and Cao, Z. (2013). Changes in feed intake, nutrient digestion, plasma metabolites, and oxidative stress parameters in dairy cows with subacute ruminal acidosis and its regulation with pelleted beet pulp. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4, 31.
- 39) Guo, J., Chang, G., Zhang, K., Xu, L., Jin, D., Bilal, M. S. and Shen, X. (2017). Rumen-derived lipopolysaccharide provoked inflammatory injury in the liver of dairy cows fed a high-concentrate diet. *Oncotarget.* 8, 46769 ~ 46780.
- 40) Hammarstedt, A., Jansson, P. A., Wesslau, C., Yang, X. and Smith, U. (2003). Reduced

expression of PGC-1 and insulin-signaling molecules in adipose tissue is associated with insulin resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 578 ~ 582.

- 41) Hirabayashi, H., Kawashima, K., Okimura, T., Tatenno, A., Suzuki, A., Asakuma, S., Isobe, N., Obitsu, T., Sugino, T. and Kushibiki, S. (2017). Effect of nutrient levels during the far - off period on postpartum productivity in dairy cows. *Anim. Sci. J.* 88, 1162 ~ 1170.
- 42) Hollmann, M., Miller, I., Hummel, K., Sabitzer, S., Metzler-Zebeli, B. U., Razzazi-Fazeli, E. and Zebeli, Q. (2013). Downregulation of cellular protective factors of rumen epithelium in goats fed high energy diet. *PLoS One.* 8, e81602.
- 43) Hook, S. E., Steele, M. A., Northwood, K. S., Dijkstra, J., France, J., Wright, A. D. G. and McBride, B. W. (2011). Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation and recovery on the density and diversity of bacteria in the rumen of dairy cows. *FEMS Microbiology Ecology.* 78, 275 ~ 284.
- 44) Hummel, J., Sudekum, K.H., Bayer, D., Ortmann, S., Streich, W. J., Hatt, J. M. and Clauss, M. (2009). Physical characteristics of reticulorumen contents of oxen in relation to forage type and time after feeding. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 93, 209 ~ 220.
- 45) 一条 茂. (1993). 家畜におけるビタミン E とセレンの重要性について. 獣畜新報. 46, 109 ~ 114.
- 46) 伊藤担道., 丹羽鞆負. (1987). Natural products 含有の anti-oxidant activity とその臨床効果. フリーラジカルの臨床. 近藤元治監修. 日本医学館.
- 47) Iwai, S., Weinmaier, T., Schmidt, B. L., Albertson, D. G., Poloso, N. J., Dabbagh, K. and DeSantis, T. Z. (2016). Piphillin: improved prediction of metagenomic content by direct inference from human microbiomes. *PloS one.* 11, e0166104.
- 48) Kenney, N. M., Vanzant, E. S., Harmon, D. L. and McLeod, K. R. (2015). Direct-fed

- microbials containing lactate-producing bacteria influence ruminal fermentation but not lactate utilization in steers fed a high-concentrate diet. *J. Anim. Sci.* 93, 2336 ~ 2348.
- 49) Khafipour, E., Krause, D. O. and Plaizier, J. C. (2009). A grain-based subacute ruminal acidosis challenge causes translocation of lipopolysaccharide and triggers inflammation. *J. Dairy Sci.* 92, 1060 ~ 1070.
- 50) Kim, Y. H., Nagata, R., Ohtani, N., Ichijo, T., Ikuta, K. and Sato, S. (2016). Effects of Dietary Forage and Calf Starter Diet on Ruminal pH and Bacteria in Holstein Calves during Weaning Transition. *Front Microbiol.* 7, 1575.
- 51) Kim, Y. H., Toji N., Kizaki K., Kushibiki S., Ichijo T. and Sato S. (2016). Effects of dietary forage and calf starter on ruminal pH and transcriptomic adaptation of the rumen epithelium in Holstein calves during the weaning transition. *Physiological Genomics.* 48, 803.
- 52) Kim, Y. H., Nagata, R., Ohkubo, A., Ohtani, N., Kushibiki S., Ichijo T. and Sato S. (2018). Changes in ruminal and reticular pH and bacterial communities in Holstein cattle fed a high-grain diet. *BMC Veterinary Research.* 14, 310.
- 53) Kimura, A., Sato, S., Kato, T., Ikuta, K., Yamagishi, N., Okada, K. and Ito, K. (2012). Relationship between pH and temperature in the ruminal fluid of cows, based on a radio-transmission ph-measurement system. *J Vet Med Sci.* 74, 1023 ~ 1028.
- 54) Kizaki, K., Kizaki, A. S., Furusawa, T., Takahashi, T., Hosoe, M. and Hashizume, K. (2013). Differential neutrophil gene expression in early bovine pregnancy. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 11, 6.
- 55) Kläring, K., Hanske, L., Bui, N., Charrier, C., Blaut, M., Haller, D., Plugge, M. C. and Clavel, T. (2013). *Intestinimonas butyriciproducens* gen. nov., sp. nov., a butyrate-producing bacterium from the mouse intestine. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63, 4606 ~ 4612.

- 56) Klieve, A. V., O'Leary, M. N., McMillen, L. and Ouwerkerk, D. (2007). *Ruminococcus bromii*, identification and isolation as a dominant community member in the rumen of cattle fed a barley diet. *J Appl Microbiol.* 103, 2065 ~ 2073.
- 57) Koike, S. and Kobayashi, Y., (2001). Development and use of competitive PCR assays for the rumen cellulolytic bacteria: *Fibrobacter succinogenes*, *Ruminococcus albus* and *Ruminococcus flavefaciens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 361 ~ 366.
- 58) Krause, K. M. and Oetzel, G. R. (2006). Understanding and preventing subacute ruminal acidosis in dairy herds: A review. *Anim. Feed Sci. Technol.* 126, 215 ~ 236.
- 59) LaMonte, G., Tang, X., Chen, J. L. Y., Wu, J., Ding, C. K. C., Keenan, M. M., Sangokoya, C., Kung, H., Ilkayeva, O., Boros, L. G., Newgard, C. B. and Chi, J. (2013). Acidosis induces reprogramming of cellular metabolism to mitigate oxidative stress. *Cancer & metabolism.* 1, 23.
- 60) Li, M., Zhou, M., Adamowicz, E. and Basarab, J. A. (2012). Characterization of bovine ruminal epithelial bacterial communities using 16S rRNA sequencing, PCR-DGGE, and qRT-PCR analysis. *Vet Microbiol.* 1, 72 ~ 80
- 61) Li, X., Liu, L., Yang, S., Song, N., Zhou, X., Gao, J., Yu, N., Shan, L., Wang, Q., Liang, J., Xuan, C., Wang, Y., Shang, Y. and Shi, L. (2014). Histone demethylase KDM5B is a key regulator of genome stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 7096 ~ 7101.
- 62) Liu, J. H., Xu, T. T., Liu, Y. J., Zhu, W. Y. and Mao, S. Y. (2013). A high-grain diet causes massive disruption of ruminal epithelial tight junctions in goats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 305, R232 ~ R241.
- 63) "Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 25, 402 ~ 408"
- 64) Louis, D., AlZahal, Ousama., Steele, M. A., Matthews, J. C. and McBride, B. W. (2014). Transcriptomic changes in ruminal tissue induced by the periparturient transition in

- dairy cows. *Am J Anim Vet Sci.* 9, 36 ~ 45.
- 65) Lozupone, C. and Knight, R. (2005). UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8228 ~ 8835.
- 66) Lu, P. J., Hsu, P. I., Chen, C. H., Hsiao, M., Chang, W. C., Tseng, H. H., Lin, K. H., Chuah, S. K. and Chen, H. C. (2010). Gastric juice acidity in upper gastrointestinal diseases. *World J. Gastroenterol.* 16, 5496.
- 67) Mani, V., Weber, TE., Baumgard, LH. and Gabler, NK. (2012). Growth and Development Symposium: Endotoxin, inflammation, and intestinal function in livestock. *J Anim Sci.* 90, 1452 ~ 1465.
- 68) Mao, S. Y., R. Y. Zhang, D. S. Wang, and W. Y. Zhu. (2013). Impact of subacute ruminal acidosis (SARA) adaptation on rumen microbiota in dairy cattle using pyrosequencing. *Anaerobe.* 24, 12 ~ 19.
- 69) McCann, J. C., Luan, S., Cardoso, F. C., Derakhshani, H., Khafipour, E. and Looor, J. J. (2016). Induction of subacute ruminal acidosis affects the ruminal microbiome and epithelium. *Front. Microbiol.* 7, 701.
- 70) Memon, MA., Wang, Y., Xu, T., Ma, N., Zhang, H., Roy, AC., Aabdin, ZU. and Shen X. (2019). Lipopolysaccharide induces oxidative stress by triggering MAPK and Nrf2 signalling pathways in mammary glands of dairy cows fed a high-concentrate diet. *Microb Pathog.* 128, 268 ~ 275.
- 71) Merry, R. J., and MacAllan, A. B. (1983). A comparison of the chemical composition of mixed bacteria harvested from liquid and solid fraction of rumen digesta. *Br. J. Nutr.* 50, 701 ~ 709.
- 72) 三森眞琴. (2014). ルーメン機能を支える微生物. *家畜感染症学会誌.* 3, 41-44
- 73) Mootha, V. K., Lindgren, C. M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J.,

- Patterson, Nick., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D. and Groop, L. C. (2003). PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* 34, 267 ~ 273.
- 74) Mueller R. E., Iannotti E. L. and Asplund J. M. (1984). Isolation and identification of adherent epimural bacteria during succession in young lambs. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 724 ~ 730.
- 75) Naeem, A., Drackley, J. K., Stamey, J. and Looor, J. J. (2012). 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.
- 76) Nagaraja, T. G. and Titgemeyer, E. C. (2007). Ruminal acidosis in beef cattle: the current microbiological and nutritional outlook. *J. Dairy Sci.* 90, E17 ~ E38.
- 77) Nagata, R., Kim, Y. H., Ohkubo, A., Kushibiki, S., Ichijo, T. and Sato, S. (2017). Effects of repeated subacute ruminal acidosis challenges on the adaptation of the rumen bacterial community in Holstein bulls. *J Dairy Sci.* 101, 4424 ~ 4436.
- 78) Nagata, R., Kim, Y. H., Ohkubo, A., Kushibiki, S., Ichijo, T. and Sato, S. (2018). Effects of repeated subacute ruminal acidosis challenges on the adaptation of the rumen bacterial community in Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 101, 4424 ~ 4436.
- 79) 日本飼養標準 & 肉用牛. (2008). 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構編, 中央畜産会, 東京 (2008 年).
- 80) Neubauer, V., Petri, R.M., Humer, E., Kröger, I., Mann, E., Reisinger, N., Wagner, M. and Zebeli, Q. (2018). High-grain diets supplemented with phytogenic compounds or autolyzed yeast modulate ruminal bacterial community and fermentation in dry cows. *J. Dairy Sci.* 101, 2335 ~ 2349.
- 81) Nocek, J. E. and Tamminga, S. (1991). Site of digestion of starch in the gastrointestinal

- tract of dairy cows and its effect on milk yield and composition. *J. Dairy Sci.* 74, 3598 ~ 3629.
- 82) Oka, A., Maruo, Y., Miki, T., Yamasaki, T. and Saito, T. (1998). Influence of vitamin A on the quality of beef from the Tajima strain of Japanese Black cattle. *Meat Sci.* 48, 159 ~ 167.
- 83) Paillard, D., McKain, N., Chaudhary, L. C., Walker, N. D., Pizette, F., Koppova, I., McEwan, N. R., Kopečný, J., Vercoe, P. E., Louis, P. and Wallace, R. J. (2007). Relation between phylogenetic position, lipid metabolism and butyrate production by different *Butyrivibrio*-like bacteria from the rumen. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 91, 417 ~ 422.
- 84) Peng, S., Yin, J., Liu, X., Jia, B., Chang, Z., Lu, H., Jiang, N. and Chen, Q. (2015). First insights into the microbial diversity in the omasum and reticulum of bovine using Illumina sequencing. *J. Appl. Genet.* 56, 393 ~ 401.
- 85) Penner, G. B., Steele, M. A., Aschenbach, J. R. and McBride, B. W. (2011). Ruminant Nutrition Symposium: Molecular adaptation of ruminal epithelia to highly fermentable diets. *J. Anim. Sci.* 89, 1108 ~ 1119.
- 86) Petri R. M., Schwaiger T., Penner G. B., Beauchemin K. A., Forster R. J. and McKinnon J. J. (2013). 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.
- 87) Piao da C., Wang, T., Lee, J. S., Vega, R.S., Kang, S. K., Choi, Y. J. and Lee, H. G. (2015). Determination of reference intervals for metabolic profile of Hanwoo cows at early, middle and late gestation periods. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6, 9.
- 88) Pitta, D. W., Pinchak, W. E., Dowd, S. E., Osterstock, J., Gontcharova, V., Youn, E., Dorton, K., Yoon, I., Min, B.R., Fulford, J. D., Malinowski, P. and Wickersham, T. A. (2010). Rumen bacterial diversity dynamics associated with changing from

- bermudagrass hay to grazed winter wheat diets. *Microb. Ecol.* 59, 511 ~ 522.
- 89) Plaizier, J. C., Krause, D. O., Gozho, G. N. and McBride, B. W. (2008). Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences. *Vet. J.* 176, 21 ~ 31.
- 90) Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, BM., Ludwig, W., Peplies, J. and Glockner, FO. (2007). SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res.* 35, 7188 ~ 7196.
- 91) Riemann, A., Ihling, A., Schneider, B., Gekle, M. and Thews, O. (2013) Impact of Extracellular Acidosis on Intracellular pH Control and Cell Signaling in Tumor Cells. (ed. Van Huffel S., Naulaers G., Caicedo A., Bruley D.F., Harrison D.K.) *Oxygen Transport to Tissue XXXV. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 789. (Springer, New York, NY, 2013)
- 92) Roche, JF. (2006). The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim. Reprod. Sci.* 96, 282 ~ 296.
- 93) Safonova, I., Darimont, C., Amri, E. Z., Grimaldi, P., Ailhaud, G., Reichert, U. and Shroot, B. (1994). Retinoids are positive effectors of adipose cell differentiation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 104, 201 ~ 211.
- 94) Sato, S., Ikeda, A., Tsuchiya, Y., Ikuta, K., Murayama, I., Kanehira, M., Okada, K. and Mizuguchi, H. (2012). Diagnosis of subacute ruminal acidosis (SARA) by continuous reticular pH measurements in cows. *Vet Res Com.* 36, 201 ~ 205.
- 95) Sato, S. (2016). Pathophysiological evaluation of subacute ruminal acidosis (SARA) by continuous ruminal pH monitoring. *Anim. Sci. J.* 87, 168 ~ 177.
- 96) Schären, M., Kiri, K., Riede, S., Gardener, M., Meyer, U., Hummel, J., Urich, T., Breves, G. and Dänicke, S. (2017). Alterations in the Rumen Liquid-, Particle- and Epithelium-

Associated Microbiota of Dairy Cows during the Transition from a Silage- and Concentrate-Based Ration to Pasture in Spring. *Front Microbiol.* 8, 744.

- 97) Schlau, N., Guan, L. L., and Oba, M. (2012). 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.
- 98) Schloss, PD., Westcott, SL., Ryabin, T., Hall, JR., Hartmann, M., Hollister, EB., Ryan, AL., Brian, BO., Donovan, HP., Courtney, JR., Jason, WS., Blaz, S., Gerhard, GT., David, JVH. and Carolyn, FW. (2009). Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537 ~ 7541.
- 99) Sehgal, S. N. (1998). Rapamune® (RAPA, rapamycin, sirolimus): mechanism of action immunosuppressive effect results from blockade of signal transduction and inhibition of cell cycle progression. *Clin. Biochem.* 31, 335 ~ 340.
- 100) Seo, B., Yoo, JE., Lee, YM. and Ko, G. (2017). *Merdimonas faecis* gen. nov., sp. nov., isolated from human faeces. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 2430 ~ 2435.
- 101) Sgorlon, S., Stradaoli, G., Gabai, G. and Stefanon, B. (2008). Variation of starch and fat in the diet affects metabolic status and oxidative stress in ewes. *Small Ruminant Res.* 74, 123 ~ 129.
- 102) Shi, Y. and Weimer, PJ. (1992). Response surface analysis of the effects of pH and dilution rate on *Ruminococcus flavefaciens* FD-1 in cellulose-fed continuous culture. *Appl Environ Microbiol.* 58, 2583 ~ 2591.
- 103) Shirouchi, B., Albrecht, E., Nuernberg, G., Maak, S., Olavanh, S., Nakamura, Y., Sato, M., Gotoh, T. and Nuernberg, K. (2014). Fatty acid profiles and adipogenic gene expression of various fat depots in Japanese Black and Holstein steers. *Meat sci.* 96, 157 ~ 164.

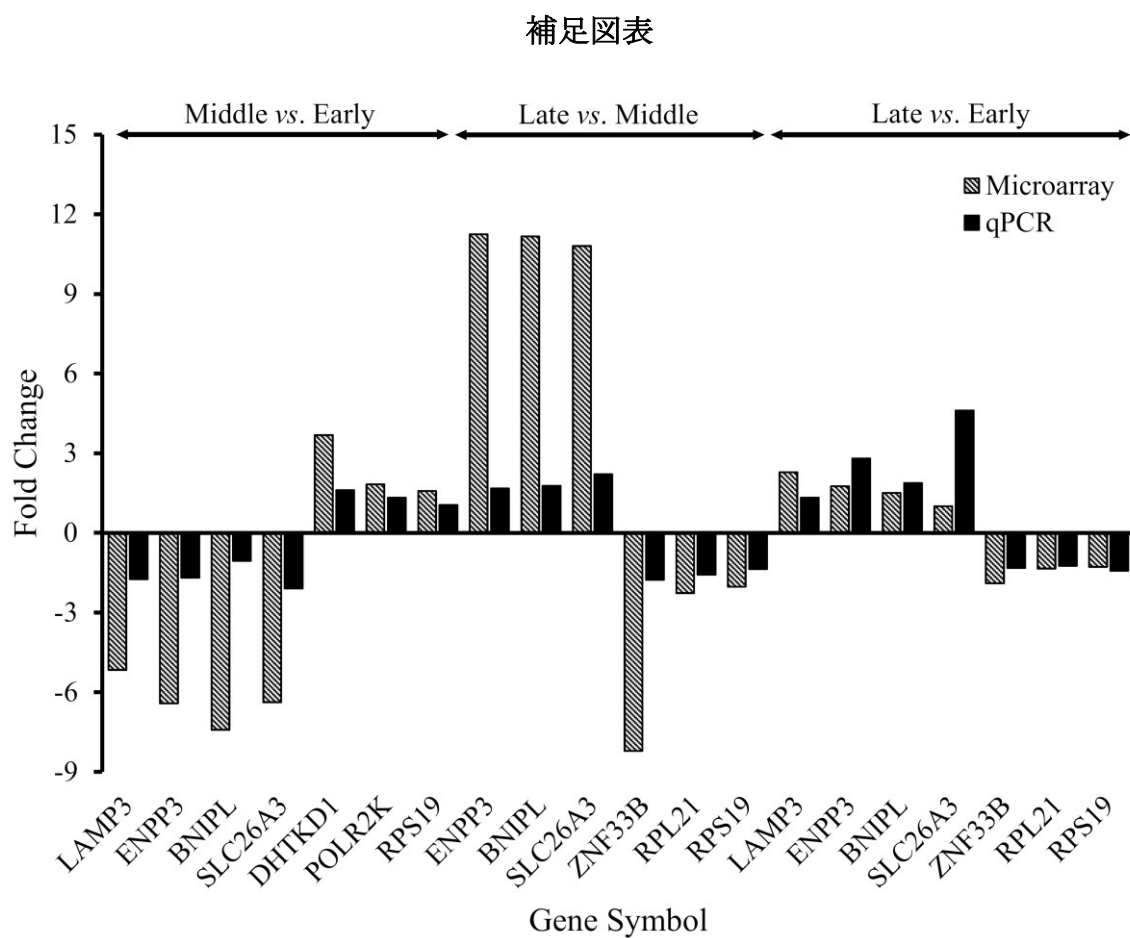
- 104) Steele, M. A., Croom, J., Kahler, M., AlZahal, O., Hook, S. E., Plaizier, K. and McBride, B. W. (2011). Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 300, R1515 ~ R1523.
- 105) Steele, M.A., Dionissopoulos, L., AlZahal, O., Doelman, J. and McBride, B.W. (2011). Rumen epithelial adaptation to ruminal acidosis in lactating cattle involves the coordinated expression of insulin-like growth factor-binding proteins and a cholesterolgenic enzyme. *J. Dairy Sci.* 95, 318 ~ 327.
- 106) Steele, M. A., Schiestel, C., AlZahal, O., Dionissopoulos, L., Laarman, A. H., Matthews, J. C., & McBride, B. W. (2015). The periparturient period is associated with structural and transcriptomic adaptations of rumen papillae in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 98, 2583 ~ 2595.
- 107) Van Gylswyk, N. O. (1995). *Succiniclasticum ruminis* gen. nov., sp. nov., a ruminal bacterium converting succinate to propionate as the sole energy-yielding mechanism. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 45, 297 ~ 300.
- 108) Wang, H., Pan, X., Wang, C., Wang, M. and Yu, L. (2015). Effects of different dietary concentrate to forage ratio and thiamine supplementation on the rumen fermentation and ruminal bacterial community in dairy cows. *Anim. Prod. Sci.* 55, 189 ~ 193.
- 109) Watanabe, Y., Kim, YH., Kushibiki, S., Ikuta, K., Ichijo, T. and Sato, S. (2019). Effects of active dried *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal fermentation and bacterial community during the short-term ruminal acidosis challenge model in Holstein calves. *J. Dairy Sci.* 102, 6518 ~ 6531.
- 110) Wetzels, S. U., Mann, E., Metzler-Zebeli, B. U., Pourazad, P., Kumar, M., Klevenhusen, F., Pinior, B., Wagner, M., Zebeli, Q. and Schmitz-Esser, S. (2016).

Epimural indicator phylotypes of transiently-induced subacute ruminal acidosis in dairy cattle. *Front Microbiol.* 7, 274.

- 111) Wu, H., Ying, M. and Hu, X. (2012) Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation. *Oncotarget.* 7, 40621.
- 112) Wu, S., Li, C., Huang, W., Li, W. and Li, R. W. (2012). Alternative splicing regulated by butyrate in bovine epithelial cells. *PloS one.* 7, e39182.
- 113) Wu, H., Ying, M. and Hu, X. (2016). Lactic acidosis switches cancer cells from aerobic glycolysis back to dominant oxidative phosphorylation. *Oncotarget.* 7, 40621.
- 114) Yang, W., Shen, Z. and Martens, H. (2012). An energy-rich diet enhances expression of Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1 and 3 messenger RNA in rumen epithelium of goat. *J Anim Sci.* 90, 307 ~ 317.
- 115) Ying, W. (2008). NAD⁺/NADH and NADP⁺/NADPH in cellular functions and cell death: regulation and biological consequences. *Antioxid. Redox. Signal.* 10, 179 ~ 206.
- 116) Zebeli, Q., Tafaj, M., Weber, I., Dijkstra, J., Steingass, H. and Drochner, W. (2007). Effects of varying dietary forage particle size in two concentrate levels on chewing activity, ruminal mat characteristics, and passage in dairy cows. *J Dairy Sci.* 90, 1929 ~ 1942.
- 117) Zhang, C., Hazarika, P., Ni, X., Weidner, D. A. and Duvic, M. (2002). Induction of apoptosis by bexarotene in cutaneous T-cell lymphoma cells: relevance to mechanism of therapeutic action. *Clin. Cancer Res.* 8, 1234 ~ 1240.
- 118) Zhang, R., Zhu, W. and Mao, S. (2016). High-concentrate feeding upregulates the expression of inflammation-related genes in the ruminal epithelium of dairycattle. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 7, 42.
- 119) Zhang, RY., Jin, W., Feng, PF., Liu, JH. and Mao, SY. (2018). High-grain diet

feeding altered the composition and functions of the rumen bacterial community and caused the damage to the laminae tissues of goats. *Animal*. 12, 2511 ~ 2520.

- 120) Zhao, K., Chen, Y. H., Penner, G. B., Oba, M. and Guan, L. L. (2017). Transcriptome analysis of ruminal epithelia revealed potential regulatory mechanisms involved in host adaptation to gradual high fermentable dietary transition in beef cattle. *BMC Genomics*. 18, 976.
- 121) Zhu, Z, Noel, S. J., Difford, G. F., Al-Soud, W. A., Brejnrod, A., Sørensen, S. J., Lassen, J., Løvendahl, P. and Højberg, O. (2017). Community structure of the metabolically active rumen bacterial and archaeal communities of dairy cows over the transition period. *PLoS One*. 12, e0187858.
- Abaker JA., Xu TL., Jin D., Chang GJ., Zhang, K. and Shen, XZ. (2017). Lipopolysaccharide derived from the digestive tract provokes oxidative stress in the liver of dairy cows fed a high-grain diet. *J. Dairy Sci*. 100, 666 ~ 678.



Supplementary Figure S1. Validation of gene expression levels in Japanese Black beef cattle during the Early, Middle, and Late fattening stages by quantitative real-time PCR (qPCR). Fold changes are the differences in mean transcript abundance between the Early and Middle or Late stages.