

カシューナッツ副産物給与によるウシからのメタン生成削減

Reduction of Methane from Cattle Rumen by Feeding Cashew Byproduct

小林 泰 男
YASUO KOBAYASHI

北海道大学大学院農学研究院 〒060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

TEL & FAX: 011-706-2476

E-mail: kyas@anim.agr.hokudai.ac.jp

Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Kita 9 Nishi 9, Kita, Sapporo, Hokkaido 060-8589, Japan

キーワード: メタン, ウシ, ルーメン, 微生物

Key words: methane, cattle, rumen, microbes

(原稿受付 2013年9月5日/原稿受理 2013年9月12日)

1. はじめに

ウシ, ヒツジ, ヤギ, トナカイ, キリンなどに代表される反芻動物は, 地球上に 34 億頭存在し, その 90%以上が家畜である。彼らは上部消化管に複胃 (複数の分房となった胃) を有し, 中でも第一胃 (ルーメン) に多様な微生物群を形成することで, 摂食した繊維質の分解を微生物にゆだねている⁶⁾。分解発酵の主産物である短鎖脂肪酸 (SCFA) は胃壁から吸収され, 動物の主要なエネルギー源となる。このルーメン微生物発酵は高度の嫌気的条件下で進行するが, 飼料栄養素の異化で生じる代謝性水素の主要処理物としてメタンが生成される。メタンはあい気 (ゲップ) として体外へ放出されるが, 可燃ガスであることからしてエネルギーを含んでいるため, 飼料エネルギーの損失と言える (図 1)。実に飼料エネルギーの 2-12% に相当する分が大気中に損失してしまう³⁾。したがってメタンの低減は飼料の節約 (飼料エネルギーの利用効率向上) につながるため, 過去半世紀にわたってはもっぱらこの視点で反芻家畜からのメタン低減が研究対象になってきた。

ところが, メタン低減は近年の温暖化論議の中で大きな注目を集めるようになった。その理由は, ルーメン微生物発酵でつくられるメタンが世界の全メタン生成量の 20% 近くを占めること, CO₂ 換算するとウシ 1 頭が自家用車 1 台分の温暖化ガスエミッターであること, 総計すると家畜消化管から出るメタンは全地球温暖化ガスの約 5% に相当すること, などに要約される。畜産立国であるニュージーランドでは, 家畜からのメタンが国全体の温暖化ガス総量の 30% 以上を占める (日本では 0.5%) ため, その“罪状”は甚大である⁷⁾。

このような背景の下, 世界各国でメタン低減方法の模索が始まった。これまでは飼料に添加された抗生物質により, 約 5-10% 程度のメタン低減が可能であったが,

抗生物質の永続使用に懸念が示されている今, 新たな代替物のニーズが高い⁵⁾。欧州数カ国の研究機関連携プロジェクト RUMEN-UP が展開され, 全世界から収集された 500 種の植物から, メタン低減効果を有するものスクリーニングが実施された。数種がウシのルーメン液での培養試験でメタン低減能を示したものの, 家畜への給与試験でのメタン低減は明確にできずに終わっている¹¹⁾。

メタンをたとえ低減させたとしても, 上述の代謝性水素が蓄積するとルーメン発酵 (反芻家畜の飼料消化の根幹) そのものが遅滞する。したがってメタン生成以外の水素処理経路を活性化する必要がある。ルーメンではいくつかの水素処理系が存在する (コハク酸還元, 硝酸・亜硝酸還元, 還元的酢酸生成) が, 代替処理系としてもっとも有望なのがプロピオン酸生成 (コハク酸還元) 経路である。実際, メタンを低減するとほとんどの場合に代替水素処理産物としてプロピオン酸が増加する⁴⁾。糖原生の短鎖脂肪酸であるプロピオン酸はルーメンから吸収後, 家畜体内でグルコースに転換されるため, 飼料エネルギーの捕捉という点でメタンに比べはるかにメリットがある。

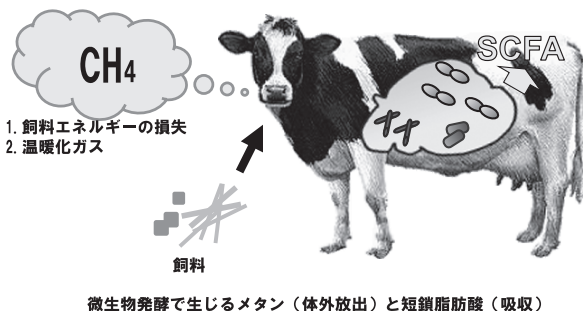


図 1. ウシ第一胃 (ルーメン) 発酵と生成メタンのもつ意味

本稿では、まずメタン低減・プロピオン酸増強効果を有する飼料添加物の代表的なものを紹介する。さらに安全かつ有効な天然飼料素材として近年注目を浴びている「カシューナッツ副産物」について概説し、その応用展開について述べることにする。

2. これまでに見つかっているメタン低減剤

ハロゲン化合物の一種であるブロムクロロメタン (CH_2BrCl) はルーメンに生息するメタン生成古細菌の代謝経路を阻害することでメタン低減をひきおこす。同時にプロピオン酸の増加が生じる。連続培養器では9割以上、ウシの給与試験では2-3割のメタン低減が可能であるので効果は高いと言える。しかし、ハロゲン物質の大気中への放出、オゾン層の破壊に対する懸念が当然生じ、これでは本末転倒なため、応用資材にはならずもっぱら研究素材である。

ウシルーメン内に生息するメタン生成古細菌に対する免疫付与も試行されてきた。ターゲットはルーメン内で優先種とされるメタン古細菌である。試験管内では明確に効果はあるものの、生体内では多種のメタン古細菌から抗体に反応を示さないものが選抜されて占有率をあげ、抗体による制御が難しいことが判明してきた¹⁶⁾。複数の優先種に対する免疫付与も試みられたもの、劇的な改善には至っていない。むしろ複雑なメタン古細菌叢に関する解析のさらなる必要性を強調する結果となっている¹⁵⁾。

1970年代後半に米国で生産された抗生物質モネンシンは、当初ウシのkokシジウム（原虫病の一種）予防薬として導入された。しかし本薬剤はルーメン微生物相と発酵様式を大きく改変するという報告が相次ぎ、上記のメタン低減・プロピオン酸増強剤として認知されるに至り、飼料添加物としての使用が瞬く間に全世界へ広がった¹²⁾。日本でも1980年代から現在に至るまで使われているが、抗生物質継続使用に対する懸念がおこり（下記参照）、そのシェアは低下中である。

2006年に欧州連合は家畜飼料への抗生物質添加を全

面的に禁止した¹¹⁾。その理由は以下のようなものである。全世界で抗生物質耐性菌が蔓延しており、その起源の主たるものが畜産領域での抗生物質の継続使用と思われる。とくに疾病予防や成長促進目的で飼料添加したものを長期使用すると家畜消化管内で耐性菌（耐性遺伝子）を生み、排泄物経由で諸環境へ伝播しうる。要約すると「ヒト用抗生物質が効かなくなるから畜産で使うな」というものである。モネンシン（上述）はヒト医療では使われておらず、その危惧には及ばない。しかし、現状では抗生物質全体の使用量・頻度をひかえるのが世界の主流となって来ている。

天然植物系のメタン低減剤がいくつか見出されている。作用機序はルーメンの微生物に選択的に働き、発酵様式が変わるといものである。ユッカや茶葉由来のサポニン、香辛料由来の精油成分などにメタン低減効果やプロピオン酸増強効果が報告されている¹⁾。これらは抗生物質と異なり医療現場とは無縁であり、またヒトとの関係の歴史は有史以前に遡ることから安全性の保障もあると考えられる。ただし、費用対効果の面から、広い活用には至っていない。

3. カシュー副産物の機能性

カシューナッツの殻を破碎・圧搾することで得られるカシュー殻液（Cashew nut shell liquid, CNSL）（図2）は、古くより塗料などの用途で広く使用されてきたが、稀少フェノール類（アナカルド酸ほか）を含む。それらフェノール成分の諸微生物に対する選択的な作用（界面活性作用）が報告されており⁸⁾、この機能をルーメン微生物相の改変と発酵制御に応用できないかとの着想に至った。以下に著者らのグループの研究着手前後の情報をまとめ、今後の応用展開について記述する。

3.1 これまでの学術情報

CNSLの主要フェノール成分はアナカルド酸であり、これはサリチル酸に炭素数15のアルキル側鎖が結合したものである。類縁フェノールのカルダノールとカルドールも含有され、これらも同じアルキル側鎖をもつ。

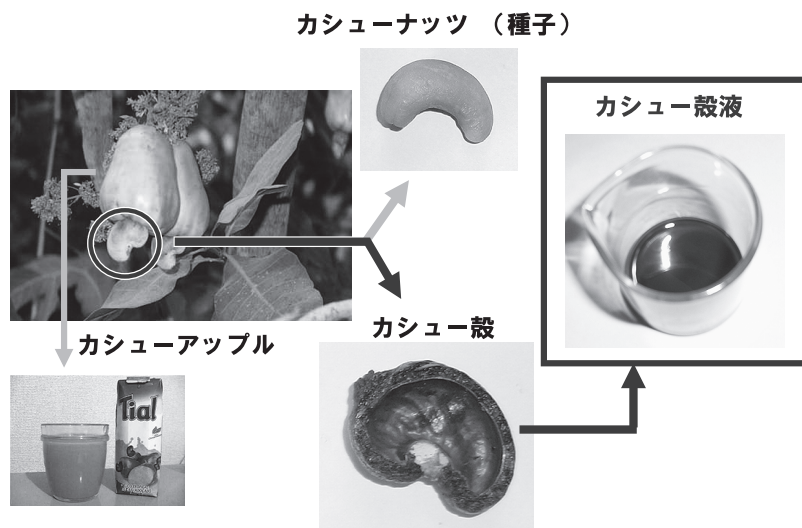


図2. カシュー殻液と関連産物

アルキル側鎖は3種あり、各々2重結合が1, 2もしくは3つあるので、合計9種の分子種が含まれることになる(図3)。いずれも界面活性作用を介して細菌細胞壁を物理的に損傷させるが、作用はアナカルド酸が最も強い。アナカルド酸は脱炭酸を受けやすくカルダノールに変わるが、カルダノールは他に比べて作用は弱い。これらのフェノール成分は、外膜を有するグラム陰性菌については損傷程度が低く、結果的に選択的な作用となる。

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* やその多剤耐性菌、う蝕菌 *Streptococcus mutans*⁸⁾、胃潰瘍起因菌 *Helicobacter pylori*⁹⁾ の抑制に効果が報告されており、食品・医療・衛生分野での応用が期待できるが、農業や畜産分野での利用をみすえた検討は、これまでできていない。ルーメンという複合微生物系が CNSL フェノール成分に暴露され、グラム陽性菌が選択的に抑制されれば、これまでウシ用飼料添加剤として使用されてきた抗生物質モネンシンと同様の効果が期待できるかもしれない。なぜならモネンシンもグラム陽性菌抑制効果を有するからである。このような背景と期待の下、CNSLのルーメン発酵へおよぼす影響について評価が始まった。

3.2 メタン低減能の発見と実証

まずルーメン内容物のガーゼろ液に調製法の異なる CNSL (加熱および非加熱 CNSL) を添加し、試験管内で生じる発酵への影響を査定した。もっとも大きな変化を示した発酵パラメータは産生ガスであり、とくにメタンは半減し、同時にプロピオン酸の蓄積が観察された¹⁴⁾。この効果は非加熱 CNSL で顕著であり、加熱 CNSL では極めて低いものであった。次に、より実際のウシ消化管に近い連続発酵槽(人工ルーメン)で容量反応をみたところ、CNSL 添加濃度に応じてメタンは減少し、200 mg/L で最大 70% 低減が観察され、プロピオン酸は 44% 増加した(図4)。ルーメン微生物活性の抑制による発酵様式の変化は時として飼料消化率を下げるが、この試験ではむしろ増加しており、CNSL は飼料消化を妨げずにメタンを選択的に減らす理想的な新素材として有望視されることになった。

次に動物への CNSL 給与試験を実施し、ヒツジおよびウシでメタン低減が可能ながことが明らかとなった。と

くにウシにおいては先端設備(Whole body chamber)において呼気ガスの連続精密定量を実施し、ウシからのメタン生成が平均 20–30% 低減可能ながことが実証された(表1)¹³⁾。このメタン低減率はモネンシンのそれ(5–10%)に比べはるかに高く、既存のメタン低減剤では最強と考えられる。

CNSL は油状の形態をとっており、嗜好性は低いいため、動物に採食させるためには嗜好性の良い飼料原料と混合成型するなど、適切な製剤化が必要である。その際、上述のように CNSL は加熱により機能が低下するため、低温製剤化のプロセスを踏む必要があった。そのためメタン低減評価用のペレット製剤として特別に調製された経緯がある。

3.3 メタン低減の機序

CNSL によるメタン低減効果を明かに説明することは、本素材の応用・普及上極めて重要である。CNSL のルーメン菌に対する選択的抑制作用の有無について、まず純培養系で評価された。代表的なルーメン由来の細菌 14 種およびメタン古細菌 8 種に CNSL やその構成フェノール成分を加え、最小生育阻止濃度の検定が行われたが、反応は菌種ごとに大きく異なっていた。すなわち、グラム陽性の細菌 7 種中 5 種は低濃度(1.56–6.25 mg/L)の CNSL、とくにアナカルド酸で生育阻害

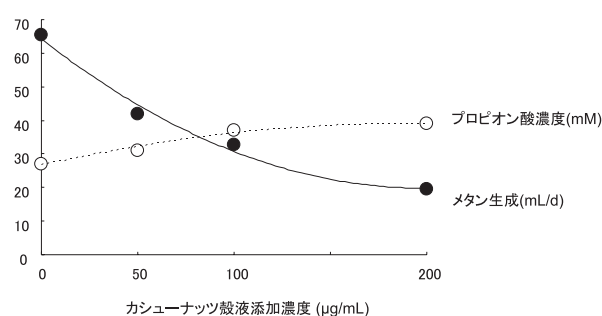


図4. 人工ルーメン内メタン低減とプロピオン酸増強におよぼすカシュー殻液の影響
いずれも2次関数的に低下または増減した(P<0.01)
Watanabe et al. (2010) より抜粋

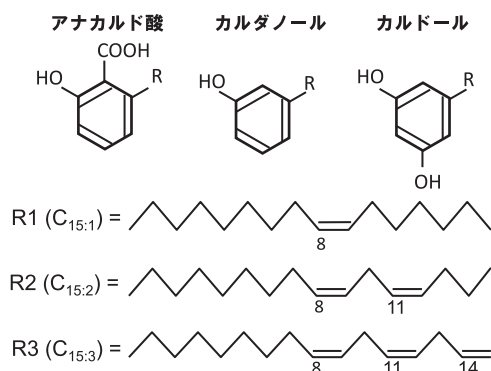


図3. カシュー殻液にふくまれる機能性フェノール成分
Rはアルキル側鎖でR1-R3の3種がある。アナカルド酸は加熱で脱炭酸がおこりカルダノールに変わる。

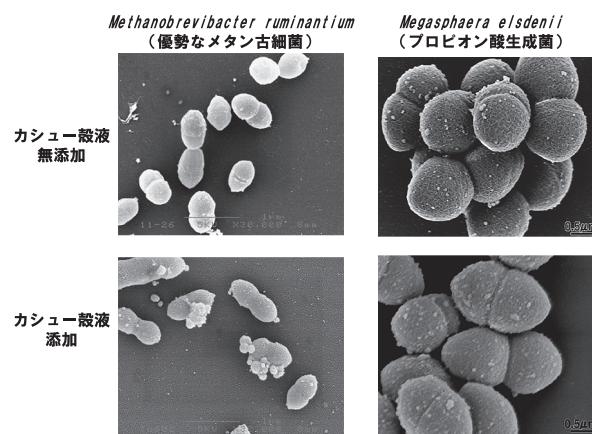


図5. カシュー殻液添加により細胞表面が損傷をうけるメタン古細菌と変化のなプロピオン酸菌

表 1. ウシからの排出メタンおよび飼料消化率におよぼすカシュー殻液給与の影響

	試験 1				試験 2			
	対照	カシュー	SEM	P-value	対照	カシュー	SEM	P-value
メタン, L/kg 乾物摂取量	44.8 ^a (100)	27.7 ^b (61.7)	3.803	0.046	38.3 ^x (100)	30.9 ^y (80.7)	1.696	0.037
メタン, L/kg 乾物消化量	59.3 (100)	38.4 (64.7)	5.259	0.058	54.1 ^x (100)	42.4 ^y (78.4)	0.935	0.011
メタン, L/kg 有機物消化量	61.4 (100)	39.7 (64.6)	5.576	0.060	55.5 ^x (100)	43.7 ^y (78.7)	1.806	0.023
有機物消化率, %	77.5	74.5	0.788	0.059	73.8	75.9	1.447	0.287
粗タンパク質消化率, %	68.2	63.2	1.464	0.076	67.4	73.1	1.495	0.063

ab,xy 同一試験において異なる肩文字のついた平均値間に有意差有り。
括弧内の数値は対照区を 100 とした時の相対値を表す。
データは Shinkai et al. (2012) より抜粋

をうけた。これらはメタンの基質となる水素やギ酸を産生する菌種であった。一方、グラム陰性菌 7 種のうち 4 種は CNSL による生育阻害を受けず、それらはプロピオン酸やその前駆体であるコハク酸を産生する菌種であった。阻害程度はアナカルド酸 > カルドール > カルダノールの順であり、CNSL の加熱によりアナカルド酸がカルダノールに変わり効能が下がることは、この阻害効果の低下が裏づけていそうである。一方、メタン古細菌も種により反応が異なり、通常ルーメン内で優先種とされる *Methanobrevibacter ruminantium* は極めて低濃度 (1.56 mg/L) で生育阻害を受けた。阻害を受けた菌種の細胞は細胞表層に損傷が生じており、阻害を受けない種は形態に変化はない (図 5)。フェノール成分の界面活性作用に対する表層の感受性の違いがうかがわれる。

アルキル鎖の炭素長や 2 重結合の数が異なるアナカルド酸類縁体の機能評価が *S. aureus* で実施されているが、C15:3 がもっとも菌生育阻害効果は高い。つまり細胞膜への損傷をもたらすためにはアルキル鎖の分子構造が重要であることが示唆されている¹⁰⁾。しかしながら、ルーメン菌においては、アルキル鎖の 2 重結合の数は生育阻害には大きな影響を与えず、CNSL の最大成分であるアナカルド酸 (CNSL 原液の約 60% を占める) はいずれの分子種であろうとほぼ同様の阻害効果が期待できると思われた。つまり、本目的に沿う CNSL の選抜にあたり (品種や地域間差はあろうとも)、アナカルド酸の濃度を基準とすることが肝要と言えらる。

次に CNSL、とくに構成フェノール成分であるアナカルド酸の選択的な菌生育阻害が、人工ルーメン内でも再現されることが証明されている (図 6)。すなわち、菌叢は CNSL 添加により大きく変動し、水素やギ酸生成菌 (*Ruminococcus flavefaciens* や *Treponema bryantii*) は数を減らし、コハク酸やプロピオン酸生成菌は数を増やしたことが明瞭である。実際のウシ給与試験でも、同様の傾向が観察されている¹³⁾ ので、CNSL 給与はルーメン菌叢をメタン減少・プロピオン酸増強の方向へ変化させていると考えて支障ないと思われる。

より網羅的な解析を通して CNSL がもたらす菌叢の変化について結論すべく、ウシルーメン内の 16S rRNA および *mcrA* 遺伝子の発現ライブラリーから 2154 配列が解析に供された。いずれも CNSL 給与時に特徴的な変化が観察されている。すなわち、真正細菌では CNSL 給与により *Succinivibrio dextrinosolvens* などのプロピオン酸生成関連菌の検出頻度が高まった。一方、古細菌

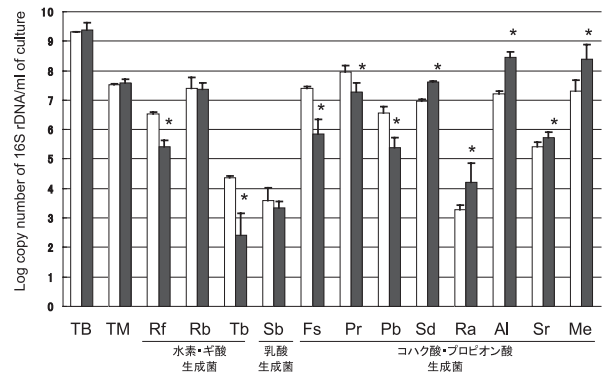


図 6. 人工ルーメン内の各種細菌数におよぼすカシュー殻液添加の影響

TB, total bacteria; TM, total methanogens; Rf, *Ruminococcus flavefaciens*; Rb, *Ruminococcus albus*; Tb, *Treponema bryantii*; Sb, *Streptococcus bovis*; Fs, *Fibrobacter succinogenes*; Pr, *Prevotella ruminicola*; Pb, *Prevotella bryantii*; Sd, *Succinivibrio dextrinosolvens*; Ra, *Ruminobacter amylophilus*; Al, *Anaerovibrio lipolytica*; Sr, *Selenomonas ruminantium*; Me, *Megasphaera elsdenii*.

□, 対照; ■, カシュー殻液

では、いくつかの未培養古細菌群が検出されなくなるのに対し、*Methanomicrobium mobile* の検出頻度が顕増した。ヒツジにおいては *Methanobrevibacter wolinii* という希少種の検出率が上がった。*S. dextrinosolvens* も *M. mobile* も CNSL やアナカルド酸に対して感受性が低いことが純粋培養で確認されており、生体内でも同様な反応を呈するものと思われる。

これまでの情報を基盤に CNSL 給与時のメタン低減機序をスキームにすると図 7 のようになる。CNSL はその界面活性作用により表層構造の異なる菌細胞に選択的に損傷を与え、その結果、真正細菌および古細菌双方の菌叢に変化をもたらす。真正細菌においては、水素やギ酸といったメタン合成の基質を作る菌種を抑制する一方、コハク酸やプロピオン酸生成菌が相対的に占有率を上げ、コハク酸還元経路の強化につながり、プロピオン酸が増加する。メタン生成古細菌においては、優先種とされているものが抑制を受け、その他のもの (*M. wolinii* など稀少種も含む) で置き換わる。後者はおそらくメタン合成に秀でたものではなく、形成されたメタン古細菌群は低活性なコミュニティになっている可能性が高い。実際、ウシの *mcrA* 遺伝子発現量は CNSL 給与時に下がっている¹³⁾。以上の要因が複合的に作用した

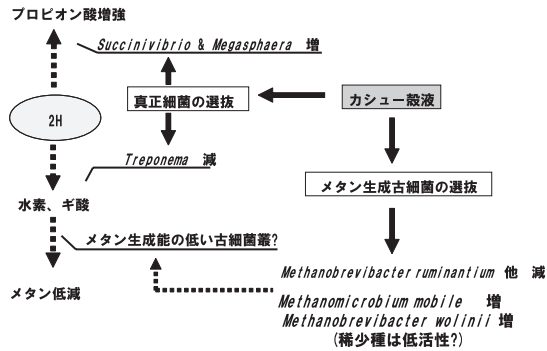


図7. カシュー殻液含有フェノール類によるウシルーメン発酵
 改変の作用機序

結果、メタン低減が生じ、それと引き換えにプロピオン酸増強が生じると考えられる。つまり、ルーメンで生じる代謝性水素は、メタン生成での処理分が減り、コハク酸還元での処理分が増えるということになる。

3.4 応用展開の方向

CNSLによるメタン低減効果が作用機序も含めて明らかになった今、より多くの家畜に利用し、メタンを減らすことで飼料エネルギーの損失を抑え、かつ温暖化の緩和につなげる必要がある。しかし家畜からのメタン削減の推進には、動物種や品種、地域飼料、飼養目的、あるいは宗教も考慮する必要がある、おかれた状況は地域により大きく異なる²⁾。またCNSLの産出はカシュー産業の成立している熱帯の数ヶ国に限定されており、製剤化のための輸送に経費がかかる。最善の策はカシュー産地で製剤プラントを立ち上げ、現地の家畜に利用する「地産地消」である。現在、最もメタン放出の多い地域のひとつである東南アジアでの実用化にむけ、タイ・カセサート大学と共同で地域家畜（在来牛や水牛：ルーメン菌叢が日本のウシと異なる）による評価を推進中である。

文 献

- Calsamiglia, S., M. Busquet, P.W. Cardozo, L. Castillejos, and A. Ferret. 2007. Essential oils as modifiers of rumen microbial fermentation. *J. Dairy Sci.* 90: 2580–2595.
- FAO. 2006. Livestock's long shadow: environmental issues and options. FAO Corporate Document Repository. <http://www.fao.org/docrep/010/a0701e/a0701e00.HTM>
- Johnson, K.A. and D.E. Johnson. 1995. Methane emissions from cattle. *J. Anim. Sci.* 73: 2483–2492.
- Kobayashi, Y. 2010. Abatement of methane production from ruminants: trends in the manipulation of rumen fermentation. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 23: 410–416.
- Kobayashi, Y., T. Shinkai, and S. Koike. 2012. Agricultural by-products as modulators of rumen microbiota. pp.49-60. In: *International Colloquium on Rumen Microbiology* (ISBN 978-85-63273-12-3, ISSN 1983-4357). Brazilian Soc. Anim. Sci., Brasillia, Brazil.
- 小林泰男. 2010. 第3章「家畜の消化機能」および第6章「家畜と温暖化」. pp. 31–49; 123–127; 150–158. 気象ブックス（畜産と気象），柴田正貴・寺田文典編，成山堂.
- 小林泰男. 2011. 家畜からのメタン生成を低減する天然物質の探索. *日本農業学会誌.* 36: 124–126.
- Kubo, I., K. Nihei, and K. Tsujimoto. 2003. Antibacterial action of anacardic acids against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *J. Agric. Food Chem.* 54: 7624–7628.
- Kubo, J., J. Lee, and I. Kubo. 1999. Anti-Helicobacter pylori agents from the cashew apple. *J. Agric. Food Chem.* 47: 533–537.
- Kubo, I., H. Muroi, and M. Himejima. 1993. Structure - antibacterial activity relationships of anacardic acids. *J. Agric. Food Chem.* 41: 1016–1019.
- Rumen-up. 2005. Final report from RUMEN-UP. Rowett Research Institute. http://www.rowett.ac.uk/rumen_up/index.html
- Russell, J.B. and H.J. Strobel. 1989. Effect of ionophores on ruminal fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1–6.
- Shinkai, T., O. Enishi, M. Mitsumori, K. Higuchi, Y. Kobayashi, A. Takenaka, K. Nagashima, M. Mochizuki, and Y. Kobayashi. 2012. Mitigation of methane production from cattle by feeding cashew nut shell liquid. *J. Dairy Sci.* 95: 5308–5316.
- Watanabe, Y., R. Suzuki, S. Koike, K. Nagashima, M. Mochizuki, R.J. Forster, and Y. Kobayashi. 2010. In vitro evaluation of cashew nut shell liquid as a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent for ruminants. *J. Dairy Sci.* 93: 5258–5267.
- Williams, Y.J., S. Popovski, S.M. Rea, L.C. Skillman, A.F. Toovey, K.S. Northwood, and A-D.G. Wright. 2009. A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 1860–1866.
- Wright, A.D.G., P. Kennedy, C.J. O'Neill, A.F. Toovey, S. Popovski, S.M. Rea, C.L. Pimm, and L. Klein. 2004. Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine* 22: 3976–3985.