

家畜の腸内細菌叢の計算科学的理解と応用展開

宮本浩邦^{1,2,3}、大野博司¹、高橋秀之⁴

¹ 理化学研究所生命医科学研究センター

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1-7-22

² 千葉大学大学院園芸学研究院

〒271-8510 千葉県松戸市松戸648

³ 千葉大発 VB (株) サーマス研究部門

〒263-8522 千葉県千葉市稲毛区弥生町1-33

千葉大学知識集約型共同研究拠点2-4F

⁴ 九州大学大学院農学研究院 資源生物科学部門 (高原農場)

〒878-0201 大分県竹田市久住町大字久住字鶴が笹4045-4

連絡責任者 宮本 浩邦 E-mail: hirokuni.miyamoto@riken.jp

Tel:043-290-3947

【要約】

地球上で人類が生存できる限界を示す概念「プラネタリー・バウンダリー」が2009年に定義されて以降、その深刻度はさらに増している。その対策の一つとして、生物多様性の損失から回復傾向へ向かわせる姿勢、いわゆる「ネイチャー・ポジティブ」が2030年のグローバル目標として掲げられている。このような国際社会の趨勢に伴い、さまざまな学術分野において、環境、並びに生態系全体を捉えた研究が増えてきている。筆者らは、産学共同研究の形式で、当該視点の研究を続けており、高温下で発酵する好熱菌叢を農畜水産分野、並びに環境分野において適用させた現場における学術的データを蓄積している。これらの解析では、計算科学的アプローチとして、機械学習、因子分析、並びに構造方程式・因果推論などが駆使されている。そこで本稿では、環境科学的な研究事例にも触れた上で、家畜の腸内細菌叢を対象とした研究事例とその応用展開の視点についてご紹介する。これらの技術情報が、持続可能な環境保全型の畜産技術の発展に少しでも貢献することができれば幸いである。

キーワード：腸内細菌叢、計算科学、環境保全型畜産、好熱菌

地球上で人類が生存できる限界を示す概念として「プラネタリー・バウンダリー」が2009年に定義されて以降 [1]、その深刻度はさらに増し、窒素・リン、新規化学物質の生物圏への過剰流入、並びに生物多様性の喪失がすでに危険な水準に達している [2]。そのため、国連生物多様性条約における第15回締約国会議

(CBD-COP15) (2021-2022年) では、2030年のグローバル目標として、生物多様性の損失から回復傾向へ向かわせる姿勢、すなわち「ネイチャー・ポジティブ」が掲げられている。生物多様性は、気象変動とも表裏一体の側面を持つことから、地球温暖化の観点にも関わることになる [2]。温暖化によって、生物の多様性は失われる傾向にあり、また逆に生物多様性が保持されることによって、温暖化のスピードが抑制されると予測されている。したがって、生物多

受付：2024年10月21日

受理：2024年10月21日

様性の喪失を防ぎつつ、温室効果ガスの発生を抑制させる仕組みを構築することが極めて重要であることがわかる。このような時代背景の中で、さまざまな学術分野において、環境、並びに生態系全体を捉えた研究が増えてきている。当該研究視点として、筆者らは、非食用の海産資源残渣を原料とした高温発酵（自家発酵熱として70-90℃）によって生産されたりサイクル発酵産物（以下、好熱菌発酵産物）[3]の機能性の評価を進めている（産学共同研究）（図1a）。好熱菌発酵産物には、好熱性のバシラス科（*Bacillaceae*）を含む好熱菌群が含まれ、複合菌、あるいは単離菌の状態、肥・飼料などとして長年使用されており、農畜水産分野、並びに環境分野における学術的なデータを蓄積している。これらの研究では、分野を超えて利用

されている計算科学的アプローチ [4, 5] を活用している。そこで本稿では、畜産分野以外の筆者らの研究事例についても概説するとともに、家畜の疾病予防と温暖化ガス発生の抑制を考慮した環境保全型畜産を目指す、家畜の腸内細菌叢を対象とした研究報告について論述する。

農水産・環境科学分野における研究事例

生態系における環境微生物・物質循環の理解を深めるために、図1bに示したステップで研究を進めている。

まず、農産分野の研究事例をご紹介します [6]。前述の好熱菌発酵産物の土壌への施用によって、植物は病害虫の影響を受けにくく、生産性を向上させる傾向が現場にて確認されていた。

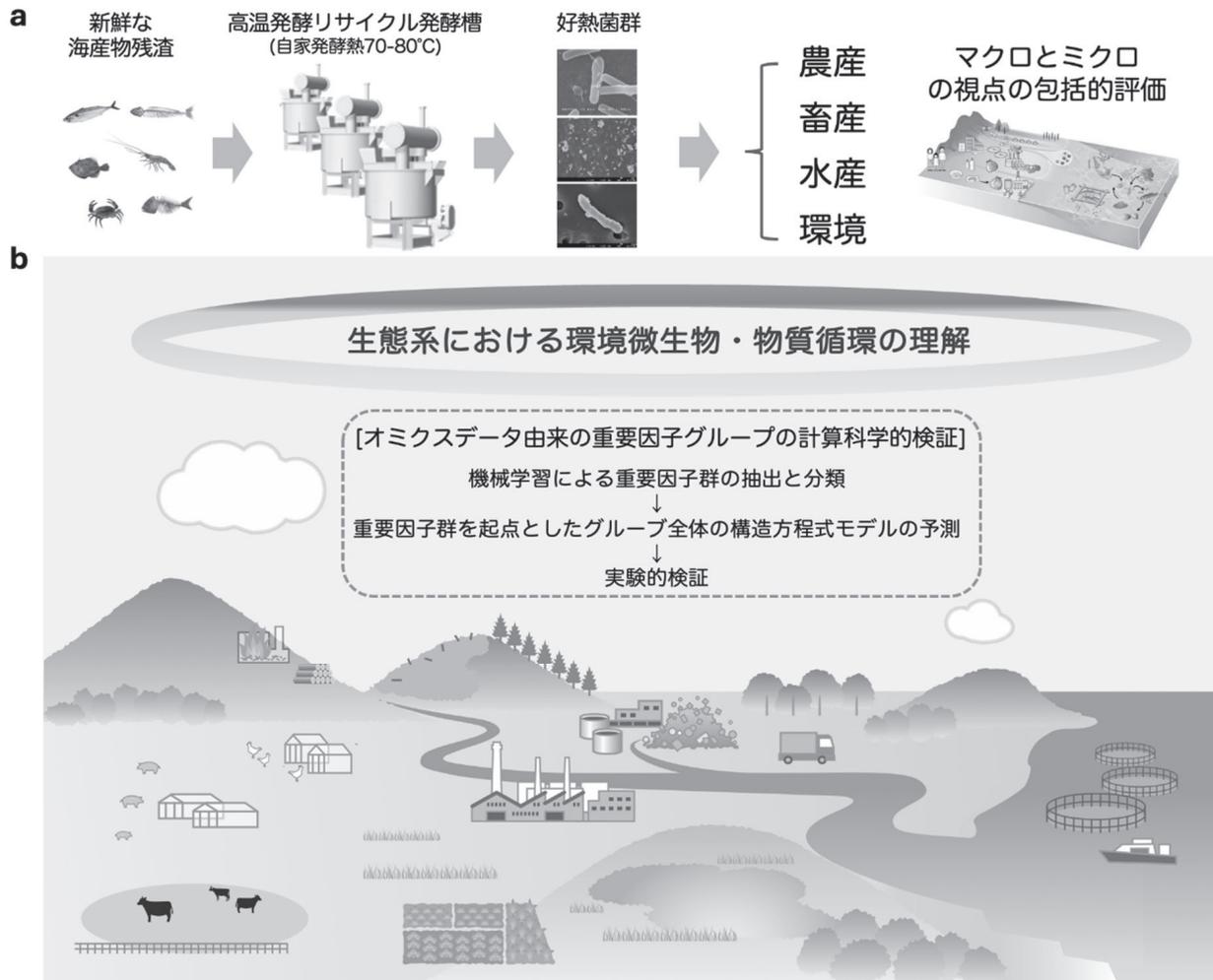


図1 計算科学を活用した生態系の理解

(a) 研究対象である好熱菌の研究開発の視点 (b) 生態系における環境微生物と物質循環に対する計算科学的評価の概念図

そこでその作用機序を探るために、根菜類であるニンジンモデル植物として、地中と地下の代謝物と土壤細菌叢の挙動を調査した。オミクス解析データに基づいて、機械学習（ここではデータの中央値に基づいて、オミクスデータを二値化して解析）によって対照区と試験区を識別する特徴的な因子群を抽出し、それらに基づく構造方程式を算出した。その結果、窒素循環に関わる細菌群と代謝物を含むグループが構造方程式モデルとして最適値を示すことが予測されたため、*in vitro* 試験によって、安定同位体の窒素の挙動、並びに脱窒反応を調べた。これらの知見から、好熱菌発酵産物の施用効果として、植物の生産性が改善した土壤環境では、窒素固定と温室効果ガスの一つである一酸化二窒素 (N_2O) (CO_2 の 298 倍の温暖化係数をもつ) の発生を抑制する可能性があることを推察している。

水産分野の事例としては、養殖施設と海草（アマモ、*Zostera marina*: 魚介類の卵を養う“海のゆりかご”として、低炭素社会の実現のためのブルーカーボンの認証対象）の関係に関する研究が挙げられる。疫学調査の結果、非閉鎖型の陸上養殖施設（海水を汲み上げ、養殖池を循環後に排水するタイプの養殖施設）が隣接する湾内では、その沿岸に海草が生えにくい傾向が確認された。しかしながら、その中でも、例外的に非閉鎖型の陸上養殖施設の沿岸で海草が繁茂する現場（好熱菌発酵産物を飼料の一部として長年利用）があり、海洋底泥の共生細菌群を調べた結果、海草繁茂に特徴的な共生細菌群のグループによる構造方程式モデルの計算に成功している。これらの共生細菌群の季節変動を調べると、発酵産物を飼料として活用している場合、構造方程式モデルの構成因子（海草繁茂に特徴的な共生細菌群）のバランスが明らかに安定していた [7]。これらの結果は、魚の腸内を介して周辺の海域の微生物生態系が変化する可能性を示唆しているため、詳しい解析が進められている。

同様の観点は、昆虫モデルの研究においても検証されている。なかでも、カブトムシの幼虫に好熱菌発酵産物を給与すると、最適値を示す構造方程式モデルの共生系のバランスが変わり、空気中の窒素固定をする細菌群や一酸化二

窒素の発生を抑制する可能性のあるアナモックス菌（ここでは *Gemmatimonadetes* 門）が増える傾向 [8] が併せて確認されている。腐葉土の存在意義や、腐葉土を用いた有機農業、あるいは森林を守るための生態系の一つとして、昆虫が果たす役割を示すデータであり、昆虫の腸内共生菌から捉えた温暖化対策に繋がる知見と想定している。

「腸・環」循環における研究視点

前述の養殖施設や昆虫を対象とした研究からも推察されるように、様々な動物種の腸内微生物は自然循環し、生態系と直接、あるいは間接的に関わっている。したがって、さまざまな「腸・環」との間で循環している生態系のネットワークを理解する必要がある（図 2a）。すなわち、外部環境因子が腸内環境にどのような影響を与え、その後、生理的な変化（家畜であれば生産性や耐病性）とともに、排泄後の外部環境にどのような影響が与えられるのかという観点における理解である。このような複雑系を捉えるための一つのツールとして、前述の計算科学的アプローチは威力を発揮しうる。概略としては、複数のデータの中から重要因子群を機械学習によって抽出し、因子分析、並びに構造方程式・因果推論によって、計算上、強い関係性を有するグループを見出す方法論である（図 2b）。一般的に、ある要因の影響を評価する場合、介入の有無（あるいは介入前後）の差を評価する差分法により任意の因子の統計的有意性を評価する。このメリットは、単一の重要因子の影響度合いを評価することにある。ただ、自然界における複雑な因子群のネットワークを俯瞰するためには、特定の因子の影響を追求するだけでなく、複雑なネットワーク構造の中でも重要なグループの統計的意義を理解する必要がある。例えば、差分分析で有意差がなくとも、常に存在する因子の存在意義を推察することにつながる。計算手順としては新旧織り交ぜた形となっており、機械学習は最新の技術である一方で、構造方程式の計算手法の歴史は古く、1900 年代の初頭に Wright が遺伝学の研究に活用した事例にまで遡る [9]。その後、計算手法も種々改良され、経済学、心理学、環境学、工学、土壌学などの幅広い分野での活用事例が報告され

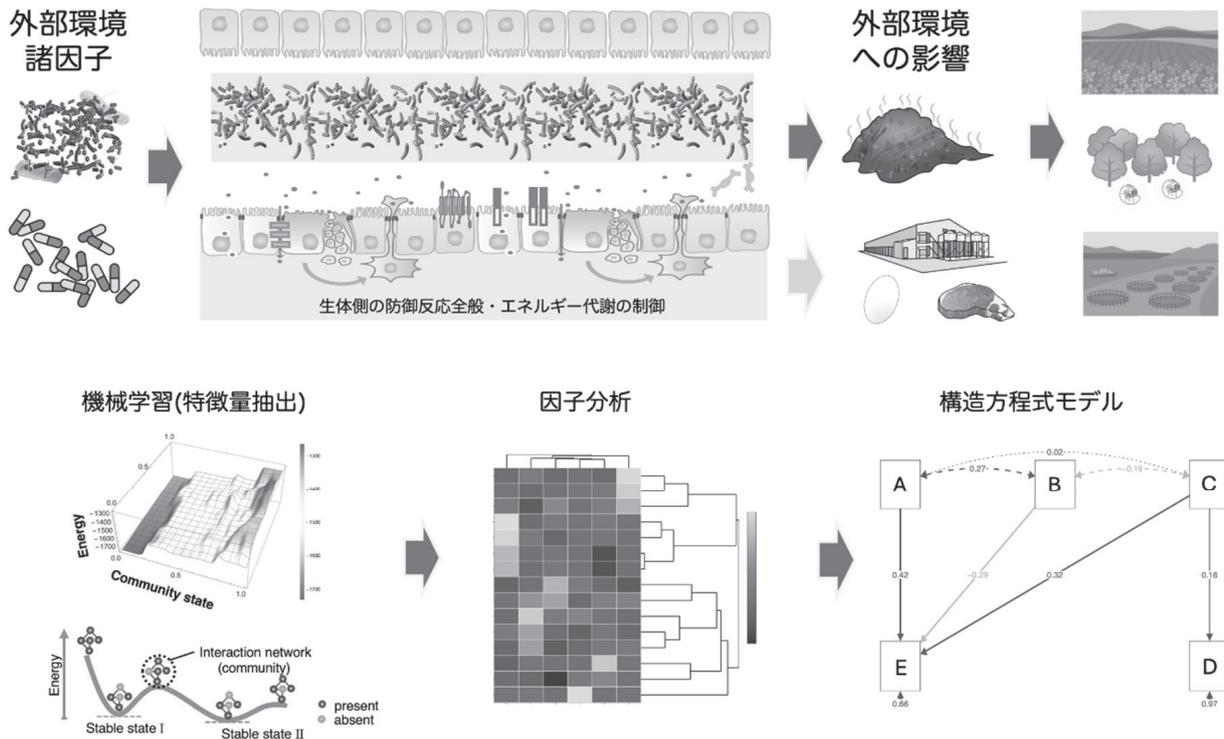


図2 「腸・環」循環の視点におけるオミクスデータを活用した構造的理解

(a)「腸・環」循環の視点.(b)計算科学的評価の主要なステップ 機械学習はエネルギーランドスケープの事例を示している。Stable state は、ネットワーク構造として安定性の高いグループ構造を意味している。因子分析では、機械学習の特徴量として選抜された因子群を対象として計算上の共通点に基づく分類をし、構造方程式では、これらの分類結果に基づいて選抜された因子群(図中では A-E)の関係性の強さを算出し、グループ全体の統計量、あるいは因子間の寄与度を合わせて示すことができる。

ている。但し、因子群の因果関係を統計的に評価しうる構造方程式モデルは、あくまでもグループ構造を予測する上での計算上のツールであるため、予測されたグループ内の因子群について実験的検証や過去の知見から推察されるデータが重要であることは言うまでもない。

家畜における研究事例

ここでは肉牛である黒毛和種を用いた研究報告として、抗菌薬 [10]、母子の腸内細菌叢の関係性 [11]、並びにこれらの関係に影響しうるプロバイオティクスに関する事例 [12] をご紹介する(図3)。

抗菌薬は、成長促進、あるいは感染症に対する予防的投薬を目的として用いられるが、過剰な使用は、薬剤耐性菌の蔓延につながる可能性があるため世界的に懸念されている。筆者らの研究では、抗菌薬を添加しない代用乳群(慣行

区)に対して、抗菌薬であるクロルテトラサイクリンを1%含有する代用乳群(抗菌薬群)を比較し、仔牛の発育成績や腸内環境に及ぼす影響を検討した。その結果、抗菌薬の有無は発育成績に影響しなかった。しかしながら、腸内細菌の構成割合と糞中有機酸濃度のデータに基づいて機械学習、および因果推論による詳細な解析を行った結果、抗菌薬無添加の代用乳給与は、仔牛の生産性・健全性に寄与する短鎖脂肪酸の一つである酪酸の産生に対して正の影響を与え、計算上、この構造方程式には酪酸産生菌である *Lachnospiraceae* 科(*Dorea* 属など)が関与していることが予測された。また、温室効果ガスであるメタンを産生する古細菌の *Methanobrevibacter* 属が酪酸に対して負の影響を与え、同時に抗菌薬の投与も負の影響を与える寄与度が算出された。このことから、抗菌薬に依存しない飼養管理は、仔牛の健全な発育の

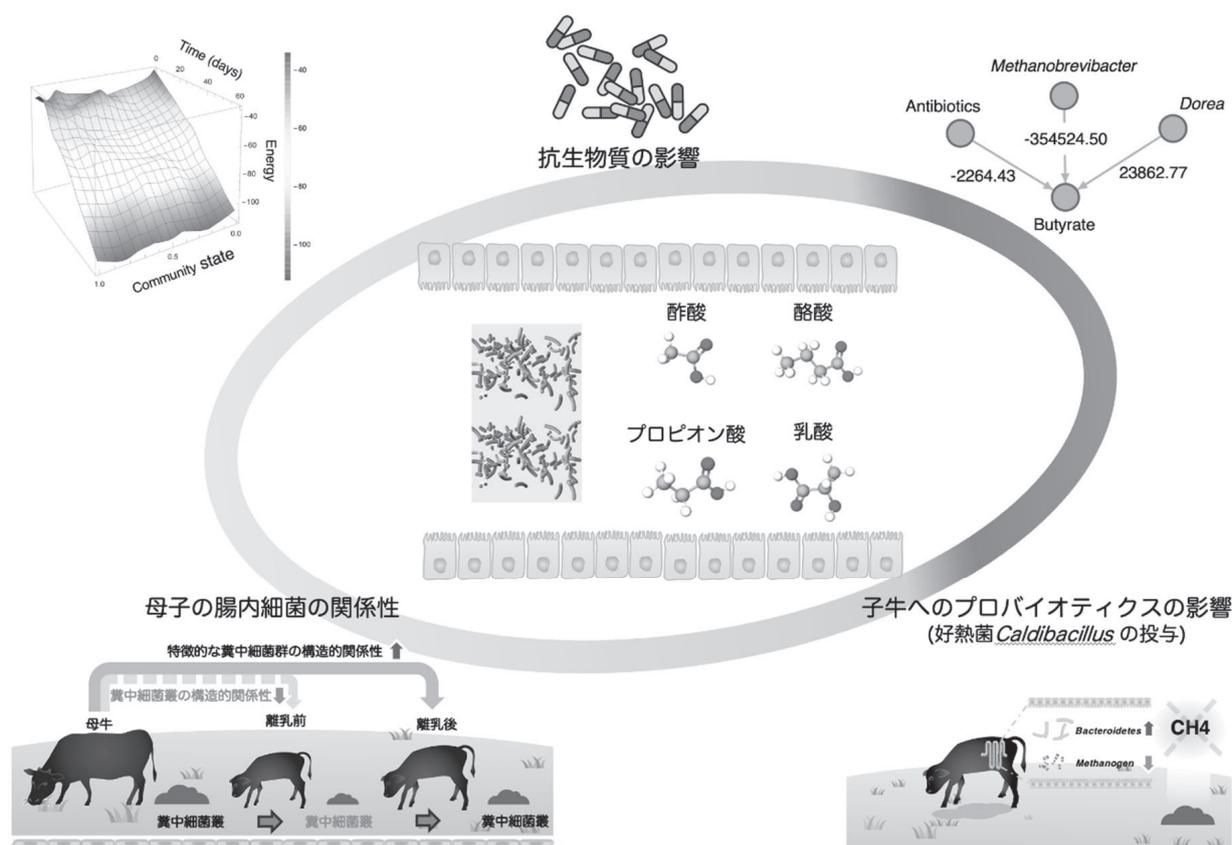


図3 家畜モデルにおける腸内環境の構造的理解

みならず、環境負荷の低減とも関係性があることが示された。

次に、母子の腸内細菌叢の関係性に関する研究事例をご紹介します。母子の腸内細菌叢を評価する取り組みは、世界的に進められており、妊娠期における母親の腸内細菌叢が、胎児の脳神経系や免疫系の発達、並びに出生後の疾病や肥満に影響を及ぼす可能性が指摘されている [13]。しかしながら、ヒト（での観察）を除き [14] 従来のモデル動物を用いた研究成果は、閉鎖系の飼育条件下で、かつ遺伝的に同系統の母子間を対象とした研究成果が中心であるため、開放系の飼育管理下において遺伝的背景が異なる母子が共存する通常の畜産現場（外部環境の土などにも直接、晒されうる畜産特有の環境下）、すなわち放牧飼育管理条件下における母子間の腸内細菌叢の関係性を機械学習、因子分析、並びに因果推論によって詳細に評価した。その結果、離乳前の仔牛よりも、むしろ離乳後の仔牛の糞中細菌叢が母牛の糞中細菌叢と強い関係性を有することが計算科学的に裏付けられた。そして、放牧飼育における離乳前後で外部

環境に晒されやすい特徴的な畜産環境においても認められることが示されたことになる。特に、糞中細菌群の中でも、*Faecalibacterium* 属と *Bifidobacterium* 属が、仔牛の生産性・健全性に貢献する短鎖脂肪酸（酢酸、プロピオン酸、酪酸）の増加に対して効果的であることが示された。

上記二つの研究事例に対して、改善傾向を示しうるプロバイオティクス候補の一つとして、前述の好熱菌発酵産物由来の *Caldibacillus hisashii*（微生物国際寄託番号 BP-863） [15] が挙げられる。離乳直後の黒毛和種仔牛への投与によって、飼育成績の向上とともに *Bacteroidetes* 門と短鎖脂肪酸が増加し、メタン産生菌の一種である *Methanobrevibacter* 属の構成割合は減少する傾向が確認されている [12]。また、離乳前の投与においても計算上の因果構造のネットワーク上、短鎖脂肪酸との間で強い寄与度であることが計算上示された [11]。同様の改善傾向は、鶏・豚でも確認されている。動物種毎に腸内細菌叢は異なるため、普遍的なメカニズムを探る研究が進められている。

以上のように環境諸要因が関わり合う複雑系の中で、基幹となるネットワーク構造を予測する上で、本稿でご紹介した計算手法は有効であり、今後の家畜の腸内細菌叢の評価と応用展開においても活用できることが期待される。

おわりに

2015 年にご逝去された早石修先生（京都大学名誉教授）は、医師でありながら土壤微生物由来の酸素添加酵素（oxygenase）の研究を進め、動物種を超えた普遍的な作用機序を解明し [16]、「生化学の父」と呼ばれた。そして、その後ノーベル医学・生理学賞の本庶佑博士など著名な研究者を輩出してきた。本稿の研究視点は、異分野に挑戦し続けてきた博士の足跡に学ぶものでもある。本稿の情報が、将来の持続可能な環境保全型の畜産技術の発展に少しでも貢献する機会となれば幸いである。

謝辞

腸内細菌叢の影響評価については、理化学研究所 IMS・服部正平博士、須田互博士、因果推論については、理化学研究所 CSRS・菊地淳先生、*Caldibacillus hisashii* の機能性評価については、千葉大学大学院園芸学研究院・児玉浩明教授に多大なる御協力を賜りました。また産学共同研究機関として、京葉ガスエナジーソリューション株式会社をはじめとして様々な現場の方々の御協力を賜っております。ここに深謝致します。

引用文献

- [1] Rockström J, Steffen W, Noone K, Persson A, Chapin FS, Lambin EF, et al. A safe operating space for humanity. *Nature*. 2009;461:472-5.
- [2] Rockstrom J, Gupta J, Qin D, Lade SJ, Abrams JF, Andersen LS, et al. Safe and just Earth system boundaries. *Nature*. 2023;619:102-11.
- [3] Miyamoto H, Miyamoto H, Tashiro Y, Sakai K, Kodama H. Studies on highly functional fermented-products made from unutilized biomass resources by thermophilic bacteria. *Seibutsu-kogaku Kaishi*. 2018;96:56-63.
- [4] Miyamoto H, Kikuchi J. An evaluation of homeostatic plasticity for ecosystems using an analytical data science approach. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2023;21:869-78.
- [5] Kurotani A, Miyamoto H, Kikuchi J. Validation of causal inference data using DirectLiNGAM in an environmental small-scale model and calculation settings. *MethodsX*. 2023;12:102528.
- [6] Miyamoto H, Shigeta K, Suda W, Ichihashi Y, Nihei N, Matsuura M, et al. An agroecological structure model of compost-soil-plant interactions for sustainable organic farming. *ISME Commun*. 2023;3(1):28.
- [7] Miyamoto H, Kawachi N, Kurotani A, Moriya S, Suda W, Suzuki K, et al. Computational estimation of sediment symbiotic bacterial structures of seagrasses overgrowing downstream of onshore aquaculture. *Environ Res*. 2022;219:115130.
- [8] Miyamoto H, Futo Asano F, Ishizawa K, Suda W, Miyamoto H, Tsuji N, et al. A potential network structure of symbiotic bacteria involved in carbon and nitrogen metabolism of wood-utilizing insect larvae. *Science of the total Environment*. 2022;836:155520.
- [9] Wright S. On the nature of size factors. *Genetics*. 1918;3(4):367-74.
- [10] Okada S, Inabu Y, Miyamoto H, Suzuki K, Kato T, Kurotani A, et al. Estimation of silent phenotypes of calf antibiotic dysbiosis. *Scientific Reports*. 2023;13:6359.
- [11] Taguchi Y, Kurotani A, Yamano H, Miyamoto H, Kato T, Tsuji N, et al. Causal estimation of maternal-offspring gut commensal bacterial associations under livestock grazing management conditions. *Computational and Structural Biotechnology Reports*. 2024;1:100012.
- [12] Inabu Y, Taguchi Y, Miyamoto H, Etoh T, Shiotsuka Y, Fujino R, et al. Development of a novel feeding method for Japanese black calves with thermophile probiotics at postweaning. *J Appl Microbiol*. 2022;132(5):3870-82.
- [13] Sinha T, Brushett S, Prins J, Zhernakova A. The maternal gut microbiome during pregnancy and its role in maternal and infant health. *Curr Opin Microbiol*. 2023;74:102309.
- [14] Makino H, Kubota H, Ishikawa E, Sakai T, Matsuda K, Akiyama T, et al. Intestinal Microbiota in Infants: Factors Influencing its Composition and Development. *腸内細菌学雑誌*. 2019;33(1):15-25.
- [15] Nishida A, Miyamoto H, Horiuchi S, Watanabe R, Morita H, Fukuda S, et al. *Bacillus hisashii* sp. nov., isolated from the caeca of gnotobiotic mice fed with thermophile-fermented compost. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2015;65(11):3944-9.

- [16] 早石修. 握り飯より柿の種. ファルマシア.
2006;42:539-41.

Computational science for the gut microbiota of livestock animals and its application

Hirokuni Miyamoto^{1,2,3}, Hiroshi Ohno¹, Hideyuki Takahashi⁴

¹ RIKEN Center for Integrative Medical Sciences, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

² Graduate School of Horticulture, Chiba University, Matsudo, Chiba 271-8510, Japan

³ Sermas Co., Ltd., Ichikawa, Chiba 263-8522, Japan

⁴ Kuju Agricultural Research Center, Kyushu University, Takeda, Oita 878-0201, Japan

[Abstract]

The Planetary Boundary, a concept that indicates the limits of human survival on Earth. The severity of the problem has increased even more. For this reason, a so-called “Nature Positive” attitude toward recovery from biodiversity loss has been set as a global goal for 2030. In response to this trend in the international community, studies that takes a holistic view of the environment and ecosystems are increasing in various academic fields. The authors have been conducting research from this perspective in the form of industry-academia joint research and have accumulated academic data in the field of applying thermophiles that play some roles in the fields of agriculture, livestock and fisheries, as well as the environment. In these analyses, machine learning, factor analysis, and structural equations, which is used in fields such as economics, psychology, and environmental science, are applied as computational scientific approaches. Here, the results of computational scientific research on the gut microbiota of livestock will be introduced after touching on these examples outside the livestock field. This technical information may contribute to the development of sustainable and environmentally-friendly livestock farming technologies.

Keywords: computational science, environmentally-friendly livestock farming, gut microbiota, thermophile