

# 殺菌乳酸菌Lactobacillus paracasei K71が離乳子豚の発育，糞便性状，小腸および病原因子に及ぼす効果

|       |   |
|-------|---|
| 誌名    | 日本養豚学会誌   |
| ISSN  | 0913882X  |
| 著者名   | 小橋,有里<br>井口,真理子<br>大久保,剛揮<br>藤井,崇<br>熊谷,武久<br>渡辺,紀之 |
| 発行元   | 日本養豚学会  |
| 巻/号   | 50巻2号   |
| 掲載ページ | p. 46-50  |
| 発行年月  | 2013年6月   |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## 短 報

殺菌乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* K71 が離乳子豚の発育、  
糞便性状、小腸および病原因子に及ぼす効果小橋有里・井口真理子\*・大久保剛揮  
藤井 崇・熊谷武久\*・渡辺紀之\*

新潟県農業総合研究所畜産研究センター, 新潟県三条市, 955-0143

\*亀田製菓株式会社お米研究所, 新潟県新潟市, 950-0198

(2012年12月25日受付, 2013年4月3日受理)

## 緒 言

欧州食品安全機関 (EFSA) は 2012 年 6 月 4 日、ヒト及び動物に重要な抗菌剤への細菌の感受性の評価に関する手引書を公表した (EFSA, 2012)。薬剤耐性の問題から、抗菌剤の使用の際には、感受性の評価が欠かせなくなっているのが現状である。動物用飼料に使用する抗菌性飼料添加物及び抗菌剤については、1997 年の EU でのアポパルシンの使用中止以来、様々な議論がなされてきている。デンマークでの抗菌性飼料添加物の使用を中止したことによる家畜の疾病増加や生産性低下、また治療用抗菌剤の使用量の増加といったマイナス面等を踏まえ (小林, 2004)、我が国でも、内閣府食品安全委員会が 2004 年に「家畜等への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌の食品健康影響に関する評価指針」を作成 (内閣府食品安全委員会, 2004)、2006 年に「食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす細菌に対する抗菌物質の重要度のランク付けについて」を決定 (内閣府食品安全委員会, 2006)、その後も個別の薬剤についてワーキンググループによる調査を続けている。

その一方で、抗菌性飼料添加物に依存しない減投薬飼養管理システムの構築を目指した研究も行われている (農林水産省農林水産技術会議事務局編集, 2009)。離乳子豚に乳酸菌を添加した発酵リキッド飼料を給与すると、抗体応答を賦活化すること (MIZUMACHI ら, 2009)、薬剤耐性菌を減少させること (KOBASHI ら, 2008)、腸内細菌の多様度が高まること (TAJIMA ら, 2010) などが報告されており、抗菌性飼料添加物の代替効果が注目されている。また、近年、乳酸菌の生菌剤だけでなく、殺菌菌体による腸管免疫活性化作用も注目されており、子豚に *Enterococcus faecalis* 殺菌菌体を摂取させると、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) によって引き起こされる浮腫病の改善が見られたとの報告もある (TSUKAHARA ら, 2007)。このような殺菌菌体成分による作用はバイオジェニックスのひとつで、バイオジェニックスとは「腸内フローラを介さず直接、免疫刺激、抗変異原作用、抗腫瘍作用、抗酸化作用、コレステロール低下作用あるいは腸内腐敗抑制作用などによって、生体に有利に働く成分」であり、乳酸菌発酵生産物、免疫強化物質を含む生理活性ペプチド、植物フラボノイドなどの成分が該当すると言

Effect of the Heat-Killed *Lactobacillus paracasei* K71 on Growth, the Feces Quality, Small Intestine, and Pathogenesis Factor in Weaning Piglets

Yuri KOBASHI, Mariko IGUCHI\*, Goki OHKUBO, Takashi FUJII, Takahisa KUMAGAI\* and Toshiyuki WATANABE\*  
Niigata Agricultural Research Institute Livestock Research Center, Sanjo, Niigata 955-0143, Japan

\*KAMEDA SEIKA CO., LTD. Rice Research Center, Niigata, Niigata 950-0198, Japan

**Key words** : weaning piglet, intestinal immunity, biogenics, *L. paracasei* K71

連絡者 : 小橋有里 (E-mail : ykobashi@ari.pref.niigata.jp Tel. 0256-46-3103)

われている (光岡, 2002)。

現在, 多くのバイオジェニクス製剤が市販されており, 様々な効果が報告されているが, 実際の動物を用いた効果は様々であり, 適用の範囲は不明である。本研究では, 既にヒトやマウスでアレルギー症状の緩和等の免疫活性効果が確認され, 市販されている殺菌乳酸菌 *Lactobacillus paracasei* K71 (以下 K71, MOROI ら, 2011; KUMAGAI ら, 2013) 粉末を用い, 抗菌性飼料添加物を排除した条件で, 知見のない離乳子豚に対する発育, 下痢, 小腸組織および病原因子に及ぼす K71 の効果を検証した。

## 材料及び方法

### 1. 供試豚

本実験におけるすべての実験手技は, 新潟県農業総合研究所畜産研究センター動物実験等実施要領に基づいて行った。

2011年7月28日から2011年8月16日に母豚6腹から生まれたランドレース純粋種子豚48頭を生後25日で離乳し(去勢24, 雌24, 平均体重 $5.8 \pm 0.1$  kg), 順次試験を開始した。同腹の離乳子豚を雌雄均等に慣行飼料のみ給与する区(対照区, 去勢12, 雌12, 平均体重 $5.8 \pm 0.2$  kg)とK71を慣行飼料の原物重0.1%添加給与する区(K71区, 去勢12, 雌12, 平均体重 $5.8 \pm 0.2$  kg)に分け, 28日間の飼養試験を行った。ただし, 母豚6腹のうち1腹の8頭は, 試験開始10日後にと畜し, 小腸長と絨毛高の調査に用いた。よって, その他の調査項目は, 5腹40頭(対照区, 去勢10, 雌10, 平均体重 $5.9 \pm 0.2$  kg), K71区, 去勢10, 雌10, 平均体重 $5.9 \pm 0.2$  kg)から得たデータを用いた。

### 2. 飼料と給与方法

試験開始までの子豚は母豚毎に群飼し, 全てに抗菌性飼料添加物および乳酸菌類の入っていないほ乳期用配合飼料を不断給与, 自由飲水とした。離乳から28日間は, 試験用豚舎に移動し, 同腹同試験区の4頭を群飼し, それぞれの飼料を不断給与, 自由飲水とした。

試験期間中に給与した慣行飼料の組成は, トウモロコシ50.2, 脱脂粉乳20.1, 大豆粕20.1, 砂糖3.4, 植物性油脂3.4, その他2.8(原物%), 飼料成分はCP21.2, EE5.8, NDF8.1, TDN85.0(乾物%)である。また, K71の効果を明確にするために, 抗菌性飼料添加物を排除した飼料とした。

飼料に添加したK71は酒粕から分離されたK71

の殺菌菌体とデキストリンを1:1で混合した粉末で, 生菌体換算で乳酸菌を $10^{12}$  CFU/g含有しているものを用いた。

### 3. 調査項目

下痢の状態を数値化するため, 1日1回, 朝方に各豚房床に落下している糞便の性状を4段階(1:正常, 2:水分が高いが有形, 3:水分が高く無形, 4:水様性)で8箇所, 観察評価し, 4頭1群の平均値を糞便スコアとした。

糞便中の微生物数測定のため, 試験開始0, 14, 28日目に全頭の直腸糞を採取し, 直ちに培養を開始した。乳酸菌はLactobacilli MRS Agar (Difco), 大腸菌群はデゾキシコレート培地(日水製薬)を用い, 希釈培養法により, 新鮮糞1gあたりのコロニー数を算出した。

小腸長と絨毛高測定のため, 試験開始10日後に, 同腹の子豚8頭(各区去勢2・雌2頭)をと畜し, 小腸の全長を測定するとともに, 回盲弁より20cm上部付近の小腸後部の組織切片をHE染色により作成した。絨毛高は, 1検体から10本の絨毛高を測定し, その平均により求めた。

血漿・糞便中の免疫グロブリン分析のため, 試験開始0, 14, 28日目に全頭の頸静脈より真空採血管で採血を行い, 遠心分離機により血漿を分離し, 分析まで $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。同日に直腸糞を採取し, 分析まで $-20^{\circ}\text{C}$ で保存した。総IgA濃度はPig IgA ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories), 総IgG濃度はPig IgG ELISA Quantitation Kit (Bethyl Laboratories)を用いて測定した。

糞便中病原性遺伝子の検出のため, 免疫グロブリン分析用に採取した直腸糞を用い, QIA amp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN)を用いてDNA抽出を行った。腸管出血性大腸菌のVT遺伝子, 毒素原性大腸菌のSTp遺伝子とLT遺伝子および毒素産生ウェルシュ菌のCPE遺伝子の4つを選択し, 糞便DNAを鋳型として, リアルタイムPCRで検出した。EVC-1/2(VT遺伝子検出用), ESP-1/2(STp遺伝子検出用), ELT-1/2(LT遺伝子検出用)には, 特殊細菌検出用Primer Set (TaKaRa)を, CPE(CPE遺伝子検出用)には, KATOら(1993)と同様のFWプライマー(5'-GGTTCATTAATTGAAA-CTGGTG-3')およびRVプライマー(5'-AACGCC-AATCATATAAATTACAGC-3')を, 計4種類のプライマーペアを用いて, Light Cycler ver. 1.5 (Roche Applied Science)により増幅した。Ct値35

サイクルまでに蛍光量が上昇した試料を陽性とした。

#### 4. 統計解析

大腸菌群数, 乳酸菌数の群間の増減は二標本 t 検定, 遺伝子検出は  $\chi^2$  検定, それ以外は Mann-Whitney の U 検定により有意差検定を行った。また, 大腸菌群数, 乳酸菌数は, 常用対数に変換後, 統計処理を行った。

### 結 果

試験期間中の日増体量, 飼料摂取量, 糞便スコアを表 1 に示した。各項目とも, 対照区と K71 区の間に有意差は無かった。乳酸菌数は, 試験開始日である離乳時に  $2.6 \times 10^{11}$  CFU/g 生重量 (FM) であった。試験開始 28 日後, 対照区では  $9.1 \times 10^{11}$  CFU/g FM に増加し ( $P < 0.01$ ), K71 区では  $1.6 \times 10^{12}$  CFU/g FM に増加した ( $P < 0.001$ )。28 日後の乳酸菌数は, 対照区と比べ, K71 区が有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。

表 1. K71 が子豚の発育および糞便スコアに及ぼす影響

Table 1. Effects of K71 diet on growth performance and fecal score

| Items                             | Control | K71    | SEM <sup>1</sup> |
|-----------------------------------|---------|--------|------------------|
|                                   | (n=20)  | (n=20) |                  |
| Weaning weight (kg)               | 5.88    | 5.88   | 0.11             |
| Feed intake (kg/day) <sup>2</sup> | 0.68    | 0.69   | 0.32             |
| Daily gain (kg/day)               | 0.19    | 0.19   | 0.02             |
| Fecal score                       | 1.87    | 1.73   | 0.11             |

<sup>1</sup>Standard error of the mean. <sup>2</sup>DM basis.

糞便中の大腸菌群数は, 試験開始日である離乳時に  $8.4 \times 10^9$  CFU/g FM であった。試験開始 28 日後, 対照区では  $3.4 \times 10^8$  CFU/g FM に減少し ( $P < 0.05$ ), K71 区では  $9.5 \times 10^7$  CFU/g FM に減少した ( $P < 0.01$ )。28 日後の大腸菌群数は, 両区に差が無かった。

小腸長は, 対照区が 7.58m であったのに対し, K71 区が 8.35m であり, 有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。また絨毛高は, 対照区が 556.4 $\mu$ m であったのに対し, K71 区が 646.4 $\mu$ m であり, 有意に高値を示した ( $P < 0.05$ )。

血漿中の総 IgA 濃度は, 対照区が 477.61 $\mu$ g/ml, K71 区が 432.40 $\mu$ g/ml であった。また, 総 IgG 濃度は, 対照区が 4.76mg/ml, K71 区が 5.03mg/ml であった。糞中の総 IgA 濃度は, 対照区が 3.37 $\mu$ g/ml, K71 区が 3.35 $\mu$ g/ml であった。いずれも統計的有意差は無かった。

表 2 に糞便中病原性遺伝子の検出結果を示した。腸管出血性大腸菌の VT 遺伝子は, 試験開始日から対照区 60%, K71 区 70% と高頻度で検出されていたが, 28 日後には, 対照区が 66% であったのに対し, K71 区が 25% であり, 有意に低値を示した ( $P < 0.01$ )。毒素原性大腸菌の STp 遺伝子は, 試験開始日に対照区 15%, K71 区 20% の検出率であったが, 14 日後には対照区 89%, K71 区 80% と増加し, 28 日後でも対照区 66%, K71 区 60% と減少したものの, K71 給与による明確な有意差は確認されなかった。毒素原性大腸菌の LT 遺伝子および毒素産生ウェルシュ菌の CPE 遺伝子は, 試験期間中に検出されなかった。

また, 試験開始 10 日後の小腸の組織検査, または 14 日後の糞便検査により, 対照区 25%, K71 区 12.5

表 2. 病原性遺伝子の検出

Table 2. Detection rate (%) pathogenic genes

| Target gene | 0 day   |     | 14 days |     | 28 days |      |
|-------------|---------|-----|---------|-----|---------|------|
|             | Control | K71 | Control | K71 | Control | K71  |
| VT          | 60      | 70  | 52      | 45  | 66      | 25** |
| STp         | 15      | 20  | 89      | 80  | 66      | 60   |
| LT          | 0       | 0   | 0       | 0   | 0       | 0    |
| CPE         | 0       | 0   | 0       | 0   | 0       | 0    |

\*\* show significantly different at  $P < 0.01$

VT, Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*; STp and LT, Enterotoxigenic *Escherichia coli*; CPE, *Clostridium perfringens*.

%がコクシジウム感染していることが判明し、その発生率や発生状況に区間差はなかった。

## 考 察

本試験では、抗菌性飼料添加物を排除した条件で、離乳子豚へのK71の効果を検証した。K71の給与によって、発育の向上や下痢の低減、総イムノグロブリン濃度の上昇には至らなかったものの、小腸の絨毛高が長くなり、糞便中の乳酸菌数が増加し、腸管出血性大腸菌のVT遺伝子の検出率が減少した。

近年の研究で、乳酸菌による腸管免疫活性化作用には、菌体成分が重要な役割を果たしているとの報告がされている。乳酸菌やビフィズス菌の菌体成分が腸管免疫を活性化する理由は、腸管上皮細胞に存在し、免疫に関わるレセプターの一つであるTLR2 (Toll-like receptors 2) を刺激したため、刺激されたTLR2はサイトカイン産生を誘導し、抗菌物質であるディフェンシンを分泌することで病原菌の繁殖を防ぐ(高橋, 2011)。さらに、このTLR2を介して、腫瘍細胞を攻撃するNK細胞を活性化すること、アレルギー反応を抑制するTh1細胞を活性化すること等、免疫を担当する細胞を活性化することが報告されている(AKIRA and TAKEDA, 2004)。一方、液性免疫では、TLR2のB細胞への刺激により、IgA抗体の産生および管腔へのIgA抗体の輸送が促進され、腸管管腔へのIgA抗体分泌量が増大し、病原菌に対する感染防御活性が高められる。

K71は、II型インターフェロン(INF- $\gamma$ )誘導能が高く、インターロイキン-4(IL-4)抑制能が高い特徴があり、結果的にIgE産生を抑制することで、アレルギー反応を抑制する可能性が高いことがBalb/cマウスを用いた最新の研究で報告されている(KUMAGAIら, 2013)。

これらのことから、K71の給与により乳酸菌の殺菌菌体由来のリポペプチドやペプチドグリカンがTLR2を刺激した結果、サイトカインINF- $\gamma$ の産生を誘導し、病原菌排除に関連する免疫が向上し、VT遺伝子の検出率低下につながったのではないかと推測される。本試験と同様に、下痢の頻発する臨床現場において、殺菌乳酸菌製剤(EC-12)を投与した試験でも、溶血性大腸菌とウェルシュ菌の検出率が有意に低下した報告があり、生菌製剤とは異なる殺菌菌体成分による腸管免疫の活性化によって起こったと考察されている(塚原ら, 2006)。また、こ

のEC-12をリステリア菌感染マウスに投与した試験では、小腸上皮細胞においてTh1サイトカインの産生促進が確認され、その結果細胞性免疫が活性化され、リステリア菌から宿主を防御したと推察されている(倉本ら, 2004)。

本試験で、小腸長が伸長したことは原因が不明であるが、有意に小腸絨毛が高くなった。早期離乳したマウスとブタで、対照区では小腸絨毛が萎縮していたのに対し、殺菌乳酸菌を投与した区では萎縮が改善できることが報告されており、TLR2が殺菌菌体成分を認識し、サイトカイン産生により様々な細胞応答が起き、絨毛の成長が引き起こされたと考察されている(TSUKAHARAら, 2011)。本試験では、抗菌性飼料添加物を排除した飼料を用い、特別な衛生対策を行わずに飼養した為、多数の下痢やコクシジウム感染が確認されている。糞便スコアとコクシジウム感染率が両区において差の無い状況下で、K71区の絨毛が高かったことから、絨毛萎縮のダメージを緩和または回復させたことは、離乳期の消化管形成を助ける可能性がある。

K71の給与によって糞便中の乳酸菌数が増加したことについて、詳細は不明であるが、焼酎蒸留粕に含まれるオリゴ糖、ペプチドが乳酸菌やビフィズス菌の増殖促進に関与する可能性が示されており(古田ら, 2007)、本試験に用いたK71も乳酸菌生産物質や乳酸菌体として糖類、アミノ酸、ペプチド等を含んでいると考えられ、糞便中の乳酸菌数の増加につながったのではないかと推測される。

以上の結果から、離乳子豚に対し、殺菌乳酸菌K71を慣行飼料の原物重0.1%添加給与することにより、小腸絨毛高の伸長、糞便中乳酸菌数の増加、腸管出血性大腸菌のVT産生遺伝子の減少が見られ、K71にはアレルギー症状の改善以外にも有効な効果がある可能性が示された。今後は、今回ターゲットとしなかった他の病原菌、ウイルス等に対するK71の効果も検証を重ねる必要があり、離乳子豚の疾病予防への貢献が期待される。

## 謝 辞

本実験を遂行するにあたり、子豚の飼養管理、と畜および解剖に御協力頂いた新潟県農業総合研究所畜産研究センター養豚現場技術員の皆様と獣医師の佐藤義政氏、研究を補助して頂いた同センター若林初代氏、渡邊悦子氏、佐藤景氏に感謝いたします。

## 文 献

- AKIRA, S. and K. TAKEDA : 2004, Toll-like receptor signaling, *Immunology*, **4**, 499-511.
- EFSA : 2012, Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance, *EFSA Journal*, **10**, 2740 [10 pp.].
- 古田吉史・外園理佐・高下秀春・大森俊朗・石崎文彬・園元謙二 : 2007, 大麦焼酎蒸留粕に含まれる乳酸菌・ビフィズス菌増殖促進因子の探索, *生物工学会誌*, **85**, 161-166.
- KATO, N., S.M. KIM, H. KATO, K. TANAKA, K. WATANABE, K. UENO and Y. CHONG : 1993, Identification of enterotoxin-producing *Clostridium perfringens* by the polymerase chain reaction, *Jpn. J. Infect Dis.*, **67**, 724-729.
- KOBASHI, Y., H. OHMORI, K. TAJIMA, T. KAWASHIMA and H. UCHIYAMA : 2008, Reduction of chlortetracycline-resistant *Escherichia coli* in weaned piglets fed fermented liquid feed, *Anaerobe*, **14**, 201-204.
- 小林秀樹 : 2004, WHO 報告書—デンマークにおける成長促進剤としての抗菌性飼料添加物中止の影響について—, *豚病会報*, (45), 12-48.
- KUMAGAI, T., M. IGUCHI, N. SHIGEYAMA, S. OKADA, T. JOH and T. HARA : 2013, *Lactobacillus paracasei* K71 Isolated from sakekasu (Sake Lees) Suppresses Serum IgE Levels in Ovalbumin-immunized Balb/c Mice, *Food Sci. Technol. Res.*, **19**, 127-132.
- 倉本雄一郎・小林憲忠・大塚昌孝・山口和子・金子博司・菅辰彦・武川和琴・鈴木達夫 : 2004, リステリア菌感染後における乳酸菌由来加熱死菌体 EC-12 の生体防御機構に及ぼす効果, *新薬と臨牀*, **53**, 298-308.
- 光岡知足 : 2002, プレバイオティクスと腸内フローラ, *腸内細菌学雑誌*, **16**, 1-10.
- MIZUMACHI, K., R. AOKI, H. OHMORI, M. SAEKI and T. KAWASHIMA : 2009, Effect of fermented liquid diet prepared with *Lactobacillus plantarum* LQ80 on the immune response in weaning pigs, *Animal*, **3**, 670-676.
- MOROI, M., S. UCHI, K. NAKAMURA, S. SATO, N. SHIMIZU, M. FUJII, T. KUMAGAI, M. SAITO, K. UCHIYAMA, T. WATANABE, H. YAMAGUCHI, T. YAMAMOTO, S. TAKEUCHI and M. FURUE : 2011, Beneficial effect of a diet containing heat-killed *Lactobacillus paracasei* K71 on adult type atopic dermatitis, *J. Dermatol.*, **38**, 131-139.
- 内閣府食品安全委員会 : 2004, 家畜等への抗菌性物質の使用により選択される薬剤耐性菌の食品健康影響に関する評価指針, <[http://www.fsc.go.jp/senmon/hisiryou/taiseikin\\_hyoukasisin.pdf](http://www.fsc.go.jp/senmon/hisiryou/taiseikin_hyoukasisin.pdf)>
- 内閣府食品安全委員会 : 2006, 食品を介してヒトの健康に影響を及ぼす最近に対する抗菌物質の重要度のランク付けについて, <[http://www.fsc.go.jp/senmon/hisiryou/taiseikin\\_rank.pdf](http://www.fsc.go.jp/senmon/hisiryou/taiseikin_rank.pdf)>
- 農林水産省農林水産技術会議事務局編集 : 2009, 安全・安心な畜産物生産技術の開発 : 抗生物質に依存しない減投薬飼養管理システムの構築, 農林水産省農林水産技術会議事務局研究成果, 470, 農林水産省農林水産技術会議事務局, 東京.
- 高橋恭子 : 2011, 腸管上皮細胞と腸内細菌とのクロストーク, *腸内細菌学雑誌*, **25**, 213-219.
- TAJIMA, K., H. OHMORI, R.I. AMINOV, Y. KOBASHI and T. KAWASHIMA : 2010, Fermented liquid feed enhances bacterial diversity in piglet intestine, *Anaerobe*, **16**, 6-11.
- TSUKAHARA, T., R. INOUE, N. NAKANISHI, K. NAKAYAMA, N. MATSUBARA and K. USHIDA : 2007, Evaluation of the low dose level of a heat-killed and dried cell preparation of *Enterococcus faecalis* to prevent porcine edema disease using experimental infection model with enterotoxigenic *Escherichia coli* in weaning pigs, *J. Vet. Med. Sci.*, **69**, 103-109.
- 塚原隆充・中西信夫・松原載宜・伊藤貢・牛田一成 : 2006, 臨床現場で起こったほ乳期又は離乳期下痢に対する殺菌乳酸菌製剤 (EC-12) の投与効果, *豚病会報*, (48), 19-23.
- TSUKAHARA, T., Y. YOSHIDA, T. TSUSHIMA, T. WATANABE, N. MATSUBARA, R. INOUE and K. USHIDA : 2011, Evaluation of the heat-killed and dried cell preparation of *Enterococcus faecalis* against villous atrophy in early-weaned mice and pigs, *Anim. Sci. J.*, **82**, 302-306.