

【研究報告】

黒毛和種子牛へのシンバイオティクス給与が 腸内細菌叢とふん性状に及ぼす影響

秋山清・坂上信忠・水宅清二・折原健太郎・川嶋賢二¹・安田憲司²・櫛引史郎³
¹千葉県畜産総合研究センター・²名糖産業株式会社名古屋研究所・³農研機構畜産研究部門

Effect of Symbiotic Feeding on Japanese Black Calves on Fecal flora and Condition

Kiyoshi AKIYAMA, Nobutada SAKAGAMI, Seiji MIZUYA, Kentaro ORIHARA,
Kenji KAWASHIMA, Kenji YASUDA and Shirou KUSHIBIKI

受精卵移植により生産した黒毛和種子牛の人工哺育において、デキストランと *Lactobacillus casei* subsp. *casei* JCM1134^T 株を組み合わせたシンバイオティクス (以下、SB) の効果を調査した。SB 区は生後 3 日齢から離乳まで代用乳 (抗菌剤不含) に日量 10g、離乳後から 17 週齢まで人工乳に日量 20g を添加して給与し、対照区は SB 無添加とした。ふん性状は毎日観察し、5 段階でスコア化し、3 以上を下痢とした。SB 区は、ふん乳酸菌数が 10 週齢および 17 週齢で多く ($P < 0.05$)、ふん中大腸菌群数は 17 週齢において少ない傾向であった ($P < 0.1$)。試験期間中の積算ふんスコアおよび下痢発生日数に有意差はなかった。日増体量、飼料摂取量および血液生化学成分値は SB 区と対照区の間には有意差は認められなかった。これらのことから、黒毛和種子牛の人工哺育におけるシンバイオティクスの給与は、腸内細菌叢に影響を及ぼすことが示唆された。

キーワード：黒毛和種子牛、シンバイオティクス、ふん乳酸菌数、
ふん中大腸菌群数、ふん性状

国内の酪農経営では受精卵移植による乳用牛からの黒毛和種子牛の生産が広く普及しており、重要な収入源のひとつとなっている。一般に、黒毛和種はホルスタイン種より妊娠期間がやや長く、生時体重は少ないが、生理的には大きな差異が認められないとされる。しかし、黒毛和種子牛は、消化機能の発達が遅く、固形飼料の摂取量の増加が遅いことから離乳時期が遅く、季節、牛舎環境および群飼への移行などの飼養環境の変化にも注意を払う必要があることが指摘されている (福島 2012)。また、下痢症をはじめとする疾病発生率がホルスタイン種子牛に比べて高く生産現場での課

題となっている (佐野 2009)。子牛の飼養管理において、哺育期は、給与飼料が全乳や代用乳などの液状飼料から固形飼料へ変化するとともに、免疫機能が初乳由来の受動免疫から能動免疫に変化するなど、その後の発育や消化機能の発達に影響を及ぼす重要な期間である。また、この時期の飼養管理は、子牛の腸内細菌叢に影響し、肺炎や下痢等の疾病の原因となり、その後の発育や生産性に影響することが知られている。

腸内細菌叢のバランスを健全に保ち免疫機能の向上と整腸作用による発育促進を図るための資材として乳酸菌などのプロバイオティ

クスやプロバイオティクスの栄養源となるオリゴ糖などを含むプレバイオティクスが家畜の飼養管理に利用されている。プロバイオティクスやプレバイオティクスは、それぞれ単独でも効果を発揮するが、宿主の体内でどちらかが欠けた場合には十分な効果の得られないことが考えられる。そこで、予め資化性を確認したプロバイオティクスとプレバイオティクスを組み合わせて給与することで、より確実に効果を得ることが期待され、このようなプロバイオティクスとプレバイオティクスを組み合わせたシンバイオティクス（以下、SB）の利用が提唱されている（Gibson と Roberfoid 1995）。

小川ら（2004）は、デキストランとデキストラン資化性乳酸菌（*Lactobacillus casei* subsp. *casei* JCM1134^T株）を組み合わせたSBのマウスへの給与が体液性免疫ならびに細胞性免疫の増強に効果のあることを報告している。また、同様のSBの給与により、産卵鶏の免疫増強（Ogawa 2004）、子豚の体重増加（安田ら2008）、ホルスタイン種泌乳牛の乳量や乳成分の増加（Yasudaら2007）に対する効果が報告されている。さらに、Hasunumaら（2011）は、ホルスタイン種雌子牛にSBを給与したところ、腸内細菌の構成に影響を及ぼし、ふんスコアや下痢日数等の改善に効果のあることを報告している。

そこで、デキストランとデキストラン資化性乳酸菌からなるSBを、受精卵移植により生産された哺育期の黒毛和種子牛に給与し、その効果を調査した。

材料及び方法

1 試験牛

神奈川県畜産技術センターにおいて受精卵移植により生産された黒毛和種子牛11頭（雄5頭、雌6頭）を供試し、試験期間は生後3日齢から17週齢までとした。供試牛はSB添加飼料を給与したSB区（5頭）および無添加飼料を給与した対照区（6頭）に振り分けた。

2 飼養管理

供試したSBは、10g中にデキストラン（名糖産業、名古屋）0.5gおよび*Lactobacillus casei* subsp. *casei* JCM1134^T株（独立行政法人理化学研究所、和光） 1.0×10^8 個を含み、生後3日齢

から離乳までは日量10gを代用乳に、離乳後から17週齢までは日量20gを人工乳に添加して給与した。

哺乳は、生後2日齢までは初乳または全乳、生後3日齢から離乳までは抗菌性物質および生菌剤を含まない代用乳（株式会社日本ミルククリプレーサー、神栖）を、午前9時と午後4時に、哺乳瓶または哺乳バケツを用いて給与した。水、人工乳（ニューメイクスター、全国酪農業協同組合連合会、東京）は生後3日齢から、チモシー乾草（1番草、出穂期、カナダ）は離乳後から自由採食させ、残食量を毎日計量した。離乳は人工乳を日量800g以上摂取した時点で行った。

体重は、午前9時の哺乳および飼料給与前に週1回測定した。血液は、2日齢、3週齢、5週齢、10週齢、13週齢および17週齢の午前9時の哺乳および飼料給与前に採取し、採取後直ちに遠心分離（20,000×g、30分間、4℃）により血漿を分離し、分析まで-20℃で保存した。直腸ふんは、5週齢、10週齢、17週齢に採取し、細菌を分離するまで-20℃で保存した。ふん性状は毎日観察し、硬い=0、普通=1、軟便=2、液状=3、水様=4の5段階でスコア化（Cruywagenら1996）し記録した。また、スコア3以上は下痢と判定した。

3 ふん中細菌数

ふん中の乳酸菌数と大腸菌群数は、Liuら（2008）の方法を改変して計測した。すなわち、直腸より採取したふん1gを生理食塩水に懸濁して10倍段階希釈し、懸濁液を検査材料とし、乳酸菌はMRS培地（Becton Dickinson and Company, USA）、大腸菌群はマッコンキー寒天培地（栄研化学、東京）に塗布し、それぞれ嫌気培養（37℃、48時間）および好気培養（37℃、24時間）後にcfuから菌数を算出し、対数値で表記した。

4 血液生化学成分

血液生化学成分は、総蛋白質、アルブミン、GOT、GGT、尿素窒素、リン、カルシウム、グルコース、遊離脂肪酸、トリグリセリドおよび総コレステロールを自動血液生化学成分測定装置で測定した。

5 統計処理

試験区間の有意差検定はt検定で行い、危険率5%未満は有意差あり、5%以上10%未満は

傾向ありとした。

結 果

試験期間中の体重の推移（図1）、日増体量および乾物摂取量（表1）はSB区と対照区間に有意差は認められなかった。また、積算ふんスコアおよび下痢発生日数はSB区と対照区間に有意差は認められなかった（表1）。

ふん中乳酸菌数は10週齢および17週齢でSB区が対照区に比べて有意に多く（ $P < 0.05$ 、図2）、大腸菌群数は17週齢においてSB区が対照区に比べて少ない傾向であった（ $P < 0.1$ 、図3）。

血液生化学成分値の各項目はSB区と対照区間に有意差は認められなかった（表2）。

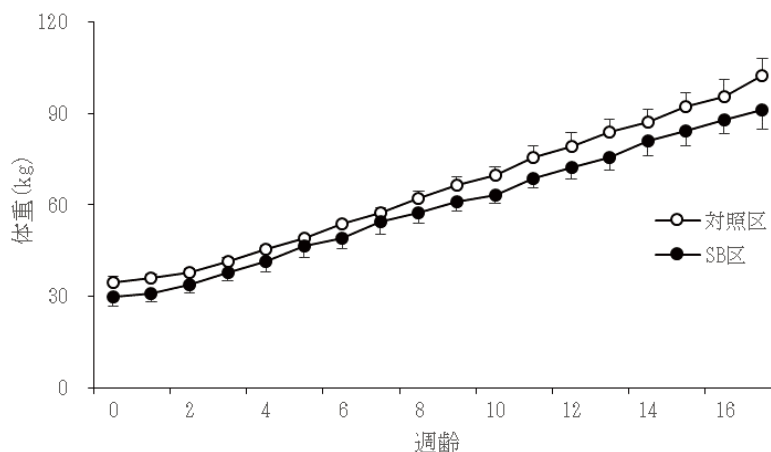


図1 体重の推移

表1 供試牛の日増量、飼料摂取量およびふん性状

試験区	対照区		SB区	
頭数	6		5	
体重, kg				
生時	33.9 ±	1.8	30.0 ±	3.2
離乳時	68.5 ±	1.9	62.7 ±	2.4
17週齢	99.1 ±	5.5	91.2 ±	6.3
日増体量, kg				
全期間	0.54 ±	0.04	0.51 ±	0.04
離乳前	0.51 ±	0.03	0.47 ±	0.02
離乳後	0.59 ±	0.08	0.56 ±	0.07
離乳日齢	69.0 ±	6.3	68.8 ±	2.4
乾物摂取量, kg *	156.8 ±	16.4	141.3 ±	8.2
積算ふんスコア **	146.7 ±	9.4	140.8 ±	5.0
下痢日数 ***	7.2 ±	3.2	4.4 ±	1.7

平均値±標準誤差

*：試験期間中の代用乳、人工乳およびチモシー乾草の合計

**：試験期間中のふんスコア（0=硬い、1=普通、2=軟便、3=液状、4=水様）の合計

***：ふんスコアが3以上の日数

表2 供試牛の血液生化学成分値

成分	試験区	2日		3週		5週		10週		13週		17週	
ALB	SB区	2.8 ± 0.1	3.0 ± 0.5	3.5 ± 0.1	4.0 ± 0.1	3.9 ± 0.1	3.8 ± 0.1						
	対照区	2.8 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.1						
BUN	SB区	15.5 ± 1.1	9.5 ± 0.5	11.5 ± 1.0	17.0 ± 0.9	21.6 ± 1.2	16.4 ± 1.6						
	対照区	10.9 ± 1.0	12.7 ± 1.4	11.4 ± 0.7	15.2 ± 2.9	16.3 ± 2.0	14.2 ± 2.1						
CA	SB区	11.1 ± 0.4	10.1 ± 0.6	10.1 ± 0.1	10.3 ± 0.1	10.4 ± 0.4	10.3 ± 0.1						
	対照区	11.6 ± 0.5	10.0 ± 0.2	10.4 ± 0.1	8.5 ± 1.7	9.9 ± 0.3	6.4 ± 2.0						
GGT	SB区	1,437.4 ± 362.5	63.8 ± 16.3	39.8 ± 13.5	26.6 ± 4.0	17.3 ± 17.3	18.6 ± 6.7						
	対照区	917.5 ± 204.5	78.7 ± 26.1	31.0 ± 6.4	14.2 ± 3.7	11.8 ± 3.4	12.2 ± 2.4						
GLU	SB区	103.4 ± 4.4	96.2 ± 10.0	109.2 ± 2.2	96.2 ± 4.1	94.8 ± 6.4	96.6 ± 5.4						
	対照区	109.5 ± 4.1	89.3 ± 5.7	91.2 ± 2.6	85.5 ± 4.9	84.3 ± 3.7	87.7 ± 5.1						
GOT	SB区	60.0 ± 5.7	40.8 ± 2.1	56.2 ± 11.5	61.4 ± 6.9	63.8 ± 7.3	62.8 ± 4.4						
	対照区	67.7 ± 16.8	41.8 ± 3.2	46.7 ± 5.4	57.8 ± 5.8	57.3 ± 4.9	63.0 ± 4.9						
IP	SB区	8.6 ± 0.3	8.5 ± 0.4	8.5 ± 0.5	9.2 ± 0.4	9.2 ± 0.2	8.9 ± 0.6						
	対照区	7.3 ± 0.2	7.9 ± 0.3	7.8 ± 0.4	7.3 ± 0.5	7.9 ± 0.4	8.0 ± 0.4						
NEFA	SB区	0.6 ± 0.1	0.4 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0						
	対照区	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0	0.3 ± 0.1	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0						
TCHO	SB区	54.0 ± 9.5	155.8 ± 11.9	161.8 ± 19.4	161.6 ± 17.3	66.0 ± 3.7	85.0 ± 8.2						
	対照区	63.5 ± 14.3	113.7 ± 22.6	143.3 ± 17.4	109.7 ± 19.2	98.8 ± 20.1	68.7 ± 8.6						
TG	SB区	49.0 ± 30.2	17.6 ± 4.8	14.2 ± 3.9	20.8 ± 2.8	26.3 ± 6.5	23.6 ± 1.7						
	対照区	25.2 ± 8.8	14.0 ± 2.3	9.0 ± 1.1	20.2 ± 4.8	19.8 ± 4.0	11.8 ± 3.7						
TP	SB区	7.6 ± 0.7	5.8 ± 0.9	6.6 ± 0.3	6.9 ± 0.2	6.8 ± 0.3	6.5 ± 0.5						
	対照区	6.8 ± 0.2	6.3 ± 0.1	6.7 ± 0.1	7.4 ± 0.5	7.2 ± 0.3	7.0 ± 0.3						

平均値±標準誤差

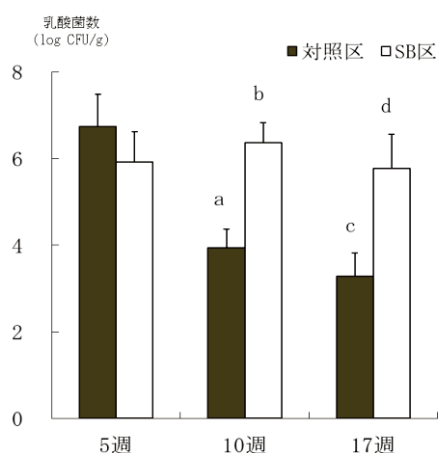


図2 ふん中乳酸菌数の推移
ab間、cd間に有意差あり ($P < 0.05$)

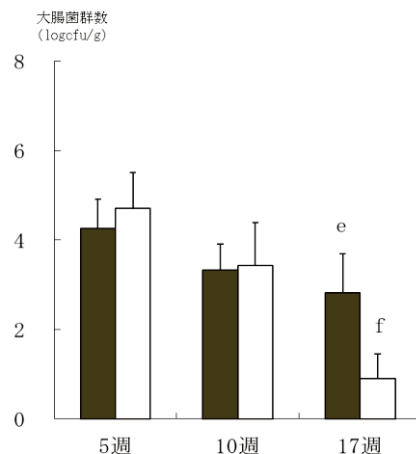


図3 ふん中の大腸菌群数の推移
ef間に傾向あり ($P < 0.1$)

考 察

嶋と光岡 (1983) は、出生から6週齢までの哺乳子牛のふん中細菌数は成長に伴って減少する傾向を認めている。また、上野と板橋 (2012) は、プレバイオティクスであるセロピオースを給与した子牛では3週齢において乳酸桿菌が増加したものの、離乳時には非給与区と差が認められないことを報告している。一方、プレバイオティクスであるオリゴ糖の給与は子牛の腸内細菌叢の改善に効果の

あることが報告されている (佐藤 2001 ; 中井ら 2007 ; 向井ら 2008 ; 大塚ら 2013)。さらに、Hasunuma ら (2011) および蓮沼ら (2011) は、ホルスタイン種子牛においてSB由来の乳酸菌が1週齢からふん中に検出され、下部消化管にまで到達していることを確認するとともに、5週齢でふん中乳酸菌数が有意に増加し、10週齢でふん中大腸菌群数が有意に減少していることを報告している。本

研究では、SB由来の乳酸菌の検出は行っていないが、SB区ではふん中大腸菌数が有意に多く、ふん中大腸菌群数が少ない傾向が認められ、黒毛和種子牛においても、哺育期におけるSBの給与が腸内細菌叢に影響を及ぼすことが示唆された。

プロバイオティクスである乳酸菌の子牛への給与は体重増加や下痢防止に効果があることが報告されている (Abeら 1995; Cruywagenら 1996)。Hasunumaら (2011)は、生後3日齢から90日齢のホルスタイン種雌子牛へのSBの給与が、有意ではないがふん性状や下痢日数を改善することを報告している。本研究では、生後3日齢から17週齢の黒毛和種子牛にSBを給与し、下痢日数は対照区に比べて有意差は認められなかった。

なお、これまでの哺育期の子牛に対する研究においては、Hasunumaら (2011)は10g中にデキストラン5gと乳酸菌 10^9 個、蓮沼ら (2011)はデキストラン1gと乳酸菌 10^{10} 個を含むSBを用い、ふん性状や下痢日数の改善効果が認められたこと報告している。

本研究で用いたSBは10g中にデキストラン0.5gと乳酸菌 10^8 個を含み、これまでの研究と比べてデキストランや乳酸菌の含量が少ないものであったが、腸内細菌叢への影響が示唆された。一方、ふんの性状、発育、飼料摂取量に対する効果は確認できなかったことから、今後は、SBの給与量や濃度の設定等について、さらなる検討が必要であると考えられた。

引用文献

Abe F, Ishibashi N, Shimamura S. 1995. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *Journal of Dairy Science* 78, 2838-2846.

Cruywagen CW, Jordan I, Venter L. 1996. Effect of *Lactobacillus acidophilus* supplementation of milk replacer on preweaning performance of calves. *Journal of Dairy Science* 79, 483-486

福島護之. 2012. 子牛の栄養と感染症. 家畜感染症学会誌 1, 49-55

Gibson GR, Roberfoid MB. 1995. Dietary modulation of human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *Journal of Nutrition* 125, 1401-1412.

Hasunuma T, Kawashima K, Nakayama H, Murakami T, Kanagawa H, Ishii T, Akiyama K, Yasuda K, Terada F, Kushibiki S. 2011. Effect of cellooligosaccharide or symbiotic feeding on growth performance, fecal condition and hormone concentrations in Holstein calves. *Animal Science Journal* 82, 543-548.

蓮沼俊哉, 川嶋賢二, 中山博文, 野田正人, 金川博行, 村上俊明, 石田美保, 永島茂男, 石井貴茂, 脇本亘, 秋山清, 安田憲司, 上野豊, 櫛引史郎. 2011. 乳用子ウシの発育に対するセロオリゴ糖およびシンバイオティクスの給与効果. 富山県農林水産総合技術センター畜産研究所研究報告 2, 1-32.

Liu P, Piao XS, Kim SW, Wang L, Shen YB, Lee HS, Li SY. 2008. Effect of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs. *Journal of Animal Science* 86, 2609-2618.

向井真知子, 近藤夏子, 大塚浩通, 藤原めぐみ, 小比類巻正幸, 勝田賢, 安藤貴朗, 及川正明. 2008. 感染症の多発した1農場における導入子牛へのイソマルトオリゴ糖製剤給与における疾病予防効果. 日本家畜臨床感染症研究会誌 3, 23-31.

中井朋一, 佐藤忠, 佐渡谷裕朗, 名倉泰三, 花田正明, 岡本明治. 2007. 哺乳子牛の成長に伴う糞便中の細菌数及び有機酸濃度の変化とラフィノース給与の影響. 日本畜産学会報 78, 167-172.

小川知彦, 朝井康行, 安田憲司, 坂本弘美, 橋川真之介. 2004. デキストラン資化性 *Lactobacillus casei* subsp. *casei* の経口的免疫増強作用. 機能性食品と薬理栄養, 2, 15-21.

Ogawa T, Asai Y, Sakamoto H, Yasuda K. 2006 Oral immunoadjuvant activity of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* in dextran-fed layer chickens. *British Journal of Nutrition*. 95, 430-434.

大塚誠, 山本英治, 高田良三. 2013. 離乳子牛へのセロビオース投与がルーメン細菌叢に及ぼす影響. 関東畜産学会報 64, 1-6.

- 佐野公洋. 2009. 子牛の科学、日本家畜臨床感染症研究会編、チクサン出版社、東京、pp85-91.
- 佐藤友吾. 2001. 肉用牛の増体・下痢に対するデキストランオリゴ糖の効果. 家畜診療 48, 653-657.
- 嶋英邦, 光岡知足. 1983. 子牛の腸内フローラに及ぼすパントテイン酸投与の影響. 日本獣医師会雑誌 36, 584-588.
- 上野豊, 板橋久雄. 2012. 分子生物学的手法による子牛の下部消化管細菌叢動態の解析. 栄養生理研究会報. 56. 13-24
- 安田憲司. 2008. デキストラン資化性乳酸桿菌を用いたシンバイオティクスの畜産分野への応用. 栄養生理研究会報 52, 23-30.
- Yasuda K, Hashikawa S, Sakamoto H, Tomita Y, Shibata S, Fukata T. 2007. A new synbiotic consisting of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and dextran improves milk production in Holstein dairy cows. *Journal of Veterinary Medical Science* 69, 205-208.