

抗菌性飼料添加物無添加飼料への乳酸菌死菌体製剤添加が肥育豚の発育、血液性状および糞便内細菌数に及ぼす影響

設楽 修*

要 約

抗菌性飼料添加物を含まない飼料に、加熱処理した乳酸菌 (*Lactobacillus sakei* HS-1) 死菌体の製剤を添加した乳酸菌区、抗菌性飼料添加物を添加した有薬区および無添加飼料の無薬区を設け、平均体重10kgから70kg到達までの間24頭の豚に各区の飼料を給与して、発育、血液性状および糞便内細菌叢に及ぼす影響を検討した。

- (1) ほ乳期にはすべての区で軽度の下痢が散見されたが、無薬区が有意に多かった (P<0.05)。
- (2) 1日平均増体量は、ほ乳期では乳酸菌区が701gで無薬区の609gに対して有意に増加し (P<0.01)、子豚期も乳酸菌区が792gで無薬区の722gに対して有意に増加し (P<0.05)、両期間ともに乳酸菌区は有薬区に近い発育を示した。
- (3) 飼料要求率は、乳酸菌区と有薬区が子豚期および育成期において無薬区よりも有意に低下した (P<0.05)。
- (4) 血液検査では、30kg時に乳酸菌区の白血球数が他の2区よりも有意に増加した (P<0.05) が、その他の一般検査およびヘモグラム、生化学検査、IgG検査では試験区間に有意差は認められなかった。
- (5) 糞便内細菌数は、腸内細菌科、大腸菌、腸球菌および*Bifidobacterium*において有薬区が他の2区よりも有意に減少した (P<0.01)。

以上のことから、本試験で供試した乳酸菌死菌体製剤は、子豚期から育成期 (体重10kg ~70kg)用飼料に添加することにより、抗菌性飼料添加物と同等の成長促進効果が得られることが明らかとなった。

Influence of Dietary Feed Supplemented with Heat Treated *Lactobacillus Sakei* HS-1 without Antimicrobials on Growth, Blood Parameters, and Fecal Microbial Flora in Growing Pigs

Osamu Shidara

Summary

This experiment evaluated whether feeding heat treated *Lactobacillus sakei* HS-1 (HS-1) to growing pigs would influence growth, blood parameters, and fecal microbial flora. Twelve male and 12 female pigs were randomly assigned to one of 3 diets: basic feed for piglets from 10 kg to 30 kg (DCP 19.3% and TDN 78.9%) and that for growing pigs from 30 kg to 70 kg of body weight (DCP 14.5% and TDN 74.5%) supplemented with 0.02% HS-1 (group HS-1), with antimicrobials (group A-M), and without the two supplements (group control C).

The following results were obtained:

- (1) During the suckling period, mild diarrhea was significantly higher in group C than group HS-1 and group A-M (P<0.05).

- (2) The average daily gain in body weight was significantly higher in group HS-1 and group A-M than for group C during the piglet period ($P<0.01$) and the growing period ($P<0.05$).
- (3) Feed conversion in group HS-1 and group A-M were significantly lower than C ($P<0.05$).
- (4) Although white blood cell count was significantly higher ($P<0.05$) in group HS-1 than the other groups, there was no significant difference in other blood parameters and IgG concentrations between groups.
- (5) The fecal microbial flora (family *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, and *Bifidobacterium*) count was significantly lower ($P<0.01$) for group A-M than the other groups.

These results suggest that the daily gain in body weight during the growing period from 10 kg to 70 kg, and feed conversion are improved by the addition of 0.02% *Lactobacillus sakei* HS-1 to basic feed, as that of antimicrobial addition, due to activation of the immune system by probiotics.

キーワード：乳酸菌死菌，抗菌性飼料添加物，成長，糞便内細菌数，子豚

緒言

我が国で生産される養豚用配合飼料のうち，肥育後期豚用および種豚用を除く子豚用飼料の多くには，飼料が含有している栄養成分を有効に利用するという目的で，飼料安全法に定められた抗菌性飼料添加物（抗菌性物質）が添加されている¹⁴⁾。これらの抗菌性物質は，子豚の発育促進や飼料要求率改善の目的で広く用いられているが，近年ヨーロッパではヒトの薬剤耐性菌の出現は，畜産分野で使用する抗菌性物質が原因であることが指摘され，EUは2006年に抗菌性物質の使用を禁止した⁸⁾。

我が国においても消費者から食の安全・安心が求められ，畜産分野での抗菌性物質使用量低減が求められている。しかし，現在の養豚経営においては豚が高い飼養密度により常にストレスを受けながら飼育されているという形態が多く，直ちに抗菌性物質の使用を全て中止した場合の生産性低下を考慮すると，段階的な使用量低減や使用期間の短縮が望ましい。また，生産性低下を防止するために，抗菌性物質の代替物として消費者の理解が得られ，豚の発育や飼料要求率に効果が期待される素材について検討を行うことが重要である。

著者は抗菌性物質無添加飼料（無薬飼料）への乳酸菌生菌製剤添加により，子豚の腸内環境が改善され，成長促進や飼料効率の改善に効果があることを報告した¹⁶⁾が，その効果は抗菌性物質には及ばなかった。一方，乳酸菌の利用において，腸内免疫活性をあげるには生菌よりも死菌を用いたほうが効果が大きいという報告^{15)・19)}がある。そこで，今回混合飼料であるキムチ由来乳酸菌死菌体製剤⁴⁾を子豚期から育成期（体重10kg～70kg）の飼料に添加して，その効果を検討した。

材料及び方法

1 供試豚，試験期間および試験区分

試験には三元交雑種豚（LWD・WLD）24頭（去勢豚12頭，雌豚12頭）を用い，腹の違いや生年月日を考慮し1区8頭（去勢豚4頭，雌豚4頭）で3区分を無作為に配置した。試験は各区の豚平均体重が10kgに到達後開始し，30kg経過後に試験飼料を子豚用から育成用に切り替えて，70kgに到達後終了した。試験は2010年5月から8月の間に実施した。今回供試したキムチ由来乳酸菌死菌体製剤（乳酸菌）は三菱食品株式会社から提供された混合飼料であり，製品は加熱処理された*Lactobacillus sakei* HS-1株⁴⁾菌体を 10^8 個/g含有している。試験区分は，抗菌性物質を含まない子豚期用指定配合飼料（体重10kg～30kg，TDN78.9%，CP19.3%）および育成期用指定配合飼料（体重30kg～70kg，TDN74.5%，CP14.5%）を基礎飼料として給与する無薬区，基礎飼料に乳酸菌を0.02%添加した飼料を給与する乳酸菌区，および基礎飼料に抗菌性物質を0.1%添加した飼料を給与する有薬区とした。抗菌性飼料添加物には，子豚期がエンラマイシン5g力価，クエン酸モランテル30g，育成期がエンラマイシン10g力価，硫酸コリスチン20g力価，クエン酸モランテル30gを混合したものをを用いた。飼育条件は，4.3×1.5mの豚房で群飼し，不断給餌，自由飲水で飼養した。

2 調査項目

豚の健康状態として下痢に注目し，軟便を1，泥状便を2，水様便を3とした。毎朝豚房の床面と肛門周囲を観察し，下痢をした個体が識別できない場合は，床面の状況で判断し複数頭いる場合には加算した。体重は1週間毎に測定し，飼料摂取量は試験期間中の総給与量を測定した。血液検査は試験飼料の切替前（30kg時）および試

験終了時（70kg時）に採血を行い，血液成分検査として白血球数，赤血球数，ヘモグロビンおよびヘマトクリットを自動血球計算装置（poch-100iv，シスメックス，神戸）で測定し，血液生化学検査は血漿を用いて総蛋白，中性脂肪，総コレステロール，血糖，グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）および尿素窒素（BUN）を自動血液分析装置（富士ドライケム5500，富士フィルム，東京）で測定した。また，ヘマカラー（メルク，東京）を用いて血液塗沫標本を作製し，白血球200個を鏡検して好中球／リンパ球（N/L）比を算出した。さらに，血漿を用いた免疫グロブリンG（IgG）濃度を一元放射免疫拡散法（ブタIgGプレート：メタボリックエコシステム研究所，宮城）により測定した。糞便内の細菌検査は試験飼料切替の直前に実施した。直腸から採取した新鮮糞を密封容器に収納後速やかに脱酸素処理を行い，5℃で検査機関に輸送し，24時間以内に細菌検査を開始した。検査は菌種レベルで大腸菌，菌属レベルで腸球菌，*Lactobacillus*，*Bifidobacterium*，菌科レベルで総好気性菌数，総嫌気性菌数の定量検査を実施した⁵⁾。検査に使用した培地，培養条件およびその判定方法を表1に示した。

表1 糞便内細菌検査方法

測定項目	供試培地	培養日数	培養条件	判定
総好気性菌	5%羊血液加TS寒天培地			全てのコロニー数を測定
腸内細菌科	DHL寒天培地			全てのコロニー数を測定
大腸菌	クロモカトコリフォーム	2日	好気	典型的形態を示したコロニー数を測定
腸球菌	TATAC寒天培地			コロニー形態を観察し，グラム染色性，菌の形態，好気・嫌気状態での発育を確認後菌数を測定
総嫌気性菌	5%羊血液加BL寒天培地			全てのコロニー数を測定
<i>Lactobacillus</i>	変法LBS寒天培地	3日	嫌気	コロニー形態を観察し，グラム染色性，菌の形態，好気・嫌気状態での発育を確認後菌数を測定
<i>Bifidobacterium</i>	BS寒天培地			コロニー形態を観察し，グラム染色性，菌の形態，好気・嫌気状態での発育を確認後菌数を測定

光岡らの方法¹¹⁾に準拠

3 統計処理

飼料の違いを要因とする1元配置分散分析後にTukeyの多重比較検定を行い，1%および5%水準の差を有意とした。

結 果

1 下痢の発生状況

期別の下痢の発生状況を表2に示した。6月10日に試験開始後35日で子豚期飼料から育成期飼料への切替を行った。子豚期には乳酸菌区と有薬区で軽度の下痢が1回ずつみられたが，無薬区では期間中に軽度の下痢が8回発生し，有意に増加(P<0.05)した。育成期は乳酸菌区で1

回発生した以外に下痢の発生は見られなかった。

2 供試豚の発育

供試豚の発育は，乳酸菌区が試験終了まで有薬区とほぼ同じ成長曲線を示した一方で，無薬区は乳酸菌区や有薬区に比べて明らかな発育の遅延がみられた（図1）。これを全期間の1日平均増体量でみると，無薬区に対して乳酸菌区と有薬区が有意に増加(P<0.01)した。また，飼料要求率も子豚期，育成期を通して無薬区が有意に高く(P<0.05)なった（表3）。

3 血液検査

血液一般検査では，30kg時において乳酸菌区の白血球数が他の2区よりも有意に増加した(P<0.05)。その他の一般検査成績やN/L比は30kg時および70kg時の検査においてすべて正常値¹³⁾の範囲内にあり，試験区間に有意差は認められなかった。また，血液生化学検査成績もすべて正常値¹³⁾であり，有意差も認められなかった（表4・5）。

4 IgG濃度

30kg時および70kg時の検査において，IgG値には試験区間に有意差が認められなかった（図2）。

表2 下痢の発生状況

区分	子豚期	育成期	全 期
乳酸菌区	2 ^b	1	3
無薬区	8 ^a	0	8
有薬区	1 ^b	0	1

a-b：異符号間に有意差（P<0.05）

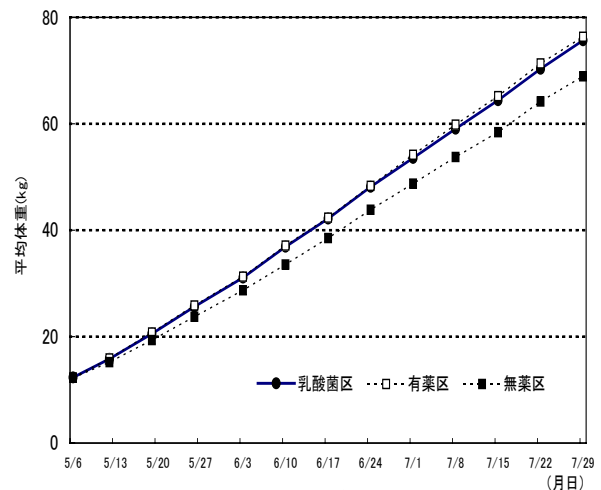


図1 供試豚の体重推移

表3 供試豚の1日平均増体量と飼料要求率

区分	子豚期	育成期	全期	
日増体量(g)	乳酸菌区	701.9 ± 44.1 ^c	795.1 ± 34.6 ^a	754.2 ± 28.0 ^c
	有薬区	710.0 ± 35.1 ^c	800.7 ± 36.9 ^c	762.9 ± 22.5 ^c
	無薬区	608.6 ± 43.4 ^d	721.8 ± 37.3 ^{bd}	674.6 ± 32.6 ^d
飼料要求率	乳酸菌区	1.82 ^b	2.77 ^b	2.40
	有薬区	1.71 ^b	2.60 ^b	2.26
	無薬区	1.99 ^a	2.91 ^a	2.57

平均値 ± 標準偏差 異符号間に有意差(a-b:P<0.05,c-d:P<0.01)

表4 血液一般検査

区分	一般検査					
	WBC (x10 ⁹ /μℓ)	RBC (x10 ⁹ /μℓ)	HGB (g/dl)	HCT (%)	N/L比	
30kg時	乳酸菌区	218.6 ^a	690.7	12.4	39.4	0.44
	有薬区	165.4 ^b	684.8	12.2	39.9	0.41
	無薬区	167.7 ^b	691.2	11.6	37.6	0.53
70kg時	乳酸菌区	234.3	750.7	13.8	44.8	0.25
	有薬区	196.9	706.2	12.3	39.1	0.34
	無薬区	193.8	769.3	13.2	41.6	0.33

a-b：異符号間に有意差(P<0.05)

表5 血液生化学検査

区分	総蛋白 (g/dl)	中性脂肪 (mg/dl)	総コレステロール (mg/dl)	血糖 (mg/dl)	GOT (U/l)	尿素窒素 (mg/dl)	
30kg時	乳酸菌区	6.5	15.2	77.5	119.3	37.8	10.2
	有薬区	6.5	13.7	79.7	120.3	38.2	11.1
	無薬区	6.6	13.0	79.3	120.5	40.0	11.0
70kg時	乳酸菌区	6.5	15.2	77.5	119.3	37.8	10.2
	有薬区	6.5	13.7	79.7	120.3	38.2	11.1
	無薬区	6.6	13.0	79.3	120.5	40.0	11.0

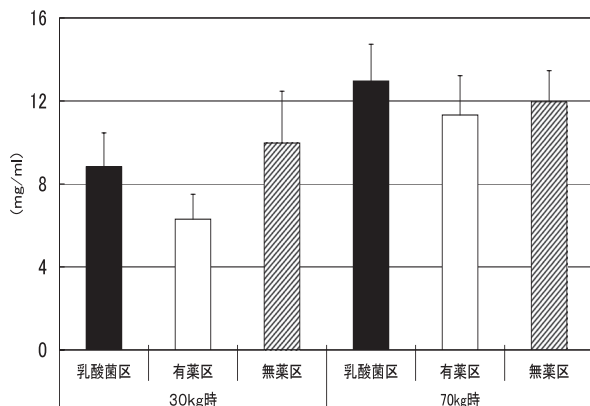


図2 免疫グロブリンG濃度

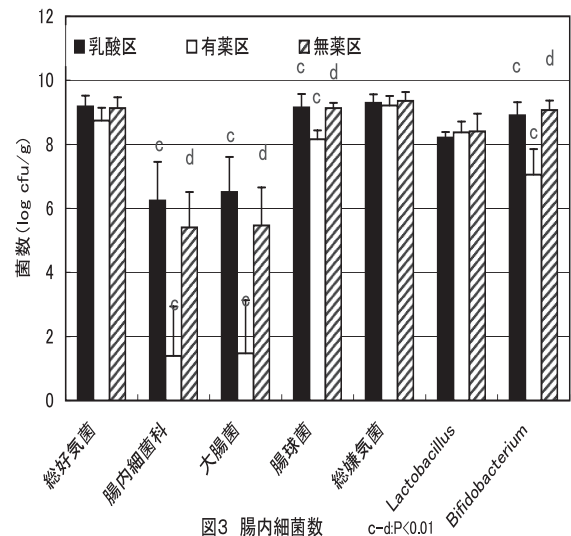


図3 腸内細菌数

5 糞便内細菌数

腸内細菌科, 大腸菌, 腸球菌および*Bifidobacterium*において、有薬区の菌数が他の2区よりも有意に減少した(P<0.01) (図3)。

考 察

今回供試した乳酸菌は白菜キムチから分離された株⁴⁾であり、ヒトが生菌を摂取した場合には、胃を通過したあとも腸管内で生存しており⁵⁾、生菌のまま糞便として排泄される⁶⁾といった特徴が確認されている。また消化管内の免疫活性には、生菌以上に死菌の菌体成分が効果を発揮することが知られている¹⁵⁻¹⁹⁾。本試験では、無薬区で抗菌性物質無添加の影響、有薬区で市販の配合飼料と同様に抗菌性飼料添加物を添加した効果を、乳酸菌区で乳酸菌の添加効果を検討した。

供試豚の発育は、乳酸菌区が試験開始から終了に至るまで有薬区とほぼ同様の発育を示し、いずれも無薬区との間には有意な差がみられ、乳酸菌死菌体製剤の成長促進効果が確認できた。さらに、飼料要求率においても、乳酸菌区は有薬区と同様に無薬区よりも向上し、飼料効率改善効果も示された。抗菌性物質の子豚期における発育や飼料効率の改善効果については多くの報告があるが^{3・10・17・18)}、育成期以降の効果については出荷までの発育と飼料効率に効果があったとする報告^{2・7)}や、育成期には有効だが肥育期では差がなくなったとする報告⁹⁾など様々である。離乳直後の子豚期は腸内細菌叢が十分に安定していないため、飼育環境やストレスの影響を受けると腸内細菌のバランスが容易に変化する¹²⁾。これに対して抗菌性物質は直接腸内細菌に作用するため、腸

内環境への影響は大きいと考えられる。その影響は30kg時の糞便内細菌検査においてみられ，グラム陽性菌と陰性菌を抑制する抗菌性物質を添加した有薬区ではグラム陰性の腸内細菌科と大腸菌，およびグラム陽性の腸球菌の菌数が有意に減少した。しかし同時に，有用菌であるビフィズス菌も有意に減少しており，マイナスの効果もみられている。さらに，抗菌性物質の添加は腸内細菌叢の乱れ以外に免疫機能を低下させるとの報告もある¹⁾。一方，乳酸菌には抗菌性物質のような直接的な作用はなく，小腸を中心に有害菌に対して拮抗的に作用し，有用菌を優勢にしていく間接的な作用を主体とするが¹²⁾，本試験では加熱処理により分解した乳酸菌死菌体成分の多糖体が直接腸管免疫系を刺激して，免疫活性を高めたと考えられる。今回腸管免疫の主体であるIgAは測定していないが，30kg時の血液検査において乳酸菌区の白血球数が正常値の範囲内で有意に増加したことや，生理的な反応としてすべての区においても70kg時のIgG濃度が30kg時よりも上昇したなかで，乳酸菌区の上昇割合が他の2区よりも大きかったことは，いずれも免疫活性の向上と関連しているかもしれない。

血液検査成績は，すべて正常値の範囲内にあり，3区ともに子豚の栄養状態や肝機能，腎機能にも異常はなく，毎日の個体観察ともあわせて総合的に判断すると，本試験では飼料への乳酸菌死菌体製剤添加による子豚への悪影響はないと考えられた。

以上のことから，本試験で供試した乳酸菌死菌体製剤は，体重10kgから70kgの養豚用飼料に0.02%添加することにより，抗菌性物質と同等の成長促進効果を有し，飼料効率の改善にも効果があることが明らかとなった。

引用文献

- (1) Celler, C. T., M. R. Smiricky-Tjardes, D. M. Albin, J. E. Wubben, V. M. Gabert, B. Deplancke, D. Bane, D. B. Anderson and H. R. Gaskins (2003): Molecular ecological analysis of porcine ideal microbiota responses to antimicrobial growth promoters: *J. anim. sci.* 81, 3035-3045
- (2) Foster, A. G., D. H. Baker, T. R. Cline, G. L. Cromwell, T. L. Veum, R. Alva-Valdes and G. F. Ericsson (1987): Effect of erythromycin on gain and feed efficiency for pigs from weaning until market weight: *J. Anim. Sci.* 65, 877-880
- (3) Hanson, L. E., E. F. Ferrin, P. A. Anderson and W. J. Aunan (1955): Growth and carcass characteristics of pigs fed antibiotics for part or all of the growing-fattening period: *J. Anim. Sci.* 14, 30-42
- (4) 橋本 俊郎 (2003): 漬物用乳酸菌スターターの開発: 茨城工技セ研報 30, (11), 1-3
- (5) 橋本 俊郎, 田畑 恵 (2004): 乳酸菌 *Lactobacillus sakei HS-1* のヒト消化管における生存性: 茨城工技セ研報 51, 6, 309-311
- (6) 田畑 恵, 橋本 俊郎 (2004): 乳酸菌等を利用した食品加工技術開発: 茨城工技セ研報 33, (10), 1-3
- (7) Jensen, A. H., D. C. Acker, H. M. Maddock, G. C. Ashton, P. G. Homeyer, E. O. Heady and D. V. Carrton (1955): Different protein levels with and without antibiotics for growing-finishing swine: effect on growth rate and feed efficiency: *J. Anim. Sci.* 14, 69-81
- (8) 小林秀樹: 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: 日本豚病研究会報, 45, 12-48, 2004.
- (9) Lehrer, W. P., E. R. Pharris, W. R. Harvey and T. B. Keith (1953): Growth effects of some antibiotics on suckling, growing, and fattening pigs, *J. Anim. Sci.* 12, 304-309
- (10) Luecke, R. W., F. Thorp, Jr., H. W. Newland and W. N. Mcmillen (1951): The growth promoting effects of various antibiotics on pigs, *J. Anim. Sci.* 10, 528-542
- (11) 光岡知足: 腸内菌の世界 嫌気性菌の分離と同定, 13-121, 320-329, 叢文社, 東京, 1980.
- (12) 光岡知足: 腸内細菌学, 139-140, 朝倉書店, 東京, 1990.
- (13) 新山雅美: 「付. 主要検査項目における正常値」, 豚病学第三版, 596-606, 近代出版, 東京, 1987.
- (14) 農林水産技術会議事務局: 日本飼養標準・豚 (2005年版): 73-77, 中央畜産会, 東京, 1998.
- (15) 里中勝人・山本哲郎・黒木三男・田村 弘・阿部茂・山口英世 (1995): *Enterococcus faecalis* FK-23株加熱死菌体標品を経口摂取した無菌マウスにおける腫瘍壊死因子産生能の増強: 日農化会誌, 69, 4, 443-446
- (16) 設楽 修・忽那圭子 (2009): 抗菌性物質無添加飼料への乳酸菌製剤添加が子豚の発育，血液性状および糞便内細菌数に及ぼす影響: 日豚会誌 46, 3, 144-15
- (17) Walsh, M. C., D. M. Sholly, R. B. Hinson, K. L. Saddoris, A. L. Sutton, J. S. Radcliffe, R. Odgaard, J. Murphy and B. T. Richert (2007): Effects of water and acidification with and without antibiotics on weanling pig growth and microbial shedding: *J. Anim. Sci.* 85, 1799-1808
- (18) Weber, T. E., A. P. Schinckel, K. L. Houseknecht and B. T. Richert (2001): Evaluation of conjugated linoleic acid and dietary antibiotics as growth promotants in weanling pigs: *J. Anim. Sci.* 79, 2542-2549
- (19) Zhang, Liyan, Nan Li, Ricardo Caicedo, and Josef Neu (2005): Alive and Dead *Lactobacillus rhamnosus* GG

decrease Tumor Necrosis Factor- α -Induced Interleukin-8
Production in Caco-2 Cells: J.Nutr. 135,1752-1756
