

パルス燃焼式乾燥装置で製造したプロバイオティクス 乳酸菌製剤の子牛への効果

田中健嗣・森清邦彦・田辺裕司*

Effect to the calf by the probiotics lactic acid bacterium drug
which it produced with a pulse combustion dryer system

Kenji TANAKA ,Kunihiko Morikiyo and Yuji TANABE

要 約

パルス燃焼乾燥装置により乳酸菌を乾燥粉末化し、調整した生菌剤をホルスタイン種及びジャージー種子牛の代用乳に添加し、効果試験を実施した。

- 1 *Enterococcus. faecium*, *Lactobacillus. plantarum* をそれぞれ乾燥粉末化し、単菌を代用乳に添加したが、発育性及び異常便の抑制効果への影響を確認することができなかった。
- 2 *E. faecium*, *L. plantarum*, の 2 菌種に *Lactobacillus, acidophilus* を加え、乾燥粉末化した 3 種混合菌添加では、対照区と同程度であり、子牛へのプロバイオティクス効果を確認することが出来なかった。
- 3 乳酸菌の給与形態の効果では、3 種混合菌が添加された培養液区で、異常便日数が 1 日以下であり、J 種では、1 日当たりの増体量が 0.68kg/日と高い成績を示し、3 種混合菌添加培養液では整腸作用があり有効性が示唆された。

キーワード : *L. plantarum*, *Ec. faecium*, *L. acidophilus*, プロバイオティクス、乳酸菌、

緒 言

現在、畜産分野においては飼料安全法に基づき家畜の成長促進を目的とした抗菌物質の飼料添加が行われている。しかし、抗菌物質の慢性的な利用は薬剤耐性菌の出現を招くことが懸念されており、既に EU では 2006 年から一部の抗菌物質の利用が制限されている。また、近年特に求められる食品の安全性の面からも利用量を縮小すべき段階に来ていると考えられる。この中において、生産現場において抗菌物質と同等の生育を保持できる代替資材の検討が求められている。現在では代替資材として腸内細菌叢のバランスを改善し宿主に有益な作用を期待するプロバイオティクスが注目され、主に乳酸菌が研究されている¹⁾。

酪農経営における子牛期の育成管理は、その後の発育及び健康状態に大きな影響を及ぼすとされ、現在、この時期の子牛への抗生物質利用、乳酸菌給与²⁾³⁾⁴⁾は広く利用されている。本課題は粉末化技術を利用した乳酸菌の持つ様々な機能を活用した、治療薬に頼らない健全な乳用子牛の飼養管理方法を検討したものである。

そこで、今回はパルス燃焼乾燥装置⁵⁾⁶⁾⁷⁾により

乳酸菌を乾燥粉末化し、調整した生菌剤を子牛の代用乳に添加した。下痢の発生など健康状態を観察するとともに、糞便中の細菌叢や IgA 濃度を調査することにより、低コストかつ効果の高いプロバイオティクス乳酸菌給与の使用方法が確認できれば、これまで一般的であった抗生物質の使用を低減させられると考えられることから、子牛の発育や下痢の予防に対する効果の検討を行った。

材料及び方法

1 試験 1 乳酸菌の給与効果

(1) 供試牛および試験区の設定

試験区の設定を表 1 および 2 に示した。本試験は当センター(試験地 1)及び真庭市(試験地 2)の 2ヶ所で実施し、試験地 1 はホルスタイン種雌仔牛(以下、H 種)を、試験地 2 はジャージー種雄、雌仔牛(以下、J 種)を供試した。試験地 1 では、*E. faecium* の単菌給与区(以下、Faeci 区)に 5 頭、*L. plantarum* の単菌給与区(以下、Plant 区)に 5 頭、*E. faecium*, *L. plantarum*, *L. acidophilus* の 3 種を混合した区(以下、3 種混合区)に 5 頭をそれぞれ供試し、

各区毎に市販代用乳のみの給与した区（以下、対照区）を設けた。試験地2では、Faeci区に10頭、Plant区に20頭、3種混合区に25頭をそれぞれ供試し、試験地1と同様に各区毎に対照区を設けた。供試期間は、両試験地ともに3～9日齢から試験を開始し、給与期間は60日齢までとした。なお、試験期間は、平成17年6月から平成20年1月とした。

(2) 投与方法

各乳酸菌の給与量は、市販代用乳に 1×10^{10} /g (2g/日) を添加した。なお、対照区は市販代用乳のみの給与とした。

(3) 調査項目

異常便は、目測により便の性状を「正常」「軟便」「下利便」と3つに分類し、「軟便」及び「下利便」を異常便とし、試験期間中の異常便日数を調査した。

増体量は、試験開始後0, 14, 28日目で個体毎に体重を測定し、1日当たりの増体重を調査した。

糞中の乳酸菌数および大腸菌数は、試験開始後0, 14日目で糞便を採取し、総乳酸菌数はMRS培地を、総大腸菌数はVRB培地を用いて測定した (Faeci区、Plant区のみ)。

糞中のIgA濃度は、試験開始後0, 14, 28日目で糞便を採材しBETHYL BOVINE IgA ELISA QUANTITATION KITを用いてELISA法により測定した。

2 試験2 乳酸菌の給与形態の効果

(1) 供試牛及び試験区の設定

試験区の設定を表3に示した。本試験は岡山県下の育成場にて実施した。供試牛は、J種雄、雌仔牛を供試した。試験区は、試験1と同様の3種混合菌を添加した区（以下、3種混合区）に25頭、前記3種混合菌にバチルス菌を混合した区（以下、バチルス区）に25頭、山陽豆腐社製の同様の3菌種を含む培養液を添加した区（以下、培養液区）に9頭をそれぞれ供試し、各区毎に代用乳のみの対照区を設けた。供試期間は試験1と同様に3～9日齢から60日齢とした。なお、試験期間は、平成19年5月から平成20年1月とした。

(2) 投与方法

各試験区の乳酸菌およびバチルス菌の給与量は、3種混合乳酸菌およびバチルス菌ともに、市販代用乳に 1×10^{10} /g (2g/日) に混合し給与した。また、山陽豆腐社製の培養液も菌量は同量とした。

(3) 調査項目

調査項目は、試験1と同様の方法で異常便日数、1日当たり増体重、糞中のIgA濃度を調査した。

表1 試験区設定 (試験地1)

区名	試験内容	供試牛	試験頭数	試験期間
Faeci区	<i>E. faecium</i> 1×10^{10}	H種 ♀	5	H17.6～H17.10
Plant区	<i>L. plantarum</i> 1×10^{10}	H種 ♀	5	H18.5～H18.10
3種混合区	3種混合菌 1×10^{10}	H種 ♀	5	H19.6～H20.1
対照区	代用乳のみ	H種 ♀	5 5 5	

表2 試験区設定 (試験地2)

区名	試験内容	供試牛	試験頭数	試験期間
Faeci区	<i>E. faecium</i> 1×10^{10}	J種 ♂♀	10	H17.6～H17.10
Plant区	<i>L. plantarum</i> 1×10^{10}	J種 ♂♀	20	H18.5～H18.10
3種混合区	3種混合菌 1×10^{10}	J種 ♂♀	25	H19.5～H19.7
対照区	代用乳のみ	J種 ♂♀	9 8 25	

表3 試験区設定

区名	試験内容	供試牛	試験頭数	試験期間
バチルス混合区	バチルス+3種混合菌 1×10^{10}	J種 ♂♀	25	H19.8～H19.12
培養液区	3種混合培養液 1×10^{10}	J種 ♂♀	25	H19.12～H20.1
3種混合区	3種混合菌 1×10^{10}	J種 ♂♀	25	H19.5～H19.7
対照区	代用乳のみ	J種 ♂♀	25 25 25	

結果及び考察

1 試験 1

(1) 糞便の状況

H種およびJ種の異常便日数を表4、5に示した。*faeci* 区および *plant* 区の単菌添加では、平均異常便日数は対照区と比較してH種で試験区での発生が多く、J種では少ないまったく逆の傾向が見られた。3種混合区では、*faeci* 区および *plant* 区とは逆に、H種の試験区では対照区と比較して少なく、J種で多い傾向が見られた。異常便発生日数を、牛種別間で比較するとH種、J種ともに3種混合区は *faeci* 区および *plant* 区の単菌添加より約1/2に発生が減少していることから、乳酸菌を添加する場合は3種混合菌添加が有効であると考えられた。また、J種において、*faeci* 区および *plant* 区の試験中に試験地でコクシジウム症が多発し、試験区および対照区ともに異常便日数が多くなった。試験区は治療の結果速やかに回復したが、対照区では回復が長引く傾向が見られた。

(2) 1日当たりの増体重

H種およびJ種の1日当たりの増体量を図1、2に示した。H種では、*plant* 区および3種混合区が対照区に比べ若干増体量が多い効果が見られた。J種では、*faeci* 区で試験区が増体量が多く、*plant* 区および3種混合区が対照区に比べ少ない傾向が見られた。

(3) 糞中乳酸菌数及び大腸菌群数

H種の糞中乳酸菌数及び大腸菌群数を表6、7図3、4に示した。*faeci* 区および *plant* 区ともに給与2W目では糞中乳酸菌数は増加することはなかった。また、糞中の大腸菌群数は、*faeci* 区および *plant* 区とも減少したが、対照区においても同様に減少しており、乳酸菌添加による影響はなかったと考えられる。

(4) 糞中IgA濃度

H種およびJ種の糞中IgA濃度を図5、6、7、8、9に示した。H種では対照区に比べ、*plant* 区で2W時まで高く、4W時では差がなかった。また、3種混合区では、2W時まで低く、4W時に若干高い傾向が見られた。J種では、*faeci* 区

で4W時にかなり高かったが、*plant* 区では2・4W時ともに対照区が高く、3種混合区では、試験区が対照区に比べ若干高いものの濃度は他の区に比べ、低い成績であった。

表4 平均異常便日数 (H種)

	Faeci区	Plant区	3種混合区
試験区	3.4	6.6	1.6
対照区	1.7	4.8	2.0

単位：日

表5 平均異常便日数 (J種)

	Faeci区	Plant区	3種混合区
試験区	9.3	11.8	5.0
対照区	12.5	13.0	3.8

単位：日

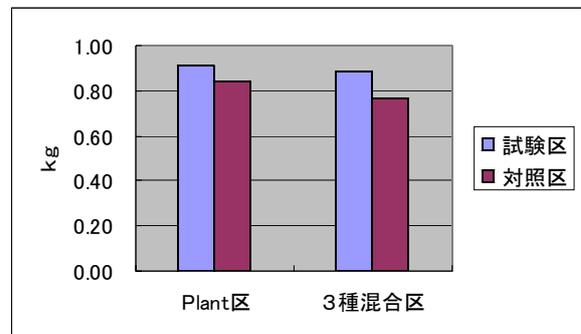


図1 1日増体量 (H種)

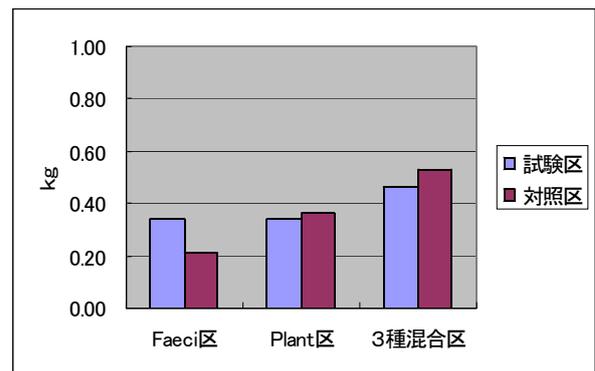


図2 1日増体量 (J種)

表6 糞中乳酸菌数 (H種)

	Faeci区		Plant区	
	0 w	2 w	0 w	2 w
試験区	9.24 ± 0.20	8.70 ± 0.24	8.99 ± 0.68	8.80 ± 0.35
対照区	9.10 ± 0.18	9.35 ± 0.18	8.84 ± 0.25	8.39 ± 0.48

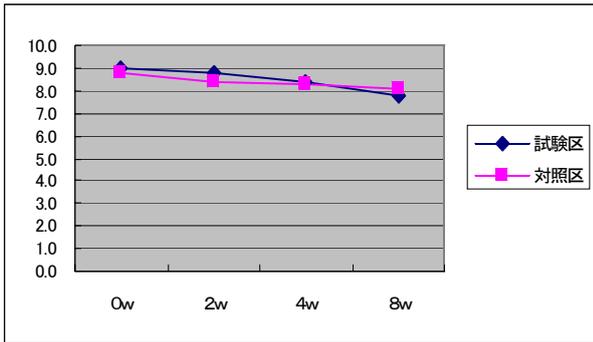
平均値 ± 標準偏差

単位：log cfu/g

表7 糞中大腸菌群数 (H種)

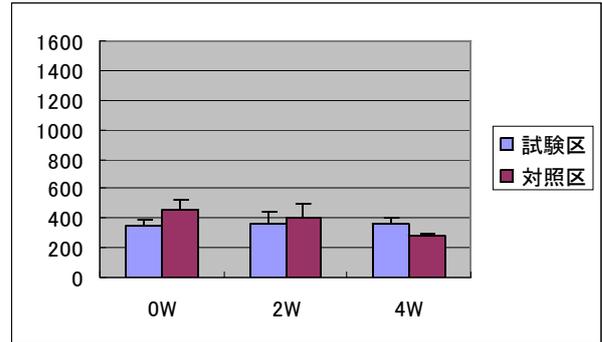
	Faeci区		Plant区	
	0 w	2 w	0 w	2 w
試験区	8.40 ± 0.30	6.58 ± 0.90	7.79 ± 0.57	7.60 ± 0.77
対照区	8.74 ± 0.14	7.06 ± 0.48	8.12 ± 0.49	6.56 ± 0.70

平均値 ± 標準偏差
 単位: log cfu/g



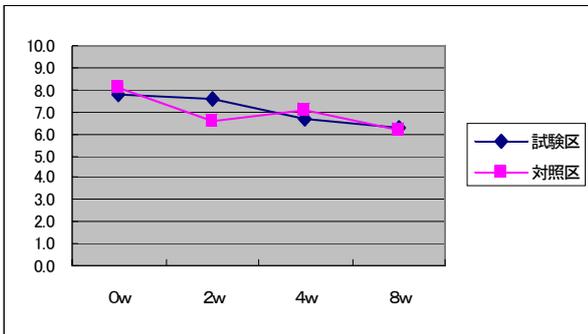
単位: log cfu/g

図3 糞中乳酸菌数 (Plant 区 H種)



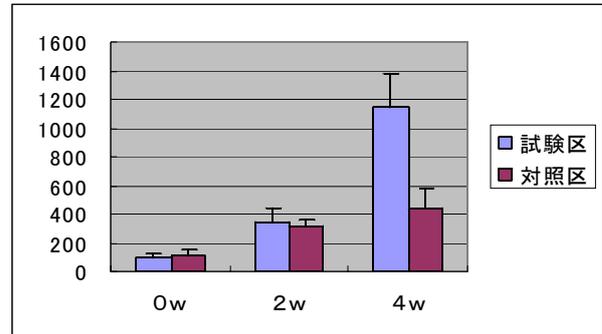
単位: μ g/ml

図6 糞中 IgA 濃度 (3種混合区 H種)



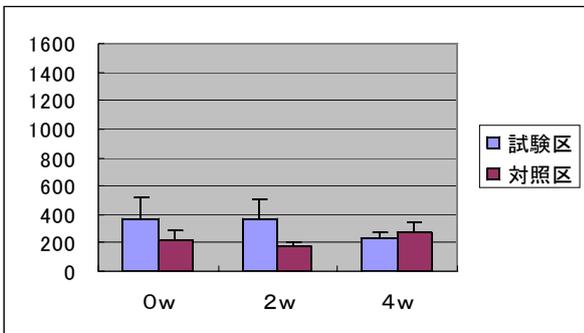
単位: log cfu/g

図4 糞中大腸菌群数 (Plant 区 H種)



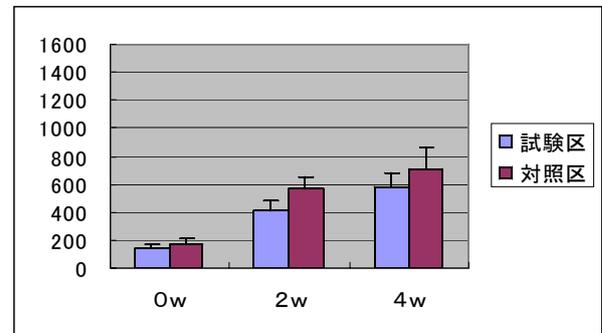
単位: μ g/ml

図7 糞中 IgA 濃度 (Faeci 区 J種)



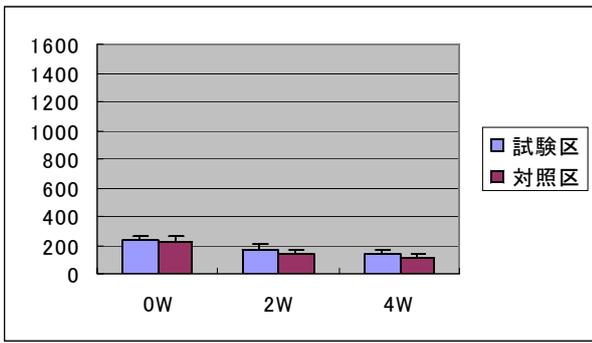
単位: μ g/ml

図5 糞中 IgA 濃度 (Plant 区 H種)



単位: μ g/ml

図8 糞中 IgA 濃度 (Plant 区 J種)



単位：μg/ml

図9 糞中 IgA 濃度 (3種混合区 J種)

異常便の抑制効果は、*E. faecium* および *L. plantarum* 単菌添加では、H種とJ種では、逆の成績が得られたことから、効果はないと考えられた。また、3種混合菌添加では、H種、J種ともに単菌添加に比べ発生日数が少ない傾向は見られたが、対照区の無添加でも減少していることから効果については明確ではなかった。1日当たりの増体量は、添加のH種では効果が見られたが、J種では、逆に無添加区の方が良好であり、発育性についても効果が明確ではなかった。糞中の乳酸菌数は、乳酸菌の添加での増加は確認できなかった。また、糞中の大腸菌群数では、給与後2W時に減少していたが、無添加においても同様の傾向が見られ、効果は認められなかった。糞中 IgA 濃度は、*faeci* 区においてJ種で4W時に 1,000 μg/ml 以上であった。その他の区では濃度が低く、ほぼ無添加給与と差は認められなかった。しかし、J種の *E. faecium* および *L. plantarum* 単菌添加では異常便日数が多かったことが影響を及ぼしたのではないかと推察される。以上のことから、乾燥粉末化したこれら乳酸菌給与による子牛へのプロバイオティクス効果は確認することができなかった。

2 試験2

(1) 糞便の状況

異常便日数を表9に示した。パルス混合区は、3種混合区と同様の成績であり、対照区とあまり差がでなかったが、培養液区は、平均日数が1日以下であり、3種混合区やパルス混合区に比べ良好の成績が得られた。

(2) 1日当たりの増体重

1日当たりの増体量を図10に示した。培養液区で0.68kg/日であり、同時期の対照区の約2倍と良好な成績が得られたが、パルス混合区および3種混合区は、対照区より少ない成績であった。

(3) 糞中 IgA 濃度

糞中 IgA 濃度を図11、12、13に示した。各試験区ともに2Wで対照区より高い値であったが、2W、4Wともに3区は200 μg/ml以下であり、低い値となった。

表8 平均異常便日数

	パルス混合区	培養液区	3種混合区
添加	5.0	0.8	5.0
無添加	3.1	2.0	3.8

単位:日

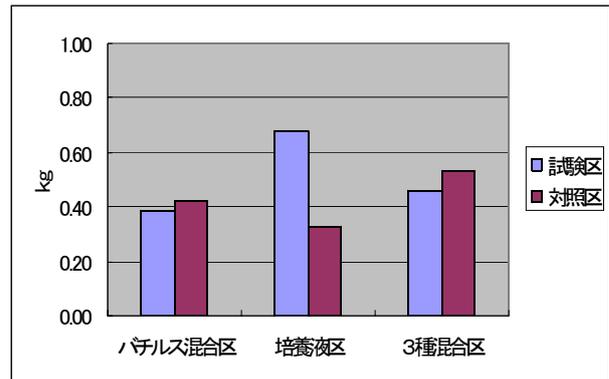
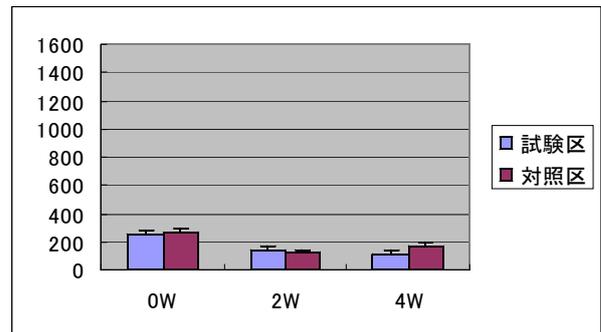
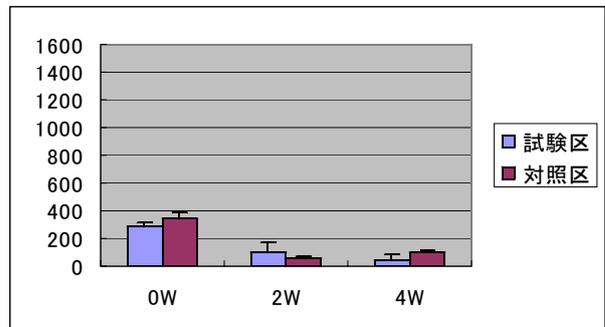


図10 1日増体量



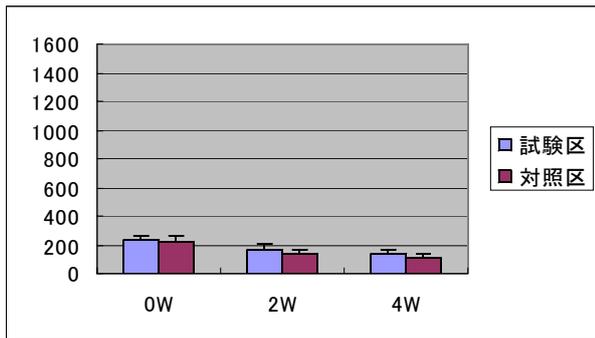
単位：μg/ml

図11 糞中 IgA 濃度 (パルス混合区 J種)



単位：μg/ml

図12 糞中 IgA 濃度 (培養液区 J種)



単位 ; μ g/ml

図13 糞中IgA濃度 (3種混合区 J種)

乳酸菌の給与形態の効果では、3種混合菌が添加された培養液区で、異常便日数が、1日以下と良好な成績が得られ、J種では、1日当たりの増体量が試験1も含め全ての試験区に比べ最も高い成績となり、2000年に野上が報告⁹⁾した成績と同様の結果が得られたことから、3種混合添加培養液は整腸作用があり有効性が示唆された。

乳酸菌による宿主抵抗性の増強の作用機序として①腸管接着部位における病原性細菌との競合②病原性細菌に対する抗菌物質の産生③宿主の免疫機能の活性化が提唱され、また宿主の免疫機能については、腸管を含む粘膜免疫や獲得免疫が乳酸菌の摂取により活性化し、免疫増強され、腸管感染症に対して宿主抵抗性に寄与するとされている⁹⁾。今回、哺乳子牛を対象とした乾燥粉末化した単菌による *E. faecium*, *L. plantarum* の2菌種について又3種混合菌による乾燥粉末化した乳酸菌添加試験を実施した結果、一部の乳酸菌では細菌叢を始め、腸内環境の向上に有効である可能性を示したが、日増体量、異常便日数に明確な差は見られなかった。全体にデータのばらつきが起りやすい環境にあったことを考慮に入れなければならないが、糞中IgA濃度では試験開始後2wで多くの試験区で対照区より高い値を示したが、一部では異なる傾向を示すデータも見られた。これらのことから、疾病予防について乾燥粉末化した状態での乳酸菌添加試験では、全体的に効果を確認する事は出来なかった。しかしながら、給与形態を変更した培養液では、特に試験区で1頭あたり異常便日数0.8日と少なく、また増体についても0.68kg/日と高い値を示し、予防に効果があることが推察された。この結果は、用いるプロバイオティクスの系統、給与量、給与期間を考慮すべきと1,995年に奥村等が報告¹⁰⁾したことから理解できる。

乳酸菌飼料の代用乳への添加効果は、有害菌種の減少又は、増殖抑制が考えられることから、さ

らに例数を重ねその有用性を証明する必要があると考えられる。

謝 辞

乳酸菌粉末の提供をはじめ、試験実施にあたり多くの助言及び協力を頂いた榊林原生物化学研究所の皆様及び現地実証試験にご協力下さった蒜山酪農業協同組合の皆様に深謝いたします。

引用文献

- 1) 奥村純市、古瀬充宏(1995):プロバイオティクス(12):畜産の研究. 49, 8, 1035-1042
- 2) 佐藤 博(2000):牛への生菌剤の利用とその効果. 畜産の研究, 54(6), 659-663
- 3) Abe, F, Ishibashi, N and Shimamura, S(1995) : Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets . J. Dairy. Sci. , 78, 2838-2846
- 4) S. E. Gilliland, B. B. Bruce, L. J. Bush and T. E . Staley(1980):Comparison of two strains of *Lactobacillus acidophilus* as dietary adjuncts for young calves. J. Dairy.Sci., 63, 964-972
- 5) 王 亮、砂田久一、崔 福德(2006) : 難溶性薬物溶出性の改善 パルス燃焼式乾燥システムを用いる場合, PHARM TECH JAPAN, 22(7), 47(1275)-51(1279)
- 6) 安井真一郎、米澤頼信、砂田久一(2008):パルス衝撃波による乾燥システムを用いたプラシカスト水和物の溶解性改善 担体の検討について, 薬剤学, 68(1), 59-66
- 7) 窪谷篤芳(2003):パルス瞬間乾燥システムの技術. 粉体と工業, 35(12), 59-68
- 8) 野上興志郎(2000):乳酸菌処理豆腐添加代用乳による哺乳子牛への下痢予防効果. 岡山県総合畜産センター研究報告, 11, 13-17
- 9) 池永 武、山平聡子、名知英樹、戸羽正道、岡松 洋(2002):*Lactobacillus plantarum* 発酵乳の *Salmonella typhimurium* 感染に対する防御作用, MILK. Sci. , 51, 27-32
- 10) 奥村純市、古瀬充宏(1995):プロバイオティクス(8):畜産の研究. 49, 4, 520-524