

三種混合乳酸菌による発酵豆乳の飼料添加が家禽の 発育、整腸・免疫賦活に及ぼす効果

金谷健史・森尚之・疇地勅和・山崎信*・大津晴彦*・矢ヶ部陽子*・阿部啓之*

Effect of three-straine lactobacillus fermented soy milk in chicks on
growth, microbial activity and cytokine gene expression

Takeshi KANETANI, Hisashi MORI, Tokikazu AZECHI, Makoto YAMAZAKI, Haruhiko OOTSU,
Youko YAKABE and Hiroyuki ABE

要 約

豆乳を三種混合乳酸菌 (*Ec.faecium*, *Lb.acidophilus*, *Lb.plantarum*) により発酵させ、乾燥させた資材を 10 日齢の採卵鶏雄雛に給与した場合における発育や腸内細菌叢、免疫機能に及ぼす効果について検討した。

- 1 発酵豆乳を給与することにより、終了時体重や飼料効率の平均値は対照区よりも改善されたが、有意な差はみられなかった。
- 2 盲腸内における細菌群数は発酵豆乳、乳酸菌を給与した区においても影響はみられなかった。一方で、盲腸糞中総 VFA 量と乳酸菌群数との間には高い相関がみられた。
- 3 豆乳粉末の 5% 添加において脾臓 IFN- γ mRNA 発現量が減少したが、同時に変動すると考えられた IL-13mRNA 発現量には影響がみられなかった。
- 4 本試験では 10 日齢からの給与であったが、腸内細菌叢はヒトでは 5 日程度で定常化するという報告もあり、より早期の給与がプロバイオティクス資材の活用にも有効であることが考えられた。また、免疫指標における変動と抵抗性との関連については、更なる検討が必要である。

キーワード：家禽 雛 乳酸菌 発酵豆乳 飼料効果 免疫

緒 言

現在、安全・安心な食肉が求められる中で、乳酸菌や枯草菌をはじめとするプロバイオティクス資材を用いた家畜の生産性や免疫抵抗性の向上が検討されている。当所においても、残品豆腐の乳酸発酵物により子牛の下痢症が低減されることを確認しており¹⁾、この効果の検証を進めてきた^{2,3,4)}。しかし、これまでの乳酸菌の菌体を給与した試験においては、無薬飼料を給与した場合と比較して、飼料効率など生産性の向上はみられるものの、糞中における大腸菌数や IgA 抗体濃度に影響はみられず、整腸作用や免疫賦活作用について再現性を確認することができなかった。そこで、再度、三種混合乳酸菌で処理した豆乳を用い、発酵豆乳での給与試験を実施しておらず、解体処理により詳細な整腸・免疫機能の評価が可能な生育の早い家禽においてその効果を検討することとした。また、豆乳の発酵に用いた乳酸菌の 1 つであ

り試験成績のない *Lb.plantarum* においても菌体の給与試験を併せて実施することとした。

材料及び方法

1 乳酸発酵豆乳の調整
固形分 10 % で調整した豆乳に三種混合乳酸菌 (*Ec.faecium*, *Lb.acidophilus*, *Lb.plantarum*) を添加し、37 °C で 24 時間発酵処理した後、パルス燃焼乾燥装置 (ハイパルコン小型テスト機、パルテック製 25 型) により 63-74 °C の範囲で乾燥・粉末化した。また、対照として乳酸発酵させていない豆乳も同様に乾燥・粉末化した。試験に用いた発酵豆乳粉末および豆乳粉末、*Lb.plantarum* 粉末の栄養成分、乳酸菌数を表 1 に示した。乳酸菌数については BCP 加プレートカウント寒天培地 (ニッスイ) を用い、37 °C で 24 時間培養した計測値を菌数とした。

2 給与試験

(1) 試験区分

卵用鶏-幼雛用に配合した基礎飼料(表 2 ; CP19.5 % ME2.9kcal/g)を給与する対照区[C]、基礎飼料に未発酵の豆乳粉末を添加した豆乳 1 % 区

[S1]、および 5 % 区[S5]、発酵豆乳粉末を添加した発酵豆乳 1 % 区[FS1]、および 5 % 区[FS5]、*Lb.plantarum* 粉末を添加した乳酸菌 1 % 区[L]、以上計 6 区を設けた。

①対照区[C]	基礎飼料
②豆乳 1 % 区[S1]	基礎飼料に 1 % 乾燥豆乳添加
③豆乳 5 % 区[S5]	〃 5 % 〃
④発酵豆乳 1 % 区[FS1]	〃 1 % 乾燥発酵豆乳添加
⑤発酵豆乳 5 % 区[FS5]	〃 5 % 〃
⑥乳酸菌区[L]	〃 1 % <i>Lb.plantarum</i> 粉末添加

表 1 乾燥豆乳および乾燥発酵豆乳、乳酸菌粉末の成分および乳酸菌数

	乾燥豆乳	乾燥発酵豆乳	乳酸菌粉末
水分%	3.46	7.30	9.63
粗タンパク質%	44.69	42.74	1.91
粗脂肪%	22.97	22.42	0.21
粗繊維%	0.42	0.23	0.11
灰分%	5.87	5.49	2.14
熱量 kcal/g	5.85	5.49	3.52
乳酸菌数 cfu/g	-	4.0×10^8	1.4×10^9

表 2 基礎飼料の配合割合と成分

配合割合%			
トウモロコシ	60.57		
大豆粕	30.00		
脱脂米ぬか	4.00		
コーングルテンミール	2.00		
植物油	0.60	水分	12.00%
第 2 リンカル	1.20	粗タンパク質	19.03%
炭酸カルシウム	1.10	粗脂肪	4.02%
DL-Met	0.10	粗繊維	3.31%
NaCl	0.28	灰分	5.09%
ビタミンミックス	0.10	熱量	4.46kcal/g
ミネラルミックス	0.05	ME	2.90kcal/g

(2) 供試鶏

10 日齢の白色レグホーン種(ハイライン・マリア)雄 40 羽を体重により区分けし、2 羽ずつのケージ飼いとした。[C][L]においては 4 ケージ各区 8 羽、[S1][S5][FS1][FS5]においては 3 ケージ各区 6 羽を配置し、不断給餌、自由飲水により 10 日齢から 37 日齢までの 4 週間試験飼料を給与した。

(3) 調査方法

生体重および飼料摂取量を 1 週間ごとに測定し

た。37 日齢において心臓より採血後、放血によりと鳥し、腸内細菌数の測定用に盲腸糞の採取、糞 pH の測定を行った。解体により肝臓・脾臓重量を測定した後、サイトカイン測定用として脾臓・小腸(メッケル憩室近位)を採材、液体窒素により急速凍結し分析を行うまで -80°C で保存した。また、と鳥時の血漿においては IgA 濃度を測定した。

(4) 分析

盲腸糞は採取後直ちに氷上で冷却し、嫌気性菌群用に調整した希釈液(表 3)により希釈した後、

総嫌気性菌群数:GAM(ニッスイ)、大腸菌数:DHL(ニッスイ)、乳酸菌数:BCP(KYOKUTO)をガスパックにより嫌気条件下で 24 時間培養し計数した。また、盲腸糞のアンモニア濃度を比色法により(和光純薬)、VFA 濃度を高速液体クロマトグラフィにより測定した(ワイエムシィ XSSFACR02、YMC-PackFA カラム)。糞 pH は盲腸糞の一部を用い小型 pH メータにより測定した。

脾臓および小腸はサイトカインの発現量を測定するため、tRNA を TRIzol 試薬(Invitrogen Life Technologies)により抽出後、RevaerTra Dash(東洋紡績)により逆転写し cDNA を合成した。リアルタイム PCR のプライマーは Qiagen より購入し、鶏 IFN- γ (QT00598059)、鶏 IL-4(QT00609126)、鶏 IL-13(QT01141021)およびハウスキーピング遺伝子として、鶏グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ(GAPDH;QT00588973)とした。発現量の測定には LightCycler(Roche Diagnostics)を用い、Qiagen 製 QuantiTect SYBR Green PCR system により測定した。PCR の反応条件は、変性 94 °C 15 秒、アニーリング 55 °C 20 秒、伸長 72 °C 20 秒とし、SYBR Green の蛍光検出は各サイクルの伸長反応終了後に行った。IFN- γ 、IL-4、IL-13 の発現量は GAPDH により補正し、対照区[C]を 1 として相対比を算出した。

血漿中 IgA 濃度については Chicken IgA ELISA Quantitation Kit (E30-103;BETHYL)により測定した。

表 3 嫌気性菌培養用希釈液

	g
KH ₂ PO ₄	4.50
Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	15.10
L-cysteine・HCL・H ₂ O	0.50
Tween80	0.50
agar	1.00
H ₂ O	1000

95 °C 30min で加温溶解後、分注し、ブチル栓をして A. C.

表 4 終了時体重および増体量、飼料摂取量、飼料要求率

	終了時体重 g	増体量 g/27 日	摂取量 g/27 日	飼料要求率
C	469 ± 15	373 ± 15	1024 ± 60	2.74 ± 0.14
S1	466 ± 20	370 ± 19	967 ± 46	2.61 ± 0.09
S5	464 ± 24	368 ± 23	975 ± 85	2.65 ± 0.10
FS1	480 ± 8	384 ± 10	1030 ± 48	2.68 ± 0.07
FS5	485 ± 15	389 ± 12	1012 ± 51	2.60 ± 0.17
L	476 ± 15	380 ± 14	1012 ± 45	2.66 ± 0.09

平均±標準偏差

(5) 統計処理

対照区と試験区、および発酵豆乳と豆乳の同水準間において student t-test を行った。有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果および考察

1 発育成績

試験終了時の生体重、および増体量、飼料摂取量、飼料要求率を表 4 に示した。

終了時体重および増体量の平均値は対照区[C]と比較して、豆乳を添加した S1 区、S5 区で低下したが、発酵豆乳を添加した FS1 区、FS5 区および *Lb.plantarum* を添加した L 区で高い結果となった。また、飼料摂取量の平均値についても対照区と比較して S1 区、S5 区で低下したが、FS1 区、FS5 区、L 区においては同程度であり、飼料要求率は全ての試験区において対照区よりも低く改善されていた。これら生産成績は、豆乳の添加で低下するものの、発酵豆乳では対照区と同等であり、豆乳のデメリットが発酵処理により補完される傾向がうかがえたが、いずれの項目についても対照区、発酵/未発酵の間に有意な差は認められなかった。

豆乳を発酵させることによる成分の変化については、高木らによると、おからと豆乳を混合し、*Lactobacillus* 属により発酵させた場合、タンパク質の分子量やイソフラボン含量、ラフィノース含量は変化しないが、スタキオース含量や乳酸含量が増加することを報告している⁵⁾。一方でイソフラボンに限ってみると、豆乳を *Bifidobacterium* 属により発酵させた場合、発酵の前後で総イソフラボン含量は確かに変わらないものの、発酵前には 98.5% を占めるグリコシド型が発酵後では 40.1% に減り、全体の 60% 近くが腸管上皮細胞から生体に吸収されるアグリコン型に変換されていると KIKUCHI らは報告している⁶⁾。本試験に用いた発酵豆乳において詳細な成分分析は行っていないが、調整した発酵豆乳が酸凝固していたことから乳酸菌の発酵は順調に進んでおり、乳酸量の増加や、アグリコン型への変換等、同様の成分変化があったと考えられ、機能性を示す糖類や有機酸含量が増加していた可能性がある。上記、KIKUCHI らの報告ではラットの飼料に 30% 配合し設計しているが、通常飼料との間や発酵による生体重への影響は観察されておらず、添加水準は異なるものの本試験と同様の結果といえる。しかし、家畜の生産性を含め機能性を付加することのできる発酵豆乳の調整については、飼料への発酵豆乳の配合割合や菌種が異なることによる成分の差違について更なる検討が必要であると考えられる。

2 盲腸糞への影響

盲腸糞中の細菌数を表 5 に、盲腸糞 pH およびアンモニア濃度を表 6 に、VFA 濃度を図 1 に示した。

盲腸糞中細菌数の平均値は対照区と比較して、総嫌気性菌群数は FS1 区で減少し、大腸菌群数は S5 区で増加、乳酸菌群数は S1 区、FS1 区、FS5 区で減少するものの、S5 区では増加する結果となった。また、糞 pH は S1 区で上昇し、アンモニア濃度も同じく S1 区と S5 区で上昇した。しかし、いずれの項目についても有意な差は見られなかった。盲腸糞中総 VFA 量については、S5 区においてのみ対照区よりも高かったが、他の試験区では低く、特に S1 区においては酢酸量が有意に減少した。

消化管内容物における尿素/尿酸を腸内細菌が代謝することによりアンモニアが発生する。ヒトにおいては 1 日に生産される尿素の 4 分の 1 が腸内細菌により分解されており、鶏においても同程度代謝されているとすれば、水和したアンモニア

が弱塩基性を示すことから、腸内細菌叢が腸内 pH の変動に与える影響は大きいと考えられる。本試験においても、アンモニア濃度と糞 pH との間には 0.81 と強い相関が検出された。しかしながら、調査対象とした細菌群とアンモニア濃度、糞 pH との相関を算出したところ、中程度、もしくは全く相関がみられなかった。腸内 pH を左右する要因としては、前述の腸内細菌叢の他に、飼料の成分組成や飲水量、鶏舎環境等が考えられるが、腸内細菌と腸内 pH に相関がないという結果は理解しにくい。これは恐らく、糞 pH に大きく影響を与える細菌群が今回用いた培地や培養条件では捕捉できなかったためではないかと考えられる。一方で、盲腸糞中の総 VFA 量と各細菌群について相関を算出すると、対 総嫌気性菌群数：0.36、対 大腸菌群数：0.56、対 乳酸菌群数：0.87 と、特に乳酸菌群数において強い正の相関が検出された。また、総 VFA 量と相関が高く、変動要因と考えられたのは酢酸量であった。乳酸菌を大別すると、乳酸のみを産生するホモ型と、酢酸やエタノール等を同時に産生するヘテロ型がある。乳酸菌数が多いことに因る VFA 量の増加か、VFA 量が多いことによる乳酸菌数の増加か、については言及できないが、乳酸に限らず酢酸や総 VFA についても乳酸菌が寄与するところが大きいことが示唆された。VFA については有害な腸内細菌に対する抗菌作用も報告されており⁷⁾、プロバイオティクス資材の有効な指標であるが、本試験においては発酵豆乳や *Lb.plantarum* 菌体の添加による細菌群数への影響はみられなかった。光岡によると、ヒトにおいて腸内細菌叢の形成は無菌的に出生した数時間後には形成され始め、5 日程度で均衡に達するとしている⁸⁾。今回は 10 日齢から試験飼料を給与しており、既に細菌叢が安定していたために影響を及ぼさなかった可能性が考えられる。このため、より早期の給与がプロバイオティクス資材の活用には有効であることが示唆された。

表5 盲腸便中における細菌数

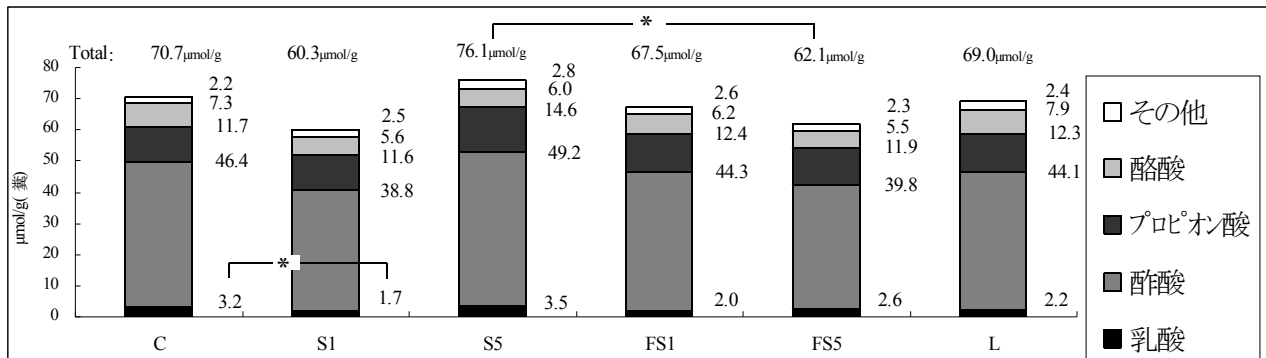
log/g	総嫌気性菌	大腸菌群	乳酸菌群
C	9.15 ± 0.25	8.41 ± 0.70	9.02 ± 0.18
S1	9.13 ± 0.43	8.47 ± 1.01	8.78 ± 0.43
S5	9.50 ± 0.41	9.21 ± 0.60	9.47 ± 0.32
FS1	8.61 ± 0.27	8.40 ± 0.29	8.71 ± 0.12
FS5	9.17 ± 1.18	8.73 ± 1.30	8.70 ± 0.85
L	9.07 ± 0.21	8.84 ± 0.10	9.02 ± 0.16

平均±標準偏差

表6 盲腸糞 pH およびアンモニア濃度

	pH	アンモニア mg/生糞 g
C	5.64 ± 0.50	0.47 ± 0.21
S1	6.13 ± 0.24	0.71 ± 0.33
S5	5.93 ± 0.56	0.75 ± 0.34
FS1	5.92 ± 0.43	0.56 ± 0.24
FS5	5.74 ± 0.35	0.54 ± 0.33
L	5.84 ± 0.60	0.58 ± 0.18

平均±標準偏差



その他: ｲ酪酸、ｲ吉草酸、吉草酸 *: P < 0.05 v. s. C

図1 盲腸便のVFA濃度

3 免疫指標

臓器重量への影響を表7に、脾臓および小腸におけるサイトカイン mRNA 発現量を図2に、血漿中におけるIgA濃度を図3に示した。

臓器重量についてはFS5区において対照区よりも有意な増加を認めた。サイトカイン mRNA 発現量については、S5区において脾臓IFN- γ mRNA 発現量が対照区よりも低下した。また、同じく脾臓IL-4 mRNA 発現量についてはS5区とFS5区との間に有意差を認めたものの、他の臓器、サイトカイン mRNA 発現量に差はみられなかった。血漿中IgA濃度については対照区と試験区の間に差を認めなかった。

IFN- γ はTh1(T helper 1)細胞により産生され、マクロファージの貪食能を活性化するなどの作用があるため細胞性免疫の指標として、IL-4およびIL-13はTh2(T helper 2)細胞により産生され、B細胞の抗体産生を活性化するなどの作用があるため液性免疫の指標として用いた。Th1細胞とTh2細胞はその作用が拮抗し合っており、Winfriedらによると鶏においてもTh1/Th2バランスが存在することが報告されている⁹⁾。本試験では、S5において細胞性免疫の活性に作用した可能性があるが、液性免疫への影響はみられなかった。また、FS5区においては脾臓重量の有意な増加がみられたが、サイトカイン mRNA 発現量への

の影響はみられなかった。Fujiwaraらによる納豆の給与においても有意なサイトカイン mRNA 発現量の変動はみられていない¹⁰⁾。鶏においては、ニューカッスル病ウイルスの筋肉注射や*Salmonella* serovar *Typhimurium* 刺激によりIFN- γ mRNA 発現量が増加し、鶏回虫である*Ascaridia galli*の卵を経口投与することにより、IL-13 mRNA 発現量が増加する事が報告されている¹¹⁾。本試験では、mRNA 発現量に一定の傾向はみられず、Th2の下流にあたる血漿中IgA濃度へも影響はみられなかった。サイトカイン発現と免疫抵抗性との関連については、詳細な作用機序の解明とともに更なる検討が必要である。

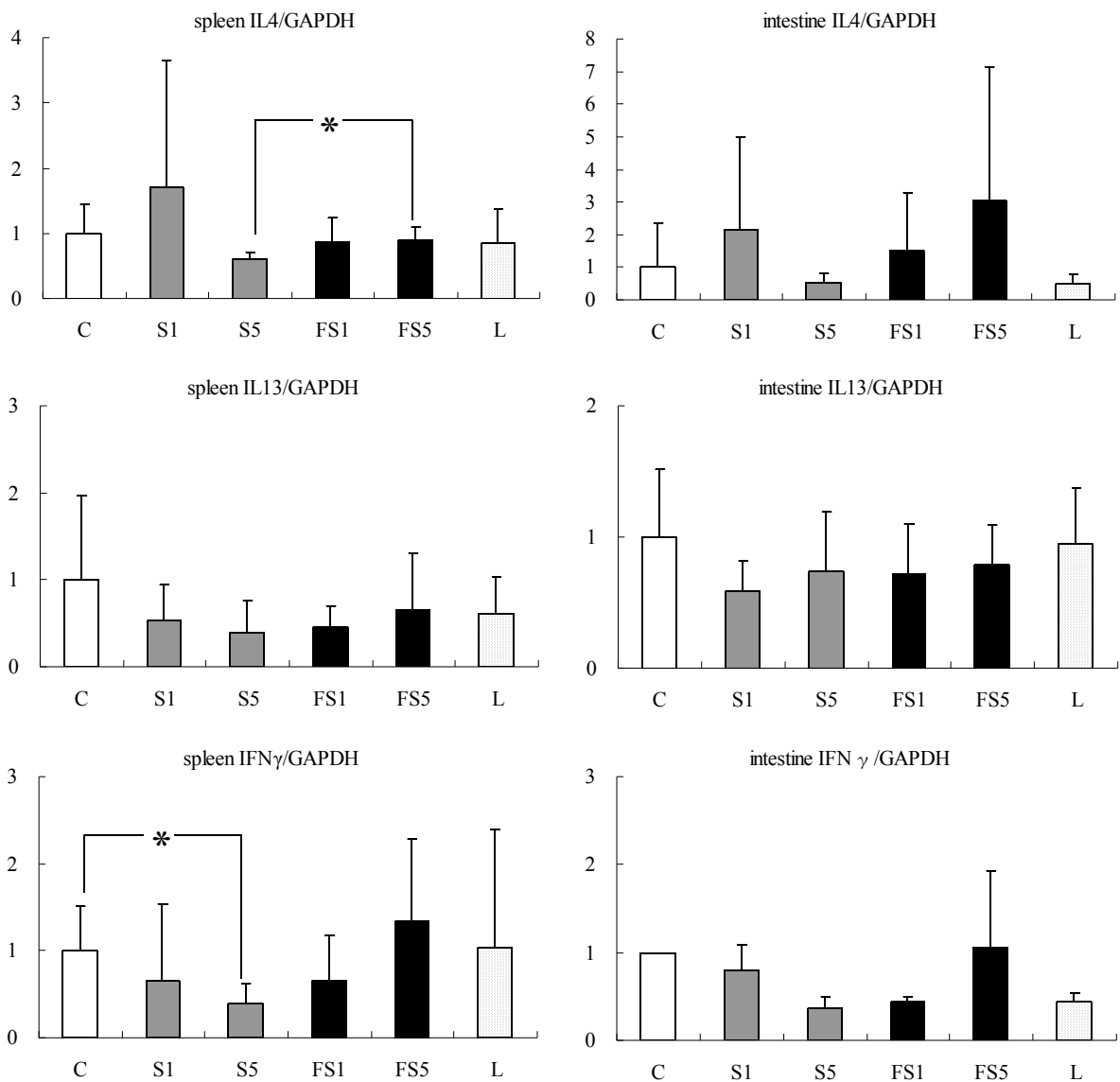
今回は、乳酸発酵させた豆乳による鶏へのプロバイオティクスの効果を検討した。発酵処理により増体重や試料効率は改善される傾向があったものの、有益な整腸作用、免疫機能賦活は認められなかった。初生雛における小腸重量は体重の3.5%を占めるといわれているが、17日齢では1%にまで低下する¹²⁾。これは、孵化直後では筋肉が発達していないことも考えられるが、残存卵黄の吸収や初期栄養の消化のための重要な器官であることがうかがえる。このことから、腸内細菌叢のコントロールを含めた機能性素材の効果を期待するには、特に孵化初期において検討するのが重

要ではないかと考えられた。

表7 臓器重量への影響

	肝臓 g/kg 体重	脾臓 g/kg 体重
C	23.1 ± 1.3	1.78 ± 0.14
S1	22.0 ± 1.6	1.74 ± 0.21
S5	22.4 ± 1.3	1.88 ± 0.21
FS1	22.3 ± 1.3	1.70 ± 0.24
FS5	23.3 ± 2.0	2.09 ± 0.31*
L	22.9 ± 1.2	1.81 ± 0.33

平均±標準偏差 * : P < 0.05 v. s. C



*: p < 0.05

図2 脾臓、小腸における IL-4、IL-13、IFN-γ mRNA 発現量

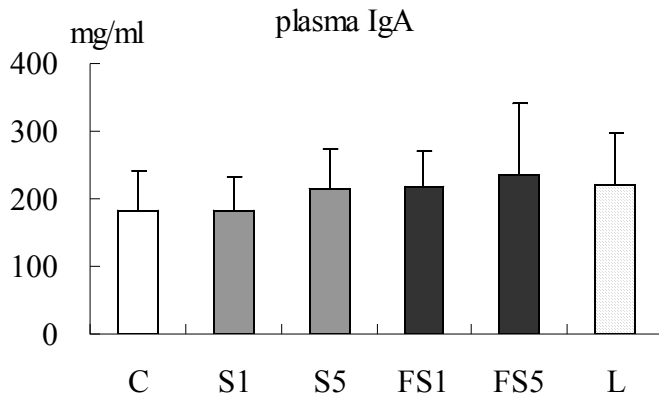


図3 血漿中における IgA 濃度

引用文献

- 1) 野上(2000)：乳酸菌処理豆腐飼料添加代用乳による哺乳子牛への下痢予防効果. 岡山総畜セ研報 11. 13-18
- 2) 田中ら(2008)：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. 岡山総畜セ研報 18. 5-10
- 3) 金谷ら(2008)：健康で安全な鶏肉の生産技術の開発. 岡山総畜セ研報 18. 51-55
- 4) 金谷ら(2008)：健康で安全な豚肉の生産技術の開発. 岡山総畜セ研報 18. 56-61
- 5) 高木ら(2006)：新規乳酸菌を用いたおから・豆乳発酵食品の成分 特性. 武庫川女子大紀要 . 54, 31-35
- 6) 北脇ら(2006)：大豆乳酸発酵食品がラットの血漿および肝臓脂質 濃度に及ぼす影響. 武庫川女子大紀要. 54, 37-42
- 7) 光岡(2005)：ヒトフローラ研究. 腸内細菌学雑誌. 19. 179-192
- 8) Winfried G. J. Degen et al., (2005)：Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Veterinary Microbiology* 105, 163-167
- 9) Ken-ichiro Fujiwara et al., (2009)：Effect of *Bacillus subtilis* var. natto Fermented Soybean on Growth Performance, Microbial Activity in the Caeca and Cytokine Gene Expression of Domestic Meat Type Chickens. *J. Poult. Sci.*, 46:116-122
- 10) R. K. Beal et al., (2004)：Temporal dynamics of the cellular, humoral and cytokine responses in chickens during primary and secondary infection with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Avian Pathology* 33, 25-33
- 11) 高橋(2005)：ブロイラー栄養生理研究の進歩そして問題点. 畜産 の研究 59. 3. 340-354