

黒毛和種哺乳子牛への生菌製剤の経口投与が糞便中の 乳酸，酪酸及び IgA 濃度に及ぼす影響

稲富太樹夫¹⁾蒔田浩平²⁾乙丸孝之介^{3)†}

1) 東京都 開業 (稲富動物病院：〒145-0071 大田区田園調布 1-1-24)

2) 酪農学園大学獣医学群 (〒069-8501 江別市文京台緑町 582)

3) 鹿児島大学共同獣医学部 (〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24)

(2019年9月7日受付・2019年11月11日受理)

要 約

黒毛和種子牛に対する生菌製剤の経口投与が糞便中の乳酸，酪酸及び免疫グロブリン (Ig) A 濃度に及ぼす影響について検討した。8日齢の黒毛和種子牛 40頭をランダムに2群 (投与群 20頭，対照群 20頭) に分け，投与群に対しては14日間，*Streptococcus faecalis*，*Clostridium butyricum* 及び *Bacillus mesenteries* を混合した生菌製剤を1日当たり 30g 投与した。一方，対照群には生菌製剤の投与を行わなかった。投与群の糞便中の酪酸濃度及び IgA 濃度は，生菌製剤投与開始後 7 及び 14 日で，対照群と比較し有意に高値であった ($P < 0.05$)。このことから，黒毛和種子牛に対する生菌製剤の投与は腸管内での酪酸濃度を上昇させ，IgA 産生を促進する可能性が示唆された。

—キーワード：糞便中 IgA，黒毛和種子牛，生菌製剤。

-----日獣会誌 73, 374~377 (2020)

生菌剤は，腸内微生物叢のバランスを改善するために動物に投与される生きた微生物であり，家畜においては，おもに成長促進や消化機能改善などを目的として投与されている [1]。子牛は一般的に，成牛と比較し免疫機能が未熟であり，特に哺乳期子牛は消化器疾患を発症しやすいため [2, 3]，疾病予防を目的に生菌剤が投与されることも多い [4, 5]。

免疫グロブリン A (IgA) は，病原性微生物が腸上皮細胞関門を通過するのを防ぐための主要な防御要素の1つであり，腸粘膜の保護に重要である [6, 7]。子牛における生菌剤投与と IgA 産生との関連について，ホルスタイン種子牛においては，生菌剤の投与による消化管内の IgA 濃度の上昇や，それに伴う消化器疾患の減少などが報告されている [4, 5, 8]。一方，ホルスタイン種子牛と比較し，免疫機能が未熟で消化器病発症のリスクが高い黒毛和種子牛 [9] における生菌剤投与と IgA 産生に関する報告は，これまでなされていない。そこで，本研究では，黒毛和種子牛に対する生菌剤の投与が腸管内での IgA 産生に与える影響を明らかにするために，糞便中の IgA 濃度に焦点を当てて検討を行った。

供試牛は長野県内の1農場で飼養されていた8日齢の臨床的に健康な黒毛和種雌子牛 40頭で，試験期間は2015年6~8月であった。すべての子牛は，出生後4日間は母牛と同居飼養された後，個別ハッチに移動し，代用乳にて飼養された。子牛をランダムに投与群 ($n=20$ ，体重 $38.2 \pm 1.3\text{kg}$) と対照群 ($n=20$ ，体重 $38.4 \pm 1.1\text{kg}$) の2群に分け，投与群に対しては *Streptococcus faecalis*，*Clostridium butyricum* 及び *Bacillus mesenteries* を混合した市販の生菌製剤 (動物用ビオスリー，東亜薬品工業株，東京)，1回 15g を1日2回，計14日間，代用乳に添加して投与した。一方，対照群に対しては生菌製剤の投与は行わなかった。試験期間中の飼料給与量及び飼料養分含量を表1に示したが，両群ともに日本飼養標準 (日本飼養標準・肉用牛編，農業・食品産業技術総合研究機構編，57-71，中央畜産会，東京 (2000)) の要求量を満たしていた。また，すべての子牛は，日本学術会議の「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に従って飼養管理された。さらに，供試したすべての子牛は試験期間中，臨床的に健康であり，治療を要した個体はいなかった。投与開始前，投与後7及び14日に採血及び糞便の

† 連絡責任者：乙丸孝之介 (鹿児島大学共同獣医学部)

〒890-0065 鹿児島市郡元 1-21-24

☎ 099-285-8750 FAX 099-285-8751

E-mail : otomaru@vet.kagoshima-u.ac.jp

採取を行った。採血は頸静脈より行い、速やかに血清を分離後、分析まで-30℃で保存した。糞便については子牛の直腸内にビニールグローブを挿入して直腸便を約5g採取し、分析まで-80℃で保存した。

血液生化学検査については、生化学自動分析装置（自動分析装置7060, (株)日立ハイテク, 東京）を用いて行い、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT), 血液尿素窒素 (BUN), 血清総タンパク (TP), 血清アルブミン (Alb) を測定した。血清グロブリン値は, TP 値から Alb 値を引くことにより算出した。

糞便中の IgA 濃度の測定は, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法を用いて行った。糞便 0.5g を PBS 5ml に懸濁し, 15,000rpm で 10 分間遠心分離した後に得られた上清について, Limら [10] の方法を用いて IgA 濃度を測定した。糞便中の乳酸及び酪酸濃度は, ガスクロマトグラフィー法を用いて行った [11]。糞便 0.5g に, 10% メタリン酸 1ml 及び 4-メチル吉草酸 0.4ml を加えボルテックスミキサーを用いて完全に混合後, 4℃下で 5,700rpm, 20 分間遠心した。

表1 飼料給与量及び飼料養分含量

		8日齢	15日齢	22日齢
給与量 (乾物)				
代用乳 ¹⁾	(g)	360	540	720
スターター ²⁾	(g)	100	140	200
乾草(オーツヘイ)	(g)	10	30	40
飼料養分含量 (乾物中)				
粗タンパク	(%)	26.3	25.6	25.6
粗脂肪	(%)	15.3	15.0	14.8
可消化養分総量 (TDN)	(%)	101.1	99.1	98.7

- 1) くろっけスーパー (雪印種苗, 北海道)
- 2) カーフスターター (雪印種苗, 北海道)

上清を回収し, ガスクロマトグラフ (HP Agilent 6890 ガスクロマトグラフ, アジレント・テクノロジー(株), 東京) を用いて, 乳酸及び酪酸濃度を測定した。

得られた値は, 平均±標準偏差にて示した。統計解析は統計解析ソフト (SPSS Statistics 24, 日本 IBM (株), 東京) を用いて行った。各群間の比較には正規性, 等分散性を確認した後に Student の *t* 検定法を用いて行った。正規性, 等分散性が確認できない場合には Mann-Whitney の U 検定法を用いて行い, 危険率 5% 未満を有意な差とした。

血液生化学検査値については試験期間中, いずれの項目も両群間に有意な差はみられなかった。糞便中の乳酸濃度は, 生菌製剤投与前及び投与後において両群間に有意な差はなかった。一方, 酪酸濃度は, 投与後 7 及び 14 日において, 対照群と比較し投与群で有意な高値を示した (表 2)。また, 糞便中の IgA 濃度においても, 投与後 7 及び 14 日において, 対照群と比較し投与群で有意な高値を示した (表 3)。

近年, 家畜動物における抗生剤の使用を減らすために, 栄養管理を中心とした疾病コントロールが注目を集めており [12], その 1 つとして, 生菌剤の効果的な活用が期待されている。

IgA は腸管内で病原菌やその毒素と結合して中和するなど, 腸管免疫において重要な役割を担っている [13]。腸管内の IgA はおもにパイエル板の形質細胞により産生され, 形質細胞による IgA 産生は濾胞性ヘルパー T 細胞により誘導される [14]。また, この濾胞性ヘルパー T 細胞は腸管の制御性 T 細胞から分化し, さらに制御性 T 細胞はナイーブ T 細胞から分化するとされている [15]。

酪酸は短鎖脂肪酸の 1 つで, 反芻動物では, おもにルーメン内の微生物の働きにより産生され, エネルギー源としてルーメン壁から吸収される [16] が, 腸管に

表2 糞便中の乳酸及び酪酸濃度

	投与前		投与開始後 7 日		投与開始後 14 日	
	投与群	対照群	投与群	対照群	投与群	対照群
乳酸 ($\mu\text{mol/g}$)	0.6±0.1	0.5±0.1	0.7±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	0.6±0.1
酪酸 ($\mu\text{mol/g}$)	16.1±3.4	17.3±4.0	20.7±2.7*	16.4±3.3	21.6±3.7*	17.3±2.9

平均値±標準偏差
群間における有意差 (* : $P < 0.05$)

表3 糞便中の IgA 濃度

	投与前		投与開始後 7 日		投与開始後 14 日	
	投与群	対照群	投与群	対照群	投与群	対照群
IgA ($\mu\text{g/g}$)	1,441±315	1,349±301	1,979±166*	1,731±250	2,139±275*	1,931±265

平均値±標準偏差
群間における有意差 (* : $P < 0.05$)

においては、腸粘膜上皮細胞のエネルギー源として重要であり、腸管の血流を増加させるなどの作用を持つとされている [17]。また近年、腸管において酪酸は、ナイーブT細胞から制御性T細胞への分化を促進することが明らかにされている [18]。さらに、生菌剤投与と腸管内の酪酸濃度との関連について、人においては *Lactobacillus paracasei* の投与により、豚においては *Clostridium butyricum* の投与により、バファロー哺乳子牛においては *Lactobacillus acidophilus* の投与により、腸管内の酪酸濃度が上昇することなどが報告されている [19-21]。本研究においても生菌製剤の投与により、投与群の糞便中の酪酸濃度は上昇し、対照群と比較し有意な高値であった。このことから、黒毛和種子牛に対する *Streptococcus faecalis*、*Clostridium butyricum* 及び *Bacillus mesenteries* を混合した生菌製剤の投与は、腸管内の酪酸濃度を高めることにより腸管でのIgA産生を促進する可能性が示唆された。しかしながら、この製剤に含まれる3種の生菌が、どのような機序で腸管内の酪酸濃度の上昇に寄与し、IgA産生を促すか、また、腸管における酪酸濃度とIgA産生にはどのような関連があるのかについては、今後、詳細に検討する必要があると考えられた。

本研究において、申告すべき利益相反はない。

引用文献

- [1] Uyeno Y, Shigemori S, Shimosato T : Effect of Probiotics/Prebiotics on cattle health and productivity, *Microbes Environ*, 30, 126-132 (2015)
- [2] Kampen AH, Olsen I, Tollersrud T, Storset AK, Lund A : Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life, *Vet Immunol Immunop*, 113, 53-63 (2006)
- [3] 保田昌宏, 林 英明, 鈴木一由, 小岩政照, 片本 宏, 猪熊 壽, 大塚浩通, 田島譽士, 堀井洋一郎, 岡田啓司 : 消化器疾患, 子牛の医学, 家畜感染症学会編, 第1版, 209-241, 緑書房, 東京 (2014)
- [4] Frizzo LS, Zbrun MV, Soto LP, Signorinib ML : Effects of probiotics on growth performance in young calves: A meta-analysis of randomized controlled trials, *Anim Feed Sci Tech*, 169, 147-156 (2011)
- [5] Kim MK, Lee HG, Park JA, Kang SK, Choi YJ : Effect of feeding direct-fed microbial as an alternative to antibiotics for the prophylaxis of calf diarrhea in Holstein calves, *Asian Austral J Anim Sci*, 24, 643-649 (2011)
- [6] Fagarasan S, Honjo T : Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences, *Nat Rev Immunol*, 3, 63-67 (2003)
- [7] Lyu Y, Wu L, Wang F, Shen X, Lin D : Carotenoid supplementation and retinoic acid in immunoglobulin A regulation of the gut microbiota dysbiosis, *Exp Biol Med*, 243, 613-620 (2018)
- [8] Tsuruta T, Inoue R, Tsukahara T, Matsubara N, Hamasaki M, Ushida K : A cell preparation of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 stimulates the luminal immunoglobulin A secretion in juvenile calves, *Anim Sci J*, 80, 206-211 (2009)
- [9] Ohtsuka H, Ono M, Saruyama Y, Mukai M, Kohirumaki M, Kawamura S : Comparison of the peripheral blood leukocyte population between Japanese Black and Holstein calves, *Anim Sci J*, 82, 93-98 (2011)
- [10] Lim BO, Yamada K, Sugano M : Effects of bile acids and lectins on immunoglobulin production in rat mesenteric lymph node lymphocytes, *In Vitro Cell Dev Biol Anim An*, 30A, 407-413 (1994)
- [11] Murugesan GR, Romero LF, Persia ME : Effects of protease, phytase and a *Bacillus* sp. direct-fed microbial on nutrient and energy digestibility, ileal brush border digestive enzyme activity and caecal short-chain fatty acid concentration in broiler chickens, *Plos One*, 9, e101888 (2014)
- [12] 久米新一 : 子牛の栄養・代謝の特異性, 家畜感染症学会誌, 2, 51-56 (2013)
- [13] Xiong N, Hu S : Regulation of intestinal IgA responses, *Cell Mol Life Sci*, 72, 2645-2655 (2015)
- [14] Winstead CJ : Follicular helper T cell-mediated mucosal barrier maintenance, *Immunol Lett*, 162, 39-47 (2014)
- [15] Tsuji M, Komatsu N, Kawamoto S, Suzuki K, Kanagawa O, Honjo T, Hori S, Fagarasan S : Preferential generation of follicular B helper T cells from Foxp3⁺ T cells in gut Peyer's patches, *Science*, 323, 1488-1492 (2009)
- [16] Blottière HM, Buecher B, Galmiche JP, Cherbut C : Molecular analysis of the effect of short-chain fatty acids on intestinal cell proliferation, *P Nutr Soc*, 62, 101-106 (2003)
- [17] Sakata T, Yajima T : Influence of short chain fatty acids on the epithelial cell division of digestive tract, *Q J Exp Physiol*, 69, 639-648 (1984)
- [18] Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H : Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells, *Nature*, 504, 446-450 (2013)
- [19] Canani RB, De Filippis F, Nocerino R, Laiola M, Paparo L, Calignano A, De Caro C, Coretti L, Chiarotti L, Gilbert JA, Ercolini D : Specific signatures of the gut microbiota and increased levels of butyrate in children treated with fermented cow's milk containing heat-killed *Lactobacillus paracasei* CBA L74, *Appl Environ Microb*, 83, e01206-17 (2017)
- [20] Zhang J, Chen X, Liu P, Zhao J, Sun J, Guan W, Johnston LJ, Levesque CL, Fan P, He T, Zhang G, Ma

X : Dietary *Clostridium butyricum* induces a phased shift in fecal microbiota structure and increases the acetic acid-producing bacteria in a weaned piglet model, *J Agr Food Chem*, 66, 5157-5166 (2018)

[21] Sharma AN, Kumar S, Tyagi AK : Effects of mannan-

oligosaccharides and *Lactobacillus acidophilus* supplementation on growth performance, nutrient utilization and faecal characteristics in Murrah buffalo calves, *J Anim Physiol An N*, 102, 679-689 (2018)

Effect of Dietary Supplementation with Probiotics on Fecal Increase in Butyric Acid and Immunoglobulin A in Suckling Japanese Black Calves

Takio INATOMI¹⁾, Kohei MAKITA²⁾ and Konosuke OTOMARU^{3)†}

1) *Inatomi Animal Clinic, 1-1-24 Denenchofu, Ota-ku, 145-0071, Japan*

2) *Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai-Midorimachi, Ebetsu, 069-8501, Japan*

3) *Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan*

SUMMARY

This study examined the effect of probiotic administration of fecal lactic acid, butyric acid and immunoglobulin A (IgA) concentration in Japanese Black suckling calves. Forty clinically healthy calves, 8 days old, were separated into two groups. Probiotic product consisting of *Streptococcus faecalis*, *Clostridium butyricum* and *Bacillus mesenteries* were administrated at a dose of 30 g per day per head for 14 days to 20 calves (administrated group), and not administrated to another 20 calves (control group). Fecal butyric acid and IgA concentrations in the administrated group were significantly higher 7 and 14 days after the start of administration than the control group ($P < 0.05$). This result shows that dietary supplementation with probiotics in calves may have increase butyric acid concentration and IgA production in the intestinal tract.

— Key words : fecal immunoglobulin A, Japanese Black calf, probiotics.

† Correspondence to : Konosuke OTOMARU (*Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University*)

1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan

TEL +81-99-285-8750 FAX +81-99-285-8751 E-mail : otomaru@vet.kagoshima-u.ac.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 374 ~ 377 (2020)