

<研究ノート>

初生雛への発酵豆乳および *Lb.plantarum* の飲水給与が腸内細菌叢、免疫機能に及ぼす効果

金谷健史*、森尚之**、疇地勅和***

Effect of fermented soy milk and *Lb.plantarum* supplementation in chicks, by drinking water on microbial activity and cytokine gene expression.

Takeshi KANETANI, Hisashi MORI, Tokikazu AZECHI

要 約

三種混合乳酸菌 (*Ec.faecium*, *Lb.acidophilus*, *Lb.plantarum*) で処理した発酵豆乳を 10 日齢の採卵鶏雛に飼料添加し給与したところ飼料要求率は改善される傾向を示したが、整腸・免疫への賦活作用は観察されなかった。そこで、孵化直後で腸内細菌叢が定常化していないと考えられる初生雛において、プロバイオティクス素材である発酵豆乳、*Lb.plantarum* 菌体を 1 週間飲水に混合し給与したところ、盲腸糞中におけるラクトバチルス属の菌数が対照区と比べ有意に上昇した。7 日齢で素材の給与を中止し、飲水を全て蒸留水に戻した後、14 日齢において腸内菌数を再度調査すると、*Lb.plantarum* 菌体給与ではラクトバチルス属菌数が 7 日齢と同様に高い水準を維持していた。これらのことから、孵化直後からのプロバイオティクス資材の給与が腸内における乳酸菌の定着に有効であり、その給与期間が短期間でも菌数の持続が可能であることが示唆された。

キーワード： 三種混合乳酸菌、豆乳、初生雛、プロバイオティクス

緒 言

プロバイオティクス素材として三種混合乳酸菌により発酵させた豆乳を 10 日齢の採卵鶏雛に給与した試験を岡山県総合畜産センター研究報告第 19 号において報告した¹⁾。この試験では、発酵豆乳粉末の添加により発育など生産性の向上はみられたものの、腸内細菌叢への影響や免疫機能など機能性への作用はみられなかった。

ヒトにおいては出生後数時間から腸内細菌叢が形成されはじめ、1 週間程度で定常化するとされている²⁾。鶏においても孵化直後は無菌的な状態であると考えられることから、10 日齢の雛では既に腸内細菌叢が固定され、プロバイオティクス素材の干渉作用が及ばなかった可能性が考えられた。そこで、初生雛の段階からプロバイオティクス素材を給与することで、早期から菌叢形成の選択肢となり、有用菌定着の可能性が高まるのではないかと考え、前報と同様の素材を孵化 0 日齢の初生雛へ給与し、腸内細菌叢、免疫機能への作用に絞って検討を行った。なお、孵化 0 日齢の雛では飼料の摂取量が少なく、一定の菌数を摂取させ

ることが難しいため、重量で飼料摂取量の 2 倍多い飲水に素材を混合し給与することとした。なお、雛導入の都合により、前報では採卵鶏雄雛(ハイライン・マリア)を用いたが、本試験では肉用鶏雌雛(チャンキー)を用いて試験を行った。

方 法

1 飲水給与の準備

前報¹⁾と同ロットの乾燥発酵豆乳および *Lb.plantarum* 粉末を用いた。なるべく多くの菌数を摂取させるため飲水への添加水準を 1% とし、蒸留水に混合したものを飲水タンクに充填し、オートファウント方式で給与することとした。

初生雛の飼育温度である 30℃ で飲水タンクを静置し、飲水の腐敗モデルとして飼料を混合したものを対照とした。大腸菌群数には DHL 培地(栄研化学)を、乳酸菌 (*Lactobacillus* 属菌) 群数には変法 LBS 培地(表 1)を用い、ガスパックによる嫌気的条件下で 37℃ 24 時間培養した計測値を菌数とした。この結果により、12 時間以上の静置では *Lactobacillus* 属菌群数が増加し飲水中の菌

叢が変化すると考えられたため、飲水タンクは12時間以内に更新することとした。

2 初生雛への飲水による給与試験

(1) 試験区分

蒸留水を給与する対照区[C区]、蒸留水に発酵豆乳粉末を1%混合した発酵豆乳区[FS区]、*Lb. plantarum*粉末を1%混合した乳酸菌区[L区]、以上3区を設けた。

①対照区[C区] 蒸留水

②発酵豆乳区[FS区] 蒸留水
+ 発酵豆乳粉末1%混合

③乳酸菌区[L区] 蒸留水
+ *Lb. plantarum*粉末1%混合

(2) 供試鶏

孵化0日齢のブロイラー(チャンキー)初生雛雌を一試験区10羽ずつ配置し、ケージ飼育とした。

飼料は市販のブロイラー前期飼料(CP23%、ME3.15kcal/g)を不断給餌とし、自由飲水とした。

(3) 調査方法

0日齢から7日齢まで試験区に沿って飲水させた。7日齢において各試験区から5羽ずつ採血後解体し、腸内細菌数測定用として盲腸糞、サイトカイン mRNA 発現量の測定用として脾臓および小腸(メッケル憩室近位)を採材した。

残りの試験鶏については、全試験区蒸留水の給与に切り替え、14日齢まで飼育した後、同じく採血後採材を行った。採材した組織の処理は前報¹⁾と同様である。

0日齢、7日齢、14日齢における生体重、および7日齢、14日齢までの飼料摂取量ならびに飲水量を測定した(図1)。

表1 変法 LBS 培地の調整

	g
LBS 寒天培地 (BBL)	84.0
Lab-lemco powder (Oxoid)	8.0
酢酸ナトリウム三水和物	15.0
H ₂ O	1000

加温溶解後 A.C.し、50℃まで冷却した後、酢酸 2.4ml を加え分注

表2 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℃ 30min で加温溶解後、分注し、ブチル栓をして A.C.

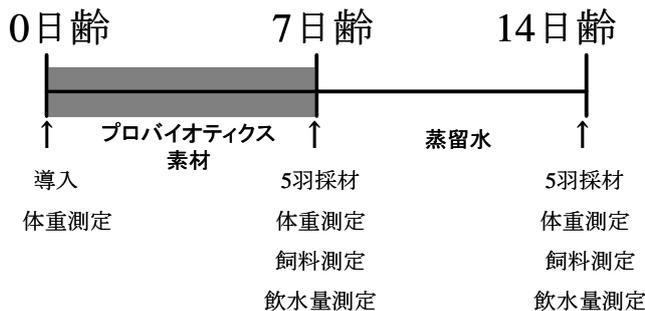


図1 試験日程

(4) 分析項目

血清中の IgA 濃度を Chicken IgA ELISA Quantitation Kit(E30-103;BETHYL)により、血清中 ND 抗体価を HI により測定した。

盲腸糞中における総嫌気性菌(GAM:ニッスイ)、大腸菌群(DHL:栄研化学)、*Lactobacillus*属菌群(変法 LBS 培地:表1)を嫌気性菌用に調整した希釈液(表2)により希釈し、ガスパックによる嫌気培養後計数した。

脾臓および小腸における鶏 IFN- γ mRNA 発現量

(QT00598059:Qiagen)、鶏 IL-4mRNA 発現量(QT00609126:Qiagen)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 mRNA 発現量(GAPDH;QT00588973:Qiagen)を前報と同様に測定し、対照区[C区]を1とした相対比を算出した。

(5) 統計処理

student t-test を行い、有意水準は $p < 0.10$ および $p < 0.05$ とした。

結 果

1 飲水中の細菌数の推移

初生雛の飼育温度である 30 °C で飲水タンクを静置した場合の大腸菌群数、乳酸菌群数の推移を表 3 に示した。給水器内における細菌数は鶏舎内の大気に暴露されることにより急激に増加し、5 日齢では総菌数が 40, 000 個に上るといわれている¹⁾。通常、鶏がついばんだ飼料がウォーターカップ内に落ち、細菌が増殖することが飲水が腐敗する一因と考えられるため、今回は配合飼料を蒸留水に 1% 混合し、経時時間ごとの大腸菌数、乳酸菌数：*La. plantarum* 属菌数の推移を調査した。しかし、飼料のみの混合では 24 時間内に細菌数の増加は観察できなかつた。一方で、*Lb. plantarum* 1% 水における *Lactobacillus* 属菌数は、乾燥粉末中における生菌数から算出した 14×10^5 cfu/ml に対し、0 時間で同程度である 9.4×10^5 cfu/ml が確認でき、8 時間以降では菌数の増加がみられたことから混合菌の増殖が考えられた。また、大腸菌群の増殖はみられなかつた。発酵豆乳 1% 水においては、*Lactobacillus* 属菌数が乾燥粉末換算の 4.0×10^5 cfu/ml に対し、0 時間では確認できず、16 時間後からの増殖がみられた。大腸菌群の増殖はみられないものの、0 時間においても *Lactobacillus* 属菌が検出できなかったのは、豆乳の発酵に用いた 3 種混合菌：*Ec. faecium*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum* の内、変法 LBS 培地で生育する *Lactobacillus* 属菌が発酵豆乳中で優勢となり得なかつた可能性、蒸留水への混合で生菌が死滅した可能性などが考えられ

る。本試験においては、飲水中の細菌叢が変化しない 12 時間以内で飲水タンクを更新したが、24 時間においても大腸菌群が増殖していないことから、混合後も数日間使用することが可能であると考えられる

2 生育および飲水量への影響

試験鶏の 0 日齢、7 日齢、14 日齢における生体重を表 4 に、0 ~ 7 日齢、7 ~ 14 日齢における飼料摂取量を表 5 に、飼料要求率を表 6 に、飲水量を表 7 に示した。

プロバイオ素材を給与した 7 日齢までにおいて、生体重は C 区と FS 区、L 区との間に有意差はなく、発育に差はみられなかつた。しかし、7 日齢までの飼料摂取量は C 区と比較し、FS 区、L 区の順に低く、対応して飼料要求率が優れる結果となった。一方で、飲水量は L 区、FS 区、C 区の順に高く、素材の添加が飲水量に影響している可能性が示された。飲水量の増加に伴い、飼料摂取量が減少する傾向が示されたが、発育に影響を及ぼしていないことから、発酵豆乳および *Lb. plantarum* 粉末は 1% という高水準での飲水添加が可能であると考えられる。

また、7 日齢以降蒸留水を給与した 14 日齢においては、C 区において生体重が若干高いものの試験区との間に有意差はみられず、飼料摂取量の増加と、飼料要求率の低下がみられたが、飲水量は C 区よりも低く、プロバイオ素材を給与したことによる飲水量の増加といった代償はみられなかつた。

表 3 飲水タンクを 30 °C で静置した場合の細菌数の変化 [cfu/ml]

試験区 \ 時間 h	菌群	0	2	4	8	16	24
① 飼料 1% 水	大腸菌	0	0	0	0	0	0
	<i>Lactobacillus</i> 属	0	0	0	0	0	0
② 発酵豆乳 1% 水	大腸菌	0	0	0	0	0	0
	<i>Lactobacillus</i> 属	0	0	0	0	1.8×10^5	21.4×10^5
③ <i>Lb. plantarum</i> 1% 水	大腸菌	0	0	0	0	0	0
	<i>Lactobacillus</i> 属	9.4×10^5	6.0×10^5	16.1×10^5	20.9×10^5	27.5×10^5	83.9×10^5

表 4 生体重 [g]

	0 日齢		7 日齢		14 日齢	
C 区	42.7	± 4.3	172.0	± 6.7	-	460.0 ± 32.3 -
FS 区	42.5	± 3.4	170.3	± 10.6	n.s.	447.6 ± 17.8 n.s.
L 区	42.7	± 3.9	173.8	± 10.2	n.s.	445.0 ± 23.8 n.s.

平均 ± 標準偏差

表5 飼料摂取量[g/羽/週]

		0～7日齢	7～14日齢
C区	-	177.9	466.0
FS区	-	175.6	484.0
L区	-	169.8	472.0

表6 飼料要求率

		0～7日齢	7～14日齢
C区	-	1.38	1.62
FS区	-	1.37	1.75
L区	-	1.30	1.74

表7 飲水量[g(ml)/羽/週]

		0～7日齢	7～14日齢
C区	-	377.2	648.6
FS区	-	391.2	632.6
L区	-	411.3	631.6

3 盲腸糞への影響

盲腸糞中における総嫌気性菌群数を図2に、大腸菌群数を図3に、*Lactobacillus* 属菌群数を図4に示した。

総嫌気性菌群および大腸菌群において、7日齢のFS区でC区よりも菌数が減少する傾向がみられたが、14日齢では差はみられなかった。一方で、*Lactobacillus* 属菌群数については、7日齢のFS区およびL区においてC区よりも有意に高く、L区においてはプロバイオ素材の給与を中止した14日齢においても高水準で推移し有意な差がみられた。0～7日齢の飲水量からFS区およびL区の試験鶏が1週間に摂取した乳酸菌数を算出すると、FS区は 1.6×10^8 cfu/羽/週、L区は 5.8×10^8 cfu/羽/週となる。飲水に混合する前の生菌数から試算した数値では、L区およびFS区の摂取生菌数はさほど変わらないが、実際に飲水中の細菌数を調査した表2の結果からも、FS区における正味の摂取生菌数は微量もしくはほとんど見込めず、FS区=発酵豆乳の効果は、豆乳の成分を含めた素材そのものの作用であり、給与期間のみに限定されるプレバイオティクス素材として有効である可能性が考えられる。1日齢から7週齢まで飲水に 40×10^9 cfu/ml単位の*Lactobacillus* 属菌群を混合し給与した試験においても、腸内における*Lactobacillus* 属菌群の増加が確認されているが³⁾、今回L区においては給与中の7日齢、給与を中止した14日齢においても*Lactobacillus* 属菌群数が高く、早期の給与により腸内への定着が促された可能性が示唆され、

プロバイオティクス素材として有効であると考えられた。

4 免疫指標

脾臓および小腸におけるIL-4mRNA発現量を図5および図6に、IFN- γ mRNA発現量を図7および図8に、血清中IgA濃度を図9に、NDHI抗体価を図11に示した。

脾臓におけるmRNA発現量は試験区間でバラツキが大きく有意差はみられなかった。一方で、小腸においては7日齢のFS区IL-4mRNA発現量がC区よりも有意に低下していたが、IFN- γ mRNA発現量には変動がみられなかった。IL-4mRNAは液生免疫の指標として、IFN- γ mRNAは細胞性免疫の指標として測定を行ったが、FS区においても両サイトカインmRNA発現量に拮抗作用はみられず、免疫作用への一定の傾向はみられなかった。また、血清中IgA濃度については14日齢のL区においてC区よりも有意な上昇を認めた。一方でNDHI抗体価については、7日齢においてFS区、L区の順に平均値は高いものの有意差は無く、14日齢では全区で低値となっていた。血清中における抗体濃度については、雛の段階では自己抗体の産生能が十分に機能しておらず、種鶏からの移行抗体に依存している。移行抗体は他の動物同様に鶏も孵化後2～3週間で消失すると言われており、ND抗体価についても3週齢まで減少するとされている⁴⁾。このことは、今回のND抗体価の変動と一致する。一方で、自己抗体については3週齢以後産生されるが、抗体価が感染症に有効な濃度

となる4週間までの間が特に斃死リスクが高い時期であると考えられる。

今回 *Lb.plantarum* 粉末を0～7日齢と早期に

給与することで、14日齢におけるIgA濃度を高めることができたことは、感染症への免疫抵抗性を高める有効な手法となることが示唆された。

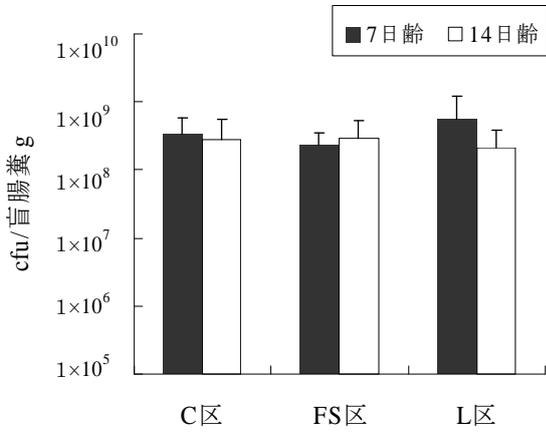
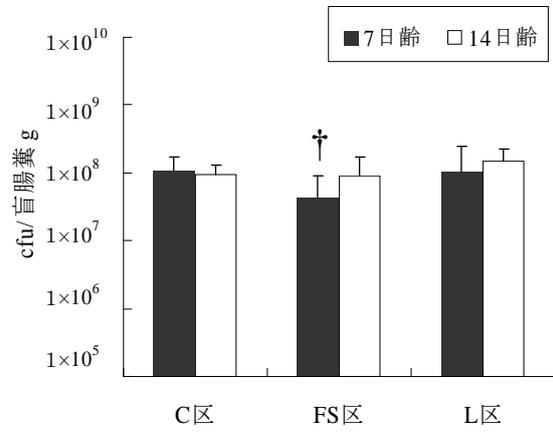
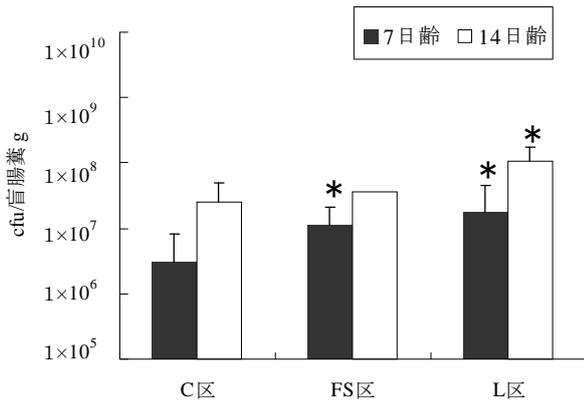


図2 総嫌気性細菌群



† : p < 0.10

図3 大腸菌群群



、* : p < 0.05

図4 *Lactobacillus* 属菌群

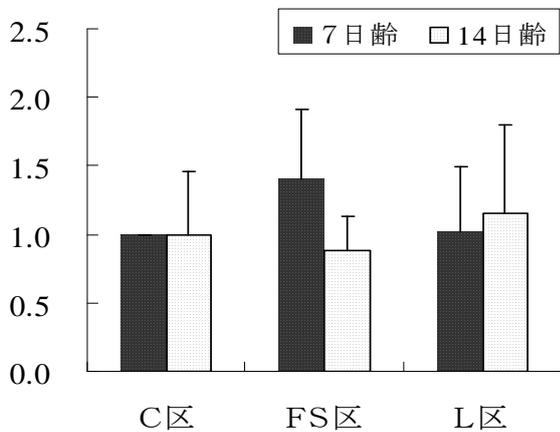
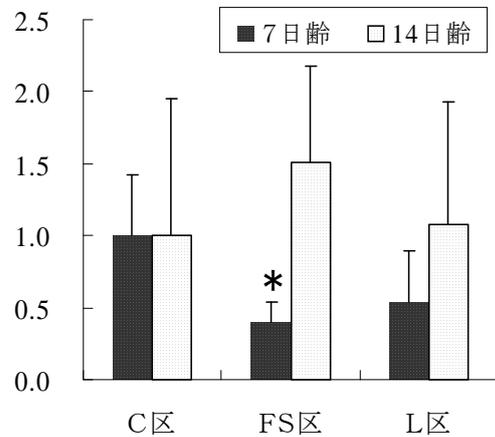


図5 spleen IL-4/GAPDH



* : p < 0.05

図6 intestine IL-4/GAPDH

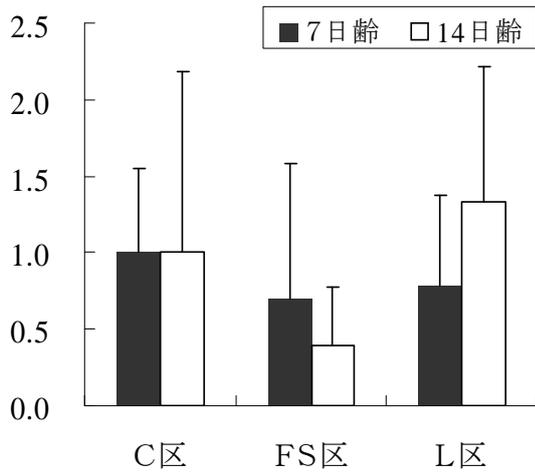


図7 spleen IFN-γ/GAPDH

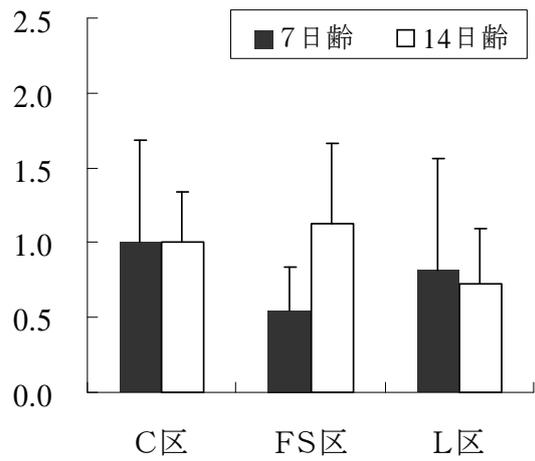
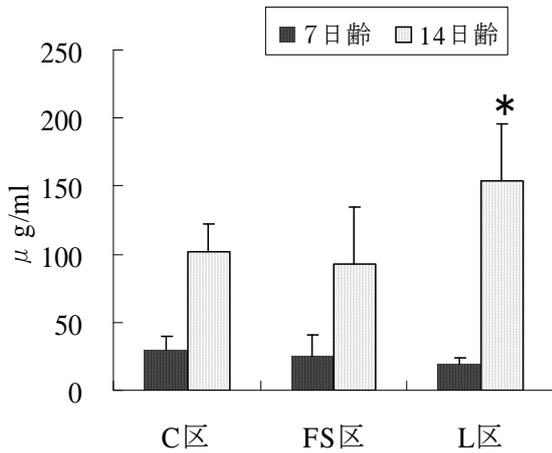


図8 intestine IFN-γ/GAPDH



*: p<0.05

図9 血清中 IgA 濃度

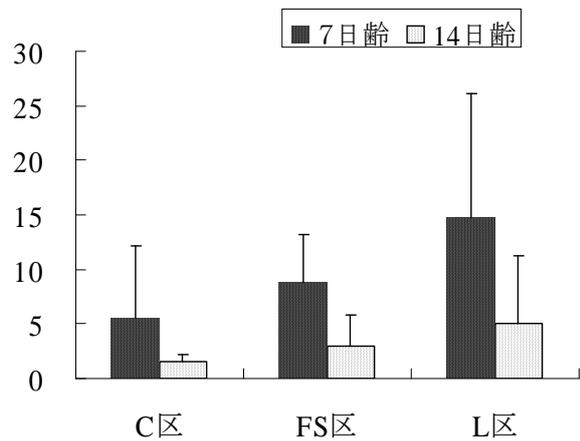


図10 NDHI 抗体価

考 察

今回の試験では孵化直後の初生雛へのプロバイオティクス素材の検討を行った。発酵豆乳については給与期間においてのみ、生菌ではなく豆乳という素材による作用で乳酸菌群数の増加が期待された。一方で、乳酸菌粉末においては、生菌数も多く、給与中止後の盲腸糞内における乳酸菌群数も高く、7日齢までの短期間であっても効果が持続することが期待された。これにより、早期の給与がより菌の定着に優れる可能性が示された。

チャンキーブロイラーの管理マニュアルによると、メスの飲水量は7日齢雛で67ml/羽/日に対して、56日齢では318ml/羽/日と5分の1程度と少量である。このため、飲水への同水準の添加であっても、より初期に実施することで素材のコス

トが削減できるとともに、定着性に優れ、免疫抵抗性が向上する可能性が示唆された。

引用文献

- 1) 金谷ら(2009);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. 岡山総畜セ研報 19. 15-21
- 2) 光岡知足;腸内菌の世界:叢文社
- 3) B. A. WATKINS et al;Drinking water treatment with a commercial preparation of a concentrated Lactobacillus culture for broiler chickens. Poult Sci. 1984;63(8)1671-3
- 4) 三船ら(1999);ブロイラーのニューカッスル病生ワクチン接種試験:徳島畜試研報 40. 93-95