

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580300

研究課題名（和文）無薬・放牧管理豚の腸内細菌叢の解明とその利用

研究課題名（英文）Analysis and utilization of intestinal microbiota from pigs in an outdoor production system without antibiotics

研究代表者

田島 清 (TAJIMA KIYOSHI)

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・機能性飼料研究チーム・主任研究員

研究者番号：80343953

研究成果の概要（和文）：

発酵リキッド飼料と放牧を組み合わせ、抗菌薬を使用せずにブタの肥育を行っている農家のブタの腸内細菌構成は、舎飼いのそれと異なっていることが予想されたため、糞中の細菌構成を比較し、乳酸菌と嫌気性菌を単離した。糞中に含まれる細菌の多様性は舎飼いに比べて放牧豚で高く、嫌気性のらせん菌が一定割合、酪酸生成に関わる未培養菌が多く検出された。放牧による環境に適応して腸内細菌構成も変化することが推察された。しかし、単離した乳酸菌はいずれも大腸菌に対する抗菌活性を持たず、酪酸生成菌も採取出来なかった。

研究成果の概要（英文）：

Some pig farms practice successful animal production without using prophylactic and growth-promoting antibiotics (PGPAs). They combine the use of fermented liquid feed and outdoor rearing without dependence on PGPAs. It was considered that there were significant differences in the composition and diversity of the intestinal microbiota between the pigs reared outdoors and indoors. Faecal bacterial diversity (Chao1) was higher in pigs reared outdoors than in the control pigs. In the pigs reared outdoors, unclassified *Ruminococcaceae* constituted a large fraction. This group have a similarity to unidentified butyrate producing bacteria and *ruminococci*. In addition, the *Spirochaetes* was consistently detected from the pigs reared outdoors. These results indicated that the pigs reared outdoors had obtained a higher intestinal diversity in response to the feeding environments such as location and diet.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、畜産学・草地学

キーワード：放牧豚 腸内フローラ解析

1. 研究開始当初の背景

離乳直後の子ブタは、腸管免疫能が活発化するまでの間、腸内は病原性菌や大腸菌群に対して無防備な状態におかれる。したがって、この間は日常的に抗菌性飼料添加物が使用されている。

一方EU諸国では成長促進を目的とした抗菌性飼料添加物の使用が禁止され、我が国でも平成17年度から、農林水産省の委託プロジェクト研究「安全・安心な畜産物生産技術の開発」による抗生物質使用量低減に向けた技術開発が進められた。当研究チームでは、離乳子ブタに *Lactobacillus plantalum* LQ80 株を発酵リキッド飼料として給与し、抗菌性飼料添加物との比較を行っている。

乳酸菌などの生菌製剤を子ブタに投与すると、抗菌性飼料添加物を投与しない場合でも、増体成績や飼料摂取量の改善、小腸での絨毛の発達を促進するなど一定の効果が認められ、また、乳酸菌の持つプロバイオティクス効果と、乳酸や短鎖脂肪酸による腸内環境の改善により回腸末端までは大腸菌群が生育し難い状況となる。しかしながら、盲腸へ移行するに従い嫌気性菌と拮抗し、抗菌性飼料添加物を含む飼料を摂取した子ブタと比較すると乳酸菌の割合は減少する。従って、小腸で効果を持つ乳酸菌に加え、盲腸以降の嫌气的条件下で宿主に対してプラスに働く細菌を併用することにより、離乳子ブタの下痢を予防し、かつ病原性菌を含む大腸菌群の排除が可能になることが推察される。

一部の養豚農家では、放牧などを取り入れることにより、抗菌性飼料添加物や抗生物質を使用せず低い事故率を維持し、健康なブタの生産を行っている。これらのブタは腸内細菌構成も特色があることが予想され、宿主に対して有用な菌の存在が期待される。

2. 研究の目的

離乳子ブタの腸内細菌叢の早期の安定と、大腸菌群の腸内からの排除を目的として、

(1) これらに作用するバクテリオシン産生を指標に菌株のスクリーニングを実施する。主として抗菌性飼料添加物、抗生物質を日常的に使用せず、病気の発症のない農場の豚糞試料を用いて、乳酸菌 (*Lactobacillus* 属の菌等) と、嫌気性菌である *Bifidobacterium* 属の菌、酪酸生成菌である *Clostridium butyricum*、*Butyrivibrio fibrisolvens* 等を標的に菌株を収集する。得られた菌株の有用性は、発酵特性と大腸菌群に対するバクテリオシン産生能、および共培養系により明らかにする。

(2) 腸内細菌の大半は培養困難な菌であることから、(1) と並行し、16S rRNA 遺伝子を指標に細菌構成を網羅的に解析する。この

結果を当研究所で飼育しているブタの細菌叢と比較することで、どの様な菌種・菌群が腸内細菌叢の安定と抗病性に関わっているかを明らかにする。

(3) 抗菌性飼料添加物を低減した4週離乳子ブタへの給与試験を行い、増体量、飼料摂取量等の検討、小腸、盲腸、大腸内容物を採取し、内容物中の細菌叢の解析、および大腸菌群、病原性菌の検出を行い、投与した菌株の腸内細菌叢改善および病原性菌を含む大腸菌群の排除についての検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 腸内環境の改善および大腸菌群を排除する菌株のスクリーニング

放牧豚の糞から選択培地を用いて乳酸菌、*Bifidobacterium* 属の菌を、非選択培地を用いて嫌気性菌全般を単離する。単離菌株は16S rRNA 遺伝子配列により菌種を同定する。得られた乳酸菌株は大腸菌群に対するバクテリオシン産生能の有無で選抜し、産生が確認されたものは大腸菌群との共培養を行い、増殖阻害効果を確認する。嫌気性菌は生成する短鎖脂肪酸濃度を測定し、プロピオン酸、酪酸を生成する菌を選抜する。

(2) 放牧豚の腸内フローラ解析

腸内細菌の中には培養困難なものが多数含まれることから、16S rRNA 遺伝子ライブラリー法による菌構成解析を行う。この結果と一般管理のブタのそれを比較し、放牧豚に特徴的な菌種・菌群を推定する。

(3) 離乳子ブタを用いた給与試験

単離、購入菌株からスターターとなる菌株を選び、発酵リキッド飼料 (抗菌性飼料添加物不使用) を調製後、LWD 交雑種4週齢離乳子ブタに給与し、日増体量、飼料摂取量などの飼養成績、盲腸、大腸の細菌構成を、抗菌性飼料添加物を含む飼料を給与した区と比較した。

また、(1) で単離した酪酸生成菌を発酵スターターに加えて発酵調製したリキッド飼料 (抗菌性飼料添加物不使用) をLWD 交雑種4週齢離乳子ブタに給与し、酪酸生成菌を加えていない区 (抗菌性飼料添加物不使用) と、飼養成績、腸内細菌構成の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 菌株のスクリーニング

抗生物質の使用歴のない肥育前期 (体重30kg) および肥育後期 (体重80kg) の放牧豚 (パークシャー種) から新鮮糞を2回採取し、実験に供した。

これらの糞からMRS 選択培地を用いて、乳

酸菌 41 株を単離し、大腸菌に対する抗菌活性を調査した。しかしながら、41 株中大腸菌に対する抗菌活性を持つ株は見られなかった。また、乳酸生産量は当所で用いている *L. plantarum* LQ80 と比較して特別高い菌株は見られず、L 乳酸を高効率で生産する株も見られなかった。

また、*Bifidobacterium* 属の菌、酪酸生成菌等の有用菌を採取する目的で、抗菌性物質使用歴のない放牧豚（パークシャー種）肥育前期（体重 30kg）および母豚から新鮮糞を採取した。これらの糞から非選択性培地である GAM、M10 を用い、嫌気平板培養法にて嫌気性菌を単離した。bifidobacteria の単離には選択培地である TOS プロピオン酸寒天培地を用いた。得られたコロニーは GAM 培地で液体培養し、上清を短鎖脂肪酸分析に供した。プロピオン酸および酪酸濃度を指標に菌株を選択し、菌の精製を行った後、16S rRNA 遺伝子を用いて種の同定を行った。また、畜産草地研究所で抗菌性飼料添加物を供しない子豚糞を用いて構築した嫌気性菌株ライブラリーからも菌の選抜を行った。放牧豚から総計 102 株を分離したが、bifidobacteria、酪酸生成菌は得られなかった。プロピオン酸生成菌は得られ、*Anaerovibrio lipolytica* との相同性が 95% であり、この近縁種と推定された。畜草研単離菌株 189 株の中から酪酸生成菌とプロピオン酸生成菌が得られた。このうち酪酸生成菌は 16S rRNA 遺伝子配列から *Acidaminococcus fermentans* と同定された。

(2) 放牧豚の腸内フローラ解析

放牧豚の糞から DNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子ライブラリーを構築、配列の解析を行い、細菌構成を調査した。対照には畜産草地研究所で屋内飼育している肥育前期（体重 30kg）の豚（LWD）の新鮮糞を用いた。放牧豚の糞から 3 種のライブラリーを構築し 281 クロオンを、畜草研屋内飼育の豚から 90 クロオンを得た。これらの配列は RDP II の Library compare program、Dutor プログラムを用いて多様性の解析と細菌構成比を解析し、近隣接合法による系統解析を行った。放牧豚の糞中の菌の多様性は屋内飼育のそれよりも高く、細菌構成比には有意差が見られた。放牧豚から作成した 3 つのライブラリーでは、共通して *Spirochaete* が一定の割合で検出され、系統樹からは放牧豚に特有と思われる未培養菌群が検出された。これらの菌群は酪酸生成に関与することが推定された。

以上のことから、豚を屋外飼育すると、環境に対する適応から腸内細菌の多様性が高まることが示唆された。

表1 16S rRNA遺伝子配列から推測される豚糞中の細菌構成比(%)

門	屋内*	屋外1(30)	屋外2(30)	屋外3(80)
Firmicutes	88.6	91.3	71.3	75.5
Bacteroidetes	4.4	1.1	25.5	10.7
Actinobacteria	2.2	1.1	0.0	2.2
Proteobacteria	1.1	1.1	0.0	0.0
Spirochaetes	1.1	3.2	3.2	3.2
Verrucomicrobia	0.0	1.1	0.0	1.1
Acidobacteria	0.0	0.0	0.0	1.1
未分類菌群	2.6	1.1	0.0	6.2

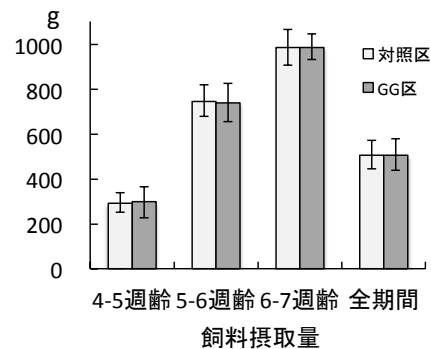
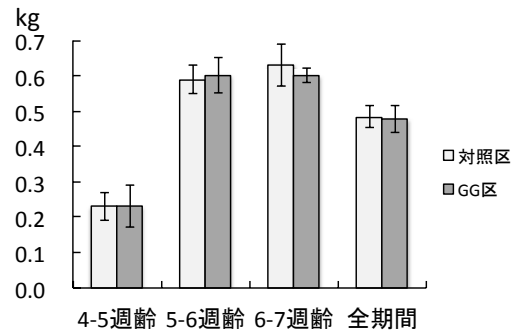
屋内: 畜産草地研究所で屋内飼育されているLWD交雑種
 屋外1(30): 屋外飼育されているパークシャー種(体重30kg)
 屋外2(30): 屋外飼育されているパークシャー種(体重30kg)
 屋外3(80): 屋外飼育されているパークシャー種(体重80kg)

表2 16S rRNA遺伝子を用いて解析した豚糞中の細菌の多様性

	屋内	屋外1(30)	屋外2(30)	屋外3(80)
解析数	90	93	94	94
推定菌種数	58	77	77	66
多様性指数	105.6	138.8	203.1	186.5

(3) 離乳子ブタを用いた給与試験

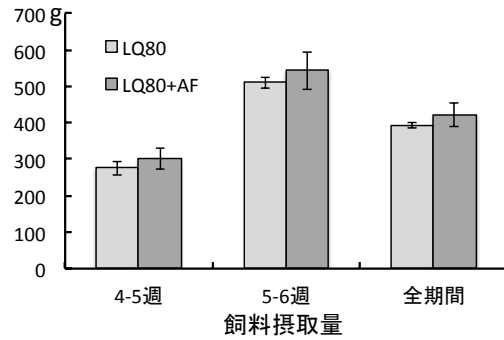
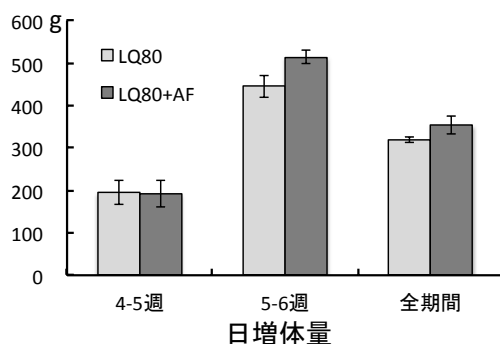
放牧豚新鮮糞から抗菌性を有する乳酸菌が単離出来なかったことから、プロバイオティクス効果が示されている *Lactobacillus rhamnosus* GG 菌を購入し、それを用いて子豚用発酵リキッド飼料を調製した。この発酵リキッド飼料を試験区、対照区に抗菌性飼料添加物を加えた飼料を設定し、4 週齢の離乳子豚（LWD）に 3 週間投与した。その結果、日増体成績、飼料摂取量に両区で有意な差は見られなかったことから、本発酵リキッド飼料が抗菌性飼料添加物代替となる可能性が示唆された。



また、16S rRNA 遺伝子を指標にした腸内フローラ解析の結果、盲腸、大腸中の多様性指数には、両区で差は認められなかった（盲腸 Chao1: 対照区・GG 区 115.5・124.0；大腸 Chao1: 対照区・GG 区 164.1・117.5）。一方、細菌構成には差が認められ、盲腸、大腸内容物共に、乳酸菌が属するバチラス綱が、抗菌性飼料添加物投与区の方が有意に高くなった（盲腸: 対照区 40.3%、GG 区 12.4%；大腸: 27.5%、GG 区 8.9%）。

発酵リキッド飼料の機能性を高めるため、豚の糞から単離したプロピオン酸生成菌である *Anaerovibrio* sp.、または、酪酸生成菌である *A. fermentans* と乳酸菌との混合培養による影響を調べた。*L. plantarum* LQ80、*L. rhamnosus* GG は MRS 培地を用い、*Anaerovibrio* sp. および *A. fermentans* は嫌気性菌用の GAM 培地を用いて一晚培養し、 10^{8-9} 濃度の菌液を新たに GAM 培地に接種して好気または嫌氣的に培養し、24 時間後の培地中の短鎖脂肪酸濃度を測定した。それぞれの菌単独での培養では、*L. plantarum* LQ80、*L. rhamnosus* GG の培養により 28-30mM の乳酸が生成され、プロピオン酸、酪酸の生成は見られなかった。*Anaerovibrio* sp. の培養により 21mM のプロピオン酸が、*A. fermentans* の培養により 8.8mM の酪酸が生成された。*L. plantarum* LQ80 または *L. rhamnosus* GG と *Anaerovibrio* sp. の混合培養ではプロピオン酸は 17-24mM 生成された一方で、乳酸の生成は 1/10 に抑制された。*L. plantarum* LQ80 または *L. rhamnosus* GG と *A. fermentans* の混合培養では、乳酸は 27mM、酪酸は 8mM 生成され、共培養が可能であることが示された。

そこで、*L. plantarum* LQ80 の単独、または *L. plantarum* LQ80 と *A. fermentans* の両方を発酵スターターに用いて発酵リキッド飼料を調製し、LWD4 週齢離乳豚 6 頭を用いて（各区 3 頭）2 週間給与試験を行い、成長等への影響を調べた。その結果、日増体量、飼料摂取量に有意な差は認められなかった。



以上の結果から、乳酸菌を用いた発酵リキッド飼料は、抗菌性飼料添加物の代替とすることが確認された。しかし、乳酸菌と酪酸生成菌の混合スターターを用いた発酵リキッド飼料の給与成績では、乳酸菌単独のそれと有意差が見られなかったことから、酪酸生成菌の選定を含めて、菌株の組み合わせをさらに工夫する必要がある。また、遺伝子解析の結果では、放牧豚の糞中から未培養の酪酸生成に関わると考えられる配列が検出されていることから、今後、これらの菌を単離し、宿主に対しての機能を明らかにする必要があると考えられる。

本課題ではブタを放牧することにより、腸内細菌叢が多様化することを明らかにした。このことが抗菌剤を使用せずに健全な家畜生産を可能にしていることが推察される。海外から論文への問い合わせも複数あった。

発酵リキッド飼料は抗菌性飼料添加物の代替となり得ることを示し、国内においても発酵リキッド飼料普及のための基礎的なデータとなると考えられる。また、発酵スターターを工夫することにより、より高機能な発酵飼料調製が可能であり、さらに研究を進めることで、国内の畜産現場に役立つ知見が得られると考えられる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 3 件）

① Tajima K, Kobashi Y, Ohmori H, Ashihara A, Kawashima T, Bacterial community composition in faeces from pigs in an outdoor production system without prophylactic or growth-promoting antibiotics, *Livestock Science*, 査読有, Vol. 133, 2010, 110-112

② Tajima K, Ohmori H, Aminov RI, Kobashi

Y, Kawashima T, Fermented liquid feed enhances bacterial diversity in piglet intestine, Anaerobe, 査読有, Vol.16, 2010, 6-11

③田島清、発酵リキッド飼料を給与した豚の腸内細菌叢、ルーメン研究会報、査読無、20巻、2009、19-22

〔学会発表〕(計1件)

①田島清、大森英之、佐々木浩一、立川洋、立川健治、川島知之、異なる乳酸菌により調整した発酵リキッド飼料が子豚の成長に与える影響、日本畜産学会大112回大会、2010年3月29日、明治大学駿河台キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田島 清 (TAJIMA KIYOSHI)

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・機能性飼料研究チーム・主任研究員

研究者番号：80343953

(2) 研究分担者

大森英之 (OHMORI HIDEYUKI)

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・機能性飼料研究チーム・研究員

研究者番号：70391381

(2) 研究分担者

川島知之 (KAWASHIMA TOMOYUKI)

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・機能性飼料研究チーム・チーム長

研究者番号：10355068