

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：24302

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660214

研究課題名(和文) 新たな代謝エネルギー源としてのブタ大腸発酵の検証と、大腸発酵性未利用資源の利活用

研究課題名(英文) Evaluation of porcine hindgut fermentation as a source of metabolic energy, and the utility of fermentable unused by-products for feedstuff.

研究代表者

塚原 隆充 (Tsukahara, Takamitsu)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・研究員

研究者番号：90562091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ブタの大腸発酵を促進させる、我が国で未利用な飼料原料を探索し、飼料転用を目指す研究を行った。7種類の被験体を選択し、盲腸内容物を用いたバッチ培養系で、ブタ大腸での発酵能を短鎖脂肪酸(SCFA)生産で推定した。上記目的に合致する飼料原料は菜種ミール(R)とビートパルプ(B)であった。これらをそれぞれ育成期仔ブタへ給与した。R添加群は、対照群よりも日増体及び飼料要求率が改善された。この時、R給与で血中SCFA濃度が高値化し、生体に利用されたSCFAも高値化した。育成期仔ブタに大腸発酵を促進させる菜種ミールを多給すると、増体が改善される可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Short-chain fatty acids (SCFA) are produced in hindgut, and utilized as a metabolic energy in host animals. The energy contribution of SCFA to the basal metabolic rate is 30-76 % in pigs. The main feedstuff of "corn" is very expensive in Japan, partially modification to a fermentable by-product (FBP) may be beneficial in swine industry. Therefore, we selected FBP, and the large supply of FBP improved the growth performance of growing pigs through stimulation of hindgut fermentation. We selected the "rapeseed meal(Rm)" and "beet-pulp(Bp)" as FBP by in vitro screening. Rm 5% supplemented diet improved the daily gain and feed conversion ratio compared by Bp supplemented or control diet. The hindgut fermentation was stimulated by Rm supplemented diet, and the utilization of SCFA by the host animals was inclined according to consideration by arterio-venous difference. Therefore, partially modification from corn to Rm, as a FBP, is beneficial for growth performance in growing pigs.

研究分野：養豚学

キーワード：大腸発酵 ブタ 未利用資源 短鎖脂肪酸 アミノ酸 腸内細菌構成

1. 研究開始当初の背景

短鎖脂肪酸(SCFA)は、主に大腸内で腸内細菌によって生産される。大腸内で生産されたSCFAは、大腸粘膜から速やかに吸収され、生体のエネルギー源になる。とくにブタでは、全代謝エネルギーの30-76%が大腸から吸収されたSCFAで賄うと行った報告があり(Engelhardt, 1995)、大腸発酵と肉豚の生産性は密接に関連していると考えられる。一方で、現在のブタ飼養標準は小腸での消化吸收のみを考慮して策定されている。近年の飼料高騰による養豚経営逼迫は深刻であり、輸入飼料原料を出来るだけ抑えて我が国の未利用資源を活用する、実現可能な飼料設計改革が我が国の畜産を存続させる意味で喫緊の課題である。

2. 研究の目的

本研究では、我が国の代表的な系統である三元交雑種(LWD系)ブタにおける大腸発酵を活用した新飼養標準改革へと研究を進めるため、現飼料の輸入穀物含有率を下げ、大腸発酵が期待できる国産の未利用資源で補完する、新たな飼料設計開発の端緒とする検討を行った。

これまでの未利用資源活用研究は、飼料原料を大きく置き換える、例えば発酵リキッド飼料や飼料米などの検討が盛んであった。一方で、近年の豚価低迷で、養豚農家の体力は著しく低下しており、ドラスティックな飼料変更は試みられない農家が大多数である。そういった状況の中飼料代が高騰し、さらに日本養豚は大きな打撃を被った。本研究は発想を転換し、飼料原料変更を小幅に抑えることで、国内飼料メーカーが対応しやすく、多くの農家も利用可能な飼料設計変更を目的とする。

とくに肉豚の中でも育成期仔ブタは、乳酸が蓄積する消化不良性下痢を多く起こす(Ushida et al, 2009)。これは易発酵性の糖質(デンプン)が大腸に流入した結果であると推察でき、飼料中のデンプンが無駄に体外へ排泄されていると考えられる。このことは、数%の穀物(トウモロコシ)を未利用資源で代替しても生産性に問題は無い可能性を示唆しており、むしろ食物繊維成分の多い未利用資源を給与することで消化不良性下痢発生率を低減させ、生産性が向上することも予測できる。よって、本研究では育成期仔ブタにターゲットを絞り、検討を行った。

3. 研究の方法

(1) SCFA 単回投与による大腸吸収動態確認試験

回盲部及び盲腸静脈にカテーテルを留置したラットを用いた(各条件 n=5~6)。試験期間中は AIN-93G 半精製飼料(Research diet)を飽食で給与した。浸透圧を調整した各 SCFA

溶液(生理食塩水、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸又は3種混合)を回盲部カテーテルへ単回注入して、投与後0, 15, 30, 60, 120 minで盲腸静脈から採血を行った。投与後120分後の採血終了後、麻酔下で解剖した。盲腸内容物、盲腸粘膜、門脈血、腹部大動脈血を採取した。

盲腸静脈血中のSCFA濃度は、Tsukahara et al. (2014)の方法に基づき、GC-MSを用いて分析した。盲腸内容物および盲腸粘膜中のSCFA濃度は、Tsukahara et al. (2014)の方法に基づき、イオン排除HPLCを用いて分析した。盲腸内容物および盲腸粘膜中の腸内細菌構成を、次世代シーケンサを用いて網羅的に解析した。また、盲腸粘膜中のSCFA受容体(GPR41, GPR43)およびタイトジャンクション関連(occludin, ZO-1)のmRNA発現をハウスキープ遺伝子である β -actinで補正して解析した。

(2) 成ブタまたは育成期仔ブタの大腸内容物を用いた未利用資源のインビトロ培養試験

第一のスクリーニングとして、成ブタの盲腸内容物を用いてインビトロ培養試験を実施した。検査を行った未利用資源は、生産量および未利用率を基準に(中央畜産会資料, 1990)、ビール粕、海藻粉末、稲わら、茶粉末、そら豆皮、ビートパルプおよび菜種ミールの7種類を選択した。各未利用資源はFuruya (1979)に準拠して各副産物の人工消化処理を行った。乾燥後、下記のインビトロ培養試験に供した。

市販飼料を給与している成ブタ2頭を屠殺し、大腸内容物を採取した。インビトロ培養法はTsukahara et al. (2006)に準拠した。即ち、内容物を嫌気性リン酸バッファー(50 mM, pH6.5)で5倍希釈し、4重ガーゼで濾過した濾液25 mLを120 mL容バイアル瓶に分注した。基質として上記人工消化済みの被験体を0.5 gずつ添加した。気相を炭酸ガスに置換後、ブチルゴム栓で密栓した。39°Cで振盪培養し、培養開始後4および24時間で培養液を各バイアル瓶から1 mL採取した。なお、トウモロコシデンプンを陽性対照、添加しないブランクを陰性対照として用いた。培養上清中のSCFA濃度を上記と同様の方法(イオン排除HPLC)で測定した。1実験区当たり3反復で行った。

第二のスクリーニングとして、市販試験用飼料(SDS No.3, フィードワン)を給与している育成期仔ブタの盲腸内容物を用いてインビトロ培養試験を実施した。被験体は、第一スクリーニングで良好な大腸発酵を起こしていると判断した茶粉末、そら豆皮、ビートパルプおよび菜種ミールを用いた。方法は上記第一スクリーニングと同様とした。

(3) 大腸発酵を促進すると考えられる被検体のインビボ給与試験

上記インビトロ試験での検討の結果、育成

期仔ブタ大腸内で、十分に発酵を受けると考えられたビートパルプおよび菜種ミールを実際に育成期仔豚へ給与して、大腸発酵および増体への変化を検討した。

平均体重約 26 kg の、LWD 系交雑種育成期仔ブタを 3 群に群分けした (n=4)。基礎飼料は SDS No.3 とし、7 日間飽食で飼料および施設馴化を行った。馴化終了後、3 週間の被検体投与期間を開始した。SDS No.3 にビートパルプ粉末または菜種ミールを 5% (w/w) 添加した飼料を作製した。対照群として α 化デンプンを 5% (w/w) 添加した飼料も作製した。各群にそれぞれの飼料を飽食で給与し、3 週間後に全例剖検を行った。試験期間中は週毎に体重および飼料摂取量の測定を行った。

ペントバルビタール (ソムノペンチル、共立) 麻酔下で開腹し、盲腸静脈、回腸静脈、門脈、腹部大動脈、腹部大静脈の順に採血を行った。放血致死後、回腸および盲腸内容物、回腸および盲腸粘膜を採取した。各部位の血液は遠心分離して血清を分取した。

血清中の微量 SCFA 濃度を 3-1. と同様に GC-MS を用いて分析した。腸管粘膜および腸管内容物中の SCFA 濃度を上記と同様にイオン排除 HPLC を用いて分析した。回腸粘膜および盲腸粘膜は一部をホルマリン固定し、常法によるパラフィン包埋、薄切およびヘマトキシリン・エオジン染色後、絨毛高さおよび陰窩深さ等を光学顕微鏡下で計測した。

4. 研究成果

(1) SCFA 単回投与による大腸吸収動態確認試験

SCFA の大腸内での吸収は、個体によって大きく変化した。SCFA の大腸注入前に、血中 SCFA 濃度が高い個体は、盲腸への SCFA 注入後の SCFA 吸収も高く、逆に殆ど血中プロピオン酸及び n 酪酸が認められなかった個体は、盲腸への SCFA 注入後の SCFA 吸収が低く推移した。これらの個体差が、腸内に常

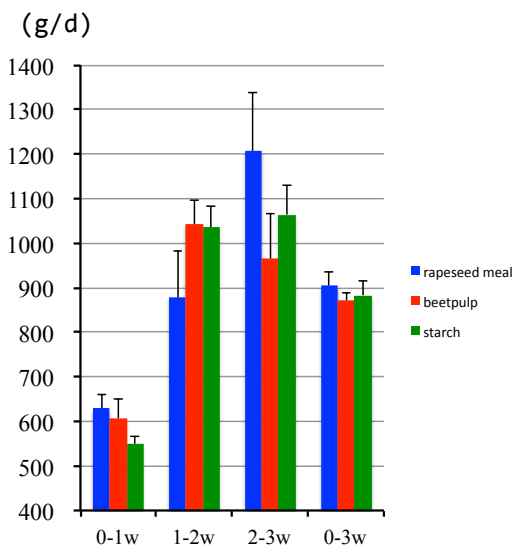


図1 試験期間中の日増体

在する腸内細菌に由来する、もしくは腸の SCFA 受容体もしくはタイトジャンクションに由来する可能性を考え、次世代シーケンサを用いた菌叢メタゲノム解析及び盲腸粘膜中 SCFA 受容体もしくはタイトジャンクション関連 mRNA 発現解析を行った。その結果、血中酢酸 AUC 値と正の相関が認められた細菌群は、内容物内では *Ruminococcus* 属、粘膜内 *Corynebacterium* 属、*Coprococcus* 属であった。血中プロピオン酸 AUC 値と正の相関が認められた細菌群は、内容物内では *Holdemania* 属であった。一方で、負の相関が認められた細菌群は、粘膜内 *Dehalobacterium* 属であった。血中 n 酪酸 AUC 値と正の相関が認められた細菌群は、内容物内では *Ruminococcus* 属、粘膜内では *Prevotella* 属、*Ruminococcus* 属であった。一方で、負の相関が認められた細菌群は、粘膜内では *Dehalobacterium* 属であった。一方で、盲腸粘膜で発現している SCFA 受容体 *GPR41* は、盲腸粘膜中酢酸及びプロピオン酸濃度と負の相関関係にあった。

(2) 成ブタまたは育成期仔ブタの大腸内容物を用いた未利用資源のインビトロ培養試験

第一スクリーニングを行った結果、ブタの大腸内で良好な SCFA 産生を行える可能性が考えられた被験体は、茶粉末、そら豆皮、ビートパルプおよび菜種ミールであったため、インビボで検討予定である育成期仔ブタの盲腸内容物を用いて第二スクリーニングを行った。その結果、培養開始後 24 時間における培養上清中の SCFA 濃度のブランク区との比較では、茶粉末添加で 53%、そら豆皮で 25%、ビートパルプ添加で 184%、菜種ミール添加で 178% の増加となった。この時、各被験体ともコハク酸、乳酸など消化不良生下痢を誘発する有機酸は蓄積していなかった (陽性対照であるデンプンは蓄積していた) ことから、育成期仔ブタで大腸発酵を促進させる資材はビートパルプ及び菜種ミールが

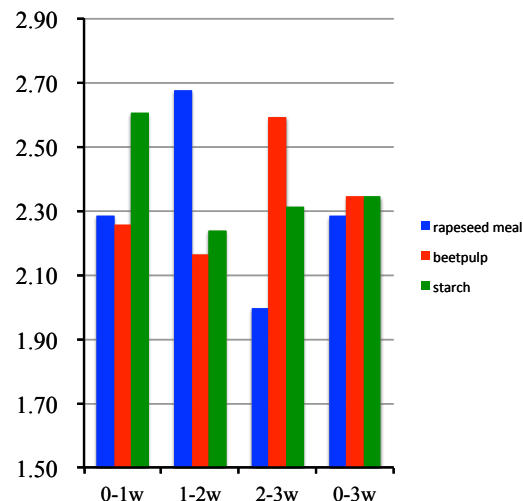


図2 試験期間中の飼料要求率

適当であると考えられた。

(3) 大腸発酵を促進すると考えられる被験体の育成期仔ブタへの給与試験

試験期間中の日増体を図1に、飼料要求率を図2に示した。全試験期間(0-3w)を対象とした日増体は、菜種ミール5%添加(以下R)群が他の2群[ビートパルプ5%添加(以下B)群, α 化デンプン5%添加(以下S)群]よりも、日増体が約30g改善し、飼料要求率も改善する傾向が認められた。盲腸内容物中のSCFA濃度を図3に、粘膜内を図4に、盲腸静脈内を図5に示した。増体が改善したR群では、盲腸内容物中SCFA濃度は低値を示したが、盲腸粘膜中のSCFA濃度はR群で高値を示し、血中濃度も粘膜中SCFA濃度と同様の傾向を示した。回腸内容物中のSCFA濃度を図6に、粘膜内を図7に、回腸静脈中を図8に示した。回腸でも盲腸と同様の傾向が認められ、増体が改善したR群では、回腸内容物中SCFA濃度は低値を示したが、回腸粘膜中のSCFA濃度はR群で高値を示し、血中濃度も高値を示した。

以上のような結果、図9に示すように門脈血中のSCFA濃度も、回腸及び盲腸静脈血と同様の傾向となり、ブタの体内でのSCFAの利用を示す動脈-静脈差でも増体が認められたR群のみ顕著な高値化が認め

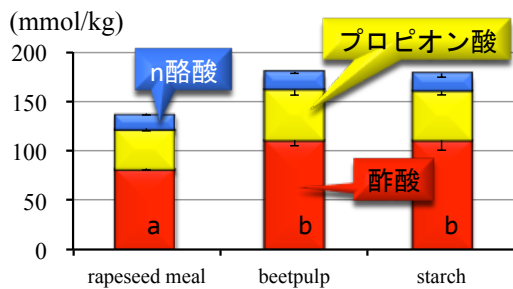


図3 盲腸内容物中のSCFA濃度

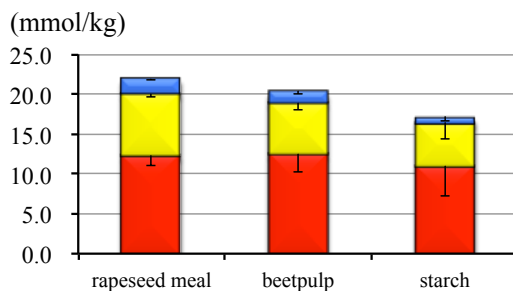


図4 盲腸粘膜中のSCFA濃度

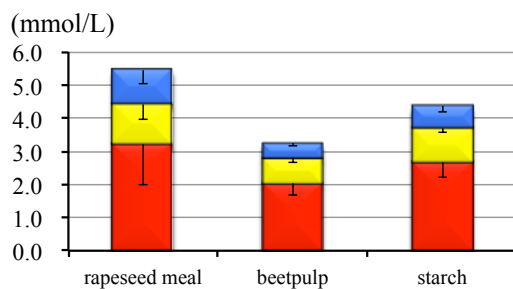


図5 盲腸静脈血中のSCFA濃度

られた。また、増体とSCFAの相関を確認したところ、門脈血中のプロピオン酸及びn-酪酸濃度が増体と正の相関傾向を示した。

病理組織学的に回腸絨毛高さ及び盲腸陰窩深さを測定し、SCFAとの相関を確認し

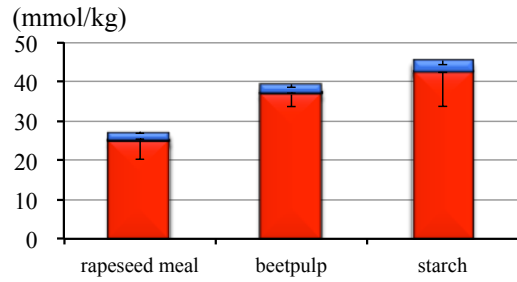


図6 回腸内容物中SCFA濃度

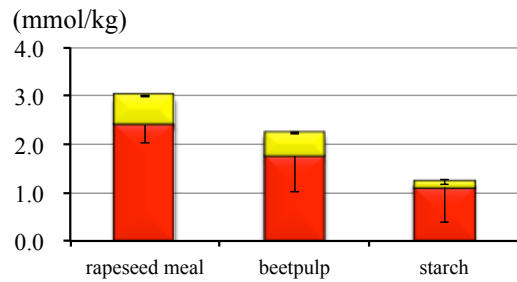


図7 回腸粘膜中SCFA濃度

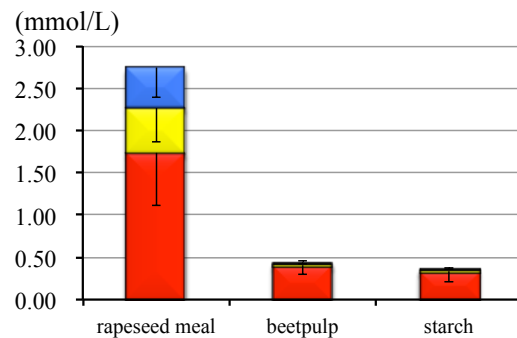


図8 回腸静脈血中SCFA濃度

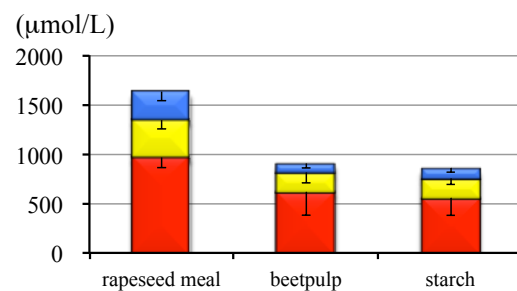


図9 門脈血中SCFA濃度

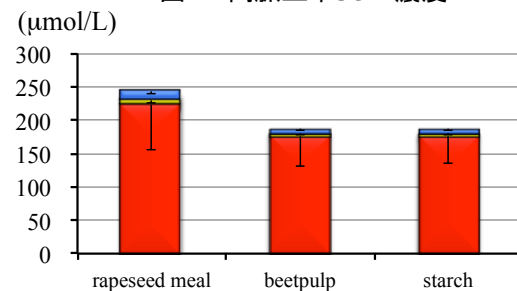


図10 SCFA動脈-静脈差

たところ、盲腸静脈中 n 酪酸濃度と盲腸陰窩深さとは正の相関が、腹部大動脈血中酢酸、プロピオン酸及び n 酪酸が盲腸陰窩深さと負の相関が認められた。また、門脈血中の n 酪酸濃度と回腸絨毛高さとの間に正の相関が認められた。

(4) 総括

ブタの大腸発酵を促進させる、我が国で未利用な飼料原料を探索し、飼料転用を目指す研究を行った。手に入れやすさや未利用率などから 7 種類の被験体を選択し、盲腸内容物を用いたバッチ培養系を用いてブタ大腸での発酵能を推定したところ、育成期仔ブタの大腸発酵をとくに促すと考えられた被験体は菜種ミールとビートパルプであった。これらの飼料原料を育成期仔ブタへ給与したところ、菜種ミールを飼料中へ 5% 添加した群は、対照群よりも日増体及び飼料要求率が改善された。この時、菜種ミール給与で血中 SCFA 濃度が顕著に高値を示しており、生体に利用された SCFA も高値化した。また、門脈血中プロピオン酸濃度および n 酪酸濃度が増体と正の相関傾向を示したことから、育成期仔ブタに大腸発酵を促進させる飼料原料を多給すると、むしろ増体が改善される可能性が示唆された。

SCFA の吸収は、少なくとも短期的には個体差があると考えられ、吸収能は SCFA 受容体が関与している可能性も示唆された。また、盲腸内の一部の腸内細菌と SCFA 吸収能にも相関が認められたため、腸内細菌も SCFA 吸収に関与している可能性が示唆されたことから、ブタへの大腸発酵を促進させる飼料原料給与時は、長期的に給与を行うべきであり、また保有する腸内細菌によって SCFA を生体エネルギーとして利用できる率が異なることも考えられた。

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① 塚原隆充, 井上亮, 川瀬貴博, 原田祐里, 友永省三, 八神和輝, 福田菊人, 田島清, 牛田一成, 坂田隆 (2016 年 3 月 29 日) 大腸発酵をメルクマールとしたブタ飼料原料の選定と, in vivo での多給時大腸発酵の特徴, 日本畜産学会第 121 回大会: 東京
- ② 川瀬貴博, 林裕美子, 原田祐里, 井上亮, 塚原隆充 (2015 年 10 月 24 日) バッチ培養系を用いたブタ大腸発酵による副産物からのアミノ酸生産の推定, 日本アミノ酸学会第 9 回学術大会: 滋賀

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 塚原隆充 (2016) 「病態栄養」という考え方-栄養と疾病との関係について-, In: 養

豚家のための飼料入門, pp71-74, 緑書房, 東京

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

とくになし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塚原隆充 (TSUKAHARA Takamitsu)

京都府立大学・生命環境科学研究科・研究員

研究者番号: 90562091

(2) 研究分担者

井上亮 (INOUE Ryo)

京都府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号: 70443926

(3) 連携研究者

坂田 隆 (SAKATA Takashi)

石巻専修大学・理工学部・教授

研究者番号: 00215633

田島 清 (TAJIMA Kiyoshi)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・家畜生理栄養研究領域・主任研究員

研究者番号: 80343953

友永 省三 (TOMONAGA Shozo)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号: 00552324