

メカブを利活用した阿波とん豚の繁殖性向上技術の開発

飯塚 悟・武田 真城・平田 真樹¹・板東 成治

要 約

繁殖母豚にストレス負荷がかかると、コルチゾール等のストレス応答ホルモンが分泌されることで、生殖機能や免疫機能が抑制され、繁殖成績に悪影響を及ぼすと考えられている。脳と腸には相互に作用する関係性があり、整腸効果のある資材を豚に給与することで、腸内環境が良好に保たれ、ストレスへの抵抗性が高まることが期待される。そこで、県特産品であるワカメの中でも、特に多糖類を多く含み、整腸作用や免疫賦活作用を有するメカブの乾燥粉末を分娩予定日 30 日前の妊娠後期の阿波とん豚母豚に 1 日あたり 25g 給与し、母豚の繁殖成績、ストレス応答ホルモン濃度および腸内細菌叢に及ぼす影響を調査した。また、腸内細菌叢については、授乳中の子豚への影響も併せて調査した。メカブを給与した母豚は、繁殖成績においては対照区と差は認められなかったが、試験開始から 25 日後までのストレス応答ホルモン（被毛中コルチゾール濃度）の上昇が対照区より低い結果 ($p < 0.01$) となった。また、腸内細菌叢においては、繁殖成績との関連性が報告されている *Fibrobacter* 属の占有率が対照区よりも高い結果となった ($p < 0.05$)。一方、授乳中の子豚の腸内細菌叢は、多数の菌で群間差が認められた。以上の結果から、阿波とん豚母豚へのメカブ給与は、妊娠後期の母豚のストレスを低減させるとともに、繁殖成績への正の効果が期待される腸内細菌の増加をもたらす可能性が示唆された。

目 的

集約化が進む養豚現場では、作業の効率化が図られ、少ない人員で管理できる頭数が増えた一方、繁殖管理を効率的に行うため、繁殖母豚は行動を著しく制限された環境で飼養されることが多く、そのような環境で飼養される豚は、正常な行動欲求が満たされないことからストレスを感じ、柵かじりなどの常同行動の発現が認められる。

ストレス負荷がかかると、視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 軸を介して、コルチゾール等のストレスホルモンの分泌が促され、生殖機能や免疫機能が抑制されることから、母豚の繁殖成績の低下につながると考えられている。

一方、脳と腸には、脳腸相関と呼ばれる相互に作用する関係性があり、近年、ヒトの分野においては、整腸効果をもたらす食品を摂取することで、腸内環境が良好に保たれ、ストレスへの抵抗性が高まることが報告¹⁾されており、豚においても、異常行動と腸内細菌叢の関係性²⁾³⁾が報告されている。そのため、有用菌を増やす等により豚の腸内環境を改善し、良好に保つことは、豚のストレスの低減に有効な手段となる可能性がある。

本県では、これまでに、整腸作用⁴⁾や免疫賦活作用⁵⁾を有するフコイダンなどの多糖類が豊富に含まれているメカブ（徳島県産）の未利用部位に

¹ 徳島大学バイオイノベーション研究所 地域生物系部門

ついて、豚用飼料としての活用性を検討し、離乳豚にメカブを給与した試験で、腸内細菌叢において、生体のエネルギー源となる酢酸や酪酸等の短鎖脂肪酸を生成する有用菌の割合が増える可能性が示唆された⁶⁾⁷⁾。

そこで、本研究では、腸内環境の改善、適正化による母豚のストレス低減や繁殖成績の向上を目的として、本県ブランド豚である阿波とん豚の母豚にメカブの未利用部を給与し、母豚の繁殖成績、ストレス値および腸内細菌叢に及ぼす影響を調査した。また、子豚の腸内細菌叢の形成には、授乳期間中の母豚からの影響を受けることが報告⁸⁾されており、授乳中の子豚の腸内細菌叢に及ぼす影響についても併せて調査した。

材料および方法

1) 試験期間

試験期間：令和6年9月4日～令和6年11月22日

2) 供試豚、試験区分、給与飼料

妊娠後期の阿波とん豚の繁殖母豚8頭（各区4頭）を分娩予定日30日前から50日間試験に供した。

供試豚はストールでの単飼とし、分娩予定日1週間前までは妊娠ストールで、1週間前から試験終了まで分娩ストールで飼養した。メカブ給与区は、毎朝、給餌の際にメカブ乾燥粉末を25gトップドレス方式により給与した。メカブ乾燥粉末は、養殖ワカメ（徳島県鳴門産）から採取したメカブを天日干し後、高速粉砕機にて粉末化したものを給与した。

3) 調査項目

(1) 繁殖成績

繁殖成績は、生存産子数、死産数、離乳頭数、

死産率および育成率を評価した。

(2) ストレス指標（被毛中コルチゾール濃度）

ストレス指標として、被毛中のコルチゾール濃度を測定した。被毛は、試験開始時に供試豚の背中中の毛をバリカンで剃毛し採取した。また、開始25日後および50日後に、再び同部位を剃毛し、伸長した被毛を採取した。採取した被毛は、鋏を用いて5mm以下の長さに細断し、60mgを5mlチューブに入れ、イソプロパノールを2.5ml加えた後、ボルテックスミキサーを用いて、2分間振動攪拌した。その後、上清を捨て、再度、イソプロパノールを2.5ml加え、2分間振動攪拌後、上清を捨ててドラフト中で1日乾燥させた。乾燥後、30mgをセラミックビーズ入りの2mlチューブに入れ、細胞粉砕機を用いて粉砕し、メタノールを1.5ml加え、振動攪拌後、チューブローテーターで48時間、室温で回転抽出した。その後、10,000rpmで2分間遠心し、上清0.6mlを2mlチューブに移し、ドラフト内で2日間静置することで、蒸発乾固させ、ELISA Kit (Cortisol Enzyme Immunoassay Kit, DetectX; ARBOR ASSAYS) 付属の Assay buffer を150 μ l加えて溶解した。コルチゾール濃度はELISA Kitのプロトコールに沿って測定した。

(3) 腸内細菌叢（16S rRNA 遺伝子配列解析）

直腸便を母豚は試験開始時、開始25日後および50日後の計3回、子豚は1週齢と3週齢の計2回採取し、調整した保存液（4M guanidine thiocyanate, 100 mM Tris-HCl [pH 9.0], 40mM EDTA）0.9mLを入れたスクリーキャップチューブに採便管のさじを用いて約0.1g入れ、冷蔵で保管した。糞便サンプルよりビーズ破砕法によりDNAを抽出し、DNA精製キット（High PCR Template Preparation Kit; Roche）を用いてDNA

を精製した。16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域は、バーコード付きプライマーを用い、KOD One PCR Master Mix (TOYOBO) を使用して PCR により増幅した。得られた PCR 産物は、FastGen Gel/PCR エクストラクションキット (日本ジェネティクス) を用いてゲル抽出により精製した。DNA 濃度測定キット (Qubit™ dsDNA BR Assay Kit; Thermo Fisher) を用いて精製した PCR 産物の濃度を測定し、各サンプルを 20 ng ずつ等量混合した。次世代シーケンスはアゼンタ (株) に依頼し Illumina 社のシーケンシングプラットフォームを用いて 2 × 300 bp のペアエンモードにて 16S rRNA の塩基配列情報を取得した。得られた配列情報について Qiime 2⁹⁾ による解析後、MaAsLin2¹⁰⁾ 解析または LEfSe 解析¹¹⁾ により群間比較を行った。

(4) 統計解析

繁殖成績および被毛中のコルチゾール濃度については、Student の T 検定により統計解析を行い、P<0.05 を有意差ありとした。

16S rRNA 遺伝子配列解析については、Mann-Whitney の U 検定を用いて統計解析を行い、P<0.05 を有意差ありとした。

結果および考察

1) 繁殖成績

繁殖成績 (生存産子数, 死産数, 離乳頭数, 死産率および育成率) は、メカブ給与区と対照区の間、有意な差は認められなかった (表 1)。

表 1 繁殖成績

区分	生存産子数 (頭)	死産数 (頭)	離乳頭数 (頭)	死産率 (%)	育成率 (%)
対照区	9.3 ± 0.4	1.3 ± 1.6	8.3 ± 1.3	10.2 ± 12.6	89.2 ± 13.6
メカブ区	9.5 ± 1.1	1.5 ± 0.9	8.0 ± 1.0	13.1 ± 5.8	85.3 ± 13.3

2) ストレス指標 (被毛中コルチゾール濃度)

被毛中コルチゾール濃度 (pg/mg) は、両区とも試験開始 25 日後, 50 日後に増加していく傾向がみられた (図 1)。試験開始後から 25 日後まで, 試験開始 25 日後から 50 日後までの各期間のコルチゾール濃度の増加量は, 試験開始後から 25 日後までにおいて, メカブ給与区は対照区よりも有意に低い結果 (p<0.01) となった (図 2)。

血液および唾液中のコルチゾール濃度は, 急性のストレスを反映する一方, 被毛中コルチゾールは, 被毛が成長する期間のコルチゾールが反映されることから, 中長期的なストレス指標としての利用が検証されている¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。分娩直前の時期は, 妊娠ストールから分娩ストールへの移動といった環境変化に伴うストレス負荷がかかる時期に当たるが, メカブ給与区では, 分娩前のコルチゾール濃度の上昇が抑えられており, 繁殖母豚へのメカブ乾燥粉末 (25g/日) の給与が, ストレス低減に良い影響をもたらす可能性が示唆された。

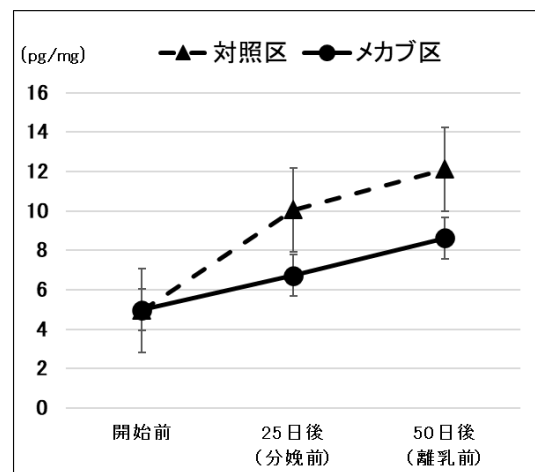


図 1 被毛中コルチゾール濃度 (pg/mg)

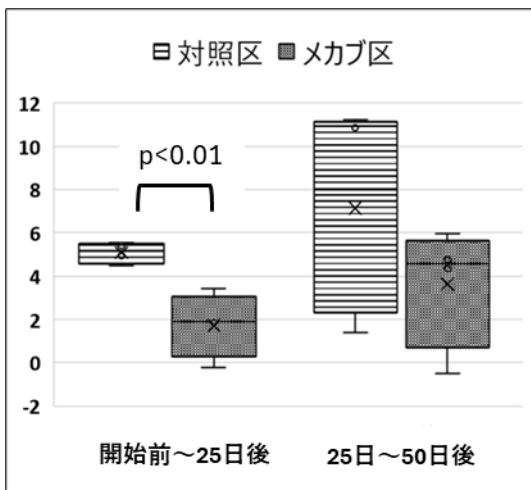


図2 被毛中コルチゾール増加量 (pg/mg)

4) 腸内細菌叢 (16S rRNA 遺伝子配列解析)

母豚糞便から得た腸内細菌叢の 16S rRNA 遺伝子配列情報を MaAsLin2 解析で群間比較した結果、試験開始前、25 日後、50 日後のメカブ区および対照区間において、メカブ給与区は対照区に比べて、試験開始 25 日後および 50 日後のいずれの時点においてもセルロース分解能を持つ *Fibrobacter* 属菌の占有率が高い結果 ($p < 0.05$) となった (図 3)。このことから、母豚へのメカブ給与は、母豚の腸内細菌叢において *Fibrobacter* 属菌が占める割合を高める可能性が示唆された。農場の年間離乳頭数と腸内細菌叢との関連性を調べた研究¹⁵⁾において、年間離乳頭数の多い農場では、*Fibrobacter* 属菌が占める割合が高くなっていたことが報告されており、母豚へのメカブ給与は、腸内細菌叢における *Fibrobacter* 属菌の割合が増え、繁殖成績に良い影響をもたらす可能性が示唆された。

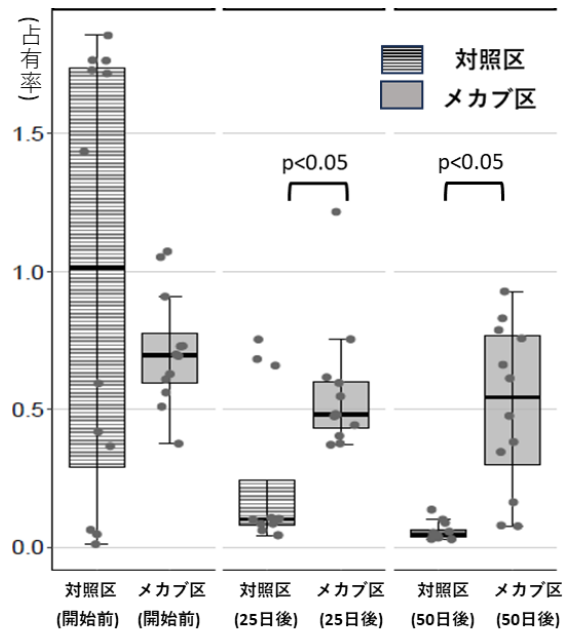


図3 母豚腸内細菌叢における *Fibrobacter* 属菌の占有率 (%)

一方、子豚では、LEfSe 解析において、LDA スコア 3 以上の群間差のあった菌属が 1 週齢と 3 週齢のいずれの時点においても多数検出された (図 4, 5)。授乳中の子豚の腸内細菌叢は、まだ定着しておらず、母豚や周囲環境の影響を受けることが報告されている。今回、環境中の細菌叢の調査を実施していないことから、環境による影響についての評価はできていないが、母豚へのメカブ給与は、授乳中の子豚の腸内細菌叢に変化が生じる可能性が示唆された。

以上の結果から、阿波とん豚母豚へのメカブ給与は、妊娠後期の母豚のストレスの低減や、繁殖成績との関係性が示唆されている *Fibrobacter* 属菌の増加をもたらす、阿波とん豚の繁殖成績向上に寄与する技術となる可能性が示唆された。

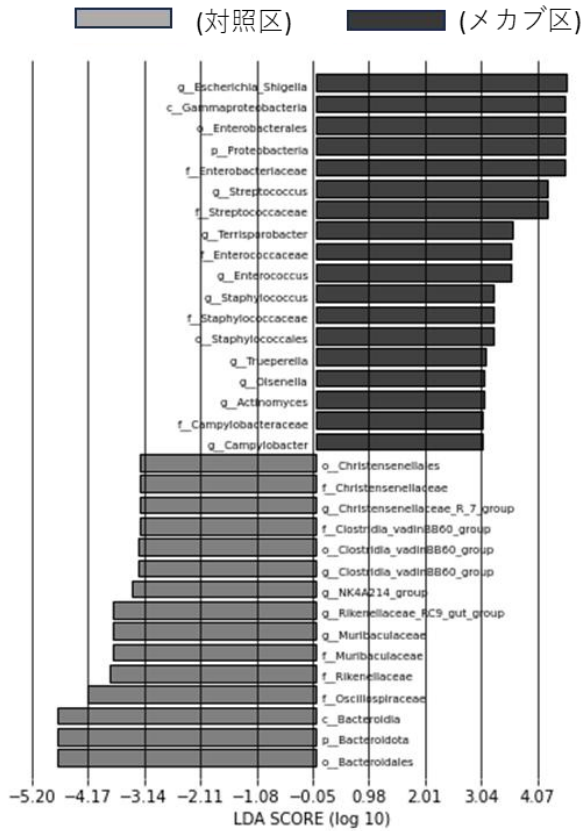


図 4 1 週齢子豚腸内細菌叢の群間比較 (LDA スコア 3 以上)

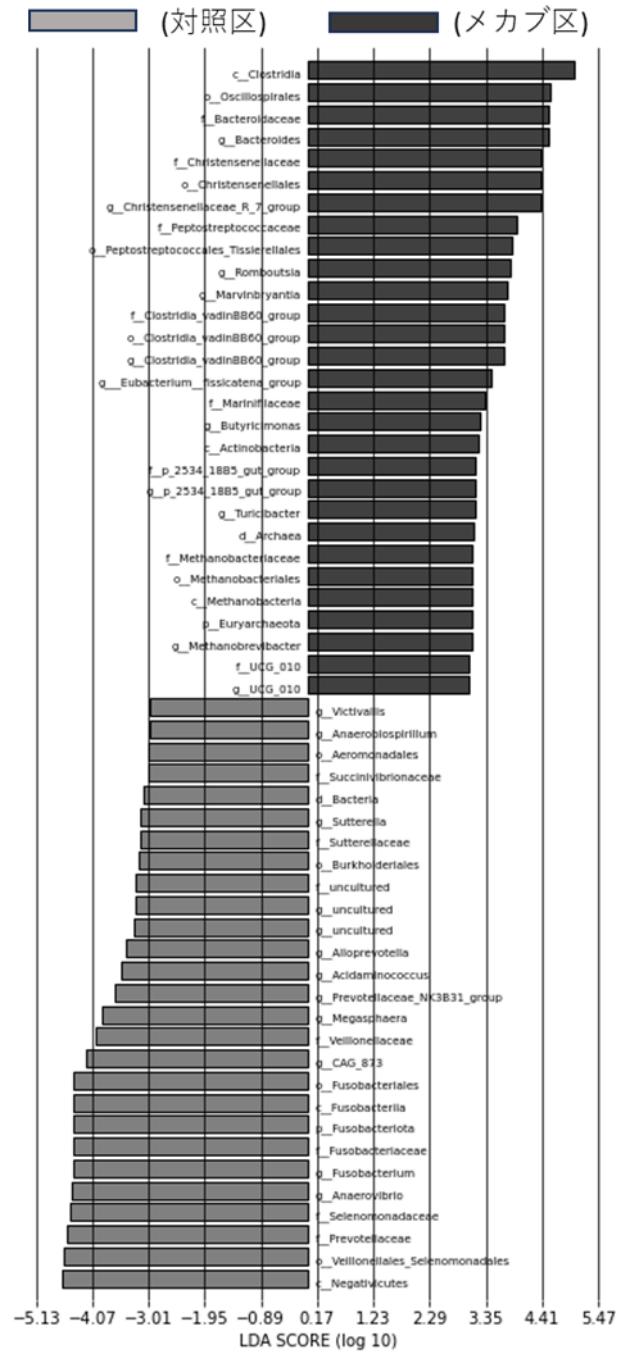


図 5 3 週齢子豚腸内細菌叢の群間比較 (LDA スコア 3 以上)

文 献

- 1) Michaël Messaoudi, Robert Lalonde, Nicolas Violle, Hervé Javelot, Didier Desor, Amine Nejdj, Jean-François Bisson, Catherine Rougeot, Matthieu Pichelin, Murielle Cazaubiel and Jean-Marc Cazaubiel. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *British Journal of Nutrition* (2011), 105, 755-764
- 2) Else Verbeek, Linda Keeling, Rikard Landberg, Jan Erik Lindberg & Johan Dicksved. The gut microbiota and microbial metabolites are associated with tail biting in pigs. *Scientific Reports* (2021) 11:20547
- 3) R. Choudhury, A. Middelkoop, J. E. Bolhuis & M. Kleerebezem. Exploring the association between microbiota and behaviour in suckling piglets. *Scientific Reports* (2022) 12:12322
- 4) 片井 加奈子, 青木 洋輔, 吉岡 瞳, 桜井 ひろみ, 濱田 和男, 小野田 恵美子, 今西 吉松, 青木 康二, 池見 明. メカブ水抽出粉末が施設入居高齢者の便通および腸内環境に及ぼす影響. *日本食生活学会誌* 29 巻 (2018) 3号 157-166
- 5) Kyoko Hayashi, Jung-Bum Lee, Takahisa Nakano, Toshimitsu Hayashi. Anti-influenza A virus characteristics of a fucoïdan from sporophyll of *Undaria pinnatifida* in mice with normal and compromised immunity. *Microbes and Infection* 15 (2013) 302-309
- 6) 福岡まどか・飯塚悟・平田真樹・森松文毅・新居雅宏. (2022). メカブを活用した豚の育成率向上飼育技術の開発 (第1報). *徳島畜研報*. 21:14-19
- 7) 武田真城・八木智子・平田真樹・森松文毅・新居雅宏. (2024). メカブを活用した豚の育成率向上飼育技術の開発 (第2報). *徳島畜研報*. 23:23-28
- 8) Xue Chen, Jumei Xu, Erdou Ren, Yong Su, Weiyun Zhu. Co-occurrence of early gut colonization in neonatal piglets with microbiota in the maternal and surrounding delivery environments. *Anaerobe* Volume 49, February 2018, Pages 30-40
- 9) Bolyen, E., Rideout, J., R., Dillon, M., R., Bokulich, N., A., Abnet, C., C., Alghalith, G., A., Alexander, H., Alm, E., J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J., E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C., J., et al. Reproduce, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME2. *Nat. Biotechnol.* 37:852-857.
- 10) Mallick, H., Rahnavard, A., Melver, L., J., Ma, S., Zhang, Y., Nguyen, L., H., Tickle, T., L., Weingart, G., Ren, B., Schwager, E., H., Chatterjee, S., Thompson, K., N., Wilkinson, J., E., Subramanian, A., Lu, Y., et al. Multivariable association discovery in population scale meta-omics studies.

PLoS Comput. Biol.

- 11) Segata N, Izard J, Waldron L, Gevers D, Miropolsky L, Garrett WS, Huttenhower C. Metagenomic biomarker discovery and explanation. *Genome Biol.* 2011; 12: R60.
- 12) Susen Heimbürge, Ellen Kanitz, Winfried Otten. The use of hair cortisol for the assessment of stress in animals. *General and Comparative Endocrinology* 270 (2019) 10–17
- 13) Susen Heimbürgea, Ellen Kanitza, Armin Tuchschererb, Winfried Ottena. Is it getting in the hair - Cortisol concentrations in native, regrown and segmented hairs of cattle and pigs after repeated ACTH administrations. *General and Comparative Endocrinology* 295 (2020) 113534
- 14) Dierck-Hinrich Wiechers¹, Susanne Brunner, Svetlana Herbrandt, Nicole Kemper and Michaela Fels. Analysis of Hair Cortisol as an Indicator of Chronic Stress in Pigs in Two Different Farrowing Systems. *Front. Vet. Sci.*, 28 January 2021 Sec. Animal Behavior and Welfare Volume 8 - 2021
- 15) Haruka Uryu, Takamitsu Tsukahara, Hiromichi Ishikawa, Munetaka Oi, Satoshi Otake, Itsuro Yamane, Ryo Inoue. Comparison of productivity and fecal microbiotas of sows in commercial farms. *Microorganisms.* 2020 Sep 24 8 : 1469.