

# メカブを利活用した豚の育成率向上飼育技術の開発（第1報）

福岡 まどか・飯塚 悟・平田 真樹<sup>1</sup>・森松 文毅<sup>1</sup>・新居 雅宏

## 要 約

肉豚を生産する上で、子豚期の事故率が高く、その低減が農場の経営安定には欠かせない課題である。そこで、腸内細菌叢の適性化や免疫賦活作用が期待されるメカブを給与し、発育、血液性状、ストレス指標物質、腸内細菌叢および腸内代謝産物に及ぼす影響を調査した。3%メカブ乾燥粉末添加飼料給与により、1日平均増体重は試験区および対照区において同等であったが、試験区は飼料要求率 2.09 に対し、対照区は 1.92 であった。血液生化学検査結果およびストレス指標物質に差は確認されなかった。両区における腸内細菌叢の 16S rRNA 遺伝子配列解析を行った結果、メカブ給与により、試験終了時の腸内細菌叢に差が見られた。メタボローム試験の結果、糞便中の 3 種類のアミノ酸（アラニン、グリシン、スレオニン）は、試験区が対照区よりも有意に低かった。メカブ給与により、腸内細菌叢の構成および糞便中代謝産物に影響があったことが示唆された。

## 目 的

集約化が進む豚の生産現場において、疾病蔓延に伴う経済的損失は大きく、特に免疫機構が未発達な子豚期には、離乳や群編成、多様な環境変化等に起因する疾病の予防が課題となっている。

ヒトでは、栄養成分やその生体防御機能への寄与に関して、腸内細菌の機能が注目されている。腸内細菌は、短鎖脂肪酸、ビタミン類等の生成や海藻等に含まれる難消化性食物繊維から、酢酸、酪酸、プロピオン酸といった揮発性脂肪酸（VFA）の産生<sup>1)2)</sup>、感染防御や免疫賦活化等<sup>3)</sup>に貢献している。

本県特産品であるワカメには、ビタミン、ミネラル、食物繊維等が豊富に含まれ、特にメカブは、腸管内でさまざまな免疫調節機能に有用である多糖類に富んでいる<sup>4)5)6)</sup>。メカブは収穫時期によっては廃棄され、その処理にかかる労力や費用が漁業

者の大きな負担となっている。そこで、腸内細菌叢のバランスが崩れやすく<sup>7)</sup>、免疫機能が未発達な離乳後子豚へメカブを給与し、子豚の腸内細菌叢および代謝物に対する影響と耐ストレス性に及ぼす効果を検証する。併せて、飼料としての利用価値の確認のため、増体および飼料効率を明らかにする。

## 材料および方法

### 1) 試験期間

馴致期間：令和2年9月23日～令和2年9月30日（8日間）

給与期間：令和2年10月1日～令和2年10月28日（28日間）

<sup>1</sup> 徳島大学バイオイノベーション研究所 産業生物系部門

## 2) 供試豚, 試験区分, 給与飼料

供試豚として 41 日齢の大ヨークシャー×ランドレース種 (WL) 1 腹の 16 頭を用い, 2 区 8 頭ずつの群飼・不断給餌とした。試験区分および給与飼料を表 1 に示した。馴致期間中は, 全供試豚に表 1 の指定配合した抗生物質無添加飼料を給与した。

メカブは養殖ワカメ (徳島県美波町由岐沖産) から採取し, 天日干し後 (水分含量 10.95%), 粉砕機 (ボウルカッター; RAMON) にて粉末化し, 抗生物質無添加飼料に 3%混合した。本試験にて粉末化したメカブ粉末の成分分析結果 (一般成分, ミネラル) を表 2 に示した。

表 1 試験区分・給与飼料

区分	給与飼料	頭数	
		去勢	雌
試験区	抗生物質無添加配合飼料にメカブ乾燥粉末3%を混合	4	4
対照区	抗生物質無添加配合飼料	4	4

表 2 メカブ粉末の成分分析結果

(一般成分, ミネラル)

	分析項目	分析値
		100g当たり
一般成分	水分	10.95 g
	灰分	30.48 g
	粗タンパク質	9.70 g
	粗脂肪	3.07 g
	粗繊維	4.95 g
	可溶無窒素物 (NFE)	40.85 g
ミネラル	ナトリウム	2598 mg
	食塩相当量	6.6 g
	カリウム	8872 mg
	カルシウム	828 mg
	マグネシウム	620 mg
	リン	163 mg
	鉄	6.2 mg
	亜鉛	1.3 mg
	銅	0.26 mg
	マンガン	0.38 mg

## 3) 調査項目

### (1) 発育成績

発育成績は, 1 日平均増体重, 総飼料摂取量, 飼料要求率を評価した。1 日平均増体重は, 試験開始時および終了時 (試験開始より 29 日後) の体

重から算出した。総飼料摂取量は, 試験開始時から 28 日間, 各区に給与した総飼料量から床にこぼれた餌量を差し引いて求めた。飼料要求率は, 同期間における各区の総飼料摂取量および総増体重より算出した。

### (2) 血液生化学検査

血液は, 試験開始前および終了時に頸静脈より真空採血管にて採取後, 遠心分離した上清の血漿をサンプルとし, ドライケム (DRI-CHEM 7000V, 富士ドライケム; FUJIFILM) により, 腎機能指標 (尿素窒素; BUN, クレアチニン; Cre) および電解質 (Na, K, Cl) を測定した。

### (3) 唾液中コルチゾール検査

唾液は, 保定した子豚にたこ糸を付けた唾液採材用スワブ (Salimetrics Infant's Swab; Salimetrics) を約 1 分間咀嚼させて採取した。スワブは保存用チューブに移し, サンプルング終了時まで氷上で保存後, 遠心分離したものをサンプルとして $-80^{\circ}\text{C}$ で凍結保管した。コルチゾール値は ELISA Kit (Cortisol Enzyme Immunoassay Kit, DetectX; ARBOR ASSAYS) を用いて測定した。

### (4) 16S rRNA 遺伝子配列解析

糞便は, 保定した子豚の肛門を綿棒で刺激し, 直腸便をシャーレに採取後, 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, 氷上で保管した。糞便サンプルよりビーズ破碎法により 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、TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (タカラバイオ) を使用してPCRにより増幅した。得られた PCR 産物は SPRI select (Beckman Coulter) を用いサイズ選択に基づいて精製した。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。混合液を Illumina のプロトコールに沿って調整後、MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycle; Illumina) にセットし、MiSeq sequencer (Illumina) 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 2<sup>8)</sup> による解析後、群間比較を Huttenhower Lab の LEfSe 解析<sup>9)</sup> プログラムを用いて解析を行った (LDA score 2 以上)。

#### (5) メタボローム解析

調査項目(4)にてシャーレに採取した糞便を 1g 以上計量し、各検体について 2 本ずつ 2mL マイクロチューブに入れ、直ちに液体窒素にて瞬間冷却した後、-80℃で保管し、GC/MS 用試料の調製を行った。サンプルは凍結乾燥して 15mg を秤量し、液体窒素にて凍結後、ボールミルで粉碎し、抽出溶媒 (MeOH:H<sub>2</sub>O:CHCl<sub>3</sub>=5:2:2) 1mL を添加してボルテックスにて混和後、遠心分離を行った。分取した上清 900 μL に MilliQ を滴下し、再びボルテックスミキサーにて混和後、遠心分離を行った。上層の水層および下層のクロロホルム層を採取し、凍結乾燥後、メトキシ化およびトリメチルシリル化を行い、遠心分離後のサンプルを GC/MS 機器 (QP2010 Ultra; SHIMADZU) にかけた。GC/MS の定量条件は表 3 の通り設定し、Agilent Fiehn GC/MS メタボロミクス RTL ライブラリを用いて化合物をアサインした。解析ソフトは Mass Profiler Professional Version 14.9 を使用し

た。

表 3 GC/MS 定量条件

注入量	1 μL
キャリアガス	ヘリウム
注入口へのパージ流量	20 mL/min
インジェクター温度	280℃
接続部位温度	280℃
イオン源温度	250℃
電子イオン衝突エネルギー	-70 eV
スキャン範囲	50-600 m/z
スキャン速度	20 spectra/s

#### (6) 統計解析

1 日平均増体重、血液生化学検査、唾液中コルチゾール検査については、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 遺伝子配列解析およびメタボローム解析については、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) 発育成績

発育成績を表 4 に示した。

1 日平均増体重は試験区および対照区において同等であったが、試験区は飼料要求率 2.09 に対し、対照区は 1.92 であった。

表 4 発育成績

項目	試験区	対照区
1日平均増体重 (kg/日)	0.46±0.06	0.46±0.06
総飼料摂取量 (kg)	214.96	197.52
飼料要求率	2.09	1.92

#### 2) 血液生化学検査

血液生化学検査の結果を表 5 に示した。

食塩の過剰摂取により、家畜はてんかんや麻痺等の神経症状、虚弱、死亡等を示す食塩中毒を引き

起こすことが知られている<sup>10)</sup>。食塩中毒による成豚の致死量は1日100～250g、生後4ヶ月齢の子豚では30gの食塩を6日間毎日与えることにより、起立不能、四肢の不随意運動、呼吸困難等を引き起こし、12日目で死亡したとの報告がある<sup>11)</sup>。メカブはミネラル類が豊富で、食塩も含まれることから、メカブを摂取した子豚体内のNaを含む電解質の変化およびその処理器官である腎臓機能の指標物質をドライケムにより測定した。

試験開始前のBUNは、対照区が試験区より有意に高かった ( $P < 0.05$ )。試験終了時においては、BUN、Creおよび電解質のいずれも両区間で有意差は確認されなかった。なお、本試験で用いたメカブ粉末に含まれる食塩相当量を計算すると、試験区の子豚は、1日約1.9g (飼料中約0.2%)の食塩を対照区よりも多く摂取していたと考察され、その程度であれば、約1ヶ月間給与しても血液性状に差はなかった。

表5 血液生化学検査結果

項目	検査時期	試験区	対照区
BUN (mg/dL)	試験開始前	6.24 ± 1.42 <sup>A</sup>	11.31 ± 1.68 <sup>B</sup>
	試験終了時	8.65 ± 1.56	10.11 ± 2.72
Cre (mg/dL)	試験開始前	0.72 ± 0.07	0.72 ± 0.04
	試験終了時	0.75 ± 0.06	0.77 ± 0.06
Na (mEq/L)	試験開始前	143.38 ± 1.85	145.25 ± 2.96
	試験終了時	148.00 ± 1.60	146.63 ± 1.69
K (mEq/L)	試験開始前	4.75 ± 0.60	4.71 ± 0.50
	試験終了時	5.85 ± 0.79	5.65 ± 0.46
Cl (mEq/L)	試験開始前	101.13 ± 1.64	101.88 ± 1.89
	試験終了時	104.25 ± 1.16	103.25 ± 1.28

同一行の異符号間に有意差あり ( $p < 0.05$ )

### 3) 唾液中コルチゾール検査

唾液中コルチゾール検査の結果を表6に示した。

動物において、ストレスにより腸内細菌叢の構成が変化することが報告されており<sup>12)</sup>、メカブ給与により腸内細菌叢構成が変化し、ストレス耐性に与える影響を調査するために唾液中コルチゾールを測定した。保定器による採血は豚にストレス

を与え、測定値に影響を及ぼす可能性があることや、アニマルウェルフェアの観点からも、非侵襲的な検体採取方法として、唾液を用いる研究が報告されており<sup>13)</sup>、今回は唾液中コルチゾールを測定した。

今回の結果からは、唾液中コルチゾール値は、試験開始前および終了時において、試験区と対照区間で有意差は認められなかった。

表6 唾液中コルチゾール検査結果

検体採取時期	平均濃度 (ng/mL)	
	試験区	対照区
試験開始前	2.80 ± 1.05	3.34 ± 1.90
試験終了時	3.43 ± 0.71	3.54 ± 1.06

### 4) 16S rRNA 遺伝子配列解析結果

糞便中の16S rRNA 遺伝子配列解析結果を表7に示した。

試験終了時の試験区および対照区間において、LEfSe解析 (LDAスコア2以上)を参考に、Mann-WhitneyのU検定を行った結果、複数の菌属で区間に有意な差が見られた。

試験区が対照区より高い菌属に、*Megasphaera*属や*Streptococcus*属がある。*Megasphaera*属は、人獣共通の腸内細菌であり、糖類や乳酸の消費能力が高く、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である<sup>14)</sup>。*Streptococcus*属は、ヒトや豚を含む動物の腸管等の正常細菌叢の構成菌であり、多くは非病原性である。一部には豚に対して病原性を有する菌種も存在する一方、飼料効率および腸内細菌叢の関連性を調べた報告では、高い飼料利用効率を示す豚では*Streptococcus*属がより豊富に存在していることが報告されている<sup>15)</sup>。

対照区で有意に高かった*Corynebacterium*属には、強い病原性を示すジフテリア菌

(*Corynebacterium diphtheriae*), 牛の乳房炎や他の動物に化膿を引き起こす起因菌が含まれる一方, 皮膚, 粘膜, 消化管等の常在菌でもあり, 非病原性の菌種が多い<sup>16)17)</sup>。このため, 増加した *Corynebacterium* 属が対照区において有意に高かったことについて, 菌の特徴を明らかにすることはできなかった。

今回の結果から, メカブ給与により, 腸内細菌叢の構成が変化することが示唆された。今後は菌叢の遷移を経時的に解析し, メカブ給与による腸内細菌叢の構成変化をより詳細に検証する。

#### 5) メタボローム解析結果

糞便中のメタボローム解析結果を表 8 に示した。

糞便中に 272 件の代謝産物が確認され, そのうち CV<20%のものは 6 種あり, その中で 3 種類のアミノ酸 (アラニン, グリシン, スレオニン) において, 試験区が対照区よりも有意に低かった。メカブが, 試験区及び対照区の糞便中代謝産物に何らかの影響を与えた可能性があり, 今後も糞便中代謝産物の調査項目を検討していく。

## 謝 辞

本研究においてメカブを提供いただいた徳島大学大学院社会産業理工学研究部生物資源産業学領域の濱野龍夫教授, バイオイノベーション研究所産業生物系部門の岡直宏准教授, および 16S rRNA 遺伝子配列解析, メタボローム解析を実施いただいたミヤリサン製薬株式会社に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) 原博. 腸内細菌学雑誌 16:35-42, 2002
- 2) Journal of Gastroenterology and Hepatology/ Volume 28, Issue S4 p.9-17
- 3) 田中彩・下野隆一・今大路治之・鈴木基生・桑原知巳. 日本静脈経腸栄養学会雑誌 31(15):1095-1098:2016
- 4) The Journal of Nutrition, Volume 143, Issue 11, November 2013, Pages 1794-1798
- 5) Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2014 Vol.78, No.10, 1743-1747
- 6) 久田孝. 石川農短大報 (Bull. Ishikawa Agr. Coll.) 28: 7-60 (1998)
- 7) 大塚誠・勝沼優・奥村麻梨子・中村豊・湊一. 日本畜産学会報, 72(8):J232-J238, 2001
- 8) Microbiome, 2018 May 17;6(1):90.
- 9) Genome Biol, 2011 Jun 24;12(6):R60.
- 10) 新垣裕子・村田美里・高橋圭二・細野真司・脇雅之. 千葉畜セ研報 14:23~29
- 11) 菊池建機. 日獣会誌 21 327~332 (1968)
- 12) 須藤信行. 腸内細菌学雑誌 19:25-29, 2005
- 13) 宗田吉広. 日本豚病研究会報 74 号, p.34-41 (2019-08)
- 14) 大西章博. 生物工学会誌 第 94 巻, 第 8 号, P500
- 15) Front. Microbiol., 29 January 2019, Volume 10, Article 52
- 16) 山根誠久・仲宗根勇 J-STAGE 2000 年, 15 巻, Supplement 号, p.33-36
- 17) 高橋元秀. 日獣会誌 63 813 ~818 (2010)

表7 16S rRNA 遺伝子配列解析結果\*

Phylum 門	Class 綱	Order 目	Family 科	Genus 属	Abundance (%)				p-value
					treatment		control		
					Mean	SD	Mean	SD	
菌属の存在比率が試験区>対照区の菌属									
p_Firmicutes	c_Bacilli	o_Erysipelotrichales	f_Erysipelatoclostridiaceae	g_Catenibacterium	0.0534	0.0223	0.0168	0.0200	0.0137
p_Firmicutes	c_Bacilli	o_Lactobacillales	f_Streptococcaceae	g_Streptococcus	0.8334	0.6225	0.3765	0.5600	0.0148
p_Firmicutes	c_Clostridia	o_Lachnospirales	f_Lachnospiraceae	g_Anaerostipes	0.2582	0.1454	0.0557	0.0766	0.0068
p_Firmicutes	c_Clostridia	o_Lachnospirales	f_Lachnospiraceae	g_Tyzzeraella	0.0634	0.0506	0.0164	0.0106	0.0145
p_Firmicutes	c_Negativicutes	o_Veillonellales-Selenomonadales	f_Veillonellaceae	g_Dialister	0.8031	0.3693	0.2684	0.3747	0.0281
p_Firmicutes	c_Negativicutes	o_Veillonellales-Selenomonadales	f_Veillonellaceae	g_Megasphaera	4.7257	1.2381	1.9711	1.7496	0.0070
p_Proteobacteria	c_Gammaproteobacteria	o_Enterobacteriales	f_Succinivibrionaceae	g_Anaerobiospirillum	0.0061	0.0015	0.0018	0.0025	0.0068
p_Synergistota	c_Synergistia	o_Synergistales	f_Synergistaceae	g_Cloacibacillus	0.0100	0.0111	0.0006	0.0015	0.0443
p_Synergistota	c_Synergistia	o_Synergistales	f_Synergistaceae	g_Synergistes	0.0067	0.0062	0.0002	0.0006	0.0256
菌属の存在比率が対照区>試験区の菌属									
p_Actinobacteriota	c_Actinobacteria	o_Corynebacteriales	f_Corynebacteriaceae	g_Corynebacterium	0.0013	0.0024	0.0059	0.0045	0.0406
p_Bacteroidota	c_Bacteroidia	o_Bacteroidales	f_Muribaculaceae	g_Muribaculaceae	2.2251	0.5019	3.5611	1.0649	0.0207
p_Bacteroidota	c_Bacteroidia	o_Bacteroidales	f_Rikenellaceae	g_Rikenellaceae_RC9_gut_group	0.7637	0.2612	1.3464	0.5940	0.0379
p_Firmicutes	c_Clostridia	o_Clostridiales	f_Clostridiaceae	g_Clostridium_sensu_stricto_1	7.6816	1.8161	11.3307	3.0374	0.0379
p_Firmicutes	c_Clostridia	o_Clostridiales	f_Clostridiaceae	g_Clostridium_sensu_stricto_6	0.0322	0.0259	0.1605	0.1075	0.0138
p_Firmicutes	c_Clostridia	o_Eubacteriales	f_Anaerofustaceae	g_Anaerofustis	0.0010	0.0018	0.0042	0.0032	0.0264
p_Firmicutes	c_Clostridia	o_Lachnospirales	f_Lachnospiraceae	g_[Eubacterium]_hallii_group	0.1855	0.0477	0.2867	0.0766	0.0207
p_Firmicutes	c_Clostridia	o_Lachnospirales	f_Lachnospiraceae	g_Blautia	0.7633	0.2798	1.2350	0.3481	0.0148
p_Firmicutes	c_Clostridia	o_Lachnospirales	f_Lachnospiraceae	g_Marvinbryantia	0.1193	0.0367	0.2469	0.1001	0.0211
p_Firmicutes	c_Clostridia	o_Oscillospirales	f_Ruminococcaceae	g_[Eubacterium]_siraenum_group	0.1428	0.0606	0.2958	0.0971	0.0148
p_Firmicutes	c_Clostridia	o_Peptostreptococcales-Tissierellales	f_Anaerovoracaceae	g_[Eubacterium]_nodatum_group	0.0071	0.0128	0.0909	0.0512	0.0019
p_Firmicutes	c_Clostridia	o_Peptostreptococcales-Tissierellales	f_Anaerovoracaceae	g_Family_XIII_AD3011_group	0.1803	0.0338	0.2861	0.0844	0.0104
p_Firmicutes	c_Negativicutes	o_Acidaminococcales	f_Acidaminococcaceae	g_Phascalocroctobacterium	2.0828	0.6022	3.1364	0.6117	0.0148
p_Proteobacteria	c_Gammaproteobacteria	o_Burkholderiales	f_T34	g_T34	0.0340	0.0607	0.1662	0.1452	0.0068
p_Verrucomicrobiota	c_Kiritimatiellae	o_WCHB1-41	f_WCHB1-41	g_WCHB1-41	0.1472	0.2213	1.3233	1.1732	0.0078
p_Verrucomicrobiota	c_Lentisphaeria	o_Oligosphaerales	f_Oligosphaeraeae	g_horsej-a03	0.0058	0.0137	0.0838	0.0520	0.0028
p_Verrucomicrobiota	c_Lentisphaeria	o_Oligosphaerales	f_Oligosphaeraeae	g_Z20	0.0006	0.0015	0.0198	0.0091	0.0014

\*LEfSe (LDA score 2 以上) を参考に Mann-Whitney の U 検定を用いた結果で相対存在比に有意差が見られた菌属を示す (P<0.05)

表8 メタボローム解析結果

代謝産物項目	代謝産物検出数 (件)		
	全体	CV<20% *	有意差あり
アミノ酸	98	3	2
糖類	36	0	0
脂肪酸	97	3	1
その他	41	0	0
合計	272	6	3

\* CV<20% : 各群の個体間の数値のばらつきが 20%以下のもの