

原著

子牛の腸内細菌叢に対する生菌剤 (ボバクチン®)の影響

高橋 純^{1)*} 高橋純子²⁾ 田中 愛³⁾ 遠藤 洋²⁾
小形芳美³⁾ 加藤敏英⁴⁾ 松田典子⁵⁾ 田中 守⁵⁾

¹⁾山形県農業共済組合連合会中央家畜診療所最上出張所 ²⁾同 置賜家畜診療所

³⁾同 中央家畜診療所 ⁴⁾同 家畜診療研修所 ⁵⁾ミヤリサン製薬(株)研究部

*連絡担当者：高橋 純

山形県農業共済組合連合会中央家畜診療所最上出張所

(〒996-0001 山形県新庄市五日町276)

Tel(023)684-5531 Fax(023)684-5538 e-mail takahashi_jun@yynosai.or.jp

[要約]

29頭の黒毛和種子牛を用いて、生菌剤が下痢症発生と腸内細菌叢に及ぼす影響について調べた。試験群(n=18)には10日齢より29日齢まで(20日間)生菌剤(ボバクチン®)を1日10g経口投与し、非投与牛(n=11)を対照群とした。供試牛の10日齢および29日齢に血液と糞便を採取し、血液および血液生化学的検査、糞便中IgA濃度、T-RFLP法による腸内細菌叢解析、定量的PCR法による腸内の優勢構成菌群の定量を行った。臨床的には、60日齢までの下痢症発生率を調べた。その結果、血液所見には大きな変化が認められなかったが、T-RFLPのフラグメントパターンには群間に相違がみられ、クラスター解析において試験群が1つのクラスターを構成することが確認された。また、試験群では*Bifidobacterium*が増加し、*Enterobacteriaceae*が減少する傾向にあった。今回の成績では、下痢症発生率は群間に有意差はみられなかったものの、ボバクチン®は子牛の腸内細菌叢の安定化を促すことが示唆された。

Keyword

子牛、生菌剤、下痢症、腸内細菌叢

[緒論]

乳酸菌等の各種生菌剤は腸内細菌叢のバランスを改善する製剤として認識されており、家畜においては主に成長促進や消化機能改善を目的として投与されている。特に、若齢の牛や豚では腸内細菌叢が不安定で下痢を発症しやすいといわれており、生菌剤は予防および治療の目的で投与されることが多く、その効果も報告されている[1,10,11]。このようなことから、近年生菌剤の使用頻度は急速に高まっているが、臨床症状以外の効果について客観的に評価した報告は少ない。そこで今回、牛の第一胃異常発酵改善効果が確認されている生菌剤を子牛に投与し、下痢症発生および腸内細菌叢に対する影響を調査した。

[材料と方法]

1)供試牛：1～60頭の黒毛和種繁殖牛を飼養する農家15戸から無作為に抽出した黒毛和種子牛29頭であり、試験群には生後10日齢より29日齢まで20日間生菌製剤(ボバクチン®)、Bov；(株)共済薬事、東京)を1日10g強制経口投与し(n=18)、非投与牛を対照群とした(n=11)。供試農場のうち9戸は、子牛が母牛と同居し母乳を自由に摂取できる環

境であった。一方、他の6戸は子牛を生後2～30日で母牛から隔離する、いわゆる早期離乳の環境であった。このうち5戸（9頭）は試験群のみに区分された。なお、Bovは2種類のアンモニア耐性乳酸菌（*Lactobacillus plantarum* 220：100g中 1×10^7 - 9×10^8 個含有、*Streptococcus faecium* 26：100g中 1×10^6 - 9×10^7 個含有）、および酪酸菌（*Clostridium butyricum* Miyairi：100g中 1×10^5 - 9×10^6 個含有）を含む生菌製剤である。

2)採材および検査項目：投与開始日（10日齢）および終了日（29日齢）に血液を採取し、血液および血液生化学的検査を行った。検査項目は、赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値（以上、血球自動計算器K-4500, Sysmex）、総タンパク、アルブミン、血液尿素態窒素（BUN）、総コレステロール（T-cho）および免疫グロブリン（IgG）（以上、血液自動分析器AU640, OLYMPUS）とした。同時に直腸便を採取し糞便中IgA濃度をELISA法（試薬：Bovine IgA ELISA Quantitation Kit, BETHYL）にて測定し、製剤が含む酪酸菌（*Clostridium butyricum* MIYAIRI）を検出（*C. butyricum*選択培地にて24時間嫌気培養）するとともに、T-RFLP法（terminal-restriction fragment length polymorphism）による腸内細菌叢の解析ならびに定量的PCR法による腸内の優勢構成菌群の定量を行った。また、投与開始から終了後1ヶ月（およそ60日齢）までの間に、臨床的に治療が必要と診断された下痢症の発生頭数ならびに発生までの日数を調べた。

3)糞便からのDNAの抽出：採取した糞便は-80℃にて保存し、Matsukiら[6]の方法に準じてDNAを抽出した。抽出したDNAは、TEバッファーに溶解し、分析まで-20℃にて保存した。

4)T-RFLP法：Hayashiら[3]およびSakamotoら[9]の方法に準じて行った。5'末端を6-FAMで蛍光標識したユニバーサルプライマー-27Fと未標識の1492Rとを用い、抽出したDNAの16S rRNA遺伝子を増幅した。増幅後、PCR産物を制限酵素（HhaI, MspI）により消化し、ABI PRISM 310 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）にて蛍光標識されたフラグメントサイズを測定した。なお、サイズマーカーには、1200 LIZ（Applied Biosystem）を使用した。検出されたT-RF（蛍光標識された末端DNA断片）は、Microbiota Profiler（infocom）を用いて、菌種の推定を行った。また、T-RFLPのフラグメントパターンに基づき、Ward法にて個体間のクラスター解析を行った。

さらに、いくつかの個体のDNA抽出物について、16S rRNA遺伝子のPCR産物を大腸菌にクローニングし、シーケンス解析を行った。配列データをもとに相同性検索を行い、菌種を推定するとともに、推定された菌種に由来するT-RFを確認した。

5)定量的PCR法：腸内の優勢構成菌群である7グループについて特異的なプライマーを用い、投与終了時における糞便中の菌数を定量した（Table. 1）。検出には、SYBR Green I（Takara）を用い、リアルタイムPCR装置には、Thermal Cycler Dice TP800（Takara）を使用した。

6)統計処理：得られた成績について、群ごとの比較は対応のあるt検定、群間の比較は対応のないt検定、 χ^2 検定またはFisherの直接確率計算法にて行った。

Table 1. 16S rRNA gene-targeted group-specific primers used in this study

Target bacterial group	name	Primer sequence (5' -3')	Ref *
<i>Clostridium coccooides</i> group	g-Coc-F	AAATGACGGTACCTGACTAA	5)
	g-Ccoc-R	CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	
<i>Clostridium leptum</i> subgroup	sg-Clept-F	GCACAAGCAGTGGAGT	7)
	sg-Clept-R3	CTTCCTCCGTTTTGTCAA	
<i>Bacteroides fragilis</i> group	g-Bfra-F	ATAGCCTTTGAAAAGRAAGAT	5)
	g-Bfra-R	CCAGTATCAACTGCAATTTTA	
<i>Bifidobacterium</i>	g-Bifid-F	CTCCTGGAAACGGGTGG	5)
	g-Bifid-R	GGTGTTCTTCCCGATATCTACA	
<i>Atopobium</i> cluster	c-Atopo-F	GGGTTGAGAGACCGACC	7)
	c-Atopo-R	CGGRGCTTCTTCTGCAGG	
<i>Prevotella</i>	g-Prevo-F	CACRGTAACGATGGATGCC	5)
	g-Prevo-R	GGTCGGGTTGCAGACCCATTGACG	
<i>Enterobacteriaceae</i>	Eco1457F	TTACCCGCAGAAGAAGC	8)
	Eco1652R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC	

*)References No.(参考文献番号)

【成績】

- 1)血液および血液生化学的検査成績：試験開始日と終了日の成績をTable.2に示した。2時点での比較で、T-choは両群とも開始日より終了日が高値を示し、試験群では有意差が認められた。また、開始日の測定値は試験群に比べ対照群で有意に高かった。IgG濃度は両群とも開始日より終了日に低値を示し、この時点で試験群は対照群に比べ有意に低かった。2時点の比較では対照群の終了日が開始日に比べ有意に低値を示した。また、試験群では低値を示す個体が多く、2時点とも著しい低値を示す個体も散見された。このほかの項目では、両群の2時点および群間の比較で差はみられなかった。
- 2)糞便中IgA濃度測定および*C. butyricum*分離成績(Table.3)：IgA濃度は両群とも個体によるバラつきが大きく、平均値は開始日に比べ終了日に著しく上昇したが有意なものではなかった。また、*C. butyricum*分離頭数は試験群が8/16(50.0%)、対照群が0頭(0%)で、群間に有意差が認められた。
- 3) T-RFLP法：投与終了時のT-RFLPのフラグメントパターンを比較すると、ほ

ぼ全頭から*Ruminococcus* sp.と推定されるT-RF (Hha I : 183 bp, Msp I : 215 bp) が検出された(Fig. 1)。これより、この菌種は子牛の腸内に共通して存在することが推測された。また、試験群では*Streptococcus* sp.と推定されるT-RF (Hha I : 573 bp, Msp I : 547 bp) および*Bifidobacterium* sp.と推定されるT-RF (Hha I : 368 bp, Msp I : 129 bp) が、対照群に比べ高頻度に検出された(検出率；試験群vs対照群, *Streptococcus* sp. ; 47% vs 0%, *Bifidobacterium* sp. ; 41 % vs 18%)。一方、対照群では、試験群に比べ*Enterobacteriaceae*と推定されるT-RF (Hha I : 368 bp, Msp I : 486 bp) および*Faecalibacterium* sp.と推定されるT-RF (Msp I : 277 bp) の検出頻度が高かった(検出率；試験群vs対照群, *Enterobacteriaceae* ; 47 % vs 64 %, *Faecalibacterium* sp. ; 41% vs 73%)。

T-RFLPパターンに基づきクラスター解析を行った結果、試験開始日、終了日ともに3つのクラスターが形成された(Fig.2,3)。開始日ではχ²検定においてクラスター間と群

間とに関連性は認められなかった。一方終了日では、Bov投与により腸内フローラのパターンが変動し、試験群の個体はクラスターⅡよりクラスターⅢに多く存在していた(P<0.05)。

4)定量的PCR法：7グループについて菌数を定量したところ、両群ともに*Clostridium coccoides* groupが最優勢グループであり、試験群では、*Atopobium cluster*も最優勢グループであった(Table.4)。また、試験群では対照群に比べ*Bifidobacterium*の菌数が有意に増加し、検出率も高かった。一方、*Enterobacteriaceae*は、菌数、検出率ともに試験群で対照群より低い傾向にあったが、有意な差は認められなかった。

5)下痢症発生率ならびに発生までの日数：群間に有意差はなかったが、試験群でやや低い傾向にあった。子牛の飼養形態の違いによる発症率をみると、早期離乳農場の15.4%(2/13)に対し同居農場は56.3%(9/16)と後者が高い傾向にあった。また、試験開始から下痢症発生までの日数は、試験群が対照群に比べ有意に短かった(Table.5)。

Table2. Blood and serum biochemical values of calves before and after administration

	Treated group(n=18)		Control group(n=11)	
	Pre ¹⁾	Post ²⁾	pre	Post
RBC(×104/ μ L)	801±14 ⁶³⁾	804±195	776±142	809±93
WBC(×102/ μ L)	79±28 ^{a)}	88±24	125±56 ^{a)}	94±22
Ht(%)	34.0±7.5	35.6±9.8	31.5±6.8	34.1±4.2
TP(g/dL)	5.2±0.9	5.0±0.7	5.9±0.4	5.8±0.3
Alb(g/dL)	2.7±0.2	2.9±0.4	2.9±0.2	3.4±0.2
BUN(mg/dL)	12.4±5.1	12.5±3.7	11.5±5.3	8.8±2.7
T-cho(mg/dL)	83±29 ^{a,b)}	118±45 ^{b)}	115±27 ^{a)}	132±48
IgG(mg/mL)	13.8±8.4	9.3±3.8 ^{a)}	18.1±6.5 ^{b)}	14.1±2.8 ^{a,b)}

1)10 days after birth, 2)30 days after birth, 3)Mean ± SD.
a)-a):P<0.01, b)-b):P<0.05

Table3. Concentration of IgA and detections of *C.butyrium*¹⁾ from feces

	Treated group(n=18)		Control group(n=11)	
	Pre ²⁾	Post ³⁾	pre	Post
IgA(μ g/g) ⁴⁾	820±346	69,030 ±201,086	1,948± 1,717	205,655 ±339,841
<i>C.butyrium</i> (%)	—	8/16(50.0) ^{a)}	—	0/10(0.0) ^{a)}

1)*Clostridium butyrium* 2)10days after birth 3)30days after birth, 4)Mean ± SD, a)-a):P<0.01

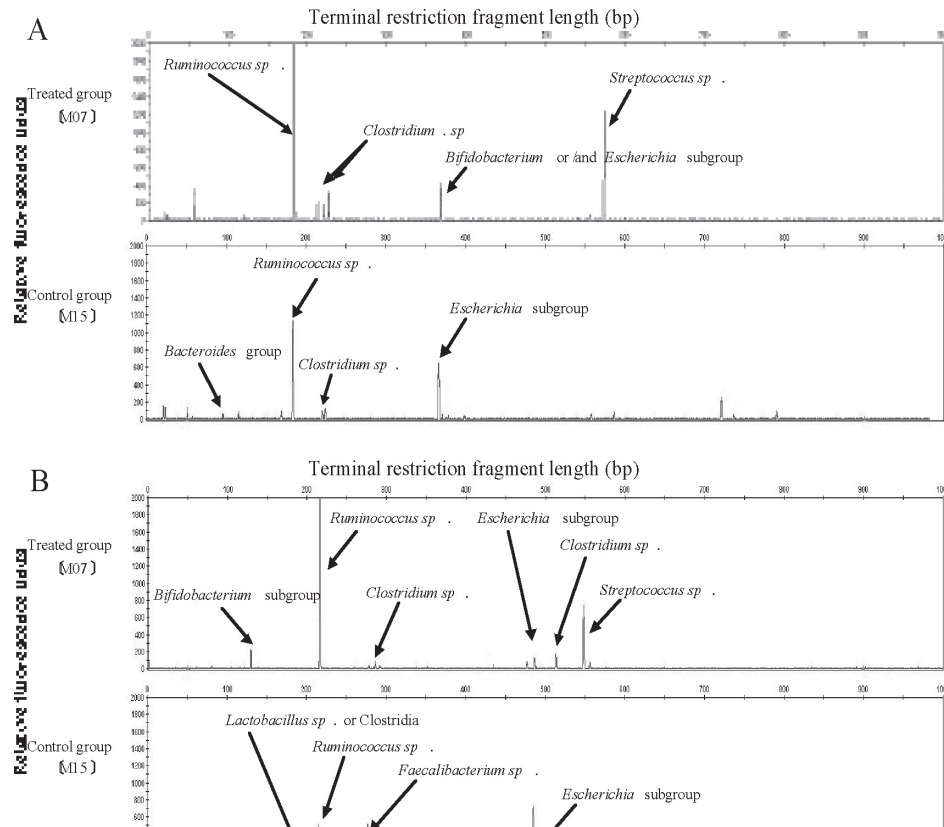


Fig.1. T-RFLP patterns of 16S rRNA genes from calves feces digested with Hha I (A) and Msp I (B) . 16S rRNA genes were amplified with primer 5' 6-FAM labeled 27F and 1492R.

Table 4. Quantification of predominant bacterial group in feces

Target bacterial group	Mean $\pm$ SD (log10 cells/g)		No. positive (%)	
	Treated group (n=17)	Control group (n=11)	Treated group (n=17)	Control group (n=11)
<i>Clostridium coccoides</i> group	9.5 $\pm$ 0.9	9.8 $\pm$ 0.5	100	100
<i>Clostridium leptum</i> subgroup	8.8 $\pm$ 1.1	9.2 $\pm$ 0.5	100	100
<i>Bacteroides fragilis</i> group	9.0 $\pm$ 1.3	9.4 $\pm$ 0.8	88.2	90.9
<i>Prevotella</i>	6.4 $\pm$ 1.1	6.4 $\pm$ 0.7	100	100
<i>Atopobium</i> cluster	9.5 $\pm$ 0.9	9.1 $\pm$ 0.5	100	100
<i>Bifidobacterium</i>	8.6 $\pm$ 0.8 ^{a)}	7.7 $\pm$ 1.1 ^{a)}	88.2	63.6
<i>Enterobacteriaceae</i>	8.4 $\pm$ 0.8	8.8 $\pm$ 1.2	94.1	100

a)-a):P<0.05

Table.5. The incidence of diarrhea and the day of onset diarrhea after initiation

	Treated group (n=18)	Control group (n=11)
The incidence of diarrhea (%)	6/18 (33.3)	5/11 (45.5)
The day of onset	14.5(8~24) ^{a)}	26.4(10~35) ^{a)}

a)-a):P<0.05

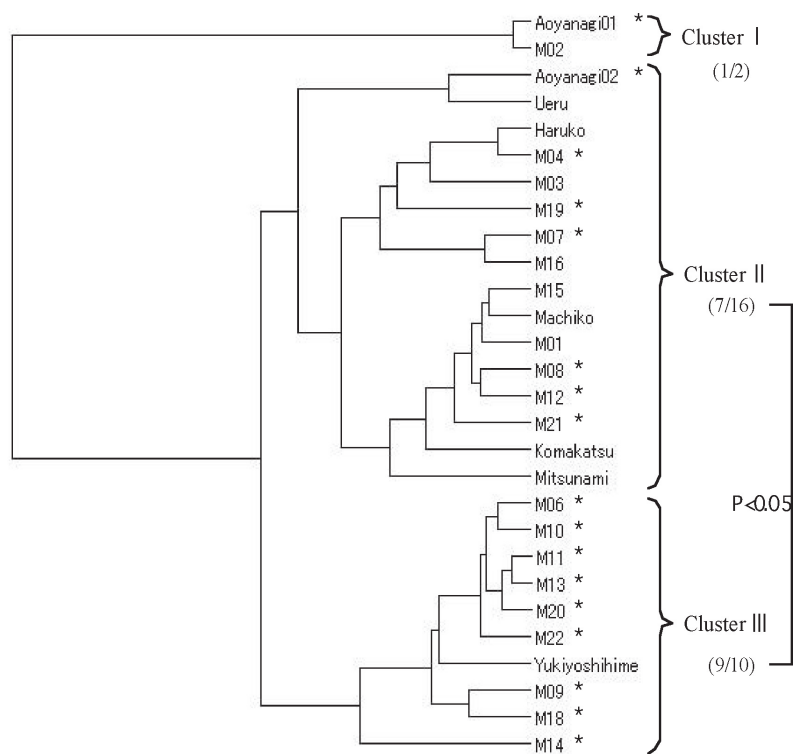


Fig.2. The dendrogram of the T-RFLP profiles of fecal flora in calves before administration. T-RFLP profiles combined Hha I and Msp I digestion were analyzed by Ward' s method. (* : treated group) The detection rates of treated calves in clusters are shown in parentheses (no.of treated calves/no. of total calves).

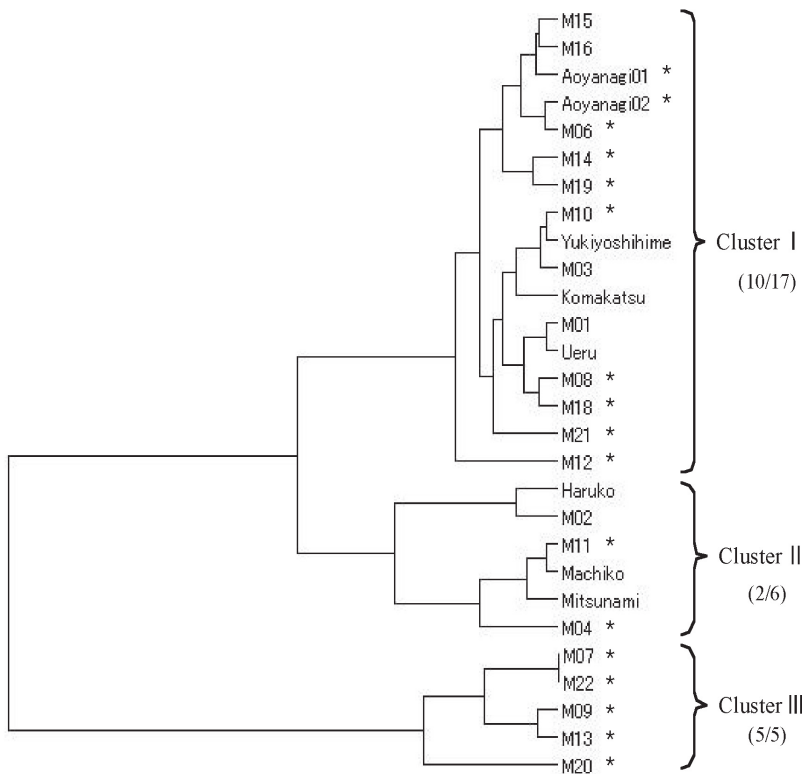


Fig.3. The dendrogram of the T-RFLP profiles of fecal flora in calves after administration.(* : treated group) The detection rate of treated calves in cluster III was higher than those in cluster II .

[考察]

T-RFLP法による解析から、子牛の腸内に共通して存在する菌種として、*Ruminococcus* sp.が推定され、定量的PCR法の結果から、この菌種の属する*C. coccoides* groupは最優勢グループであることが認められた。また、*Bifidobacterium* sp.は、T-RFLP法にて試験群から高頻度に検出され、定量的PCR法においても試験群で有意に増加していた。同様に、T-RFLP法にて対照群から多く検出された *Enterobacteriaceae* は、定量的PCR法においても対照群で増加傾向にあった。このようにT-RFLP法の結果は、定量的PCR法の結果と、ほぼ一致した。

ところで、従来の培養法を用いた報告によると、木村ら[4]は下痢症を呈する子牛では健康子牛に比べ総菌数、*Bacteroidaceae*, *Bifidobacterium* および *Lactobacillus* の菌数がわずかに減少し、*Enterobacteriaceae*が増加することを明らかにしている。本試験の試験群にて下痢症発生が低い傾向にあったことは、*Bifidobacterium*が増加し、*Enterobacteriaceae*がやや減少したことに関係しているのかもしれない。同時に、このような菌の動きはBov投与が幼牛期の不安定な腸内細菌叢を安定化させたためと推察された。牛の腸内細菌についての分子生物学的な検討は、成牛に関するものが多く、子牛についての報告は少ない。辨野[2]は、育成牛の腸内細菌叢を16S rRNA遺伝子のクローンライブラリー法にて解析した結果、*Clostridium leptum* subgroupが最優勢であり、続いて*C. coccoides* group, *Clostridium botulinum* group, *Bacteroidaceae*が優勢グループであることを報告している。一方、本試験の結果では、*C. coccoides* groupおよび*Atopobium* clusterが最優勢グループとして検出された。本試験の結果は、辨野[3]の結果と相違がみ

られたが、これは牛種、日齢および解析法の違い等によるものと考えられた。現在、分子生物学的な腸内細菌叢の解析は、主な対象がヒトであり、牛に関する情報が少ないため、T-RFLP法にて菌種の推定困難なT-RFも多く存在した。また、定量的PCR法についても、*C. botulinum* groupなど牛特有のグループに特異的なプライマーの開発が進めば、より詳細な検討が可能になると考えられる。

今回の成績では、両群の下痢症発生率に有意な差はなく、Bovの予防効果を臨床的に裏付けることはできなかった。なお、下痢症発生が子牛の飼養形態の違いに影響を受けている可能性が高いので、今後は群分けを適切に行うべきである。また、糞便中IgA濃度の値は個体により大きく異なり、糞便性状との関連性は見出せなかった。試験前は、腸内細菌叢の安定化が糞便中IgA濃度を上昇させるのではないかと予測していたが、今回の成績では明らかにできなかった。

今後は、固有の腸内細菌叢が構成される前で、有益菌が定着しやすいと考えられる出生日からのBov投与を試みる予定である。

[参考文献]

1. Abe, F., Ishibashi, N. and Shimamura, S. 1995. Effect of administration of *Bifidobacteria* and Lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.* 78:2838-2846.
2. 辨野義己. 2004.腸内細菌の生態と機能.新ルーメンの世界.微生物生態と代謝制御.534-543.
3. Hayashi, H., Kamagata, Y., Benno, Y. 2002. Fecal microbial diversity in a strict vegetarian as determined by molecular analysis and cultivation. *Microbiol Immunol* 46:819-31.

4. 木村修武, 吉金美和子, 小林照男, 辨野義己, 光岡光足. 1982.家畜の下痢と腸内フローラー乳用雄子ウシを中心に. 腸内フローラシンポジウム2 腸内フローラと生体防御.143-162.
5. Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Miyamoto, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Oyaizu, H. and Tanaka, R. 2002. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. Appl. Environ. Microbiol. 68:5445-5451.
6. Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K. and Tanaka, R. 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primer for analysis of human intestinal bifidobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 70 :167-173.
7. Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T. and Tanaka, R. 2004. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. Appl. Environ. Microbiol.70:7220-7228.
8. 中山二郎, 田中重光, Prapa Songjinda, 立川 敦, 坪内美樹, 清原千香子, 白川太郎, 園元謙二. 2007. 各種分子生物学的手法による乳児腸内細菌叢の解析ー乳児アレルギー発症ハイリスク原因究明の大規模疫学調査にむけてー.腸内細菌学雑誌. 21:129-142.
9. Sakamoto, M., Hayashi, H. and Benno, Y. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis for human fecal microbiota and its application for analysis of complex bifidobacterial communities. Microbiol. Immunol. 47:133-142.
10. 佐藤 博. 2000. 牛への生菌剤の利用とその効果.畜産の研究. 54:659-663.
11. 高橋淳根, 田中清明. 2005. 哺乳期子牛の下痢予防に対するバクト菌投与の効果. 畜産の研究. 59:379-382.

Influence of Probiotics (Bovactin®) for Intestinal Flora of Calves

Jun Takahashi¹⁾, Junko Takahashi²⁾, Ai Tanaka³⁾,
Hiroshi Endo²⁾, Yoshimi Ogata³⁾, Toshihide Kato⁴⁾,
Noriko Matsuda⁵⁾ and Mamoru Tanaka⁵⁾

1)Central-Mogami region Veterinary Clinical Center, 2)Okitama V.C.C,
3) Central V.C.C, 4)Veterinary Clinical Training Center, Yamagata Prefectural
Federation of Agricultural Mutual Aid Association.
5)Miyarisan Pharmaceutical CO.,LTD.

(276,Miyauchi,Itsukamachi,Shinjo-shi,Yamagata,996-0001, Japan)