

原著論文

輸送後の黒毛和種肥育素牛に対する生菌剤投与効果

加藤敏英¹⁾ 野崎敏浩¹⁾ 遠藤 洋¹⁾ 小形芳美¹⁾ 関 千佳²⁾ 田中 守²⁾

1) 山形県農業共済組合連合会 2) ミヤリサン製薬(株)研究部

連絡担当者：加藤敏英

山形県農業共済組合連合会中央家畜診療所

(〒990-2171 山形県山形市大字七浦字北川原 286-1)

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

[要 約]

山形県内に沖縄県から導入された黒毛和種肥育素牛 20 頭を用い、生菌剤が輸送後の免疫能や腸内細菌叢に及ぼす効果について調査した。生菌剤 (ボバクチン[®]) は投与群 (n=10) に対して導入日より 1 日 10 g、30 日間経口投与し、非投与牛を対照群 (n=10) とした。供試牛から、導入時、導入後 30 日目および 60 日目に血液ならびに直腸便を採取し、血液および血液生化学的検査、白血球サブポピュレーション解析、糞便では T-RFLP 法による腸内細菌叢解析および T-RF の主成分分析を実施した。また、両群から無作為に抽出した 6 頭の輸送前と導入後 60 日目の体重を測定し増体重量を比較したほか、60 日間の臨床所見を観察した。その結果、両群ともに血液および血液生化学的検査成績においてほとんど変化はみられず、白血球サブポピュレーション解析においても群間で有意な差は認められなかった。また、増体重量と臨床所見にも差はみられなかった。一方、T-RF 主成分分析では投与群で導入後 30 日および 60 日目の腸内細菌叢が均一化する傾向が確認された。この変動には、腸内細菌叢の優勢グループである *Clostridium coccooides* 属と *Bacteroides* 属が主に関与したことが判明したことから、生菌剤が腸内環境正常化の一因となったことが示唆された。これは、今回用いた生菌剤の第一胃機能改善効果が影響したものと推察された。

キーワード：肥育牛、腸内細菌叢、生菌剤、輸送、T-RFLP 法

[緒 論]

近年、肥育素牛生産地が各地に形成され肥育農場の大型化が急速に進むなか、家畜の移動範囲は著しく広域化している。そのため、トラックなどによる輸送が以前に比べ長距離、長時間となるケースが増えている。輸送は牛にとって大きなストレスとなることが知られており [3, 4]、免疫能低下を招き感染症発症など生産性を低下させることが懸念される。特に、飼料や飲

水などが制限される時間が長いほど、第一胃発酵異常など消化管機能は低下することが予想される。加えて、導入後の飼育環境や給与飼料変更も消化管機能低下を増悪する可能性が高い。したがって、免疫能および消化管機能を維持するためには導入後の適切な飼養管理が求められる。そこで、今回は牛の第一胃機能改善効果が確認されている生菌剤 [10-12] が導入後の管理プログラムのひとつに組み込まれる可能性を探ることを目的として、山形県への移動としては比較的長距離で長時間を要する沖縄県産の肥育素牛に投与し、輸送後の免疫能や腸内細菌叢に及ぼす効果について調査した。

受付：2011 年 7 月 9 日

受理：2011 年 8 月 10 日

[材料と方法]

山形県内の1大型肥育農場(約2,500頭飼養)に沖縄県から導入された臨床的に健康な肥育素牛20頭を用いた。導入時、無作為に投与群(n=10)と無投与対照群(n=10)に分け、投与群には *Lactobacillus plantarum* 220、*Streptococcus faecium* 26 および *Clostridium butyricum* Miyairi を一定量以上含む生菌剤(ポバクチン®; ミヤリサン製薬、東京)を1日あたり10g、30日間経口投与した。調査期間は平成21年10月から12月であり、導入時と導入後30日目および60日目に頸静脈血を採取し、血液(ヘマトクリット値Ht; 血球自動計算器K-4500、Sysmex)および血液生化学検査(総タンパクTP、アルブミンAlb、総コレステロールT-cho、総ケトン体T-KB; 血液自動分析器AU640、OLYMPUS)を行うとともに、北里大学に依頼し末梢白血球サブポピュレーションを解析した。同時に採取した直腸便を用いてT-RFLP法により細菌叢を解析した(60日目のみ投与群9頭、対照群7頭)。採取した糞便は-80℃にて保存し、Matsukiらの[5]方法に準じてビーズ・フェノール法によりDNAを抽出した。抽出したDNAは、TEバッファーに溶解し-20℃で保存した。T-RFLP法による解析は、Hayashiら[2]およびSakamotoら[9]の方法に準じて行った。すなわち、5'末端を6-FAMで蛍光認識したユニバーサルプライマー27Fと未標識の1492Rを用いてDNA抽出物の16SrRNA遺伝子を増幅したあと、PCR産物を制限酵素(*Hha* I、*Msp* I)により消化した。消化されたDNA断片について、それぞれのDNAフラグメント長(T-RF)をABIPRISM310 Genetic Analyzer (Applied

Biosystems)にて測定した。なお、サイズマーカーには1200LIZ (Applied Biosystems)を使用した。以上の検査はミヤリサン製薬(株)中央研究所で実施した。また、各群から無作為に抽出した6頭の輸送前(家畜市場上場時)と導入後60日目の体重から増体量を算出し比較したほか、導入後2ヶ月間臨床所見を観察した。

[成績]

1. 血液および血液生化学的検査

各群の平均値と標準偏差値をTable 1に示した。群間の比較では、30日目のAlbで有意差($P < 0.05$ 、一元配置分散分析法)が認められたほかは差が認められなかった。経時的にみると、両群ともTPはやや低下しT-choは増加する傾向が認められた。T-KBは導入時に比べその後の値は低く、30日目と60日目のバラつきは小さかった。

2. 白血球サブポピュレーション

すべての項目において群間に有意な差は認められなかった(一元配置分散分析法)。各群の平均値と標準偏差値をTable 2に示した。両群において、導入時に比べその後上昇した項目は、 $CD3^+CD45R^-$ (メモリーT細胞)、 $CD8^+$ (キラーT細胞)および $WC1^+N3^+$ ($\gamma\delta$ T細胞)であり、 $CD335^+$ (NK細胞)は30日目に上昇し60日目に低下した。 $CD3^+CD45R^+$ (ナイーブT細胞)は、両群とも導入時に比べ30日目にやや低下し、60日目の値は対照群で上昇し導入時よりも高かったものの、投与群では30日目とほとんど変わらなかった。また $CD4^+$ (ヘルパーT細胞)は、投与群で30日目さらに60日目と上昇したが、対照群では30日目に低下していた。

Table 1 Blood and serum biochemical values of cattle before and after administration

		Ht (%)	TP (g/dl)	Alb. (g/dl)	T-cho (mg/dl)	T-KB (μ mol/L)
Treated (n=10)	Day-0	41.7 \pm 2.0	6.9 \pm 0.3	3.7 \pm 0.2	109.7 \pm 23.6	890.2 \pm 151.4
	Day-30	38.5 \pm 1.4	6.6 \pm 0.3	3.1 \pm 0.2 a)	125.2 \pm 12.3	435.7 \pm 68.2
	Day-60	41.8 \pm 2.9	6.4 \pm 0.3	3.3 \pm 0.2	138.8 \pm 16.8	439.7 \pm 81.8
Control (n=10)	Day-0	42.2 \pm 1.7	7.1 \pm 0.2	3.8 \pm 0.1	119.7 \pm 15.1	967.5 \pm 356.4
	Day-30	40.7 \pm 5.2	7.0 \pm 0.3	3.4 \pm 0.1 a)	131.3 \pm 24.8	351.3 \pm 92.3
	Day-60	40.4 \pm 1.7	6.6 \pm 0.2	3.4 \pm 0.2	136.8 \pm 13.0	410.8 \pm 94.1

Data are presented as mean \pm S.D. a-a): $P < 0.05$

3. 糞便細菌叢

検体に由来する PCR 産物を *Hha* I および *Msp* I によって消化した時の T-RFLP プロファ

イルを Fig. 1 および Fig. 2 に示した。横軸がフラグメントの長さ (T-RF (base pairs))、縦軸が蛍光強度を表す。群ごとに個体の解析結果に

Table 2 Peripheral leukocyte population of cattle before and after administration

		WBC (cells/ μ L)	PBMC	Granulocyte	CD3 ⁺ CD45R ⁻	CD3 ⁺ CD45R ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD335 ⁺	WC1-N3 ⁺
Treated (n=10)	Day-0	9320 \pm 1750	5939 \pm 1623	3378 \pm 727	880 \pm 197	780 \pm 226	604 \pm 260	353 \pm 90	110 \pm 99	400 \pm 168
	Day-30	10270 \pm 2140	5493 \pm 1269	4774 \pm 1357	942 \pm 250	660 \pm 226	652 \pm 207	397 \pm 98	169 \pm 52	432 \pm 143
	Day-60	10250 \pm 1830	6174 \pm 1757	4076 \pm 1721	1088 \pm 267	646 \pm 146	826 \pm 235	465 \pm 296	131 \pm 102	600 \pm 255
Control (n=10)	Day-0	9050 \pm 2100	5496 \pm 1011	3554 \pm 2427	882 \pm 149	806 \pm 296	550 \pm 197	503 \pm 168	60 \pm 33	316 \pm 163
	Day-30	8420 \pm 1120	4394 \pm 1119	4022 \pm 1357	1147 \pm 559	578 \pm 250	494 \pm 195	711 \pm 499	281 \pm 157	512 \pm 203
	Day-60	9670 \pm 2350	5341 \pm 1007	4326 \pm 2310	1428 \pm 355	1027 \pm 374	878 \pm 201	679 \pm 282	152 \pm 85	612 \pm 147

Data are presented as mean \pm S.D. No difference (treated group vs control group)

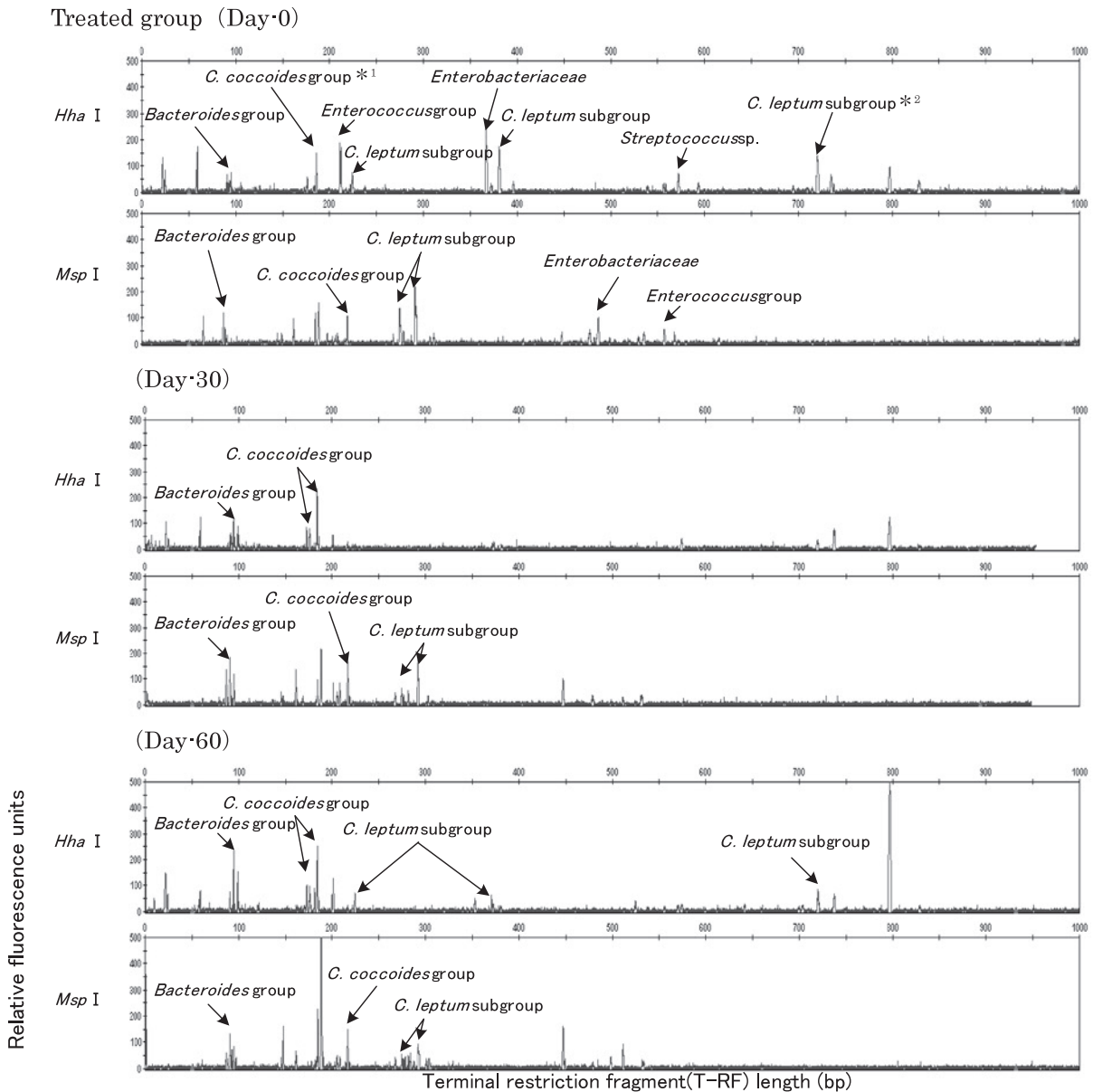


Fig. 1 T-RFLP patterns of 16S rRNA genes from cattle feces digested with *Hha* I and *Msp* I

*1 *C. coccooides*, *Clostridium coccooides*; *2 *C. leptum*, *Clostridium leptum*

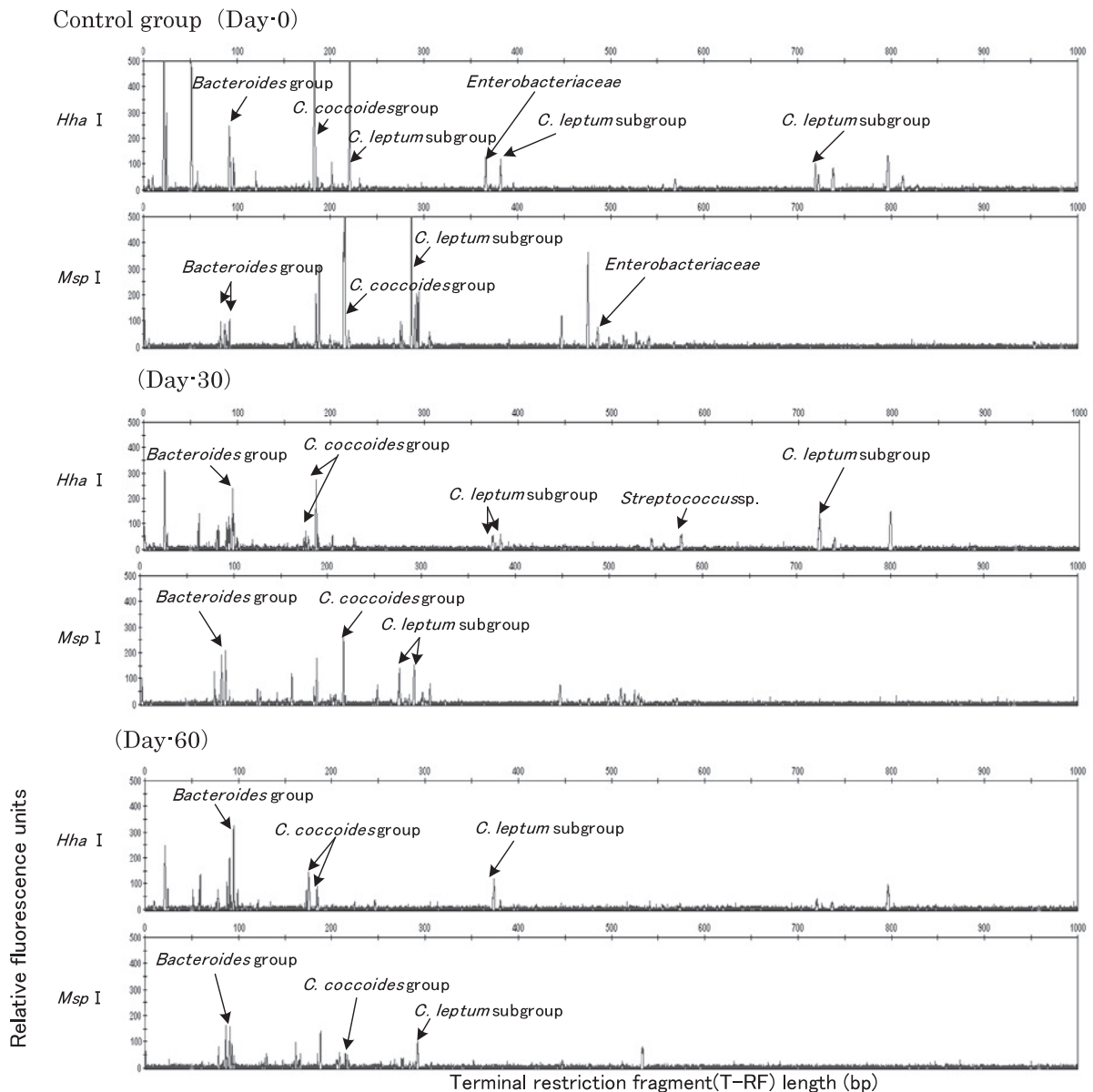


Fig. 2 T-RFLP patterns of 16S rRNA genes from cattle feces digested with *Hha* I and *Msp* I (Cont.)

大きな差がなったことから、図には各群 1 検体の成績を示した。総ピーク面積に対する各 T-RF のピーク面積比と推定される分類群を Table 3 および Table 4 に示した。検出された T-RF に対応する分類群は、解析ソフト (Microbiota Profiler; infocom) および Ozutsumi ら [8] の牛の腸内細菌叢のクローニング解析により得られた菌属・菌群の 16S rDNA 塩基配列から、制限酵素 (*Hha* I および *Msp* I) により切断される予測断片長に基づき推定した。Table 3 の結果より、60 日目において投与群の T-RF: 796-798 のピーク面積比が他の群に比べ、顕著に増加していた。また、Table 4 でも同様に、60 日目において投与群の T-RF: 188-190 のピー

ク面積比が他の群に比べ、顕著に増加していた。さらに、推定された分類群ごとのピーク面積比を Fig. 3 と 4 に示した。なお、分類群を推定できない T-RF については Others とした。*Hha* I で消化した場合には群間に差がみられなかったが、*Msp* I で消化した場合、投与群において 60 日目の Others の割合が対照群に比べ多かった。各検体の *Hha* I および *Msp* I で消化した場合の T-RF の面積比に基づいて、主成分分析を行った結果を Fig. 5 に示した。0 日目では、投与群と対照群に違いはみられなかったが、30 日目では投与群の個体が左側に集まる傾向がみられた。この細菌叢の変動に関与している主要な T-RF は、*Hha* I ; 183-186 (*Clostridium coc-*

Table 3 Predominant terminal-restriction fragments (T-RF) and presumed organisms after digestion with *Hha* I

T-RF size (bp)	Presumed Organisms	Day-0		Day-30		Day-60	
		Treated	Control	Treated	Control	Treated	Control
22-25		9.8	10.3	14.3	10.8	11.4	19.8
51-55		1.1	1.4	0.0	0.0	0.6	0.4
58-59		4.2	7.3	6.6	4.8	1.5	5.7
76-80		2.1	9.2	2.0	4.1	0.0	1.2
84-90		2.5	6.6	2.8	5.8	1.6	5.0
92-97	<i>Bacteroides</i> group	11.4	15.4	16.0	12.6	11.4	16.1
99-100	<i>Bacteroides</i> group	1.0	0.5	5.1	0.4	4.7	2.9
115-119		0.0	0.1	3.0	0.5	1.0	0.0
161-166		0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3
172-176	<i>C. coccoides</i> group	3.4	2.8	10.3	11.1	4.8	8.7
181	<i>C. coccoides</i> group	0.0	0.0	0.2	0.0	0.5	0.0
183-186	<i>C. coccoides</i> group	17.7	8.3	15.3	13.2	10.5	10.6
192-196		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6
199-202		0.0	0.2	2.1	2.8	3.8	1.2
209-211	<i>Enterococcus</i>	1.2	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0
220-225	<i>C. leptum</i> subgroup	2.8	2.1	0.6	0.9	3.5	0.9
238-241		1.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
246-247		0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0
364-368	<i>Enterobacteriaceae/Bifidobacterium</i>	11.9	6.0	0.0	0.0	0.0	0.0
370-375	<i>C. leptum</i> subgroup	0.1	0.0	2.5	2.4	2.2	4.4
380-384	<i>C. leptum</i> subgroup	8.2	3.7	0.0	0.8	0.0	0.2
543	<i>C. leptum</i> subgroup	0.0	0.5	0.0	1.0	0.0	0.0
557-559	<i>C. leptum</i> subgroup	0.5	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
570-574	<i>Streptococcus</i>	2.2	0.4	0.0	1.6	0.0	0.0
592		1.1	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0
653-654		0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
715		0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
719-725	<i>C. leptum</i> subgroup	7.3	12.0	1.0	1.2	4.5	4.1
736-738		2.0	0.7	2.2	0.2	1.2	0.0
796-798		4.3	6.0	14.3	25.7	35.6	15.8
826-830		2.6	3.7	0.0	0.0	0.0	0.0
1018-1023		0.0	0.0	0.6	0.3	1.2	0.0
1035-1038		0.2	1.7	0.0	0.0	0.0	0.0
1042-1046		0.9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

These data showed peak area (%)

coides group)、*Msp* I ; 90-93 (*Bacteroides* group)であった。また、60日目では、投与群の個体が右側に集まる傾向がみられた。この細菌叢の変動に関与している主要な T-RF は、*Hha* I ; 199-202、796-798、*Msp* I ; 446-449であった。

4. 体重の変化

両群の導入時および60日目の体重、増体量を Table 5 に示した。増体量は投与群で 77.0 ± 17.0 kg (平均 ± 標準偏差)、対照群で 61.5 ± 9.9 kg

であり、投与群でやや多い傾向がみられたものの、導入時体重を補正した結果、有意な差は認められなかった (一元配置共分散分析法)。

5. 導入後の臨床所見

両群とも、導入後間もなく呼吸器症状を示したものが5頭ずつ認められた。また、投与群の1頭が導入後2ヵ月に下痢便を排泄した。

[考察]

トラックなどによる輸送は、牛にとって大き

Table 4 Predominant terminal-restriction fragments (T-RF) and presumed organisms after digestion with *Msp* I

T-RF size (bp)	Presumed Organisms	Day-0		Day-30		Day-60	
		Treated	Control	Treated	Control	Treated	Control
61-65		0.6	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0
79-82		0.0	0.2	1.9	4.3	0.0	1.4
84-88	<i>Bacteroides</i> group	7.6	11.1	4.2	8.0	3.6	7.3
90-93	<i>Bacteroides</i> group	11.1	8.5	15.2	12.8	10.9	25.3
95-97	<i>Bacteroides</i> group	0.0	0.0	4.9	0.8	6.0	2.6
113-115		0.3	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0
125-128		1.4	4.1	1.1	3.1	0.0	0.0
129-130	<i>Bifidobacterium</i>	0.0	1.5	0.0	0.3	0.0	1.7
145-150		1.8	0.2	0.6	1.6	4.1	3.0
161-164		3.3	6.0	4.5	8.2	0.5	1.5
183-186		2.9	3.5	4.6	3.6	5.4	2.9
188-190		6.2	7.7	14.4	19.0	42.0	20.9
194-201		0.6	1.9	0.0	0.0	0.0	0.0
203-208	<i>C. coccoides</i> group	3.0	1.9	6.0	4.5	2.9	2.4
214-222	<i>C. coccoides</i> group	16.9	6.0	9.5	6.7	3.2	7.8
250-253		0.6	3.7	1.0	1.2	0.0	0.0
273-279	<i>C. leptum</i> subgroup	7.9	12.3	3.9	4.0	2.6	4.3
282-287	<i>C. leptum</i> subgroup	1.1	2.2	4.0	0.7	1.2	0.6
289-294	<i>C. leptum</i> subgroup	14.1	14.1	14.5	8.1	3.3	9.2
300-303		0.0	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0
305-309		1.4	1.3	0.0	0.6	0.0	0.0
446-449		1.7	2.2	5.4	7.5	11.7	5.7
458-462		0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	2.3
476		6.0	4.5	0.4	0.0	0.0	0.0
482-487	<i>Enterobacteriaceae</i>	6.4	4.3	0.0	0.0	0.0	0.0
498-500		0.4	0.0	0.0	0.7	0.3	0.0
510-514		0.6	0.3	0.5	2.5	1.5	0.0
525-528		0.7	0.2	0.9	1.0	0.0	0.0
532-535		1.5	1.1	1.2	0.6	0.7	1.0
537-540		0.6	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
547-550	<i>Streptococcus</i>	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
556-557	<i>Enterococcus</i>	0.5	0.0	0.5	0.0	0.0	0.0

These data showed peak area (%)

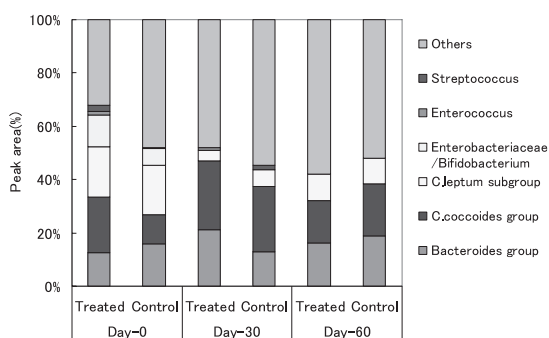


Fig. 3 Peak areas of presumed organisms after digestion with *Hha* I

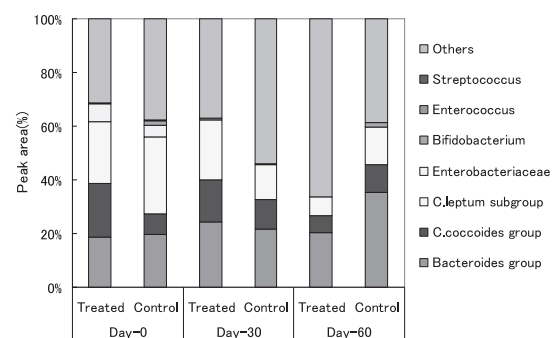


Fig. 4 Peak areas of presumed organisms after digestion with *Msp* I

なストレスとなることが知られている。Ishizakiら [3] は、ホルスタイン種子牛を用いて、4時間（100 km）のトラック輸送が呼吸器局所

の免疫機能に及ぼす影響について調査した。その結果、輸送前と比べ輸送直後および3日後の肺胞マクロファージの化学発光能は減少し、気

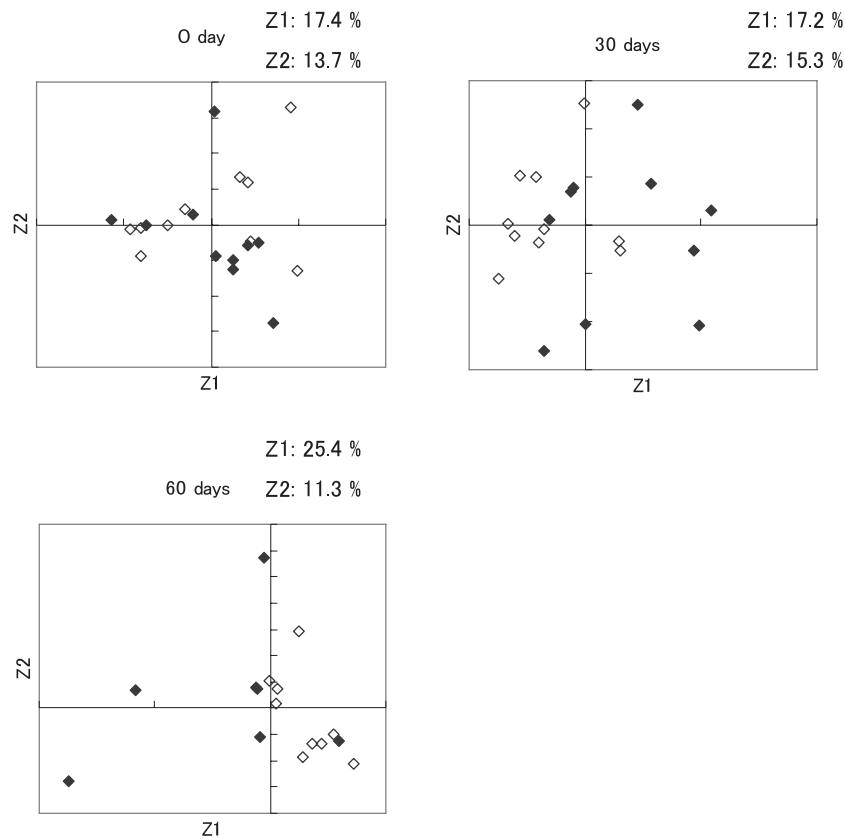


Fig. 5 Principal components analysis based on T-RFLP profiles from *Hha* I and *Msp* I digestion. Z1 and Z2 indicated the percentage variation converted by each group I (◇) and group II (◆).

Table 5 Change in body weight of cattle before and after administration

	Before transportation 1)	After 60 days	Increased volume
Treated (n=6)	274.5±2.9	351.5±15.8	77.0±17.0
Control (n=6)	255.3±7.9	316.8±11.9	61.5±9.9

Data are presented as mean±SD. No difference (treated group vs control group)

1) At Livestock market in Okinawa Prefecture.

管支肺胞洗浄液中リンパ球の CD4⁺/CD8⁺細胞比は増加していたという。また、松田ら [4] が寒冷期のトラック輸送において着衣によって保温した群の免疫能は保温しなかった群に比べ低下の程度が少なかったと報告しているように、各種ストレスは生体の免疫能低下に深く関わっている。今回の末梢血白血球サブpopulation解析結果では、導入前後での比較はできなかったものの、CD3⁺CD45R⁻や CD8⁺、WC1⁻N3⁺などが導入時と比較し 30 日後および 60 日後に増加しており、輸送により導入時には低下していた免疫能が徐々に回復したものと考えられた。しかし、この傾向は生菌剤投与群のみならず非投与群でも同等にみられたことから、投与した生菌剤が免疫能をより高める、あるいは低下を防ぐという効果は確認できな

かった。ただ、Odamaki ら [7] の報告によると、ヒトの花粉症では糞便中に *Bacteroides fragilis* がシーズン終盤に増加するが、*Bifidobacterium longum* BB536 を含むヨーグルトを摂取することで有意に抑制されていた。この *Bacteroides fragilis* group は、*Bifidobacterium* spp. と比べヒト末梢血中のインターロイキン (IL) -6 や Th2 型サイトカインを増やし、IL-12 など Th2 型サイトカインを減らすという [6]。以上のことは、プロバイオティクスは腸内細菌叢を整えることにより結果的に免疫能コントロールの一助となることを示唆している。したがって、今回用いた生菌剤が何らかの形で免疫能に影響した可能性も否定できない。一方、糞便の細菌叢について、T-RFLP 解析により得られた T-RF の主成分分析の結果から、生菌剤を投与するこ

とにより腸内菌叢が変動し、均一な菌叢にまとまっていくことが確認された。この傾向は、導入後30日目（薬剤投与最終日）のみならず、60日目（投与30日後）にも認められた。この変動に関与した主な菌種は *Clostridium coccooides* 属と *Bacteroides* 属であることが判明した。辨野 [1] は、育成牛の腸内細菌叢を 16SrRNA 遺伝子のクローンライブラリー法で解析し、*Clostridium leptum* subgroup が最優勢であり、*C. coccooides* group、*C. botulinum* group および *Bacteroidaceae* が優勢グループであると報告している。したがって、今回の成績は生菌剤が腸管内環境正常化の一因となったことを示唆している。30日目および60日目で関与した菌種は完全には一致していなかったが、均一な菌叢にまとまることは腸内環境の安定化に寄与するものと期待される。また、成績には示さなかったが、異なる菌種を含む他の生菌剤を同様に30日間経口投与した群の60日目の成績では、菌叢の均一化は認められなかった。このことから、今回の成績は投与した生菌剤が第一胃機能改善効果を有していることが影響したものと推察された。すなわち、生菌剤に含まれる有益菌が、輸送ストレスに加え一週間余り不十分な飼料と水で飼養され低下した第一胃機能を改善したことによって、腸内菌叢均一化が促されたものと考えられた。

第一胃および腸内環境の安定化が食欲を増進させ、増体量を増やす効果も期待されたが、投与群の増体量は対照群のそれと比較し有意に高いものではなかった。また、導入後の臨床所見および疾病発生状況にも全く差がなかった。以上の成績より、今回の調査では使用した生菌剤が導入肥育素牛に対して臨床的に有効な飼養管理プログラムのひとつであると結論付けることはできなかった。この要因のひとつとして、生菌剤投与期間が導入後30日間と限定的だったことが考えられたため、今後長期継続投与した場合の効果調べる予定である。また、輸送前からの投与が輸送ストレスを軽減することも考えられることから、これについても計画したい。

[謝 辞]

稿を終えるに当たり、白血球サブピュレーション解析にご協力をいただいた北里大学獣医

学部大動物内科学教室大塚浩通先生に深謝いたします。

[引用文献]

1. 辨野義巳. 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.
2. 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.
3. Ishizaki, H., Hanafusa, Y., Kariya, Y. 2005. Influence of truck-transportation on the function of bronchoalveolar lavage fluid cells in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 105: 67-74.
4. 松田敬一, 大塚浩通. 2011. 黒毛和種牛の冬季トラック輸送に対する保温ジャケットの効果. 日本家畜臨床感染症研究会誌. 6. 1-7
5. Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Kado, Y., Takada, T., Matsumoto, K., Tanaka, R. 2004. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primer for analysis of human intestinal bifidobacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 167-73.
6. Odamaki, T., Xiao, JZ., Iwabuchi, N., Sakamoto, M., Takahashi, N., Kondo, S., Iwatsuki, K., Kokubu, S., Togashi, H., Emoto, T., Benno, Y. 2007. Fluctuation of fecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during pollen season and influence of probiotic intake. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 17: 92-100.
7. Odamaki, T., Xiao, JZ., Iwabuchi, N., Sakamoto, M., Takahashi, N., Kondo, S., Miyaji, K., Iwatsuki, K., Togashi, H., Enomoto, T. and Benno, Y. 2007. Influence of *Bifidobacterium longum* BB536 intake on faecal microbiota in individuals with Japanese cedar pollinosis during the pollen season. *J. Med. Microbiol.* 56: 1301-1308.
8. Ozutsumi Y, Hayashi H, Sakamoto M, Itabashi H, Benno Y. 2005. Culture-independent analysis of fecal microbiota in cattle. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 69: 1793-1797.
9. Sakamoto, M., Hayashi, H., 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: 133-42.

10. 桜井信夫, 下田貫三, 坂田 順, 土井治夫, 染谷昭二, 原 茂, 宮入 保, 北城俊男, 湯沢隆義. 1973. ウシ第一胃内菌叢の正常化および血液成分におよぼす影響. 家畜診療. 125 : 19-32.
10. 菅沢武敏, 小崎哲一, 平田 昇, 堀北哲也, 星 欽彌. 1989. 肥育牛に対する生菌製剤の投与効果. 家畜診療. 308 : 35-39.
11. 安田 準, 戸尾祺明彦, 近藤誠司. 1986. 前胃運動微弱牛に対するアンモニア耐性付与乳酸菌製剤大量投与の及ぼす影響. 家畜診療. 277 : 13-16.

Efficacy of Probiotics for Japanese Black Beef Cattle after Transportation

Toshihide Kato¹⁾, Toshihiro Nozaki¹⁾, Hiroshi Endo¹⁾, Yoshimi Ogata¹⁾,
Chika Seki²⁾ and Mamoru Tanaka²⁾

1) Yamagata Prefectural Federation of Agriculturak Mutual Aid Associations

2) Miyarisan Parmaceutical CO., LTD.

Correspondence to: Toshihide KATO

Yamagata P.F.A.M.A.A (286-1 Kitakawara, Nanaura, Yamagata, 990-2171, Japan)

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

[Summary]

We investigated whether attenuated probiotics improved the immunity and intestinal flora after transportation. Twenty Japanese black beef cattle were evaluated after reaching Yamagata prefecture from Okinawa prefecture (day0). Ten of them were fed 10g of attenuated probiotics (Bovactin[®]) from day0 to day30, while the other half received no treatment and were defined as control group. Blood and feces were taken from all cattle on day0, day30 and day60. Biochemical examination and leukocyte subpopulation analysis were conducted using blood samples. Intestinal flora and basis of T-RF were analyzed by T-RFLP method using feces. Furthermore, six cattle were selected randomly from each group. They were weighed before transportation and on day60 to evaluate somatic growth. Clinical findings were also recorded from day0 to day60. There were no significant differences on biochemical examination, leukocyte subpopulation, somatic growth and clinical findings between groups. On day30 and day60, there was a tendency of intestinal flora to being equalized in treated cattle through basis of T-RF. *Clostridium coccoides* and Bacteroides, the majority of intestinal flora, affected predominantly. Therefore, it is indicated that the attenuated probiotics improved intestinal environment, especially the capability of rumen.

Keywords: beef cattle, intestinal flora, probiotics, transportation, T-RFLP method,