

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 笹崎 直哉

題 目 : A Study on Efficacy of Novel Dietary Feed Supplementations Presented  
to Japanese Black Cattle  
(黒毛和種牛における新規飼料添加物の有効性に関する研究)

## 論文要旨 :

The objective of the first series of experiment was to investigate the effect of heat-killed *Lactobacillus sakei* HS-1 (HK-LS HS-1) on the health and fecal bacteriological change of suckling Japanese Black calves as a supplement in milk replacers. Twelve calves were separated from dams to calf-hatch after calving for milk replacers feeding. They were randomly assigned to an HK-LS HS-1 supplement or a control without HK-LS HS-1 group in milk replacers. HK-LS HS-1 was administered from separation day to 3 weeks. Blood and fecal samples were examined. Two calves with a haptoglobin concentration of  $>500 \mu\text{g/ml}$  on day 0 were excluded from the experiment, and 10 calves were finally included. Glucose and vitamin A levels on day 7 were significantly higher ( $P<0.05$ ) in the supplement group than in the control group. No significant differences were observed in haptoglobin or serum amyloid A between the groups. The number of *Escherichia coli* in feces was lower in the control group than in the supplement group on day 21 ( $P=0.06$ ). No difference was observed in the number of bifidobacteria, but that of lactic acid bacteria was significantly higher ( $P<0.05$ ) in the supplement group on day 21. The number of medications administered was significantly lower ( $P<0.05$ ) in the supplement group ( $5.2\pm 3.9$ ) than in the control group ( $10.6\pm 5.9$ ) during the experimental period. The results indicated that HK-LS HS-1 is potentially beneficial for improving intestinal microbes and reducing the number of medical treatments.

In the second experimental series, we evaluated the effects of supplementing cattle feed with difructose anhydride III (DFA III) by measuring urinary sterigmatocystin (STC) concentrations, using 20 Japanese Black cattle aged 9-10 months from one herd. DFA III was supplemented for 2 weeks to 10 animals and non-treated animals served as controls. The natural STC concentration in the dietary feed was  $0.06 \text{ mg/kg}$  (mixture of roughage and concentrate) at the beginning of the study (Day 0). The urine STC concentration was measured using liquid chromatography with tandem mass spectrometry one day prior to DFA III administration, 9 and 14 days thereafter, and 9 days following supplementation cessation, concomitant with the measurement of serum amyloid A (SAA). The number of heifers in which STC was detected in the urine was low (10%) in the DFA III group compared to that (60%) in the control group on Day 9. Nine days following supplementation cessation (Day 23), STC concentrations were significantly lower ( $P = 0.032$ ) in the DFA III group than in the control group, although there was no difference in the number of heifers in which urinary STC was detected or in SAA concentrations between the two groups. Our findings are

(別紙様式第 3 号)

demonstrating the effect of DFA III on reducing the urinary concentration of STC in Japanese Black cattle.

In conclusion, the results of these field trials indicate that the two types of feed supplementations, which are expected to improve and restore the intestinal environment of cattle, have been confirmed to be effective in preventing disease outbreaks and reducing mycotoxin intake. Therefore, the feed supplementations were shown to be a useful approach in improving productivity in cattle production.

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

## 学位論文審査の結果の要旨

氏 名	笹崎 直哉
審 査 委 員	主 査： 山口大学 教授 高木 光博
	副 査： 山口大学 教授 日下部 健
	副 査： 山口大学 教授 西垣 一男
	副 査： 鹿児島大学 教授 大和 修
	副 査： 山口大学 准教授 谷口 雅康
題 目	A Study on Efficacy of Novel Dietary Feed Supplementations Presented to Japanese Black Cattle (黒毛和種牛における新規飼料添加物の有効性に関する研究)
<p>審査結果の要旨：</p> <p>乳酸菌は、人間や動物にとって安全で有用な微生物であり、経口摂取した場合の効果として腸内細菌叢を改善するだけでなく、免疫系を活性化することが知られている。子豚とブロイラーにおける最近の研究成果では、乳酸菌の生菌のみならず、乳酸菌死菌体制剤 (heat-killed <i>Lactobacillus sakei</i> HS-1; HK-LS HS-1) の飼料添加による健康状態、発育率改善効果が報告されている。黒毛和種 (JB) 牛は日本で最も主要な肉用牛種であるが、JB 子牛は比較的弱く、したがって免疫不全のために、出生後初期に消化器系や呼吸器系疾患に罹患するが多い。第 1 章では、生後早期の JB 子牛の健康状態および糞便中細菌叢に対する代用乳サプリメントとしての HK-LS HS-1 のプロバイオティクス効果を検証することを目的とした。</p> <p>本研究には自然分娩で出生した 12 頭の JB 子牛を用いた。全ての子牛には出生後 2 時間以内に新鮮な初乳を給与した。その後、母乳飼育から子牛ハッチへの代用乳飼育のための母子分離を生後 3~13 日後に行った。子牛は、無作為に代用乳への HK-LS HS-1 添加群 (n = 6) または無添加のコントロール群 (n = 6) に区分した。HK-LS HS-1 は、母子分離の日を 0 日目として 3 週間まで、1 日朝夕 2 回経口投与した (添加量は予備試験に基づいて HK-LS HS-1:0.2%)。母子分離日 (HK-LS HS-1 添加前、0 日目)、添加後 10 日目および 21 日目に血液及び血清生化学検査[血清ハプトグロビン (HG) 及び血清アミロイド A (SAA) の急性期タンパク質濃度を含む]を行うための血液、および糞便中の好気性細菌 (大腸菌群) および嫌気性細菌 (乳酸菌、ビフィズス菌) 数検査用の糞便サンプル採取を行なった。さらに、農場スタッフによる食欲、糞便状態を含む臨床症状を毎日観察するとともに、臨床症状に基づいて治療を必要とする場合には支持療法や抗生物質の投与を行なった。添加試験期間中の各子牛の治療データを全て記録した。2 頭の子牛において 0 日目の血清サンプルの HG 濃度が 500 g/mL を超えたため、本実験か</p>	

(別紙様式第 10 号)

ら除外した。従って HK-LS HS-1 添加群 (n = 5; オス 1 頭、メス 4 頭) とコントロール群 (n = 5; オス 3 頭、メス 2 頭) の 10 頭の子牛を本試験に用いた。7 日目のグルコースとビタミン A のレベルは、コントロール群よりも添加群の方が有意に高かった (P < 0.05)。これは、グループ間の子牛の栄養状態の違いを示していると思われた。グループ間で HG または SAA 濃度に有意差は観察されなかった。糞便中の大腸菌数は、抗生物質の投与が原因と思われる、21 日目 (P = 0.06) の添加群よりもコントロール群で少ない傾向が見られた。ビフィズス菌数に有意差は認められなかったが、乳酸菌数は、21 日目の添加群で有意に高かった (P < 0.05)。添加群における試験期間中の疾病治療回数 (5.2 ± 3.9) はコントロール群 (10.6 ± 5.9) と比較して有意に減少した (P < 0.05)。本研究は哺乳期子牛で初めての LS HS-1 添加効果を示すものである。本研究結果より、代用乳への HK-LS HS-1 添加による子牛の腸内細菌叢の改善効果、及び疾病発生低減効果が確認された。

家畜に給与される飼料中には真菌が常在し、環境の変化等により真菌によって産生されたカビ毒が飼料を汚染する。飼養環境下におけるカビ毒浸潤動態とその影響の解明、およびその対策は、家畜衛生面のみならず、食品の安全性や動物福祉の観点等からも極めて重要である。牛生産現場レベルにおける飼料中カビ毒防除法としては、飼料へのカビ毒吸着剤添加が実践可能な方法として広く用いられているが、実際の添加効果は未だ不明な点が多い。第 2 章では、*Aspergillus* 属真菌由来カビ毒で、アフラトキシン B1 生合成過程の中間物質であるステリグマトシスチン (STC) に着目し、尿中 STC 濃度を指標とした飼料へのフラクトオリゴ糖 (Difuctose anhydride III: DFA III) 添加効果の検証を行うことを目的とした。

試験は 9~10 か月齢の JB 未経産牛 20 頭を用い、DFA III は 10 頭に対し 2 週間添加され、無添加群 10 頭を対照群に設定した。飼料中 STC 濃度は、試験開始時 (0 日目) に 0.06 mg/kg (粗飼料と濃厚飼料の混合) であった。尿中 STC 濃度は DFA III 添加前日、添加 9 日後と 14 日後、および添加中止後の 23 日目に液体クロマトグラフィータンデム質量分析法にて測定し、あわせて血清 SAA 濃度の測定を行なった。添加 9 日目に尿中に STC が検出された未経産牛の頭数は、DFA III 添加群 (10%) で対照群 (60%) と比較して少なかった。さらに 23 日目において、尿中 STC が検出された未経産牛の頭数や SAA 濃度に差はなかったものの、DFA III 添加群の尿中 STC 濃度は対照群よりも有意に低下した (P = 0.032)。腸管からの STC 吸収低下については、DFA III 添加により腸管タイトジャンクション (TJ) の消化管バリア機能の増強、あるいは、DFA III 添加による腸内細菌叢の改善とそれに続く腸管 TJ の消化管バリア機能の増強などが考えられた。本研究結果から、牛飼料への DFA III 添加は新規 STC 防除法としての可能性が初めて示唆された。

飼養環境下の牛群において、HK-LS HS-1 のプロバイオティクス効果の一旦を初めて明らかにするとともに、治療回数の低減効果を示したことは、産業動物生産現場における抗生剤使用低減に向けた足かがりとなるものである。さらにカビ毒吸着剤に変わる防除法としての DFA III 添加効果の客観的評価がなされたことは、安全な畜産物の生産が求められる今日、乳肉生産現場における新たな生産性向上のための一助となるものと思われる。以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文として十分な価値を有するものと判定した。