

## 市販海藻飼料の添加給与が黒毛和種繁殖牛の糞中 IgA および VFA 濃度ならびに糞便性状に与える影響

山中麻帆<sup>1</sup>・浅野桂吾<sup>1</sup>・林 英明<sup>2</sup>・河井重幸<sup>1</sup>・平山琢二<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 石川県立大学生物資源環境学部, 野々市市 921-8836

<sup>2</sup> 酪農学園大学獣医学群, 江別市 069-8501

(2020. 3. 10 受付, 2020. 8. 19 受理)

**要約** 本研究では、ウシに市販海藻飼料を給与した場合の糞中 IgA, VFA 濃度および糞便性状について調査し、腸管免疫賦活活性に与える影響について検討した。試験には黒毛和種の経産牛 4 頭を用い、海藻飼料を給与する区 (海藻区) および給与しない区 (対照区) に 2 頭ずつ分け、給与 I 期 (10 日間)、休止期 (13 日間)、給与 II 期 (10 日間) の 3 期からなる 2×2 のクロスオーバー法で実施した。糞中 IgA 濃度の変化量は、海藻区が対照区に比べ有意に増加した ( $P < 0.05$ )。一方、糞 pH 値および糞中 VFA 濃度は両区ともに正常範囲内で推移し、海藻飼料の給与の有無で差は認められなかった。また、糞中 VFA 濃度と糞中 IgA 濃度との間にも相関は認められなかった。以上から、ウシへの市販海藻飼料の添加給与は、腸内微生物叢には影響しないものの、腸管免疫を活性化させることが示唆された。

日本畜産学会報 91 (4), 375-379, 2020

**キーワード** : 海藻, 腸管免疫, 反芻動物, 糞中 IgA, 糞中 VFA

肉用牛生産の現場において、感染性の下痢や肺炎などの予防や治療のために抗菌剤の投与が一般的に行われている (山田 2014)。しかし、最近では抗菌剤に対する薬剤耐性菌の出現や抗菌剤による食の安全性が懸念されていることから、これらに対する消費者の関心が一段と高まっている (石崎 2010)。このような背景から、抗生物質に依存しない天然素材などを活用した飼養管理手法の確立が強く望まれており (伊藤ら 2014 ; 田崎ら 2015)、臨床現場では動物自身の免疫力を向上させ、発症リスクを低減させる取り組みが積極的に行われるようになってきた (松田ら 2013)。

ウシの免疫成分には、免疫グロブリン G (IgG), M (IgM), A (IgA) などがあるが、特に IgA は腸内の抗原の捕捉や腸管壁からの抗原の侵入防止など、ウシの腸管免疫の主要な機能を担っている (Harris ら 2006 ; Stelwagen ら 2009)。腸管免疫は外部から侵入する細菌やウイルスなどの異物に対して働き、腸管免疫賦活化は宿主のそれらに対する抵抗力を高めることから、感染性の下痢症予防において極めて重要である (安部 2008 ; 林 2008)。

単胃動物であるブタでは、海藻中の難消化性多糖類を腸内微生物が分解することで腸管免疫が賦活化される可能性が示唆されている (水間ら 2013)。この海藻中の難消化性多糖類を分解できる細菌は、ブタのみならずウシにも認められていることから (Atherly と Ziemer 2014)、海藻摂取による腸管免疫の賦活化はウシなどの反芻動物でも利

活用できる可能性がある。このような作用機序でウシの自己免疫を高めることは、抗菌剤の使用低減を通して安心・安全な家畜生産技術への応用が期待できる。

単胃動物の腸管免疫賦活化には、難消化性多糖類を基質とした腸内微生物による VFA 産生の関与が報告されている (Reilly ら 2008 ; Kim 2016)。また、健康状態の指標として一般的に広く用いられている糞便スコアや糞中水分含量などの糞便性状は、ウシの下痢症との関連が報告されている (佐藤ら 2003 ; Palacios ら 2006 ; 安松谷 2013)。したがって、ウシの海藻摂取による腸管免疫への影響について詳細に検討する場合、腸内での微生物代謝を反映する糞中 VFA 濃度および糞便性状も併せて検討する必要がある。

このようなことを背景に本研究では、腸管免疫の指標として利用されている糞中 IgA 濃度に加え、糞中 VFA 濃度および糞便性状に与えるウシへの海藻給与の影響について検討した。

### 材料および方法

供試動物には、石川県の同一農場内で繋留飼育される黒毛和種経産牛 4 頭 (平均 74 ± 27 ヲ月齢) を用い、2019 年 11~12 月に試験を実施した。なお、供試牛は全て妊娠牛で試験終了時において分娩 3 ヲ月前までとなる牛群を選定した。試験は、海藻飼料を給与する区 (海藻区) およ

連絡者 : 平山琢二 (e-mail : manta.bluep@gmail.com)

び給与しない区（対照区）に供試牛を2頭ずつ配置し、給与Ⅰ期（10日間）、休止期（13日間）、給与Ⅱ期（10日間）の3期からなる2×2のクロスオーバー法で実施した。海藻区には、アスコフィラム・ノドサム（褐藻類、*Ascophyllum nodosum*）を原料とした市販の海藻飼料（アルギット；神協産業、山口）を給与した。なお、海藻飼料の給与量は製造者の推奨量に準拠し、給与Ⅰ期およびⅡ期のいずれも朝の給餌時に1頭あたり150gの海藻飼料を給与した。なお、供試牛への基礎飼料として1頭あたりスーダングラス3kg、ハイキューブ1kg、野菜くず7kgおよび大豆粕または配合飼料0.4kgを1日2回（朝：8時、夕：17時）に分けて給与し、飲水はウォーターカップから自由に摂取させた。いずれの供試牛も、給与量の全量を摂取した。

測定項目は糞便スコア、糞 pH 値、糞中水分含量、糞中 IgA および VFA 濃度とし、給与Ⅰ、Ⅱ期の1日目および10日目に直腸糞約150gを夕方の給餌前（15～16時）に採取した。糞便スコアはPalaciosらの報告（2006）に従い、硬便=0、正常便=1、軟便=2、下痢便=3とし、糞採取時に目視で複数名により判別記録した。採取した糞は氷冷下で実験室に持ち帰り、各項目測定用に分取し、それぞれ夾雑物を除去するため前処理を行った。糞 pH 値の測定は、佐藤らの報告（2003）に準じて分取した糞を速やかに前処理し、硝子電極法による pH 計（D-23；堀場製作所、京都）を用いて行った。糞中水分含量は常圧乾燥法（河合ら2002）により測定した。VFA 測定用糞サンプルは既法（佐藤ら2003）に準じて前処理を行い、測定まで冷凍（-20℃）下で保存した。糞中 VFA 濃度の測定は、高速液体クロマトグラフィー（有機酸分析システム：島津製作所、京都）を用いて既法（梅津ら1998）に準じて行った。IgA 測定用糞サンプルは既法（Cookら2019）に準じて前処理を行い、測定まで冷凍（-20℃）下で保

存した。糞中 IgA 濃度の測定には、Cookら（2019）による ELISA 法を用いた。

得られた結果については、統計解析ソフト IBM SPSS Statistics 25（IBM, Chicago, IL, USA）を用い、各測定項目における区間差の有意性を、正規分布するデータは Student-t、非正規分布データは Mann-Whitney U 検定で判定した。また、糞中 IgA と VFA 濃度の関連性の有無は、正規分布するデータは Pearson、非正規分布データは Spearman の相関係数から判定した。なお、 $P < 0.05$  の場合を有意差ありとし、 $0.05 \leq P < 0.1$  を傾向ありとした。

### 結果および考察

糞便スコア、糞 pH 値、糞中水分含量および糞中 IgA 濃度について表1に示した。いずれの区においても、糞便スコアは正常値である1を示し、糞中水分含量も82%程度と正常範囲内であり、Hanajimaら（2006）の報告と一致していた。また、糞 pH 値についても、両区で7.5前後と中性付近で推移しており、正常範囲からの逸脱はないと考えられた（中村ら1997）。さらに、日々の観察所見においても、飼料摂取量に差はなく、食欲や活力などに変化は認められなかったことから、供試牛の健康状態は試験期間を通して一定に保たれていたものと推察された。

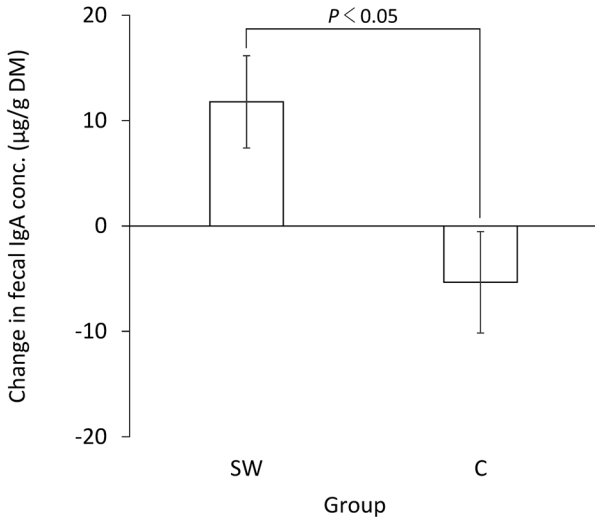
一方、海藻区の糞中 IgA 濃度は、給与開始時で約5μg/g DM、終了時で約17μg/g DMとなり、給与終了時に高くなる傾向がみられた（ $P < 0.10$ ）。さらに、給与ⅠおよびⅡ期の1日目と10日目の糞中 IgA 濃度の変化量は、対照区において約-5μg/g DMであったのに対し、海藻区では約12μg/g DMであり、両区間に有意差が認められた（図1、 $P < 0.05$ ）。糞中 VFA 濃度および酢酸/プロピオン酸（A/P）比について表2に示した。給与1日目および10日目のいずれにおいても海藻区と対照区の間で糞中

**Table 1** Fecal score, pH value, water content and IgA concentration in seaweed (SW) and control (C) group on day 1 and day 10 of feeding period

		Group	
		SW	C
Fecal score	Day 1	1 ± 0	1 ± 0
	Day 10	1 ± 0	1 ± 0
Fecal pH value	Day 1	7.4 ± 0.1	7.5 ± 0.1
	Day 10	7.8 ± 0.1	7.8 ± 0.1
Fecal water content (%)	Day 1	82.1 ± 0.4	82.5 ± 0.7
	Day 10	81.3 ± 1.3	83.2 ± 1.6
Fecal IgA conc. (μg/g DM)	Day 1	5.0 ± 2.7	9.2 ± 4.2
	Day 10	16.8 ± 4.4 <sup>†</sup>	3.9 ± 1.6

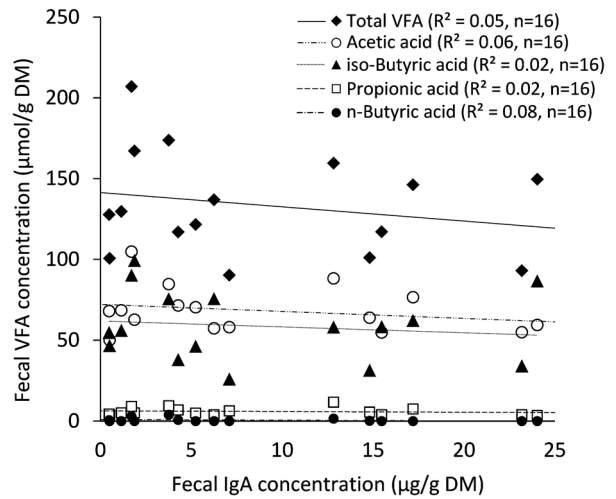
Values are mean ± SE. Day 1 : the first day of feeding period, Day 10 : the last day of feeding period. SW : seaweed fed group (n = 4), C : seaweed non-fed group (n = 4). Fecal score 0 : hard feces, score 1 : normal feces, score 2 : soft feces, and score 3 : watery feces. † :  $P < 0.10$ .

VFA 濃度および A/P 比に有意差はみられなかった。また、図 2 に示したように、糞中 IgA 濃度はいずれの VFA 濃度との間にも相関が認められなかった。ブタに海藻抽出物を摂取させた場合、それに含まれる難消化性多糖類が腸管に流入し、腸内微生物がそれらを資化することで VFA が産生されることが報告されている (Reilly ら 2008)。本研究では、海藻給与により糞中 VFA 濃度に有意な変化がみられなかったことから、腸内微生物が海藻由来の難消化性多糖類を資化した可能性は低いと推察された。



**Figure 1** Comparison of change in fecal IgA concentration on day 1 to day 10 of feeding period between seaweed (SW) and control (C) group. Values are mean  $\pm$  SE. SW : seaweed fed group (n = 4), C : seaweed non-fed group (n = 4).

難消化性多糖類による腸管 IgA 産生の促進について、マウス腸管細胞を用いた *in vitro* 試験から大きく 2 つの作用経路が報告されている (Kim 2016 ; Kim ら 2016)。まず、難消化性多糖類が腸内微生物により代謝され、産生された VFA が腸管粘膜に作用することで腸管 IgA の産生が促進される間接的な経路がある。さらに、難消化性多糖類が腸管粘膜内に直接取り込まれ、B 細胞や T 細胞が活性化することにより IgA 産生が促進される直接的な経路がある。本研究では、海藻給与により糞中 VFA 濃度に有意な変化はみられなかったことから、糞中 IgA の増加は、間接的な経路による可能性は低く、摂取した海藻飼料に含まれる難消化性多糖類が腸管 IgA 産生に直接作用した可



**Figure 2** Correlation between fecal IgA and VFA concentration.

**Table 2** Fecal volatile fatty acid (VFA) concentration in seaweed (SW) and control (C) group on day 1 and day 10 of feeding period

		Group	
		SW	C
Acetic acid (µmol/g DM)	Day 1	72.7 $\pm$ 5.5	66.6 $\pm$ 8.4
	Day 10	72.1 $\pm$ 3.3	72.1 $\pm$ 11.2
Propionic acid (µmol/g DM)	Day 1	7.2 $\pm$ 1.6	6.2 $\pm$ 1.4
	Day 10	4.6 $\pm$ 0.5	5.9 $\pm$ 1.1
n-Butyric acid (µmol/g DM)	Day 1	0.6 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 1.0
	Day 10	0.1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.7
iso-Butyric acid (µmol/g DM)	Day 1	62.9 $\pm$ 13.0	60.7 $\pm$ 6.0
	Day 10	49.6 $\pm$ 12.8	61.6 $\pm$ 14.0
Total VFA (µmol/g DM)	Day 1	143 $\pm$ 12	134 $\pm$ 16
	Day 10	116 $\pm$ 13	141 $\pm$ 24
A/P ratio	Day 1	10.9 $\pm$ 1.3	11.4 $\pm$ 1.1
	Day 10	14.0 $\pm$ 1.1	12.6 $\pm$ 1.4

Values are mean  $\pm$  SE. Day 1 : the first day of feeding period, Day 10 : the last day of feeding period. SW : seaweed fed group (n = 4), C : seaweed non-fed group (n = 4). A/P ratio : acetate to propionate ratio. There were no significant differences between SW and C in every item.

能性が高いと考えられた。

その一方で、本研究からは海藻飼料に含まれる難消化性多糖類が反芻胃での消化を逃れ、腸管に流入したのかは不明である。また、褐藻にも多く含まれるカロテノイドの抗酸化作用で腸管免疫が賦活化することも報告されており (Rühl 2007)、本研究における海藻給与による糞中 IgA の増加は、難消化性多糖類以外のフコキサンチンなどのカロテノイドが間接的に関与した可能性も考えられる。そのようなことから、海藻給与による腸管免疫の賦活化には、単一の成分ではなく複数の成分が関与している可能性がある。したがって、ウシへの海藻給与による腸管免疫賦活化について、本研究のみからその作用機序を十分に説明することは難しく、海藻成分の反芻胃内における動態なども含め詳細に検討する必要がある。

本研究において、ウシの腸管免疫賦活活性に与える海藻給与の影響について調査した結果、糞中 IgA 濃度の変化量が海藻飼料を給与した場合に有意に大きく ( $P < 0.05$ )、正の変化を示したことから、市販海藻飼料の給与によって腸管免疫が活性化することが示唆された。その一方で、糞 pH 値や糞中 VFA 濃度に変化がみられなかったことから、腸内微生物叢の変化以外の機序による免疫賦活作用が糞中 IgA 濃度に関連している可能性がある。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、供試牛を提供していただいた杉本信夫獣医師、供試飼料を提供していただいた神協産業株式会社深謝する。

## 文 献

安部 良. 2008. 粘膜免疫—腸管免疫に焦点を当てて—. 日本家畜臨床感染症研究会誌 **3** (2), 61-65.

Atherly T, Ziemer CJ. 2014. Bacteroides isolated from four mammalian hosts lack host-specific 16S rRNA gene phylogeny and carbon and nitrogen utilization patterns. *MicrobiologyOpen* **3** (2), 225-238.

Cooke AS, Watt KA, Morgan ER, Dungait JAJ. 2019. The latest FAD-Faecal antibody detection in cattle. Protocol and results from three UK beef farms naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Parasitology* **146** (1), 89-96.

Hanajima D, Kuroda K, Fukumoto Y, Haga K. 2006. Effect of addition of organic waste on reduction of *Escherichia coli* during cattle feces composting under high-moisture condition. *Bioresource Technology* **97** (14), 1626-1630.

Harris NL, Spoerri I, Schopfer JF, Nembrini C, Merky P, Massacand J, Urban JF Jr, Lamarre A, Burki K, Odermatt B, Zinkernagel RM, Macpherson AJ. 2006. Mechanisms of neonatal mucosal antibody protection. *The Journal of Immunology* **177** (9), 6256-6262.

林 智人. 2008. 粘膜免疫の基礎—全身性免疫と粘膜性免疫—.

日本家畜臨床感染症研究会誌 **3** (3), 105-109.

石崎 宏. 2010. 育成期の子牛の免疫抵抗性を低下させる要因. 日本家畜臨床感染症研究会誌 **5** (2), 47-54.

伊藤 謙, 赤峰知奈美, 河田 和, 志村洋一郎, 稲元民夫, 喜多一美. 2014. 飼料中へのプロポリス残渣の添加が横斑ブリマスの盲腸内細菌叢へ及ぼす影響. 日本家禽学会誌 **51** (1), J1-J5.

河合正人, 市川雅賢, 大谷昌之, 池滝 孝, 松岡 栄. 2002. アルファルファおよびコーンサイレージ給与割合の違いが泌乳牛の窒素利用と乳生産に及ぼす影響. 北海道畜産学会 **44**, 1-6.

Kim CH. 2016. B cell-helping functions of gut microbial metabolites. *Microbial Cell* **3** (10), 529.

Kim M, Qie Y, Park J, Kim CH. 2016. Gut microbial metabolites fuel host antibody responses. *Cell Host & Microbe* **20** (2), 202-214.

松田敬一, 坂井 靖, 大塚浩通, 村松由記子, 原 英郎, 八木勇三, 原 高明. 2013. ホルスタイン子牛に対するクマイザサ抽出物 (SanSTAGE) の免疫活性化作用および疾病予防効果. 家畜感染症学会誌 **2** (1), 17-24.

水間 恵, 岡村俊宏, 鈴木英作, 須田義人, 平山琢二, 小川智子, 鈴木啓一. 2013. 海藻・海苔の飼料添加給与がブタの免疫能に及ぼす効果. 日本畜産学会報 **84** (1), 51-57.

中村良一, 笹原二郎, 酒井 保, 村上大蔵, 吐山豊秋. 1997. 新編獣医ハンドブック. 第2版. p. 1061. 養賢堂, 東京.

Palacios AR, Stämpfli HR, Duffield T, Peregrine AS, Trotz-Williams LA, Arroyo LG, Weese JS. 2006. *Clostridium difficile* PCR ribotypes in calves, Canada. *Emerging Infectious Diseases* **12** (11), 1730-1736.

Reilly P, O'doherty JV, Pierce KM, Callan JJ, O'sullivan JT, Sweeney T. 2008. The effects of seaweed extract inclusion on gut morphology, selected intestinal microbiota, nutrient digestibility, volatile fatty acid concentrations and the immune status of the weaned pig. *Animal* **2** (10), 1465-1473.

Rühl R. 2007. Effects of dietary retinoids and carotenoids on immune development: Symposium on 'Nutrition influences on developmental immunology'. *Proceedings of the Nutrition Society* **66** (3), 458-469.

佐藤 博, 黒澤 隆, 及川 伸. 2003. 乳用子牛の糞中アンモニア, 尿素および有機酸濃度と下痢との関係. 日本獣医師会雑誌 **56** (8), 517-521.

Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT. 2009. Immune component of bovine colostrum and milk. *Journal of Animal Science* **87** (Suppl. 1), 3-9.

田崎駿平, 平川守彦, 及川卓郎, 平山琢二. 2015. 黒毛和種子牛への甘草給与が血中 GH および IGF-1 濃度に与える影響. 日本暖地畜産学会報 **58** (2), 233-238.

梅津一孝, 牛雨, 干場秀雄, 高畑英彦. 1998. 高濃度乳牛糞尿固液分離スラリーの中温メタン発酵における担体の効果. 農業施設 **29** (2), 57-67.

山田 裕. 2014. 子牛の下痢治療における抗菌剤の使用法を考える. 家畜感染症学会誌 **3** (4), 123-127.

安松谷恵子, 笠井浩司, 山中健吾, 坂瀬充洋, 西野 治, 赤池 勝, 久米新一. 2013. 出生後の黒毛和種新生子牛への免疫グロブリン G と免疫グロブリン A の移行. 日本畜産学会報 **84** (3), 389-393.

## Effect of seaweed-fed on fecal IgA and VFA concentration, and fecal characteristics in Japanese Black cow

Maho YAMANAKA<sup>1</sup>, Keigo ASANO<sup>1</sup>, Hideaki HAYASHI<sup>2</sup>, Shigeyuki KAWAI<sup>1</sup> and Takuji HIRAYAMA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Graduate School of Bioresources and Environmental Science,  
Ishikawa Prefectural University, Nonouchi 921-8836, Japan

<sup>2</sup> School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu 069-8501, Japan

**Corresponding : Takuji HIRAYAMA (e-mail : manta.bluep@gmail.com)**

The purpose of this study was to examine the effect of feeding seaweed (*Ascophyllum nodosum*) on the activating intestinal immune system of Japanese Black cow. We studied the influence of feeding seaweed on fecal immunoglobulin A (IgA), volatile fatty acid (VFA) concentration, and fecal characteristics of Japanese Black cow. The examination was carried out by a 2×2 cross-over design with arranging two cattle each treatment group (SW ; seaweed fed group, C ; seaweed non-fed group). Measuring items were as follows : fecal score, pH, water content, IgA and VFA concentrations. Difference on day1 to day10 of fecal IgA concentration was significantly higher in the SW group compared with C group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in fecal pH and VFA concentration between the groups. There was no correlation between fecal IgA and VFA concentrations. These results indicated that intake of seaweed improved intestinal immune system of Japanese Black cow. On the other hand, we considered that the intestinal microbiota does not appear to be involved in this effect.

*Nihon Chikusan Gakkaiho 91 (4), 375-379, 2020*

**Key words** : fecal IgA, fecal VFA, intestinal immune system, ruminant, seaweed.