

北海道における自給飼料を活用した  
養豚に関する研究  
-イアコーンサイレージの飼料活用  
および  
サイレージ由来乳酸菌による  
免疫細胞活性化の検証-

平成 27 年  
(2015)

帯広畜産大学大学院畜産学研究科  
博士後期課程 畜産衛生学専攻  
長谷川 隆則

Study on utilization of self-supplied feed on pig  
farming in Hokkaido

-Utilization of ear-corn silage as feed for  
fattening pig and immunomodulating effect of  
lactic acid bacteria isolated from silage feeds-

2015

Takanori HASEGAWA

Doctoral Program in Animal and Food Hygiene

Graduate School of Animal Husbandry

Obihiro University of

Agriculture and Veterinary Medicine

## 目次

略号一覧	3
緒言	4
第Ⅰ章 肥育豚飼料としての自給イアコーンサイレージの活用	
1. 序論	13
2. 材料と方法	16
3. 結果	22
4. 考察	25
5. 小括	30
6. 図表	31
第Ⅱ章 サイレージ由来乳酸菌の免疫活性化能の評価	
1. 序論	39
2. 材料と方法	43
3. 結果	48
4. 考察	51
5. 小括	55
6. 図表	56
第Ⅲ章 免疫活性化能で選抜された乳酸菌のイアコーンサイレージ加工適性の評価	
1. 序論	64

2. 材料と方法	67
3. 結果	70
4. 考察	72
5. 小括	76
6. 図表	77
総括	83
Summary	87
参考文献	89
謝辞	99

## 略号一覽

TPP	trans-pacific partnership
TDN	total digestible nutrients
ECS	ear corn silage
NDF	neutral detergent fiber
ADF	acid detergent fiber
EFS	eco-feed silage
ECEFS	ear corn and eco-feed silage
CP	crude protein
DM	dry matter
FID	flame ionization detector
TLR	toll-like receptor
LTA	lipoteichoic acid
IL	interleukin
NK	natural killer
IFN	interferon
MRS	deMan, Rogosa, and Sharpe
FBS	fetal bovine serum
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
TNF	tumor necrosis factor
iNOS	inducible nitric oxide synthase
Ig	immunoglobulin

## 緒言

豚肉の国内生産量は、過去最多であった 1988 年度（159 万トン；枝肉重量ベース）に比べると若干減少しているものの、直近 10 年間は 124～131 万トンと、一定量を維持している（農林水産省，畜産物流通統計．URL; <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001136744>）。その一方で、豚の国内飼養戸数は、2004 年度の 8,900 戸から、2014 年度では 5,300 戸と約 60%に減少しており（農林水産省，畜産統計．URL; <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001138556>）（図 1）、わずか 10 年の間に、主に小規模飼養者の戸数が急激に減少し、大規模飼養者への生産の集約が進んでいることが分かる。また、肥育豚生体 100 kg 当たりの飼料費は、2013 年度（20,065 円）では、2003 年度（16,333 円）より 23%増加している（農林水産省，畜産物生産費調査．URL; <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001130986>）。このように、一見安定的な豚肉生産の裏側で、国内養豚を取り巻く環境は、急激に変化していると言えよう。

国内養豚業の近未来を展望すると、以下に示すいくつかの課題が考えられる。第一の課題としては、輸入豚肉との競合が挙げられる。2015 年度の豚肉の自給率は 54%で、残りの 46%は、アメリカ、カナダ、デンマーク、メキシコから主に輸入されている（独立行政法人農畜産業振興機構，畜産物の需給関係の諸統計データ．URL; [http://www.alic.go.jp/joho-c/joho05\\_000073.html](http://www.alic.go.jp/joho-c/joho05_000073.html)）。豚肉自給率は、過去 10 年間、50～55%でほぼ一定であるが、その背景には、豚肉に適用される「差額関税制度」がある。この制度は、輸入豚肉の価格が低いときは、

基準輸入価格に満たない部分を関税として徴収し、国内養豚農家を保護する一方、価格が高いときには、低率な従価税を適用することにより、関税負担を軽減し、消費者の利益を守る仕組みである。しかしながら、妥結に向けて進んでいる環太平洋パートナーシップ協定（TPP）が発効されれば、差額関税額が大きく減少する見込みであり、国内食肉市場において、安価な輸入豚肉のシェアが著しく増大する可能性がある。農林水産省の試算では、TPPに関連する国境撤廃措置により、豚肉の国内生産量は70%減少し、銘柄豚以外は海外産豚肉に置き換わる可能性が示されている（農林水産省、包括的経済連携に関わる資料。URL：[http://www.maff.go.jp/j/kokusai/renkei/fta\\_kanren/pdf/19\\_hinmoku.pdf](http://www.maff.go.jp/j/kokusai/renkei/fta_kanren/pdf/19_hinmoku.pdf)）。

第二として、飼料需給に関する課題が挙げられる。日本の濃厚飼料自給率は2013年度においてわずか14%（可消化養分総量（TDN）ベース）であり、養豚用飼料原料の大部分は、海外産に依存している（農林水産省、飼料をめぐる情勢。URL：[http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/l\\_hosin/pdf/09\\_meguji\\_data.pdf](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/l_hosin/pdf/09_meguji_data.pdf)）。養豚飼料の主成分である飼料用トウモロコシ、マイロ（こうりゃん）、大麦、小麦、大豆粕の輸入価格は、約10年前から上昇傾向で（図2）、この影響から配合飼料の国内平均価格は、1994年度（46,054円/トン）と2014年度（69,603円/トン）を比較すると20年で51%増加している（畜産物の需給関係の諸統計データ）（図3）。将来的な飼料穀物の需給予測についても、今後とも継続が予想される世界的人口の増加は、穀類の「食糧」としての需要を高め、また、新興国を中心とした食肉消費の増大は、飼料穀物の国際規模での競合を引き起こす可能性がある（国際連合農業食糧機関、

統計データベース . URL; [http://faostat3.fao.org/download/O/OA/Esinko/lin/l\\_siry/pdf/01\\_meguji\\_data.pdf](http://faostat3.fao.org/download/O/OA/Esinko/lin/l_siry/pdf/01_meguji_data.pdf)) (図 4)。国内養豚の生産コスト全体に占める飼料コストの割合は 67%と高い (農林水産省, 農業経営統計調査 . URL; <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid=000001130986>) ことから、飼料穀物のコスト増大は、そのまま養豚農家の経営に大きなダメージを与える。このような背景から、農林水産省も、飼料自給率の向上を目標に掲げている。安定的な国内養豚産業の維持のためには、国際的な影響が少ないと考えられる自給飼料の活用は、推進すべき課題であろう。

課題の第三に、感染症からの防御が挙げられる。近年の国内養豚は、集約生産が進み、豚舎管理や設備の進歩、病気に強い繁殖豚の育成、ワクチンや消毒技術の向上など、衛生管理が進化しているが、それでも集団発生を起こす疾病事例は少なくない。ウイルス性疾病では、2014年に、コロナウイルス科 (*Coronaviridae*)、アルファコロナウイルス属 (*Alphacoronavirus*) に属するウイルスが病原体である豚流行性下痢症 (Porcine Epidemic Diarrhea; PED) が全国で発生し、現在までに約 158 万頭の豚に発症し、約 49 万頭が死亡している (農林水産省, 豚流行性下痢について . URL: <http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/ped/ped.html>)。また、アルテリウイルス科 (*Arteriviridae*)、アルテリウイルス属 (*Arterivirus*) に属するウイルスが原因で、繁殖豚では繁殖障害、肥育豚では呼吸器症状を特徴とする豚繁殖・呼吸器障害症候群 (Porcine reproductive and respiratory syndrome; PRRS) は、1993 年の国内発生後、国内養豚業界に甚大な被害を及ぼしており、2006 年から 2007 年の調査においては、年間 283 億円の経済損失を引き起こすと試算されてい



る (1)。細菌性疾病としては、主に大腸菌症やサルモネラ症などの消化器病と、豚マイコプラズマ肺炎や豚莢膜肺炎などの呼吸器病が、二大疾病として養豚経営に大きなリスクとなっている (2)。

このように国内養豚の改善すべきポイントを整理すると、今後も国内養豚を維持、発展させていくためには、①輸入豚肉と差別化できる高価値型国産豚肉の創出、②国際的な飼料穀物需給の影響を受けにくい自給生産飼料の積極活用、③疾病対策に繋がる新たな肥育技術開発の課題を、現実的なコストで実現していくことが重要となろう。

北海道は、2013 年度において、乳牛で全国の 59%、肉用牛で 20%の飼養頭数を占める一大畜産地域である。広大な農地を活用した土地利用型農業を実現している北海道は、飼料作物の栽培量も全国で群を抜いており、牧草では、作付面積、収穫量とも全国の 7 割、飼料用（青刈り）トウモロコシの生産では、全国の 5 割以上を占める。北海道における豚の飼養頭数は、年間約 110 万頭で、全国の 7%にとどまるが（農林水産省，北海道農業の概要．URL; <http://www.maff.go.jp/hokkaido/policy/jyousei/pdf/201506zenbun.pdf>）、海に囲まれ他県と接するエリアがないため防疫上も有利であり、全国的な温暖化が進む中、冷涼な気候の北海道では、さらに養豚業の発展が期待できると考えられる。

このような背景のもと、本研究では、北海道で生産可能な自給飼料の活用を手段として、コストを上げることなく良質な豚肉を生産し、かつ疾病予防につながる養豚体系モデルの構築を目指し、検討を行った。第 I 章では、自給濃厚飼料源として北海道内で開発が進む飼料用トウモロコシ雌穂（イアコーン）サイレージ（ECS）を利用した豚肥育手法の検討を、第 II 章では、豚の感染防御手段として期待できる免

疫活性化能を有するサイレージ由来乳酸菌の選抜を、第Ⅲ章では、免疫活性化能で選抜された乳酸菌について、ECS 調製用スターターとして用いた場合の発酵適性の評価を行った。

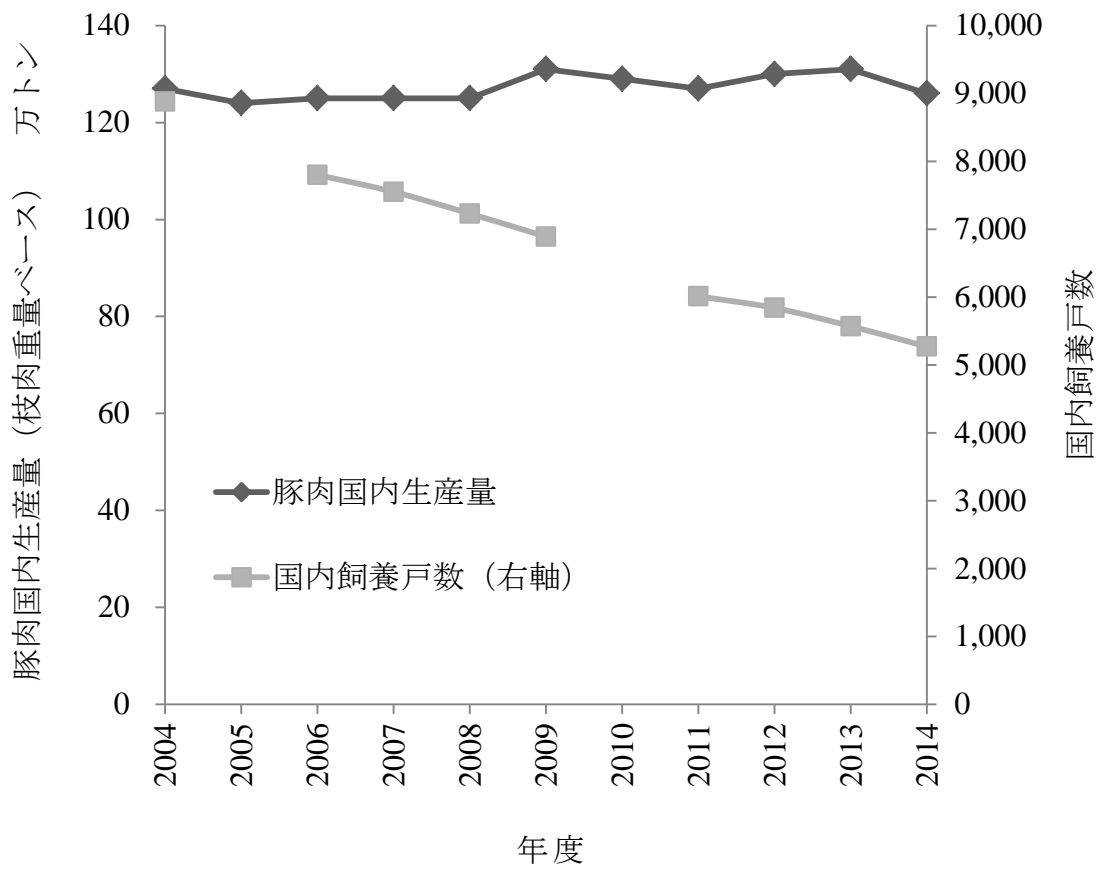


図 1. 豚肉国内生産量と国内豚飼養戸数

参考資料：農林水産省 畜産物流通統計および畜産統計

2005、2010 の国内飼養戸数のデータは未公表

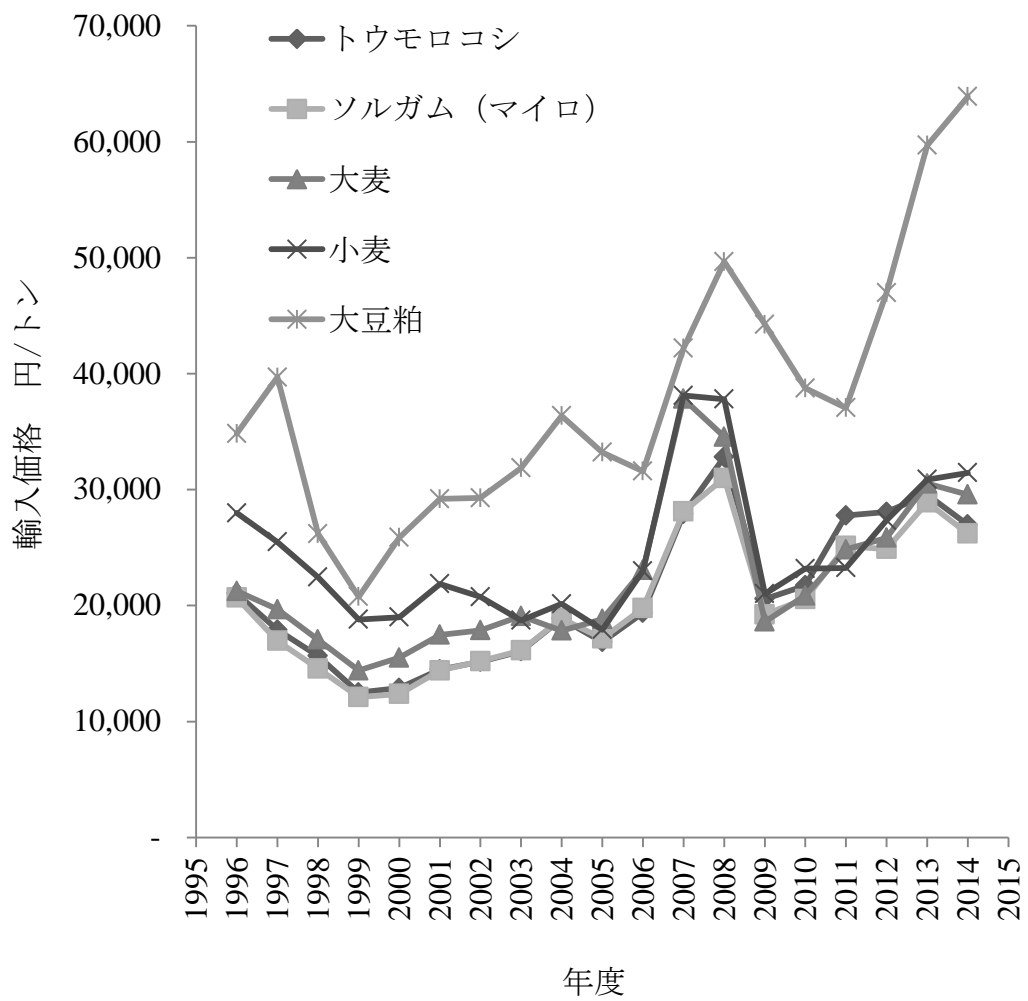


図 2. 飼料用穀物の輸入価格の推移（運賃・保険料込（CIF）価格）

参考資料：農畜産業振興機構 畜産物の需給関係の諸統計データ

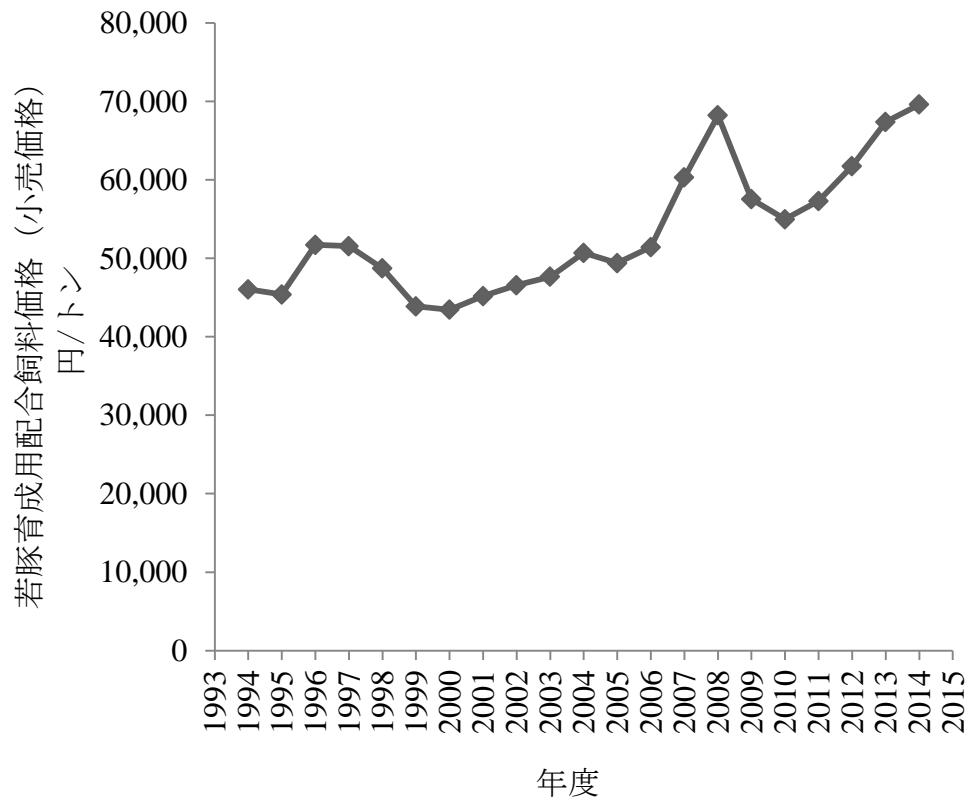


図 3. 若豚育成用配合飼料価格の推移

参考資料：農畜産業振興機構 畜産物の需給関係の諸統計データ

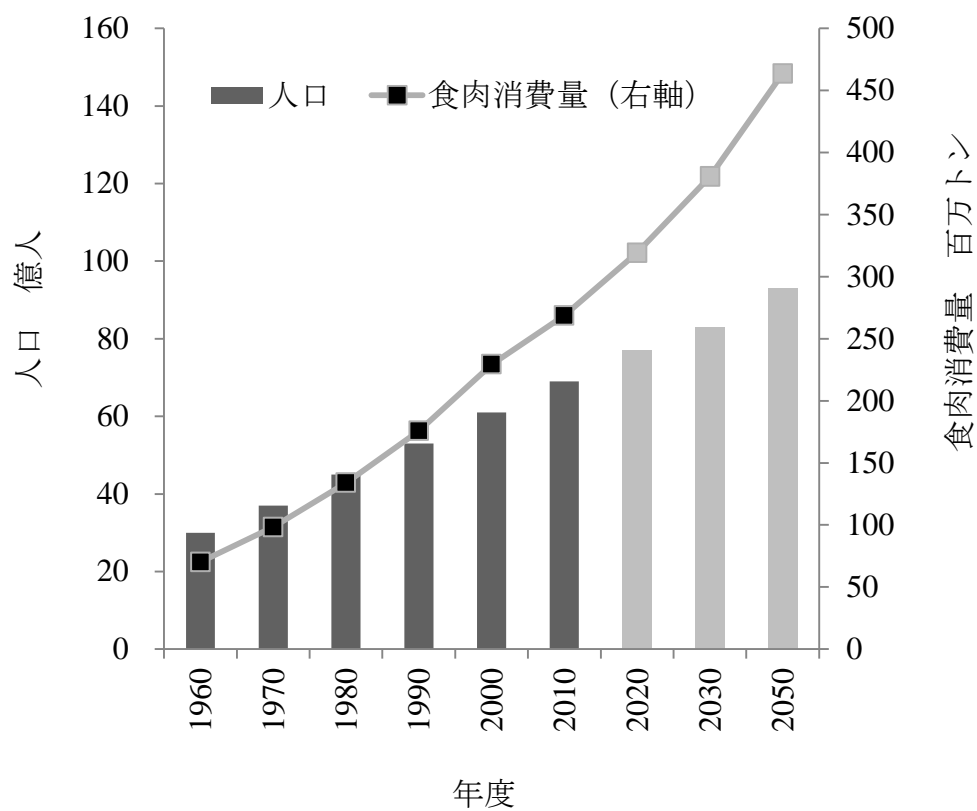


図 4. 世界の人口及び食肉消費量の推移予測

(実測値を黒色、推定値を灰色で表記)

参考資料：国際連合農業食糧機関 統計データベース

## 第 I 章 肥育豚飼料としての自給 ECS の活用

### 1. 序論

国内養豚業を持続的に発展させるためには、海外依存が高く、需給が不安定な濃厚飼料原料の自給体制を見直す必要がある。さらに自給飼料の活用により、生産コストを下げ、かつ肉質に特長を付与できれば、海外産豚肉との競争面からもメリットが大きいと考えられる。国内で自給可能な濃厚飼料の候補としては、食品製造副産物や余剰食品、調理残渣、農場残渣などから製造された「エコフィード」（農林水産省、エコフィードをめぐる情勢。URL; [http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l\\_siryu/pdf/ecofeed\\_20150220.pdf](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryu/pdf/ecofeed_20150220.pdf)）や「飼料用米」（農業・食品産業技術総合研究機構、飼料用米の生産・給与技術マニュアル。URL; [http://www.naro.affrc.go.jp/publicity\\_report/publication/files/ricm2013.pdf](http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/ricm2013.pdf)）が挙げられる。エコフィードの利用は、廃棄物の削減および有効活用につながり、排出側と畜産側が飼料化を工夫することで、飼料費の削減や産肉の品質、生産性の向上につながる。しかしながら、生産に季節性がある材料は、通年での安定確保が難しく、水分が高い材料は、長期保存に工夫が必要である。また、液状のエコフィードは、輸送費用がかさみ、給与にリキッドフィード専用の設備を導入しなければならない。一方、濃厚飼料として活用できる飼料米は、2011年から実施された農業者戸別補償制度（現在は、経営所得安定対策）により、2011年度の栽培面積は 30,000 ha を超えたが、米は生産にかかるコストが高く、現行の最大 10.5 万円/10 a の戦略作物助成が続

かなければ、コスト面から飼料としての使用は困難であると考えられる。それゆえ、安定供給が可能で生産コストが飼料として見合う、新たな国産濃厚飼料資源の開発が求められている。

飼料用トウモロコシは、圃場面積あたりの穀実収量が米、麦、大豆より高く、家畜の嗜好性も良い。ECS は、飼料用トウモロコシの雌穂を収穫し、密封貯蔵して発酵させたもの（図 5）で、子実と芯部のみを原料とするため TDN 含量が約 70～80%と高く、濃厚飼料資源として有望である。それゆえ、近年、北海道では、圧片トウモロコシを代替する自給飼料源として ECS を利用する取り組みが試みられている（北海道農業研究センター，イアコーンサイレージ生産・利用マニュアル第 1 版。URL; [http://www.naro.affrc.go.jp/publicity\\_report/publication/files/harc2013iacornmanual.pdf](http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/files/harc2013iacornmanual.pdf))。ECS に対する乳肉用牛の嗜好性は良く、泌乳牛に対して、給与飼料の 10～15%程度を圧片トウモロコシから ECS で代替給与しても、採食量、乳量、乳成分に影響しないことが報告されている (3)。しかし、肥育豚への ECS の給与については、可能な代替割合や産肉性に及ぼす影響が明らかとなっていない。さらに、ECS と飼料成分特性の異なるエコフィードとを併用できれば、さらなる養豚用飼料の自給率向上も期待できる。

肥育豚の飼料に、繊維含量の高いチコリ根 (4) やルピン種子 (5)、シュガービートパルプ (6) を添加することにより、豚肉の脂肪組織中のスカトール含量が低下すると報告されている。スカトールは、豚肉の不快臭の原因となるため (7, 8)、給与飼料による脂肪組織中のスカトールやインドール含量への影響を明らかにすることは、消費者の嗜好にあった豚肉生産に重要と考えられる。ECS は、トウモロコシの芯



や穂皮等を含むため、圧片トウモロコシと比べ、中性デタージェント繊維（NDF）含量が約 2 倍、酸性デタージェント繊維（ADF）含量が約 3 倍高い（3）。また、北海道で年間 10 万トン排出されるデンプン粕は、圧片トウモロコシに比べ、NDF が約 3 倍量、ADF が約 4 倍量含まれ（9）、ECS と比較してとくに ADF 含量が高いため、飼料への配合により、繊維をさらに強化できる。これらのことから、ECS にデンプン粕を主体としたエコフィードサイレージ（EFS）を配合することで、飼料自給率が高くなり、さらに不快臭が少ない豚肉生産に繋がる可能性が考えられる。

ECS、EFS は乾物当たりには占める繊維質の含量が高く、増体に影響を与える可能性があるため、養豚現場における活用を実現するためには、飼料用トウモロコシの栽培費や ECS の加工費、EFS の製造費から算出される各飼料の「飼料コスト」と、さらに飼料要求率を加味して算出される、体重を 1 kg 増やすために必要な「生産コスト」を明らかにすることが重要であろう。

そこで、本章では、肥育豚に ECS、あるいは ECS と EFS を混合した飼料を給与して、増体成績、枝肉成績、肉質、背部皮下脂肪および糞便中のインドール、スカトール含量への影響を検討した。合わせて、ECS および EFS を一般配合飼料と一部代替した場合の生産コストを試算した。

## 2. 材料および方法

### 供試動物および試験計画

本試験は、「国立大学法人帯広畜産大学動物実験等に関する規程」を順守し、帯広畜産大学内豚舎で行われた。四元交雑種であるハイポー豚（去勢豚）18頭（開始時平均体重  $65.4 \pm 2.7$  kg）を用い、試験飼養期間は、馴致期間9日間を含む60日間もしくは67日間とした。

試験区として、市販配合飼料（中部飼料，北海道苫小牧市）のみを給与した対照区、乾物（DM）ベースで配合飼料80%とECS20%を十分混合した飼料を給与したECS区、配合飼料60%にECS20%とEFS20%を十分混合した飼料を給与したECEFS区を設定した。ECSは、2012年に帯広畜産大学内で栽培された飼料用トウモロコシ（品種P7631，バイオニアハイブレッッドジャパン，東京）の雌穂を破碎処理装置付きの自走式フォレンジハーベスタ（JUGUAR890；CLAAS，Harsewinkel，Germany）で収穫し、細断型コンビラップ（MW1210；タカキタ，三重）で密封梱包し、11カ月間屋外で貯蔵したものを試験に供した。EFSは、神野でんぷん工場株式会社（北海道河西郡）で市販されている植物性発酵飼料で、原材料の79.4%がデンプン粕から成り、その他、ふすま（9.1%）、米ぬか（3.3%）、粉末おから（3.3%）、ビートパルプ（2.1%）、醤油粕（1.9%）、小豆粕（0.9%）が混合されたものを用いた。

飼料成分は、十勝農業協同組合連合会 農産化学研究所に依頼し、常法（10）に従って分析した。ECSの乾物TDN含量は、既報（11）におけるECSの代謝エネルギー値（ $ME=13.48$  MJ/kg DM）を用い、以下の式から算出、推定した。

$$\text{TDN (\%)} = \text{DE (kcal/100 g)} / 4.41 \quad (12)$$

$$\text{DE (可消化エネルギー; kcal/100 g)} = \text{ME (kcal/100 g)} / 0.965 \quad (13)$$

$$1 \text{ cal} = 4.184 \text{ J}$$

EFSの乾物TDN割合は、原料配合割合と日本標準飼料成分表2009年版(14)の掲載値から算出し、推定した。

供飼豚 18 頭を平均体重が同等となるよう 6 頭ずつ 3 区に分け、さらに 1 区 6 頭を 3 頭ずつ 2 群に分け飼養した。飼養は、全区とも、おがくず発酵床を用いたバイオベット豚舎で行った(図 6)。ECS 区および ECEFS 区の給与飼料は、小型スコップで市販配合飼料と ECS および EFS を十分に手混ぜし、数日分ずつ調製した。各区の飼料は朝と夕の 2 回、手給餌により制限給与し、水は自由摂取とした。飼料摂取量は群ごとに毎日測定し、体重は 2 週間ごとに測定した。試験期間終了後、各試験区の平均体重が 110 kg に達するまで肥育し、60 日目と 67 日目に屠畜解体した。飼料(乾物)摂取量、日増体量および飼料(乾物)要求率は、全頭揃っていた 60 日時点までの実測値から算出した。

## 豚肉の理化学分析

豚肉の理化学分析は、食肉の理化学分析及び官能評価マニュアル(独立行政法人家畜改良センター, 食肉の理化学分析及び官能評価マニュアル. URL; <http://www.nlbc.go.jp/pdf/tyousa/shokuniku-manual-1.pdf>)を参考に実施した。屠畜解体後、部分肉を真空包装し、4°C で 10 日間熟成した。分析には、全 18 頭の供試豚から採取した胸最長筋と、第 9 胸椎ロース部の背部皮下脂肪および筋間脂肪を用いた。胸最長筋は体軸に垂直となる方向で、第 5 胸椎部から第 9 胸椎部にかけて 4.0、2.5、

2.5 cm 厚で 3 枚切り出した。4.0 cm 厚の 1 枚は挽肉にして、水分含量、粗脂肪含量分析に用いた。2.5 cm 厚の 2 枚は、肉色および脂肪色を測定後、加熱損失率、剪断値測定用の試料とした。

水分含量は、100°C、3 時間の常圧加熱乾燥法で測定した。水分含量測定後の試料は、円筒濾紙に詰め、ソックスレー抽出装置で、16 時間エーテル抽出を行った。抽出瓶を 100°C、3 時間加熱した後に放冷、秤量し、抽出前後の恒量の差から、粗脂肪含量を算出した。

肉色、背部皮下脂肪の脂肪色は、測定する胸最長筋を切断し、4°C の冷蔵庫中で 1 時間空気に晒した後、色彩色差計 (CM-1000; ミノルタ, 東京) を用い、 $L^*$ 、 $a^*$ 、 $b^*$  値を測定した。

加熱損失率は、2.5 cm 厚の胸最長筋を袋に密封し、70°C のウォーターバス中で 1 時間加熱後、筋肉重量の減少率により算出した。

剪断値は、加熱損失率の測定で使用した加熱試料を 4°C で 12 時間保存した後、試料ごとに、直径 1.27 cm のコアラーで 6 本のコアを筋線維束に平行に打ち抜き、一つのコアにつき 2 回、剪断値測定機 (Warner-Bratzler meat share Model 235; G-R Manufacturing Co., Manhattan, KS, USA) で測定し、最大値と最小値を除いて平均し、剪断値を求めた。

脂肪酸組成の分析は、以下のとおり行った。背部皮下脂肪および筋間脂肪から分析試料として約 10 mg をねじ付試験管に入れ、その中に塩酸を 5% 混合したメチルアルコール溶液を 5 mL 加えて、100°C で 3 時間メチル化した。室温で冷却後、3 mL のヘキサンを入れて 1 分間攪拌し、上部のヘキサン層をガスクロマトグラフィー (GC-2010; 島津製作所, 京都) で分析した。キャリアーガスとしてヘリウムを用い、キ

ャピラリーカラム (ULBON HR-SS-10, 30 m x 0.32 mm id; 信和化工, 京都) で、インジェクター温度 250°C、検出器 (FID) 温度 250°C、初期温度 150°C、昇温最終温度 220°C の条件で測定した。ガスクロマトグラフィー用脂肪酸メチルエステル標準品混合物 (GLC 85; NU-CHEKPREP, Inc., Elysian, MN, USA) の保持時間を基準として、各脂肪酸の同定を行った。同定は、ミリスチン酸 (C14:0)、パルミチン酸 (C16:0)、パルミトレイン酸 (C16:1)、ステアリン酸 (C18:0)、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2) について行い、パルミトレイン酸、オレイン酸およびリノール酸の合計から総不飽和脂肪酸 (USFA) を算出した。

背部皮下脂肪中のインドールおよびスカトールは、Hansen-Møller の方法 (15) で抽出した。脂肪約 0.3 g をねじ付試験管に秤量し、内部標準 (2-メチルインドール) を含む 5 倍量のメタノールを加え、ホモジェナイズ (Polytron PT-1200; Kinematica AG, Lucerne, Switzerland) した。5 分間超音波処理後、氷上で 15 分静置した。4,000 x g、5°C で 5 分間遠心分離し、0.45 μm フィルターで濾過後、液体クロマトグラフィー／タンデム質量分析法により、インドールおよびスカトールの定量を行った。すなわち、液体クロマトグラフィー (Agilent 1200, Agilent, Santa Clara, CA, USA) は、分離カラムとして、Wakopak Navi C18-5, 2 mm x 15 cm (和光純薬工業, 大阪) を用い、0.25 mL/分の流速で、50%メタノール-1%酢酸から、13 分間で 100% メタノールまで混合割合を変化させたグラジエント分析を行った。カラムオーブンは 45°C、サンプルの注入容量は 10 μL に設定した。質量分析計 (API3000; AB SCIEX, Framingham, MA, USA) のイオン化は、大気圧化学イオン化 (APCI)

法で行い、ポジティブモード、Spray voltage 5.0 kV、Temperature 450°C で分析を行った。インドール、スカトールおよび 2-メチルインドールのモニターイオン (m/z) は、それぞれ、Q1 イオン 118.0→Q3 イオン 90.8、Q1 イオン 132.2→Q3 イオン 116.9 とした。

### 糞便中のインドール、スカトール含量の分析

出荷前日に全 18 頭の糞便を採取し、分析時まで-20°C で保管した。糞便 0.5 g をねじ付試験管に秤量し、飽和食塩水 2 mL を加え、ホモジェナイズ (Polytron PT-1200; Kinematica AG) した。ジエチルエーテル 2 mL を加え、さらにホモジェナイズをした後、1,680 x g で 5 分間遠心分離を行い、上部のジエチルエーテル層を採取した。残渣に再度ジエチルエーテルを 2 mL 加え、同様の条件でホモジェナイズ、遠心分離を繰り返した。再度上層を採取し、1 回目の上層と合わせたうえで、ジエチルエーテルで 10 mL に合わせ、試料とした。定量は、ガスクロマトグラフィー (7890A; Agilent) で行った。キャリアーガスはヘリウムを用い、キャピラリーカラム (DB-1 30 m X 0.25 mm id, 0.1 μm, Agilent) で、初期温度 60°C から 170°C まで 5°C/分、170°C から 240°C まで 20°C/分の条件で昇温した。インレット温度は 250°C、検出器 (FID) 温度は 285°C とした。

### 飼料コスト試算

ECS の乾物 1 kg あたりの生産コストは、イアコーンサイレージ生産・利用マニュアルの報告値を用いた。配合飼料の単価は、独立行政法人農畜産業振興機構公表の配合飼料の価格動向 (農家購入価格) の

値を用いた。各区飼料中の配合飼料、ECS、EFS の配合割合から、各区の飼料コストを算出した。合わせて、各区の飼料要求率の結果から、体重 1 kg 増加させるために必要な生産コストを試算した。

### 統計解析

得られたデータは SAS 9.3 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) の GLM プロシジャを用い、Bartlett 検定で等分散性を確認後、飼料を要因とした一元配置による分散分析を行った。 $P < 0.05$  のとき、差が有意であると判定し、Turkey の多重比較検定を行った。

### 3. 結果

#### 各区に給与した飼料の栄養成分

ECS および EFS の成分値を表 1 に示した。ECS および EFS の乾物中 TDN 含量は、「2.材料と方法」で記した既報の推定式から、75.7%および 71.8%と推定された。また、ECS および EFS の乾物中粗タンパク質 (CP) 含量は、それぞれ 8.5%、12.2%で、配合飼料 (14.7%) より低値であった。乾物中 NDF 含量は、ECS (27.9%) と EFS (30.5%) でほぼ同等であったが、乾物中 ADF 含量は、EFS (19.6%) が ECS より約 1.7 倍高値を示した (表 1)。

各試験区の配合後の飼料成分値 (表 2) において、乾物中の CP 含量は、ECS 区、ECEFS 区とも 12.9%で、対照区 (14.7%) の約 88%であったが、ECS 区の CP 中必須アミノ酸割合は、対照区より高かった。一方、ECEFS 区飼料の必須アミノ酸割合は対照区より低く、養豚飼料で第一制限アミノ酸となりやすいリジンについても低値であった。

#### 生産成績

表 3 に 1 頭 1 日あたりの飼料 (乾物) 摂取量、日増体重、飼料 (乾物) 要求率 (飼料摂取量を日増体重で除した値) を示した。ECS 区では、対照区と比べて、全期間平均の飼料摂取量に差はみられなかったが、ECEFS 区では、0~2 週、7 週、全期間平均において、対照区より摂取量が低かった ( $P < 0.05$ )。ECS 区の日増体重は、全期間平均 0.90 kg/日であり、対照区 (0.89 kg/日) と同等であったが、ECEFS 区の日増体重は、0~2 週において、対照区、ECS 区よりも低く ( $P < 0.05$ )、全期



間平均 (0.75 kg/日) においても低い傾向 ( $P < 0.1$ ) であった。飼料要求率についても、ECEFS 区では、3~4 週を除く試験期間の大部分において、対照区よりも高かった ( $P < 0.05$ )。

表 4 に出荷体重、枝肉重量、枝肉歩留、背部皮下脂肪厚を示した。試験開始から出荷までの平均肥育日数は、対照区で 61.2 日、ECS 区で 63.5 日、ECEFS 区で 65.8 日であった。枝肉重量は ECS 区が 79.17 kg と最も高値で、ECEFS 区 (73.10 kg) は ECS 区と比較して低かった ( $P < 0.05$ )。枝肉歩留および背部皮下脂肪厚については、各試験区間で差は認められなかった。

## 肉質

表 5 に肉質に関する評価結果を示した。水分含量は、対照区 (71.53%)、ECS (72.21%)、ECEFS 区 (72.97%) で差は認められなかった。粗脂肪含量は、対照区 (4.35%)、ECS 区 (4.11%) と比較して、ECEFS 区 (3.33%) で低値を示したが、他区と比べて差はなかった。加熱損失率 (クッキングロス) は、対照区 (24.63%)、ECS 区 (25.50%)、ECEFS 区 (25.11%) に差は認められなかった。胸最長筋および背部皮下脂肪の色調 ( $L^*a^*b^*$  値) についても、区間で違いはなかった。背部皮下脂肪の脂肪酸組成は、試験区間に差はなかったが、筋間脂肪の脂肪酸組成では、対照区のステアリン酸 (C18:0) 含量 (14.03%) が、ECS 区 (15.80%)、ECEFS 区 (15.67%) よりも低かった ( $P < 0.05$ )。

## 背脂肪および糞便中のインドール、スカトール含量

背部皮下脂肪中もしくは糞便中のインドール、スカトール含量を表

6 に示した。脂肪中のインドール含量については、試験区間で差は認められなかった。スカトール含量については、ECS 区 (10.48 ng/g)、ECEFS 区 (9.86 ng/g) で、両区とも、対照区 (26.07 ng/g) よりも低かった ( $P < 0.05$ ) が、ECS 区と ECEFS 区の間には、差は認められなかった。

### 推定飼料コスト

若豚育成用配合飼料の農家購入価格の平均は、平成 26 年度で 69.6 円/kg であった (畜産物の需給関係の諸統計データ)。これを配合飼料の乾物 (DM) 当たりの価格に換算すると、80.4 円/kg DM であった。ECS の生産コストは、既報 (イアコーンサイレージ生産・利用マニュアル) で、36.4 円/kg DM と報告されており、配合飼料に ECS を乾物 20% 配合した ECS 区の推定飼料価格は、71.6 円であった。ECS の販売価格は、29.2 円/kg であり、乾物に換算すると、84.6 円/kg となった。ECS と EFS を乾物で 20% ずつ配合した ECEFS 区の推定飼料価格は、72.4 円/kg DM であった。表 3 に示した飼料要求率の結果と合わせ、体重を 1 kg 増加するために必要な生産コストを算出したところ、対照区は 252.5 円、ECS 区は 227.7 円、ECEFS 区は 262.8 円であった。

#### 4. 考察

飼料成分分析の結果から、ECS および EFS の乾物 TDN 含量や CP 含量は、配合飼料と比較すると低値であり、一方、繊維質である NDF や ADF の含量が高いため、ECS や EFS を高い割合で配合飼料と置換することは、生育や肉質に影響を及ぼすことが考えられた。とくに、養豚飼料で第一制限アミノ酸となりやすいリジンについては、ECEFS 区では、乾物飼料中 0.51%（配合飼料の 72.8%）と低値であった。肥育豚飼料中のリジン濃度を 0.65% から 0.55% に低下させると、飼料摂取量が減少した報告（16）がある。日本飼養標準 豚（12）によれば、リジン要求量は 17.3 g/日である。本試験の対照区と ECS 区では、飼料摂取量の少ない 0~2 週時においても、リジン摂取量はそれぞれ 21.3 g/日、19.6 g/日であり、飼料標準の要求量を充足していたが、ECEFS 区のリジン摂取量は、全期間平均で 13.9 g/日で、要求量を充足していなかった。ECEFS 区では、飼料要求率が有意に高かったが、これは、必須アミノ酸摂取量の不足に加え、低リジン濃度による飼料摂取量の減少に起因することが推察された。

肉質について、水分含量、粗脂肪含量は、対照区、ECS 区、ECEFS 区それぞれに差は認められなかった。Springer ら（17）は、豚肉のロインにおける水分含量は 72.3% であると報告しているが、本試験では、全試験区平均で 72.2% であり、同様な値であった。家入ら（18）は、小麦を主原料とするパン屑を配合した低リジン飼料（肥育前期飼料中リジン含量 0.57%，後期飼料 0.42%）を給与すると、日増体量の低下とともに、筋肉内脂肪含量が増加したと報告している。本試験における

ECEFS 区の飼料は、前述のとおり、リジン含量が 0.51%であり、筋肉内脂肪含量の増加を期待したが、対照区と比較して有意な差は認められなかった。Hyun ら (19) は、低リジン飼料 (飼料中リジン含量 0.5%) に起因する筋肉内脂肪の増加は、飼料中ロイシン含量が 1%では認められないが、2%において有意に増加したと報告している。ECEFS 区の飼料のアミノ酸組成は、表 2 の通り、リジンだけでなく、ロイシンの割合も低かった (0.58%) ため、低リジン飼料にもかかわらず、筋肉内脂肪蓄積が起こらなかつた可能性が考えられた。肉質の差別化のため、筋肉内脂肪の高蓄積を目指す場合は、ロイシンを含めたアミノ酸バランスを再検討する必要があると考えられた。また、岩本ら (20) は、水分と粗脂肪の関係は負の相関関係にあると報告しているが、本試験においても、水分含量が低い傾向にあった対照区で粗脂肪含量が高く、水分含量が高い傾向にあった ECEFS 区で対照区より低値を示した。

加熱損失率 (クッキングロス) には、試験区間に有意な差はなかった。加熱損失率とは、加熱調理による損失量を表すもので、この値が低いほど、調理後も多くの水分が残るため、多汁性の高い肉質となる。入江ら (21) は、肉からの水分の滲出性は組織微細構造と関係しており、水分の大部分は毛細管現象によってタンパク質の微細構造内に保持されているため、微細構造がしっかりとした良質な肉では、保水能力が高くなると報告している。畑江 (22) は加熱最終温度が 70°C の場合、加熱損失率は 29.3%と報告している。本試験では全試験区平均で 25.1%であり、畑江らの結果より、やや高い保水能力であった。

剪断値は、肉の柔らかさの指標であり、値が低いほど柔らかい肉質となる。とくに日本においては柔らかい肉質が求められているが、本

試験では、試験区間に有意な差はみられず、ECS, EFS 給与の影響は認められなかった。

筋間脂肪の脂肪酸組成は、対照区において、飽和脂肪酸であるステアリン酸含量が、他区より有意に低かった。豚の脂肪組織の脂肪酸組成は、給与飼料の脂肪酸組成の影響が大きいと考えられている (23)。本試験の飼料設計では、ECS, ECEFS 区は、対照区より、トウモロコシの給与割合が高く、ECS 由来飼料用トウモロコシ穀実に含まれるステアリン酸が筋間脂肪の脂肪酸組成に影響した可能性が考えられた。

背部皮下脂肪中のスカトール含量については、ECS 区と ECEFS 区で、対照区よりも有意に低かった。スカトールやインドールは、トリプトファンの代謝物として腸内で産生され、一般に豚の雄臭の成分として知られているが、雌豚や去勢豚においても生成される (24)。これらは、豚肉の脂肪組織中に存在し、不快なにおいの原因となる物質として知られている (7)。西岡ら (8) は、日本における官能評価の結果、油水混合液中に含まれる 0.03  $\mu\text{g/mL}$  のスカトールを、15 名中 10 名が正しく識別でき、加熱脂肪においても、スカトール 0.05  $\mu\text{g/g}$  の含量で、5 名中 3 名が識別可能であったと報告している。西岡らの報告と、本試験の対照区における背部皮下脂肪中スカトール含量が最大で 40.30  $\text{ng/g}$  であったことを考え合わせると、対照区と ECS 区および ECEFS 区のスカタール含量の違いは、官能的にも違いが識別できた可能性があるかと推察される。Doran ら (25) は、腸内で微生物によって産生されたスカトールは、腸管から吸収され、肝臓で代謝されるが、一部は脂肪組織に蓄積すると報告している。また、スカトールの脂肪への蓄積量は、飼料や飼育環境などの影響を受け、イヌリンやキクイモ

(*Jerusalem artichoke*)、生ポテトデンプン、ルピン種、シュガービートパルプ、チコリ根の給与は、脂肪組織や血液、および糞中のスカトール含量を低下させると報告されている(24)。本試験において、試験終了時の糞便中のスカトール含量を定量したところ、ECS 区、ECEFS 区において、有意でないものの、対照区より低い傾向が認められた。ECS および EFS は、繊維含量が高く、また、サイレージ化したことにより、乳酸菌およびその代謝産物の乳酸を含むため、その給与は、腸内細菌の組成やトリプトファン代謝に作用を及ぼし、糞便中のスカトール産生に影響を与え、結果として、脂肪組織中への蓄積を低下させた可能性が考えられた。

飼料コストは、ECS 生産の利益部分は考慮していないものの、ECS および EFS の配合により、配合飼料のみと比べて、1割以上コストダウンできると試算された。また、体重 1kg 増加させるために必要な生産コストについても、ECS の配合により、抑制に繋がる可能性が示唆された。本試験では、養豚用の一般配合飼料をそのままベースとし、一部、自給飼料で置換する設計としたため、生育面への懸念から ECS の配合量に制限があったが、今後、ECS の栄養成分値に合わせて、その他の飼料原料の配合、組成を設計すれば、更に配合量を高めることができ、より大きなコストメリットを生み出せるかもしれない。

以上より、配合飼料を ECS で 20% (乾物割合) 代替しても、飼料コストを上げることなく、飼料要求率は市販配合飼料のみの肥育と同等で、かつ、その産肉は、脂肪組織中に不快臭の原因となりうるスカトールが少ない肉質であったことから、ECS は肥育豚用飼料として有用であると考えられた。ECEFS 区は、飼料要求率が高く、生産コストの

メリットが減少することから、実用のためには、必須アミノ酸を補うなど、増体を改善する工夫が必要であることが示唆された。さらに今後、肥育豚用の自給飼料原料として ECS の活用を促進するためには、混合飼料への配合割合、給与期間および給与体系の検討のみならず、アミノ酸バランスに配慮したタンパク質系飼料資源の併用等について、検討が必要と考えられた。

## 5. 小括

自給飼料活用の更なる推進のため、北海道で今後生産拡大が見込まれるイアコーンサイレージ（ECS）に着目し、ECS 給与が肥育豚の産肉性に及ぼす影響を検討した。

市販配合飼料を給与した対照区、配合飼料 80% + ECS20%の混合飼料を給与した ECS 区、配合飼料 60% + ECS20% + デンプン粕主体エコフィールドサイレージ（EFS）20%の混合飼料を給与した ECEFS 区を設け、各区に肥育豚（平均 65.4 kg）を 6 頭ずつ割り当て、平均 117.9 kg まで肥育した。飼料要求率は、対照区と ECS 区では同等で、ECEFS 区では全期間平均で高かった。各試験区の肉質は、水分含量、粗脂肪含量、加熱損失率、色調、背脂肪の脂肪酸組成については違いがなく、ECS および EFS を配合しても、遜色のない肉質となることが示唆された。一方、背部皮下脂肪中のスカトール含量は、対照区と比較して ECS 区、ECEFS 区で低かった。

また、飼料コストと飼料要求率の結果から生産コストを試算したところ、乾物割合で 20%の自給 ECS を配合することで、生産費が約 1 割程度抑えられる可能性が示された。

以上から、ECS を配合飼料と乾物 20%置換しても産肉性に影響はなく、生産コストも低減できることが示唆された。肉質についても、慣行飼料と比較して遜色なく、とくに、産肉の不快臭は、ECS の活用により、低減できる可能性が示された。



6. 図表



図 5. イアコーンサイレージ調製の様子

(参考：北海道上川郡美瑛町における作業の様子)

(左上) 収穫期のデントコーン、(右上) 自走式ハーベスタによる収穫  
(左下) 粉碎されたイアコーン、(右下) ロールベアラによる密封梱包



図 6. 学内豚舎における肥育試験の様子

表 1. ECS および EFS の栄養成分値

	ECS	EFS
乾物 (%)	71.5	34.5
TDN <sup>1</sup> (%DM)	75.7	71.8
粗タンパク質 (%DM)	8.5	12.2
中性デタージェント繊維 (%DM)	27.9	30.5
酸性デタージェント繊維 (%DM)	11.8	19.6
酸性デタージェントリグニン (%DM)	3.9	8.2
デンプン (%DM)	64.8	34.7
粗脂肪 (%DM)	4.2	5.6
粗灰分 (%DM)	2.4	4.5
OCC <sup>2</sup> (%DM)	76.1	63.1

<sup>1</sup>TDN : 可消化養分総量

<sup>2</sup>OCC : 細胞内容物質

表 2. 各試験区において給与した混合飼料の栄養成分値

	対照	ECS	ECEFS
乾物 (%)	86.6	79.7	67.8
粗タンパク質 (%DM)	14.7	12.9	12.9
デンプン (%DM)	47.0	49.1	52.7
粗脂肪 (%DM)	3.2	3.2	3.4
粗灰分 (%DM)	4.8	3.7	3.5
OCC <sup>1</sup> (%DM)	79.1	79.5	81.6
アミノ酸組成 (粗タンパク質中%)			
ヒスチジン	1.64	1.38	1.29
イソロイシン	2.52	3.07	2.00
ロイシン	5.55	6.61	4.48
リジン	5.42	5.60	3.95
メチオニン	1.26	1.10	0.63
フェニルアラニン	3.19	3.81	2.30
チロシン	0.56	0.31	0.11
バリン	3.24	3.83	2.72
トレオニン	3.00	3.63	2.36

<sup>1</sup>OCC : 細胞内容物

表 3. 各試験区の生産成績 (飼料摂取量、日増体重、飼料要求率)

	対照	ECS	ECEFS	SEM <sup>1</sup>	P 値
飼料摂取量 (kg DM/頭/day)					
0-2 weeks	2.67 <sup>a</sup>	2.72 <sup>a</sup>	2.51 <sup>b</sup>	0.03	< 0.01
3-4 weeks	2.77 <sup>b</sup>	2.83 <sup>a</sup>	2.75 <sup>b</sup>	0.01	< 0.01
5-6 weeks	2.87	2.93	2.82	0.04	0.14
7 week	2.94 <sup>b</sup>	3.03 <sup>a</sup>	2.92 <sup>c</sup>	0.00	< 0.01
Total period	2.80 <sup>a</sup>	2.86 <sup>a</sup>	2.73 <sup>b</sup>	0.02	< 0.01
日増体重 (kg/頭/day)					
0-2 weeks	0.94 <sup>a</sup>	0.95 <sup>a</sup>	0.74 <sup>b</sup>	0.04	< 0.01
3-4 weeks	0.90	0.83	0.80	0.09	0.73
5-6 weeks	0.83	0.94	0.66	0.11	0.27
7 week	0.91	0.89	0.81	0.06	0.53
Total period	0.89	0.90	0.75	0.18	0.06
飼料要求率 (飼料摂取量/日増体重)					
0-2 weeks	2.84 <sup>b</sup>	2.86 <sup>b</sup>	3.40 <sup>a</sup>	0.02	< 0.01
3-4 weeks	3.07	3.42	3.43	0.17	0.18
5-6 weeks	3.47 <sup>b</sup>	3.12 <sup>b</sup>	4.25 <sup>a</sup>	0.12	< 0.01
7 week	3.23 <sup>b</sup>	3.42 <sup>ab</sup>	3.60 <sup>a</sup>	0.06	< 0.01
Total period	3.14 <sup>b</sup>	3.18 <sup>b</sup>	3.63 <sup>a</sup>	0.02	< 0.01

<sup>1</sup>Standard error of the mean<sup>a,b</sup>の異なる記号間で有意差あり ( $P < 0.05$ )

表 4. 各試験区の枝肉成績

	対照	ECS	ECEFS	SEM <sup>1</sup>	<i>P</i> 値
出荷体重 (kg)	118.00	121.40	114.43	2.00	0.08
枝肉重量 (kg)	77.25 <sup>ab</sup>	79.17 <sup>a</sup>	73.10 <sup>b</sup>	1.46	0.03
枝肉割合 (%)	65.48	65.21	63.87	0.46	0.06
背脂肪厚 (cm)	2.00	2.15	2.18	0.09	0.30

<sup>1</sup>Standard error of the mean

<sup>a,b</sup>の異なる記号間で有意差あり ( $P < 0.05$ )

表 5. 各試験区の肉質

		対照	ECS	ECEFS	SEM <sup>1</sup>	P 値
水分割合 (%)		71.53	72.21	72.97	0.63	0.30
粗脂肪 (%)		4.35	4.11	3.33	0.66	0.53
加熱損失率 (%)		24.63	25.50	25.11	0.18	0.12
剪断値 (kg/cm <sup>2</sup> )		2.32	2.66	2.26	0.49	0.50
L <sup>*</sup> a <sup>*</sup> b <sup>*</sup> (胸最長筋)						
L <sup>*</sup>		53.20	54.57	53.30	0.65	0.29
a <sup>*</sup>		6.38	5.82	5.11	0.52	0.26
b <sup>*</sup>		9.00	9.15	9.58	0.49	0.70
L <sup>*</sup> a <sup>*</sup> b <sup>*</sup> (背部皮下脂肪)						
L <sup>*</sup>		77.07	77.14	77.40	0.58	0.91
a <sup>*</sup>		2.71	2.26	2.35	0.26	0.46
b <sup>*</sup>		9.38	8.54	7.80	0.57	0.18
脂肪酸組成 (%)						
背部皮下脂肪	C14:0	1.24	1.16	1.20	0.06	0.66
	C16:0	26.63	26.34	26.30	0.58	0.90
	C16:1	1.72	1.52	1.56	0.10	0.39
	C18:0	14.82	15.69	15.15	0.55	0.53
	C18:1	44.97	44.97	44.55	0.80	0.91
	C18:2	10.62	10.32	11.24	0.43	0.33
	USFA <sup>2</sup>	57.31	56.81	57.35	0.97	0.91
筋間脂肪	C14:0	1.36	1.26	1.30	0.06	0.50
	C16:0	27.79	27.74	27.72	0.50	1.00
	C16:1	2.13	1.72	1.75	0.14	0.09
	C18:0	14.03 <sup>b</sup>	15.80 <sup>a</sup>	15.67 <sup>a</sup>	0.50	0.04
	C18:1	45.74	44.93	43.89	0.66	0.17
	C18:2	8.95	8.55	9.67	0.32	0.07
	USFA <sup>2</sup>	56.82	55.20	55.31	0.70	0.22

<sup>1</sup> Standard error of the mean

<sup>2</sup> USFA : 不飽和脂肪酸

<sup>a,b</sup>の異なる記号間で有意差あり ( $P < 0.05$ )

表 6. 背脂肪および糞便中のインドール、スカトール含量

	対照	ECS	ECEFS	SEM <sup>1</sup>	<i>P</i> 値
背部皮下脂肪					
インドール (ng/g)	11.64	13.94	15.09	1.33	0.59
スカトール (ng/g)	26.07 <sup>a</sup>	10.48 <sup>b</sup>	9.86 <sup>b</sup>	2.77	0.01
糞便					
インドール (μg/g)	3.72	2.22	3.82	0.39	0.18
スカトール (μg/g)	10.74	4.82	5.17	1.19	0.07

<sup>1</sup>Standard error of the mean

<sup>a,b</sup>の異なる記号間で有意差あり ( $P < 0.05$ )



## 第Ⅱ章 サイレージ由来乳酸菌の免疫活性化能の評価

### 1. 序論

2013年度の肥育豚生産費のうち、「獣医師料および医薬品費」は5.6%を占める（畜産物生産費調査）にも関わらず、近年でも、ウイルスや細菌感染に起因する呼吸器および消化器系疾病は慢性的に発生しており、農場における豚の病死や生育不良の発生は、養豚経営の大きなリスクとなっている。衛生対策として、養豚現場では、病原体に対するワクチンや抗菌剤の注射による疾病の予防、治療に加え、抗菌性飼料添加物の日常的な使用が行われている（26）。抗菌性飼料添加物の使用は、生産性を低下させる細菌感染性疾病を抑制し、腸内細菌叢を適正に保ち、栄養成分の利用性を高めるために有効で、日本科学飼料協会の試算によれば、抗菌性飼料添加物を廃止した場合、国内養豚の経済損失は約453億円になると算出されている（27）。しかしながら、近年、欧州において、ヒトにおける薬剤耐性菌の出現と家畜生産で使用する抗菌性飼料添加物との関係性が指摘され、2006年1月より、欧州連合では、成長促進を目的とする抗菌性飼料添加物等の使用が禁止された（28）。国内においても、抗菌性飼料添加物に替わる、新たな感染防御、成長促進の手段が実用化すれば、生産現場における意義は大きいと考えられる。

乳酸菌は、ヒトや家畜の腸内細菌叢を構成する主要な微生物の1つであるが、経口摂取により、宿主に様々な健康機能性をもたらすことが明らかになっている（29）。主要な健康機能性の一つとして、宿主の

免疫機能を向上し、病原体に対する感染防御能を高める効果が挙げられる (30)。マウスにおける感染実験により、Kikuchi らは、インフルエンザウイルス感染について (31)、Castillo らは、*Salmonella Typhimurium* 感染について (32)、*Lactobacillus* 属の経口投与により、致死率が著しく低下することを報告している。豚における乳酸菌の給与試験でも、*L. brevis* や *L. fermentum* の給与は、腸内のサイトカイン産生パターンを変化させることから、家畜の免疫機能を高める手段となる可能性が示されている (33, 34, 35)。

摂取した乳酸菌は、宿主の小腸などに局在するリンパ組織、パイエル板の M 細胞を通過して取り込まれ、パイエル板内に存在するマクロファージや樹状細胞に認識されることにより、宿主免疫系に対する生理作用を発揮すると考えられている (36)。免疫細胞が乳酸菌を認識するための受容体として、Toll-like receptor (TLR) がある。乳酸菌では、細胞壁構成成分であるリポテイコ酸 (LTA) が TLR2 に (37, 38)、乳酸菌 DNA の CpG モチーフが TLR9 に認識されうる (39) ことが報告されている。

いくつかの特定の乳酸菌株では、生体への給与や細胞への添加により、マクロファージや樹状細胞から産生されるサイトカイン Interleukin (IL) -12 の産生を誘導すると報告されている (40, 41)。IL-12 は、自然免疫系を担当するナチュラルキラー (NK) 細胞の活性化を引き起こす (42, 43)。活性化した NK 細胞は、グランザイムやパーフォリンを含む細胞傷害性顆粒をウイルスや病原体に感染した細胞に向けて分泌し、アポトーシスに陥らせ、適応免疫系において抗原特異的な防御反応が誘導されるまで、感染拡大を制御する役割を担っている (44)。ま

た、IL-12 は、ナイーブ CD4 陽性 T 細胞を Th1 細胞へ分化させる。分化した Th1 細胞は、感染したマクロファージを細胞接着と局所での Interferon (IFN) - $\gamma$  分泌により活性化させる (45)。このように、IL-12 の産生亢進は、細胞性免疫の活性化に深く寄与することから、乳酸菌の免疫活性化能を評価する場合に、重要なターゲットとなりうると考えられる。

乳酸菌は、乳製品、農産物、発酵食肉製品など、様々な食品の加工用微生物として能動的に活用されてきた (46)。畜産分野においても、乳酸菌は、牧草やコーンサイレージの発酵過程に主役として関わっており、嫌気条件下で速やかに増殖し、乳酸生成により原料植物の pH を低下させ、飼料原料へ保存性を付与する (47)。日本の畜産業の中で、反芻家畜は、牧草や飼料とうもろこしを原料としたサイレージの給与を通して、日常的に乳酸菌を摂取している (48)。養豚においても、生菌製剤としての給与は一般的に行われているが、免疫細胞活性化能を有する乳酸菌をサイレージ発酵過程で意図的に増殖させ、日常的に摂取させることができれば、手間や経済的負担の少ない感染症の予防手段となる可能性も考えられる。

一般的に、植物性の材料を基質とした場合、栄養成分の偏りや阻害成分の存在から、増殖適性のある乳酸菌種は限定されることが考えられている (46)。発酵乳などの加工用として使われる腸内や食品由来の乳酸菌では、複数の菌株について、ヒトの摂取による IL-12 の産生や NK 細胞の活性化が報告されているが (49, 50)、植物性基質であるサイレージに由来する乳酸菌については、ウシへの酵母と *L. plantarum* の同時投与により接種した大腸菌ワクチンの抗体価を高めたという報告

(48) はあるものの、菌株間で自然免疫の活性化能を比較した報告はない。本章では、畜産フィールド科学センターにおいて、牧草およびトウモロコシを原料として調製されたサイレージから乳酸菌を分離し、加熱死菌体の免疫細胞活性化について、マウス脾臓細胞を用いた *in vitro* 試験系における IL-12 産生誘導能を指標にスクリーニングした。また、選抜株については、マウスマクロファージ株を用い、炎症性サイトカイン産生や NO 産生、増殖活性について検討した。

## 2. 材料と方法

### サイレージからの乳酸菌の単離

帯広畜産大学畜産フィールド科学センターで 2013 年度に製造されたグラスサイレージ（オーチャードグラス、クローバー、チモシー、アルファルファの混合サイレージ）、ホールクロップコーンサイレージ、および ECS から乳酸菌を単離した（図 7）。各サイレージ 25 g を秤量し、生理食塩水（0.9% NaCl）を 225 mL 添加後、ストマッカー（Mix 1, Aes Laboratoire, Combours, France）で 60 秒の処理を行い、各サイレージの懸濁液とした。分離用培地として、酢酸を 3.7%（v/v）、Lab-lemco powder（Oxoid, Basingstoke, UK）を 0.8%（w/v）添加して乳酸菌の選択性を高めた変法 LBS 寒天培地（51）（BD-Difco, Sparks, MD, USA）、deMan, Rogosa, and Sharpe（MRS）寒天培地（BD-Difco）、BCP 加プレートカウント寒天培地（日水製薬, 東京）を用い、各サイレージの懸濁液を塗抹後、嫌気条件下、37°C で 48 時間培養し、出現したコロニーを釣菌して同様の寒天培地に接種して分離した。

### 菌種の同定

分離菌株の菌種の同定は、16S rDNA 遺伝子配列に基づき行った。各菌株を 1 mL の MRS broth（BD-Difco）を用いて、37°C、48 時間培養後、遠心分離で集菌し、PrepMan Ultra Reagent（Applied Biosystems, Waltham, MA, USA）を 200  $\mu$ L 添加後、攪拌した。沸騰水中で 10 分間ボイルしたのち、遠心分離した上清を採取し、鋳型 DNA とした。PCR（C1000; Bio-rad, Hercules, CA, USA）は、ユニバーサルプライマー 10F:

5'-GTTTGATCCTGGCTCA-3'、800R: 5'-TACCAGGGTATCTAATCC-3'、および、KOD FX-Neo DNA ポリメラーゼ（東洋紡、東京）を用いて、94°C for 2 min→98°C for 10 sec, 55°C for 30 sec, 68°C for 60 sec; 35cycle →68°C for 7 min の条件で行った。PCR 産物は、1.5%アガロースゲル電気泳動で増幅を確認後、QIA quick PCR Purification Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて精製した。Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) によるシーケンス反応後、ABI3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を解読し、DNAsis Pro ソフトウェア ver.3.0 (Hitachi, 東京) を用いて配列データの解析を行った。表 8 に分離菌株と実験の比較に使用した基準株を示す。基準株は、Japan Collection of Microorganisms (JCM) もしくは American type Culture Collection (ATCC) から入手した。

### 加熱死菌体の調製

分離乳酸菌株は、MRS broth (BD-Difco) で 37°C、48 時間培養後、滅菌水で 2 回洗浄し、100°C で 30 分間加熱殺菌した。これを 24 時間凍結乾燥 (FDU-2100; 東京理化工機、東京) した後、2 mg/mL の濃度で PBS に懸濁し、-80°C で保管した。

### マウス

オス BALB/c マウスを日本クレア（東京）から購入した。すべての実験は、6-8 週齢のマウスを用い、「国立大学法人帯広畜産大学動物実験等に関する規定」を順守して行った。

## 細胞培養

マウスを頸椎脱臼で安楽死させた後、脾臓細胞を採取し、ACK Lysing buffer を用いて赤血球を溶血処理して除去した。脾臓細胞もしくはマウスマクロファージ様細胞株 J774.1 細胞 (Riken cell bank, 茨城) は、37°C、5% CO<sub>2</sub> 下で、10% FBS (BioWest, Nuaille, France)、50 U/mL penicillin-50 µg/mL streptomycin (Gibco, Auckland, NZ)、50 µM 2-mercaptoethanol (ICN Biomedicals, Aurora, OH, USA) を含む RPMI 1640 培地 (SIGMA, St. Louis, MO, USA) を用いて培養を行った。

## サイトカイン濃度の定量

採取した脾臓細胞 (2.5 x 10<sup>6</sup> cells/mL) を 96 ウェルプレート (Nunc, Roskilde, Denmark) に播種し、加熱殺菌された乳酸菌体をそれぞれのウェルに最終濃度 10 µg/mL で添加した。一定時間培養した後、上清を採取し、mouse IL-12 p70 および mouse IFN-γ enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用いて、サイトカイン濃度の定量を行った。測定は、製品プロトコールに則り、マイクロプレートリーダー (GENios Pro ; X-Fluor 4 software, Tecan, Männedorf, Switzerland) にて 450 nm の吸光度を測定し、算出した。

## Total RNA 抽出と定量 real-time PCR 解析

J774.1 細胞 (5 x 10<sup>5</sup> cells/mL) を 24 ウェルプレート (Nunc) に播種し、48 時間培養した。その後、培地を交換し、乳酸菌を最終濃度 100 µg/mL となるように加えた。一定時間培養した後、0.25%トリプシン-

EDTA (Gibco) を加えて J774.1 細胞を剥離・採取し、QIAshredder (QIAGEN) でホモジェナイズ後、RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて total RNA を抽出した。Total RNA の濃度と純度は、Nanodrop 1000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を用い、260 nm と 280 nm の吸光度値から確認した。Tumor necrosis factor(TNF)- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-12 p40、inducible nitric oxide synthase (iNOS) の mRNA 量の測定のため、表 7 に記した配列の各プライマーおよび One-Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (タカラバイオ, 京都) を用い、LightCycler480 II (Roche, Upper Bavaria, Germany) で定量 real-time PCR 解析を行った。One-step real-time PCR は、逆転写反応 (42°C for 5 min, 95°C for 10 sec)、PCR 反応 (95°C for 5 sec, 60°C for 20 sec; 40 cycle)、融解曲線分析 (95°C for 1 sec, 65°C for 15 sec, 95°C for 1 sec) の条件で行った。mRNA 発現レベルの算出は、glyceraldehyde phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA を内部標準として、比較 Ct 法で行った。

### 一酸化窒素 (NO) の定量

J774.1 細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/mL) を 24 ウェルプレートに播種し、48 時間培養した。その後、培地を交換し、乳酸菌を最終濃度 100  $\mu$ g/mL となるように加えた。72 時間培養して上清を採取し、800 x g、15 分間遠心分離後、上清を得た。NO<sub>2</sub>/NO<sub>3</sub> Assay Kit-C II (同仁化学研究所, 熊本) を用い、製品プロトコールに従って 550 nm の吸光度を測定し、上清中の NO<sub>2</sub><sup>-</sup>濃度を算出した。



## 細胞増殖解析

J774.1 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/mL) を 96 ウェルプレートに播種し、乳酸菌を最終濃度 10  $\mu\text{g/mL}$  となるように加えた。24 時間培養後、Cell counting kit-8 (同仁化学研究所) を用い、製品プロトコールに従って 450 nm の吸光度 (GENios Pro, Tecan) を測定し、細胞増殖を評価した。

## 統計解析

それぞれの結果は、平均 $\pm$ 標準偏差 (SD) で表した。統計解析は、SAS 9.3 software (SAS institute) を用い、菌株を要因とした一元配置分散分析を行った。  $P < 0.05$  のとき、差が有意であると判定し、Turkey の多重比較検定を行った。

### 3. 結果

#### サイレージからの乳酸菌の単離

サイレージから単離した乳酸菌株のリストを表 8 に示した。組成の異なる 3 種類の培地を用いて、合計 17 株の *Lactobacillus* 属菌、3 種類の *Pediococcus* 属菌を単離した。最も多く単離された菌種は、*L. plantarum* (計 6 株) で、その他は、*L. buchneri* (計 2 株) を除き、すべて異なる菌種であった。

#### 乳酸菌株による脾臓細胞からの IL-12 産生誘導

本研究で単離したサイレージ由来乳酸菌 20 株および基準株 9 株について、加熱死菌体の添加後、マウス脾臓細胞から産生された培養上清中の IL-12 (p70) を定量した (図 8)。全 29 株の IL-12 量の平均値は 91.9 pg/mL であった。基準株の中では、*L. salivarius* JCM1231 株が際立って高い IL-12 誘導能を示した (444.6 pg/mL)。サイレージ由来乳酸菌では、*L. coryniformis subsp. torquens* GB1 株が、IL-12 の産生を最も強く誘導した (416.5 pg/mL)。球菌である *Pediococcus* 属では、*P. pentosaceus* GOM1 株に比較的高い IL-12 誘導能が認められた (186.5 pg/mL)。複数の菌株を評価した *L. plantarum* については、IL-12 の産生誘導能が菌株間で大きく異なる結果であったが、その中では、CL1 株に高い誘導が認められた (149.0 pg/mL)。本結果から、免疫活性化能が期待される *L. coryniformis subsp. torquens* GB1 株、*P. pentosaceus* GOM1 株、*L. plantarum* CL1 株を選抜し、ポジティブコントロール (*L. salivarius* JCM1231 株) および、ネガティブコントロール (*L. sunkii* CM1

株) とともに、以降の実験に用いた。

### 乳酸菌株による IFN- $\gamma$ 産生誘導

GB1 株、GOM1 株、CL1 株の添加が、マウス脾臓細胞からの IFN- $\gamma$  産生に与える影響を図 9 に示した。培養上清への IFN- $\gamma$  の産生は、GB1 の添加で、最も強い誘導が起こり (44.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、CL1 株 (37.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )、GOM1 株 (25.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) においても、乳酸菌未添加 (0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) および CM1 株 (4.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 添加と比較して、産生が亢進した。

### 乳酸菌株による炎症性サイトカイン mRNA の発現誘導

図 8 の結果に基づき選抜した GB1 株、GOM1 株、CL1 株について、J774.1 細胞への添加により誘導された炎症性サイトカイン mRNA の発現誘導レベルを評価した (図 10)。IL-12 については、GB1 株と GOM1 株が同等に高い mRNA の発現誘導を示した。また、GB1 株、GOM1 株、CL1 株いずれについても、乳酸菌未添加もしくはネガティブコントロールとした CM1 株と比較して、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の mRNA 発現レベルが亢進した。

### 乳酸菌株による NO 産生誘導

GB1 株、GOM1 株、CL1 株の添加が、J774.1 細胞からの NO 産生に与える影響を図 11 に示した。誘導型 NO 合成酵素である iNOS の mRNA 発現量は、GB1、GOM1 株添加により乳酸菌未添加および CM1 株添加と比較して、発現を亢進した。培養上清中の NO 産生量についても、GB1 (5.79  $\mu\text{M}$ )、GOM1 株 (5.23  $\mu\text{M}$ ) の添加により、乳酸菌未添加 (0.74

μM) および CM1 株 (1.02 μM) 添加と比較して、高濃度であった。CL1 株は、iNOS 発現量および NO 産生量 (1.64 μM) のいずれにおいても、乳酸菌未添加および CM1 株と比較して差は認められなかった。

#### 乳酸菌株による細胞増殖誘導

GB1 株、GOM1 株、CL1 株の添加が、J774.1 細胞の細胞増殖に与える影響を図 12 に示した。GB1、GOM1、CL1 株については、乳酸菌未添加および CM1 株と比較して、細胞増殖を亢進していたが、JCM1231 株も含めて、その程度は同等であった。CM1 株においても、乳酸菌未添加に比べて細胞増殖を亢進した。

## 6. 考察

帯広畜産大学畜産フィールド科学センターで生産された牧草およびトウモロコシを原料としたサイレージから、20 菌株の乳酸菌を分離した。一般的に、サイレージの発酵過程において、発酵初期には乳酸球菌が、後期には乳酸桿菌が優勢になると報告されている (52)。本試験で単離した乳酸菌は、乳酸桿菌である *Lactobacillus* 属が 20 株中 17 株と多くを占め、3 株が乳酸球菌の *Pediococcus* 属であった (表 8)。この偏りは、いずれも発酵が十分に進んだ完成サイレージを分離源としたことに起因すると考えられた。

本研究では、乳酸菌加熱死菌体の添加によるマウス脾臓細胞からの IL-12 産生誘導能に基づき、全 20 菌株から *L. coryniformis subsp. torquens* GB1 株、*P. pentosaceus* GOM1 株、*L. plantarum* CL1 株の 3 株を選抜した。IL-12 の産生能は、乳酸菌を同一濃度 (10 µg/mL) で添加した場合でも、菌株によって違いは顕著で (図 8)、6 株存在した *L. plantarum* の各菌株の産生能を比較しても、菌株によって IL-12 産生量は大きく異なった。同一菌種間でも、マウス免疫細胞からの IL-12 の産生誘導能が異なることは、既報と一致しており (53, 54)、乳酸菌株が免疫系に与える影響を評価するためには、菌種ではなく、菌株単位でのスクリーニングが重要であることが確認された。Willem (55) は、菌体成分である LTA の側鎖を修飾する D-alanine を産生しない *L. plantarum* の変異株では、単球からの IL-12 p70 の産生誘導能が低下したと報告しており、菌株間の LTA の成分組成、とくに D-alanine 含量の違いが、IL-12 の産生誘導能に影響を与えているかもしれない。

選抜した GB1、GOM1、CL1 の 3 株は、マウス脾臓細胞からの IFN- $\gamma$  の産生を誘導した (図 9)。IFN- $\gamma$  は、マクロファージや細胞傷害性 T 細胞の活性化に働くサイトカインで (56)、NK 細胞や Th1 細胞から産生される (57)。選抜した 3 株の乳酸菌の添加により、IL-12 の産生亢進を経て、脾臓細胞中に存在する NK 細胞の活性化やナイーブ CD4 陽性 T 細胞の Th1 細胞への分化が誘導されたと考えられた。

IL-12 産生誘導能で選抜した 3 株は、マウスマクロファージ様細胞である J774.1 細胞から、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$  の mRNA 発現を誘導した (図 10)。これらのサイトカインの産生は、マクロファージの古典的活性化により起こることから (58)、3 株の乳酸菌の添加により、J774.1 細胞は、M1 マクロファージへ分極が誘導されたことが示唆された。TNF- $\alpha$  は、広範な生理作用をもつサイトカインで、感染局所に宿主防御に働く体液、蛋白、細胞を動員させるとともに、炎症反応の初期において、食細胞の貪食能や活性酸素産生能などを高める (59, 60)。IL-6 は、腸管のパイエル板細胞における B 細胞の分化段階において、IgA 産生前駆細胞から形質細胞への成熟に関与し、IgA 産生を亢進する (61, 62)。IL-1 $\beta$  は、T 細胞における CD40 リガンドや OX40 の発現を誘導し (63)、B 細胞、単球やマクロファージを活性化する (64, 65)。加えて、これらの炎症性サイトカインは相乗的に働き、オプソニン化や補体活性化に寄与する急性期蛋白 (C reactive protein など) の肝細胞からの産生を誘導するとともに、発熱に関与して宿主防御に働く (66)。

また、J774.1 細胞への GB1 株、GOM1 株の添加により、iNOS の mRNA 発現および培養上清への NO の分泌が亢進した (図 11)。NO は、マク

ロファージの活性化に伴い、一酸化窒素合成酵素である iNOS の働きで酸素とアルギニンから合成され、その毒性により、貪食した病原体の殺菌に寄与する (67, 68)。

以上をまとめると、選抜した 3 株の乳酸菌は、以下のメカニズムで免疫細胞の活性化を引き起こすことが示唆された。乳酸菌刺激により、TLR を介して古典的活性化し、M1 マクロファージへ分極化する。活性化したマクロファージは、IL-12、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 を産生し、CL1 株を除いては NO の産生も誘導する。これらの産生により、炎症反応が惹起され、病原体感染からの宿主防御に寄与する。さらに、IL-12 の作用により、NK 細胞を活性化させ、IFN- $\gamma$  を産生させるとともに、CD4 陽性 T 細胞を Th1 細胞へ分化誘導して IFN- $\gamma$  の産生を亢進させる。また、IL-6 の産生誘導により、腸管における感染防御に重要な IgA の産生も亢進するかもしれない。

*in vitro* 実験において、ヒト末梢血単核球 (PBMC) への刺激により IFN- $\gamma$ 、IL-1 $\beta$  および TNF- $\alpha$  の産生誘導が確認されている *L. casei shirota* 株 (69) は、マウスへの給与により、縦隔リンパ節の IL-12 の産生を誘導し、インフルエンザウイルス感染実験における致死率を有意に抑制した (70)。同様に、*in vitro* 実験において、マウスパイエル板細胞からの IL-12、IL-6、IFN- $\gamma$ 、IgA 産生を高める特徴を示した *L. gasseri* TMC0356 株および *L. rhamnosus* GG 株についても、マウスへの給与によりインフルエンザウイルスの感染症状を緩和したと報告されている (71)。本研究で選抜した乳酸菌については、動物への給与による効果検証は未実施であるが、これら既報の乳酸菌株の *in vitro* 実験でのサイトカイン誘導パターンは、本研究で選抜した 3 株の乳酸菌のパターン

と類似することから、給与により、同様に感染防御能を発揮する可能性も期待される。

このように、本章では、牧草およびとうもろこしサイレージを分離源に乳酸菌を単離し、マウス免疫細胞からの IL-12 の産生誘導能に従い、免疫活性化を期待できる乳酸菌株を選抜した。*Lactobacillus* や *Pediococcus* は、乳酸菌の中でも食習慣が豊富な属であり、また、これらの菌株の分離源は、実際に家畜に給与されたサイレージであることから、一般的に安全性は高いと考えられる。豚への給与試験は今後の課題となるが、前提として、選抜したこれらの乳酸菌により、豚に給与可能なサイレージ飼料を調製できるかが重要である。そこで、次章では、選抜した *L. coryniformis subsp. torquens* GB1 株、*P. pentosaceus* GOM1 株、*L. plantarum* CL1 株の 3 株を用いてイアコーンを材料としたサイレージ発酵試験を行った。



## 5. 小括

サイレージ飼料中で生息する乳酸菌について、免疫活性化能を有する菌株を選抜するため、牧草およびトウモロコシサイレージから乳酸菌を分離し、マウス免疫細胞を用いて、サイトカイン産生誘導能を評価した。

畜産フィールド科学センターで調製された牧草およびトウモロコシを材料草としたサイレージから、*Lactobacillus* 属株 17 株、*Pediococcus* 属株 3 株を単離した。これら計 20 株の加熱死菌体を調製し、マウス脾臓細胞への添加により、IL-12 産生を強く誘導する乳酸菌株として、*L. coryniformis subsp. torquens* GB1 株、*P. pentosaceus* GOM1 株、*L. plantarum* CL1 株の 3 株を選抜した。これら 3 株は、マウス脾臓細胞からの IFN- $\gamma$  の産生を誘導するとともに、マウスマクロファージ様 J774.1 細胞において、炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 の mRNA の発現を誘導し、GB1 株と GOM1 株については、一酸化窒素 (NO) の産生も亢進した。

これらのことから、選抜した乳酸菌は、マクロファージや NK 細胞の活性化や、Th1 細胞の分化誘導を引き起こし、宿主の細胞性免疫の増強に繋がる可能性が示された。今後、動物や豚への給与試験により免疫力向上に伴う感染防御能を明らかにする必要があると考えられる。

## 6. 図表



図7. 乳酸菌分離源として用いた各種サイレージ

左：グラスサイレージ（オーチャードグラス、クローバー、チモシー、アルファルファの混合サイレージ）

中：ホールクロップコーンサイレージ（トウモロコシ全体のサイレージ（茎葉と雌穂））

右：ECS（トウモロコシ雌穂のサイレージ）

表 7. 定量 real-time PCR で使用したプライマー配列

プライマー		配列
GAPDH	Forward	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3'
	Reverse	5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'
TNF- $\alpha$	Forward	5'-TATGGCCCAGACCCTCACA-3'
	Reverse	5'-GGAGTAGACAAGGTACAACCCATC-3'
IL-12 p40	Forward	5'-CACATCTGCTGCTCCACAAGAA-3'
	Reverse	5'-CCAGCCATGAGCACGTGAA-3'
IL-1 $\beta$	Forward	5'-TCCAGGATGAGGACATGAGCAC-3'
	Reverse	5'-GAACGTCACACACCAGCAGGTTA-3'
IL-6	Forward	5'-GTCACAGAAGGAGTGGCTA-3'
	Reverse	5'-AGAGAACAACATAAGTCAGATACC-3'
iNOS	Forward	5'-GTGGTGACAAGCACATTTGG-3'
	Reverse	5'-AAGGCCAAACAGCATAACC-3'

表 8. 本試験で単離した乳酸菌および基準株として使用した乳酸菌の一覧

株ID	菌種	分離源	分離培地	コレクション
GL1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Glass silage	Modified LBS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
GL2	<i>Lactobacillus buchneri</i>	Glass silage	Modified LBS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
GL3	<i>Lactobacillus camelliae</i>	Glass silage	Modified LBS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
GM1	<i>Lactobacillus collinoides</i>	Glass silage	MRS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
GM2	<i>Pediococcus ethanolidurans</i>	Glass silage	MRS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
GMN1	<i>Lactobacillus acidipiscis</i>	Glass silage	MRS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
GB1	<i>Lactobacillus coryniformis</i> subsp. <i>torquens</i>	Glass silage	BCP-added plate count agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
GOL1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Glass silage	Modified LBS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
GOM1	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Glass silage	MRS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
GOM2	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Glass silage	MRS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
GOB1	<i>Lactobacillus brevis</i>	Glass silage	BCP-added plate count agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
CL1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Whole clop corn silage	Modified LBS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
CL2	<i>Lactobacillus casei</i>	Whole clop corn silage	Modified LBS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
CM1	<i>Lactobacillus sunkii</i>	Whole clop corn silage	MRS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
CM2	<i>Lactobacillus harbinensis</i>	Whole clop corn silage	MRS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
CMN1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Whole clop corn silage	MRS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
CMN2	<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	Whole clop corn silage	MRS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
CMN3	<i>Lactobacillus pentosus</i>	Whole clop corn silage	MRS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
EL1	<i>Lactobacillus buchneri</i>	Ear corn silage	Modified LBS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
EM1	<i>Pediococcus cellicola</i>	Ear corn silage	MRS agar	Obihiro university of agriculture and veterinary medicine
JCM1059	<i>Lactobacillus brevis</i>	Human feces		Japan collection of microorganisms
JCM1149	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i>	Pickled cabbage		Japan collection of microorganisms
JCM6124	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	Fermentating olives		Japan collection of microorganisms
JCM8132	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Dental caries		Japan collection of microorganisms
JCM1231	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Human saliva		Japan collection of microorganisms
JCM1022	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Human intestine		Japan collection of microorganisms
JCM1129	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	Pickled cabbage		Japan collection of microorganisms
ATCC53103	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Human feces		American Type Culture Collection
ATCC33316	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Dried beer yeast		American Type Culture Collection

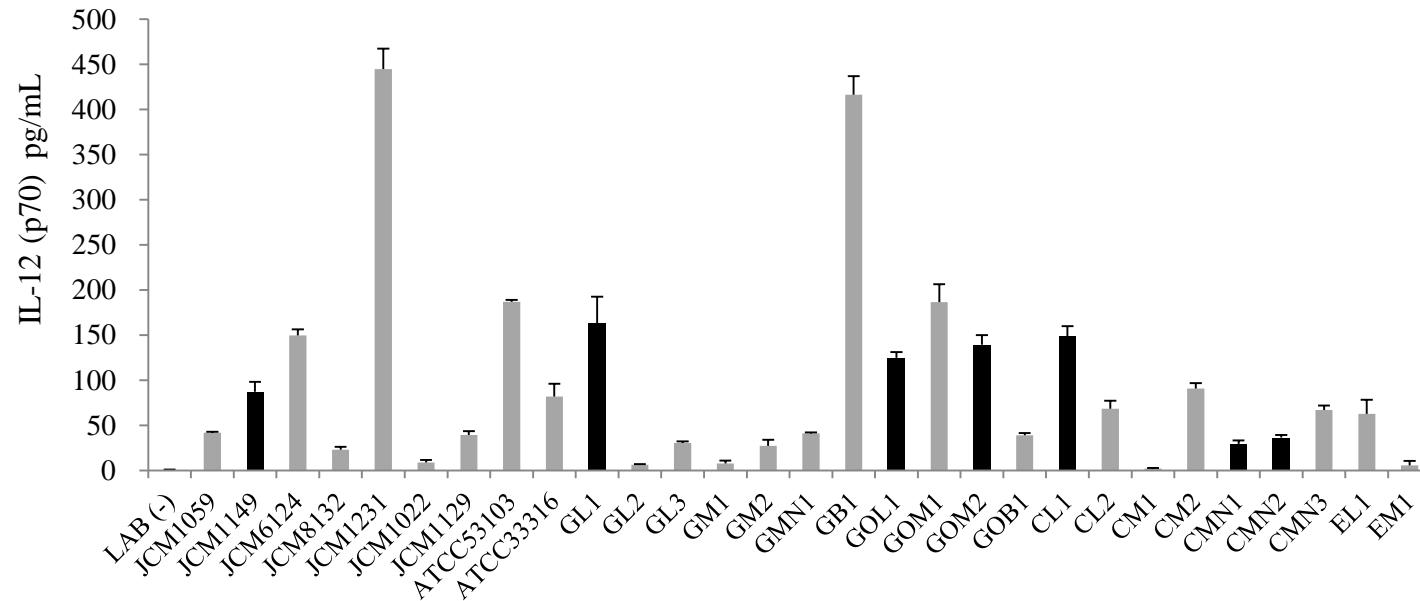


図 8. サイレージ分離乳酸菌によるマウス脾臓細胞からの IL-12 産生

各乳酸菌加熱死菌体 (10  $\mu\text{g/mL}$ ) をマウス脾臓細胞 ( $2.5 \times 10^6$  cells/mL) に添加して培養した。24 時間後の培養上清中の IL-12 (p70) を ELISA 法により定量した。*L. plantarum* に属する 6 株のみ、黒色のバーで示した。3 連の培養で得られた結果を平均 $\pm$ 標準偏差で表した。

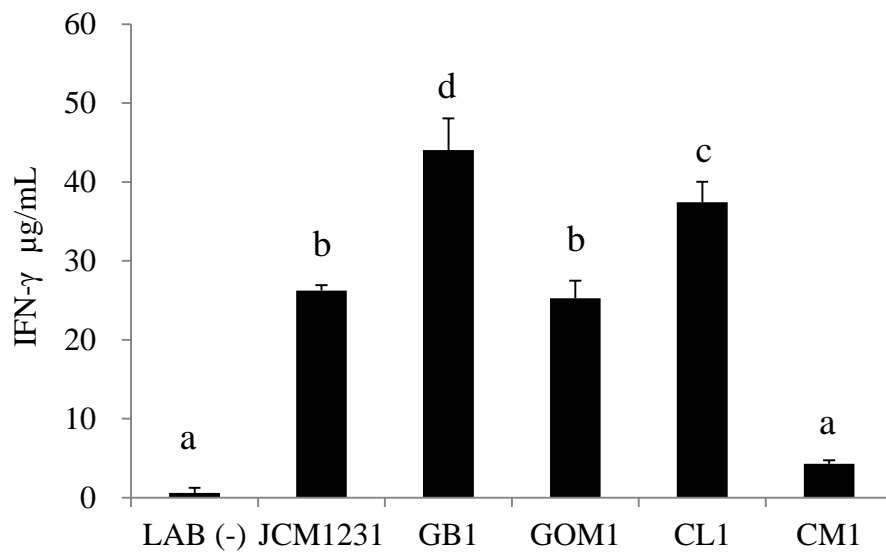


図 9. 選抜乳酸菌株によるマウス脾臓細胞からの IFN- $\gamma$  産生

各乳酸菌加熱死菌体 (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) をマウス脾臓細胞 ( $2.5 \times 10^6$  cells/mL) に添加して培養した。72 時間後の培養上清中の IFN- $\gamma$  を ELISA 法により定量した。3 連の培養で得られた結果を平均 $\pm$ 標準偏差で表した。a-d の異なる記号の菌株間で、有意差を示した ( $P < 0.05$ )。

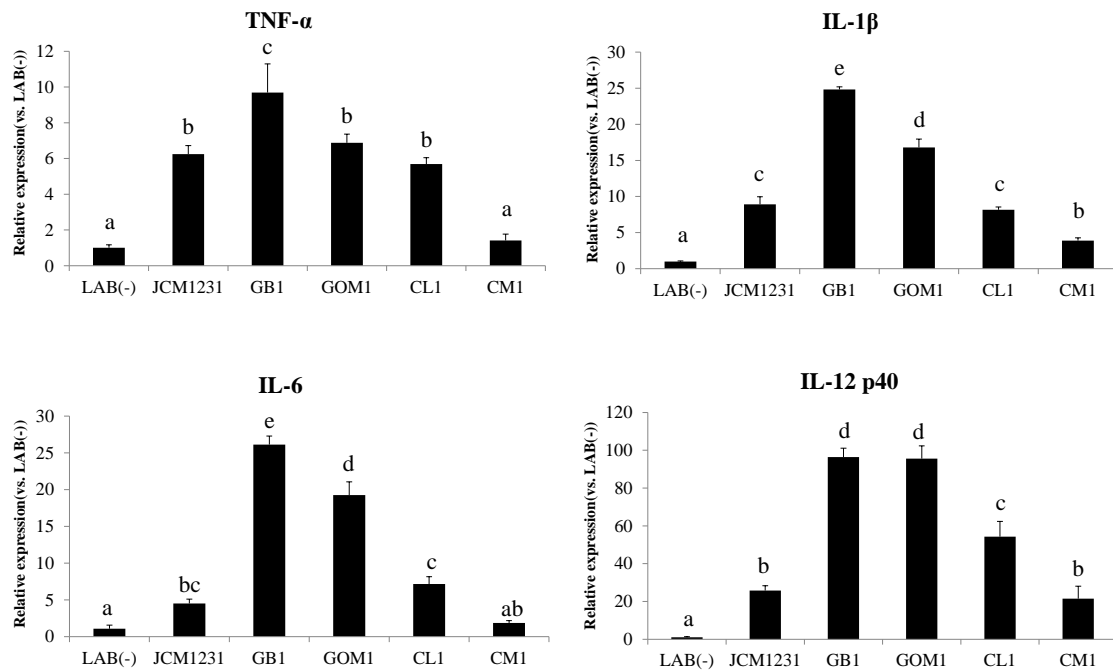


図 10. 選抜乳酸菌株による

J774.1 細胞の炎症性サイトカイン遺伝子の発現

各乳酸菌加熱死菌体 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を J774.1 細胞 ( $5 \times 10^5$  cells/mL) に添加して培養した。6 時間培養後の細胞から mRNA を抽出し、定量 RT-PCR により炎症性サイトカインの遺伝子発現を定量した。各乳酸菌添加におけるサイトカイン mRNA 量は乳酸菌無添加時の mRNA 量に対する比で示した。3 連の培養で得られた結果を平均 $\pm$ 標準偏差で表した。a-e の異なる記号の菌株間で、有意差を示した ( $P < 0.05$ )。

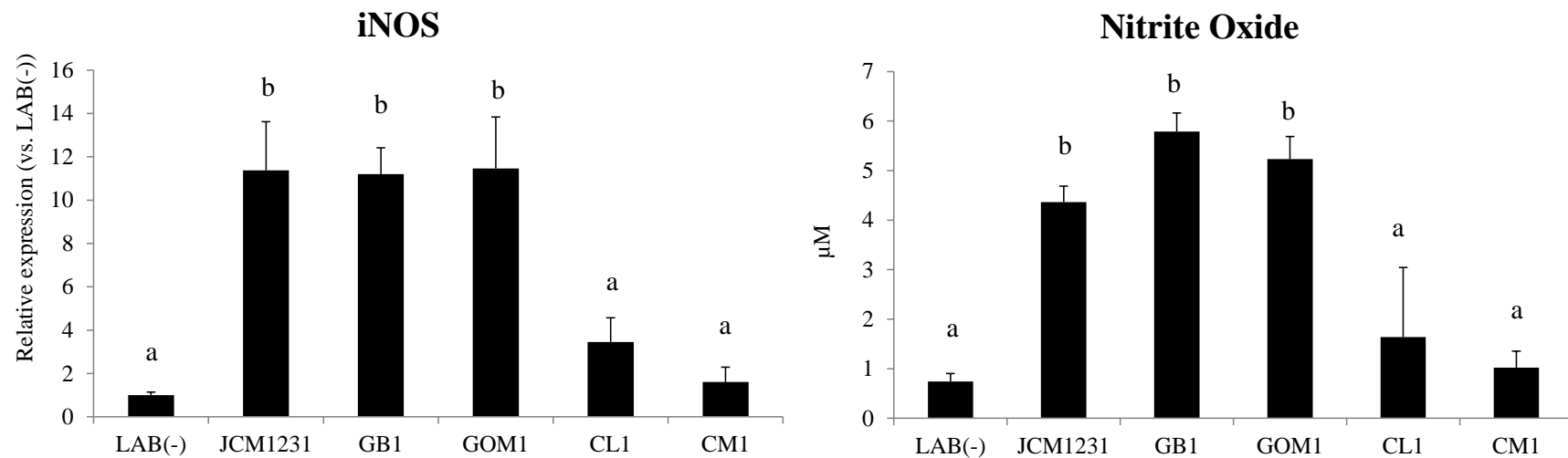


図 11. 選抜乳酸菌株による iNOS mRNA 発現および NO 産生

各乳酸菌加熱死菌体 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を添加し、J774.1 細胞 ( $5 \times 10^5 \text{ cells}/\text{mL}$ ) を培養した。24 時間培養後の細胞から mRNA を抽出し、定量 RT-PCR により iNOS の mRNA 発現を定量した。各乳酸菌添加における iNOS mRNA 量は乳酸菌無添加時の mRNA 量に対する比で示した。72 時間培養後の培養上清を採取し、Griess 試薬を用いて、NO を定量した。3 連の培養で得られた結果を平均 $\pm$ 標準偏差で表した。a,b の異なる記号の菌株間で、有意差を示した ( $P < 0.05$ )。



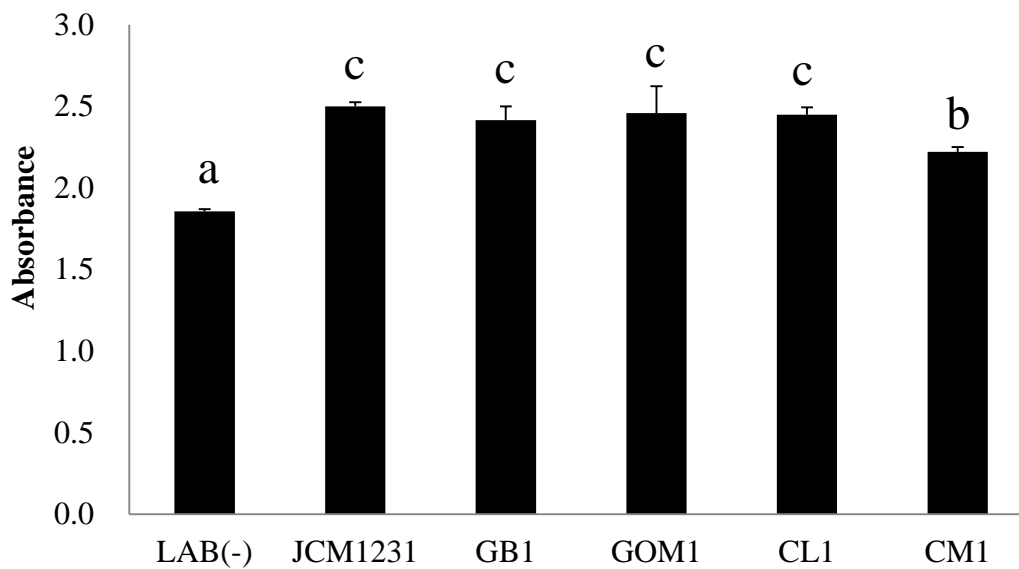


図 12. 選抜した乳酸菌の添加による J774.1 細胞の増殖能

播種した J774.1 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells/mL) に各乳酸菌加熱死菌体 ( $10 \mu\text{g/mL}$ ) を添加し、24 時間培養後、生細胞数を Cell counting kit-8 で測定した。3 連の培養で得られた結果を平均 $\pm$ 標準偏差で表した。a-c の異なる記号の菌株間で、有意差を示した ( $P < 0.05$ )。

### 第Ⅲ章 免疫活性化能で選抜された乳酸菌の ECS 加工適性の評価

#### 1. 序論

サイレージの発酵過程では、嫌気条件下で、通性嫌気性菌である乳酸菌が増殖し、材料植物に含まれる糖から乳酸を主とした有機酸が生成されて材料植物の pH が低下する。低 pH と嫌気的環境から、サイレージ材料中に自生する大部分の微生物の代謝が抑制され、栄養分の消費を抑えたまま長期保存が可能になる (72)。

サイレージ発酵過程に関わる乳酸菌種は、*Lactobacillus*、*Pediococcus*、*Lactococcus*、*Enterococcus*、*Leuconostoc*、*Weissella* 属と多岐にわたる (73)。ホモ型乳酸菌が働く場合は、材料植物の糖分を乳酸に変換する。一方、ヘテロ型発酵を行う *Leuconostoc* や *Weissella* 属の乳酸菌が働く場合は、乳酸のほかに酢酸、エタノール、二酸化炭素が生成する。

乳酸発酵による pH 低下が不十分な時は、原料飼料作物に共生する酪酸菌、好気性細菌、糸状菌、酵母などの微生物が、乳酸菌と競争的に働く。とくに、偏性嫌気性の芽胞形成性細菌である酪酸菌 (*Clostridium butyricum*) が働くと、糖および乳酸を消費して酪酸を産生し、タンパク質の分解物であるアミノ酸をさらに代謝してアンモニアを生成する。この酪酸菌の代謝により、サイレージの養分損失が高くなるとともに、臭いや味に影響を与えて嗜好性が悪化し、サイレージの質が低下する (74)。よって、乳酸菌を主役とした発酵初期の微生物制御が高品質サイレージを調製する際の重要なポイントといえる。

サイレージ発酵で、乳酸菌が素早く増殖し、品質に悪影響を与える

微生物の増殖を圧倒的に抑えるには、材料 1 g あたり、 $10^6$  個程度の乳酸菌の存在が必要であると考えられている。しかし、トウモロコシに自然付着する乳酸菌は、他の微生物と比べて少数派であり、 $10^6$  個に満たないことが一般的であると報告されている (47)。したがって、原料に自然生息する乳酸菌だけでは、良質サイレージを調製するための不安定要因になる可能性があるため、サイレージ加工においては、一定の生菌数に調製されたスターター乳酸菌を添加することが一般的に行われている。ヘテロ発酵型である *Leuconostoc* 属と *Weissella* 属の乳酸菌株は、ガスを発生し、乾物損失率を増大させるため (75)、ホモ発酵型乳酸菌で、低 pH 耐性と高乳酸産生能に優れた菌株が、サイレージ用スターターとして適性が高いと考えられている。

第 II 章において、免疫活性化能を指標に *L. coryniformis subsp. torquens* GB1 株、*P. pentosaceus* GOM1 株、*L. plantarum* CL1 株の 3 株を選抜した。これらの乳酸菌は、サイレージから単離した菌株であるため、植物性材料を基質とした発酵性は高いと考えられるが、いずれも牧草もしくはホールクロップコーンサイレージから単離した菌株であり、トウモロコシの子実と芯が主成分であるイアコーンを材料とした場合、その発酵性は不明である。第 I 章で示した通り、肥育豚用飼料として ECS を活用し、生産コストを高めることなく良質な豚肉を生産することは、飼料自給率向上の観点からも有用であるが、合わせて、イアコーン発酵用スターターとして、免疫活性化能が期待できるこれらの乳酸菌を利用できれば、サイレージ中で増殖させ、一定量の菌体成分を豚へ給与することも可能になると考えられる。そこで、本章では、これら 3 株のホモ発酵型乳酸菌について、イアコーンを原料とし

た添加発酵試験を行い、発酵能と pH および有機酸組成を指標に、ECS 加工適性（スターター適性）を評価した。

## 2. 材料と方法

### スターター候補菌株の培養

免疫活性化能を指標に選抜した *L. coryniformis subsp. torquens* GB1 株、*P. pentosaceus* GOM1、*L. plantarum* CL1 株の 3 株について、MRS broth (BD-Difco) で 37°C、48 時間静置培養し、発酵試験のスターター菌とした。スターター菌数は、MRS 寒天培地 (BD-Difco) を用いて、37°C、48 時間静置培養し、形成したコロニー数をカウントして計測した。

### イアコーンを材料とした簡易サイレージの作製

真空パウチを用いた簡易サイレージの作製は、既報を参考にした (図 13) (76, 77)。発酵基質として用いた粉碎イアコーンは、2013 年に畜産フィールド科学センターで収穫、調製され、直後に -20°C で冷凍し、使用時まで保存したものをを用いた。イアコーンの滅菌は、121°C、15 分間加熱蒸気を行った。これらの滅菌あるいは未滅菌イアコーンを、100 g ずつ真空パウチ袋 (FACF-1525, カウパック, 愛知) に分け取った。前培養した 3 種類の乳酸菌を、粉碎イアコーン 1 g あたり  $10^6$  cfu 前後となるように添加し、袋を振って良く混合したのち、真空包装機 (VM-T5/S/C, Roscherwerke, Feldmuhlenweg, Germany) でパッキングし、簡易サイレージとした。簡易サイレージは、25°C インキュベーター内で静置し、各日数経過時に、袋を開けてサンプリングした後、再度真空包装を行い、最長 14 日間まで発酵を継続した。

### 簡易サイレージ中の乳酸菌数の測定

25°C で一定時間静置した簡易サイレージを開封し、15 g 秤量した。生理食塩水 (0.9% NaCl) を 135 mL 加え、ストマッカー (EXNIZER400, オルガノ, 東京) で 60 秒の処理を行った。滅菌イアコーンを原料とした検体は、MRS 寒天培地 (BD-Difco) を用いて、嫌気条件下で 37°C、48 時間培養後、形成したコロニー数を乳酸菌数として計測した。未滅菌イアコーンを原料とした検体は、酢酸を 3.7% (v/v)、Lab-lemco powder (Oxoid) を 0.8% (w/v) 添加して乳酸菌の選択性を高めた変法 LBS 寒天培地 (BD-Difco) を用い、嫌気条件で 37°C、96 時間培養後、形成したコロニーを乳酸菌数としてカウントした。変法 LBS 寒天培地は、生育するコロニーのほとんどが *Lactobacillus* 属で、*Pediococcus* 属も小コロニーを形成することが報告されている (51)。

### 簡易サイレージの pH 測定

各サイレージ検体を 9 倍量の生理食塩水でストマッカー処理し、ガラス電極 pH メーター (F-52, 堀場製作所, 東京) で測定した。

### サイレージ中の有機酸量の分析

有機酸は、液体クロマトグラフィー (Waters 2695, 日本ウォーターズ, 東京) を用いて測定した。各日数経過した簡易サイレージ 15 g を 9 倍量の生理食塩水でストマッカー処理し、0.45  $\mu\text{m}$  フィルター (ADVANTEC, 東京) でろ過して分析サンプルとした。乳酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸の検量線は、各有機酸の ISO/IEC17025 認証標準物質 (SIGMA-ALDRICH, ST Louis, MO, USA) を測定して作成した。カラムは、逆相カラムである Inertsil Ph-3 (250 x 4.6 mm I.D; GL Science,

東京) と陽イオン交換カラムである Inertsil CX (250 x 4.6 mm I.D.; GL Science, 東京) を連結し、溶媒は 3 mM 過塩素酸 (HClO<sub>4</sub>) を用いて 0.5 ml/min の流速で分離した。分離温度は 35°C、注入量は 10 μL とした。ポストカラム反応として 0.1 mM ブロモチモールブルー / 30 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を流速 0.5 mL/min で流し、カラム通過液とリアクター中 (35°C) で混合させ、吸光度検出器 (Waters 2487, 日本ウォーターズ, 東京) を用いて、440 nm の吸光度をモニターした。

### 3. 結果

#### 原料イアコーンの分析とスターター乳酸菌の調製

簡易サイレージの発酵基質として用いた原料イアコーンの乳酸菌数は、 $1.3 \times 10^4$  cfu/g、pH は、5.91 であった。サイレージ発酵試験に用いたスターター乳酸菌の添加菌数は、イアコーン 1 g に対して、GB1 株、CL1 株、GOM1 株それぞれ、 $9.0 \times 10^5$  cfu、 $5.6 \times 10^5$  cfu、 $1.9 \times 10^6$  cfu であった。

#### 滅菌イアコーンを原料とした簡易サイレージの発酵動態

添加した乳酸菌数の経時変化をクリアに追跡するため、原料イアコーンを加熱蒸気滅菌した原料を用いて簡易サイレージを調製し、乳酸菌数（図 14）と pH（図 15）の経時変化を測定した。*Pediococcus* 属である GOM1 は、1 日間の発酵で、乳酸菌数はサイレージ 1 g あたり  $10^9$  cfu を超え（ $1.2 \times 10^9$  cfu/g）、pH は 4.18 まで低下した。*Lactobacillus* 属の GB1 株、CL1 株についても、2 日間の発酵で、サイレージ 1 g あたり  $10^9$  cfu を超え（GB1;  $1.2 \times 10^9$  cfu/g, CL1;  $2.2 \times 10^9$  cfu/g）、pH は 4 以下（GB1; 3.95, CL1; 3.80）に低下した。

#### 未滅菌イアコーンを原料とした簡易サイレージの発酵動態

培地への酢酸添加により乳酸菌の選択性を高めた変法 LBS 培地を用い、嫌気条件下でコロニー形成した菌を乳酸菌数としてカウントした。GOM1 株添加サイレージでは、1 日間の発酵で、乳酸菌数は、サイレージ 1 g あたり  $10^9$  cfu を超え（ $1.5 \times 10^9$  cfu/g）、pH も 4.06 まで低下し



た（図 16、図 17）。GB1、CL1 株についても、発酵 2 日で菌数は、 $1.4 \times 10^9$  cfu/g および  $2.4 \times 10^9$  cfu/g、pH はそれぞれ 3.88、3.78 を示した。発酵 3 日以降、乳酸菌数は徐々に低下し、14 日経過時の菌数は、GB1 株、CL1 株、GOM1 株でそれぞれ  $3.2 \times 10^8$  cfu/g、 $2.6 \times 10^8$  cfu/g、 $4.9 \times 10^7$  cfu/g であった。これは、3 日経過時の最大であった菌数と比較し、それぞれ 18.8%、10.8%、3.1% で、特に GOM1 の菌数低下が顕著であった。スターター乳酸菌未添加のサイレージにおいては、発酵翌日の乳酸菌数は  $3.7 \times 10^7$  cfu/g、pH は 5.00 で、乳酸菌を添加した場合と比較して発酵の進行が遅かった。

有機酸の産生について、表 9 に示した。乳酸菌未添加サイレージでは、乳酸菌添加サイレージと比較して、発酵 2 日以降において、酢酸含量が 2 倍以上高値で推移した。乳酸生成量は、*Lactobacillus* 属の GB1、CL1 株で、*Pediococcus* 属の GOM1 株より高い産生が認められた。酪酸、プロピオン酸については、乳酸菌添加有無に関わらず、生成は認められなかった。

#### 4. 考察

加熱蒸気滅菌したイアコーンを基質として、*L. coryniformis subsp. torquens* GB1 株、*P. pentosaceus* GOM1 株、*L. plantarum* CL1 株は、いずれも迅速に増殖し、pH を低下させた。*Pediococcus* 属である GOM1 株は増殖速度が速く、発酵 1 日経過時点で、菌数はイアコーン 1 g あたり  $10^9$  cfu 台に到達した。一方、*Lactobacillus* 属の GB1 株、CL1 株についても、発酵 2 日時点で、菌数は、 $10^9$  cfu 台まで増殖した。

未滅菌イアコーンを原料としたサイレージでは、乳酸菌未添加サイレージにおいて、発酵 1 日経過時の乳酸菌数は、乳酸菌添加サイレージと比べて 20 分の 1 以上低値であったが、発酵 3 日経過時には、乳酸菌添加サイレージと同等の 1 g あたり  $10^9$  cfu 台まで増殖し、pH も 4 以下まで低下した。しかし、発酵 1 日の菌数について、乳酸菌の選択性の低い MRS 寒天培地で測定した結果 ( $1.9 \times 10^8$  cfu/g サイレージ) では、酢酸添加により乳酸菌選択性を高めた変法 LBS 培地 (51) の結果 ( $3.7 \times 10^7$  cfu/g サイレージ) より、菌数が約 5 倍となったことから、乳酸菌未添加サイレージでは、発酵のごく初期に、嫌気条件で生育可能な乳酸菌以外の微生物が優勢となったことが示唆された。サイレージの微生物制御のためには、発酵初期に素早く pH4.2 以下まで低下させることが重要であると報告されているが (78)、3 株の乳酸菌添加サイレージでは、*Pediococcus* 属の GOM1 株では発酵 1 日で、*Lactobacillus* 属の GB1 株、CL1 株も、発酵 2 日後には、pH が 4.2 を下回り、迅速で旺盛な乳酸産生が認められた。乳酸菌数の推移も、滅菌イアコーンを材料とした結果と同様に、GOM1 株は、他 2 菌株よりやや増殖が速く、

GB1 株、CL1 株でも発酵 2 もしくは 3 日で菌数は最大になった。一方、発酵 14 日後の結果では、GOM1 株は、最も乳酸菌数が低く、pH4 付近での生存性は *Lactobacillus* 属の 2 株より弱いと考えられた。サイレージの発酵初期では *Pediococcus* が優勢になりやすく、*L. plantarum* は、調製済みサイレージからの出現率が高い菌株であると報告されているが (52)、本試験における各菌株の増殖および死菌化の変化からも、この属ごとの特徴が認められた。

サイレージの発酵過程は、以下のような経過をたどると報告されている (79)。第 1 期は、材料植物細胞の呼吸が続き、糖が消費され、二酸化炭素が放出される時期、第 2 期はグラム陰性細菌により酢酸が生成される短期間の時期、第 3 期は乳酸菌により糖から乳酸が産生される時期、第 4 期は乳酸含量がピークに達し、pH 4.2 以下 になって安定維持される時期である。もし、材料草の炭水化物や、初発乳酸菌数の不足などにより pH 低下が不十分であると、第 5 期の段階として、残存している炭水化物および一旦生成された乳酸を消費して、酪酸菌による酪酸生成が起こる。この変化は、第 1~3 期までは、詰込み後、約 3 日間で完了し、第 4 期が終わるまでは、2~3 週間を要すると考えられている。本試験において、未滅菌イアコーンサイレージを原料に、乳酸菌未添加でサイレージを調製した場合、発酵 2 日以降、酢酸量が乳酸菌添加サイレージの 2 倍以上と高値を示した。これは、原料に自生していた乳酸菌数が  $1.4 \times 10^4$  cfu/g と少なかったため、第 2 期の期間が長くなったか、もしくは原料由来のヘテロ型発酵乳酸菌が発酵過程に関わったのではないかと推測された。

第 I 章で報告した肥育豚への ECS 給与試験では、1 頭あたり、ECS

を平均 570g DM/日 給与した。各乳酸菌の最大乳酸菌数は、GB1 株、CL1 株、GOM1 株で、それぞれ  $1.7 \times 10^9$ 、 $2.4 \times 10^9$ 、 $1.6 \times 10^9$  cfu/g サイレージであることから、乾物換算を考慮して試算すると、1 日あたり、GB1 株、CL1 株、GOM1 株でそれぞれ、 $1.2 \times 10^{12}$ 、 $1.7 \times 10^{12}$ 、 $1.1 \times 10^{12}$  cfu に相当する乳酸菌体を給与できると算出された。ヒトにおける臨床試験において、*L. rhamnosus* GG 株を  $1 \sim 2 \times 10^8$  cfu 含むヨーグルトを 1~6 歳の子供 571 人に毎日摂取させたところ、風邪への感染を有意に抑制したと報告されている (80)。ヒトと豚で、生物種の違いはあるものの、体重当たりの乳酸菌数で考えても、1 日あたり  $10^{12}$  cfu の乳酸菌の摂取は、感染防御能を発揮する有効量に十分達している可能性が考えられる。一方で、発酵 7 日以降、乳酸菌生菌数の低下が観察された。第 II 章における乳酸菌の免疫活性化能は、加熱死菌体で検証していることから、菌は必ずしも生きている必要はなく、菌体成分が効果本体と考えられるが、酸性のサイレージ中で長期保存された菌体成分が変わらず免疫活性化能を有するかについては、改めて検証が必要かもしれない。

以上のことから、免疫活性化能で選抜した 3 株は、いずれもイアコンを迅速に発酵させ、発酵 2 日以内に  $10^9$  cfu/g 台まで乳酸菌数が達することが示された。pH もいずれも 4 以下まで低下させ、酪酸、プロピオン酸の産生も検出できなかったことから、良質なサイレージを調製するスターター乳酸菌として有用であることが示唆された。本研究で行った免疫活性化能の評価結果と、サイレージ発酵過程の各乳酸菌の増殖ステージを考え合わせると、*P. pentosaceus* GOM1 株と、*L. coryniformis subsp. torquens* GB1 株の 2 株をスターター乳酸菌として併

用すれば、サイレージ品質、免疫活性化能の両面で効果的かもしれない。

## 5. 小括

第Ⅱ章において、免疫細胞活性化能に基づき選抜した *L. coryniformis subsp. torquens* GB1 株、*P. pentosaceus* GOM1 株、*L. plantarum* CL1 株の 3 種のコモ発酵型乳酸菌について、イアコーンを原料とした添加発酵試験を行い、菌数推移、pH および産生有機酸を指標に、ECS 加工適性（スターター適性）を評価した。

いずれの菌株も原料となるイアコーンを迅速に発酵させ、発酵 2 日以内に  $10^9$  cfu/g ECS 以上まで乳酸菌数が増殖することが示された。pH も、発酵 2 日でいずれの菌株でも 4 以下まで低下させ、酪酸、プロピオン酸の産生も検出できなかったことから、良質なサイレージを調製するスターター乳酸菌として活用できることが示唆された。

第Ⅰ章における肥育後期豚への ECS 給与量から換算すると、これら 3 株のいずれかの乳酸菌をスターターとして調製した ECS を給与したと仮定すると、1 日当たり  $10^{12}$  cfu 以上の菌体成分を肥育豚へ与えることができるかと試算された。

6. 図表



図 13. 真空パウチ法で調製した簡易サイレージ

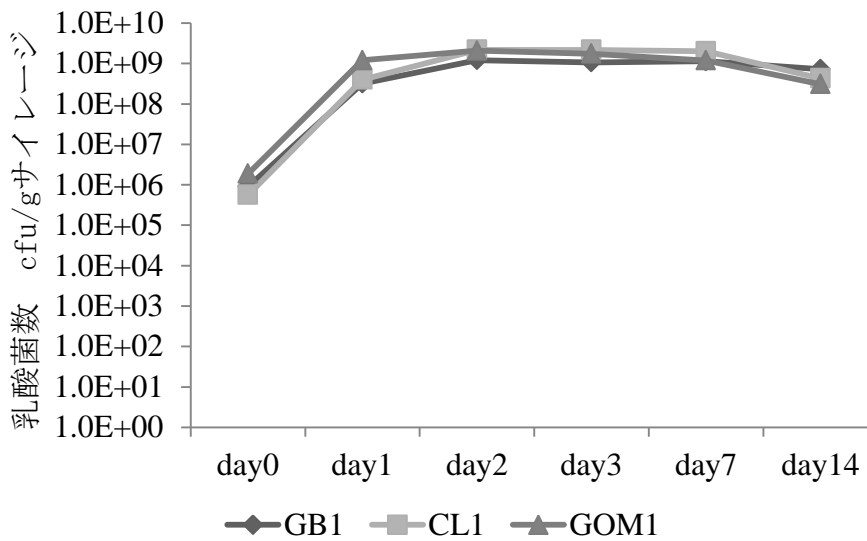
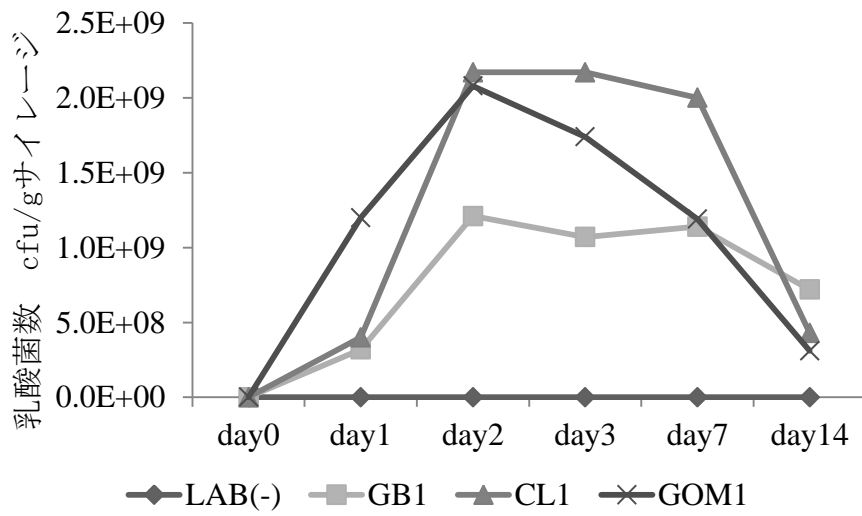


図 14. 滅菌エアコーンを原料とした簡易サイレージの乳酸菌数の変化

加熱蒸気滅菌したエアコーンに各乳酸菌を添加後、真空パウチで梱包し、25°Cで発酵させ、各日数経過時にMRS寒天培地で菌数測定した。下図は、縦軸を対数スケールにして示した。



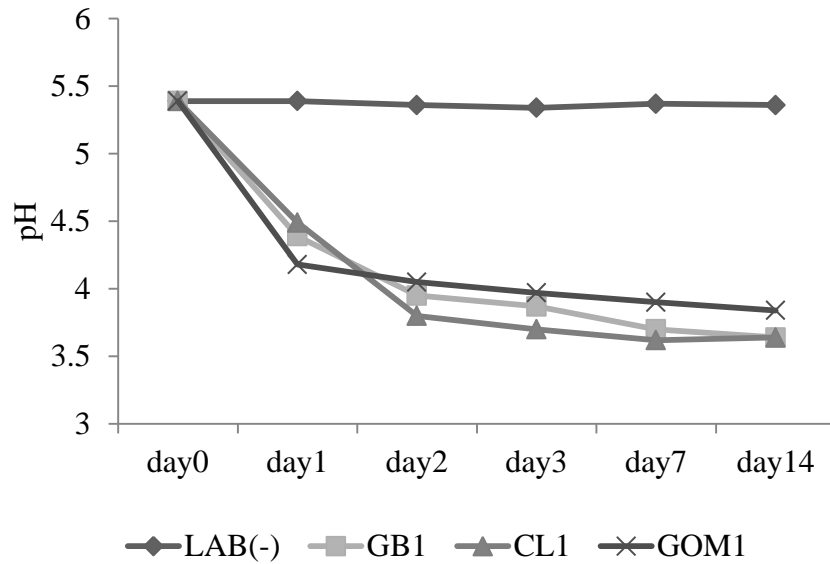


図 15. 滅菌イアコーンを原料とした簡易サイレージの pH 変化

加熱蒸気滅菌したイアコーンに各乳酸菌を添加後、真空パウチで梱包し、25°C で発酵させ、各日数経過時に pH を測定した。

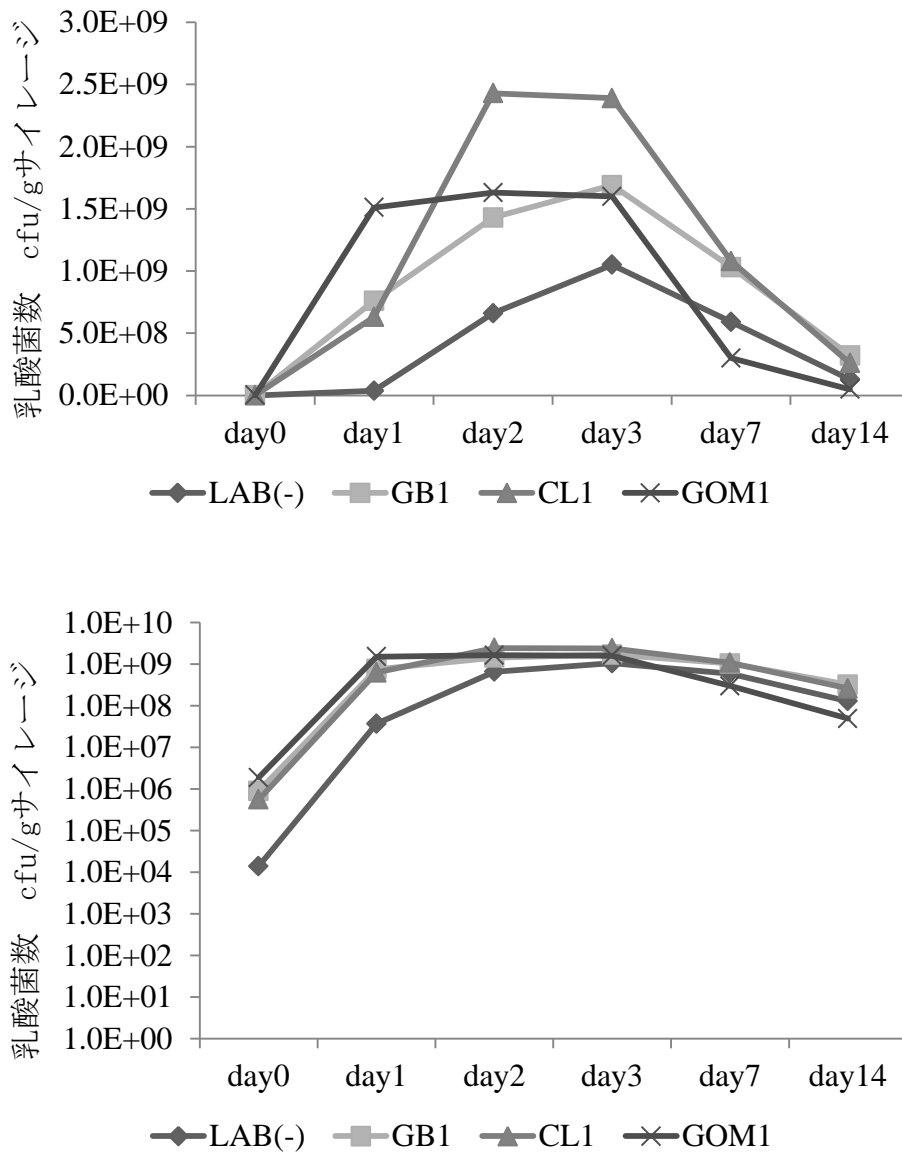


図 16. 未滅菌エアコーンを原料とした簡易サイレージの乳酸菌数変化

エアコーン原料を解凍後、各乳酸菌を添加し、真空パウチで梱包後、25°Cで発酵させ、各日数経過時に変法 LBS 寒天培地で菌数を測定した。下図は、縦軸を対数スケールにして示した。

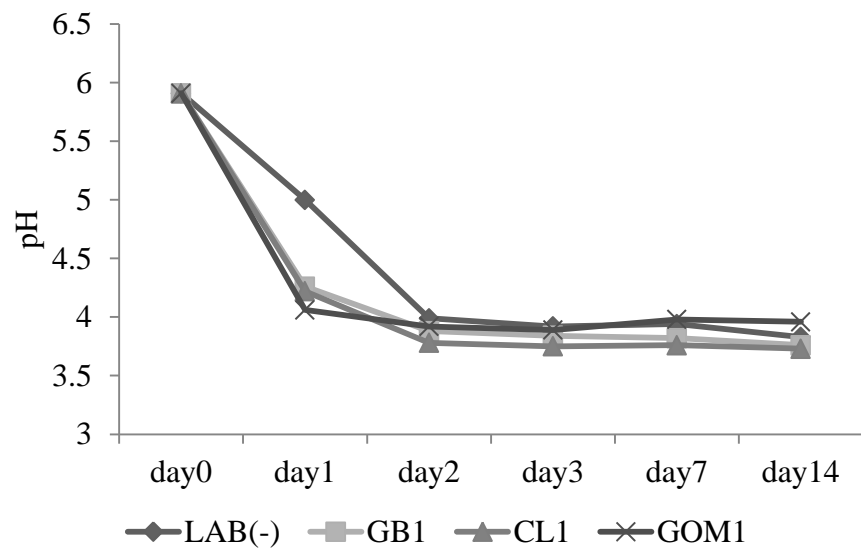


図 17. 未滅菌イアコーンを原料とした簡易サイレージの pH 変化

イアコーン原料を解凍後、各乳酸菌を添加し、真空パウチで梱包後、  
25°C で発酵させ、各日数経過時に pH を測定した。

表 9. 未滅菌イアコンを原料とした簡易サイレージの有機酸量の経時変化

		乳酸 (ppm)					酢酸 (ppm)				
	接種菌数	1day	2day	3day	7day	14day	1day	2day	3day	7day	14day
LAB(-)	0 / g ECS	162.6	760.8	967.9	1103.8	1130.4	64.9	183.4	247.8	261.0	278.8
GB1	$9.0 \times 10^5$ / g ECS	477.3	806.4	986.4	1148.7	1224.6	48.9	71.2	89.5	112.3	138.3
CL1	$5.6 \times 10^5$ / g ECS	458.0	999.8	1154.9	1199.9	1244.2	49.9	67.9	123.4	128.8	134.9
GOM1	$1.9 \times 10^6$ / g ECS	639.0	860.3	918.7	943.6	938.3	40.9	79.0	76.0	81.9	92.5

		プロピオン酸 (ppm)					酪酸 (ppm)				
	接種菌数	1day	2day	3day	7day	14day	1day	2day	3day	7day	14day
LAB(-)	0 / g ECS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GB1	$9.0 \times 10^5$ / g ECS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CL1	$5.6 \times 10^5$ / g ECS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
GOM1	$1.9 \times 10^6$ / g ECS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND : 検出せず

## 総括

本研究では、国内養豚の今後の課題と考えられる、①輸入豚肉と差別化できる高価値国産豚肉の創出、②国際的な飼料穀物需給の影響を受けにくい自給生産飼料の栽培および活用の推進、③低コストで疾病対策に繋がる肥育技術の開発 につながる自給飼料活用型国内養豚モデルを想起（図 18）し、検討を行った。

第 I 章において、自給 ECS を飼料原料として活用することは、飼料費および生産性（飼料効率、増体など）の両面から生産コストを上げることなく、慣行養豚と同等の肉質の豚肉を生産できることが示された。とくに、産肉の不快臭という一面においては、自給 ECS の活用により、通常飼料より質の良い豚肉を生産できることが示唆された。また、食に安心・安全を求める消費者にとって、国内産飼料の利用推進は、産肉への安心感につながり、海外産豚肉と比較して高い購買意欲につながるかもしれない。

現行の国内養豚体系では、海外の農地で栽培された穀物類が国内で飼料として使われ、肥育の際に排出される家畜排泄物は、肥料として国内の圃場に還元される。これは、養豚業界の中だけで考えると、土壌栄養成分の収支バランスが整っていない。養豚においても、自給飼料の活用が進めば、養豚で排出された家畜排泄物を、養豚用自給飼料の肥料源として活用することが可能となり、資源循環に配慮された、持続可能な養豚システムの構築にもつながると考えられる。このような社会性あるシステムは、消費者の共感・同意が得られるものではないだろうか。

現在、北海道では、約 110 万頭の豚が生産されている（北海道農業の概要）。本試験の飼料設計に則り、肥育後期約 60 日間に、配合飼料の 20%を配合すると考えると、ECS は、年間 3.8 万トン必要であると試算できる。この量の ECS を生産するのに必要となる農地面積は、既報（イアコーンサイレージ生産・利用マニュアル）を参考に算出すると約 4,000ha となる。北海道における酪農の飼料として用いられる青刈りとうもろこしの生産面積は、平成 26 度において約 5 万 ha であることから、このうち約 12 分の 1 の面積の圃場で養豚用の ECS を生産できれば、北海道で生産される全頭の肥育豚に対し、本試験と同じ条件（配合飼料に乾物割合 20%で ECS を混合）で飼料給与が可能になると算出される。

第 II 章では、学内畜産フィールド科学センターにおいて、酪農用飼料として実際に給与されているサイレージを分離源として乳酸菌を単離し、マウス細胞を用いた試験により、宿主免疫系の活性化が期待される乳酸菌株を選抜した。選抜された *L. coryniformis subsp. torquens* GB1 株、*P. pentosaceus* GOM1 株、*L. plantarum* CL1 株は、マクロファージ活性化に伴い産生される炎症性サイトカインを誘導するとともに、IL-12 産生に伴う NK 細胞の活性化や Th1 細胞応答の亢進を引き起こすことが示唆された。第 III 章では、これら 3 株について、ECS 調製用乳酸菌スターターとして、十分な発酵適性を有することが示された。現在のところ、サイレージ用乳酸菌スターターは、植物性材料の発酵適性が重視されており、健康機能性については、食品加工用乳酸菌と比べて知見が少ないことから、選抜された 3 株は将来価値の高いものと考えられるが、養豚現場への活用を実現するためには、肥育豚へ自給

サイレージ飼料を給与するアイデアから、普及させる必要があると考える。

このように、本研究で目指した自給飼料を活用した養豚に関する研究は、北海道産 ECS の活用を軸とし、産肉の差別化やサイレージ乳酸菌による疾病予防に対し、将来的な可能性を示せたと考える。今後のステップとしては、現在、北海道内で生産研究が進められている、飼料用トウモロコシ雌穂の「芯と子実」部分をサイレージ化したコーンコブミックスや「子実のみ」をサイレージ化したハイモイスチャーシェルドコーンを活用し、自給飼料の配合割合をより高める検討や、免疫活性化能で選抜した乳酸菌で調製したサイレージを実際に豚へ給与し、感染防御の観点において、養豚現場で効果があるかどうかを検証していくことが重要であると考えます。

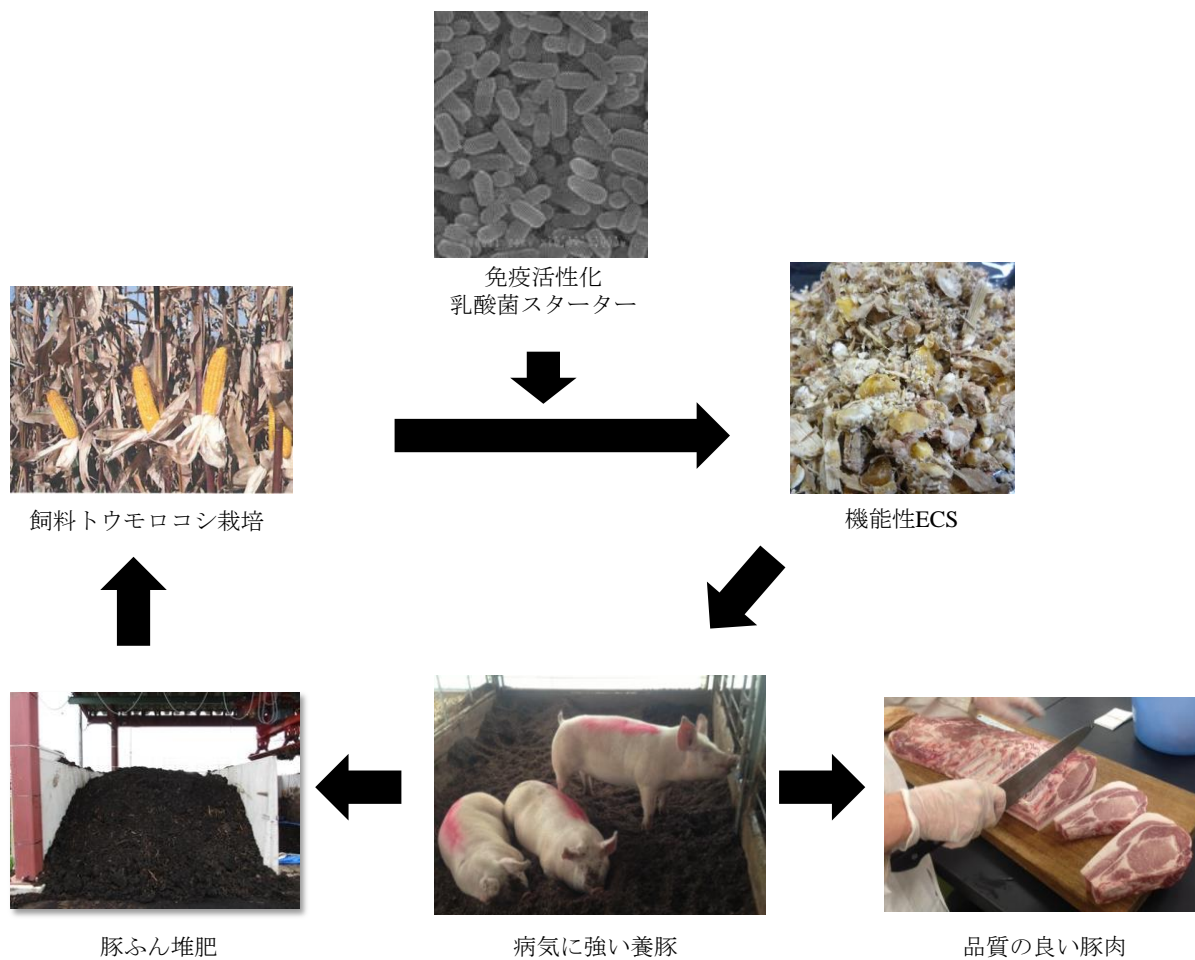


図 18. 本研究で想定した自給飼料活用型養豚体系図



## Summary

There are three problems that current pig farming faces in Japan: 1. Creation of domestic pork, which can be differentiated from imported pork; 2. Promotion of cultivation and utilization of material sources of self-supplied feed and; 3. Development of a novel fattening technique which leads to disease control.

In this study, for estimating a pig farming system based on the use of self-supplied ear corn silage (ECS), which leads to solutions for those problems, we examined the following issues.

In Chapter I, it was shown that the utilization of self-supplied ECS as a material for feed enables the production of pork with quality equivalent to that of pigs given conventional compound feed without raising the production costs considering both feed cost and productivity. Specifically, about unpleasant odor of produced pork, it was suggested that the application of ECS will enable the production of pork with better quality than that of pigs fed with conventional feed.

In Chapter II, lactic acid bacteria strains expected to activate a host immune system were selected from 20 strains isolated from silage which was actually supplied as the feed for dairy farming. It was suggested that the selected strains, *L. coryniformis subsp. torquens* strain GB1, *P. pentosaceus* strain GOM1 and *L. plantarum* strain CL1, induce IL-12 from mouse spleen cells, cause the activation of NK cells, acceleration of Th1 cell response and activate macrophages. In Chapter III, those three strains

were suggested to possess sufficient fermentation aptitude as lactic acid bacteria starters for ECS preparation.

Based on these results, I believe that we managed to suggest a certain possibility of the pig farming system to realize reasonable production costs, good pork quality and disease resistance based on the utilization of self-supplied ECS.

## 参考文献

1. 山根逸郎, 呉克昌, 石川弘道, 高木道浩, 宮崎綾子, 鈴木孝子, 芝原友幸, 久保正法, 小林秀樹, 國保健浩, 恒光 裕. 2009. PRRS の発生に関わる呼吸器疾患および繁殖障害などによる経済的な損失調査. 日本豚病研究会報 **55**, 33-37.
2. 鈴木啓一. 2014. ブタの科学, pp. 138-146. 朝倉書店, 東京.
3. 上田靖子, 大下友子, 青木康浩, 根本英子, 青木真理, 西浦明子. 2014. イアコーンサイレージ給与が乳牛の乳生産性と乳中揮発性成分に及ぼす影響. 日本畜産学会報 **85**, 301-307.
4. Hansen LL, Mejer H, Thamsborg SM, Byrne DV, Roepstorff A, Karlsson AH, Hansen-Møller J, Jensen MT, Tuomola M. 2006. Influence of chicory roots (*Cichorium intybus* L) on boar taint in entire male and female pigs. *Animal Sci.* **82**, 1-11.
5. Hansen LL, Stolzenbach S, Jensen JA, Henckel P, Hansen-Møller J, Syriopoulos K, Byrne DV. 2008. Effect of feeding fermentable fibre-rich feedstuffs on meat quality with emphasis on chemical and sensory boar taint in entire male and female pigs. *Meat Sci.* **80**, 1165-1173.
6. Whittington FM, Nute GR, Hughes SI, McGivan JD, Lean IJ, Wood JD, Doran E. 2004. Relationships between skatole and androstenone accumulation, and cytochrome P4502E1 expression in Meishan x Large White pigs. *Meat Sci.* **67**, 569-576.
7. Weiler U, Font i Furnols M, Fischer K, Kemmer H, Oliver MA, Gispert M,

- Dobrowolski A, Claus R. 2000. Influence of differences in sensitivity of Spanish and German consumers to perceive androstenone on the acceptance of boar meat differing in skatole and androstenone concentrations. *Meat Sci.* **54**, 297-304.
8. 西岡輝美, 石塚譲, 因野要一, 入江正和. 2011. 豚脂肪中のスカトール含量と官能評価への影響. 日本畜産学会報 **82**, 147-153.
  9. 大下友子, 三谷朋弘, 宮地 慎, 青木康浩, 秋山典昭. 2007. 無添加および乳酸菌添加バレイショでんぷん粕サイレージの発酵特性および消化特性. 日本草地学会誌 **53**, 201-207.
  10. 自給飼料利用研究会. 2009. 粗飼料の品質評価ガイドブック. pp. 4-61. 社団法人日本草地畜産種子協会, 東京.
  11. Zanfi C, Colombini S, Mason F, Galassi G, Rapetti L, Malagutti L, Crovetto GM, Spanghero M. 2014. Digestibility and metabolic utilization of diets containing whole-ear corn silage and their effects on growth and slaughter traits of heavy pigs. *J. Animal Sci.* **92**, 211-219.
  12. 農業・食品産業技術総合研究機構. 2013. 日本飼養標準豚2013年版. pp. 14-15. 公益社団法人中央畜産会, 東京.
  13. Agricultural Research Council. 1981. The nutrient requirements of pigs. Commonwealth Agricultural Bureaux, England.
  14. 農業・食品産業技術総合研究機構. 2010. 日本標準飼料成分表2009年版. pp. 106-133. 公益社団法人中央畜産会, 東京.
  15. Hansen-Møller J. 1994. Rapid high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of androstenone, skatole and indole in back fat from pigs. *J. Chromatography B* **661**, 219-230.

16. Henry Y, Colleaux Y, Seve B. 1992. Effect of dietary level of lysine and of level and source of protein on feed intake, growth performance, and plasma amino acid pattern in the finishing pig. *J. Animal Sci.* **70**, 188-195.
17. Springer MP, Carr MA, Ramsey CB, Miller MF. 2003. Accelerated chilling of carcasses to improve pork quality. *J. Animal Sci.* **81**, 1464-1472.
18. 家入誠二, 崎村武司, 石橋誠, 勝俣昌也, 梶雄次. 2007. 肥育豚へのパン屑利用低リジン飼料給与による筋内脂肪含量の増加. 日本養豚学会誌 **44**, 8-16.
19. Hyun Y, Kim JD, Ellis M, Peterson BA, Baker DH, McKeith FK. 2007. Effect of dietary leucine and lysine levels on intramuscular fat content in finishing pig. *Can. J. Animal Sci.* **87**, 303-306.
20. 岩本英治, 設楽修, 入江正和. 2005. パン添加飼料給与がブタの増体量および肉質に及ぼす影響. 日本畜産学会報 **76**, 15-22.
21. 入江正和. 2002. 豚肉質の評価法. 日本養豚学会誌 **39**, 221-254.
22. 畑江敬子. 1996. 肉の科学. pp. 112-127. 朝倉書店, 東京.
23. 高田良三, 設楽修, 齋藤守, 森淳. 1992. 中鎖脂肪給与が肥育豚の発育、消化率、背脂肪および脂肪酸組成に及ぼす影響. 日本養豚学会誌 **29**, 32-39.
24. Wesoly R, Weiler U. 2012. Nutritional Influences on skatole formation and skatole metabolism in the pig. *Animals* **2**, 221-242.
25. Doran E, Whittington FW, Wood JD, McGivan JD. 2002. The relationship between adipose tissue skatole levels, rates of hepatic

- microsomal skatole metabolism and hepatic cytochrome P450E1 expression in two breeds of pigs. *Animal Sci.* **74**, 461-468.
26. 石橋晃. 2007. 飼料の現状と課題. 日本畜産学会報 **78**, 1-13.
27. 米持千里. 2003. 日本における抗菌性飼料添加物の役割と課題. 動物用抗菌剤研究会報 **25**, 33-38.
28. 小林秀樹. 2004. デンマークにおける成長促進剤としての抗菌性飼料添加物中止の影響について. 日本豚病研究会報 **45**, 12-48.
29. 古賀泰裕. 2009. 医科プロバイオティクス学. pp.208-609. 株式会社シナジー, 東京.
30. Tsai YT, Cheng PC, Pan TM. 2012. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **96**, 853-862.
31. Kikuchi Y, Kunitoh-Asari A, Hayakawa K, Imai S, Kasuya K, Abe K, Adachi Y, Fukudome S, Takahashi Y, Hachimura S. 2014. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain AYA enhances IgA secretion and provides survival pretention against influenza virus infection in mice. *Plos one* **9**, 1-9.
32. Castillo NA, de Moreno de LeBlanc A, Galdeano CM, Perdigon G. 2012. Comparative study of the protective capacity against *Salmonella* infection between probiotic and nonprobiotic *lactobacilli*. *J. Appl. Microbiol.* **114**, 861-876.
33. Lahtinen T, Lindholm A, Rinttila T, Junnikkala S, Kant R, Pietila TE, Levonen K, Ossowski IV, Solano-Aguilar G, Jakava-Viljanen M, Palva A. 2014. Effect of *Lactobacillus brevis* ATCC8287 as a feeding supplement

- on the performance and immune function of piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **158**, 14-25.
34. Wang A, Yu H, Gao X, Li X, Qiao S. 2009. Influence of *Lactobacillus fermentum* I5007 on the intestinal and systemic immune responses of healthy and *E. coli* challenged piglets. *Antonie van Leeuwenhoek* **96**, 89-98.
35. Zhang J, Deng J, Wang Z, Che C, Li Y, Yang Q. 2011. Modulatory effects of *Lactobacillus salivarius* on intestinal mucosal immunity of piglets. *Cur. Microbiol.* **62**, 1623-1631.
36. Maldonado Galdeano C, de Moreno de LeBlanc A, Vinderola G, Bibas Bonet ME, Perdigon G. 2007. Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin. Vac. immunol.* **14**, 485-492.
37. Oelschlaeger TA. 2010. Mechanisms of probiotic actions - A review. *Int. J. Med. Microbiol.* **300**, 57-62.
38. Labeer S, Claes IJJ, Vanderleyden J. 2012. Anti-inflammatory potential of probiotics: lipoteichoic acid makes a difference. *Trends Microbiol.* **20**, 5-10.
39. Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T. 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* **126**, 520-528.

40. Christensen HR, Frokiaer H, Pestka JJ. 2002. *Lactobacilli* differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J. Immunol.* **168**, 171-178.
41. Marcinkiewicz J, Ciszek M, Bobek M, Strus M, Heczko PB, Kurnyta M, Biedron R, Chmielarczyk A. 2007. Differential inflammatory mediator response *in vitro* from murine macrophages to *lactobacilli* and pathogenic intestinal bacteria. *Int. J. Exp. Path.* **88**, 155-164.
42. Colombo MP, Trinchieri G. 2002. Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 155-168.
43. Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. 1999. Natural killer cells in antiviral defense: Function and regulation by innate cytokines. *Annu. Review Immunol.* **17**, 189-220.
44. Warren HS, Smyth MJ. 1999. NK cells and apoptosis. *Immunol. Cell Biol.* **77**, 64-75.
45. Billiau A, Matthys P. 2009. Interferon- $\gamma$ : A historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**, 97-113.
46. 岡田早苗. 2002. 植物性乳酸菌世界とその秘める可能性. 日本乳酸菌学会誌 **13**, 23-36.
47. Cai Y. 2001. The role of lactic acid bacteria in the preparation of high fermentation quality. *Grassland Sci.* **47**, 527-553.
48. 河上眞一, 山田知哉, 中西直人, 蔡義民. 2010. サイレージ調製用乳酸菌と酵母との混合給与がウシの液性免疫に及ぼす影響. 肉用牛研究会報 **89**, 23-27.
49. Takeda K, Suzuki T, Shimada SI, Shida K, Nanno M, Okumura K. 2006.



- Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin Exp Immunol.* **146**, 109-115.
50. Gill HS. 2001. Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *J Am Coll Nutr* **20**, 149-156.
51. 木下英樹, 井本瞬, 須田義人, 石田光晴. 2011. MRS 寒天培地と変法 LBS 寒天培地における乳酸菌の選択的単離能の比較. *ミルクサイエンス* **60**, 171-176.
52. 佐々木酉二. 1972. 乳酸発酵とサイレージ. *化学と生物* **10**, 175-184.
53. Segawa S, Nakakita Y, Takata Y, Wakita Y, Kaneko T, Kaneda H, Watari J, Yasui H. 2008. Effect of oral administration of heat-killed *Lactobacillus brevis* SBC8803 on total and ovalbumin-specific immunoglobulin E production through the improvement of Th1/Th2 balance. *Int. J. Food Microbial.* **121**, 1-10.
54. Fujiwara D, Inoue S, Wakabayashi H, Fujii T. 2004. The Anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **135**, 205-215.
55. Willem MV. 2005. Lipoteichoic acid in lactobacilli: D-Alanine makes the difference. *PNAS* **102**, 10763-10764.
56. Trinchieri G. 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nature Reviews* **3**, 133-146.

57. Billiau A, Matthys P. 2009. Interferon- $\gamma$ : A historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.* **20**, 97-113.
58. Gordon S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature rev. Immunol.* **3**, 23-35.
59. Murphy K, Travers P, Walport M. 2010. 免疫生物学 (原著第 7 版). pp 39-108. 株式会社南江堂, 東京.
60. 笠倉新平, 松倉網治. 2004. サイトカイン・ケモカインのすべて. pp. 279-298. 株式会社日本医学館, 東京.
61. Ramsay AJ, Husband AJ, Ramshaw IA, Bao S, Matthaei KI, Koehler G, Kopf M. 1994. The role of interleukin-6 in mucosal IgA antibody responses in vivo. *Science* **264**, 561-563.
62. Beagley KW, Eldridge JH, Lee F, Kiyono H, Everson MP, Koopman W, Hirano T, Kishimoto T, Mcghee AR. 1989. Interleukin and IgA synthesis; Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells. *J. Exp. Med.* **169**, 2133-2148.
63. Nakae S, Asano M, Horai R, Sakaguchi N, Iwakura Y. 2001. IL-1 enhances T cell-dependent antibody production through induction of CD40 ligand and OX40 on T cells. *J. Immunol.* **167**, 90-97.
64. Dinarello CA. 1991. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* **77**, 1627-1652.
65. Dinarello CA. 1997. Interleukin-1. *Cytokine Growth Factor Rev.* **8**, 253-265.
66. Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. 1990. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF).

- FASEB J.* **4**, 2860-2867.
67. Bogdan C, Rollingshoff M, Diefenbach A. 2000. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 64-76.
68. Wink DA, Hines HB, Cheng RYS, Switzer CH, Flores-Santana W, Vitek MP, Ridnour LA, Colton CA. 2011. Nitric oxide and redox mechanisms in the immune response. *J. Leukocyte Biol.* **89**, 873-891.
69. Dong H, Rowland I, Tuohy KM, Thomas LV, Yaqoob P. 2010. Selective effects of *Lactobacillus casei* Shirota on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production. *Clin. Exp. Immunol.* **161**, 378-388.
70. Yasui H, Kiyoshima J, Hori T. 2004. Reduction of influenza virus titer and protection against influenza virus infection in infant mice fed *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**, 675-679.
71. Kawase M, He F, Kubota A, Harata G, Hiramatsu M. 2010. Oral administration of *lactobacilli* from human intestinal tract protects mice against influenza virus infection. *Let. Appl. Microbiol.* **51**, 6-10.
72. McDonald P, Henderson N, Heron S. 1991. The Biochemistry of silage. 2nd ed. pp. 11-162. Chalcombe publications, Berkshire.
73. Barnett AJG. 1954. Silage fermentation. pp. 5-67. Buterworths scientific publication, London.
74. 大山嘉信. 1971. サイレージ発酵に関連する諸問題. 日本畜産学会報 **42**, 301-317.
75. Cai Y, Benno Y, Ogawa M, Ohmomo S, Kumai S, Nakase T. 1998. Influence of *Lactobacillus* spp from an inoculant and of *Weissella* and

- Leuconostoc* spp. from forage crops on silage fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2982-2987.
76. 自給飼料利用研究会. 2009. 粗飼料の品質評価ガイドブック. pp. 64-78. 社団法人日本草地畜産種子協会, 東京.
77. 田中治, 大桃定洋. 1995. プラスチックフィルムを用いた小規模サイレージ発酵試験法(パウチ法)の開発. 日本草地学会誌 **41**, 55-59.
78. 熊井清雄, 木村徹哉, 福見良平, 蔡義民. 1990. 乳酸菌添加がサイレージの微生物相の変遷並びにサイレージの発酵品質に及ぼす影響. 日本草地学会誌 **36**, 231-237.
79. Barnett AJG. 1954. Silage fermentation. pp. 4-5. Butterworths scientific publication, London.
80. Hatakka K, Savilahti E, Ponka A, Meurman JH, Poussa T, Nase L, Saxelin M, Korpela R. 2001. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ* **322**, 1-5.

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官として終始ご指導、ご鞭撻をいただきました動物・食品検査診断センター食品有害微生物分野 川本恵子教授に、深く感謝申し上げます。また、研究推進および学位審査において、貴重なご助言と温かい励ましをいただきました倉園久生教授、梅津一孝教授、日高智教授、川島千帆准教授に深謝いたします。

エアコーンサイレージを用いた豚肥育試験は、畜産生命科学研究部門 家畜生産科学分野の日高智教授および学生の皆様との共同研究として取り組み、計画から準備、実施まで、細部にわたり、ご指導とご協力をいただきましたこと、深く御礼申し上げます。

博士課程在学中、楠本晃子助教はじめ、食品有害微生物分野のスタッフおよび学生の皆様には、様々なサポートをいただきました。また、動物・食品検査診断センターの各先生方、学生の皆様にも、大変お世話になりました。有難うございました。

北海道における自給飼料に関する情報収集では、農研機構北海道農業研究センターの天下友子主席研究員はじめ、酪農研究領域の皆様には、温かいご指導をいただきました。ここに深く感謝申し上げます。

社会人大学院生となる機会を認めていただき、研究面でも多大なバックアップいただきました日本ハム株式会社中央研究所の皆様には、本研究を通して学んだことを今後の業務で活かし、恩返しをしていきたいと考えています。

最後に、離れた地で学ぶ機会を受け入れてくれ、どんな時も心の支えになってくれた妻と息子たちに、心から感謝いたします。