

豚の大腸菌による離乳後下痢対策飼料の開発

松本 弘輝

(全国農業協同組合連合会 家畜衛生研究所)

〒285-0043 千葉県佐倉市大蛇町7番地)

Matsumoto, H. (2022): Development of Feed to Prevent Post-weaning Diarrhea Caused by *Escherichia coli* in Pigs

All about SWINE 60, 17-21

1. はじめに

子豚の離乳後下痢 (Post-weaning diarrhea: PWD) は、離乳後3～10日で主に腸管毒素原性大腸菌 (Enterotoxigenic *Escherichia coli*: ETEC) によって引き起こされる。ETECに感染した豚は通常、1～5日間続く泥状から水様性の下痢を呈し、脱水による斃死もしくは発育低下・遅延が生じ、世界中の養豚産業に深刻な経済的損失をもたらしている [1]。我が国においても、下痢を呈した離乳豚を検査したところ、大腸菌単独感染およびロタウイルス、コクシジウムなどとの混合感染を合わせると、半数以上 (52.6%) の豚から ETEC が検出されており、本疾病に対する ETEC の重要性が伺える [2]。

一般に、ETECのような細菌による PWD をコントロールするために抗菌剤が使用されることが多く、中でもコリスチンが豚で多く用いられていた [3]。しかしながら、2015年に大腸菌やサルモネラなどの特定のグラム陰性菌において、コリスチンに対する耐性を付与する安定なプラスミド媒介遺伝子 *mcr-1* が同定された [4]。*mcr-1* の発見により水平伝播および種間移行の可能性も生じ

得ることから、ヒト医療においてコリスチンの有効性が低下することが懸念されている。我が国では内閣府食品安全委員会により家畜に対して硫酸コリスチンを使用することは中程度のリスク (ヒト用抗菌性物質による治療効果が減弱又は喪失する可能性は否定できない) であるとされ、2018年7月1日をもって硫酸コリスチンの飼料添加物としての使用が禁止された。さらに、2019年5月にリン酸タイロシン、同年12月にはテトラサイクリン系抗生物質の飼料添加物としての指定が取り消された。

国内では、飼料添加物として抗菌剤および抗生物質の添加がいくつか承認されているが、EU加盟国では、耐性菌増加を抑制するために成長促進目的での抗菌剤および抗生物質の添加が2006年より禁止されており、世界中で同様の動きがみられる [5-7]。耐性菌出現を管理し、同時に家畜の生産性を維持するためには、抗菌剤、特に豚用のコリスチンに代わるものを見つけることが強く求められており [8]、腸内環境を整えるために酸化亜鉛や有機酸、プロバイオティクスなどの飼料添加が広く研究されている [9-12]。

それゆえ、我々のグループは家畜の腸内環境を整えることを目的に、有機酸、プロバイオティクス、天然物由来抽出資材などからスクリーニングを行い、2種の機能性成分を含有した混合飼料『キビテクトE』を開発した。本稿では、キビテクトEの評価試験成績について紹介する。

2. 混合飼料『キビテクトE』の評価試験

(1) 豚における腸内環境への影響

試験豚は離乳日（21日齢）にJA全農家畜衛生研究所に移送し、オープンベンによる個別飼育を行った。試験区は離乳子豚用の通常飼料のみを与えた非給与区と、通常飼料にキビテクトEを2.0%（w/w）混合した給与区の2つを設定し（4頭/区）、導入日から各試験区に応じた飼料を与えた。試験開始から約1週間後に、全頭剖検し空腸・回腸の内容物および血漿を回収した。各内容物を用いて、次世代シーケンサーによる腸内細菌叢解析およびCE-TOF MSによる血漿中の代謝物解析を実施した。

空腸・回腸の内容物を用いた腸内細菌叢解析では、給与区において、*Enterobacteriaceae*の相対存在率が空腸・回腸で大きく減少した（表1）。本菌群の構成比が増加することは、腸内細菌叢の乱れ（dysbiosis）を示し得るとされており[13-15]、非給与では*Enterobacteriaceae*の相対存在率が高いことから、移送および新たな飼育環境に移したことによるストレスや離乳ストレスにより腸内環境が乱れていたことが示唆された。一方、給与区の豚では、非給与区と同様のストレスが負荷されているが、腸内環境の乱れは抑えられた可能性が示唆された。また、乳酸産生菌が多く分類されている*Lactobacillaceae*の相対存在率が空腸で、酪

表1 各部位における腸内細菌の相対存在率（%）

	試験区	
	非給与	給与
空腸		
<i>Enterobacteriaceae</i>	71.3	15.0
<i>Pasteurellaceae</i>	22.3	13.9
<i>Clostridiaceae</i>	0.2	0.1
<i>Lactobacillaceae</i>	0.0	2.3
回腸		
<i>Enterobacteriaceae</i>	51.8	4.0
<i>Pasteurellaceae</i>	40.8	54.3
<i>Lachnospiraceae</i>	0.0	3.3
<i>Clostridiaceae</i>	0.3	2.0

酸産生菌が多く分類されている*Lachnospiraceae*の相対存在率が回腸で有意に増加した。さらに血漿を用いた代謝物解析では、給与区において、有用成分である乳酸や酪酸、免疫機能向上作用が知られているジメチルグリシン（DMG）の増加[16]、生体の酸化ストレスに素早く反応して生成されるメチオニンスルフォキシド（MetO）の減少が認められた[17]（図1）。

以上のことから、キビテクトEの給与は子豚の腸内環境を整え、免疫機能向上や抗酸化作用が得られる可能性が示唆された。

(2) 離乳後下痢に対する効果検証

試験豚は離乳日（21日齢）に当研究所に移送し、オープンベンによる個別飼育を行った。試験区は離乳子豚用の通常飼料のみを与えた非給与区と、通常飼料にキビテクトEを1.0%もしくは2.0%（w/w）混合した給与区の3つを設定し（8頭/区）、導入日から各試験区に応じた飼料を与えた。試験開始から5日後にETEC（F4; LT+,

STa+, STb+) を 10^9 CFU/頭で経口感染させ、感染後1週間症状を観察した。評価項目は下痢発症程度(糞便スコア:0正常, 1軟便, 2泥状便, 3水様便), 試験期間中の平均一日増体量(ADG), 斃死率とした。

キビテクトEを給与することにより、給与濃度に比例して糞便スコアの低下が認められた(図2)。非給与区は下痢を呈したことにより、ADG

が9gと低値を示したのに対し、給与区では104g(1.0%混合区), 167g(2.0%混合区)と下痢による体重減少が抑えられていた(図3)。また、非給与区では4頭(50%)の斃死が認められたが、給与区では僅か1頭(12.5%)ずつの斃死にとどまった(図4)。

以上のことから、キビテクトEを給与し腸内環境を整えておくことで、ETEC感染による発症

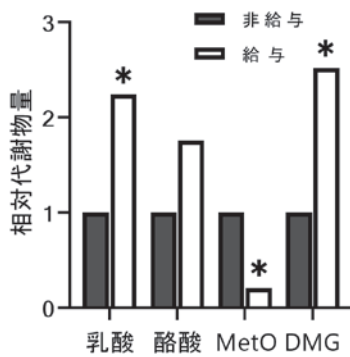


図1 血漿代謝物の変化
各代謝物において、非給与区を1とした時の相対量を示す。
*は $P < 0.05$ で有意差があったことを示す (vs 非給与)。

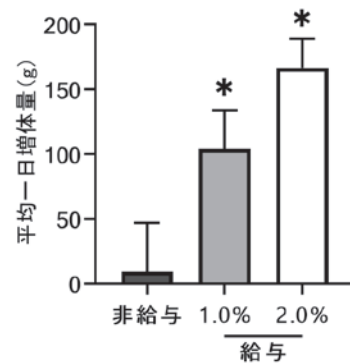


図3 平均一日増体量 (ADG) の比較
データは平均値±標準誤差を示す。*は $P < 0.05$ で有意差があったことを示す (vs 非給与)。ADGは、試験期間(12日間)終了時(もしくは斃死時)から導入時の体重差を試験期間(12日間)で除して算出した。

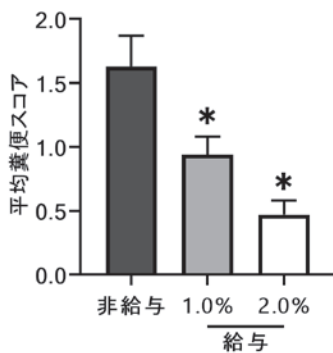


図2 平均糞便スコアの比較
データは平均値±標準誤差を示す。
*は $P < 0.05$ で有意差があったことを示す (vs 非給与)。

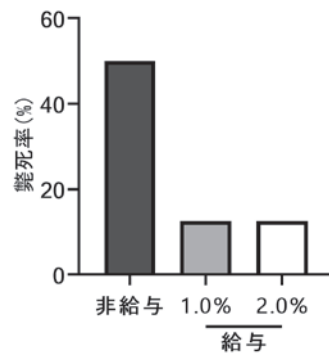


図4 斃死率の比較

程度を緩和し、生産成績が維持できる可能性が示唆された。

3. おわりに

今回、我々が開発した混合飼料『キビテクト E』は、子豚の腸内環境を整え、生産性の維持・向上をはかることが可能であることが示唆された。家畜での抗菌剤使用により薬剤耐性菌の出現が懸念され、抗菌剤の使用がますます厳しくなる中で、本製品が我が国の養豚産業の生産性向上に寄与することを期待する。

引用文献

1. Dubreuil, J. D., Isaacson, R. E., & Schifferli, D. M. 2016. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*. 7(1): 10
2. Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K., & Tsunemitsu, H. 2006. Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 18(4): 350-354.
3. Tambadou, F., Caradec, T., Gagez, A. L., Bonnet, A., Sopéna, V., Bridiau, N., Thiéry, V., Didelot, S., Barthélémy, C., & Chevrot, R. 2015. Characterization of the colistin (polymyxin E1 and E2) biosynthetic gene cluster. *Archives of Microbiology*. 197(4): 521-532.
4. Rebelo, A. R., Bortolaia, V., Kjeldgaard, J. S., Pedersen, S. K., Leekitcharoenphon, P., Hansen, I. M., Guerra, B., Malorny, B., Borowiak, M., Hammerl, J. A., Battisti, A., Franco, A., Alba, P., Perrin-Guyomard, A., Granier, S. A., De Frutos Escobar, C., Malhotra-Kumar, S., Villa, L., Carattoli, A., & Hendriksen, R. S. 2018. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro surveillance* 23(6): 17-00672.
5. Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., & Phillips, I. 2003. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 52(2): 159-161.
6. Dębski, B. 2016. Supplementation of pigs diet with zinc and copper as alternative to conventional antimicrobials. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 19(4): 917-924.
7. Nhung, N. T., Cuong, N. V., Thwaites, G., & Carrique-Mas, J. 2016. Antimicrobial usage and antimicrobial resistance in animal production in southeast asia: A review. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*. 5(4): 37.
8. Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Beaudry, F., & Letellier, A. 2017. Post weaning diarrhea in pigs: risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 59(1): 31.
9. Badia, R., Zanello, G., Chevaleyre, C., Lizardo, R., Meurens, F., Martínez, P., Brufau, J., & Salmon, H. 2012. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* var. *Boulardii* and β -galactomannan oligosaccharide on porcine intestinal epithelial and dendritic cells challenged in vitro with

- Escherichia coli* F4 (K88). *Veterinary Research*. 43(1): 4.
10. Suiryanrayna, M. V. & Ramana, J. V. 2015. A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 6, 45.
 11. Yang, G. Y., Zhu, Y. H., Zhang, W., Zhou, D., Zhai, C. C., & Wang, J. F. 2016. Influence of orally fed a select mixture of *Bacillus* probiotics on intestinal T-cell migration in weaned MUC4 resistant pigs following *Escherichia coli* challenge. *Veterinary Research*. 47(1): 71.
 12. Zhu, C., Ly, H., Chen, Z., Wang, L., Wu, X., Chen, Z., Zhang, W., Liang, R., & Jiang, Z. 2017. Dietary zinc oxide modulates antioxidant capacity, small intestine development, and jejunal gene expression in weaned piglets. *Biological Trace Element Research*. 175(2): 331-338.
 13. Ducatelle, R., Goossens, E., De Meyer, F., Eeckhaut, V., Antonissen, G., Haesebrouck, F., & Van Immerseel, F. 2018. Biomarkers for monitoring intestinal health in poultry: Present status and future perspectives. *Veterinary Research*. 49(1): 43.
 14. Eeckhaut, V., Wang, J., Van Parys, A., Haesebrouck, F., Joossens, M., Falony, G., Raes, J., Ducatelle, R., & Van Immerseel, F. 2016. The probiotic *Butyricicoccus pullicaecorum* reduces feed conversion and protects from potentially harmful intestinal microorganisms and necrotic enteritis in broilers. *Frontiers in Microbiology*. 7, 1416.
 15. Hughes, E. R., Winter, M. G., Duerkop, B. A., Spiga, L., Furtado de Carvalho, T., Zhu, W., Gillis, C. C., Büttner, L., Smoot, M. P., Behrendt, C. L., Cherry, S., Santos, R. L., Hooper, L. V., & Winter, S. E. 2017. Microbial respiration and formate oxidation as metabolic signatures of inflammation-associated dysbiosis. *Cell Host & Microbe*. 21(2): 208-219.
 16. Lawson, B. R., Belkowski, S. M., Whitesides, J. F., Davis, P., & Lawson, J. W. 2007. Immunomodulation of murine collagen-induced arthritis by N, N-dimethylglycine and a preparation of *Perna canaliculus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 7, 20.
 17. Wojciechowska, N., Alipour, S., Stolarska, E., Bilska, K., Rey, P., & Kalemba, E. M. 2020. Involvement of the MetO/Msr system in two acer species that display contrasting characteristics during germination. *International Journal of Molecular Sciences*. 21(23): 9197.