

臨床現場で起こったほ乳期又は離乳期下痢に対する殺菌乳酸菌製剤 (EC-12) の投与効果

塚原隆充^{1,2)*}、中西信夫²⁾、松原範宜³⁾、伊藤貢⁴⁾、牛田一成¹⁾

(¹⁾栄養・病理学研究所、²⁾京都動物検査センター、³⁾コンビ、⁴⁾あかばね動物クリニック)

Tsukahara, T., et al. (2006) The effect of *Enterococcus faecalis* cell preparation (EC-12) against the diarrhea in the nursing and weaning piglets under the clinical condition.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 48, 19-23

現在の養豚では、ほ乳期及び離乳期に多発する下痢に対して、予防及び治療目的で抗菌剤が使用されている。我が国ではBSE問題以降、養豚分野でも農林水産省主導でトレーサビリティ実施の調整が進んでいるという経緯もあり、抗菌剤の適正使用について考えなくてはならない時期にさしかかっていると考えられる。一方で、予防的な抗菌剤の投薬を禁止したデンマークなどでは、かえって治療目的での抗菌剤使用が増加したという報告がある¹⁾。豚の治療用抗菌剤は、ヒトに用いられる化学療法剤と同じものもあり、使用の増加による耐性菌発生の心配はこちらの方が大きく、単に予防的抗菌剤の投薬を中止するだけでは、養豚分野だけでなくヒトの公衆衛生にも悪影響を及ぼしかねない。

これらのことから、予防用抗菌剤の使用抑制を議論するならば、それらの代替物質の探索も併せて行うべきであるといえる。今回我々は、畜産資材の一つである殺菌乳酸菌 EC-12 を用いて、ほ乳期および離乳期に下痢を発症した子豚に対する投与試験を実施したので報告する。なお、本報告の一部は、第4回 Joint INRA-Rowett Symposium にて発表した²⁾。

材料及び方法

1. 供試動物及び飼料

以下に示す3養豚農家で試験を実施した。京都府下の母豚80頭規模の一貫経営農家をA農場、愛知県下の母豚170頭規模の一貫経営農家をB農場、同じく愛知県下の母豚170頭規模の一貫経営農家をC農場とした。どの農家も三元交雑種のみを飼育していた。A及びB農場はほ乳期子豚に下痢が頻発し、C農場では離乳期子豚に下痢が頻発していた。

A及びB農場では、試験期間中の基礎飼料として抗菌剤及び生菌剤を含まない市販ほ乳期飼料 [SDS No.1、日本配合飼料(株)製] を用いた。C農場では、同様に基礎飼料として抗菌剤及び生菌剤を含まない市販離乳期飼料 [スーパーコロミールあ

んしん SXS、日本配合飼料(株)製] を用いた。

各農場とも試験期間中は飼料及び飲水は自由摂取とした。ほ乳期子豚は、母乳も自由摂取していた。その他、各農場での飼育管理は、農場毎の慣例に従った。

2. 被験物質の投与

被験物質として *Enterococcus faecalis* EC-12 株を加熱滅菌した製品 [EC-12、コンビ(株)製] を用いた。EC-12 を各基礎飼料に0.05% (w/w) 添加した試験飼料を調製した。

3. 試験方法

3-1. A農場

母豚とともに分娩ストールで飼育されていた18-24日齢のほ乳期子豚で下痢症状を認めた31頭 (4腹分) を供試した。供試子豚の21頭 (3腹分) に EC-12 添加試験飼料を、残りの10頭 (1腹分) には基礎飼料を各々7日間給与した。なお、供試子豚は試験開始時まで母乳のみで育成されていた。

投与開始時及び投与開始後7日に体重測定を実施した。また投与開始時、投与開始後1、2、3、4及び7日に臨床症状を観察し、表1に示すようにスコア化して記録した。投与開始時及び投与開始後7日に供試子豚全頭の採糞をスワブで行い、病原因子の陽性率を定性的に調査した。

なお、試験期間中に母豚及び子豚に抗菌剤等の治療薬は投与されていなかった。

3-2. B農場

母豚とともに分娩ストールで飼育されていた8-

表1 臨床スコア

観察項目	スコア			
	0	1	2	3
糞便性状	正常便	軟便	泥状便	水様性下痢
元気	良好	減退	消失	
食欲	良好	やや不振	不振	
被毛	正常	失沢	粗剛・立毛	

各臨床スコアは、Tsukahara et al.³⁾に準拠した。

18日齢のほ乳期子豚で下痢症状を認めた38頭（7腹分）を供試した。供試子豚の28頭（5腹分）にEC-12添加飼料を、残りの10頭（2腹分）に無添加対照飼料を各々7日間給与した。なお、供試子豚は試験開始時には母乳及び市販ほ乳期餌付け飼料で飼育されていた。

A農場と同様に体重測定及び病原因子の調査を実施した。また投与開始時、投与開始後1、2、3及び7日に臨床症状を観察し、A農場と同様に記録した。

なお、試験期間中に母豚及び子豚に抗菌剤等の治療薬は投与されていなかった。

3-3. C農場

40日齢の離乳期子豚で下痢症状を認めた30頭を供試した。供試子豚の20頭にEC-12添加飼料を、残りの10頭に無添加対照飼料を各々7日間給与した。なお、供試子豚は試験開始時には市販人工乳後期用飼料で飼育されていた。

A農場と同様に体重測定、臨床症状の観察及び病原因子の調査を実施した。

なお、試験期間中子豚に抗菌剤等の治療薬は投与されていなかった。

4. 病原因子の特定

4-1. A農場

供試豚がほ乳期子豚であったため、スワブを用いて採材し、*Clostridium perfringens*, *Salmonella* spp. 及び溶血性大腸菌の3項目について検査を行った。

4-2. B農場

投与前及び投与開始後7日に糞便を採取し、*C. perfringens*, *Salmonella* spp.、溶血性大腸菌、*Brachyspira hyodysenteriae*, *Lawsonia intracellularis*、ロタウイルス、コクシジウムの検査を行った。なお、糞便が採取できなかった個体については、直腸スワブを採取し、*C. perfringens*, *Salmonella* spp.、溶血性大腸菌の3項目について検査を行った。

4-3. C農場

投与前及び投与開始後7日に糞便を採取し、*C. perfringens*, *Salmonella* spp.、溶血性大腸菌、*B. hyodysenteriae*, *L. intracellularis*、ロタウイルス、コクシジウム及びその他寄生虫の検査を行った。

4-4. 検査方法

C. perfringens, *Salmonella* spp. 及び溶血性大腸菌の検査は、Tsukahara and Ushidaの方法⁴⁾に準拠した。*B. hyodysenteriae*は糞便の直接鏡検及び血液寒

天培地を用いて分離培養することで同定した。*L. intracellularis*はMollerらの方法⁵⁾に準拠したPCR法で同定した。ロタウイルス検出は市販ロタウイルス検出キット〔ロタチェック、塩野義製薬(株)製〕を用いた。コクシジウム及びその他寄生虫の検査は、シヨ糖遠心浮遊法を用いた⁶⁾。

5. 統計学的解析

臨床観察結果は観察日毎にMann-Whitney testを行った。体重測定結果及び試験期間中増体量は、Student'sもしくはWelch's t-testを行った。糞便中の病原因子は、試験群間の検定はFisher exact testを行った。投与前及び投与後の検定はWilcoxon signed ranks testを行った。p<0.05を有意差有りと判断した。

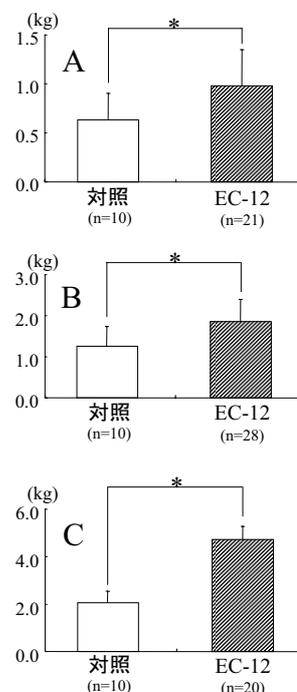
結果

1. 体重測定結果 (図1)

A、B及びC農場とも、EC-12投与によって増体が有意に増加した。

2. 臨床観察 (図2)

A農場では、EC-12投与によって投与翌日から糞便性状が有意に低値を示し、その傾向は投与開始後7日まで持続した。投与前から投与開始後7日まで、どの供試豚にもその他の項目の異常は認められなかった。



*p<0.05を有意差有りとした。

図1 試験期間中の増体量

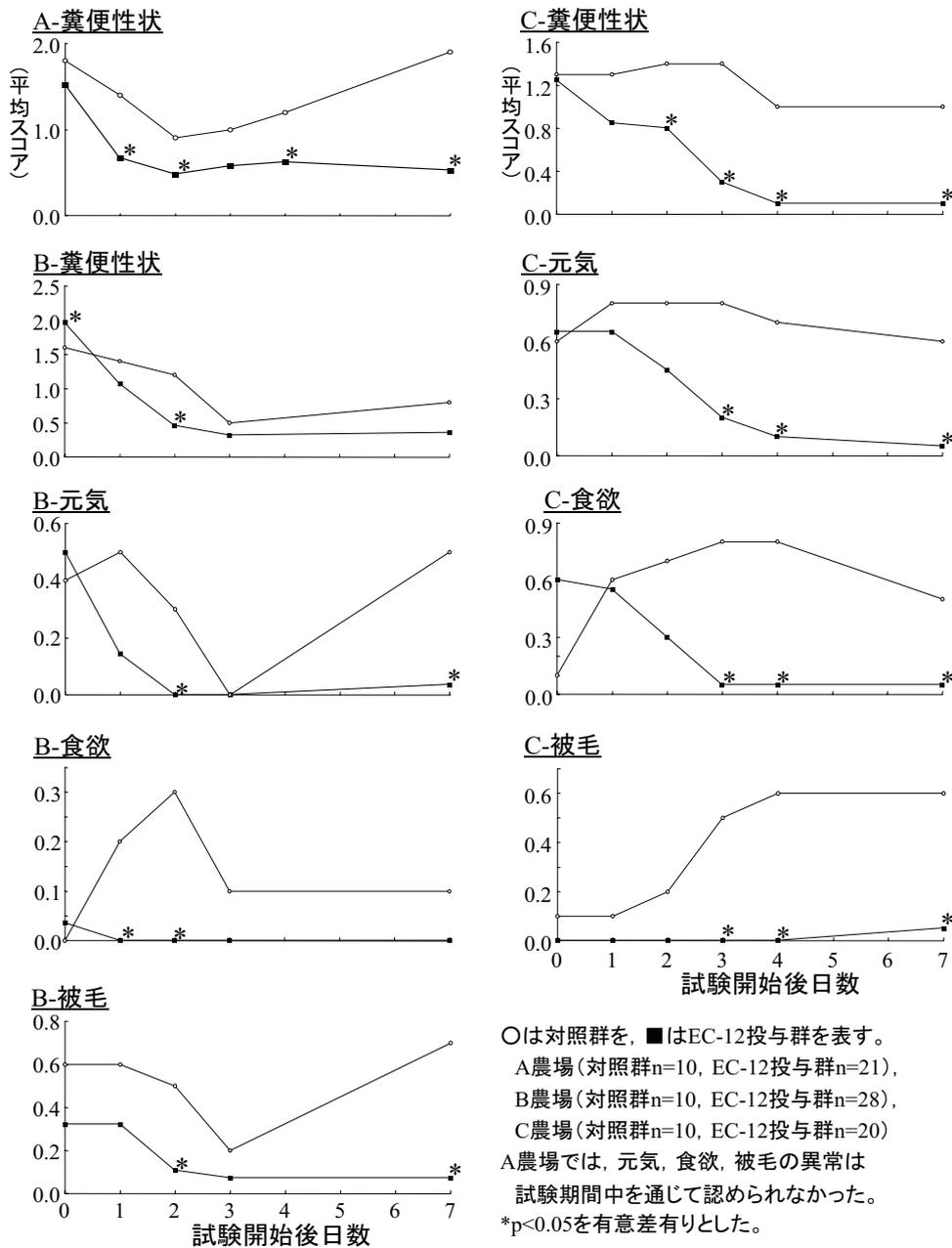


図2 試験期間中の平均臨床スコア

B農場では、投与前では対照群よりも高スコアだったEC-12投与群の糞便性状が、投与翌日から対照群を下回りはじめ、投与開始後2日には有意な改善を示した。この傾向は投与開始後7日まで持続した。投与前にEC-12投与群が対照群よりも高い元気スコアを示したが、投与翌日から対照群を下回り、投与開始後2日には有意な低値を示した。投与開始後3日には差は認められなくなったが、投与開始後7日には再びEC-12投与群が有意な低値を示した。投与前にEC-12投与群が対照群よりも高い食欲スコアを示したが、投与翌日から対照群を下回り、投与開始後2日には有意な改善

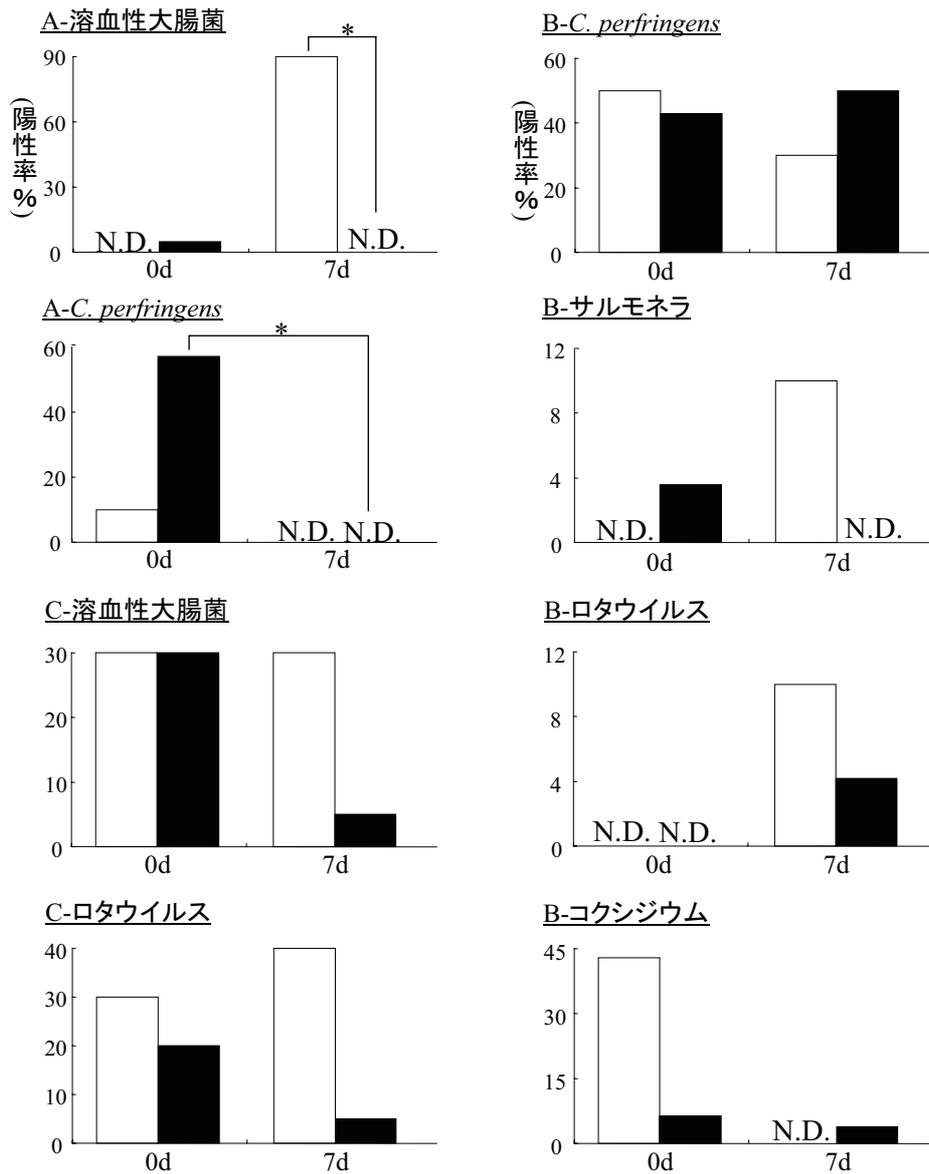
を示し、その傾向は投与開始後7日まで持続した。被毛スコアは、EC-12投与によって投与開始後2日から有意な低値を示し、その傾向は投与開始後7日まで持続した。

C農場では、EC-12投与によって糞便性状が投与翌日から改善傾向を示し、投与開始後2日には有意な低値を示した。EC-12投与による糞便性状の改善は、投与開始後7日まで持続した。投与前にEC-12投与群が対照群よりも高い元気スコアと食欲スコアを示したが、投与翌日から対照群を下回り、投与開始3日後には有意な低値を示した。この傾向はいずれも投与開始後7日まで持続した。被毛スコアは、EC-12投与によって投与開始後3日から有意に低値を示し、その傾向は投与開始後7日まで持続した。

3. 病原因子の特定 (図3)

A農場では、溶血性大腸菌及び*C. perfringens*が糞便中から分離された。EC-12投与によって、投与開始後7日の溶血性大腸菌陽性率が対照群と比較して有意に低値を示した。また、EC-12投与によって投与開始時に57%だった*C. perfringens*陽性率が、投与開始後7日には検出されなくなった。

B農場では、*C. perfringens*、サルモネラ、ロタウイルス及びコクシジウムが糞便中から検出された。*C. perfringens*陽性率が投与開始後7日にEC-12投与によって高値を示したものの、サルモネラ属菌及びロタウイ



□は対照群を、■はEC-12投与群を表す。

A農場は、スワブでの採材のため溶血性大腸菌、*C. perfringens*及びサルモネラの検査のみ行った。

サルモネラは検出されなかった。

B農場は、溶血性大腸菌、*B. hyodysenteriae*及び*L. intracellularis*は検出されなかった。

C農場は、*C. perfringens*、サルモネラ、*B. hyodysenteriae*、*L. intracellularis*及びコクシジウムは検出されなかった。

* $p < 0.05$ を有意差有りとした。

図3 糞便中の病原因子検査結果

ルス陽性率は投与開始後7日に低値を示した。コクシジウム陽性率に顕著な変化が認められなかった。

C農場では、溶血性大腸菌及びロタウイルスが糞便中から検出された。溶血性大腸菌及びロタウイルス陽性率は、投与開始後7日にEC-12投与で対照群よりも低値を示した。

まとめ

ほ乳期及び離乳期に下痢が頻発していた3農場の罹患豚に、殺菌乳酸菌体EC-12を投与したところ、糞便

性状及び増体量が改善した(図1及び2)。その効果は、投与開始1日目以降からうかがわれ、試験終了時(投与開始後7日)まで持続した。

EC-12は、ヒト用の健康食品として既に市販されている製品で、便秘改善効果⁷⁾、リステリア感染予防効果⁸⁾、腸管内ビフィズス菌増殖効果⁹⁾がある。これらの効果は、この製品が殺菌菌体であるため他の生菌製剤と違い、腸管の免疫を活性化させた結果起こっていると考えられている⁸⁾。一方で、豚では浮腫病予防効果が認められていることが報告されている²⁾。今回の試験では、この時期に発生する下痢の全ての病原因子を測定していないため、どの病原因子に対して予防効果があったのかを断定することはできない。しかし、本試験の2農場でEC-12投与によって陽性率が低値を示した溶血性大腸菌及びロタウイルスは、少なくとも感染が予防された又は治療された可能性が考

えられた(図3)。勝田ら¹⁰⁾は、ロタウイルス及び病原性大腸菌がほ乳期又は離乳期下痢から最も高率で検出されたとしていることから、EC-12は多くの養豚場で、ほ乳期及び離乳期子豚の下痢に効果があることが示唆された。

EC-12投与による下痢症の改善効果は、作用機序は未だ不明なままであるが、実験動物を用いた実験から腸管のIL-12、TNF- α などのサイトカイン産生亢進⁸⁾、および鶏ヒナの盲腸内IgA濃度の亢進¹¹⁾などの報告がある。これらの報告のように、豚でも腸管免疫を活性

化させて感染防御を促している可能性は十分に考えられる。今後、EC-12 投与による下痢予防効果の作用機序については更なる検討が必要である。

謝辞

本試験を遂行するにあたり、ご協力頂いた養豚農家の方々、病性鑑定を実施して頂いた株式会社京都動物検査センターの林純子、和田直子氏、及び体重測定及び臨床観察をお手伝い頂いた同センターの内海恭太氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) 小林秀樹 (2004) WHO 報告書—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—。豚病研報、No.45:12-48.
- 2) Tsukahara et al. (2004) *Enterococcus faecalis* cell preparation (EC-12) significantly alleviating diarrhea diseases in nursing piglets may replace antimicrobials. *Reprod. Nutr. Dev.*, 44: S49.
- 3) Tsukahara et al. (2005) Experimental infection of enterotoxemic *Escherichia coli* associated with porcine edema disease and its pathologic characteristics in the intestine. *J. Vet. Med. Sci.*, 67: 1169-1173.
- 4) Tsukahara and Ushida (2001) Organic acid profiles in feces of pigs with pathogenic or non-pathogenic diarrhea. *J. Vet. Med. Sci.*, 63: 1351-1354.
- 5) Moller et al. (1998) Detection of *Lawsonia intracel-*

lularis, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. *Vet. Microbiol.*, 62: 59-72.

- 6) 平詔亨ら (1995) 家畜臨床寄生虫アトラス。チクサン出版社、東京。
- 7) Tsukahara et al. (2005) Effect of a cell preparation of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 on digesta flow and recovery from constipation in a pig model and human subjects. *Microb. Ecol. Health Dis.*, 17: 107-113.
- 8) Kuramoto et al. (2004) The effect of the heat-killed Enterococci, EC-12, on a host defense mechanism in mice after infection with *Listeria monocytogenes*. *J. New Rem. & Clin.*, 53: 298 - 308.
- 9) Terada et al. (2004) Effects of the consumption of heat-killed *Enterococcus faecalis* EC-12 preparation on microbiota and metabolic activity of the feces in healthy adults. *Microb. Ecol. Health Dis.* 16: 188-194.
- 10) 勝田賢ら (2005) 子豚下痢便からの病原微生物の検出成績。第 68 回日本豚病研究会研究集会要旨集
- 11) Sakai et al. (2006) Cell preparation of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 prevents vancomycin-resistant enterococci colonization in the cecum of newly hatched chicks. *Poultry Sci.*, in press.