

暑熱ストレス下の仔牛における日増体量、血液代謝産物および ストレスホルモン濃度に及ぼす*Bacillus subtilis* C-3102株給与の影響

高橋秀之^{1,2}・浦川めぐみ¹・渡邊一史¹・芦田延久³・今林寛和³・佐藤光美⁴・
佐藤富雄⁴・渡邊康一¹・大和田修一¹・後藤貴文²・麻生 久^{1,*}

¹ 東北大学大学院農学研究科機能形態学分野

² 九州大学大学院農学研究科農学部附属農場高原農業実験実習場家畜生産生態学分野

³ カルピス株式会社飼料事業部

⁴ 公益社団法人 みやぎ農業振興公社

¹ 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1 〒 981-8555

² 大分県竹田市久住町大字久住字鶴が笹 4045-4 〒 878-0201

2015年7月15日受付, 2015年11月19日受理

要 約

本研究では、腸内細菌叢を最適化し飼料効率を上昇させる *Bacillus subtilis* C-3102 株を給与し、仔牛の暑熱ストレスならびに栄養状態に及ぼす *Bacillus subtilis* C-3102 株の作用を明らかにすることを目的とした。離乳後の黒毛和種雌仔牛 (12 頭) を供試し (対照区: n = 6, *Bacillus subtilis* C-3102 株給与区: n = 6)、対照区は市販配合飼料、*Bacillus subtilis* C-3102 株給与区は市販配合飼料に 3.0×10^9 個 / 頭 / 日の *Bacillus subtilis* C-3102 株を添加し給与した。また、乾草は両区ともに自由採食とした。糞中の *Bacillus subtilis* C-3102 株は、給与中に増加した。糞中の総菌数 (嫌気) および *Bifidobacterium* 数は、*Bacillus subtilis* C-3102 株給与中止後に減少した ($p < 0.05$)。日増体量は *Bacillus subtilis* C-3102 株給与前は有意 ($p < 0.01$) に小さかったが給与中止後は有意 ($p < 0.05$) な増加を示した。暑熱ストレスマーカーである血漿コルチゾール濃度は *Bacillus subtilis* C-3102 株給与区は対照区と比較し *Bacillus subtilis* C-3102 株給与中止後に有意 ($p < 0.01$) に減少した。血液代謝産物については、血漿グルコース濃度は *Bacillus subtilis* C-3102 株給与区は対照区と比較し *Bacillus subtilis* C-3102 株給与中止後に増加傾向 ($p < 0.1$) が見られた。血漿コレステロール、NEFA および TG 濃度は両区の間有意な差は認められなかった。以上より、*Bacillus subtilis* C-3102 株は生存したまま下部消化管へ到達し、暑熱下に仔牛の日増体量およびストレスホルモン濃度に影響を及ぼす可能性が示唆された。

キーワード：栄養代謝、暑熱ストレス、*Bacillus subtilis* C-3102 株

東北畜産学会報 65(3): 54 ~61 2016

諸 言

夏期の暑熱環境は仔牛の発育停滞をもたらすことが報

告されている (比嘉ら, 2002)。一方で、離乳後の反芻家畜は摂取した炭水化物から微生物発酵により揮発性脂肪酸 (VFA) が産生されエネルギー源として利用される (小原, 2004)。このため VFA 産生は反芻家畜の成長に必要な不可欠であるが、暑熱環境時は反芻胃の発酵熱を抑制するために第一胃内の収縮回数が減少する (成光ら, 1996) とともに、摂取飼料の発酵不足により第一胃内 VFA 濃

* 連絡者：麻生 久 (あそう ひさし)
(東北大学大学院農学研究科)
〒 981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1
Tel 022-717-8702 Fax 018-872-1676
E-mail : asosan@bios.tohoku.ac.jp

度が低下する(砂川ら, 1997)。さらに、体温上昇を抑制するために採食量は減少し、飼料摂取量の低下にともなう増体量の低下も認められる(野中, 2009)。したがって、暑熱環境下におけるストレス低減への対策が家畜の成長に重要であると考えられている。

暑熱ストレスは第一胃内のVFA産生だけでなく家畜のグルコース代謝や脂質代謝を変化させる。反芻家畜はグルコース利用を増加させエネルギー供給を確保するため(Silanikove, 2000)、暑熱ストレス負荷時は血中グルコース濃度が減少する(Srikandakumarら, 2003; O'Brienら, 2010)。また、暑熱環境下では熱生産を減少させるために脂肪分解が抑制され遊離脂肪酸(NEFA)濃度が減少する(Sanoら, 1985)。これらの代謝応答の変化は暑熱ストレスに対する生体防御反応であり生命維持のために必要不可欠なものであるが、成長や増体に必要なグルコースやNEFAが動員されてしまうため飼料効率の低下や家畜の生産性低下に繋がる原因の1つとなっている。

Bacillus subtilis C-3102株は、鶏において生産性の向上や体重増加に効果を示す(Frittsら, 2000)ことが報告されている。豚においては*Bacillus subtilis* C-3102株の給与が環境ストレスを緩和する(Sasakiら, 2007)。さらに、*Bacillus subtilis* C-3102株は鶏や豚において腸内環境に有益な*Bifidobacterium*属や*Lactobacillus*属などの乳酸菌を増加させ、腸内環境に有害な*C.perfringens*を減少させるといった腸内細菌叢の最適化効果を有することが示されている(Marutaら, 1996; Marutaら, 1996)。一方で、仔牛においては乳酸菌である*Bifidobacterium*属や*Lactobacillus*属の給与が体重増加効果を有することが報告されている(Abeら, 1995; Cruywagenら, 1996)ことから、*Bifidobacterium*属や*Lactobacillus*属を増加させる*Bacillus subtilis* C-3102株は豚や鶏と同様に仔牛のストレス緩和、それに伴う栄養素代謝機能の改善効果を示す可能性が考えられるが仔牛に*Bacillus subtilis* C-3102株を給与した例は少ない。

そこで本研究では、飼料効率の低下や生産性の低下が危惧される暑熱環境時の仔牛に*Bacillus subtilis* C-3102株を給与し、*Bacillus subtilis* C-3102株の暑熱ストレス下における黒毛和種仔牛の糞中の菌叢変化ならびに栄養機能に及ぼす影響を検討した。

材料および方法

本研究における動物実験は、東北大学動物実験委員会の承認を得て実施した。

1. 供試動物

黒毛和種仔牛12頭を用いて対照区(3ヵ月齢, 雌6頭, 平均体重 111.17 ± 12.69)および*Bacillus subtilis* C-3102株給与区(3ヵ月齢, 雌6頭, 平均体重 104.33 ± 7.30)の2区を設け、対照区では試験開始日(0日)から粗飼料としてチモシー乾草を自由採食とし、配合飼料は市販配合飼料(もりの薫り: 日本配合飼料: CP 18%, TDN 75%)を1kg/日および(新牛若: JA全農北日本くみあい飼料: CP 16%, TDN70%)を0.6kg/日給与し、配合飼料は朝(9:00)と夕方(15:30)の2回に分けて給餌した。枯草菌給与区はこれらの飼料に加え、試験開始14日後から1日に1頭当たり 3.0×10^9 個の*Bacillus subtilis* C-3102株を添加し、給与期間は試験開始42日後までの28日間とした。試験期間中の気温は、仔牛を飼養した公益社団法人みやぎ農業振興公社白石牧場にて計測し、試験期間中の日最高気温を結果として示した(図1a)。

2. 試料採取方法および測定方法

対照区における糞便採取は、試験開始後12日、40日および65日に実施した。*Bacillus subtilis* C-3102株給与区については、試験開始後13日(*Bacillus subtilis* C-3102株給

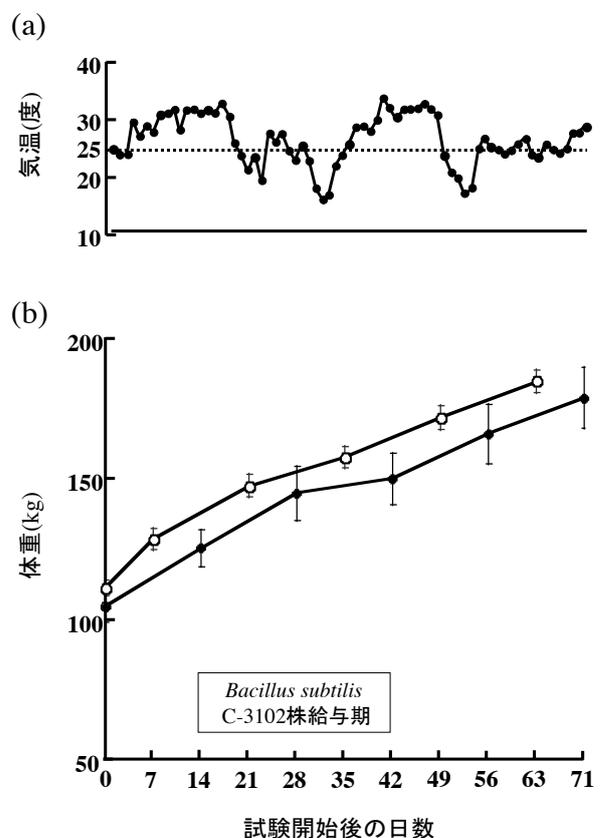


図1 試験期間中における日最高気温(a)ならびに体重の推移(b)

対照区(○)および*Bacillus subtilis* C-3102株給与区(●)

与前)、41日(給与期間中)、66日(給与終了後)に糞便採取を行った。糞便中の腸内細菌は、Maruta (1996)の方法を用いて解析した。直腸から採取した糞便は直ちに嫌気条件下にした後4°Cで保存した。9mlの嫌気的な希釈液が入ったチューブに1gの糞を移し炭酸ガス置換後、直ちに10倍ずつ段階希釈を行った。*Bacillus subtilis* C-3102株数測定用サンプルは 10^1 から 10^2 まで希釈し、それぞれの希釈液を65°Cで30分加熱後冷却し、その0.05mlをTrypticase soy (TS)ゲルに塗布し、好気的条件下で24時間培養した。嫌気総菌数、*Bifidobacterium*数測定用サンプルは、 10^1 から 10^6 まで段階希釈を行い、*C.perfringens*数測定用サンプルは、 10^0 から 10^5 まで段階希釈を行った。嫌気総菌、*Bifidobacterium*および*C.perfringens*数測定用サンプルは、それぞれglucose blood liver (BL)ゲル、*Bifidobacteria* selective (BS)ゲルおよびneomycin-brilliantgreen-taurocholate-nagler (NN)ゲルに塗布し嫌気的条件下で48時間培養し、培養終了後、それぞれのゲルに形成されたコロニー数を測定した。BL培地はBL寒天培地「栄研」(栄研化学株式会社、東京、日本)を使用した。表1に示した数値は、それぞれの希釈倍率で観察された菌数を合計したものを示した。

体重測定は、対照区では試験開始日および試験開始7日後に行いその後は試験終了後まで14日間ごとに行った。*Bacillus subtilis* C-3102株給与区は試験開始から試験終了後まで14日間ごとに行った。

採血は朝の給餌前(8:30)に行い左側頸静脈より10mlを採取した。対照区では試験開始4日および8日後に行い、その後は13日から15日ごとに行った。*Bacillus subtilis* C-3102株給与区では試験開始11日および14日後に採血を行い、その後は11日から17日ごとに採血を行った。採取した血液はヘパリン(10unit/ml)の入ったチューブに移し、3000rpmで20分の遠心分離後、血漿を採取

しサンプルとした。ストレスマーカーとして血漿中コルチゾールおよびコルチコステロン濃度、酸化ストレスマーカーとして血漿TBARS濃度をそれぞれコルチゾールELISAキット(Enzoライフサイエンス、東京、日本)、コルチコステロンELISAキット(Enzoライフサイエンス)、TBARS assayキット(Cayman CHEMICAL、ミシガン、USA)を用いて測定した。また、栄養素代謝成分として血漿グルコース、コレステロール、遊離脂肪酸(NEFA)、トリグリセリド(TG)濃度はそれぞれグルコースB-テストワコー(和光純薬工業、大阪、日本)、コレステロールE-テストワコー(和光純薬工業)、NEFAC-テストワコー(和光純薬工業)およびトリグリセリドE-テストワコー(和光純薬工業)により測定した。

3. 統計解析

体重および各血漿成分のデータは平均±標準偏差で示し、統計処理は反復測定二元配置分散分析を行った後、経時的な変化に交互作用がある項目についてはTukey-Kramer法を用いて多重比較検定を行った。 $p<0.05$ のとき有意差ありとした。各試験区内の腸内細菌数を比較するため統計解析は、Tukey-Kramer法を用いて多重比較を行い平均±標準偏差を示した。 $p<0.05$ のとき有意差ありとした。

結 果

農林水産技術会議の研究成果によれば、肉用牛ならびに哺乳仔牛の適温は25°Cまでと報告されている。試験期間中の最高気温が25°Cを超えた日は49日間であった(図1a)。枯草菌給与区における*Bacillus subtilis* C-3102株数および検出率は、給与中および給与中止後に糞便中に増加した(表1)。総菌数(嫌気)は、両区ともに試験期間

表1 試験期間中の腸内細菌叢の推移

腸内細菌種	腸内細菌数 (log CFU/g) と検出個体数 (分離検体数/検査検体数) ¹					
	給与前 ²		C-3102株給与中 ³		給与中止後 ⁴	
	対照区	給与区	対照区	給与区	対照区	給与区
<i>Bacillus subtilis</i> (C-3102株)	2.76 ± 0.56 ^B (4/6)	2.55 ^c (1/6)	3.66 ± 0.37 ^A (6/6)	5.08 ± 0.11 ^a (6/6)	3.58 ± 0.51 ^A (6/6)	3.79 ± 0.28 ^b (6/6)
嫌気細菌 (総菌)	8.68 ± 0.36 ^A (6/6)	8.80 ± 0.49 ^a (6/6)	8.24 ± 0.30 ^A (6/6)	8.27 ± 0.43 ^{ab} (6/6)	7.38 ± 0.69 ^B (6/6)	7.83 ± 0.60 ^b (6/6)
<i>Bifidobacterium</i>	7.68 ± 0.48 ^A (6/6)	7.89 ± 0.52 ^{ab} (6/6)	8.15 ± 0.33 ^A (6/6)	8.06 ± 0.37 ^a (6/6)	6.52 ± 0.69 ^B (6/6)	7.12 ± 0.84 ^b (6/6)
<i>C. Perfringens</i> ⁵	2.26 (1/6)	2.26 ± 0.02 (2/6)	4.99 ± 1.85 (3/6)	3.19 ± 1.26 (2/6)	3.25 ± 1.35 (2/6)	2.95 ± 0.34 (5/6)

¹A, B, C: $P<0.05$. a, b, c: $P<0.05$; 試験区内における有意差。

²糞採材日: 対照区が試験開始後12日、給与区は試験開始後13日(給与1日前)。

³糞採材日: 対照区が試験開始後40日、給与区は試験開始後41日(給与後27日)。

⁴糞採材日: 対照区が試験開始後65日、給与区は試験開始後68日(給与中止後26日)。

⁵*C.Perfringens*の検出限界 = 2.30

を通して減少した。*Bifidobacterium* 数は給与中止後に減少した。*C.perfringens* 数は、対照区では試験開始 13 日後において 6 検体中 1 検体で検出された。また、試験開始 41 日後は 6 検体中 3 検体で検出され菌数も高かったが、給与区では菌数は微増であった。検出率は *Bacillus subtilis* C-3102 株の給与を中止した後に増加した (表 1)。

体重は両区の間には差は見られなかった (図 1b) が、日増体量は経時的な変化に交互作用が認められた ($p < 0.01$)。対照区における日増体量は給与前と比較し給与中および給与後に有意 ($p < 0.05$) な低下が見られたが、*Bacillus subtilis* C-3102 株給与区では給与中止後は給与前と比較し有意な差は見られなかった (表 2)。

血漿コルチゾール濃度は経時的な変化に交互作用が認められた ($p < 0.05$)。 *Bacillus subtilis* C-3102 株給与区は *Bacillus subtilis* C-3102 株給与中止後に有意 ($p < 0.05$) に減少した (表 3)。血漿コルチコステロン濃度は経時的な変化に交互作用は認められ ($p < 0.05$)、血漿 TBARS 濃度は経時的な変化に交互作用は認められなかった。しかしながら両区ともに試験期間を通した変化は無かった (表 3)。

血漿グルコース濃度は経時的な変化に交互作用は認められなかった。(表 3)。

血漿コレステロール濃度は経時的な変化に交互作用は認められた ($p < 0.01$)。しかしながら両区ともに試験期間を通した変化は無かった (表 3)。血漿 NEFA および TG 濃度は、経時的な変化に交互作用は認められた ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。対照区における血漿 NEFA および TG 濃度は給与中および給与中止後は給与前と比較し有意な減少が見られた ($p < 0.05$)、が *Bacillus subtilis* C-3102 株給与区は変化が見られなかった (表 3)。

考 察

肉用牛ならびに哺乳仔牛の適温は 25℃ までとされているが試験期間中の最高気温が 25℃ を超えた日は、試験期間 71 日間中に 49 日間を記録した。また、総嫌気細菌数は対照区、*Bacillus subtilis* C-3102 株給与区ともに試験開始 13 日後から 68 日後まで減少した。腸内の嫌気細菌はストレスにより減少する (光岡, 1991) ことから仔牛は暑熱ストレスを感受していたと考えられる。また、岡ら (1995) は、健康な肉用牛の血漿コルチゾール濃度は、5.6ng/ml と報告している。本研究では、対照区および *Bacillus subtilis* C-3102 株給与区の血漿コルチゾール濃度は、6ng/ml~10ng/ml を推移していたことから仔牛は

表 2 試験期間における日増体量の推移¹

	給与前		C-3102 株給与中		給与中止後	
	対照区	給与区	対照区	給与区	対照区	給与区
試験開始後日数 (期間)	1-7 日 (7 日間)	1-14 日 (14 日間)	7-35 日 (29 日間)	14-42 日 (29 日間)	35-63 日 (29 日間)	42-71 日 (29 日間)
25℃ 以上の日数	4 日	12 日	16 日	17 日	21 日	22 日
日増体量 (kg)**	2.50 ± 0.42 ^A	1.50 ± 0.47 ^a	1.04 ± 0.06 ^B	0.88 ± 0.31 ^b	0.96 ± 0.31 ^B	1.25 ± 0.24 ^{ab}

¹** $P < 0.01$: 反復測定二元配置分散分析における交互作用 (日増体量 vs Time)。A, B: $P < 0.05$, a, b: $P < 0.05$; 試験区内における有意差。

表 3 各給与期間内におけるストレスホルモンおよび血液代謝成分濃度変化¹

血漿測定項目	給与前		C-3102 株給与中		給与中止後	
	対照区 (4 日、8 日) ²	給与区 (11 日、14 日)	対照区 (21 日、35 日)	給与区 (29 日、42 日)	対照区 (48 日、63 日)	給与区 (48 日、70 日)
コルチゾール (ng/ml)*	9.89 ± 1.30	9.96 ± 0.96 ^a	9.21 ± 1.70	9.23 ± 1.85 ^a	9.05 ± 0.91	6.97 ± 0.93 ^b
TBARS (ng/ml)	4.30 ± 1.13	4.35 ± 1.06	4.70 ± 1.14	5.11 ± 1.35	3.90 ± 1.06	4.97 ± 1.28
コルチコステロン (mg/ml)*	26.29 ± 1.86	25.36 ± 1.01	26.51 ± 1.16	25.82 ± 1.32	26.73 ± 1.81	25.71 ± 1.39
グルコース (mg/dl)	90.53 ± 16.86	88.50 ± 11.56	75.27 ± 6.41	81.37 ± 10.20	67.78 ± 6.57	74.16 ± 3.82
コレステロール (mg/dl)**	82.42 ± 24.43	49.93 ± 10.78	59.44 ± 15.36	60.63 ± 18.23	56.87 ± 12.02	62.21 ± 13.67
NEFA (mEq/l)**	0.175 ± 0.052 ^A	0.078 ± 0.035	0.093 ± 0.023 ^B	0.088 ± 0.012	0.086 ± 0.019 ^B	0.073 ± 0.025
トリグリセリド (mg/dl)*	12.77 ± 3.85 ^A	8.66 ± 2.49	6.99 ± 1.38 ^B	7.77 ± 2.30	8.54 ± 3.02 ^B	8.55 ± 2.04

¹* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: 反復測定二元配置分散分析における交互作用 (血漿測定項目 vs Time)。A, B: $P < 0.05$, a, b: $P < 0.05$; 試験区内における有意差。

² 試験開始後の採血日

暑熱ストレスを受けていたと推察される。

本試験では、TS培地上の *Bacillus subtilis* C-3102株コロニーが非常に特有のコロニー形状（山型）を作り、他の株と容易に区別が可能であることから特有のコロニー（山型）を *Bacillus subtilis* C-3102株として測定した。*Bacillus subtilis* C-3102株給与区において給与期間中である試験開始41日の時点で1g当たりの菌数がlogで5（対数）の菌数が検出されており、本試験が成立している事を示している。また本試験結果から、*Bacillus subtilis* C-3102株給与区は *Bacillus subtilis* C-3102株給与を中止した後においても有用菌である *Bifidobacterium* 数の減少を抑えたことから、*Bacillus subtilis* C-3102株は有用菌である *Bifidobacterium* の多い腸内環境を作り、その効果は *Bifidobacterium* に対して持続的である可能性が考えられる。一方で、有害菌である *C.perfringens* 数は *Bacillus subtilis* C-3102株給与を止めた試験開始68日後に検出率が上昇した。本来、腸内菌叢のバランスは安定しているが飼料環境の変化によって変動する（光岡, 1991）。したがって、*Bacillus subtilis* C-3102株給与を止めた結果、腸内細菌叢のバランスが変化し徐々に腸内環境が悪化したため有害菌である *C.perfringens* 数の検出率が変化したと推察される。

家畜はストレス負荷時にコルチゾール分泌が上昇する（齋藤ら, 2010）。*Bacillus subtilis* C-3102株給与区では、血漿コルチゾール濃度は経時的な変化に交互作用があり *Bacillus subtilis* C-3102株給与中止後に6ng/ml前後まで減少した。*Bifidobacterium* 等の腸内有用菌は、有害菌の増加を阻止する（光岡, 2011）。SmirnovとLizko（1987）はストレス反応により腸内の *Bifidobacterium* 等の有用菌が減少し腸内細菌叢のバランスが崩れる事を報告している。一方で、須藤（2009）はマウスにおいて腸内細菌の存在がストレス応答を緩和させることを報告している。したがって、暑熱下の *Bacillus subtilis* C-3102株給与により *Bifidobacterium* 数の減少が抑えられことがストレスの低減やコルチゾール濃度の低下に繋がった可能性が推察される。

日増体量は経時的な変化に交互作用があり、対照区では低下したが *Bacillus subtilis* C-3102株給与区では *Bacillus subtilis* C-3102株給与中止後に給与前と同じ水準に回復した。齋藤ら（2010）はストレスによって分泌されるコルチゾールは血糖値の上昇や脂肪分解などの代謝が促進されることが体重減少の要因であると報告している。*Bacillus subtilis* C-3102株給与区では、血漿コルチゾール濃度の低下が見られた。したがって、*Bacillus subtilis* C-3102株給与によりストレス応答が緩和されたために日増体量の回復につながった可能性が考えられる。以上よ

り、*Bacillus subtilis* C-3102株給与は脂質代謝に影響を及ぼさないがストレス応答の変化が日増体量に影響を及ぼす可能性が示唆された。

反芻家畜はグルコースの供給をVFAのプロピオン酸を主な基質とした糖新生により賄われることが知られている。また、プロピオン酸は有用菌である *Bifidobacterium* の増殖を促進する（Kanekoら, 1994）。本研究結果から暑熱環境時に *Bacillus subtilis* C-3102株は有用菌である *Bifidobacterium* の減少を抑えることが明らかとなった。反芻家畜は暑熱環境において反芻胃の発酵熱を抑制するため第一胃の収縮回数が減少しVFA濃度が低下する（佐野, 1998）が、本研究結果より *Bacillus subtilis* C-3102株給与はグルコース供給や有用菌である *Bifidobacterium* の多い腸内細菌叢を維持する可能性が示唆されている。したがって、*Bacillus subtilis* C-3102株給与による *Bifidobacterium* の増加は第一胃内の発酵や飼料からのVFA生産を正常に保つ可能性が考えられるが、VFA中のプロピオン酸から糖新生により生成される血漿グルコース濃度は飼料の効果および経時的な変化に交互作用は認められなかった。VFA産生や血漿グルコース濃度に対する *Bacillus subtilis* C-3102株給与効果については *Bacillus subtilis* C-3102株給与期間の延長や給与量を増やす等のさらなる検討が必要である。

血漿TBARS濃度は脂質の酸化性ストレスマーカーの一つであることが知られ（Nielsenら, 1997）、暑熱環境下で増加する（Tanakaら, 2007）。また、コルチコステロンは慢性的な酸化ストレスにより上昇する（浦野, 2007）。本研究では、血漿TBARSは経時的な変化に交互作用は認められず、血漿コルチコステロン濃度は経時的な変化に交互作用は認められた。しかしながら、両区ともに試験期間を通して変動が無いことから、*Bacillus subtilis* C-3102株は、仔牛の酸化ストレスに影響を及ぼさないことが示唆された。

血漿コレステロールは経時的な変化に交互作用があったが、試験区内の変動に差は無かった。コレステロールはアセチルCoAからメバロン酸を経て肝臓や小腸で合成され、律速酵素であるヒドロキシメチルグルタリル-CoAレダクターゼにより合成される（奥村ら, 1995）ことから、*Bacillus subtilis* C-3102株はこの経路に影響を及ぼさない可能性が推察される。

血漿NEFAおよびTGは経時的な変化に交互作用があったが、これは対照区の血漿NEFAおよびTG濃度が給与前に高い濃度を示したことに起因すると考えられる。対照区における給与前は最高気温が25℃を超えた日は4日間と少なく、この時期は暑熱ストレスが低い状態だったのでないかと推測される。飼料中の脂質であるTG

はルーメン内に存在する微生物によりグリセロールと脂肪酸に加水分解される。グリセロールは血液を循環し肝臓に取り込まれ（佐々木ら，1998）、脂肪酸の一部は微生物に取り込まれ微生物体の構成素材となり下部消化管で吸収される（板橋ら，1998）。微生物により分解を免れたTGは睥リパーゼにより分解され炭素数の少ない脂肪酸は小腸の絨毛上皮細胞から門脈血中に移行しNEFAとして輸送される。炭素数が10から12個以上の脂肪酸は小腸の絨毛上皮細胞中でTGに再合成され腸管リンパに移行し輸送される（加藤，1998）。本研究結果では給与中および給与後は両区ともに血漿NEFAおよびTG濃度は低く推移し試験区内の変動に差は認められなかった。したがって、この時期は暑熱ストレスを感受していたものと推察され *Bacillus subtilis* C-3102 株は肝臓での加水分解やルーメンにおけるTG分解および小腸における脂質代謝やTG再合成に影響を及ぼさない事が示唆される。

本研究では、黒毛和種仔牛への *Bacillus subtilis* C-3102 株給与が暑熱ストレスならびに栄養状態に及ぼす影響について検討した。その結果、*Bacillus subtilis* C-3102 株は生存したまま腸に到達し、仔牛の腸内細菌叢を最適化させることが示唆された。また、*Bacillus subtilis* C-3102 株は脂質代謝や酸化ストレス低減には影響を及ぼさないが、ストレスに対する代謝応答を向上させる効果を持つことが判明した。これらのことから *Bacillus subtilis* C-3102 株は、腸内細菌叢を最適化することにより暑熱環境下の仔牛の健康状態や発育にとって有用であることを示した。本研究の結果より、*Bacillus subtilis* C-3102 株を家畜へ給与することは仔牛のストレス低減対策や発育向上対策として今後の新たな飼養管理技術の開発に寄与すると考える。

謝 辞

本研究は、カルピス株式会社および公益社団法人みやぎ農業振興公社との共同研究により行われた。

引用文献

Abe F, Ishibashi N, Shimamura S. Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *J. Dairy Sci.*, 78: 2838-2846. 1995.
 Cruywagen CW, Jordaan I, Venter L. Effect of lactobacillus acidophilus supplementation of milk replacer on preweaning performance of calves. *J. Dairy Sci.*, 79: 483-486. 1996.
 Fritts CA, Kersey JH, Motl MA, Kroger EC, Yan F, Si J, Jiang Q, Campos MM, Waldroup AL, Waldroup PW. *Bacillus*

subtilis C-3102 (Calsporin) improves live performance and microbiological status of broiler chickens. *J. Appl. Poult. Res.*, 9: 149-155. 2000.
 比嘉辰雄, 外間聡, 平山琢二, 石嶺行男. 亜熱帯フィールド科学教育研究センターにおける子牛の下痢発生状況. *琉球大学術報*, 49: 219-222. 2002.
 板橋久雄. 反芻動物の栄養生理学. 第1版. (佐々木康之 監修, 小原嘉昭 編集) 104-105. 社団法人農山漁村文化協会. 東京. 1998.
 Kaneko T, Mori H, Iwata M, Meguro S. Growth stimulator for bifidobacteria produced by propionibacterium freudenreichii and several intestinal bacteria. *Int. J. Dairy Sci.*, 77: 393-404. 1994.
 加藤清雄. 反芻動物の栄養生理学. 第1版. (佐々木康之 監修, 小原嘉昭 編集) 128-129. 社団法人農山漁村文化協会. 東京. 1998.
 Maruta K, Miyazaki H, Tadano Y, Masuda S, Suzuki A, Takahashi H, Takahashi M. Effects of *Bacillus subtilis* C-3102 intake on fecal flora of sows and on diarrhea and mortality rate of their piglets. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)*, 67: 403-409. 1996.
 Maruta K, Miyazaki H, Masuda S, Takahashi M, Marubashi T, Tadano Y, Takahashi H. Exclusion of intestinal pathogens by continuous feeding with *Bacillus subtilis* C-3102 and its influence on the intestinal microflora in broilers. *Anim. Sci. Technol. (Jpn.)*, 67: 273-280. 1996.
 光岡知足. 家畜生産における生菌剤の利用. *ピフィズ*, 5: 1-18. 1991.
 光岡知足. 腸内菌叢研究の歩み. *腸内細菌学雑誌*, 25: 113-124. 2011.
 成光昭男, 林田宏昭, 長友邦男. 暑熱がフリーストール牛舎内の搾乳牛の行動に及ぼす影響. *九州農業研究*, 58: 125. 1996.
 Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Anderson HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin. Chem.*, 43: 1209-1214. 1997.
 野中最子, 小林洋介, 樋口浩二, 永西修. 地球温暖化が日本における家畜の生産性に及ぼす影響評価の現状と課題. *地球環境*, 14: 215-222. 2009.
 小原嘉昭. 新ルーメンの世界. 第1版. (小野寺良次 監修, 板橋久雄 編集) 341-354. 社団法人農山漁村文化協会. 東京. 2004.
 O'Brien MD, Rhoads PR, Sanders SR, Duff GC, Baumgard LH. Metabolic adaptations to heat stress in growing cattle. *Domest. Anim. Endocrinol.*, 38: 86-94. 2010.

- 岡章生, 壽圓正克, 道後泰治, 鳥飼善郎. 簡易パイプにおける牛舎における肥育牛の血液性状と肉質. 兵庫県農技研報 (畜産), 31: 33-36. 1995.
- 奥村純一, 田中圭一. 動物栄養学. 第1版. (奥村純市, 田中圭一 編集) 123. 朝倉書店. 東京. 1995.
- 齊藤隆夫, 高橋覚志, 岩間永子, 小川慎吾, 堀越忠泰, 合原義人. 肉用子牛のストレス軽減による市場性向上試験. 茨城県畜産研究報, 42: 27-30. 2010.
- Sano H, Ambo K, Tsuda T. Blood glucose kinetics in whole body and mammary gland of lactating goats exposed to heat. *J. Dairy Sci.*, 68: 2557-2564. 1985.
- 佐野宏明. 反芻動物の栄養生理学. 第1版. (佐々木康之 監修, 小原嘉昭 編集) 322-323. 社団法人農山漁村文化協会. 東京. 1998.
- 佐々木晋一. 反芻動物の栄養生理学. 第1版. (佐々木康之 監修, 小原嘉昭 編集) 219-221. 社団法人農山漁村文化協会. 東京. 1998.
- Sasaki T, Atsuji H, Yoshida C. Effect of probiotics (*Bacillus subtilis* strain C-3102) on reduce of environmental stress for fattening pig. *Tohoku Agricul. Res.*, 60: 97-98. 2007.
- Silanikove N. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livest. Prod. Sci.*, 67: 1-18. 2000.
- Smirnov KV and Lizko NN. Problems of space gastroenterology and microenvironment, *Nahrung.*, 31: 563-566. 1987.
- Srikandakumar A, Johnson EH, Mahgoub O. Effect of heat stress on respiratory rate, rectal temperature and blood chemistry in Omani and Australian Merino sheep. *Small Rumin. Res.*, 49: 193-198. 2003.
- 砂川勝徳, 桜田賢, 高橋宏, 本郷富士弥, 新城明久, 城間定夫. ヤギにおける第一胃液中低級脂肪酸濃度および消化率に及ぼす暑熱環境の影響. *日畜会報*, 68: 156-162. 1997.
- Tanaka M, Kamiya Y, Kamiya M and Nakai Y. Effect of high environmental temperatures on ascorbic acid, sulfhydryl residue and oxidized lipid concentrations in plasma of dairy cows. *Anim. Sci. J.*, 78: 301-306. 2007.
- 浦野四郎. 退行性変化発生機序の解明とその防御. 先端工学研成果報, 1-7. 2007.

The effect of *Bacillus subtilis* C-3102 on daily weight gain, nutrient metabolism and stress hormone levels in heat stressed calves

Hideyuki Takahashi^{1,2} · Megumi Urakawa¹ · Hitoshi Watanabe¹ · Nobuhisa Ashida³ · Hirokazu Imabayashi³ · Natsumi Koyama³ · Mitsuyoshi Satoh⁴ · Tomio Satoh⁴ · Kouichi Watanabe¹ · Shuichi Owada¹ · Takafumi Gotoh² · Hisashi Aso^{1,*}

¹Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, Japan.

²Faculty of Agriculture, Graduate School, Kujū Agricultural Research Center, Kyushu University, Kujū-cho, Taketa, Oita, Japan. ³Calpis Food Industry Co. Ltd., Sagamihara, Kanagawa, Japan.

⁴Miyagi Agricultural Corporation, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, Japan.

1-1, Amamiya-machi, Tsutsumitori, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, 981-8555, Japan.

4045-4, Tsurugasasa, kujū-cho, Taketa, Oita, 878-0201, Japan.

Corresponding author: Hisashi Aso

Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Aoba-ku, Sendai, Miyagi, Japan

Tel: +81-22-717-8702 e-mail: asosan@bios.tohoku.ac.jp

The purpose of this study was to determine the effect of feeding *Bacillus subtilis* strain C-3102 to calves on their intestinal flora, nutritional status, and ability to withstand heat stress. Twelve Japanese Black female calves after weaning were randomly assigned to two groups (control group: n = 6, *Bacillus subtilis* strain C-3102 group: n = 6). The both calves were fed concentrate and hay (ad libitum). *Bacillus subtilis* strain C-3102 group were added *Bacillus subtilis* strain C-3102 of 3.0×10^9 cells / head / day in diet. The number of colony forming units of *Bacillus subtilis* strain C-3102 in the feces of *Bacillus subtilis* strain C-3102 group increased ($p < 0.05$) during the study period. The total number of bacteria in the feces (anaerobic) and Bifidobacterium number were reduced after stop the *Bacillus subtilis* strain C-3102 salary ($p < 0.05$). Daily weight gain was significantly smaller ($p < 0.01$) before *Bacillus subtilis* strain C-3102 salary. But, it showed a significant increase ($p < 0.05$) compare to control group. Daily weight gain was a significantly increase ($p < 0.05$) after stop in the *Bacillus subtilis* strain C-3102 group. Plasma cortisol concentration in *Bacillus subtilis* strain C-3102 group, a marker of heat stress, significantly decreased ($p < 0.01$) compare to control group. Plasma glucose levels after stop tended to increase ($p < 0.1$) compared to control group. Plasma cholesterol, NEFA and TG concentrations were not different between the two groups. These results suggest that orally ingested *Bacillus subtilis* strain C-3102 reaches the lower intestinal tract while still viable and improves the daily weight gain. Additionally, *Bacillus subtilis* strain C-3102 could affect the stress hormone levels.

Key words: *Bacillus subtilis* strain C-3102, heat stress, nutrition metabolism