

解説記事

抗菌剤使用の制限意識が高まる養豚におけるキトオリゴ糖の活用

— 腸内環境の制御を中心に —

押田明則・大貫勝彦

(株)フロンティアインターナショナル, 神奈川県川崎市麻生区, 215-0025

要約 薬剤耐性菌の対策として抗菌剤の使用制限が提唱されるようになり、代替品として検討されたキトオリゴ糖(以下、COS)について話題提供した。COSの作用を検証するために行われた様々な抗菌剤との比較試験ではそれらの機序は異なるものの、結果として、十二指腸から回腸までの間で絨毛の発達を促進したり、微生物叢を好ましい状態にするなどの腸内環境を改善し、その作用は抗菌剤と同等の影響力を有するとしていることからCOSは抗菌剤の代替品として利用可能と考えられ、その適正な飼料中の濃度は200~600 mg/kg 飼料の範囲と考えられた。

キーワード: キトオリゴ糖、養豚

受領日: 18.06.2024. 受理日: 01.08.2024.

日本畜産環境学会誌

序文

畜産領域における薬剤耐性菌の対策に関して高橋ら[1]は、感染症の治療薬として発見されたペニシリンに始まり、数多くの抗菌剤が開発され、医学のみならず獣医学領域でも利用されるようになり、その後家畜の発育促進および飼料栄養成分の利用促進や内部寄生虫の感染予防を目的に低濃度で長期間利用し、その家畜を食用に供してもヒトに給与した抗菌剤の影響が出ないことを確認して飼料添加物として認められてきたが、長期間の薬剤使用によって薬剤耐性菌が発現し、耐性菌がヒトの健康に及ぼす危険性が提唱されるようになってきたと、耐性菌の出現に関する背景を解説している。

また、田村[2]は、現在の取り組みとして動物用抗菌剤や抗菌性飼料添加物(抗菌剤の代替品)によるリスク評価の実施などが国際獣疫事務局(OIE)の提唱によって取り込まれるようになっていくことを解説している。抗菌剤の代替品に関しては自然界の様々な機能性物質が対象として検討されており、その一つとして注目されているのが腸管内の良性微生物(いわゆる善玉菌)の増殖を促すプレバイオティクスである難消化性のオリゴ糖である。オリゴ糖は甘味成分である以外に生理的機能を有することで着目されている。具体的には福安ら[3]は黎明期の試験であるが豚を対象とした内容で、発育促進効果、腸内フローラ改善効果などの生理的

養豚におけるキトオリゴ糖の活用

機能について広範な効果を確認している。

自然界に多く存在するセルロースやヘミセルロースとは異なり、難消化性オリゴ糖の一種であるキトオリゴ糖やキトサンオリゴ糖(以下COS)はNアセチルグルコサミンまたはグルコサミンが2~6個 β -(1,4)グリコシド結合したものである。甲殻類の殻から精製するキチンまたはキチンを脱アセチル化して得られるキトサンにグルコサミンが2~6個結合した状態で精製される。COSには血糖値調節作用や免疫活性作用が着目[4]されている。COSの化学的性質としてキトサンに比べて分子量が小さく、容易に水に溶けやすいことが一般的に知られている。COSの原料は前述のように加工時に廃棄される甲殻類の甲羅や真菌および植物の細胞壁に豊富に含まれるキチンであり、入手は容易である。近年、COSが動物生産において果たす潜在的な活性機能についての研究が取り込まれ、その作用機序が知られるようになってきた。そこで本稿ではその研究事例、主として養豚分野について紹介する。

具体的な報告事例

キチン、キトサンの有効活用については1980年代初頭に検討が始まり、この流れの中で高橋[5]は急性炎症を惹起したマウスを対象としてCOSの血管透過性抑制活性をアスピリンと比較し、COSが有効であること、鎮痛活性はCOSがアスピリンよりも高いこと、さらに歯肉炎に対する抗炎症効果もアスピリンよりも高いこと等を報告している。

Kimら[6]の研究成果において下記の内容が明らかにされた。4週間高コレステロール食を与えたラットを供してCOSが血中脂質、抗酸化酵素活性、過酸化脂質量に及ぼす影響を観察した。ラットはCOSを与えない対照区、COSを1%給与した区、COSを2%給与した区の3区に配分した。COSを2%給与した区では血中総コレステロール値、LDLコレステロール値、中性脂

質が有意に減少し、相対して総コレステロールに対するHDLコレステロールの割合が高まった。肝臓の脂質酸化度を示すTBARSの値や細胞内の活性酸素を分解する酵素活性の指標であるSODおよび過酸化水素を水に変換する酵素であるカタラーゼの活性はCOSを1%給与した区で有意に低下した。以上の結果から高コレステロール食を摂取したラットにおいて、COSは血中コレステロール量を引き下げ、肝臓の抗酸化防御機能を活性化して過酸化のダメージを低減すると結論された。

Liuら[7]は16日齢、平均体重 4.72 ± 0.23 kgの離乳子豚50頭を対象としてCOS給与が成長、大腸菌と乳酸菌の排出、見かけの消化率、小腸の表皮構造に及ぼす影響を観察した。子豚は単飼育の代謝ケージに収容され、基礎飼料を給与した対照区、COSを飼料1kg当たり100、200、400mg含む飼料を給与した試験区、抗菌剤(クロルテトラサイクリン:CTC)を飼料1kg当たり80mg給与した区の5区に分配した。離乳後0、7、14および21日の新鮮ふんを採取し、大腸菌と乳酸菌の排出程度を調査した。19~21日の新鮮ふんを採取して凍結保存し、見かけの消化率測定に利用した。そして、21日目に全ての子豚をと殺し、粘膜組織を観察するために十二指腸、空腸、回腸それぞれの中央部を採取した。COSを100、200mgとCTCを給与した区は増体量、飼料摂取量、飼料効率が対照区に比べて有意($P < 0.05$)に高まった。COS200mg給与区はCTC給与と同様に乾物、総エネルギー、粗タンパク質、粗脂肪、カルシウム、リンの見かけの消化率と吸収率が有意($P < 0.05$)に高まり、COSを100mg給与した区は乾物の消化率とカルシウム、リンの吸収率が対照区よりも有意($P < 0.05$)に高まった。COSあるいはCTCを摂取した子豚では対照区に比べて下痢発生の頻度が有意($P < 0.05$)に低下した。離乳後14、21日目においてCOSを摂取した子豚のふんでは対照区や抗生物質を摂取した区よりも乳酸菌が有意($P < 0.05$)に

養豚におけるキトオリゴ糖の活用

多かった。一方で、COS200mg と CTC のいずれかを摂取した子豚の離乳後 21 日目のふんは対照区のそれに比べて大腸菌が有意 ($P < 0.05$) に減少していた。COS を 200mg と CTC のいずれかを摂取した区では空腸と回腸の絨毛の長さが伸び、絨毛と腸陰窩の比が有意 ($P < 0.05$) に高まり、COS を 100mg 摂取した区は対照区に比べて空腸絨毛の長さが有意 ($P < 0.05$) に長かった。以上の結果から COS を 100mg または 200mg 給与すると見かけの消化率を高め、下痢の発生を予防し、小腸の組織を良好にすることで子豚の発育を促進するものと結論された。

Wang ら[8]は、初期体重 23.6 ± 1.1 kg の育成中の三元交雑種豚 144 頭を用いて COS の飼料添加が成長、栄養素消化率、血液性状、ふん中微生物叢に及ぼす影響を検討した。子豚は基礎飼料、基礎飼料に 100ppm タイロシン 44mg を添加した区、基礎飼料に COS5g を添加した区、基礎飼料にタイロシン 44mg と COS5g を添加した区の 4 区に区分した。豚は 1 豚房に 4 頭の群飼育を行い、各区に 9 豚房(9 反復)を用意した。試験を通じてタイロシンと COS を併用した区は平均飼料摂取量が少なく、飼料効率が他の試験区よりも有意 ($P < 0.05$) に高かった。さらに、併用区のみが乾物、窒素、総エネルギーの消化率が有意 ($P < 0.05$) に高かった。赤血球数、白血球数および血漿中アルブミン量は COS とタイロシンのどちらの影響も受けなかった。しかし、リンパ球の構成や血漿総タンパク質濃度はタイロシンを添加した区で添加していない区よりも有意 ($P < 0.05$) に高くなった。タイロシンは血漿中の IgG を有意 ($P = 0.02$) に高めたが、COS あるいはタイロシンを添加した区では総コレステロール量と中性脂質量に影響は認められなかった。COS を給与した区では給与していない区に比べて HDL コレステロールが有意 ($P = 0.02$) に高まった。COS の給与はふん中の大腸菌数を有意 ($P < 0.01$) に減少させたが、ふん中の乳酸菌数は COS、タイロシンの影響を受けなかった。

結果として、飼料への COS 添加は飼料消化率を高め、ふん中の大腸菌を減らすことを示した。

Liu ら[9]は、COS が抗生物質の代替になりうるかを初期平均体重 4.9 ± 0.3 kg の交雑種子豚 72 頭を対象として代替試験を行った。試験では大腸菌 K88 で感作した子豚に飼料 1kg あたり COS160mg を添加するか、シアドックス 100mg を添加した飼料の給与で行っており、対照として大腸菌感作していない 2 区も設け、計 4 区とした。子豚は 1 区に 6 豚房を当て、1 豚房に 3 頭を無作為に配分した。結果として、大腸菌感作によって、飼料摂取量、増体量、ふんの性状、粘膜表面構造および血中 IGF-1 は有意 ($P < 0.05$) に悪化し、下痢の頻度、小腸内の大腸菌数、血中インターロイキン- 1β 、-10 ならびに空回腸の IGA 陽性細胞は大腸菌感作していない子豚よりも有意 ($P < 0.05$) に多くなった。COS を給与した子豚では下痢の症状は少なくなったが、増体などには COS を給与していない子豚との差はなかった。以上のことからこの試験成績は下痢を抑制する作用を有するが、それ以上の影響はこの試験では確認できなかったとしている。

Yang ら[10]は、180 頭の離乳子豚(平均体重 5.98 ± 0.04 kg)を対象として基礎飼料の対照区、COS を飼料 1kg 当たり 200、400 および 600mg 添加した 3 区ならびにコリスチン(飼料 1kg 当たり 20mg)添加区に初期体重、性別で均等配分し、14 日間の試験飼育を行った。離乳後 7~14 日の間に各区から無作為に選択した 6 頭の子豚から、血清、腸各部位と盲腸のサンプルを採取した。離乳後 7 日間に COS、抗生物質摂取区は対照区よりも日増体量と日飼料摂取量が大きかった。2 週間の間は COS400、600mg 添加区とコリスチン添加区が対照区に比べて日増体量と飼料効率が有意 ($P < 0.05$) に高かった。COS 給与区と抗生物質給与区の間には増体量、飼料摂取量、飼料効率の差は認められなかった。COS400mg と 600mg を摂取した子豚とコリスチンを摂取した子豚は血清中のジアミンオキシダーゼの活性

養豚におけるキトオリゴ糖の活用

が低下したが、空腸粘膜のジアミンオキシダーゼの活性は離乳 7 日後に対照区よりも有意 ($P < 0.05$) に高かった。これらの処理は腸管粘膜の構造に一切影響しなかった。COS400mg を摂取した子豚では盲腸内のビフィズス菌、乳酸菌が対照区とコリスチン摂取区よりも有意 ($P < 0.05$) に増加した。COS とコリスチンを摂取した子豚の盲腸内スタフィロコッカスは対照区に比べて有意 ($P < 0.05$) に少なかった。600mg の COS を摂取した子豚の盲腸内ビフィズス菌は離乳 14 日後にコリスチン摂取区や対照区よりも有意 ($P < 0.05$) に多かった。しかし、盲腸内の大腸菌数に処理間の差はなかった。以上より、離乳子豚への COS400、600mg 給与は成長を促進し、腸管の防御機能を高め、ビフィズス菌、乳酸菌の増殖を促進し、盲腸内の微生物叢の改善が認められた。

Bahar ら[11]は、様々な生理活性を有する COS が炎症に関するサイトカイン遺伝子の発現に及ぼす影響をヒトの腸管上皮粘膜細胞を用いて検討した。結果として、COS は *CCL20*、*CCR6*、*CCL17*、*CCR8*、*IL8* など 11 種の遺伝子の発現を高め、*CCL15* や *CCL25* など 10 種の遺伝子発現を低下させた。さらに COS は炎症信号を転写する AP-1 回路を活性化し *JUN* 遺伝子の発現を高めながらも NF- κ B 回路によって誘起される TNF- α や *RELA*、*IKKB* 遺伝子発現に抑制的に作用した。これらの点から COS は腸管の免疫系を刺激することが明らかになった。

Wang ら[12]は、大腸炎における重大な病的変化として粘液層と上皮細胞の密な接合による防御機能に注目している。しかし、過去の研究では COS の粘液層に対する作用について検討できていない。そこで、ヒトの大腸粘液分泌細胞 HT-29 を培養して腸管粘液への COS の作用を検討した。COS は薬剤で生じる粘液の減少を軽減し、さらに COS の構造に基づく性質はこの作用に強く影響した。また、薬剤で粘液分泌を抑制して大腸炎を誘発したマウスの腸管防御機能に対

する COS の作用を確認した。以上の結果から COS は腸管粘液産生を調節することができ、これが腸管保護作用に寄与している可能性が示された。

Xiao ら[13]は、上述の報告とは異なり COS を調整する前のキトサンを用いて大腸菌感作した単飼の哺乳子豚 30 頭を対象に、無添加の対照区、飼料 1kg 当たり 300mg の COS 給与区、飼料 1kg 当たり 50mg のクロルテトラサイクリン (CTC) 給与区の 3 区を設けて飼育試験成績ならびに空腸上皮の構造変化や IgA の分泌量、*TLR4* および *claudin-1* の遺伝子発現量を比較した。それによれば、キトサンと CTC の給与により飼料要求率は対照区に比べて有意 ($P < 0.05$) に改善した。粘膜の絨毛の長さや腸陰窩との比率、杯細胞数はキトサンと CTC の給与区で有意 ($P < 0.05$) に高まった。粘膜内のリンパ細胞は COS 給与区で他の 2 区よりも有意 ($P < 0.05$) に高まった。上皮細胞のタイト結合タンパク質である occludin はキトサン給与区で有意 ($P < 0.05$) に増加したが、CTC 給与区では有意 ($P < 0.05$) に低下した。IgA の分泌はキトサン給与区で有意 ($P < 0.05$) に高かったが、*TLR4* mRNA の発現は給与区でともに減少した。*claudin-1* の発現に差は認められなかった。以上のことからキトサンは腸管粘膜の防御機能に対しては CTC と異なる作用を有していたが、子豚の発育に対しては CTC と同様の影響を与えることから、キトサンは CTC の代替として利用可能であることを示した。この研究報告はキトサンよりも COS が有効であることとは逆であるが、重合度が高く、分子量が大きい COS においても抗生剤の代替となる可能性を示唆するものと考えられた。

まとめ

上記のように薬剤耐性菌の問題を解決するために抗菌剤の使用に対する制限が提唱されるようになり、COS の利用が検討された。今回示した試験結果の中から豚を対象とした成績

のみを一覧表として作成した(表 1)。比較対象とされた抗菌剤は、テトラサイクリン系あるいはその誘導体であるドキシサイクリン系、マクロライド系、ペプチド系と様々であり、いずれの試験報告でも機序は異なるものの結果として十二指腸から回腸までの間で絨毛の発達を促進し、微生物叢を好ましい状態にするなどの腸内環境を改善し、その作用はこれまで利用されてきた抗菌剤と同等の影響力を有するとしていることから COS は抗菌剤の代替品として子豚に利用可能と考えられる。また、使用量の確認について 1 試験で試みられたものが 2 件、極端に高濃度で試験された報告が 1 件ある。これらの結果から、COS の有効な使用には適正な飼料中濃度があると考えられ、それは 200～600mg/kg 飼料の範囲と考えられた。

参考文献

- [1] 高橋敏雄、浅井鉄夫、小島明美、原田和記、石原加奈子、守岡綾子、木島まゆみ、田村 豊 (2006) 家畜衛生分野における耐性菌の現状と今後の対応、感染症学雑誌、80 (3)、185-195.
- [2] 田村 豊 (2015) わが国の食用動物由来耐性菌対策と耐性菌の現状、モダンメディア、61 (6)、161-168.
- [3] 福安嗣昭、押田敏雄(1986) ネオシュガーのブタへの利用(1)、第 2 回ネオシュガー研究会抄録、61-69.
- [4] 谷口 肇(2001-3) 機能性オリゴ糖の生産と利用、生物機能開発研究所紀要、1、37-47.
- [5] 高橋顯仁(2003) 炎症に対するキチンオリゴ糖およびキトサンオリゴ糖の薬理的検討、奥羽大歯学誌、30 (2)、115-126.
- [6] Kim K.N., E.S. Joo, K.I. Kim, S.K. Kim, H.P. Yang, Y.J. Jeon(2005) Effect of chitosan oligosaccharides on cholesterol level and antioxidant enzyme activities in hypercholesterolemic rat. Journal of Korean Society of Food Science and Nutrition. 34(1): 36-41.
- [7] Liu.P., X.S.Piao, S.W.Kim L.Wang, Y.B.Shen, H.S.Lee, S.Y.Li (2008) Effects of chito-oligosaccharide supplementation on the growth performance, nutrient digestibility, intestinal morphology, and fecal shedding of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* in weaning pigs. Journal Animal Science 86, 2609-2618.
- [8] Wang. J.P., J.S. Yoo, H.J. Kim, J.H.Lee, I.H.Kim (2009) Nutrient digestibility, blood profiles and fecal microbiota are influenced by chito-oligosaccharide supplementation of growing pigs. Livestock Science, 125(2-3),298-303.
- [9] Liu.P., X.S.Piao, P.A.Thacker, Z.K.Zeng, P.F.Li, D.Wang, S.W.Kim (2010) Chito-oligosaccharide reduces diarrhea incidence and attenuates the immune response of weaned pigs challenged with *Escherichia coli* K88. Journal of Animal Science, 88(12): 3871-3879.
- [10] Yang.C.M., P.R. Ferket, Q.H.Hong, J. Zhou, G.T. Cao, L. Zhou, A.G. Chen (2012) Effect of chito-oligosaccharide on growth performance, intestinal barrier function, intestinal morphology and cecal microflora in weaned pigs. Journal of Animal Science 90(8), 2671-2676.
- [11] Bahar B., J.V.O'Doherty, S.Maher, J.McMorrow, T.Sweeney (2012) Chito-oligosaccharide elicits acute inflammatory cytokine response through AP-1 pathway in human intestinal epithelial-like (Caco-2) cells. Molecular Immunology,51(3-4): 283-291.

養豚におけるキトオリゴ糖の活用

表1. 豚を用いた試験成績の一覧

発表年	飼試動物	比較剤/生剤	COS給与量 mg/kg飼料	観察項目と有効性 (対照区: 0給与との比較)				飼料加率	下痢頻度	血中成分		
				3.5%中大腸菌	3.5%中乳酸菌	見かけの消化率	腸管表皮構造					
Liu et al. 2008	哺乳子豚	クロルテラサイクリン (CTC) (80mg/kg飼料)	100	○	○	○	○	○	x			
			200	x	○	○	○	○	○	x		
			400	○	○	○	○	○	○	x		
		CTC	x	○	○	○	○	○	x			
Wang et al. 2009	育成豚	タイロシン(100ppm) (44mg/kg飼料)	5000	x		○				Lumphyocyte, TPO, HDL		
			5000+タイロシン タイロシン			○		x	○		lgG	
Yang et al. 2012	哺乳子豚	コリスチン(20mg/kg飼料)	200	7日	昔腸内乳酸菌、 ビフィズス菌	昔腸内 大腸菌	1~7日	1~14日	1~14日	○	ジファミンオキシダーゼ x	
			400	x	14日		○	○	○	○	ジファミンオキシダーゼ x	
			600	x	○ vs コリスチン、0		○	○	○	○	○	ジファミンオキシダーゼ x
			コリスチン	x	○ vs コリスチン、0		○	○	○	○	○	ジファミンオキシダーゼ x
Liu et al. 2010	大腸菌感作 哺乳子豚	シアドックス 飼料	0 対照区	0 対照区	昔腸内乳酸菌、 ビフィズス菌	昔腸内 大腸菌	1~7日	1~14日	1~14日	○	IGF-1 x IL-10, IL-1B	
			160	160	7日		○	○	○	○	○	IGF-1 x IL-10, IL-1B
			シアドックス	シアドックス			○	○	○	○	○	IGF-1 x IL-10
Xiao et al. 2013	大腸菌感作 哺乳子豚	CTC (50mg/kg飼料)	300	300			○	○	○	○	lgA	
			CTC	CTC			○	x	○	x	○	

○: 断りがなければ対照区に比べて有意に増加した成績を示したことを意味する。
 x: 断りがなければ対照区に比べて有意に減少した成績を示したことを意味する。
 △: 有意はないが、良好な傾向にあることを意味する。
 表内に記載した日数は断乳後の経過日数であり、給与開始日の経過日数を意味する。

- [12] Wang.Y., R.Wen, D.Liu, C.Zhang, Z.A.Wang, Y.Du (2021) Exploring effects of chitosan oligosaccharides on the DSS-induced intestinal barrier impairment in vitro and in vivo. *Molecules*,26(8): 2199-2215.
- [13] Xiao.D., Z. Tang, Y. Yin, B.Zhang, X.Hu, Z.Feng, J.Wang (2013) Effects of dietary administering chitosan on growth performance, jejunal morphology, jejunal mucosal sIgA, occluding, claudin-1 and TLR4 expression in weaned piglets challenged by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *International Immunopharmacology* 17.670-676.

Scientific Remarks

Application of chito-oligosaccharide in Swine production

Akinori Oshida and Katsuhiko Onuki

Frontier International Co., Ltd, Asou, Kawasaki, Kanagawa, 215-0025

As the use of antibacterial agents has been restricted as a measure against drug-resistant bacteria, chito-oligosaccharides (COS) have been investigated as an alternative. Although the effective mechanism of COS is different from that of antibiotics, COS enhances the intestinal environment by promoting the development of villi in the duodenum to ileum, further it induces a favorable state for microflora. Since the general effect of COS on the growth of animals seems to be as same as antibiotics, COS is considered to be an alternative of antibiotics and the appropriate concentration in the feed range is 200 to 600 mg/kg feed.

Key words: Chito-oligosaccharide, pig production

Corresponding: Akinori Oshida oshida@frontier-intl.co.jp

Receipt of Ms: 18.06.2024. Accepted: 01.08.2024.

Journal of Animal Production Environmental Science