



Studies of Natural Feed Ingredients β -1,4-Mannobiose and Mannanase-Hydrolyzed Copra Meal

Ibuki, Masahisa

(Degree)

博士（農学）

(Date of Degree)

2014-03-06

(Date of Publication)

2015-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3242号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003242>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



論文内容の要旨

氏 名 伊吹 昌久

論文題目

Studies of Natural Feed Ingredients

 β -1,4-Mannobiose and Mannanase-Hydrolyzed Copra Meal(天然飼料添加物、 β 1,4-マンノビオースおよびマンナナーゼ加水分解コプラミールの研究)

食の安全性の確保は、現代の先進国社会において重要な課題となっている。中でも、細菌やウイルスによる汚染が原因で引き起こされる食中毒は、食の安全性を脅かす主な要因の一つとなっており、特に、最近の先進国社会で起こる食中毒の主な原因菌として挙げられるサルモネラ菌やカンピロバクター菌への対策が急務となっている。これらの菌の感染源のほとんどは畜肉、特に鶏肉であり、食肉加工センターから流通段階での不十分な温度管理による細菌の増殖によって汚染が拡大していく。従って、生産現場におけるこれらの細菌のニワトリへの感染防止が食中毒防止の有効な手段となっている。畜産業界で使用されている抗生物質には、病原菌の感染治療と成長促進の二つの効果が有ることから、現在まで畜産業界、特に養豚及び養鶏業界で汎用されている。しかしながら、近年、薬剤耐性菌の出現が懸念されることから、欧州や米国等において、畜産動物への成長促進を目的とした飼料用抗生物質の使用が禁止もしくは制限されつつある。この世界的な動向に対処する為に、抗生物質に代わり得る安全、且つ、有効な飼料素材が求められている。ここで、従来からマンノースもしくはその化合物は、サルモネラ菌の線毛と付着する特性を持つことから、サルモネラ菌の排除剤として畜産動物へ給与されていた。これらの化合物は、マンナン含有量の多い自然素材から分離・調製されている。又、ヤシ油の搾油過程で得られる副産物であるコプラミールは、マンナン含有量が多いことから鶏や豚の飼料原料として既に利用されており、その安全性は広く認知されている。従って、このコプラミールを酵素処理して得られるマンノース及びその化合物を含む酵素処理コプラミール (MCM) は、サルモネラ菌の排出効果が期待されるが、抗生物質が持つもう一つの効果である成長促進について検討された事例はこれまでにない。そこで本研究では、MCM とこれに含まれる主要なマンノース化合物である β -1,4-マンノビオース (MNB) の病原菌の感染治療と成長促進作用を調べることにより、飼料用抗生物質の代替としての可能性について調べた。

第一章では、本研究に至った背景について述べた。

第二章では、11.4%のMNBを含むMCM (MCM-B1) を生後2週間に渡り給与したブロイラーに、サルモネラエンテリティス (SE) を感染させ、MCM-B1のSE排泄効果、腸管上皮細胞における組織学的影響及びIgAの分泌に及ぼす影響を調べた。その結果、MCM-B1の給与は、経時的に糞、盲腸糞及び内臓器官におけるSEの菌数を減少させることが示された。又、SE特異的IgAの分泌は、SE感染の後半、SEの糞中への排出とともに最大値を示した。SE感染23日後の腸管の組織学的評価はMCM-B1給与群において、腸管の病変の減少と、腸管粘膜固有層の上昇に伴う上皮細胞内単核細胞数の上昇がみられた。これらの結果から、MCM-B1の生後2週間に渡る給与は、IgAの分泌促進を含む免疫賦活によりSEの排出を促進することが示唆された。

第三章では、MNBを67.8%含むMCM (MCM-B2) の給与がブロイラーにおける腸管免疫賦活効果に及ぼす影響をリアルタイムRT-PCRおよびマイクロアレイを用いて調べた。MCM-B2の給与は、体重及び臓器重量に影響を及ぼさず、又、腸管組織にも異常は認められなかった。IgAの分泌は、MCM-B2給与区は4週間に渡る給与期間中、非給与群に比べ有意に高い値を示した。MCM-B2給与区においてマイクロアレイ、リアルタイムRT-PCR解析の結果、抗原認識、抗原提示 (MHC-I及びII) 及びインターフ

ェロン関連因子を含む免疫防御関連遺伝子の発現量の増加が認められた。これら結果により、MCM-B2 は腸管免疫賦活化することが示唆された。

第四章では、ニワトリのマクロファージ細胞 (MQ-MCSU) を用いて、純度 99% の MNB (MNB) の *in vitro* における免疫賦活効果を調べた。MNB は、濃度依存的に MQ-MCSU の SE 殺傷能力を高めた。SE 感染 48 時間後、MNB 濃度 40 μ g/ml において、SE 生存率が最も低く、H₂O₂、NO 産生量は、MNB 濃度依存的に増加した。MNB 処理された MQ-MCSU において、宿主防御、或いは、抗菌活性遺伝子である、iNOS、NOX-1、INF- γ 、NRAMP1 及び LITAF が非処理群に比べ有意に増加した。これらの結果から、MNB はニワトリにおいてマクロファージの抗菌防御能を高めることが示唆された。

第五章では、MNB を 11.4% 含む MCM (MCM-B1) の給与がニワトリにおける成長及び腸管絨毛の形態に及ぼす影響を調べた。0.1% MCM-B1 給与群では、増体重及び飼料効率の有意な向上が見られた。又、細胞の大きさは、0.1% MCM 給与群で回腸において有意な増加が、0.02% 及び 0.1% MCM-B1 給与群で空腸及び十二指腸において増加傾向が見られた。又、MCM-B1 の添加量と空腸、回腸及び十二指腸の細胞の大きさの間に有意な正の相関が見られた。更に、細胞分裂数においては、0.1% MCM-B1 給与群で高いことが見られた。走査型電子顕微鏡での観察で、非給与群で平面状になっているのに対して、0.1% MCM-B1 給与群では腸絨毛上に突起物がみられ、十二指腸には微絨毛の脱落の形跡も見られた。これらの結果は、MCM がニワトリ腸管の形態学的変化を引き起こすことによって、栄養素の吸収能を高め、成長を促進することが示された。

第六章では、純度 99% の MNB (MNB) の給与が成長中のブロイラーの体重、ムネ肉重量、モモ重量、肝臓重量並びに腹腔内脂肪組織重量に及ぼす影響について調べた。0.01% MNB 給与は体重あたりのムネ肉重量を有意に増加させたが、体重及び体重あたりのその他の組織重量には影響を及ぼさなかった。筋肉タンパク質合成の抑制因子として知られているミオスタチンの mRNA 量は、浅胸筋において MNB 給与により有意に減少したことから、ミオスタチン遺伝子発現の抑制が MNB による体重あたりのムネ肉重量の増加に関与した可能性もある。MNB は、筋原線維タンパク質分解の指標となる血漿 3-メチルヒスチジン濃度及びタンパク質分解に関与する浅胸筋におけるアトロジン-1 並びに種々のプロテアーゼの mRNA 量には影響を及ぼさなかったことから、MNB による体重あたりのムネ肉重量の増加にはタンパク質分解は関与していないことが示唆された。これらの結果から、MNB がブロイラーの産肉量を増加させる飼料素材となる可能性が示された。

以上のように、MNB を含有する MCM は、ニワトリにおける免疫賦活化、腸管上皮の形態学的変化及び筋肉タンパク質合成促進を引き起こしたことから、抗生物質代替物として利用できる可能性出来る可能性が示された。

氏名	伊吹 昌久		
論文 題目	Studies of Natural Feed Ingredients β -1,4-Mannobiose and Mannanase-Hydrolyzed Copra Meal (天然飼料添加物、 β -1,4-マンノビオースおよびマンナナーゼ加水分解コブラミールの研究)		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	上曾山 博
	副 査	教授	北川 浩
	副 査	教授	芦田 均
	副 査	准教授	本田 和久
	副 査		
要 旨			
食の安全性の確保は、現代の先進国社会において重要な課題となっている。中でも、細菌やウイルスによる汚染が原因で引き起こされる食中毒は、食の安全性を脅かす主な要因の一つとなっており、特に、最近の先進国社会で起こる食中毒の主な原因菌として挙げられるサルモネラ菌やカンピロバクター菌への対策が急務となっている。これらの菌の感染源のほとんどは畜肉、特に鶏肉であり、食肉加工センターから流通段階での不十分な温度管理による細菌の増殖によって汚染が拡大していく。従って、生産現場におけるこれらの細菌のニワトリへの感染防止が食中毒防止の有効な手段となっている。ここで、抗生物質には、病原菌の感染治療と成長促進の二つの効果が有ることから、現在まで畜産業界、特に養豚及び養鶏業界で汎用されている。しかしながら、近年、薬剤耐性菌の出現が懸念されることから、欧州や米国等において、畜産動物への成長促進を目的とした飼料用抗生物質の使用が禁止もしくは制限されつつある。この世界的な動向に対処する為に、抗生物質に代わり得る安全、且つ、有効な飼料素材が求められている。ここで、従来からマンノースもしくはその化合物は、サルモネラ菌の線毛と付着する特性を持つことから、サルモネラ菌の排除剤として畜産動物へ給与されていた。これらの化合物は、マンナン含有量の多い自然素材から分離・調製されている。又、ヤシ油の搾油過程で得られる副産物であるコブラミールは、マンナン含有量が多いことから鶏や豚の飼料原料として既に利用されており、その安全性は広く認知されている。従って、このコブラミールを酵素処理して得られるマンノース及びその化合物を含む酵素処理コブラミール (MCM) は、サルモネラ菌の排出効果が期待されるが、抗生物質が持つもう一つの効果である成長促進について検討された事例はこれまでにない。このような背景を基に、MCM とこれに含まれる主要なマンノース化合物である β-1,4-マンノビオース (MNB) の病原菌の感染治療と成長促進作用を調べることで、飼料用抗生物質の代替としての利用の可能性について調べたものである。 第一章では、本研究に至った背景について述べている。 第二章では、11.4%の MNB を含む MCM (MCM-B1) を生後 2 週間に渡り給与したブロイラーに、<i>Salmonella Enteritidis</i> (SE) を感染させ、MCM-B1 の SE 排泄効果、腸管上皮細胞における組織学的な影響及び IgA の分泌に及ぼす影響を調べている。その結果、MCM-B1 の給与は、経時的に糞、盲腸糞及び内臓器官における SE の菌数を減少させることを示している。又、SE 特異的 IgA の分泌は、SE 感染の後半、SE の糞中への排出とともに最大値を示すことを明らかにしている。SE 感染 23 日後の腸管の組織学的評価は MCM-B1 給与群において、腸管の病変の減少と、腸管粘膜固有層の上昇に伴う上皮細胞内単核細胞数の増加を示している。これらの結果から、MCM-B1 の生後 2 週間に渡る給与は、IgA の分泌促進を含む免疫賦活により SE の排出を促進することを示唆している。 (British Poultry Science, 48, 331-341, 2007) 第三章では、MNB を 67.8%含む MCM (MCM-B2) の給与がブロイラーにおける腸管免疫賦活効果に及			

氏名	伊吹昌久
ぼす影響をリアルタイム RT-PCR およびマイクロアレイを用いて調べている。MCM-B2 の給与は、体重及び臓器重量に影響を及ぼさず、又、腸管組織にも異常を認め無いことを観察している。又、IgA の分泌は、MCM-B2 給与区では 4 週間に渡る給与期間中、非給与群に比べ有意に値が高いことを示している。更に、MCM-B2 給与区においてマイクロアレイ、リアルタイム RT-PCR 解析の結果、抗原認識、抗原提示 (MHC-I 及び II) 及びインターフェロン関連因子を含む免疫防御関連遺伝子の発現量の増加を認めている。これら結果により、MCM-B2 は腸管免疫を賦活化することを示唆している。 (Poultry Science, 89, 1894-1904, 2010) 第四章では、ニワトリのマクロファージ細胞 (MQ-MCSU) を用いて、純度 99%の MNB (MNB) の <i>in vitro</i> における免疫賦活効果を調べている。MNB は、濃度依存的に MQ-MCSU の SE 殺傷能力を高めることを認めている。SE 感染 48 時間後、MNB 濃度 40μg/ml において、SE 生存率は最も低く、H₂O₂、NO 産生量は、MNB 濃度依存的に増加したことを示した。MNB 処理された MQ-MCSU において、宿主防御、或いは、抗菌活性因子である、iNOS、NOX-1、INF-γ、NLRP1 及び LITAF の mRNA 量が非処理群に比べ有意に増加することを明らかにしている。これらの結果から、MNB はニワトリにおいてマクロファージの抗菌防御能を高めることを示唆している。 (Veterinary Immunology and Immunopathology, 139, 289-295, 2011) 第五章では、MNB を 11.4%含む MCM (MCM-B1) の給与がニワトリにおける成長及び腸管絨毛の形態に及ぼす影響を調べている。0.1%MCM-B1 給与群では、増体重及び飼料効率の有意な向上を示している。又、細胞面積は、0.1%MCM 給与群で回腸において有意な増加を、0.02%及び 0.1%MCM-B1 給与群で空腸及び十二指腸において増加傾向が有ることを明らかにしている。又、MCM-B1 の添加量と空腸、回腸及び十二指腸の細胞面積の間に有意な正の相関が有ることを示している。更に、細胞分裂数においては、0.1%MCM-B1 給与群で有意に高いことを観察している。走査型電子顕微鏡を用いて、非給与群で腸絨毛が平面状になっているのに対して、0.1%MCM-B1 給与群では腸絨毛上に突起物がみられ、十二指腸には微絨毛の脱落の形跡も見られることを観察している。これらの結果から、MCM がニワトリ腸管の形態学的変化を引き起こすことによって、栄養素の吸収能を高め、成長が促進されると考察している。 (Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition 2013 アクセプト、WEB公表済) 第六章では、純度 99%の MNB (MNB) の給与が成長中のブロイラーの体重、ムネ肉重量、モモ重量、肝臓重量並びに腹腔内脂肪組織重量に及ぼす影響について調べている。0.01%MNB 給与はムネ肉重量/体重を有意に増加させたが、体重及び体重あたりのその他の組織重量には影響しないことを示した。筋肉タンパク質合成の抑制因子として知られているミオスタチンの mRNA 量は、浅胸筋において MNB 給与群で有意に減少したことから、その遺伝子発現の抑制が MNB によるムネ肉重量/体重の増加に関与した可能性もあると示唆している。MNB は、筋原線維タンパク質分解の指標となる血漿 3-メチルヒスチジン濃度及びタンパク質分解に関与する浅胸筋におけるアトロジン-1 並びに種々のプロテアーゼの mRNA 量には影響を及ぼさなかったことから、MNB によるムネ肉重量/体重の増加にはタンパク質分解は関与してないことを示唆している。これらの結果から、MNB がブロイラーの産肉量を増加させる飼料素材となる可能性が有ると考察している。 (Journal of Poultry Science, 50, 120-125, 2013) 本研究は、MNB を含有する MCM について、その形態学的、組織学的、免疫学的並びに栄養生理学的な作用を研究したものであり、抗菌性物質に依存しない安心・安全な鶏肉生産に重要な知見を得たものとして価値ある研究成果の集積であると認める。よって、学位申請者の伊吹昌久は、博士 (農学) の学位を得る資格があると認める。	