

大豆代替飼料原料としてのユーグレナの給与が ニワトリの成長および腸管粘液に及ぼす効果

伊藤 謙¹・笹渡 翔²・安部瑠利香²・藤盛和子²・渡邊翔太³・
鈴木健吾³・朝山雄太³・南 一郎⁴・西向めぐみ²・喜多一美²

¹ 秋田県立大学生物資源科学部, 秋田県秋田市下新城中野街道端西 241-438 010-0195

² 岩手大学農学部, 盛岡市上田 3 丁目 18-8 020-8550

³ 株式会社ユーグレナ, 東京都港区芝五丁目 29 番 11 号 108-0014

⁴ 株式会社ミナミ食品, 岩手県九戸郡洋野町大野第 55 地割 38-8 028-8802

日本の飼料穀物のほとんどは海外からの輸入に頼っており、畜産物における生産コストの増大に繋がっている。そこで国内における未利用資源を飼料原料として活用し、国内飼料自給率を向上させることが課題となっている。鞭毛虫の一つであるユーグレナ (*E. gracilis*) は培養が容易であり、各種栄養素に富むことからヒトのサプリメント等に利用されている。また飼料としての活用も期待されているが、*E. gracilis* をニワトリへ給与した際の影響については不明な点が多い。そこで本研究では、*E. gracilis* の給与がニワトリの成長成績に及ぼす影響を調査した。その結果、飼料中の大豆粕を全て *E. gracilis* と代替しても、ニワトリの成長成績に影響を及ぼさなかった。また、*E. gracilis* は食物繊維様作用を示すパラミロンを豊富に含むことが知られていることから、飼料中の繊維を全てパラミロンと代替した飼料をニワトリに給与した。その結果、*E. gracilis* 含量の増加に伴って腸管におけるムチンおよびリゾチームの mRNA 発現量が上昇し、飼料中繊維のパラミロンとの代替はリゾチームの mRNA 発現量を上昇させた。

以上より、飼料中の大豆を全て *E. gracilis* と代替しても成長成績に影響を及ぼすことは無く、腸管免疫を向上させる可能性が示唆された。

キーワード: ユーグレナ, ニワトリ, 成長成績, パラミロン, ムチン, リゾチーム

緒 言

日本で消費される飼料穀物（濃厚飼料）のほとんどは、米国やオーストラリアなど海外からの輸入に頼っており、平成 28 年度の国内自給率は約 14% である（農林水産省, 2018）。また、コーンベルトにおける干ばつの影響やバイオエタノール生産などによるトウモロコシ価格の高騰により、生産者の実質負担額は年々増加傾向にある。さらに飼料原料の異常な価格高騰時には、国および企業から「異常補填基金」が畜産経営者へ分配されており、飼料価格の高騰は生産者だけではなく国の負担にもなっている。そこで、国内飼料自給率向上のため、飼料用米の普及や食品残渣等から成るエコフィードや未利用資源の利用が進められている。

ユーグレナは鞭毛虫の一種で、水溜り、池や湖に生息し 250 種類以上が確認されている。さらにユーグレナは遺伝的に安定で突然変異が起きにくく、無機塩と炭酸ガスだけで生育可能である。

特に *Euglena gracilis* はユーグレナの中でも培養が比較的容易であり、アミノ酸やアラキドン酸、ドコサヘキサエン酸、エイコサペンタエン酸、リノール酸、リノレン酸、オレイン酸等の不飽和脂肪酸を豊富に含む (Hulanicka *et al.*, 1964; Korn, 1964; Barsanti *et al.*, 2000; Schwarzhans *et al.*, 2015)。さらに、光合成の過程で難消化性の澱粉顆粒であり食物繊維様作用を持つパラミロンを生成する (北岡, 1989; 宮武ら, 1995)。以上の特性から、*E. gracilis* の乾燥粉末は一般食品への添加物、健康食品、化粧品や飼料の原料として活用されている。農林水産業の分野では、マダイにおける体内ドコサヘキサエン酸増加試験やニジマス用飼料としての栄養評価が行われている (佐藤ら, 1984; 林ら, 1993)。ウシにおいては、飼料中 *E. gracilis* 添加量が 100 g/kg まではメタン排出量の減少や飼料消化率が向上したとの報告がなされている (Aemiro *et al.*, 2016)。ニワトリにも給与例はあるが (高井ら, 2008)、飼料中への添加量は 5% までであり、より高い添加レベルにおける給与試験は行われていない。以上から、*E. gracilis* は未利用資源として着目されており、畜産動物への利用も進められているが、ニワトリに関する報告は少ない。また、*E. gracilis* は生育環境により栄養成分が変動し、2000 lux の光条件下では CP 含量が 54.81%、粗脂肪 15.19% となり、暗黒中では CP 含量が 31.75%、粗脂肪が 8.71% となる (北岡ら, 1997)。

2018 年 7 月 10 日受付, 2018 年 12 月 17 日受理

連絡者: 喜多一美

〒020-8550 盛岡市上田 3 丁目 18-8

Tel: 019-621-6163

Fax: 019-621-6163

E-mail: kitak@iwate-u.ac.jp

そこで、本研究で用いる *E. gracilis* の一般成分分析を行った後、飼料原料である大豆粕を *E. gracilis* と大量に代替した際の成長成績に及ぼす影響を調査するとともに、*E. gracilis* の機能性成分であるパラミロンの効果を調査することを目的とした。

材料と方法

1. *E. gracilis* の一般成分分析および総アミノ酸含量測定

E. gracilis の乾燥粉末を株式会社ユーグレナ（東京）から入手した。CP 含量、粗脂肪および粗灰分は公定法に従って行った（日本飼養標準成分表（2009 年版））。CP 含量は、自動ケルダール装置（Kjeltec TM 2300, FOSS Co., Ltd., Hillerød, Denmark）を用いて分析を行った。粗脂肪含量はソックスレー法を用い、ジエチルエーテルで 16 時間抽出を行なった。粗灰分含量は乾式灰化法を用い、サンプルを 600°C で 4 時間加熱した。*E. gracilis* 中の総アミノ酸含量を測定するため、サンプルを 6N HCl, 110°C で 24 時間加水分解した後、減圧下で乾固し、0.02N HCl で再溶解した。再溶解したサンプルを全自動アミノ酸分析装置（JLC-500/V2, 日本電子株式会社、東京）により *E. gracilis* 中の総アミノ酸含量を測定した。

2. 飼料中大豆粕の *E. gracilis* への代替がニワトリの成長成績および血中遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響（実験 1）

単冠白色レグホン種初生雄ヒナ 100 羽を小岩井農牧株式会社（雫石、岩手）から購入し、8 日齢まで育雛器内で平飼いにした。飼料および水は自由摂取とし、飼料は市販幼雛用飼料（アジャスト幼雛, CP 20.0%, ME 2,900 kJ/g, 豊橋飼料株式会社, 愛知）を用いた。8 日齢のヒナを 1 区画あたり 2 羽ずつケージに入れ、2 日間環境馴致を行った。10 日齢時に各処理区の平均体重が等しくなるように 42 羽を選抜し、1 処理区あたり 6 羽ずつ計 7 処理区に振り分けた（平均体重 99.6±2.3（標準誤差）g）。ケージに 1 羽ずつ入れ、各処理区用の実験飼料を水と共に自由摂取で 2 週間給与し、照明は明期 24 時間とした。実験飼料は日本飼養標準・家禽（2011 年版）を満たすように飼料中含量 2, 4, 10, 20, 30 および 40% の大豆粕を *E. gracilis* と代替した飼料を用いた（表 1）。試

験終了後、飼料摂取量および体重を測定した。ニワトリは、イソフルランを用いて過麻酔処理した後、心臓から全量採血を行ない安楽死させた。血液は 4°C, 3,000 x g で 20 分間遠心分離し、上清を回収後 -20°C で凍結保存した。心臓、肝臓、筋胃、浅胸筋、深胸筋および大腿二頭筋を採取し、組織重量を測定した。本実験は岩手大学動物実験委員会の承認（承認番号：A201727）を得て実施した。

3. 飼料中繊維のパラミロンへの代替がニワトリの成長成績に及ぼす影響（実験 2）

単冠白色レグホン種初生雄ヒナ 100 羽を小岩井農牧株式会社（雫石、岩手）から搬入後、8 日齢まで育雛機で平飼いにした。飼料と水は自由摂取とし、飼料は市販幼雛用飼料（アジャスト幼雛, CP 20.0%, ME 2,900 kcal/kg, 豊橋飼料株式会社, 愛知）を用いた。8 日齢のヒナを 1 区画あたり 2 羽ずつケージに入れ 2 日間環境馴致を行った。10 日齢時に各処理区の平均体重が等しくなるように 32 羽選抜し、1 処理区あたり 8 羽ずつ 4 処理区に振り分けた（平均体重 91.0±0.4（標準誤差）g）。ケージに 1 羽ずつ入れ、各処理区用の実験飼料を水と共に自由摂取で 2 週間給与した。照明は明期 24 時間とした。実験試料は、飼料中含量 5, 10 および 20% の大豆粕を *E. gracilis* と代替した飼料と、セルロースを全量パラミロンと代替した飼料を用いた（表 2）。パラミロンは株式会社ユーグレナから入手した。試験終了後、飼料摂取量および体重を測定した。イソフルランを用いてニワトリを過麻酔処理し、心臓から全量採血を行ない安楽死させた。血液は 4°C, 3,000 x g, 20 分間で遠心分離し、上清を回収した後、-20°C で凍結保存した。心臓、肝臓、筋胃、浅胸筋、深胸筋、大腿二頭筋および小腸を採取し、組織重量を測定した。また、小腸から粘膜上皮を採取し、液体窒素で凍結後、-80°C で凍結保存した。本実験は岩手大学動物実験委員会の承認（承認番号：A201550）を得て実施した。

4. 血中遊離アミノ酸濃度測定

血清を 3% スルホサリチル酸と 1:1 の割合で混合した後、1 晩 4°C 下で静置した。静置したサンプルを 13,000 x g, 4°C, 20 分間遠心分離し、上清を 0.22 μm メンブレンフィルターに通した後、

表 1. 実験飼料組成 (g/kg) (実験 1)

	対照区	<i>E. gracilis</i> 添加区					
		2%	4%	10%	20%	30%	40%
<i>E. gracilis</i>	0	20	40	100	200	300	400
大豆粕	400	380	360	300	200	100	0
圧片トウモロコシ	400	400	400	400	400	400	400
ミネラル混合物	60	60	60	60	60	60	60
ビタミン混合物	2	2	2	2	2	2	2
コーン油	40	40	40	40	40	40	40
セルロース	98	98	98	98	98	98	98
CP (%)	19.8	19.6	19.4	18.8	17.8	16.9	15.9
ME (Mcal/kg)	2.96	2.99	3.01	3.09	3.23	3.36	3.49

対照区の飼料組成を基本とし、*E. gracilis* と大豆粕を置換した。対照区飼料は日本飼養標準・家禽（2011）を満たすように飼料設計を行った。ミネラル混合物およびビタミン混合物の組成は Kita ら（1996）の組成を参考に調整した。

表 2. 実験飼料組成 (g/kg) (実験 2)

	<i>E. gracilis</i> 添加区				パラミロン添加区
	対照区	5%	10%	20%	
<i>E. gracilis</i>	0	50	100	200	0
パラミロン	0	0	0	0	98
大豆粕	400	350	300	200	400
圧片トウモロコシ	400	400	400	400	400
ミネラル混合物	60	60	60	60	60
ビタミン混合物	2	2	2	2	2
コーン油	40	40	40	40	40
セルロース	98	98	98	98	0
CP (%)	19.8	19.3	18.8	17.8	19.8
ME (Mcal/kg)	2.96	3.03	3.09	3.23	2.96

対照区の飼料組成を基本とし、*E. gracilis* またはパラミロンを大豆粕と置換した。対照区飼料は日本飼養標準・家禽 (2011) を満たすように飼料設計を行った。ミネラル混合物およびビタミン混合物の組成は Kita ら (1996) の組成を参考に調整した。

表 3. プライマー配列

Gene name	Transcript ID	Left primer (5' → 3')	Right primer (5' → 3')	Product size
<i>MUC2</i>	NM_001318434.1	TGCTCACACTTGGAAGTCAGCAGCC	TCCATGGAGTCTGCAGGAGCACTGG	96
<i>LYZ C</i>	NM_205281.1	TCCAGGAACCTGTGCAACATCCCGT	CGCTGACGATCTTCTTCGCGCAGTT	137
<i>ACTB</i>	NM_205518.1	CACAGAGGCTCCCTGAACCCAAA	ACGACCAGAGGCATACAGGGACAGC	127
<i>GAPDH</i>	NM_204305.1	CTTTGATGCGGGTGCTGGCATTGC	TGTGTGCCTGGCTCACTCCTTGGA	100

Primer 3 plus を用いてプライマーの設計を行った。*MUC2*: Mucin 2. *LYZ C*: Lysozyme C. *ACTB*: Actin beta. *GAPDH*: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

全自動アミノ酸分析装置により血中遊離アミノ酸含量を測定した。

5. 総 RNA 抽出および qRT-PCR による遺伝子発現の測定

MUC2 (Mucin 2), *LYZ C* (Lysozyme C), *ACTB* (Actin beta) および *GAPDH* (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) をターゲットとしたプライマーを作成し、RT-qPCR を行った。ターゲットとなる遺伝子を Ensemble genome browser 92 (Zerbino *et al.*, 2018) 上で参照し、エクソンジャンクションを含む、またはイントロンが 500 bp 以上含むように Primer3Plus (Untergasser, 2007) を用いてプライマーを設計した (表 3)。総 RNA は、TRI Reagent[®] (シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社, 東京) を用いて抽出し、精製した RNA ベレットを Nuclease-free water 中で溶解した。総 RNA の濃度は Nanodrop (サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社, 東京) を用いて測定し、A260/A280 比が 1.65 以上であることを確認した。総 RNA は DNase I (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用いて DNase I 処理を行い、続いて ReverTra Ace[®] (東洋紡株式会社, 大阪) を用いて cDNA を合成した。サイクルは 37°C 30 分間, 98°C 5 分間, 12°C 5 分間で行った。最終濃度が、cDNA 100 ng, 10 pmol Left primer, 10 pmol Right primer となるように THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡株式会社) へ添加し、Applied Biosystems[®] StepOne Plus[™] リアルタイム PCR システム (サーモフィッシャーダイア

グノスティックス株式会社) を用いてインターカレーション法による RT-qPCR を行った。初期変性を 95°C 60 秒間で行った後、95°C 15 秒間, 60°C 30 秒間, 72°C 30 秒間で 40 サイクル反応させた。Ct 値を算出した後、PCR 効率補正モデルによる相対定量法を用いて定量を行った。内在性コントロールは、複数の候補の中から安定している遺伝子である *ACTB* を用いた。

6. 統計解析

結果は平均値および Pooled SE で表した。統計処理はフリー統計ソフト「R」の lme4 パッケージを用いて一般線形混合モデル (GLMM) により解析をおこない、モデルの適合度は AIC を基準とした (R Core Team, 2017)。成長成績、血中遊離アミノ酸濃度および遺伝子発現量は最終体重をランダム要因として指定し、組織重量は飼料効率をランダム要因として指定した。その後、Tukey HSD の多重比較検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差とした。

結 果

E. gracilis の一般成分分析

E. gracilis 中の CP 含量、粗脂肪含量および粗灰分含量はそれぞれ、34.4%、13.8% および 4.8% であった。これに対して大豆粕は 51.1%、2.2% および 7.3% であった (表 4)。*E. gracilis* 中のグルタミンおよびグルタミン酸含量は大豆粕と比較して低いものの、アラニン含量は *E. gracilis* で高値を示した。ニワトリにおける

表 4. *E. gracilis* の一般成分分析およびアミノ酸含量

	<i>E. gracilis</i>	*大豆粕	*圧片トウモロコシ
アミノ酸 (g/100g)			
Ala	4.74	2.21	0.65
Asn + Asp	4.43	5.73	0.58
Arg	3.86	3.64	0.43
Gln + Glu	6.31	8.90	1.55
Gly	2.55	2.19	0.35
His	1.21	1.32	0.25
Ile	1.80	2.20	0.27
Leu	4.22	4.03	1.09
Phe	2.34	2.57	0.45
Pro	3.51	2.51	0.75
Ser	1.61	2.55	0.43
Thr	2.94	1.99	0.33
Tyr	1.70	1.62	0.27
Lys	3.34	3.29	0.29
Val	2.87	2.31	0.42
一般成分			
CP (%)	34.4	51.1	8.8
粗脂肪 (%)	13.8	2.2	4.4
粗灰分 (%)	4.8	7.3	1.4

*日本標準飼料成分表 (2009) 参照値。太字はニワトリにおける必須アミノ酸を示す (National Research Council, 1994)。

表 5. 飼料中大豆粕の *E. gracillis* への代替がニワトリの成長成績に及ぼす影響 (実験 1)

	対照区	<i>E. gracillis</i> 添加区						Pooled SE
		2%	4%	10%	20%	30%	40%	
増体量 (g)	170.67	175.67	164.17	178.83	172.83	171.67	162.67	7.26
飼料摂取量 (g)	429.67	433.00	403.50	421.83	409.50	409.83	389.00	15.51
飼料効率	0.40	0.41	0.41	0.42	0.42	0.42	0.42	0.02
組織重量 (g/100g 体重)								
肝臓	2.70 ^b	2.84 ^{ab}	3.02 ^{ab}	3.06 ^{ab}	3.06 ^{ab}	3.12 ^a	3.18 ^a	0.10
心臓	0.76	0.69	0.68	0.75	0.68	0.68	0.70	0.03
筋胃	2.19 ^c	2.18 ^c	2.30 ^{bc}	2.44 ^{abc}	2.29 ^{bc}	2.68 ^{ab}	2.83 ^a	0.12
浅胸筋	3.19	3.30	3.06	3.18	3.07	3.05	3.05	0.12
深胸筋	1.01	1.10	0.99	0.99	0.94	0.98	0.97	0.06
大腿二頭筋	5.71	5.50	4.82	5.20	4.98	4.86	4.80	0.34

それぞれの数値は平均値で表し、標準誤差を pooled SE として表記した。反復数 n=6。^{a-c}; 異なる符号間に 5% 水準の有意差あり。

必須アミノ酸に関しては大豆粕とほぼ同値を示しており、大豆粕との代替が可能であることが示唆された。

飼料中大豆粕の *E. gracillis* への代替がニワトリの成長成績および血中遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響 (実験 1)

増体量、飼料摂取量および飼料効率において、全処理区間において有意差は認められなかった (表 5)。飼料中ユーグレナ含量 30% および 40% 区で 100g 体重当たりの肝臓および筋胃重量が有意に増加した。

血中遊離アミノ酸含量は、飼料中 *E. gracillis* 含量 2% 区でイン

ロイシンおよびメチオニン濃度が有意に上昇し、30% 区ではメチオニンおよびスレオニン含量が有意に上昇した (表 6)。

飼料中繊維のパラミロンへの代替がニワトリの成長成績に及ぼす影響がニワトリの成長成績に及ぼす影響 (実験 2)

増体量、飼料摂取量および飼料効率では、いずれの処理区間においても有意差は認められなかった (表 7)。対照区と比較して *E. gracillis* 5% 添加区において浅胸筋および深胸筋重量が有意に増加し、パラミロン添加区における浅胸筋重量が対照区よりも低値を示した。

表 6. 飼料中大豆粕の *E. gracilis* への代替がニワトリの血中アミノ酸濃度に及ぼす影響 (μM) (実験 1)

	対照区	<i>E. gracilis</i> 添加区						Pooled SE
		2%	4%	10%	20%	30%	40%	
Ala	520	620	541	594	615	642	623	48
Arg	349	321	293	341	273	267	252	31
Asn	281	314	346	324	349	280	267	53
Asp	91	95	70	88	76	116	99	30
Cys	48 ^{ab}	61 ^a	49 ^{ab}	56 ^{ab}	50 ^{ab}	46 ^b	46 ^{ab}	4
Gln	1144	1193	1219	11268	1215	1403	1345	115
Glu	233	226	224	265	223	290	245	45
Gly	471	564	460	478	508	526	491	34
His	98	106	101	97	112	113	102	9
Ile	148 ^b	194 ^a	147 ^b	138 ^b	139 ^b	129 ^b	98 ^b	13
Leu	261 ^{ab}	318 ^a	271 ^{ab}	257 ^{ab}	265 ^{ab}	261 ^{ab}	222 ^b	19
Lys	564 ^b	968 ^{ab}	906 ^{ab}	663 ^{ab}	925 ^{ab}	1105 ^a	644 ^{ab}	124
Met	51 ^b	69 ^a	61 ^{ab}	58 ^{ab}	63 ^{ab}	69 ^a	66 ^a	4
Phe	110 ^{ab}	128 ^a	124 ^{ab}	114 ^{ab}	106 ^{ab}	115 ^{ab}	101 ^b	7
Pro	322	371	310	308	326	311	283	32
Ser	822	982	1002	1001	1057	1118	1069	78
Thr	472 ^b	549 ^{ab}	561 ^{ab}	462 ^b	616 ^{ab}	751 ^a	667 ^{ab}	55
Tyr	125 ^{ab}	168 ^a	143 ^{ab}	121 ^b	142 ^{ab}	162 ^{ab}	146 ^{ab}	12
Trp	82	90	88	87	96	91	103	12
Val	287	323	274	270	285	276	242	21

それぞれの数値は平均値で表し、標準誤差を pooled SE として表記した。反復数 n=6。^{a-c};異なる符号間に 5% 水準の有意差あり。

表 7. 飼料中繊維のパラミロンへの代替がニワトリの成長成績に及ぼす影響 (実験 2)

	対照区	飼料中 <i>E. gracilis</i> 添加区			パラミロン添加区	Pooled SE
		5%	10%	20%		
増体量 (g)	173.67	182.67	185.50	180.50	182.67	6.01
飼料摂取量 (g)	426.17	435.67	442.83	434.83	453.50	13.52
飼料効率	0.41	0.42	0.42	0.42	0.40	0.01
組織重量 (g/100 g 体重)						
心臓	0.64	0.62	0.60	0.64	0.65	0.01
肝臓	2.69	2.73	2.88	2.68	2.72	0.07
筋胃	2.75 ^a	2.48 ^b	2.55 ^{ab}	2.64 ^{ab}	2.64 ^{ab}	0.07
浅胸筋	3.35 ^b	3.66 ^a	3.45 ^b	3.29 ^{bc}	3.09 ^c	0.05
深胸筋	1.16 ^{bc}	1.28 ^a	1.22 ^{ab}	1.15 ^{bc}	1.12 ^c	0.03
大腿二頭筋	5.59 ^{ab}	5.68 ^{ab}	5.76 ^a	5.33 ^b	5.44 ^b	0.12

それぞれの数値は平均値で表し、標準誤差を pooled SE として表記した。反復数 n=6。^{a-c};異なる符号間に 5% 水準の有意差あり。

飼料中繊維のパラミロンへの代替が小腸における免疫関連遺伝子発現量に及ぼす影響

小腸における *MUC2* の mRNA 発現量は *E. gracilis* 10% 添加区よりも 20% およびパラミロン添加区で有意に増加した。*LYZ C* の mRNA 発現量は対照区および *E. gracilis* 5% 添加区と比較してパラミロン区で有意に上昇した。また、*E. gracilis* 10% 添加区よりも 20% 添加区の *LYZ C* の mRNA 発現量が上昇する傾向

が認められた ($P=0.069$) (表 8)。

考 察

一般成分分析から、*E. gracilis* の CP 含量は大豆粕よりも低いものの 34.4% と高く、粗脂肪含量は圧片トウモロコシよりも高く 4.4% であった (表 1)。また、*E. gracilis* のアミノ酸組成が大豆粕に近い組成となっていたため (表 4)、実験 1 では *E. gracilis* を大

表 8. 飼料中繊維のパラミロンへの代替が小腸における免疫関連遺伝子発現量に及ぼす影響

標的遺伝子	対照区	飼料中 <i>E. gracilis</i> 添加区			パラミロン添加区	Pooled SE
		5%	10%	20%		
<i>MUC2</i>	1.00 ^{ab*}	1.62 ^{ab}	0.98 ^b	4.34 ^a	2.85 ^a	0.87
<i>LYZ C</i>	1.00 ^{b*}	2.50 ^b	3.34 ^{ab}	7.22 ^{ab}	12.56 ^a	2.30

それぞれの数値は平均値で表し、標準誤差を pooled SE として表記した。反復数 n=6。^{a, b}; 異なる符号間に 5% 水準の有意差あり。

*一つの欠損値を示す。

豆粕と段階的に置換し、ニワトリの成長成績および組織重量に及ぼす影響を調査した。その結果、全処理区間における増体量、飼料摂取量および飼料効率における有意差は認められなかった。マウスやヒツジを対象としてユーグレナを給餌した際、タンパク質の消化率が向上させることが報告されている (細谷ら, 1977; Aemiro *et al.*, 2017)。Aemiro ら (2017) の報告では、ヒツジへのユーグレナ給与試験において、対照区の CP 消化率が 0.69 となり、飼料中 *E. gracilis* 添加量 15% の飼料では 0.72 と有意に上昇したことを示している。本研究において、*E. gracilis* の CP 含量が豆粕より低値を示したにも関わらず、実験 1 で成長成績に対照区と *E. gracilis* 添加区の間には有意な差が認められなかったことから、ニワトリにおいても哺乳類と同様に、飼料中 *E. gracilis* 添加量の増加とともに CP の消化率向上作用が働いたと推察された。

実験 1 では対照区と *E. gracilis* 添加区の間には飼料効率の変化は認められなかったものの、100 g 体重当たりの筋胃重量が有意に増加した (表 5)。紙や木の削りクズ、オーツ麦の外皮等の不溶性繊維をニワトリの飼料に添加することで筋胃重量が有意に増加することが報告されている (Hetland *et al.*, 2005; Sacranie *et al.*, 2012)。*Euglena* 属は細胞壁を持たないが、不溶性食物繊維と同様の生理機能を示すパラミロンを細胞内に蓄積している。パラミロンは *Euglena* 属に特有の難消化性の多糖類であり、3 本の直鎖 β -1,3-グルカンがねじれ合った螺旋構造を持ち、どの生物起源の β -1,3-グルカナーゼを用いても加水分解されない (Marchessault and Deslandes, 1979; 宮武ら, 1995)。本研究では、飼料中 *E. gracilis* 添加量が 30% 以上になると筋胃重量が増加したことから (表 5)、飼料中の *E. gracilis* 添加が増加するとともにパラミロン含量が増加することで不溶性食物繊維作用が強まった結果、筋胃重量が増加した可能性が示唆された。

そこで、実験 2 では飼料中のセルロースとパラミロンを置換し、パラミロン給与によるニワトリの成長成績および組織重量に及ぼす影響を調査した。*E. gracilis* 中のパラミロンは最大限乾燥重量の 50% 程度であり (宮武ら, 1995)、本試験では *E. gracilis* 20% 添加区がパラミロン添加区と同等のパラミロン含量となっている。実験 2 における給与試験の結果、筋胃重量については、全処理区間に有意な差は認められなかった (表 7)。以上より、飼料中パラミロン含量が 10% よりも高くなければ *E. gracilis* の持つ不溶性食物繊維作用を示さないことが示唆された。

また、パラミロンは食物繊維作用によりコレステロール吸収自

体を抑制させ、消化管内滞留時間および排泄量を増加させることが示されている (河野ら, 1987)。実験 2 では、対照区と比較してパラミロン添加区で浅胸筋重量が有意に減少していることから、パラミロンにより本来吸収される脂質量が減り、摂取するエネルギー量が減った結果、浅胸筋重量の低下が生じたと推測された。

前述の通り、パラミロンは食物繊維作用を持つことから、腸における整腸作用が期待された。食物繊維の給与は腸内細菌の変化を引き起こし、腸管内の杯細胞の細胞数を増加させ、腸管の粘液であるムチンの分泌量を増加させることが報告されている (Satchithanandam *et al.*, 1990; McCullough *et al.*, 1998)。そこで、実験 2 では小腸を採取し、腸管粘液の成分であるムチンの遺伝子 *MUC2* の発現量を RT-qPCR で定量し、パラミロンおよび *E. gracilis* が腸管粘液に及ぼす影響を調査した。その結果、パラミロン区で小腸における *MUC2* の遺伝子発現量が上昇し、さらに飼料中 *E. gracilis* 含量の増加に伴って小腸における *MUC2* の遺伝子発現量が増加することが明らかとなった (表 8)。ムチンは、腸管上皮の杯細胞から分泌され細胞表面を覆うことで細菌感染を防ぐことが知られている (Kim and Ho, 2010)。以上より、*E. gracilis* 中のパラミロンの食物繊維作用が、ニワトリ腸管内の杯細胞を増加させ、その結果としてムチン分泌量を増加させた可能性が示唆された。また、飼料中への *E. gracilis* 添加によりムチンの分泌量増加を介して腸管免疫機能の向上に貢献している可能性が示された。

ムチンと同様、腸管免疫を支えるリゾチーム (*LYZ C*) の mRNA 発現量についても測定を行った。その結果、パラミロン添加区で有意に小腸における *LYZ C* の mRNA 発現量が増加し、飼料中 *E. gracilis* 含量の増加に伴い小腸における *LYZ C* の mRNA 発現量が増加した (表 8)。リゾチームはクロストリジウム属やスタフィロコッカス属等のグラム陽性細菌に対して抗菌性を示すことから (Elphick and Mahida, 2005)、飼料中への *E. gracilis* はニワトリにおけるグラム陽性細菌に対する抗菌性を高める可能性が示唆された。

本研究では、*E. gracilis* を豆粕と完全に置き換えても飼料効率に影響を及ぼさず、さらに飼料中 *E. gracilis* 添加量を 5% にすることで骨格筋重量を有意に増加させることが示された。しかし、飼料中 *E. gracilis* 添加量を増加させても骨格筋重量を増加させる効果は認められなかった。興味深いことに、飼料中 *E. gracilis* 添加量を 20% にすることで腸管免疫を向上させる可能性が示唆された。このように、*E. gracilis* は豆粕と同様にタンパ

ク質供給源としては優秀であり、腸管免疫賦活化効果も期待できるが、*E. gracilis* の食物繊維作用は生体へのエネルギー供給を抑制する可能性があるため、使用する際には添加量に十分留意することが必要である。今後は、*E. gracilis* の整腸作用および腸内細菌叢に及ぼす影響を調査する必要がある。

引用文献

- Aemiro A, Kiiru P, Watanabe S, Suzuki K, Hanada M, Uematsu K and Nishida T. Effects of *Euglena* (*Euglena gracilis*) supplementation on nutrient intake, digestibility, nitrogen balance and rumen fermentation in sheep. *Animal Feed Science and Technology*, 225 : 123-133. 2017.
- Aemiro A, Watanabe S, Suzuki K, Hanada M, Umetsu K and Nishida T. Effect of *Euglena* (*Euglena gracilis*) supplemented to diet (forage : concentrate ratios of 60:40) on the basic ruminal fermentation and methane emissions in invitro condition. *Animal Feed Science and Technology*, 212 : 129-135. 2016.
- Barsanti L, Bastianini A, Passarelli V, Tredici MR and Gualtieri P. Fatty acid content in wild type and WZSL mutant of *Euglena gracilis*. *Journal of Applied Phycology*, 12 : 515-520. 2000.
- Elphick DA and Mahida YR. Paneth cells : their role in innate immunity and inflammatory disease. *Gut*, 54 : 1802-1809. 2005.
- 林 正弘, 戸田亨次, 米司 隆. ユーグレナ *Euglena gracilis* による生物餌料の栄養強化とマダイ仔魚に対する餌料価値. *日本水産学会誌*, 59 : 1051-1058. 1993.
- Hetland H, Svihus B and Choct M. Role of insoluble fiber on gizzard activity in layers. *Journal of Applied Poultry Research*, 14 : 38-46. 2005.
- 細谷圭助・北岡正三郎. *Euglena gracilis* タンパク質の人工消化実験およびネズミ飼育試験による栄養価の決定. *日本農芸化学会誌*, 51 : 483-488. 1977.
- Hulanicka D, Erwin J and Bloch K. Lipid metabolism of *Euglena gracilis*. *Journal of Biological Chemistry*, 239 : 2778-2787. 1964.
- 河野裕一, 中野長久, 北岡正三郎, 加藤 清, 重岡 成, 大西俊夫. ラットにおける [¹⁴C] コレステロールの吸収, 体内移行に及ぼすユーグレナ (*Euglena gracilis* z) の影響. *日本栄養・食糧学会誌*, 40 : 193-198. 1987.
- Kim YS and Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease : recent insights and progress. *Current Gastroenterology Reports*, 12 : 319-330. 2010.
- Kita K, Matsunami S and Okumura J. Relationship of protein synthesis to mRNA levels in the liver of chicks under various nutritional conditions. *Journal of Nutrition*, 126 : 1610-1617. 1996.
- 北岡正三郎. ユーグレナの細胞機能の解析と新規資源生物としての利用. *日本農芸化学会誌*, 63 : 1741-1753. 1989.
- 北岡正三郎. *Euglena gracilis* タンパク質の栄養価決定のための培養条件の検討と細胞の一般成分およびアミノ酸組成. *日本農芸化学会誌*, 51 : 477-482. 1997.
- Korn ED. The fatty acids of *Euglena gracilis*. *Journal of Lipid Research*, 5 : 352-362. 1964.
- Marchessault RH and Deslandes Y. Fine structure of (1→3)-β-D-glucans : curdlan and paramylon. *Carbohydrate Research*, 75 : 231-242. 1979.
- McCullough JS, Ratcliffe B, Mandir N, Carr KE and Goodlad RA. Dietary fibre and intestinal microflora : effect on intestinal morphometry and crypt branching. *Gut*, 42 : 799-806. 1998.
- 宮武和孝, 竹中重雄, 山地亮一, 中野長久. 原生動物の作り出すバイオ粒子, パラミロンの性質と利用. *粉体工学会誌*, 32 : 566-572. 1995.
- National Research Council. *Nutrient Requirements of Poultry*, 9th rev. ed. National Academy Press. Washington, D. C. 1994.
- 日本飼養標準・家禽 (2011 年版). 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構編, 中央畜産会. 2011.
- 日本標準飼料成分表 (2009 年版). 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構編, 中央畜産会. 2009.
- 農林水産省. 飼料をめぐる情勢, 農林水産省生産局畜産部飼料課, http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/l_siryo/attach/pdf/index-233.pdf. 2018.
- R Core Team. R : A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>. 2017.
- Sacranie A, Svihus B, Denstadli V, Moen B, Iji PA and Choct M. The effect of insoluble fiber and intermittent feeding on gizzard development, gut motility, and performance of broiler chickens. *Poultry Science*, 91 : 693-700. 2012.
- Satchithanandam, S, Vargofcak-Apker, M, Calvert, RJ, Leeds, AR and Cassidy, MM 1990. Alteration of gastrointestinal mucin by fiber feeding in rats. *Journal of Nutrition*, 120 : 1179-1184. 1990.
- 佐藤 守, 吉中禮二, 森本晴之, 黒島良介. 養魚初期飼料としてのユーグレナの栄養評価 - II ニジマス稚魚に対するユーグレナ飼料の栄養価. *水産増殖*, 32 : 88-91. 1984.
- Schwarzshans JP, Cholewa D, Grimm P, Beshay U, Risse JM, Friehs K and Flaschel E. Dependency of the fatty acid composition of *Euglena gracilis* on growth phase and culture conditions. *Journal of Applied Phycology*, 27 : 1389-1399. 2015.
- 高井雄一郎, 瀬山智博, 安松谷恵子, 笠井浩司, 出雲章久. ユーグレナを用いたメタン発酵消化液中窒素の除去と家きん飼料としての安全性評価. *近畿中国四国農業研究*, 12 : 3-8. 2008.
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R and Leunissen JA. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, 35 : W71-W74. 2007.
- Zerbino DR, Achuthan P, Akanni W, Amode MR, Barrell D, Bhai J, Billis K, Cummins C, Gall A, Girón CG, Gil L, Gordon L, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, To JK, Laird MR, Lavidas I, Liu Z, Loveland JE, Maurel T, McLaren W, Moore B, Mudge J, Murphy DN, Newman V, Nuhn M, Ogeh D, Ong CK, Parker A, Patricio M, Riat HS, Schuilenburg H, Sheppard D, Sparrow H, Taylor K, Thormann A, Vullo A, Walts B, Zadissa A, Frankish A, Hunt SE, Kostadima M, Langridge N, Martin FJ, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Staines DM, Trevanion SJ, Aken BL, Cunningham F, Yates A, Flicek P. Ensembl 2018. *Nucleic Acids Research*, 46 : D754-D761. 2018.

Effects of the Feeding of *Euglena* Replaced with Dietary Soybean on the Growth and Intestinal Mucus of Chickens

Ken Ito¹, Kakeru Sasawatari², Rurika Abe², Wako Fujimori², Shota Watanabe³, Kengo Suzuki³,
Yuta Asayama³, Ichiro Minami⁴, Megumi Nishimukai² and Kazumi Kita²

¹ Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University,
2-2 Aza Minami Ogata Village, Minamiakita-gun, Akita 010-0444 Japan

² Faculty of Agriculture, Iwate University, 3-18-8 Ueda, Morioka 020-8550, Japan

³ Euglena Co, Ltd., 5-29-11 Shiba, Minato-ku, Tokyo 108-0014, Japan

⁴ Minami Food's Inc., 55-38-8 Ohno, Hirono-cho, Kunohe-gun, Iwate 028-8802, Iwate

Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries in Japan reported that the self-sufficiency rate of feedstuffs was approximately 25%. Most of grains for feedstuffs like corn, soybean and wheat are imported from overseas to Japan, which results in a sharp increase in prices of commercial animal feeds because of various incidents like the climate change, also called global warming. To solve this problem, it is important to increase the domestic supply of unused resources which can be alternative to feed grains. Recently, *Euglena*, which is a genus of single-celled flagellate eukaryotes, has been used to be a material of dietary supplements, cosmetics and feedstuffs because it has a plenty of nutrients. But the dietary effect of *Euglena gracilis* has not been elucidated so far. In the present study, the influence of *E. gracilis* replaced with soybean in diets on the growth of chickens was examined. *E. gracilis* replaced with all of soybean did not showed any adverse effects on the growth of chickens. The mRNA expression levels of *MUC2* and *LYZ C* were increased along with the increase in dietary *E. gracilis* content. When most dietary fiber was replaced with paramylon, which is a resistant carbohydrate and made in *E. gracilis*, the mRNA expression level of *LYZ C* was elevated compared to the control. These results suggest that all of soybean can be replaced with *E. gracilis*, and dietary *E. gracilis* could enhance intestinal immunity of chickens.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, **56** : J47-J54, 2019)

Key words : chicken, *E. gracilis*, growth performance, lysozyme, mucin, paramylon