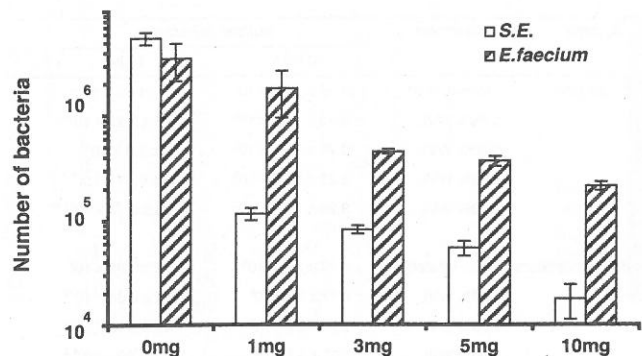


図2 The adsorption effect of activated charcoal from the bark on the bacteria

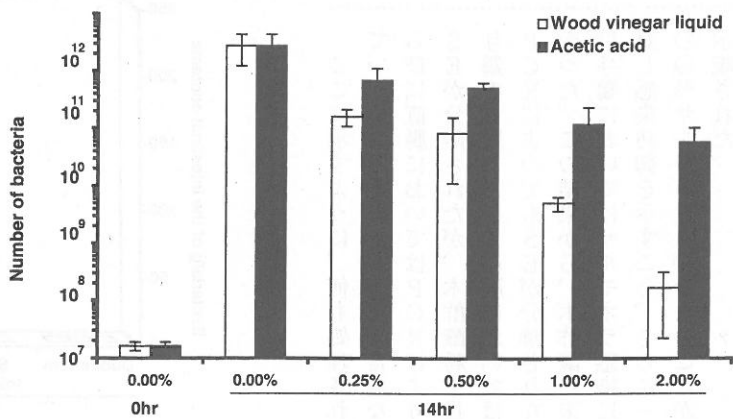


いたS.E.は、軟質炭素末により dose-dependent に吸着された。すなわち、1mg、3mg、5mg、10mgの軟質炭素末で処理すると5.5×10⁶個の菌数が、平均で、それぞれ1.1×10⁵個、8.1×10⁴個、5.4×10⁴個、1.7×10⁴個と減少した。

また、腸内の正常細菌叢に対する軟質炭素末の影響について調べるために、腸内常在菌である *Enterococcus faecium* を用いて、軟質炭素末の吸着効果を検討した。 *Enterococcus faecium* の場合、3.5×10⁶個の菌数が、平均で、それぞれ1.8×10⁶個、4.5×10⁵個、3.7×10⁵個、2.1×10⁵個と軟質炭素末に dose-dependent に吸着されたが、その吸着は、S.E.に比べ弱いものであった。これらの結果から、軟質炭素末は菌種の違いにより吸着性が異なることが示された。

さらに、木酢液のS.E.の増殖に対する効果も明らかにするため、S.E.の増殖培地に木酢液を0.25%、0.5%、1%あるいは2%になるように添加し、菌の増殖を調べた。木酢液を培地に添加した場合、pHの変化はなく中性であった。その結果を示したのが図3である。S.E.の増殖は、木酢液の添加量に比例してその増殖が抑制された。一方、木酢液と同じ有機酸である酢酸を培地に添加し、木酢液と同様にpHを中性に調整してS.E.に対する効果を調べた結果、酢酸は菌の増殖を抑制するものの、その影響は弱いものだった。この結果から、木酢液はS.E.に対し、増殖抑制効果を示

図3 The effect of wood vinegar liquid from the bark on growth of *S. enteritidis*



すことが明らかとなった。木酢液の正常細菌叢に対する影響を明らかにするために、*Enterococcus faecium* ならびに *Bifidobacterium thermophilum* を用い、増殖培地に木酢液を添加しそれぞれの菌の増殖を調べた。その結果、図4のようにいずれの菌の増殖も、木酢液の添加により促進された。この結果から、木酢液は *Enterococcus faecium* や *Bifidobacterium thermophilum* といった近年プロバイオティクスとして注目されている菌に対し、増殖促進効果を示すことが明らかとなった。

そこで木酢液を軟質炭素末に吸着させた木酢炭素末にサルモネラ感染防御効果を明らかにするために、あらかじめネッカリッチ添加飼料を与えた鶏にS.E.を1×10⁶個、経口接種し、その後の糞便中の菌の排菌を調べた。また、サルモネラワクチン接種鶏におけるサルモネラ感染防御効果についても検討し、木酢炭素末投与の効果を比

較した。サルモネラのワクチン接種は、市販のサルモネラワクチンをプロトコールに従ってワクチンを行い、サルモネラに対し十分免疫応答を誘導した鶏にS.E.を1×10⁶個、同様に経口接種し、その後の糞便中の菌の排菌を調べた。

その結果、図5のように何も処理されていないコントロールの鶏にお

「木酢炭素末投与による鶏のサルモネラ汚染防止に関する研究」

塔娜渡来仁(李文哲) 児玉洋(大府大) 獣医免疫、岩切好和(宮崎みどり製薬株)

◎目的

わが国において、*Salmonella* Enteritidis (以下S.E.)を原因とする食中毒が公衆衛生上重要な問題となっている。そのため、生産農場においてワクチンを含めたサルモネラ保菌率の減少につながる方策が急務となっている。これまで我々は、活性炭の一種である薬用炭が体内からの病原菌排除に有用であることを示した(第百三十回本学卒)。今回我々は、木酢液を軟質炭素末に吸着させた木酢炭素末(商品名:ネッカリッチ)を鶏からのS.E.の排除に応用するため、S.E.に対する軟質炭素末の吸着効果ならびにS.E.増殖に対する木酢

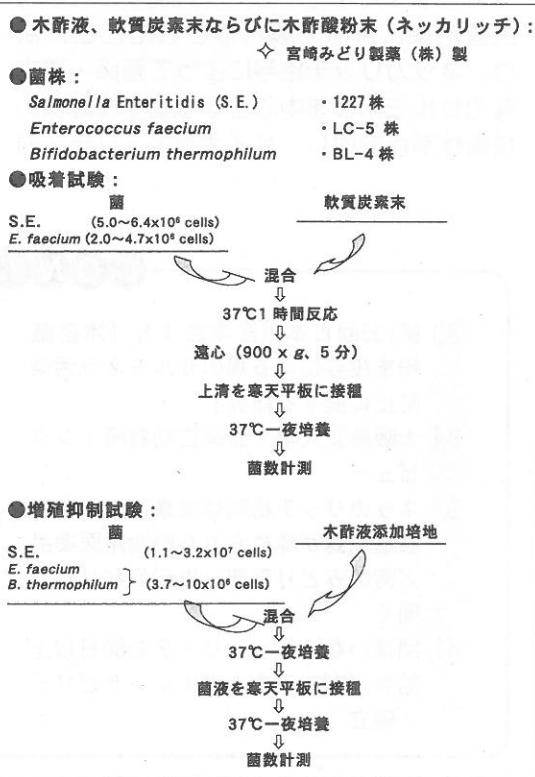
液の作用を調べるとともに、木酢炭素末投与による鶏のサルモネラ保菌率の減少効果について検討したので報告する。

◎方法

図1は、実験に用いた木酢液、軟質炭素末、木酢炭素末、菌株、ならびに試験方法について示したものである。

木酢液、軟質炭素末ならびに木酢炭素末(ネッカリッチ)は宮崎みどり製薬製のものである。S.E.は12277株を用いた。また、腸内常在菌のモデルとして、*Enterococcus faecium* (LC-5株)、*Bifidobacterium thermophilum* (BL-4株)を用いた。

図1 材料および方法



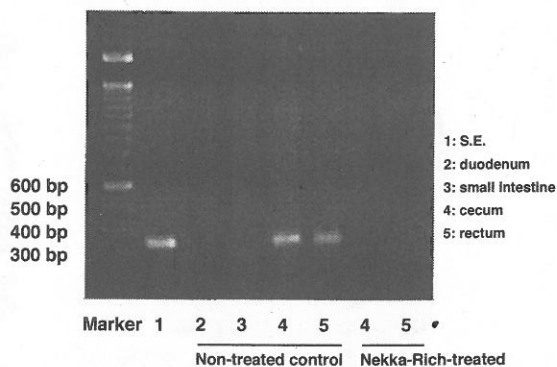
◎結果

まず、S.E.ならびに *Enterococcus faecium* に対する軟質炭素末の吸着効果について示したものが図2である。この図に示すように、実験に用

軟質炭素末による吸着試験は、S.E.ならびに *Enterococcus faecium* を、軟質炭素末と混ぜ、三七度Cで一時間反応させる。その後、九〇〇×g・五分間遠心を行い、得られた上清を希釈し寒天平板に接種した。三七度Cで一晩培養し、出現した菌数を計測し、これらの菌に対する軟質炭素末の吸着効果について調べた。

また、菌の増殖に対する木酢液の作用について調べるために、S.E.、*Enterococcus faecium* ならびに *Bifidobacterium thermophilum* を、木酢液添加培地で三七度C一夜培養した後、菌液を希釈し寒天平板に接種し、三七度Cで一晩培養した。その後、出現した菌数を計測し、菌の増殖に対する木酢液の作用について調べた。

図7 Agarose gel electrophoresis of PCR products from the intestinal contents of chickens 15 days after *S. Enteritidis* challenge



- ◎まとめ
 結果をまとめると、
- ① 軟質炭素末は腸内常在菌である *Enterococcus faecium* に対してよりも *S.E.* に対し高い吸着効果を示した。
 - ② 木酢液は、*S.E.* に対しては増殖抑制効果を、腸内常在菌である *Enterococcus faecium* や *Bifidobacterium thermophilum* に対しては増殖促進効果を示した。
 - ③ サルモネラワクチン接種によるサ

ルモネラの感染防御効果は不十分であることが明らかとなった。

④ 木酢酸粉末(ネッカリッチ)投与鶏においてはサルモネラ感染に対し防御を示すことが示唆された。

以上これまで得られた結果から、サルモネラの感染防御において、サルモネラワクチン接種よりも木酢酸粉末投与が優れた方策であることが推察された。

さらに、木酢酸粉末投与によるサルモネラ感染防御のメカニズムとして、①木酢酸粉末の成分である軟質炭素末によるサルモネラの吸着効果、②木酢液のサルモネラに対する増殖抑制効果ならびに③木酢液の乳酸産生菌等に対する増殖効果の結果としてのプロバイオティクス効果。これらの効果が相加的あるいは相乗的に作用しているものと考えられる。今後さらに詳しいメカニズムについて解析するとともに、ニワトリ以外の他の家畜の感染防御に木酢酸粉末の応用を図って行きたいと考えている。

いては、菌接種後五日目で糞便1g当たり数万個の菌が、十日目以降ずっと糞便1g当たり数千個の菌が認められたのに対し、木酢酸粉末投与鶏においては、菌接種後五日目で糞便1g当たり数十個の菌が、十日目で糞便1g当たり十数個の菌が認められたが、十五日目では糞便中に菌は認められなかった。一方、ワクチン投与鶏においては、菌接種後五日目で糞便1g当たり数万個の菌が、

十日目で糞便1g当たり数千個の菌が、十五日目でも糞便1g当たり数百個の菌が認められた。

次に、同じサルモネラ感染鶏を用いて、腸の内容物から菌の分離同定を行った。

その結果、図6のように何も処理されていないコントロールの鶏においては、十二指腸、小腸からは *S.E.* が分離されなかったが、盲腸ならびに直腸において *S.E.* が分離された。

さらに、ワクチン投与鶏においても、十二指腸、小腸からは *S.E.* が分離されなかったが、盲腸ならびに直腸において *S.E.* が分離された。しかしながら、木酢酸粉末投与鶏においては、消化管いずれの場所においても菌は分離されなかった。

そこでこの事実を確認するため、腸の内容物を用いてPCRにより *S.E.* の検出を行った。その結果を示したのが図7である。

ここに示すように、何も処理されていないコントロールの鶏の盲腸ならびに直腸においてはPCRにより *S.E.* が分離されたが、木酢酸粉末投与鶏の盲腸ならびに直腸においてはPCRによっても *S.E.* が分離されなかった。この結果から、木酢酸粉末投与鶏においてはサルモネラ感染に対し感染防御を示すこと、さらに100%サルモネラを持たないことが示唆された。

図4 The effect of wood vinegar liquid (WVL) from the bark on the growth of bacteria

Bacteria	Treatment	Number of bacteria	
		0 hr	14 hr
<i>E. faecium</i>	Non-treated	8.25 ± 1.75 × 10 ⁶	5.9 ± 1.75 × 10 ¹⁰
	0.25% WVL	8.25 ± 1.75 × 10 ⁶	8.05 ± 3.25 × 10 ¹⁰
	0.50% WVL	8.25 ± 1.75 × 10 ⁶	8.3 ± 3.8 × 10 ¹⁰
	1.00% WVL	8.25 ± 1.75 × 10 ⁶	9.6 ± 0.14 × 10 ¹⁰ #
	2.00% WVL	8.25 ± 1.75 × 10 ⁶	1.38 ± 0.13 × 10 ¹¹ ##
<i>B. thermophilum</i>	Non-treated	6.77 ± 3.1 × 10 ⁶	7.52 ± 0.96 × 10 ⁹
	0.25% WVL	6.77 ± 3.1 × 10 ⁶	1.15 ± 0.64 × 10 ¹⁰
	0.50% WVL	6.77 ± 3.1 × 10 ⁶	1.43 ± 0.96 × 10 ¹⁰
	1.00% WVL	6.77 ± 3.1 × 10 ⁶	2.3 ± 0.69 × 10 ¹⁰ \$
	2.00% WVL	6.77 ± 3.1 × 10 ⁶	3.5 ± 1.23 × 10 ¹⁰ \$\$

#, p<0.05 compared to non-treated control; ##, p<0.004 compared to non-treated control; \$, p<0.02 compared to non-treated control; \$\$, p<0.02 compared to non-treated control.

図5 Isolation of *S. Enteritidis* from fecal samples of chickens after challenge

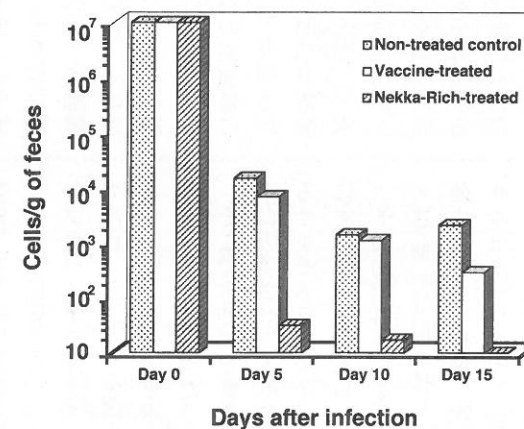


図6 Isolation of *S. Enteritidis* from the intestinal contents of chickens after challenge

