# 土壌改良植物活性剤「みみっこ」の
# 動物への応用可能性

## 研究成果報告書

岩手大学農学部動物科学科
動物栄養機能学研究室
小田伸一
研究協力者：岩手大学農学部動物科学科 4 年
岡　直樹、八幡美緒、出野春花
2021 年 3 月

本報告書は、岩手大学との共同研究（プロジェクトNo　J200000146、所管NoJ20146共研―小田伸一、課題名：土壌改良植物活性剤「みみっこ」の動物への応用可能性、受託者：imaアグリサービス、研究期間：令和2年8月1日～令和2年12月15日）に基づいて行った研究報告に当たる。

これらの研究は、岩手大学農学部動物科学科　4年生　岡直樹君と八幡美緒さんの卒業研究として、それぞれ「ミミズ由来土壌改良植物活性剤がヒツジのルーメン発酵に及ぼす影響」および「ミミズ由来土壌改良植物活性剤がヒツジ血漿抗酸化活性および耐糖能に及ぼす影響」のタイトルで行ったものである。二人の卒業論文をもとに、重複した内容を編集したものである。若干の重複および不備がある場合はお許し願いたい。また、引用及び参考文献の中には、適当でないものも含まれているが、現時点での情報を知るうえで、修正していないことを付記する。

なお、これらの内容に関しては、岩手大学農学部動物科学科　小田伸一が責任を負うものとする。また、本研究を遂行するにあたり、同4年生　出野春花さん、修士課程2年沖津和男君、同木村ちはるさんの協力を得たので、ここに記して感謝の意を表したい。

岩手大学農学部動物科学科

小田伸一

令和3年3月15日

ミミズ由来土壌改良植物活性剤がヒツジのルーメン発酵に及ぼす影響

動物栄養機能学研究室　岡　直樹

## 緒論

### 1. ルーメン発酵

反芻動物の主食は牧草等の粗飼料であるが、この粗飼料に含まれる炭水化物は主に、β-グルコースが直鎖状に結合したセルロースを中心とする繊維成分である。そのため、反芻動物は自身の持つ消化酵素では粗飼料を分解することはできない。しかし、反芻動物は植物由来のセルロースを利用する消化システムが独自に発達しており、複数の胃を持つことで植物性飼料由来の栄養素（揮発性脂肪酸）の吸収を可能にしている(1)。

ウシ、ヒツジ、ヤギの場合は第一胃、第二胃、第三胃を前胃と呼び第四胃が単胃動物の胃に相当する。特に第一胃はルーメンと呼ばれ、胃全体の約80%を占める巨大な器官である。ルーメンには多様な微生物が生息しており、摂取された植物性飼料はルーメン内微生物の持つセルラーゼ、キシラナーゼ、ペクチナーゼなどの複数の酵素により分解され、揮発性脂肪酸、メタン、$CO_2$および乳酸などが生成される(2)。これらの内、揮発性脂肪酸は主に第一胃壁から吸収され、エネルギー源として利用される一方で飼料として第一胃に入った蛋白質、あるいは非蛋白態窒素化合物の大部分はルーメン内微生物の作用によって、アミノ酸に分解され、アミノ酸はその後アンモニア、短鎖脂肪酸などの有機酸と$CO_2$になる。第一胃内で生成されたアンモニアは微生物の体内に取り込まれ、アミノ酸合成の窒素源として使われ、微生物蛋白質合成に利用され、増殖した微生物菌体は宿主動物の蛋白質源として第四胃以下の消化管で消化吸収される(3)。

このような反芻動物の第一胃内微生物による飼料成分の分解や生成物の合成あるいは微生物の増殖などを総称して**ルーメン発酵**と呼んでいる。

### 2. 揮発性脂肪酸

ルーメン発酵によって生成される揮発性の短鎖脂肪酸は VFA（volatile fatty acid）と呼ばれ、VFA には主なものとして**酢酸**（$CH_3COOH$）、**プロピオン酸**（$CH_3CH_2COOH$）、**酪酸**（$CH_3$（$CH_2$）COOH）が挙げられる。発酵で生成さ

れる VFA の割合（モル%）は酢酸 60～70%、プロピオン酸 15～20%、酪酸 10～15%程であり、生成された VFA はルーメン上皮細胞から体内へ吸収される(2)。酢酸は吸収後、アセチル CoA シンテターゼの働きによりアセチル CoA となって TCA 回路に入り、ATP の産生に利用される。また、反芻動物は単胃動物と比較して下部消化管でのグルコースの吸収量が少ないことから、糖新生が非常に重要な代謝である。プロピオン酸は、その糖新生の主体を担っており、プロピオン酸はアシル CoA シンターゼの働きによってプロピオニル CoA からサクシニル CoA に変換され TCA 回路に入り、そこから糖新生経路を経てグルコースへと変換される(1)。

このように VFA は、反芻動物が必要とするエネルギーの多くを供給しているため、家畜の生産性はルーメン発酵の状態に大きく依存される。通常、ルーメン発酵によって VFA が産生されるとルーメン内の pH は酸性に傾くが、弱アルカリ性の唾液が流れ込むことによって中和され、恒常性を維持している。しかし、粗飼料が不足し濃厚飼料を多給している環境下では、ルーメン発酵が急激に進むことによって VFA の生産が活発になり pH がより酸性に傾くため、ルーメン内の微生物が死滅してしまい、様々な障害を引き起こすルーメンアシドーシスを発症する危険性を伴う(4)。したがって、安定した家畜生産を行うためには、ルーメン発酵に関わる微生物の状態にも着目する必要がある。

## 3. ルーメン微生物

反芻動物の第一胃、第二胃には細菌、プロトゾア、 嫌気性真菌、バクテリオファージといった多種多様な微生物が相互に関連性をもちながら生息しており、それら微生物は嫌気的発酵によって摂取した飼料を分解することでルーメン内の生態系を維持している。ルーメン微生物の大きな特徴である嫌気発酵は主に、細菌により大きく担われているため、ルーメンが消化器官として機能するには、少なくともルーメンの機能を維持するための最低限の種類と量のルーメン細菌が存在しなくてはならない。ルーメンの主要な機能である飼料の分解から考えると、植物の構成成分を発酵分解する細菌の存在がルーメン機能にとって重要である。ルーメン細菌によって形成されるルーメン細菌叢は、ルーメンへ投入される飼料を発酵分解し、その発酵産物である 揮発性脂肪酸を宿主にエネルギー源として供給するだけでなく、増殖した菌体をタンパク質源としても供給している。牛に給与された飼料によりルーメン細菌は増殖し活動を行うことから、エサの質と量に応じてルーメン細菌叢はその構成メンバーに変化が生じる。この飼料の変化に伴うルーメン細

菌叢の変化は、その発酵産物の質と量にも変化を産み、それに応じて生成される VFA 割合にも影響を及ぼす(5)。

VFA のルーメン内での構成割合は、一般的に粗飼料多給の場合には酢酸が多く、濃厚飼料多給の場合にはプロピオン酸が多い。反すう家畜の体内に存在するルーメンは、ルーメン微生物と飼料だけで発酵を調整しているわけではなく、宿主の生理機能と密接に連動しながらその機能が保たれていることから、ルーメン機能は宿主である反芻家畜の健康状態にも影響されていることは想像に容易い (6)。

## 4. ミミズと「みみっこ」

大型土壌動物であるミミズは土壌中に生息し、土壌の物理性・化学性・生物性に大きく影響を及ぼすことからも、農業上重要な生物である。その影響の多くは、摂食と排便の際の微生物作用と考えられていて、土壌の物質循環の円滑化に働き、土壌中の微生物を活性化させ、土壌の改良に有効であるとの報告がある(7)(8)(9)。また、ミミズは、その腸内に多くの消化酵素を有しており (10)、それらの酵素は土壌だけでなく我々のような生物やバイオマス資化にとっても有用であることが明らかになっている。近年では、医学や健康食品分野においてもミミズの研究がなされてきた(11)。

今回の実験に用いる「みみっこ」はそのミミズやミミズ糞土が有する微生物・酵素・動植物性ミネラルといった物質を原料とした好気的培養産物で、主に土壌改良商物活性剤として利用されている。土壌に散布することで土壌中の細菌叢に変化を与え、植物にとって優良な影響を及ぼすことが確認されている(12)。

## 5. 本研究の目的

反芻動物は、ルーメン内の発酵が不良になると、摂取飼料からの栄養素の吸収が滞ったり、代謝障害を引き起こすことが知られている。そのため、安定したルーメン発酵を維持することは生命活動において極めて重要である。また、先にも述べたように「みみっこ」は土壌内の細菌叢を活性化させ、植物の発育に有効であることが知られている。近年、「みみっこ」を動物用飼料添加剤として応用する試みがなされているが、反芻家畜への実証はまだ無い。

そこで、本研究では動物の中でも消化管内に特有の細菌叢を所有している反芻動物にみみっこを経口投与することによって、反芻動物への適正な投与

量とルーメン内の発酵への影響を、VFA 組成の変動と 4 週間連続投与後の耐糖能に及ぼす効果に着目して検討を行うことを目的とした。この投与によりルーメン発酵に影響を及ぼせば、産生される VFA の濃度や割合に変化が生じ、飼料効率やルーメン内環境の改善に繋がるなどの効果が期待できる。

## 1. 材料と方法

### 1.1. 供試動物及び飼養条件

サフォーク種雌ヒツジ 8 頭を「みみっこ」を投与する実験区と投与しない対照区に 4 頭ずつ無作為に分けて飼養し、4 週間実験に供試した。飼料は、維持飼料として、乾草(チモシー)を体重の 2%量 1 日 1 回午前 11 時に給与した。鉱塩と水は自由摂取とした。

### 1.2. 経口投与とルーメン液サンプリング

飼料給餌前に「みみっこ」2%溶液 25ml を 1 日 1 回実験区の動物に子馬用投薬器を用いて経口投与を行った。ルーメン液は、投与開始 1 週後から 1 週間の間隔で午後 2 時に採取した（採食開始 3 時間後)。採取は、サーフロー静脈留置針（テルモ、16G）と注射筒を用いてルーメンの穿刺により 1ml 採取した。

### 1.3. ルーメン液処理

採取後は速やかに研究室に持ち帰り、採取したルーメン液は遠心分離(15000rpm,10min,4℃)を行い、得られた上清 500μl をエッペンチューブに移した。上清 500μl に内部標準としてクロトン酸(20mmol/L) 500μl を混合し、そこにリン酸 10μl を添加して除タンパク処理を行い、成分測定まで-25℃で冷凍保存した。

### 1.4. VFA 濃度の測定

ガスクロマトグラフ(GC-1700, 島津製作所)によるクロトン酸を内部標準物質とした内部標準法を用いた。分析条件は以下の通りである。

カラム：HP-FFAP,　30m,

膜厚：0.25μm

移動相：純ヘリウム

検出器：FID

結果はあらかじめ測定しておいたVFAスタンダード溶液のピーク面積からVFA濃度として求め、クロトン酸の数値で補正した。

### 1.5. 統計処理

データはMicrosoftのExcelで処理し、結果は平均値と標準誤差で示した。統計処理はIBMの統計ソフトパッケージ(SPSS)を用い、みみっこ投与後の変動については反復測定分散分析を行い、危険率5%以下で有意と認められたものについては、さらにBonferroniの多重比較検定を行った。また、試験区と対照区間の差の検定は測定週ごとにt検定で行った。

## 2. 結果

各測定項目の値は、平均値と標準誤差で示した。

### 2.1. 総VFA濃度（図1）

対照区では投与開始1週後の62.6±5.2mmol/Lから2週後では47.6±1.8mmol/Lに低下したが、投与開始3週後で54.9±1.1mmol/L、4週後70.3±8.3mmol/Lにまで上昇した。実験区では投与開始1週間後で47.6±3.1mmol/Lから投与開始後4週間の61.3±7.1mmol/Lの間で緩やかに上昇した。投与1週後において試験区と対照区の間に有意な差が認められたが($p<0.05$)、週ごとの時間的変化については有意差は認められなかった。

### 2.2. 酢酸濃度(図2)

対照区では投与開始1週後の44.6±3.6mmol/Lから2週後では33.6±1.3mmol/Lに低下したが、投与開始3週後で36.9±1.2mmol/L、4週後47.7±5,6mmol/Lにまで上昇した。実験区では投与開始1週間後で34.4±2.2mmol/Lから投与開始後4週間の41.7±4.4mmol/Lの間で緩やかに上昇した。いずれの区においても有意な時間的変化は認められなかった。

### 2.3. プロピオン酸濃度(図3)

対照区では投与開始1週後の11.2±0.9mmol/Lから2週後では8.8±0.6mmol/Lに低下したが、投与開始3週後で11.6±1.1mmol/L、4週後14.4

±2.2mmol/L にまで上昇した。実験区では投与開始 1 週間後で 8.7±1.1mmol/L から投与開始後 4 週間の 13.0±2.1mmol/L の間で緩やかに上昇した。いずれの区においても有意な時間的変化は認められなかった。

2.4. 酪酸濃度(図 4)

対照区では投与開始 1 週後の 6.9±0.7mmol/L から 2 週後では 5.2±0.1mmol/L に低下したが、投与開始 3 週後で 6.5±0.5mmol/L、4 週後 8.2±1.0mmol/L にまで上昇した。実験区では投与開始 1 週間後で 4.5±0.6mmol/L から投与開始後 4 週間の 6.6±0.7mmol/L の間で緩やかに上昇した。投与 1 週後において試験区と対照区の間に有意な差が認められたが($p<0.05$)、週ごとの時間的変化については有意差は認められなかった。

2.5. 酢酸/プロピオン酸比(図 5)

対照区では投与開始 1 週後から投与開始 4 週後にかけて 3.3~4.0 の値を示した。実験区では投与開始 1 週間後で 4.0±0.4 から投与開始後 2 週間には 3.3±0.4 に低下したのち、4 週間後の 3.2±0.3 まで緩やかに低下した。いずれの区においても有意な時間的変化は認められなかった。

## 3. 考察

図 1 に示したように、VFA 総濃度では投与 1 週後において試験区と対照区の間に有意な差が認められたが、2 週以降は対照区と試験区の間に差は認められなかった。試験区では 1 週後から 4 週後まで緩やかに上昇する傾向が見られた。VFA の各成分濃度においても同様の傾向を示したが、VFA 総濃度及び酪酸濃度の 1 週後での試験区と対照区の数値の開きが個体による変動なのかみみっこの投与による差かどうかは今回、投与開始前の測定を行っていないため、不明である。また、測定期間を通しての試験区での緩やかな上昇は対照区でも 4 週において数値の上昇が見られたことから、この変動はみみっこの投与によるものではなく、季節の変化による変動によるものと考えられた。本研究でのサンプルの採取は 2020 年の 11 月から 12 月にかけて行ったため、季節の変化による、すなわち冬に向けて、ヒツジ達の食欲の増加と飲水量の低下が、VFA の濃度に影響を与えたのではないかと考えられた。

「みみっこ」の投与量は、2%溶液 25ml/日としたが、これは植物での使用量のおよそ 2 倍量であった。この濃度ではルーメン VFA 濃度及び濃度比に大きな影響を及ぼさないことから、より高濃度での投与を検討すべきと考えられる。

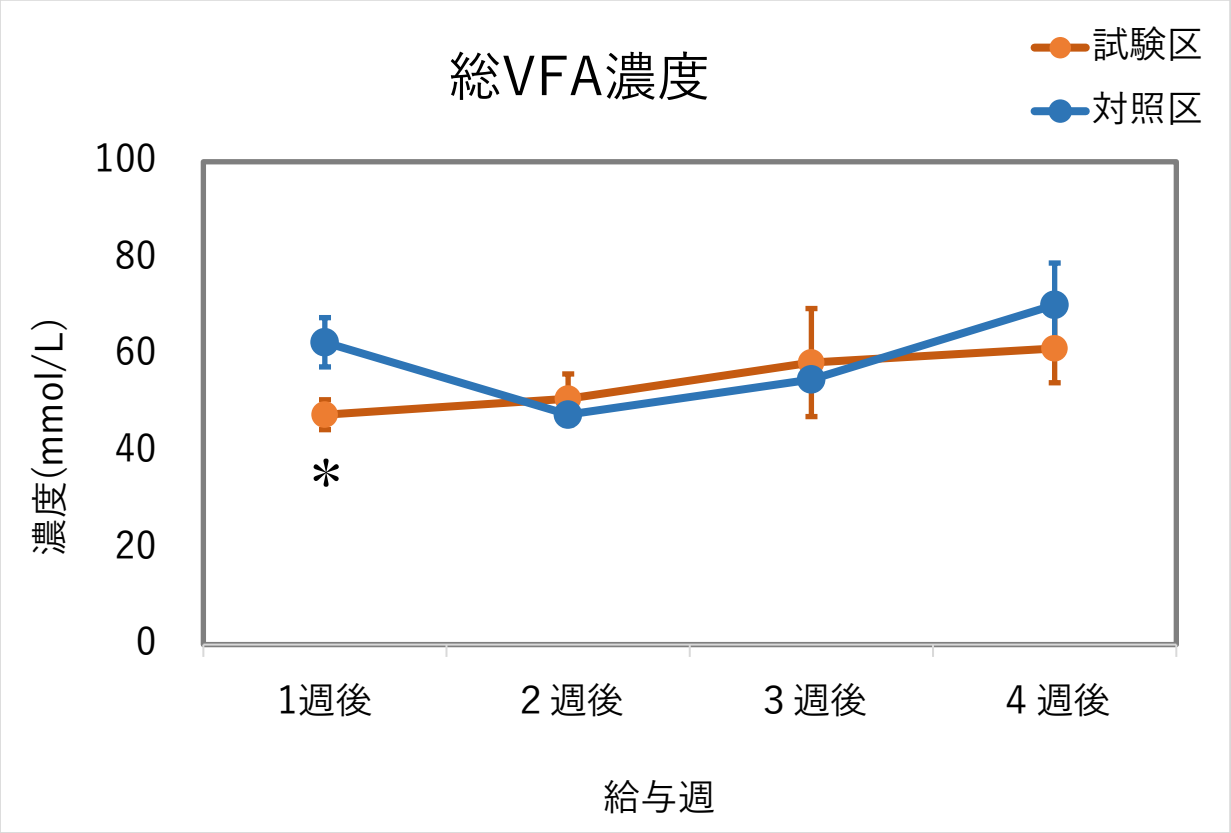


図 1 .総 VFA 濃度の週ごとの変動

（n=4、平均値±標準誤差）

＊：$p<0.05$，対照区と試験区の間の差の検定

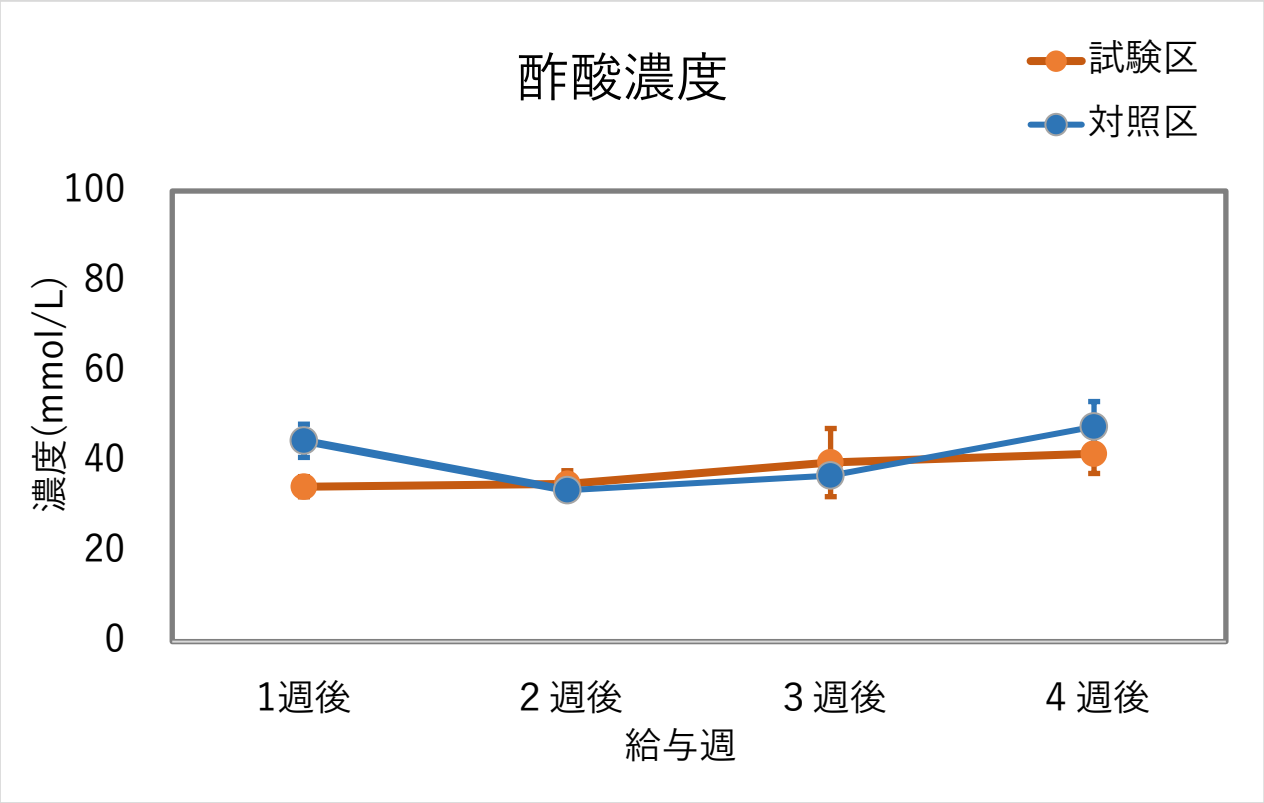


図 2.酢酸濃度の週ごとの変動

（n=4、平均値±標準誤差）

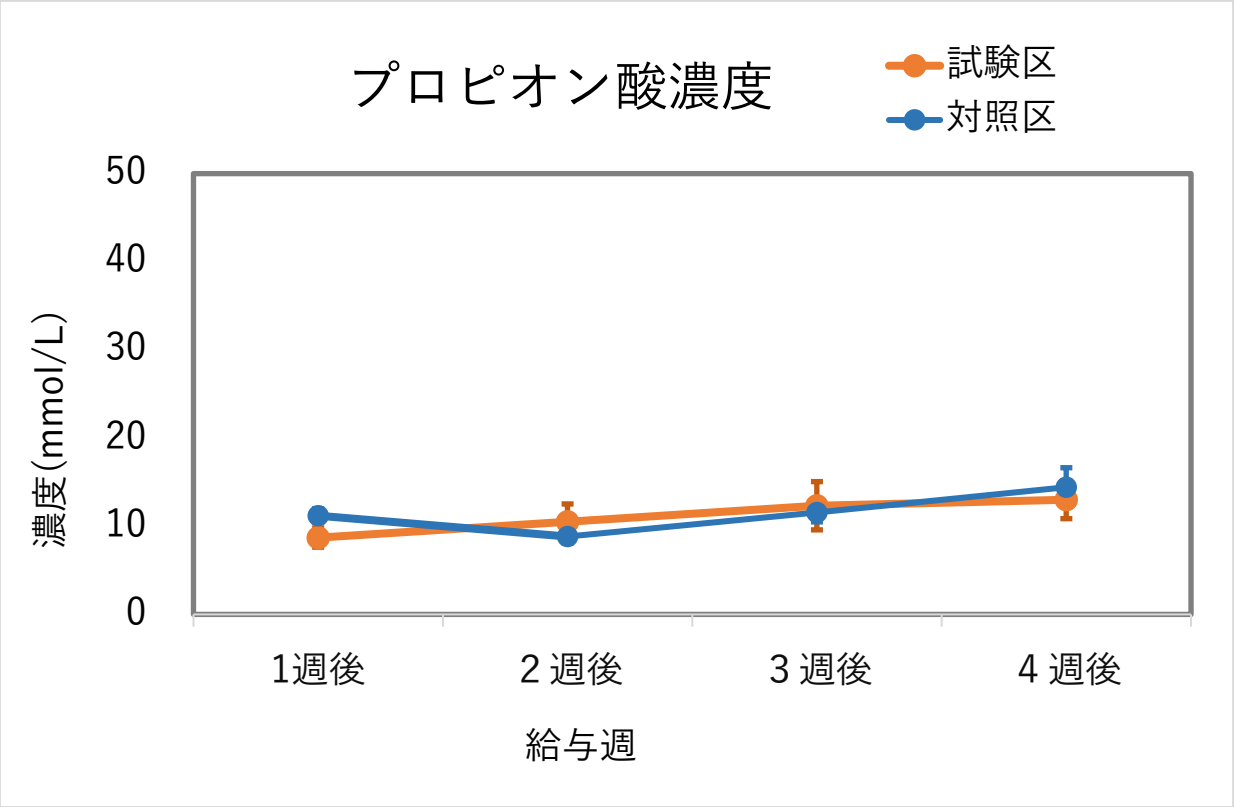


図 3.プロピオン酸濃度の週ごとの変動

（n=4、平均値±標準誤差）

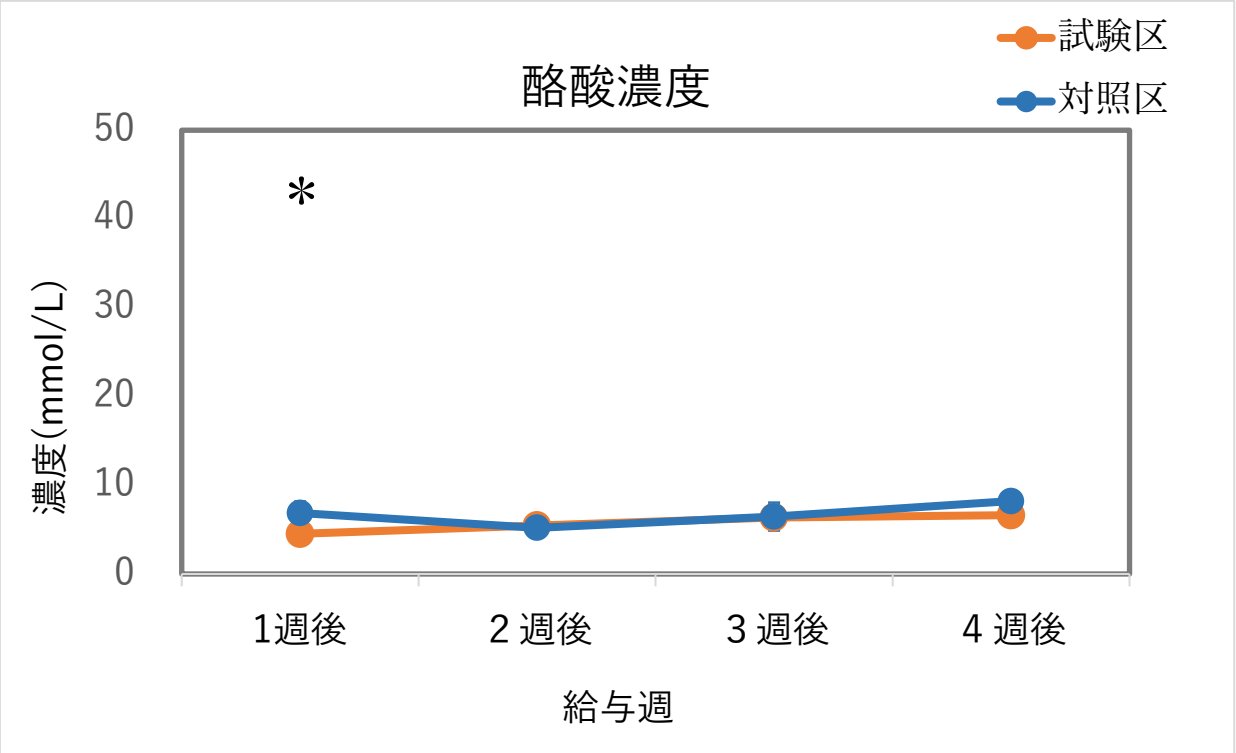


図 4.酪酸濃度の週ごとの変動

（n=4、平均値±標準誤差）

＊：$p<0.05$，対照区と試験区の間の差の検定

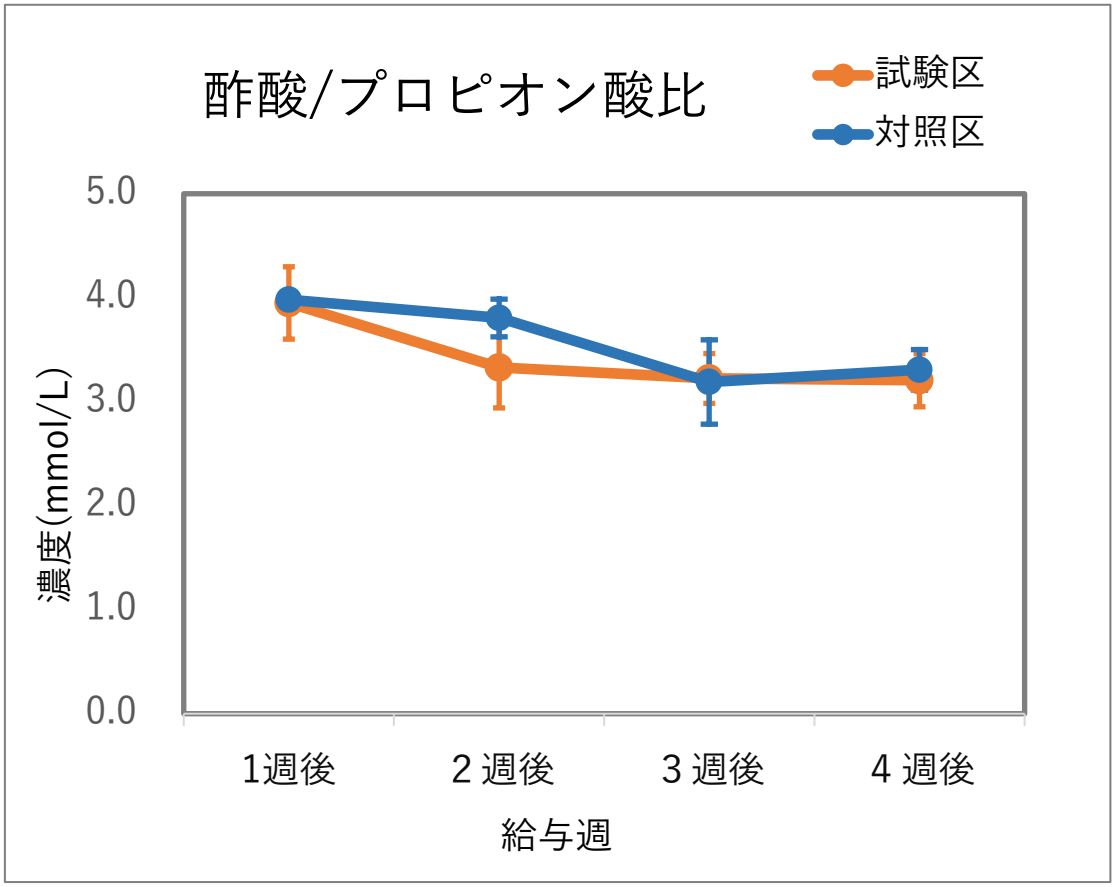


図 5. 酢酸/プロピオン酸比の週ごとの変動

（n=4、平均値±標準誤差）

総括

本研究で用いた「みみっこ」は、試験区及び対照区での時間経過による変動には統計的に有意な差は見られず、同時刻での比較では総 VFA 濃度と酪酸に、1 週後においてのみ統計的に有意な差が見られた。今回経口投与をする際、みみっこは 2%に希釈して与えていたため、ルーメン内の環境を変化させるほどの効果がなかった可能性が考えられた。そのため、濃度を高めた投与実験を検討していく必要がある。また、経口投与による実験を行ったが、投与の際、ヒツジを保定した状態で子馬の投薬器を用いて投与を行った。しかし、この方法では実用化を視野に入れる際、給与の手間がかかるだけでなく、ヒツジ達へのストレス負荷も大きいと考えられたことから、より簡便で手間のかからない投与方法を検討する必要があると思われた。

## 引用文献および資料

(1)畜産ハンドブック(2014) 扇元敬司・韮澤圭二郎・桑原正貴・寺田文典・中井裕・杉浦勝明 講談社　225,233 頁
(2)家畜生理学　第二次改訂増補第 1 版(2004) 津田恒之　株式会社養賢堂 160-172 頁
(3)ルーラル電子図書館-農業技術辞典 NAROPEDIA
「ルーメン発酵」
http://lib.ruralnet.or.jp/nrpd/#koumoku=15557 (2021 年 1 月 2 8 日利用)
(4)牛群検定通信　No79(家畜改良事業団)
「～ルーメンアシドーシスに気をつけて～」
http://liaj.lin.gr.jp/japanese/kentei/gyukentusin/gyukentusin79.pdf (2021 年 1 月 28 日利用)
(5)新ルーメンの世界　微生物生態と制御(2004)　小野寺良次・板橋久雄　農文協　560 頁
(6)ルーメン機能を支える微生物(2014)　家畜感染症学会　独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究機構　畜産草地研究所 三森眞琴
http://www.kachikukansen.org/kaiho2/PDF/3-2-041.pdf　(2021 年 1 月 28 日利用)
(7)ミミズによる圃場の土壌微生物活性化および硝化活性への影響(2006) 市川隆子・高橋輝昌・小林達明　日本緑化工学会誌　第 32 巻　第 1 号　154-158 頁
(8)ミミズや微生物資材を用いた土壌改良方法の検討(2007) 市川隆子・高橋輝昌 日本緑化工学会誌　第 33 巻　第 1 号　277-280 頁
(9)ミミズ糞土中の微生物・糖・アミノ酸(1987) 松本貞義　日本土壌肥料学雑誌　第 58 巻第 1 号　86-88 頁
(10) ミミズのはたらき　土を耕す・肥やす「地球の虫」(2011)　中村好男　株式会社創森社 21 頁
(11) ミミズの魅力と可能性は無限大(2016) 赤澤真一　生物工学会誌　第 94 巻第 9 号　576-579 頁
(12) みみっこ:ミミズの力を利用した土壌改良植物活性剤
「みみっこが誇る 4 つの効果」
http://mimicco.com/ (2021 年 1 月 28 日利用)

ミミズ由来土壌改良植物活性剤がヒツジ血漿抗酸化活性
および耐糖能に及ぼす影響

動物栄養機能学研究室　八幡美緒

緒論

## １．　インスリンの作用機序と反芻動物における代謝特性

エネルギー源であるグルコースの代謝調節に不可欠なホルモンであるインスリンは、分泌量の変化によりさまざまな影響を及ぼすことが知られている。インスリンの同化、すなわち細胞内へのグルコース取り込みの作用機序の一つは以下のように考えられている。細胞膜上にはグルコース輸送体（GLUT４）が多数存在するといわれており、細胞内には予備としてこのグルコース輸送体を含む小胞が存在している。インスリンが分泌されると、まず細胞膜表面上に露出しているインスリン受容体に結合する。この刺激を受けると細胞内に向けてホスファチジルイノシトール３キナーゼ（PI3 キナーゼ）というシグナル物質が放出され、これが細胞内にあるグルコース輸送体を含む小胞の移動を刺激する。小胞が細胞膜上に移動することで、細胞膜上のグルコース輸送体の数が増加することで細胞内へのグルコース取り込みを促進すると言われている（7)。
このインスリンの作用に関して、特異な代謝機構を持つ反芻動物は**インスリン抵抗性**を示すことが知られている。インスリン抵抗性の作用機序についてはいくつかの研究が進められているが、反芻動物のインスリン抵抗性は、もともと細胞膜上に存在するグルコース輸送体の数が少ないことに由来すると報告されている（8)。このように反芻動物はインスリン抵抗性、すなわちインスリンが効きにくいという特異な代謝機構を有してはいるが、インスリンは３大栄養素に対して強い同化作用を示すことから、家畜生産においてプラスの要因としてはたらく。体内のインスリン分泌が増加すると、あるいはインスリン抵抗性が小さくなると、代謝系が体にエネルギーを蓄積する、いわゆる同化方向に働くことになる。すなわち、脂質代謝においては肝臓や脂肪における脂肪合成が促進され、タンパク質代謝においては骨格筋でのアミノ酸の取り込みが促進される。その結果、家畜はより多くの筋肉や脂肪などを蓄えることができ、生産効率の向上へとつながる。

## ２．酸化ストレスとインスリン

生物は、呼吸により酸素を利用することによって、エネルギー産生や免疫機能を発動する一方で、取り込まれた酸素の一部は活性酸素となり、動物に酸化ストレスを与えたり、老化や多くの疾病の原因となったりする。生物には本来このような過剰な活性酸素を速やかに消去するための抗酸化作用が備わっている。生体内の抗酸化作用を担う抗酸化剤として働く物質には、アスコルビン酸（ビタミンC）や α-トコフェロール（ビタミンE)、ポリフェノール、カロテノイド類など多くが知られている。特に代表的な抗酸化物質として知られているのが、水溶性で強力な抗酸化活性を示すアスコルビン酸（ビタミンC）である。アスコルビン酸は主に**酸化型**のアスコルビン酸と**還元型**のデヒドロアスコルビン酸として生体内に存在しており、活性酸素に電子を１つ渡して自らはラジカルとなるが、これが共鳴化することで平衡状態となり安定する。このラジカルの安定化が、他の分子を次々とラジカルにしていく連鎖反応を防ぐとともに、自らは不均化してデヒドロアスコルビン酸となる（9)。我々ヒトをはじめとする霊長類やモルモットは、アスコルビン酸合成酵素を欠いているため、食べ物などを通じて外部から摂取する必要があるが、それ以外の哺乳類ではこの生成経路を持つために**体内でアスコルビン酸を生合成することができ**、基本的に不足することはない。しかし動物が受ける酸化ストレスの程度によっては、体内で合成されるアスコルビン酸量が十分でない場合がある。家畜生産においては、温度や湿度のような物理的なストレスから害虫などの生物的ストレス、隔離などの精神的ストレスまでさまざまなストレッサーが存在し、それらが家畜に酸化ストレスを引き起こすことが知られている。また、酸化ストレスの亢進は家畜の生産性低下につながることから、酸化ストレスを軽減するためにこのような抗酸化物質を飼料添加物として家畜に追加給与することがある。また、ビタミンEやビタミンCといった抗酸化物質がインスリン感受性を改善するという報告もあり、酸化ストレスとインスリン抵抗性の相関が示唆されている（10）（11)。

このように生体内における抗酸化作用は、酸化ストレスの軽減によるさまざまな疾病の予防に寄与するため、家畜の健康維持や抗病性、ひいては家畜生産効率に関して重要な役割を果たしている。

## ３．本研究の目的

土壌改良植物活性剤”みみっこ”は動物用飼料への応用が検討されているが、鑑賞魚やブタ以外の動物に対しての効果は未だ実証されていない。今回は、当製品に含まれるミミズ由来成分がヒツジの第一胃内微生物叢に何らかの影響を与えることで、VFA 産生にも影響を及ぼし、さらに 1 ヶ月の連続給与によりインスリン抵抗性が改善される可能性を考えて研究を立案した。給与効果の検討に関しては、一定期間、調製したみみっこを給与した後に VFA 濃度の測定と耐糖能試験を行うこととした。また耐糖能試験に伴う血漿抗酸化活性についても合わせて測定した。このうち、本研究においては耐糖能試験と血漿抗酸化活性について検討することとした。

１．実験方法

1）供試動物および飼養条件

サフォーク種の雌成ヒツジ 8 頭(体重 36.0~48.5kg)を供試し、飼養期間は 4 週間とした。維持飼料として体重あたり 2%のチモシー乾草を与え、飲水ならびに鉱塩は自由摂取とした。供試飼料はみみっこの特別配合品を 2%溶液として調製し、1 頭あたり 25ml 与えた。これを試験区のヒツジには 1 日 1 回午前 11 時に経口投与し、投与後に乾草を与えた。なお、ヒツジにおける実証例がない中で研究を行ったため、今回使用したみみっこ溶液の濃度は土壌に散布する際の濃度の 2 倍程度にあたる 2 %に設定した。なお、投与量の更なる検討は今後、順次行う予定である。

２）実験区分

試験区として、みみっこ特別配合品（フルボ酸添加）2%溶液の 25mL 経口投与区を設定した。対照区は、試験区と同様に体重あたり 2 %のチモシー乾草のみを与え、飲水と鉱塩は自由摂取とした。

３）グルコース溶液

グルコース溶液は、使用直前に D(+)-Glucose（Wako）40%溶液を MQ 水で作製し、供試動物の体重あたり 0.625mmol/kg になるよう 1 分間かけて頸静脈より注入した。

４）血液採取

採血は、グルコース溶液投与の 10 分前から投与後 90 分までの間、経時的に 9 回行った。採血時間は、グルコース溶液の投与を開始した時間を 0（分）とし、-10、0、5、10、15、30、45、60、90（分）とした。0 分の採血を行った後、約 1 分間かけて頸静脈に規定量のグルコース溶液を投与した。

血液は、あらかじめヘパリン処理した注射筒を用いて 5mL ずつ採取し、採取後は速やかに遠沈管に移して氷冷保存した。遠沈管には血液凝固防止剤として、ヘパリン（1000U/mL）を血液 1mL あたり 10μL 添加した。

５）測定項目

a）血漿グルコース濃度の測定

グルコース CⅡ-テスト　ワコー（ムタロターゼ・GOD 法）を用いた。

b）血漿抗酸化活性の測定

抗酸化能測定試薬（サーモサイエンティフィック株式会社、SuperSignal ELIZA(37070)および HRP for EIA(ペルオキシダーゼ、FujiFilm 和光純薬株式会社)）を使用して、化学発光測定装置（テトラライト、トッケン）で測定した。

６）統計処理

データは Microsoft の Excel で処理し、結果は平均値と標準誤差で示した。統計処理は SPSS を用いて行った。同郡間における経時的な変化については一元配置分散分析（ANOVA）および Dunnett の両側検定を行い、２群間の検定については t 検定を行った。

２．結果

各測定項目の値は、平均値と標準誤差で示した。

a）耐糖能試験

（ｉ）血糖値の変動

図 1 に示すように、対照区の血糖値は、0 分値で 61.3±9.7mg/dL から 5 分値で 132.3±22.5mg/dL に急激に上昇し（P＜0.01）、その後速やかに低下し、30 分で 80.6±13.6mg/dL となったが、30 分値は 0 分値との間に有意差は認められなかった。45～90 分にかけては、やや緩やかに低下し続け、64.4±8.5mg/dL～57.6±11.1mg/dL の値であった。試験区の血糖値は、0 分値で 54.7±4.6mg/dL

から 5 分値で 136.3±33.0mg/dL に急激に上昇し（P＜0.01)、10 分、15 分と速やかに低下、30 分で 86.6±8.6mg/dL を示した（P＜0.05)。45～90 分にかけては対照区と同様な推移を示した。

（ⅱ）イニシャル値と比較した血糖値の変化率、曲線下面積の比較

次に耐糖能試験における血糖低下速度について検討するため、 0 分値と比較して有意差が認められた 5 分、10 分、15 分及び 30 分値の値において血糖値の変化率を求めた。投与前-10 分と 0 分における血糖値の平均値をイニシャル値とし、それを 100%としてグルコース溶液投与後の経時的変化を比較した（図 2 -1)。（ⅰ）で 0 分値と比較して有意差が認められた 30 分までの区間において、血糖値変化率の直線回帰式（y=ax+b）を求めその傾きを比較すると(図 2－2)、対照区の a は-1.945±0.26、試験区では-1.868±0.946 であった。両区の間に統計的な有意差は認められなかった。ここで、対照区においては 30 分値で有意差が認められなかったことから、両区ともに有意差が認められた 0～15 分までの区間においても同様に回帰式を求め、傾きを比較してみた。対照区では-2.729±0.682、試験区では-3.013±1.933 となったが、やはり両区の間には統計的な有意差は認められなかった。

また、図には示さないが、曲線下面積（AUC）は対照区で 2107.8±1456.9 であり、試験区では 3118.4±390.9 であったが、それぞれ 3 頭のデータのため、この両区の間に統計的な有意差は認められなかった。

b）血漿抗酸化活性（図 3）

対照区では、 0 分値で 17.569±5.356μg/mL から 5 分値で 11.583±4.181μg/mL に低下し、10 分値で 23.200±9.341μg/mL に上昇したあと緩やかに低下し、60 分値で 9.176±4.644μg/mL となり、90 分で 17.642±12.354μg/mL と 0 分値の水準に戻る傾向が見られた。一方試験区においては、 0 分値の 13.198±6.347μg/mL から 5 分値の 9.635±2.213μg/mL までわずかに低下したのち目立った変動は見られず、対照区と比較して血漿抗酸化活性は低い値で推移した。10 分値において統計的な有意差が認められた（p＜0.05)。

３．考察

a）血糖値変動の比較（図１）

対照区、試験区ともに、投与後 5~10 分後において最も高い値を示したのち、投与後 90 分にかけて緩やかに減少していく傾向が見られ、両区の間に統計的な有意差は見られなかった。もし、みみっこ溶液の給与によりルーメン内で産生される VFA 量の増加あるいは VFA 組成に何かしらの影響があれば、その刺激を受けてインスリン分泌量が変化し、その結果細胞内へのグルコース取り込み能にも影響を及ぼす可能性が考えられた。細胞内へのグルコース取り込み能が増強された場合、血糖値の低下速度は速くなると考えられることから、グルコース投与後 5 分の最大値を示してからのグラフの傾き（a）は絶対値が大きく、急勾配になると予想した。しかしながら、有意差があった区間（0～30 分）における傾きを両区で比較したが、対照区で-1.945±0.26、試験区で-1.868±0.946 となり、有意な差は見られなかった。両区ともに有意差が認められた 0~15 分の区間においても同様に両区の間に統計的な有意差は認められなかった。先に示したルーメン VFA 濃度の変動においても、みみっこ溶液の給与による VFA 産生量に顕著な変化は見られなかった（12)。したがって、今回の飼養条件では耐糖能に影響がないものと考えられた。

b）血漿抗酸化活性の比較

図 3 に示す通り、実験区よりも対照区がやや高い値を示しているように見えるが、両区の間に統計的な差はほとんど見られなかった。みみっこの給与により抗酸化力が増強されていれば、試験区の抗酸化活性の水準は対照区よりも高くなると予想されるが、今回の結果では対照区と同程度あるいはわずかに低い水準にとどまった。ここで両区それぞれにおいて経時的な変動の幅に着目すると、対照区では変動が大きく、試験区では小さいということがわかる。この理由としては、試験区において一日一回みみっこ溶液を経口投与するため、一頭ずつ保定をしながら投薬用シリンジを用いて経口投与を行っていたことで、試験区の個体は保定に慣れが生じていた可能性があるが、対照区においてはそれがなかったことで、耐糖能試験の採血に伴う保定ストレス反応が結果に影響したのではないかと考えられた。

また他にもミミズ由来の糖リポタンパク質は強力な抗酸化作用を持つことが知られているが、みみっこ溶液の詳細な成分については開示されていないため、溶液中にこの糖リポタンパク質が含まれていたかどうかは明らかでない（13)。

さらに、みみっこに含まれるフルボ酸は抗酸化作用を持つことがわかっている。フルボ酸は活性酸素やフリーラジカル消去能を持つとされており、活性酸素種の１つである DPPH ラジカルの消去能を持つことを明らかにした論文もある（3)。この DPPH ラジカルは比較的安定な構造であり、簡便な方法であるため再現性を重視した実験によく用いられている。しかし、今回の実験方法では当製品に含まれるどの成分が血漿抗酸化活性に影響しているかを特定することはできなかった。

すでに動物用飼料としての効果が示されたブタは単胃動物であり、みみっこの成分が腸内細菌叢に何らかの影響を与えた結果、体臭や糞尿などの臭いが軽減されたと考えられる。一方で反芻動物であるヒツジでは、経口投与した溶液は下部消化官の前に存在するルーメンを通過する。ルーメン内部にはさまざまな微生物群が生息しており、ブタとは大きく異なった細菌叢が構成されている。したがって、給与したみみっこの成分はまずルーメン内の細菌叢に作用したが、その細菌叢の構成に影響を与える程度の濃度ではなかったと考えられた。今回はヒツジでの実証例がない中での研究であり、当製品の成分がルーメン発酵に影響を与えるという仮説のもとで試験を行ったため、飼養条件は当製品を土壌に対して使用する際の濃度である 1~2%という基準をもとにして 2%を設定した。今回の濃度ではほとんど影響が見られないということが明らかになったため、今後はみみっこ溶液の濃度をより高く設定してその影響を検討する必要があると考える。また、何らかの影響があった場合、みみっこに含まれるどの成分が影響を及ぼしたのかを検討する必要があると考える。今回は投薬専用のシリンジを用いて経口投与を行ったが、実際の畜産現場で一頭ずつ保定をしながら経口投与を行う方法は効率的でない。よって、この液状飼料を濃厚飼料等の固形飼料に噴霧して与え、自発採食させる方法が適していると考えられる。

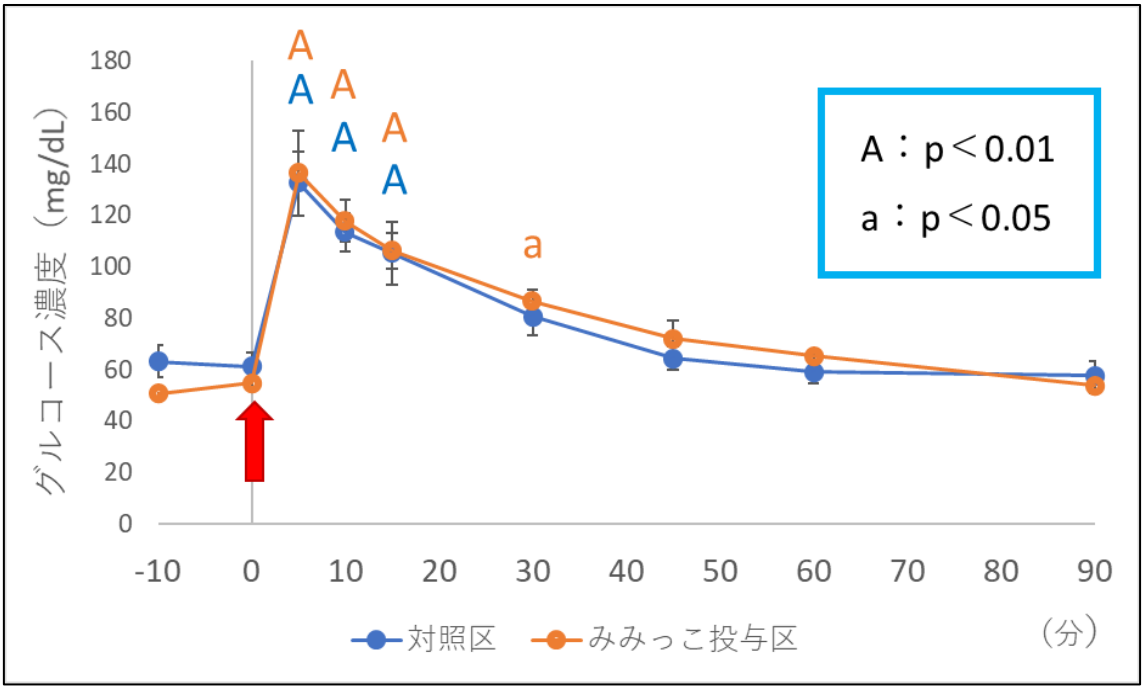


図１．耐糖能試験における血糖値の変動

（n=3、平均値±標準誤差）

↑ グルコース投与（1 分間）

0 分値に対して A: $P$<0.01、a:$P$<0.05

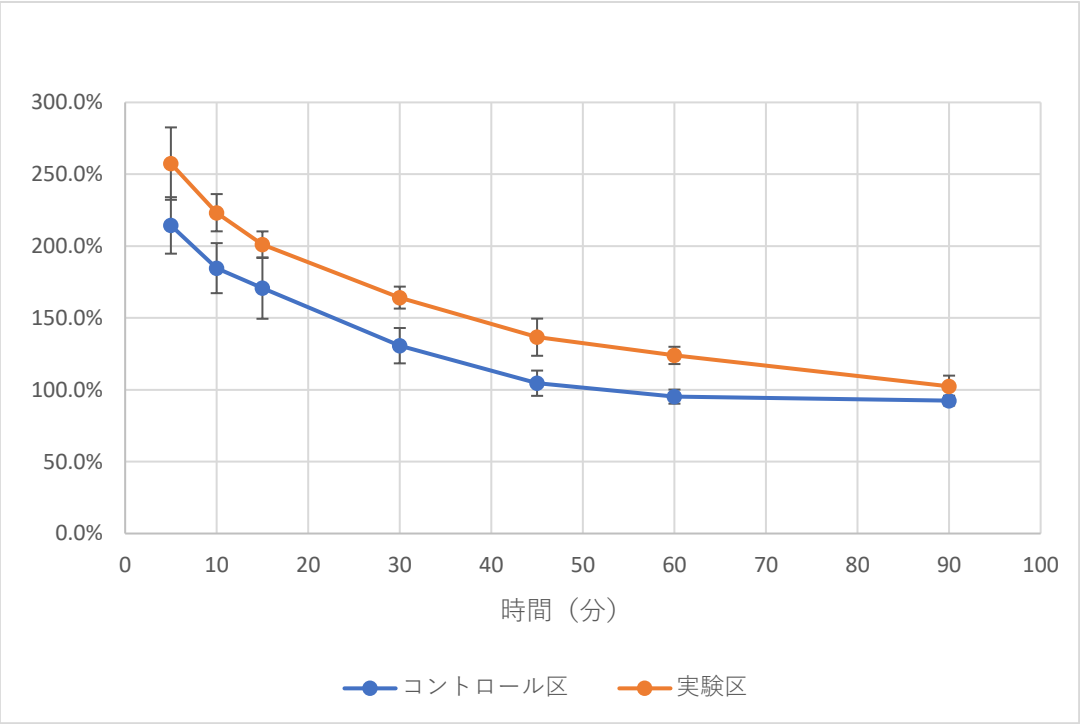


図２－1．イニシャル値と比較した血糖値の変化率の変動

（n=3、平均値±標準誤差）

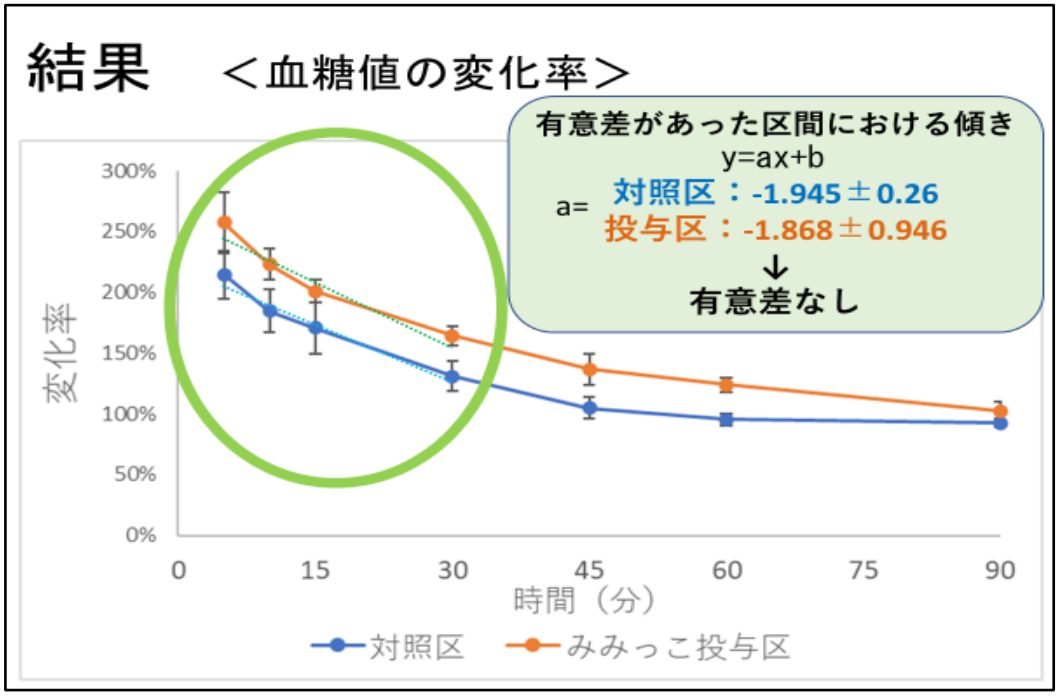


図２－２　5～30 分値までの直線回帰式の比較

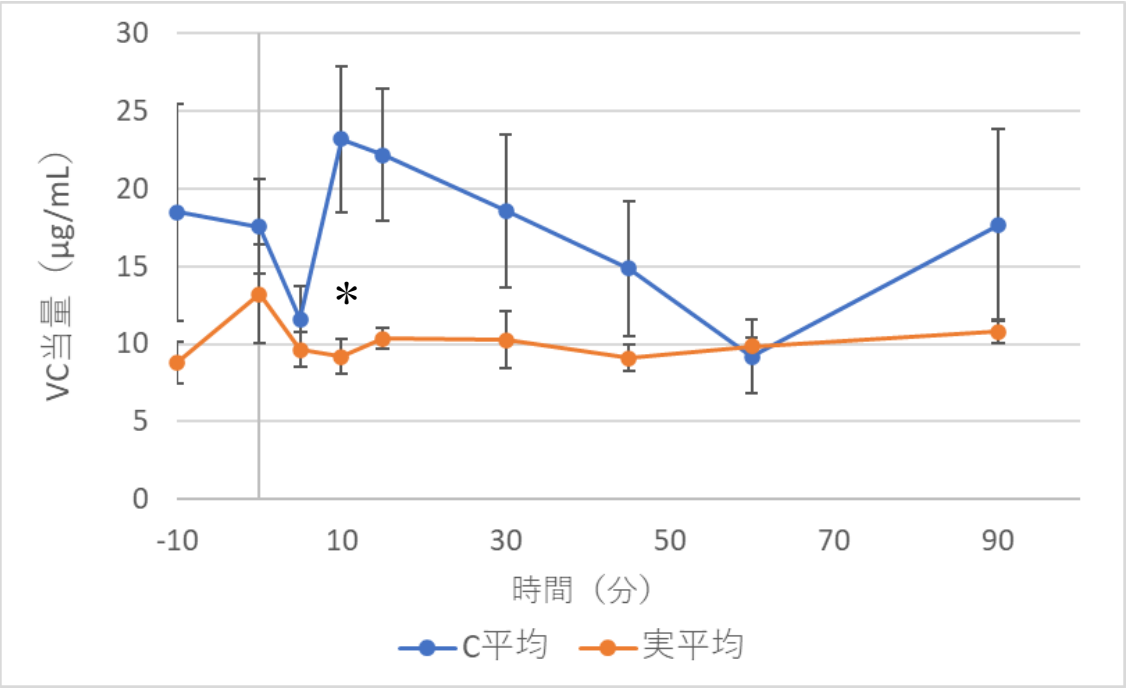


図３．血漿抗酸化活性の変動

（n=3、平均値±標準誤差）

＊：$P<0.05$　対照区と試験区の間

## ４．総括

畜産業において、飼料効率の向上による低コスト化や肉質の改善、乳量等の収量増加といった生産力の向上は収益性を上げるために重要な要素である。このような背景から、生産性を上げるために多くの飼料添加物が利用されているが、今回使用したみみっこもその１つとして利用が進められようとしている。みみっことは、ミミズ由来成分を主原料として開発された土壌改良植物活性剤であり、多量の農薬や化学肥料により汚染された土壌に散布すると、ミミズ由来の微生物が土壌中の農薬を分解するため土壌改良効果が期待できると謳われている。また、みみっこは動物用飼料としての利用も進められており、すでに観賞魚やブタにおける実証例がある。含有微生物による腸内細菌叢の改善作用や有機物分解作用により、動物の健康増進や悪臭軽減といった効果があると報告されている。しかし、反芻動物における実証例はない。そこで今回は、土壌改良植物活性剤であるみみっこを動物用飼料として幅広く利用・展開していくため、反芻動物であるヒツジに対する効果を検討することとした。反芻動物は、主に粗飼料をルーメン発酵によって生成される揮発性脂肪酸（VFA）に変換することで、体内で利用するエネルギーのほとんどを作り出しているが、その VFA 産生の刺激はインスリンなどのホルモン分泌を刺激することもわかっている。更に、反芻動物はインスリン抵抗性をもつが、このインスリン抵抗性が改善されることで細胞や組織へのグルコース取り込み能が増強され、肉や乳等の収量が増加することが期待できる。また、家畜が受ける抗酸化ストレスの軽減もまた家畜の生産性向上に寄与する。よって今回は、みみっこの給与が VFA 産生に及ぼす影響と、それに伴うホルモン分泌や動物の抗酸化力に及ぼす影響に着目した。その中で耐糖能および血漿抗酸化活性への影響を検討した。

４週間のみみっこ溶液投与後に行った耐糖能試験において、血糖値は対照区と実験区との間で有意な差は見られなかった。また VFA 産生量に関しても両区における有意な差は見られなかったことから、今回の飼養条件では VFA 産生とそれに伴うホルモン分泌に影響はなかったものと考えられた。すでに効果が認められているブタは単胃動物であり、経口投与により取り込まれた成分が比較的速やかに下部消化管に到達して腸内細菌叢を改善した結果、悪臭軽減などの効果が現われたのではないかと考えられた。一方で反芻動物であるヒツジが持つルーメン内にはさまざまな微生物群が生息しており、ブタの腸内とは大きく組成が異なっている。今回給与したみみっこ溶液の投与量では、VFA 産生に影

響を及ぼす程度ではなかったと推察された。また今回はヒツジにおける実証例がない中での実験であったため、給与するみみっこ溶液の濃度は土壌に散布する際の濃度である 1~2%という基準をもとに、その 2 倍程度に設定した。この程度の濃度では、ヒツジにおける効果は見られないことが明らかになったため、今後はこの溶液濃度をさらに高く設定してその効果を検討する必要があると考えられた。また投与方法に関しても、畜産現場での利用を考えて、より簡便な方法で行う必要があると考えられた。

引用および参考文献


（1）ima アグリサービス　みみっこ　技術資料（2018）

（2）豊田剛己（2009）ミミズと土壌病害、農業および園芸 p213~218

（3）立花陽子、堀部紗世、田和理市（2004）　ピートモス中の腐食物質の抗酸化活性について(1) Trace Nutrients Research23:104-108

（4）みみっこ F　チラシ錦鯉みみっこリーフ ol (mimicco.com)

（5）畜産ハンドブック　p225

（6）小田伸一、佐々木康之（1993）ヒツジにおけるルーメン VFA と下垂体ホルモン分泌、栄養生理研究会報　37(2) 153-170

（7）ギャノング生理学　p374~377

（8）佐々木晋一（1993）　反芻動物におけるインスリン抵抗性機序への細胞生理学的アプローチ、栄養生理研究会報 37(2) 211-234

（9）中村成夫　活性酸素と抗酸化物質の化学（2013)、日医大会誌　164-169

（10）水流添 覚、西川 武志、荒木 栄一（2006）酸化ストレスとインスリン抵抗性、糖尿病 49 巻 11 号 845-848

（11）櫃本ら (2003)　インスリン抵抗性と生体内酸化ストレスの関連、J Cardiol 119-127

（12）岡直樹　ミミズ由来土壌改良植物活性剤がヒツジのルーメン発酵に及ぼす影響　2020 年度　岩手大学農学部動物科学科　卒業研究

（13）峯尾仁、西村美樹、加藤清雄、牛島純一（1985）　ヒツジの耐糖能に及ぼす絶食の影響、酪農学園大学紀要　自然科学編　J.Coll. Darying 11:173~178

（14）大森貴舟（2008）　ミミズ・スッポン等動物系ヘルスフード素材の持久力向上・抗疲労作用、東京海洋大学大学院　海洋科学技術研究科　食機能保全科学専攻　修士学位論文
（15）Weidong P,Xianghui L,Feng G（2003）Reconfirmation of antimicrobial activity in the coelomic fluid of the earthworm Eisenia fetida andrei by colorimetric assay　J Biosci. Vol28 No.6 723-731 Indian Academy of Sciences
（16）光岡知足（1991）家畜生産における生菌剤の利用、ビフィズス　5 巻 1 号