

離乳前後の子豚における枯草菌製剤の給与効果

細野真司・高橋圭二・新垣裕子*・八木 健

The Effect of *Bacillus subtilis* Feed Additive on Before and After Weaning Pigs

Shinji HOSONO, Keiji TAKAHASHI, Yuko ARAGAKI* and Takeshi YAGI

要 約

離乳前後における子豚の疾病低減のため、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 製剤の給与効果を調査した。試験区は、市販の枯草菌製剤2種類をそれぞれ添加した2区と無添加の対照区とした。抗菌製剤を含まない飼料を用いて30頭を供試した試験1および抗菌製剤を含む市販の子豚用飼料を用いて45頭を供試した試験2を行った。

供試した子豚の糞便の腸内細菌叢の調査により、枯草菌の検出率は、いずれの試験においても枯草菌製剤を給与した区が対照区に比べ高かった。さらに枯草菌の給与は、離乳ストレス下における腸内の有益菌である乳酸菌群の多様性を保持し、糞便スコアの低下および下痢症の程度と発生率を低減させた。しかし各試験区間における子豚の増体には、差が現れなかった。これは給与期間が短いことに起因すると推察された。

各個体における、増体の良し悪しの分類と腸内細菌叢を解析する変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法のバンドパターン分類の調査により、増体が良い個体は、離乳前から離乳後にかけて徐々にバンドパターンが変化していく傾向が認められた。逆に増体が悪い個体は、極端な変化をみせるか変化に乏しいかのどちらかであることが判明し、ほとんど変化のなかった個体は下痢症を呈していた。これらのことから離乳前後の子豚に対し枯草菌製剤を給与することは、腸内細菌叢の構成を良好な状態に保ち、下痢症の発生率を低減することから離乳管理として良好な影響を与えることが示唆された。

緒 言

離乳後の子豚は、食餌の急変や母豚不在といったストレスがかかり、免疫能が低下して下痢等の疾病が発生することが多く (Smithら1963)、子豚の飼養管理の中では重要なポイントと認識されている。また、適切な離乳管理は、その後の育成期にも影響を与え (柏岡2006)、飼料効率の向上や事故率の低下から生産性向上につながる。

そのため、多くの市販の配合飼料には、疾病予防や成長促進の目的で抗菌製剤が添加されており、また抗菌製剤の入った飼料添加剤の使用も行われている。しかし、近年、畜産現場における抗菌性飼料添加物や動物用医薬品の多用による薬剤耐性菌の発生が危惧され、EUやアメリカでは家畜における疾病予防のための抗菌製剤の使用が規制され始めている。

日本では、各種抗菌製剤に対するリスク低減のため、農林水産大臣の指定によって添加可能な抗菌製剤が定められているが、認可取り消しなどにより年々減少傾向にあり、人獣共通の抗菌製剤などの使用が規制されようとしている。

抗菌性物質の使用量を低減するために微生物資源を利用する方法が知られている。宿主に良い影響を与える微生物の総称であるプロバイオティクスについては、多くの研究がなされ、腸内細菌叢のバランスが改善され、免疫能が強化され疾病発生の低減につながるということが報告されている (古賀2009a)。

プロバイオティクスの一つとして、枯草菌が知られている。枯草菌は、多様な糖類を分解することができ、腸内環境においても好気性菌でありながら非常に高い環境適応性を持つ微生物の一つとして認識されている (Ashleeら2008)。これら枯草菌が分解し生成された糖類のうちオリゴ糖は、乳酸菌が乳酸発酵に利用できると考えられており、実際に枯草菌を繁殖母豚に一定量給与したところ、有益菌とされる *Lactobacillus* 属 (乳酸桿菌) や

平成27年8月31日受付

*現 千葉県君津農業事務所

*Bifidobacterium*属 (ビフィズス菌) が増加したという報告がある (Marutaら 1995; 星野ら1977; 藤田ら1987)。

一方、分子生物学的手法を用いることにより、これまで培養が不可能であった細菌の検出が可能となり、腸内細菌叢の構造解析や生菌製剤の効果検証に広く利用されている (古賀2009b)。

本試験では、プロバイオティクスとしての枯草菌に着目し、離乳前後の子豚に給与することで、子豚の発育向上や下痢症の低減の可能性について検討した。同時に子豚の直腸便の細菌叢を調査し、離乳ストレスや生菌製剤給与の有無による影響を確認した。

材料および方法

本試験では、1種の枯草菌株 (C-3102株) を効能菌として含む市販の生菌製剤 (A) および、5種の枯草菌株 (トルパン株、台中株、ノースケープ株、チェンマイ株、バリ株) を含む市販の生菌製剤 (B) を用いた。

飼料への添加量は、それぞれ指示書のとおりとした。試験区Aの生菌製剤は飼料1gに対し枯草菌 1.0×10^6 個、試験区Bの生菌製剤は飼料1gに対し全枯草菌合計で 2.5×10^7 個とした。

1. 抗菌製剤無添加配合飼料を使用した生菌製剤の給与試験 (試験1)

一般的な市販の哺乳期子豚用人工乳 (配合飼料) には抗菌製剤が配合されており、使用した生菌製剤への影響が考えられたため、本試験では、抗菌製剤を無添加の自家配合飼料 (表1) を用いた (大成1975; 大成1976)。

市販の生菌製剤AおよびBは、添加飼料給与群を試験区Aおよび試験区Bとし、また生菌製剤無添加飼料給与群を対照区とし計3区を設けた。

表1 自家配合飼料の成分表

成分名	配合割合
水分	8.4 %
粗タンパク質	20.3 %
粗脂肪	6.3 %
粗繊維	2.3 %
粗灰分	3.3 %
可溶無窒素物	54.9 %
可消化養分総量	84.8 %
可消化エネルギー	3.7 Mcal/kg

三元交雑豚LWDの哺乳豚30頭を用い、1区あたり約10頭を配置した。離乳は、生後21日齢とし、試験飼料の給与期間は離乳前後2週間とした。子豚の発育調査のため、体重を分娩当日から4週齢まで、1週間ごとに個体別に測定した。

各区間の細菌叢を解析比較するため、試験期間中の

子豚の直腸便を、生後約14日齢および19日齢に離乳前の計2回、生後約23日齢および28日齢に離乳後の計2回、合計で4回採材し、採材後は-80℃ (VT-208E、日本フリーズ) で保存した。また、採材時の直腸便について、糞便の状態から固形便を0、泥状便を1、水様便を2と評価し、糞便スコアとして下痢症の傾向を数値化した。また後述の変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (以下、DGGE) 法 (Dcode™ system、BIO-RAD) で糞便中の腸内細菌叢の解析を行った。

2. 抗菌製剤を含有した市販の哺乳期子豚用人工乳 (配合飼料) を使用した生菌製剤の給与試験 (試験2)

一般農家での生菌製剤使用に準じて、市販の哺乳期子豚用人工乳 (配合飼料) (表2) に市販生菌製剤を添加し給与試験を行った。試験1と同一の市販生菌製剤を2種類用い、各生菌製剤添加飼料給与群を試験区A、試験区B、生菌製剤無添加飼料給与群を対照区とし、計3区を設けた。LWDの哺乳豚45頭を用い、1区あたり約15頭を配置した。

その他の調査項目や試験区、試験期間については試験1と同様に設定した。

表2 市販の配合飼料の成分表

成分名	配合割合
粗タンパク質	21 %以上
粗脂肪	5 %以上
粗繊維	2 %以下
粗灰分	7 %以下
可消化養分総量	85 %以上
含有される飼料添加物	
エンラマイシン	20 g力価/t
硫酸コリスチン	40 g力価/t
クエン酸モランテル	30 g力価/t

3. DGGE法による腸内細菌叢の調査

(1) PCR法

腸内細菌叢の調査には、凍結保存された直腸便のうち、1試験に延べ72頭 (1区6頭、計4回採材) 分を用いた。直腸便から、UltraClean® Fecal DNA Kit (MO BIO) を用いDNAを抽出した。抽出したDNAからPCR法によって細菌群および乳酸菌群の任意のDNAを増幅させた。PCR法の条件には、Hot-Start法およびTouch Down法を併用した (表3)。また、プライマーは、細菌群 (Muyzerら1995) および乳酸桿菌 (Hansら2002) に特異的なプライマーセット (表4) を用いた。なお、サーマルサイクラーは、2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いた。

(2) 生菌製剤マーカーの作成

使用した2種類の生菌製剤から生菌製剤マーカーを作成した。すなわち、標準平板培地 (ニッスイ) に、生菌製剤を塗抹し、好気条件で38℃、24時間培養 (恒

温培養器MIR-160、サンヨー) 後、さらに枯草菌様コロニーを新しい平板培地に3本画線塗抹し同条件で分離培養した。分離後、単離された枯草菌様コロニーは、標準液体培地[Bacto™ Peptone (BD) 5.0g、Bacto™ Yeast Extract (BD) 2.5g、D (+)-グルコース (WAKO) 1.0g、蒸留水 (DW) 1000ml]で増菌培養した。この方法で、2種類の生菌製剤からそれぞれ16サンプル、合計32サンプルを分離した。各サンプルは、前述PCR法によりDNAを増幅した。増幅後は、後述のDGGE法によって解析を行った。全サンプルともに1つの濃度勾配ゲル (DGG) 上で同一のバンドが現れたことから、全て同じ菌種であると判定され、各サンプルの増幅産物を、生菌製剤のマーカースとした。

表3 PCR反応工程

サイクル数	温度	時間
1cycle	94C	5min
	80C	1min *
	65C	1min
	72C	3min
19cycle	94C	1min
	64C	1min **
	72C	3min
9cycle	94C	1min
	55C	1min
	72C	3min
1cycle	94C	1min
	55C	1min
	72C	10min
	15C	∞

* ヒートブロックが80Cになったら、ExTaqHSを各サンプルごとに0.5 μl添加

**アニーリング温度は、2cycle毎に1C下がるように設定

表4 プライマーセットの塩基配列

細菌特異的ユニバーサルプライマーセット

プライマー名	配列
① GC-341F	5'- (GC clamp) CCT ACG GGA GGC AGC AG -3'
GC clamp	5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GRC CCG CCG CCC CCG CCC G -3'
② 907R	5'- CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT -3'

乳酸菌特異的プライマーセット

プライマー名	配列
③ GC-27F	5'- (GC clamp) AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3'
GC clamp	5'- CGC CCG CCG CGC CCC GCG CCC GTC CCG CCG CCC CCG CCC G -3'
④ Lab677R	5'- C ACC GCT ACA CAT GGA G -3'

※ 塩基配列の表記方法は、IUPAC表記に準じた

※ ①②は (石井ら2000) を参照し、③④は (Heiligら2002) を参照した。但し③は、①で使用したGC clampを用い作成した

(3) DGGE法

DGGE法には、Dcode™ System (BIO-RAD) を用い、ゲルの精製方法や泳動条件については、石井ら (2000) の方法に従った。

変性剤80%アクリルアミド (AA) 溶液および変性剤0%AAを調整し、図1のとおり混合し、30%AAおよび60%AAをそれぞれ作成した。

30-60%濃度勾配ゲル (DGG) を作成するため、0%AA 16mlおよび60%AA 16mlに、それぞれ10%ペルオキシ二硫酸アンモニウム (APP) (WAKO) 200 μlおよびN,N,N', N'- テトラメチルエチレンジアミン (TEMED) (Bio-Rad) 15 μlを混合し、すばやくシリンジで吸い取り、それらをDcode™ System gradient former model 475 (BIO-RAD) にセットし、変性剤の濃度勾配が30%から60%となるようにAAを20well corm (BIO-RAD) から1 cm程度下端まで、注入から3分間かけて作成した。さらに滅菌蒸留水 (DW) 1 mlを静かに重層し、ゲル化させるため、室温で3

時間放置した。

30-60%DGG上にアプライウェルを作成するため、重層したDWをろ紙で拭き取り、APP 50 μlおよびTEMED 3.75 μlを加えた0%AA 4 mlをさらに重層した。20well cormを挿入し、3時間放置した。

上述の方法に従いDGGを2枚作成した。これらをDcode™ systemに正しくセットし、泳動槽に沈めた。泳動バッファーは、1 xTAEとし、泳動条件は時間を12時間、電圧を75V、泳動槽温度を60Cとした。

泳動後は、DGGをエチジウムブロミド液で30分染色し、DWでよくすすいだ後、プリントグラフ (AE-6911FXFD, ATTO) を用い、デジタル画像の撮影を行った。

(4) デジタル画像の処理

撮影したデジタル画像は、市販の一次元ゲル解析ソフト (Phoretix 1D, totallab) によってバンド検出を行い、解析した。また、同一ゲル上のバンドパターンの類似性を調べるため、検体ごとにバンドパターンをグラフ化 (図2) し、類似性の評価を行った。

0%アクリルアミド (AA) 溶液		泳動ゲルの組成		
		30%AA	60%AA	
40%Acrylamid/Bis solution, 37.5 : 1 (2.6C)	22.5ml	0 %AA	10ml	4ml
50XTAE (Tris/Acetic Acid/EDTA) buffer	1.5ml	80%AA	6ml	12ml
DW(メスアップ)	150ml	10%APS	200 μ l	200 μ l
		TEMED	15 μ l	15 μ l
80%AA溶液		↓		
40%Acrylamid/Bis solution, 37.5 : 1 (2.6C)		アプライゲルの組成		
50XTAE (Tris/Acetic Acid/EDTA) buffer		0 %AA		
Deionized formamide		0%AA		
Urea		80%AA		
DW(メスアップ)		10%APS		
		TEMED		
		※ 泳動ゲル作成後 (3時間) に重層する		

図1 DGGの作成方法

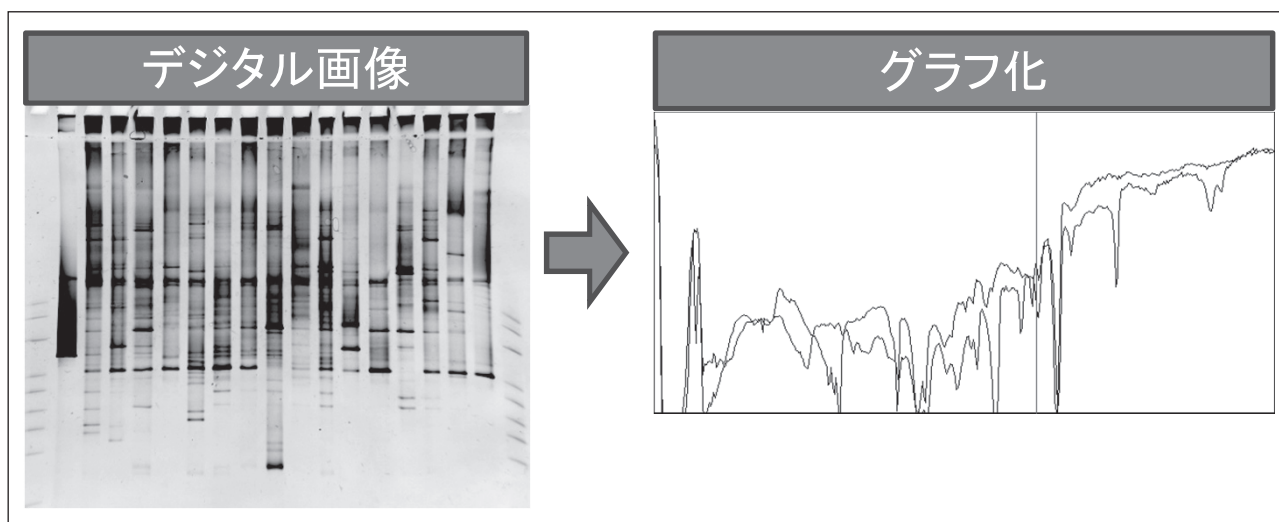


図2 デジタル画像のグラフ化

結 果

1. 直腸便における生菌製剤効能菌の検出割合

採材した直腸便サンプルをDGGE法で調査し、生菌製剤マーカースと同一の位置にバンドが現れたサンプルをカウントし、その検出率を求めた (表5)。生菌製剤と同一の位置に現れたバンドは、枯草菌由来のDNAとした。

試験1では、生菌製剤を給与した区の検出率が高い傾向にあった。このことは、試験2でも同様であった。

2. 糞便スコアの推移

各試験における糞便スコアを、表6に示した。

どの試験区も離乳後の子豚は、糞便スコアが上昇する傾向にあった。試験1において、対照区に比べ試験区Aが、また試験2では対照区に比べ試験区Aおよび試験区Bが、糞便スコアが有意に低かった。

表5 直腸便における生菌製剤由来菌の検出率

	検出数	検体数	検出率 (%)
対照区	6	24	25.0
【試験1】 試験区A	16	24	66.7
試験区B	13	24	54.2
対照区	5	24	20.8
【試験2】 試験区A	18	24	75.0
試験区B	15	24	62.5

表6 糞便スコアの推移

	2週齢	離乳前	離乳後	4週齢
対照区	0.21	0.14	0.94 ^b	0.88
【試験1】 試験区A	0.00	0.00	0.29 ^a	0.50
試験区B	0.00	0.00	0.65	0.76
対照区	0.00	0.17	1.08 ^b	0.25
【試験2】 試験区A	0.00	0.00	0.25 ^a	0.50
試験区B	0.00	0.08	0.08 ^a	0.33

※ 異符号間で有意差有り 小文字: $P < 0.05$

※ 固形便0、泥状便1、水様便2

3. 直腸便中に現れた乳酸桿菌の推移

本試験では、細菌群の他に、一部の乳酸菌群 (*Lactobacillus*属、*Eubacterium*属) に特異的なプライマーを用い、DGG上におけるバンドの数の推移を求めた(図3、図4)。試験1および試験2において、対照区は、離乳後の乳酸菌群のバンド数が、離乳前に比べ減少する傾向にあった。しかし生菌製剤を投与した区は、乳

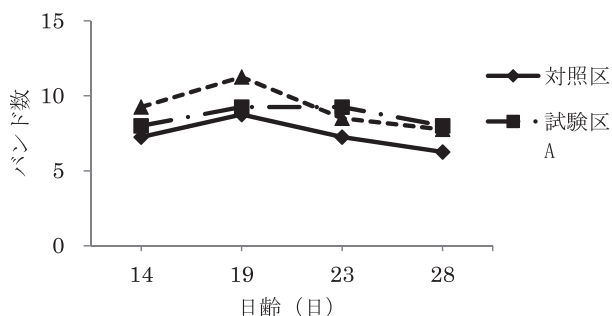


図3 試験1における直腸便中に現れた乳酸菌群のバンド数の平均

酸菌群のバンド数が離乳後に増加または変動のない区もあり、対照区に比べ、乳酸菌群の多様性の減少が抑制されているようであった。

4. 子豚の体重の推移

各試験における子豚の体重の推移を表7に示した。いずれの試験でも、対照区と投与区に差はみられなかった。

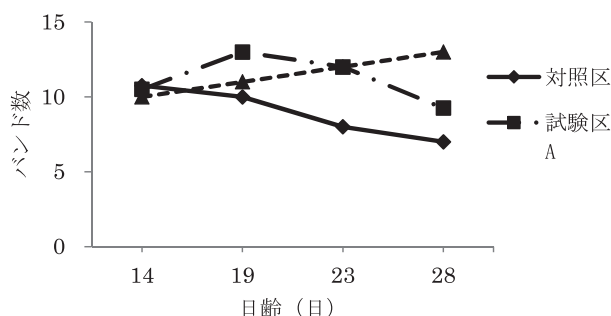


図4 試験2における直腸便中に現れた乳酸菌群のバンド数の平均

表7 哺乳期における子豚の体重の推移 (kg)

	分娩当日	7日齢	14日齢	21日齢	28日齢	
【試験1】	対照区	1.46	3.09	5.23	7.41	8.31
	試験区A	1.43	3.35	5.52	7.74	8.63
	試験区B	1.55	3.11	5.58	7.49	9.08
【試験2】	対照区	1.77	3.58	5.80	7.85	9.12
	試験区A	1.90	3.68	5.83	7.83	9.08
	試験区B	1.77	3.53	5.85	8.22	9.56

※ 各区間に有意差なし

5. 腸内細菌叢の変化と増体との関係

バンドパターンの類似性の調査により、多くの個体は、バンドパターンが採材ごとに“段階的に変化した”、“大きな変化をした”、“ほとんど変化をしなかった”の3つのパターンに分類できた。

さらに供試した子豚を各試験における全体の平均よりも高い個体は増体良し、低い個体は増体悪し、と分類した。

これら2つの分類により、表8のような関係がうかがわれた。すなわち腸内細菌叢が2週齢から4週齢にかけて徐々に変化することが、その個体の増体量に良い影響を与える可能性が高いことが示唆され、一方、腸内細菌叢が採材ごとに大きな変化をした個体や2週齢から4週齢まで変化のなかった個体は、すべて増体量が悪く、特にほとんど変化のなかった個体は、下痢症を呈していた。

表8 子豚の腸内細菌叢と体重および離乳刺激との関係

バンドパターンの変化	該当サンプル		体重増加の良し悪し			
			良し		悪し	
	数	該当/全	数	割合(%)	数	割合(%)
段階的に変化した	13	54.2%	12	92.3	1	7.7
大きく変化した	3	12.5%	0	0.0	3	100.0
ほとんど変化しなかった	1	4.2%	0	0.0	1	100.0

※ 試験区ごとの平均値よりも高い個体は増体良し、低い個体は増体悪しとした

※ いずれのパターンに該当しなかった個体が7頭いた

考 察

動物の腸内細菌叢における有害菌または有益菌は、宿主の免疫状態のみならず、過密や暑熱といったストレスによって大きな影響を受け、宿主の個体差やストレスの種類により差はあっても、有害菌は増加し、有益菌は減少する方向に変動するとされている(光岡1990a)。

本試験結果においても、離乳や食餌の変化といった環境ストレスに曝され、多くの子豚は、採材ごとに腸内細菌叢が段階的に変動していた。しかし同時にこれらの子豚は、良好な発育を示しており、この段階的な変動は、発育に影響のないレベルで起こっているものと考えられる。逆に採材ごとに大きな変動を示した個体やほとんど変動しなかった個体は、発育が悪かった。ほとんど変動しなかった個体については、下痢症を呈していたことから、採材開始時からすでに一部の有害菌が腸内で優勢を保っていたと示唆される(勝田ら2006; Kenworthyら1963)。

特にヒトや鶏において、*Lactobacillus*属(乳酸桿菌)や*Bifidobacterium*属(ビフィズス菌)の減少は、有害菌の増殖を助長するという報告があり(光岡1990a; 宮内2007; 鈴木ら1982)、また、ブタにおいては、下痢症を呈した子豚の糞便細菌叢の調査において、空腸、回腸や大腸といった各部消化管における乳酸桿菌およびビフィズス菌が減少していると報告されており(Kimura1983)、2つの菌種の減少は、日和見感染の誘引となると考えられている。本試験においても2つの菌種は、有害菌の異常増殖を抑制していると考えられる。

家畜の飼養管理技術として、腸内細菌叢を構成する乳酸桿菌およびビフィズス菌の菌数のコントロールが重要視されており、2種またはどちらか一方をプロバイオティクスとして、家畜飼料に配合することが行われている(光岡1990b)。

一方で、これら2種の菌属を増加させる目的で、枯草菌のプロバイオティクスとしての利用が考えられている。枯草菌の特徴として、高いアミラーゼ産生性が挙げられる。そのためデンプンなどの多様な糖類を分解することができ、非常に高い環境適応性を持つ微生物の一つとして認識されている(Ashleeら2008)。枯草菌により分解生成された糖類のうちオリゴ糖は、乳酸菌群が乳酸発酵に利用していると考えられており、こうした作用から、実際に枯草菌を豚にプロバイオティクスとして一定量給与したところ、乳酸桿菌やビフィズス菌が増加したと報告がされている(Marutaら1995; 星野ら1977; 藤田ら1987)

さらに枯草菌は好気性の芽胞形成菌であり、飼料中といった乾燥した環境でも長期間生存できる。また、本試験で使用した生菌製剤は、2種ともに効果を示すための飼料配合量が105個/g程度と比較的低濃度で良いとされ、これらの利点から、飼料添加剤として取り扱いやすいと

いう利点が挙げられる。

本試験結果により、離乳後の子豚は、乳酸菌群の多様性が減少することが判明した。これは、先に述べたとおり、離乳により食餌などの環境の変化が影響しているものと思われる。今回の試験では、枯草菌を給与した群では、乳酸菌群の多様性の減少が抑制され、糞便スコアも良好であった。

つまり離乳後の子豚は、ストレスなどによって乳酸菌群の多様性およびその菌数が減少、疾病が発生しやすい状態であるが、子豚に枯草菌の生菌製剤を離乳前後に給与したことで、乳酸桿菌を含む乳酸菌の多様性が保持され、下痢症を抑制したと考えられる。

一般的に、生菌製剤の効能菌が、腸内細菌叢に構成され安定するためには、給与開始から数日は必要とされており、離乳後に上述の効果をj得るためには、離乳より前から給与することが望ましい。本試験では、離乳管理向上を目的としたため、1週間前から給与開始した。給与期間に関する過去の報告によると、生後5日齢から42日齢までの37日間連続で給与させた結果、育成率、増体指数の増加および下痢症発生低減につながった(柏岡ら2006)とある。本試験では給与期間が14日間であり、3週間程度短い。そのため子豚期の増体に変化が現れなかったと考えられる。それでも離乳後の糞便スコアに差が現れ、生菌剤の投与が離乳管理として良好な影響を与えることが示唆されたことから、離乳前1週間から給与を開始し、給与期間は14日間以上続けることが望ましい。

以上のことから、離乳後における疾病低減を図るため、離乳前後の子豚に枯草菌を主剤とした生菌製剤を投与することは効果的であり、良好な離乳管理を促す可能性が示唆された。

引用文献

- Earl AM, Losick R and Kolter R, 2008, Ecology and genomics of *Bacillus subtilis*. *Trends Microbiol.* 16 (6) : 269-279
- 藤田昭二、茶菌明、小沢恭輔、藪内寛次、坂井町節、1987、下痢性プロイラー雛の発育とその腸内細菌叢の研究
- Heilig HGHJ, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans ADL and de Vos WM, 2002, Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the Human Intestine as determined by specific amplification of 16s ribosomal DNA. *App. Environ. Microbiol* 68 (1) : 144-123
- 星野保夫、小原裕光、渡辺晋、1977、土壌から分離した *Bacillus* (B.C.T-7112) の生物学的諸性状と豚の下痢および牛の第一胃代謝異常に対する改善効果、微生物の生体(4)場の管理をめぐって、微生物生体研究会編 : 224-259
- 石井浩介・中川達功・福井学、2000、微生物学生態学への

- 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法の応用、*Microbes and Environments* Vol15, No.1, : 59-73
- 柏岡静、2006、5 週齢時体重とその後の発育、養豚の友 158 : 44-48
- 柏岡静、新居雅宏、森直樹、山本澄人、2006、乾燥オカラ納豆菌の豚に対する投与効果、徳島畜研報 6 : 22-25
- 勝田賢、河本麻里子、川島健司、恒光裕、2006、子豚下痢便からの病原微生物の検出成績、豚病会報 48 : 1-6
- Kenworthy KR and Crabb WE, 1963, The intestinal flora of young pigs with reference to early weaning, *Escherichia coli* and scours. *J. Comp. Pathol* 56 : 635-647
- Kimura N, 1983, An application of dried bifidobacteria preparation to scouring animal. *Bifidobacteria Microflora* 2 : 41-55
- 古賀泰裕、2009a、医科プロバイオティクス学、第 1 版、七野俊明 : 11-20
- 古賀泰裕、2009b、医科プロバイオティクス学、第 1 版、七野俊明 : 22-31
- Maruta K, Miyazaki H, Tadano Y, Masuda S, Suzuki A, Takahashi H and Takahashi M, 1967, Effects of *Bacillus subtilis* C-3102 Intake on Fecal Flora of Sows and on Diarrhea and Mortality Rate of their Piglets. *Anim. Sci. Technol* 67 (5) : 403-409
- 光岡知足、1990a、腸内細菌学、第 1 版、朝倉邦造 : 195-203
- 光岡知足、1990b、腸内細菌学、第 1 版、朝倉邦造 : 453-458
- 宮内浩文、2007、ビフィズス菌による感染防御と免疫調整作用、*Milk Science* 55 (4) : 242-252
- Muyzer G, Teske A, Wirsén CO and Jannasch HW, 1995, Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Arch. Microbiol* 164 : 165-172
- Smith HW and Jones JET, 1963, Observations on the alimentary tract and its bacterial flora in healthy and diseased pig. *J. Pathol. Bacteriol* 89 : 95-122
- 鈴木邦夫、光岡知足、吉武豊、児玉義勝、1982、ストレスと腸内フローラ 光岡知足編 腸内フローラと生体防御、第 1 版、学会出版センター : 47-67
- 大成清、1975、子豚用飼料とその配合設計 (2)、畜産の研究 29 (10) : 1329-1334
- 大成清、1976、子豚用飼料とその配合設計、畜産の研究 30 (5) : 641-646

