

植物多糖体 C-UPⅢ を投与した子豚の成長および 単球の貪食能の活性化

内海恭太^{1)†} 中西信夫¹⁾ 山田耕司¹⁾ 吉田 哲²⁾

1) (株)京都動物検査センター (〒612-8073 京都市伏見区下板橋町585)

2) オリジナル・イメージ(株) (〒231-0004 横浜市中区元浜町3-21-2)

(2009年12月9日受付・2010年3月1日受理)

要 約

植物多糖体C-UPⅢを投与した子豚の単球におけるラテックスビーズ貪食能（貪食数および貪食率）と成長について検討した。C-UPⅢを飼料中に0.05%、0.1%、0.2%および0.4%添加して、離乳直後の子豚に3日間連続で混餌投与した。その結果、単球貪食能はC-UPⅢを投与した全群で投与開始7日および14日後で増加が認められたが、対照群では逆に試験開始前よりも減少していた。増体および飼料効率は、対照群と比較してC-UPⅢを添加した全群で高値となり、0.2%および0.4%添加群でより高値を示したことから、C-UPⅢが生体防御能が低下する離乳直後の子豚の免疫活性化に有効な手段の一つであると考えられた。——キーワード：免疫系、単球、貪食能活性、多糖体、離乳子豚。

----- 日獣会誌 63, 519～523 (2010)

近年、豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）およびサーコウイルス2型（PCV2）による離乳後多臓器発育不良症候群（PCVAD）の被害が拡大したため、ワクチンが開発されて使用されている。これらの呼吸障害には環境要因や二次感染等による複合感染が多く見受けられ、適切な薬剤の使用、衛生管理および環境改善を行うことが重要であり、これにより新規ウイルス病が発生してもその被害を比較的少なく押さえることができると考えられている [1, 2]。

また、子豚にとって離乳は最大のストレスとなり [3]、この時期にウイルス感染した豚の免疫細胞は、感染後2週間程は減少することが知られており [1]、PRRSVやPCV2の暴露を受けるとリンパ球やマクロファージ（以下Mφ）の破壊および免疫能の低下が起こり、感染後はリンパ球が減少する [1]。このような免疫能の低下は、上記と同様に他の細菌との複合感染等においても報告されており、症状はウイルス単独感染よりもより重篤となり [1]、成長不良による経済的損失はより大きくなる。そこで、免疫能が未熟な離乳直後の子豚の免疫能を活性化して抵抗力が定着するまでの間を備えれば、PCVADなどによる症状の重症化を軽減できるものと考えられる。

著者らは生体防御に大きな役割を果たしているMφ／単球に注目し、血液中の単球を分離培養してラテックスビーズの貪食能を測定する方法を確立し、牛 [4] および犬 [5] における植物多糖体C-UPⅢ投与時の単球貪食能の活性の変化を本誌で報告した。今回、C-UPⅢを子豚の離乳直後から3日間、0.05～0.4%混餌投与して、血液中の単球の貪食能を投与開始14日後まで測定するとともに、成長に関する影響も確認したので報告する。

材 料 お よ び 方 法

被検物質：植物多糖体C-UPⅢ（MACH[®]、オリジナル・イメージ(株)、神奈川）はベニバナ花（*Carthamus tinctorius* Linne）、カボチャ種子（*Cucurbita moschata* Duch.）、スイカズラ花（*Lonicera japonica* Thunb.）およびオオバコ種子（*Plantago asiatica* Linne）の4種の植物の乾燥粉末の混合物である。

使用動物および飼育環境：試験には京都府内の養豚場1戸に飼育されている三元交雑種の健康な子豚25頭（試験開始時20日齢および21日齢）を供試し、各群にできるだけ偏りのないように供試豚を割り付けた。飼料は導入時から投与開始3日まで豚人工乳餌付け用飼料（日本配合飼料(株)、神奈川）を、試験開始4日以降から14日

† 連絡責任者：内海恭太（株）京都動物検査センター）

〒612-8073 京都市伏見区下板橋町585

☎075-612-0861 FAX 075-601-3407

E-mail : k.utsumi@kyodoken.co.jp

表1 貪食数及び貪食率

試 験 群		貪 食 数 ¹⁾				貪 食 率 ²⁾			
		試験開始後日数				試験開始後日数			
		0	3	7	14	0	3	7	14
無添加対照	平 均	0.50	0.47	0.43	0.41	23.5	21.8	22.5	20.7
	標準偏差	0.05	0.07	0.04	0.08	2.8	2.3	0.9	1.9
	相対値 ³⁾	100	93.6	86.4	82.3	100	94.1	97.3	88.5
	投与前との比較				*				*
	対照群の比較								
C-UPⅢ 0.05%	平 均	0.44	N.T.	0.48	0.53	21.8	N.T.	24.2	25.3
	標準偏差	0.06		0.04	0.11	1.9		2.2	3.3
	相対値	100	N.T.	110.2	121.2	100	N.T.	112.0	116.3
	投与前との比較								*
	対照群の比較								
C-UPⅢ 0.1%	平 均	0.37	N.T.	0.47	0.59	19.9	N.T.	26.3	26.5
	標準偏差	0.08		0.08	0.14	2.0		2.8	3.6
	相対値	100	N.T.	130.7	170.0	100.0	N.T.	133.9	135.2
	投与前との比較							*	
	対照群の比較								
C-UPⅢ 0.2%	平 均	0.43	N.T.	0.51	0.69	22.6	N.T.	28.6	30.9
	標準偏差	0.08		0.05	0.18	3.0		3.2	4.6
	相対値	100	N.T.	130.7	170.0	100	N.T.	127.2	136.6
	投与前との比較				*			**	**
	対照群の比較				#			##	##
C-UPⅢ 0.4%	平 均	0.42	0.56	0.64	0.55	20.9	23.9	28.1	26.5
	標準偏差	0.06	0.09	0.22	0.10	2.5	2.0	4.1	2.1
	相対値	100	137.7	156.3	133.4	100	116.0	136.5	128.6
	投与前との比較							*	**
	対照群の比較								

1) 単球1細胞あたりの平均ラテックスビーズ貪食数 (貪食ラテックスビーズ数/細胞)

2) ラテックスビーズ1個以上貪食した単球の割合 (貪食率; %)

3) 試験開始時を100とした時の相対値 (%)

*: $P < 0.05$ **: $P < 0.01$ (投与前との有意差) #: $P < 0.05$ ##: $P < 0.01$ (対照群との有意差) N.T.: 実施せず

までは豚人工乳前期用飼料 (日本配合飼料株, 神奈川) を不断給餌した。飲水は水道水の自由摂取とした。

投与量および投与方法: 投与量は、予備的な検討でC-UPⅢを0.02%, 0.04%および0.1%の各用量で1週間連続投与した際に、単球の貪食能が最も有意に上昇したのが0.1%群であったことから (未発表), 本試験では0% (対照群), 0.05%, 0.1%, 0.2%および0.4%投与群の5群を設定した。前報の牛 [4] および犬 [5] では3日間の強制経口投与により単球の貪食能を確認した経緯から、投与期間は3日間に設定した。投与方法は養豚現場で多用されている飼料添加を選択した。投与群は豚人工乳餌付け用飼料にC-UPⅢを所定量添加して自由摂取させた。

末梢血液採取時期: 子豚の単球貪食能の測定は投与前、投与開始3日 (対照群およびC-UPⅢ0.4%投与群の2群のみ実施), 7日および14日後に頸静脈血を採血して実施した。

単球分離: 血液5mlをLeucoPREP (日本ベクトンデ

ィッキンソン株, 東京) に静かに注入して、遠心分離 (3,600rpm, 20分間) した後、マイクロペットで静かに白血球層を2ml程度回収した。回収した白血球はリン酸緩衝液 (ソレンセン法) を用いて室温で攪拌してふたたび遠心分離 (1,000rpm, 5分間) し、上清を除去し細胞数を 1.0×10^3 個/mlになるように調整した。

貪食能の測定: 上清を除去した白血球調整液にラテックスビーズ (0.81 μ m, SIGMA株, U.S.A.以下, LBと略す) が 1.0×10^5 個/mlになるように調整した培養液 (RPMI 1640培養液 No. 31800, インビトロジェン株, 東京) を1ml加え, 5%CO₂インキュベーター中で37℃, 1時間静置培養後, ふたたび遠心分離 (1,000rpm, 5分間) した。上清を除去後, フリーのLBを除くためリン酸緩衝液で1回洗浄 (1,000rpm, 5分間) し, 70%エタノールで固定した。固定した液をスライドグラス上に塗抹し, メイグリュンワルド・ギムザ染色した。判別方法は顕微鏡下 (600倍) で細胞質および核の大きさ, 細胞質の空胞の有無等で判別し, 100個の単球における貪

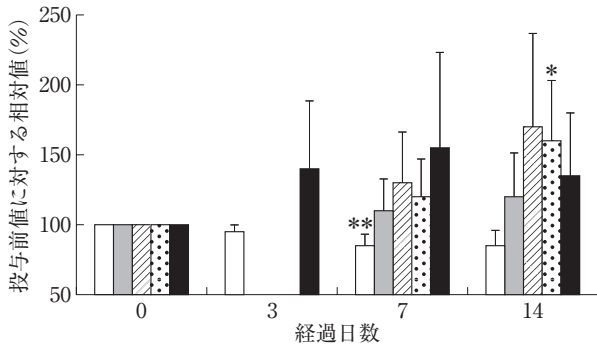


図1 単球貪食数 (3日間連続投与)
 □ 無添加対照 ■ C-UPⅢ 0.05%
 ▨ C-UPⅢ 0.1% ▩ C-UPⅢ 0.2%
 ■ C-UPⅢ 0.4%
 * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$ (投与前との有意差)

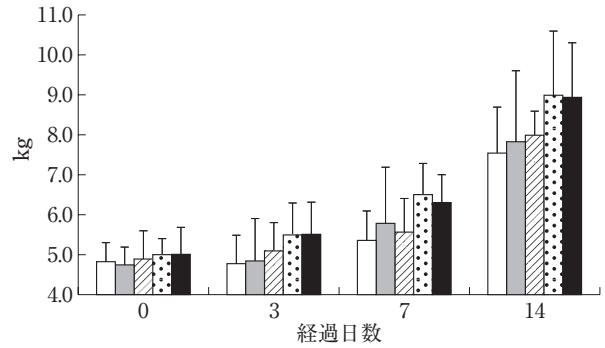


図3 体重の推移
 □ 無添加対照 ■ C-UPⅢ 0.05%
 ▨ C-UPⅢ 0.1% ▩ C-UPⅢ 0.2%
 ■ C-UPⅢ 0.4%

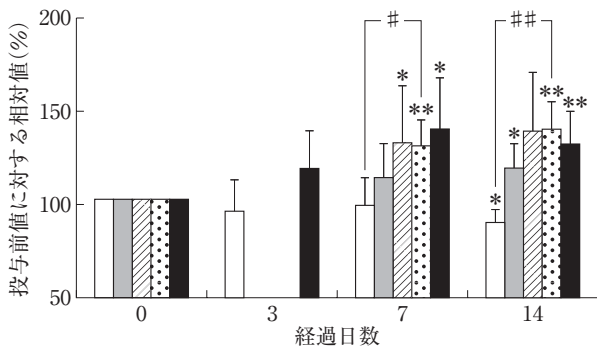


図2 単球貪食率 (3日間連続投与)
 □ 無添加対照 ■ C-UPⅢ 0.05%
 ▨ C-UPⅢ 0.1% ▩ C-UPⅢ 0.2%
 ■ C-UPⅢ 0.4%
 * : $P < 0.05$ ** : $P < 0.01$ (投与前との有意差)
 # : $P < 0.05$ ## : $P < 0.01$ (対照群との有意差)

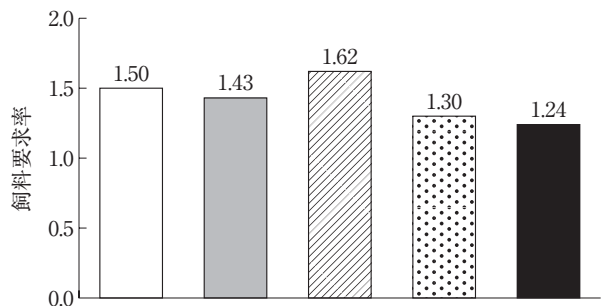


図4 14日間の飼料要求率*
 □ 無添加対照 ■ C-UPⅢ 0.05%
 ▨ C-UPⅢ 0.1% ▩ C-UPⅢ 0.2%
 ■ C-UPⅢ 0.4%
 * : 飼料要求率 = 飼料摂取量 / 増体重

食LB数を1検体あたり3回測定した。貪食数は単球1細胞あたりの平均LB貪食数(貪食LB数/細胞)、貪食率はLBを1個以上貪食した単球の割合(貪食率;%)とし、投与前の値を100としたときの相対値で示した。

体重および臨床観察: 体重測定は試験開始前、投与開始3日、7日および14日後に測定した。臨床症状は呼吸器(くしゃみ、咳、鼻汁露出など)、糞便性状(軟便あるいは下痢など)および一般状態(元気、食欲など)を観察し記録した。

統計学的解析: 単球の貪食能(貪食数および貪食率)の投与前後の比較をPaired-*t*検定により行い、群間の比較をWilcoxonの順位和検定またはノンパラメトリック型のBonferroni検定により行った。増体量についてはTurkey-Kramerの多重比較検定を行い、対照群と投与群との比較を行った。

成 績

単球貪食能測定: 子豚の単球貪食数および貪食率を表

1, 図1および図2に示した。

貪食数は、各群の投与前後の比較において、対照群は減少する傾向にあり、7日後では有意な減少が認められた($P < 0.01$)。ところが、C-UPⅢを添加した各群で高値を示したが、統計学的には各群間の比較では、試験開始3日および7日後では有意な差は見られず、試験開始14日後において投与前に比べ0.2%添加群で統計学的に有意な高値を示した($P < 0.05$)。

貪食率では、各群の添加前後の比較において、貪食数と同様に対照群は減少する傾向にあり、14日後では有意な減少が認められた($P < 0.05$)。C-UPⅢ 0.05%添加群では試験開始14日後、0.1%添加群では試験開始7日後、0.2%および0.4%添加群では試験開始7日および14日後で高値を示し、統計学的に有意な差が認められた。また、各群間の比較では、試験開始後3日では差は見られなかったものの、対照群と比較して試験開始7日および14日後において0.2%添加群では統計学的に有意な高値を示した(それぞれ $P < 0.05$ および $P < 0.01$)。

体重および飼料効率：体重の推移を図3，飼料要求率（飼料摂取量／増体量）を図4に示した．試験開始時の各群の体重は3.65～6.05kgの範囲であった．その後，各時点間における増体量では統計学的に有意な差は認められなかったものの，C-UPⅢ添加群は対照群より高値を示し，対照群における14日間の増体量が平均2.75kgであったのに対し，0.2%および0.4%添加群では両群とも平均3.96kgと約1.2kgの良好な増体が認められた．飼料要求率においても0.1%添加群では対照群より高値を示したものの，0.05%，0.2%および0.4%添加群では改善傾向が認められることから，飼料要求率の改善効果も期待できるものと推定された．

臨床症状：試験期間中，各群の動物において元気，食欲，呼吸器症状および糞便性状を含む一般症状に異常は認められなかった．

考 察

植物多糖体C-UPⅢを牛に5～50g/日連続3日間投与した場合，血液中単球の貪食能活性は，投与後3日から増加，7日後にピークとなり，14日後まで高いレベルを維持し[4]，犬では0.0083g/kg/回，1日2回，3日間連続投与した血液中単球の貪食能活性が，貪食数は3日および7日後に有意に増加し，貪食率は2日，3日および7日後に有意に高値を示したことを報告した[5]．

本試験においては豚にC-UPⅢを飼料中に0.05%，0.1%，0.2%および0.4%添加して3日間連続で給餌させ，血液中単球の貪食能への影響を検討した．対照群では，単球の貪食数および貪食率は14日目まで漸減する傾向が認められ，試験開始時との比較において貪食数は7日目（ $P < 0.01$ ），貪食率は14日目（ $P < 0.05$ ）に有意な減少がみられた．いっぽう，C-UPⅢを添加した各群ではいずれも増加傾向がみられ，C-UPⅢによる単球貪食能の活性化が他の動物と同様に起こることが確認された．試験群間の比較では対照群と比較して，0.2%添加群で試験開始7日後の貪食数，試験開始14日後の貪食数および貪食率で有意な差が認められた．試験開始時との比較をすると，各添加群は3日目および7日目では貪食能が向上していたが，14日目では最大添加量である0.4%群は0.1%群および0.2%群よりも活性が下回っており，各添加群内の標準偏差が大きいことが影響している可能性が示唆された．単球貪食活性における動物の種差を考えると，犬と牛では7日目をピークにした後，徐々に元の活性にまで戻るような変化を示したが[4, 5]，豚では貪食率は7日目と14日目ではほぼ同じ活性を維持し，貪食数はむしろ7日目より14日目の方が高い群が多く，持続性がより長いことが確認された．

Shiら[1]は，PRRSVとPCV2が混合感染した子豚においてそれぞれ単独で感染したときに比べ，抗体の上

昇が遅れたり，抗体価が低いことを報告している．また，Ushidaら[6]は子豚の糞便中分泌型イムノグロブリンA（IgA）を50日齢まで測定し，生後すぐには糞便1gあたり分泌型IgAが $10^4 \sim 10^5 \mu\text{g}$ であったのが，10日齢には $10^1 \sim 10^2 \mu\text{g}$ と急落して30日齢までそのレベルをほぼ維持し，30日齢以降はさらに減少して $10^1 \mu\text{g}$ 以下となったことを報告している．これらの報告から，PRRSVあるいはPCV2の浸潤している農場の子豚は，非浸潤農場の子豚に比べて血液中の抗体産生が抑制され，さらに，この時期は生理的な分泌型IgA産生も著しく抑制されており，局所の免疫能も低下していることが推測される．しかし，C-UPⅢを子豚に与えることにより単球の活性化が認められたことから，生体防御システムが向上していると考えられ，免疫抑制時の複合感染などによる症状の重症化を軽減する可能性が考えられる．

吉田ら[7]は，5種の植物（ヨモギ葉（*Artemisia indica* var. *maximowiczii*），ドクダミ葉（*Houttuynia cordata* Thunb.），カボチャ種子（*Cucurbita moschata* Duch.），スイカズラ花（*Lonicera japonica* Thunb.）およびオオバコ種子（*Plantago asiatica* Linne.）の5種の植物の乾燥粉末の混合物）による植物多糖体飼料添加物をPRRS浸潤農場の30日齢の子豚に90日間飼料中に0.2%投与した際の肺胞内および腹腔内のM ϕ 数と貪食活性を確認している．それによれば，植物多糖体飼料添加物投与群の肺胞M ϕ の貪食数は120日齢で有意な増加が観察されたのみであったが，貪食率は腹腔M ϕ で60日齢以降，肺胞M ϕ で90日齢以降有意な増加を示した．また，マウスにおいてC-UPⅢと同じ4種の植物の乾燥粉末を経口投与したところIFN産生がみられることも報告されている（Takashi M, Shimizu S, Tsumagari K, Kinoshita A, Yoshida S, Momotani E, et al. : Studies on efficacy of the herbal MACH on IgE, Interferon and intra-peritoneal macrophage in mice. In : Proceeding of the Fourth Advanced Traditional Chinese Veterinary Medicine Seminar; 2002 Oct 8-10, Guangzhou, China. Chi Institute, Florida, 85-102 (2002))．よって，これら植物の乾燥粉末が生体内において，INFを誘導することによりM ϕ の活性化に効果のあることが考えられる．

本試験では増体量が向上し，14日目までの増体量が対照群で2.75kgであったのに対し，0.2%および0.4%投与群では3.96kgと統計学的には有意な差はなかったものの，約1.2kg増加していた．飼料要求率は0.4%投与群が最も低く，改善傾向があると思われる結果であった．

子豚の肥育成績を上げるためには，離乳直後の増体量をより大きくすること，ならびにウイルス感染等に対する防御能を高めることは重要である．今回の結果から

C-UPⅢは離乳直後から3日間飼料添加することで、14日目までの単球の貪食能を活性化することが明らかとなった。C-UPⅢ投与による単球の貪食能の活性化メカニズムについては今後の研究課題となるが、自然免疫において重要な働きをするToll-likeレセプターの発見により、自然免疫担当細胞が特異的に病原体の侵入、多糖類や核酸などを感知し、炎症を誘導するとともに獲得免疫の活性化に役割を担っていることが分かってきている[8]。離乳直後の子豚において単球の貪食能を活性化するC-UPⅢは、離乳後の抗体産生能が著しく低下する時期に自然免疫能の向上により感染に対する抵抗性を高めるとともに、子豚の増体も促進する可能性が示唆された。

引用文献

- [1] Shi K, Li H, Guo X, Ge X, Jia H, Zheng S, Yang H : Changes in peripheral blood leukocyte subpopulation in piglets co-infected experimentally with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus type 2, *Vet Microbiol*, 129, 367-377 (2008)
- [2] 清水実嗣：豚繁殖・呼吸障害症候群，豚病学，第4版，237-244，近代出版，東京（1999）
- [3] 石川弘道：離乳豚舎の管理，すぐに役立つ現場の豚病対策，48-54，(有)ベネット，東京（2005）
- [4] 吉田 哲，中西信夫，山田耕司：植物多糖体C-UPⅢによる成牛および子牛の単球の貪食能の活性化，日獣会誌，59，315-319（2006）
- [5] 吉田 哲，中西信夫，山田耕司：植物多糖体C-UPⅢによる犬単球貪食能の活性化，日獣会誌，59，117-121（2006）
- [6] Ushida K, Kameue C, Tsukahara T, Fukuta K, Nakanishi N : Decreasing traits of fecal immunoglobulin A in neonatal and weaning piglets, *J Vet Med Sci*, 70, 849-852 (2008)
- [7] 吉田 哲，中西信夫，山田耕司：PRRS浸潤農場における植物多糖体飼料添加物S-UPによる子豚の呼吸器症状の抑制効果，日獣会誌，59，467-472（2006）
- [8] 植松 智，審良静男：自然免疫とToll-likeレセプター，日内会誌，95，1115-1121（2006）

Phagocytic Activity of Monocytes and Growth of Piglets by the Plant Polysaccharide Supplement C-UPⅢ

Kyota UTSUMI^{*†}, Nobuo NAKANISHI, Koji YAMADA and Satoshi YOSHIDA

** Kyodoken Institute, 585 Shimoitabashi-cho, Fushimi-ku, Kyoto, 612-8073, Japan*

SUMMARY

We examined the latex bead phagocytic activity (number of phagocytes or phagocytic rate) of monocytes and the growth of piglets, given the plant polysaccharide supplement C-UPⅢ. Feed mixed with 0% (control), 0.05%, 0.1%, 0.2% or 0.4% of C-UPⅢ was given on three consecutive days to recently weaned piglets. Increased phagocytic activity of monocytes was noted in all C-UPⅢ-treated groups at 7 and 14 days following the start of treatment. Meanwhile lower phagocytic activity was noted in the control groups, compared to before the treatment. The weight gain and feed conversion rate were higher in all C-UPⅢ groups than in the control piglets, especially in the 0.2% and 0.4% C-UPⅢ groups. These results suggest that C-UPⅢ is an effective way of promoting immunological activation in recently weaned piglets with lowered biophylaxis.

— Key words : immune system, monocytes, phagocytic activity, polysaccharide, recently-weaned piglets.

† Correspondence to : Kyota UTSUMI (Kyodoken Institute)

585 Shimoitabashi-cho, Fushimi-ku, Kyoto, 612-8073, Japan

TEL 075-612-0861 FAX 075-601-3407 E-mail : k.utsumi@kyodoken.co.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 63, 519 ~ 523 (2010)