

黒毛和種子牛への β カロテン経口投与が 糞便中のIgA濃度に及ぼす影響

乙丸孝之介^{1)†} 岩本悠紀¹⁾ 洪 惠英¹⁾ 永井克尚¹⁾
窪田 力¹⁾ 山内清哉²⁾ 野地智法²⁾

1) 鹿児島大学共同獣医学部 (〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-24)

2) 東北大学大学院農学研究科 (〒980-0845 仙台市青葉区荒巻字青葉468-1)

(2018年11月13日受付・2019年1月18日受理)

要 約

本研究は、黒毛和種子牛に対するベータ(β)カロテンの経口投与による糞便中の免疫グロブリン(Ig)A濃度へ及ぼす影響について検討を行った。2週齢の黒毛和種子牛22頭をランダムに2群に分け、11頭の子牛には、2週齢から4週齢まで、1日当たり20mgの β カロテンを経口投与した(投与群)。一方、11頭の子牛には β カロテンの投与は行わなかった(対照群)。すべての子牛は、2週齢及び4週齢(投与2週間後)で血液及び直腸便を採取された。投与群の血清 β カロテン濃度は、投与2週間後において対照群と比較し有意に高値であった。また、投与2週間後において投与群の糞便中IgA濃度は、対照群と比較し有意に高値であった。これらの結果から、黒毛和種子牛に対する β カロテンの投与は子牛の消化管内におけるIgA産生を増加させる可能性がうかがえた。

—キーワード: β カロテン, 糞便中のIgA, 黒毛和種子牛。

-----日獣会誌 72, 344~347 (2019)

一般的に子牛は、成牛と比較し免疫機能が未熟であり、哺乳期の子牛は消化器疾患を発症しやすい[1, 2]。そのうえ、黒毛和種子牛はホルスタイン種子牛と比較し、免疫機能が未熟なため、疾病発症のリスクは高いとされている[3]。

免疫グロブリン(Ig)Aは、主に病原微生物が消化管上皮細胞バリアを通過するのを防ぐ最初の防御の一つであり、消化管粘膜を保護する重要な調節物質であるとされている[4, 5]。ベータ(β)カロテンは、生体膜の安定性を維持し、体内の抗酸化物質として重要な役割を果たしている[6]。子牛においては、血液中の β カロテン濃度と消化器疾患の発症には関連があり、 β カロテン濃度が低いほど消化器疾患の発症リスクが高いことが報告されている[7]。一方、人においては、 β カロテンの投与により死亡率を低下させ、細胞性免疫の機能及びワクチン接種に対する抗体産生を向上させることが報告されている[8, 9]。また、マウスにおいては、 β カロテンの投与により消化管粘膜でのIgA産生を高めることが報告されている[10]。

これらのことから、子牛においても β カロテンの投与により消化管でのIgA産生を高め、消化器疾患の発症

リスクを低減することが期待される。そこで、本研究では、黒毛和種子牛に対する β カロテンの投与による消化管でのIgA産生への影響を明らかにするために、糞便中のIgA値に焦点を当て検討を行った。

本研究では、鹿児島県内の1農場で飼養されていた臨床的に健康な黒毛和種子牛22頭を用いた。すべての子牛は、出生後4日間は母子同居にて飼養された後、母子分離され代用乳にて個別ハッチにて飼養された。子牛はランダムに β カロテン投与群と対照群の2つの群に分けられた。投与群の11頭には、生後2週齢から4週齢までの2週間、Biererら[11]の報告を参考に、経口的に20mgの β カロテンを1日1回投与した。一方、対照群の11頭には、 β カロテンの投与は行わなかった。また、試験期間中の飼料給与量及び飼料養分含量を表1に示したが、可消化養分総量(TDN)、粗タンパク(CP)並びにレチノールの飼料給与量は日本飼養標準(日本飼養標準・肉用牛編, 農業・食品産業技術総合研究機構編, 57-71, 中央畜産会, 東京(2000))における要求量を満たしていた。一方、 β カロテンの飼料要求量については日本

† 連絡責任者: 乙丸孝之介(鹿児島大学共同獣医学部)

〒890-0065 鹿児島市郡元1-21-24

☎ 099-285-8750 FAX 099-285-8751

E-mail: otomaru@vet.kagoshima-u.ac.jp

表1 飼料給与量及び飼料養分含量

	2 週齢	4 週齢
給与量 (乾物)		
代用乳 ¹⁾ (g)	720	920
スターター ²⁾ (g)	50	100
乾草 (オーツヘイ) (g)	5	10
飼料養分含量 (乾物中)		
粗タンパク (%)	30.6	30.1
粗脂肪 (%)	15.7	15.2
可消化養分総量 (TDN) (%)	101.1	100.1
レチノール (mg/日)	14.5	18.3
β カロテン (μ g/日)	2.0	4.0

1) ミルダッシュ (JA 鹿児島, 鹿児島)

2) ぱくぱくモーレット (JA 鹿児島, 鹿児島)

飼養標準及び NRC 飼養標準 (Nutrient requirements of beef cattle, National Research Council, The National Academies Press, Washington DC (2000)) において定められていなかった。すべての子牛は、鹿児島大学共同獣医学部のガイドラインに従って飼養管理された。また、すべての子牛は試験期間中、臨床的に健康であり、消化器疾患を含む疾病の発症はなく、治療を要した個体はいなかった。さらに、9カ月齢でせり市に出荷されるまで、ハイエナ病を発症した個体はいなかった。

子牛は、2週齢 (投与前) 及び4週齢 (投与2週間後) に体重測定され、EDTA-2K 添加真空採血管及びプレーン真空採血管を用いて頸静脈から血液を採取した。プレーン採血管を用いて採取した血液は、遠心分離され血清分離し、分析まで -30°C で保存した。糞便は子牛の直腸内にビニールグローブを挿入して直腸便を約5g採取し、分析まで -30°C で保存した。

EDTA-2K 添加採血管を用いて採取した血液は、採血後3時間以内に白血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリットを自動血球計算装置 (セルタック α , 日本光電工業株, 東京) で測定した。血清 β カロテン、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), γ -グルタミルトランスフェラーゼ (GGT), 尿素窒素, 総タンパク (TP), アルブミン (Alb), グルコース, 総コレステロール, 遊離脂肪酸, β ヒドロキシ酪酸については生化学自動分析装置 (自動分析装置 7020, 株日立ハイテクノロジーズ, 東京) にて測定を行った。血清グロブリン値は、TP 値から Alb 値を引いて求めた。血清レチノールは、高速液体クロマトグラフィー法 (Prominence, 株島津製作所, 京都) にて測定した [12]。糞便中の IgA 濃度は、採取した直腸便 400mg に対し PBS (PBS without Ca and Mg, ナカライテスク株, 京都) を 1,000 μ l の割合で入れ、ビーズ破砕機を用いて懸濁し、15,000rpm で10分間遠心後の上清をサンプルとして測定した。carbonate bicarbonate buffer (C3041, シグマアルドリッ

チジャパン(株), 東京) で、sheep anti-bovine IgA affinity purified (Bovine IgA Antibody A10-131A, Bethyl Laboratories, U.S.A.) を 500 倍希釈し、96 ウェルプレートに 100 μ l ずつ入れ、一晚、固相化した。固相液を除去した後、wash buffer (0.05% Tween 20 in TBS) で洗浄した後、0.05% Tween-20 溶液でブロッキングし、常温で1時間静置した。wash buffer を用いて、糞便上清を段階希釈してプレートに反応させ、常温で2時間反応させた。その後、プレート上清を除去し、wash buffer で洗浄後、10,000 倍希釈した sheep anti-bovine IgA HRP conjugated (Bovine IgA Antibody A10-131P, Bethyl Laboratories, U.S.A.) を、常温で1時間反応させた。プレート上清を除去後、wash buffer で洗浄し、発色液 (TMB solution) を 100 μ l 入れ、5分間反応させた後、希硫酸を用いて反応停止させ、450nm の吸光度を測定した。検体中の IgA 濃度は、IgA 濃度が既知の標準標品の吸光度を基に算出した。

得られたすべての値は、平均 \pm 標準偏差にて示した。統計解析は統計解析ソフト (SPSS Statistics 24, 日本 IBM 株, 東京) を用いて、スチューデント t 検定にて群間の比較を行い、 $P < 0.05$ 及び $P < 0.01$ を有意な差とした。

血清 β カロテン値及び血清レチノール値の結果を図1に示した。血清 β カロテン値は、投与前において両群に有意な差はみられなかったが (図 1a), 投与2週間後において投与群では、対照群と比較し有意に高値であった ($P < 0.01$)。血清レチノール値は、投与前及び投与2週間後において両群に大きな差はなかった (図 1b)。体重、血球計算値及び生化学検査値については、両群に有意な差はみられなかった (表 2)。糞便中の IgA 値は、投与前では両群に有意な差はなかったが (図 2), 投与2週間後において投与群では対照群と比較し有意に高値であった ($P < 0.05$)。

IgA は、子牛の消化器疾患の予防に重要な働きをしており、腸粘膜において病原微生物と結合してその侵入を防ぐとされている [4, 5]。新生子牛のほとんどの IgA は初乳由来であり、新生子牛は初乳から栄養成分とともに IgA などの免疫成分を摂取し、健康状態を維持している [13-16]。しかしながら、この初乳由来の IgA は経時的に減少するとされている [14, 15]。

本研究において、対照群の糞便中の IgA 値は経時的に減少したが、この IgA 値の減少は、初乳由来の IgA の減少によるものではないかと考えられた。また、この変化は、哺乳子牛の糞便中の IgA 値の推移の報告と類似していた [17]。一方、投与2週間後の投与群の糞便中の IgA 値は、対照群と比較し有意に高値であった。マウスにおいては、 β カロテンの投与により消化管粘膜の IgA 産生細胞数の増加並びに消化管の粘膜細胞中の

子牛へのβカロテン投与が糞便中のIgA濃度に及ぼす影響

表2 体重、血液及び生化学検査値

	投与前 (2週齢)		投与2週間後 (4週齢)	
	投与群	対照群	投与群	対照群
日 齢	16.6±1.5	17.5±1.4	30.6±1.5	31.5±1.4
体 重	46.9±7.3	48.1±8.0	61.1±8.0	62.1±9.9
白血球数 (/μl)	8,055±717	8,409±424	8,873±2,246	8,464±2,138
赤血球数 (10 ⁴ /μl)	946±140	962±75	1,027±102	1,110±87
ヘモグロビン (g/dl)	10.5±1.6	11±1.0	10.8±1.4	11.7±1.3
ヘマトクリット (g/dl)	35.6±5.3	35.4±3.1	35.8±4.1	37.4±3.2
総タンパク (g/dl)	5.8±0.7	6.2±0.6	5.8±0.5	6.1±0.3
アルブミン (g/dl)	2.8±0.2	2.9±0.2	3.1±0.2	3.2±0.1
グロブリン (g/dl)	2.9±0.8	3.4±0.4	2.7±0.4	3.0±0.3
尿素窒素 (mg/dl)	11.7±2.2	12.5±2.6	10.9±2.0	11.9±1.1
AST (IU/l)	54.7±17.3	43±6.0	58.6±22.6	52.3±10.3
GGT (IU/l)	81.0±56.4	117.9±57.6	37.0±17.6	44.5±12.2
グルコース (mg/dl)	95.5±26.8	96.1±23.0	100.0±13.4	97.5±13.8
総コレステロール (mg/dl)	117±23	127±21	173±30	178±33
遊離脂肪酸 (μEq/l)	302±195	275±159	325±159	351±121
βヒドロキシ酪酸 (μmol/l)	78.7±54.1	66.1±28.9	80.6±17.8	97.5±22.9

AST: アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ, GGT: γ-グルタミルトランスフェラーゼ
平均±標準偏差

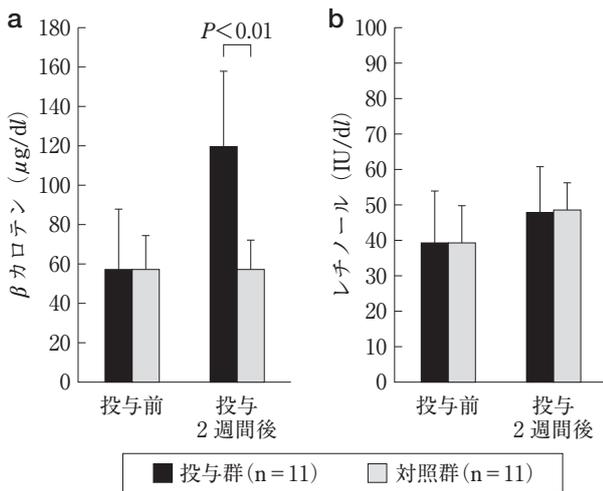


図1 血清βカロテン (a) 及び血清レチノール (b) 値

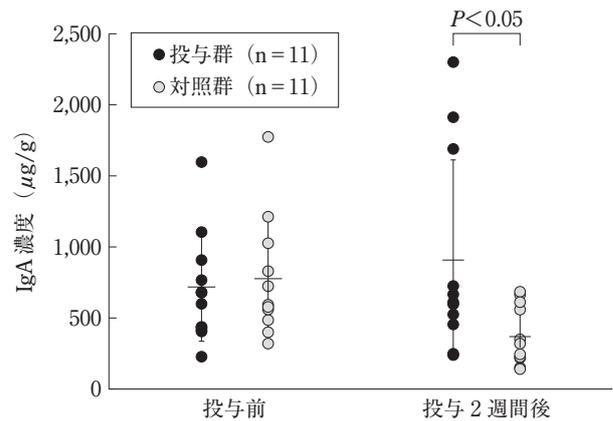


図2 糞便中のIgA値

検体中のIgA濃度は、IgA濃度が既知の標準標品の450nmの吸光度を基に算出した。

IgA産生に関連するmRNAの発現数の増加などが明らかにされている [10]. また、繁殖牛においては、βカロテンの投与により乳腺でのIgA産生が向上するとされている [18]. したがって、投与群の子牛では、βカロテンの投与により消化管粘膜におけるIgA産生が向上したのではないかと考えられた。本研究において、両群の子牛は試験期間中に治療歴はなく、さらに病原体の実験的感染も実施されなかったため、病原体感染のリスクが低い状態で実施されたと考えられた。また、本研究は、供試頭数や試験期間など限られた条件ではあったが、投与2週間後における投与群の血清βカロテン値は投与前と比較し上昇し、糞便中のIgA値は対照群と比較し高値を示した。このことから、黒毛和種子牛への経口的なβカロテンの投与は、消化管におけるIgA産生を

促進し、消化管疾患を予防する一助となる可能性が伺えた。今後、子牛へのβカロテン経口投与が、どのような機序でIgA産生を促すのか、どの程度の消化器疾患に対する予防効果を有するのかなどを詳細に検討する必要があると考えられた。

本研究は(国研)農業・食品産業技術総合研究機構生研支援センター「革新的技術開発・緊急展開事業(うち地域戦略プロジェクト)」の支援を受けて行った。

引用文献

- [1] Kampen AH, Olsen I, Tollersrud T, Storset AK, Lund A: Lymphocyte subpopulations and neutrophil function in calves during the first 6 months of life, *Vet Immunol Immunop*, 113, 53-63 (2006)
- [2] 保田昌宏, 林 英明, 鈴木一由, 小岩政照, 片本 宏,

- 猪熊 壽, 大塚浩通, 田島誉士, 堀井洋一郎, 岡田啓司 : 消化器疾患, 子牛の医学, 家畜感染症学会編, 第1版, 209-241, 緑書房, 東京 (2014)
- [3] Ohtsuka H, Ono M, Saruyama Y, Mukai M, Kohirui-maki M, Kawamura S : Comparison of the peripheral blood leukocyte population between Japanese Black and Holstein calves, *Anim Sci J*, 82, 93-98 (2011)
- [4] Fagarasan S, Honjo T : Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences, *Nat Rev Immunol*, 3, 63-72 (2003)
- [5] Lyu Y, Wu L, Wang F, Shen X, Lin D : Carotenoid supplementation and retinoic acid in immunoglobulin A regulation of the gut microbiota dysbiosis, *Exp Biol Med*, 243, 613-620 (2018)
- [6] Paiva SA, Russell RM : Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants, *J Am Coll Nutr*, 18, 426-433 (1999)
- [7] Kume S, Toharmat T : Effect of colostrum β -carotene and vitamin A on vitamin and health status of newborn calves, *Livest Prod Sci*, 68, 61-65 (2001)
- [8] Ondrejková A, Suli J, Harvanová J, Ondrejka R, Prokes M : Antioxidative protection of squalene adjuvant and rabies vaccine with adjuvant, *Biol Pharm Bull*, 40, 1029-1034 (2017)
- [9] Prabhala RH, Garewal HS, Hicks MJ, Sampliner RE, Watson RR : The effects of 13-cis-retinoic acid and beta-carotene on cellular immunity in humans, *Cancer*, 67, 1556-1560 (1991)
- [10] Nishida K, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S : Effects of supplemental β -carotene on mucosal IgA induction in the jejunum and ileum of mice after weaning, *Brit J Nutr*, 111, 247-253 (2014)
- [11] Bierer TL, Merchen NR, Nelson DR, Erdman JW : Transport of newly-absorbed beta-carotene by the pre-ruminant calf, *Ann NY Acad Sci*, 691, 226-228 (1993)
- [12] Adachi K, Katsura N, Nomura Y, Arikawa A, Hidaka M, Onimaru T : Serum vitamin A and vitamin E in Japanese black fattening cattle in Miyazaki prefecture as determined by automatic column-switching high performance liquid chromatography, *J Vet Med Sci*, 58, 461-464 (1996)
- [13] Roux ME, McWilliams M, Phillips-Quagliata JM, Weisz-Carrington P, Lamm ME, Origin of IgA-secreting plasma cells in the mammary gland, *J Exp Med*, 146, 1311-1322 (1977)
- [14] 久馬 忠, 田中彰治, 高橋政義, 米内美晴 : 子牛の唾液腺における IgA 産生能の発達, *日本畜産学会報*, 57, 568-574 (1986)
- [15] Rajala P, Castrén H : Serum immunoglobulin concentrations and health of dairy calves in two management systems from birth to 12 weeks of age, *J Dairy Sci*, 78, 2737-2744 (1995)
- [16] Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT : Immune components of bovine colostrum and milk, *J Anim Sci*, 87, 3-9 (2009)
- [17] Tsuruta T, Inoue R, Tsukahara T, Matsubara N, Hamasaki M, Ushida K : A cell preparation of *Enterococcus faecalis* strain EC-12 stimulates the luminal immunoglobulin A secretion in juvenile calves, *Anim Sci J*, 80, 206-211 (2009)
- [18] Nishijima Y, Taniguchi S, Ikeda S, Yoshitani K, Hamano T, Tani H, Fujita M, Murakami K, Kogusa K, Sato K, Sugimoto M, Kume S : Effects of β -carotene-enriched dry carrots on β -carotene status and colostrum immunoglobulin in β -carotene-deficient Japanese Black cows, *Anim Sci J*, 88, 653-658 (2017)

Effect of Beta-carotene on Fecal IgA in Japanese Black Calves

Konosuke OTOMARU^{1)†}, Yuki IWAMOTO¹⁾, Hye Young HONG¹⁾, Katsuhisa NAGAI¹⁾,
Chikara KUBOTA¹⁾, Shinya YAMAUCHI²⁾ and Tomonori NOCHI²⁾

1) *Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, 1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan*

2) *Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, 468-1 Aramaki Aza Aoba, Aoba-ku, Sendai, 980-0845, Japan*

SUMMARY

This study aims to assess the effect of beta-carotene supplementation on fecal immunoglobulin A (IgA) in calves. Twenty-two Japanese Black calves were alternately assigned to two groups: 11 calves received 20 mg/day of beta-carotene orally from 2 to 4 weeks of age (BC group), and the other 11 calves did not (control group). Blood samples were collected at 2 weeks of age and 4 weeks of age (two weeks after administration). The serum beta-carotene concentration in the BC group was significantly higher than in the control group two weeks after administration. In addition, the fecal IgA concentration in the BC group was significantly higher than in the control group two weeks after administration. These results suggest that beta-carotene supplementation might increase IgA secretion in the intestinal tract of calves.

— Key words : Beta-carotene, fecal immunoglobulin A, Japanese Black calf.

† *Correspondence to : Konosuke OTOMARU (Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) 1-21-24 Korimoto, Kagoshima, 890-0065, Japan*
TEL 099-285-8750 FAX 099-285-8751 E-mail : otomaru@vet.kagoshima-u.ac.jp

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 72, 344 ~ 347 (2019)