

採卵鶏への免疫賦活化物質の飲水給与による マクロファージ貪食能・走化性の向上試験

山本哲也（京都府南丹家畜保健衛生所）
八谷純一 西井真理 吉岡正行（京都府家畜技術センター）
芳賀 泉 八田 一（京都女子大学・家政学部）

要 約

人で免疫賦活化作用が確認されているアガリクス子実体抽出エキス（以下：AG）を採卵鶏に飲水投与し、血中マクロファージの貪食能・走化性を調査し、以下の成績を得た。

- 1 マクロファージ貪食能は、対照区10.1%に対しAG0.1%添加区（AGL区）22.0%、AG1%添加区（AGH区）21.5%、投与4週目では、対照区24.1%に対しAGL区46.8%、AGH区43.6%と有意に亢進した。
- 2 マクロファージの走化性は、対照区13.9%に対しAGL区52.9%、AGH区57.0%、投与4週目では、コントロール15.3%に対しAGL区57.3%、AGH区60.9%と有意に亢進した。

はじめに

採卵養鶏は抗生物質が添加できないため、ワクチン接種や衛生管理に重点をおいているが、近年、サルモネラ汚染による食中毒問題やワクチン接種済みの鶏群にニューカッスル病や伝染性気管支炎が発生する事例があるなど、鶏群への抗病性の向上が望まれている。

また、近年、食品に含まれる特定の成分（機能性成分）が有する3次機能（免疫賦活、成人病予防等の生体調節機能）が注目されており、3次機能を有する機能性卵の生産による付加価値向上は卵の有利販売に大きく貢献するものと考えられる。そこで、今回は、ヒトで免疫賦活作用が確認されているアガリクスを採卵鶏に投与して採卵鶏の自然免疫力を評価し、採卵鶏の産卵成績、一般卵質、血液成分への影響を調査した。

材料及び方法

- 1 試験期間
平成14年11月6日～15年1月11日までの5週間とした。
- 2 供試鶏
30週齢から35週齢のイサブラウン（平成14年4月9日生）
3羽×3区 計9羽
- 3 供試飼料

飼料はC P 17%以上、ME 2,800kcal/kg以上の市販配合を用いた。

4 供試鶏舎

モニター式開放鶏舎とし、ヒナ2段24cmケージ下段に単飼とした。

5 飼養管理

飼料は朝1回1日量を給与し、夕方は餌ならしのみとした。飼料給与は不断給餌とし、翌朝の残量により給与量を増減した。給水は、飲水量を測定するため、ポリプロピレン製500mlメスシリンダーの底部に穴を開け、ステンレス製ニップルドリンカーを取り付けた自作の飲水器で行った。ワクチネーションは初生時にMD、FP、4及び21日齢時にNB生、58日齢時にFP生、90日齢時にNB・MG不活化オイルワクチンを接種した。

6 供試した免疫賦活成分

試験にはA社製のアガリクス子実体抽出エキス(以下AG)を供試した。

アガリクスは、 β 1.3/1.6-D-グルカン、その他の多糖類、核酸成分を含有し、ヒトで免疫賦活作用や抗ガン作用が報告されている。

7 試験区分

対照区	: 水を自由飲水
AG低用量区 (以下: AGL区)	: AG 0.1%水溶液を自由飲水
AG高用量区 (以下: AGH区)	: " 1% "

8 調査項目

(1) 免疫賦活作用

マクロファージは、免疫機能の初期応答に深く関与しており、マクロファージ食能、マクロファージ走化性を高めることは、疾病の対策に重要な要因であると考えられている。そこで、免疫賦活作用の評価方法は、鶏血漿中マクロファージの食能、走化性とした。

ア 白血球分画の分離・回収

- ① 鶏の全血10ml採取し、ヘパリン加採血管に注入し、室温(15~30°C)で保存。
- ② モノ・ポリ分離液(Ficoll-Hypaque混合液、比重:1.114±0.006g/ml)30mlを遠心管に入れ、①を重層する。
- ③ 遠心分離(400×g、20min、15~30°C)
- ④ パスツールピペットでプラズマ層を除去
- ⑤ リンパ球・単球層と好中球層をそれぞれ遠心管へ入れる。
- ⑥ ⑤に洗浄するためのDMEM(+)培地を加え、ボルテックスで攪拌し遠心管壁に付着した細胞をはがす。
- ⑦ 遠心分離(400×g、20min、15~30°C)
- ⑧ 上清を除去し、タッピング後、DMEM(+)培地1mlに再浮遊(約 10^6 cell/ml)の単球回収
- ⑨ 細胞の食能活性をラテックスビーズ法で、走化性をケモタキシスチャンバー法で測定するために用いる。

イ ケモタキシスチャンバー法(鶏血漿中マクロファージ走化性の評価)

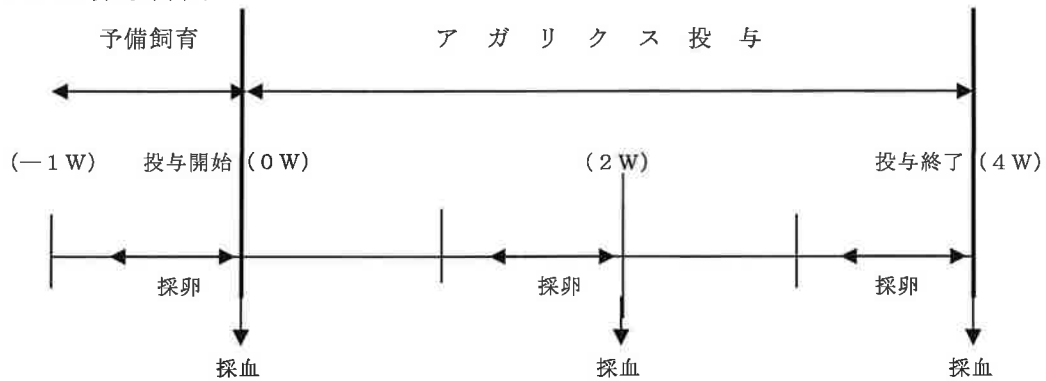
- ①大腸菌のC11株を培養し、5%ホルマリンを添加
- ②①を遠心後、死菌重量10mg/mlでDMEM(+)を加える。この死菌を走化性因子とし、24wellプレートに500 μ lずつ入れる。
- ③②のプレートにケモタキセルを置く。
- ④ 5×10^5 cell/mlで培養した細胞をケモタキセルに200 μ lずつアプライ (1×10^5 cell)
- ⑤5%CO₂、37°Cで、一晚インキュベート
- ⑥PBS(-)で3回洗浄、浮遊細胞を除去
- ⑦ギムザ染色液を300 μ lアプライ15分放置。
- ⑧H₂Oで染色液を洗浄。
- ⑨乾燥後、メンブランカッターで膜をはずす。
- ⑩スライドガラス上に封入剤をガラス棒で1~2滴置く。
- ⑪外した膜をピンセットで置いて気泡が入らないようにカバーガラスを置く。
- ⑫顕微鏡でランダムに4視野検鏡。
- ⑬1視野中の5 μ 孔の全数をカウントし、その内膜を通過した細胞数を再カウント。
- ⑭100孔中通過細胞率を計算し、走化性を評価。

ウ ラテックスビーズ法 (鶏血漿中マクロファージ食食能)

- ①DMEM(+)で100倍希釈し、細胞数カウント (4視野検鏡して $\times 10^4$ で細胞数を調べる)
- ② 5×10^6 cell/mlに調整
- ③8チャンバースライドに200 μ l (1×10^6 cell/ml) でアプライ
- ④8チャンバーの各ウェルで培養 (一晚) した細胞を、DMEM(+)で3回洗浄。浮遊細胞を除去し、付着細胞を実験に用いる。
- ⑤風乾
- ⑥冷メタノールで固定 (1時間)
- ⑦ギムザ染色して検鏡、ランダムに4視野の細胞をカウントし、その内3個以上ビーズを食食している細胞数を百分率で算出。食食率とする。

- | | |
|------------------|---|
| (2) 体重 | 2週毎に測定 |
| (3) 飼料消費量 | 15羽の群管理とし、毎日15羽分の1日量を給与し、1日1羽当りの消費量を算出した。 |
| (4) 飲水量 | 毎日計量 |
| (5) 産卵率 | 期間の産卵個数から産卵率を算出 |
| (6) 一般血液検査 (公定法) | 総タンパク質、中性脂肪、総コレステロール、HDL-コレステロール、GOT、GPT、 γ -GTP |
| (7) 一般卵質検査 | 卵重、卵形係数、卵殻破壊強度、ハウユニット、卵黄係数、卵黄色、肉斑・血斑混入率 |

9 サンプル採取計画



予備飼育期間1週間は慣らし期間(-1Wから0W)とし、AGL区、AGH区には投与開始時(0W)から投与終了時(4W)間での4週間AGをそれぞれ給与した。

卵は、無投与の投与開始時(0W)、投与中(2W)、投与終了時(4W)の3日前から採卵を開始し採取できたものを供試した。

血液は、無投与の投与開始時(0W)、投与中(2W)、投与終了時(4W)に翼下静脈から15ml採取し全血10mlで免疫賦活作用の評価をし、残り5mlの血清で一般血液検査を行った。

10 統計処理

TURKEYの方法で行った。

結果及び考察

1 マクロファージ食食能

表1、図1にマクロファージ食食能を示した。

マクロファージ食食能は投与2週目で効果が現れ、対照区10.1%に対しAGL区22.0%、AGH区21.5% ($P < 0.05$)、投与4週目では、対照区24.1%に対しAGL区46.8%、AGH区43.6% ($P < 0.01$)といずれの区も対照区に対し有意に亢進した。

表 1 マクロファージ食食能 (%)

区	投与前	投与2週目	投与4週目
対照区	10.9 ± 4.7	10.1 ± 2.9 ^a	24.1 ± 8.0 ^c
AGL区	7.3 ± 1.4	22.0 ± 5.0 ^b	46.8 ± 11.5 ^d
AGH区	12.1 ± 2.9	21.5 ± 5.8 ^b	43.6 ± 7.7 ^d

*a-b, c-d 間に有意差あり。a-b 間 ($P < 0.05$)、c-d 間 ($P < 0.01$)

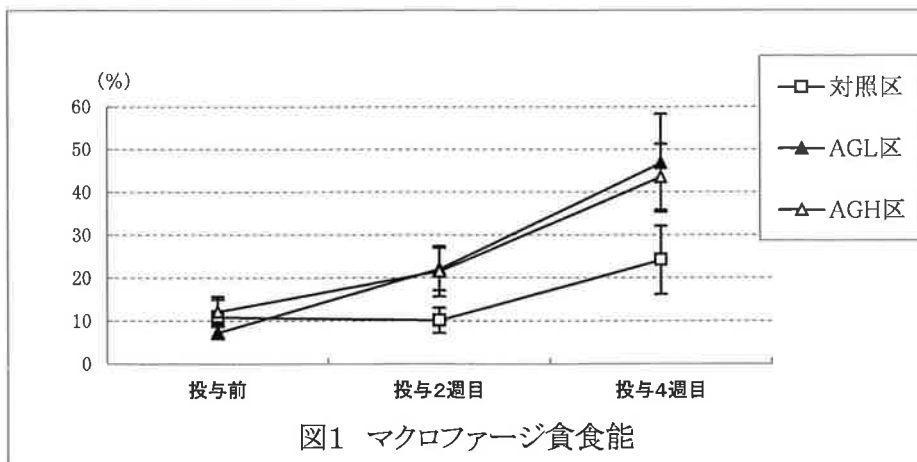


図1 マクロファージ食食能

2 マクロファージ走化性

表2、図2にマクロファージ走化性を示した。

マクロファージの走化性についても、投与2週目で効果が現れ、対照区13.9%に対しAGL区52.9%、AGH区57.0% (P<0.05)、投与4週目では、対照区15.3%に対しAGL区57.3%、AGH区60.9% (P<0.01) といずれの区も対照区に対し有意に亢進した。

表2 マクロファージ走化性 (%)

区	投与前	投与2週目	投与4週目
対照区	10.3 ± 0.9	13.9 ± 8.9 ^a	15.3 ± 5.1 ^c
AGL区	23.6 ± 6.3	52.9 ± 6.4 ^b	57.3 ± 5.6 ^d
AGH区	13.5 ± 5.8	57.0 ± 8.5 ^b	60.9 ± 6.8 ^d

*a-b, c-d 間に有意差あり。a-b 間 (P<0.05)、c-d 間 (P<0.01)

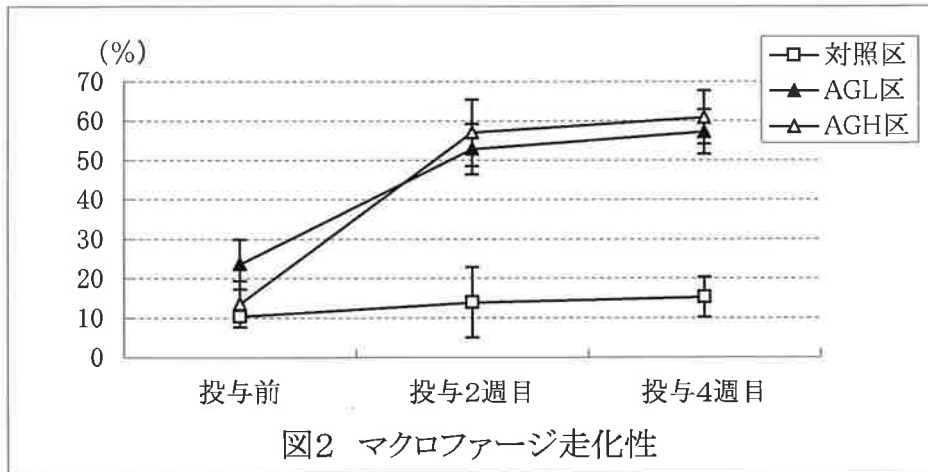


図2 マクロファージ走化性

3 体重

表3に体重を示した。

体重は、AGH区がやや軽めであったが、1,863 g から 2,060 g とこの時期の体重としては一般的であり、投与前及び対照区との比較で大きな変化はなかった。

表3 体重 (g)

区	投与前	投与開始時	投与2週目	投与4週目
対照区	1,960 ± 57	2,003 ± 58	2,010 ± 36	2,047 ± 41
AGL区	2,007 ± 172	2,027 ± 200	2,060 ± 205	2,017 ± 255
AGH区	1,863 ± 73	1,882 ± 79	1,900 ± 59	1,883 ± 61

4 飼料消費量

表4に飼料消費量を示した。

飼料消費量は、9羽一群管理で区別の給与量は確認できていないが、1日1羽あたりの消費量は、117.5 g から 124.7 g の範囲で、この時期の飼料摂取量としては、やや多い程度であった。

表4 飼料消費量 (g/日・羽)

期間	-1W~0W	0W~2W	2W~4W
平均	117.5	121.5	124.7

5 飲水量

表5に飲水量を示した。

飲水量は、給水機になれるまでの無投与期間中の飲水量に違いがでたが、投与開始後は167.4gから186.2gの間で安定しAG給与による影響はないものと考えられた。

表5 飲水量 (g)

区	-1W~0W(AG摂取量)	0W~2W(AG摂取量)	2W~4W(AG摂取量)
対照区	176.2 ± 24.7(0.00)	179.8 ± 17.9(0.00)	186.2 ± 20.3(0.00)
AGL区	149.9 ± 31.2(0.00)	175.5 ± 26.0(0.17)	172.0 ± 29.5(0.17)
AGH区	151.2 ± 32.7(0.00)	171.7 ± 30.1(1.72)	167.4 ± 35.4(1.67)

6 産卵率

表6に産卵率を示した。

産卵率は、投与開始後いずれも92.9%以上と良好であった。

表6 産卵率 (%)

区	投与前	投与2週目	投与4週目
対照区	90.5 ± 13.5	100.0 ± 0.0	100.0 ± 0.0
AGL区	85.7 ± 11.7	97.6 ± 3.4	95.2 ± 6.7
AGH区	100.0 ± 0.0	97.6 ± 3.4	92.9 ± 5.8

7 一般卵質検査

表7に一般卵質検査成績を示した。

総ての項目について、投与前から低下や向上はみられず、AG給与による影響はないものと考えられた。

表7 一般卵質検査成績

調査項目	区	投与前	投与2週目	投与4週目
卵重 (g)	対照区	64.5 ± 4.1	64.5 ± 5.0	64.1 ± 4.3
	AGL区	60.0 ± 4.1	63.2 ± 3.0	64.2 ± 3.7
	AGH区	61.4 ± 3.0	61.2 ± 2.2	61.6 ± 3.0
卵形係数	対照区	1.29 ± 0.04	1.28 ± 0.02	1.29 ± 0.04
	AGL区	1.33 ± 0.04	1.32 ± 0.05	1.33 ± 0.03
	AGH区	1.29 ± 0.05	1.30 ± 0.05	1.29 ± 0.05
卵殻破壊強度 (kg/cm ²)	対照区	4.7 ± 0.4	4.3 ± 0.5	4.5 ± 0.3
	AGL区	4.9 ± 0.5	4.5 ± 0.8	4.3 ± 0.6
	AGH区	4.8 ± 0.6	4.2 ± 0.4	4.5 ± 0.7

HU	対照区	93.3 ± 3.8	90.5 ± 3.9	87.0 ± 4.4
	AGL区	85.0 ± 8.4	89.8 ± 7.9	85.2 ± 8.4
	AGH区	88.1 ± 8.0	88.4 ± 4.8	85.1 ± 7.4
卵黄係数	対照区	0.53 ± 0.03	0.56 ± 0.02	0.51 ± 0.02
	AGL区	0.53 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.51 ± 0.02
	AGH区	0.54 ± 0.04	0.57 ± 0.03	0.52 ± 0.04
卵黄色	対照区	10.6 ± 0.5	10.4 ± 0.2	10.4 ± 0.2
	AGL区	10.3 ± 0.7	9.9 ± 0.5	10.1 ± 0.3
	AGH区	10.1 ± 0.4	10.1 ± 0.4	10.1 ± 0.2
肉斑 (%)	対照区	75.0 ± 43.3	75.0 ± 43.3	66.7 ± 47.1
	AGL区	44.4 ± 49.7	55.6 ± 49.7	42.9 ± 49.5
	AGH区	100.0 ± 0.0	77.8 ± 41.6	75.0 ± 43.3
血斑 (%)	対照区	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	AGL区	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
	AGH区	0.0 ± 0.0	11.1 ± 31.4	0.0 ± 0.0

8 一般血液検査成績

表 8 に一般血液検査成績を示した。

一般血液検査成績からは、投与前、対照区との比較から各区とも軟部組織、肝臓、胆嚢機能への障害はなく、AG 給与による影響はないものと考えられた。

表 8 血液検査成績

調査項目	区	投与前	投与 2 週目	投与 4 週目
総蛋白質 (%)	対照区	5.50 ± 0.22	5.57 ± 0.19	5.30 ± 0.16
	AGL区	6.27 ± 1.09	5.17 ± 0.25	5.00 ± 0.59
	AGH区	5.80 ± 0.51	5.40 ± 0.29	5.17 ± 0.83
中性脂肪 (mg/dl)	対照区	1,930 ± 332	1,863 ± 418	1,919 ± 223
	AGL区	1,869 ± 464	1,211 ± 353	1,212 ± 614
	AGH区	1,896 ± 684	1,902 ± 765	2,168 ± 1412
総コレステロール (mg/dl)	対照区	132.3 ± 18.6	139.3 ± 17.6	131.7 ± 6.8
	AGL区	133.0 ± 12.0	100.3 ± 16.5	96.7 ± 18.0
	AGH区	159.0 ± 19.8	132.7 ± 32.8	145.0 ± 70.5
HDLコレステロール (mg/dl)	対照区	40.7 ± 2.4	46.7 ± 4.6	42.3 ± 1.7
	AGL区	50.0 ± 4.1	40.0 ± 10.2	39.0 ± 6.2
	AGH区	50.3 ± 3.9	43.7 ± 8.7	42.3 ± 9.0
GOT (IU/l)	対照区	184.0 ± 14.5	196.0 ± 22.2	174.7 ± 17.2
	AGL区	204.0 ± 53.6	182.0 ± 19.8	166.3 ± 14.4
	AGH区	168.3 ± 2.9	181.7 ± 2.9	157.0 ± 7.3
GPT (IU/l)	対照区	6.3 ± 1.2	5.3 ± 0.5	5.0 ± 2.4
	AGL区	9.0 ± 3.3	3.3 ± 0.5	5.3 ± 2.1
	AGH区	7.0 ± 1.6	6.7 ± 2.1	5.3 ± 2.9
γ-GTP (IU/l)	対照区	22.0 ± 2.2	22.3 ± 0.5	21.3 ± 0.5
	AGL区	14.7 ± 4.6	17.7 ± 2.1	17.3 ± 3.1
	AGH区	23.3 ± 7.1	27.7 ± 7.1	24.3 ± 16.6

以上から、AG の飲水給与は、一般的な採卵鶏の飼育成績、産卵成績、一般血液検査成績に影響を及ぼすことなく、マクロファージ食能、マクロファージ走化性を亢進す

ることが確認できた。

抗生物質が使用できない採卵鶏経営において、AG 給与による免疫力増強は疾病発生時の生産性低下を回避できる可能性が考えられる。また、飲水給与であるため、飼養形態が異なる鶏舎への応用も容易と考えられる。しかし、攻撃試験による抗病性の評価や生産される卵の機能性獲得の確認は今後の課題である。

参考（引用）文献

- 1 山本ら 2002. 採卵鶏の高能力管理技術—適品種（銘柄）選定（33回）—。京都畜研成績。42：77-97
- 2 小山ら 1982. Hydrotisone によるマウス腹腔マクロファージの Zymosan 付着および食食の抑制。薬学雑誌。Vol. 102：698-700
- 3 森浦ら 1990. 生薬・マムシの薬理活性研究（第2報）マウス網内系の食食能に及ぼす50%エタノールエキスの影響。薬学雑誌。Vol. 110：341-348
- 4 雨谷ら 1987. 漢方方剤の科学的解析（6）—小柴胡湯、大柴胡湯の免疫応答に及ぼす影響—。漢方医学。Vol. 11、No9：14-18
- 5 新・生物化学実験のてびき 1 生物試料の調整法：化学同人