

平成 22 年 2 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18380161

研究課題名 (和文) 哺乳子牛のサイトカイン産生能に対するラクトフェリンの調節作用と臨床応用

研究課題名 (英文) Effect of lactoferrin feeding on plasma cytokines and metabolites concentration in preruminant calves

研究代表者

櫛引 史郎 (KUSHIBIKI SHIRO)

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 栄養素代謝研究チーム
上席研究員

研究者番号：30355218

研究成果の概要 (和文)：

本研究は、ウシラクトフェリン (LF) を哺乳子牛に給与して、エンドトキシンであるリポポリサッカライド (LPS) 投与後の炎症反応における代謝および内分泌機能の変化に及ぼす LF の影響について検討することを目的とした。ホルスタイン種雄子牛 30 頭を LF 0g/日 (対照区)、1g または 3g/日区に等分割配置した。LF は朝と夕方の哺乳用の牛乳に混和して、生後 4 日目から 10 日間給与した。哺乳はホルスタイン種全乳を体重の 10% (9:00、4% ; 16:00、6%) 給与した。10 日間の LF 給与が終了した翌日の 9 時に、大腸菌由来 LPS (50 ng/kg) を頸静脈より投与した。血液は LF 給与前 (-10 d)、LPS 投与前 (0 h)、投与後 2、6、12、24、48、72、および 96 時間目に頸静脈より採取した。血漿中の腫瘍壊死因子 (TNF) およびハプトグロビン濃度はサンドウィッチ ELISA 法で、鉄およびアスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST) 濃度は酵素法で、インスリン用成長因子 (IGF) -1、インスリンおよび副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 濃度は RIA 法で測定した。LPS 投与により血漿中 TNF、ハプトグロビン、AST、インスリン、および ACTH 濃度は増加したが、LF 給与区は対照区に比べて低い反応性を示した。鉄および IGF-1 濃度は、対照区で LPS 投与後に低下する傾向が見られたが、LF 給与区における低下は対照区に比べて小さかった。これらの結果は、LF は哺乳子牛において抗炎症反応を示し、TNF などの炎症性サイトカインの発現を制御して代謝および内分泌反応に影響を及ぼすものと考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

One of the biological functions of bovine lactoferrin (LF) is modulation of the host defense system, including cytokine production and immune response. The aim of this study was to investigate the effect of oral administration of LF in calves on lipopolysaccharide (LPS)-induced metabolic and hormonal changes in inflammatory response. Thirty Holstein calves at 4 day of age were given one of 3 oral doses of LF (0, 1, 3 g/day) for 10 days (-10 day - -1 d). They were intravenously injected LPS (50 ng/kg BW) the day (day 0) after the end of LF treatment. Plasma samples were obtained on -10, 0 day (immediately before LPS injection), and at 2, 6, 12, 24, 48, 72, and 96 h after LPS injection. Plasma tumor necrosis factor- α concentrations at 2 h after LPS treatment were lower ($P < 0.05$) in LF 1g/day-fed calves compared with LF 0g/day (control) calves. On day 0, there were no significant group differences in plasma LF concentration. Plasma concentration of haptoglobin in control calves was elevated by LPS injection. In LF groups, plasma haptoglobin concentrations slightly increased after LPS injection, but those levels at 6 - 24 h were lower ($P < 0.05$) than in the control group. The LF treatment inhibited ($P < 0.05$) the reduction of plasma ferritin concentration in calves following LPS challenge. The concentration of plasma aspartate amino transferase in calves treated with LF was lower ($P < 0.05$) than in control calves at 24 - 96 h after LPS treatment. The concentration of plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in all groups was decreased by LPS

treatment while, in LF groups, the IGF-1 level was higher ($P < 0.05$) than in the control group. Plasma adrenocorticotrophic hormone and insulin concentrations in LF groups were lower ($P < 0.05$) than in control calves at 2 h after LPS injection. These data suggest that LF has a substantial anti-inflammatory effect on the modulation of the host defense system in preruminant calves.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2007年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 畜産学・草地学

キーワード：哺乳子牛・ラクトフェリン・サイトカイン・抗炎症作用

1. 研究開始当初の背景

新生子牛は、離乳後に、栄養生理機能は反芻胃機能の発達に伴い、微生物発酵による低級脂肪酸や微生物タンパク質の利用能が増大し、免疫機能は母乳による受動免疫から能動免疫へと大きく変化する。この時期は、栄養摂取過程が変化し生体の疾病に対する抵抗性も低下することから、下痢や肺炎等の感染症が発生しやすく、子牛の発育遅延や損耗率の増加を招く。特に近年は、子牛を取り巻く環境において病原菌の多様化及び耐性菌の出現が認められることから、薬剤による疾病予防及び治療法のみならず、生体機能を向上させる技術が必要である。最近では、ラクトフェリン (LF) がサイトカインの発現を介して抗炎症作用を示すことが実験動物を用いて *in vivo* や *in vitro* で確認されている。

2. 研究の目的

本研究では新生子牛に LF を給与し、エンドトキシン感作による炎症性サイトカインの発現及び急性相反応を最小限に抑え、かつ代謝内分泌機能の変調を防ぐことで、生体機能を調節する 3 つの要因である免疫、栄養、内分泌に対する LF の抗炎症作用を総合的に解析することである。具体的には、エンドトキシン感作時の、1) 急性相反応におけるハプトグロビン及びサイトカインの発現、ミネラル及びリポタンパク質代謝の変動、2) インスリン及び成長ホルモン (GH) 分泌能と IGF-1 の動態に対する LF の効果を明らかにする。

3. 研究の方法

ホルスタイン種雄子牛 30 頭を LF 1g/day 区、LF 3g/day 区、および LF 0g/day 区 (対照区) の 3 区に 10 頭ずつ分割配置して、LF の給与試験を行った。子牛へは出生後 3 日間は初乳を給与し、翌日からの 10 日間にホルスタイン種の生乳を 1 日当たり 10% (9:00、4%; 16:00、6%) 量を給与した。LF は朝と夕方方の哺乳用生乳に混和した。10 日間の LF 給与終了の翌日 9 時に、大腸菌由来のエンドトキシンである LPS (50ng/kg) を頸静脈より注入した。LPS 注入前及び注入後 72 時間まで経時的に採血し、血漿中の急性期蛋白であるハプトグロビンとミネラル成分である鉄、炎症性サイトカインである TNF とインターロイキン (IL) -1、脂質成分である中性脂肪、遊離脂肪酸、およびリポタンパク質、ホルモンである GH、IGF-1、インスリン、および ACTH を測定した。なお、子牛の頸静脈にはカニューレを装着し、LPS の注入および採血に用いた。分析項目の定量は、ハプトグロビンと炎症性サイトカイン濃度はサンドウィッチ ELISA 法で、ホルモン濃度は RIA 法で行い、脂質成分と鉄濃度は日立 7070 自動分析装置を用いた。また、リポタンパク質は超遠心法により血漿を超低密度 (VLDL)、低密度 (LDL)、および高密度リポタンパク質 (HDL) の 3 画分に分離し、各画分における脂質成分を測定した。臨床的な炎症反応を確認するために、直腸温度を測定した。

4. 研究成果

子牛の直腸温度は、LPS 投与後から上昇し

たが、LF 給与区では対照区に比べて緩慢な変化であった。

血漿中 TNF 濃度の変化を図 1 に示した。

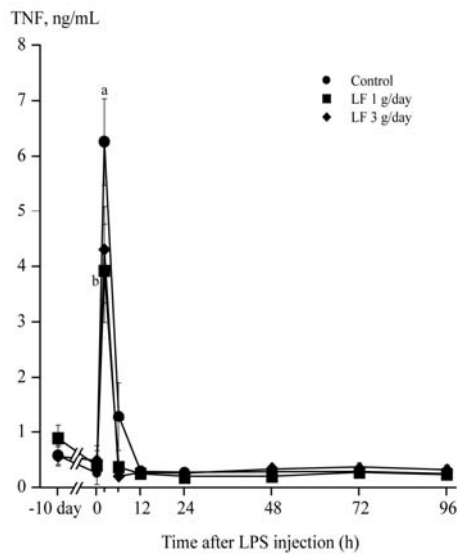


図 1. 血漿中TNF濃度の推移
異文字間 (a, b) で有意差あり、 $p < 0.05$

LPS 投与直後に一過性のピークが認められた。特に、対照区のレベルは LF 給与区に比べて高くなった。LF 給与区における血漿中 TNF 濃度上昇の抑制効果が認められた。

炎症性サイトカインに産生が刺激される急性期蛋白質としてハプトグロビン濃度の推移を図 2 に示した。

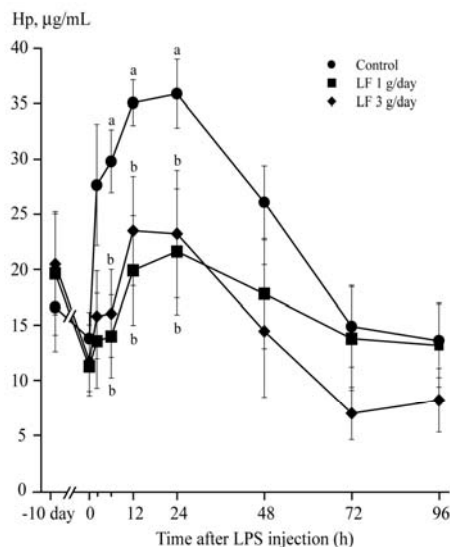


図 2. 血漿中ハプトグロビン濃度の推移

血漿中ハプトグロビン濃度は、LF 給与区で LPS による増加が抑えられた。LPS 投与後 6~24 時間後にかけては有意差が認められた。

血漿中インスリン (図 3) および ACTH 濃度も、TNF と同様に LPS 投与 2 時間後に一過性

のピークが認められた。そして、LF 給与区におけるレベルは対照区に比べて有意に低くなった。

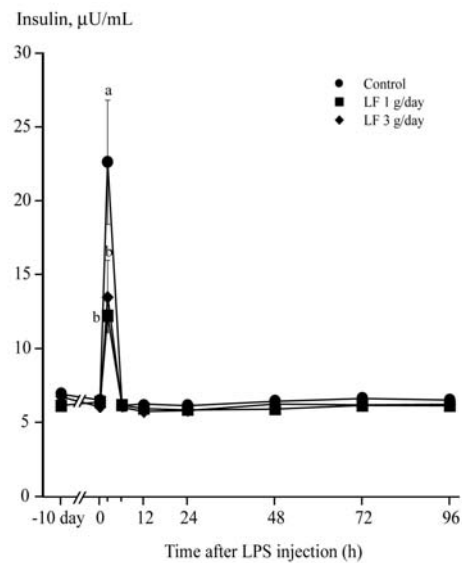


図 3. 血漿中インスリン濃度の推移

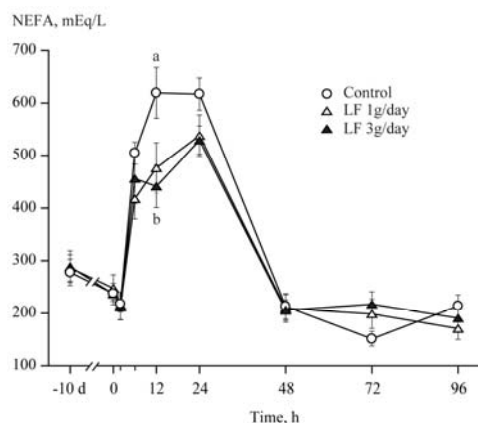


図 4. 血漿中遊離脂肪酸濃度の推移

血漿遊離脂肪酸 (NEFA) 濃度の変化を図 4 に示した。NEFA 濃度は、LPS 投与により 2~24 時間後にかけて増加した。LF 給与区における増加は、対照区に比べて低くなる傾向が認められた。

血漿中性脂肪濃度は、LPS 投与により増加し、高中性脂肪血症を示したが、LF 給与区では増加傾向が抑えられた。

対照区における血漿鉄濃度は、LPS 投与直後から増加し、その後減少に転じた。このような高鉄血症に続く低鉄血症は炎症反応特有の変化である。一方、LF 給与区では増加が抑えられ、低鉄血症は認められなかった。

血漿中成長ホルモン (GH) 濃度には処理区間での違いは認められなかった。

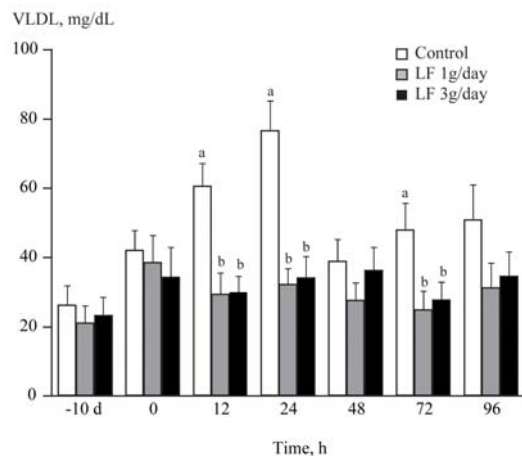


図5. 血漿中 VLDL 濃度の推移

血漿中 VLDL 濃度の変化を図5に示した。LF 給与区では対照区に比べて、LPS 投与後における増加が認められなかった。血漿中 NEFA および中性脂肪濃度の変化とあわせて考えると、対照区では LPS に伴う炎症反応により体脂肪の動員と肝臓での中性脂肪合成により血漿中 VLDL 濃度が高まったと思われる。しかし、LF 給与区では対照区のような炎症反応が起こらなかったため、血漿中 NEFA、中性脂肪、および VLDL 濃度の変化が抑制されたものと推察される。

LF による抗炎症反応は、図1で示した炎症性サイトカインである TNF の産生抑制に寄与するところが多いと考えられる。また、同じ炎症性サイトカインである IL-1 の血漿濃度についても、LPS による増加が抑制された。

したがって、LF は炎症性サイトカインの発現を抑制することで、炎症反応における代謝および内分泌反応の変動を調節することものと考えられた。この結果は、LF の経口ワクチンの臨床応用につながる成果である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① K Yamaji, S Kushibiki et al (8人中3目). Decrease in bovine CD14 positive cells in colostrums is associated with the incidence of mastitis after calving. Vet Res Commun. In press, 2010. 査読あり.
- ② S Kushibiki, H Shingu, T Komatsu et al (8人中1番目). Influence of orally administered bovine LF on lipid metabolism in LPS-injected preruminant calves. Anim Sci J. 80(3), p258, 2009. 査読あり.
- ③ H Shingu, S Kushibiki et al (8人中3番目). Effects of GHRH treatment on

milk production and plasma hormones and metabolites in lactating cows under negative energy balance. J Anim Sci. 87(4), p1247, 2009. 査読あり.

- ④ S Kushibiki, H Shingu, T Komatsu et al (11人中1番目). Effect of bovine LF feeding on LPS-induced metabolic and hormonal disturbances in calves. Anim Sci J. 79(3), p375, 2008. 査読あり.
- ⑤ E Kasuya, S Kushibiki et al (5人中2番目). Light exposure during night suppresses nocturnal increase in GH secretion in steers. J Anim Sci. 86(8), p1799, 2008. 査読あり.
- ⑥ E Kasuya, S Kushibiki et al (7人中2番目). Effects of serotonin injected into the 3rd ventricle on PRL and GH secretion in Holstein steers. Anim Sci J. 79(3), p362, 2008. 査読あり.
- ⑦ H Shingu, S Kushibiki et al (8人中5番目). Characteristics of developmental changes in the kinetics of glucose and urea in calves. J Anim Sci. 85(11), p2910, 2007. 査読あり.

[学会発表] (計5件)

- ① 蓮沼俊哉, 櫛引史郎, 他 (9人中9番目). 代用乳への抗菌剤およびシンバイオの添加が乳用子牛の体重および糞便中細菌数に及ぼす影響、日本畜産学会第111回大会(琉球大学)、講演要旨 p18, 2009.
- ② 櫛引史郎, 新宮博行, 小松篤司, 他 (6人中1番目). 哺乳子牛へのラクトフェリンの給与が血漿中サイトカイン濃度に及ぼす影響、日本畜産学会第111回大会(琉球大学)、講演要旨 p58, 2009.
- ③ 蓮沼俊哉, 櫛引史郎, 他 (12人中11番目). 乳用子牛へのシンバイオティクス給与が血中サイトカイン濃度、糞便中細菌数および糞便形状に及ぼす影響、日本畜産学会第109回大会(茨城大学)、講演要旨 p41, 2008.
- ④ 新宮博行, 櫛引史郎, 他 (5人中5番目). トリプトファンを経口給与が子牛の成長関連ホルモンの分泌機能に及ぼす影響、日本畜産学会第108回大会(岡山大学)、講演要旨 p52, 2007.
- ⑤ 中山博文, 櫛引史郎, 他 (11人中9番目). シンバイオティクス及びセロオリゴ糖の給与が乳用子牛に及ぼす影響、日本畜産学会第107回大会(麻布大学)、講演要旨 p17, 2007.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫛引 史郎 (KUSHIBIKI SHIRO)

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・上席研究員
研究者番号：30355218

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

新宮 博行 (SHINGU HIROYUKI)
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・栄養素代謝研究チ
ーム・主任研究員
研究者番号：40355219

小松 篤司 (KOMATSU TOKUSHI)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構 東北農業研究センター・東北飼料イ
ネ研究チーム・研究員
研究者番号：90360453

粕谷 悦子 (KASUYA ETSUKO)
独立行政法人農業生物資源研究所 生体
機能研究グループ・主任研究員
研究者番号：90355743