

平成 22 年 4 月 19 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19380153
 研究課題名（和文）減投薬家畜生産システムの確立に向けた子豚の粘膜免疫発達に関する研究
 研究課題名（英文）Studies on development of mucosal immune system in piglets for establishment of animal production system with reduced use of antimicrobials
 研究代表者
 牛田一成（Ushida Kazunari）
 京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授
 研究者番号：50183017

研究成果の概要（和文）：家畜生産において、無薬あるいは減投薬畜産の確立が急がれている。そのために幼動物の感染抵抗性の増強をはかるため粘膜免疫系の発達を促す方法論を確立する必要がある。本研究は、子ブタの免疫系の発達を把握し、最も効果的な介入時期と手段を明らかにしようとするものである。本研究で、① 離乳前後の腸管内 IgA 濃度減少② それによる感染症リスク上昇③ 21 日離乳と比べて 35 日離乳では粘膜免疫系がより発達し④乳酸菌の刺激に応答できるようになることがわかった。

研究成果の概要（英文）：In the animal agriculture, the disease control of infant animals is crucial for the efficient production. Weaning period is the most vulnerable period to the infection. Therefore, many antimicrobials have been applied as feed additive, growth promoters, to the weaning animals. However, it is required to establish animal production systems without any antimicrobials or with minimum use of antimicrobials from the social pressure that demands non-contaminated food with any chemicals. In this context, it is obvious to increase the resistance of infant animals against the infectious diseases. To this end, it is necessary to accelerate the development of the mucosal immune system of the infant animals. In this study, we have shown (1) decrease in luminal IgA concentration around weaning, (2) Increase in the risk of infection in this particular period, (3) late weaning(35d old) induced development of mucosal immune system, (4) Stimulation by probiotic lactobacillus was more helpful in late weaning animals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
総計	8,600,000	2,580,000	11,180,000

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：仔ブタ 腸管 IgA 分泌 離乳 抗菌剤 粘膜免疫

1. 研究開始当初の背景
 家畜生産において、幼動物の健康管理は最

重要な課題である。近代的な畜産業では、ほ乳期および離乳期の飼料に抗菌物質を添加

することが常態となってきた。しかし、安全・安心な食料を求める消費者心理から、社会的に家畜に抗菌物質を安易に投与することが許されなくなってきたために無薬あるいは減投薬畜産の確立が急がれている。すでに欧州においては成長促進用の飼料添加薬剤を禁止する政策が始まっており、我が国の畜産政策にも大きな影響を与えている。しかし欧州においても無薬の畜産、とくに養豚は必ずしも順調ではない。デンマーク農務省の統計(DANMAP 2003)によれば、飼料添加抗菌剤の使用禁止以降、治療用抗菌剤の使用が著しく増加し、抗菌剤の使用総量としては、期待されたほどの減少を達成できていない。これは、これまで抑制できていた疾病が成長促進目的の抗菌剤が禁止されて以降増加したことにより、治療を必要とする患畜が著しく増加したためであり、根本的には無薬で行う畜産技術が未確立であることに由来する。

2. 研究の目的

無薬ないしは減投薬の畜産技術を確立するためには幼動物の感染抵抗性の増強をはかる必要がある。とくに、粘膜免疫系の発達を促す方法論を確立する必要がある。本研究は、子ブタの免疫系の発達を、糞便中の分泌型IgA濃度の推移から経日的に把握するとともに、粘膜免疫の発達を促すために最も効果的な介入時期と手段を明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

(1) 通常離乳条件下の子ブタの糞便中 IgA 濃度の推移を経日的に測定した。哺乳期および離乳期仔ブタ用の飼料については、比較のために無薬飼料と抗菌剤添加飼料を用いた。4 腹の妊娠母豚を用意し、3 頭から生まれた子豚各 4 頭ずつには無薬の飼料を 1 頭から生まれた子豚 3 頭には抗菌剤添加飼料を哺乳期よりあたえた。仔ブタの性別の影響をみるために 2 腹は雄のみを選抜し 2 腹は雌のみを選抜した。25 日齢で母豚より離し強制離乳した。出生時を 0 日とし以降 50 日齢になるまで毎日糞便を採取した。また、次の実験で出荷日齢まで採材を続けた。

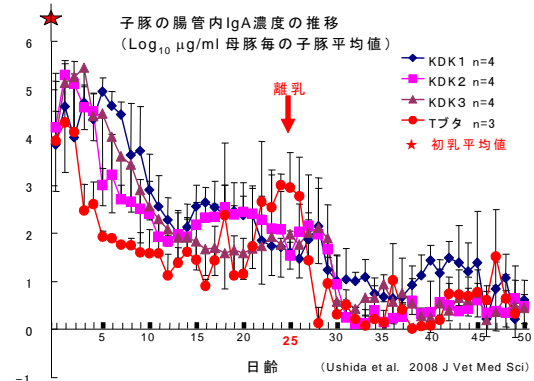
(2) 哺乳期以降の各成育段階における感染症に関して疫学調査を実施した。対象とした感染症は、細菌性の消化器感染症や気道感染をおこす PRRS や PMC である。いずれも病原体の検出は、分子生物学的な方法で行った。

(3) 21 日離乳子ブタと 35 日離乳子ブタの免疫機能の発達を末梢血単核球 (PBMC) および腸間膜リンパ節 (MLN) のリンパ球の種別と存在比をフローサイトメトリーによって検討すると共に、MLN 細胞を単離し、乳酸菌製剤を添加して培養することで免疫

刺激に対する応答性を比較検討した。

7 日齢、21 日齢、28 日齢、35 日齢の子ブタを 21 日齢までは各 4 頭、28 日齢と 35 日齢では 21 日離乳群 4 頭と 35 日離乳群 4 頭ずつを剖検し、腸管内容物、PBMC、MLN を採取した。腸管内容物は IgA 濃度を ELISAQ 法で測定した。PBMC および MLN から調整した細胞をフローサイトメトリーで分別した。MLN 細胞に対して、乳酸菌製剤 *L. casei* を添加した培養を行い、産生された IL-12 濃度を ELISA 法で測定した。

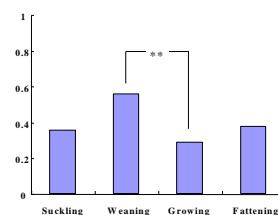
4. 研究成果



(1) 日齢の仔ブタ糞便中の IgA 濃度は $10^4 \mu\text{g/g}$ であった。その後の数日間で $10^5 \mu\text{g/g}$ まで上昇したが次の 10 日間で $10^1 \mu\text{g/g}$ 程度まで減少した。ここから離乳までほぼ同水準で推移した。そして、離乳に伴ってさらに減少を示し ELISA 法による検出限界に近づいた。糞便中の IgA は、極めて低いまま推移し 50 日齢になっても回復することがなかった。抗菌剤含有飼料を与えた群では糞便中の IgA 濃度が無薬飼料と比べて低く推移する傾向が認められたが、統計的な有意差を示すことは少なかった。また、次の実験で 170~180 日齢まで採材を続けたものの、明確に増加に転じる日齢をみきわめることができなかった。

(2) 下図に示すように、成育段階ごとに消化器系の感染症の発生頻度を調べると、離乳期が最も高いことがわかった。また、近年我が国で流行しているブタ繁殖・呼吸障害症候群や離乳後多臓器性発育不良

Prevalence of enteropathogens in pig feces at different growth stage in various commercial farms in Aichi, Nagano and Kyoto



(Ushida et al. 2009 Anim Sci J)

症候群の病原体の検出頻度も離乳期が高くなる傾向を示し、粘膜免疫の機能低下と感染率上昇に関係の深いことが認められた。

(3) 21日離乳と35日離乳の個体群で、体重の推移を示すと下図(3-1)の様に離乳日齢を遅らせるほうが体重の増加率が大きかった。また、腸管内のIgA濃度(3-2)も離乳日齢を遅らせるほうが高く推移した。免疫機能の発達を腸間膜リンパ節細胞中の抗原提示細胞数(存在比%)および乳酸菌(*Lactobacillus casei*)に対する応答性(IL-12p40産生量)を指標として検討したところ、いずれも離乳日齢が遅い個体群で高値を示した。

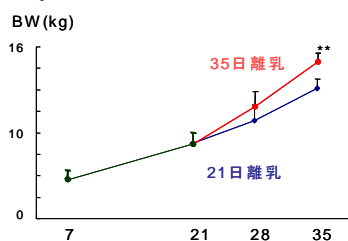


図 3-1 体重の推移

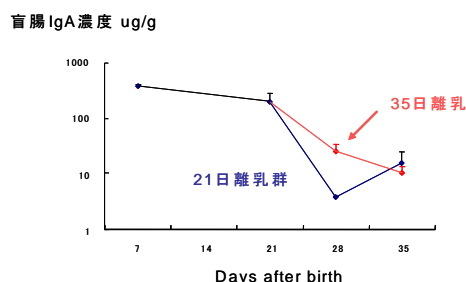


図 3-2 腸管内 IgA 濃度の推移

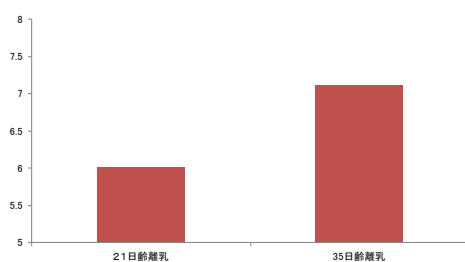


図 3-3 MLN 細胞中の抗原提示細胞存在比 (%)

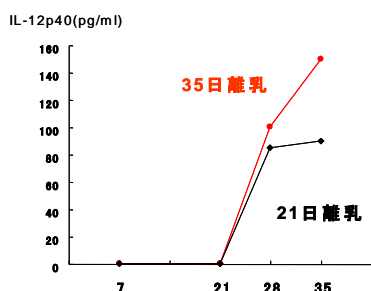


図 3-3 MLN 細胞の乳酸菌に対する応答力

これらの結果から、21日離乳群では、離乳後10日経過しても経口投与された乳酸菌の刺激に対する応答が悪いことが推測された。つまり、乳酸菌製剤の刺激に応答するには免疫系のある程度の成熟が哺乳中に達成される必要のあることが示唆された。すなわち、抗菌剤の代替物として乳酸菌製剤を使用する場合、早期離乳の個体では免疫機能が未発達で、乳酸菌の刺激を十分に受けることができない危険性があるということに他ならない。

以上の(1)(2)の結果から、離乳期が腸管内IgA濃度の最も低い時期であり、その時期に種々の感染症が多発することが明確に示された。この時期の子ブタに無薬(あるいは減投薬)飼料を与えるためには、粘膜免疫の発達を促して、免疫力を高める必要があると考えられた。そこで、代替物として最も期待が大きい乳酸菌製剤を利用する事の可能性を免疫学的に明らかにしようとした。

(3)で得られた結果からは、21日齢で離乳してしまうと、離乳期に乳酸菌を給与してもそれに応答できる粘膜免疫系が未発達であることがしめされた。特に腸間膜リンパ節の抗原提示細胞数が低いうえに乳酸菌に対する応答性も低調であることから、早期に離乳した個体群に対して無薬ないしは低濃度の抗菌剤のみをふくむ飼料で飼育することの危険性は高く、さらに乳酸菌製剤で免疫力を向上させて抗菌剤を代替することも難しいことが示唆された。

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3件)

① Kazunari Ushida, Chiyoko Kameue, Takamitsu Tsukahara, Kikuto Fukuta, Nobuo Nakanishi, Decreasing Traits of Fecal Immunoglobulin A in Neonatal and Weaning Piglets. Journal of Veterinary Medical Science, 査読有, 70巻, 2008, 849-852

② Kazunari Ushida, Akio Kishimoto, Shong-Ji Piao, Mitsugi Itoh, Akira Shiga, Nobuo Nakanishi, Takamitsu Tsukahara, An epidemiological survey on pigs showing symptoms of enteric diseases and dyspepsia in Japan. Animal Science Journal. 査読有, 80巻, 2009, 556-561

③ Kenichi Sasaki, Takamitsu Tsukahara, Osamu Taira, Kotaro Tsuchiya, Mitsugi Itoh, Kazunari Ushida, Prevalence of porcine reproductive and respiratory

syndrome virus and porcine circovirus type 2 in piglets after weaning on a commercial pig farm in Japan. *Animal Science Journal*. 査読有, 81 巻, 2010, 135-141

本研究に関連した研究発表

①Takahashi S, Y. Yoshida, Nakanishi N, Tsukahara T, Ushida K. Quantitative real-time PCR monitoring of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* with oral administration of *Lactobacillus plantarum* strain Lp80 to weaning piglets *Animal Science Journal*. 査読有, 2008, 79 巻 737-744.

②Yoshida Y, Tsukahara T, Ushida K. Oral administration of *Lactobacillus plantarum* Lq80 and *Megasphaera elsdenii* iNP-001 induces efficient recovery from mucosal atrophy in the small and the large intestines of weanling piglets. *Animal Science Journal*. 査読有, 2009, 80 巻, 709-715.

〔学会発表〕 (計 1 件)

① 塚原隆充・佐々木謙一・井上亮・中西信夫・牛田 一成, ブタ糞便中イムノグロブリン A 濃度の新生仔から出荷までの推移日本畜産学会 2009 年 3 月 28 日 日本大学

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://seika.kpu.ac.jp/~k_ushida/ushida_intro.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

牛田 一成 (USHIDA KAZUNARI)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号 : 50183017