

令和 2 年 11 月 26 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26292145

研究課題名（和文）初乳を介した移行免疫の重要性の解明 仔ブタの発達促進にむけた基盤研究

研究課題名（英文）Passive Immunity acquired via colostrum in pig

研究代表者

井上 亮（INOUE, Ryo）

京都府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：70443926

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 12,500,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究は主に以下の3点である。1. ブタ初乳から仔豚に移行するタンパク質の推定、2. その成果のなかから選抜した2つのタンパク質の生後24時間の仔豚血漿中濃度変化の解明、3. 初乳から仔豚の腸管を介して細胞が取り込まれることの確認。この他にも、3をさらに詳細に解明するための新規手法を確立した。本研究の成果から、ブタ初乳からは相当数のタンパク質が移行すること、細胞が腸管を介して移行することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではブタ初乳に含まれるタンパク質の詳細な分析や、それらのうち仔豚に移行する成分の特定、さらには初乳から移行する細胞の分析を行った。本研究により「重要である」と漠然と認識されていたブタ初乳摂取がなぜ重要なのか、その科学的理由の一端が明らかになった。また、ブタ初乳において、何が科学的にわかっている、何がわかっていないのかを整理し、より研究の焦点を当てるべき研究領域を明らかにすることができた。

研究成果の概要（英文）：The major outcomes of the research are; 1. Estimation of proteins that transfers from colostrum to piglets, 2. determination of the dynamics of plasma concentration of two proteins selected from the estimation, 3. Confirmation of the transfer of colostrum cells into piglet's small intestine. This research suggested that a considerable number of proteins could transfer from colostrum to piglets and colostrum cells indeed transfer via small intestine of piglet.

研究分野：腸管免疫、移行免疫

キーワード：ブタ 初乳 移行免疫

### 1. 研究開始当初の背景

近年、養豚では感染率の増加・成長遅延などの問題から、早期離乳が見直され始めている。しかし、長期の哺乳が望ましいことが明らかでも、経営上の理由もありその実現は容易ではない。特に我が国のような集約養豚の場合、敷地面積の問題からも、長期哺乳の実現が困難な農家も多い。早期離乳しても弊害が出にくい養豚システムの構築が、これからの我が国の養豚に求められており、そのためには早期離乳に耐える免疫系を仔豚に出来るだけ早く構築させることが必須である。申請者らは、これまでのブタ母乳に関する研究から、早期に離乳しても弊害が少ない養豚システム構築の鍵は“初乳からの十分な移行免疫”にあると考えた。ブタは、胎生期に母子間の免疫移行が無く、母からの受動免疫の全てを初乳に依存している。しかしながら、初乳からの免疫移行が起こる期間を含め、どのような成分が移行し、仔の免疫系の発達にどのように寄与しているのかはほとんど明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、ブタ初乳から仔へ移行する免疫成分を細胞性・液性免疫の両面から解析し、それらが仔豚（特に離乳時まで）の免疫系の発達に与える影響を検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

試験には全て、LW(Landrace x Large White) または WL の母豚を使用し、これに D(Duroc) の種をつけて得た仔豚を使用した。

#### ① 初乳から仔豚へ移行する液性免疫成分（タンパク質）の解析

初乳摂取前の仔豚及び初乳摂取 12 時間後の仔豚から結晶、腸間膜リンパ節を採取し、それぞれのプロテオーム解析を行った。さらに当該仔豚が摂取した初乳（乳清）のプロテオーム解析も行った。

#### ② 初乳中細胞の仔豚腸管からの取り込みの確認

生後 4-6 時間の仔豚を解剖し、小腸を摘出後、腸管サックを作製した。サックの中に、初乳から単離し、蛍光標識した細胞を導入し、37°C で 2 時間培養した。その後、サックを開裂し、粘膜固有層から細胞を単離した。単離細胞をフローサイトメーターで解析し、蛍光標識された細胞の有無を確認した。

#### ③ 初乳からの移行タンパク質の仔豚血漿中濃度の経時的変化

上記①で初乳から仔豚に移行する可能性が示唆されたタンパク質で、抗体以外のものを 2 種類選抜し、そのタンパク質の移行をさらに詳細に確認した。仔豚 4-8 匹を初乳摂取前、摂取後 4、10、24 時間後で解剖し、血漿中の当該タン

パク質の濃度を測定した。

### 4. 研究成果

- ① 初乳から仔豚へ移行する液性免疫成分（タンパク質）の解析（図 1 及び 2）  
血漿からはおよそ 400 種類、腸間膜リンパ節からは 750-800 種類程度の、初乳（乳清）からは約 600 種類のタンパク質が同定された。初乳摂取前には検出されず、摂取 12 時間後のみで検出されたタンパク質のうち、初乳からも検出されたものは、血漿で 106 個、腸間膜リンパ節で 61 個であった。また、初乳摂取前に比べて、摂取 12 時間後で農奴が 2 倍以上に増加したタンパク質で、初乳でも検出されたものは、血漿で 41 個、腸間膜リンパ節で 54 個であった。これらの中には、仔豚の発達に重要であると考えられるタンパク質も複数含まれていた。

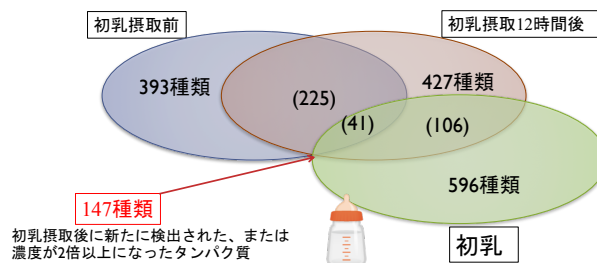


図 1. 初乳摂取前後の仔豚血漿、及び当該仔豚が摂取した初乳から検出されたタンパク質の数

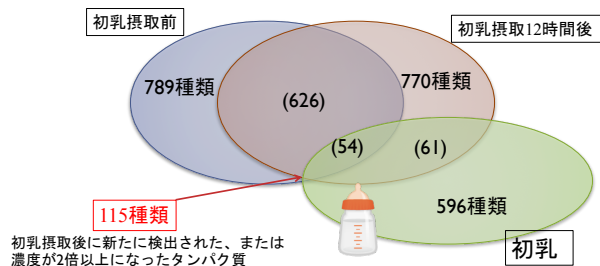


図 2. 初乳摂取前後の仔豚の腸間膜リンパ節、及び当該仔豚が摂取した初乳から検出されたタンパク質の数

#### ② 初乳中細胞の仔豚腸管からの取り込みの確認（図 3）

小腸の粘膜固有層から単離した細胞中に蛍光標識された細胞が含まれる、つまり初乳から取り込まれたと考えられる細胞が存在することがわかった。なお、この試験は 1 腹 2 匹の仔豚を使用して行い、ことなる 3 腹で実施し再現性を確認した。

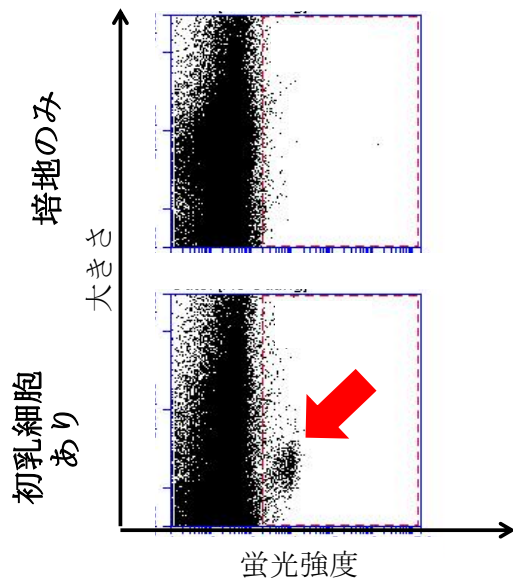


図3. 2時間培養後の腸管サックから単離した粘膜固有層細胞のフローサイトメトリー解析 (矢印は蛍光標識された初乳細胞)

- ③ 初乳からの移行タンパク質の仔豚血漿中濃度の経時変化 (図4)  
免疫や組織の発達への関与が疑われる2つのタンパク質、GDF-8及びHaptoglobinを選抜し、仔豚血漿中濃度を測定したところ、いずれのタンパク質も初乳摂取前は検出限界以下であったが、摂取4時間後には検出可能なまでに増加した。さらに、摂取10時間後にはピーク到達したが、腸管を介した乳成分の移行が縮小する24時間後では、検出可能ではあるものの、摂取10時間後に比べると濃度が減少した。

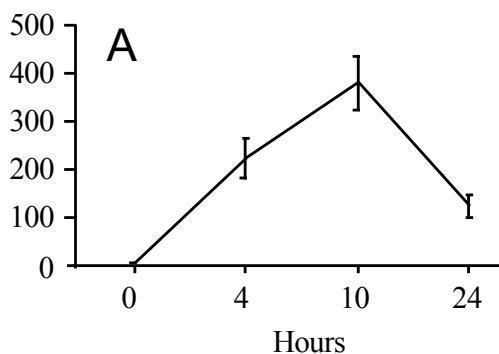


図4-A. GDF-8の仔豚血漿中濃度

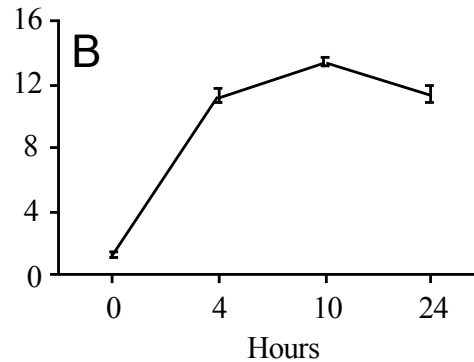


図4-B. Haptoglobinの仔豚血漿中濃度

#### 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 6 件)

- ① Hayashi, Y. Okutani, M. Ogawa, S. Tsukahara, T. and Inoue, R. Generation of anti-porcine CD69 monoclonal antibodies and their usefulness to evaluate early activation of cellular immunity by flow cytometric analysis. *Animal Science Journal*, 2018. 査読有、DOI:10.1111/asj.12989
- ② Inatomi, T. Amatatsu, M. Romero-Perez, GA. Inoue, R. and Tsukahara, T. Dietary Probiotic Compound Improves Reproductive Performance of Porcine Epidemic Diarrhea Virus-Infected Sows Reared in a Japanese Commercial Swine Farm under Vaccine Control Condition. *Frontiers in Immunology*, 2017. 査読有、DOI:10.3389/fimmu.2017.01877
- ③ Inoue, R. and Tsukahara, T. Development of the porcine intestine during early postnatal life -Evaluation focusing on histological, enzymatic and immunological parameters-. *Proceedings of Japan Society of Animal Nutrition and Metabolism*, 2017. 査読有、vol.60, p99-109
- ④ Ogawa, S. Tsukahara, T. Imaoka, T. Nakanishi, N. Ushida, K. and Inoue, R. The effect of colostrum ingestion during the first 24 h of life on early postnatal development of piglet immune system. *Animal Science Journal*, 2016. 査読有、DOI:10.1111/asj.12573
- ⑤ Ogawa, S. Okutani, M. Tsukahara, T. Nakanishi, N. Kato Y. Fukuta, K. Romero-Perez, GA. Ushida, K. and Inoue, R. Comparison of gene expression profiles of T cells in porcine colostrum and peripheral blood. *American Journal of Veterinary Research*, 2016. 査読有、DOI:10.2460/ajvr.77.9.961
- ⑥ Inoue, R. Tsukahara, T. Nakatani, M. Nishibayashi, R. Ogawa, S. Harayama, T.

Nagino, T. Hatanaka, H. Fukuta, K. Romero-Perez, GA, Ushida, K and Kelly D. Weaning markedly Affects Transcriptome Profiles and Peyer's Patch Development in Piglet Ileum. *Frontiers in Immunology*, 2015. 査読有、DOI:10.3389/fimmu.2015.00630

なし

(4) 研究協力者

なし

[学会発表] (計 7 件)

- ① 小林良奈、塚原隆充、矢原芳博、井上亮、豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) 野外単離株と市販生ワクチン株との全ゲノム配列の相同性、2017 年、日本畜産学会第 122 回大会
- ② Inoue, R. and Tsukahara, T. Development of the porcine intestine during early postnatal life -Evaluation focusing on histological, enzymatic and immunological parameters-. 2017 年、17<sup>th</sup> AAAP 家畜栄養生理研究会 (招待講演) (国際学会)
- ③ 井上亮、仔豚免疫についての最新知見、2016 年、ゼノアック養豚セミナー (招待講演)
- ④ 井上亮、仔豚免疫についての最新知見、2015 年、ゼノアック養豚セミナー (招待講演) 宮崎会場 (招待講演)
- ⑤ 井上亮、仔豚免疫についての最新知見、2015 年、ゼノアック養豚セミナー (招待講演) 栃木会場 (招待講演)
- ⑥ 井上亮、初乳免疫の最新知見、2015 年、日本養豚開業獣医師協会 第 13 回通常総会 (招待講演)
- ⑦ 井上亮、初乳の成分と重要性について、2014 年、宮崎しゃくなげ会 (招待講演)

[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://eureka.kpu.ac.jp/~r-inoue/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井上 亮 (INOUE, Ryo)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師

研究者番号：70443926

### (2) 研究分担者

塚原 隆充 (TSUKAHARA, Takamitsu)

京都府立大学・大学院生命環境科学研究科・研究員

研究者番号：90562091

### (3) 連携研究者