

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：24302

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780269

研究課題名(和文)免疫学的・栄養学的要因から提案するわが国の養豚生産システムに適した離乳時期

研究課題名(英文)The determination of suitable weaning age of suckling piglets considered by the immune and nutrition standpoints.

研究代表者

塚原 隆充 (Tsukahara, Takamitsu)

京都府立大学・生命環境科学研究科(系)・研究員

研究者番号：90562091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：わが国では、仔豚を分娩から3-4週で強制離乳する。離乳は、仔豚の栄養の充足や良好な生育を基準にせず、母豚の発情周期又は分娩ストールの状況で決定される。近年、ウイルス症が経営を著しく悪化させており、離乳時期を遅らせて仔豚への移行免疫を充分確保させるべきという機運が高まっている。しかし、仔豚の離乳時期を総合的に検討した事例はない。本研究は、離乳時期を変えた仔豚の腸管を栄養学、遺伝学、免疫学的及び病理組織学的に解析し、わが国の養豚生産システムに適した離乳時期を決定することを目的とした。その結果、どの側面からも14日齢離乳は早すぎ、少なくとも21日齢までは母乳を継続させることが必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Suckling piglets are weaned forcibly at 3 or 4 weeks old in Japan. Weaning are almost considered the convenience of sows, less considered the sufficiency of nutrition or good growth of neonates, previously. Recently, some viral diseases prevail, and its infection deteriorates ferocity in pig industry. Therefore, weaning age is reconsidered to prevent the viral infection for the improvement of pig management. On the other hands, suitable weaning age of neonate is not examined yet particularly in matching the Japanese pig industry. Therefore, I determine the suitable weaning age for neonates from the points of view of nutrition, gene expression, immune and pathology. According the results, weaned at 14 days old is too early, weaned at 21 days old or more is needed to their subsequent healthy development.

研究分野：畜産学・獣医学

科研費の分科・細目：畜産学・草地学

キーワード：離乳 豚 消化管 発達 短鎖脂肪酸 免疫 2糖分解酵素 パイエル板

1. 研究開始当初の背景

わが国の養豚現場では、分娩から 3~4 週で仔豚を強制離乳する。離乳時期は、仔豚の栄養の充足や良好な生育を条件とするよりも、母豚の発情周期又は分娩ストールの空き状況で決定されることが多い。近年、サーコウイルス 2 型や豚繁殖・呼吸器障害症候群ウイルス感染症が猛威を振るい、経営効率を著しく悪化させており、離乳時期を遅らせて仔豚への移行免疫を充分確保させるべきという機運が高まっている。しかし、仔豚の離乳時期を栄養学及び免疫学の両見地から検討した事例はない。

2. 研究の目的

本研究は、①離乳時期を変えた仔豚の腸管を栄養学及び免疫学的に解析し、わが国の養豚生産システムに適した離乳時期を決定すると共に、②適切な離乳時期を判定するための離乳マーカー探索することを目的とする。

3. 研究の方法

3-1. 供試動物

WLD系の仔豚を使用した。母乳のみを摂取した1, 7, 14, 21, 28及び35日齢(1S, 7S, 14S, 21S, 28S, 35S) ,及び14, 21又は28日齢で強制離乳させた7及び14日後に3-4頭ずつを剖検した(14Wp7, 14Wp14, 21Wp7, 21Wp14, 28Wp7, 28Wp14; 図1)。剖検時に体重を測定した。

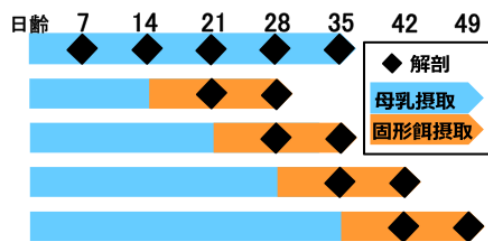


図1 産仔の剖検スケジュール

盲腸静脈、回腸静脈、門脈、腹部大静脈の順に採血を行った。血液は遠心分離を行って血清を分取後、凍結保存した。口腔内から唾液を、膀胱内から尿を採取した。腸管を採取して小腸及び大腸に分けた。小腸長さを測定した。回腸及び盲腸内容物を採取後、小腸を8等分して、胃側を小腸1、盲腸側を小腸8とした。小腸各部位から粘膜を採取して、一部を2糖分解酵素活性測定用として凍結保存した。残余の一部はRNA-laterに浸漬し、凍結保存した。小腸各部位、盲腸及び結腸組織をホルマリン固定した。

3-2. 栄養学的な見地からの腸管発達

凍結した各個体の小腸8部位粘膜について、マルターゼ、ラクターゼ及びスクラーゼ活性を測定した。測定法はTsukahara et al. (2013)に準拠した。

凍結した各個体血清中、唾液中及び尿中の

短鎖脂肪酸濃度をGC-MSを用いて測定した。測定法はTsukahara et al. (2014)に準拠した。また、回腸内容物及び盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度をイオン排除HPLCで測定した。測定法はTsukahara et al. (2014)に準拠した。

3-3. 遺伝子的な見地からの腸管発達

14S, 21S, 28S, 35S, 21Wp7, 21Wp14の小腸8粘膜からtotal RNAを抽出し、cDNA合成後、Porcine Genome Chip (Affymetrix)を用いてマイクロアレイ解析を行った。

3-4. 免疫学的な見地からの腸管発達

1S, 7S, 14S, 21S, 28S, 35S, 14Wp7, 14Wp14, 21Wp7, 21Wp14, 28Wp7, 28Wp14の小腸2及び8の粘膜からtotal RNAを抽出し、cDNA合成後に上記マイクロアレイ解析で変化が認められたリンパ球走化性に関する遺伝子発現をreal-time PCR法を用いて解析した。

また、上記仔豚の回腸及び盲腸内容物中の総IgA濃度及び総IgG濃度を市販ELISAキット(Pig IgA ELISA Quantitation Set or Pig IgG ELISA Quantitation Set; Bethyl)で測定した。

3-5. 病理組織学的な見地からの腸管発達

ホルマリン固定した腸管は、常法に基づいて、パラフィン包埋、薄切後、HE染色を行った。光学顕微鏡下で、絨毛高さ、陰窩深さ及びバイエル板面積を測定した。

4. 研究成果

4-1. 栄養学的な見地からの腸管発達

剖検時の小腸長さを図2に示した。

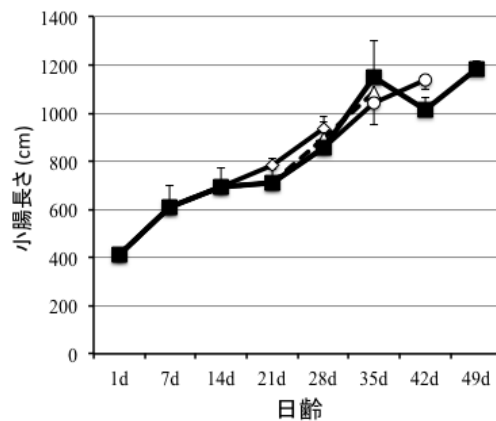


図2 小腸長さの推移

■, 35日齢離乳仔豚; ○, 28日齢離乳仔豚
△, 28日齢離乳仔豚; ◇, 14日齢離乳仔豚

小腸は生後、伸長を続けた。早期離乳(14日又は21日離乳)することで小腸は長くなる傾向にあった。

剖検時小腸各部位の絨毛高さを光学顕微鏡下で計測した(図3)。小腸絨毛高さは、生後から漸次短くなった。離乳によって小腸前部(小腸1~4)の絨毛は短くなる傾向にあったが、後部の絨毛は短くならなかった。

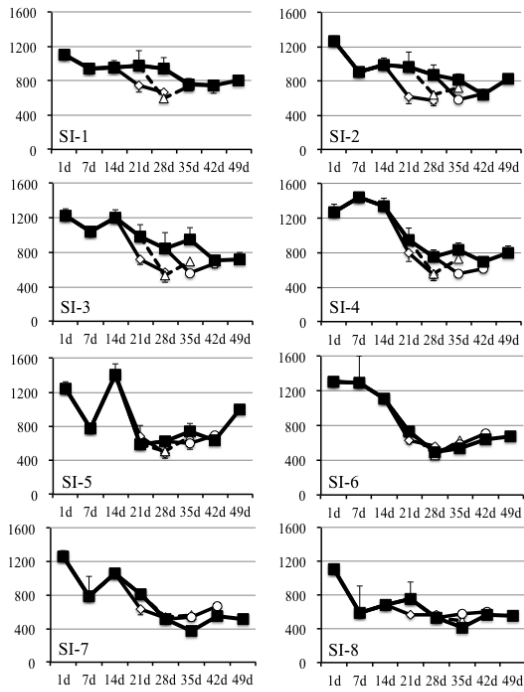


図3 小腸絨毛高さ(μm)の推移
 ■, 35日齢離乳仔豚; ○, 28日齢離乳仔豚
 △, 28日齢離乳仔豚; ◇, 14日齢離乳仔豚

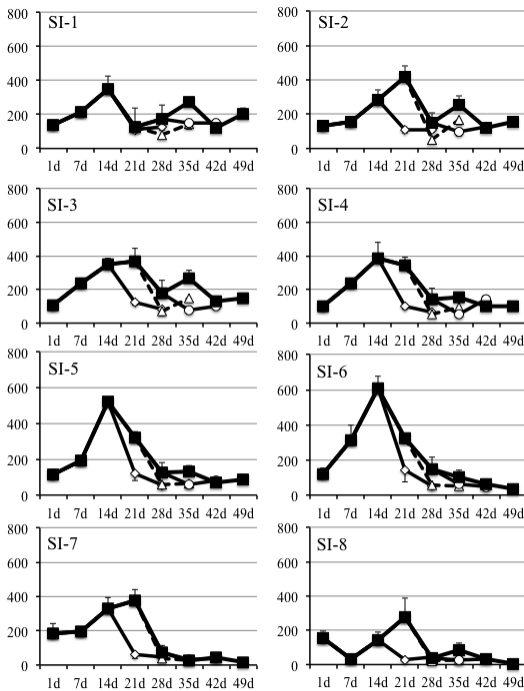


図4 小腸粘膜ラクターゼ活性(U)の推移
 ■, 35日齢離乳仔豚; ○, 28日齢離乳仔豚
 △, 28日齢離乳仔豚; ◇, 14日齢離乳仔豚

離乳日齢によって小腸絨毛は大きく影響を受けた。14日齢離乳7日後は、ほ乳継続豚よりもさらに絨毛は短くなり、小腸前半で顕著であった。その後離乳後14日を経過しても絨毛萎縮は回復しなかった。21日齢離乳豚の7日後でも前半は絨毛萎縮が顕著に認められたが、14日後には回復傾向が認められ、小腸後半では同日齢のほ乳豚よりも、絨毛がむしろ伸張した。28日齢以降ではさらに離乳の影響は軽微になり、離乳後7日でも小腸後半で絨毛は伸張

した。

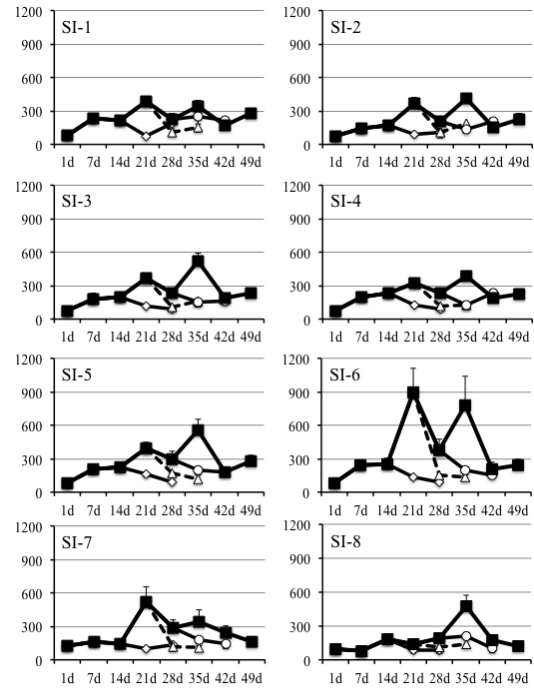


図5 小腸粘膜マルターゼ活性(U)の推移
 ■, 35日齢離乳仔豚; ○, 28日齢離乳仔豚
 △, 28日齢離乳仔豚; ◇, 14日齢離乳仔豚

小腸粘膜のラクターゼ活性の推移を表4に示した。小腸粘膜のラクターゼ活性は生後から徐々に亢進する傾向にあり、14~21日齢でその活性はピークとなり、その後母乳のみを摂食していてもラクターゼ活性は低下した。離乳によってラクターゼ活性は顕著に低下した。小腸5及び6でラクターゼ活性が最も高かった。

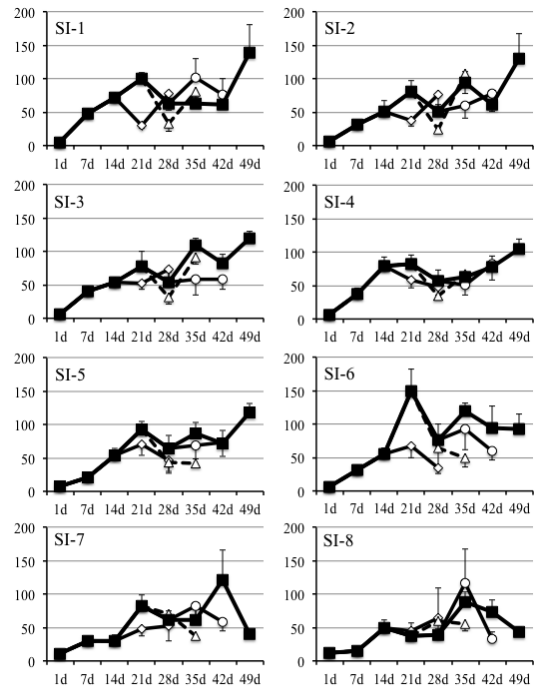


図6 小腸粘膜スクラーゼ活性(U)の推移
 ■, 35日齢離乳仔豚; ○, 28日齢離乳仔豚
 △, 28日齢離乳仔豚; ◇, 14日齢離乳仔豚

小腸粘膜マルターゼ活性を表5に示した。小腸粘膜のマルターゼ活性は生後から徐々に亢進

する傾向にあった。ラクターゼ活性と同様に離乳によって顕著に低下した。小腸6でマルターゼ活性が最も高かった。また、14日齢離乳ではマルターゼ活性が発達しないまま離乳となって、その後のマルターゼ活性亢進が認められないが、21日齢離乳以降では、離乳による下げ幅が少なくなった。これらの傾向は離乳時期を遅らせるだけ下げ幅は更に少なくなった。

小腸粘膜スクラーゼ活性を表6に示した。スクラーゼ活性は生後から徐々に亢進する傾向にあり、小腸前部では49日齢まで亢進が続いていた。離乳による顕著な変化は認められなかった。

ほ乳期間中の盲腸内容物中及びの短鎖脂肪酸濃度を図7に示した。生後発達に従って盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度は漸次高値を示し

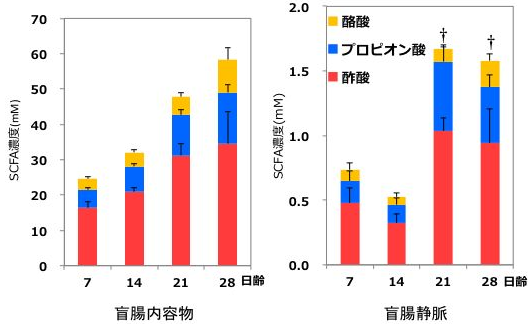


図7 ほ乳仔豚の盲腸内容物中及び盲腸静脈中の短鎖脂肪酸 (SCFA)濃度

た。盲腸静脈血中の短鎖脂肪酸濃度は、ほ乳21日齢以降で顕著に高値を示した。

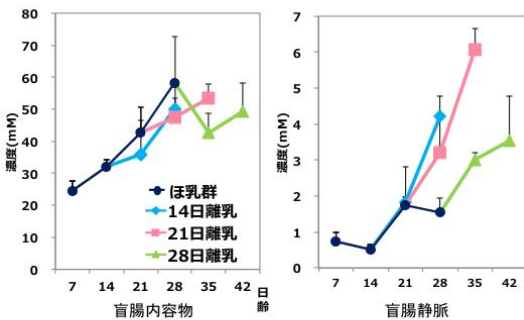


図8 ほ乳及び離乳仔豚の盲腸内容物中及び盲腸静脈血中の短鎖脂肪酸 (SCFA)濃度

盲腸内容物中及び盲腸静脈血中の短鎖脂肪酸濃度の離乳による影響を図8に示した。離乳によって盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度は低下する傾向にあったが、逆に盲腸静脈血中の短鎖脂肪酸濃度は高値を示す傾向が認められた。高値傾向は28日齢離乳では緩やかになる傾向にあった。

唾液及び尿中の短鎖脂肪酸濃度を測定したが、殆ど検出できなかった。また、末梢血中には酢酸のみが検出された。

4-2. 遺伝子的な見地からの腸管発達

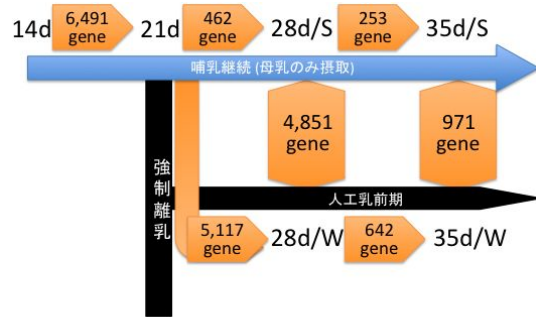


図9 小腸8粘膜で発達及び離乳によって変動した遺伝子数(マイクロアレイ解析)

各仔豚小腸8粘膜をマイクロアレイ解析した結果を図9に示した。14S~21Sにかけて、回腸内で多くの遺伝子が発動した。また、21日齢で離乳することでも多くの遺伝子が発動した。

表1 ほ乳14日齢から21日齢迄、及びほ乳21日齢から2離乳後7日迄の顕著に変動した遺伝子pathway

14S→21S	亢進	抑制
免疫	リンパ球走化性・免疫構成	—
細胞	分裂・DNA修復	細胞接着
輸送	—	小胞体・イオン・吸収
代謝	—	脂質・ケトン・小分子
応答	—	ホルモン・外来刺激

21S→21Wp7	亢進	抑制
免疫	MHC 1・自然免疫・1型インターフェロン	リンパ球走化・MHC 2・Bリンパ球・レセプタ
細胞	アポトーシス	VEGF
輸送	—	—
代謝	コレステロール・糖・脂質	—
応答	有機物	—

顕著に変動した遺伝子pathwayを表1に示した。14S~21Sにかけて、免疫的にはリンパ球走化が、細胞的には分裂などが亢進した。一方で、細胞接着、脂質などの代謝及び外来刺激に対する応答に関するpathwayが抑制された。21S~21Wp7にかけて、自然免疫の指標であるMHC class 1や炎症性サイトカインであるインターフェロンが亢進し、獲得免疫系であるリンパ球走化、MHC class 2及びBリンパ球などが抑制された。一方で、細胞のアポトーシスが誘導され、糖や脂質代謝などに関するpathwayが亢進された。

4-3. 免疫学的な見地からの腸管発達

4-2でリンパ球走化が、14S~21Sにかけて亢進し、離乳によって抑制された。この結果を受けて、リンパ球走化に関連する5遺伝子(MHC class II, VCAM1, ICAM1, VAV-1, CXCL13)について、小腸2及び8粘膜中の遺伝子発現をreal-time PCR法で解析した。

5遺伝子が殆ど同じ傾向を示し、初生から発現が亢進し空腸では14Sで、回腸では21Sで最

大となった。強制離乳によって発現量が低下したが、空腸では28日齢以降の離乳で低下率が小さかった。代表してMHC class II mRNA発現を図10に示した。

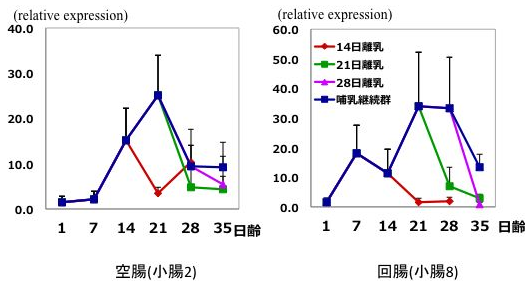


図10 ほ乳及び離乳仔豚の空腸又は回腸粘膜中のMHC class II mRNA発現

総IgA濃度は初生から漸次減少し、どの離乳日齢でも離乳によって低値を示したが、盲腸総IgG濃度は逆に離乳で高値を示した。

4-4. 病理組織学的な見地からの腸管発達

哺乳仔ブタの小腸パイエル板発達推移を図11に示した。

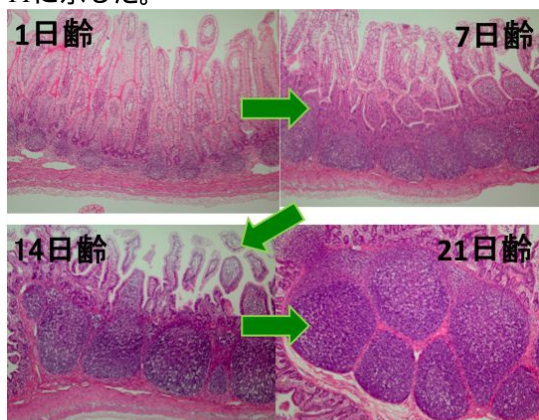


図11 ほ乳仔豚の小腸パイエル板の発達 (小腸8での比較)

小腸パイエル板は生後の腸管発達に伴って大きくなった。

スライドガラス上の小腸パイエル板面積を計測した結果を図12に示した。

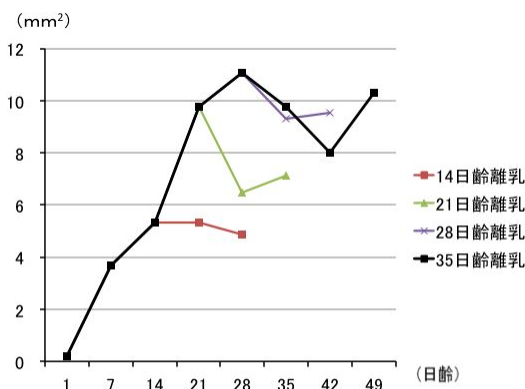


図12 小腸パイエル板面積の推移 (小腸8での比較)

14日齢離乳では離乳後パイエル板は萎縮し

たが、21日齢以降は一時的な萎縮は認められるものの、その後成長に伴ってリンパ装置の発達が確認できた。

4-5. まとめ

以上の結果から、栄養学的、遺伝学的、免疫学及び病理組織学的な観点から総合的に検討した結果、仔豚の離乳時期は少なくとも21日齢以上、出来れば28日齢まで哺乳させることが産仔にとって好ましいと考えられた。

また、離乳マーカーを検討するため、唾液及び尿中の短鎖脂肪酸濃度を測定したが、殆ど検出できなかった。末梢血中の短鎖脂肪酸濃度も酢酸以外殆ど検出できず、大腸発酵変化を指標にした離乳マーカーは選定できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takamitsu TSUKAHARA Noriko MATSUKAWA, Shozo TOMONAGA, Ryo INOUE, Kazunari USHIDA and Kuniyasu OCHIAI. 2014. High-sensitivity detection of short-chain fatty acids in porcine ileal, cecal, portal and abdominal blood by gas chromatography-mass spectrometry. Anim. Sci. J. 85, 494-498.

〔学会発表〕(計 6 件)

- ①鈴木健太, 塚原隆充, 井上亮, 福田菊人, 牛田一成 (2012) ほ乳期仔豚の日齢による小腸絨毛の変化と、強制離乳による影響, 第154回日本獣医学会学術集会, 岩手大学
- ②塚原隆充, 井上亮, 牛田一成 (2012) 遺伝子発現からみる哺乳ブタ小腸の発達, 日本食品免疫学会 2012年度大会, 東京ヤクルトホール
- ③鈴木健太, 塚原隆充, 井上亮, 福田菊人, 牛田一成 (2013) ほ乳期仔豚の成長に伴う小腸リンパ装置の発達及び間質内好酸球浸潤と、離乳による影響, 第155回日本獣医学会学術集会, 東京大学
- ④中谷麻紗子, 塚原隆充, 井上亮, 福田菊人, 牛田一成 (2013) 初生からの仔ブタ腸管免疫発達と、離乳時期が免疫発達に及ぼす影響, 日本畜産学会第116回大会, 安田女子大学
- ⑤中谷麻紗子, 塚原隆充, 松川典子, 友永省三, 福田菊人, 井上亮, 牛田一成 (2013) ほ乳仔豚の成長と、離乳による大腸内短鎖脂肪酸産生及び吸収の変化, 日本畜産学会第118回大会, つくば国際会議場
- ⑥Masako NAKATANI, Ryo INOUE, Denise KELLY, Imke MULDER, Kikuto FUKUTA, Kazunari USHIDA, Takamitsu TSUKAHARA (2014) Postnatal development of ileum in suckling piglet and influence of weaning. 9th Joint Rowett/INRA Symposium, Gut

Microbiology, Aberdeen.

〔図書〕(計 1 件)

①塚原隆充 他, 緑書房, 豚をお腹から元気
に! 腸管疾病と下痢対策, 2014, in press.

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

〔その他〕

とくになし

6. 研究組織

(1)研究代表者

塚原隆充 (TSUKAHARA Takamitsu)

京都府立大学・生命環境科学研究科・研究
員

研究者番号: 90562091