

# おかやま地どりへの杜仲種子グッタペルカ投与の及ぼす影響

## Effect of feeding Trans PolyIsoprene to immuno-activities in chickens

桑守正範<sup>1</sup>、内田光教<sup>2</sup>、目瀬守男<sup>4</sup>、中澤慶久<sup>3</sup>、小林昭雄<sup>3</sup>、

Masanori KUWAMORI, Mitsunori UCHIDA, Morio MESE, Yoshihisa NAKAZAWA,  
and Akio KOBAYASHI

### 1. まえがき

杜仲は多くの機能性を有するが、中でも杜仲ゲニポシド酸による血圧降下作用が知られて以来、杜仲からの有効成分の抽出と同定が行われてきた。一般的に知られている機能性成分としては、先述の分離されたゲニポシド酸やクロロゲン酸などがある<sup>1)</sup>。また、杜仲からは摂食量を減らす一方で筋肉量を増加させる働きのある Asperuloside (ASP) も分離されている<sup>2)-6)</sup>。我々はかねてから乾燥杜仲葉を「おかやま地どり」に投与し、可食部の成分組成に与える影響の検討を行っており、脂肪量の低下、ならびに多価不飽和脂肪酸割合の増加という結果を得ている。また飼育を重ねた結果、乾燥杜仲葉を投与した群でいくつかの注目すべき変化を観察した。その内の一つが乾燥杜仲葉を投与した際の疾病罹患率の減少である。杜仲には先述の機能性成分の他に、ペクチンやグッタペルカをはじめとする多種多様な食物繊維を含んでいる。著者らはこのおかやま地どりの疾病罹患率の低下の原因を杜仲食物繊維に注目し、実証することを目的として以下の実験を行った。

生体免疫システムの中で消化管免疫は重要な役割を担っている。消化管の免疫担当組織、GALT (gut associated lymphoid tissue) は、外界からの細菌やウイルスといった異物に対して、小腸粘膜をはじめと

する消化管粘膜を感応部位とした、主に IgA を介した局所免疫を担っていることが知られている。

近年になって、食物繊維 (Dietary fiber : DF) そのものの経口投与による腸管膜リンパ節の挙動や、抗体産生の応答に対する影響についての研究が報告されはじめた<sup>7)</sup>。Kudoh et al. (1998)<sup>8)</sup>も菌類子実体に含まれる難消化性糖質の経口投与により、消化管粘膜中の B リンパ球発現の割合が増加することを認めている。抗腫瘍活性についての経口投与実験例としては NANBA et al. (1987)<sup>9)</sup> <sup>10)</sup> によるシイタケ粉末を用いた報告や OHKUMA et al. (1982, 1983)<sup>11)</sup> <sup>12)</sup> らによる EA6 についての報告がある。我々が行ってきたおかやま地どりに対する杜仲葉投与では、杜仲から単独の成分を抽出して摂取させたわけではなく、乾燥杜仲葉を食餌として摂取させている。この場合の効果は、単一成分だけによる影響ではなく、複数の成分が関与している可能性が考えられる。

そこで、本実験では杜仲種子由来のグッタペルカをおかやま地どりに経口投与し、ワクチン接種条件下で免疫応答にどのような影響を及ぼすかを検討した。

1. 美作大学短期大学部栄養学科 教授 Prof., Dept. of Nutrition Sciences, Mimasaka Junior College, Ph.D.
2. タカラ産業株式会社 会長 Chairman, TAKARA industrial incorporated company
3. 大阪大学大学院 工学研究科 教授 Prof., Graduate School of Engineering course, Osaka University, Ph.D.
4. 美作大学名誉学長 Honorary president, Mimasaka University, .

## 2. 材料と方法

### 2-1. 試料

大阪大学大学院工学研究科 Hitz バイオマス開発共同研究講座より供与された杜仲種子由来トランス型ポリイソプレレン (TPI) をミキサーにて粉末状にしたものを実験用試料 (30-60 メッシュ) とした。

### 2-2. 実験動物および飼育方法

TPI を家禽後期肥育用飼料に 1% 混入し、生後 100 日の「おかやま地どり」に 3 週間投与した。対照として、家禽後期肥育用飼料のみを与えたグループを設けた。各グループの鶏数は 10 羽から 12 羽とした。

### 2-3. 感作

ワクチンプログラムは生後 7 日目にニューカッスル病ワクチン、14 日目に伝染性ファブリキウス嚢病ワクチン、24 日目にニューカッスル病+伝染性気管支炎ワクチン、48 日目に再びニューカッスル病ワクチン投与を飲料水にて行った (Fig. 1)。

### 2-4. 分析方法

飼育終了後、断頭による放血により採血を行った。断頭は速やかに行われ、動物に苦痛を与えることはなかった。また定法により、各食用部位の総脂質量、コレステロール量、および脂肪酸組成を測定した。

TPI 投与の健康状態に与える影響はマイクロヘマトクリット法による全血ヘマトクリット値測定で検討した。また、乾燥杜仲葉投与のストレス反応に与える影響はメイ・ギムザ染色による偽好酸球/リンパ球比で検討した<sup>14)</sup>。乾燥杜仲葉投与の免疫活性に与える影響は蛍光ラテックスビーズ法による血中マクロファージ貪食能測定と、ケモタキシスチャンパー法による血中マクロファージ走化性の測定で検討した<sup>15)</sup>。

### 2-5. 末梢血からのリンパ球の分離および分析

末梢血からのリンパ球の分離および NK 細胞の活性を反映する CD8 $\alpha$ +細胞の測定は KUSHIMA et al. (2003) の方法<sup>16)</sup>に従った。全血は先述の通り、断頭による放

血によりヘパリン処理されたシリンジに採血を行った。全血に低張液を加え、溶血させた後、Ficol-paque (Amersham Pharmacia Biotech, USA) を用いた濃度勾配溶液を 50 $\times$ g にて 30 分遠心分離を行い、末梢血単核細胞 (PBMC) を得た。得られた細胞集団は 10% 牛胎児血清を含んだ Isocove's modified Dulbecco's medium (FBS-IMDM) で 3 回洗浄した。CD8 $\alpha$ +細胞発現は、FITC で標識されたモノクローナル抗体を用い、フローサイトメーター (COLTER EPICS EI-ITE, COLTER, USA) にて測定した。

### 2-6. 統計処理

各群間の平均値の有意差検定は Yukumus statistical library を用い、Duncan's multiple range test にて行った。

## 3. 結果

### 3-1. 体重増加量

100 日齢時に体重が均等になるように対照群、TPI 投与群に分け、その後 3 週間それぞれの飼料で飼育を行った。TPI 投与により、体重上昇の抑制が見られたが有意差は認められなかった (Table 1)。

### 3-2. 全血ヘマトクリット値

全血ヘマトクリット値に有意差は見られず、体重増加抑制に伴う健康状態悪化は観察されなかった (Table 2)。

### 3-3. 血液中の偽好酸球とリンパ球の比率 (H/L 比)

TPI 投与により、ストレスの指標となる血液中の偽好酸球とリンパ球の比率 (H/L 比) が有意に低下したことから、TPI 投与によるストレス軽減効果の可能性が示唆された (Table 3)。

### 3-4. マクロファージ貪食能

免疫反応の指標となるマクロファージの貪食能は対照群が 46 $\pm$ 3%、TPI 投与群が 58 $\pm$ 3% となり、TPI 投与群において有意に上昇した (Table 4)。一方、走化

性も対照群が 49±2%、TPI 投与群が 57±3%となり、TPI 投与群において有意に上昇した (Table 5)。

### 3-5. NK 細胞の活性

免疫反応の指標となる NK 細胞の活性は CD8 $\alpha$ +細胞の測定を持って検討した。CD8 $\alpha$ +細胞の発現は対照群が 16±1.5%、TPI 投与群が 29±2.1%であり、TPI 投与群において有意に上昇した (Table 7)。これらの結果により、TPI 投与による免疫能活性化効果の可能性が示唆された。

## 4. 考察

本実験条件下において、TPI 投与による体重上昇の抑制が見られたが、全血ヘマトクリット値に有意差は見られず、体重増加抑制に伴う健康状態悪化は観察されなかった。また TPI 投与により、ストレスの指標となる血液中の偽好酸球とリンパ球の比率 (H/L 比) が低下したことから、TPI 投与によるストレス軽減効果の可能性が示唆された。

グッタペルカのような難消化性の、いわゆる食物繊維には前述のように免疫賦活作用のある成分が存在するが、その多くは多糖類である。最近、食物繊維の中にも消化管免疫に対して影響を及ぼすものがあるという研究結果が発表された。LIM et al. (1997)<sup>7)</sup> は水溶性食物繊維の中でペクチンを経口投与することにより血清中の IgG、IgA の濃度が増加し、アレルギーの要因であるといわれている IgE の濃度を低下させるという全身性免疫への影響のほか、腸管膜リンパ節中のリンパ球が産生する IgA 濃度の増加および IFN- $\gamma$  や TNF- $\alpha$  などのサイトカインの増加という局所免疫である消化管免疫への影響の可能性を示唆したが、キトサンは血清中の IgA を減少させると報告している。これに対し、MIGUEL et al. (1992)<sup>16)</sup> および MAEDA et al. (1992)<sup>17)</sup> はキチン質が免疫賦活効果のあることを報告している。Kudoh et al. (1998)<sup>8)</sup> は、菌類子実体 (しいたけなど) の難消化性糖質の経口投与による消化管粘膜中の  $\kappa$ -light chain および IgA 発現細胞の割合の増加を認めている。食物繊維の一種である  $\beta$ -D-

グルカンや EAG の抗腫瘍活性の発現については宿主の免疫機能を賦活することによって起こるとされている<sup>5)</sup>。このような免疫賦活作用が消化管粘膜の中でも発現されているとすれば、グッタペルカの経口投与は消化管粘膜免疫に対して影響を及ぼすことは十分考えられる。また本実験では NK 細胞活性の指標となる CD8 $\alpha$ +細胞の発現を検討したが、TPI 投与により有意に CD8 $\alpha$ +細胞の発現増加が認められた。本実験で得られた結果は、TPI のような糖質以外の食物繊維においても免疫賦活作用を持ち得る可能性があること強く示している。

### ワクチンプログラム

(投与は飲水投与)

7	14	24	48(日齢)
NB	IBD	NB	ND

ND:ニューカッスル病

NB:ND+伝染性気管支炎

IBD:伝染性ファブリキウス囊病

Fig.1 おかやま地どりワクチンプログラム

Table 1. おかやま地どりの各飼料における体重測定結果(kg)

	100 日齢	121 日齢
対照群	3.10±0.25	3.32±0.31
TPI 投与群	3.08±0.18	3.11±0.25

Values are mean  $\pm$  S.E.(n=10 to 12)

Table 2 鶏全血ヘマトクリット値(%)

対照群	30.3±2.0
TPI 投与群	30.1±1.8

Values are mean  $\pm$  S.E.(n=10 to 12)

Table 3 血液中の偽好酸球とリンパ球の比率 (H/L 比)

対照群	0.41±0.01 <sup>a</sup>
TPI 投与群	0.32±0.01 <sup>b</sup>

Values are mean  $\pm$  S.E.(n=10 to 12)

Values with different superscript letters are significantly different(p<0.05)

Table 4 マクロファージ貪食能 (%)

対照群 46±3<sup>a</sup>

TPI 投与群 58±3<sup>b</sup>

Values are mean ± S.E.(n=10 to 12)

Values with different superscript letters are significantly different(p<0.05)

Table 5 マクロファージ走化性 (%)

対照群 49±2<sup>a</sup>

TPI 投与群 57±3<sup>b</sup>

Values are mean ± S.E.(n=10 to 12)

Values with different superscript letters are significantly different(p<0.05)

Table 6 末梢血からのリンパ球の CD8 $\alpha$ +細胞の発現 (%)

対照群 16±1.5<sup>a</sup>

TPI 投与群 29±2.1<sup>b</sup>

Values are mean ± S.E.(n=10 to 12)

Values with different superscript letters are significantly different(p<0.05)

## 5. 謝辞

本研究を進めるに当たり、乾燥杜仲葉を提供してくださった小林製薬株式会社、ならびにご指導頂きました東京農業大学の田所忠弘教授に謝意を表します。

## 6. 引用文献

- 1)Chika Takamura, Tetsuya Hirata, Yasuyo Yamaguchi, Masateru Ono, Hiroyuki Miyashita, Tsuyoshi Ikeda and Toshihiro Nohara:Studies on the chemical constituents of green leaves of *Eucommia ulmoides* Oliv., *Journal of Natural Medicines*,61:220–221(2007)
- 2)Nakamura T.,Nakazawa Y., Onizuka S., Saori Satoh, Chiba A., Sekihashi K., Miura A., Yasugahira N.,Sasaki Y.F: Antimutagenicity of Tochu tea (an aqueous extract of *Eucommia ulmoides* leaves): - 1.

The clastogen-suppressing effects of Tochu tea in CHO cells and mice, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 388, 7-20(1997)

3) 矢崎 廣久, 福島 悦子, 加瀬 信明, 竹田 敏晴:杜仲葉の生理活性成分に関する調査,千葉衛研報告,22号,5–9(1998)

4)中里光男,小川 仁志,牛山 博文,小林 千種,只野 敬子,川合 由華,立石 恭也,田村 行弘,松 俊夫, 杜仲葉を主原料とした健康食品中のゲニポシド酸及びカフェインの分析, *食品衛生学雑誌*,37,343-350(1996)

5)駒井 功一郎, 中杉 徹, 辻井 郁雄, 三浦 睦, 浜田 昌之:Asperuloside およびその関連配糖体の生長抑制作用と作用機構, *雑草研究*.別号,28, 27-28(1989)

6)CALIS Ihsan, KIRMIZIBEKMEZ Hasan, TASDEMIR Deniz, IRELAND Chris M.:Iridoid Glycosides from *Globularia davisiana*, *Chemical & pharmaceutical bulletin*,50,678-680(2002)

7)Lim,B.O.,Yamada,K.,Nonaka,M.,Kumamoto,Y.,Hung,P. and Sugano,M.:Dietary Fibers Modulate Indices of Intestinal Immune Function in Rats, *Journal of Nutritio.*,127,663-667(1997)

8)Kudoh,K.,Shimizu,J.,Wada,M.,Takita,T.,Kanke,Y and Innami,T.:Effect of indigestible saccharides on B lymphocytes response of intestinal mucosa and fermentation in rats, *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*,44,103-112(1998)

9)Nanba,H.,mori,K.,Toyomasu,T.,and Kuroda,H.: Antitumor action of shiitake (*Lentinus edodes*) fruit bodies orally administered to mice., *Chemical & pharmaceutical bulletin*,35,2453-2458(1987)

10) Nanba,H.and Kuroda,H.: Antitumor mechanisms of orally administered shiitake fruit bodies., *Chemical & pharmaceutical bulletin*,35,2459-2464(1987)

11)Ohkuma,T.,Otagiri,K.,Ikekawa,T.and Tanaka.S.: Augmentation of antitumor activity by combined cryo-destruction of sarcoma 180 and protein-bound

polysaccharide, EA6, isolated from Flammulina velutipes (Curt. ex Fr.) Sing. in ICR mice.,  
JOURNAL OF

PHARMACOBIO-DYNAMICS,5,439-444(1982)

12) Ohkuma,T., Tanaka.S.,and Ikekawa,T.:  
Augmentation of host's immunity by combined  
cryodestruction of sarcoma 180 and administration  
of protein-bound polysaccharide, EA6, isolated from  
Flammulina velutipes (Curt. ex Fr.) Sing. in ICR  
mice. JOURNAL OF

PHARMACOBIO-DYNAMICS.,6,88-95(1983)

13) 平原 敏史, 新村 毅,江口 祐輔, 植竹 勝治, 田中  
智夫:産卵鶏の 6 つの飼育システムにおける生産性と  
生理・免疫反応の比較, 日本家畜管理学会  
44,150-151(2008)

14)El-Abasy, M., Motobu, M., Shimura, K., Na, K-J.,  
Kang, C-B., Koge, K., Onodera, T., and Hirota, Y:  
Immunostimulating and growth-promoting effect of  
sugar cane extract (SCE) in chickens., , Journal of  
Veterinary Medical Science, 64,1061-1063(2002).

15) KUSHIMA K., FUJITA M., SHIGETA A.,  
HORIUCHI H., MATSUDA H.,FURUSAWA S.:Flow  
Cytometric Analysis of Chicken NK Activity and  
Its Use on the Effect of Restraint Stress., Journal of  
Veterinary Medical Science,65,995-1000(2003)

16) Sosa Miguel A. G., Fazely Fatemeh, Koch John  
A., Vercellotti Sharon V.:Ruprecht Ruth  
M.N-Carboxymethylchitosan-N,O-sulfate as an  
anti-HIV-1 agent., Biochemical and biophysical  
research communications.,174,489-496(1992)

17) Maeda, M., Murakami, H., Ohta, H. and Tajima,  
M.:Stimulation of igm production in human-human  
hybridoma. HB4C5 cells by chitosan. Bioscience,  
Biotechnology, and Biochemistry, 56: 427-431 (1992)