

乾燥杜仲葉投与による鶏免疫活性向上効果の検討

Effect of feeding dry *Eucommia ulmoides* to immuno-activities in chickens

○桑守正範¹、内田教光²、目瀬守男¹

(1. 美作大学短期大学部 栄養学科、2. タカラ産業株式会社 杜仲開発部)

Masanori KUWAMORI, Mitsunori UCHIDA, and Morio MESE,

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¹⁾。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。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²⁾⁶⁾。我々はおかねてから乾燥杜仲葉を「おかやま地どり」に投与し、商品価値を高める検討を行ってきた。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。

本論

1.序論

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⁷⁾。工藤ら⁸⁾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 ら^{9) 10)}によるシイタケ粉末を用いた報告や OHKUMA¹¹⁾¹²⁾らによる EA6 についての報告がある。しかし、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、乾燥杜仲葉を食品として摂取している。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。しかしながら、杜仲そのものを経口投与した場合の消化管免疫に対する影響を調べた報告はない。

そこで、摂取形態の 1 モデルとして杜仲凍結乾燥粉末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。

2. 実験方法

2-1. 試料と一般成分分析

実験に供した乾燥杜仲葉（中国四川省産）はそれぞれ焙煎・乾燥後、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。またゲニポシド酸などの水溶性機能性成分、ペクチンなど水溶性食物繊維といった水溶性成分の影響を検討するため、熱湯抽出を行った乾燥杜仲葉を再乾燥させたものも飼料として与えた。各杜仲試料の一般成分分析は常法により、また食物繊維はLEE らによる方法¹³⁾でそれぞれ分析した。

2-2. 実験動物および飼育方法

焙煎後に乾燥した杜仲葉、および熱湯により水溶性成分を煮出した後の残渣を乾燥させたもの（ゲニポシド酸は 99%失われている）を家禽後期肥育用飼料に 3%混入し、生後 80 日の「おかやま地どり」に 3 週間投与した。

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)。

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嚢病

Fig.1 おかやま地どりワクチンプログラム

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。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。

乾燥杜仲葉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 (H)/リンパ球 (L)比で検討した¹⁴⁾。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¹⁵⁾。

2-5. 統計処理

各群間の平均値の有意差検定は Bartlett 検定による分散分析を行った後、Duncan's multiple range test にて行った。

3. 結果

3-1. 杜仲葉および煮沸杜仲葉の一般成分

本実験で用いた杜仲葉の一般成分を Table2 に示した。乾燥杜仲葉はタンパク質 13.1%，食物繊維 41.8%であり、煮沸杜仲葉はタンパク質 11.4%，食物繊維 33.7%であった。

Table2

杜仲葉 (E.U.) および乾燥煮沸杜仲葉 (B.E.U) の一般成分(100g中の含有量)

	E.U	B.E.U
水分	1.3g	3.8g
たんぱく質	13.1g	11.4g
脂質	5.3g	6.3g
灰分	11.6g	8.5g
糖質	52.6g	22.5g
食物繊維	41.8g	33.7g
ゲニポシド酸	300mg	—

3-2.体重増加量

乾燥杜仲葉投与により、体重上昇の抑制が見られた(Fig.3)。

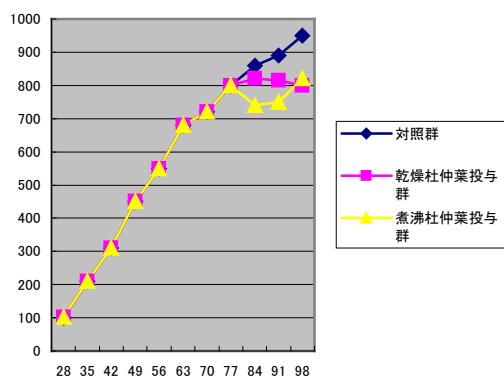


Fig3.おかやま地どりの各飼料における成長曲線

3-3.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 3)。

Table3 鶏全血ヘマトクリット値

対照群	30.3±2.0
乾燥杜仲葉投与群	30.1±1.8
煮沸杜仲葉投与群	29.5±1.6

Values are mean ± S.E.(n=10 to 12)

3-4.血液中の偽好酸球とリンパ球の比率 (H/L 比)

乾燥杜仲葉投与により、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、乾燥杜仲葉投与によるストレス軽減効果の可能性が示唆された (Table 4)。

Table4 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
乾燥杜仲葉投与群	0.32±0.01
煮沸杜仲葉投与群	0.34±0.01

Values are mean ± S.E.(n=10 to 12)

3-5.マクロファージ食食能

免疫反応の指標となるマクロファージの食食能は対照群 (一般飼料のみ投与) が 46±3、乾燥杜仲葉投与群が 58±3、杜仲茶煮出後残渣乾燥物投与群が 56±2 であり、対照群と比較して乾燥杜仲葉投与群、杜仲茶煮出後残渣乾燥物投与群ともに有意に上昇した (Table 5)。

Table5 マクロファージ食食能

対照群	46±3 ^a
乾燥杜仲葉投与群	58±3 ^b
煮沸杜仲葉投与群	56±2 ^b

Values are mean ± S.E.(n=10 to 12)

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

一方、走化性も対照群が 49 ± 2 、乾燥杜仲葉投与群が 57 ± 3 、杜仲茶煮出後残渣乾燥物投与群が 55 ± 2 であり、対照群と比較して乾燥杜仲葉投与群、杜仲茶煮出後残渣乾燥物投与群ともに有意に上昇した (Table 6)。これらの結果により、乾燥杜仲葉投与による免疫能活性化効果の可能性が示唆された。

Table6 マクロファージ走化性

対照群	49 ± 2^a
乾燥杜仲葉投与群	57 ± 3^b
煮沸杜仲葉投与群	55 ± 2^b

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

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

4. 考察

本実験条件下において、乾燥杜仲葉投与により、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。体重上昇抑制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)の働きによるものと考えられる。群間の飼料摂取量を揃えるために pair feeding を行う必要があるが、その点は今後の検討課題としたい。

また乾燥杜仲葉投与により、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、乾燥杜仲葉投与によるストレス軽減効果の可能性が示唆された。この結果より、乾燥杜仲葉投与群の摂食量低下はストレス性のものではなく、やはり Asperuloside(ASP)の働きによる可能性が強まった。

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 ら⁷⁾ は水溶性食物繊維の中でベタ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- γ や TNF- α 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 ら¹⁶⁾ および MAEDA ら¹⁷⁾ はキチン質が免疫賦活効果のあることを報告している。工藤ら⁸⁾ 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 κ -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 β -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⁵⁾。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。

今回の実験ではマクロファージの応答の程度が当初の予想より弱かった。その原因の一つとしては、杜仲葉の乾燥粉末そのものを 3% レベルで投与したために食餌中のグッタペルカ含有量が少なかったことが考えられる。グッタペルカそのものを動物に与える実験が必要であろう。またワクチン接種については、今回経口投与を行ったが、この場合は消化管粘膜の抗原特異的 IgA の産生が認められている^{18) 19)}。本実験のように食物繊維を含む乾燥杜仲葉の経口投与による消化管免疫応答を観察するには抗原の経口投与による直接的な刺激は

好ましくないと考えられるところから、今後は抗原の非感作条件下で、グッタペルカの消化管粘膜の免疫応答をさらに検討する必要がある。

結語

焙煎後に乾燥した杜仲葉、および熱湯により水溶性成分を煮出した後の残渣を乾燥させたものを家禽後期肥育用飼料に3%混入し、生後80日の「おこやま地どり」に3週間投与した。乾燥杜仲葉投与により、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、乾燥杜仲葉投与により、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乾燥杜仲葉投与によるストレス軽減効果の可能性が示唆された。免疫反応の指標となるマクロファージの食食能は対照群と比較して乾燥杜仲葉投与群、杜仲茶煮出後残渣乾燥物投与群ともに有意に上昇した。一方、走化性も対照群と比較して乾燥杜仲葉投与群、杜仲茶煮出後残渣乾燥物投与群ともに有意に上昇した。これらの結果により、乾燥杜仲葉投与による免疫能活性化効果の可能性が示唆された。

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大阪大学大学院工学研究科の中澤慶久先生、小林昭雄先生に謝意を表します。

参考文献

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.,

J. Nat. Med. 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, *J.Nutr.*, 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, *J.Nutr.Sci.Vitaminol.*, 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., *Chem.Pharm.Bull.*, 35, 2453-2458 (1987)

10) Nanba, H. and Kuroda, H.: Antitumor mechanisms of orally administered shiitake fruit

bodies.,*Chem.Pharm.Bull.*,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., *J.Pharmacobio-Dyn.*,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.,*J.Pharmacobio-Dyn.*,6,88-95(1983)

13)Lee,S.C.,and Hicks,V.a.:*New developments in dietary fiber*,Plenum press,New York,P.237(1990)

14) 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)

15)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., *J. Vet. Med. Sci.* 64, 1061-1063 (2002).

16) Sosa Miguel A. G., Fazely Fatemeh, Koch John A., Vercellotti Sharon V.:Ruprecht Ruth M.N-Carboxymethylchitosan-N,0-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. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 56: 427-431 (1992)

18) Yasui, H., Nagaoka, N., Mike, A., Hayakawa, K., and Ohwaki, M.: Detection of Bifidobacterium strains

that induce large quantities of IgA. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 5, 155-162 (1992)

19) M Marinaro, H F Staats, T Hiroi, R J Jackson, M Coste, P N Boyaka, N Okahashi, M Yamamoto, H Kiyono, H Bluethmann, K Fujihashi, J R McGhee:Mucosal adjuvant effect of cholera toxin in mice results from induction of T helper 2 (Th2) cells and IL-4, *Journal of immunology*, 155, 4621-4629 (1995)