

採卵鶏の免疫応答に及ぼす脱塩濃縮梅酢の影響

伊丹哲哉¹・上田雅彦¹・香川高士¹・黒田順史²・吉村幸則³

¹ 和歌山県農林水産総合技術センター畜産試験場養鶏研究所, 和歌山県日高郡中津村船津 644-1111

² 和歌山県紀北家畜保健衛生所, 和歌山市園部 640-8483

³ 広島大学大学院生物圏科学研究科, 東広島市鏡山 739-8528

脱塩濃縮梅酢 (BX70) を飼料に添加し, 白色レグホン種産卵鶏の免疫機能に及ぼす影響を検討した。試験区は, BX70 を 0.07%, 0.14% および 2.80% の割合で添加した区 (以下, 0.07% 区, 0.14% 区, および 2.80% 区) を設定し, 対照区は無添加とした。各区には 50 羽を供試し, 70~510 日齢の間, 自由採食とした。細胞性免疫の指標としては, フィトヘマグルチニン P に対する遅延型過敏反応 (DHT) を行った。また, 液性免疫の指標としては, ニューカッスル病ワクチン抗体価 (以下, ND-HI 価), ニワトリ伝染性気管支炎ワクチン抗体価 (以下, IB-SP 値), 血清中 IgG 濃度およびブルセラ・アボルタス抗原に対する血清中凝集抗体価 (IgG および IgG+IgM) を調べた。試験は各区から 10 羽を無作為に抽出して行った。

DHT は, 492 日齢では 0.07% 区が対照区より有意に高かった。ND-HI 価は, 215, 320, 428 および 500 日齢で 0.07% 区および 2.80% 区が対照区より有意に高かった。IB-SP 値は, 428 および 500 日齢で 0.14% 区が対照区より有意に高かった。血清中 IgG 濃度は, 218 日齢では 0.07% 区および 2.80% 区で, 429 日齢では 2.80% 区で, 501 日齢では 0.07% 区で対照区より有意に高かった。ブルセラ・アボルタス抗体価 (IgG+IgM) は, 241 日齢において 0.14% 区で対照区より有意に高かった。これらのことから BX70 の産卵鶏への給与は, 細胞性および液性免疫機能を亢進するものと考えられた。

キーワード: 採卵鶏, 脱塩濃縮梅酢, 免疫機能

緒言

著者らは, 梅漬けの副産物として産出される梅酢を濃縮した BX70 を製造した。BX70 は, 梅肉エキス同様に, クエン酸やリンゴ酸などの有機酸, ミネラルを豊富に含み, 産卵鶏へ給与すると, 産卵性および卵質を改善させる効果がある (伊丹ら, 2005)。BX70 の原料である梅は古来から和漢民間薬として使用されており (亀岡と北側, 1976), その作用には免疫応答の亢進に関連している可能性が考えられる。一方, クエン酸などの有機酸の給与が液性免疫の機能を亢進させることが報告されている (Hadri *et al.*, 2004)。BX70 はクエン酸を 35.3%, リンゴ酸を 10.2% と有機酸を多く含み (伊丹ら, 2005), これを

給与することによっても免疫能を改善させる可能性が考えられる。そこで本実験は, BX70 を飼料に添加し, 産卵鶏の免疫機能への影響を追究した。

材料と方法

1. 供試鶏および管理

2002 年 3 月 19 日に孵化した白色レグホン種産卵鶏 (ジュリア) を初生ヒナで導入して育成し, 70 日齢で試験鶏舎に移動して試験を開始した。試験鶏舎では, 供試鶏は単飼ケージで飼養し, 照明条件を 14L:10D とした。飼料は市販飼料 (株式会社日本配合飼料, 神戸市) で, 70~120 日齢は大雛用 (CP 14.0% 以上, ME 2,780 kcal/kg), 121~510 日齢は成鶏用 (CP 17.0% 以上, ME 2,850 kcal/kg) を用いた。これに下述の濃度で BX70 を飼料に添加して 70 日齢から試験終了まで自由採食させた。飲水は自由摂取とした。供試鶏のワクチネーションは, 4 日齢と 28 日齢にニュースカッスル・IB 混合ワクチン「カケツケン」(化学及血清療法研究所, 熊本市) を飲水で, 14 日齢で IBD 生ワクチン「パーシン 2」(ゲン

2006 年 4 月 24 日受付, 2006 年 6 月 5 日受理

連絡者: 伊丹哲哉

和歌山県日高郡中津村船津 1090-1

Tel: 0738-54-0144

Fax: 0738-54-0966

E-mail: itami_t0001@pref.wakayama.lg.jp

コーポレーション, 岐阜市) を飲水で接種した。次いで, 21 日齢で日生研穿刺用鶏痘ワクチン (日生研株式会社, 青梅市) を翼部筋膜穿針により, 45 日齢で「オイルボックス NB2AC」(化学及血清療法研究所) を頸部皮下注射により, 58 日齢で鶏ロイコチトゾーン病ワクチン「北研」(社団法人北里研究所, 東京都港区) を脚部筋肉注射により, 67 日齢で「オイルボックス EDS-76」(化学及血清療法研究所) を脚部筋肉注射により, および 84 日齢に「レイヤーミューン SE」(第一科学株式会社, 東京都中央区) を頸部皮下注射で投与した。

2. 試験区分

試験区は BX70 を市販飼料へ 0.07%, 0.14% および 2.80% 添加した区 (以下それぞれ, 0.07% 区, 0.14% 区および 2.80% 区) および無添加の対照区の 4 区とし, 各区には 50 羽を供試した。なお, BX70 は伊丹ら (2005) の報告と同じ組成のものを使用した。

3. 調査項目

(1) 遅延型過敏反応 (DHT)

各試験区より 10 羽を抽出し, 同一個体において, 210, 387 および 492 日齢に遅延型過敏反応検査を行い細胞性免疫の指標とした (Cook *et al.*, 1982)。すなわち, まず, 左右の肉垂の厚さを測定した。その後, 滅菌 PBS に溶解した 0.1% フィトヘマグルチニン-P (和光純薬工業株式会社, 大阪市) を右肉垂に, 滅菌 PBS を左肉垂に接種し, 24 時間後に再度肉垂の厚さを測定した。接種前後の右肉垂の測定値の差 (右肉垂の腫脹の厚さ) から接種前後の左肉垂の測定値の差を除いたものを判定値 (以下, PHA-P 値) とした。

(2) ニューカッスル病ワクチン抗体価 (ND-HI 価)

各試験区より 10 羽を抽出し, 215, 320, 428 および 500 日齢に翼下静脈より真空採血管を用いて採血し, 1,600×g, 10 分間の条件で遠心分離して, 血清を試験に供した。ワクチン抗体価は, ニューカッスル病赤血球凝集素 (化学及血清療法研究所) を用いたマイクロタイター法で測定した (井上ら, 1971; 藤原ら, 1973)。すなわち, V 字底マイクロトレーのウェルに滅菌リン酸緩衝食塩水 (PBS) 25 μ l を加え, 被検血清を 25 μ l を 1 列目に加え, ダイリューターを用いて 2 倍ずつ段階希釈し, その後ニューカッスル病赤血球凝集素 25 μ l と鶏血球液 25 μ l を順に加え, 室温で 60 分間インキュベートした後, 凝集抑制した最終倍率を ND-HI 価とした。

(3) ニワトリ伝染性気管支炎ワクチン抗体価 (IB-SP 値)

ニワトリ伝染性気管支炎ワクチン抗体価の測定には, 上述の ND-HI 価の測定に供したのと同じ血清を用いた。IB エリーザキット (アイデックスラボラトリーズ株

式会社, 東京都三鷹市) を用いて, 125 倍に希釈した血清 25 μ l と血清希釈液 75 μ l を, 測定用プレートの各ウェルに分注し, 30 分間室温で反応後, 蛍光抗体ラベル血清 100 μ l を加え, 再度 30 分反応後, 蒸留水で 4 回洗い, 酵素基質溶液 (テトラメチルベンゼン溶液) 100 μ l, 反応停止液 (0.12% フッ化水素酸) 100 μ l を順に加えた。被検血清以外に, 陽性数値および陰性数値が明確にされている指示血清 (キット添付のもの) も同様の処理を行った。以上の処理を行った測定用プレートを吸光マイクロプレートリーダーサンライズクラシック 526-79701 (テカンジャパン株式会社, 川崎市) で OD 値を求めた。

SP 値は測定した OD 値より以下の式で求められた。

SP 値 =

$$\frac{\text{被検血清のOD値} - \text{陽性指示血清のOD値}}{\text{被検血清のOD値} - \text{陰性指示血清のOD値}}$$

これらは Dewit *et al.* (1997) の方法に準拠して行った。

(4) 血清中 IgG 濃度の測定

各試験区より 10 羽を抽出し, 218, 317, 429 および 501 日齢に翼下静脈より真空採血管を用いて採血し, 1,600×g, 10 分間の条件で遠心分離した血清を試験に供した。供試鶏は, ND-HI 価と IB-SP 値の測定用に採血したものを除いて抽出した。血清を滅菌蒸留水により 10 倍希釈し, ニワトリ IgG プレート (エコスティック研究所, 古川市) の各ウェルに 5 μ l ずつ分注, 48 時間室温で反応させた後, 反応した円の直径を測定した。得られた数値と既知の濃度の IgG を含む標準血清より作成した検量線から IgG 濃度を求めた。

(5) ブルセラ・アボルトス抗原 (BA) に対する凝集抗体価

各試験区より 241 および 417 日齢に 10 羽を抽出し, 0.1 ml のブルセラ・アボルトス抗原 (以下, BA 抗原; 化学及血清療法研究所) を浅胸筋に接種した。1 週間後に採血して血清を分離し, 凝集抗体価を測定した。供試鶏は, 他の試験に供していないものから選定し, 採血ならびに血清分離の方法は他の試験と同一の方法をとった。血清の半分については, 0.1M 2-メルカプトエタノール (ME) 溶液 (0.1M Tris-HCl 緩衝液, pH 8.0, 100 ml に 2-ME を 1.26 ml 添加) と血清を等量加え, 37°C で 60 分間インキュベートし, 2-ME 処理血清とした。凝集抗体価の測定は U 底マイクロプレートの各ウェルに 0.05% 牛血清アルブミン (シグマアドリッチ株式会社, 東京都) 添加 PBS を 50 μ l ずつ分注し, 1 列目のウェルに未処理血清と 2-ME 処理血清を各々 50 μ l 注入し, ダイリューターを用いて 2 倍段階希釈をを行った。その後, 再度各ウェルに PBS を 50 μ l 加え, 1 分間振動混和後, 24 時間

室温にて湿潤箱で静置した。凝集の得られた最高倍率をもって凝集抗体価とした (Munns and Lamont, 1990)。得られた数値は、ブルセラ・アボルタス抗原に対する IgG 抗体価 (2-ME 処理血清の抗体価) および IgG+IgM 抗体価 (2-ME 未処理血清の抗体価) とし、両者の差を IgM 抗体価とした。

4. 統計分析

各測定項目については、分散分析と Duncan の多重検定で解析した。P<0.05 を有意差があるものとした。

結 果

フィットヘマグルチニン P 接種による遅延型過敏反応に及ぼす影響を表 1 に示した。210 および 387 日齢では、添加各区と対照区との間では有意差は認められなかったが、492 日齢では 0.07% 区が対照区より有意に高い値を示した。

ND-HI 価については、215, 320, 428 および 500 日齢で、0.07% 区および 2.80% 区が対照区より有意に高い数値を示した。500 日齢では、2.80% 区 0.07% 区および 0.14% 区よりも有意に高くなった (図 1)。IB-SP 値は 215 および 320 日齢では BX70 による有意な影響を示さなかったが、428 および 500 日齢で 0.14% 区が対照区より有意に高い値を示した (図 2)。

血清中 IgG 濃度は、218 日齢で 0.07% 区および 2.80% 区で、429 日齢においては 2.80% 区で、501 日齢においては 0.07% 区で対照区より有意に高い数値を示した (図 3)。

ブルセラ・アボルタス抗原に対する血液中凝集抗体価では、241 日齢では 0.14% 区の IgG+IgM が対照区より有意に高い数値を示した。417 日齢の IgG は、0.14% 区が 2.80% 区よりも有意に高い値を示したが、IgG+IgM および IgM については添加区と対照区との間に有意差は認められなかった (図 4)。

考 察

鶏の免疫機能には、生体内に侵入した異物をマクロファージや顆粒球などが貪食する自然免疫能とリンパ球による獲得免疫能があり、それらが多様に連動していることが知られている (Zekarias *et al.*, 2002)。獲得免疫は、細胞性免疫と液性免疫に大別され、このうち遅延型過敏反応は細胞性免疫応答の一指標として考えられる (Cook *et al.*, 1982)。本実験では、遅延型過敏反応を測定したところ、492 日齢に 0.07% 区で対照区に対して有意に高い数値を示した。このことは、BX70 は細胞性免疫応答の亢進に有効で、特に産卵後期で高い効果があることを示す。

液性免疫への影響の評価として、ワクチン抗体価への影響、自然抗体としての IgG、ブルセラ・アボルタス抗原に対する血液中凝集抗体価の測定を実施した。ワクチン抗体価のうち、ND-HI 価は各日齢で 0.07% 区および 2.80% 区が対照区より有意に高かった。一方、IB-SP 値は、428 日齢および 500 日齢において 0.14% 区が対照区より有意に高かった。すなわち BX70 は ND-HI 価に対しては産卵前期から後期まで効果が認められ、IB-SP 値に対しては産卵後期のみで効果が得られると考えられる。このことは、BX70 の添加は ND-HI 価と IB-SP 値のいずれにも効果があると思われるが、有効な時期がワクチンの種類で異なる可能性が示唆される。

IgG はワクチン接種鶏を用いたので、育成時に接種したワクチン及び環境中に存在する異物に対する抗体のレベルを反映していると考えられる。これらは、異物が生体内に侵入した際に広い範囲の抗原を認識して不活化する役割を持つと考えられる。日齢と BX70 の添加濃度に一定の傾向は示されなかったが、BX70 添加は試験期間中全体において IgG 濃度を高める傾向を示した。

ブルセラ・アボルタス抗原接種に伴う血液中凝集抗体

表 1. 産卵鶏への BX70 給与が PHA-P 反応に与える影響

試験区分	PHA-P 値 (mm)		
	210 日齢	387 日齢	492 日齢
対照区	0.283±0.060	1.266±0.309	0.880±0.194 ^b
0.07% BX70	0.318±0.040	1.457±0.266	1.589±0.185 ^a
0.14% BX70	0.330±0.068	1.850±0.149	1.226±0.188 ^{ab}
2.80% BX70	0.432±0.065	1.559±0.189	1.587±0.286 ^{ab}

数値は平均値±標準誤差 (n=10)。

同列異文字間で有意差あり (P<0.05)。

PHA-P 値=(PHA-P 接種後の肉垂の厚さ-接種前の肉垂の厚さ)-(PBS 接種後の肉垂の厚さ-接種前の肉垂の厚さ)

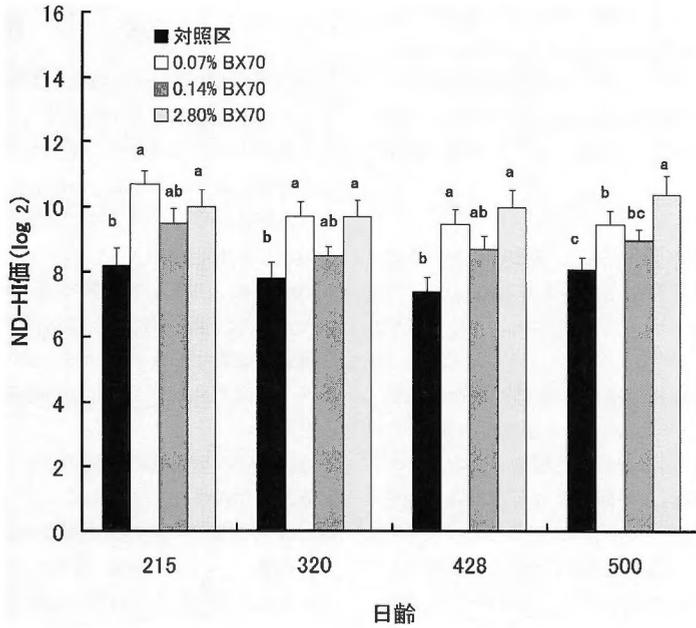


図 1. BX70 の飼料添加が異なる日齢の産卵鶏のニューカッスルワクチン抗体価に及ぼす影響 (ND-HI 値) 数値は平均値±標準誤差 (n=10)。各日齢内で異文字間に有意差あり (P<0.05)。

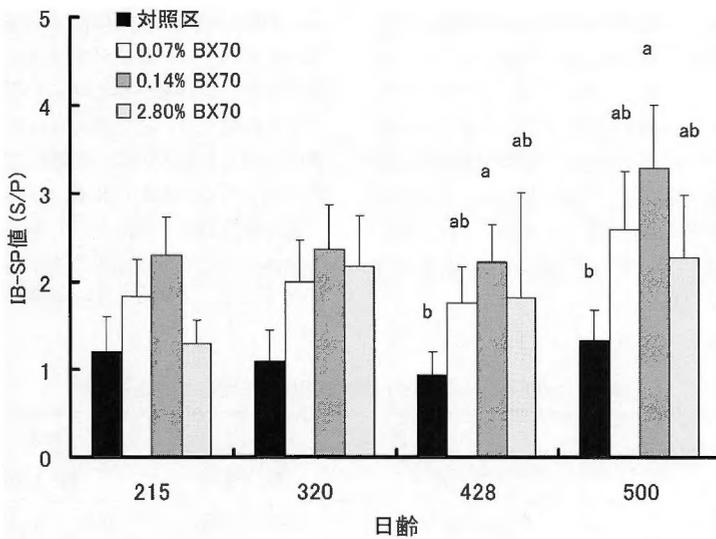


図 2. BX70 の飼料添加が異なる日齢の産卵鶏の IB ワクチン抗体価 (IB-SP 値) に及ぼす影響 数値は平均値±標準誤差 (n=10)。各日齢内で異文字間に有意差あり (P<0.05)。

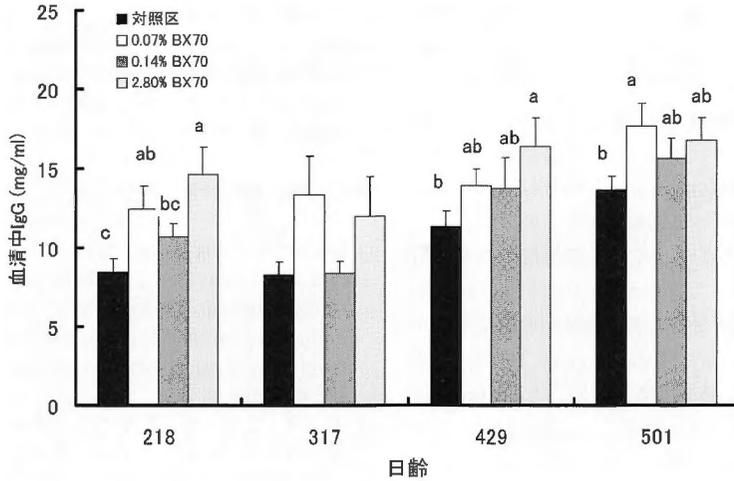


図 3. BX70 の飼料添加が異なる日齢の産卵鶏の血清中 IgG 濃度に及ぼす影響
 数値は平均値±標準誤差 (n=10)。
 各日齢内で異文字間に有意差あり (P<0.05)。

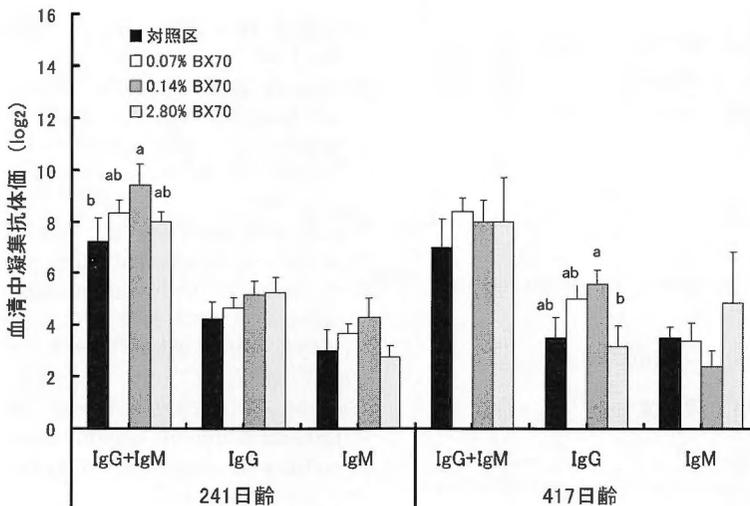


図 4. BX70 の飼料添加が異なる日齢の産卵鶏のブルセラ・アボルトス抗原に対する
 血清中凝集抗体価に及ぼす影響
 数値は平均値±標準誤差 (n=10)。
 各日齢内で異文字間に有意差あり (P<0.05)。

価は生体内に侵入した異物に対する T 細胞非依存性の抗体産生の機能を反映しており (Munns and Lamont, 1990), 鶏の抗体産生過程では, 他の動物と同じく初期には IgM 抗体, その後 IgG 抗体が産生されることが知られている (国安, 1985)。IgM 抗体は, ウイルスや細菌などの粒子状抗原に対してよく産生され, 一方, IgG 抗体

は可溶性抗原に対して有効な免疫反応を示す (国安, 1985)。今回の結果では, 産卵前期 (241 日齢) では, IgG + IgM が 0.14% 区で対照区に対して有意に高かったが, 産卵後期ではその差はなく, BX70 の効果が産卵前期に有効であった。

これらのことから, 効果が認められる日齢には異なる

ものの、BX70 は細胞性免疫と、ワクチン抗体価、自然抗体およびブルセラ・アポルタス抗原に対する抗体産生能で評価される液性免疫亢進に有効であると思われる。

制限給餌により液性免疫機能は低下するが、クエン酸を飲水摂取させることでその低下は抑えられることが知られている (Hadri *et al.*, 2004)。BX70 には、約 4 割以上のクエン酸をはじめとする有機酸が含まれていることから、BX70 による免疫応答の亢進は有機酸の効果が関わる可能性が考えられる。プロイラーにおいて、メチオニンの含量の増加が液性免疫応答や遅延型過敏反応を亢進すること (高橋ら, 1992, Tsiagbe *et al.*, 1987), バリン含量の増加が ND-HI 価を高めること (Bhargava *et al.*, 1970), ナトリウム含量が液性免疫応答を亢進すること (Pimentel and Cook, 1987) が知られている。これらのアミノ酸やナトリウムは BX70 に含まれている (伊丹ら, 2005)。BX70 の免疫機能増強の生理的機構は不明であるので、有機酸の効果やアミノ酸、ミネラルの関与は今後の検討を要する。

以上のことから BX70 の産卵鶏への給与は、細胞性および液性免疫を亢進するものと考えられる。今回の試験では、免疫応答の BX70 添加濃度による依存性は認められなかった。これは、産卵成績等に及ぼす結果と同様であり、有効な添加濃度は 0.07%~0.14% であると考えられる。

謝 辞

実験に使用した BX70 を共同で開発、提供してくださった、株式会社 紀州ほそ川 (和歌山県みなべ町)、ND-HI 価および IB-SP 値測定に協力して下さった和歌山県紀北家畜保健衛生所に深謝致します。

引用文献

Bhargava KK, Hanson RP and Sunde ML. Effects of methionine and valine on antibody production in chicks infected with Newcastle disease virus. *Journal of Nutrition*, 100 : 241-248. 1970.
Cook ME and Springer WT. Effect of Reovirus infection and dietary levels of selected vitamins on immunocompetence of chickens. *Avian Diseases*,

27 : 367-377. 1982.

Dewit JJ, Mekkes DR, Kouwenhoven B and Verheijden JHM. Sensitivity and specificity of serological tests for infections bronchitis virus antibodies in broiler. *Avian Pathology*, 26 : 105-118. 1997.

藤原三男・秦野好博・藤原若彦. マイクロタイター法のニューカッスル病赤血球凝集抑制反応への応用. *鶏病研究会報*, 9 : 124-129. 1973.

Hadri LE, Garlich JD, Qureshi MA, Ferket PR and Qdetallah NH. Glucose and electrolyte supplementation of drinking water improve the immune responses of poults with inanition. *Poultry Science*, 83 : 803-809. 2004.

井上 勇・三友 勇・野本貞夫・渡辺文男・斎藤憲彦・岡 豊夫. マイクロタイターを使用したニューカッスル病 HI 検査の実用化成績. *鶏病研究会報*, 7 : 191-194. 1971.

伊丹哲哉・香川高士・細川 清・吉村幸則. ニワトリの産卵性および卵質に及ぼす脱塩濃縮梅酢の影響. *日本家禽学会誌*, 42 : J209-J216. 2005.

亀岡 弘・北側忠次. 梅の果実の成分について. *日本農芸化学学会誌*, 50 : 389-393. 1976.

国安主税. 鶏の免疫グロブリン. *鶏病研究会報*, 21 : 39-50. 1985.

Munns PL and Lamont SL. Resarch Note : Effect of age immunization intrval on the anamnestic response to T-cell-dependent and T-cell-independent antigens in chickens. *Poultry Science*, 70 : 2371-2374. 1991.

Pimentel JL and Cook ME. Suppressed humoral immunity in chicks fed diets deficient in sodium, chlorohide, or both sodium and chloride. *Poultry Science*, 66 : 2005-2010. 1987.

高橋和昭. 鶏における飼料メチオニン含量と免疫応答の関係. *畜産の研究*, 46 : 1253-1258. 1992.

Tsiagbe VK, Cook ME, Harper AE and Sunde ML. Enhanced immune responses in broiler chicks fed methionine-supplemented diets. *Poultry Science*, 66 : 1147-1154. 1987.

Zekarias B, Huurne AHMT, Landaman WJM, Rebel JMJ, Pol JMA and Grays E. Immenological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Veterinary Research*, 33 : 109-125. 2002.

Improvement of Immunity Response by the Deionized and Condensed Ume Vinegar in Laying Hens

Tetsuya Itami¹, Masahiko Ueda¹, Takashi Kagawa¹, Yorifumi Kuroda²
and Yukinori Yoshimura³

¹ Wakayama Prefecture Research Center of Agriculture, Poultry Farming Research Laboratory, Forestry, Fisheries and Livestock Experimental Station, Hidaka-gun, Wakayama 644-1111

² Wakayama Livestock Health Center, Wakayama 640-8483

³ Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima 739-8528

The aim of this study was to examine the effects of deionized and condensed ume vinegar (BX70) on the immune functions in White Leghorn laying hens. Experimental birds are divided into four groups ; control, 0.07%, 0.14%, 2.80% groups which were supplemented with 0, 0.07, 0.14, or 2.80% of BX70 in feed, respectively. Each group consisted of 50 hens and were kept free access to the feed from 70- to 510-days-old. Delayed hypersensitivity test (DHT) using phytohemagglutinin-P (PHA-P) was performed to evaluate the cellular immunity. Newcastle disease antibody titer (ND-HI titer), Avian infectious bronchitis antibody titer (IB-SP value), IgG concentrations in serum, hemagglutinating antibodies titer (HA) to *Brucella abortus* (IgG and IgG+IgM) were examined as parameters of humoral immunity. The hens which were selected randomly were used for each test. The DHT value was significantly greater in 0.07% group than in control at 492 -days-old. The ND-HI titers were significantly higher in 0.07% and 2.80% groups than in control at 215-, 320-, 428- and 500-days-old. IB-SP values were significantly higher in 0.14% group than in control at 428- and 500-days-old. Serum IgG concentrations were significantly higher in 0.07% and 0.14% groups at 218- days-old, in 2.80% group at 429-days-old and in 0.07% group at 501-days-old compared with corresponding control. IgG+IgM titer of HA to *Brucella abortus* was significantly higher in 0.14% group than control at 417-days-old. These results show that BX70 may enhance cellular and humoral immune functions in laying hens.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, 43 : J103-J109, 2006)

Key words : laying hen, deionized and condensed ume vinegar, immune response