植物多糖体 C-UP Ⅲ による成牛および子牛の単球の 貪食能の活性化

吉田 哲^{1)†}中西信夫²⁾山田浩司²⁾

1) 山之内製薬(株)ヘルスケア研究所 (〒174-8612 板橋区蓮根3-17-1)

2) (株)京都動物検査センター (〒612-8073 京都市伏見区下板橋町585)

(2005年1月27日受付・2005年12月27日受理)

要 約

植物多糖体 C-UP Ⅲ を投与した成牛および子牛の単球のラテックスビーズ貪食能（貪食数および貪食率）について検討した。C-UP Ⅲ を 5, 10, 20, 50g/日連続3日間投与した成牛の単球の貪食能は、全投与群で投与開始3日後から増加し、7日後にピークとなり、2週後まで高いレベルを維持した。10～50g/日投与群の貪食能は同値を示した。子牛に C-UP Ⅲ を 3g または 6g/日の経口投与、あるいは 6g/日の人工乳添加により7日齢から21日間連続投与したところ、単球の貪食数は全投与群で同様の増加傾向を示し、投与開始21日後では対照群より高かった。経口投与群の貪食率は投与開始7日後から増加し、その後もほぼ同じ増加傾向を示した。人工乳添加群においても貪食率の増加は認められたが、経口投与群より明らかに増加の程度は低かった。——キーワード：乳牛、単球、貪食活性、多糖体。

----- 日獣会誌 59, 315～319 (2006)

近年、世界中で薬剤耐性菌の出現が深刻な問題となっている。欧州では、バンコマイシン耐性腸球菌の出現によってバージニアマイシンなど数種類の抗生物質の動物飼料への添加が禁止された。今後も抗生物質の使用による耐性菌出現の問題は解決されるべき大きな課題である。いっぽう、易感染宿主化している家畜側の感染抵抗性を向上させる試みもなされてきており、漢方生薬の家畜への利用が検討されている [2, 7, 22]。漢方生薬の投与により抗生物質の使用を抑えることができれば、耐性菌対策の有効な手段となり得る。人の漢方処方薬の有用性は実験動物を用いて研究が進んでいる [13, 16, 17, 20] が、牛の疾病対策としても漢方生薬の投与が研究されつつある [6]。漢方生薬は数種の植物（成分）の配合による相乗作用で生体機能を正常化もしくは調節し、疾病・ストレス・体質改善等に対して効果を発揮する。また、漢方生薬は医薬品とは異なり、多くは乾燥した天然の植物が使用されるため、安全性が広く認知されている。さらに、漢方生薬の家畜への応用に際しては、人間の治療で培われた知識と経験を有効に利用できる。このように漢方生薬の家畜への応用については、消費者のニーズにも合っているが、有効性に関する研究はほとんど行われていない。

植物多糖体 C-UP Ⅲ^{a)} はインターフェロン (IFN) 誘起能を有する植物を、鶏のマクロファージ (Mφ) 活性化と飼料効率の向上をもたらすことを期待して、一定の配合率で混合して作製した。選択した植物は食品レベルであり、医薬品のみに使用される植物は含んでいない。C-UP Ⅲ は、養殖魚 [4] や家畜等に対する Mφ 活性化および飼料効率向上などの効果が確認されている。さらに、すでに C-UP Ⅲ は人の健康食品^{b)} にも応用され、その臨床的使用の効果についての報告もある [8, 24]。今回、成牛および子牛における C-UP Ⅲ 投与による単球の貪食能に及ぼす影響に関して検討した。

材 料 お よ び 方 法

被検物質：植物多糖体 C-UP Ⅲ はベニバナ (*Carthamus tinctorius* L.)、カボチャ種子 (*Cucurbita moschata* Duch.)、スイカズラ花 (*Lonicera japonica* Thunb.) およびオオバコ種子 (*Plantago asiatica* L.) の4種の植物の乾燥粉末の混合物である。

使用動物および飼育環境：供試牛はホルスタイン(雌)

a) EH0202, 山之内製薬(株), 東京。

b) インターバンチ, (株)サンウエル, 東京。

† 連絡責任者：吉田 哲 (オリジナル・イメージ(株))

〒231-0004 横浜市中区元浜町3-21-2 ☎045-222-8424 FAX 045-222-8425

の成牛および子牛である。成牛は550～650kgの健康な泌乳牛10頭（3～5歳）、子牛は38.0～43.5kgの健康な哺乳期子牛12頭（投与開始時7日齢）を供試した。成牛は開放系畜舎内のデンマーク式改良型チェーンタイにて係留飼育し、1日2回定期的にミルカーで搾乳した。子牛は開放系畜舎内の哺乳期子牛用の箱型ケージで単飼育した。飼料は成牛には配合飼料（7.0kg/日）と粗飼料（13.0kg/日）を午前午後の2回定量給餌し、食べ切りとした。子牛には哺乳期子牛用人工乳^{c)}（2l/回）を1日2回給与した。飲水は水道水の自由摂取とした。

投与量および投与方法：成牛は各群2頭、子牛は各群3頭である。体重600kgの成牛にC-UPⅢを実験的に臨床使用したところ、C-UPⅢ原末20g/日/頭の連続投与で野外発症例の泌乳期乳房炎の回復に効果があり、投与開始5日後には乳汁中の大腸菌、ブドウ球菌、連鎖球菌およびコリネバクテリウムの細菌数が減少した（未発表データ）。それに基づきC-UPⅢは成牛1頭あたり1日投与量を5g、10g、20gおよび50gに設定し、3日間連続投与した際の貪食能の増加と投与開始14日後までの持続性を検討した。投与方法は、C-UPⅢ原末を20%含有したペレット^{d)}を用い、投与量に相当する量を朝の給餌時に給与した。子牛への投与量は成牛での有効な投与量を外挿するよりも、第一胃が未発達であるため、鶏や豚でMφ活性化に有効な飼料中への添加量（未発表データ）から設定した。子牛の飼料量の0.05%あるいは0.1%に相当すると考えられるC-UPⅢ原末3g/日および6g/日を、固形飼料が摂取できる7日齢から、朝の給餌時に21日間経口投与した。また、投与方法の検討として、人工乳への添加による貪食能への影響を検討するため、哺乳期子牛用人工乳^{e)}にC-UPⅢ原末6g/日を混合して朝の給餌時に21日間給餌した。成牛および子牛の対照群は無添加対照群である。

末梢血液採取時期：成牛の単球貪食能の測定は投与前、投与開始3、5、7および14日後に実施した。子牛の単球の貪食能測定は投与前、投与開始7、14および21日後に実施した。血液は頸静脈よりヘパリン処理真空採血管にて約10ml採取した。

単球分離：血液8mlを単核球分離用チューブ^{f)}に静かに重層して、速やかに遠心分離（3200rpm、10℃、20分間）した後、5mlシリンジで静かに白血球層を回収し、ダルベッコのリン酸緩衝食塩液（PBS）を用いて室温で2回洗浄（1200rpm、5分間）した。沈渣をRPMI1640培養液^{g)}（培養液）に浮遊してシリコン処理したガラスシャーレに入れ、5%CO₂インキュベーター中で37℃、1時間培養した。培養上清を吸引除去後、ガラスシャーレに吸着した細胞（単球）を培養液で静かに回収した。単球浮遊液は単球が 1.0×10^3 個/mlになるように培養液で調製した。また、ラテックスビーズ液は

図1 成牛の単球貪食数（3日間連続投与）

●：無添加対照，■：C-UPⅢ 5g/日，
△：C-UPⅢ 10g/日，□：C-UPⅢ 20g/日，
▲：C-UPⅢ 50g/日，
貪食LB数：貪食ラテックスビーズ数

図2 成牛の単球貪食率（3日間連続投与）

●：無添加対照，■：C-UPⅢ 5g/日，
△：C-UPⅢ 10g/日，□：C-UPⅢ 20g/日，
▲：C-UPⅢ 50g/日

ラテックスビーズ^{g)}（LB）が 1.0×10^5 個/mlになるように培養液で調製した。

貪食能の測定：単球浮遊液とLB液を1mlずつ混合し、37℃1時間感作した。次いで、PBSで2回洗浄（1200rpm、5分間）し、フリーのLBを除去後、70%エタノール0.2mlで固定した。次いで、上記の液をスライドグラス上に塗抹し、ギムザ染色した。顕微鏡観察下（400倍）で単球の貪食LB数を測定した。1頭あたり300個の単球を測定し、成牛は2頭、子牛は3頭のデータを平均したものを各群のデータとした。貪食数は単球1細胞あたりの平均LB貪食数（貪食LB数/細胞）、貪食率はLBを1個以上貪食した単球の割合（貪食率：%）

c) マクシケア-LG、(株)オールインワン、香川。

d) ウサギ用飼料RC4をベースに作製、オリエンタル酵母(株)、東京。

e) VACUTAINER CPT, Becton Dickinson, U.S.A.

f) No. 31800, Gibco Invitrogen Corporation, U.S.A.

g) 0.81μm, Difco Laboratories, U.S.A.

図3 子牛の単球食食数 (21日間連続投与)

●：無添加対照，■：C-UP III 3g/日 経口投与，
▲：C-UP III 6g/日 経口投与，
◆：C-UP III 6g/日 人工乳添加，
食食LB数：食食ラテックスビーズ数

図4 子牛の単球食食率 (21日間連続投与)

●：無添加対照，■：C-UP III 3g/日 経口投与，
▲：C-UP III 6g/日 経口投与，
◆：C-UP III 6g/日 人工乳添加

として示した。

体重および臨床観察：体重測定は試験開始前と試験終了後に測定した。臨床症状は呼吸器（くしゃみ、咳、鼻汁露出など）、糞便性状（軟便あるいは下痢など）および一般状態（元気、食欲など）を観察し記録した。

成 績

単球食食能測定：成牛の単球の食食数および食食率を図1および図2に、子牛の単球の食食数および食食率を図3および図4に示した。成牛の食食能（食食数および食食率）は、投与開始7日後および14日後において全投与群は対照群よりも高かった。また、投与前後と比較すると、食食能（食食数および食食率）は全投与群で投与開始3日後より増加し、7日後に最大値となり、14日後まで持続した。なお、食食能は5g/日投与群と比較して10g/日以上投与群で高かったが、10g/日、20g/日および50g/日投与群ではほぼ同一であった。

子牛の単球の食食数は投与群、対照群ともに投与開始

7日後以降は経時的に増加し、投与開始21日後の単球食食数は全投与群で対照群よりも多かった。子牛の単球の食食率も投与群、対照群ともに経時的に増加した。全投与群の単球食食率は投与開始7日、14日あるいは21日後のいずれの時点においても対照群よりも高かった。ただし、3g/日および6g/日経口投与群はほぼ同じ食食率を示したが、6g/日人工乳添加群では経口投与群よりも低い傾向が認められた。6g/日人工乳添加群と3g/日あるいは6g/日経口投与群とは食食率に差があった。

体重および臨床症状：使用した10頭の成牛および子牛12頭の体重は、試験終了時まで群間で大きな差は認められなかった。試験前および試験期間を通じて成牛および子牛の呼吸器、消化器および一般状態の観察で、全例に異常は認められなかった。

考 察

本試験はC-UP IIIを成牛および子牛にさまざまな量で投与した場合の単球食食能の増加について検討した。体重約600kgの成牛にC-UP IIIを10g/日、3日間投与したところ、投与開始3日後より単球の食食能は増加し、2週間後まで持続した。また、単球の食食能は50g/日を投与しても、10g/日投与と同程度であったが、5g/日投与は10g/日投与よりも明らかに低かった。以上の結果より、約2週間の単球の活性化の維持に必要なC-UP IIIの投与量は、10g/日の3日間投与で十分であることが明らかとなった。また、7日齢の子牛にC-UP III 3g/日を3週間連続経口投与すると、単球の食食能が増加することが確認された。この場合、3g/日と6g/日経口投与群の食食能にはほとんど差がなかった。いっぽう、無添加の子牛の食食能も経時的に増加していることが観察されたが、これは成長とともに免疫機構が成熟して行く生理的な現象であると理解できる。また、人工乳に添加して投与する方法では、経口投与群に比べ単球の食食率増強効果は低かった。このことは、人において漢方薬を牛乳とともに摂取すると効果が減弱する現象 [12] と共通なものと考えられた。

IFNの発見者の一人である小島 [11] は、日本で通常使用されている約200の漢方生薬のIFN誘起能について *in vitro* のスクリーニングを行った [9]。小島 [10] によると、漢方生薬中のIFN誘起能の有効成分は、多糖体成分である。また、多糖体はMφの食食能を高めることが知られている [19]。今回使用したC-UP IIIの成分である各植物は、漢方生薬としての人における長年の知識から、食べても毒性学的にはまったく問題ない植物のみであり、投与量や投与期間も医薬品のように注意する必要がなく、飼料として日常的に扱える利点がある。いっぽうでは、C-UP IIIの人用健康食品^{b)}も市販され、それをを用いた臨床試験が実施されている。それらに

よると、C型慢性肝炎患者では本試験の10g/日に相当する量を3カ月間投与したところ、自覚症状の一部改善とC型肝炎ウイルス(HCV-RNA)量の減少が認められた[8]。また、更年期の不定愁訴では本試験の20g/日に相当する量を6カ月間投与したところ、自覚症状の改善、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子の増加、卵巣刺激ホルモンの減少、血圧減少、顔面皮膚表面血流量の減少など、多様な変化が確認された[24]。C-UPⅢの成分である各植物単独ではこれらの薬理的作用は知られておらず、相乗効果によりこれらの現象を起こしていると理解される。

ほ乳類の腸管には免疫をつかさどる主要な器官としてパイエル板があり、これは反芻動物においては単胃動物に比べより発達しており、鳥類のファブリキウス嚢と同様にB細胞の分化の場となる[15]。腸管腔側には一層の円柱上皮細胞があり、これは絨毛細胞とM細胞からなるが、M細胞は細菌や抗原をとりこんでこれをM ϕ や樹状細胞などの抗原提示細胞(APC)へ伝達する[1]。APCは深部にあるリンパ組織に移動してヘルパーT(Th)細胞へ抗原提示を行って免疫反応が進行して行く。腸管免疫では局所の免疫とともに全身免疫も成立する。

植物多糖体C-UPⅢの各成分はM ϕ にI型(α/β)IFNを誘発する[9]が、経口投与されたC-UPⅢは腸管上皮のM細胞を通じてM ϕ へ伝達され、M ϕ においてIFNを誘発することが推測される。C型肝炎患者に対する唯一の治療薬はIFNであるが、C-UPⅢの経口投与はC型肝炎患者に治療効果が認められた[8]。低用量(10~100IU)のヒトIFN- α の経口投与が慢性活動性B型肝炎、牛の上部気道感染症、豚の伝染性胃腸炎やロタウイルスによる下痢、ネコ白血病ウイルス感染等さまざまなウイルス感染症に治療効果がある[23]。

抗原刺激によってAPCが産生するIFN- α はTh0をTh1へと分化させる[18]。Th1にはIL-12レセプターが発現しており、これにAPCによって産生されたIL-12が結合するとIFN- γ の産生が誘導され、全身的Th1免疫システムが発動する[23]。

IFNにはプライミング効果があり、経口投与されたIFN- α は粘膜のリンパ組織に結合し[3]、M ϕ や樹状細胞などをプライミングして侵入してくる抗原物質に反応性が高まっていると考えられている[23]。マウスに低用量のIFN- α を経口投与すると骨髄への抑制効果と白血球減少が現れるとともに、好中球の組織への移動および骨髄から二次免疫組織へのNK細胞の移動がみられる[5]。また、IFN- β を経口投与されたマウスの末梢血単球はIFNによって誘導される2-5A合成酵素の活性が高まっていた[21]。

経口投与されたC-UPⅢが腸管のリンパ組織においてIFNを誘発するとすれば、上記と同様の反応を生体内で

引き起こす可能性がある。

IFNはM ϕ を活性化して貪食能と抗菌作用を高めることが知られており[14]、C-UPⅢを経口投与した牛の単球の貪食能の増大は誘発されたIFNによる可能性が示唆されるが、これらの説明は今後の研究によらなければならない。

引用文献

- [1] Ackermann MR, Cheville NF, Deyoe BL : Vet Pathol, 25, 28-35 (1988)
- [2] 白 式連 : 畜産の研究, 48, 9-13 (1994)
- [3] Beilharz MW, McDonald W, Watson MW, Heng J, McGeachie J, Lawson CM : J Interferon Cytokine Res, 17, 625-630 (1997)
- [4] Chansue N, Ponpornpisit A, Endo M, Sakai M, Yoshida S : Fish Pathol, 35, 89-90 (2000)
- [5] Fleischmann WR Jr, Fields EE, Wang JL, Hughes TK, Stanton GJ : Proc Soc Exp Biol Med, 197, 424-430 (1992)
- [6] 長谷川篤彦 : 家畜診療, 378, 27-29 (1994)
- [7] Hu S, Cai W, Ye J, Qian Z, Sun Z : Zentralbl Veterinarmed A, 39, 593-599 (1992)
- [8] Kaji K, Yoshida S, Nagata N, Yamashita T, Mizukoshi E, Honda M, Kojima Y, Kaneko S : J Gastroenterol, 39, 873-878 (2004)
- [9] 小島保彦 : 漢方医学, 5, 9-15 (1981)
- [10] 小島保彦 : Food Style 21, 2, 34-40 (1998)
- [11] 小島保彦 : インターフェロン その研究の歩みと臨床応用への可能性一, 今西二郎編, 10-15, ライフ・サイエンス, 東京 (1998)
- [12] 久保道徳 : アトピー性皮膚炎の薬物療法, 10, 薬事日報社, 東京 (1997)
- [13] 黒川昌彦, 白木公康 : 和漢医薬誌, 11, 71-85 (1994)
- [14] Mizunoe K, Hiraki M, Nagano Y, Maehara N : Jpn J Microbiol, 19, 235-236 (1975)
- [15] 百溪英一 : 家畜診療, 47, 265-278 (2000)
- [16] Nagai H, Nakai N, Nishiyori T, Ogiso H, Ochi T, Tanaka H, Inagaki N : J Trad Med, 15, 208-215 (1998)
- [17] Nagai T, Hanawa T, Yamada H : J Trad Med, 15, 216-224 (1998)
- [18] Rogge L, Barberis-Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F : J Exp Med, 185, 825-831 (1997)
- [19] 斎藤卓也, 柴野三智子, 山口淳二 : マクロファージと生体防御—新しい研究の展開—, 光山正雄編, 85-111, 菜根出版, 東京 (1997)
- [20] 左向敏紀, 本好茂一 : 獣畜新報, 51, 449-453 (1998)
- [21] Satoh Y, Kasama K, Satoh M, Kuwabara M, Yanai A : J Interferon Cytokine Res, 17, S96 (1997)
- [22] 田中二良 : 生態化学, 1, 51-54 (1979)
- [23] Tompkins WA : J Interferon Cytokine Res, 19, 817-828 (1999)
- [24] Ushiroyama T, Yoshida S, Tadaki K, Ikeda A, Ueki M : Am J Chin Med, 32, 755-770 (2004)

Phagocytic Activation of Monocytes by C-UP III Herbal Polysaccharides in Calves and Cows

Satoshi YOSHIDA^{*†}, Nobuo NAKANISHI and Koji YAMADA

^{*} Institute for Consumer Healthcare, Consumer Healthcare Division, Yamanouchi
Pharmaceutical Co., Ltd., 3-17-1 Hasune, Itabashi, 174-8612, Japan

SUMMARY

Phagocytic activity of monocytes derived from cows and calves administered a mixture of plant polysaccharides called C-UP III was examined by measuring the number and rate of cells that phagocytosed latex beads. The phagocytic activity of monocytes in cows, which had been given 5, 10, 20 or 50 g/day of C-UP III for three consecutive days, began to increase at three days after the start of administration and peaked after seven days. Phagocytic activity remained high for two weeks. The extent of these increases in phagocytic activity was similar in cows administered with 10-50 g/day of C-UP III. In calves, C-UP III was administered for 21 consecutive days from the seventh postnatal day, either orally at 3 or 6 g/day or via artificial milk formula containing 6 g/day of C-UP III. The number of phagocytosed latex beads per cell increased in each of these calves similarly, and it was higher than that of the control group at 21 days after the start of C-UP III administration. In calves orally administered with C-UP III, the rate of phagocytosis increased from seven days after the start of C-UP III administration and continued to increase at similar rates. When C-UP III was given with milk, the rate of phagocytosis was also elevated but was not as high as that of oral administration.

— Key words : Dairy cattle, monocyte, phagocytic activity, polysaccharide.

† Correspondence to : Satoshi YOSHIDA (Original Image Co., Ltd.)

3-21-2 Motohama-cho, Naka-ku, Yokohama-shi, 231-0004, Japan

TEL 045-222-8424 FAX 045-222-8425

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 59, 315 ~ 319 (2006)

牛の過剰排卵誘起に!!

動物用医薬品
要指示医薬品

アントリン® R・10

注射用前葉性
卵胞刺激ホルモン

アントリンR・10は、豚の下垂体前葉から当社の技術により高純度に精製した卵胞刺激ホルモン (Follicle Stimulating Hormone : F S H) を有効成分とする注射剤で、牛の過剰排卵誘起を目的とする製剤です。

- 効能・効果 牛 (雌) : 過剰排卵誘起
- 包装 10アーマー単位 (A.U.) × 5アンブル溶解液 (「日局」生理食塩液) 添付

川崎三鷹製薬株式会社

お問い合わせ及び資料請求先
お客様窓口 TEL 0422-46-9193