

原著論文

ホルスタイン子牛に対するクマイザサ抽出物 (SanSTAGE™) の免疫活性化作用および疾病予防効果

松田敬一^{1*)} 坂井 靖¹⁾ 大塚浩通²⁾ 村松由記子³⁾ 原 英郎³⁾ 八木勇三⁴⁾ 原 高明³⁾

1) 宮城県農業共済組合連合会 中央家畜診療センター 2) 北里大学獣医学部

3) 株式会社ユニアル 4) 株式会社ハクジュ・ライフサイエンス

* 連絡担当者：松田敬一 〒 989-6251 宮城県大崎市古川小野字嵐山 26-1

TEL：0229-28-2581 FAX：0229-28-3070 E-mail：matsuda@nosaimiyagi.or.jp

[要 約]

生後1ヶ月前後で酪農家から育成農家へ移動される雄のホルスタイン子牛には、下痢や肺炎等の感染症が多発しており、効果的な疾病発生予防対策の確立が求められている。本研究では、人においてNK細胞活性化などの免疫活性化作用が認められているクマイザサ抽出物 (SanSTAGE™) が、雄のホルスタイン種子牛に与える免疫活性化作用および疾病予防効果を調査した。移動直後の健康な雄のホルスタイン子牛32頭のうち、移動当日より SanSTAGE™ (30mg/kg/日) を2週間継続して代用乳に混ぜて給与した16頭を投与群、非給与の16頭を対照群とした。0 (投与前)、7、14 および21日に身体測定および採血を行い、血液生化学検査、白血球サブポピュレーションおよびサイトカイン遺伝子反応量の解析を行った。また、調査期間中の疾病発生頭数を調査した。0日に比べ、体重は投与群で14および21日に増加、Tcho および TG は対照群で7、14 および21日に減少、CD3 陽性細胞および CD4 陽性細胞数は両群共に7、14 および21日で増加した。投与群では対照群と比較して、7日のMX2 遺伝子反応量および21日のMHCclass II 陽性CD14 陰性細胞数が高値を示し、疾病発生頭数は21日で少なかった。結果より、移動直後のホルスタイン子牛に対する SanSTAGE™ の2週間継続投与は、子牛に対する免疫活性化作用があり疾病予防対策として活用可能と示唆された。

キーワード：子牛、SanSTAGE™、疾病予防効果、免疫活性化作用

[緒 言]

牛は移動ストレスにより免疫機能が低下する事が知られており [12, 15, 27]、繁殖農家から肥育農家への移動が免疫機能の低下を引き起こし、呼吸器病などの感染症を発症する牛が散見される [4, 25]。特に雄のホルスタイン子牛は、生後1ヶ月前後の若齢で繁殖農家である酪農家から家畜市場を経由して育成農家へ移動されるため、育成農家において導入直後から下痢

や肺炎等の感染症が多発している。育成農家で半年程度飼育されたのちに移動される、肥育農家では感染症予防のため、導入時に抗生物質投与 [8] およびワクチン接種 [10, 19] などの病原体に対する予防対策を行っているが、必ずしも期待した効果が得られているわけではなく、導入時における牛の免疫状態が問題である可能性が示唆されている [8, 12]。

育成期の子牛の免疫機能の低下を防ぐためには、栄養状態や環境を適切にしてストレスを少なくすることが重要であるが [9]、輸送直後に新しい環境で群飼される雄のホルスタイン子牛において、子牛に与えるストレスを無くすのは

受付：2012年6月13日

受理：2012年8月31日

困難である。そのため、子牛の免疫機能を活性化させ、効果的に疾病発生を予防する方法の確立が求められている。

牛において免疫活性化作用のある物質としては、バナナ [16]、活性卵白末 [26]、および植物多糖体 [31] などいくつか報告されており、経口用インタフェロン α 製剤 [11]、および天然ハープ・マンナンオリゴ糖配合飼料 [17] のように様々な疾病予防対策として活用されているものもある。また、導入子牛の免疫機能の低下を防ぐ手段として免疫活性化作用のあるイソマルトオリゴ糖を投与して疾病を予防する試みが報告されている [18]。

今回我々は、ヒトにおいてNK細胞活性などの免疫活性化作用が認められているクマイザサ抽出物 [14] の、雄のホルスタイン子牛に対する免疫活性化作用の有無を調査し、加えて導入子牛の疾病予防対策として活用可能かを調査した。

[材料と方法]

調査対象牛：宮城県内の酪農家から家畜市場を経由して管内3ホルスタイン子牛育成農家に導入されてきた、健康で外見上疾病等の罹患が認められない雄のホルスタイン子牛32頭を用いた。導入日より2週間継続して、クマイザサ抽出物である SanSTAGE™ (株)ハクジュライフサイエンス、東京) を 30mg/kg/日の用量で代用乳に混ぜて給与した16頭を投与群(平均日齢: 34.5 ± 1.9日)、SanSTAGE 非投与で代用乳のみを給与した16頭(平均日齢: 36.5 ± 2.2日)を対照群と群分けした。なお、3農家共に同一組合に所属し飼養管理法は同一規格で行っており、代用乳以外に水、乾草、人工乳の給与を行っていた。

調査方法: 導入当日の SanSTAGE™ 給与前(0日)、給与7日後(7日)、給与14日後(14日)および給与終了7日後(21日)に体重、体温、心拍数および呼吸数の身体測定を行った。加えて頸静脈より採血し、血球数算定、血液生化学検査、末梢血白血球サブポピュレーションおよびサイトカイン遺伝子反応量の解析に供した。また、調査期間中の肺炎および腸炎の発生状況を調査した。

血液生化学検査: ストレス状態の指標として、コルチゾール (Corti) を測定した。また、栄

養状態の指標として、総コレステロール (Tcho)、トリグリセリド (TG) および尿素窒素 (BUN) を測定した。Corti、Tcho、TG および BUN は酵素法により、ディスクリット方式臨床化学自動分析装置 (Dade Behring, Inc., Illinois, U.S.A.) を用いて測定した。

白血球サブポピュレーションの解析: 白血球表面抗原の解析は間接蛍光抗体法を用い、報告されている方法 [21] に準じてフローサイトメーター (FACScan, Becton Dickinson, U.S.A.) で測定・解析した。使用した一次抗体は、抗ウシ CD3 抗体 (MMIA, VMRD, U.S.A.: 成熟総 T 細胞)、抗ウシ CD4 抗体 (CACT183B, VMRD, U.S.A.: ヘルパー T 細胞)、抗ウシ CD8 抗体 (9ACT80C, VMRD, U.S.A.: キラー T 細胞)、抗ウシ CD14 抗体 (MY-4, ベックマンコールター(株)、東京: 単球)、抗ウシ CD335 抗体 (MCA2365, AbDserotec, U.S.A.: NK 細胞)、抗ウシ WC1-N1 抗体 (B7A1, VMRD, U.S.A.: $\gamma \delta$ T 細胞)、および抗ウシ MHC class- II 抗体 (TH14B, VMRD, U.S.A.: 単球、B細胞等の抗原提示細胞) である。算定はこれまでの報告 [21] を参考に、FACScan 解析により得られたサイトグラム中の単核球および顆粒球の割合、単核球中の各抗原の陽性割合および白血球数から下記の計算式をもちいて各細胞の実数値を算出した。

細胞数 ($\times 10^2/\mu l$) = 単核球中の対象細胞陽性率 \times 白血球数 \times [単核球割合 / (単核球割合 + 顆粒球割合)]

末梢血単核球におけるサイトカイン遺伝子反応量の解析: ヘパリン血 5ml を 5ml の 1/15M リン酸緩衝液 (PBS, pH7.4) で希釈し、4.2ml のリンホセパール I (免疫生物研究所(株)、群馬) に重層した。重層後、1800rpm、30min で遠心し、単核球を分離した。分離した単核球を数回 PBS で洗浄後 5×10^6 個/ml となるように調整した。単核球は 10 μ g/ml の Phytohemagglutinin-P (PHA: J-OIL MILLS, TOKYO) を加え、37°C、5% CO₂ 湿潤の条件下で 12 時間培養した。培養細胞にクロロホルム (関東化学(株)、東京、日本) 0.2ml を加え、激しく混和した。これを氷上に 5 分間静置後、4°C で 15,000rpm、15 分間遠心後した。遠心後、分離した水層を新しいマイクロチューブに移した。これにイソプロパ

Table. 1 Sequence for primers of the genes

| Gene of interest | Forward Primer (5'-3') | Reverse Primer (5'-3') | Product Length |
|------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------|
| IL-4 | GCCCCAAAGAACAACAACCTGA | GAGATTCCCTGTCAAGTCCGC | 117 |
| IL-17A | TGTCTACAGTGAAGTGAAGGAAC | CCACCAGACTCAGAAGCAGTAG | 83 |
| IFN- γ | TCAAATTCGGGTGGATGATCT | CTTCTCTCCGCTTTCTGAGG | 108 |
| MX-2 | CCTACAAGTGCACAGGTGACAAC | CTCTACGCTTCCACGGGAGA | 80 |
| Perfolin | ACTCCGAGGATGCCAACTTC | TGTGCACCAGGTGAAAACCTGTA | 105 |
| TGF- β | TGACCCGACAGAGGAAATAG | GTTCATGCCGTGAATGGTG | 140 |

ノール（関東化学株）を 0.5ml 加えて激しく混和後、氷上に 15 分間静置した。次に 4℃ で 15,000rpm、15 分間遠心後、上清を除去し 70% エタノール（関東化学株）を 1ml 加えリンスした後、15,000rpm、5 分間遠心後、上清を除去し風乾させた。これを RNA を分解する RNase を失活させた Rnase フリー水（ultra PURE Distilled water DNase Rnase Free, Invitrogen Corp）12 μ l に溶かし、総 RNA 溶液とした。この溶液から、Nano Drop ND-1000 分光光度計（エル・エム・エス株、東京、日本）を用いてサンプルの RNA 濃度を測定した。抽出した RNA を定法 [22] により、cDNA の合成（逆転写反応）およびリアルタイム PCR に供した。リアルタイム PCR においては、表 1 に示したプライマーにより、IL-4、IL17A、INF- γ 、MX2 および Perfolin の、また、内部標準遺伝子として β -actin の反応量を測定した。なお、リアルタイム PCR は Step One Plus™ Real Time PCR System（Applied Biosystems, U.S.A.）を用いて、それぞれの PCR 産物について融解曲線を求め、結果の定量は、比較 Threshold Cycle (Ct) 法を用いて行った。反応量比較のために用いた $\Delta\Delta$ CT 値は、下記の式を用いて算出した。

$\Delta\Delta$ CT 値 = PHA 添加での Δ CT 値 - Control の Δ CT 値

Δ CT 値 = 対象遺伝子の CT 値 - β actin の CT 値

サイトカイン遺伝子反応量 = $2^{(-\Delta\Delta CT)}$

統計方法：統計解析には SPSS 13.0（エス・ピー・エス・エス株式会社、東京）を用いた。得られた結果は平均値 \pm 標準誤差で示した。同じ採材ポイントの各群間の比較は、F 検定を用いて等分散とされたものには student の t 検定、非等分散とされたものには Welch の t 検定を用いて行った。また、各群における 0 日とその

後の採材ポイントとの比較は一元配置分散分析をおこない Tukey の方法による多重比較を実施した。疾病発生頭数の比較は、Fisher の直接確立計算法を用いた。各統計結果において、危険率 5% 未満となったものを有意差ありとした。

【結果】

身体測定：体重は、投与群の 14 および 21 日で 0 日に比べ有意に増加した。また、21 日には同日の対照群に比べ有意な高値を示した。心拍数は、投与群の 7、14 および 21 日、および対照群の 7 日で 0 日に比べ有意に減少した。呼吸数は、対照群の 21 日で同日の投与群に比べ有意な高値を示した。体温には有意な変化は認められなかった（表 2）。

血液生化学検査：Tcho は、対照群の 7、14 および 21 日で 0 日に比べ有意に減少した。TG は、対照群の 7、14 および 21 日で 0 日に比べ有意に減少した。また、対照群の 7 日で同日の投与群に比べ有意な低値を示した。Corti および BUN に有意な変化は認められなかった（表 3）。

白血球サブポピュレーション：成熟総 T 細胞を示す CD3 陽性細胞数は、両群の 7、14 および 21 日で 0 日に比べ有意に増加した。ヘルパー T 細胞を示す CD4 陽性細胞数は、両群の 7 日、14 日、21 日で 0 日に比べ有意に増加した。B 細胞を示す MHCclass II 陽性 CD14 陰性細胞数は、投与群の 21 日で同日の対照群に比べ有意な高値を示した。キラー T 細胞を示す CD8 陽性細胞、NK 細胞を示す CD335 陽性細胞数、 γ δ 型 T 細胞を示す WC1-N1 陽性細胞数および単球を示す CD14 陽性細胞は、両群ともに数に有意な変化は認められなかった（表 4）。

末梢血単核球におけるサイトカイン遺伝子反応量：PHA 刺激による末梢血単核球サイトカ

Table. 2 Change of physical examination findings before and after the administration of SanSTAGE™

| | | 0day | 7days | 14days | 21days |
|-------------------------------|---------------|-------------|--------------|---------------|----------------|
| Body weight (kg) | Treated group | 70.7 ± 1.8 | 75.2 ± 2.1 | 78.6 ± 1.9 * | 83.6 ± 1.9 *** |
| | Control group | 73.5 ± 1.2 | 72.7 ± 1.7 | 74.4 ± 1.9 | 77.4 ± 2.1 |
| Body temperature (°C) | Treated group | 39.2 ± 0.1 | 39.3 ± 0.1 | 39.3 ± 0.2 | 39.4 ± 0.2 |
| | Control group | 39.1 ± 0.1 | 39.4 ± 0.2 | 39.6 ± 0.2 | 39.2 ± 0.2 |
| Pulse rate (number/min) | Treated group | 105.6 ± 5.5 | 80.6 ± 3 ** | 81.6 ± 5.1 ** | 87.5 ± 3.5 * |
| | Control group | 101.4 ± 7.4 | 78.1 ± 5.5 * | 84.5 ± 5.3 | 86.6 ± 5.1 |
| Respiration rate (number/min) | Treated group | 38.0 ± 2.5 | 37.3 ± 1.4 | 34.9 ± 2.6 | 36.9 ± 3.1 * |
| | Control group | 40.3 ± 2.5 | 39.4 ± 3.4 | 34.1 ± 2.7 | 47.9 ± 3.8 |

Data are expressed as the mean ± S.E.

* : P < 0.05 vs. 0day., ** : P < 0.01 vs. 0day.

* : P < 0.05 vs. control group.

Table. 3 Change of blood biochemical findings before and after the administration of SanSTAGE™

| | | 0day | 7days | 14days | 21days |
|---------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| Corti (μg/dl) | Treated group | 0.78 ± 0.27 | 0.59 ± 0.15 | 0.50 ± 0.11 | 0.56 ± 0.08 |
| | Control group | 0.74 ± 0.11 | 0.50 ± 0.10 | 0.45 ± 0.07 | 0.62 ± 0.11 |
| Tcho (mg/dl) | Treated group | 111.6 ± 6.9 | 85.1 ± 8.1 | 85.1 ± 6.1 | 86.5 ± 7.5 |
| | Control group | 116.8 ± 10.8 | 79.0 ± 8.5 * | 72.9 ± 7.5 ** | 63.3 ± 8 ** |
| TG (mg/dl) | Treated group | 31.9 ± 4.1 | 17.2 ± 2.5 * | 22.1 ± 5.9 | 17.9 ± 3.8 |
| | Control group | 33.1 ± 7.1 | 9.6 ± 0.9 ** | 12.1 ± 1.8 ** | 11.8 ± 1.5 ** |
| BUN (mg/dl) | Treated group | 8.74 ± 0.59 | 10.07 ± 0.94 | 10.45 ± 0.93 | 10.56 ± 2.51 |
| | Control group | 9.05 ± 0.70 | 11.67 ± 1.70 | 11.16 ± 0.61 | 10.50 ± 0.98 |

Data are expressed as the mean ± S.E.

* : P < 0.05 vs. 0 day., ** : P < 0.01 vs. 0day.

* : P < 0.05 vs. control group.

Table. 4 Change of the number of leukocytes before and after the administration of SanSTAGE™

| | | 0day | 7days | 14days | 21days |
|--|---------------|----------------|-------------------|------------------|-------------------|
| CD3 ⁺ cell (cells/μl) | Treated group | 1716.8 ± 104.2 | 2754.5 ± 210.4 ** | 2491.9 ± 151.4 * | 2636.0 ± 233.1 ** |
| | Control group | 1879.5 ± 200.6 | 2633.4 ± 186.4 * | 2672.0 ± 175.1 * | 2600.7 ± 203.1 * |
| CD4 ⁺ cell (cells/μl) | Treated group | 531.7 ± 42.5 | 930.2 ± 93.9 ** | 808.5 ± 50.4 * | 924.6 ± 73.8 ** |
| | Control group | 495.2 ± 51.5 | 919.6 ± 69.4 ** | 811.2 ± 59.0 ** | 763.6 ± 68.0 * |
| CD8 ⁺ cell (cells/μl) | Treated group | 469.7 ± 34.4 | 610.6 ± 43.5 | 583.3 ± 38.0 | 595.5 ± 46.0 |
| | Control group | 494.1 ± 62.8 | 649.2 ± 39.9 | 629.4 ± 39.3 | 583.8 ± 43.5 |
| CD335 ⁺ cell (cells/μl) | Treated group | 376.2 ± 38.1 | 403.8 ± 47.5 | 371.5 ± 32.5 | 343.9 ± 35.7 |
| | Control group | 361.6 ± 39.2 | 447.8 ± 49.0 | 344.9 ± 42.9 | 305.3 ± 31.1 |
| WC1-N1 ⁺ cell (cells/μl) | Treated group | 774.6 ± 72.6 | 1138.1 ± 105.5 | 968.6 ± 93.7 | 1140.0 ± 150.3 |
| | Control group | 824.5 ± 92.7 | 1038.1 ± 102.3 | 970.5 ± 106.4 | 1037.3 ± 127.2 |
| MHCclass II ⁺ CD14 ⁺ cell (cells/μl) | Treated group | 1805.2 ± 157.4 | 2433.9 ± 164.0 | 2539.3 ± 290.0 | 2579.0 ± 232.1 * |
| | Control group | 1677.3 ± 153.0 | 2086.3 ± 200.7 | 2075.4 ± 142.0 | 1913.8 ± 226.5 |
| CD14 ⁺ cell (cells/μl) | Treated group | 1445.1 ± 124.1 | 1272.6 ± 164.6 | 1428.9 ± 220.7 | 1375.0 ± 137.6 |
| | Control group | 1667.2 ± 112.3 | 1628.2 ± 157.5 | 1595.3 ± 118.9 | 1572.7 ± 166.4 |

Data are expressed as the mean ± S.E.

* : P < 0.05 vs. 0 day., ** : P < 0.01 vs. 0 day.

* : P < 0.05 vs. control group.

Table. 5 Change in level of cytokine genes (ΔΔCt value) in peripheral blood mononuclear cells before and after the administration of SanSTAGE™

| | | 0day | 7days | 14days | 21days |
|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| IL-4 mRNA | Treated group | 512.6 ± 310.6 | 774.8 ± 356.8 | 447.9 ± 113.5 | 473.2 ± 146.2 |
| | Control group | 854.1 ± 286.4 | 280.0 ± 83.7 | 349.3 ± 163.4 | 533.0 ± 216.5 |
| IL-17 mRNA | Treated group | 127.8 ± 56.5 | 345.3 ± 75.5 | 196.5 ± 102.2 | 363.8 ± 135.6 |
| | Control group | 321.5 ± 100.3 | 266.2 ± 54.8 | 112.1 ± 35.7 | 260.5 ± 65.3 |
| TGF-β mRNA | Treated group | 1.07 ± 0.32 | 1.55 ± 0.33 | 1.75 ± 0.63 | 1.47 ± 0.28 |
| | Control group | 1.66 ± 0.52 | 1.42 ± 0.43 | 1.52 ± 0.32 | 1.08 ± 0.14 |
| IFN-γ mRNA | Treated group | 173.1 ± 81.6 | 132.7 ± 49.0 | 51.0 ± 15.5 | 130.6 ± 35.7 |
| | Control group | 113.4 ± 53.2 | 189.3 ± 72.9 | 114.3 ± 51.5 | 176.3 ± 41.8 |
| Perforin mRNA | Treated group | 1.75 ± 0.65 | 2.87 ± 0.81 | 3.04 ± 0.64 | 1.68 ± 0.35 |
| | Control group | 2.00 ± 0.35 | 2.17 ± 0.46 | 1.62 ± 0.36 | 1.23 ± 0.22 |
| MX2 mRNA | Treated group | 1.60 ± 0.42 | 3.07 ± 0.63 * | 2.96 ± 0.58 | 3.03 ± 0.44 |
| | Control group | 2.04 ± 0.60 | 1.43 ± 0.37 | 2.48 ± 0.60 | 2.55 ± 0.48 |

Data are expressed as the mean ± S.E.

* : P < 0.05 vs. control group.

イン遺伝子反応量は、MX2 遺伝子反応量が、投与群の7日目で同日の対照群に比べ有意な高値を示した。IL-4、IL-17、TGF- β 、INF- γ および Perfolin 遺伝子反応量に有意な変化は認められなかった (表5)。

疾病発生頭数：7日では、投与群3頭 (肺炎2頭、腸炎1頭)、対照群6頭 (肺炎2頭、腸炎4頭)。14日では、投与群4頭 (肺炎3頭、腸炎1頭)、対照群8頭 (肺炎4頭、腸炎4頭)。21日では、投与群4頭 (肺炎2頭、腸炎2頭)、対照群9頭 (肺炎4頭、腸炎5頭) に疾病が確認され、各採材日における腸炎の発生頭数は、投与群が対照群に比べ少なく、21日の疾病発生頭数は、投与群が対照群に比べ有意に少なかった。

[考 察]

本試験の結果より、投与群は対照群に比べて7日から21日での肺炎および腸炎の発生頭数少なく推移し、特に21日目で疾病発生頭数が有意に少なかったことから、導入後のホルスタイン子牛に対する SanSTAGE™ の投与には、子牛における疾病予防効果があるものと考えられた。ヒトに SanSTAGE™ を投与すると腸内細菌叢が改善されることが報告されており [14]、本試験において腸炎の発生頭数が投与群で少なかった要因の一つとして、SanSTAGE™ の腸内細菌叢の改善効果があるものと考えられた。

この投与群における肺炎や腸炎の発生数減少により、食欲が維持され、栄養状態の指標である Tcho や TG が安定推移して、順調な体重の増加に繋がったものと考えられた。反対に対照群では、Tcho と TG が減少し、体重の増加も認められないことから、疾病の発生により食欲や栄養吸収能力が低下して、栄養状態が悪化したものと示唆される。

末梢 MHCclass II 陽性 CD14 陰性 B 細胞数は、新生子牛で著しく少ないが、成長に伴って増加する [21]。いっぽう低栄養状態にある子牛では末梢リンパ球の減少や機能の低下が観察され、B 細胞の分化・増殖応答が劣っていることが報告されている [20, 23]。また、クマイザサから抽出された物質の一つである *p*-Coumaric acid は、リンパ球の増殖を促進する作用があることが報告されている [30]。これらのこ

とから、本試験で認められた、投与群における MHC class II 陽性 CD14 陰性 B 細胞数の高値は、対照群の栄養状態悪化による B 細胞の分化・増殖応答の低下および投与群に対する *p*-Coumaric acid のリンパ球増殖作用が関与していると考えられた。B 細胞は病原体の抗原を捕らえ Th2 細胞に提示し、Th2 細胞は IL-4 や IL-5 を産生し、B 細胞を活性化する [3]。活性化した B 細胞は増殖し、抗体産生細胞へと分化して、抗体産生が誘導される。産生された抗体は病原体や毒素を直接中和し、その感染性や毒性を消失させる [9]。そのため、B 細胞数が少ないことは、免疫機能の低下に繋がる。これらのことから、SanSTAGE™ には子牛の免疫機能を高める作用があるものと示唆された。

牛は輸送ストレスが加わると T 細胞数が低下することが報告されている [15]。本試験で認められた7日以降の CD3 陽性細胞および CD4 陽性細胞数の増加は、輸送直後にみられた T 細胞数の減少が、その後回復したものと考えられた。

クマイザサ抽出物である SanSTAGE™ は、ヒトにおける NK 細胞の活性化 [14]、腸内菌叢の改善 [14]、ストレスの緩和 [13]、抗炎症作用 [28]、モルモットにおける抗アレルギー作用 [6]、およびラットにおけるエンドトキシン誘発炎症性サイトカインの抑制 [7] など様々な生理作用があることが報告されている。本研究の結果では、投与群において MX2 遺伝子反応量が7日から21日の間で対照群に比べて高い値で推移し、特に SanSTAGE™ の投与期間中である7日に、対照群に比べ有意な高値を示した。7日では、対照群が他の測定ポイントに比べて低値を示しており、投与群との有意差を示す要因となっていると考えられる。牛は移動ストレスにより免疫機能が低下し [12, 27]、その低下は移動後7日程度持続するとの報告 [15] がある。また、本試験の結果では、対照群の7日で栄養状態の指標である Tcho および TG が有意に減少していることから、本研究の結果で認められた、対照群における7日の MX2 遺伝子反応量の低値は、移動ストレスや栄養状態の悪化が影響したものと示唆される。投与群では、MX2 遺伝子反応量は、7日で低下することなく、比較的高い値で推移したこと

から、SanSTAGE™ に子牛のリンパ球での MX2 蛋白産生能を増加させる作用があるものと示唆された。MX2 蛋白質を含む MX 蛋白質は I 型 IFN (IFN α/β) にのみ誘導され、他のサイトカイン因子では誘導されないと報告されている [29]。しかし、IFN α と IFN γ が共に作用すると、相乗的に MX2 遺伝子を増加させるという報告もあり [24]、MX2 遺伝子反応量の増加には、I 型 IFN のみならず IFN γ も関与をしている可能性がある。本試験の結果では、IFN γ 遺伝子反応量の増加は認められなかったが、クマイザサから抽出された物質の一つである *p*-Coumaric acid は、INF γ の分泌量を増加させるとの報告があり [2]、本試験で認められた投与群における MX2 遺伝子反応量の増加には、*p*-Coumaric acid の IFN γ 分泌増加作用が関与している可能性がある。今後、I 型 IFN の遺伝子反応量の測定などの調査が必要と考えられた。MX 蛋白質はウイルスの増殖を阻害することによる抗ウイルス作用を有しており、ウイルス感染初期における生体の抗ウイルス状態の確立に関与している [5]。特に MX2 蛋白質は、牛や水牛において高い抗ウイルス活性を有することが報告されており [1]、本試験で認められた、SanSTAGE™ 投与による MX2 遺伝子反応量の増加は、子牛の抗ウイルス活性を高めた可能性が示唆されるが、投与群の MX2 遺伝子反応量増加の程度は微少であるため、今後子牛における MX2 遺伝子反応量と抗ウイルス活性について検討する必要があると考えられた。

本試験の結果より、SanSTAGE™ には子牛においても人と同様に免疫活性作用があり、疾病予防対策として活用可能と示唆された。しかし、子牛では SanSTAGE™ が作用する免疫細胞やサイトカインがヒトの報告とは異なるため、SanSTAGE™ が子牛の免疫機能に及ぼす影響を今後詳細に検討する必要があると考えられた。

[引用文献]

1. Babiker, H. A., Nakatsu, Y., Yamada, K., Yoneda, A., Takada, A., Ueda, J., Hata, H. and Watanabe, T. 2007. Bovine and water buffalo Mx2 genes: polymorphism and antiviral activity. *Immunogenetics*. 59: 59-67.
2. Chiang, L. C., Ng, L. T., Chiang, W., Chang, M. Y. and Lin, C. C. 2003. Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, triterpenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of *Plantago* species. *Planta Med.* 69: 600-604.
3. Coffman, R. L. 1993. Mechanisms of helper T-cell regulation of B-cell activity. *Ann. N. Y. Acad. sci.* 681: 25-28.
4. Duff, G. C. and Galyean, M. L. 2007. BOARD-INVITED REVIEW: Recent advances in management of highly stressed, newly received feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 85: 823-840.
5. Haller, O., Staeheli, P. and Kochs, G. 2007. Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie.* 89: 812-818.
6. 原 高明, 小澤修二, 泉水直人, 八木勇三. 2011. クマイザサ葉抽出物 (SanSTAGE™) パウダーの抗アレルギー活性について. *Food Function.* 8. 17-22.
7. 原 高明, 八木勇三, 佐藤雪太, 湯川眞嘉, 泉水直人. 2006. エンドトキシン誘発炎症性サイトカイン産生 In Vitro および胃粘膜損傷 In Vivo に対する SanSTAGE の効果. *Food Function.* 2: 54-57.
8. 市川憲一. 1987. 導入直後の肉用牛の呼吸器病. *畜産の研究.* 41: 865-867.
9. 石崎 宏. 2010. 育成期の子牛の免疫抵抗性を低下させる要因. *日本家畜臨床感染症研究会誌.* 5: 47-53.
10. 伊藤麻子, 迫田義博, 亀山健一郎, 山崎幸夫, 白井 章, 喜田 宏. 2008. 牛ウイルス性下痢病および牛伝染性鼻気管炎に対する市販混合ワクチン接種プログラムの中和抗体応答による評価. *日獣会誌.* 61: 39-42.
11. 柿沼清市, 大前桂穂里, 田波絵里香, 佐藤敏子, 綾部杏子, 柿沼元治, 大塚浩通, 安藤貴朗, 及川正明. 2008. BLV 感染牛群における経口用インタフェロン α 製剤の乳房炎予防効果. *家畜感染症会誌.* 3: 33-44.
12. Kegley, E. B., Spears, J. W. and Brown, T. T. Jr. 1997. Effect of shipping and chromium supplementation on performance, immune response, and disease resistance of steers. *J. Anim. Sci.* 75: 1956-1964.
13. 小池田崇史, 斎藤安弘, 八木勇三, 原 高明. 2006. ダイエットストレス誘発不定愁訴および BMI 指標に対する「SanSTAGE」摂取の効果. *新薬と臨床.* 55: 1200-1206.
14. 小池田崇史, 斎藤安弘, 八木勇三, 原 高明. 2007. 便秘傾向者の排便状況, 腸内菌叢およ

- びNK細胞活性にたいする「SanSTAGEソフトカプセル」摂取の効果. 新薬と臨床. 56 : 163-170.
15. 松田敬一, 大塚浩通. 2011. 黒毛和種牛の冬季トラック輸送に対する保温ジャケットの効果. 家畜感染症会誌. 6 : 1-8.
 16. Matsuda, K., Ohtsuka, H., Ichijoh, T. and Kawamura, S. 2006. Effect of dietary administration of bananas on immunocytes in fl hybrid calves. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 75-77.
 17. 松田敬一, 高畑幸子, 大塚浩通. 2008. 黒毛和種子牛の下痢症に対する天然ハーブ・マンナンオリゴ糖配合飼料の予防効果. 家畜診療. 543 : 557-563.
 18. 向井真知子, 近藤夏子, 大塚浩通, 藤原めぐみ, 小比類卷正幸, 勝田 賢, 安藤貴朗, 及川正明. 2008. 感染症の多発した1農場における導入子牛へのイソマルトオリゴ糖製剤給与による疾病予防効果. 家畜感染症会誌. 3 : 23-32.
 19. 中川 尚, 石田 学. 2008. 子牛の呼吸器病が問題とされる繁殖和牛農家におけるマヘンミア・ヘモリチカ(1型)感染症不活化ワクチンの接種効果. 家畜診療. 55 : 577-582.
 20. Ohtsuka, H., Fukunaga, N., Fukuda, S., Hatsugaya, A., Hayashi, T., Hara, H., Koiwa, M., Abe, R. and Kawamura, S. 2005. Effect of nutritional conditions on changes in leukocyte populations in Japanese black calves. *J. Vet. Med. Sci.* 67: 183-185.
 21. 大塚浩通, 小松勝一, 今内 覚, 福田茂夫, 菊 佳男, 吉野和男, 小岩政照, 川村清市. 2001. 黒毛和種とホルスタイン種の子牛における末梢血白血球の比較. 日獣会誌. 55 : 789-795.
 22. Ohtsuka H, Watanabe C, Kohiruimaki M, Ando T, Watanabe D, Masui M, Hayashi T, Abe R, Koiwa M, Sato S, Kawamura S. 2006. Comparison of two different nutritive condition against the change in peripheral blood mononuclear cells of periparturient dairy cows. *J. Vet. Med. Sci.* 68: 1161-1166.
 23. 大塚浩通, 吉敷美友子, 安藤貴朗, 向井真知子, 小比類卷正幸, 田波絵里香. 2011. 哺乳期におけるホルスタイン種子牛の発育と内分泌および免疫状態との関係. 日獣会誌. 64 : 294-299.
 24. Sanda, C., Weitzel, P., Tsukahara, T., Schaley, J., Edenberg, H. J., Stephens, M. A., McClintick, J. N. Blatt, L. M., Li, L., Brodsky, L. and Taylor, M. W. 2006. Differential gene induction by type I and type II interferons and their combination. *J. Interferon Cytokine. Res.* 26: 462-472.
 25. 佐藤良彦, 佐藤友吾, 青柳高弘, 木内英昭, 小澤 尚. 2001. 導入直後に見られた肥育牛の呼吸器複合感染症例. 畜産の研究. 55 : 33-38.
 26. 佐藤 繁, 岡田啓司, 鈴木利行. 2006. 乳牛の末梢血中の好中球およびリンパ球機能に及ぼす活性卵白粉末の影響. 日獣会誌. 59 : 464-466.
 27. Schaefer, A. L., Jones, S. D. and Stanley, R. W. 1997. The use of electrolyte solutions for reducing transport stress. *J. Anim. Sci.* 75: 258-265.
 28. 志村幸洋, 斎藤安弘, 八木勇三, 原 高明. 2006. 「SanSTAGE」の塗布による歯肉炎の改善効果. 新薬と臨床. 55 : 286-292.
 29. Simon, A., Fäh, J., Haller, O. and Staeheli, P. 1991. Interferon-regulated Mx genes are not responsive to interleukin-1, tumor necrosis factor, and other cytokines. *J. Virol.* 65: 968-971.
 30. Tsai, K. D., Lin, B. R., Perng, D. S., Wei, J. C., Yu, Y. W. and Cherng, J. M. 2011. Immunomodulatory effects of aqueous extract of *Ocimum basilicum* (Linn.) and some of its constituents on human immune cells. *Journal of Medicinal Plants Research.* 5: 1873-1883.
 31. 吉田 哲, 中西信夫, 山田浩司. 2006. 植物多糖体C-UP IIIによる成牛および子牛の単球貪食能の活性化. 日獣会誌. 59 : 315-3119.

Immune Activation Effect and Disease Prevention Effect of *Sasa senanensis* Extract (SanSTAGE™) for Holstein Calves.

Keiichi MATSUDA¹⁾, Yasushi SAKAI¹⁾, Hiromichi OHTSUKA²⁾, Yukiko MURAMATSU³⁾,
Hideo HARA³⁾, Yuzo NAKAGAWA-YAGI⁴⁾, Takaaki HARA³⁾

1) Miyagi Prefecture Federation of Agricultural Mutual Aid Associations Central Veterinary Clinical Center
26-1 Arashiyama, Kono, Furukawa, Osaki, Miyagi 989-6251, Japan

2) School of Veterinary Medicine, Kitasato University 3) UNIAL Co.Ltd 4) Hakuju Life science Co., Ltd.

[Abstract]

Male Holstein calves are transported from the dairy farms to cattle feedlot about one month old. Infectious diseases such as pneumonia and diarrhea are frequently observed after the transport. As a result, it is required to establish the preventive measures against the spread of those diseases. In this study, we investigated the effect of the extract of *Sasa senanensis* (SanSTAGE™) administration to Holstein calves on immune activation and disease prevention. Thirty-two healthy male calves were evenly divided into two groups. The calves in the treatment group (n=16) were given substitute milk with SanSTAGE™ (30mg/kg/day) for two weeks after transportation. Other calves in the control group (n=16) were given substitute milk without SanSTAGE™. On Day 0 (before the administration), Day 7, Day 14, Day 21, physical examination and blood sampling to analyze the blood biochemistry, leukocyte subpopulation and cytokine DNA response were conducted. The body weight in treatment group increased on Day 14 and Day 21 compared to those in Day 0. Tcho and TG in control group decreased on Day 7, Day 14 and Day 21 compared to those in Day 0. The number of CD3 positive cells and CD4 positive cells increased on Day 7, Day 14 and Day 21 compared to those in Day 0. The MX2 gene response and number MHCclass II⁺ CD14⁺ cells in treatment group were higher than those in control groups on Day 21. The number of cases of the disease in treatment group was lower than that in control group on Day 21. The results showed that continuous administration of SanSTAGE™ for two weeks immediately after transport has immuneactive effect in Holstein calves, and it might be effective preventive measures against diseases

Key words: Calves, Disease Prevention Effect, Immune Activation Effect, SanSTAGE™