

離乳仔マウスと泌乳マウスの IgA 産生に及ぼすペプチド亜鉛の影響

橋本 知明, 松山 奈央, 杉本 実紀,
池田 俊太郎, 久米 新一
(京都大学大学院農学研究科*)

Effects of Peptide Zn on IgA Induction of Weanling and Lactating Mice

Tomoaki HASHIMOTO, Nao MATSUYAMA, Miki SUGIMOTO, Shuntaro IKEDA and Shinichi KUME
Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan

Summary

The present study was conducted to clarify the effects of peptide Zn on IgA induction in the intestine or mammary glands of weanling and lactating mice. Weanling mice were fed rodent feed and 100 or 150 ppm peptide Zn-supplemented rodent feed for 14 or 21 days, and maternal mice were fed rodent feed or 150 ppm peptide Zn-supplemented rodent feed from 6.5 days postcoitus to 14 days postpartum. Supplemental peptide Zn had no effects on the numbers of IgA antibody-secreting cells (ASC) in the jejunum and ileum of weanling mice, but IgA concentrations in the jejunum tended to be lower in the 150 ppm peptide Zn-supplemented mice after 14 days of treatment. Supplemental peptide Zn tended to increase IgA ASC in the mammary glands and IgA concentrations in the jejunum of lactating mice and IgA concentrations in the feces of neonatal mice. These results indicate that supplementation of peptide Zn is slightly effective to enhance IgA induction in the mammary glands of lactating mice.

亜鉛は動物の成長や繁殖に必要なだけでなく、必須微量元素の中では動物体内に比較的均一に分布し、免疫機能にも関与している¹⁻³⁾。特に、出生直後の新生児は下痢などの疾病予防のために免疫グロブリン (Ig) を豊富に含む初乳の摂取が欠かせない⁴⁾が、Kume と Tanabe (1993)⁵⁾は初乳中の必須微量元素では亜鉛含量が最も高く、乳牛の初乳中亜鉛含量は鉄の約 8 倍、銅の約 140 倍と非常に高い値であることを報告した。筆者らの研究室では、腸管免疫の観点から牛の初乳中に豊富に含まれているβ-カロテンに着目し、β-カロテンを離乳仔マウスに給与すると空腸のレチノイン酸受容体を介してケモカインリガンド CCL25 の mRNA 発現量が増加し、空腸の IgA 産生細胞数と IgA 濃度が増加した⁶⁾ことと、泌乳マウスにβ-カロテンを給与すると回腸と乳腺の IgA 産生細胞数が増加し、乳中への IgA 分泌量が増加した⁷⁾ことを報告した。IgA は腸管内腔の抗原の捕捉や腸管壁からの抗原の侵入防止など、腸管免疫の主要な機能を担っている^{8,9)}が、初乳中に多量に含まれている亜鉛もβ-カロテンと同様に腸管免疫の改善効果が期待できる。

一般に、乳牛などの家畜用飼料には無機態の亜鉛が添加されているが、Shen ら (2014)¹⁰⁾はコーティング処理した酸化亜鉛 (飼料中の亜鉛含量は 380 ppm と 570 ppm)

と高濃度の酸化亜鉛 (飼料中の亜鉛含量は 2250 ppm) を給与した離乳仔豚は、空腸の IgA 濃度と腸管の発達が改善し、下痢の発生率が減少したことを報告した。それに対して、ペプチド亜鉛などの有機物と結合した亜鉛は酸化亜鉛などの無機態亜鉛よりも亜鉛の利用効率や免疫機能の改善効果が高いと報告されている^{1,2,11)}。

飼料中の機能性成分を活用した下痢などの疾病予防法の開発は、新生児の健康維持だけでなく、抗生物質の使用量を低減する。そこで本研究では、離乳仔マウスと泌乳マウスにペプチド亜鉛を給与して、マウスの小腸と乳腺における IgA 産生に及ぼすペプチド亜鉛の影響を調べた。

実験方法

1. マウスの給与試験

ICR 系 3 週齢雄マウス計 36 匹および妊娠マウス計 8 匹を日本クレア (東京) から購入し、マウスは室温 24 ± 2 °C で一定の光周期 (明: 暗サイクル = 14 : 10 時間) に維持された動物飼育室で、個体毎にプラスチックケージに収容して飼育した。これらの動物は、京都大学における動物実験の実施に関する規程 (京都大学動物実験委員会, 2007 年) に従って管理し、水と飼料は自由摂取させた。

*所在地: 京都市左京区北白川追分町 (〒606-8502)

なお、マウス用標準飼料（オリエンタル酵母工業，東京）には亜鉛が48.9 ppm含まれ，またペプチド亜鉛はアミノ酸キレート亜鉛（ノーバス・インターナショナル社，東京）を用いた。

離乳仔マウスは対照区，ペプチド亜鉛100 ppm 給与区およびペプチド亜鉛150 ppm 給与区に割り当てて，マウス用標準飼料あるいはマウス用標準飼料に亜鉛の飼料中添加量が100 ppmと150 ppmになるようにペプチド亜鉛を添加した飼料で14日間および21日間飼養した。離乳仔マウスの体重および飼料摂取量を毎日10:00に測定し，飼育後14日目および21日目に血液，空腸，回腸および直腸糞を前報⁶⁾の方法に従って採取した。

妊娠マウスは対照区およびペプチド亜鉛150 ppm 給与区に割り当てて，マウス用標準飼料あるいはマウス用標準飼料に亜鉛の飼料中添加量が150 ppmになるようにペプチド亜鉛を添加した飼料で交配後6.5日から分娩14日後まで飼養した。母マウスの体重および飼料摂取量と新生仔マウスの体重を毎日10:00に測定した。新生仔マウスは出生後2日目に10匹になるように間引きし，分娩14日後に母マウスから血液，乳腺，空腸，回腸および直腸糞を，また新生仔マウスから血液，胃内容物，小腸および直腸糞を前報⁷⁾の方法に従って採取した。

2. 分析方法

離乳仔マウスおよび母マウスの血清，乳腺，空腸，回腸および糞と新生仔マウスの血清，胃内容物，小腸および糞のIgA濃度は，各サンプルを前報^{6,7)}と同様な方法で前処理後，Mouse IgA ELISA Quantitation Set (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)を用い，測定手順に従ってマイクロプレートリーダー (Multiskan FC; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)で定量した。離乳仔マウスの空腸および回腸と母マウスの乳腺，空腸および回腸のIgA産生細胞数は，各組織を前報^{6,7)}と同様な方法で蛍光免疫染色後，蛍光顕微鏡 (BX50; Olympus, 東京)で画像を撮影し，画像解析ソフト Image Jで単位面積当たりのIgA産生細胞数を計数した。

3. 統計処理

離乳仔マウスおよび母マウスの体重および飼料摂取量と新生仔マウスの体重は，処理と日数を変数にしたモデル式^{6,7)}を用いてSAS¹²⁾のGLMプロシジャーで解析した。採取したサンプルのIgA濃度およびIgA産生細胞数は，処理あるいは採取日を変数にしてSAS¹²⁾のGLMプロシジャーで解析した。有意水準は $P < 0.05$ とし，また $P < 0.10$ で有意な傾向があるとした。

結果

離乳仔マウスの体重および飼料摂取量には，ペプチド亜鉛給与による影響は認められなかった。飼育後14日目と

比較すると，飼育後21日目には離乳仔マウスの血清 ($P < 0.10$)，空腸 ($P < 0.05$)，回腸 ($P < 0.10$) および糞 ($P < 0.01$) のIgA濃度が増加した。離乳仔マウスの飼育後14日目の血清IgA濃度はペプチド亜鉛100 ppm 給与区がペプチド亜鉛150 ppm 給与区よりも高く ($P < 0.01$)，また空腸のIgA濃度は対照区がペプチド亜鉛150 ppm 給与区よりも高い傾向 ($P < 0.10$)を示した (Fig. 1)。しかし，離乳仔マウスの飼育後14日目の回腸および糞のIgA濃度と飼育後21日目の血清，空腸，回腸および糞のIgA濃度には処理間に差は認められなかった。飼育後14日目と比較すると，飼育後21日目には離乳仔マウスの空腸 ($P < 0.10$) および回腸 ($P < 0.01$) のIgA産生細胞数が増加したが，離乳仔マウスの飼育後14日目および21日目の空腸および回腸のIgA産生細胞数には処理間に差は認められなかった (Fig. 2)。

母マウスの体重および飼料摂取量と新生仔マウスの体重には，ペプチド亜鉛給与による影響は認められなかった。泌乳マウスの空腸のIgA濃度と新生仔マウスの糞のIgA濃度はペプチド亜鉛150 ppm 給与区で増加傾向 ($P <$

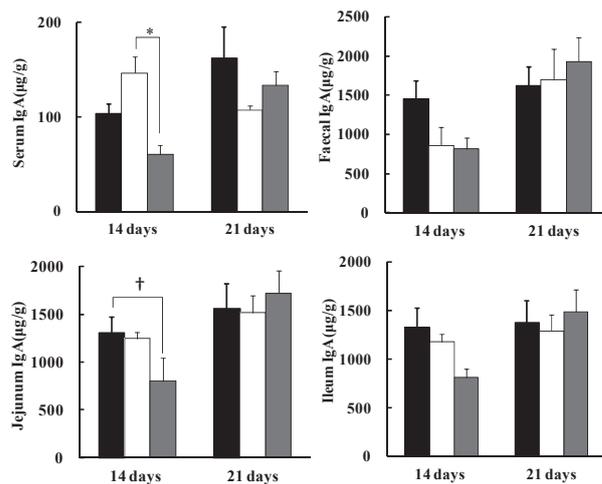


Fig. 1 IgA concentrations in serum, feces, jejunum and ileum of the control (■), 100 ppm Zn (□) and 150 ppm Zn (▨) groups after 14 and 21 days of treatment (Mean ± SE). † $P < 0.10$, * $P < 0.05$.

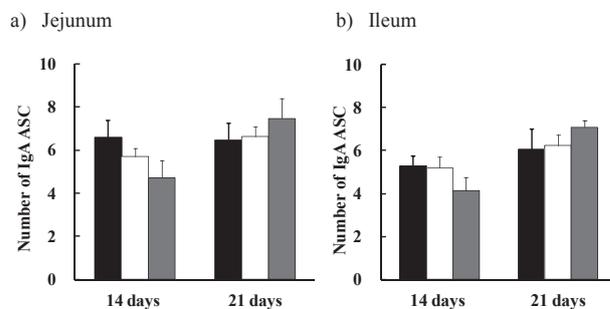


Fig. 2 Numbers of IgA antibody-secreting cells (ASC) in the jejunum and ileum of the control (■), 100 ppm Zn (□) and 150 ppm Zn (▨) groups after 14 and 21 days of treatment (Mean ± SE). The numbers of IgA ASC in the jejunum and ileum were counted in the lamina propria of villi in eight randomized villi from each mouse.

0.10) を示したが、泌乳マウスの血清、乳腺、回腸および糞の IgA 濃度と新生仔マウスの血清、胃内容物および小腸の IgA 濃度にはペプチド亜鉛給与による影響は認められなかった (Table 1)。泌乳マウスの乳腺の IgA 産生細胞数はペプチド亜鉛 150 ppm 給与区で増加傾向 ($P < 0.10$) を示したが、泌乳マウスの空腸および回腸の IgA 産生細胞数にはペプチド亜鉛給与による影響は認められなかった (Table 2)。

考 察

動物の腸管免疫では IgA が重要な役割を果たしているが、小腸のバイエル板や腸間膜リンパ組織は捕捉した抗原を IgA 前駆細胞に提示する役割があるのに対して、小腸の粘膜固有層は IgA 前駆細胞から IgA 産生細胞への分化および増殖と腸管腔への IgA 分泌などに関わっている⁸⁾。動物の乳腺と腸管から分泌される IgA は乳腺と小腸の IgA 産生細胞で生産されるが、乳腺と腸管からの IgA 分泌量を増やすためには腸管で抗原感作された IgA 前駆細胞の IgA 産生細胞への分化および増殖と、乳腺と小腸へのホーミングが必須である^{8,9)}。実際に、乳腺のホーミングレセプターである CCR10 を欠損した泌乳マウスでは乳中への IgA の分泌が阻害され、新生仔マウスの糞中 IgA 濃度が減少したことが報告されている¹³⁾。また、本研究と同様のキレート処理した銅、マンガンと亜鉛添加物を給与した泌乳牛では、無機態の銅、マンガンと亜鉛添加物を給与した泌乳牛よりも抗体価が上昇し、免疫機能が改善した¹⁾。本研究では飼料中の亜鉛添加量が 150 ppm のペプチド亜鉛給与で泌乳マウスの乳腺の IgA 産生細胞数と仔マウスの直腸糞の IgA 濃度が増加傾向を示したことから、ペプチド亜鉛は乳腺における IgA 産生と仔マウスへの IgA 移行にやや効果のあることが推察される。

出生後の新生仔マウスは IgA を乳由来の IgA に依存しているため、出生直後から離乳まで小腸の粘膜固有層に IgA 産生細胞がほとんど検出されない⁷⁾ が、離乳後には飼料摂取によって腸管粘膜が多数の抗原に曝されるため、腸管の IgA 産生細胞と IgA 分泌量が急激に増加する⁶⁾。本研究では離乳仔マウスの空腸および回腸の IgA 産生細胞数と IgA 濃度は飼育後 14 日目から 21 日目にかけて増加したものの、飼料中の亜鉛添加量が 150 ppm になるようにペプチド亜鉛を給与した仔マウスでは飼育後 14 日目の空腸の IgA 濃度が減少傾向を示した。しかし、離乳仔マウスの飼育後 14 日目の空腸および回腸の IgA 産生細胞数と飼育後 21 日目の空腸および回腸の IgA 産生細胞数と IgA 濃度にペプチド亜鉛の影響が認められなかったことから、本研究ではペプチド亜鉛は離乳仔マウスの IgA 産生にはほとんど影響しなかったことが示唆された。

飼料中の機能性成分によって IgA 産生の作用機序とその改善効果は異なるが、筆者らの研究室では β -カロテンはレチノイン酸受容体を介して IgA 産生を改善する^{6,7)} こ

Table 1 IgA concentration ($\mu\text{g/g}$) in serum, mammary glands, jejunum, ileum and feces of maternal mice and serum, stomach contents, small intestine and feces of neonatal mice in the control and 150 ppm Zn groups at 14 days postpartum (Mean \pm SE).

	Control	Zn	<i>P</i>
Mother			
Serum	337 \pm 94	387 \pm 47	0.697
Mammary gland	211 \pm 62	362 \pm 82	0.251
Jejunum	841 \pm 67	1075 \pm 65	0.075
Ileum	781 \pm 139	864 \pm 99	0.686
Feces	289 \pm 141	144 \pm 53	0.429
Neonate			
Serum	0.8 \pm 0.2	1.2 \pm 0.2	0.237
Stomach contents	79 \pm 18	136 \pm 18	0.107
Small intestine	59 \pm 19	92 \pm 7	0.208
Feces	1568 \pm 452	3541 \pm 620	0.068

Table 2 The numbers of IgA antibody-secreting cells (ASC) in the mammary glands, jejunum and ileum of maternal mice in the control and 150 ppm Zn groups at 14 days postpartum (Mean \pm SE).

	Control	Zn	<i>P</i>
Mammary gland	10.8 \pm 1.8	16.8 \pm 1.6	0.076
Jejunum	5.3 \pm 0.9	7.3 \pm 1.5	0.339
Ileum	1.9 \pm 0.6	3.7 \pm 1.3	0.302

The numbers of IgA ASC in the mammary glands were counted in eight randomised fields from each mouse, and values in the jejunum and ileum were counted in lamina propria of villi in eight randomised villi from each mouse.

とと、アスタキサンチンとビタミンCには抗酸化作用による IgA 産生の改善効果がある^{14,15)} ことを報告した。特に、アスタキサンチンによる IgA 産生の改善効果は体内で発生した活性酸素をアスタキサンチンによる抗酸化作用で除去し、IgA 産生細胞を酸化ストレスから保護したことが一因と考えられた¹⁴⁾。亜鉛はスーパーオキシドジスムターゼなど、抗酸化作用のある酵素の重要な構成成分であるため、ペプチド亜鉛による乳腺の IgA 産生改善効果は抗酸化作用が一因と推察されるが、ペプチド亜鉛による腸管免疫改善効果を解明するためにはさらなる研究が必要である。

謝 辞

ペプチド亜鉛をご提供いただいた Meiji Seika ファルマ株式会社と鳥居伸一郎博士 (ノーバス・インターナショナル社) に深謝します。

参考文献

- 1) Nemec LM, Richards JD, Atwell CA, Diaz DE, Zanton GI, Gressley. (2012) Immune responses in lactating Holstein cows supplemented with Cu, Mn, and Zn as sulfates or methionine hydroxy analogue che-

- lates. *J Dairy Sci* 95: 4568-4577.
- 2) National Research Council. (2001) Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th ed. National Academy Science. Washington, DC.
 - 3) Kume S, Mukai A, Shibata M. (1984) Effect of zinc level in rations on zinc concentration in liver and kidney of Holstein cattle. *Anim Sci Technol (Jpn)* 55: 183-190.
 - 4) Stelwagen K, Carpenter E, Haigh B, Hodgkinson A, Wheeler TT. (2009) Immune component of bovine colostrum and milk. *J Anim Sci* 87 (Suppl.1): 3-9.
 - 5) Kume S, Tanabe T. (1993) Effect of parity on colostrum mineral concentrations of Holstein cows and value of colostrum as a mineral source for newborn calves. *J Dairy Sci* 76: 1654-1660.
 - 6) Nishida K, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S. (2014) Effects of supplemental β -carotene on mucosal IgA induction in jejunum and ileum of mice after weaning. *Brit J Nutr* 111: 247-253.
 - 7) Nishiyama Y, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S. (2011) Supplemental β -carotene increases IgA-secreting cells in mammary gland and IgA transfer from milk to neonatal mice. *Brit J Nutr* 105: 24-30.
 - 8) Fagarasan S, Honjo T. (2003) Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature Immunol* 3: 63-72.
 - 9) Harris NL, Spoerri I, Schopfer JF, Nembrini C, Merky P, Massacand J, Urban JF Jr, Lamarre A, Burki K, Odermatt B, Zinkernagel RM, Macpherson AJ. (2006) Mechanisms of neonatal mucosal antibody protection. *J Immunol* 177: 6256-6262.
 - 10) Shen J, Chen Y, Wang A, Zhou A, He M, Mao H, Zou H, Peng Q, Xue B, Wang L, Zhang X, Wu S, Lv Y. (2014) Coated zinc oxide improves intestinal immunity function and regulates microbiota composition in weaned piglets. *Brit J Nutr* 111: 2123-2134.
 - 11) Liu Y, Ma YL, Zhao JM, Vanquez-Anon M, Stein HH. (2014) Digestibility and retention of zinc, copper, manganese, iron, calcium, and phosphorus in pigs fed diets containing inorganic or organic minerals. *J Anim Sci* 92: 3407-3415.
 - 12) Statistical Analysis Systems (SAS). (1997) SAS/STAT software: Changes and Enhancement Through Release 6.12. SAS Institute Cary, NC.
 - 13) Morteau O, Gerard C, Lu B, Ghiran S, Rits M, Fujiwara Y, Law Y, Distelhorst EM, Nielsen EM, Hill ED, Kwan R, Lazarus NH, Butcher EC, Wilson E. (2008) An indispensable role for the chemokine receptor CCR10 in IgA antibody-secreting cell accumulation. *J Immunol* 181: 6309-6315.
 - 14) Nagayama T, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S. (2014) Effects of astaxanthin-enriched yeast on mucosal IgA induction in the jejunum and ileum of weanling mice. *Anim Sci J* 85: 449-453.
 - 15) 泉谷紗也佳・杉本実紀・池田俊太郎・久米新一 (2015) 離乳後マウスの小腸におけるIgA産生に及ぼすビタミンCの影響. *微量栄養素研究* 32: 63-66.