

原 著

絶食ヒナ好異球の殺菌能力の研究

熊 城 由起子

川崎医療福祉大学 医療技術学部 感覚矯正学科

(平成 4 年10月31日受理)

Study of Bactericidal Activity of Heterophils on the Starved Chicks

Yukiko KUMASHIRO

*Department of Sensory Science
Faculty of Medical Professions
Kawasaki University of Medical Welfare
Kurashiki, 701-01, Japan
(Accepted Oct. 31, 1992)*

Key words : chicks, heterophils, starvation, bactericidal activity

Abstract

It is shown by Kondo (1986) that the number of heterophil and phagocytic activity of heterophils in the peripheral blood were increased by the starvation using chicks, and the clearance rates of *Saccharomyces Cerevisiae* was decreased. He reported that these facts dependent on decrease of bactericidal activity of heterophils by the increase of glucocorticoid concentration in blood.

In this experiment, the phagocytic activity was decreased by the injection of corticosterone into the chicks. These results show this activity was not dependent on the glucocorticoid concentration in the peripheral blood. It was shown that the starvation caused the increase of phagocytic activity.

要 約

近藤(1986)は絶食させたニワトリのヒナにおいて末梢血中の好異球数が増加し、その好異球の食食能も上昇するが、*Saccharomyces Cerevisiae* クリアランス能は低下することを観察した。この現象は血中のグルコルチコイド濃度上昇によって好異球の殺菌能力が低下したためにおこったと報告している。

本実験ではコルチコステロン投与によりヒナの好異球の食食能力が低下することを明らかにした。この結果は好異球の食食能力は血中のグルコルチコイド濃度には依存しないこと

をあらわしている。これは好異球の貪食能力の上昇は絶食が原因であることをしめしている。

緒 言

ストレスを負荷されたニワトリでは血漿コルチコステロン濃度の上昇によって免疫能が低下することが報告されており^{1)~4)}、ニワトリでは血漿コルチコステロン濃度の上昇をストレスの指標の一つとみなされている^{5)~7)}。また末梢血中のリンパ球数の減少も有効な指標とされている⁸⁾。

24時間及び48時間絶食させたニワトリのヒナの血漿グルココルチコイド濃度は上昇し、血中のリンパ球は減少した。これらのことから絶食はヒナにとってストレスであることが報告された⁹⁾。さらにその絶食ストレスを負荷されたヒナでは血中からの *Saccharomyces Cerevisiae* クリアランス率が低下した。ニワトリでは *S. Cerevisiae* は主に好異球（哺乳類の好中球に相当する。ただし好中球は活性酸素による殺菌を myeloperoxidase : MPO を介して行うのに対し、好異球は MPO を有していない）によって貪食されることが確認されているが（未発表）、絶食ストレスヒナの血中の好異球数は増加して、その貪食能力も上昇していた。したがって絶食ストレスによって好異球の殺菌・消化が抑制されたために、血中からの異物クリアランス能が低下したと推測された⁹⁾。本実験では絶食ストレス時の好異球の殺菌能力低下の要因が副腎皮質ホルモンであるか否かを検討した。ニワトリのヒナにコルチコステロンを投与した後、血中からの *S. Cerevisiae* のクリアランス能、血中の白血球数、好異球の *S. Cerevisiae* 貪食能と酸化殺菌過程における重要な因子であるスーパーオキシド(O_2^-)の産生量を測定した。

材料と方法

1. 供 試 ヒ ナ

供試ヒナには、6～8週齢の白色レグホーン種の雄ヒナを用いた。コルチコステロン(Sigma C-2505)は落花生油(Nacalai tesque)にけん濁し、2.5, 10, 20mg/0.2ml 落花生油/100 g 体重となるようヒナの下肢に筋肉内注射した。以下コルチコステロン投与ヒナ群はそれぞれ2.5mg

投与群, 10mg 投与群, 20mg 投与群とした。対照のヒナには0.2ml 落花生油/100 g 体重を投与した。

2. 血中から異物クリアランス能の測定

実験群として10mg 投与群と20mg 投与群を設定し、実験群、対照群ともにコルチコステロン投与の3, 7, 14日後にヒナの翼下静脈に0.25 ml/100 g 体重の *S. Cerevisiae* (3×10^8 個/ml 0.9 %食塩水)を注射した。注射後5, 10, 15, 30, 60, 120分に0.3ml ずつヘパリン加採血し、麦芽寒天培地(日水製薬)に0.1ml ずつ滴下して、恒温器内(28℃)で48時間培養した。乳白色、円形のコロニーを形成した *S. Cerevisiae* は血中で好異球に貪食されなかった、あるいは貪食されたが殺菌・消化されなかったもので、この数を *S. Cerevisiae* の血中残存数とした。

3. 末梢血中の白血球数の測定

実験群として2.5mg 投与, 10mg 投与, 20mg 投与の各実験群を設定し、コルチコステロン投与1, 3, 7, 14日後にヒナの翼下静脈から0.5ml ずつ採血した。その血液を Natt & Herick 染色液¹⁰⁾で希釈、染色して顕微鏡下で好異球、単球及びリンパ球数を測定し、コルチコステロン投与前に測定した数値と比較した。

4. 好異球の貪食能力の測定

実験群として2.5mg 投与, 10mg 投与, 20mg 投与の各実験群を設定し、コルチコステロン投与1, 3, 7, 14日後、ヒナの頸静脈から約20ml ヘパリン加採血した。得られた血液は Ficoll 液(Histopaque-1077 Sigma, Ficoll 液)で処理して好異球(純度90%以上)を分離した。好異球は HEPE S-RPM1640培養液(日水製薬)で 5×10^6 個/ml の濃度に調整した。

好異球浮遊液0.4ml に *S. Cerevisiae* 浮遊液(1×10^8 個/ml of HEPES-RPMI 1640培養液)0.4ml と実験直前に採取した新鮮ニワトリ血清(無処理のノーマルニワトリより採血)0.2ml を加え、振とう培養器で39℃, 30分間培養した。培養液中の好異球100個を顕微鏡下で観察して、*S. Cerevisiae* を貪食している好異球と貪食していない好異球の割合を求めた。さらに異物貪食

を示す好異球内に取り込まれた *S. Cerevisiae* 数の平均値を好異球の *S. Cerevisiae* 貪食数として求めた。殺菌・消化による溶解によって *S. Cerevisiae* が不鮮明な像を呈しているために好異球内の *S. Cerevisiae* 数を求めることが困難な好異球が少数みられたがこれらの好異球は測定から除外した。

5. 好異球による O_2 産生量の測定

O_2 -測定にはニトロブルーテトラゾリウム (NBT) による Baehner¹¹⁾ の方法を用いた。好異球浮遊液 2 ml (5×10^6 個/ml) に *S. Cerevisiae* 浮遊液 (1×10^8 個/ml) 2 ml, 新鮮ニワトリ血清 1 ml, 0.1% NBT (Sigma) HEPES-RPMI 1640 培養液 2 ml, 0.01% KCN HEPES-RPMI 1640 培養液 0.5 ml を加えて混和液を調整した。混和後直ちに回収したものを比色用のブランクとした。混和液は 39℃ の振とう培養器で培養し、一定時間 (15, 30, 60 分) 経過ごとに 1.5 ml ずつ反応液を回収して、0.5 N HCl 10 ml で反応停止させ、遠心分離 (2200rpm, 4℃, 15分) した。上清除去した細胞沈渣にピリジンを 2 ml 加え、沸騰水中に 10 分間浸した。その反応液を遠心分離 (1600rpm, 4℃, 15分) し、上清を 515nm の吸光度で測定し、得られた吸光度を O_2 -産生量とした。

結 果

1. コルチコステロン投与による血中からの異物クリアランスの変化

S. Cerevisiae 末梢血中残存数は *S. Cerevisiae* 投与後実験区、対照ともに経時的に減少したが、同じ測定時間において *S. Cerevisiae* 数を比較すると 20mg 投与群、10mg 投与群、対照の順に多く、投与量に比例した (Fig. 1)。この結果はコルチコステロン投与 3 日目、7 日目、14 日のすべての時点において認められた。特に 20mg 投与群の *S. Cerevisiae* 残存数は対照と比較して、すべての時点 (コルチコステロン投与後 3, 7 及び 14 日目) 及び測定時間 (*S. Cerevisiae* 投与後 5 から 20 分) において有意に増加した。血中の異物クリアランスはコルチコステロン投与濃度に比例して低下した。

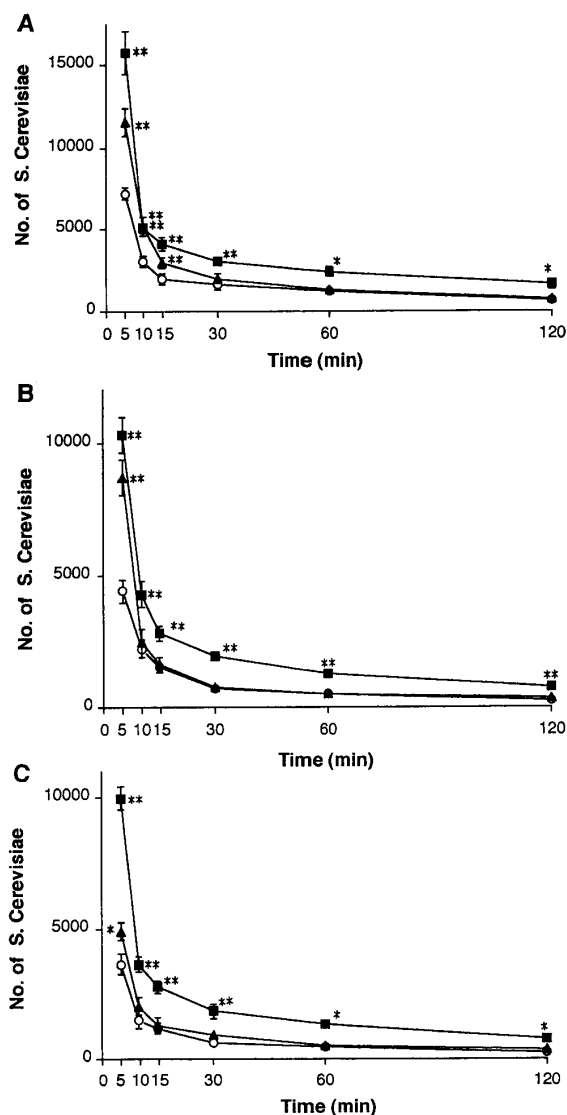


Fig. 1 Changes in the clearance rates of *S. Cerevisiae* from blood of chicks by corticosterone.

A : 3 days, B : 7 days, C : 14 days, after injection of corticosterone.

○ : control, ▲ : 10mg, ■ : 20mg

Data are presented as means \pm SE

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with control.

2. コルチコステロン投与によるヒナの血中の白血球数の変化

コルチコステロン投与によって、投与前と比較して各実験区ともリンパ球数は減少、好異球数は増加して、単球も増加傾向を示した。この現象はコルチコステロン投与後 1 日目と 3 日目で顕著に認められ、さらに投与濃度とも相関性

Table 1 Changes in the blood leucocytes counts in chicks by corticosterone. Data are presented as means \pm SE. * <0.05, ** p<0.01, *** p<0.001 compared with preinjection.

Days after injection with corticosterone	Doses/100g of BW (mg)	No. of chicks	Leucocyte counts/mm ³		
			Lymphocytes	Heterophils	Monocytes
preinjection	2.5	10	19000 \pm 2000	3300 \pm 630	3800 \pm 530
	10.0	9	15780 \pm 1790	1100 \pm 350	2600 \pm 760
	20.0	9	19670 \pm 2290	2220 \pm 660	2890 \pm 750
1 day	2.5	10	13500 \pm 2450	7220 \pm 2050	8500 \pm 1380
	10.0	10	8500 \pm 1900*	7800 \pm 2360*	4900 \pm 1070
	20.0	9	7560 \pm 2040**	7170 \pm 1740*	4780 \pm 1330
3 days	2.5	9	10220 \pm 1540**	4400 \pm 970**	4600 \pm 1380
	10.0	9	13110 \pm 2700	8330 \pm 2550*	4330 \pm 600
	20.0	9	15000 \pm 2310	5880 \pm 880**	5220 \pm 700*
7 days	2.5	10	18100 \pm 2320	3100 \pm 620	3900 \pm 780
	10.0	8	11500 \pm 1580	1670 \pm 730*	1630 \pm 560
	20.0	8	13630 \pm 1180*	5880 \pm 2550	4560 \pm 1410
14 days	2.5	9	14220 \pm 2420	880 \pm 400*	6720 \pm 1240
	10.0	6	15000 \pm 2250	2400 \pm 400*	3500 \pm 500
	20.0	6	8830 \pm 1110***	1830 \pm 1080	5140 \pm 1830

が認められた。(Table 1).

3. コルチコステロン投与による好異球の食食能力の変化

S. Cerevisiae を食食した好異球の割合はコルチコステロン投与後1, 3日目では対照と比較して各実験区とも有意に低下した。コルチコステロン投与後7, 14日目では2.5mg 投与群では低下傾向を示したが有意差は認められなかったが, 10mg 投与群, 20mg 投与群は有意に減少し, 食食好異球の割合の低下はコルチコステロン投与濃度に比例した (Table 2).

食食能を示した好異球内に取り込まれた *S. Cerevisiae* 数はコルチコステロン投与後1, 3, 7, 14日目の各時点では, 対照と比較して2.5mg 投与群, 10mg 投与群, 20mg 投与群の各実験区とも減少した (Table 2). 好異球の食食能に対するコルチコステロンの影響はコルチコステロン投与後14日目においても認められ, 投与濃度に比例して低下する傾向を示した。

4. コルチコステロン投与による好異球からの O₂⁻産生量の変化

コルチコステロン投与後1, 3, 7日目では

好異球の O₂⁻産生量は各測定時間の対照と比較して低下し, コルチコステロン濃度に比例した。

(Fig. 2 A, B, C). コルチコステロン投与後14日目では培養後30分で各投与群が対照より上回ったが, 培養15, 60分の時点では対照と比較して低下傾向を示した。(Fig. 2 D).

考 察

ニワトリではストレスによる免疫能低下は血漿グルココルチコイド濃度上昇が要因であると考えられている。コルチゾンや ACTH 投与¹²⁾, あるいはコルチコステロン給与¹³⁾によって血漿グルココルチコイド濃度を上昇させたニワトリでは免疫能が低下したとの報告がある。本実験ではコルチコステロンを投与したヒナの末梢血中の白血球はコルチコステロン投与量に比例してリンパ球は減少, 好異球数は増加した。これによってコルチコステロン投与によりヒナはストレス状態に類似した状態にあると推察された。

24時間, あるいは48時間絶食させたニワトリのヒナでは48時間絶食群のほうが血漿グルココルチコイド濃度は高く, 異物クリアランス能も

Table 2 Changes in the phagocytic activity of heterophils in chicks by corticosterone. Data are presented as means \pm SE. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared with control.

Days after injection with corticosterone	Doses/100g of BW (mg)	No. of chicks	Rates of heterophil Phagocytosing <i>S. Cerevisiae</i> (%)	No. of <i>S. Cerevisiae</i> ingested into heterophil
1 day	—	6	95.60 \pm 0.51	2.87 \pm 0.19
	2.5	6	85.83 \pm 1.64**	2.22 \pm 0.09*
	10.0	6	85.67 \pm 1.84**	2.14 \pm 0.04*
	20.0	6	84.33 \pm 1.98***	1.93 \pm 0.15**
3 days	—	6	96.67 \pm 1.20	2.86 \pm 0.12
	2.5	6	85.67 \pm 1.80***	2.28 \pm 0.10**
	10.0	6	82.00 \pm 2.41***	2.10 \pm 0.04**
	20.0	6	78.00 \pm 2.48***	1.97 \pm 0.11***
7 days	—	4	95.25 \pm 1.25	2.90 \pm 0.03
	2.5	4	90.00 \pm 2.94	2.54 \pm 0.33*
	10.0	4	85.50 \pm 1.04***	2.44 \pm 0.22*
	20.0	4	82.00 \pm 1.58***	1.97 \pm 0.14*
14 days	—	6	98.00 \pm 0.77	2.87 \pm 0.09
	2.5	6	95.83 \pm 1.19	2.54 \pm 0.11*
	10.0	6	86.67 \pm 1.89***	2.23 \pm 0.21*
	20.0	6	89.50 \pm 0.76***	2.42 \pm 0.14*

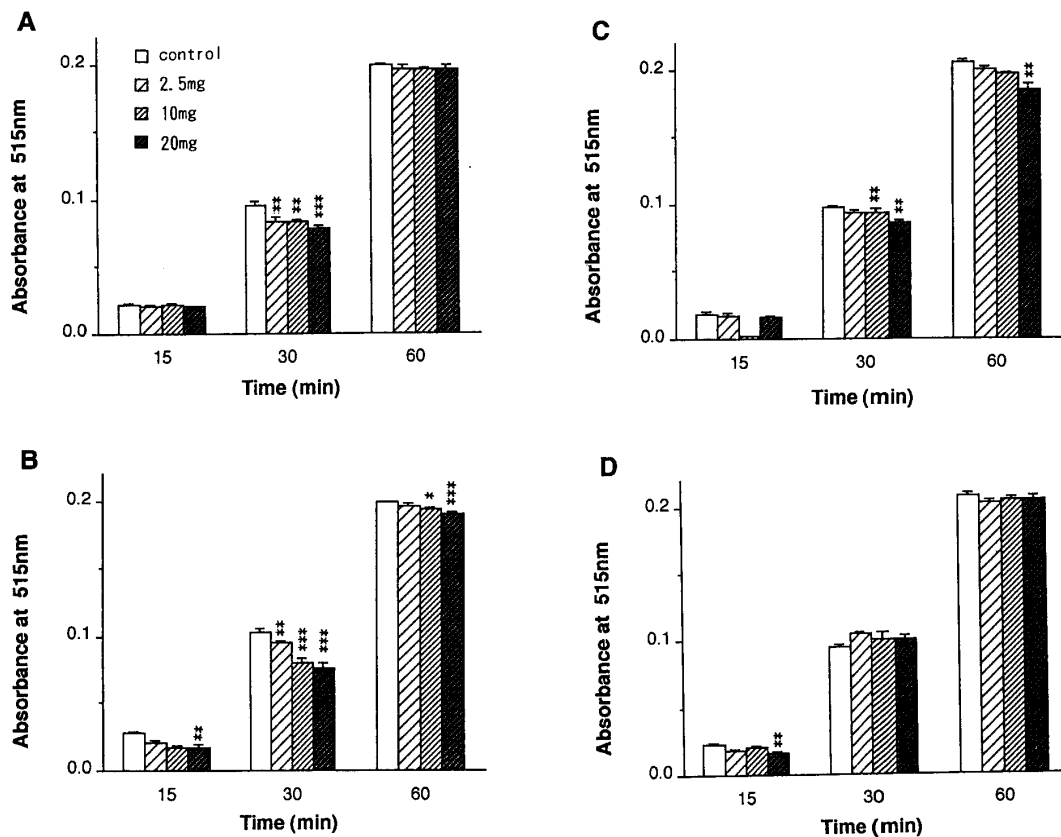


Fig. 2 Changes in O_2^- release of heterophils by corticosterone A : 1 day, B : 3 days, C : 7 days, D : 14 days after injection of corticosterone. Data are presented as means \pm SE. * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared with control.

低かった。コルチコステロン投与したヒナの末梢血中の異物クリアランス能もコルチコステロン投与量に比例して低下した。異物クリアランス能の低下はコルチコステロン濃度に依存すると推測した。

コルチコステロンを給与したニワトリの食細胞のオプソニンインデックスが低下し¹³⁾、またデキサメタゾンによりハムスターの好中球のケモタキシスや異物貪食が阻害されたとの報告¹⁴⁾がある。これらのことからコルチコステロン投与したヒナの好異球の *S. Cerevisiae* 貪食能が低下したのはコルチコステロンが要因であるといえる。

好異球の O_2^- 産生はコルチコステロン投与により抑制された。貪食細胞の殺菌は主に活性酸素 (O_2^- , H_2O_2 , $OH\cdot$, 1O_2 など) による殺菌である。 O_2^- は貪食細胞が最初に産生する活性酸素で、 O_2 が 1 電子還元されて O_2^- となったものである。 O_2 を還元する NADPH オキシダーゼは膜刺激 (抗原抗体複合体・補体・走化性因子の受容体結合、脂肪酸、界面活性剤刺激など) によって活性化される¹⁵⁾。それに伴ってヘキソースモノリン酸側路が更新され NADPH が供給される。本実験では貪食抑制による細胞膜刺激の減少に伴う O_2^- 産生低下と推測される。

これらのことからコルチコステロンを投与したヒナでは好異球の貪食能力の低下によって血中の異物クリアランスが低下したことは明らかである。この結果から絶食ヒナの好異球の貪食

能力の上昇はコルチコステロンによるものではなく、絶食が要因であることがわかった。

高温暴露したニワトリでは補体活性低下と血漿コルチコステロン濃度には相関性が認められず、熱刺激によって補体活性が抑制されたと報告がある¹⁶⁾。

ストレスによる免疫能低下はコルチコステロン単一の因子によるものではなく、ストレスサーとなった刺激自体も因子として作用していることが確認された。ストレスによる免疫低下を調べるには免疫低下の因子がストレスサーとなる刺激によるものか、ストレス負荷による生体の非特異的応答によるものなのか、判別する必要がある。

アスコルビン酸に抗ストレス作用があることはよく知られている¹⁷⁾⁻¹⁸⁾。アスコルビン酸投与によるコルチコステロン合成阻害¹⁹⁾によるもので、アスコルビン酸によってステロイド投与による免疫抑制が改善したという報告もある²⁰⁾。免疫機能へのコルチコステロンの作用を調べるうえでアスコルビン酸投与による免疫機能回復の検討も有効かと思われる。

本実験を遂行するにあたり御指導いただいた岡山大学農学部近藤康博助教授に深く感謝申し上げます。またご協力いただいた愛知県畜産試験場豊島浩一氏に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Glick B, Taylor RL, Martin DE, Watabe M, Day EJ and Thompson D (1983) Calorie-protein deficiencies and the immune response of chicken. II. Cell-mediated immunity. *Poultry Science*, **62**, 1889—1893.
- 2) Reginer JA, Kelley KW and Gaskins CT (1980) Acute thermal stressors and synthesis of antibodies in chickens. *Poultry Science*, **59**, 985—990.
- 3) Regnier JA and Kelley KW (1981) Heat and cold stress suppressed in vivo and in vitro cellular immune responses in chickens. *American Journal of Veterinary Research*, **42**, 294—299.
- 4) Subba Rao DSV and Glick B (1970) Immuno-suppressive action of heat in chickens. *Proceeding of Society of Experimental Biology and Medicine*, **133**, 445—448.
- 5) Freeman BW (1976) Stress and the domestic fowl, a physiological re-appraise. *World's Poultry Science Journal*, **32**, 249—256.
- 6) Hill JA (1983) Indications of stress in poultry. *World's Poultry Science Journal*, **39**, 24—32.

- 7) Etches RJ (1976) A radioimmunoassay for corticosterone and its application to the measurement of stress in poultry. *Steroids*, **28**, 763—773.
- 8) Gross WB and Siegel HS (1983) Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Diseases*, **27**, 972—979.
- 9) Kondo Y, Taniguchi Y and Tanabe A (1986) The effect of starvation on the phagocytic and bacteriocidal activities in heterophils of chicks. *Japanese Poultry Science*, **23**, 269—275.
- 10) Natt MP and Herick CA (1952) A new blood diluent counting the erythrocytes and leucocytes of the chickens. *Poultry Science*, **31**, 735—738.
- 11) Baehner RI and Nathan DG (1968) Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *New England Journal of Medicine*, **278**, 971—980.
- 12) Glick B (1967) Antibody and gland studies in cortisone and ACTH-injected birds. *Journal of Immunology*, **98**, 1076—1084.
- 13) Gross WB, Siegel HS and Dubose RT (1980) Some effects of feeding corticosterone to chickens. *Poultry Science*, **59** : 515—522.
- 14) Katori M, Oda T and Nagai K (1990) A site of action of dexamethazone on leukocyte extravasation in microcirculation. *Agent and Actions*, **29**, 24.
- 15) 康 東天, 中村三千男, 中野 稔, 柿沼カツ子 (1990) 白血球の代謝. 水上茂樹, 柿沼カツ子, 竹重公一朗 編, 白血球と生態防御, 初版, 講談社, 東京, pp 79—143.
- 16) Komine K, Ohta H, Kamata S, Kakiichi N, Fujii H and Uchida K (1991) Influence of the heat-stress on the complement activity and hormone-level in chickens. *The Japanese Journal of Zootechnical Science*, **62**, 972—974.
- 17) Nathan DB, Heller ED and Perek M (1976) The effect of short heat stress upon leucocyte count, plasma corticosterone level, plasma and leucocyte ascorbic acid content. *British Poultry Science*, **17**, 481—485.
- 18) Heywang BW and Kemmerer AR (1955) The effect of procaine penicillin and ascorbic acid on egg weight and shell thickness during hot weather. *Poultry Science*, **34**, 1032—1036.
- 19) Schmeling SK and Nockels CF (1978) Effect of age, sex, and ascorbic acid ingestion on chicken plasma corticosterone levels. *Poultry Science*, **57**, 527—533.
- 20) Pardue SL and Thaxton JP (1984) Evidence for amelioration of steroid-mediated immunosuppression by ascorbic acid. *Poultry Science*, **63**, 1334—1338.