

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：3 2 6 0 7

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：2 0 K 0 6 3 8 0

研究課題名（和文）腸管での匂い感知はニワトリの腸管グルコース吸収を制御するか

研究課題名（英文）Does the intestinal odor sensing regulate the intestinal glucose absorption in chickens?

研究代表者

高橋 辰行（Takahashi, Tatsuyuki）

北里大学・獣医学部・助教

研究者番号：8 0 7 0 7 8 5 2

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：肉用鶏の成長に伴う腸管グルコース吸収の低下要因を明らかにするために、腸内匂い物質に着目し、匂い物質の同定、機能および腸内細菌叢解析を実施した。1、2、5週齢の肉用鶏を用いて腸管内容物から匂い物質を固相マイクロ抽出法および有機溶媒抽出法の2種類により抽出し、ガスクロマトグラフィー質量分析法により各100種類程度の匂い物質を同定した。同定した匂い物質の中から選抜した候補物質を用いて腸管グルコース吸収試験を行なった結果、数種の物質でわずかな抑制あるいは促進効果が観察されたが有意な差は見られなかった。また、これらの内容物の細菌叢解析により、分類および多様性は成長に伴い変化することが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は肉用鶏生産における新たな飼料開発と匂いで飼養管理を制御することを最終目的とし、腸管内で産生される匂い物質が腸管グルコース吸収の制御因子として機能しているという新しい視点での試みであった。本研究によってわずかであるがグルコース吸収を制御する匂い物質が存在することが確認できたが、強力に腸管グルコース吸収を制御する匂い物質の同定までには至らなかった。また、腸内匂い物質は成長とともに大きく変化することが明らかとなった。今後更なる研究が必要ではあるが、本研究成果は肉用鶏生産において、匂い物質を新たな飼養管理技術として利用できる可能性があり、飼料自給率の向上や新規飼料開発に貢献するものである。

研究成果の概要（英文）：To determine the factors that cause the decrease in intestinal glucose absorption in broiler chickens with growth, intestinal odorants were identified, their functions and gut microbiota analysis was carried out. The odorants were extracted from the intestinal contents of 1-, 2- and 5-week-old chickens using two different methods, headspace solid phase micro extraction and organic solvent extraction, and then approximately 100 odorants were identified by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). Intestinal glucose absorption tests were performed using candidate substances selected from among the identified odorants. Although there were slightly inhibitory or acceleratory effects for several odorants, no significant differences were observed. Analysis of microbiota derived from intestinal contents showed that composition and alpha diversity of microbiota changed with growth of broiler chickens.

研究分野：家畜栄養生理学

キーワード：匂い物質 腸管内容物 グルコース吸収 ブロイラー

1. 研究開始当初の背景

国内の鶏肉および鶏卵生産における自給率は、鶏肉ではおよそ 65%、鶏卵ではおよそ 95%となっており高い自給率である。しかしながら、給与飼料のほとんどは輸入穀物飼料に依存していることから、飼料自給率を考慮すると 10%程度まで低下する。飼料価格は世界情勢とともに大きく変動するため、消費者へ安定した生産物を提供するためには、現在の生産効率を維持したまま飼料自給率を向上させる新たな飼料開発が必要であると言える。

腸管からの栄養素の吸収は、生体内のエネルギー代謝の起点であることから、成長過程における栄養素の吸収制御の理解は飼料開発には欠かすことができない。申請者のこれまでの研究より、肉用鶏（ブロイラー）の腸管グルコース吸収は成長に伴い面積当たりの吸収が低下することを明らかにしてきた。しかしながら、この低下要因は未だ不明である。動物が摂取する食餌は成長とともに変化し、これに伴い腸内環境も変化する。ニワトリにおいても同様であり、孵化後のニワトリは卵黄嚢から栄養を獲得するが、その後は飼料などの餌から栄養を獲得する。さらに、ブロイラーにおいては、摂食量が極めて高いという特徴がある。これらのことから、ブロイラーにおいても腸内環境、つまり腸内細菌叢は著しく変化する。腸内細菌は多くの代謝産物や匂い物質を産生することが知られている。さらに近年、匂いを感知する嗅覚受容体が腸管にも発現し、様々な生理作用を有しており、生体の恒常性維持の役割を担っていることが報告されている。これらのことから、腸内で産生される匂い物質がブロイラーの成長に伴う腸管グルコース吸収の低下要因の可能性が考えられる。

2. 研究の目的

以上のことより、ブロイラーの成長に伴う腸管グルコース吸収の低下要因を明らかにすることは、より効率的なグルコース吸収を実現することが可能となり、新たな飼料開発への貢献ができる。また、この制御と匂い物質の関連性を見出すことができれば、飼養管理を匂いで制御できるという大きなメリットもある。そこで本研究では成長に伴う腸内環境の変化が腸管グルコース吸収へ与える影響を明らかにすることを目的とし、腸内匂い物質というこれまでにない視点から成長に伴う腸管グルコース吸収の低下機序の解明を目指した。実験 1.および 3.では異なる方法を用いて腸管内容物から匂い物質を同定し、実験 2.および 4.では同定物質による腸管グルコース吸収への影響を検討した。さらに実験 5.では腸管内容物における細菌叢解析を行なった。これらを通して、ブロイラーの腸管グルコース吸収における匂い物質の関わりを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) ヘッドスペース固相マイクロ抽出 (SPME) 法による匂い物質の同定

SPME 法で用いるファイバーを決定するために、4 種類のファイバー (Carboxen/PDMS、Polyacrylate、DVB/Carboxen/PDMS、PDMS/DVB) を用いて最適ファイバーを決定した。ファイバーの決定には試料として 1 週齢のブロイラーを用いた。匂い物質を吸着させた後、ガスクロマトグラフィー質量分析装置 (GC-MS) で同定した。ファイバーの決定後、1、2、5 週齢の腸管内容物を用いて、同様の方法でファイバーに吸着させ、GC-MS で同定した。同定した 100 種類の物質の中から、1 週齢のみで検出される物質、2 週齢および 5 週齢で検出される物質、すべての週齢で検出され週齢間で増減のある物質を選抜した。

(2) SPME 法によって同定した匂い物質存在下におけるグルコース吸収の検討

1 週齢のブロイラーを用いて、グルコース吸収試験を実施した。具体的には実験(1)で選抜した 1,8-シネオール、アセトイン、ジアセチル、シトロネロールあるいは上記 4 種の化合物混合液を用いて、反転腸管法によりグルコース吸収を検討した。また、刺激濃度は 0.1 mM、1 mM、10 mM とした (混合溶液は 0.1 mM のみとした。)

(3) 有機溶媒抽出法による匂い物質の同定

SPME 法は試料を温めることで、表面に存在する匂い物質を抽出するため、対象物質の内側から発生する匂いまで補集することはできない。有機溶媒抽出法は匂い成分を有機溶媒 (ペンタン・エーテル) によって匂い物質を抽出し、試料全体から幅広い匂い物質を抽出できることから、有機溶媒抽出法を用いて、1、2、5 週齢の腸管内容物および 1 週齢の卵黄嚢に含まれる匂い物質を抽出し、GC-MS によって匂い物質を 100 種類同定した。同定した物質を主成分分析し、候補物質の選抜を行った。

(4) 有機溶媒抽出法によって同定した匂い物質存在下におけるグルコース吸収の検討

1 週齢のブロイラーを用いて、グルコース吸収試験を実施する予定であったが、鳥インフルエンザの発生によって入手が不可能となったため、ニワトリと同様の吸収制御機構を有しているマウスを用いて短絡電流解析法によるグルコース吸収を解析した。実験には、まず 5 週齢の内

容物から抽出した抽出物が腸管グルコース吸収に与える影響を検討し、次に実験(3)で選抜した4-エチルベンズアルデヒド、4-イソプロピルベンジルアルコール、4'-エチルアセトフェノン、1,4-ジアセチルベンゼンを用いて検討した(刺激濃度は各0.1 mMとした。)

(5) 腸内細菌叢解析

1、2、5週齢のプロイラーの腸管内容物を用いて、各週齢における細菌叢解析を行なった。各週齢の腸管内容物からDNAを抽出し、16S rRNA領域特異的プライマーを用いてPCRによって増幅した。その後、精製を経てライブラリーを作製した。次世代シーケンサーで作製ライブラリーを解析した。解析後、分類解析および多様性解析を行なった。

4. 研究成果

(1) SPME法による匂い物質の同定

ファイバーの検討では、ピークの高さやピーク数を考慮し、Carboxen/PDMSが最も平均的に良好な結果であったためこれを実験に用いることにした。このファイバーを用いて1、2、5週齢の腸管内容物から匂い物質を抽出し、GC-MSによって同定した。方法で記載した週齢で特徴的な各匂い物質を選抜した結果、シトロネロール(1週齢のみで検出)、ジアセチル(2および5週齢で検出)、アセトイン(すべての週齢で検出され、成長に伴い増加)、1,8-シネオール(すべての週齢で検出され、成長に伴い低下)となった。

(2) SPME法によって同定した匂い物質存在下におけるグルコース吸収の検討

各匂い物質存在下でのグルコース吸収は、シトロネロールではやや低下し、1 mMで最も低下していた。ジアセチルにおいては濃度依存的に低下していた。アセトインには大きな変化は見られなかった。1,8-シネオールは0.1 mMでやや上昇し、10 mMで低下していた。上記4種類の匂い物質の混合溶液(0.1 mM)では変化は見られなかった。以上のことからシトロネロール、ジアセチルおよび1,8-シネオールには、わずかではあるが腸管グルコース吸収を制御しているが、その効果は弱いことが明らかとなった。

(3) 有機溶媒抽出法による匂い物質の同定

同定した1、2、5週齢の腸管内容物および1週齢の卵黄嚢に含まれる匂い物質を主成分分析すると、それぞれ異なった位置でグループ化された。2週齢と5週齢の匂い物質は近い位置でグループ化されていたことに対して、1週齢では離れた位置にあった。また卵黄嚢においては2週齢と5週齢に近い位置にあった。このことから、1週齢の腸管内匂い物質は2および5週齢と異なり、さらに卵黄嚢に含まれる匂い物質とも異なることが推察された。さらにこの結果をもとに特徴的な匂い物質を選抜すると、8種の匂い物質(4-エチルベンズアルデヒド、4-イソプロピルベンジルアルコール、3-エチルアセトフェノン、4'-エチルアセトフェノン、1,4-ジアセチルベンゼン、3-エチルフェノール、2-ヒドロキシ-N-メチル-2-フェニルプロパンアミド、2,3-ジメチル-2,3-ジフェニルブタン)が週齢間で大きく変化していた。4-エチルベンズアルデヒド、4-イソプロピルベンジルアルコール、3-エチルアセトフェノン、4'-エチルアセトフェノン、1,4-ジアセチルベンゼン、2-ヒドロキシ-N-メチル-2-フェニルプロパンアミドは1週齢と比較して2週齢および5週齢で有意に低下していた。3-エチルフェノールは1週齢よりも2週齢で有意に低下し、5週齢では検出されなかった。2,3-ジメチル-2,3-ジフェニルブタンは2週齢と比較して5週齢で有意に低下していたが、1週齢では検出されなかった。

(4) 有機溶媒抽出法によって同定した匂い物質存在下におけるグルコース吸収の検討

5週齢の内容物から抽出した抽出物で刺激培養すると、有意差は見られなかったが、短絡電流値の上昇が見られた。さらに、実験(3)で同定した4-エチルベンズアルデヒド、4-イソプロピルベンジルアルコール、4'-エチルアセトフェノン、1,4-ジアセチルベンゼンをそれぞれ用いて、グルコース吸収に与える影響について同様の方法で検討した。4-エチルベンズアルデヒド存在下ではグルコース吸収時における短絡電流値はやや低下し、4-イソプロピルベンジルアルコールおよび4'-エチルアセトフェノンはやや上昇した。1,4-ジアセチルベンゼンでは変化が見られなかった。以上のことから4-エチルベンズアルデヒド、4-イソプロピルベンジルアルコールおよび4'-エチルアセトフェノンには、わずかではあるが腸管グルコース吸収制御に関与していることが示唆されたが、その効果は弱いことが明らかとなった。

(5) 腸内細菌叢解析

各週齢の腸管内容物を用いた細菌叢解析より、すべての週齢は*Pediococcus*属と*Enterococcus*属でおおよそ50%程度占められていた。*Pediococcus*属は1週齢では55%、2週齢では65%、5週齢では36%となり、5週齢で最も低かった。*Enterococcus*属は1週齢では36%、2週齢では17%、5週齢では10%となり、成長に伴い低下していた。また、*Escherichia-Shigella*は1週齢では0.6%、2週齢では14%、5週齢では19%となり、成長に伴い増加を示した。多様性解析では1週齢が最も多様性が低く、2週齢で最も多様性が高くなった。しかしながら、個体差が大きく更なる追跡調査が必要となる結果だった。

本研究より、腸内匂い物質の組成およびその濃度は成長に伴い大きく変化することが明らかとなった。一方で表面的な匂い成分を捕集する SPME 法と試料全体から匂いを抽出する有機溶媒抽出法では異なる匂い物質が同定された。両抽出法とも各週齢において特徴的な匂い物質を選抜し、腸管グルコース吸収への効果を検討した結果、いくつかの匂い物質は腸管グルコース吸収の制御に関与している可能性が示唆されたが、有意な効果は得られず有用な匂い物質の同定には至らなかった。また、腸管内容物における細菌叢解析より、成長に伴い細菌叢も大きく変動することが明らかとなった。今後、腸内細菌叢と同定物質との関連性から別の匂い物質を選抜し、更なる追跡調査を実施することで有用な匂い物質を同定する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋辰行，時川千晴，横山 忞成，有原圭三，小酒井貴晴，黒瀬陽平
2. 発表標題 プロイラーの腸管グルコース吸収における匂い物質の影響
3. 学会等名 日本畜産学会第128回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------