

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580391

研究課題名(和文) 腸管栄養吸収を制御するケミカルセンサーの解析と動物資源生産への応用

研究課題名(英文) Morphological elucidation of nutrients absorption and chemical sensor in the gastrointestinal tract by new imaging methods in animal production science

研究代表者

松本 由樹 (Matsumoto, Yoshiki)

香川大学・農学部・准教授

研究者番号：90335844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：動物生産科学領域における機能性飼料の研究では、栄養成分の可視化と飼育環境評価が求められている。フーリエ変換型赤外分光光度計 (FT-IR) を用いた可視化法は確立している。カルシウム沈着やコラーゲン成熟度の可視化は、形態学変化に連動する。栄養吸収の可視化研究では、SEM、一般染色、分光imaging法を併用し、異なる環境下の消化管でAmide I (C=O) 発現を同定し、FT-IR、MALDI-TOF MS imagingを確立できた。栄養吸収時の陥入や細胞隆起等、腸管栄養吸収の可視化を可能とした。現在、飼育環境改善に向けた腸内細菌叢、デキストリン量、薬剤取り込み差異の可視化を目指している。

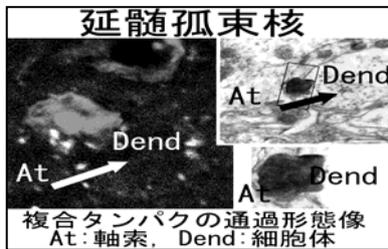
研究成果の概要(英文)：In this, research was based on animal production science in a poultry farm, and focuses on safe animal feed, nutrition, preventing disease and best welfare. It was identified new morphological aspects of digestive organs with compare to functional supplementation for chickens, such as lactobacillus, charcoal powder and vinegar to improve growing ratio. Moreover, previous research indicated that Fourier transforms infrared (FT-IR) spectroscopic imaging was elucidated the inflammation and localization of collagen in bone maturation. Furthermore, we focused on Amide I (C=O) peak on FT-IR, which was related crystallization with maturation of collagen, and evaluated the nutrient absorption by FT-IR, MALDI-TOF MS. According to our results of Amide I mapping was suggested that interactions may be related with prolonged cell life on the villus apical surface. Therefore, the FT-IR and also MALDI-TOF MS imaging methods will be a useful tool for animal production science.

研究分野：動物生産科学

キーワード：コラーゲン 機能性飼料 栄養成分 飼育環境評価 腸管形態 可視化 FT-IR MALDI-TOFMS

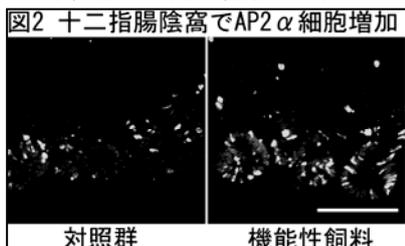
1. 研究開始当初の背景

“第二の脳”と呼ばれる消化器系の“腸”では、近年、特に独創的な研究へと向かいつつある。その根拠には、“脳と腸”をつなぐ神経組織で細胞膜変化に伴う特殊な物質輸送形態（図参照：Diacrine- and apocrine-like secretions）を捉えた事により、腸内の環境要因に応じた反射的な蠕動・分節運動と共に、神経-腸を行き来する分子の挙動を隣接する細胞間の物質輸送（矢印方向：トランスサイトシス）の評価を行える点にある（Biomed. Res. 2009, Curr. Neurobiol. 2011）。家禽生産においてこの現象を解明する目的は、腸管での栄養吸収は迷走神経の軸索輸送を察知して認知する可能性を証明できるのではないかと考えた。近年、腸管上皮や神経膜表面における物質輸送には、300種類を超える栄養物質トランスポーターが同定され、腸管膜表面と神経支配の双方に作用することが示唆されている。本研究では、家禽飼育試験を通して得られた研究成果に注目し、家禽生産において再検討を行うことで、機能的飼料の探索、及び鳥類特異的な消化・吸収機能をさらに十二指腸の活性化シグナルの存在に着眼する着想に結びついた。

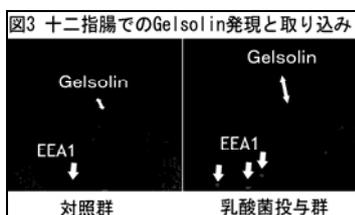


2. 研究の目的

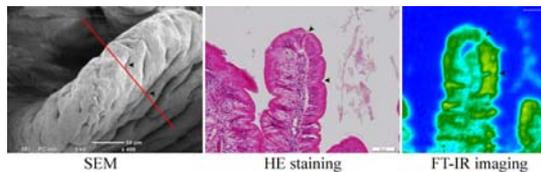
栄養吸収が促進された動物では、(図2: 機能的飼料投与群、図3: 乳酸菌投与群)に示すように、腸管上皮形態において栄養吸収を促進する形態像を得ることが出来る。特に図2では、ケミカルセンサーとして機能する可能性が示唆される消化器系における AP2 $\alpha$  の役割に着眼することで、家禽生産における新たな吸収部位としての十二指腸に注目することが出来るだけでなく、腸管上皮の未分化細胞性の保持を司る陰窩での AP2 $\alpha$  の役割について報告してきた（Histol. Histopathol. 2011）。



一方、図3で示す乳酸菌投与群の解析結果では、十二指腸絨毛上皮での



Gelsolin 発現と EEA-1 (Early endosome antigen-1) 発現が増加（定量性 RT-PCR 解析済）しており（Manuscript、未発表データ）、このことは、細胞骨格分子が誘導された結果、細胞膜表面からの取り込みを安定化さ



せた結果、家禽体重の増体に寄与したと考えられる。近年の報告では、加齢性変化による内因性 Gelsolin 発現量の低下はコクシジウム感染症を含むウイルス感染症に罹患しやすくなるとされ、吸収上皮形態を中心に AP2 $\alpha$  発現、Gelsolin 及び EEA-1 発現の動または、細胞骨格の保持に関わる分子動態を捉えることで、健全な飼育環境の判定や予測に応用できる可能性を提案できる。さらには、カルシウム制御性のアクチン結合タンパクで、Villin/Gelsolin ファミリーなど、小腸の吸収上皮細胞に特異的に発現し、刷毛縁を形成する細胞骨格の機能維持と細胞死抑制に関わる分子の変化が関与すると考えられた。本研究では、腸管吸収上皮での栄養吸収形態の同定法は、機能的飼料の探索研究における有効な手段として確立している。近年、増体効果を認めた家禽において、腸管上皮吸収形態像を客観的な数値化法により容易に比較法の確立を目指す。また、近年の飼育環境の評価法においては、ワクモ等の寄生虫や感染症による被害も顕在化しており、実施研究機関においても飼育試験を通じた研究において、甚大な被害を受けたことから、真摯に受け止めたうえで、動物生産領域における生産性向上および飼育環境の改善との関連性についても研究を行うこととした。

3. 研究の方法

腸管上皮形態と飼料効率良否判定法の確立を目指した飼料添加物（乳酸菌、木酢酸、酵母菌、麹菌等）の解析において、腸管上皮形態への効果を家禽 SEM 標本において、HiROX KH-7700（デジタルマイクロスコープ）を用いて解析し、吸収上皮形態の3次元化を通して、十二指腸腸管上皮形態の隆起部体積算出法を確立を目指す。このことにより、形態変化と増体効果の相関には、カルシウム制御性のアクチン結合タンパク Gelsolin 作用関わる可能性明らかにできる。

一方、Gelsolin の作用機序の1つには、カルシウム濃度上昇に連動した、アクチンフィラメント切断機能を有しており、物質の取り込み評価を可能としている。また、血中のカルシウム濃度は日内変動を有していることから、サーカディアンリズムを司るメラトニンやカルシウム、Collagen 代謝

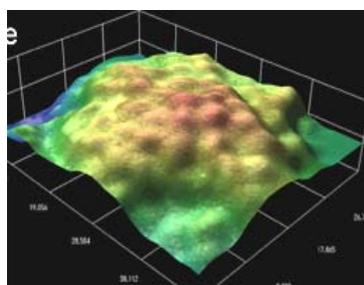
や骨代謝と密接に関連している。本研究では、採卵鶏の産卵率にもたらす木酢酸および炭化粉末の作用点解明、さらには、麹菌や酵母菌などを給餌することによる飼育試験を実施し卵用鶏の卵殻膜形成ならびに、肉用鶏の骨形成、筋膜形成について解析を行う。同じく、生化学的にも形態学的にも相関評価が可能な Collagen 発現に注目し、腸管上皮におけるアミノ酸レベルでの栄養吸収の形態的变化に注目し、アミノ酸局在を可視化できる FT-IR 分光イメージングやMALDI-TOF/MS imagingを用いて組織上での応用解析を試みることで、具体的には腸管形態で得られた知見と共に、機能性飼料開発に新たな価値を見出す。アミノ酸の特性として、腸管組織上において、異なる質量毎に局在性をマッピングすることが可能である。本研究では、形態学的な情報と共に栄養吸収機能の変化を捉え、家禽の発達過程に求められるアミノ酸要求量さらには、機能性畜産物の評価や判定用いる技術へと発展させる。

#### 4. 研究成果

飼料添加物(乳酸菌、木酢酸、酵母菌、麹菌等)を給仕した家禽において、体重増加が促進したブロイラーでは、デジタルマイクロスコープを用いた客観的な評価法を確立できた。本内容の一部は、大学院生の高木涼氏によって右図のように報告され、腸管絨毛の隆起の高さをデジタルマイクロスコープで数値化して表現する手法を発表した(日本顕微鏡学会, 2014)、これら、デジタルマイクロスコープによる3D化並びに数値化と共に、SEM標本で観察できる腸管絨毛に陥入や隆起が多く見られること明らかにした(投稿準備中)。

さらに、成果の一部には、FT-IRを用いた解析を通して、卵殻膜ならびに筋肉中のコラーゲン様物質の変化として同定し、日本家禽学会並びに国際誌上において客観的な評価法として報告し受理された。

上図は、SEM形態、一般染色、FT-IRマッピング(現在、投稿準備中)

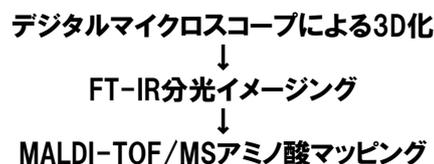


さらに、これらコラーゲン様物質の変化からは、腸管上皮における栄養成分の取り込み増加が促進されている可能性があることから、MALDI-TOF/MS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化-飛行時間型質量分析) imagingを用いて、腸管組織上でのアミノ酸マッピング技術を確立した。

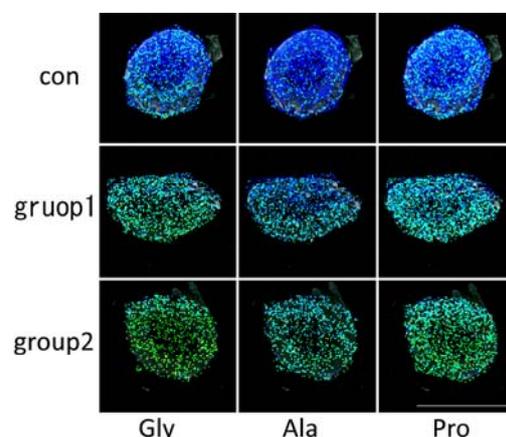
上図は、腸管のパラフィン切片上でのMALDI-TOF/MSアミノ酸マッピング図を示す。

対象区よりも実験群でアミノ酸 (Gly, Ala, Pro) 局在量の上昇が認められた。

これらの結果からは、アミノ酸腸管組織内に吸収されたアミノ酸の可視化を可能とし、栄養吸収機能の形態学的評価が可能となる可能性を示唆している。研究成果の一部は、国際学会にて発表した (MNM, 2014)。これらのことから、機能性飼料の客観的な評価においては、以下のスキームにより新たな栄養吸収の評価が可能となった。



最後に、形態的变化に注目する事で本研究を通して組織中のTOF/MS imagingの成果の一部からは、今後、アミノ酸以外にもリ



ン脂質や薬剤の局在を組織上で同定することができることから、抗生物質や抗菌剤の利用が制限された際の食品中の物質同定が可能になると考えられ、特に、寄生虫や感染症による影響を形態学的に可視化ならびに客観的な数値化できることは大変意義深い。

5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Yamauchi, K., Manabe, N., Matsumoto, Y., Takenoyama, S., and Yamauchi, K. E., Increased collagen III in culled chicken meat after feeding dietary wood charcoal and vinegar contributes to palatability and tenderness, *Animal Science Journal*, 査読有, 85(4), 2014, 468-80
- ② Yamauchi, K., Manabe, N., Matsumoto, Y., and Yamauchi, K. E., Exterminating Effect of Wood Vinegar to Red Mites and its Safety to Chickens, *Journal of Poultry Science*, 査読有, 51(3), 2014, 327-332
- ③ Matsumoto, Y., Yamashita, S., Suzuki, N., and Takara, N. Effect of enzyme supplement enteral environment in humans,

- Journal of Preventive Medicine in Japan, 査読有, 9(3), 2014, 123-131
- ④ O'Charoen, S., Hayakawa, S., Matsumoto, Y., and Ogawa, M. Effect of d-Psicose Used as Sucrose Replacer on the Characteristics of Meringue, Journal of Food Science, 査読有, 79, 2014, E2463-2469
- ⑤ Yamauchi K, Manabe N, Matsumoto Y, Takenoyama SI, Yamauchi KE. Increased collagen III in culled chicken meat after feeding dietary wood charcoal and vinegar contributes to palatability and tenderness, Animal Science Journal, 査読有, 85(4), 2013, 468-480,
- ⑥ Takeuchi, K., Liu, J.Q., Matsumoto Y, Miki T., Ohta KI., Warita K., Suzuki S., Tamai M., Secretion-related structures of hypothalamo-hypophysial terminals in the rat posterior pituitary, Okajimas folia anatomica japonica, 査読有, 90(3), 2013, 69-76
- ⑦ Yamauchi K, Manabe N, Matsumoto Y, Yamauchi KE. Increased collagen accumulation in eggshell membrane after feeding with dietary wood charcoal powder and vinegar, Connective Tissue Research, 査読有, 54(6), 416-25, 2013.
- ⑧ Liu J.Q., Miki T., Matsumoto Y, Ohta KI, Shingo S., Warita K., Yakura T., Tamai M., Takeuchi Y. The role of WGA for decreasing the accumulation of A $\beta$ : A new approach to promote transsynaptic transport of A $\beta$  in the rat, Current Neurobiology, 査読有, 4(1-2), 2013, 1-8
- ⑨ Takeuchi Y, Miki T, Liu JQ, Ohta K, Warita K, Matsumoto Y, Suzuki S, Tamai M, Ameno K, Bedi KS, Yakura T. Morphological evidence of an altered process of synaptic transcytosis in adult rats exposed to ethanol, Alcohol and Alcoholism, 査読有, 47(6), 2012, 671-6
- ⑩ Takeuchi Y, Miki T, Liu JQ, Ohta K, Warita K, Matsumoto Y, Suzuki S, Tamai M, Ameno K, Bedi KS, Yakura T.: Morphological evidence of an altered process of synaptic transcytosis in adult rats exposed to ethanol. Alcohol Alcohol. 査読有, 47(6), 2012, 671-676.
- ⑪ Ruttanavutm, J., Matsumoto, Y., and Yamauchi, K. A fluorescence-based demonstration of intestinal villi and epithelial cell in chickens fed dietary silicic acid powder including bamboo vinegar compound liquid. Histology and Histopathology, 査読有, 27(10), 2012, 1333-1342.
- [学会発表] (計 19 件)
- ① 松本由樹ものづくり連携研究が導くワクモ被害ゼロの軌跡, 平成27年度農林水産技術会議提案会 (中国・四国ブロック), (招待講演), 2014年7月, 岡山市. URL [http://www.s.affrc.go.jp/docs/project/senryaku/pdf/shiryoo3\\_chugokushikoku.pdf](http://www.s.affrc.go.jp/docs/project/senryaku/pdf/shiryoo3_chugokushikoku.pdf)
- ② Teranaka, M., Kunikata, N., Iwamura, R., Matsumoto, Y., Kondo, T., Yamada, T., Harada, M., and Arai, M. Response to CO<sub>2</sub> of *Dermanyssus gallinae*, The 5th Joint Symposium between CMU and KU, Sep. 10<sup>th</sup> 2014, Thailand, Chiang Mai.
- ③ Takagi R, Matsumoto Y. The new evaluation method of intestinal absorption used by spectroscopic imaging in Animal Production Science, *EMBS Micro and Nanotechnology in Medicine Conference*, 査読有, Dec. 8<sup>th</sup> 2014, Kahuku Turtle Bay, USA. <http://emb.citengine.com/event/mnm-2014/paper-details?pdID=2597>
- ④ Matsumoto, Y PEST-ACCUMULATING DEVICE AND PEST-ACCUMULATING METHOD, Japan-China University Fair & Forum in China 2014, (*Invited Speaker*, JST China), March 14-20, 2014.
- ⑤ 松本由樹. ワクモ捕獲装置による採卵鶏農家の被害低減に向けた研究, アグリビジネス創出フェア2014, (招待講演), 2014年11月, 東京都東京ビッグサイト. <http://agribiz-fair.jp/detail.php?id=1008>
- ⑥ 高木 涼, 松本 由樹. プロイラーの空腸絨毛の形態変化は細胞増殖や細胞死の変化に起因する, 日本顕微鏡学会第70回記念学術講演会要旨, P\_B27, 2014年5月, 千葉県幕張メッセ.
- ⑦ 岩村 亮, 國方希美, 三島弘幸, 松本由樹 集積装置で捕獲できた鶏に寄生する吸血ダニ(ワクモ)の形態観察, 第70回記念学術講演会要旨, P\_I-61, 2014年5月, 千葉県幕張メッセ.
- ⑧ 山内高尚, 松本由樹, 山内高圓. 複数の励起波長を利用した畜産物評価と機能性添加飼料としての新しい提案, 日本家禽学会要旨, 2014, 鹿児島大学.
- ⑨ 岩村亮, 國方希美, Satrija E. S., 寺中正人, 原田正和, 新井明治, 松本由樹. 養鶏場で捕獲したワクモが持つ励起物質の解析と応用研究第70回日本寄生虫学会西日本支部大会講演要旨, 3-4, 2014年10月, 兵庫県兵庫医療大学.
- ⑩ 松本由樹. ワクモ集積装置の開発及び忌避剤との相乗効果について, 養鶏研修会要旨集, 香川県畜産協会主催, 2013年9月, 香川県国分寺ホール.
- ⑪ 松本由樹. 害虫集積装置および害虫集積方法, イノベーション・ジャパン2013 ~大学見本市&ビジネスマッチング~ (招待講演), 2013年8月, 東京都

- 東京ビッグサイト.
- ⑫ 松本由樹. 香川の畜産を考える座談会:「これからの畜産業が目指す方向」, 畜産研修会 (招待講演), 2013年3月, 香川県畜産試験場.
- ⑬ 國方希美, 寺中正人, 近藤哲也, 原田正和, 新井明治, 松本由樹. 静電型集積装置に誘引されたワクモのSEM-EDX解析, 日本寄生虫学会地方会要旨集, 67, 2013年10月, 香川県香川大学医学部.
- ⑭ 山内高尚, 松本由樹, 山内高圓. 木酢酸化粉末(ネッカリッチ)添加飼料を給与したブロイラーの筋肉中コラーゲンの増大日本家禽学会秋季大会要旨集, 2013年9月, 新潟県新潟大学農学部.
- ⑮ 國方希美, 近藤哲也, 山内高尚, 山内高圓, 松本由樹. 害虫集積装置が持つ誘引効果の応用と作用点の解明. 日本家禽学会秋季大会要旨集, 2013年9月, 新潟県新潟大学農学部.
- ⑯ 山城鮎美, 松本由樹, 田増章吾, 児玉俊明, 山内高圓. 腸管吸収上皮形態の構造変化に着眼した酵素添加物の作用点解明, 日本家禽学会春季大会要旨集, 3, 2012年3月, 広島県安田女子大学.
- ⑰ 國方希美, 近藤哲也, 山内高尚, 山内高圓, 松本由樹. 静電型集積装置で捕獲できる害虫評価と養鶏産業への応用, 日本家禽学会春季大会要旨集, 4, 2012年3月, 広島県安田女子大学.
- ⑱ 山内高尚, 松本由樹, 山内高圓. 木酢酸化粉末(ネッカリッチ)の卵殻膜内コラーゲン増大効果による卵の貯蔵能力改善, 日本家禽学会2012年秋季大会, 2012年9月(まなびCAN香川県高松市).
- ⑲ 近藤哲也, 松本由樹, 山内高圓. ワクモ集積装置の開発と家禽飼育研究への応用, 日本家禽学会2012年秋季大会, 2012年9月(まなびCAN香川県高松市).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計3件)

名称: 害虫集積装置および害虫集積方法  
 発明者: 松本由樹、近藤哲也、山内高尚、山内高圓  
 権利者: 香川大学  
 種類:  
 番号: PCT/JP2013/004958  
 出願年月日: 2013/8/22  
 国内外の別: 国際(中華人民共和国への国内移行日 2015/2/23)

名称: 害虫集積装置および害虫集積方法  
 発明者: 松本由樹、近藤哲也、山内高尚、山内高圓  
 権利者: 香川大学  
 種類:  
 番号: PCT/JP2013/004958

出願年月日: 2013/8/22  
 国内外の別: 国際(タイ王国への国内移行日 2015/2/23)

名称: 害虫集積装置および害虫集積方法  
 発明者: 松本由樹、近藤哲也、山内高尚、山内高圓  
 権利者: 香川大学  
 種類:  
 番号: PCT/JP2013/004958  
 出願年月日: 2013/8/22  
 国内外の別: 国際(アメリカ合衆国への国内移行日 2015/2/23)  
 ○取得状況 (計1件)

名称: 害虫集積装置および害虫集積方法  
 発明者: 松本由樹、近藤哲也、山内高尚、山内高圓  
 権利者: 近藤電子(株)  
           宮崎みどり製薬(株)  
           香川大学  
 種類:  
 番号: 特許第5690986号  
 取得年月日: 2015/2/13  
 国内外の別: 国内(移行日: 2014/4/3)

〔その他〕

ホームページ等  
[https://www.researchgate.net/profile/Yoshiki\\_Matsumoto2](https://www.researchgate.net/profile/Yoshiki_Matsumoto2)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松本 由樹 (MATSUMOTO YOSHIKI)  
 香川大学農学部 准教授  
 研究者番号: 90335844

(2) 研究分担者

山内 高圓 (Koh-en Yamauchi)  
 香川大学農学部 名誉教授  
 研究者番号: 50111232

(3) 研究協力者

山内 高尚 (Kohsyo Yamauchi)  
 香川大学農学部 協力研究員  
 宮崎みどり製薬(株) 研究開発部

(4) 研究協力者

近藤 哲也 (Kondo Tetsuya)  
 香川大学農学部 協力研究員  
 近藤電子株式会社

(5) 研究協力者

高木 涼 (Ryo Takagi)  
 香川大学農学部 大学院生