

令和元年6月13日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19321

研究課題名(和文)モミ米摂取による腸管免疫バリア機能の増強と薬剤フリー鶏育成への挑戦

研究課題名(英文) Enhancement of gut immune barrier function by paddy rice-based diet and challenges in production of antibiotics-free chickens

研究代表者

村井 篤嗣(Murai, Atsushi)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：10313975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリは破碎能力に優れた筋胃を持つ特性により強固な物性を持つモミ米をそのまま利用できる。本研究では、モミ米摂取によるニワトリ腸管での生理的变化を網羅的遺伝子発現解析により捉え、この解析によって顕著に減少することが判明したIgA抗体産生への影響を調査した。DNAマイクロアレイ解析により、モミ米摂取は小腸におけるIgA構成遺伝子の発現を減少させることが判明した。また、モミ米摂取はワクチン暴露による特異的なIgA抗体の産生も減少させた。モミ米摂取は盲腸内で産生される短鎖脂肪酸産生量を減少させたことから、モミ米の発酵基質としての特性がIgA抗体産生減少の一因と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、モミ米を摂取したニワトリでは腸管におけるIgA抗体の産生が減弱化することが初めて明らかとなった。この結果は、モミ米摂取により腸管からの病原菌侵入が容易になることを示すわけではないが、モミ米を使用する生産者にとっては懸念材料となる。モミ米の摂取時に、発酵性食物繊維を加えることで腸管IgAの産生を回復できる可能性が示されたことから、生産者が安心してモミ米を利用し、国産飼料資源としてのモミ米の地位確立に貢献できる成果である。

研究成果の概要(英文)：Chickens can utilize the hard paddy rice since they possess a gizzard with excellent crushing ability. In this study, we examined the influence of paddy rice ingestion on physiological changes in the gut by comprehensive gene expression analysis, and the influence on IgA antibody production was investigated. DNA microarray analysis revealed that ingestion of paddy rice reduced the expressions of IgA-related genes in the small intestine. In addition, ingestion of paddy rice also reduced specific IgA antibody production after vaccination. As ingestion of paddy rice reduced the amount of short-chain fatty acids produced in the cecum, the properties of paddy rice as a low fermentation substrate might be responsible for the reduction in IgA antibody production.

研究分野：動物栄養生理学

キーワード：畜産学 ニワトリ モミ米 腸管 IgA 有機酸 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

モミ米は輸入トウモロコシに代わる日本独自の飼料資源として注目されている。我々は、モミ米の適度な硬度と難水溶性食物繊維に富む特性、さらには破砕力に優れた筋胃を持つニワトリのモミ米への高い適応性に着眼して、ニワトリ腸管でのモミ米の生理機能を探索してきた。その結果、ニワトリにモミ米を摂取させると、腸管における糖タンパク質「ムチン」の分泌と産生の両方が亢進することを見出した。ムチンは腸管内に物理的な粘液バリアを形成し抗原や微生物の侵入を阻止する。さらに、ムチンは腸管免疫修飾作用を有することが発見された (McDole et al., 2012; Shan et al., 2013)。モミ米の摂取は、ムチン分泌を起点として腸管での原始的なバリア機能とより高次な免疫機能の両方に影響することが推測された。

2. 研究の目的

(1) 飼料用米の中でも特にモミ米には難水溶性食物繊維が豊富に含まれるため、ニワトリの腸管で様々な生理機能を発揮することが期待された。本研究では、はじめに DNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析により、モミ米摂取によってニワトリ腸管で生じる遺伝子発現変動をトウモロコシ摂取時と比較することで、モミ米の腸管における生理機能を特徴づけることを目的とした。

(2) 上記項目(1)の結果から、モミ米摂取は腸管免疫特有の IgA 抗体の産生レベルを低下させる可能性が考えられた。IgA は腸管での病原菌の中和や排出を担い、腸内細菌叢の健全性維持にも貢献する。しかし、モミ米摂取が IgA の産生と分泌、さらには病原菌侵入時の免疫応答にどのような影響を及ぼすのかは不明であった。

本項では、モミ米摂取が経口ワクチン曝露時のニワトリの免疫応答に及ぼす影響を調査することを目的とした。免疫応答を評価するためには、抗原特異的な抗体を産生させる必要がある。そこで、鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (IBDV) に対する生ワクチンをニワトリヒナに経口曝露し、モミ米摂取がニワトリの腸管免疫応答に及ぼす影響を調査した。

(3) 上記項目(2)の結果から、モミ米摂取は腸管免疫を担う IgA の産生を減弱化することが判明した。しかしこの腸管 IgA 産生減弱化の原因は不明であった。マウスでは腸内細菌の発酵により生じる短鎖脂肪酸により B 細胞の IgA 産生細胞への分化が促進されることが報告されている。そこで、トウモロコシ、玄米またはモミ米を主体とした飼料を給与することで腸管 IgA 産生に変化が生じるかを調査するとともに、モミ米摂取による IgA 産生減少の原因を見出すために盲腸内容物中の有機酸濃度と腸内細菌レベルを調査した。

3. 研究の方法

(1) DNA マイクロアレイ解析による網羅的な遺伝子発現解析

市販の採卵鶏雄ヒナ (ジュリアライト®) をトウモロコシ群とモミ米群の 2 群に分け、孵化後 1 週齢から 3 週齢までトウモロコシあるいはモミ米のいずれかを 65% 含む試験飼料を自由摂取させた。3 週齢時に回腸を採取して、総 RNA を抽出した。GeneChip® Chicken Genome Array (Affymetrix®) を用いて、精製 RNA における網羅的な遺伝子発現解析を行った。トウモロコシ群 (対照) と比較して、モミ米群での発現レベルが 1.5 倍以上増加した遺伝子および 1.5 倍以下に減少した遺伝子を抽出し、2 群間での遺伝子発現レベルを比較解析した。免疫機能や腸管バリア機能などの生体防御ならびに栄養素の利用や吸収に関与する遺伝子で、かつ 2 群間で差があったものを選抜し、回腸での発現量をリアルタイム定量 PCR 法で測定した。

(2) 経口ワクチン曝露時の腸管免疫応答に及ぼす影響

1 週齢の採卵鶏雄ヒナをトウモロコシ群とモミ米群の 2 群に分け、トウモロコシあるいはモミ米のいずれかを 65% 含む試験飼料を給与した。9 週齢時に鶏伝染性ファブリキウス嚢病ウイルス (以下 IBDV) に対する生ワクチン (ノピリス®ガンボロ D78・1000; インターベット株) に曝露した。IBD の錠剤ワクチンは 100 ml の蒸留水に溶解し、 10^5 TCID₅₀ IBD 生ワクチン溶液 1 ml を、ゾンデでその嚢内に経口インチュベーションするとともに、IBD 生ワクチン溶液を 10 倍希釈し 50 ml 飲水摂取させた。11 週齢時に血液と胆汁を採取し、血清を分離した。総 IgG と総 IgA 濃度は市販キット (Bethyl) を用いた ELISA 法で測定した。また、IBDV 特異的な IgG と IgA のレベルは IBD エリーザキット (IDEXX Laboratories) を用いた。

(3) 盲腸内容物中の短鎖脂肪酸濃度と腸内細菌数の変動

市販の採卵鶏雄ヒナを用いた。孵化後 1 週齢から 11 週齢までトウモロコシ、玄米、モミ米のいずれかを 65% 含む試験飼料を自由摂取させた。11 週齢時に、血清と胆汁、腸管組織 (十二指腸、空腸、回腸) 盲腸内容物を採取した。血清と胆汁中の総 IgA と総 IgG の濃度を ELISA 法で測定した。盲腸糞からは細菌 DNA を抽出し、腸内細菌数と乳酸菌数をリアルタイム定量 PCR 法により調べた。また、盲腸内容物中の有機酸濃度を高速液体クロマトグラフィーにより測定した。

4. 研究成果

(1) モミ米摂取により生じる腸管機能の変化を捉えるため、回腸での遺伝子発現変動を比較解析した結果、トウモロコシ群に対しモミ米群で1.5倍以上発現が高くなったものは120遺伝子、1.5倍以下に発現が低くなったものは159遺伝子見つかった。そのうち、生体防御機能や栄養素の利用性に関与する遺伝子に着目した(表1)。モミ米群で1.5倍以上発現が高くなった遺伝子群に、CUBN: cubilin (intrinsic factor-cobalamin receptor)、CYP4B1: cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1があった。モミ米群で1.5倍以下に発現が低くなった遺伝子群では、GAL10: Gal 10, IGJ: immunoglobulin J polypeptide (linker protein for immunoglobulin alpha and mu polypeptides)、CALB1: calbindin 1, 28 kDa、IGLL1: immunoglobulin lambda-like polypeptide 1、APOA4: apolipoprotein A-IV、SLC16A1: solute carrier family 16, member 1 (monocarboxylic acid transporter 1)、SLC5A8: solute carrier family 5 (iodide transporter), member 8があった。

表1. トウモロコシ飼料とモミ米飼料を2週間給与したヒナの回腸における遺伝子発現レベルの比較

| 遺伝子名 | 遺伝子の機能 | モミ米群/ トウモロコシ群 |
|---------|--------------------------------------|------------------|
| IGJ | 免疫グロブリンJ鎖 | 0.13 |
| IGLL1 | 免疫グロブリン軽鎖 領域 | 0.16 |
| GAL10 | 抗菌ペプチド ディフェンシン | 0.35 |
| CYP4B1 | 異物代謝活性酵素 | 2.46 |
| APOA4 | アポリポタンパク質 | 0.44 |
| CUBN | 内因子 - ビタミンB ₁₂ 受容体: キュビリン | 2.46 |
| CALB1 | Ca ²⁺ 結合タンパク質: カルビンディン | 0.35 |
| SLC16A1 | | 0.62 |
| SLC5A8 | 短鎖脂肪酸トランスポーター | 0.54 |

DNA マイクロアレイにより遺伝子発現を網羅的に比較解析し、1.5倍以上変動した遺伝子の中で注目した遺伝子を掲載した。

免疫グロブリンを構成するIGJ(免疫グロブリンJ鎖)およびIGLL1(免疫グロブリン軽鎖λ鎖領域)の遺伝子が変動したことに着目し、腸管免疫に特徴的なIgA抗体の重鎖のα鎖をコードする遺伝子IGHAの遺伝子発現量も含めて、これらの遺伝子の発現量をリアルタイム定量PCR法で再計測した。DNAマイクロアレイの解析結果とほぼ一致し、IGHA、IGJ、IGLL1遺伝子発現量は回腸においてモミ米群で有意に低くなった。以上より、モミ米摂取によるIgA抗体産生レベルの低下が示唆された(図1)。

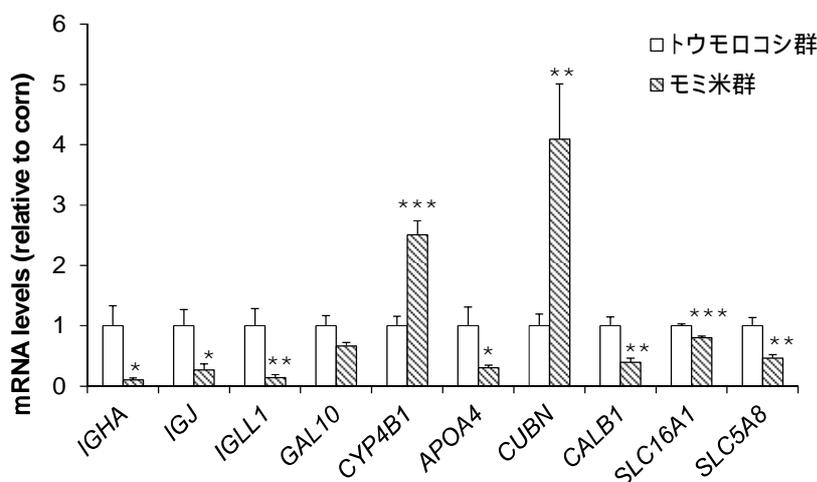


図1. トウモロコシ飼料とモミ米飼料を2週間給与したヒナの回腸における表1. に示した各遺伝子の発現量 (n=9; *.P<0.05, **.P<0.01, ***.P<0.001)

我々の予想に反して、腸管の主要な免疫因子であるIgA抗体の産生はモミ米摂取により増加するのではなく、むしろ減少することが見出された。本試験は、IgAの遺伝子発現レベルの変動しか捉えられておらず、実際に病原菌に暴露された時のIgA産生応答は不明であったため、次項でワクチン暴露時のIgA産生応答を調査することとした。

(2) モミ米摂取時の抗体産生レベルの低下が示唆されたことから、病原菌の侵入に対する腸管免疫応答を観察するため、IBDV生ワクチンを経口暴露した。孵化後のヒナは母親の血液に由来する抗体がヒナ自身の血中に大量に移行するため、生まれながらにしてIBDV特異的な抗体のレベルが高いことが知られている。そこで、IBDV特異的な抗体のレベルが十分に低下したことが確認された9週齢でIBDVワクチンを暴露した。

その結果、血液では、総IgGと総IgAの濃度、ならびにIBDV特異的なIgGとIgAの濃度に差は見られなかった。一方、胆汁では、トウモロコシ群に比べてモミ米群で総IgGとIgA濃度が低下するとともに、IBDV特異的なIgGとIgAのレベルも有意に低下した(図2)。胆汁ではIgGに比べて、IgAの濃度が約30倍も高く、IgAが腸管の主要抗体であることが確認された。また、ニワトリでは胆汁に蓄積されたIgAが腸管免疫応答の指標となることが知られており、モミ米摂取は経口ワクチン暴露時のニワトリの腸管免疫応答を低下させることが明らかになっ

た。

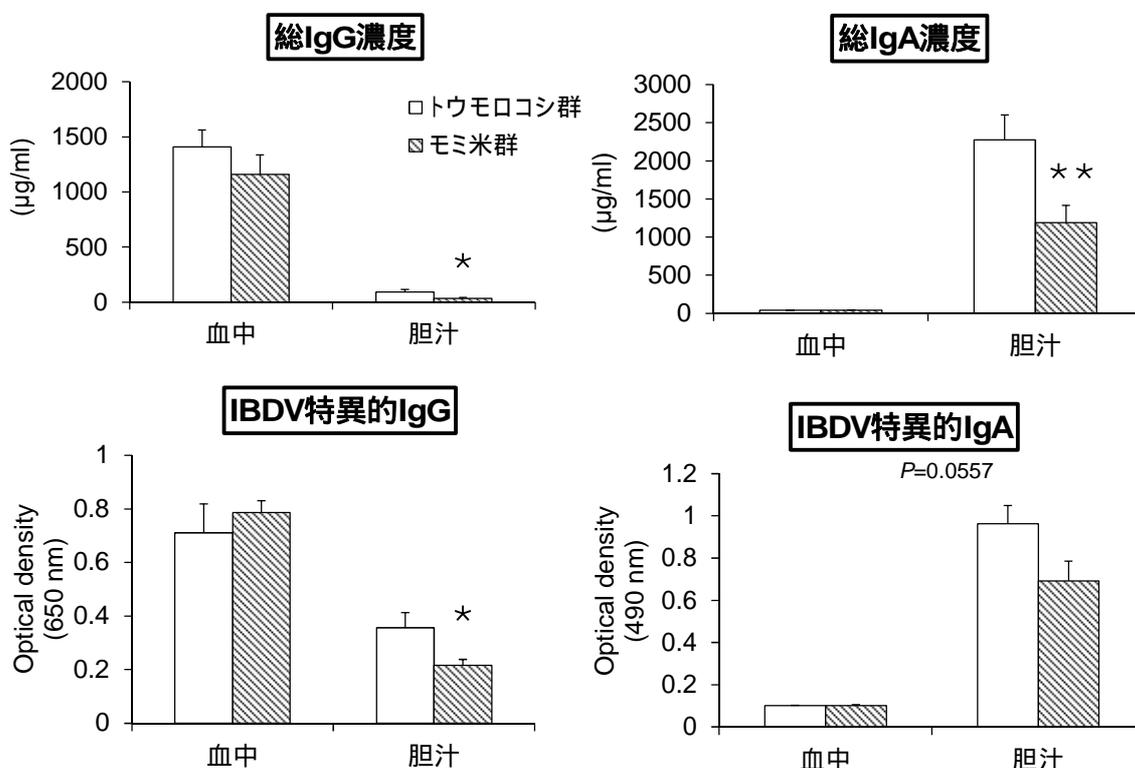


図2. トウモロコシ飼料とモミ米飼料を9週間給与したニワトリにIBDV生ワクチンを投与して2週間後の血中と胆汁における総IgGとIgA濃度 (A) およびIBDV特異的IgGとIgAレベル (B) (n=7 or 8; *, $P<0.05$, **, $P<0.01$)

以上の結果は、前項で得られたマイクロアレイ解析の結果を裏付けており、モミ米摂取によりIgAの産生は減弱化することが判明した。一方で、飼育したニワトリの成長や健全性は維持されており、IgA産生応答の現象が必ずしも負の効果をもたらしているわけではないと考えられた。モミ米摂取により腸管でのムチン産生や分泌が誘導され、粘液による物理的バリアが増強されたことで、病原菌など異物の侵入が阻止された結果、腸管におけるIgAの産生が節約されたのかもしれない。また過去の報告より、腸内発酵により生じる短鎖脂肪酸がB細胞からIgA産生形質細胞への分化を促進することが知られている(Kim et al., 2016)。したがってIgA、IGJ、IGLL1遺伝子発現量が低くなった原因として、モミ米群での腸内発酵が抑えられ短鎖脂肪酸の産生量が少なかったことも考えられる。モミ米は発酵基質となるヘミセルロースの含量がトウモロコシよりも少ないことが知られている。そこで、次項では腸管内容物中の短鎖脂肪酸濃度を測定することとした。

(3) 腸管 IgA 産生の指標となる胆汁中の IgA 濃度が玄米、モミ米両群でトウモロコシ群と比べ約 45%に低下した(データ省略)。モミ米群の盲腸内容物中の総細菌数はトウモロコシ群の約 68%まで有意に減少した(図3)。一方、盲腸内容物中の乳酸菌数に差は見られなかった。盲腸内容物中の有機酸濃度は、酢酸、酪酸、乳酸、プロピオン酸の濃度が他の2群と比べてモミ米群で30~70%減少する傾向にあった(図4)。有機酸の総量はトウモロコシ群と比べて、モミ米群で約35%にまで減少した。また、酪酸および酢酸の濃度と胆汁中IgA濃度の間には正の相関があった(図5)。

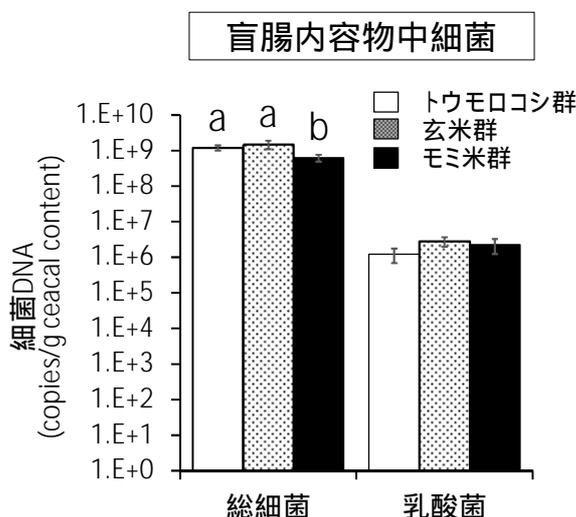


図3. トウモロコシ飼料、玄米飼料、モミ米飼料を9週間給与したニワトリにおける盲腸内容物中の細菌レベル。(n=4; a, b; $P<0.05$)

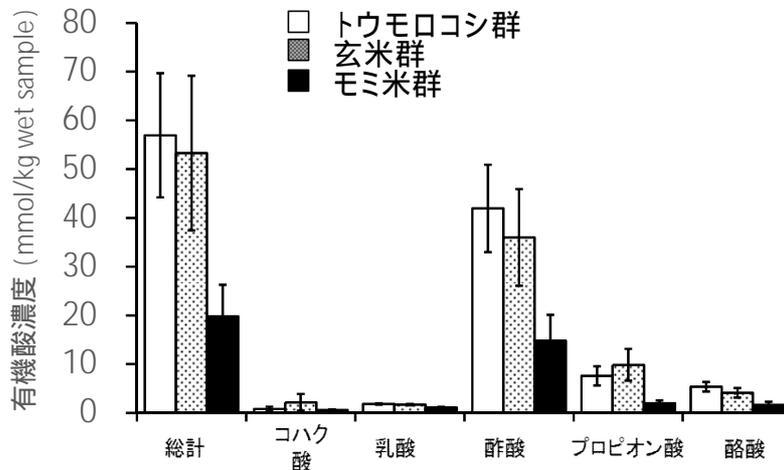


図4. トウモロコシ飼料、玄米飼料、モミ米飼料を9週間給与したニワトリにおける盲腸内容物中の有機酸濃度 (n=3 ; a, b; $P < 0.05$)。

モミ米飼料は不溶性のリグニンなどを含み、発酵基質となる物質の濃度が少ないことが腸内の総細菌数と発酵産物である有機酸の濃度が減少した原因と考えられた。セルロースやリグニンを主体とする酸性デタージェント繊維 (ADFom) の単位質量当たりの割合が、モミ米で 12.6%、玄米で 1.2%、トウモロコシで 2.9%とされている。セルロース、リグニンのほか水溶性ヘミセルロースを含む中性デタージェント繊維 (NDFom) の単位質量当たりの割合はモミ米で 18.5%、玄米で 4.0%、トウモロコシで 13.2%とされている (NARO, 2017)。NDFom と ADFom の差が飼料中のヘミセルロースのおおよその含量と推定される。すなわち、モミ米のヘミセルロース含量はおおよそ 5.9%、玄米が 2.8%、トウモロコシが 10.3%となる。モミ米は腸内細菌に資化されやすいヘミセルロースの含量が少ないこと、さらには殆ど資化されないセルロースやリグニンを大量に含むため、腸内細菌の増殖が進まず、その結果、短鎖脂肪酸含量が減少する可能性が示唆された。腸管内で産生させた短鎖脂肪酸が未分化 B 細胞の IgA 産生細胞への分化を促進することが報告されている (Kim et al., 2016)。よって、モミ米給与による盲腸内容物中の有機酸濃度減少が腸管での IgA 産生減弱化の一因と考えられた。

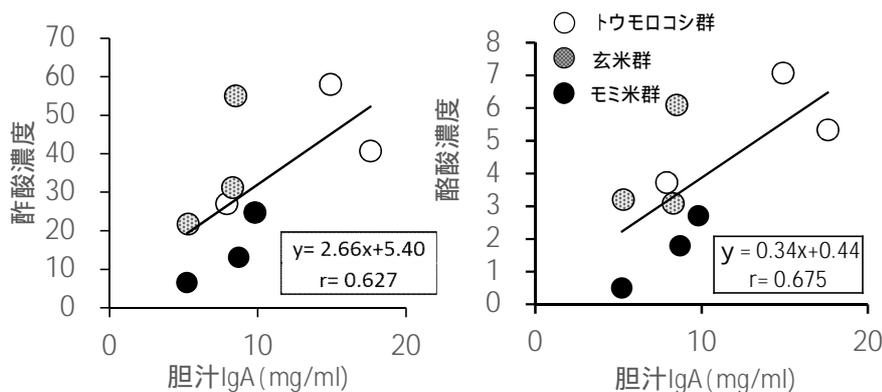


図5. トウモロコシ飼料、玄米飼料、モミ米飼料を9週間給与したニワトリにおける盲腸内容物中の酢酸、酪酸濃度 (mmol/kg wet sample) と胆汁中IgA濃度との相関 (n=3)。胆汁IgA vs 酢酸, $P = 0.0713$; 胆汁IgA vs 酪酸, $P = 0.0444$ 。

(4) 以上より、モミ米の摂取によりムチンの産生は増加するものの、腸管免疫の指標となる IgA の産生応答は減少することが明らかとなった。モミ米摂取による IgA 産生応答減少の生理的意義ははまだ不明である。一般に、抗体産生の減少は病原菌などの抵抗性低下につながる懸念される。しかし、モミ米を摂取したニワトリで成長には負の効果が見られなかった。また、モミ米群では排出される糞の形状もトウモロコシ群に比べむしろ良好であり、軟便も観察されなかった。モミ米摂取によりムチン等の物理的防御因子の産生が増強され、その代償として免疫的防御因子である IgA の産生が減少したのかもしれない。今後、細菌感染実験などを行うことで、モミ米摂取が免疫応答に与える影響を調査し、生体防御機能へのモミ米の効果を慎重に検討する必要がある。

< 引用文献 >

Kim M, Qie Y, Park J, Kim CH. Gut microbial metabolites fuel host antibody responses. *Cell Host & Microbe* 2016, 20, 202-14.

McDole JR, Wheeler LW, McDonald KG, Wang B, Konjufca V, Knoop KA, Newberry RD, Miller MJ. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103⁺ dendritic cells in the small intestine. *Nature*. 2012, 483, 345-9.

NARO. Technical Manual for Production and Feeding of Rice. 2017 ver., ed. National Agriculture and Food Research Organization, Japan.

Shan M, Gentile M, Yeiser JR, Walland AC, Bornstein VU, Chen K, He B, Cassis L, Bigas A, Cols M, Comerma L, Huang B, Blander JM, Xiong H, Mayer L, Berin C, Augenlicht LH, Velcich A, Cerutti A. Mucus enhances gut homeostasis and oral tolerance by delivering immunoregulatory signals. *Science*. 2013, 342, 447-53.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Murai A, Kitahara K, Terada H, Ueno A, Ohmori Y, Kobayashi M, Horio F. Ingestion of paddy rice increases intestinal mucin secretion and goblet cell number and prevents dextran sodium sulfate-induced intestinal barrier defect in chickens. *Poultry Science*. 査読有, 2018, 97, 3577-86 doi.org/10.3382/ps/pey202. PMID: 29850863

〔学会発表〕(計3件)

村井篤嗣・森大樹・渡辺駿斗・新居隆浩・小林美里・堀尾文彦. デキストラン硫酸ナトリウムの頻回経口投与がニワトリヒナの腸管バリア機能に及ぼす影響. 日本家禽学会 2019 年秋季大会. 麻布大学. 2019 年 3 月 30 日.

渡辺駿斗・小林美里・堀尾文彦・村井篤嗣. トウモロコシ、玄米、モミ米を摂取したニワトリにおける盲腸内容物の有機酸濃度と腸内細菌数の予備的調査. 日本家禽学会 2018 年春季大会. 東京大学. 2018 年 3 月 30 日.

村井篤嗣・上野綾子・小林美里・堀尾文彦. モミ米を摂取したニワトリでは腸管での IgA 産生応答が減弱化する. 日本家禽学会 2017 年度秋季大会. 信州大学. 2017 年 9 月 5 日.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

無し

(2)研究協力者

研究協力者氏名：堀尾 文彦

ローマ字氏名：(HORIO, fumihiko)