

令和 3 年 4 月 28 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14569

研究課題名(和文)腸内環境に着目したニワトリにおける腸-脳-生殖ネットワークの解明

研究課題名(英文)Study of the network among the intestine, brain and reproductive organs focused on the intestinal environment in hens.

研究代表者

新居 隆浩(Nii, Takahiro)

広島大学・統合生命科学研究科(生)・助教

研究者番号：90804873

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)：本研究はニワトリの腸内環境が産卵機能に及ぼす影響を解明することを目的とした。その結果、腸炎は肝臓の炎症を伴う肝機能障害を誘導することで、卵黄前駆物質の合成機能を低下させること、また、腸内環境の悪化はニワトリのストレス応答を誘起することで卵胞の発育を阻害する可能性を明らかにした。これらの産卵機能の低下は、腸内環境改善効果を持つプレバイオティクスの給与によって改善された。本研究により、腸内環境の悪化が産卵機能低下に影響する作用メカニズムの一端が明らかになっただけでなく、その改善策としてプレバイオティクスが有効であることが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はニワトリの腸内環境が産卵機能に及ぼす影響を解明することを目的としたものである。これまでに腸と産卵機能との関係について栄養学的な側面では研究されてこなかったが、本研究により腸は肝臓や脳機能を介して産卵に影響するというメカニズムの一端が明らかになった。特に、腸-脳-生殖系の相関があることを示したことは学術的なインパクトが大きい。さらに、本研究では家禽生産現場における産卵機能の改善のためには、腸内環境の改善が有効であることを示しており、これは家禽産業に直接的に貢献する知見である。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study was to determine the effects of intestinal environment on egg production in laying hens. As a result, it is revealed that (1) the intestinal inflammation decreased yolk precursor production through disorder of liver function in association with liver inflammation, and (2) the slight disruption of intestinal environment may lead suppression of ovarian follicle growth by stress reaction. In addition, (3) the prebiotics treatment recovered egg productivity that was declined by disruption of intestinal environment. Therefore, the study elucidated a part of the mechanisms of the relation between intestinal environment and egg production as well as it demonstrated the efficacy of prebiotics for improvement of egg production of laying hens under worse intestinal condition.

研究分野：家禽生殖免疫学

キーワード：ニワトリ 腸内環境 粘膜バリア 炎症 産卵機能 ストレス プレバイオティクス

## 1. 研究開始当初の背景

これまで報告者は、ニワトリの健康維持と、安全な卵生産を目指して粘膜免疫調節機構に関する研究を行ってきた。一連の研究において、卵管粘膜の炎症反応の誘起と同時に、卵殻形成異常と産卵機能の低下が引き起こされることを明らかにし、これには炎症性サイトカインが関与する可能性が示唆された。これらの結果から、産卵機能と炎症との関係性に着目するに至った。ニワトリの産卵機能は脳の中樞の制御を受けることから、脳腸相関の「脳」「腸」に加えて、「生殖巣」との相関もあると考え、さらにプロバイオティクスによるニワトリの産卵機能改善効果も、これに関与すると仮説を立てるに至った。

そのため、報告者は世界に先駆けて、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) を用いた産卵鶏の腸管炎症モデルを作出し、腸管の炎症応答が起こると、卵胞閉鎖を伴って産卵機能が低下することを示した。当初、これは炎症に伴うストレス応答によるものと仮説を立てたが、興味深いことにストレス指標となる血中コルチコステロン濃度の上昇は認められなかった。これらの結果から、内分泌系の介在の可能性を検討するためには、腸管を発端として脳に続く様々な経路について1つずつ検討する必要があると考えた。

## 2. 研究の目的

ニワトリは病原微生物による感染や、加齢によって産卵機能が低下するが、その原因は解明されていない。これまでに、報告者は産卵鶏の腸管炎症モデルを作出し、炎症によって産卵機能が低下することを示した。ニワトリが病原菌に経口感染すると、腸内で炎症反応が生じて腸内環境が悪化する (Crhanova et al., 2011, *Infect Immun* 79:2755)。近年では、加齢により腸管粘膜における抗炎症性の免疫応答が抑制されることで、炎症が誘起され、結果的に腸内環境が悪化することが分かってきた (Becher et al., 2017, *Gut* doi:10.1136/gutjnl-2016-312940)。このことから、微生物感染や加齢による産卵機能の低下に、炎症による腸内環境の悪化が関与すると推測される。また、医学分野では脳腸相関という概念が提唱され、腸内環境が脳の内分泌制御に影響することが示唆されている (Carabotti et al., 2015, *Ann Gastroenterol* 28:203)。産卵機能は内分泌制御を受けて調節されるため、腸内環境が内分泌制御機能を介して産卵に影響する可能性が考えられるが、これを調べた例は無い。また、卵黄の主成分は肝臓で作られることが知られているが、この肝臓と腸は門脈で繋がっているため、腸内環境が肝機能に影響する可能性も考えられる。そこで、申請者は産卵鶏の産卵機能低下の一因は、炎症を発端とした腸内環境の悪化による脳の内分泌制御機能の破綻や、肝機能の低下であると仮説を立てた。

乳酸菌などの腸内環境改善効果を有する有用微生物をプロバイオティクス、これらの細菌のエサとなり腸内環境の改善効果を有する糖類などはプレバイオティクスと称される。家禽においても、特に肉用鶏の増体効果を検証するプロ・プレバイオティクスに関する応用研究が広く行われている。一方で、産卵鶏の産卵率や卵殻厚などの産卵機能改善効果も一部で報告されているが、その作用機序は解明されておらず、産卵機能と消化吸收機能の向上を関連付ける研究結果にとどまっている。このように、産卵機能には脳の内分泌制御が大きく関わっているにもかかわらず、これを考慮した産卵鶏のプロ・プレバイオティクスの作用メカニズムの研究はされていない。この作用機序が明らかになれば、将来的に産卵機能改善効果をもたらすプロ・プレバイオティクスの有効因子の探索など、家禽の産卵機能強化に寄与できると期待される。

そこで本研究では産卵機能の強化を目指して、内分泌制御機能と肝機能の観点から腸内環境と産卵機能の関連を明らかにし、これを基盤としてプレバイオティクスによる産卵機能への効果を検証することを目的とした。なお、申請書の提出時点では、腸-脳-生殖ネットワークへの着目だけであったが、実施までの間に肝機能の影響の可能性が浮上したため、腸-肝-生殖ネットワークの関与についても検討した。また、当初の予定ではプロバイオティクスの使用を検討していたが、哺乳類で腸管バリア機能の強化に有効なプレバイオティクスがあるという情報を得たため、本研究ではプレバイオティクスを用いた。

## 3. 研究の方法

まず、これまでに確立済みの DSS による産卵鶏の急性腸炎モデルを用いることで、産卵鶏において腸炎が産卵機能と肝機能に及ぼす影響を解析した (実験 1)。しかし、この急性腸炎モデルはニワトリの腸へのダメージが大きく、顕著な摂食量の低下や体重減少が認められた。そこで、より腸内環境の影響をクリアに評価することを目的として、低濃度 DSS の長期投与によって摂食量や体重に影響の出ない腸内環境の悪化モデルを作成し、これを用いることで腸内環境の悪化が産卵機能に及ぼす影響を解析した (実験 2)。次いで、この結果から内分泌機能への影響が示唆されたため、この詳細を調べるために短期間の低濃度 DSS 投与を行い、性ホルモン軸とストレス軸を中心とした内分泌制御機構へ与える影響を解析した (実験 3)。最後に、これらの腸内環境悪化による産卵機能低下の改善策として、腸内環境改善効果が知られているグァーガム加水分解物 (PHGG) の給与が産卵機能に及ぼす効果を検証した。

## 4. 研究成果

[実験1] DSS誘導性急性腸炎が産卵鶏の肝機能と産卵機能に及ぼす影響

産卵鶏の腸内環境と内分泌制御機構との関連を調べることを目的とし、これまでに急性腸炎による腸内環境悪化モデルとして、デキストラン硫酸ナトリウム (DSS) の経口投与によるニワトリ腸炎モデルを作出している。この炎症モデルは産卵鶏の盲腸における腸管炎症を誘導し、産卵機能を低下させることが分かっていたが、その原因は不明であった。そのため、この原因を明らかにすることを目的とし、卵黄前駆物質の合成の場である肝臓に焦点を当てて DSS 投与の影響を解析した。

300日齢の白色レグホン産卵鶏に、0, 9 mg/ 4 ml/ kg BW の DSS 水溶液または水 (DSS 区または対照区) を 5 日間経口投与し、6 日目に肝臓を採材した。材料は HE 染色による組織像の観察と、肝臓組織中の LPS (リポ多糖: グラム陰性菌成分) 分布頻度の解析、および肝臓組織中の遺伝子発現解析に用いた。その結果、DSS 投与区では対象区と比べて炎症性サイトカイン (IL-1, IL-8) が増加し、抗炎症性サイトカイン (TGF- $\beta$ 2 および-4) の遺伝子発現は低下した。また、肝臓組織内の白血球や LPS 陽性細胞数は DSS 投与区では対象区と比べて有意に高い値を示していた (図1)。続いて、脂質合成関連因子 (SREBP-1 および ACC)、脂質の取り込み関連因子 (SREBP-2 および LDLr) そして卵黄前駆物質関連因子 (VLDLII, ApoB, VTGII) の遺伝子発現は DSS 投与区で対象区よりも低い値を示した (図2)。このことから、DSS による急性腸炎は、グラム陰性菌やその菌体成分である LPS の肝臓への流入を増加させ、肝臓での炎症を誘導させることが明らかになった。この肝臓の炎症が卵黄前駆物質の合成や、その材料となる脂質の合成や取り込みを低下させ、結果的に産卵機能が落ちたものと推察された。

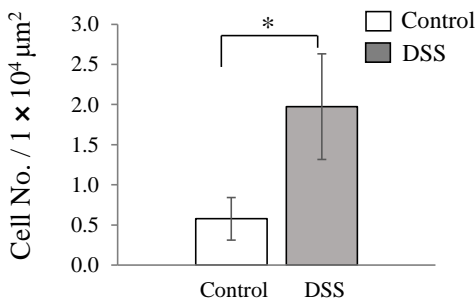


図1. 肝臓のLPS陽性細胞数の変化

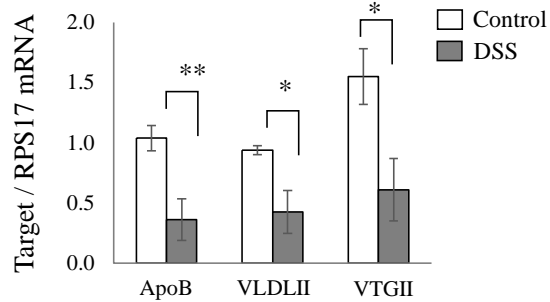


図2. 卵黄前駆物質関連遺伝子発現

[実験2] 低濃度 DSS の長期投与による軽度の腸内環境悪化が産卵機能に及ぼす影響

実験1の急性腸炎モデルはニワトリの腸へのダメージが大きく、顕著な摂食量の低下や体重減少が認められた。腸内環境の影響をよりクリアに評価するためには、できるだけ摂食量や体重に影響が出ない実験モデルが必要である。また、このようなモデルは実際の生産現場で起こりうる「見た目は健康だが、腸内環境が崩れているニワトリ」の実験モデルとしての使用が期待される。そこで、産卵鶏に低濃度の DSS (0, 225 mg/ kg BW) を 28 日間投与することで、軽度の腸内環境の悪化を誘導した。

その結果、DSS 長期投与によって、盲腸では腸内細菌の多様性が減少し、細菌叢のクラスターは対象区と比べて変化した。DSS 区では下部消化管粘膜で軽微な炎症反応が認められたほか、粘膜ひだ/陰窩比の低下が認められたことから、DSS 投与によって腸内環境が悪化したといえる。また、DSS 投与 1 週間後から試験開始前と比べて卵黄重量が約 15% 低下した (図3)。急性腸炎で

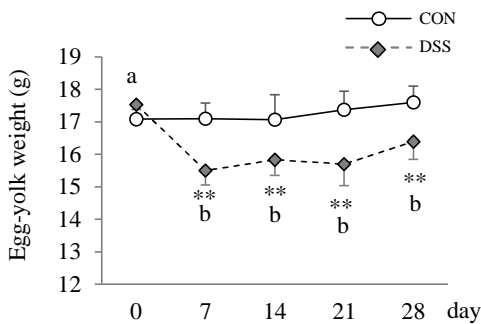


図3. 低濃度DSS投与が卵黄重量に及ぼす影響

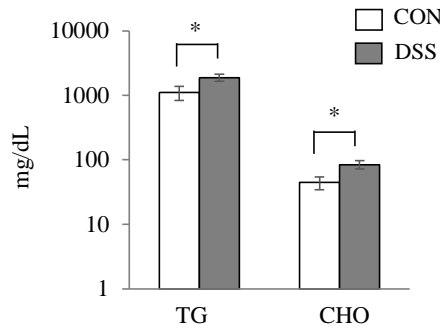


図4. 血漿VLDL中のTGとCHO濃度

は肝障害によって卵黄前駆物質の合成機能が低下することが分かっているため、今回の卵黄重量低下の原因として、肝臓の卵黄前駆物質の合成機能の低下を疑った。しかし、主な卵黄前駆物

質である VLDL の血中濃度は DSS 区で減少しておらず、逆に対照区よりも高い値を示した(図4)。このことから卵胞における VLDL の取り込み機能が低下している可能性が考えられた。しかし、卵胞顆粒層における VLDL 取り込み関連因子の遺伝子発現パターンは、取り込み促進状態にあり、卵黄前駆物質の取り込み低下につながる結果は得られなかった。また、卵胞発達の中枢である下垂体前葉の遺伝子発現を解析すると、FSH と IL-1 の遺伝子発現が DSS 区で有意に高値を示した。FSH の発現増加は卵胞における前駆物質の取り込みを促進していると考えられる。下垂体における IL-1 の発現増加はストレス内分泌反応を促進することが知られているため、これが今回の産卵機能低下と関与している可能性も考えられる。

#### [実験3] 軽度な腸内環境の悪化が内分泌制御機構に及ぼす影響

実験2より、軽度な腸内環境の悪化は、産卵を停止させることなく卵黄重量を減少させることが明らかになった。これには肝機能への影響だけでなく、性ホルモンによる内分泌調節機能も関与している可能性が示唆された。卵黄重量の変化は DSS 投与3日目から起こっていたため、この低下の前後に着目することで、卵黄重量の低下を引き起こした内分泌変化を捉えられると考えた。そこで実験3では低濃度 DSS (0, 225 mg/ kg BW) を 1, 2, 7 日間の短期間投与することで、腸内環境の悪化が性ホルモン軸とストレス軸を中心とした内分泌制御機構へ与える影響について解析した。

その結果、DSS 投与による腸内環境悪化モデルでは、投与後すぐに卵胞顆粒層の卵黄前駆物質の取り込みに関わる2種類のリポ蛋白質受容体 (LDLr, LR8) の発現が低下し、これが腸内環境悪化初期の卵胞発育低下の一因になると考えられた。性ホルモン軸では、視床下部の GnRH と下垂体の LH は DSS 投与後2日目にかけて急激に増加したが、7日後には平常レベルに戻った。しかし、FSH は投与後2日目にかけて増加し、7日目でも高値を維持した(図5)。一方で、ストレス軸では下垂体の POMC は2日目まで DSS 投与で高値を示し、7日目では対照区と同等まで低下した。しかし、視床下部の AVT は2日目にかけて増加し、7日目まで高値を示した(図6)。加えて、視床下部では IL-1 の遺伝子発現が7日目まで増加傾向にあり、これが AVT のストレス応答と関与する可能性が考えられた。以上のことより、腸内環境が悪化すると、直後には、LH の短期間の増加による早期排卵による卵黄サイズの低下が起こる可能性が示唆された。これに伴い卵胞側のリポ蛋白質の取り込みが抑制されたのかもしれない。その後、長期的には AVT を介したストレス応答が卵胞発育を低下させる可能性が示唆され、その発育不全の補填として FSH 発現が増加し、卵胞の遺伝子発現に影響する可能性が考えられた。

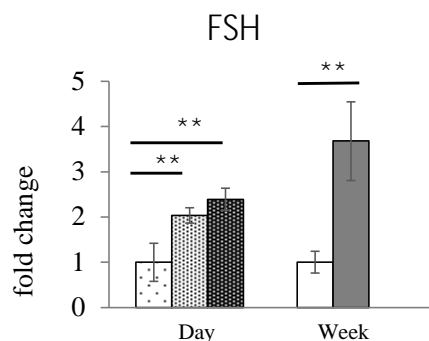


図5. 低濃度DSS投与が下垂体のFSH遺伝子発現に及ぼす影響

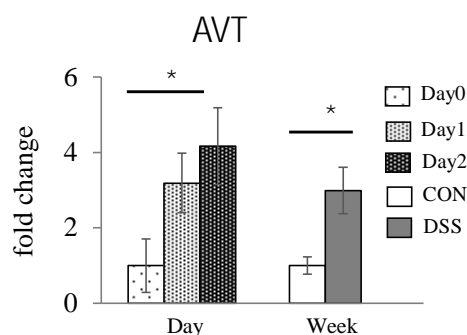


図6. 低濃度DSS投与が視床下部のAVT遺伝子発現に及ぼす影響

#### [実験4] PHGG 給与による腸内環境改善が産卵機能に及ぼす影響

これまでの腸内環境悪化による産卵機能低下の改善策として、プレバイオティクスとして知られ、腸内環境改善効果が報告されているグァーガム加水分解物 (PHGG) の給与が産卵機能に及ぼす影響を解析した。そのために、採卵鶏に通常飼料または PHGG を 10%添加した飼料を給餌した。給餌開始3日目から10日目にかけて低濃度 DSS (0, 225 mg/ kg BW) を7日間投与した。試験期間中の卵質と、腸、肝、脳の各組織の遺伝子発現を解析した。

その結果、PHGG 投与区では DSS によって卵黄重は一時的に低下したものの、すぐに回復した(図7)。回腸や盲腸では DSS 投与により増加する IL-1、IL-6、CXCLi2 といった炎症性サイトカインの遺伝子発現が PHGG 区では低下し、肝臓においてもこれらの炎症性サイトカイン発現が PHGG 区で低下した(図8)。また、肝臓の卵黄前駆物質の VLDLII や SREBP-1 の遺伝子発現量は実験3では低濃度 DSS 投与により増加する傾向にあったが、本実験の PHGG 区では DSS 区より減少しており、正常なレベルに戻ったと推察される(図9)。これらの結果から、DSS 投与によって一時的に腸内環境が悪化した可能性があるものの、PHGG 給与によってすぐに腸内環境が改善し、腸管の炎症反応が抑制され、これに伴い肝臓の炎症が抑制されたことで卵黄前駆物質の合成に関わる肝機能も正常レベルに回復したと考えられる。一方で、内分泌制御に関連する遺伝子群

については、DSS 投与区で増加した FSH は PHGG 投与の影響を受けず、同じく DSS で増加する AVT は、PHGG 区でさらに増加した。しかし、ストレス軸の制御に関わる CRH 受容体 (CRHR) や、AVT の受容体である VT2R の遺伝子発現は PHGG 区で低下しており、ストレスに対する感受性は低下したと推察される (図 10)。

以上のことより、プレバイオティクスである PHGG の給与は、ニワトリの腸内環境を整えることで DSS 投与下でも炎症による腸内環境の悪化を防ぐことが明らかになった。これにより、肝機能が迅速に回復し、卵質の低下も抑制されたと考えられる。内分泌制御については今回の卵質低下の抑制との関連は不明だが、CRHR や VT2R が減少していたことからニワトリが感じるストレスも低下していた可能性がある。いずれにしても、PHGG は生産現場で起こりうる腸内環境の悪化を防ぐことでニワトリの産卵機能の維持に貢献すると期待される。

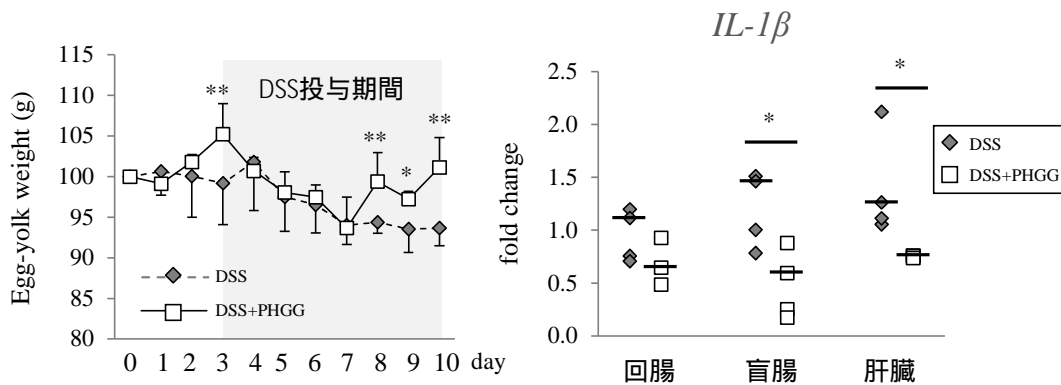


図7. PHGGが卵黄重量に及ぼす影響

図8. PHGGが腸と肝臓のIL-1β遺伝子発現に及ぼす影響

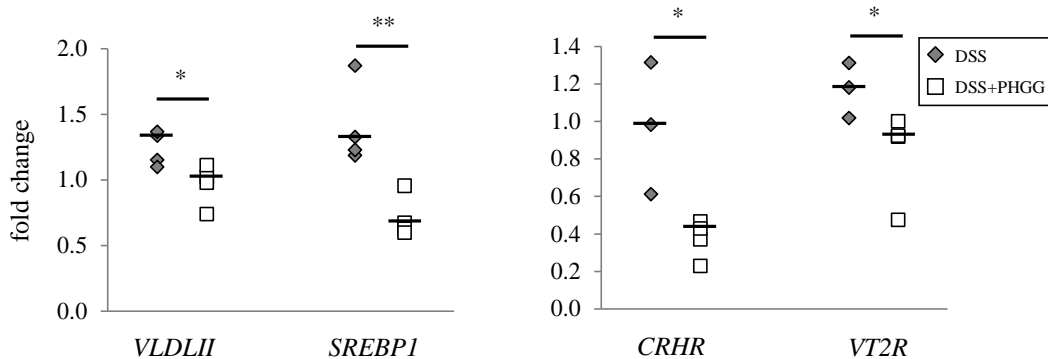


図9. PHGGが肝臓の卵黄前駆物質合成関連遺伝子発現に及ぼす影響

図10. PHGGが下垂体のストレス関連受容体遺伝子発現に及ぼす影響

[まとめ]

本研究の結果から、腸炎は肝臓の炎症を伴う肝機能障害を誘導することで、卵黄前駆物質の合成機能を低下させること、また、腸内環境の悪化はニワトリのストレス応答を誘起することで卵胞の発育を阻害する可能性を明らかにした。これらの産卵機能の低下は、腸内環境改善効果を持つプレバイオティクスの給与によって改善された。本研究は、腸内環境の悪化が産卵機能低下に影響する作用メカニズムの一端を明らかにしただけでなく、その改善策としてプレバイオティクスが有効であることが証明しており、この成果は家禽産業に直接的に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nii T, Bungo T, Isobe N, Yoshimura Y	4. 巻 11
2. 論文標題 Slight Disruption in Intestinal Environment by Dextran Sodium Sulfate Reduces Egg Yolk Size Through Dysfunction of Ovarian Follicle Growth.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology.	6. 最初と最後の頁 607369
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fphys.2020.607369	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nii T, Kakuya H, Isobe N, Yoshimura Y	4. 巻 57
2. 論文標題 Lactobacillus reuteri enhances the mucosal barrier function against heat killed Salmonella Typhimurium stimulation in the intestine of broiler chicks.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Poultry Science	6. 最初と最後の頁 148-159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2141/jpsa.0190044	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nii T, Isobe N, Yoshimura Y	4. 巻 99
2. 論文標題 Intestinal inflammation induced by dextran sodium sulphate causes liver inflammation and lipid metabolism dysfunction in laying hens.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Poultry Science	6. 最初と最後の頁 1663-1677
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.psj.2019.11.028.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 新居隆浩
2. 発表標題 ニワトリの卵管および腸管の粘膜免疫機構と産卵機能との関係に関する研究
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度春季大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新居隆浩・豊後貴嗣・磯部直樹・吉村幸則
2. 発表標題 腸内環境の悪化がニワトリの産卵機能と内分泌機能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Nii T, Bungo T, Isobe N, Yoshimura Y
2. 発表標題 Effects of Chronic Intestinal Inflammation Caused by Dextran Sodium Sulfate on Function of Egg Production in Laying Hens
3. 学会等名 World Poultry Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新居隆浩、豊後 貴嗣、磯部直樹、吉村幸則
2. 発表標題 低濃度のデキストラン硫酸ナトリウムの長期投与がニワトリの産卵機能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本家禽学会2019年度秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新居隆浩、豊後 貴嗣、磯部直樹、吉村幸則
2. 発表標題 腸炎がニワトリの視床下部および下垂体の内分泌機能に及ぼす影響
3. 学会等名 日本家禽学会2020年度春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新居隆浩、豊後 貴嗣、磯部直樹、吉村幸則
2. 発表標題 ニワトリの腸内環境が産卵機能に及ぼす影響-DSSによる腸炎モデルの確立-
3. 学会等名 2019年度家畜栄養生理研究会秋季集談会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新居隆浩、磯部直樹、吉村幸則
2. 発表標題 デキストラン硫酸ナトリウム投与が産卵鶏肝臓の卵黄前駆物質関連因子の発現に及ぼす影響
3. 学会等名 日本家禽学会2018年度秋季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Nii T, Isobe N, Yoshimura Y
2. 発表標題 Dextran Sodium Sulfate Induced Intestinal Inflammation Causes Liver Inflammation and Lipid Metabolic Malformation in Laying Hens.
3. 学会等名 18th AAAP Congress. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 角屋はるな、磯部直樹、吉村幸則、新居隆浩
2. 発表標題 Lactobacillus reuteri投与がサルモネラ抗原刺激に対するプロイラーヒナ腸管免疫の応答機能に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本家禽学会2019年度春季大会
4. 発表年 2019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
---------	---------