

令和 6 年 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14960

研究課題名（和文）卵管内細菌叢に着目したニワトリの母子粘膜バリア機能の強化

研究課題名（英文）Enhancement of hen and chick mucosal barrier function focused on oviductal microbiota.

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）・准教授

研究者番号：90804873

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は母鶏への有用細菌の経口投与によって母鶏卵管粘膜とヒナ腸管粘膜のバリア機能が強化されるかを検証することを目的とした。その結果、母鶏への有用細菌の経口投与が腸だけでなく卵管粘膜の細菌叢を変化させ、粘膜のバリア機能を増強させる可能性が示された。このバリア機能の増強には卵管粘膜のCoprococcus属の増加と、それに伴い産生されたギ酸が関与するかもしれない。また、当初の予定とは異なりヒナ腸管粘膜バリア機能強化については直接の効果検証はできなかったが、母鶏から受精卵へ移行すると思われる細菌種を同定し、この共有細菌の受精卵感作によりヒナの成長性が増強される可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は母鶏への有用細菌投与が、母鶏の健康だけでなく後代のヒナの健康にも寄与する可能性を示すものである。これまでに有用細菌の経口投与は腸の健康にのみ寄与すると考えられていたが、本研究結果により腸だけでなく、細菌叢を変えることで生殖器の感染防御機能の向上にも寄与することが明らかになった。また、母鶏からヒナへ卵を介して垂直伝播する細菌がヒナの健康の向上へ寄与する可能性を示したことは学術的な新規性だけでなく、母鶏への有用細菌給与は一石三鳥の効果をもたらすという家禽産業に直接的に貢献する知見でもある。これは、母鶏を介した次世代ヒナの感染防御機能の向上を目的とした新技術の開発に繋がる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to investigate whether oral administration of probiotic bacteria to hens could enhance the barrier function of the oviduct mucosa in hens and the intestinal mucosa in next generation chicks. The results suggested that oral administration of probiotic bacteria to hens altered the microflora and enhances mucosal barrier function not only in the intestine, but also in oviduct. This enhancement of barrier function might be associated with an increase in the genus Coprococcus in the oviduct mucosa and the formic acid produced by these bacteria. Although the initial plan to directly verify the enhancement of the intestinal mucosal barrier function in chicks was not achieved, the study identified bacterial species likely transferred from hens to fertilized eggs, indicating that sensitization to these shared bacteria might improve chick growth performance.

研究分野：家禽粘膜免疫学

キーワード：産卵鶏 プロバイオティクス 粘膜バリア機能 腸内細菌叢 卵管細菌叢 母子細菌移行 卵内細菌叢

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ニワトリ卵管への病原微生物の感染は、卵形成機能の障害や卵の汚染をもたらす。鳥類の卵管は腸管と共に総排泄腔に開口しているため、卵管へ糞中の病原微生物が侵入しやすく感染リスクが高い。このため、卵管粘膜のバリア機能向上が求められる。私たちはニワトリの卵管免疫機能の調節機構に関する研究過程で、卵管腔部粘膜への微生物抗原の刺激が、同粘膜の免疫機能を活性化することを明らかにした (Nii T et al., 2013)。しかし、生産現場で各個体の卵管へ直接抗原刺激を行うことは現実的ではなく、卵管の感染防御機能を高めるための効果的な技術は未だ確立されていない。

近年の研究で、ニワトリの総排泄腔と卵管、卵内に共通の微生物が存在すると報告されており、腸内と卵管内で細菌の行来がある可能性が示唆されている (Lee et al., 2019; Shterzer et al., 2020)。このため、腸内細菌が総排泄腔を介して卵管内細菌叢に影響すると推察される。私たちは乳酸菌など宿主に有益な効果をもたらす有用細菌 (= プロバイオティクス) が、ニワトリの腸内環境改善効果を有し、腸粘膜バリア機能を強化することを示している (Nii et al., 2020a,b)。これらの有用細菌が卵管の粘膜バリア機能に及ぼす影響は不明であるが、予備検討の結果から、有用細菌が卵管粘膜のバリア機能の向上にも寄与する可能性が高い。

さらに、母鶏の卵管内細菌叢は、卵内の菌叢を介して、孵化したヒナの腸内細菌叢にも影響することが考えられる。一般的に、ヒナへの有用細菌を含む生菌剤の給与は、腸の感染予防に効果的であるとされている。しかし、生菌剤の使用の有無は農場によって異なり、使用する場合でも孵化から生菌剤給与までに約 24 時間かかるため、孵化直後はその恩恵を受けられない。したがって、母鶏の卵管を介して初生ヒナに生まれながらに有用細菌を持たせることができれば、孵化直後の感染防御機能の底上げに役立つことが期待される。

### 2. 研究の目的

有用細菌の経口投与により卵管内細菌叢を変えることで、母鶏の卵管粘膜バリア機能と初生ヒナの腸管粘膜バリア機能を強化できると仮説を立てた。経口投与で母体の卵管粘膜とヒナの腸管粘膜のバリア機能が強化できれば、飼料添加物の革新的な利用方法の開発に繋がる。そこで、本研究では母鶏への有用細菌の経口投与によって母鶏卵管粘膜とヒナ腸管粘膜のバリア機能が強化されるか検証することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究では、有用細菌の経口投与が、母鶏の卵管粘膜バリア機能と、初生ヒナの腸管粘膜バリア機能を強化するという仮説を検証するために、まず、産卵鶏への有用細菌の経口投与が腸内と卵管内の細菌叢と卵管の粘膜バリア機能に及ぼす影響を検証した (実験 1)。次に、卵管上皮細胞の細胞培養システムを用いて、有用細菌が卵管粘膜バリア機能に作用するメカニズムの解明を進めた (実験 2)。最後に、母鶏への有用細菌投与が卵管・卵内・初生ヒナ腸管の細菌叢と、初生ヒナの腸の粘膜バリア機能を強化するかを検証する予定であったが、母鶏への細菌投与による卵管粘膜や受精卵内の細菌叢制御が不安定であったため、実験 3 では予定を変更して母鶏の腸内から卵管、そして受精卵までの細菌の共有状況 (細菌の垂直移行の可能性) の分析と、母鶏から受精卵へ移行しうる細菌の受精卵への感作がヒナの成長性に及ぼす影響を検証した (実験 3)。

なお、本研究では一貫して産卵鶏品種の雌の白色レグホンを使用した。また、有用細菌にはニワトリの糞便由来で、かつ過去の研究で腸管粘膜の免疫機能の強化作用を示した *Lactobacillus johnsonii* を用いた。この菌種はニワトリの卵管内にも存在することが報告されており、卵管内への移行が期待できるため選択とした。

### 4. 研究成果

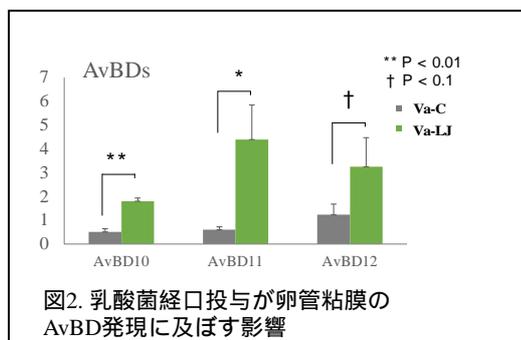
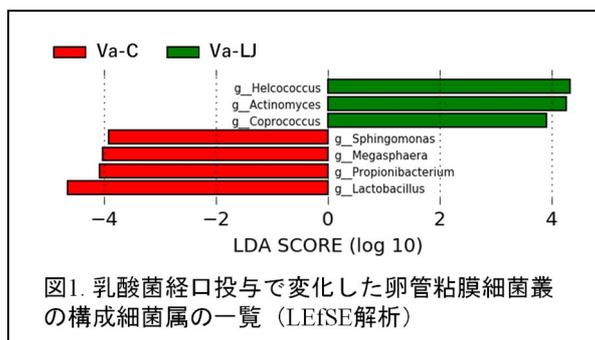
#### 【実験 1】有用細菌の経口投与が卵管粘膜のバリア機能に及ぼす影響

実験 1 では有用細菌の経口投与が産卵鶏の卵管粘膜のバリア機能に及ぼす影響を調べることを目的とした。約 500 日齢の白色レグホン産卵鶏に PBS または  $1 \times 10^{10}$  cfu/ml の *L. johnsonii* (C 区および LJ 区) の生菌を毎日 1 ml ずつ 14 日間経口投与した。最終投与日の翌日に腸管 (回腸、盲腸) と卵管 (膨大部、子宮部、腔部) を採取した。腸管の内容物と卵管の粘膜スワブの細菌叢を解析した。粘膜サンプルは粘膜バリア関連因子の遺伝子発現量の解析と、HE 染色による組織形態を画像解析に供した。

その結果、腸管と卵管いずれも乳酸菌の投与によって細菌の多様性には大きな変化はなかったが、構成細菌の種類が変化した (図 1)。タイト結合関連分子である zonula occluding (ZO)2 と junctional adhesion molecular (JAM)2 の遺伝子発現量は回腸の乳酸菌投与区で有意に増加した。一方で、卵管腔部において、抗菌ペプチドの avian defensin (AvBD)10 とタイト結合関連分子の claudin (CLA)1 の発現量は乳酸菌投与区で有意に増加した (図 2)。粘膜の組織学的解析では、回腸では乳酸菌投与区で絨毛の発達が見られたが、盲腸および卵管では乳酸菌投与の影響は認められなかった。これらの結果から、*L. johnsonii* の経口投与は、腸だけでなく卵

管の細菌叢も変化させることが明らかになった。さらに、乳酸菌の経口投与は腸管粘膜の Z02 や JAM2 の遺伝子発現量を高め、腸管粘膜の機械的バリア機能を強化するだけでなく、卵管粘膜においても、AvBD10 と CLA1 の遺伝子発現量を高め、卵管の粘膜バリア機能を強化する可能性が示唆された。

以上のことから、乳酸菌の経口投与は、腸管および卵管双方の感染防御機能の向上に寄与すると期待できる。



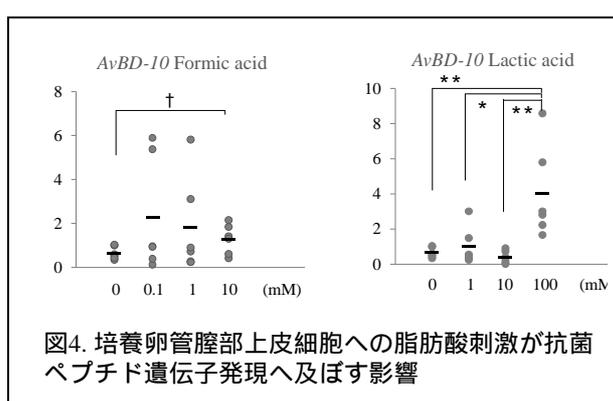
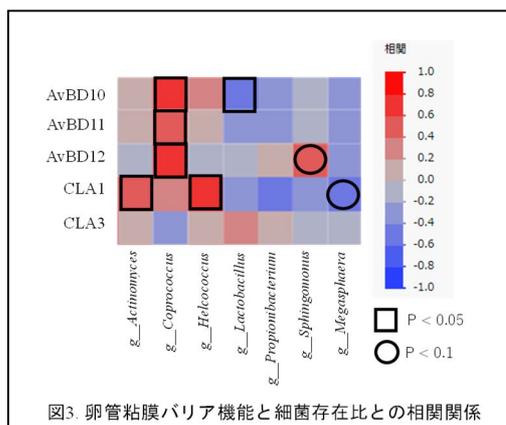
### 【実験 2】有用細菌の代謝産物が卵管粘膜バリア機能に及ぼす影響

実験 2 では、実験 1 の結果を基にして卵管粘膜におけるバリア機能増強のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

まず初めに、実験 1 の研究で得た卵管の細菌叢と粘膜バリア関連因子の遺伝子発現の結果の相関解析と卵管粘膜スワブサンプル中の短鎖脂肪酸分析をした。その結果、卵管の AvBDs の遺伝子発現と酪酸やギ酸といった短鎖脂肪酸の合成能を有する Coprococcus 属との間に有意な正の相関が認められた (図 3)。また、乳酸菌の経口投与によって卵管子宮部粘膜でギ酸の濃度が上昇する可能性が示唆された。

続いて、ギ酸や酪酸などの脂肪酸が卵管粘膜のバリア機能に作用するのかを卵管粘膜細胞を用いて調べた。約 350 日齢の白色レグホン産卵鶏から卵管腔部を採取し、初代卵管腔部上皮細胞を TCM-199 培地中に播種した。播種の 24 時間後にギ酸、酢酸、酪酸、乳酸で刺激し、72 時間後に培養細胞中の AvBDs との遺伝子発現量を解析した。その結果、ギ酸および乳酸刺激で AvBD10 が (図 4)、酪酸および乳酸刺激で AvBD12 の発現量がそれぞれ増加した。一方で、ギ酸、酪酸および乳酸刺激により CLA1 や CLA3 の発現量が減少した。

以上のことから、産卵鶏への乳酸菌の経口投与は卵管の細菌叢を変化させ、卵管で増加した Coprococcus 属菌が卵管粘膜のギ酸産生を増加させることで、これが卵管粘膜の AvBD10 や CLA1 の発現を増加させ、卵管粘膜のバリア機能を強化する可能性が示唆された。

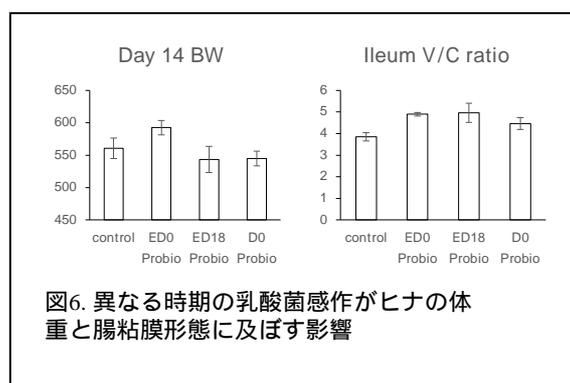
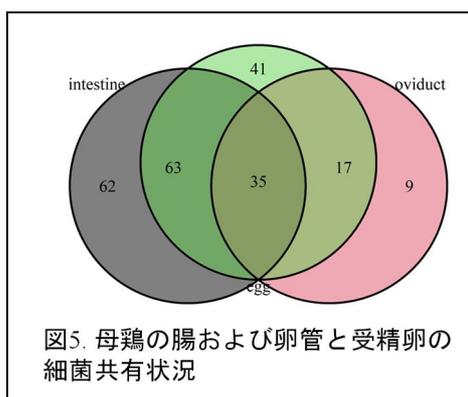


### 【実験 3】母鶏と受精卵の細菌共有状況と受精卵への有用細菌感作がヒナの成長性に及ぼす影響

当初は母鶏への乳酸菌給与によりヒナの細菌叢を制御可能かどうかを検証することを目的にしていたが、ここまでの研究で母鶏への乳酸菌給与が卵管粘膜の細菌叢を変化させるものの、投与した細菌自体の卵管への移行は認められず、安定した制御が出来なかった。そこで、当初の方針から変更し、実験 3 では実際の母鶏の腸内から卵管、そして受精卵までの細菌の共有状況 (移行の可能性) を分析し、続いてこの共有細菌種を用いて母鶏よりも細菌制御が容易な受精卵への細菌感作を行い、これがヒナの成長性に影響するか検証した。

その結果、母鶏の腸管 (回腸と盲腸) からは 160 種類、卵管粘膜 (腔部と膨大部) からは 61

種類の細菌種が検出され、腸と卵管の共通細菌は 35 種類であった。一方で受精卵からは 156 種類（卵殻と卵白、卵黄）検出された。腸と卵管で共通している 35 種類はすべて受精卵からも検出されたほか、合計で 115 種類（受精卵全体で検出された菌種の 74%）が母鶏の腸と卵管から移行する可能性が示された（図 5）。続いて、この中から 1 種類の乳酸菌 X を単離して、受精卵への細菌感作がヒナの成長性に及ぼす影響を追究した。プロイラーの受精卵の胚期 0 日齢（ED0）、胚期 18 日齢（ED18）または孵化後 0 日齢ヒナ（D0）に乳酸菌 X を  $1 \times 10^8$  cfu/個または羽、卵殻への噴霧（受精卵）または経口投与（ヒナ）し、14 日齢まで飼育した。その結果、ED0 群は、噴霧しなかった対象群（control）や孵卵後期または孵化後に感作させた ED18 群や D0 群と比べて、孵化後 14 日齢時点での増体量は 6~9%増加した。しかし、この時の回腸や盲腸粘膜の組織形態は群間で差が無かった（図 6）。以上のことから、母鶏から受精卵を介したヒナへの細菌移行を行う場合に選択すべき細菌種の候補が明らかになった。また、この中の細菌を受精卵に感作させることでヒナの成長性が促進する可能性が示された。



#### [まとめ]

本研究の結果から、母鶏への有用細菌の経口投与が腸だけでなく卵管粘膜の細菌叢を変化させ、粘膜のバリア機能を増強させる可能性が示された。このバリア機能の増強には卵管粘膜の Coprococcus 属の増加と、それに伴い産生されたギ酸が関与するかもしれない。また、本研究で母鶏から受精卵へ移行すると思われる細菌種が明らかになり、このうちの 1 種類を受精卵に感作させたところ、孵化後のヒナへの乳酸菌の感作よりもヒナの成長が促進される可能性が示された。以上のことから、母鶏への有用細菌の経口投与によって母鶏卵管粘膜とヒナ腸管粘膜のバリア機能が強化されるかを検証するという当初の目的のうち、母鶏卵管粘膜のバリア機能強化については予定通り検証された。後者のヒナ腸管粘膜バリア機能強化については直接の効果検証はできなかったが、「母鶏から受精卵へ移行しうる細菌種の同定」と「受精卵への共有細菌の感作試験」により、母鶏から受精卵へ移行する細菌がヒナの成長性を促進させる可能性について間接的に証明された。これらの成果は、将来的には有用細菌に限らず、様々な飼料添加物の経口給与による母鶏を介した次世代ヒナの感染防御機能の向上を目的とした新技術の開発に繋がり、家禽生産の向上に大きく貢献すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nii T, Shinkoda T, Isobe N, Yoshimura Y	4. 巻 -
2. 論文標題 Intravaginal injection of <i>Lactobacillus johnsonii</i> may modulates oviductal microbiota and mucosal barrier function of laying hens.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Poultry Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.psj.2023.102699	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 新小田太郎、津上優作、磯部直樹、新居隆浩
2. 発表標題 <i>Lactobacillus johnsonii</i> の経口投与によるニワトリ卵管粘膜のバリア機能強化に関する研究
3. 学会等名 第46回鳥類内分泌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 新居隆浩
2. 発表標題 ニワトリの卵管細菌叢に着目した卵管粘膜バリア機能強化に関する研究
3. 学会等名 第4回日本畜産学会若手企画サイエンスキャンプ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新小田太郎、磯部直樹、吉村幸則、新居隆浩
2. 発表標題 <i>Lactobacillus johnsonii</i> の経腔投与が卵管の粘膜バリア機能に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本家禽学会2021年度秋季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Taro Shinkoda, Naoki Isobe, Yukinori Yoshimura, Takahiro Nii
2. 発表標題 Effects of intra-vaginal administration of lactic acid bacteria on the oviductal mucosal barrier function of the laying hens.
3. 学会等名 The 9th International Seminar on Tropical Animal Production (ISTAP) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新小田太郎、津上優作・磯部直樹、吉村幸則、新居隆浩
2. 発表標題 Lactobacillus johnsonii の経口投与が産卵鶏の卵管および腸管の粘膜バリア機能に及ぼす影響.
3. 学会等名 日本家禽学会2022年度春季大会
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			
タイ	Silpakorn University			
エジプト	University of Sadat City			