

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450374

研究課題名(和文) 家禽の破卵および脚弱を制御するリン代謝調節機構の解明

研究課題名(英文) Phosphorus Metabolism in Poultry: Prevention of Eggshell Broken and Leg Weakness

研究代表者

杉山 稔恵 (SUGIYAMA, Toshie)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：10272858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：鶏では起立不能の脚弱あるいは卵殻の薄化による破卵が頻発し、多大な経済的損失を被っている。これらは、いずれも、リンとカルシウムからなる骨の代謝異常に起因する。

本研究では、リン輸送を司るナトリウム依存性リン酸トランスポーター(NaPi-II)が腎臓ならび腸管で発現しており、成熟とともにその発現量は増加しリン吸収が増加していることを明らかにした。また、これらリン代謝はエストロゲンによって生成された活性型ビタミンD3によって調節されていることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：A large amount of economic loss in poultry industry is produced by specific disorders such as the leg weakness and eggshell broken. The disorders are closely related with bone metabolism. Bone is composed of hydroxyapatite (phosphorus and calcium). Therefore, phosphorus metabolism also plays an important role in bone health.

In this research project, the mRNAs of sodium-dependent phosphate transporter (NaPi-II) were expressed in intestines and kidney, and the NaPi-II mRNAs were increased with the growth and maturation of female chickens. The NaPi-II mRNA expression was also stimulated by 1,25-hydroxyvitamin D3 (1,25-OH<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) and estrogen. These results demonstrated that phosphorus metabolism during sexual maturation is regulated by the estrogen-induced 1,25-OH<sub>2</sub>D<sub>3</sub> production.

研究分野：農学

キーワード：家禽 脚弱 破卵 リン カルシウム エストロゲン 代謝

1. 研究開始当初の背景

現在の養鶏産業において、ブロイラーでは起立不能となる脚弱、産卵鶏では卵殻の薄化による破卵が頻発し、多大な経済的損失を被っている。骨や卵殻の主成分はカルシウムであることから、これまで、脚弱や破卵の発生についてはカルシウムに着目し研究されてきた。しかしながら、骨はリン酸カルシウムからなっており、骨形成にリンは必須である。また、飼料中の過剰なリンはカルシウム代謝を阻害し、脚弱や破卵をもたらす。このように、リン代謝は骨代謝ならびにカルシウム代謝と深く関連しているが、リン代謝とそれを調節するメカニズムは明らかではない。

2. 研究の目的

本研究では、リン輸送を司るナトリウム依存性リン酸トランスポーター (NaPi-II) を発現する器官と組織を明らかにするとともに、成長や産卵に伴うリンとカルシウム代謝の変化、ならびにそれらを調節するメカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) **産卵鶏における NaPi-II サブタイプの遺伝子発現** リアルタイム PCR 法により、産卵鶏 (300 日齢) の腸管 (十二指腸、空腸、結腸、盲腸、直結腸) 腎臓、卵管および骨髄骨における NaPi-II サブタイプ遺伝子 (mRNA) の相対的発現量を検討した。

(2) **成長に伴う NaPi-II サブタイプ遺伝子の発現** 10 日齢の未成熟産卵鶏と産卵鶏の腎臓および腸管における NaPi-II サブタイプ遺伝子の相対的発現量を比較した。また、血中のリン、カルシウムならびに活性型ビタミン D3 濃度についても計測した。

(3) **産卵鶏の産卵周期に伴う NaPi-II サブタイプ遺伝子の発現** 産卵鶏では、卵が 24 時間をかけて卵管を通過し 1 個の卵を生産する。ここでは、卵が卵白分泌に存在し卵殻形成が行われていない時期 (卵白分泌期) と卵殻形成の行われている時期 (卵殻形成期) における腎臓および腸管における NaPi-II サブタイプ遺伝子の相対的発現量について比較した。また、血中のリンならびにカルシウム濃度についても計測し、カルシウム吸収に関わるカルシウム結合タンパク質 (CaBP) 遺伝子の相対的発現量についても検討した。

(4) **エストロジェンによるリン代謝調節機構の解明**

**未成熟産卵鶏におけるエストロジェンの NaPi-II サブタイプ遺伝子の発現に及ぼす影響** 10 日齢の未成熟産卵鶏にエストロジェンを投与し、血中のリン、カルシウムならびに活性型ビタミン D3 濃度の変化を検討した。また、エストロジェン投与による腎臓ならびに腸管における NaPi-II サブタイプ遺伝子および CaBP 遺伝子の相対的発現量に及ぼす影響について検討した。

**ビタミン D 欠乏飼料給与の未成熟産卵鶏に**

**おけるエストロジェンの NaPi-II サブタイプ遺伝子の発現に及ぼす影響** 未成熟産卵鶏を 40 日齢まで通常飼料もしくはビタミン D3 欠乏飼料で飼育した後、エストロジェンを投与し血中のリン、カルシウムおよび活性型ビタミン D3 濃度に及ぼすエストロジェンの影響を検討した。また、同時に腎臓ならびに腸管における NaPi-II サブタイプおよび CaBP 遺伝子の相対的発現量に及ぼすエストロジェンの影響を観察した。

**産卵鶏におけるエストロジェン受容体競合阻害剤の NaPi-II サブタイプ遺伝子の発現に及ぼす影響** 産卵鶏にエストロジェン受容体競合阻害剤 (タモキシフェン) を投与してエストロジェン作用を阻害し、血中リン、カルシウムならびに活性型ビタミン D3 濃度を計測した。また、腎臓ならびに腸管での NaPi-II サブタイプおよび CaBP 遺伝子の相対的発現量を検討し、エストロジェンのリンおよびカルシウム代謝に及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

(1) **産卵鶏における NaPi-II サブタイプの遺伝子発現**

NaPi-IIa (サブタイプ a) は、腎臓でのみ発現していることが示された。一方、NaPi-IIb (サブタイプ b) は、腸管、骨髄骨ならびに卵管で発現がみられ、とりわけ十二指腸 (相対値 1.00) で最も高く、卵管卵殻腺部 (0.48)、卵管卵白分泌部 (0.44)、卵管峡部 (0.32)、空腸 (0.32) で比較的高い発現量を示した。骨髄骨 (0.03)、回腸 (0.001)、直結腸 (0.001) では、わずかな発現量を示すにすぎなかった (図 1)。

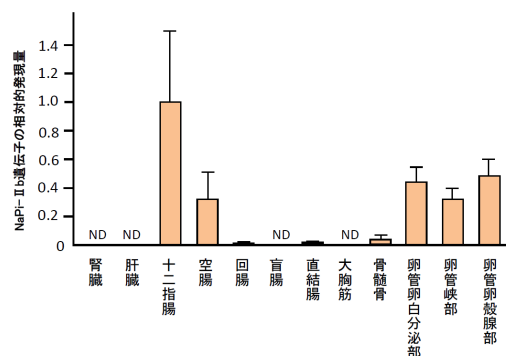


図1 産卵鶏の器官におけるNaPi-IIb遺伝子発現量 (平均±SD)

このことより、NaPi-IIa は主に腎臓でのリンの再吸収に関与していることが示唆された。また、NaPi-IIb は腸管でのリンの吸収 (能動輸送) に関与しており、とりわけ十二指腸ならびに空腸でリン吸収が行われていることが示唆された。卵管でも NaPi-IIb が高発現していることが示され、卵殻形成にリンの吸収もしくは排出が何らかの関与をしていることが考えられた。

(2) **成長に伴う NaPi-II サブタイプ遺伝子の発現**

産卵鶏の腎臓では、10 日齢の未成熟鶏と比較して NaPi-IIa 遺伝子量が約 4 倍増加していた。また、NaPi-IIb は産卵鶏の十二

指腸で 1.80 倍、空腸でも 6.94 倍に増加していた。加えて、成長に伴い血中の活性型ビタミン D3 濃度も有意に増加した。このことより、ニワトリでは産卵の開始に伴い血中の活性型ビタミン D3 濃度が上昇するとともに、腎臓でのリンの再吸収が増加し、十二指腸ならびに空腸でのリン吸収が増加することが考えられた。

**(3) 産卵鶏の産卵周期に伴う NaPi-II サブタイプ遺伝子の発現** 血中リン濃度は卵白分泌期において 4.79 mg/dL、卵殻形成期には 6.79 mg/dL であり、卵殻形成期でリン濃度が有意に増加した。しかしながら、血中カルシウム濃度は産卵周期に伴う変化はみられなかった。NaPi-IIa 遺伝子の相対的発現量は卵白分泌期と比較して、卵殻形成期の腎臓では 0.73 倍であった。NaPi-IIb 遺伝子の相対的発現量は、卵白分泌期と比較して十二指腸では 0.40 倍、空腸では 0.33 倍、回腸では 2.56 倍、直結腸では 0.28 倍を示し、多くの組織が低い発現量を示した(図 2)。CaBP 遺伝子の相対的発現量は卵白分泌期と比較すると、卵殻形成期では腎臓で 0.53 倍、十二指腸では 0.40 倍、空腸では 0.38 倍、回腸では 0.98 倍、盲腸では 0.66 倍、直結腸では 1.13 倍を示し低かった。

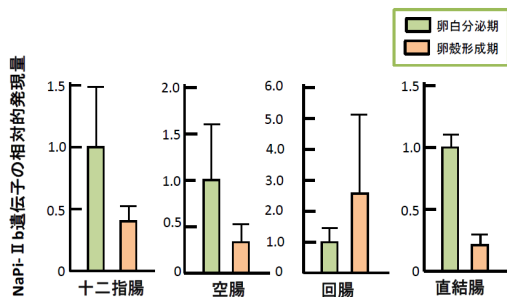


図2 腸管におけるNaPi-IIb遺伝子の相対的発現量

このことは、卵殻形成期では腎臓ならびに腸管でのリンおよびカルシウムの吸収(再吸収も含む)は減少していることを示している。しかしながら、血中リン濃度は卵殻形成期で増加していることから、卵殻形成時には骨髄骨の骨吸収によりカルシウムが卵殻形成へと供給されていることが示された。

**(4) エストロジェンによるリン代謝調節機構の解明**

**未成熟産卵鶏におけるエストロジェンのNaPi-II サブタイプ遺伝子の発現に及ぼす影響** エストロジェン投与により、血中リンおよびカルシウム濃度が増加した。CaBP 遺伝子の発現量は空腸、回腸および盲腸において有意に増加し、NaPi-IIb 遺伝子発現量も腸管において増加がみられた。また、血中活性型ビタミン D3 濃度も、エストロジェン投与により増加した。

**ビタミン D 欠乏飼料給与の未成熟産卵鶏におけるエストロジェンのNaPi-II サブタイプ遺伝子の発現に及ぼす影響** 通常飼料区の

未成熟鶏(40日齢)において、エストロジェン投与により腎臓ならびに腸管での NaPi-II サブタイプならびに CaBP 遺伝子の相対的発現量が増加した。通常飼料区とビタミン D 欠乏飼料区の間でのエストロジェン作用について比較したところ、ビタミン D 欠乏飼料区において血中活性型ビタミン D3 濃度が有意に減少し、血中カルシウム濃度、腎臓ならびに腸管における CaBP の発現量も減少した。しかしながら、血中リン濃度および NaPi-II サブタイプ遺伝子の相対的発現量に変化はみられなかった。

**産卵鶏におけるエストロジェン受容体競合阻害剤のNaPi-IIサブタイプ遺伝子の発現に及ぼす影響** 産卵鶏にタモキシフェンを投与したところ、血中リンおよびカルシウム濃度が有意に減少し、腸管における CaBP、腸管および腎臓における NaPi-II サブタイプ遺伝子の相対的発現量が有意に減少した。また、血中活性型ビタミン D3 濃度も減少した(図 3)。

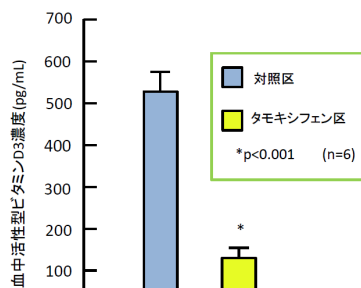


図3 血中活性型ビタミンD3濃度(平均 ± SE)

このことから、エストロジェンは腎臓での活性型ビタミン D3 の生成を介してリンならびにカルシウム代謝を調整していることが示唆された。また、(1) - (3)の結果を合わせて考えると、産卵鶏では成熟に伴う卵胞からのエストロジェンの分泌により、腎臓での活性型ビタミン D3 生成の促し腎臓ならびに腸管でのリンおよびカルシウム吸収が促進し、卵殻形成に伴う特異的なリンおよびカルシウム代謝を調節しているものと考えられる(図 4)。

今後、これらのリン代謝に関する基礎的研究結果をもとに、脚弱および破卵の具体的な対応策が確立されるものと期待される。

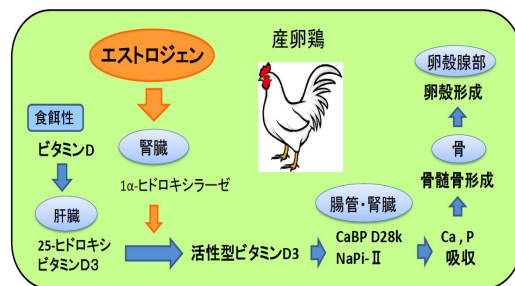


図4 産卵鶏におけるエストロジェンによるカルシウムおよびリン代謝調節機構

## 5. 主な発表論文等

[学会発表](計6件)

頓所詩織、内田美南、宮川ちはる、杉山稔恵。ニワトリにおけるエストロゲンによるビタミンD代謝調節機構に関する研究。2017年3月17日、新潟大学(新潟県・新潟市)。

内田美南、宮川ちはる、近藤元気、杉山稔恵。ニワトリにおけるカルシウムおよびリン代謝のエストロゲンによる調節機構。第16回 Niigata Bone Research Conference。2017年2月17日、ホテルオークラ新潟(新潟県・新潟市)。

Toshie Sugiyama, Chiharu Miyakawa, Minami Uchida. Hen calcium and phosphorus metabolism during the egg-laying cycle. 2016年7月14日、ニューオリンズ(米国)。

Toshie Sugiyama. Calcium regulation in egg-laying chickens. 4<sup>th</sup> Joint Meeting of ECTS and IBMS. 2015年4月26日、ロッテルダム(オランダ)。

内田美南、宮川ちはる、杉山稔恵。ニワトリのリンおよびカルシウム代謝に及ぼすエストロゲンの影響。日本畜産学会第109回大会。2015年3月28日、宇都宮大学(栃木県・宇都宮市)。

Chiharu Miyakawa, Genki Kondoh, Toshie Sugiyama. Effect of estrogen on phosphorus and calcium metabolism in chicks. The 10<sup>th</sup> Asia Pacific Poultry Conference. 2014年10月19日、済州島(韓国)。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

杉山 稔恵 (SUGIYAMA, Toshie)

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：10272858