

成長過程のブロイラーにおける
腸管栄養素吸収の変化
およびその制御機構の解明

北里大学大学院獣医学系研究科
動物資源科学専攻 博士後期課程 動物栄養学

氏名 柴田 実可子
指導教授 黒瀬 陽平

2019 年度

Studies on age-related changes
in the intestinal nutrient absorption and
its regulatory mechanisms in broiler
chickens.

Mikako Shibata

2019

審査委員

<主査> 濱野 美夫
(動物栄養学・教授)

<副査> 有原 圭三
(食品科学・教授)

<副査> 久留主 志朗
(獣医生理学・教授)

<副査> 古瀬 充宏
(九州大学大学院農学研究院
代謝・行動制御学・教授)

目次

第一章：

緒論	・・・ 1
----	-------

第二章：ブロイラーにおける成長に伴う腸管グルコース吸収の比較および腸管の形態学的解析	・・・ 9
--	-------

2-1 序

2-2 材料と方法

2-3 結果

2-4 考察

第三章：ブロイラーにおける成長に伴う腸管アミノ酸吸収の比較	・・・ 28
-------------------------------	--------

3-1 序

3-2 材料と方法

3-3 結果

3-4 考察

第四章：ブロイラーにおけるレプチンの腸管グルコース吸収抑制作用およびその制御機構の解明	・・・ 35
---	--------

4-1 序

4-2 材料と方法

4-3 結果

4-4 考察

第五章：

総括 . . . 48

謝辞 . . . 56

参考文献 . . . 58

図表 . . . 74

第一章

緒論

1-1 家禽の改良とその歴史

家禽とは、人の飼養下において生産物の目的に合わせて改良された鳥類の総称であり、その中でも圧倒的に飼養羽数が多いのがニワトリである。ニワトリの家禽化のその歴史は古く、東南アジアなどに生息するセキショクヤケイを祖先種として約 8000 年前に家禽化されたと言われている^{1,2}。家禽の品種改良の対象となる形質には、肉・卵の生産性、飼料利用性、強健性、繁殖性などがあげられ、改良の目的によって遺伝的分化が進み、系統ごとに異なる成長パターンを示す³。飼養現場において、現在は主に肉用鶏であるブロイラーと採卵鶏であるレイヤーが飼養されている。食肉に利用されるニワトリとして代表的な系統であるブロイラーは、品種改良により増体率が高い。飽食給与下における飼養で、孵化直後の体重と比較すると孵化後 5 週齢時には約 50 倍、同週齢のレイヤーと比較しても体重は約 10 倍に及ぶ(図 1)。一方で、過剰な飼料摂取および急速な身体の成長に生理機能が伴わないことによる飼料効率の低下⁴、腹腔内への不可食脂肪の過剰な蓄積^{5,6}、循環器障害⁷、脚の障害などの発生が問題となっている^{8,9}。また、日本の鶏肉自給率は約 60%であるが、給与飼料の多くを輸入に依存しているため、飼料自給率を考慮した鶏肉自給率は約 10%まで低下する。そのため、飼料自給率の上昇が望まれている。上記を踏まえると、ブロイラーの成長過程に応じた適切な栄養管

理が必要である。また、現在飼養現場において用いられているブロイラー飼料の組成は、1970年代から2000年代にかけてほとんど変化は見られない。一方で、1970年代のブロイラーと比較して、その後の改良により現在のブロイラーは増体率が2倍以上高くなった¹⁰。このことから、現在の飼料組成は、ブロイラーの情報を正確に反映しているとはいえない。そこで、ブロイラーの成長過程において栄養素要求量を再検討し、適切な栄養管理を行う必要がある。

1-2 鳥類におけるエネルギー獲得機構

多くの鳥類は、他の哺乳類と比較して基礎代謝量が高く、多くの熱を産生し、活発に動き回る。この高い代謝能力は、高い体温と発達した循環器系により維持されている。鳥類の多くは、身体のサイズや生息地に関わらず、体温をほぼ40℃に維持している。この高い体温は、身体の反射能力を高め、俊敏な動きや、長時間の飛翔を可能にしている。また鳥類の心臓は、同じ体サイズの哺乳類と比較しても、平均約40%大きい¹¹。鳥類の大きな心臓は、収縮による心室内の血液の押出を強くし、哺乳類と比較してより効率的に全身への血液循環を行うことができる。また、鳥類は気嚢を有することで酸素を効率的に利用することができる。しかしながら、この高い体温や代謝を維持するためには多くのエネルギーが必要となる。このことから、鳥類は、頻繁に餌を食べて効率的に消化吸収を行い、エネルギーを獲得しなければならない。よって、そのエネルギー獲得機構は、多様な舌や嘴の構造をはじめ

として、消化管全体の特殊化など、種ごと鳥類特有に進化している¹²。

ニワトリをはじめとした鳥類は、哺乳類と同様に、生命の維持に必要なエネルギーを食物として口腔から摂取する。鳥類の口腔には歯が無く、唾液中には α -アミラーゼといった糖分解酵素が哺乳類とは異なりほとんど存在しない¹²。よって、摂取された食物は消化をほとんど受けない状態で、食道の一部が袋状に膨らんだ組織である素囊に入る。素囊は、フクロウやカラスといった一部の鳥類を除外した、ニワトリなどの鳥類が持つ食物の貯蔵器官である。素囊にいったん蓄えられた食物は、その後、腺胃および筋胃と呼ばれる二つの胃に送られる。腺胃は、胃壁に前胃腺や酸分泌消化細胞が無数に存在しており、ペプシノーゲンや塩酸などの消化液を分泌することで、化学的消化を行う器官である¹³。一方で筋胃は、発達した固いケラチン様物質という角質層を持ち、食物を攪拌磨砕することで物理的消化を行う¹⁴。腺胃や筋胃においてある程度消化が行われた食物は、十二指腸、空腸、回腸から構成される小腸において、消化酵素により消化され、消化による最終産物は腸管上皮に存在する各栄養素の特異的な輸送体を介して血液中に流入する¹⁵。鳥類の腸管は、種ごとの食性の違いによって、形態や機能が異なっている。一般に、哺乳類と比較して鳥類の腸管は短いですが、上皮に存在する絨毛は約二倍長い¹⁶。また鳥類のなかでも、果実、肉、昆虫といった消化のしやすい食物を主食とする種の腸管の長さは短く、種子、植物、魚といったより消化に時間のかかる食物を主食とする種で長い傾向がある¹²。さら

に、腸管における消化酵素の活性や栄養素の輸送能力も、食性によって多様化している。スズメの仲間である鳴禽類の多くは、二糖類のショ糖を分解する酵素であるスクラーゼをほとんど持たない。一方で、ショ糖を多く含む花の蜜を餌とするハチドリ類のスクラーゼ活性は、スズメ類の約 10 倍高い^{17,18}。また、穀物類を主な栄養源とするニワトリ類では、二糖類のマルトースを分解する酵素であるマルターゼの活性が最も高い¹⁹。さらに、花の蜜を主食とする鳥類の消化管では、果糖のフルクトース輸送体である GLUT5 が多く発現する²⁰。また、穀類を主食とする鳥類の消化管では、単糖であるグルコースの輸送体である Na⁺依存性グルコース輸送体 1 (SGLT1) やグルコース輸送体 2 (GLUT2) が多く発現している²¹。一方、果実を主食とする種はペプチドや炭水化物と比較して、より吸収速度の速い遊離アミノ酸を優先的に吸収する²²。さらにその中でも、より脂質の豊富な果実を食べている鳥は、腸管において、中性脂肪を分解する酵素であるリパーゼの活性が高く、脂質を細胞内に取り込む能力も高い²³。

このように、鳥類はより効率的にエネルギーを獲得するために、その機構は食性によって大きく変化している。したがって、個体におけるエネルギー獲得機構を理解するためには、種ごとに腸管からの栄養素吸収を個別に検討および比較する必要がある。

1-3 哺乳類および鳥類の腸管における栄養素吸収機構

腸管において、栄養素をはじめとした物質の輸送は、輸送体を介した細胞内経路と、細胞間を通る細胞間隙経路の2つに分けら

れる。さらに、細胞内経路にはエネルギー（ATP）を利用した能動的な輸送と、濃度勾配を利用した受動的な輸送があり、栄養素は主にこの2つの機構を介して腸管で吸収される。

三大栄養素である糖質、タンパク質、脂質は、腸管において各栄養素特異的な輸送体を介して吸収される。糖質である単糖のグルコースは、生体の主なエネルギー源となる。食物中では多糖類や二糖類のマルトースとして存在し、口腔や消化管において、 α -アミラーゼやマルターゼといった消化酵素によってグルコースにまで分解される^{24,25}。グルコースは、腸管粘膜上皮に存在するSGLT1やGLUT2、 Na^+/K^+ -ポンプ（ Na^+/K^+ -ATPase）を介して吸収される²⁶。SGLT1は、グルコース1分子あたり2分子の Na^+ を共役輸送する輸送体で²⁷、魚類から哺乳類に至るまでの脊椎動物の小腸や腎臓をはじめ、無脊椎動物の消化管などにも存在しており²⁶、そのDNA情報とタンパク質構造が様々な種において高く保存されている²⁸。細胞内に流入したグルコースは、基底膜側に存在するGLUT2を介して²⁹、 Na^+ は Na^+/K^+ -ATPaseを介して血液中に流入する³⁰。また、果糖であるフルクトースは、腸管粘膜側に発現しているGLUT5を介して、受動的な輸送機構で吸収される³¹。タンパク質は、18種類のL-アミノ酸とL型・D型の区別がないグリシン、イミノ酸であるプロリンの20種類が重合してできた化合物であり、アミノ酸は筋タンパク質合成やアミノ酸の炭素骨格は肝臓における糖新生の基質となる。食物中のタンパク質は、消化管においてペプチダーゼなどの酵素によりアミノ酸にまで分解された後、能動的あるいは受動的な輸送機構により、各アミノ酸に特

異的な輸送体を介して吸収される^{32,33}。脂質は、エネルギー源となるだけでなく、ホルモンや細胞膜を構成する成分でもある³⁴。食物中では主に、中性脂肪の形で存在し、腸管において消化酵素であるリパーゼによりモノグリセリド、脂肪酸、グリセロールなどに分解される。その後グリセロールはそのままの状態、モノグリセリドと脂肪酸は、胆汁酸によってミセルと呼ばれる親水性の小さい分子に取り込まれ、吸収される³⁵。これらの栄養素吸収に利用されたNa⁺等のイオンは、血液中に流入した後、細胞間隙の経路を通して再び粘膜側に戻り、栄養素吸収に再利用される³⁶。この細胞間の結合は、クローディンやカドヘリンといった細胞間接着因子によって構成されており、腸管におけるイオン濃度の恒常性を維持している³⁷。

栄養素は腸管から吸収されることで初めて生体内での利用が始まる。したがって、成長段階における腸管での栄養素吸収制御機構を理解することにより、その特性に合わせた適切な栄養素の給与が可能になり、新規飼料の開発による鶏肉自給率の向上や、代謝性疾患の予防と改善に繋がる。

1-4 腸管における栄養素吸収の変化およびその制御機構

腸管の栄養素吸収は、成長過程における食性の変化の影響を受ける。反芻動物であるヒツジは、離乳による食性の変化に伴い、腸管のSGLT1遺伝子発現量が離乳前と比較して離乳後に約100-500分の一に減少する³⁸。ネコにおいては、離乳時に腸管のグル

コース吸収が著しく低下し、離乳後はアミノ酸の吸収が年齢依存的に増加する³⁹。一方で、食性に変化のない動物種における離乳後の検討では、未だ一致した結果が得られていないのが現状である。糖の吸収に関して、ラットでは離乳後の3週齢と比較すると、2-3ヶ月齢および18ヶ月齢で、腸管のグルコースおよびガラクトースの吸収が低下する⁴⁰。一方、3ヶ月齢のラットと比較して、24ヶ月齢のラットでは、腸管のグルコースおよびフルクトースの吸収が増加する⁴¹。このことから、成長過程における腸管の栄養素吸収の変化は、その一因として食性の変化が挙げられるが、成長による影響も考慮する必要がある。

成長過程における腸管の栄養素吸収制御に関しては、ホルモンなど内因性因子の影響も検討する必要がある。膵臓のランゲルハンス島B細胞から分泌され糖代謝を制御するインスリンは、ラットにおいて、空腸の粘膜側および基底膜側に作用し、SGLT1遺伝子発現量の変化なしにSGLT1タンパク質発現量を低下させ、それによりグルコース吸収を抑制する^{42,43}。また、主に哺乳類の脂肪細胞や胃から分泌され、摂食やエネルギー代謝を制御するホルモンであるレプチンは、腸管の粘膜側および基底膜側に作用し、グルコース吸収を抑制する⁴⁴。このような内因性のホルモンは、増体や生理状態によって分泌量の変動することから、成長過程において作用強度が変化している可能性がある。よって、腸管の栄養素吸収への内因性因子の影響を明らかにするためには、各動物種や成長過程での検討が必要である。また、その作用メカニズムが明らかになれば、それを標的とした意図的な栄養素吸収制御を行

うことも可能になると考えられる。

1-5 本研究の目的

以上のことから、ブロイラーを用いてニワトリにおける成長過程での栄養素吸収を解明することができれば、成長ステージに合わせて適切な栄養素を給与することが可能になる。また、内因性のホルモンによる栄養素吸収の制御機構を明らかにすることは、ブロイラーにおける腹腔内脂肪の過剰蓄積の問題を解決する一助となる。さらに、鳥類における代謝制御機構の新しい知見にもなる。よって本研究では、成長過程のニワトリにおける腸管のグルコースおよびアミノ酸吸収を検討し、さらに内因性ホルモンのレプチンによる腸管グルコース吸収への作用およびその制御機構を明らかにすることを目的とした。

第二章

ブロイラーにおける成長に伴う

腸管グルコース吸収の比較および腸管の形態学的解析

2-1 序

ブロイラーの高い増体能力は、育種改良の結果得られたものであるが、摂食量や増体の成長能が向上した要因は明らかになっていない⁴⁵。

鳥類において、口腔から摂取された栄養素は、約90%が腸管において吸収され、腸管上皮細胞内を通り、血液中に流入する。またこの時、腸管は摂取した栄養素を消化吸収するだけでなく、栄養素の刺激を受容しホルモンを分泌する。このことから、腸管は生体における栄養素利用の起点であり、全身の代謝を制御していると考えられる。したがって、成長段階における腸管での栄養素吸収制御機構を理解することにより、その特性に合わせた適切な栄養素の給与が可能になり、前述した様な飼養現場における問題の改善に繋がる。

哺乳類と同様に、鳥類であるブロイラーにおいても、生命の維持に必要な主なエネルギー源は、糖質のグルコースである。このことから、ブロイラーの栄養素要求を理解するために、成長過程における腸管のグルコース吸収の検討が行われてきた。その結果、ブロイラーにおいては、腸管全体でのグルコース吸収が生後と比較して2、5および10週齢で増加することが報告されている⁴⁶。し

かしながら、これらの報告の多くは1960-90年代に行われたものであり、現在の個体と比較して増体率が5倍以上低いことから、再検討する必要があると言える¹⁰。一方で、レイヤーは、空腸におけるSGLT-1のタンパク質発現量が、2日齢と比較して5週齢で低下する⁴⁷。したがって、成長過程における腸管栄養素吸収の変化は系統によっても異なることが予想されるが、これまで系統間の比較は報告されていない。

このことから、本章では成長過程および系統間におけるグルコース吸収能を再検証し、現在のブロイラーの特性を知るために、成長過程の1週齢および5週齢のブロイラーまたはレイヤーを用いて、腸管におけるグルコース吸収能を調査した。食物中のグルコースは、吸収部位周辺ではグルコースが2分子結合した二糖類であるマルトースとしても存在する。よって実験では、グルコースだけでなく、マルトースを用いて、消化過程を考慮したグルコース吸収も検討した。はじめに、個体におけるグルコース吸収を比較するために、1週齢および5週齢のブロイラーを用いて経口糖負荷試験（マルトース・グルコース）を行い、血中グルコース濃度の変動を比較した。次に、腸管の形態学的変化を成長過程で評価するために、腸管全体の長さや腸管の通過速度について比較した。さらに、電子顕微鏡を用いて、絨毛サイズ・単位面積当たりの絨毛数を解析した。消化過程の検討としては、マルトース分解酵素であるマルターゼ活性の評価を行った。最後に、腸管組織における実際のグルコース吸収能を検討するために、反転腸管法および短絡電流解析法を用いて、グルコース吸収およびイオン透過

性を比較した後、腸管上皮におけるグルコース吸収関連輸送体および細胞間接着因子の遺伝子発現量を測定した。さらに得られた結果をもとに、ブロイラーで見られた反応が系統特異的であるかを検討するため、1週齢および5週齢のレイヤーを用いて同様に腸管グルコース吸収能を検討し、ブロイラーと比較した。

2-2 材料と方法

本論文におけるすべての動物実験は、北里大学動物実験倫理委員会の審査を経た後、学長の承認を得て実施された（承認番号：15-118）。

2-2-1 供試動物と飼育条件

1週齢（ブロイラー：n=104，レイヤー：n=6）および5週齢（ブロイラー：n=85，レイヤー：n=8）のブロイラー系チャンキー種（プライフーズ株式会社第一ブロイラーカンパニー，青森）とレイヤー系ジュリア種（小岩井農牧株式会社，岩手）を用いた。飼育環境は24時間点灯とし、5週齢までマル中印ブロイラー肥育前期用配合飼料ヒナ餌付けE（中部飼料株式会社，愛知）を自由採食・自由飲水とした。3週齢まで育雛器内（ $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）で飼育し、3週齢以降は、ブロイラーは単飼ケージ（幅40×高さ60×奥行45cm）（ $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）、レイヤーは育雛器内（ $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）で飼育した。腸管内容物の影響を除外するために、実験前に1週齢では12時間、5週齢では24時間の絶食を行った。

2-2-2 経口糖負荷試験

2.5 M グルコースまたは 2.0 M マルトース溶液を、胃ゾンデを用いて 2.0 g/kg BW の投与量で嚙嚢に入るように経口投与した。投与量および濃度は、過去の報告をもとに設定した⁴⁸。糖類投与前 0 分、投与後 10、20、30、40、50、60、90、120 分において全血を爪から採取し、ダイアセンサー（パナソニックヘルスケア株式会社，東京）を用いてグルコース濃度を測定した。また得られた結果より、0-120 分までの Area Under the Curve (AUC) を求めた。

2-2-3 腸管の長さおよび絨毛サイズの比較

ソムノペンチル（共立製薬株式会社，東京）をペントバルビタールとして 50mg/kg になるよう腹腔内投与し、全身麻酔を行った。侵害反射が見られなくなり、深麻酔下であることを確認した後、頸動静脈放血により安楽殺した。開腹後、速やかに十二指腸から回腸遠位までを採取し、長さを計測した。絨毛サイズの解析においては、採取した空腸遠位を切開し、2.5%グルタルアルデヒド溶液に浸漬し、固定した。その後、1%オスミウム酸緩衝液に 1 時間浸漬し、50、70、90、95、100%エタノールの順に置換した。作製したサンプルを用いて、走査型電子顕微鏡で撮影を行った。絨毛のサイズ（短径・長径）および単位面積（1 mm²）あたりの絨毛数は、撮影した電子顕微鏡写真を用いて、画像解析ソフト ImageJ（version 1.48, NIH, USA）により計測した。

2-2-4 経口投与物質の消化管内通過速度の検討

経口投与物質の消化管内通過速度は、過去の報告をもとに以下の条件で検討を行った^{49,50}。1%エバンスブルー含有 2.0M グルコース溶液を、胃ゾンデを用いて 2.0 g/kg BW の投与量で嚙嚢に入るように経口投与した。経口投与 20 分後、直ちに腹腔内にソムノペンチル（共立製薬株式会社，東京）をペントバルビタールとして 200 mg/kg になるよう過剰投与し、安楽殺した。開腹後、速やかに染色された腸管の末端を鉗子で留め、十二指腸から回腸遠位までを取り出した。十二指腸から回腸遠位までの腸管全体の長さ、十二指腸から染まった位置までの長さを測定し、腸管全体の長さに対する染色された長さの割合を算出した。また、最もグルコース吸収能力の高い部位であるとされる空腸遠位および回腸近位の境に位置するメッケル憩室を基準に、メッケル憩室から染色された位置までの長さを測定した。

2-2-5 空腸遠位におけるマルターゼ活性の測定

屠殺方法は、腸管の長さおよび絨毛サイズの比較と同様の方法で行った。開腹後、速やかに空腸遠位を採取し、スパーテルを用いて上皮層のみを剥離した。剥離した組織は、液体窒素で直ちに凍結させ、測定まで -80℃ で保存した。測定時に組織をマイクロチューブに移し、サンプル 1 g あたり 22.5 ml の 56 mM マレイン酸バッファー (pH6.0) を加えた。氷上でホモジナイザーを用いて組織を破碎した後、5,000 × g、4℃ で 20 分間遠心を行い、上清を回収した。上清と等量の 2% マルトース含有 56 mM マレイン酸バ

ッファー (pH6.0) を加え、37°C でインキュベートを行い、0、15、30、45、60 分の各時間でサンプルを回収し、沸騰水浴中で 2 分間煮沸して反応を停止させた。回収した各サンプルのグルコース濃度をグルコースキット (グルコース CII テストークワー, 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪) を用いて測定した。

2-2-6 反転腸管法によるグルコース吸収試験

屠殺方法は、上記と同様の方法で行った。開腹後、速やかに十二指腸から回腸遠位までを採取し、十二指腸、空腸近・遠位、回腸近・遠位を各約 5 cm の長さで切り分けた。空腸および回腸は、メッケル憩室を境に十二指腸側約 5 cm を空腸遠位とし、盲腸側約 5 cm を回腸近位とした。予め冷やした PBS (136 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM NaH₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4) で満たしたシャーレ上に腸管を置き、以降の操作は全て氷上で行った。腸管に付着した脂肪組織を取り去り、先端にパラフィルムを巻いたプラスチックチューブに腸管を通し、チューブの先端を腸管ごと縫合糸で結紮した。腸管を反転させ、末端側の端を結紮し、シリンジを用いて内側 (漿膜側) に以下の溶液を充填した。マルトース培養区においては Krebs Ringer Buffer (KRB) 溶液 (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM CaCl₂・2H₂O, 10 mM HEPES, pH 7.4)、グルコース培養区においては 10 mM グルコース含有 KRB 溶液を充填した。充填した培養液は、予め実験開始前に 100% O₂ で 30 分間のバブリングを行った。作製した腸管組織を 10 mM グルコース含有 KRB または 25 mM マルトー

ス含有 KRB が 50 ml 入ったビーカーに投入し、100% O₂ でバブリングしながら 40℃ で 60 分間培養した。培養後、腸管を取り出し、腸管に付着した余分な水分をペーパータオルで取り除いた。シャーレ上で腸管に切れ込みを入れ、内容液を回収した。また、培養後のビーカー内の培養液も回収した。回収した両溶液（M：粘膜側・S：漿膜側）のグルコース濃度は、グルコースアナライザー（東亜ディーケー株式会社，東京）を用いて測定した。

2-2-7 短絡電流解析法を用いた起電性グルコース吸収の検討

安楽殺法は、上記と同様の方法で行った。開腹後、速やかに空腸遠位を採取し、10 mM グルコースが加えられた冷 KRB 改変溶液（127 mM NaCl, 4 mM KCl, 2 mM CaCl₂·2H₂O, 10 mM HEPES, pH 7.4）で満たしたシリコントレイに移した。腸管を切開し、一枚のシート状にした後、マイクロピンセットを用いて、実体顕微鏡下で筋層を剥離した。組織をチャンバーに装着し、粘膜側および漿膜側共に上記のバッファーを加え、40℃、100% O₂ バブリング下で 15 分間の前培養を行った。その後両側の培養液を除去し、本培養用として予め 40℃、100% O₂ で 30 分バブリングしたグルコースを含まない KRB 改変溶液に置換した。1 M NaCl で溶解した 4% アガロースゲルから作製した銀-塩化銀電極をチャンバーにセットし、ボルテージクランプアンプを接続した後、測定を開始した。

能動的イオン輸送により生じる電位差を測定するために、実験前に分極電圧、液間抵抗の補正を行い、受動輸送による溶液中の

イオン輸送がない状態で測定を行った。測定開始 10 分後に、短絡電流値 (I_{sc} (μA)) の安定を確認し、粘膜側にコントロール区としてマンニトール (終濃度: 10 mM)、刺激区としてマルトースあるいはグルコース (終濃度: 各 10 mM) を添加し、 I_{sc} の経時的変化を測定した。また、阻害剤の検討として、粘膜側に 100 μM フロリジン (SGLT1 阻害剤) あるいは漿膜側に 100 μM ウアバイン (Na^+/K^+ -ATPase 阻害剤) を含むリンゲル改変溶液で培養し、グルコース (終濃度: 10 mM) 添加により発生する I_{sc} の経時的変化も測定した。さらに、 Na^+ の影響を検討するために、 Na^+ 存在下および非存在下におけるグルコース (終濃度: 10 mM) 添加により発生する I_{sc} の経時的変化も測定した。前培養後、コントロール区としてリンゲル改変溶液、 Na^+ -free 区として NaCl を N-メチル-D-グルカミン (NMDG) (Sigma-Aldrich 株式会社, アメリカ) に置換した Na^+ -free リンゲル改変溶液 (127 mM NMDG, 4 mM KCl, 2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mM HEPES) で培養し、10 分後に I_{sc} が安定したのを確認し、粘膜側にグルコース (終濃度: 10 mM) を添加した。すべての実験区において、刺激 10 分後に、組織の状態を評価するため、塩化カルバコール (シグマアルドリッチ株式会社, アメリカ) (終濃度: 100 μM) を漿膜側に添加し、 Cl^- 分泌による I_{sc} の上昇を確認した。

すべての I_{sc} の変化は、刺激直前の数値を規定値と定め、刺激後 10 分間の最大値から減算した値を ΔI_{sc} とし、チャンバーの開口面積 (0.5 cm^2) で除算した ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)。また測定時、1 分毎に 1 秒間、10 mV のコマンドパルスを経路に与え、 I_{sc} を測定し、 I_{sc} が

ら抵抗値 (R) をオームの法則に基づいて算出した ($R=E/I$)。抵抗値の逆数を膜コンダクタンス (S) とし、チャンバーの開口面積 (0.5 cm^2) で除算した (S/cm^2)。膜コンダクタンスは、刺激溶液投与時を 0 分として、刺激前 0-5 分、刺激後 0-5、5-10 分の各時間の平均値とし、すべての実験区で測定した。

2-2-8 リアルタイム PCR によるグルコース吸収関連輸送体および細胞間接着因子の遺伝子発現量の測定

安楽殺法は上記と同様の方法で行った。開腹後、速やかに空腸遠位を採取し、スパーテルを用いて上皮のみを剥離後、予め RNAlater (Thermo Fisher Scientific 株式会社, アメリカ) を加えたマイクロチューブに浸漬させ、実験に使用するまで -80°C で保存した。RNAiso Plus (Takara Bio 株式会社, 滋賀) を用いて RNAlater で保存した組織を Acid Guanidium-Phenol-Chloroform (AGPC) 法によって RNA 抽出を行い、Nano Drop (Thermo Fisher Science 株式会社, アメリカ) を用いて total RNA の濃度を測定した。500 ng の total RNA から、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡株式会社, 神奈川) を用いてゲノム DNA の分解処理および逆転写を $37^\circ\text{C} \cdot 5$ 分、 $37^\circ\text{C} \cdot 15$ 分、 $50^\circ\text{C} \cdot 5$ 分、 $98^\circ\text{C} \cdot 5$ 分の反応条件で行った。逆転写後、すべてのサンプルを滅菌水で 10 倍希釈した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡株式会社, 大阪) を酵素として、リアルタイム PCR を StepOnePlus™ Real-Time PCR System (東洋紡株式会社, 神奈川) により denature $95^\circ\text{C} \cdot 30$ 秒、

annealing 57°C・30 秒、extension 20 秒を 35 サイクル行った。それぞれのプライマーに対して最も発現量の高いサンプルを 1 として、そこから 10 倍希釈した 0.1、0.01、0.001 の合計 4 つの各濃度をスタンダードとして用いた。内部標準として、 β -actin を用いた。相対的 mRNA 発現レベルを標準曲線と比較し、サンプルの Ct 値から計算した。各標的産物は TA-クローニングあるいはダイレクトシーケンス法により配列を確認した。用いたプライマー、塩基配列、産物サイズは表 1 に示した。

2-2-9 統計処理

すべての結果は平均値 \pm 標準誤差で表し、有意差は $p<0.05$ で示した。2 群間の比較は Welch's *t*-test を用いて解析し、3 群間以上の比較は Tukey's HSD を用いて解析した (SPSS, version 25, USA)。

2-3 結果

経口糖負荷試験において、両週齢共にマルトースまたはグルコース溶液投与後に血中グルコース濃度の上昇が観察された(図 2A, 3A)。マルトース負荷による血中グルコース濃度の変動は、1 週齢では血中グルコース濃度が投与 10 分後で最大値となり、投与 40 分後では投与前の基礎値付近まで戻った。5 週齢においては、血中グルコース濃度は投与 40 分後に最大値となり、投与 120 分後において基礎値付近まで戻った。週齢間における血中グルコース濃度では、0、10 分において 1 週齢の方が 5 週齢よりも有意に高

く、30、40、50分では1週齢の方が5週齢よりも有意に低かった（図2A, $p < 0.05$ ）。血中グルコース濃度の曲線下面積（AUC）は、1週齢と比較して5週齢で有意に高かった（図2B, $p < 0.05$ ）。グルコース負荷では、1週齢の血中グルコース濃度は投与20分後で最大値となり、投与50分後では投与前の基礎値付近まで戻った。一方で、5週齢の血中グルコース濃度は、投与50分後に最大値となり、投与120分後において基礎値付近まで戻った。血中グルコース濃度を週齢間で比較すると、10、20分において、1週齢の方が5週齢よりも有意に高く、50、60、90分では1週齢の方が5週齢よりも有意に低かった（図3A, $p < 0.05$ ）。また、血中グルコース濃度のAUCは、1週齢と比較して5週齢で有意に高かった（図3B, $p < 0.05$ ）。

腸管の長さおよび絨毛サイズの比較では、十二指腸から回腸遠位までの長さは1週齢と比較して5週齢で有意に長かった（図4A, $p < 0.001$ ）。絨毛のサイズは、長径（陰窩から頂端まで）および短径（横幅）が1週齢と比較して5週齢で有意に長かった（図4B, 表2, $p < 0.001$ ）。しかしながら、 1 mm^2 あたりの絨毛の数は、1週齢において5週齢よりも有意に多かった（図4C, 表2, $p < 0.001$ ）。

経口投与物質の消化管内通過速度の比較では、腸管の長さ（1週齢： $94 \pm 4\text{ cm}$ 、5週齢： $148 \pm 4\text{ cm}$ ）およびエバンスブルー投与による染色された位置は、1週齢と比較して5週齢で有意に長かったが（1週齢： $67 \pm 5\text{ cm}$ 、5週齢： $83 \pm 5\text{ cm}$ ；表3, $p < 0.05$ ）、腸管全体の長さに占める染色された長さの割合（%）は1週齢と比

較して 5 週齢で有意に低かった (1 週齢 : $71 \pm 4\%$, 5 週齢 : $51 \pm 4\%$; 表 3, $p < 0.05$)。しかしながら、染色部位の先端からメックル憩室までの距離には、週齢間で有意な差はなかった (1 週齢 : $6 \pm 4\text{cm}$, 5 週齢 : $-6 \pm 6\text{cm}$; 表 3, $p = 0.136$)。

反転腸管法によるグルコース吸収試験では、マルトースおよびグルコース培養区共に、両週齢、すべての部位でグルコースが検出された。マルトース培養区では、空腸近・遠位、回腸近・遠位の粘膜側で 1 週齢と比較して 5 週齢で有意にグルコース濃度が高かったが、空腸遠位および回腸近位の漿膜側では有意に低かった (図 5A, $p < 0.05$)。漿膜側/粘膜側のグルコース濃度比 (S/M 比) は、1 週齢と比較して 5 週齢において、十二指腸、空腸近・遠位、回腸近・遠位で有意に低かった (図 5B, $p < 0.05$)。腸管マルターゼ活性の測定では、両週齢共に 60 分までグルコース産生量が増加したが、すべての時間において、グルコース産生量に週齢間の差はなかった (図 6)。グルコース培養区における粘膜側および漿膜側のグルコース濃度は、1 週齢と比較して 5 週齢の空腸遠位、回腸近位の漿膜側で有意に低かった (図 7A, $p < 0.05$)。S/M 比は、1 週齢と比較して 5 週齢で空腸遠位および回腸近位で有意に低かった (図 7B, $p < 0.05$)。しかしながら、十二指腸、空腸近位、回腸遠位において有意な差はなかった (図 7B)。

短絡電流解析法によるグルコース吸収の検討では、粘膜側へのマンニトール添加では I_{sc} には両週齢とも変化が見られなかった (図なし)。マルトースまたはグルコース添加は、両週齢で I_{sc} を上昇させた (図 8A・B, 9A・B)。しかしながら、5 週齢における

ΔI_{sc} は、マルトースおよびグルコース添加共に、1 週齢と比較して有意に低かった (図 8C, 9C, $p < 0.05$)。フロリジン培養によって、1 週齢においては ΔI_{sc} が有意に低下したが、5 週齢においては低下しなかった (図 10, $p < 0.05$)。ウアバイン培養によって、両週齢で ΔI_{sc} が有意に低下した (図 11, $p < 0.05$)。Na⁺の存在または非存在 (NMDG-C1 培養) に関わらず、両週齢においてグルコース添加により I_{sc} が上昇したが (図 12)、1 週齢では NMDG-C1 培養によって ΔI_{sc} が有意に減少した (図 12, $p < 0.05$)。一方、5 週齢では NMDG-C1 培養の影響は見られなかった (図 12)。

両週齢において、細胞間のイオン透過性の指標である膜コンダクタンスにグルコース刺激の影響は見られなかったが、5 週齢の膜コンダクタンスは 1 週齢と比較して有意に低かった (図 13, $p < 0.05$)。

遺伝子発現量の解析では、グルコース吸収関連輸送体である SGLT1、GLUT2、Na⁺/K⁺-ATPase の発現量には、両週齢間で有意な差は見られなかった (図 14)。細胞間接着因子については、claudin5 の発現量が 1 週齢と比較して 5 週齢で有意に高かったが (図 14, $p < 0.05$)、claudin2、claudin15、connexin43、cadherin92 には両週齢間で有意な差はなかった (図 14)。

ブロイラーとレイヤーの両系統間における短絡電流解析による起電性腸管グルコース吸収の比較では、両週齢および両系統において粘膜側へのグルコース添加によって I_{sc} が上昇した (図 15)。1 週齢においては、両系統間で ΔI_{sc} に有意な差は見られなかったが、5 週齢においては、レイヤーの ΔI_{sc} はブロイラーと比較して

有意に高かった（図 15, $p<0.05$ ）。

2-4 考察

1 週齢および 5 週齢ブロイラーへの経口糖負荷試験において、血中グルコース濃度の経時変化は、最大値に達する時間および基礎値に戻る時間が、1 週齢と比較して 5 週齢で遅延していた。また、両週齢において、血中グルコース濃度は経口糖負荷後 120 分以内に負荷前の値に回復した。このことから、ブロイラーにおいても、血中グルコース濃度が哺乳類と同様に制御されることが示唆された。血中グルコース濃度の恒常性は、細胞内への取り込み量と血中への放出量のバランスによって維持されている。哺乳類においては、血中グルコース濃度は通常 80-120 mg/dl に維持されており、この調節には膵ランゲルハンス島 β 細胞から分泌されるインスリンやグルカゴンなどのホルモンが主に関与している。一方、ニワトリをはじめとする鳥類の血中グルコース濃度は、空腹時でも 200-300 mg/dl と哺乳類よりも高く維持されている。このことから、鳥類におけるインスリン感受性の低下が推察されるが、詳細は不明である。しかしながら、ブロイラーにおいて、インスリン投与による血中グルコース濃度の最小値および基礎値への回復時間は、1 週齢と比較して 21 日齢において遅延する⁵¹。したがって、5 週齢ブロイラーにおいて糖負荷後の血中グルコース濃度が基礎値に戻る時間が遅延する要因として、インスリン感受性の低下が考えられる。さらに、経口糖負荷後に血中グルコース濃度が最大値に達する時間も 5 週齢で遅延した。この結果から、

5 週齢の腸管組織における単位面積当たりのグルコース吸収が 1 週齢と比較して低下している可能性が考えられた。そこで、ブロイラーの腸管におけるグルコース吸収の詳細を解明するため、① 成長に伴う腸管の形態学的な変化、② 腸管のグルコース吸収の変化を検討した。

はじめに、成長に伴う腸管の長さおよび単位面積当たりの絨毛の数の変化が、経口投与した糖溶液の吸収部位への到達時間を変化させる可能性について検討した。5 週齢の腸管の長さ、絨毛の長径および短径は 1 週齢と比較して増大していたが、単位面積当たりの絨毛の数は減少していた。腸管における主要なグルコース吸収部位は、メッケル憩室両側に位置する空腸遠位および回腸近位である⁴⁶。経口グルコース負荷後の血中グルコース濃度の最大値は、1 週齢で 20 分、5 週齢では 50 分であった。しかしながら、エバンスブルー含有グルコース溶液を経口投与してから 20 分後に染まった腸管部位の先端とメッケル憩室間の距離には週齢間で差がなかった。つまり、5 週齢においても、負荷 20 分後にグルコース溶液は主要な吸収部位に到達していたことになる。したがって、5 週齢ブロイラーの腸管の長さの増大が、経口グルコース負荷後の血中グルコース濃度上昇の遅延に関与している可能性は低い。

次に、腸管グルコース吸収の変化を週齢間で比較検討した。1 週齢および 5 週齢ブロイラーの腸管を用いて、反転腸管法および短絡電流解析法により、腸管グルコース吸収を週齢間で比較した。マルトースは、腸管上皮において膜酵素であるマルターゼにより

2 分子のグルコースに膜消化され吸収される。反転腸管法のマルトース培養区において、粘膜側の培養液にはマルトースのみが含まれ、漿膜側の培養液には糖が含まれないことから、漿膜側のグルコース濃度の上昇は、マルトースの消化およびグルコースの吸収が行われていることを意味する。両週齢において、漿膜側でグルコース濃度が上昇したが、5 週齢の漿膜側のグルコース濃度は 1 週齢と比べて低く、逆に粘膜側グルコース濃度は 5 週齢の方が高かった (S/M 比の低下)。これらの結果は、5 週齢におけるマルターゼ活性の低下あるいはグルコース吸収能の低下を示唆する。ブロイラーの腸管においてマルターゼ活性が最も高いのは空腸遠位である⁵²。そこで、空腸遠位のマルターゼ活性を両週齢間で比較検討した。その結果、マルターゼ活性には両週齢間で差がなかった。したがって、5 週齢ブロイラーの腸管では、マルターゼ活性の低下ではなくグルコース吸収能の低下がグルコース吸収の遅延に関与する可能性が示唆された。ブロイラーの腸管におけるグルコース吸収は、主に能動的な機構を介していることが分かっている⁴⁷。グルコース培養区において、1 週齢と比較して 5 週齢の空腸遠位および回腸近位で、S/M 比が有意に低かった。このことから、1 週齢と比較して 5 週齢のブロイラーにおいては腸管の能動的なグルコース吸収が低下していることが示唆された。

前述したように、ブロイラーにおいては 1 週齢から 5 週齢の間に腸管および絨毛の形態が大きく変化する。反転腸管法は簡便な方法ではあるものの、腸管の長さ、重量、表面積を揃えることが困難で、腸管内に充填する培養液の容量を揃えることも難しい。

そこで、腸管の能動的なグルコース吸収をより正確に検討するため、短絡電流解析法を用いて単位面積あたりのグルコース吸収能を測定した。短絡電流値 (I_{sc}) およびその変化量 (ΔI_{sc}) をグルコース吸収の指標として、グルコースの能動輸送に関わる輸送体の関与を 1 週齢および 5 週齢ブロイラーにおいて検討した。グルコースおよびマルトース刺激によって両週齢において I_{sc} の増加が認められたが、1 週齢と比較して 5 週齢の ΔI_{sc} が有意に低かったことから、5 週齢におけるグルコース吸収能の低下が改めて示唆された。

短絡電流解析法によっても 5 週齢ブロイラーの腸管グルコース吸収能の低下が示唆されたことから、その低下の要因を明らかにするため、グルコース吸収に関わる各輸送体の関与について薬理的検討を行った。1 週齢では SGLT1 阻害剤のフロリジン添加培養によりグルコース吸収が低下したが (ΔI_{sc} の低下)、5 週齢ではフロリジン添加培養の影響はなかった。一方、 $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ 阻害剤のウアバイン添加培養では、両週齢でグルコース吸収が低下した。これらの結果から、1 週齢におけるグルコース吸収は SGLT1 および $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{-ATPase}$ を介した能動的な輸送機構に依存していることが示唆された。一方、5 週齢においては SGLT1 の発現量あるいは機能の低下が考えられる。しかしながら、SGLT1 遺伝子の発現量には両週齢間で差がないことから、5 週齢では SGLT1 タンパク質への翻訳過程が抑制されている可能性がある。事実、レイヤーでは成長に伴って腸管の SGLT-1 タンパク質発現量が低下することが報告されている⁴⁷。よって、タンパク質レベ

ルで SGLT-1 発現量および翻訳過程を検討する必要がある。

腸管では、細胞間隙に存在する細胞間接着因子を介して、絶えずイオンが移動している³⁷。SGLT1 を介して、能動的にグルコースが吸収される際に共役輸送される Na⁺イオンは、漿膜側に排出された後、細胞間隙を通過して再び粘膜側に輸送される³⁷。細胞間隙は、細胞間接着因子により構成されており、細胞間の結合の強さとイオン透過性を制御している。細胞間接着因子 claudin15 のノックアウトは、腸管の漿膜側から粘膜側への Na⁺イオンの透過性を低下させ、グルコース吸収を抑制する⁵³。本研究では、1 週齢において Na⁺非存在下でグルコース吸収が低下したのに対し (ΔI_{sc} の有意な低下)、5 週齢では低下しなかった。さらに、1 週齢と比較して 5 週齢の膜コンダクタンスが低下した。これらの結果から、5 週齢ブローラーでは細胞間イオン透過性が低下しているものと推察された。事実、哺乳類であるマウスやウサギにおいては、若齢個体と比較して壮齢個体において腸管のイオン透過性が低下することと一致する⁵⁴。そこで、細胞間接着因子の遺伝子発現量を PCR 法によって検討した。

ニワトリの腸管における細胞間接着因子の機能は哺乳類に比べよく理解されていないが、腸管上皮に claudin5 が存在し、細胞間接着に関与している可能性が既に報告されている⁵⁵。ヒトの腸管においては、claudin5 発現量が低下すると細胞間のイオン透過性が亢進する⁵⁶。ブローラーの空腸遠位において、1 週齢と比較して 5 週齢で claudin5 遺伝子の発現量が高かったことから、成長に伴い漿膜側から粘膜側への細胞間イオン透過性が低下し、グ

ルコース吸収能が低下する機序が考えられた。しかしながら、ニワトリのみならず哺乳類においても claudin5 のイオン選択性は明らかにされていないことから、今後 claudin5 の特性やタンパク質発現量についても検討する必要がある。

ブロイラーとレイヤーの系統間での能動的グルコース吸収の比較では、1 週齢では差は見られなかったが、5 週齢ではブロイラーと比較してレイヤーで有意に高かった。レイヤーでは、10 週齢時と比較して 40 および 55 週齢で体重が 20 倍以上増加するにもかかわらず、経口グルコース負荷後に血中グルコース濃度が最大値を示す時間は変わらない⁴⁸。この報告は、レイヤーにおいては成長過程で腸管の単位面積当たりのグルコース吸収量が低下しないことを示す。よって、成長過程でみられた腸管グルコース吸収の低下は、ブロイラー特異的であることが示唆された。

第三章

ブロイラーにおける成長に伴う腸管アミノ酸吸収の比較

3-1 序

第二章において、ブロイラーは成長過程で系統特異的に、腸管のグルコース吸収が低下していることが明らかにされた。このことから、ブロイラーは成長に伴ってその他の栄養素吸収が増加することで、摂取するエネルギーの低下を補っていることが示唆された。よって本章では、筋タンパク質の合成や肝臓の糖新生の基質となるタンパク質の加水分解物であるアミノ酸の吸収に着目して検討を行った。家禽におけるアミノ酸は、レイヤーでは成長、羽毛の更新、卵の生産に、ブロイラーでは増体に強く影響を与える⁵⁷。哺乳類の体タンパク質を構成しているアミノ酸は20種類であり、家禽においては必須アミノ酸として、アルギニン (Arg)、ヒスチジン (His)、イソロイシン (Ile)、ロイシン (Leu)、リジン (Lys)、メチオニン (Met)、フェニルアラニン (Phe)、スレオニン (Thr)、トリプトファン (Trp)、バリン (Val) の10種が知られている⁵⁷。飼料から摂取されたアミノ酸は、哺乳類と同様にニワトリにおいても腸管から吸収される。ニワトリの腸管には、数多くのアミノ酸輸送体が存在していることが明らかになっており⁵⁸、能動的あるいは受動的な機構を介して吸収される³²。ニワトリの腸管におけるアミノ酸吸収は、成長に伴う栄養素要求

量の変化に伴い変化する^{46,59}。ブロイラーでは、イミノ酸の一種であるプロリンの吸収が6週齢まで増加する⁴⁶。さらに、生後1日齢と比較して14日齢において、アミノ酸輸送体であるb^{0,+}AT、EAAT3、BoATの遺伝子発現量が増加する⁶⁰。またレイヤーでは、2日齢と比較して5および13週齢で、盲腸のL-プロリンの吸収が増加する⁶¹。しかしながら、これまでの腸管アミノ酸吸収の報告は、プロリンやロイシンといったアミノ酸単体での検討や⁶²、孵化前から孵化後にかけての調査が大半であり、孵化後から出荷齢時体重までの検討は行われていない。

そこで本章では、成長過程における腸管アミノ酸吸収の変化を検討することを目的とした。アミノ酸吸収の検討には、ニワトリの必須および非必須アミノ酸の中で、分岐鎖アミノ酸を含む酸性、塩基性、中性、酸アミド、ヒドロキシ、含硫、芳香族から各1種類ずつ、計10種類のアミノ酸を供試した⁶³。1週齢および5週齢のブロイラーを用いて、反転腸管法と短絡電流解析法による検討を行い、腸管の能動的なアミノ酸吸収を比較した。さらに、腸管上皮におけるアミノ酸輸送体の遺伝子発現量をPCR法により検討した。また、ブロイラーにおける反応が系統特異的であるかを検討するため、1および5週齢のレイヤーを用いて腸管アミノ酸吸収を検討した。

3-2 材料と方法

本実験における動物実験は、北里大学動物実験委員会の審査を経た後、学長の承認を得て実施された（承認番号：15-118）。

3-2-1 供試動物と飼育条件

1 週齢（ブロイラー：n=25，レイヤー：n=7）および 5 週齢（ブロイラー：n=25，レイヤー：n=7）のブロイラー系チャンキー種とレイヤー系ジュリア種を用いた。飼育環境は第二章と同様である。実験前に 1 週齢では 12 時間、5 週齢では 24 時間の絶食を行った。

3-2-2 反転腸管法によるアミノ酸吸収の検討

と殺および測定方法は、第二章と同様の方法で行った。粘膜側、漿膜側共に 10 種のアミノ酸（各 1 mM：L-アラニン（Ala），L-アスパラギン（Asn），L-グルタミン酸（Glu），L-リシン（Lys），L-ヒスチジン（His），L-グルタミン（Gln），L-セリン（Ser），L-メチオニン（Met），L-トリプトファン（Trp），グリシン（Gly））を KRB に溶解し、培養液として用いた。培養後に、粘膜および漿膜側の培養液を回収し、Lee の方法に基づき α -アミノ態窒素濃度を測定した⁶⁴。サンプルまたはスタンダード溶液（グリシン 36 mM，アスパラギン酸 36 mM）に対し 3 倍量の 5% トリクロロ酢酸を加え、除タンパクを行った。10,000×g、4℃で 10 分間の遠心を行い、上清を回収した。上清サンプルまたはスタンダード溶液量の 50 倍量の発色液（クエン酸 1 水和物 253 mM，ニンヒドリン 14 mM，アスコルビン酸 0.6 mM，メトキシエタノール 20%，pH5.6）を加えた。20 分間煮沸した後、氷上で 5 分間静置し、570 nm の波長で吸光度を測定した。

3-2-3 短絡電流解析法によるアミノ酸吸収および膜コンダクタンスの検討

と殺および測定方法は、第二章と同様の方法で行った。測定開始 10 分後に、短絡電流値 (I_{sc} (μA)) の安定を確認し、粘膜側にコントロール区として水、刺激区として 10 mM アミノ酸混合溶液 (各 1 mM : L-アラニン (Ala), L-アスパラギン (Asn), L-グルタミン酸 (Glu), L-リシン (Lys), L-ヒスチジン (His), L-グルタミン (Gln), L-セリン (Ser), L-メチオニン (Met), L-トリプトファン (Trp), グリシン (Gly)) を用い、粘膜側に添加し、 I_{sc} の経時的変化を測定した。

3-2-4 リアルタイム PCR によるアミノ酸吸収関連輸送体遺伝子発現量の測定

と殺および測定方法は第二章と同様の方法で行った。用いたプライマー、塩基配列、accession number、プロダクトサイズは表 1 に示した。

3-2-5 統計処理

すべての結果は平均値 \pm 標準誤差で表し、有意差は $p<0.05$ で示した。2 群間の比較は Welch's t-test を用いて解析した (SPSS, version 25, USA)。

3-3 結果

ブロイラーの腸管アミノ酸吸収の反転腸管による週齢間比較において、回腸遠位の漿膜側では、1週齢と比較して5週齢において有意に α -アミノ態窒素濃度が低かった(図16A, $p < 0.05$)。しかしながら、漿膜側/粘膜側の α -アミノ態窒素濃度比においては、両週齢間に有意な差は見られなかった(図16B)。

腸管アミノ酸吸収の短絡電流解析による週齢間比較において、ブロイラーおよびレイヤーの1週齢と5週齢で、粘膜側へ10 mM アミノ酸を添加すると I_{sc} が上昇した(図17, 18AB)。 ΔI_{sc} は、両系統において1週齢と比較して5週齢で有意に高かった(図17C, 18C, $p < 0.05$)。

アミノ酸吸収に関わる輸送体の遺伝子発現量の検討では、ブロイラーにおいて1週齢と比較して5週齢でASCT1、EAAT3、B⁰AT1、y+LAT1の発現量が有意に高かったが、ATB⁰⁺、b^{0,+}AT、rBAT、CAT1、CAT2では有意な差は見られなかった(図19, $p < 0.05$)。一方、レイヤーにおいては1週齢と比較して5週齢でASCT1、ATB⁰⁺、EAAT3、B⁰AT1、y+LAT1、b^{0,+}ATの発現量が有意に高かった(図20, $p < 0.05$)。

3-4 考察

哺乳類の腸管において、アミノ酸は主に能動的な輸送体を介して吸収される⁶⁵。レイヤーにおいても、空腸でL-プロリンが能動的な機構を介して吸収される⁶⁶。このことから、ブロイラーの腸管においても、主に能動的な機構を介してアミノ酸が吸収されていることが示唆される。反転腸管法によるアミノ酸吸収の比較で

は、粘膜側と漿膜側に 10 種類のアミノ酸（各 1 mM）を溶解した KRB を用い、能動的なアミノ酸吸収を検討した。1 週齢と比較して 5 週齢において、回腸遠位の漿膜側で有意に α -アミノ態窒素濃度が低かったが、漿膜側/粘膜側の α -アミノ態窒素濃度比は週齢間において有意な差は見られなかった。一方で、反転腸管法において最もアミノ酸吸収が高かった回腸遠位を用いて、能動的なアミノ酸吸収を短絡電流解析法によって検討したところ、1 週齢と比較して 5 週齢において短絡電流値 (I_{sc}) の増加量 (ΔI_{sc}) が有意に高かった。腸管におけるアミノ酸吸収は、輸送体によって吸収速度が異なる⁶⁷。短絡電流解析法による検討において、粘膜側に 10 mM アミノ酸溶液を添加した時の I_{sc} 上昇の経時変化は、1 週齢と比較して 5 週齢の方が迅速であった。また、アミノ酸吸収関連輸送体の遺伝子発現量については、1 週齢と比較して 5 週齢で、ASCT1、EAAT3、B⁰AT1、y+LAT1 が増加していた。このことから、5 週齢の腸管においては、アミノ酸吸収関連輸送体の増加が、アミノ酸吸収速度およびアミノ酸吸収量の増加に繋がっている可能性が示唆された。

さらに、系統間での比較を目的として、レイヤーを用いて同様の検討を行った。その結果、短絡電流解析法において、1 週齢と比較して 5 週齢の ΔI_{sc} が有意に高かった。また、遺伝子発現量の検討においても、1 週齢と比較して 5 週齢で ASCT1、ATB⁰⁺、EAAT3、B⁰AT1、y+LAT1、b⁰⁺AT の遺伝子発現量が増加していた。このことから、レイヤーにおいても、1 週齢と比較して 5 週齢で腸管の能動的なアミノ酸吸収が増加していることが示唆された。

以上の結果より、5週齢のブロイラーにおいては、1週齢と比較して能動的なアミノ酸吸収が増加し、その増加にはアミノ酸吸収関連輸送体の増加が関与している可能性が示唆された。また、レイヤーにおいても類似した結果が得られた。したがって、ブロイラーにおける能動的アミノ酸吸収においてはグルコース吸収で見られる様な成長に伴う低下は生じないこと、系統に関わらず腸管アミノ酸吸収は成長に伴い増加することが示された。

第四章

ブロイラーにおけるレプチンの腸管グルコース吸収抑制作用 およびその制御機構の解明

4-1 序

これまでの検討において、ブロイラーは系統特異的に成長過程で腸管のグルコース吸収が低下していることが明らかになった。現在ブロイラーの飼養現場では、糖質含量の高いとうもろこし主体の飼料を給与している。第二章の結果に基づけば、このことは、ブロイラーは成長過程において、飼料の利用効率が悪くなることを意味する。したがって、ブロイラーは成長過程において、エネルギー源の供給低下を補うために過食になると考えられる。実際、哺乳類においては、腸管からの十分なグルコース吸収が摂食行動を抑制することが報告されている⁶⁸。よって、ブロイラーの腸管における栄養素吸収を制御出来れば、前述した様な生産現場における諸問題を解決できる可能性がある。

以上のことから第四章では、ブロイラーの腸管における栄養素吸収制御因子を探索し、その作用および機序を検討することを目的とした。これまで、ニワトリの腸管で栄養素の吸収を制御する内因性因子については全く報告がない。このことから、はじめに腸管における栄養素吸収制御因子を探索することを目的として、マイクロアレイ解析による網羅的な解析を行った（データ未掲載）。その結果、哺乳類において摂食やエネルギー消費を制御して

いるホルモンであるレプチンの受容体が⁶⁹、ブロイラーの空腸遠位にも存在していることが明らかになった。

摂食調節ホルモンであるレプチンは、*ob gene* の転写産物であり、167のアミノ酸からなるペプチドで、哺乳類においては主に脂肪細胞、胎盤、胃から分泌される⁷⁰。脂肪細胞から分泌されるレプチンは、血液中に分泌され全身を循環し、摂食中枢である視床下部の受容体に作用することで摂食の抑制およびエネルギー消費の亢進、各臓器の受容体に作用することで代謝の制御を行っている⁶⁹。一方、胃から分泌されるレプチンは、摂食による食物流入の刺激で約30%が血液中に、約70%が管腔側に分泌される⁷¹。哺乳類において、管腔側のレプチンは腸管上皮のレプチン受容体に作用し、グルコースやアミノ酸の吸収を抑制することで、栄養素吸収を制御している^{72,73}。ブロイラーの腸管にレプチン受容体が存在することから、哺乳類と同様にレプチンが栄養素吸収を制御している可能性がある。

鳥類であるニワトリにおいて、レプチンの受容体は1992年にその存在が報告されたが⁷⁴、レプチンの遺伝子配列が決定したのはごく最近である⁷⁵。また、哺乳類の体脂肪率が平均20-30%であるのに対し、鳥類は飛翔のために身体を軽量化する必要があり、多くの種で体脂肪率が5%未満である。さらに、その脂肪組織におけるレプチンの発現量は極めて低い⁷⁵。このことから、鳥類におけるレプチンの作用や分泌部位は哺乳類と比較して大きく異なると考えられており、ニワトリにおいても未解明な点が多い。

よって本研究では、ブロイラーにおけるレプチンやレプチン受

容体の発現部位を明らかにし、腸管グルコース吸収への作用および作用機序の検討、成長過程での比較を行うことを目的とした。個体における、管腔レプチンの腸管グルコース吸収への作用を検討するために、レプチン経口投与後に経口グルコース負荷試験を行い、血中グルコース濃度の変動を比較した。また、レプチンおよび受容体発現部位を明らかにするために、脳、消化管をはじめとした各組織における発現を PCR 法、免疫染色法により検討した。さらに、腸管組織におけるレプチンのグルコース吸収への作用および作用機序を解析するため、短絡電流解析法を用いて、レプチン存在下で各細胞内シグナル因子活性化剤および阻害剤による能動的グルコース吸収への影響を検討した。最後に、成長過程でのレプチンのグルコース吸収への作用を検討した。

4-2 材料と方法

本実験における動物実験は、北里大学動物実験委員会の審査を経た後、学長の承認を得て実施された（承認番号：17-148）。

4-2-1 供試動物と飼育条件

1 週齢（n=279）および 5 週齢（n=12）のプロイラー系チャンキー種を用いた。飼育環境は第二、三章と同様である。実験前に 1 週齢では 12 時間、5 週齢では 24 時間の絶食を行った。

4-2-2 レプチン経口投与後の経口グルコース負荷試験

水（コントロール）または水に溶解した 1 M マウスレプチン（Sigma-Aldrich 株式会社，アメリカ）溶液を、1 mg/kg BW の投与量で嚔嚔に入るように胃ゾンデを用いて経口投与した。水またはレプチン溶液経口投与 5 分後に、2.5 M グルコース溶液を、2.0 g/kg BW の投与量で経口投与した。血中グルコース濃度の測定方法および時間は第二章の経口糖負荷試験と同様である。

4-2-3 PCR によるレプチン受容体 mRNA 発現部位の検討

と殺方法は、第二章と同様の方法で行った。開腹後、速やかに間脳、素嚔、腺胃（噴門部，胃体部，幽門部）、筋胃、腸管、肝臓、脂肪を採取した。腸管は、十二指腸、空腸近位、空腸遠位、回腸近位、回腸遠位、結腸に分け、スパーテルを用いて上皮と筋層を剥離した。各組織および腸管上皮を RNA レイター入りのチューブに投入し、実験に使用するまで -80℃ で保存した。製造業者の説明書に従い、RNAiso Plus を用いて採材した組織から Acid Guanidium-Phenol-Chloroform (AGPC) 法による RNA 抽出を行い、Nano Drop を用いて total RNA 濃度を測定した。500 ng の全 RNA から、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いてゲノム DNA の分解処理および逆転写を 37℃・5 分、37℃・15 分、50℃・5 分、98℃・5 分の反応条件で行った。逆転写後、全てのサンプルを滅菌水で 10 倍希釈した。GoTaq® Master Mixes（プロメガ株式会社，大阪）を酵素として、PCR をサーマルサイクラー（バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社，

アメリカ) により denature 95°C・2分、95°C・30秒、annealing 57°C・30秒、72°C・1分/1 kbp、extension 72°C・5分・35サイクルの反応条件で行った。反応後のサンプルを 2%アガロースゲルで電気泳動し、Chemidoc XRS (バイオ・ラッドラボラトリーズ株式会社, アメリカ) を用いて撮影を行った。

4-2-4 腸管上皮におけるレプチン受容体発現の組織学的検討

と殺方法は、第二章と同様の方法で行った。開腹後、組織を 4%パラホルムアルデヒド(PFA)に投入し、4°Cで一晩固定を行った。エタノール(80, 90, 95, 100%)の入ったビンに投入し、各 12時間ずつ段階的に脱水した。キシレンの入ったビンに投入し、3時間ごとに新しいものに交換した後、キシレンとパラフィンの混合溶液中に浸漬させ、60°Cのインキュベーターの中で一晩静置した。60°Cのインキュベーター内で 3時間ごとに新しいパラフィンに 3回交換し、パラフィン包埋を行った。ミクロトームにより切片を作製し、スライドガラスに載せた後、伸展機上で一晩静置した。脱パラフィン処理を行った切片を、流水で 5分洗浄後、賦活化試薬(Target Retrieval Solution, pH9, Dako 日本株式会社, 東京)の入ったドーズに投入し、120°Cで 10分間オートクレーブによる賦活化処理を行った。室温で 20分静置した後、PBS(137 mM NaCl, 38 mM NaH₂PO₄・2H₂O, 162 mM Na₂HPO₄・12H₂O)で洗浄し、PBS 100 mlにサポニン 0.1gを溶解した溶液内で 10分間静置した。PBSで 5分×4回洗浄後、過酸化水素:メタノール(1:9)の混合溶液で 10分間処理した。PBSで 5分×4回洗浄し、

ブロッキング試薬 G-Block (ジェノスタッフ株式会社, 東京) を滴下し、湿潤箱内、室温で 40 分静置した。1 次抗体 (Chicken leptin receptor モノクローナル抗体, 茨城大 大久保教授より分与) を抗体希釈用 PBS (225 mM NaCl, 38 mM NaH₂PO₄ · 2H₂O, 162 mM Na₂HPO₄ · 12H₂O) で 1/1000 の濃度に希釈したものを滴下し、4℃で一晩、湿潤箱内で静置した。翌日、PBS で 5 分×4 回洗浄し、2 次抗体 (ヒストファインシンプルステイン MAX-PO(M)、株式会社ニチレイバイオサイエンス, 東京) を滴下し、室温で 1 時間、湿潤箱内で静置した。その後、PBS で 5 分×4 回洗浄した。37℃に加温した Tris-HCl (0.05 M, pH7.6) で 3.3'-ジアミノベンシジン 4 塩酸塩 (0.25 mg/mL) (株式会社同仁化学研究所, 熊本) を溶解し、蒸留水で 6 倍希釈した過酸化水素 (終濃度: 5.9~6.0%) 溶液を 3.3'-ジアミノベンシジン溶液に加えた (過酸化水素としての終濃度: 0.00885~0.009%)。この溶液を滴下し、反応させた。反応後に蒸留水で 5 分洗浄し、ヘマトキシリンで 5 分間核染色を行い、15 分間流水で洗浄し、包埋を行った。

4-2-5 短絡電流解析法によるレプチンのグルコース吸収への作用の検討および細胞内シグナルの検討

と殺および測定方法は、第二章と同様の方法で行った。レプチンおよび活性化剤の検討では、粘膜側あるいは漿膜側の培養液に 10⁻¹⁰~10⁻⁸ M レプチン、SC79 (Akt 活性化剤, シグマアルドリッチジャパン合同会社, 東京)、AICAR (AMPK 活性化剤, アディポゲンライフサイエンス株式会社, アメリカ) を溶解し、測定を開

始した。阻害剤の検討では、AG490 (JAK2 阻害剤, 東京化成工業株式会社, 東京)、Stattic (STAT3 阻害剤, アブカム株式会社, イギリス)、LY294002 (PI3K 阻害剤, エルシーラボラトリーズ株式会社, アメリカ)、Wortmannin (PI3K 阻害剤, アディポゲンライフサイエンス株式会社, アメリカ)、Akti-1/2 (Akt 阻害剤, 東京化成工業株式会社, 東京)、AS42856 (FoxO1 阻害剤, Shanghai Haoyuan Chemexpress 株式会社, 上海)、CHIR99021 (GSK-3 阻害剤, ケイマンケミカル株式会社, アメリカ)、Rapamycin (mTOR 阻害剤, エルシーラボラトリーズ株式会社, アメリカ) を粘膜側の培養液に溶解し、測定開始 10 分後に粘膜側の培養液のみ各阻害剤および 10^{-9} M レプチンを溶解した培養液に置換した。各実験区において、10 分後に短絡電流値 (I_{sc} (μ A)) の安定を確認し、粘膜側に 10 mM D-グルコース溶液を添加し、 I_{sc} の経時的変化をモニタリングした。全ての実験区において、刺激 10 分後に、100 μ M の塩化カルバコールを漿膜側に添加し、Cl⁻分泌による I_{sc} の上昇を確認した。すべての I_{sc} の変化は、刺激直前の数値を規定値と定め、刺激後 10 分間の最大値から減算した値を ΔI_{sc} とし、チャンバーの開口面積 (0.5cm^2) で除算した ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)。

4-3 統計処理

すべての結果は平均値 \pm 標準誤差で表し、有意差は $p<0.05$ で示した。2 群間の比較は Welch's *t*-test を用いて解析し、3 群間以上の比較は Tukey's HSD を用いて解析した (SPSS, version 25, USA)。

4-4 結果

レプチン経口投与後の経口グルコース負荷試験では、コントロール区およびレプチン投与区ともに、経口グルコース投与後に血中グルコース濃度の上昇が観察された（図 21）。血中グルコース濃度は、両区において投与 20 分後でピークとなったが、コントロール区と比較してレプチン投与区で有意に低かった（図 21, $p<0.05$ ）。

PCR によるレプチン受容体遺伝子発現部位の検討では、間脳、嚙嚢、腺胃の噴門部、胃体部、幽門部、筋胃、十二指腸、空腸近位、空腸遠位、回腸近位、回腸遠位、結腸、肝臓、脂肪組織でレプチン受容体遺伝子の発現が観察された（図 22）。また、腸管上皮におけるレプチン受容体発現の組織学的な検討では、空腸遠位の絨毛に沿って、陰窩から頂端にかけて発現が認められた（図 23）。

短絡電流解析法を用いたレプチンのグルコース吸収への作用の検討および細胞内シグナルの検討では、粘膜側へ 10 mM グルコースを添加すると、すべての試験区で I_{sc} の上昇が観察された（図 24）。 ΔI_{sc} は、コントロール区と比較して粘膜側 10^{-9} M および 10^{-8} M、漿膜側 10^{-9} M レプチン添加培養区で有意に低下したが、粘膜側 10^{-10} M レプチン培養区では有意な差は見られなかった（図 24, $p<0.05$ ）。活性化剤による検討では、コントロールと比較して SC79 添加培養区において、 ΔI_{sc} が有意に低かったが（図 25, $p<0.05$ ）、AICAR 添加培養区では有意な差は見られなかった（図 26）。阻害剤による検討では、レプチン培養区、レプチン+

Stattic 添加培養区 (図 27, $p<0.05$)、レプチン + AS42856 添加培養区 (図 28, $p<0.05$)、レプチン + CHIR99021 添加培養区 (図 29, $p<0.05$) において、 ΔI_{sc} がコントロール区と比較して有意に低かったが、レプチン + AG490 添加培養区 (図 30)、レプチン + LY294002 添加培養区 (図 31)、レプチン + Wortmannin 添加培養区 (図 32)、レプチン + Akti-1/2 添加培養区 (図 33)、レプチン + Rapamycin 添加培養区では、コントロール区との間の ΔI_{sc} の差はなくなった (図 34)。

成長過程におけるレプチンのグルコース吸収への作用の検討では、1 週齢においてコントロールと比較して 10^{-9} M レプチン添加培養区で ΔI_{sc} が有意に低かったが、5 週齢ではコントロールと 10^{-9} M レプチン培養区間で有意な差は見られなかった (図 35, $p<0.05$)。

4-5 考察

レプチン経口投与後の経口グルコース負荷試験では、コントロールおよびレプチン投与区ともに、経口グルコース投与後に血中グルコース濃度が上昇したことから、腸管におけるグルコース吸収が確認された。また、その経時変化の挙動も同じであった。しかしながら、グルコース経口投与 20 分後のピーク値において、コントロール区と比較してレプチン投与区が有意に低かった。哺乳類において、管腔側のレプチンは、腸管からのグルコース吸収を抑制し、血中グルコース濃度の上昇を抑制する^{71,76}。したがって、ブロイラーにおいても、レプチンが腸管のグルコース吸収を

抑制する可能性が示唆された。経口投与したレプチンの作用部位を明らかにするため、PCR法を用いてレプチン受容体遺伝子の発現部位を調べたところ、解析した全ての組織においてレプチン受容体遺伝子の発現が確認された。よって、哺乳類と同様^{77,78}、ブロイラーにおいてもレプチン受容体が全身に広く存在していることが明らかとなった。また、腸管におけるレプチン受容体発現部位の免疫染色法による検討では、空腸遠位絨毛の陰窩から頂端に沿って発現が認められた。しかしながら、本検討に用いたレプチン受容体抗体は既報の配列で作成しているが、ブロッキングペプチドによる抗体の評価を行っていないため、今後抗体の評価を追加試験として行う必要がある。これらの結果より、哺乳類と同様にニワトリにおいても、レプチンが腸管上皮のレプチン受容体に作用し、グルコース吸収を制御している可能性が示唆された。

次に、腸管グルコース吸収に対するレプチンの作用について、腸管組織を用いて検討した。粘膜側への10 mMグルコース添加による短絡電流値の増加量(ΔI_{sc})は、コントロール区と比較して粘膜側の 10^{-9} M、 10^{-8} M、漿膜側の 10^{-9} Mレプチン培養区で有意に低かった。このことから哺乳類と同様にブロイラーにおいても、腸管管腔側および血管側のレプチンは、腸管グルコース吸収を抑制することが明らかになった。また本検討のレプチン濃度は、ラットの報告をもとに設定した⁷³。したがって、ブロイラーにおいても、哺乳類と同等のレプチン濃度で腸管のグルコース吸収が抑制されることが示唆された。次に、レプチンによるグルコース吸収抑制機序を解析した。過去の報告⁷⁹をもとに、レプチンにより

変動する細胞内シグナルの活性化剤および阻害剤を選択し、単独あるいはレプチンと共培養することによりグルコース吸収への作用を検討した。活性化剤による検討では、コントロールと比較して Akt 活性化剤である SC79 培養区において、発生した ΔI_{sc} が有意に低かった。このことから、Akt の活性化がレプチンのグルコース吸収抑制作用に関与していることが示唆された。また、阻害剤である Akti-1/2 においても、同様の結果が得られた。阻害剤の検討において、コントロール区と比較してレプチン培養区で有意に ΔI_{sc} が低かったのに対し、レプチン+AG490、+LY294002、+Wortmannin、+Rapamycin 共培養区では、コントロール区と比較して有意な差は見られなかった。これらの結果は、上記の阻害剤存在下では、レプチンのグルコース吸収抑制作用が見られなくなることを示す。以上の結果より、ブロイラーにおけるレプチンによる腸管グルコース吸収抑制には、細胞内シグナルである JAK2、PI3K、Akt、mTOR が関与していることが示唆された。哺乳類であるラットにおいては、腸管粘膜側のレプチンによるグルコース吸収抑制には、細胞内シグナル因子である PI3K と AKT が関与している^{76,80,81}。このことから、ブロイラーにおけるレプチンによる腸管グルコース吸収抑制時の細胞内シグナルは、哺乳類と類似している可能性が示唆された。

最後に、成長過程におけるレプチンの腸管グルコース吸収抑制作用の比較を検討した。1 週齢では、コントロール区と比較して 10^{-9} M レプチン培養区において ΔI_{sc} が有意に低かったが、5 週齢ではレプチンによる低下は見られなかった。このことから、ブロ

イラーの 5 週齢では、レプチン抵抗性により、レプチンによる腸管グルコース吸収抑制作用が減弱していることが推察された。哺乳類における代謝性疾患の多くでは、このレプチン抵抗性が要因となっている。レプチン抵抗性のメカニズムの一つとして、レプチン受容体発現の低下によるシグナル伝達の低下が報告されている⁸²。ブロイラーの脂肪組織におけるレプチン受容体の発現は、3 週齢と比較して 6 週齢で低下することから⁸³、腸管においてもレプチン受容体の発現が成長に伴って低下し、レプチンによる腸管グルコース吸収抑制作用が減弱する可能性がある。さらに、哺乳類において、胃のレプチンは、レプチン単独または胃酸による分解を免れるためにレプチン-レプチン受容体複合体として分泌される。複合体は、腸管において細胞内に取り込まれる際に一度分解された後、細胞内で再び会合し、血中に排出される⁷¹。肥満や高脂肪食摂取は血中のレプチン-レプチン受容体複合体を増加させ、レプチン作用を低下させると考えられている。しかしながら、胃のレプチン分泌は脂肪細胞と分泌動態が異なることや、複合体の測定系が確立されていないことから、その詳細は不明である。したがって、ブロイラーにおいても今後胃のレプチン分泌動態についても詳細に検討する必要がある。

以上の結果より、1 週齢のブロイラーの腸管においては、レプチンはその受容体を介して能動的グルコース吸収を抑制し、その抑制には細胞内シグナル因子である JAK2、PI3K、Akt、mTOR が関与していることが明らかになった。しかしながら、5 週齢ではレプチンによるグルコース吸収抑制作用が減弱していることが

示唆されたことから、ブロイラーの成長に伴う腸管グルコース吸収の低下に対する管腔内レプチンの関与については、今後さらなる検討が必要と考えられる。

第五章

総括

肉用鶏であるブロイラーは、品種改良により高い増体を持つ、産肉性に特化した系統である。その増体は、生後と比較して生後5週齢で約50倍、同週齢の採卵鶏であるレイヤーと比較しても約5倍にも及ぶ。一方で飼養現場においては、急激な増体に身体の生理機能の発達が追い付かず、原因不明の過食を要因とした飼料効率の低下や、脂質代謝異常による疾病の発生が深刻な問題となっている。このことからこの問題を解決するために、ブロイラーの成長過程に応じた適切な栄養素管理が必要である。栄養素は腸管から吸収されることで初めて生体内での利用が始まることから、成長段階における腸管での栄養素吸収制御機構を理解することは、上記の諸問題の解決に繋がると考えられる。しかしながら、ブロイラーの腸管における栄養素吸収制御を詳細に検討した報告はほとんどない。よって本研究では、ブロイラーにおける腸管栄養素吸収を理解するために、成長過程および系統間での腸管栄養素吸収の比較、さらに栄養素吸収制御因子を探索することを目的とした。

大きく次の3つの実験を行った。1つはブロイラーにおける成長に伴う腸管グルコース吸収の比較および形態学的解析（第二章）、次にブロイラーにおける成長に伴う腸管アミノ酸吸収の比較（第三章）、最後にブロイラーにおけるレプチンの腸管グルコー

ス吸収抑制作用およびその制御機構の解明（第四章）である。

第二章では、1週齢および5週齢のブロイラーを用いて、腸管グルコース吸収を比較検討した。はじめに、消化過程を加味した血中グルコース動態を検討するために、マルトースまたはグルコースを用いて経口負荷試験を行った。マルトースあるいはグルコース負荷後、両週齢共に血中グルコース濃度の上昇が観察された。しかしながら、1週齢と比較して5週齢の血中グルコース濃度の上昇は緩やかで、ピーク値に達する時間が遅延していた。また、基礎値までの回復時間も1週齢が早く、5週齢はより緩やかに低下した。AUCは両試験区において1週齢と比較して5週齢で有意に高かった。このことから、腸管を介したグルコース供給に対する血中グルコース濃度の反応は、加齢により異なることから、腸管全体でのグルコース吸収は5週齢の方が高いことが示唆された。血中グルコース濃度の経時変化が週齢間で異なる要因として、①腸管の形態学的な変化と②腸管のグルコース吸収の変化が関与していると考えられた。そこで、まず腸管の形態学的な解析を行った。1週齢と比較して5週齢において、腸管全体の長さ、および絨毛の長径、短径は、有意に拡大していたが、単位面積あたりの絨毛数は減少していた。さらに、腸管の通過速度を比較するため、エバンスブルーを溶解したグルコース溶液を経口投与し、投与後20分において腸管の染まった長さを測定した。メッケル憩室から染まった部位の先端までの距離に週齢間の差は見られなかった。ニワトリの腸管においては、メッケル憩室付近が最もグルコース吸収の高い部位であることから、この結果は、両週齢

で経口負荷 20 分後には、グルコース溶液が吸収部位に達していたことを示している。このことから腸管の形態学的な変化だけが経口糖負荷試験の結果に影響しているわけではないことが示唆された。腸管における実際のグルコース吸収を評価するため、反転腸管法を用いて検討を行った。その結果、1 週齢と比較して 5 週齢で、腸管のグルコース吸収が低下していた。また消化過程を検討するため、マルトース分解酵素であるマルターゼの活性を測定したところ、週齢間で差はなかった。次に、能動的グルコース吸収を評価するために、短絡電流解析法を用いて検討を行った。1 週齢と比較して 5 週齢において、空腸遠位における短絡電流値 (I_{sc}) の低下が観察された。このことから、1 週齢と比較して 5 週齢において、腸管のグルコース吸収が低下しており、その低下には消化過程は関与していないことが明らかとなった。腸管グルコース吸収は、腸管吸収上皮細胞に発現する $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ とナトリウム依存性グルコース輸送担体 1 (SGLT1) を介して細胞内に取り込まれる。取り込まれたグルコースはグルコース輸送担体 2 (GLUT2) を介して血液側に輸送される。さらに、血管側に輸送された Na^+ は、細胞間を経て再び粘膜側に輸送され、グルコース吸収に再利用される。そこで、両週齢の腸管グルコース吸収の違いを詳細に解明するため、これら輸送体およびイオン輸送の関与を短絡電流解析法により検討した。SGLT-1 阻害剤であるフロリジンを用いた検討では、1 週齢においてコントロール区と比較してフロリジン添加培養区で有意に I_{sc} の低下が観察されたのに対し、5 週齢ではフロリジン添加培養の影響は見られなかった。

Na⁺/K⁺-ATPase 阻害剤であるウアバイン存在下での検討では、1週齢および5週齢共に、コントロール区と比較してウアバイン添加培養区で有意に I_{sc} が低下していた。また、Na⁺イオンがグルコース吸収に及ぼす影響の検討では、1週齢において、NaCl培養区と比較して NMDG-Cl 培養区で有意に I_{sc} が低下していたのに対し、5週齢では両培養区間の差は見られなかった。さらに、イオン透過性指標である膜コンダクタンスを解析した。これを測定したすべての時間で、5週齢の膜コンダクタンスは1週齢のブローラーのそれより有意に低いことがわかった。以上の結果より、5週齢における能動的なグルコース吸収の低下には、SGLT-1の発現量およびイオン輸送の変化が関与している可能性が示された。遺伝子発現量の検討では、SGLT-1をはじめとしたグルコース吸収関連輸送体の遺伝子発現量に週齢間の差は無かった。一方で、細胞間接着因子である claudin5 の遺伝子発現量が1週齢と比較して5週齢で有意に増加していた。以上の結果より、ブローラーにおいては、成長に伴い腸管細胞間の密着が強化され、細胞間のイオン透過性が低下することによりグルコース吸収が低下する機序が示唆された。

さらに、成長に伴う腸管のグルコース吸収の低下が系統特異的であるかを検討するため、短絡電流解析法を用いてレイヤーとの比較を行った。1週齢において、ブローラーとレイヤーで I_{sc} に有意な差は見られなかったが、5週齢では、ブローラーと比較してレイヤーで I_{sc} が有意に高かった。このことから、成長に伴う腸管の能動的グルコース吸収の低下は、ブローラー特異的であること

が明らかになった。

第二章において、ブローラーは成長過程で腸管のグルコース吸収が低下することが明らかになった。このことから、低下したエネルギー源の獲得を他の栄養素吸収によって補っている可能性がある。第三章では、筋肉タンパク質の合成や糖新生の基質となるアミノ酸の吸収に着目し、検討を行った。

腸管組織におけるアミノ酸吸収について、反転腸管法および短絡電流解析法による解析を行った。反転腸管法において、5週齢における腸管アミノ酸吸収の低下は見られなかった。しかしながら短絡電流解析法では、1週齢と比較して5週齢の回腸遠位におけるアミノ酸刺激による I_{sc} の増加が高かったことから、5週齢では能動的アミノ酸吸収が増加していることが示唆された。腸管のアミノ酸吸収は、グルコースと同様、各種アミノ酸特異的輸送体を介した能動的機構で主に行われる。そこで、アミノ酸吸収関連輸送体遺伝子発現量を両週齢で比較検討したところ、1週齢と比較して5週齢の回腸遠位において、ASCT1、EAAT3、B⁰AT1、y⁺LAT1の発現量が増加していた。さらに系統間の比較では、短絡電流解析法において、1週齢と比較して5週齢のレイヤー回腸遠位で、有意に I_{sc} が高かった。また遺伝子発現量は、1週齢と比較して5週齢の回腸遠位で、ASCT1、ATB⁰⁺、EAAT3、B⁰AT1、y⁺LAT1、b⁰⁺ATの発現量が増加していた。以上の結果より、ブローラーの

腸管における能動的アミノ酸吸収能は、グルコースと異なり成長に伴い低下せず、むしろ高まることが明らかになった。

これまでの実験結果から、ブロイラーの腸管からのグルコース吸収能は成長に伴い低下し、アミノ酸吸収能は上昇することが示唆された。現在ブロイラーの飼養現場で用いられている穀物飼料は、糖質に富むトウモロコシが主体である。よって、現状の飼養形態では、ブロイラーは成長に伴い飼料中の栄養素を効率的に利用できなくなっていると推察される。このことから、成長に伴う腸管のグルコース吸収低下の要因を明らかにすることは、増体の制御や新たな飼料開発の糸口になると言える。そこではじめに、ブロイラーの腸管におけるグルコース吸収制御因子を探索することを目的として、マイクロアレイによる網羅的解析を行った。その結果、哺乳類において主に脂肪細胞や胃から分泌され、摂食、代謝、腸管の栄養素吸収を制御するホルモンであるレプチンの受容体がブロイラーの腸管にも発現していることが明らかとなった。哺乳類において、管腔のレプチンは腸管上皮のレプチン受容体に作用し、グルコースおよびアミノ酸吸収を抑制する。このことから、ブロイラーの成長に伴う腸管グルコース吸収の低下にレプチンが関与する可能性が示唆された。よって第四章では、レプチンによるグルコース吸収調節作用およびその制御機構を検討した。

レプチンのグルコース吸収へ与える影響を検討するために、1週齢のブロイラーを用いて、水（コントロール区）あるいはレプチン溶液（レプチン投与区）を経口投与し、その5分後にグルコ

ースを経口投与した時の血中グルコース濃度変化を測定した。コントロール区と比較してレプチン投与区において、グルコース投与 20 分後の血中グルコース濃度が有意に低かった。次に、レプチン受容体の存在部位を明らかにするために、組織学的な検討を行った。PCR 法による遺伝子解析において、1 週齢のブロイラーで、腸管を含めた測定部位全ての組織においてレプチン受容体の発現が認められた。さらに、腸管におけるレプチン受容体発現部位を検討するため免疫染色を行った。空腸遠位において、絨毛上皮に沿って陰窩から頂端部にかけて発現が認められた。このことからブロイラーにおいても、レプチンが腸管の栄養素吸収を制御している可能性が示唆された。腸管上皮のグルコース吸収に対するレプチンの作用を短絡電流解析法によって検討した。コントロール区と比較して粘膜側の 10^{-9}M 、 10^{-8}M 、漿膜側の 10^{-9}M レプチン培養区で有意に I_{sc} が低下したことから、レプチンが腸管上皮のレプチン受容体に直接作用することによってグルコース吸収が抑制されることが明らかとなった。さらに、その細胞内シグナル経路を明らかにするために、レプチンに関わる細胞内シグナル因子の阻害剤および活性化剤を用いて検討を行った。活性化剤では、コントロール区と比較して Akt 活性化剤培養区で有意に I_{sc} が低かった。また阻害剤では、レプチン培養区ではコントロール区と比較して有意に I_{sc} が低下したが、レプチンと JAK2、PI3K、Akt、mTOR の阻害剤との共培養区ではコントロール区との差がなくなった。これらの結果より、レプチンによるグルコース吸収抑制作用には JAK2、PI3K、Akt、mTOR が関与していることが

明らかになった。最後に、腸管グルコース吸収に対するレプチンの作用を成長過程で比較するため、1週齢および5週齢ブロイラーを用いて短絡電流解析法による検討を行った。1週齢において、コントロール区と比較してレプチン培養区で有意に I_{sc} が低かったのに対し、5週齢では差は見られなかった。このことから、ブロイラーでは成長に伴ってレプチンの腸管グルコース吸収への作用が減弱することが明らかになった。

以上の結果を踏まえると、ブロイラーは成長過程において、腸管や絨毛サイズの拡大、細胞間接着因子の遺伝子発現量の増加に伴う細胞間の密着強度の強化によるイオン透過性の低下を要因として、系統特異的に腸管における能動的なグルコース吸収が低下することが明らかになった。また一方で、アミノ酸吸収に関しては、成長に伴い大きく低下せず、むしろ高まることが明らかとなった。さらに、1週齢においては、管腔内のレプチンが腸管上皮のレプチン受容体に作用し、JAK2、PI3K、Akt、mTORを介してグルコース吸収を抑制するが、その作用は成長に伴って減弱することが示唆された。すなわち、ブロイラーの成長に伴う腸管グルコース吸収の低下に対する制御因子として、レプチンは関与していない可能性がある。管腔内レプチンの関与についてはさらなる検討が必要である。

謝辞

本研究を遂行し、学位論文をまとめるにあたり、多くの関係者の皆様にご助力いただきましたことを感謝申し上げます。黒瀬陽平教授には日常の議論を通じて多くの知識や研究に対する助言を頂きました。高橋辰行助教には丁寧な研究指導を頂きました。本研究室に配属されてからの6年間は授業の座学だけでは学ぶことのできない科学の面白さや、生物の興味深さに日々驚きの連続でした。本研究室のお二方に、心から感謝の気持ちと御礼を申し上げますさせていただきます。

短絡電流解析の実験では、山形大学学術研究院の小酒井貴晴教授に懇切丁寧なご指導をしていただき、本成果を提出することができました。貴重な時間を割いていただき、多大なる感謝の念が絶えません。

走査型電子顕微鏡を用いた絨毛解析では、本学野生動物学研究室の進藤順治教授、レプチン受容体発現部位の解析においてニワトリレプチン受容体抗体を分与していただいた茨城大学農学部の大久保武教授に深くお礼申し上げます。また、供試動物としてニワトリを提供してくださった株式会社プライフーズ様に感謝致します。

北里大学獣医学部の濱野美夫教授、有原圭三教授、久留主志朗教授、九州大学大学院農学研究院の古瀬充宏教授、学位論文審査委員を引き受けて下さり心より御礼申し上げます。本実験に協力

していただいた教員の皆様へ心から感謝の気持ちと御礼を申し上げます。ここに感謝の意を表します。

博士課程の在学期間中において、動物代謝機能学研究室の4年生や、卒業生の皆様のご協力に改めて御礼申し上げます。博士課程進学にあたり、経済的な援助、精神的なサポートをしてくれた家族に深く感謝致します。最後に、本実験に関わっていただいたすべての方々に改めて敬意と感謝を表し、皆様のますますのご活躍を心より願います。

参考文献

1 Fumihito A, Miyake T, Takada M, Shingu R, Endo T, Gojobori T, Kondo N, Ohno S. Monophyletic origin and unique dispersal patterns of domestic fowls. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Vol.93(13). 6792-6795. 1996.

2 前田 芳實. アジアおよび西南日本の家畜遺伝資源-保存と評価-. 熱帯農業研究. Vol.1(1). 26-31. 2008.

3 秋元 博一, 平岡 英一, 山田 博之. 3点法を用いた Richards growth model 当てはめによる土佐地鶏の体重成長の解析. 獣医畜産新報. Vol 48(8). 625-630. 1995.

4 Richards M, Poch S, Coon C, Rosebrough R, Ashwell C, Mcmurtry John. Expression of selected genes related to lipid metabolism in broiler breeder chickens. J Nutr. Vol.133(3). 707-715. 2003.

5 秋葉 征夫. 鶏肉品質に関する諸問題(6) (ブロイラーの脂肪蓄積の現状). 畜産の研究. Vol.44(3). 437-444. 1990.

6 Leenstra FR. Effect of age, sex, genotype and environment on fat deposition in broiler chickens—A review. World's Poult.

Sci. J. Vol.42(1). 12-25. 1986.

7 Julian RJ. Rapid growth problems: ascites and skeletal deformities in broilers. Poult Sci. Vol.77(12). 1773-1780. 1998.

8 Sanotra GS. Lund JD. Ersbøll AK. Petersen JS. Vestergaard KS. Monitoring leg problems in broilers: a survey of commercial broiler production in Denmark. World's Poult. Sci J. Vol.57(1). 55-69. 2001.

9 Vestergaard KS, Sanotra GS. Relationships between leg disorders and changes in the behaviour of broiler chickens. Vet. Rec. Vol.144(8). 205-209. 1999.

10 Zuidhof MJ, Schneider BL, Carney VL, Korver DR, Robinson FE. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. Poult Sci. Vol.93(12). 2970-2982. 2014.

11 Bishop CM. The maximum oxygen consumption and aerobic scope of birds and mammals: getting to the heart of the matter. Proc Biol Sci. Vol.266(1435). 2275-2281. 1999.

12 Gill FB, 2006, Physiology, Ornithology (3rd ed), 141-179, WH Freeman.

13 Ogunkoya YO, Cook RD. Histomorphology of the proventriculus of three species of Australian passerines: *Lichmera indistincta*, *Zosterops lateralis* and *Poephila guttata*. *Anat Histol Embryol*. Vol.38(4). 246-253. 2009.

14 Liman N, Alan E, Bayram GK. The differences between the localizations of MUC1, MUC5AC, MUC6 and osteopontin in quail proventriculus and gizzard may be a reflection of functional differences of stomach parts. *J. Anat*. Vol.217(1). 57-66. 2010.

15 Mueckler MM. The molecular biology of mammalian glucose transporters. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. Vol.1(1). 12-20. 1992.

16 山内高圓. 家禽の消化器. 獣医組織学. Vol.4. 288-295. 2008.

17 Martinez del Rio C, Stevens BR. Physiological constraint on feeding behavior: intestinal membrane disaccharidases of the starling. *Science*. Vol.243(4892). 794-796. 1989.

18 Napier KR, McWhorter TJ, Nicolson SW, Fleming PA. Sugar preferences of avian nectarivores are correlated with

intestinal sucrase activity. *Physiol Biochem Zool.* Vol.86(5). 499-514. 2013.

19 Siddons RC. Intestinal disaccharidase activities in the chick. *Biochem J.* Vol.112(1). 51-59. 1969.

20 Myrka AM, Welch KC Jr. Evidence of high transport and phosphorylation capacity for both glucose and fructose in the ruby-throated hummingbird (*Archilochus colubris*). *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* Vol.224. 253-261. 2017.

21 Kaminski NA, Wong EA. Differential mRNA expression of nutrient transporters in male and female chickens. *Poult Sci.* Vol.97(1). 313-318. 2018.

22 Douglas JL, Carlos MdR. It takes guts (and more) to eat fruit: Lessons from avian nutritional ecology. *Auk.* Vol.118(4). 819-831. 2001.

23 Dietschy JM, Turley SD, Spady DK. Role of liver in the maintenance of cholesterol and low density lipoprotein homeostasis in different animal species, including humans. *J Lipid Res.* Vol.34(10). 1637-1659. 1993.

24 Southgate DA. Digestion and metabolism of sugars. Am J Clin. Nutr. Vol.62(1). 203S-210S. 1995.

25 David MMD, Robert KCPHD, The digestion of carbohydrates in the small intestine. Am J Clin Nutr. Vol.12(3). 220-227. 1963.

26 Pajor AM, Wright EM. Cloning and functional expression of a mammalian Na⁺/nucleoside cotransporter. A member of the SGLT family. J Biol Chem. Vol.267(6). 3557-3560. 1992.

27 Ikari A. Regulatory mechanisms of intracellular distribution of Na⁺-dependent glucose transporter and the role in recovery from cellular injury. Yakugaku Zasshi. Vol.124(12). 959-964. 2004.

28 Shirazi-Beechey SP. Molecular biology of intestinal glucose transport. Nutr Res Rev. Vol.8(1). 27-41. 1995.

29 Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda J, Lin D, Fukumoto H, Seino S. Molecular biology of mammalian glucose transporters. Diabetes Care. Vol.13(3). 198-208. 1990.

30 Gal-Garber O, Mabjeesh SJ, Sklan D, Uni Z. Nutrient

transport in the small intestine: Na⁺,K⁺-ATPase expression and activity in the small intestine of the chicken as influenced by dietary sodium. *Poult Sci.* Vol.82(7). 1127-1133. 2003.

31 Garriga C, Barfull A, Planas JM. Kinetic characterization of apical D-fructose transport in chicken jejunum. *J Membr Biol.* Vol.197(1). 71-76. 2004.

32 Bröer S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev.* Vol.88(1). 249-286. 2008.

33 Hyde R, Taylor PM, Hundal HS. Amino acid transporters: roles in amino acid sensing and signalling in animal cells. *Biochem J.* Vol.373(Pt 1). 1-18. 2003.

34 Singh R, Kaushik S, Wang Y. Autophagy regulates lipid metabolism. *Nature.* Vol.458(7242). 1131-1135. 2009.

35 Phan CT, Tso P. Intestinal lipid absorption and transport. *Front Biosci.* Vol.6. 299-319. 2001.

36 Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* Vol.9(11). 799-809. 2009.

37 Günzel D, Fromm M. Claudins and other tight junction proteins. *Comp Physiol*. Vol.2(3). 1819-1852. 2012.

38 Shirazi-Beechey SP, Kemp RB, Dyer J, Beechey RB. Changes in the functions of the intestinal brush border membrane during the development of the ruminant habit in lambs. *Comp Biochem Physiol B*. Vol.94(4). 801-806. 1989.

39 Buddington RK, Diamond J. Ontogenetic development of nutrient transporters in cat intestine. *Am J Physiol*. Vol.263(5pt1). 605-616. 1992.

40 Vinardell P, Bolufer J. Age dependent changes on jejunal sugar absorption by rat in vivo. *Exp Gerontol*. Vol.19(2). 73-77. 1984.

41 Darmenton P, Raul F, Doffoel M, Wessely JY. Age influence on sucrose hydrolysis and on monosaccharide absorption along the small intestine of rat. *Mech Ageing Dev*. Vol.50(1). 49-55. 1989.

42 Kurokawa T, Hashida F, Kawabata S, Ishibashi S. Evidence for the regulation of small intestinal Na⁺/glucose cotransporter by insulin. *Biochem Mol Biol Int*. Vol.37(1). 33-

38. 1995.

43 Pennington AM, Corpe CP, Kellett GL. Rapid regulation of rat jejunal glucose transport by insulin in a luminally and vascularly perfused preparation. *J Physiol*. Vol.478(Pt 2). 187-193. 1994.

44 Lostao MP, Urdaneta E, Martínez-Ansó E, Barber A, Martínez JA. Presence of leptin receptors in rat small intestine and leptin effect on sugar absorption. *FEBS Lett*. Vol.423(3). 302-306. 1998.

45 Kuenzel WJ. Central neuroanatomical systems involved in the regulation of food intake in birds and mammals. *J Nutr*. Vol.124(8). 1355S-1370S. 1994.

46 Obst BS, Diamond J. Ontogenesis of intestinal nutrient transport in domestic chickens (*Gallus Gallus*) and its relation to growth. *Auk*. Vol.109(3). 451-464. 1992.

47 Barfull A, Garriga C, Mitjans M, Planas JM. Ontogenetic expression and regulation of Na(+)-D-glucose cotransporter in jejunum of domestic chicken. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. Vol.282(3). G559-564. 2002.

48 Willems E, Koppenol A, De Ketelaere B, Wang Y, Franssens L, Buyse J, Decuyper E, Everaert N. Effects of nutritional programming on growth and metabolism caused by albumen removal in an avian model. *J Endocrinol*. Vol.225(2). 89-100. 2015.

49 De Schepper HU, De Man JG, Van Nassauw L, Timmermans JP, Herman AG, Pelckmans PA, De Winter BY. Acute distal colitis impairs gastric emptying in rats via an extrinsic neuronal reflex pathway involving the pelvic nerve. *Gut*. Vol.56(2). 195-202. 2007.

50 Zhang B, Cao A, Zhou J, Hu Z, Wu D. Effect of jatrorrhizine on delayed gastrointestinal transit in rat postoperative ileus. *J Pharm Pharmacol*. Vol.64(3). 413-419. 2012.

51 Tokushima Y, Sulistiyanto B, Takahashi K, Akiba Y. Insulin-glucose interactions characterised in newly hatched broiler chicks. *Br Poult Sci*. Vol.44(5). 746-751. 2003.

52 Chotinsky D, Toncheva E, Profirov Y. Development of disaccharidase activity in the small intestine of broiler chickens. *Br Poult Sci*. Vol.42(3). 389-393. 2001.

53 Tamura A, Hayashi H, Imasato M, et al. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology*. Vol.140(3). 913-923. 2011.

54 Udall JN, Pang K, Fritze L, Kleinman R, Walker WA. Development of gastrointestinal mucosal barrier. I. The effect of age on intestinal permeability to macromolecules. *Pediatr Res*. Vol.15(3). 241-244. 1981.

55 Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschanffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke J-D. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. Vol.56(1). 61-72. 2007.

56 Ozden O, Black BL, Ashwell CM, Tipsmark CK, Borski RJ, Grubb BJ. Developmental profile of claudin-3, -5, and -16 proteins in the epithelium of chick intestine. *Anat Rec (Hoboken)*. Vol.293(7). 1175-1183. 2010.

57 石橋晃. 家禽のアミノ酸要求量. 日本家禽学会誌. Vol.27(1). 1-15. 1990.

58 Awad WA, Ascenbach JR, Ghareeb K, Khayal B, Hess C, Hess M. *Campylobacter jejuni* influences the expression of nutrient transporter genes in the intestine of chickens. *Vet Microbiol.* Vol.172(1-2). 195-201. 2014.

59 Ebrahimi R, Faseleh JM, Liang JB, Soleimani FA, Shokryazdan P, Idrus Z. Effect of dietary lead on intestinal nutrient transporters mRNA expression in broiler chickens. *Biomed Res Int.* Vol.2015. 1-8. 2015.

60 Gilbert ER, Li H, Emmerson DA, Webb KE Jr, Wong EA. Developmental regulation of nutrient transporter and enzyme mRNA abundance in the small intestine of broilers. *Poult Sci.* Vol.86(8). 1739-1753. 2007.

61 Moretó M, Amat C, Puchal A, Buddington RK, Planas JM. Transport of L-proline and alpha-methyl-D-glucoside by chicken proximal cecum during development. *Am J Physiol.* Vol.260(3 Pt 1). G457-463. 1991.

62 Gonzalez G, Vinardell MP. Research note: age-dependent changes in 3-oxy-methyl-D-glucose and leucine intestinal absorption in chickens. *Poult Sci.* Vol.71(9). 1556-1558. 1992.

- 63 唐澤豊. 動物の栄養. 文永堂出版株式会社. 初版. 10-11. 2001.
- 64 Lee YP, Takahashi T. An improved colorimetric determination of amino acids with the use of ninhydrin. *Anal Biochem.* Vol.14(1). 71-77. 1966.
- 65 Christensen HN. On the strategy of kinetic discrimination of amino acid transport systems. *J Membr Biol.* Vol.84(2). 97-103. 1985.
- 66 Awad WA, Rehman H, Böhm J, Razzazi-Fazeli E, Zentek J. Effects of luminal deoxynivalenol and L-proline on electrophysiological parameters in the jejunums of laying hens. *Poult Sci.* Vol.84(6). 928-932. 2005.
- 67 Frenhani PB, Burini RC. Mechanisms of absorption of amino acids and oligopeptides. Control and implications in human diet therapy. *Arg Gastroenterol.* Vol.36(4). 227-237. 1999.
- 68 Booth DA, Jarman SP. Inhibition of food intake in the rat following complete absorption of glucose delivered into the stomach, intestine or liver. *J Physiol.* Vol.259(2). 501-522. 1976.

69 Bendayan M, Cammisotto. Control of food intake and body weight through oral administration of leptin. *Austin J Endocrinol Diabetes*. Vol.3(3). 1049. 2016.

70 Zhang Y, Prienca R, Maffei M, Barone M, Leopold L, Friedman JM. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*. Vol.372(6505). 425-432. 1994.

71 Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, Moizo L, Lehy T, Guerre-Millo M, Le Marchand-Brustel Y, Lewin MJ. The stomach is a source of leptin. *Nature*. Vol.394(6695). 790-793. 1998.

72 Barrenetxe J, Villaro AC, Guembe L, Pascual I, Muñoz-Navas M, Barber A, Lostao MP. Distribution of the long leptin receptor isoform in brush border, basolateral membrane, and cytoplasm of enterocytes. *Gut*. Vol.50(6). 797-802. 2002.

73 Ducroc R, Guilmeau S, Akasbi K, Devaud H, Buyse M, Bado A. Luminal leptin induces rapid inhibition of active intestinal absorption of glucose mediated by sodium-glucose cotransporter 1. *Diabetes*. Vol.54(2). 348-354. 2005.

74 Tanaka M, Maeda K, Okubo T, Nakashima K. Double antenna structure of chicken prolactin receptor deduced from the cDNA sequence. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol.188(2). 490-496. 1992.

75 Seroussi E, Cinnamon Y, Yosefi S, Genin O, Smith JG, Rafati N, Bornelöv S, Andersson L, Friedman-Einat. Identification of the long-sought leptin in chicken and duck: expression pattern of the highly GC-rich avian leptin fits an autocrine/paracrine rather than endocrine function. *Endocrinol*. Vol.157(2). 737-751. 2016.

76 Iñigo C, Patel N, Kellett GL, Barber A, Lostao MP. Luminal leptin inhibits intestinal sugar absorption in vivo. *Acta Physiol (Oxf)*. Vol.190(4). 303-310. 2007.

77 Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J, Muir C, Sanker S, Moriarty A, Moore KJ, Smutko JS, Mays GG, Wool EA, Monroe CA, Tepper RI. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell*. Vol.83(7). 1263-1271. 1995.

78 Lin J, Barb CR, Matteri RL, Kraeling RR, Chen X,

Meinersmann RJ, Rampacek GB. Long form leptin receptor mRNA expression in the brain, pituitary, and other tissues in the pig. *Domest Anim Endocrinol*. Vol.19(1). 53-61. 2000.

79 Park HK, Ahima RS. Leptin signaling. *F1000Prime Rep*. Vol.6(73). 1-8. 2014.

80 El-Zein O, Kreydiyyeh SI. Leptin inhibits glucose intestinal absorption via PKC, p38MAPK, PI3K and MEK/ERK. *Plos One*. Vol.8(12). 1-9. 2013.

81 Rasmussen BA, Breen DM, Duca FA, Côté CD, Zadeh-Tahmasebi M, Filippi BM, Lam TK. Jejunal leptin-PI3K signaling lowers glucose production. *Cell Metab*. Vol.19(1). 155-161. 2014.

82 Gruzdeva O, Borodkina D, Uchasova E, Dyleva Y, Barbarash O. Leptin resistance: underlying mechanisms and diagnosis. *Diabetes Metab Syndr Obes*. Vol.12. 191-198. 2019.

83 Hausman GJ, Barb CR, Fairchild BD, Gamble J, Lee-Rutherford L. Expression of genes for interleukins, neuropeptides, growth hormone receptor, and leptin receptor in adipose tissue from growing broiler chickens. *Domest Anim*

Endocrinol. Vol.43(3). 260-263. 2012.

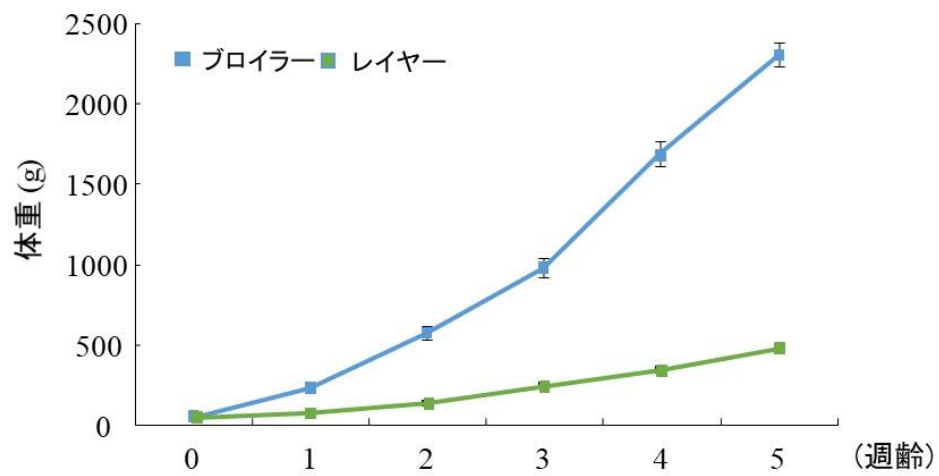
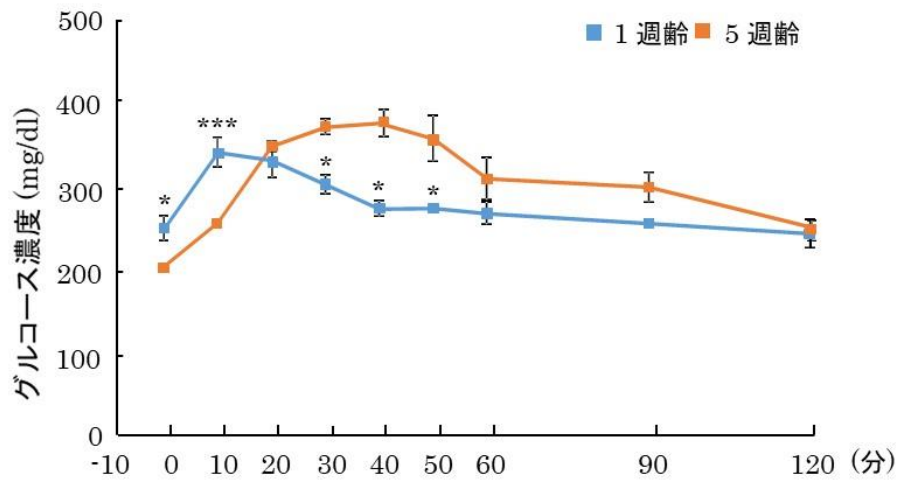


図 1 ブロイラーおよびレイヤーにおける体重の推移。

ブロイラー (■) およびレイヤー (■) の各週齢における体重を測定した。数値は平均値±標準誤差 (各系統 n=28-164) とした。

(A)



(B)

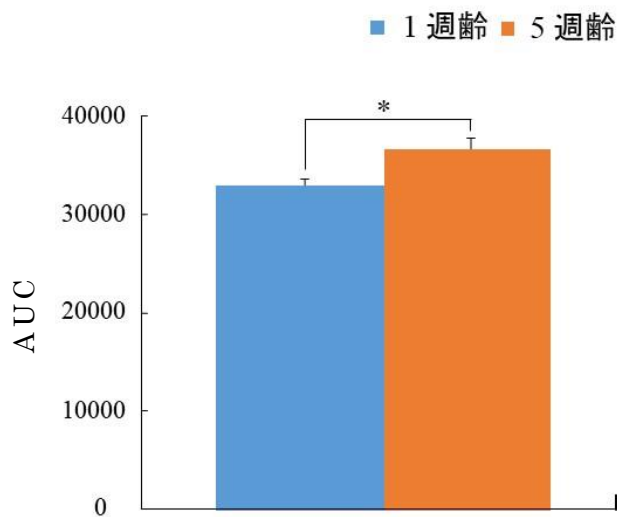


図2 1週齢 (■) および5週齢ブロイラー (■) における経口マルトース負荷試験.

1週齢 (n=7) および5週齢 (n=7) のブロイラーを用いて (A) 2.5M マルトース (2.0 g/kg) を経口投与した後の血中グルコース濃度の経時変化および (B) AUC を測定した。数値は平均値±標準誤差とした。*は $p < 0.05$ 、***は $p < 0.001$ を示す。

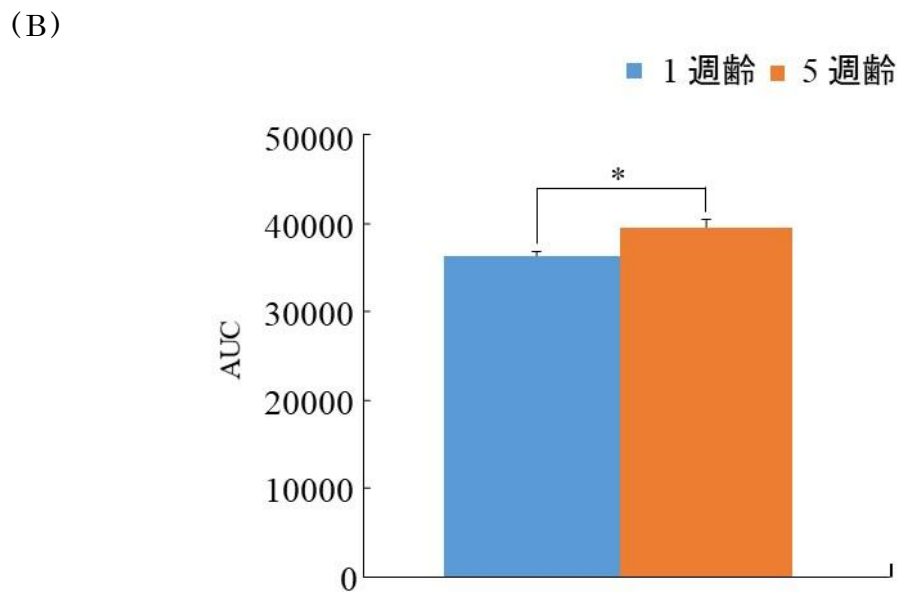
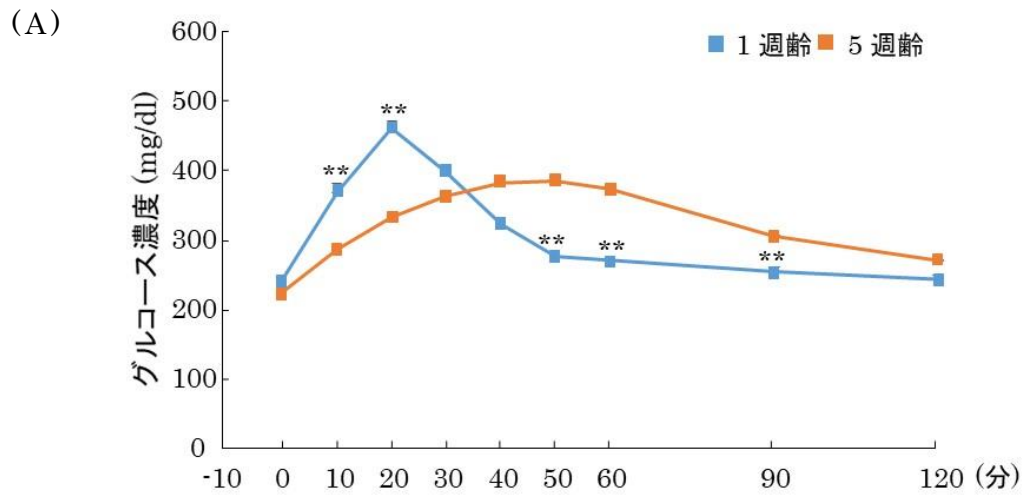


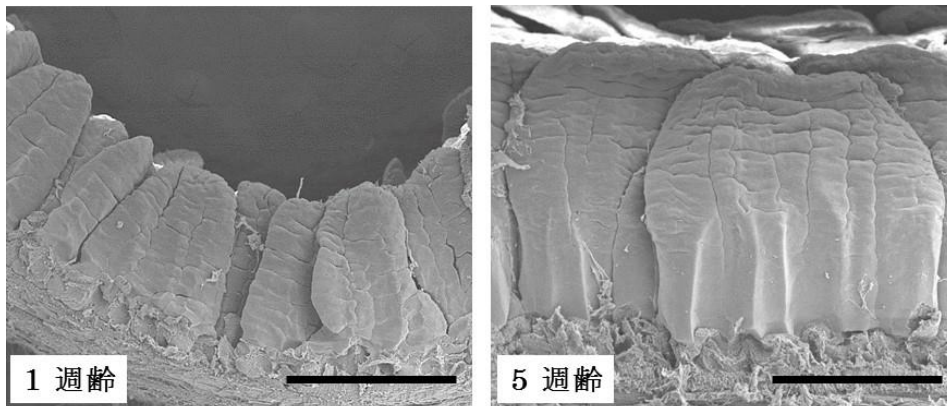
図3 1週齢（■）および5週齢ブロイラー（■）における経口グルコース負荷試験。

1週齢（ $n=7$ ）および5週齢（ $n=8$ ）のブロイラーを用いて（A）2.0Mグルコース（2.0 g/kg）を経口投与した後の血中グルコース濃度の経時変化および（B）AUCを測定した。数値は平均値±標準誤差とした。*は $p<0.05$ 、**は $p<0.01$ を示す。

(A)



(B)



(C)

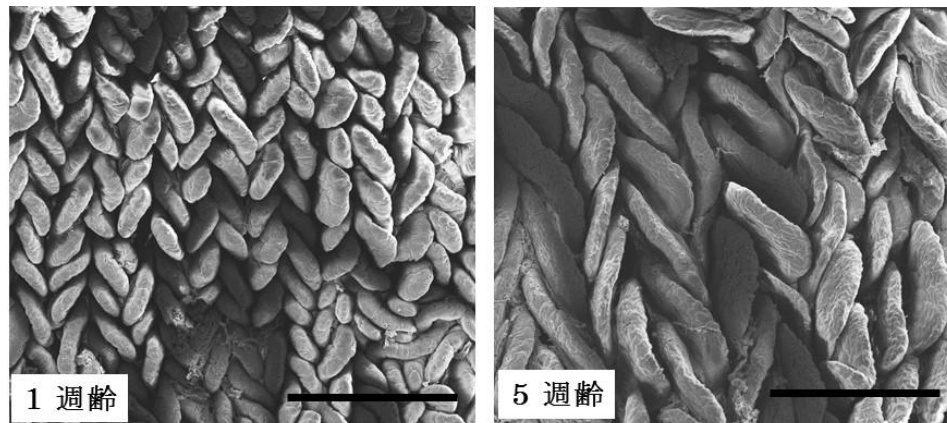


図 4 1 週齡および 5 週齡ブロイラーの腸管の長さおよび絨毛サイズと比較。

1 週齡 (n=20) および 5 週齡 (n=18) ブロイラーを用いた。(A)

胃から結腸までの腸管の長さ（上：1週齢，下：5週齢，スケール：10 cm）、（B）絨毛の環状面（左：1週齢，右：5週齢，スケール：500 μm ）、（C）横断面（左：1週齢，右：5週齢，スケール：500 μm ）を示す。

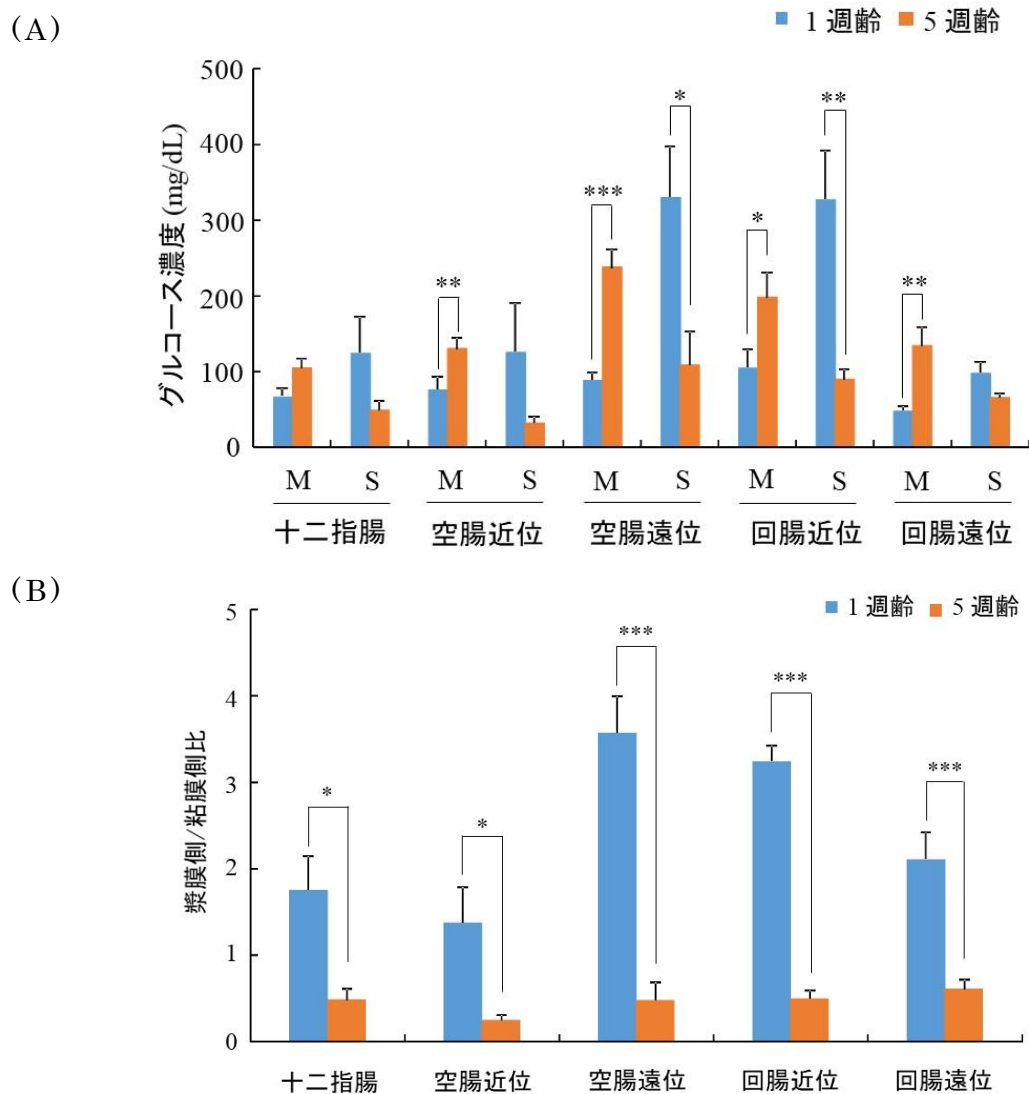


図 5 1 週齢 (■) および 5 週齢 (■) ブロイラーの腸管におけるグルコース吸収の比較。

1 週齢 (n=8) および 5 週齢 (n=7) のブロイラー腸管における (A) 25 mM マルトース培養液を用いた時のグルコース吸収を反転腸管法により検討した。(A) M (粘膜側): 25 mM マルトース含有 KRB 溶液、S (漿膜側): KRB 溶液を用いた。(B) 漿膜側/粘膜側のグルコース濃度比を示した。数値は平均値±標準誤差とした。異符号間は $p < 0.05$ を示す。

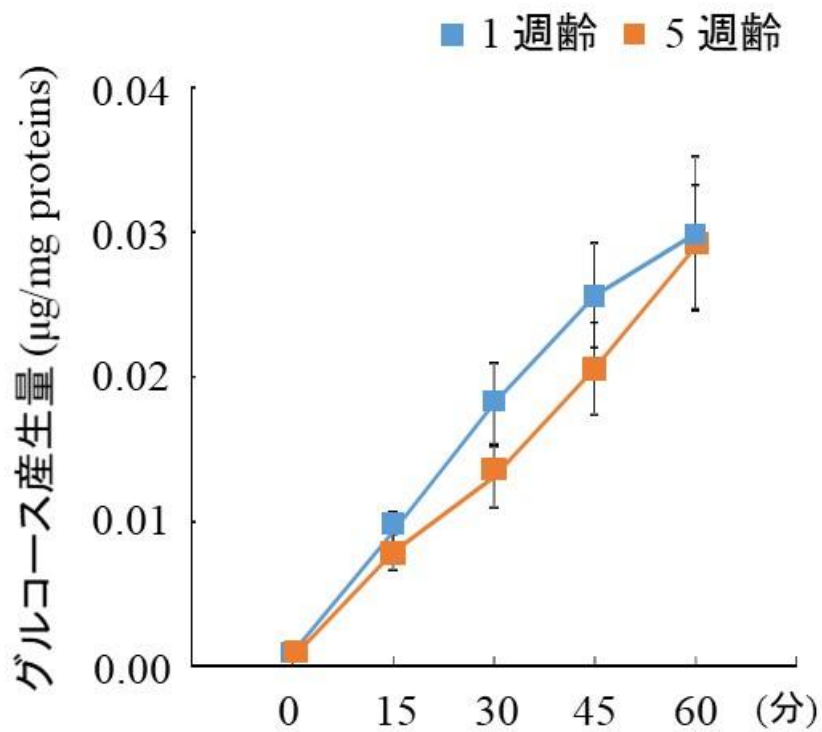
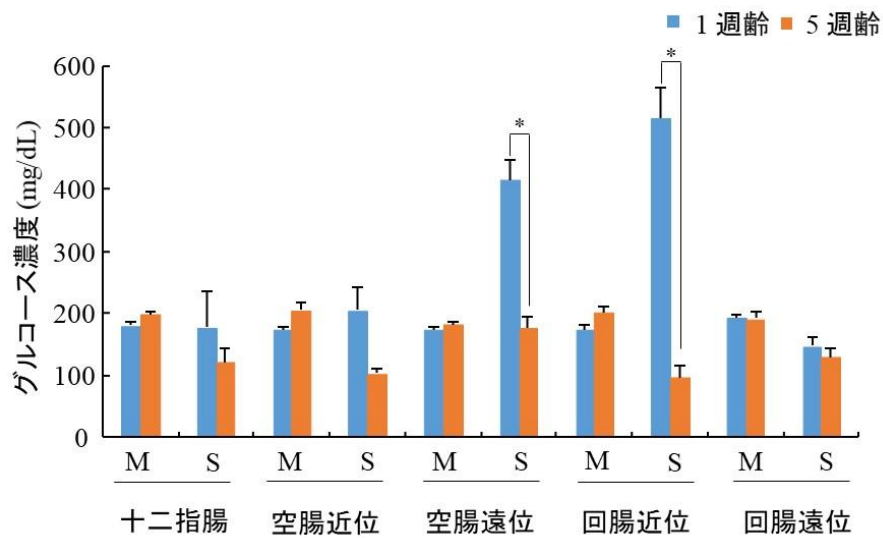


図 6 1 週齢 (■) および 5 週齢 (■) ブロイラーにおける腸管マルターゼ活性の比較。

1 週齢 (n=5) および 5 週齢 (n=4) のブロイラーにおける腸管マルターゼ活性を経時的なグルコース生成量で比較した。数値は平均値±標準誤差とした。

(A)



(B)

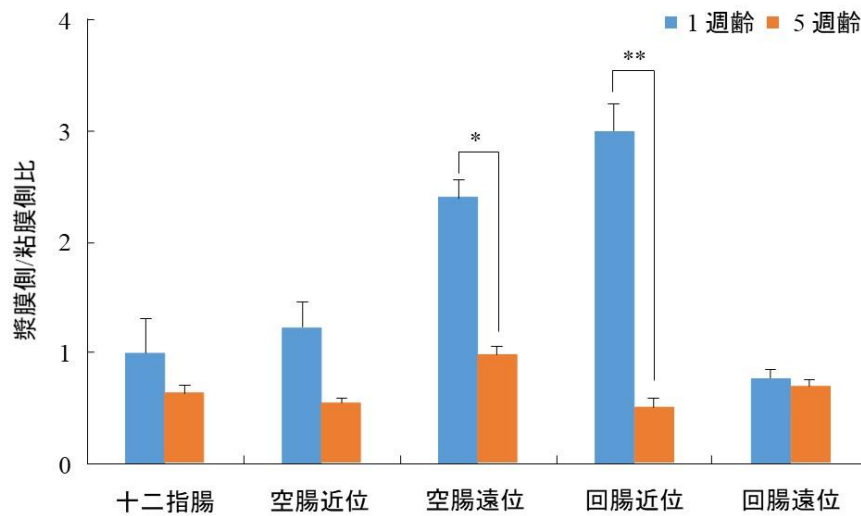


図 7 1 週齢 (■) および 5 週齢 (■) ブロイラーの腸管におけるグルコース吸収の比較.

1 週齢 (n=10) および 5 週齢 (n=7) のブロイラー腸管における (A) 10 mM グルコース培養液を用いた時のグルコース吸収を反転腸管法により検討した。(A) M (粘膜側): 10 mM グルコース含有 KRB 溶液, S (漿膜側): 10 mM グルコース含有 KRB 溶液を用いた。(B) 漿膜側/粘膜側のグルコース濃度比を示した。数値は平均値±標準誤差とした。*は $p<0.05$ 、**は $p<0.01$ を示す。

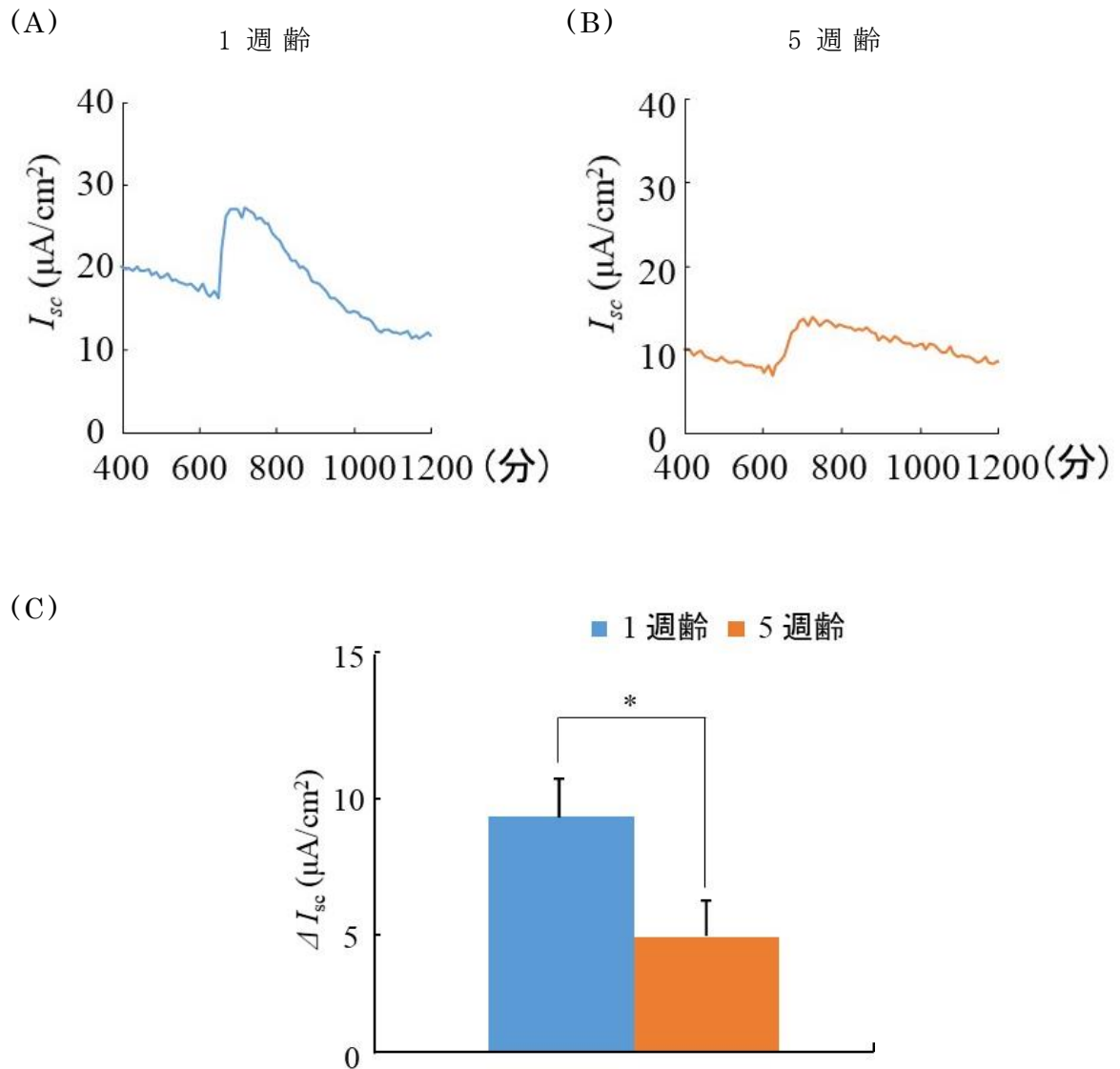


図 8 1 週齢および 5 週齢ブロイラーにおける腸管マルトース吸収の比較.

短絡電流解析を用いて、(A) 1 週齢 ($n=8$) および (B) 5 週齢 ($n=7$) ブロイラーの空腸遠位における、10 mM マルトース添加 (粘膜側) 時の短絡電流値の経時的変化、(C) 10 mM マルトース添加 (粘膜側) による短絡電流値の増加量 (ΔI_{sc}) を評価した。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。*は $p < 0.05$ を示す。

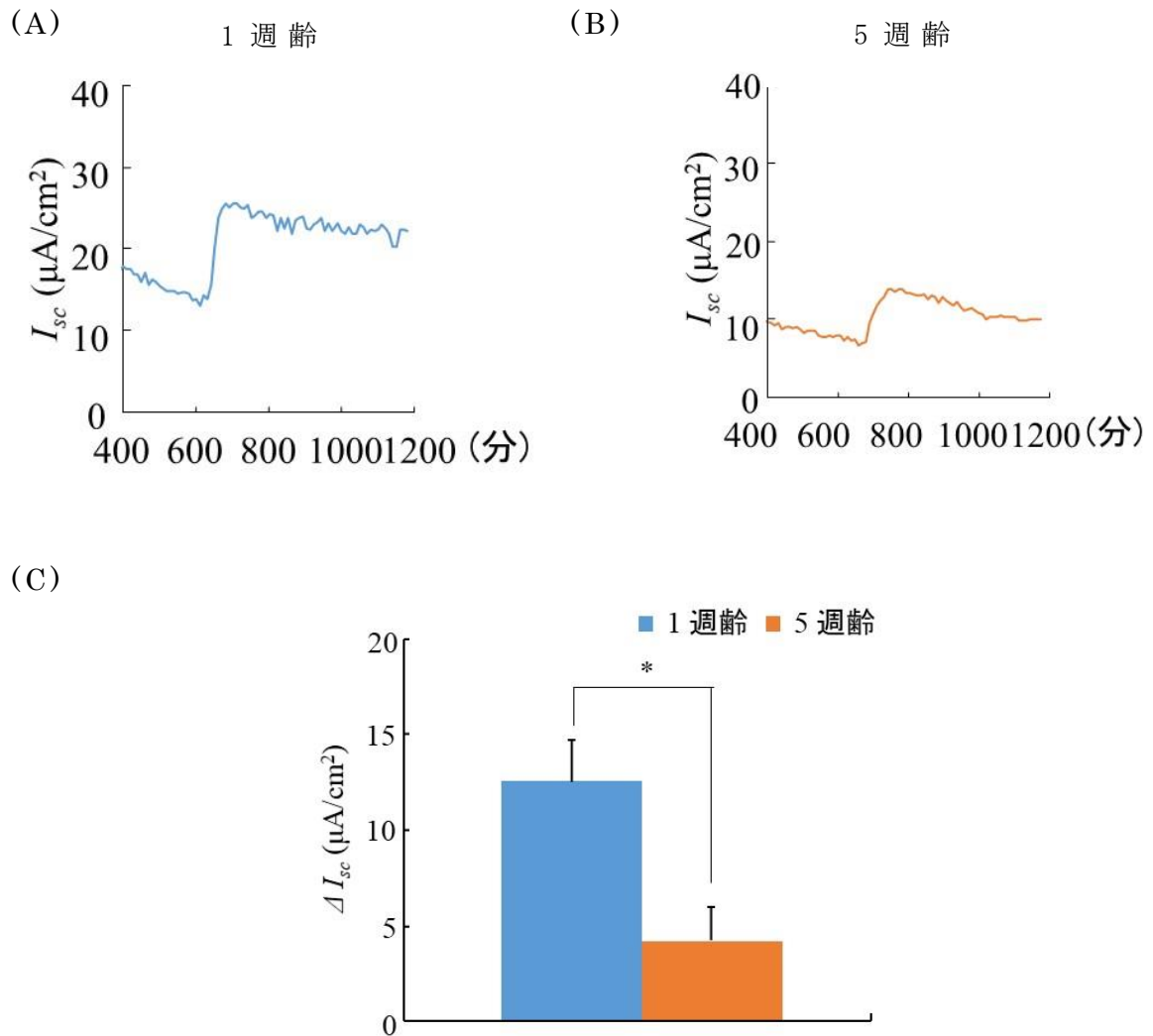


図 9 1 週齢および 5 週齢ブロイラーにおける腸管グルコース吸収の比較.

短絡電流解析を用いて、(A) 1 週齢 ($n=10$) および (B) 5 週齢 ($n=8$) ブロイラーの空腸遠位における、10 mM グルコース添加 (粘膜側) 時の短絡電流値の経時的変化、(C) 10 mM グルコース添加 (粘膜側) による短絡電流値の増加量 (ΔI_{sc}) を評価した。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。* は $p < 0.05$ を示す。

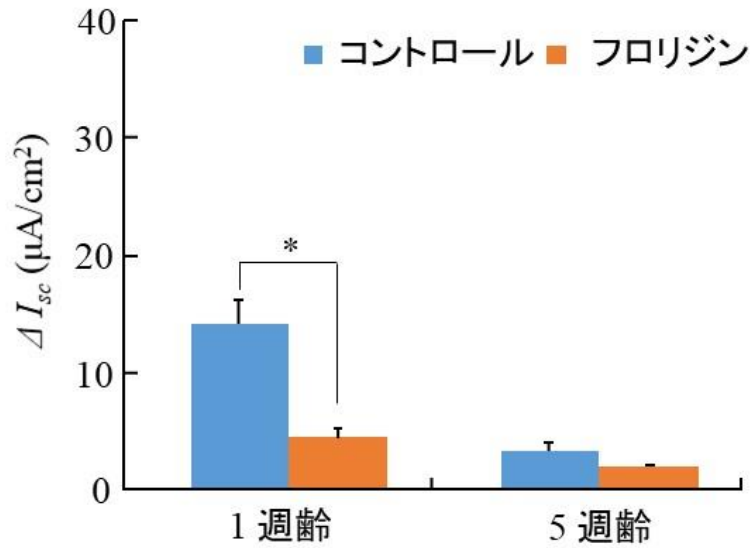


図 10 1 週齢および 5 週齢ブロイラーにおけるフロリジン阻害時の腸管グルコース吸収の比較。

短絡電流解析を用いて、1 週齢 (n=5) および 5 週齢 (n=5) ブロイラーの空腸遠位における、フロリジン添加培養 (粘膜側) 時の 10 mM グルコース添加 (粘膜側) による短絡電流値の増加量 (ΔI_{sc}) を評価した。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。*は $p < 0.05$ を示す。

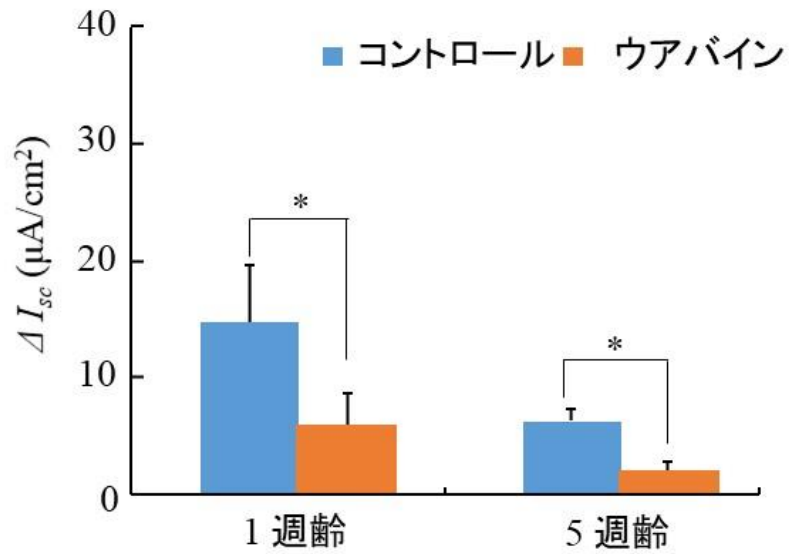


図 11 1 週齢および 5 週齢ブロイラーにおけるウアバイン阻害時の腸管グルコース吸収の比較。

短絡電流解析を用いて、1 週齢 (n=5) および 5 週齢 (n=5) ブロイラーの空腸遠位における、ウアバイン添加培養 (漿膜側) 時の 10 mM グルコース添加 (粘膜側) による短絡電流値の増加量 (ΔI_{sc}) を評価した。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。*は $p < 0.05$ を示す。

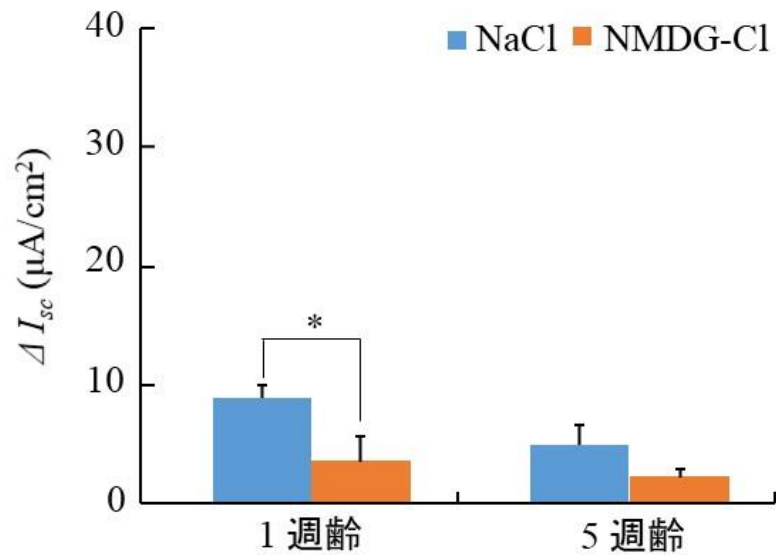


図 12 1 週齢および 5 週齢ブロイラーにおける Na^+ 存在下、非存在 (NMDG-Cl) 下での腸管グルコース吸収の比較。

短絡電流解析を用いて、1 週齢 (n=5) および 5 週齢 (n=5) ブロイラーの空腸遠位における、10 mM グルコース添加 (粘膜側) 後に 10 mM NaCl あるいは 10 mM NMDG-Cl 添加による短絡電流値の増加量 (ΔI_{sc}) を評価した。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。

*は $p < 0.05$ を示す。

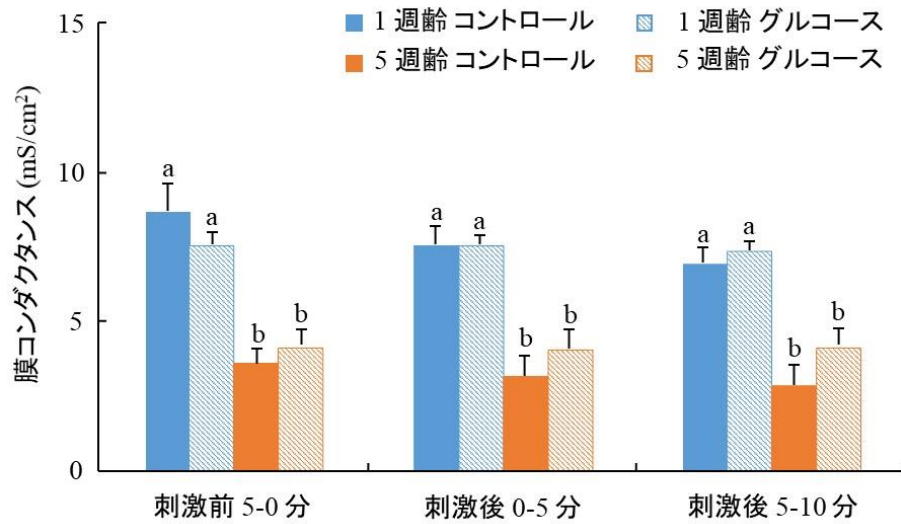


図 13 1 週齢および 5 週齢ブロイラーにおける膜コンダクタンスの比較。

短絡電流解析を用いて、1 週齢 (n=10) および 5 週齢 (n=8) ブロイラーの空腸遠位における、10 mM グルコース添加前 (-5-0 分)、添加後 (0-5 分)、添加後 (5-10 分) における膜コンダクタンスを解析した。数値は平均値±標準誤差とした。異符号間は $p<0.05$ を示す。

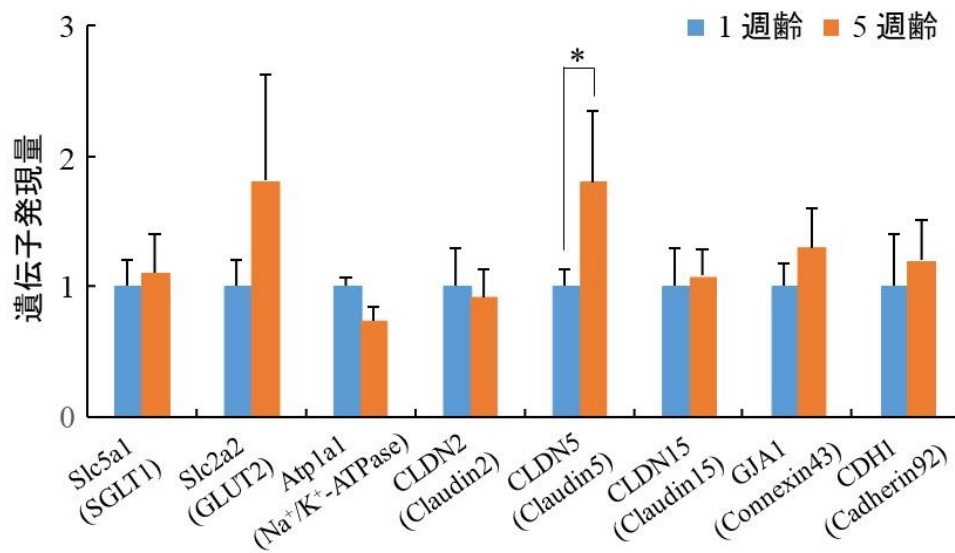
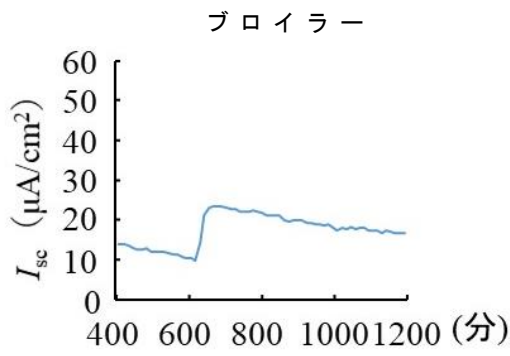


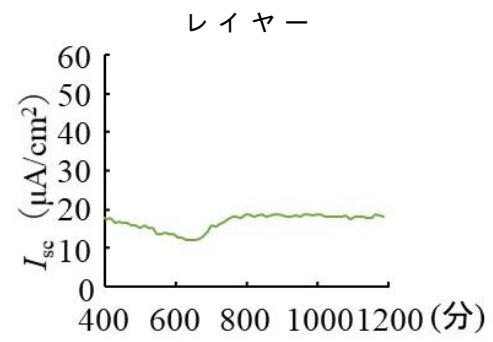
図 14 1 週齢 (■) および 5 週齢 (■) ブロイラーにおけるグルコース吸収関連因子および細胞間接着因子の遺伝子発現量の比較。

1 週齢 (n=5) および 5 週齢 (n=5) ブロイラーの空腸遠位におけるグルコース吸収関連因子および細胞間接着因子の遺伝子発現量をリアルタイム PCR によって解析した。数値は平均値±標準誤差とした。*は $p<0.05$ を示す。

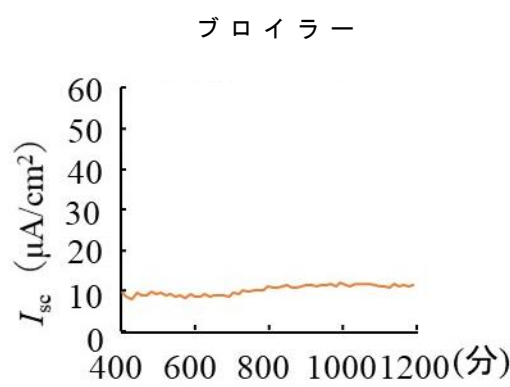
(A)



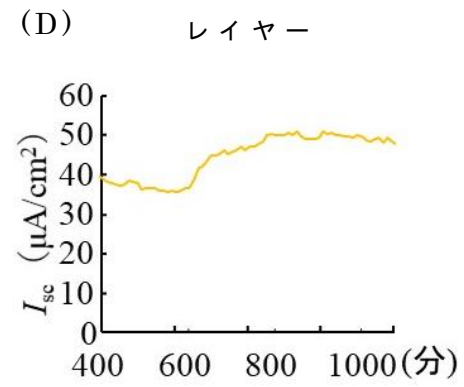
(B)



(C)



(D)



(E)

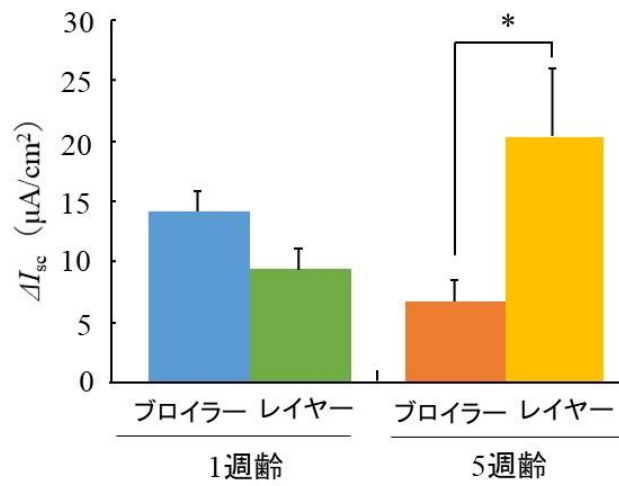
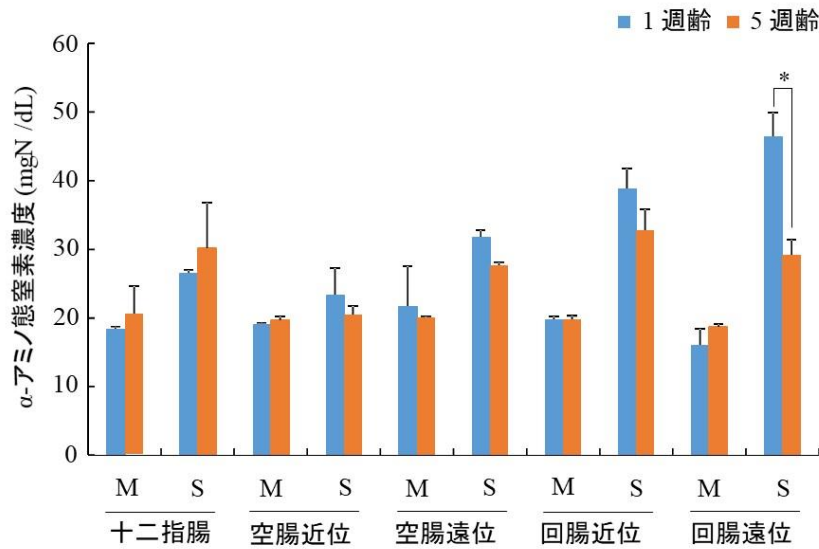


図 15 1 週齢 (■)、5 週齢 (■) ブロイラーおよび 1 週齢 (■)、5 週齢 (■) レイヤーの空腸遠位におけるグルコース吸収の比較。
(A) 1 週齢 (n=14)、(B) 5 週齢 (n=6) ブロイラーおよび (C) 1 週齢 (n=6)、(D) 5 週齢 (n=8) レイヤー空腸遠位において、10 mM グルコース添加 (粘膜側) 時の短絡電流値の経時的変化、(E) 10 mM グルコース添加 (粘膜側) による短絡電流値の増加量 (ΔI_{sc}) を評価した。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。* は $p < 0.05$ を示す。

(A)



(B)

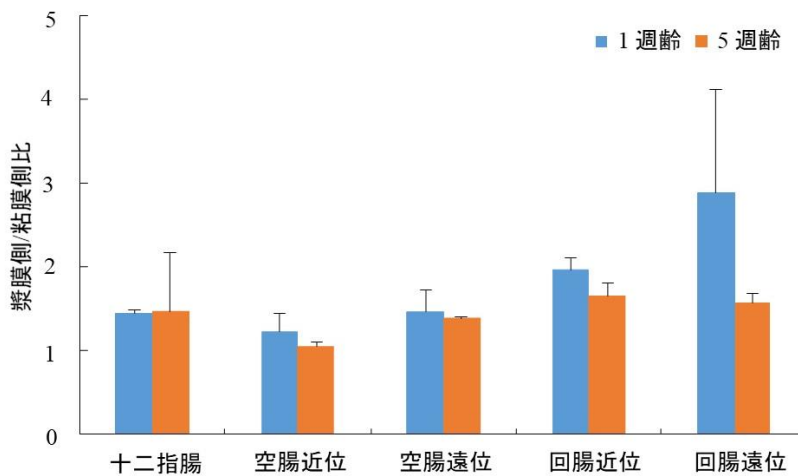


図 16 1 週齢 (■) および 5 週齢 (■) ブロイラーの腸管におけるアミノ酸吸収の比較。

1 週齢 (n=3-6) および 5 週齢 (n=3-6) のブロイラー腸管における (A) 10 mM アミノ酸培養液を用いた時のアミノ酸吸収を反転腸管法により検討した。(A) M (粘膜側): 10 mM アミノ酸含有 KRB 溶液, S (漿膜側): 10 mM アミノ酸含有 KRB 溶液を用いた。(B) 漿膜側/粘膜側のアミノ酸濃度比を示した。数値は平均値 ± 標準誤差とした。*は $p < 0.05$ を示す。

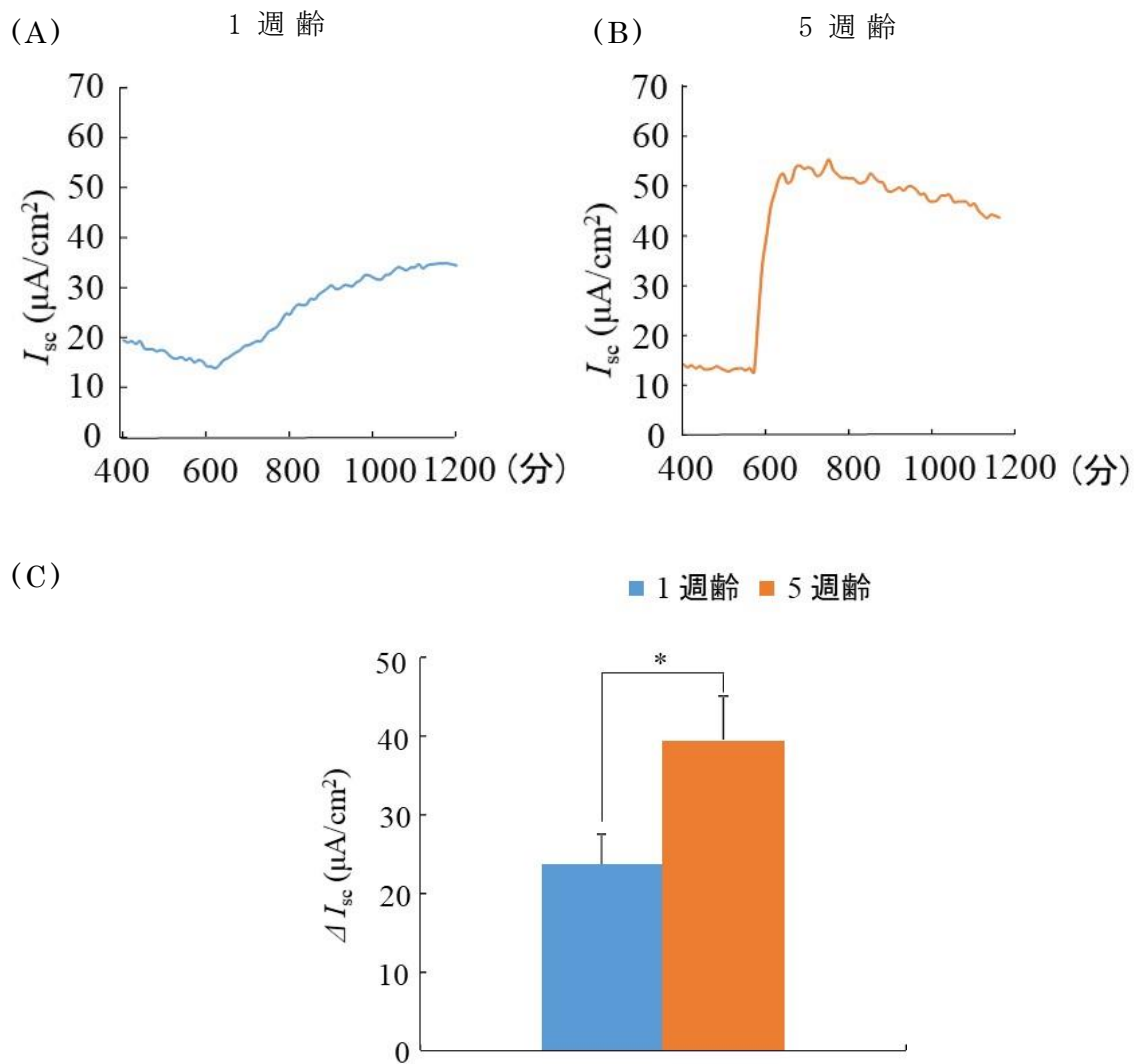


図 17 1 週齢 (■) および 5 週齢 (■) ブロイラーの回腸遠位におけるアミノ酸吸収の比較。

(A) 1 週齢 ($n=6$) および (B) 5 週齢 ($n=6$) ブロイラー回腸遠位において、10 mM アミノ酸溶液添加 (粘膜側) 時の短絡電流値の経時的変化、(C) 10 mM アミノ酸溶液添加 (粘膜側) による短絡電流値の増加量 (ΔI_{sc}) を評価した。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。*は $p < 0.05$ を示す。

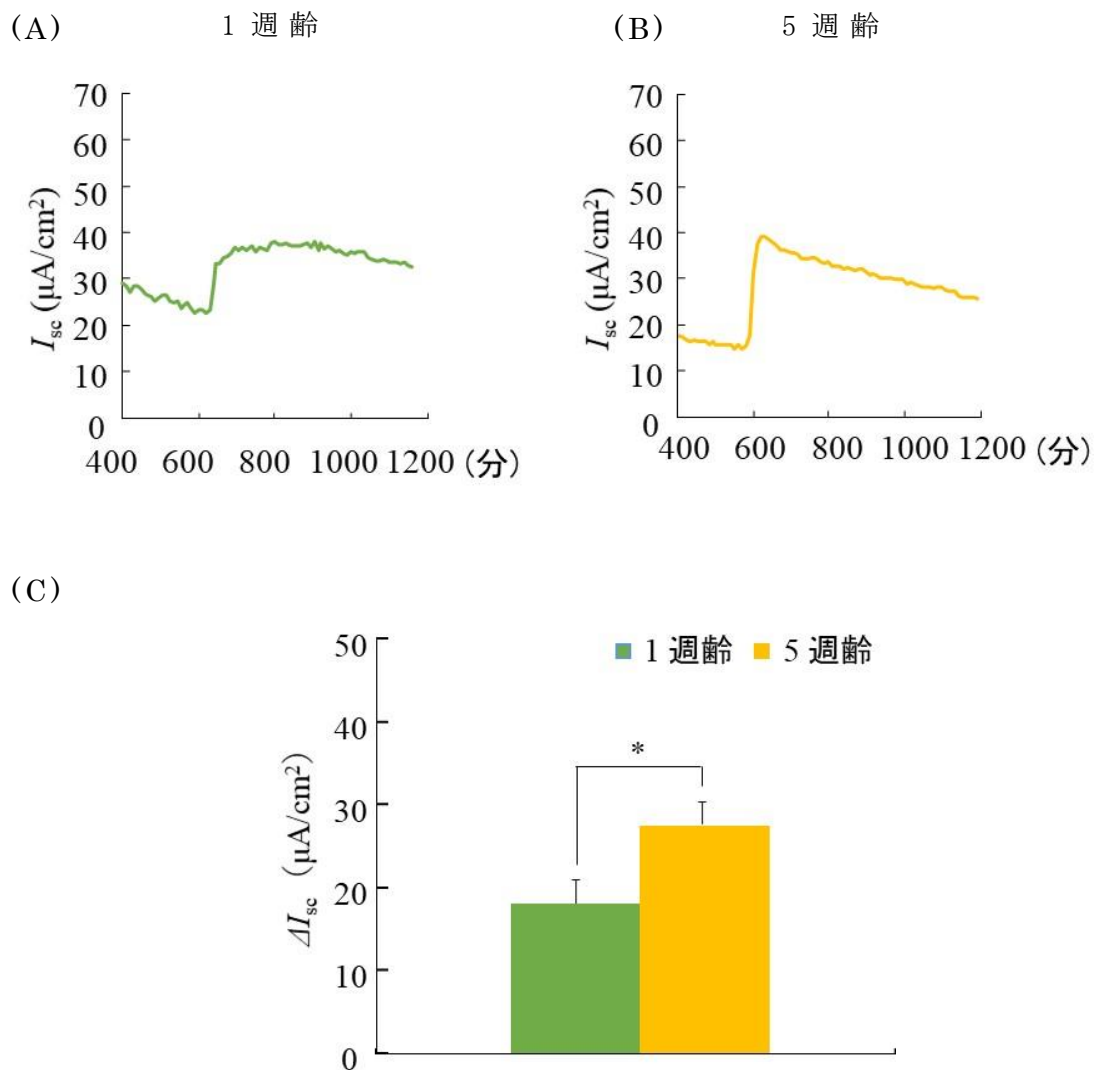


図 18 1 週齢 (■) および 5 週齢 (■) レイヤーの回腸遠位におけるアミノ酸吸収の比較。

(A) 1 週齢 (n=6) および (B) 5 週齢 (n=6) レイヤー回腸遠位において、10 mM アミノ酸溶液添加 (粘膜側) 時の短絡電流値の経時的変化、(C) 10 mM アミノ酸溶液添加 (粘膜側) による短絡電流値の増加量 (ΔI_{sc}) を評価した。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。* は $p < 0.05$ を示す。

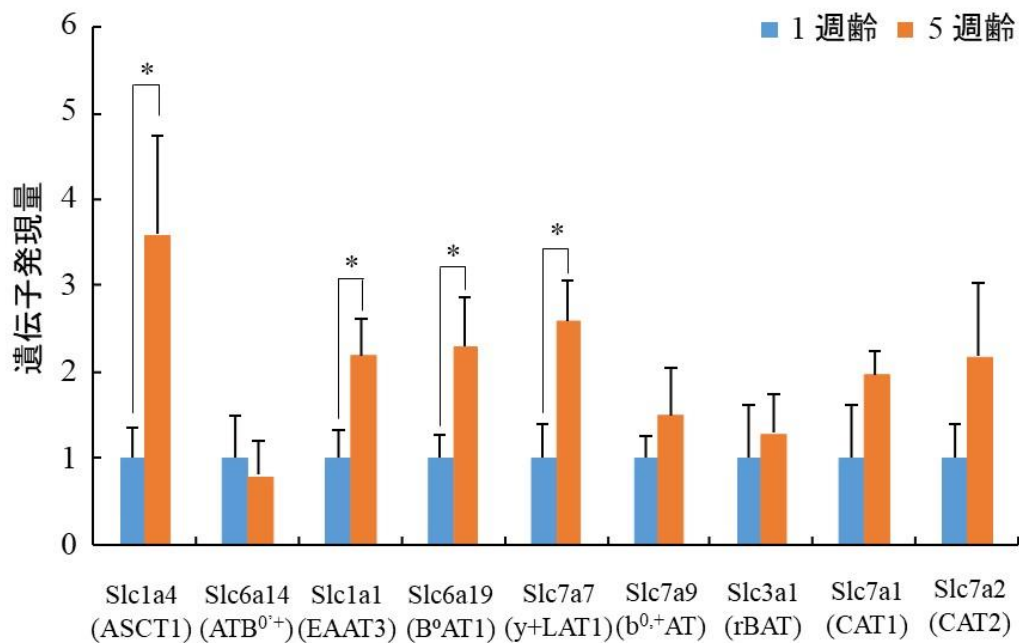


図 19 1 週齢 (■) および 5 週齢 (■) ブロイラーにおけるアミノ酸吸収関連因子の遺伝子発現量の比較。

1 週齢 (n=7) および 5 週齢 (n=7) ブロイラーの回腸遠位におけるアミノ酸吸収関連因子の遺伝子発現量をリアルタイム PCR によって解析した。数値は平均値±標準誤差とした。*は $p < 0.05$ を示す。

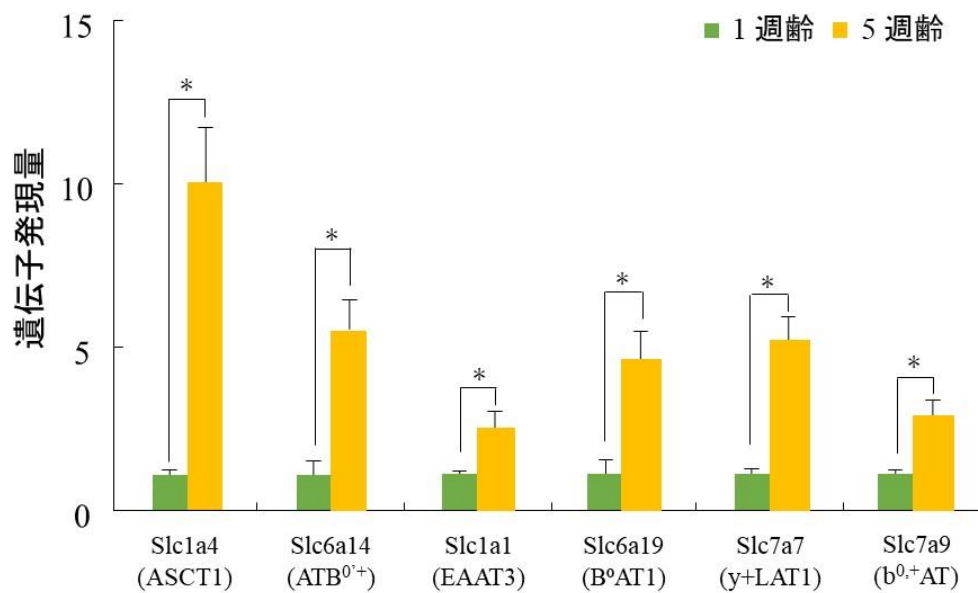


図 20 1 週齢 (■) および 5 週齢 (■) レイヤーにおけるアミノ酸吸収関連因子の遺伝子発現量の比較。

1 週齢 (n=7) および 5 週齢 (n=7) レイヤーの回腸遠位におけるアミノ酸吸収関連因子の遺伝子発現量をリアルタイム PCR によって解析した。数値は平均値±標準誤差とした。*は $p<0.05$ を示す。

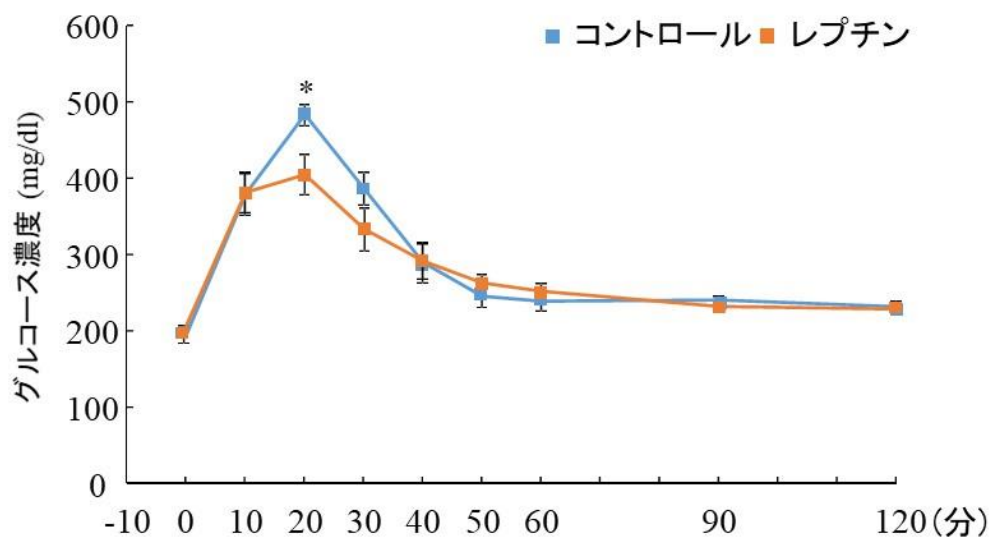


図 21 水:コントロール (■) およびレプチン (■) 経口投与後の経口グルコース負荷試験。

1 週齢のブロイラーを用いて、コントロールとして水 (n=11) または 18.75mM レプチン溶液 (n=10) (1 mg/kg) を経口投与 5 分後、2.5M グルコース溶液 (2.0 g/kg) を経口投与し、血中グルコース濃度の経時変化およびを測定した。数値は平均値±標準誤差とした。*は $p<0.05$ を示す。

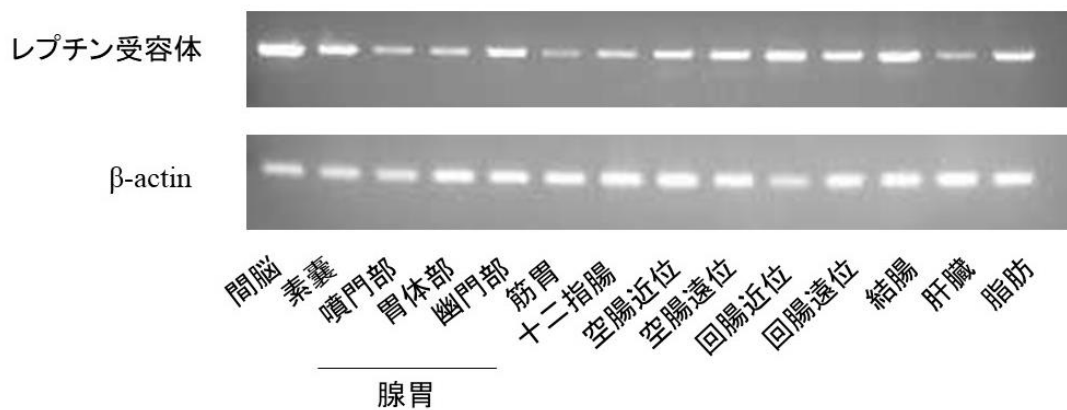
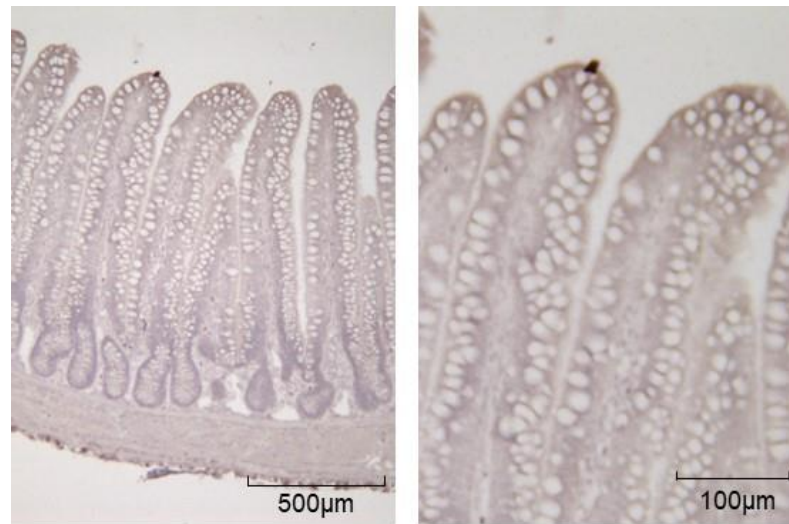


図 22 1 週齢ブロイラーにおけるレプチン受容体遺伝子発現部位の検討.

1 週齢ブロイラーの間脳、素囊、腺胃（噴門部、胃体部、幽門部）、筋胃、十二指腸、空腸近位、空腸遠位、回腸近位、回腸遠位、結腸、肝臓、脂肪組織におけるレプチン受容体遺伝子発現を PCR によって検討した。

(A)



(B)

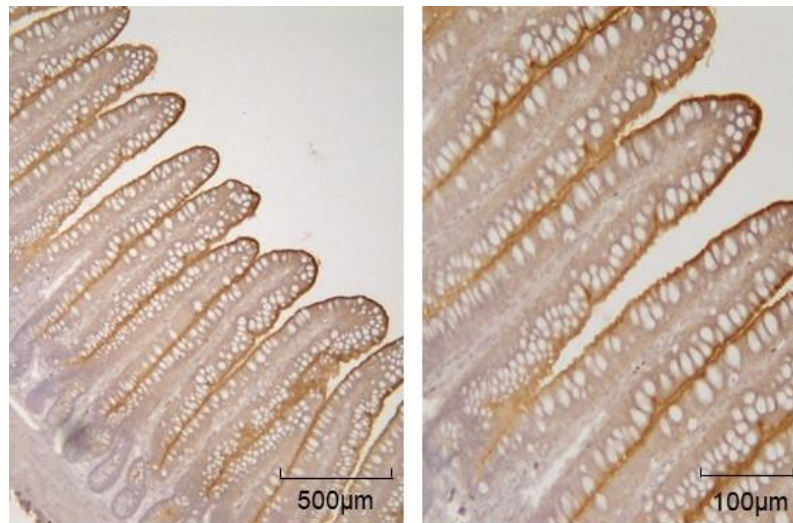


図 23 1 週齢ブロイラー空腸遠位におけるレプチン受容体発現の検討

1 週齢ブロイラーの空腸遠位におけるレプチン受容体発現を免疫染色によって検討した。(A) コントロール、(B) レプチン受容体を示す。

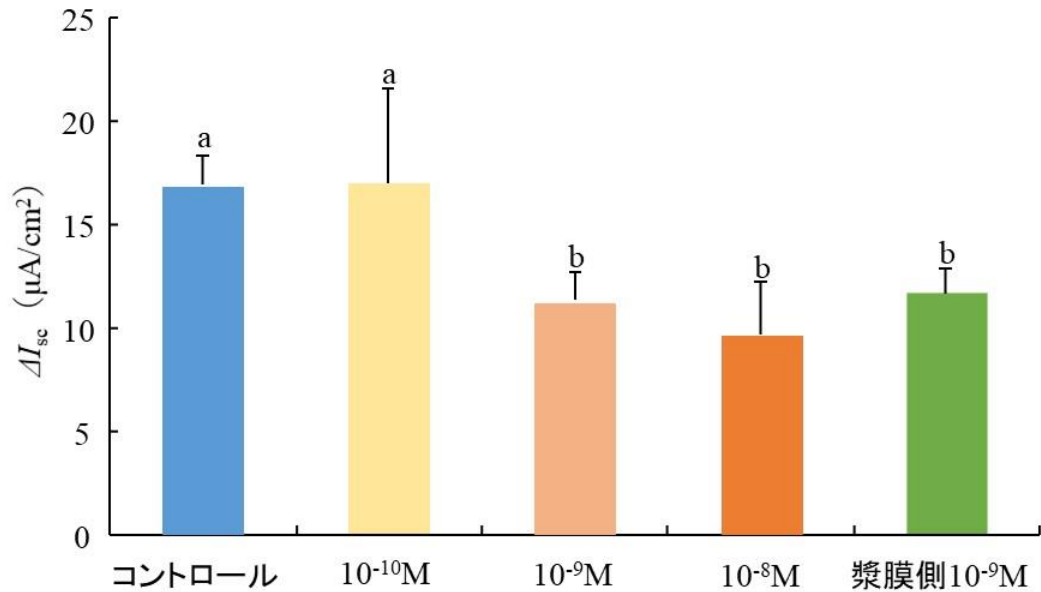


図 24 1 週齢ブロイラー空腸遠位におけるコントロール (■) および粘膜側レプチン 10^{-10} M (■)、 10^{-9} M (■)、 10^{-8} M (■)、漿膜側レプチン 10^{-9} M (■) 培養時のグルコース吸収への作用の検討。

1 週齢ブロイラー空腸遠位において、10 mM グルコース溶液を添加 (粘膜側) した時の短絡電流値の増加量 (ΔI_{sc}) を評価した。コントロール区 ($n=25$) は両側に KRB 溶液、レプチン添加培養区は粘膜側に 10^{-10} M ($n=8$)、 10^{-9} M ($n=6$)、 10^{-8} M ($n=6$) レプチン含有 KRB 溶液または漿膜側に 10^{-9} M ($n=6$) レプチン含有 KRB 溶液を用いた。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。異符号間は $p < 0.05$ を示す。

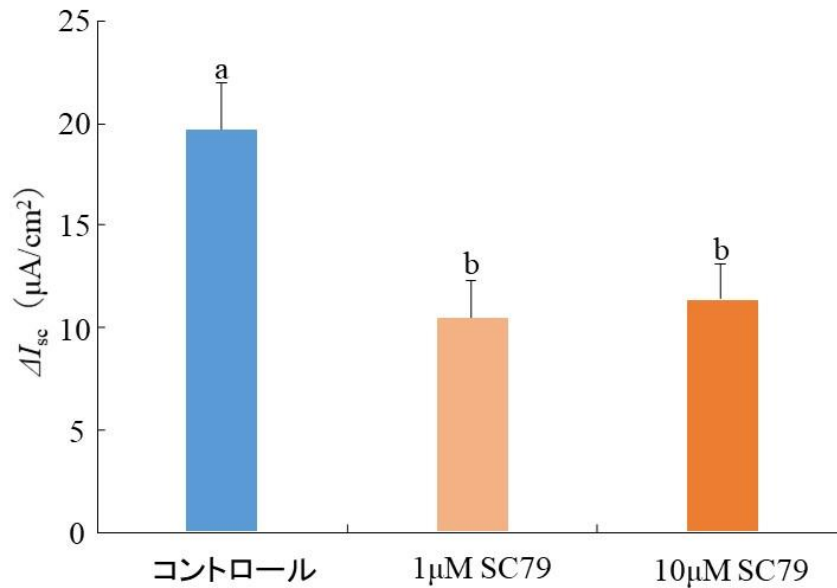


図 25 1 週齢ブロイラーの空腸遠位におけるコントロール(■)、1 μM SC79 (Akt 活性化剤) (■) および 10 μM SC79 (■) 培養時のグルコース吸収の検討。

1 週齢ブロイラー空腸遠位において、10 mM グルコース溶液を添加(粘膜側)した時の短絡電流値の増加量(ΔI_{sc})を評価した。コントロール区(n=21)は両側に KRB 溶液、活性化剤添加培養区は粘膜側に 1 μM (n=8)、10 μM (n=7) SC79 含有 KRB 溶液を用いた。数値は平均値±標準誤差とした。異符号間は $p < 0.05$ を示す。

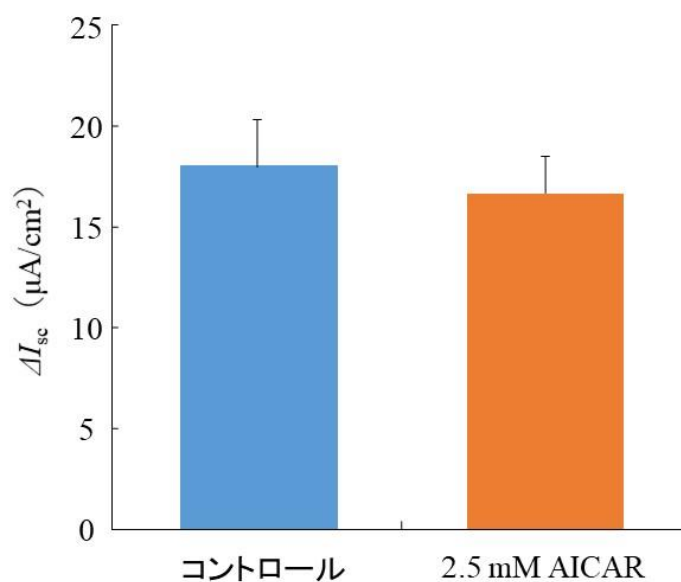


図 26 1 週齢ブロイラーの空腸遠位におけるコントロール(■)、2.5 mM AICAR (AMPK 活性化剤) (■) 培養時のグルコース吸収の検討。

1 週齢ブロイラー空腸遠位において、10 mM グルコース溶液を添加(粘膜側)した時の短絡電流値の増加量(ΔI_{sc})を評価した。コントロール区(n=6)は両側に KRB 溶液、活性化剤添加培養区は粘膜側に 2.5 mM (n=6) AICAR 含有 KRB 溶液を用いた。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。

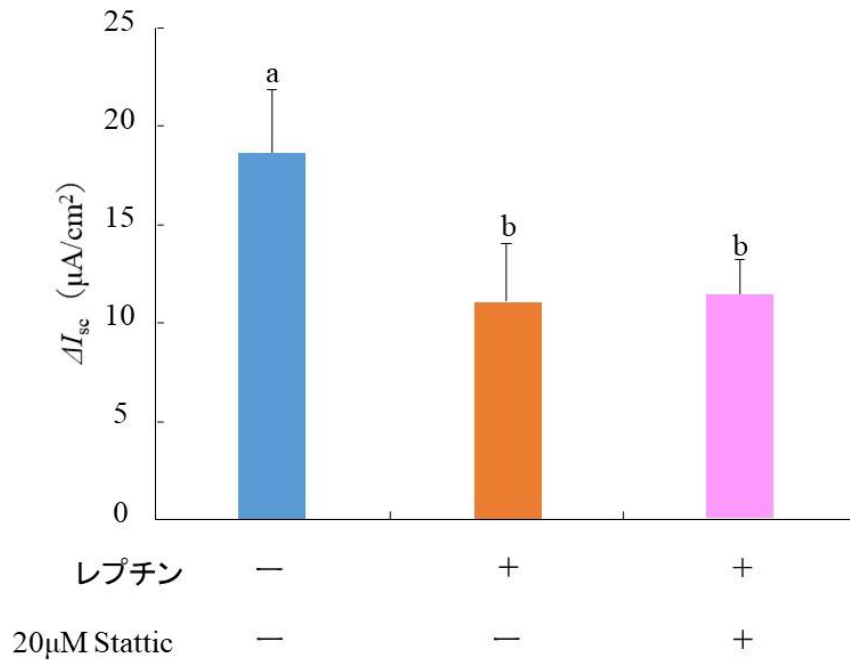


図 27 1 週齢ブロイラーの空腸遠位におけるコントロール(■)、 10^{-9} M レプチン (■)、 10^{-9} M レプチン + 20 μ M Stattic (STAT3 阻害剤) (■) 培養時のグルコース吸収の検討。

1 週齢ブロイラー空腸遠位において、10 mM グルコース溶液を添加（粘膜側）した時の短絡電流値の増加量 (ΔI_{sc}) を評価した。コントロール区 (n=10) は両側に KRB 溶液、レプチン添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン (n=6)、阻害剤添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン + 20 μ M Stattic (n=10) 含有 KRB 溶液を用いた。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。異符号間は $p < 0.05$ を示す。

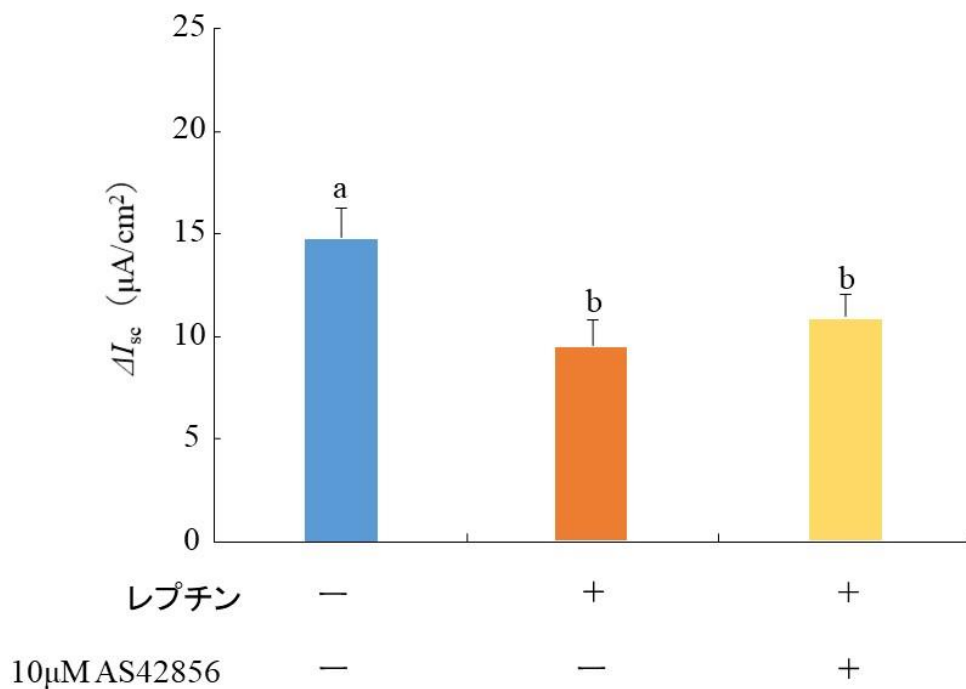


図 28 1 週齢ブロイラーの空腸遠位におけるコントロール(■)、 10^{-9} M レプチン (■)、 10^{-9} M レプチン + $10 \mu\text{M}$ AS42856 (Foxo1 阻害剤) (■) 培養時のグルコース吸収の検討。

1 週齢ブロイラー空腸遠位において、 10 mM グルコース溶液を添加（粘膜側）した時の短絡電流値の増加量 (ΔI_{sc}) を評価した。コントロール区 ($n=8$) は両側に KRB 溶液、レプチン添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン ($n=6$)、阻害剤添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン + $10 \mu\text{M}$ AS42856 ($n=8$) 含有 KRB 溶液を用いた。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。異符号間は $p < 0.05$ を示す。

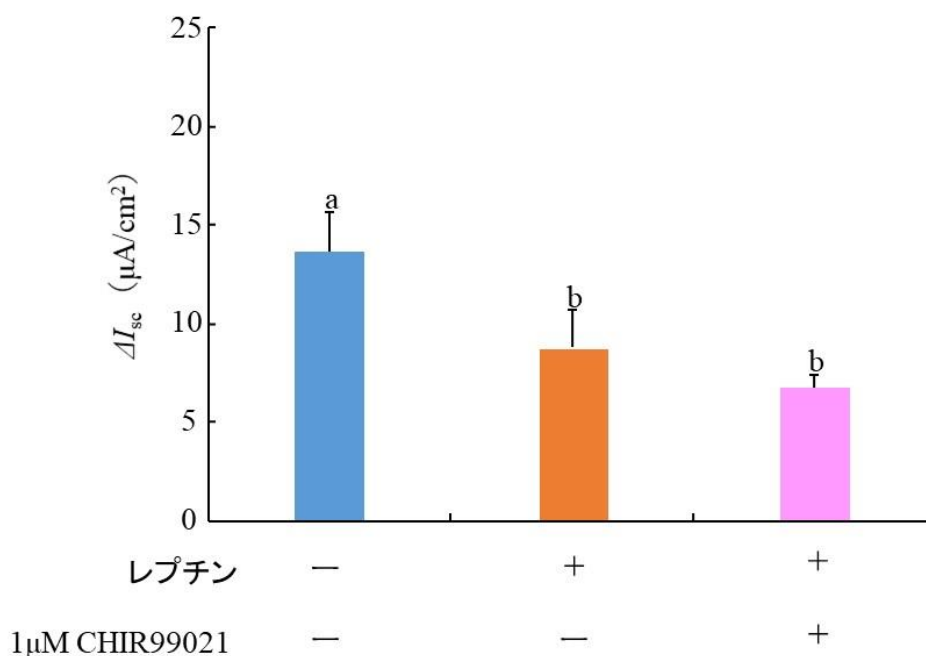


図 29 1 週齢ブロイラーの空腸遠位におけるコントロール(■)、 10^{-9} M レプチン (■)、 10^{-9} M レプチン + $1 \mu\text{M}$ CHIR99021 (GSK3 阻害剤) (■) 培養時のグルコース吸収の検討。

1 週齢ブロイラー空腸遠位において、 10 mM グルコース溶液を添加(粘膜側)した時の短絡電流値の増加量 (ΔI_{sc}) を評価した。コントロール区 ($n=6$) は両側に KRB 溶液、レプチン添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン ($n=6$)、阻害剤添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン + $1 \mu\text{M}$ CHIR99021 ($n=6$) 含有 KRB 溶液を用いた。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。異符号間は $p < 0.05$ を示す。

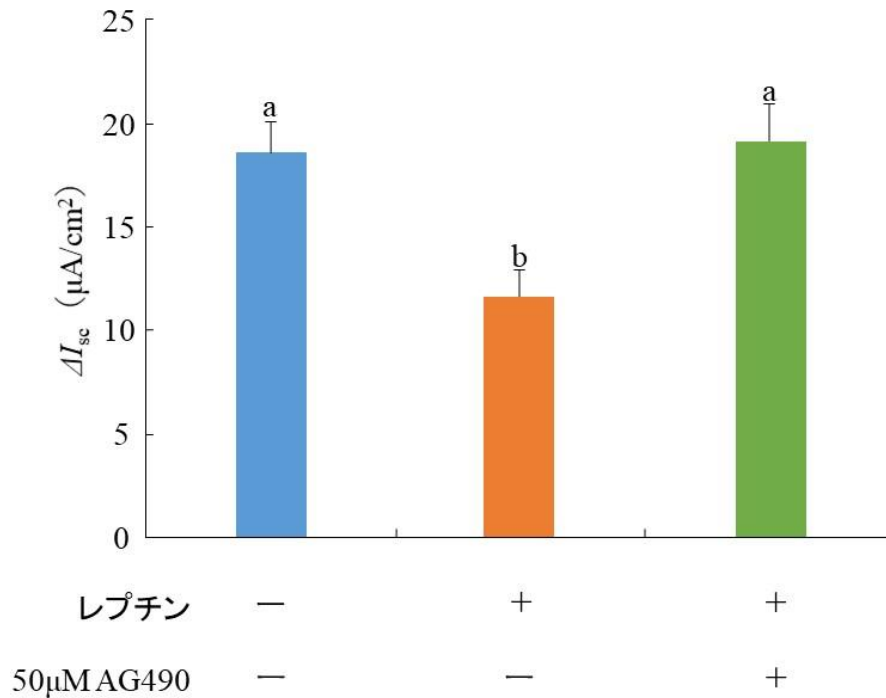


図 30 1 週齢ブロイラーの空腸遠位におけるコントロール(■)、 10^{-9} M レプチン (■)、 10^{-9} M レプチン + 50 μ M AG490 (JAK2 阻害剤) (■) 培養時のグルコース吸収の検討。

1 週齢ブロイラー空腸遠位において、10 mM グルコース溶液を添加(粘膜側)した時の短絡電流値の増加量(ΔI_{sc})を評価した。コントロール区(n=10)は両側に KRB 溶液、レプチン添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン(n=6)、阻害剤添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン + 50 μ M AG490(n=10) 含有 KRB 溶液を用いた。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。異符号間は $p < 0.05$ を示す。

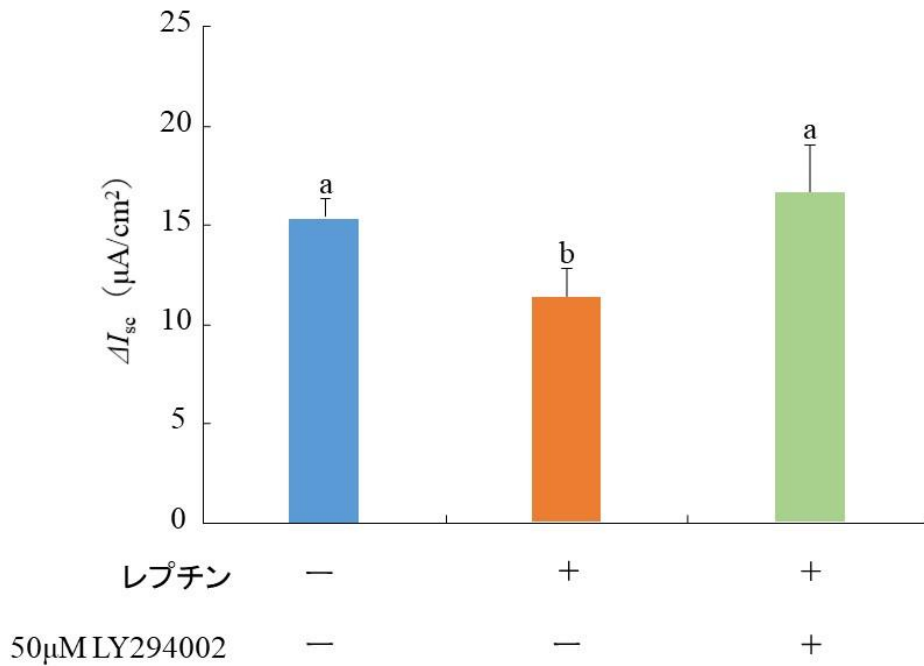


図 31 1 週齢ブロイラーの空腸遠位におけるコントロール(■)、 10^{-9} M レプチン (■)、 10^{-9} M レプチン + 50 μ M LY294002 (PI3K 阻害剤) (■) 培養時のグルコース吸収の検討。

1 週齢ブロイラー空腸遠位において、10 mM グルコース溶液を添加(粘膜側)した時の短絡電流値の増加量(ΔI_{sc})を評価した。コントロール区(n=15)は両側に KRB 溶液、レプチン添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン(n=7)、阻害剤添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン + 50 μ M LY294002(n=15) 含有 KRB 溶液を用いた。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。異符号間は $p < 0.05$ を示す。

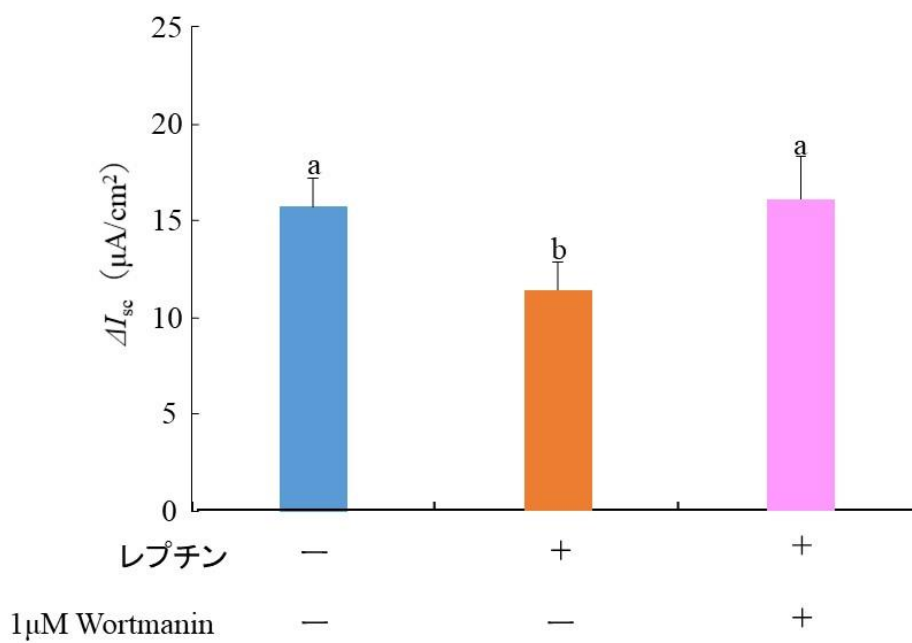


図 32 1 週齢ブロイラーの空腸遠位におけるコントロール(■)、 10^{-9} M レプチン(■)、 10^{-9} M レプチン + 1 μ M Wortmannin (PI3K 阻害剤)(■) 培養時のグルコース吸収の検討。

1 週齢ブロイラー空腸遠位において、10 mM グルコース溶液を添加(粘膜側)した時の短絡電流値の増加量(ΔI_{sc})を評価した。コントロール区(n=10)は両側に KRB 溶液、レプチン添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン(n=6)、阻害剤添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン + 1 μ M Wortmannin(n=10) 含有 KRB 溶液を用いた。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。異符号間は $p < 0.05$ を示す。

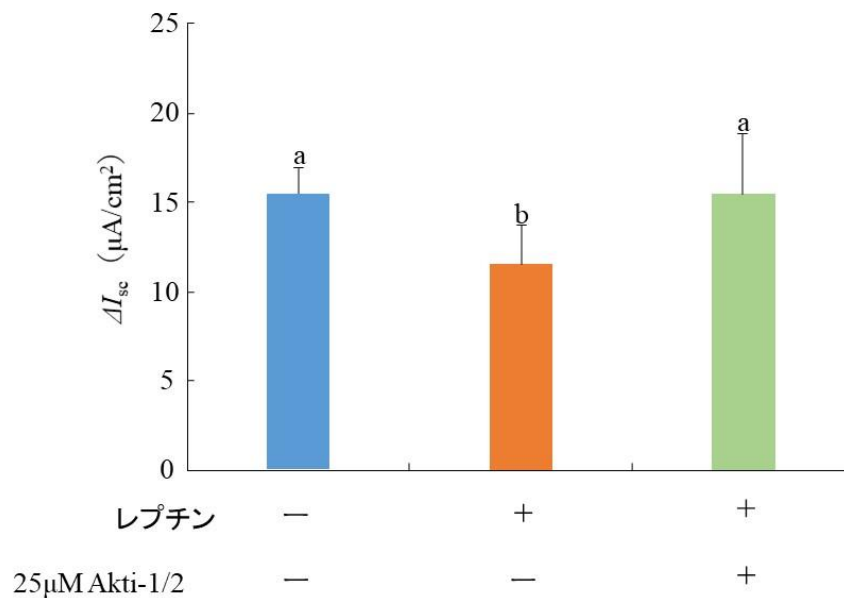


図 33 1 週齢ブロイラーの空腸遠位におけるコントロール(■)、 10^{-9} M レプチン (■)、 10^{-9} M レプチン + 25 μ M Akti-1/2 (Akt 阻害剤) (■) 培養時のグルコース吸収の検討。

1 週齢ブロイラー空腸遠位において、10 mM グルコース溶液を添加(粘膜側)した時の短絡電流値の増加量(ΔI_{sc})を評価した。コントロール区(n=7)は両側に KRB 溶液、レプチン添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン(n=6)、阻害剤添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン + 25 μ M Akti-1/2(n=7) 含有 KRB 溶液を用いた。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。異符号間は $p < 0.05$ を示す。

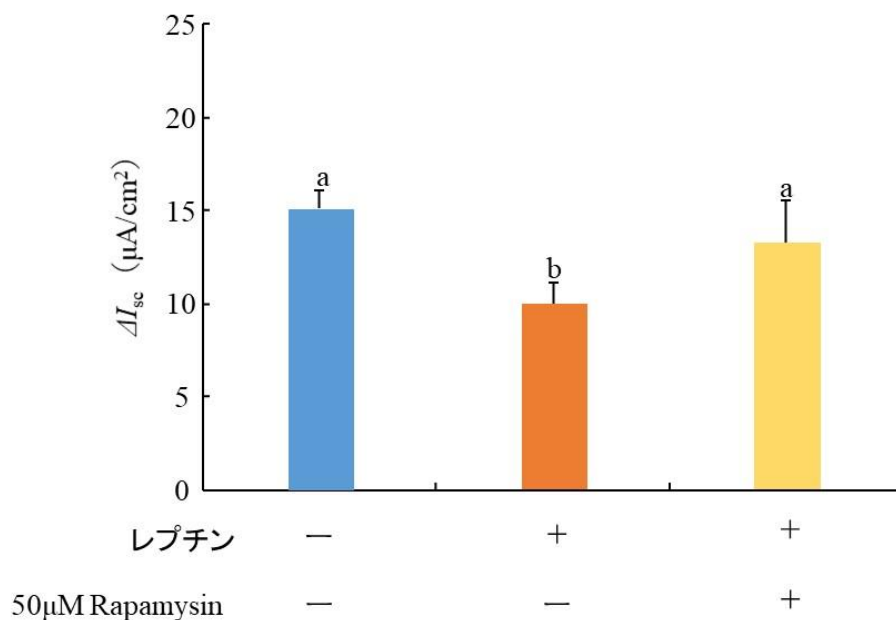


図 34 1 週齢ブロイラーの空腸遠位におけるコントロール(■)、 10^{-9} M レプチン(■)、 10^{-9} M レプチン + 50 μ M Rapamycin(mTOR 阻害剤)(■) 培養時のグルコース吸収の検討。

1 週齢ブロイラー空腸遠位において、10 mM グルコース溶液を添加(粘膜側)した時の短絡電流値の増加量(ΔI_{sc})を評価した。コントロール区(n=6)は両側に KRB 溶液、レプチン添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン(n=6)、阻害剤添加培養区は粘膜側に 10^{-9} M レプチン + 50 μ M Rapamycin(n=6) 含有 KRB 溶液を用いた。数値は平均値 \pm 標準誤差とした。異符号間は $p < 0.05$ を示す。

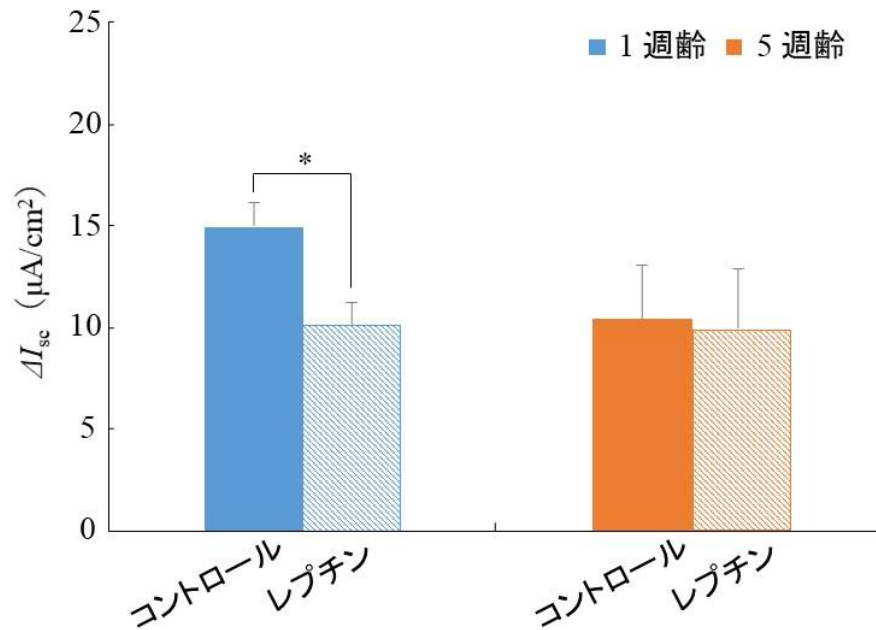


図 35 1 週齢ブロイラーの空腸遠位におけるコントロール（■）と 10^{-9} M レプチン培養時（▨）、5 週齢ブロイラーの空腸遠位におけるコントロール（■）と 10^{-9} M レプチン培養時（▨）のグルコース吸収の検討。

1 週齢（n=12）および 5 週齢（n=12）ブロイラー空腸遠位において、コントロールとして KRB のみまたはレプチン 10^{-9} M 含有 KRB（粘膜側）を培養液として用い、10 mM グルコース溶液を添加（粘膜側）した時の短絡電流値の増加量（ ΔI_{sc} ）を評価した。数値は平均値±標準誤差とした。*は $p<0.05$ を示す。

表 1 各プライマーの塩基配列

Primer		Sequence	Accession No.	Size (bp)
Slc5a1	Forward	GTC CTG GCA GTG GGA GTA TG	NM_001293240	108
	Reverse	AAG AGT GAA GCA CCG ATC GG		
Slc2a2	Forward	CCT CGT GCC CAT GTA TGT GA	NM_207178.1	94
	Reverse	AGG ACC TGG CTG ATG AGG AT		
Atp1a1	Forward	AGA GGC AGC CAA GAA ATC CC	NM_205521.1	120
	Reverse	CCA AGG GCC TGG ATC ATA CC		
Slc1a4	Forward	TTG GAG GCC ATT GGA CTT CC	XM_001232899.5	102
	Reverse	GGC ATC CCC TTC CAC ATT CA		
Slc6a14	Forward	CTG CAG TAA AAC ACG CCT CG	XM_426267.1	97
	Reverse	CGT GAG GTT GTT GCT TGC AA		
Slc1a1	Forward	CGG ACA GGA AGG GAT GTA GC	XM_424930.6	91
	Reverse	ACT CCA ATA CCC AGC AGC AC		
Slc6a19	Forward	TTG AGC AAA TGC AGC AGC TG	XM_419056.6	112
	Reverse	CCG GTT CCT TCA ACT CCC TC		
Slc7a7	Forward	GCT CCT GCT AAA TGC CCT TTG	XM_418326.6	110
	Reverse	AGA TCA GCA CGA CGT ACA GC		
Slc7a9	Forward	CCA GGT TGT GAT CCA CCT CC	NM_001199133.1	99
	Reverse	GCT TCC CAG CTT CAC ACT CA		
Slc3a1	Forward	CCA TAC ATC GGG GCT GGA TG	XM_004935370.3	86
	Reverse	GAC GCT GTC TAA CCC ATC CA		
Slc7a1	Forward	CAA GAG GAA AAC TCC AGT AAT TGC A	NC_006088.4	75
	Reverse	AAG TCG AAG AGG AAG GCC ATA A		
Slc7a2	Forward	TGC TCG CGT TCC CAA GA	NC_006091.4	67
	Reverse	GGC CCA CAG TTC ACC AAC AG		
Actb	Forward	TGC GTG ACA TCA AGG AGA AG	NM_205518.1	110
	Reverse	GAC CAT CAG GGA GTT CAT AGC		

表 2 1 週齢および 5 週齢ブロイラーにおける腸管および絨毛の長さ、単位面積あたりの絨毛数

	腸管の長さ (cm)	絨毛の長径 (mm)	絨毛の短径 (mm)	単位面積当たりの 絨毛の数 (/mm ²)
1 週齢	93±2***	0.49±0.03***	0.30±0.02***	58±4***
5 週齢	151±6	0.77±0.04	0.73±0.05	23±1

図 4 で撮影した画像を用いて、画像解析ソフト ImageJ で計測した。数値は平均値±標準誤差とした。***は $p<0.001$ を示す。

表 3 1 週齢および 5 週齢ブロイラーにおける経口投与物質の消化管内通過速度の比較

	腸管の長さ (cm)	染まった長さ (cm)	染まった長さ (%)	メッケル憩室からの距離 (cm)
1 週齢	94 ± 4***	67 ± 5*	71 ± 4*	6 ± 4
5 週齢	148 ± 4	83 ± 5	51 ± 4	-6 ± 6

1 週齢 (n=7) および 5 週齢 (n=5) ブロイラーを用いた。1%エバンズブルー含有 2.0M グルコース溶液経口投与 20 分後に腸管を採取し、十二指腸から回腸遠位までの長さおよび染まった長さを測定した。数値は平均値±標準誤差とした。*は $p<0.05$ 、***は $p<0.001$ を示す。