

## 《研究ノート》

## 飼料用粃米給与がブロイラー腸管免疫関連遺伝子発現と血液免疫グロブリン濃度に及ぼす影響

高橋和昭<sup>1</sup>・南都文香<sup>2</sup>・豊水正昭<sup>2</sup><sup>1</sup>山形県立米沢女子短期大学 山形県米沢市通町 6-15-1 992-0025<sup>2</sup>東北大学大学院農学研究科 宮城県仙台市堤通雨宮町 1-1 981-8555

飼料用粃米給与がブロイラー腸管免疫に及ぼす影響を腸管免疫関連遺伝子発現から検討した。トウモロコシ-大豆粕を主体とした飼料（対照飼料）または対照飼料のトウモロコシ全量を2種の未破碎粃米（タカナリまたはモミロマン）で代替した飼料を初生ブロイラーオズ（チャンキー系）に孵化後から4週間給与した。メッセル憩室近辺の腸組織の免疫関連遺伝子発現と血漿中免疫グロブリン(Ig)AおよびG濃度を測定した。前炎症性サイトカイン発現（インターロイキン-1,6及びインターフェロン- $\gamma$ 腫瘍壊死因子様リガンド1A）量はタカナリ給与区が対照またはモミロマン区より統計的に有意に高いか、高い傾向にあった。タカナリ給与区における調整型サイトカイン発現（インターロイキン-10及びトランスフォーミング増殖因子- $\beta$ ）量はモミロマン給与区よりも有意に高かった。指標遺伝子発現量から推定したT細胞数(CD3)とT細胞増殖能力（インターロイキン-2）はタカナリ給与区がモミロマン給与区よりも高く、モミロマン給与区は対照区よりも低かった。免疫グロブリン濃度もタカナリ区でモミロマン区よりも高かった。これらの結果は、腸管免疫に対する飼料用粃米給与の影響はトウモロコシ給与のそれと異なること、飼料用粃米間でも腸管免疫に対する作用は異なる可能性を示している。

キーワード：飼料用粃米，タカナリ，モミロマン，腸管免疫関連遺伝子発現，ブロイラー

### 緒 言

飼料用粃米の栄養価はニワトリ飼料の主たる原料であるトウモロコシよりも代謝エネルギー量、粗タンパク質量などが低いとされているが、これらの成分を調整すれば、産卵や増体などの生産性に影響することなくトウモロコシの代替として利用可能とされている（<http://www.nilgs.affrc.go.jp/project/jiky-pro/jiky-d/manual.htm>）。一方で、粃米はトウモロコシと比較して特有の難消化性炭水化物や抗酸化作用を有する物質を含んでいる（[http://www.nfri.affrc.go.jp/guidance/kankobutu/kanko\\_sou41-1/kanko\\_sou30/30\\_p07L.pdf](http://www.nfri.affrc.go.jp/guidance/kankobutu/kanko_sou41-1/kanko_sou30/30_p07L.pdf)）。難消化性の多糖や抗酸化作用を有する物質は、免疫などの生理機能に影響を及ぼすこと、そして、粃米外皮部分には、ケイ酸やフィチン酸などの成分も含まれていることから、粃米給与は腸管免疫を含むニワトリの免疫機能に対してトウモロコシとは異なる影響を示す可能性がある。さらに、飼料用粃米品種の違いが、腸管を含めて免疫能力に及ぼす影響については知られていない。本試験では、トウモロコシ代替物としての飼料用粃米がブロイラー腸管免疫に及ぼす影響を腸管免疫関連遺伝子

(mRNA) 発現と血液免疫グロブリン濃度から検討するとともに、飼料米品種の違いがブロイラー腸管免疫に対する異同もあわせて検討した。

### 材料と方法

初生のブロイラーオズ（ロス系）を孵化場から導入し、電熱器付き育雛器で3週齢まで飼育した。3-4週齢は個別ケージで飼育した。飼育温度は0-2週齢までは34℃から下げ2週齢時で24℃とし、3週齢以降は24℃で飼育した。照明時間は試験期間中24時間照明とした。試験飼料として、トウモロコシ-大豆粕主体の飼料（対照飼料）、対照飼料のトウモロコシを全量飼料用粃米で代替した飼料を調製した。飼料用粃米は未破碎タカナリまたはモミロマンの2種を用い、合計3飼料を各飼料区6羽のニワトリに初生時から4週齢まで自由摂取条件で給与した。飲料水も自由摂取条件で給与した。試験終了時に翼下静脈よりヘパリンを抗凝固剤として用いて採血した。頸椎脱臼でと殺した後、メッセル憩室（卵黄憩室）付近の腸管約1gを採取し、液体窒素を用いて凍結した。腸管試料は分析まで-80℃で保存した。血液は血漿を分離し、-80℃で保存した。動物試験は東北大学動物実験委員会の承認を受けて行った。

腸管試料はトリゾールを用いて総RNAを抽出した後、Takahashi *et al.* (2008) の方法に準拠してインターロイキン(IL)-1, 2, 6, 10, インターフェロン(IFN)- $\gamma$ , 腫瘍壊死因子様リガンド(TL) 1A, トランスフォーミング増殖因子(TGF)- $\beta$ , CD3, Bu-1 および

2011年11月28日受付, 2012年2月17日受理

連絡者: 高橋和昭

〒992-0025 山形県立米沢女子短期大学 米沢市通町 6-15-1

Tel: 0238-22-7326

Fax: 0238-22-7326

E-mail: k-takahashi@yone.ac.jp

Toll様受容体(TLR)-2のmRNA発現量を測定した。それぞれの遺伝子発現はハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド3リン酸脱水素酵素(GAPDH)遺伝子発現量を用いて標準化し発現量とした。血漿免疫グロブリン(Ig)G濃度は単円免疫拡散法(エコサイカ研究所製測定キット), IgA濃度は酵素結合抗体法(ELISA法, Bethyl社製測定キット)を用いて定量した。

## 結 果

表2に飼料用籾米給与が腸管免疫関連遺伝子発現に及ぼす影響の結果を示した。

IL-1発現量はトウモロコシ給与区でモミロマン給与区より有意に高かった。IFN- $\gamma$ 発現量はタカナリ給与区でトウモロコシ給与区より有意に高かった。TL1A発現量はタカナリ給与区でモミ

ロマン給与区より有意に高かった。IL-6発現量は各飼料区間で有意の差は認められなかった。前炎症関連サイトカイン(IL-1, IFN- $\gamma$ , TL1AおよびIL-6)全般では、トウモロコシ給与区とタカナリ給与区に比較してモミロマン給与区で有意に低いか、低い傾向にあった。調節型サイトカインであるIL-10発現量はトウモロコシ給与区とタカナリ給与区に比較してモミロマン給与区で有意に低く、TGF- $\beta$ 発現量はタカナリ給与区に比較してトウモロコシまたはモミロマン給与区で有意に低かった。T細胞数の指標として用いたCD3発現量およびB細胞数の指標として用いたBu-1発現量そしてT細胞の増殖能力を示すIL-2発現量はタカナリ給与区に比較してモミロマン給与区で有意に低かった。またタカナリ給与区のBu-1発現量はトウモロコシ給与区よりも有意に高かった。グラム陽性菌のペプチドグリカン, リポテイコ酸, 真菌の多糖およびウイルスの糖タンパク質の受容体となるTLR-2発現量は各飼料区間で有意の差は認められなかった。

表3に飼料用籾米給与が血漿免疫グロブリン濃度に及ぼす影響の結果を示した。

全般的にタカナリ給与区の免疫グロブリン濃度は他の2飼料給与区に比較して高かった。すなわち, IgA濃度はタカナリ給与区に比較してモミロマン給与区で有意に低く, IgG濃度はタカナリ給与区に比較してトウモロコシ給与区で有意に低かった。

## 考 察

モミロマンは国際稲研究所で開発されたジャポニカ型の「IR65598-112-2」と九州沖縄農業研究センターが開発したジャポニカ・インディカ中間型の「西海203」を交雑して育成された品種であり, タカナリは韓国のインディカを交配育成した品種である。本試験結果は, 腸管免疫に対する飼料用籾米給与の影響はトウモロコシ給与のそれと異なること, 飼料用籾米間でも腸管免疫に対する作用は異なる可能性を示している。米ふすまに含まれるオリゼノールには, 炎症性各転写因子活性低下や前炎症性サイト

表 1. 飼料組成

原料	対照	籾米
	(%)	
トウモロコシ	48.000	0.000
籾米	0.000	41.500
大豆粕	42.000	43.500
大豆油	5.900	5.900
炭酸カルシウム	1.030	1.030
リン酸水素カルシウム	1.750	1.750
塩化ナトリウム	0.330	0.330
ビタミン混合	0.160	0.160
ミネラル混合	0.400	0.400
DL-メチオニン	0.234	0.253
代謝エネルギー	3101	2850
粗タンパク質	22.0	22.0

表 2. 飼料用籾米給与がブロイラー腸管の免疫関連遺伝子(mRNA)発現に及ぼす影響

		飼料区		
		トウモロコシ	タカナリ	モミロマン
IL-1 $\beta$	$\times 10^{-2}$	5.84 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>	4.33 $\pm$ 0.82 <sup>ab</sup>	3.68 $\pm$ 1.00 <sup>b</sup>
IFN- $\gamma$	$\times 10^{-2}$	1.96 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup>	3.57 $\pm$ 0.71 <sup>a</sup>	2.29 $\pm$ 0.54 <sup>ab</sup>
TL1A	$\times 10^{-1}$	3.75 $\pm$ 0.73 <sup>ab</sup>	4.67 $\pm$ 0.97 <sup>a</sup>	2.62 $\pm$ 0.57 <sup>b</sup>
IL-6	$\times 10^{-4}$	2.04 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	2.65 $\pm$ 0.79 <sup>a</sup>	2.06 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>
IL-10	$\times 10^{-2}$	4.35 $\pm$ 1.16 <sup>a</sup>	5.21 $\pm$ 0.68 <sup>a</sup>	1.63 $\pm$ 0.55 <sup>b</sup>
TGF- $\beta$	$\times 10^{-1}$	3.70 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	7.20 $\pm$ 1.49 <sup>a</sup>	3.23 $\pm$ 0.52 <sup>b</sup>
CD3	$\times 10^{-2}$	0.82 $\pm$ 0.32 <sup>ab</sup>	1.46 $\pm$ 0.88 <sup>a</sup>	0.295 $\pm$ 0.142 <sup>b</sup>
IL-2	$\times 10^{-2}$	2.98 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	3.06 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	1.91 $\pm$ 0.40 <sup>b</sup>
Bu-1	$\times 10^{-6}$	2.98 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>	8.87 $\pm$ 0.54 <sup>a</sup>	1.96 $\pm$ 0.18 <sup>c</sup>
TLR-2	$\times 10^{-2}$	2.98 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>	3.06 $\pm$ 0.69 <sup>a</sup>	1.92 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>

平均値 $\pm$ 標準誤差(観察数 6)

IL:インターロイキン, IFN:インターフェロン, TL:腫瘍壊死因子様リガンド, TGF:トランスフォーミング増殖因子, TLR:トール様受容体

表 3. 飼料用米粉給与がプロイラー血漿中免疫グロブリン濃度に及ぼす影響

		飼料区		
		トウモロコシ	タカナリ	モミロマン
IgA	$\mu\text{g/ml}$	515 $\pm$ 76	556 $\pm$ 67	447 $\pm$ 98
IgG	$\text{mg/ml}$	9.83 $\pm$ 1.39	11.32 $\pm$ 0.90	10.55 $\pm$ 0.49

平均値 $\pm$ 標準誤差 (観察数 6)

Ig 免疫グロブリン

カイン IL-6 TNF- $\alpha$  生成を低下 (Iglam *et al.*, 2011) が報告されている。また、米ぬかのエタノール抽出成分 IL-6 TNF- $\alpha$  IFN $\gamma$  mRNA 発現を低下させる (Choi *et al.*, 2007), 米外皮由来インゾピテシンは TNF- $\alpha$  の生成を抑制する (Huang *et al.*, 2005)。また、黒色米ふすま成分はマウス炎症モデルにおいて前炎症サイトカインやプロスタグランジンやロイコトリエンの産生を抑制する (Choi *et al.*, 2010)。これらことから、飼料用米粉給与により腸管免疫関連遺伝子の前炎症性サイトカイン遺伝子発現はトウモロコシ給与ニワトリよりも低くなると予想したが、本試験結果からは、タカナリ給与では前炎症性サイトカイン遺伝子発現量は高く、モミロマン給与では、低くなる可能性が示された。米ふすま由来アラビノキラスは TNF- $\alpha$  や IFN $\gamma$  生成を促進する (Ghoneum and Matsuura, 2004) こと、黒色米や灰色米のふすま成分は IL-6 TNF- $\alpha$  IFN- $\gamma$  の mRNA 発現を低下させる一方赤色米のふすま成分は IL-6, TNF- $\alpha$  および IFN- $\gamma$  発現を刺激する (Okai *et al.*, 2009) ことなどが報告されていることから、飼料用米粉の初部分や玄米中の果皮や種皮部分の成分および成分量の違いにより、米粉が腸管免疫に及ぼす影響は異なると推定される。今後、飼料用米粉の免疫に対する影響を調査する際には、個々の飼料米の一般栄養成分とともに特殊成分についても詳しく調査する必要があると思われる。なお、ニワトリ TL1A は哺乳動物の TNF- $\alpha$  の機能代替をすることが知られている (Takimoto *et al.*, 2008)。

ジャポニカ型インディカ型イネの栄養成分での大きな違いはアミロースおよびアミロペクチン含量の差はよく知られている。粉殻の成分としては、セルロース、ヘミセルロースおよびリグニンを中心とする難消化性多糖、糖組成としてグルコース、キシロースおよびアラビノースの主体をなしていることが、非晶質シリカが粉殻部分の主たるミネラルであることが食用米の分析値として示されているもの本試験で使用した。飼料用米であるモミロマンとタカナリの成分分析値については著者の知る限り公表されていないようである。このほか、米に含まれる米に含まれるフェルラ酸、フィチン、オリザノールの生理作用がよく知られているがモミロマンやタカナリなど飼料用米に関する成分含量などもよく知られていない。本試験では、炎症性サイトカイン生成を抑制的調節すると考えられている調節型サイトカイン遺伝子発現量は、前炎症性サイトカイン発現量が高かったタカナリ給与ニワトリで高くなっており、タカナリ給与により上昇する前炎症性サイトカイン生成を抑制する調節が働いていると考えられた。また、前炎症性サイトカイン遺伝子発現量が低かったことから、調節型サイトカイン遺伝子発現量も低いと考えられた。タカナリ給与による

高い腸管の T および B 細胞数は、T 細胞により生産されるサイトカインの増加に対応していると考えられるが、詳細については、ニワトリ腸管免疫細胞間の相互間関係があきらになるまで待つ必要がある。統計的に有意差はなかったがタカナリ給与ニワトリの血漿免疫グロブリン A と G 濃度も高い傾向にあり、免疫状態が亢進している可能性が考えられた。抗生物質給与や乳酸菌給与は一過的に腸管免疫関連遺伝子を高める (Sato *et al.*, 2009)。したがって、タカナリ給与は抗生物質給与や乳酸菌給与と類似した腸管免疫の応答を示していることになる。米繊維の酵素処理成分はプレバイオテック様作用を持つ、米繊維の酵素処理成分のヘミセルロースは乳酸菌に有効に利用され、酪酸を生成するが、TNF- $\alpha$  生成に関与しない (Kanauchi *et al.*, 2010) ことが報告されている。本試験では、菌体成分受容体である一部の TLR-2 mRNA 発現量の変化がなかったことから、免疫関連遺伝子発現の違いは腸内細菌の代謝産物による可能性も否定できない。一方で、腸管免疫が刺激されていない状態では腸管免疫は低い状態に維持されるとも考えられる。今回、異なる腸管免疫の状態を作り出したタカナリとモミロマンいずれがニワトリ健康や生産性の向上に寄与するのかについては、一層の研究が必要である。

## 謝 辞

本研究は、農林水産省委託プロジェクト研究「自給飼料を基盤とした国産畜産物の高付加価値化技術の開発」の補助を得て行われた。

## 引用文献

- Choi SP, Kim SP, Kang MY, Nam SH and Friedman M. Protective effects of black rice bran against chemically-induced inflammation of mouse skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58 : 10007-100015. 2010.
- Choi SP, Kang MY, Koh HJ, Nam SH and Friedman M. Antiallergic activities of pigmented rice bran extracts in cell assays. *Journal of Food Science*, 72 : S719-726. 2007.
- Huang ST, Chen CT, Chieng KT, Huang SH, Chiang BH, Wang LF, Kuo HS and Lin CM. Inhibitory effects of a rice hull constituent on tumor necrosis factor alpha, prostaglandin E2, and cyclooxygenase-2 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1042 : 387-395. 2005.
- Islam MS, Nagasaka R, Ohara K, Hosoya T, Ozaki H, Ushio H and Hori M. Biological abilities of rice bran-derived antioxidant phytochemicals for medical therapy. *Current Topics in Medic-*

- inal Chemistry, 11 : 1847-1853. 2011.
- Ghoneum M and Matsuura M. Augmentation of macrophage phagocytosis by modified arabinoxylan rice bran (MGN-3/bio-bran). *International Journal of Immunopathology & Pharmacology*, 17 : 283-292. 2004.
- Kanauchi O, Mitsuyama K, Komiyama Y, Yagi M, Andoh A and Sata M. Preventive effects of enzyme-treated rice fiber in a restraint stress-induced irritable bowel syndrome model. *International Journal of Molecular Medicine*, 25 : 547-555. 2010.
- Kim SP, Yang JY, Kang MY, Park JC, Nam SH and Friedman M. Composition of liquid rice hull smoke and anti-inflammatory effects in mice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 : 4570-4581. 2011.
- Miyazaki Y, Takahashi K and Akiba Y. Developmental changes in mRNA expression in immune-associated cells of intestinal tract of broiler chickens after hatch and by dietary modification. *Animal Science Journal* 78 : 527-534. 2007.
- Niewold TA. The nonantibiotic anti-inflammatory effect of anti-microbial growth promoters, the real mode of action? A hypothesis. *Poultry Science*, 86 : 605-609. 2007.
- Okai Y, Okada T, Higashi-Okai K, Kasahara E, Inoue M and Yamashita U. Immunomodulating activities in bran extracts of Japanese red, black and brown rices. *Journal of Uoeh*, 31 : 231-242. 2009.
- Sato K, Takahashi K, Tohno M, Miura Y, Kamada T, Ikegami S and Kitazawa H. Immunomodulation in gut-associated lymphoid tissue of neonatal chicks by immunobiotic diets. *Poultry Science*, 88 : 2532-2538. 2009.
- Takahashi K, Miura Y and Mizuno T. Antibiotics feeding accelerate functional maturation of intestinal immune-related cells of male broiler chicks after hatch. *Journal of Poultry Science*, 48 : 187-193. 2011.
- Takimoto T, Sato K, Akiba Y and Takahashi K. Role of chicken TL1A on inflammatory responses and partial characterization of its receptor. *Journal of Immunology*, 180 : 8327-8332. 2008.

## Effect of Feeding of Unhulled Rice on mRNA Expression of Intestinal Immune-Related Mediators and Plasma Immunoglobulin Concentration of Male Broiler Chicks

Kazuaki Takahashi<sup>1</sup>, Fumika Nanto<sup>2</sup> and Masaaki Toyomizu<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Health and Nutrition, Yonezawa Women's Junior College of Yamagata Prefecture Yonezawa-shi, Yamagata 992-0025

<sup>2</sup>Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai-shi, Miyagi 981-8555

Effect of feeding of unhulled rice for animal feed on mRNA expression of intestinal immune-related mediators of male broiler chicks was investigated in order to evaluate intestine immunity. Male broiler chicks (day old, Ross) were given corn-soybean meal diet as a control or two kinds unhulled rice (Takanari and of Momiromann)-soybean meal diets for 4 weeks. All corn in the control diet was replaced in unhulled rice in unhulled rice-soybean meal diets. Intestinal sample were taken from tissue around Meckel's diverticulum. Momiromann fed group showed significantly or had tended to be lower mRNA expression of proinflammatory cytokines (interleukin (IL)-1beta, IL-6, tumor necrosis like ligand 1A, interferon-gamma) than Corn or Takanari fed group. Takanari fed group had significantly higher mRNA expression of IL-10 or transforming growth factor-beta as regulatory cytokines than Momiromann fed group. CD3 and IL-2 mRNA expression in Takanari fed group were significantly higher than those in Momiromann fed group. Takanari fed group had tended to be higher plasma immunoglobulin A and G concentration than Momiromann fed group. The results suggest that effect of feeding of unhulled rice on intestine immunity was different from that of corn, and that breed of unhulled rices also affect the intestinal immunity.

(*Japanese Journal of Poultry Science*, 49 : J44-J47, 2012)

**Key words** : broiler, intentional-immune response, mRNA expression, unhulled rice for animal feed.