

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380147

研究課題名(和文)動物のストレス耐性向上のための包括的研究：酸化ストレス・代謝・免疫系の統合的制御

研究課題名(英文)Integrated control to improve animal performance under environmental stress conditions: interactions between oxidative stress and metabolic and immunological responses

研究代表者

豊水 正昭 (TOYOMIZU, Masaaki)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：80180199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は暑熱・内毒素ストレスが肉用鶏の生体におよぼす影響を調べた。慢性的な暑熱環境下では、骨格筋・肝臓ともに酸化ストレスが亢進したが、前者では抗酸化システムが活性化していたのに対し、後者ではこれが認められなかった。LPS投与時では、両組織において酸化ストレスは亢進しなかったものの、炎症性サイトカインの遺伝子発現量が増加した。抗酸化力に優れる電解還元水および有機セレン給与により、暑熱時の酸化ストレスは抑制されたものの増体量は回復しなかった。以上の結果より、暑熱ストレス時の増体量の回復は酸化ストレス制御のみでは十分ではなく、他の要因例えば腸内細菌叢の最適化なども重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：The present study was conducted to investigate the effect of heat stress (HS) and endotoxin stress on redox and metabolic states of broiler chickens. HS induced oxidative stress in skeletal muscle and liver. The anti-oxidant responses in the muscle were observed, but not in the liver. The treatments of birds with lipopolysaccharide did not induce oxidative damages to those tissues, while expression of inflammatory cytokines was enhanced. Then, electrolyzed reduced water and organic selenium were given HS-birds to aim at alleviating the oxidative stress and growth retardation. As results, oxidative stress was basically restored to normal values, whereas the growth in HS conditions was not improved by both treatments. Taken together, these findings suggest that not only regulation of oxidative stress but also optimization of other physiological alteration such as intestinal microbiota may be required in order to suppress the growth retardation due to HS conditions.

研究分野：動物生産科学、家禽科学、栄養生化学、代謝・生理学

キーワード：暑熱ストレス 活性酸素種 タンパク質分解速度 サイトカイン ミトコンドリア

## 1. 研究開始当初の背景

近年の畜産は、家畜の健康や福祉を重視した低ストレス環境下での生産形態を構築するという理想を掲げる一方で、現行の施設管理方式では抗ストレスや抗病性を担保することができない厳しい現実に直面している。ストレス緩和をモットーにした理想的家畜飼養を達成するためには、現行の酸化・免疫改善飼料添加物よりも効果のある新規物質の幅広い検索や複数の添加物の組み合わせなどの工夫が必要である。しかしながら、畜産動物の抗ストレス効果を著しく高めるための基礎および応用研究は未だ十分ではない。

これまでに、研究代表者は家禽における急性・慢性暑熱条件下における酸化ストレス亢進メカニズムの解明とそれに基づく飼料設計を実現している。すなわち、急性暑熱ストレス条件下のニワトリの骨格筋では、ミトコンドリアにおいて、活性酸素種 (ROS) の一種であるスーパーオキシドアニオンラジカル ( $\text{O}_2^-$ ) の産生量が著しく増加し (Mujahid et al., 2005; 2007)、さらに、この増加にはミトコンドリア膜電位の上昇が関与していることを実証した (Kikusato et al., 2010)。さらに、慢性暑熱感作時では、感作初期段階において上記ラジカルが過剰に発生するが、後期段階においてはこの過剰産生は起きておらず、酸化防御機構が活性化することを明らかにした (Azad et al., 2010)。他方で、研究代表者はこのような暑熱時の代謝応答メカニズムを制御する資材についても研究を行ってきた。急性暑熱ストレスにはオリーブオイルの給与 (Mujahid et al., 2009) が、慢性暑熱ストレスには電解還元水 (ERW) の給与 (松枝ら、日本家禽学会 2011 年度秋季大会) が、それぞれ生体組織の過酸化を抑制することを実証した。このように、研究代表者の研究により暑熱ストレスによるニワトリの代謝破綻プロセスの一端が解明され、さらにその有効な制御法も明らかにされた。しかしながら、いずれの資材給与時に、家禽の飼養成績は 100% 改善できておらず、特に慢性暑熱時での増体量の回復は 50% 程度にとどまっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、暑熱ストレスと同様に家畜生産低下主要因の一角を担う内毒素ストレスにも着目し、両ストレスが肉用鶏の成長ならびに抗病性におよぼす影響を明らかにすることを目的とする。具体的には、酸化ストレス、タンパク質分解 (ユビキチンプロテアソーム系) ならびに自然免疫の各応答メカニズムを複数臓器・器官に渡って統合的かつ包括的に調べ、さらに成長量改善 100% を目標に、上記の代謝・栄養・免疫系を統合的に制御できる資材を探索する。これにあたって、研究計画 1 年目では、まず

暑熱環境ならびに内毒素投与時のニワトリの酸化ストレス、タンパク質分解、免疫応答の変化の詳細を包括的に解明した (試験 1 および 2)。続く計画 2 年目では、種々の生理活性物質候補物質を *in vitro* 培養細胞実験によってスクリーニングし、細胞レベルでのストレス抑制作用を明らかにし、実践的に活用できる数種類の飼料資材を選抜した (試験 3)。計画 3 年目では、明らかにされたストレス亢進メカニズムに基づき、選抜された飼料資材 (ERW、有機 Se および枯草菌製剤) を *in vivo* 動物実験において、そのストレス抑制作用を検証した (試験 4 および試験 5)。

## 3. 研究の方法

**動物試験**：0 日齢オス肉用鶏 (Ross 系統、*Gallus gallus domesticus*) を供試し、肉用鶏用標準飼養に準拠した自家製飼料 (粗蛋白質：21%、代謝エネルギー：3,100 kcal/kg) を以下試験の基礎飼料として給与した。

**試験 1)** 2 週齢時まで幼雛用電気バッテリーで群育した後、環境温度制御室で 1 週間単飼した。22 日齢より、対照区を 25 °C とし、33 °C で慢性暑熱感作し (相対湿度 55 ± 5%)、28 日齢まで飼育した。同日齢において、動物を放血屠殺した後、血液、骨格筋 (浅胸筋) 肝臓、脾臓、腸管 (メッケル憩室付近) を採取し、液体窒素を用いて凍結粉碎し、-80 °C で保存した。いずれの期間中も、水および飼料は自由摂取とした。

**試験 2)** 33 °C の暑熱感作をせずにニワトリを 28 日齢まで飼育し、リポポリサッカライド (LPS、*Escherichia coli* 0127:B8) を腹腔内投与 (1 mg/kg BW) し、1、2、4、24 h 後において血液、脾臓、肝臓を採取した。

**試験 4)** 16 日齢までは試験 1 と同様に飼育し、同日齢からは ERW (日本トリム、TRIM ION TI9000) および、無機 Se・有機 Se (Se 酵母) を 0.17-0.51 ppm 含む飼料をニワトリに給与した。暑熱感作は試験 1 と同様に実施した。

**試験 5)** 上記基礎飼料に枯草菌製剤を 30-100 ppm 添加した飼料を暑熱感作終了時まで給与した。暑熱感作は試験 1 と同様に実施した。

試験 1-3 において、骨格筋・肝臓におけるカルボニル化タンパク質量および過酸化脂質含量を酸化ストレスマーカーとして DNPH および TBA を用いて比色定量し、骨格筋タンパク質分解の指標として 3 メチルヒスチジン (3M-His) 含量を HPLC を用いて測定した。さらに酸化関連因子などの遺伝子発現量をリアルタイム RT-PCR 法で解析した。また、上記組織中のスーパーオ

キシドジスムターゼ (SOD) 活性、グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 活性、グルタチオン (GSH) 含量を市販キットを用いて定量した。脾臓・腸管では、自然免疫関連因子の遺伝子発現量を解析した。

#### ニワトリ筋細胞培養試験：

**試験3)** 0日齢オス肉用鶏(上に同じ)を供試し、浅胸筋より筋芽細胞を単離・培養した。Differential adhesion法により筋芽細胞を濃縮した後、90φディッシュに播種し、10%(v/v)FBSを含むDMEM+M199(4:1)混合培地を用いて筋細胞を37℃・5%CO<sub>2</sub>条件下で約48時間培養した。増殖した筋芽細胞を回収後、遠心分離し、24ウェルプレートに45,000 cells/cm<sup>2</sup>となるよう播種し、80-90%サブコンフルエントに達するまで培養した。培養後、対照区を37℃として41℃で6時間高温感作し、細胞内ROS産生量を蛍光プローブCM-H<sub>2</sub>DCFDAを用いて定量した。

なお、いずれの試験においても、初生鶏は松本鶏園(蔵王、宮城)より入手し、全ての実験動物取扱いは東北大学動物実験専門委員会の承認を得て実施した。

### 4. 研究成果

#### 試験1)

暑熱・内毒素ストレス下における酸化ストレス、タンパク質分解ならびに免疫の各応答メカニズムを調べた。その結果、暑熱感作したニワトリの骨格筋・肝臓では、過酸化脂質・カルボニル化タンパク質含量が増加したが、血漿中3M-His含量は変化しなかった。骨格筋では、抗酸化酵素であるカタラーゼ(CAT)活性が低下したものの、総SOD活性の増加、ROS産生酵素NADPHオキシダーゼ(NOX4)のmRNA発現量の低下、ミトコンドリアROS産生タンパク質(avUCP)のmRNA発現量の上昇が認められ、骨格筋ではROS産生が低下する一方で、抗酸化防御システムが活性化している可能性が示唆された。また、骨格筋ではタンパク質分解関連因子FoxO・μ-calpainのmRNA発現量に変化は認められず、これらの結果と血漿中3M-His含量の結果を合わせて考えると6日間の暑熱感作後では体タンパク質分解が生じていないことが示された。

一方、肝臓では、抗酸化関連酵素ヘムオキシゲナーゼ(HO-1)のmRNA発現量は上昇したものの、総SOD活性の低下やNOX4 mRNA発現量の上昇が認められ、同器官では酸化ストレス誘導機構が暑熱感作6日後においても活性化していることが示唆された。

また、脾臓では炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子様リガンド1a(TL1A)、インターロイキン(IL)-1、IL-6のmRNA発現量が増加しており、暑熱にともない自然免疫能が亢進していることが示唆された。

#### 試験2)

LPS投与後、いずれの時間帯においても骨格筋筋・肝臓中の過酸化脂質含量に大きな変化は認められなかったが、24h後の肝臓・脾臓の重量は増加し、血漿中セルロブラズミン含量も増加した。脾臓においては、炎症性サイトカインであるインターフェロン(IFN)-γ、IL-6、TL1A、IL-10、誘導型NO合成酵素(iNOS)の各mRNA発現量がLPS投与により上昇し、そのレベルは1-2hで最大に達し、4h後には対照レベルまで戻ることが示された。

#### 試験3)

FeCl<sub>3</sub>/チオシアン酸塩を用いて潜在的還元力を評価するBAP(biological anti-oxidative potential、WISMERLL)テストを用いて、暑熱感作時の酸化ストレスを抑制する生理活性物質候補の選別を行った後、さらにこのうち一部の活性物質の高温ストレス緩和効果を*in vitro*培養細胞試験で検証した。

BAPテストの結果、典型的抗酸化物質であるコエンザイムQ<sub>10</sub>(CoQ<sub>10</sub>)、アスコルビン酸、Nアセチルシステイン(NAC)は非常に高い還元力を示し、0.5-500mMの濃度範囲内において、オリーブ特有成分オレウロペインはこれら3物質よりも高い抗酸化力を示すことが分かった。また、カシューナッツ殻油主成分アナカルド酸もある程度の還元力を示すことが分かった。アミノ酸の還元力はMet、Lys、Glyの順に高い値を示したがこれらの値は上記5物質に比べはるかに低く、二糖類トレハロースはほとんど還元力を示さなかった。

各種抗酸化物質候補をニワトリ筋細胞に添加し、高温感作した結果、アスコルビン酸(100-1000μM)、αトコフェロール(20-200μM)、無機Se(0.17-17nM)、有機Se、ERW添加によって、高温感作にともなう細胞内ROS産生量が低下した。なお、ニワトリ単離肝細胞を用いて、アナカルド酸の内毒素ストレス緩和効果を検証した結果、TNF-α/IFN-γ添加時の細胞内ROS産生ならびに脂質過酸化が同物質によって抑制されることが示された。

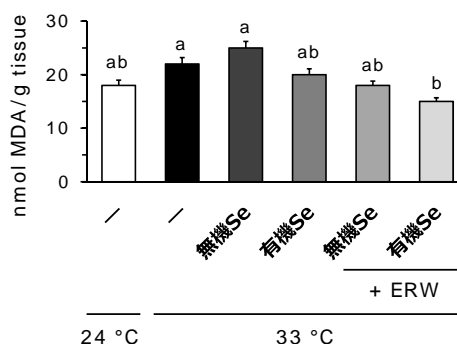


Fig. 1. 暑熱感作ニワトリ骨格筋の脂質過酸化 (means±SE., n = 8. \*P < 0.05)

#### 試験4)

ERW および無機 Se および有機 Se の同時給与による暑熱ストレス低減効果を評価した。両資材を暑熱感作鶏に組み合わせて給与した結果、有機 Se (Se 酵母、0.17 ppm) および ERW の同時給与時において過酸化脂質含量が最も低下することが示されたが (Fig. 1) 同給与条件における増体量の回復は一部に留まった。なお、精製 LPS 投与にともなう内毒素ストレスに対する ERW の作用も調査したが、有効な効果は得られなかった。

#### 試験5)

暑熱ストレス誘導要因の一つである腸管免疫能を改善した際と同ストレス緩和作用を検証した。枯草菌製剤 (30、50、100 ppm) を暑熱感作鶏に給与した結果、増体量ならびに飼料効率が濃度依存的に回復した。同製剤給与区では、腸管 IL-6、トランスフォーミング増殖因子 (TGF)- $\beta$ 、IL-10 の mRNA 発現量の低下ならびに乳酸菌占有率の増加が認められた (Fig. 2)。これらの結果より、腸内細菌叢・腸管免疫能の改善は暑熱ストレスの改善に有効であることが示された。

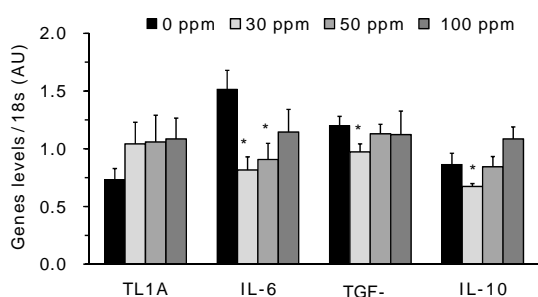


Fig. 2. 暑熱感作ニワトリの腸管炎症性サイトカイン発現量 (means  $\pm$  SE., n = 10-12. \*P < 0.05)

また、試験3において還元力は認められなかったものの、抗酸化成分保護作用ならびに自然免疫抑制作用を有すると考えられているトレハロースを肉用鶏に給与した結果、慢性暑熱感作時の脂質過酸化は抑制される傾向が示されたが、増体量はほとんど回復しなかった。

以上の結果より、暑熱にともなう酸化ストレスの緩和には吸収性の高い抗酸化資材の給与が有効である一方で、増体量の回復には腸内細菌叢改善の腸管免疫能の最適化が有効である可能性が示された。したがって、暑熱ストレスを100%改善するためには、上記のような異なった作用点を有する資材の併用が有効であると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計8件)

Kikusato, M., Yoshida, H., Furukawa, K. and Toyomizu, M./Effect of heat stress-induced production of mitochondrial reactive oxygen species on NADPH oxidase and heme oxygenase-1 mRNA levels in avian muscle cells/ The Journal of Thermal Biology/in press/2015/査読有

/DOI: 10.1016/j.jtherbio.2015.04.005

Furukawa, K., Kikusato, M., Kamizono, T., Yoshida, H and Toyomizu, M./Possible involvement of mitochondrial reactive oxygen species production in protein degradation induced by heat stress in avian muscle cells/The Journal of Poultry Science/52:in press/2015/ 査読有 /

https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jpsa

Ohtsu, H., Yamazaki, M., Abe, H., Murakami, H. and Toyomizu, M./ Heat stress modulates cytokine gene expression in the spleen of broiler chickens/ The Journal of Poultry Science/ in press/2015/ 査読有 /

https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jpsa

Nanto, F., Ito, C., Kikusato, M. and Toyomizu, M./ Effects of whole-grain paddy rice on growth performance, oxidative stress and morphological alterations of the intestine in broiler chickens exposed to acute and chronic heat stress /The Journal of Poultry Science/52:109-118/2015/ 査読有 /DOI: 10.2141/ jpsa.0140009

Azad, M.A.K., Kikusato, M., Zulkifli, I. and Toyomizu, M./ Electrolyzed reduced water decreases reactive oxygen species-induced oxidative damage to skeletal muscle and improves performance in broiler chickens exposed to medium-term chronic heat stress/ British Poultry Science/54:503-509/2013/ 査読有 /DOI:10.1080/00071668.2013.801067

[学会発表](計19件)

Nanto, F., Kikusato, M., Ohwada, S., Takahashi, K. and Toyomizu, M./ Effect of paddy rice diets on intestinal morphology and inflammatory responses in broiler chickens under chronic heat stress conditions/ The 10th Asian Pacific Poultry Conference/Jeju, Korea/2014, October 19-23/査読有

Toyomizu, M. and Kikusato, M./ Mitochondrial Function and Poultry

Production (招待講演) / The 10th Asian Pacific Poultry Conference/ Jeju, Korea/2014, October 19-23/査読有  
松野良平・喜久里基・豊水正昭/鶏の慢性暑熱ストレスに対する電解還元水とセレン酵母の同時給与効果/日本家禽学会 2015 年度春季大会(宇都宮大学/栃木県宇都宮市)/2015 年 3 月 30 日  
南都文香・喜久里基・松本悠・陶山佳久・向井和久・豊水正昭/籾米飼料へのトレハロース添加は慢性暑熱曝露鶏の成長とも腸内細菌叢に影響を及ぼす/日本家禽学会 2015 年度春季大会(宇都宮大学/栃木県宇都宮市)/2015 年 3 月 30 日  
南都文香・喜久里基・大和田修一・豊水正昭/暑熱曝露にともなう鶏腸管の形態損傷ならびに内毒素の血中流入は飼料摂取量低下に起因しない/日本家禽学会 2014 年秋季大会(鹿児島大学/鹿児島県鹿児島市)/2014 年 9 月 27~28 日  
松野良平・喜久里基・古川恭平・大津晴彦・高橋和昭・豊水正昭/電解還元水給与による慢性暑熱曝露鶏の酸化ストレス緩和機構の解明ならびに炎症応答抑制効果の検証/日本家禽学会 2014 年春季大会(エポルカつくば/茨城県つくば市)/2014 年 3 月 29 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

豊水 正昭 (TOYOMIZU Masaaki)  
東北大学・農学研究科・教授  
研究者番号: 80180199

### (2) 研究分担者

高橋 和昭 (TAKAHASHI Kazuaki)  
山形県立米沢栄養大学・健康栄養学科・教授  
研究者番号: 80183440

大津 晴彦 (OHTSU Haruhiko)

(独) 農業・食品産業技術総合研究機構・畜産草地研究所・主任研究員  
研究者番号: 40455316

喜久里 基 (KIKUSATO Motoi)

東北大学・農学研究科・助教  
研究者番号: 90613042

### (3) 連携研究者

なし