

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660213

研究課題名(和文)新たに発見したデスアシルグレリンの体温低下作用による家畜の熱中症防止の検証

研究課題名(英文) Inspection of the prevention of heat stroke of the domestic animal by the des acyl ghrelin which decrease body temperature

研究代表者

村上 昇 (MURAKAMI, NOBORU)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：80150192

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：夏期の高温下での家畜の熱中症は多大な経済的損害を与える。我々はデスアシルグレリンが体温を低下させることをラットの投与実験で見いだした。そこで、夏期の高温時に肉牛と和牛においてデスアシルグレリンの臨床研究を行ったところ、熱中症防止の効果が認められた。またラットの実験から、デスアシルグレリン投与は高温下での血液性状の増加的变化(クレアチニン、尿素窒素、ヘマトクリットなど)を正常に維持する作用があることが判明した。以上の結果、デスアシルグレリンが熱中症予防に有効であると思われる。

研究成果の概要(英文)：The heat stroke in domestic animals under the high temperature of the summer causes the economic damage. We found that treatment with desacyl ghrelin reduced body temperature in rats. Therefore we examined whether desacyl ghrelin prevent the heat stroke in beef cattle and dairy cattle at the high temperature of the summer, and observed an effect of the prevention of heat stroke. In addition, in a rat experiment, treatment with desacyl ghrelin improved normally the incremental change (creatinine, urea nitrogen and hematocrit etc.) of the blood property under the high temperature. These results suggest that desacyl ghrelin may be effective for the heat stroke prevention.

研究分野：獣医生理学

キーワード：トランスレーショナルリサーチ グレリン デスアシルグレリン 熱中症 体温

### 1. 研究開始当初の背景

我が国の夏期の全国的な高温化は深刻な状況にあり、夏期の家畜の損耗における経済的損失は約8億円近くに及ぶと言われている。これには、牛や豚の繁殖率・受胎率の低下(例えば、宮崎では通年の平均受胎率は牛で約43%であるのに対し、6月~10月は18~25%まで低下する)、鶏の産卵率低下、乳牛での乳量および豚の増体率低下などが含まれている。そのため、県や国では気温湿度指数をもとに、家畜への散水や送風などを奨励しているが、我が国の飼養形態(密飼い)では有効な処置とは言えない状況にある。一方で、現在でも人を含め熱中症の有効な治療薬は開発されていない(熱中症に解熱剤は使用できないため)。我々はこれまでに、様々な新規ペプチドの生理作用を探索し、その応用研究を展開してきた(Nature 409:194-198, 2001、J. Endocrinology 174, 283-288, 2002。Biochem. Biophys. Res. Commun. 303(3):751-755, 2003,他)とところが最近、胃で合成され、血中へ分泌されるデスアシルグレリンに極めて強い体温低下作用があることを発見し、ラットにおいてデスアシルグレリンの投与が高温下(33度以上)での致死率を著しく阻止することを発見した(Biochem. Biophys. Res. Commun. 430:278-283, 2012)。また、牛のデスアシルグレリンの構造を決定し、これを合成して、夏季の灼熱下での牛に投与した結果、体温が低下し、ストレスの指標である副腎皮質ホルモンや血圧、呼吸などが極めて安定することを予備実験で見いだした。このような恒常性に関わる新規ペプチドを応用すれば灼熱下での体温の変化に対する生体防御に資する可能性がある。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに新規ペプチドホルモンのトランスレーションリサーチを展開してきた。例えば、グレリンがラットの摂食や乳汁分泌を促進することを見だし、これを、伴侶動物の摂食低下症の治療や乳牛での乳汁増加に応用した。最近、ペプチドのデスアシルグレリンに強い体温低下作用があることを発見し、灼熱下での牛の熱中症の予防に効果があることを関連学会で報告した(国内外特許出願済み)。そこで、膨大な経済的損失を起こしている全国的な、夏季の家畜の生産低下(牛・豚の生産や増体率低下、乳汁生産の低下、牛の繁殖率・受胎率の低下、鶏の産卵率低下等)に対するデスアシルグレリンによる損耗防止効果の検証を行うことを企画した。特に今回は、肉牛(体温)、乳牛(体温と乳量)での夏期における熱中症防止効果を検討する。また実験的に高温下における実験動物でのデスアシルグレリンの熱中症予防機序を検討する。

### 3. 研究の方法

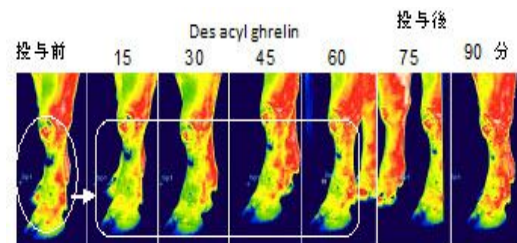
#### (1) 和牛および乳牛のデスアシルグレリン

の体温低下作用や乳量への影響について：これまでの予備実験において、本学の附属牧場の乳牛2頭、和牛3頭を用いて、夏季(気温30度以上の日)に牛合成デスアシルグレリンを10μg/Kg単一末梢投与した。その結果すべての牛において、体表体温(サーモグラフィ)の低下と直腸温が有意に低下(最大3.2度、最低0.9度低下)した。そこで、本実験では、和牛9頭、乳牛4頭を用いて、デスアシルグレリンの投与量依存性の体温低下、および体温低下持続時間を詳細に検討した。乳牛ではさらに乳量への影響を調べるために5日間毎日2回、デスアシルグレリンあるいはグレリンを投与し、毎日午前中の乳量を測定した。また、投与翌日のミルク中へのデスアシルグレリンの排出の有無、および乳汁成分を投与前と比較し、乳汁成分におよぼす影響の有無を検討した。

(2): ラットにおける高温下でのデスアシルグレリンの熱中症予防効果の評価  
ラットを高温高湿下飼育し、デスアシルグレリンを投与した時の致死率を調べ生理食塩水投与群と比較検討する。また、経時的に血液を採取し、血中デスアシルグレリンの動態、ヘマトクリット、熱射病の指標となるGPT、GOT、BUN、クレアチン、Naイオン、Caイオンの濃度を測定する。また解剖後の各種臓器重量や組織形態学検査を実施する。

### 4. 研究成果

(1): 和牛および乳牛のデスアシルグレリンの体温低下作用や他の生理機能への影響について  
デスアシルグレリンの牛の体温低下作用の検証実験を平成26年と27年の夏に宮崎大学農学部附属牧場で行った。和牛においてはまず、体表体温と直腸温度が並行して推移することを確認したので、ストレスの影響を除くために直腸温度は測定しないこととし、離れた距離からの下肢のサーモグラフィのみでの解析を行った(下の写真)。



最初の年度は成熟和牛(黒毛)6頭を用いて、製薬企業で合成した牛デスアシルグレリン(10μg/kg体重あるいは20μg/kg体重)、また対象群として生理食塩水を頸静脈に単一投与し、四肢温度を経時的に記録した。次年度は和牛3頭と乳牛4頭を用いて行った。和牛では主に四肢の体表体温を、乳牛では体幹と乳房の体表体温を標的とした。尚乳牛については投与日およびその前後の乳量について

でも検討した。1回の実験は1日で終わるので、少なくとも3日間隔をあけて、繰り返し4回実験を行った。尚、気温が30度以上達しなかった実験については結果を除外した。実験はすべて午後1時から開始した。正午までは風通しの良い牛舎(日陰)内に置き、その後外の日当たりの良い牛場に置いて実験した。

2年間の和牛での実験をすべてまとめると、生理食塩水投与群は四肢の体表温度は平均39.6度に達したのに対し、デスアシルグレリンを投与したものは平均38.2度近くまで減少し、その減少は約75分間程度持続した。また、投与群では心拍数および呼吸数に有意な減少が認められた。

乳牛での乳房表面温度は灼熱のために40度近くになったが、デスアシルグレリンを単一投与すると、体幹温度および乳房表面温度ともに15分~30分後から有意に低下し始め約1時間後に最低値を示し、その低下は約2時間持続した。平均で38.1度であった。デスアシルグレリンあるいはグレリンを5日間投与した結果、乳量はグレリン投与群で102.3%の増加であった。デスアシルグレリンには有意な増加は認められなかった。またミルク中でグレリンやデスアシルグレリン濃度は検出できなかった。さらにミルク成分にも変化は認められなかった。

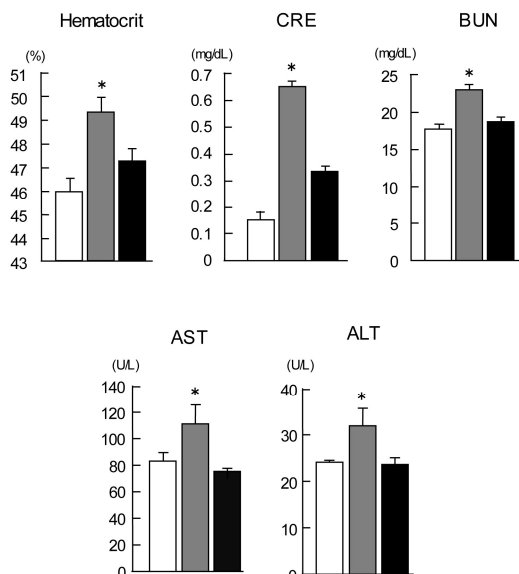
(2): ラットにおける高温下でのデスアシルグレリンの熱中症予防効果の評価:

ア) 高温下飼育でのラットの体温に対するデスアシルグレリンの影響

ラットを通常温度の飼育室から高温・高湿度室へ移すと、30分後には、食塩水投与ラットでは体表体温は36°Cから40°Cに徐々に増加し、80分後には41.2°Cに達した。一方で、デスアシルグレリン投与では、この体温の増加は緩和され、80分後で40°Cで維持された。両者の間には有意差が認められた。

イ) 高温下飼育ラットでのヘマトクリットおよび血清CRE、BUN、AST、ALTの濃度に対するデスアシルグレリン投与の影響

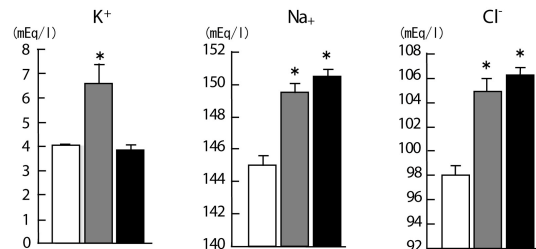
高温・高湿度に移されたラットでは生理食塩水投与を行うと、ヘマトクリットの有意な増加とAST、ALT、BUNとクレアチニンの



血清レベルの増加が認められた。他方、デスアシルグレリン投与ラットでは、このヘマトクリットの有意な増加やAST、ALT、BUNとクレアチニンの血清レベルは、投与後90分でも増加せず、正常の値が維持された。(上の図: 白棒は通常温度での飼育、灰色と黒棒は高温高湿下飼育で灰色は生理食塩水投与、黒棒はデスアシルグレリン投与群を示す)

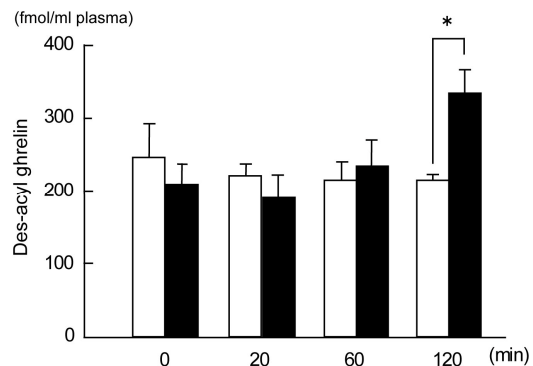
ウ) Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>の血清レベルに対する高温とデスアシルグレリン管理の影響

同様に、Na<sup>+</sup>、K<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>の血清レベルも高温高湿下では有意に増加したが、デスアシルグレリン投与ラットでは、K<sup>+</sup>の上昇を抑制した。一方で、Na<sup>+</sup>とCl<sup>-</sup>の血清レベルの増加は抑制できなかった。(下の図: 白棒は通常温度での飼育、灰色と黒棒は高温高湿下飼育で灰色は生理食塩水投与、黒棒はデスアシルグレリン投与群を示す)



エ) 高温と標準温度状況の下に収容されるラットのプラズマデスアシル・グレリン濃度血中の内因性のデスアシルグレリンが高温・高湿下でどのように変化するかを調べるために、高温高湿にラットを移動し、経時的に採血した血中濃度を測定した。その結果、デスアシルグレリンの濃度の有意な増加が、120分後に観察された。(上の図: 白棒は通常温度での飼育、灰色と黒棒は高温高湿下飼育で灰色は生理食塩水投与、黒棒はデスアシルグレリン投与群を示す)

高温条件下において、血中デスアシルグレリン濃度が上昇したこと及びデスアシルグレリン末梢投与が持続的な体温上昇を抑制し、



生存率を上昇させたことから、デスアシルグレリン投与は高温条件下における体温上昇に対して、生理学的に有用である可能性が示唆された。

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5件)

1. K Nakahara, A Akagi, K Mori, M Miyazato, K Kangawa, S Shimizu, AW Qattali, N Murakami

: Involvement of endogenous neuromedin U and neuromedin S in thermoregulation. **Biochemical and Biophysical Research Communications** 470:930-935, 2016 査読有り DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.01.155.

2. Y Inoue, Y Hayashi, K Kangawa, N Murakami, K Nakahara: Des-acyl ghrelin prevents heatstroke-like symptoms in rats exposed to high temperature. **Neuroscience Letters** 615:28-32, 2016 査読有り DOI: 10.1016/j.neulet.2016.01.003.

3. R.Okame, K.Nakahara, N.Murakami: Plasma amino acid profiles at various reproductive stages in female rats. **J. Vet. Med. Sci.** 77(7):815-821, 2015 査読有り DOI: 10.1292/jvms.15-0095.

4. R.Okame, K.Nakahara, Y.Kato, M.Bannai, N.Murakami: Comparison of amino acid profiles between forced running exercise and voluntary running exercise in rats. **J. Vet. Med. Sci.** 77(6):661-668,2015 査読有り DOI: 10.1292/jvms.15-0020

5. Y Suzuki, K Nakahara, K Maruyama, R Okame, Y Inoue, N Murakami: Changes in mRNA expression of hypothalamic appetite-regulating peptides during different phases of lactation in rats. **J Mol Endocrinol.** 52(2):97-109, 2014 査読有り DOI: 10.1530/JME-13-0015.

[学会発表](計6件)

1. 村上 昇、中原桂子：“摂食と走行運動の相反的調節機構”第158回日本獣医学会(2015年9月7日)北里大学 青森

2. 丸田めぐみ、清水誠也、中原 桂子、村上昇：“食餌性肥満マウスにおけるレプチン抵抗性獲得時期の検討”第158回日本獣医学会(2015年9月7日)北里大学 青森

3. 立野 聡、中原 桂子、村上 昇：“ニューロメジンUとSの欠損マウスの行動リズムの解析”第158回日本獣医学会(2015年9月7日)北里大学 青森

4. 大亀 吏江子、鈴木 喜博、丸田めぐみ、中原 桂子、村上 昇：“肥満マウスの血液アミノ酸プロファイルと末梢アミノ酸センシングの中枢への神経伝達の可能性”157回日本獣医学会(2014年9月9日)北海道大学

5. 村上 昇、中原桂子：“Val欠乏食摂取による脂質代謝の変化”第35回日本肥満学会(2014年10月25日)宮崎市 シーガイア

6. 鈴木 喜博、中原 桂子、村上 昇：“内臓脂肪蓄積型肥満マウス“C57BL/6J-Daruma”の表現系とインスリン抵抗性の雌雄差について”第157回日本獣医学会(2014年9月9日)北海道大学

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)  
なし

取得状況(計0件)  
該当無し

[その他]

ホームページ等

[http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/vet\\_phy/index.htm](http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/vet_phy/index.htm)

6. 研究組織

(1)研究代表者

村上 昇(MURAKAMI NOBORU)  
宮崎大学・農学部・教授  
研究者番号：80150192

(2)研究分担者

小林 郁雄(KOBAYASHI IKUO)  
宮崎大学・農学部・准教授  
研究者番号：20576293

中原 桂子(NAKAHARA KEIKO)  
宮崎大学・農学部・准教授  
研究者番号：90315359

北原 豪(KITAHARA GOU)  
宮崎大学・農学部・助教  
研究者番号：90523415