

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19580312  
 研究課題名（和文） ストレス緩和に伴う生理活性物質の変動解析による鶏の快適さの評価  
 研究課題名（英文） Estimation of comfort in chicks using analysis for changes of bioactive substances after release from stress.  
 研究代表者  
 豊後 貴嗣（BUNGO TAKASHI）  
 広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授  
 研究者番号：40325361

## 研究成果の概要：

摂食行動調節と生理活性物質との関係から情動状態の把握の可能性を検討した。その結果、間脳遺伝子発現量および血液性状の変化からストレス刺激の種類あるいはその強度を評価できること、終脳ドーパミン濃度の左右差が情動指標となる可能性が示唆された。また、これら変化と行動等表現型との関係がさらに明らかになった場合は家畜のストレス状態の評価が容易になるものと考えられた。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 ・畜産学・草地学

キーワード：家畜福祉

## 1. 研究開始当初の背景

今日の「家畜福祉」研究におけるアプローチのひとつとしてストレス関連物質を指標とした検討、とりわけ、血中グルココルチコイド濃度あるいは好中球/リンパ球比の変動について多くの研究が行われている。しかし、「ストレス軽減」は「快適」により近づく方策ではあるが、「快適さ」を理解するには充分とはいえない。すなわち、家畜にとっての「より快適な環境」を評価するにはストレスという「不快情動」の一側面から追求するだけでなく、「快情動」の面からも検討を加える必要がある。

われわれはこれまで、摂食調節に働くホルモンなどの多くが濃度によって摂食行動調節作用あるいは鎮静作用といった二つの側面を持つことを明らかとした。したがって、摂食行動調節と生理活性物質との関係をひとつの糸口として快・不快といった「情動状態」の変化を捉えうるものと考えられる。さらに、ここで得られた知見をもとにさまざまな条件下における生理活性物質の変動を解析し、家畜にとっての「より快適な環境」を客観的に評価できるものとする。

## 2. 研究の目的

本課題では、中枢および血中における生理活性物質の変動およびその相互関係について、ストレス負荷時からストレス緩和後にかけて経時的に調査し、それら変動に伴う行動変化についても検討を行う。これによって、行動生理学的観点からニワトリの「快および不快情動」を明らかにし、家畜における「快適さ」を評価する新たな指標を確立するための基礎的情報を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

＜試験1＞ストレス負荷がヒナの血液性状および摂食関連ペプチドホルモン遺伝子発現量におよぼす影響：供試動物は、3-5日齢のニワトリ雄ヒナを用いた。飼育および試験は、24時間点灯、環境温度30℃の恒温条件下で行なった。種々のストレスをヒナに負荷し、間脳の摂食関連ペプチドホルモン遺伝子発現量および血液性状を調査した。血液は血漿を分離し、血中コルチコステロン、グルコースおよび遊離脂肪酸濃度の測定に供した。採取した間脳からはTotal RNAを抽出し、各遺伝子発現量をQuantitative PCR法により解析した。

＜試験2＞ストレスからの解放がヒナの血液性状および摂食関連ペプチドホルモン遺伝子発現量におよぼす影響：供試動物は、3-5日齢のニワトリ雄ヒナを用いた。飼育および試験は24時間点灯、環境温度30℃の恒温条件下で行なった。種々のストレスをヒナに負荷し、その解放後の間脳遺伝子発現量の変動を調査した。

＜試験3＞ストレス関連ホルモンおよび緩和薬剤投与の影響：供試動物は、3-5日齢のニワトリ雄ヒナを用い、脳室内にコルチコステロンあるいはmu受容体アゴニストを投与してその後の行動および間脳遺伝子発現量の変化を調査した。

＜試験4＞ニワトリ中枢におけるモノアミン濃度の日内変動と情動行動：試験は、約500日齢白色レグホーン系産卵鶏を供試した。光線管理は8時点灯の14L10D、環境温度は24℃恒温とした。飼料および水は点灯と同時に十分量を一括給与した。供試鶏は各々9、12、15、18および21時に断頭屠殺し、終脳および間脳のモノアミン濃度を測定した。なお、行動観察は、屠殺前1時間に行ない、情動指標である羽繕いおよび床つづきの出現回数を記録した。

### 4. 研究成果

＜試験1＞

①単離ストレス：ストレス負荷10分後においてニワトリヒナの血漿コルチコステロン濃度は上昇し、30分後では対照区よりも高値では

あったものの低下することが示された。間脳コルチコトリピン放出因子およびアルギニンバソトシン遺伝子発現量はコルチコステロン濃度と同様な変動をすることが認められた。しかし、ニューロペプチドY遺伝子発現量については対照区と比較して有意な変化は認められなかった。一方、ニューロペプチドY中枢投与後にストレス負荷を行なった場合、間脳コルチコトリピン放出因子遺伝子発現量は低下する傾向が認められた。

#### 単離ストレス負荷後のニワトリ間脳遺伝子発現

	CRF	AVT	NPY	POMC
無処理	1.03	0.85	0.88	1.28
負荷5分後	1.27	1.30	0.80	1.95
負荷10分後	2.05	1.34	0.79	2.06
P値	*	*	NS	NS

CRF: コルチコトリピン放出因子、  
AVT: アルギニンバソトシン  
NPY: ニューロペプチドY  
POMC: プロオピオメラノコルチン  
NS: 有意差無し、\*: P<0.05

②暑熱ストレス：ストレス負荷15分後、ヒナの直腸温は上昇しニューロペプチドY遺伝子発現量も増加する傾向が認められたが、間脳コルチコトリピン放出因子遺伝子発現量および血漿コルチコステロン濃度いずれも対照区と比較して差は示されなかった。ストレス負荷30分後では、コルチコステロン濃度およびニューロペプチドY遺伝子発現量ともに対照区と比較して有意に高い値を示したが、間脳コルチコトリピン放出因子遺伝子発現量において差は認められなかった。

③絶食ストレス：24時間の絶食によって、ヒナの間脳ニューロペプチドYおよびアグチ関連蛋白発現量は増加し、プロオピオメラノコルチン遺伝子発現量は減少することが認められた。また、ストレスとの関係が指摘されているインスリンに関して、間脳におけるその受容体遺伝子発現量が肉用種ヒナで絶食ストレスによって高くなった。

④拘束ストレス：拘束ストレス負荷後10分においてプロオピオメラノコルチン遺伝子発現量は高いことが示された。

#### 拘束ストレス負荷後のニワトリ間脳遺伝子発現

	CRF	AVT	NPY	POMC
無処理	1.28	1.08	0.93	1.41
負荷5分後	1.46	1.03	0.81	1.19
負荷10分後	1.47	1.03	1.10	2.05
P値	NS	NS	NS	*

CRF: コルチコトリピン放出因子、  
AVT: アルギニンバソトシン

NPY: ニューロペプチドY  
 POMC: プロオピオメラノコルチン  
 NS: 有意差無し、\*: P<0.05

以上の結果から、ストレスあるいは生理条件によって測定対象となるペプチドホルモンが異なることが示された。

<試験 2>

血漿コルチコステロン濃度は、単離および拘束ストレスいずれにおいてもその解放後時間経過的に低下した。間脳の遺伝子発現は、単離ストレスではコルチコトロピン放出因子が解放後も無処理区より高い値を示し、プロオピオメラノコルチン遺伝子発現は、解放後10および30分において無処理および対照区と比較して高かった。血液性状と遺伝子発現量との関係において、単離ストレス解放では血漿コルチコステロン濃度とプロオピオメラノコルチンとの間に負の相関が認められた。

単離ストレス解放後のニワトリ間脳遺伝子発現

	CRF	AVT	NPY	POMC
無処理	1.42	0.79	1.00	0.61
負荷直後	2.94	1.10	0.91	0.49
解放 5 分後	2.77	1.20	1.06	1.01
解放 10 分後	2.48	1.24	1.02	1.54
解放 30 分後	1.99	1.02	0.96	1.29
P 値	**	NS	NS	**

CRF: コルチコトロピン放出因子、  
 AVT: アルギニンバソトシン  
 NPY: ニューロペプチドY  
 POMC: プロオピオメラノコルチン  
 NS: 有意差無し、\*: P<0.01

一方、拘束ストレスではニューロペプチドY遺伝子発現が解放後時間経過的に低下し、プロオピオメラノコルチン遺伝子発現は、処理および対照区の値が無処理区と比較して高いことが認められた。各測定値間の関係では、ニューロペプチドY遺伝子発現がコルチコステロン濃度およびプロオピオメラノコルチン遺伝子発現との間に負の相関を示した。

拘束ストレス解放後のニワトリ間脳遺伝子発現

	CRF	AVT	NPY	POMC
無処理	1.25	0.73	1.05	0.63
負荷直後	1.21	0.60	0.94	1.04
解放 5 分後	1.36	0.78	0.74	1.49
解放 10 分後	0.70	0.70	0.66	1.09
解放 30 分後	1.14	0.67	0.61	1.15
P 値	NS	NS	**	**

CRF: コルチコトロピン放出因子、  
 AVT: アルギニンバソトシン  
 NPY: ニューロペプチドY

POMC: プロオピオメラノコルチン  
 NS: 有意差無し、\*: P<0.01

以上の結果から、いずれのストレス刺激においてもプロオピオメラノコルチン遺伝子発現の増加はストレス解放後の指標となることが考えられた。

<試験 3>

コルチコステロン投与によって、プロオピオメラノコルチンおよびアルギニンバソトシン遺伝子発現量はそれぞれ投与10および15分後に対照区より低いことが認められた。また、コルチコトロピン放出因子遺伝子発現量も投与後15分において低い傾向が認められた。このことから、コルチコトロピン放出因子のみならず間脳のプロオピオメラノコルチンおよびアルギニンバソトシン神経系もストレス負荷後にみられる血中コルチコステロン濃度の上昇の影響を受けるものと推察された。一方、コルチコステロン投与によるニューロペプチドY遺伝子発現への影響は示されなかったが、コルチコステロン放出因子遺伝子発現との間に負の相関関係が認められた。哺乳類において、ストレス負荷によって分泌されたコルチコステロンは中枢のニューロペプチドY分泌を促すことが報告されており、同様の結果であるものと考えられた。

CORT投与後の間脳遺伝子発現

	投与10分後		投与15分後	
	対照区	CORT区	対照区	CORT区
CRF	0.70	0.70	2.14	1.40†
AVT	1.70	1.50	2.62	1.61*
NPY	1.18	1.19	0.91	1.02
POMC	1.04	0.79*	1.37	1.32

CORT: コルチコステロン  
 CRF: コルチコトロピン放出因子、  
 AVT: アルギニンバソトシン  
 NPY: ニューロペプチドY  
 POMC: プロオピオメラノコルチン  
 †: P<0.1, \*: P<0.05

muオピオイド・アゴニスト投与によって間脳プロオピオメラノコルチン遺伝子発現は抑制されること、エンドルフィンのN末端断片がmu受容体の部分アゴニストとしてエンドルフィンの効果を緩和することが示された。

以上の結果から、コルチコステロンの分泌調節には、コルチコトロピン放出因子、アルギニンバソトシンそしてプロオピオメラノコルチン神経系が関与し、ニューロペプチドY神経系は間接的に関与していること、プロオ

ピオメラノコルチン神経系の活動が、mu受容体を介して情動の調節に関連している可能性が考えられた。

#### <試験4>

床つっきの発現頻度は少なく、いずれのモノアミン濃度との間に相関関係は認められなかった。羽繕いでは間脳のドーパミンおよびセロトニン濃度との間に負の相関関係が示されるとともに、終脳におけるドーパミン濃度の左右比との間に正の相関関係が示された。さらに、終脳におけるドーパミン濃度の左右差が最も大きくなる時間帯が、維持行動の影響を受けない15時頃の時間帯であることが認められた。

#### 産卵鶏の終脳DA濃度の日内変動

時刻	DA (ng/mg wet tissue)		P値
	左終脳	右終脳	
09:00	1.31	1.75	NS
12:00	1.36	0.88	NS
15:00	1.40	0.88	**
18:00	1.63	0.83	NS
21:00	1.57	1.56	NS

DA: ドーパミン

NS: 有意差無し、\*\*: P<0.01

#### <総合考察>

以上より、間脳遺伝子発現量および血液性状の変化からストレス刺激の種類あるいはその強度を評価できる可能性が示唆されること、終脳ドーパミン濃度の左右差が情動指標となる可能性が示唆された。また、これら変化と行動等表現型との関係がさらに明らかになった場合は家畜のストレス状態の評価が容易になるものと考えられた。とりわけ、終脳におけるモノアミン濃度の左右差については、生理学的意義を含めて今後さらに追求していく必要はあるものの、情動との関連性については新知見であり、家畜福祉での情動研究において新たな展開が期待される。

#### 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 2件)

(1) Shiraishi, J.-i., Yanagita, K., Fujita, M. and Bungo, T. Mu-Opioid receptor agonist diminished POMC gene expression and anorexia by central insulin in neonatal chicks. *Neuroscience Letters*, (査読有) 439 (2008) 227-229.

(2) Yanagita, K., Shiraishi, J.-i., Fujita, M. and Bungo, T. Effects of N-terminal fragments of  $\beta$ -endorphin on feeding in chicks. *Neuroscience Letters*, (査読有) 442 (2008) 140-142.

[学会発表] (計 5件)

(1) 松浦真紀・吉田菜美・柳田光一・豊後貴嗣 産卵鶏における中枢モノアミン濃度と情動行動との関係. 日本家禽学会春季大会. 2009/3/28: 藤沢市.

(2) 柳田光一・白石純一・田原有紀・西川文也・豊後貴嗣 コルチコステロン投与がニワトリヒナ中枢の遺伝子発現に及ぼす影響. 第33回日本鳥類内分泌研究会. 2008/11/14: 草津市.

(3) 柳田光一・白石純一・藤田正範・豊後貴嗣 ストレス負荷がニワトリヒナの間脳遺伝子発現および血液性状に及ぼす影響. 日本家禽学会春季大会. 2008/3/28: 水戸市.

(4) 柳田光一・白石純一・豊後貴嗣・藤田正範 ストレス負荷がヒナの血液性状と間脳NPYおよびCRF mRNA発現に及ぼす影響. 第32回日本鳥類内分泌研究会. 2007/11/16: 高松市.

(5) 白石純一・柳田光一・藤田正範・豊後貴嗣 産卵鶏および肉用鶏ヒナにおける中枢インスリン介在性摂食調節機構の相違. 日本家禽学会秋季大会. 2007/9/29: 岡山市.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

豊後 貴嗣 (BUNGO TAKASHI)  
広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授  
研究者番号: 40325361

##### (2) 研究分担者

##### (3) 連携研究者