

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580293

研究課題名(和文) 食餌内容による消化管運動制御及び摂食行動制御の可能性

研究課題名(英文) The possibility that the diet contents control the digestive tract motility and the feeding behavior.

研究代表者

平松 浩二 (HIRAMATSU KOHZY)

信州大学・農学部・教授

研究者番号：80238386

研究成果の概要(和文): 食餌内容が消化管の運動性と摂食行動を制御する可能性についてヒヨコを用いて検討した。視床下部において、摂食亢進系のペプチドである NPY とソマトスタチンの分布を明らかにした。食餌中のタンパク質含量の低下あるいはメチオニンやリジンの食餌への添加により、消化管運動に關与する消化管内分泌細胞の分布密度は低下した。しかし、視床下部の NPY とソマトスタチンの分布に明白な変化はなかった。以上の結果から、食餌中のタンパク質含量の調節およびアミノ酸添加による消化管運動性制御の可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文): I discussed the possibility that the diet contents control the digestive tract motility and the feeding behavior in chicks. The patterns of distribution of NPY and somatostatin, which stimulate the feeding behavior, were clarified in the chick hypothalamus. The decrease in diet protein content and the supplementation of methionine or lysine in the diet decreased the density of endocrine cells involved in the digestive tract motility. Obvious changes, however, were not recognized in the distributional pattern of NPY and somatostatin in the hypothalamus. It is suggested that the diet contents may control the motility of the digestive tract.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、応用動物科学

キーワード：摂食制御、消化管運動性、消化管内分泌細胞、免疫組織化学法、グルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1)、ニューロテンシン、視床下部、ニワトリ

## 1. 研究開始当初の背景

腸管の運動制御に関する研究は、神経学的側面から多くの研究がなされてきた。つまり、腸管の粘膜下神経叢及び筋層間神経叢における神経細胞の同定とその投射の解明が主であった (Sundler et al., Arch. Histol.

Cytol., 1989; Brookes, Anat. Rec., 2001)。一方、腸管にはセロトニンなどのモノアミンあるいはグルカゴン様ペプチド I (以下 GLP-1) やニューロテンシン (以下 NT) などのペプチドホルモンを分泌する細胞が多数存在し、消化管の運動機能に関わるとされ

ている。これらの内分泌細胞は、いわゆる開放型内分泌細胞に区分され、腸管腔内の化学的信号（pH の変化やアミノ酸の存在など）を受容して、血中にホルモンを放出し生理学的反応を引き起こす。これまでに申請者らはニワトリの腸管内分泌細胞に関して次のことを明らかにした。

- (1) ニワトリの腸管にも、多数の GLP-1 及び NT 含有細胞が粘膜上皮に分布する (Hiramatsu et al., J. Poultry Sci., 2003, 2005)
- (2) 哺乳類では大腸に多く現れる GLP-1 含有内分泌細胞が、ニワトリでは小腸、特に回腸で最も多く見られる (Hiramatsu et al., J. Poultry Sci., 2005)
- (3) 絶食あるいは制限給餌により GLP-1 及び NT 含有細胞の分布密度は減少する
- (4) 絶食により消化管内分泌細胞は、核の分葉化や空胞の出現などの変性像を示す
- (5) 食餌中のタンパク質含量を減ずると GLP-1 及び NT 含有内分泌細胞の分布密度も減ずる

これらの結果は、ニワトリ小腸の GLP-1 及び NT 含有内分泌細胞が食餌中のタンパク質ないしはその分解物を信号として受容し、それに応じて生理学的反応を発現していることを示している。

近年、申請者は科学研究費の助成を得て、ニワトリにおける摂食制御機構の解明に取り組んできた。それにより次の点が明らかになった。

- (1) ニワトリ視床下部には、多数の神経ペプチド含有神経細胞が存在し、複雑なネットワークを形成している (平松ら, 栄養生理学会報, 2007)
- (2) 摂食亢進作用を引き起こすペプチドは、ニワトリでは唯一、神経ペプチド Y のみであると見られていたが、ソマトスタチンも摂食亢進作用を引き起こすことが明らかとなった。
- (3) プロイラーでは孵化直前に視床下部下核及び漏斗核における神経ペプチド Y の発現が高くなり、孵化後の旺盛な摂食を引き起こすことが示唆された。

この様に摂食制御には視床下部における神経ペプチドの働きが重要であることが古くから示されている。しかし、摂食制御には動物の栄養状態や消化管の運動性なども影響すると云われている。したがって、摂食制御機構の解明にあたっては視床下部における摂食関連ペプチドの動態だけでなく、消化管の運動制御機構を併せて解明する必要があると考えるに至った。本研究では食

餌内容が消化管の運動性に与える影響を解明し、その際の消化管における摂食関連ペプチドの動態を明らかにすることで、摂食制御機構の全容を解明しようとするものである。

## 2. 研究の目的

上述の背景を踏まえて、ニワトリの摂食制御機構を中枢神経系及び消化管運動性との関係から解明するために、次の点を明らかにしようとして計画している。

- (1) 腸管内分泌細胞に及ぼす食餌の影響・・・食餌内容、特に特定のアミノ酸が消化管ホルモンの分泌に関わるか否かを、免疫組織化学法を用いた形態学的側面から明らかにする。
- (2) 消化管ホルモンが腸管平滑筋に与える影響・・・腸管の運動性に消化管ホルモンがいかに関わっているかを、バイオアッセイ系を用いて明らかにする。
- (3) 食餌内容の変化が視床下部の摂食制御ペプチドに及ぼす影響・・・食餌内容を変化させた際（タンパク質レベルの変化や特定アミノ酸の添加）の視床下部における摂食制御関連ペプチドの変動をペプチド発現の変化を捉えることで明らかにする。
- (4) 腸管における神経系と内分泌細胞との関係・・・消化管の運動性には腸管の神経系が深く関わっているが、消化管ホルモンとの関係は明らかではない。そこで、腸管の平滑筋を支配し、運動性の調節に関わっている筋層間神経叢における消化管ホルモンの受容体分布及び腸管内分泌細胞の神経支配について明らかにする。

以上の点を明らかにし、腸管の運動性及び食餌内容が摂食制御に如何に関わっているかについて考察を行う。

## 3. 研究の方法

本研究では、食餌内容と消化管の運動性及び摂食制御との関係を明らかにするために、おもに形態学的手法を用いた研究計画を策定した。研究計画は、大きく2つに分けることができる。

まず第1は、食餌内容の変化が腸管内分泌細胞と視床下部における摂食関連ペプチドに与える影響を確認することである。つまり、食餌中のタンパク質含量を変化させた際の、あるいは特定のアミノ酸のみを添加した際の回腸におけるニューロテンシン（NT）及びグルカゴン様ペプチド（GLP1）含有細胞の分布密度の変化を、画像解析装置を用いた形態計測法で確認する (Hiramatsu et al., J. Poultry Sci., 2003, 2005)。これらの

結果の裏付けとして、生理学的手法つまり、EIA法を用いたペプチドホルモンの血中濃度測定やバイオアッセイ系を用いた平滑筋への影響調査 (Gillespie, Br. J. Pharmacol., 1972) を合わせて行う。さらに、脳を摘出し、摂食制御に大きな関わりを持つ視床下部の諸神経核における摂食関連ペプチドの発現状態を免疫組織化学法により調べる (平松ほか, 栄養生理研究会誌, 2007)。

第2は、消化管ホルモンと消化管の運動性を司る筋層間神経叢との関わりを明らかにすることである。つまり、平滑筋への作用が大きいとされている酸化窒素作動性神経 (Neunlist et al., Cell Tissue Res., 2001) による内分泌細胞の神経支配について、免疫組織化学法を用いて検討する。

#### 4. 研究成果

(1) 摂食中枢が存在する視床下部下核及び漏斗核の神経ペプチドY(NPY)含有ニューロンは、サボリン結合NPYを用いた実験より室房核及び室周囲核の小型ニューロンと視床下部外側核の大型ニューロンに投射することが分かった。また、ソマトスタチンがNPYと共に摂食亢進作用をニワトリでは示すことが明らかになり、二重免疫組織化学法により室周囲核でNPYニューロンと接触することが分かった。これらの結果は、NPY含有ニューロンが室周囲核のソマトスタチン含有ニューロンに投射し、このものを介して摂食亢進作用を示すことを示唆する。一方、摂食行動制御にも関わる膵島のインスリン分泌は、下垂体アデニルシクラーゼ活性化ペプチド(PACAP)により影響されることが示唆された。つまり、ニワトリのB島には豊富なPACAP含有神経が分布しており、インスリン産生細胞(B細胞)に接する像が観察された。この結果は、末梢神経が内分泌組織の分泌制御を介して摂食行動に影響することを示唆する。

(2) 食餌中のタンパク質含量を変化させると、回腸のグルカゴン様ペプチド(GLP1)及びニューロテンシン(NT)産生内分泌細胞が影響を受けることが明らかになった。つまり、食餌のタンパク質含量を18%, 9%, 4.5%および0%と下げると、これらの内分泌細胞の分泌密度は低下した。この結果は、NT産生で顕著であった(投稿準備中)。両ペプチドの血中濃度は、有意差はつかないが、タンパク質含量の低下に伴い減少する傾向にあった。なお、この際における視床下部のNPYおよびソマ

トスタチンの分布に顕著な変化は認められなかった。

(3) 供試鶏として7日齢の白色レグホン種雄20羽を用い、1)対照飼料(CP20%)群、2)CP0%飼料群、3)CP0%+メチオニン添加飼料群、4)CP0%+リジン添加飼料群の4群に分けた。各群の供試鶏に対照飼料を1日、実験飼料を2日間強制給餌後、回腸を材料として摘出した。4%PFAで固定し、定法によりパラフィン切片を作製した。一次抗体としてGLP-1、ニューロテンシン(NT)及び5-HTに対する抗血清を用い免疫染色を施し、形態観察及び絨毛丈測定、画像解析装置により各内分泌細胞の分布密度を測定した。また、PAS染色により杯細胞の形態観察も行った。絨毛丈は対照群が他の群と比べ有意に高かった。すべての群でGLP-1、NTまたは5-HTを含有する内分泌細胞が観察された。GLP-1とNTは、陰窩から絨毛基部に、5-HTは絨毛全域に分布した。これらの細胞はカンマ形、紡錘形やフラスコ形などを呈した。内分泌細胞の分布密度(個/粘膜mm<sup>2</sup>)は、対照飼料群に比べCP0%飼料群で有意に高く、アミノ酸添加飼料群は対照飼料群に近い値を示した。PAS染色により、CP0%飼料群の杯細胞は他の群と比べ、ミュージゲン滴が小さくなる傾向が見られた。メチオニン及びリジンは、それぞれ単独で消化管内分泌細胞からのGLP-1及びNTの分泌を刺激し、これらのホルモンの分泌を介して消化管運動を制御しうる可能性が示唆された。

4) ニワトリ空腸および回腸における酸化窒素作動性神経の分布を、抗NOS血清と伸展標本を用いて間接蛍光抗体法により明らかにした。NOS免疫反応陽性ニューロンは、筋層間神経叢の神経節に観察された。同神経叢の節間枝および内輪走筋層に多数のNOS免疫反応陽性神経線維が走行していた。粘膜下神経叢にも細胞体および線維が観察されたが、粘膜における神経線維の走行はまれであった。また、抗ソマトスタチン血清を用いた二重染色ではNOSとの共存は認められなかった。酸化窒素作動性神経は、小腸の平滑筋を直接支配することが分かったが、内分泌細胞との連絡は照明できなかった。

#### 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11件)

Tachibana T, Cline MA, Khan MSI,

Ueda H and Hiramatsu K (2011) Feeding responses to central administration of several somatostatin analogs in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, 158: 47-51. 査読有 .

Nagao K, Hiramatsu K, Tsukada A and Kita K (2010) Effects of insufficient levels of dietary protein on IGF-1 and IGF-BPs in young chickens. *The Journal of Poultry Science* 47: 236-239. 査読有 .

甲木 潤, 平松浩二, 高木優二, 佐々木晋一, 辻井弘忠, 濱野光市 (2010) マウス精子形成におけるエストロジェンレセプター を介したエストロジェンの関与 . 北信越畜産学会報 100: 27-32. 査読有 .

Hiramatsu K and Yamasaki A (2009) Immunohistochemical study on the innervation of the chicken pancreas by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptides (PACAPs)-containing nerves. *The Journal of Poultry Science* 46: 234-239. 査読有 .

Tachibana T, Cline MA, Sugahara K, Ueda H and Hiramatsu K (2009) Central administration of somatostatin stimulates feeding behavior in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 161: 354-359. 査読有 .

渡辺純, 平松浩二 (2009) ニワトリ視床下部における神経ペプチド Y(NPY)含有ニューロンの投射経路に関する組織学的研究 . 北信越畜産学会報 98:23-28 . 査読有 .

Atsumi Y, Yazawa S, Usui F, Nakamura Y, Yamamoto Y, Tagami T, Hiramatsu K, Kagami H and Ono T (2009) Depletion of primordial germ cells (PGCs) by X-irradiation to extraembryonic region of chicken embryos and expression of xenotransplanted quail PGCs. *The Journal of Poultry Science* 46: 136-143. 査読有 .

Fujiwara A, Ono T, Hiramatsu K and Kagami H. (2009) Complete regeneration of muscular dystrophy chickens by mating of male and female offspring derived from germline chimeras. *The Journal of Poultry Science* 46: 123-126. 査読有 .

Tachibana T, Mori M, Khan MdSI, Ueda H, Sugahara K and Hiramatsu

K. (2008) Central administration of galanin stimulates feeding behavior in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A* 151: 637-640.

査読有 .

平松浩二, 原田智佳, 中村 顕, 渡辺純 (2008) ニワトリの視床下部における摂食制御関連ペプチドの局在 . 栄養生理研究会報 51:15 - 25. 査読有 .

Hamauzu Y, Forest F, Hiramatsu K and Sugimoto M (2008) Effect of pear (*Pyrus communis* L.) procyanidins on gastric lesions induced by HCl/ethanol in rats. *Food Chemistry* 100:255-263. 査読有 .

[学会発表](計8件)

西村佳, 平松浩二, 松山翔子, 喜多一美, 西間木良輔, 佐々木直子, 食餌へのアミノ酸添加が消化管内分泌細胞へ与える影響 第59回北信越畜産学会 2010.11.5. 富山 .

平松浩二, 鈴木美音, 小野珠乙, 鏡味裕, 坂田絢子, コリンウズラ (*Colinus virginianus*) 回腸の内分泌細胞の形態と分布, 日本家禽学会 2010年度春季大会, 2010.3.30. 東京 .

平松浩二, 中村顕, 渡辺純, プロイラーヒナの視床下部における神経ペプチド及びチロシン水酸化酵素の分布, 日本家禽学会 2009年度秋季大会, 2009.9.30. 那覇 .

渡辺純, 平松浩二, プロイラー視床下部における摂食関連ペプチドの相関関係, 日本畜産学会第111回大会 2009.9.28. 那覇 .

渡辺 純, 平松浩二, 中村 顕, ニワトリ視床下部における神経ペプチド Y (NPY) 含有ニューロンの投射経路に関する組織学的研究 第 57 回北信越畜産学会 . 2008.11.7. 金沢 .

平松浩二, 中村 顕, 渡辺 純, 橘 哲也, 菅原邦生, ソマトスタチンのプロイラー雛視床下部における局在と側脳室内投与による摂食及び飲水行動への影響, 第146回日本獣医学会学術集会, 2008.9.25. 宮崎 .

橘 哲也, 森みやび, 上田博史, 菅原邦生, 平松浩二, ガラニンはニワトリヒナの摂食行動を刺激する, 日本家禽学会 2008年度秋季大会, 2008.8.29. 十和田 .

橘 哲也・Mark A. Cline・菅原邦生・

上田博史・平松浩二，ソマトスタチンの  
脳内投与はニワトリヒナの摂食行動を  
刺激する．第33回日本比較内分泌学会  
大会．2008.12.6．東広島．

6．研究組織

(1)研究代表者

平松 浩二 (HIRAMATSU KOHZY)  
信州大学・農学部・教授  
研究者番号：80238386

(3)連携研究者

喜多 一美 (KITA KAZUMI)  
岩手大学・農学部・教授  
研究者番号：20221913