

令和元年6月6日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07991

研究課題名(和文)ニワトリヒナの摂食調節機構における炎症性物質の役割の解明

研究課題名(英文) Studies of roles of inflammatory bioactive molecules on feeding regulation in chicks

研究代表者

橘 哲也 (Tachibana, Tetsuya)

愛媛大学・農学研究科・准教授

研究者番号：80346832

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、炎症性物質のうち、インターロイキン-1 (IL1)、腫瘍壊死因子様サイトカイン1A (TL1A)、プロスタグランジンE2 (PGE2)、PGF2 およびPGD2の脳室内投与または腹腔内投与がニワトリヒナの摂食を抑制することを明らかにした。また、哺乳類の摂食を抑制するIL6、IL8、インターフェロン- (IFN) およびIFN には効果がないことを明らかにした。さらに、リポポリサッカライドおよびポリI:Cの腹腔内投与によってこれらの炎症性物質およびその合成酵素の遺伝子発現量が変化したことから、これらの炎症性物質が細菌およびウイルスに感染時の食欲不振に関わっている可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原性微生物の感染により、ニワトリは食欲不振に陥り、さらにはその生産性が低下する。この食欲不振には免疫に関わる炎症性物質が関わると考え、本研究ではニワトリヒナの摂食を抑制する炎症性物質の探索を進め、いくつかの炎症性物質がニワトリの摂食を抑制することを明らかにした。この成果は、ニワトリの摂食調節機構の解明を進めるものであるとともに、ニワトリの免疫系の解明に有用な情報を与えることができるものである。本研究の成果を基礎として今後の研究の発展させることで、感染時の食欲不振に伴う生産性の低下の防止に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study revealed that intracerebroventricular or intraperitoneal injection of interleukin-1, tumor-necrosis factor-like cytokine-1A, prostaglandin E2 (PGE2), PGF2 and PGD2 decreased food intake in chicks. In addition, the injection of IL6, IL8, interferon- (IFN) and IFN, which suppress feeding behavior in rodents, had no effect on food intake in chicks. Intraperitoneal injection of lipopolysaccharide, which is a component of Gram-negative bacteria, and poly I:C, which is a synthetic double-stranded RNA suppressed feeding behavior with induction of gene expression of cytokines and PGs noted above. These results suggested that these cytokines and PGs would be related to anorexia induced by infection of bacteria and virus in chicks.

研究分野：家畜栄養学 家畜行動学 家畜生理学

キーワード：ニワトリヒナ 摂食行動 炎症性物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ニワトリの成長は幼雛期の摂食量の影響を受けることから、効率的家禽生産を目標としてニワトリヒナの摂食調節機構の解明が進められてきた。しかし、動物の摂食はその年齢や性別、成長や繁殖の状態、ストレス状態などによって変わるため、も様々な生理状態における摂食調節機構を明らかにしなければ、ニワトリヒナの摂食調節機構の全貌を解明することはできない。

動物の摂食に影響を与えるものの一つとして感染がある。細菌やウイルス、寄生虫などが動物に感染すると、発熱や白血球の増加、嗜眠、消化管機能の低下などの生理的变化に加え、摂食の抑制が見られる。ニワトリヒナにおいても、大腸菌症やクロストリジウム感染症、サルモネラ症、ニワトリブドウ球菌症などといった細菌による感染症で摂食が抑制されることが知られているが、このような感染状態に陥った場合の摂食抑制機構に関する研究はほとんどない。細菌感染に伴う摂食量の低下は、グラム陰性菌の細胞壁外膜成分であるリポポリサッカライド (LPS) やグラム陰性菌・陽性菌の両方に見られるペプチドグリカンおよびムラミルジペプチド (MDP) などの細菌成分に起因することが哺乳類の研究で明らかにされている。しかし、ニワトリヒナではどの細菌成分が摂食を抑制するのかは未だ不明である。ヒナの摂食調節機構に影響を与える細菌成分を特定し、「細菌感染摂食抑制モデル」をヒナで構築することが、感染状態における摂食調節機構の解明に必須であると考えられる。

なお、哺乳類においては感染に伴う摂食抑制にはサイトカインやエイコサノイドなどのいわゆる「炎症性物質」が関わっていることが明らかにされている。しかし、これらの炎症性物質がニワトリヒナの摂食にどのような影響を与えるかも未だ明らかにされていない。哺乳類では、いくつかの炎症性物質が糖代謝や肥満の形成、そしてそれに伴う疾病に関与していることが報告されているため、ニワトリヒナにおいても炎症性物質が摂食のみならず糖代謝や脂肪蓄積に関与している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、細菌感染時のニワトリヒナの摂食調節機構を、特に炎症性物質の観点から明らかにすることで、ニワトリヒナの摂食調節機構を解明することを目的とした。具体的には、ニワトリヒナにおける細菌感染摂食抑制モデルの構築、サイトカインおよびエイコサノイドをはじめとする炎症性物質がニワトリヒナの摂食に与える影響の解明、細菌感染による摂食抑制ネットワークの解明について明らかにするという三点について調べた。

3. 研究の方法

1) ニワトリヒナにおける細菌感染摂食抑制モデルの構築

LPS、MDP およびリポタイコ酸をニワトリヒナに腹腔内および脳室内投与した後の摂食量を調べた。また、この三種類の細菌成分のうち、ニワトリヒナの摂食を抑制したものが LPS のみだったため、ウイルス感染摂食抑制モデルの構築も併せて進めることとし、人工二本鎖 RNA であるポリ I:C を腹腔内および脳室内投与する実験を行った。

2) 炎症性物質がニワトリヒナの摂食行動に与える影響の解明

サイトカインをニワトリヒナに投与した後の反応

ここでは、インターロイキン (IL) として IL1、IL6 および IL8 を、インターフェロン (IFN) として IFN α および IFN γ を、腫瘍壊死因子として腫瘍壊死因子様サイトカイン-1A (TL1A) をそれぞれ脳室内投与した後の摂食量の変化について調べた。なお、IL については腹腔内投与した後の摂食量の変化についても調べた。

プロスタグランジン (PG) をニワトリヒナに投与した後の反応

ここでは、PGE₂、PGF₂ および PGD₂ を脳室内および腹腔内投与した後の摂食量の変化を調べた。また、自発運動量測定装置およびビデオ撮影装置を用いて上記の PG を投与した後の運動量と行動様式の変化を調べた。さらに PG が飼料の消化管通過に与える影響について調べるために、PG を投与した後の飼料のそのう通過率を調べた。最後に、PG を投与した後に採血を行って血漿を採取し、血漿中コルチコステロン濃度を酵素免疫測定法で、血糖値を生化学的手法で測定した。

3) 細菌感染による摂食抑制ネットワークの解明

LPS およびポリ I:C を腹腔内投与した 3 時間後に間脳を採取し、間脳内の炎症性物質およびその合成酵素の遺伝子発現量をリアルタイム PCR 法にて調べた。また、摂食調節因子の遺伝子発現量を調べることで、感染による摂食抑制に関わる摂食調節因子を特定し、その摂食抑制ネットワークの解明を進めた。

4. 研究成果

1) ニワトリヒナにおける細菌感染摂食抑制モデルの構築

100 μ g または 200 μ g の LPS を腹腔内および脳室内投与した場合において摂食量の有意な低下が見られた。一方、MDP およびリポタイコ酸はいずれの投与においても摂食量の変化が見られなかったことから、細菌成分のうちニワトリヒナの摂食を抑制するものとして LPS のみを特定することができた。また、ポリ I:C を腹腔内および脳室内投与した場合にも摂食量が有意

に低下したことから、ウイルス関連成分もニワトリヒナの摂食を抑制することが明らかとなった。以上の結果から、LPS を用いた細菌感染摂食抑制モデルおよびポリ I:C を用いたウイルス感染摂食抑制モデルを構築することができた。

2) 炎症性物質がニワトリヒナの摂食行動に与える影響の解明

サイトカインをニワトリヒナに投与した後の反応

各 IL を脳室内投与したところ、IL1 を脳室内および腹腔内投与した場合にはニワトリヒナの摂食量が有意に低下したが(図1) IL6 および IL8 を投与した場合には摂食量の変化が見られなかった。IFN および IFN を脳室内投与した実験では、いずれの IFN もニワトリヒナの摂食に影響を与えなかった。また、TL1A をニワトリヒナに脳室内投与すると摂食量の有意な低下が見られた。本実験で用いたサイトカインは齧歯類の摂食を抑制することが報告されているが、ニワトリヒナにおいては IL1 と TL1A のみに摂食抑制作用があることが明らかとなった。

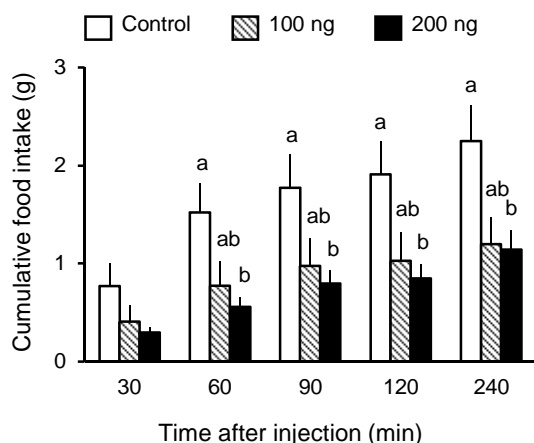


図1 IL1 の脳室内投与による摂食量の変化
値は平均値 ± 標準誤差を示す(各群7-10羽)。各時間において異符号間に有意差あり(P<0.05)。

プロスタグランジン (PG) をニワトリヒナに投与した後の反応

PGE2 および PGF2 を脳室内および腹腔内投与した場合には摂食量の有意な低下が見られた(図2)。一方、PGD2 を脳室内投与した場合には摂食量が有意に低下したが、腹腔内投与には効果がなかった。また、いずれの PG を脳室内投与した場合でも自発運動量の低下が見られたが、腹腔内投与した場合は PGE2 のみ自発運動量の低下が見られた。さらに、PGE2 および PGD2 の脳室内投与によって飼料のそのう通過率が有意に低下し、腹腔内投与した場合でも同様の低下が見られた。血漿中コルチコステロン濃度については PGE2 を脳室内および腹腔内投与した後に有意な増加が見られたが、その他の PG には効果がなかった。血糖値については PGE2 の投与によって有意に増加したが、その他の PG は血糖値を低下させる傾向が見られた。以上のように、PG の作用はその種類によって変わることが明らかとなった。

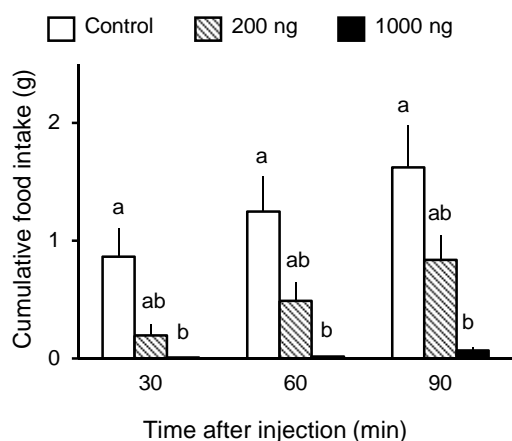


図2 PGE2の脳室内投与による摂食量の変化
値は平均値 ± 標準誤差を示す(各群8-9羽)。*各時間のControlと比べて有意差あり(P<0.05)。

3) 細菌感染による摂食抑制ネットワークの解明

LPS を腹腔内投与した後の間脳内炎症性物質およびその合成酵素の遺伝子発現量を調べたところ、IL1、IL6、IL8、IFN およびプロスタグランジンの合成酵素である COX2 の遺伝子

発現量が有意に増加していた。一方、IFN の遺伝子発現量には変化が見られず、TL1A では有意な低下が見られた。ポリ I:C を腹腔内投与した場合には、IL1、IL6、IL8 および COX2 の遺伝子発現量が有意に増加しており、IFN および TL1A の遺伝子発現量は有意に低下した (図 3)。以上のことから、細菌成分およびウイルス関連成分が摂食調節を司る間脳における炎症性物質およびその合成酵素の遺伝子発現量に影響を与えることが明らかとなった。このうち、2) の実験で摂食に影響を与えたものが IL1 と PG であったことから、これらが LPS とポリ I:C による摂食抑制作用に関わっている可能性が高いと考えられた。

次に、LPS およびポリ I:C を腹腔内投与した後の間脳内摂食調節因子の遺伝子発現量を調べた。調査した摂食調節因子は、摂食促進因子としてニューロペプチド Y とアグーチ関連ペプチド、摂食抑制因子として副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、ウロコルチン 3、プロオピオメラノコルチンおよびヒスタミンの合成酵素とした。これらのうち、LPS の腹腔内投与によって遺伝子発現量が変化したものはヒスタミン合成酵素であるヒスタミン脱炭酸酵素 (HDC) だけであった (図 3)。ただし、HDC の遺伝子発現量は 100 μ g の LPS を投与した場合には有意に増加したものの、200 μ g を投与した場合には有意な変化は見られなかった。ポリ I:C を投与した場合にも HDC の遺伝子発現量のみ有意に増加した。したがって、感染時の摂食抑制ネットワークにはヒスタミンが関わっている可能性が高いことが明らかとなった。

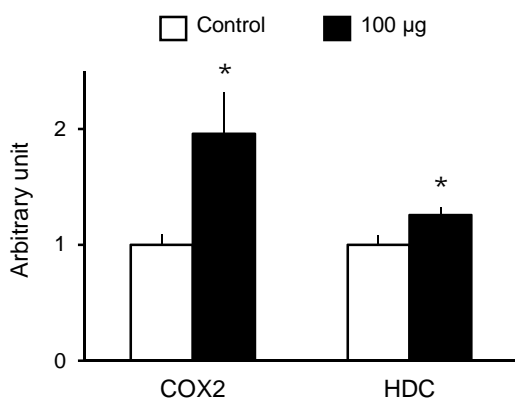


図4 LPSの腹腔内投与による間脳内遺伝子発現量の変化
値は平均値 \pm 標準誤差を示す (各群7-8羽)。*Controlと比べて有意差あり (P<0.05)。

以上の結果から、本研究ではニワトリヒナを用いた細菌およびウイルス感染摂食抑制モデルを構築するとともに、摂食を抑制する炎症性物質を特定することができた。また、感染時の摂食抑制ネットワークに IL1 と PG、そしてヒスタミンが関与している可能性を示した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Tachibana T, Kodama T, Yamane S, Makino R, Khan SI, Cline MA. Possible role of central interleukins on the anorexigenic effect of lipopolysaccharide in chicks. *British Poultry Science*. 2017. 58: 305-311. 査読有り

Tachibana T, Nakai Y, Makino R, Khan MSI, Cline MA. Effect of central and peripheral injection of prostaglandin E2 and F2 on feeding and the crop-emptying rate in chicks. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 2017. 130: 30-37. 査読有り

Tachibana T, Ishimaru Y, Makino R, Khan SI, Cline MA. Effect of central injection of tumor-necrosis factor-like cytokine 1A and interferons on food intake in chicks. *Physiology and Behavior*. 2018. 194:199-204. 査読有り

Tachibana T, Nakai Y, Makino R, Khan MSI, Cline MA. Physiological response to central and peripheral injection of prostaglandin D2 in chicks. *Prostaglandins and Other Lipid Mediators*. 2018 137:46-51. 査読有り

Tachibana T, Ishimaru Y, Takeda K, Khan MSI, Makino R, Cline MA. Physiological responses to central and peripheral injection of polyinosinic-polycytidylic acid in chicks. *British Poultry Science*. 2019. 60:64-70. 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

中井康愛、牧野良輔、モハメド シャキル イスラム カーン、橋哲也 . プロスタグランジンの中枢および末梢投与がニワトリヒナの摂食行動に与える影響 . 第 40 回鳥類内分泌研究会 . 松山市 . 2016.11.3-4.

石丸蓉子、牧野良輔、モハメド シャキル イスラム カーン、橋哲也 . インターフェロンと

TL1A がニワトリヒナの摂食行動に与える影響 .第 42 回日本比較内分泌学会大会 .奈良市 .
2017.11.17-19.

橘哲也、石丸蓉子、牧野良輔、モハメド シャキル イスラム カーン . Poly I:C の中枢および末梢投与がニワトリヒナの摂食行動に与える影響 . 日本家禽学会 2018 年度春季大会 .
2018.3.27-30.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。