

平成 22 年 3 月 3 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19880036  
 研究課題名（和文） ケトジェネシスの鶏酸化ストレス・免疫応答制御機構の解析  
 研究課題名（英文） Modulation of the redox status and immune function by ketone body in chicken.  
 研究代表者  
 大津 晴彦 (OHTSU HARUHIKO)  
 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構  
 畜産草地研究所機能性飼料研究チーム 研究員  
 研究者番号：40455316

## 研究成果の概要（和文）：

肝臓脂肪酸代謝の中間代謝物であるケトン体の鶏における酸化ストレス・免疫能に対する作用を *in vitro* および *in vivo* の両面から検討した。その結果、高濃度のケトン体は直接的に免疫細胞の生存率を低下させ炎症応答因子シクロオキシゲナーゼ II (COXII) の発現を増加させる、また生体内において高濃度のケトン体は抗酸化能を低下させ、脾臓 COXII 発現量を増加させることが明らかとなり、ケトン体は鶏酸化ストレス・免疫応答に負的作用をもつことが示された。

## 研究成果の概要（英文）：

Effects of ketone body, an intermediary of fatty acid  $\beta$ -oxidation in liver, on the redox status and immune function in chicken were investigated *in vitro* and *in vivo*. High concentration of ketone body reduced the cell viability and increased the mRNA expression of cyclooxygenase II (COXII), an inflammatory factor, in chicken lymphocyte. Furthermore, plasma antioxidant activity was decreased, and the expression of spleen COXII mRNA was increased in chicken with ketosis, suggesting that ketone body increased oxidative stress and decreased immune function in chicken.

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

## 研究分野：動物栄養生化学

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：ケトン体・ストレス・免疫・応用動物・生理

## 1. 研究開始当初の背景

初期成長時の代謝が動物の成長全体と生産性を決定づける上で大きな要因である。家禽の初期成長期は腹腔内に存在する脂質を主成分とする残存卵黄が主なエネルギー源

として機能し、炭水化物主体の飼料を摂取する成鶏とは異なる栄養環境下にある。免疫機能においても、孵化直後の鶏では、ファブリキウス嚢は未発達であり、また免疫グロブリンを産生できず、成鶏とは異なる特徴を持つ。

申請者はこれまでに、肝臓での脂質の  $\beta$  酸化による生成物であるケトン体の生成、「ケトジェネシス」がブロイラーの孵化時をピークとし、孵化直前直後で特異的に亢進しており、血液、肝臓および骨格筋中ケトン体濃度が高いことを明らかにした。

ケトン体はエネルギー基質であるとともに、様々な生理活性を持つことが知られており、哺乳動物において、ケトン体の酸化ストレス・免疫応答の調節作用が報告されている。しかし、ケトン体の酸化ストレス・免疫応答に対する作用は確立されておらず、鶏免疫細胞における報告はない。

Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF $\kappa$ B)、Activator protein-1 (AP-1) は活性酸素によって活性化されるレドックス応答転写因子で種々の免疫、炎症反応に関与する遺伝子発現を促すとともに、細胞、組織の機能を変化させる。酸化ストレス環境下においては活性酸素がレドックス応答転写因子を過剰に活性化し、免疫応答異常を起こすと考えられる。したがって酸化ストレスを調節するケトン体がこのレドックス応答転写因子活性を調節し、免疫応答を調節する可能性が考えられるが、その報告はほとんどない。

そこで本研究においては初期成長期の鶏の栄養生理による免疫機能調節を目的とし、ケトン体の鶏の酸化ストレス、免疫応答に対する作用機序の解明をレドックス応答転写因子の観点も含めて試みた。

## 2. 研究の目的

鶏の酸化ストレス・免疫応答へのケトン体の作用を細胞培養実験 (*In Vitro*) および動物実験 (*In Vivo*) において検討した。

### (1) *In Vitro* 系におけるケトン体の鶏リンパ球酸化ストレス応答に対する作用

ケトン体である  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸およびアセト酢酸が鶏リンパ球において酸化ストレス・免疫応答に対し、促進作用をもつか抑制作用を有するか、培養系においてケトン体の直接的な作用を検討した。

### (2) *In Vivo* 系におけるケトン体の鶏初期成長時の免疫応答、酸化ストレスに対する作用

ケトン体が実際 Whole body で、どのように酸化ストレス・免疫応答を調節するかを明らかにすること目的とし、高脂肪飼料で生体内のケトン体産生を亢進するケトジェニック飼料の産卵鶏および初期成長期のブロイラー雛への給与試験ならびにブロイラー雛へのケトン体投与試験を行い、血漿中脂質成

分などの変動と共に、酸化ストレス・免疫応答への影響を検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) *In Vitro* 系におけるケトン体の鶏リンパ球酸化ストレス応答に対する作用

① 鶏血液よりリンパ球を調製し、 $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 (0.1mM-10mM) およびアセト酢酸 (0.1mM-10mM) を培地中 (RPMI-1640 ウシ胎児血清 10% 鶏血清 1%) に添加し、24 時間後の Cell Viability を WST-8 法により測定した。

② 鶏 B 細胞株 (DT40) に  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸もしくはアセト酢酸を添加し、Cell Viability およびレドックス応答因子により mRNA 発現が調節される炎症応答因子 COXII mRNA 発現量に対するケトン体の影響を調べた。

### (2) *In Vivo* 系におけるケトン体の鶏初期成長時の免疫応答、酸化ストレスに対する作用

① 産卵鶏用に設計したケトン体産生を促す、高脂肪、低炭水化物、低タンパク質飼料である「ケトジェニック飼料」を 4 週間給与し、血中ケトン体濃度、脂質成分 (遊離脂肪酸、トリグリセリド) および酸化ストレスマーカー (過酸化脂質量 [TBARS]、総抗酸化能) さらに脾臓サイトカイン (インターロイキン 4 [IL-4], インターフェロン  $\gamma$  [IFN- $\gamma$ ], 炎症応答因子 (COXII) の mRNA 発現量を測定した。

② 孵化直後のブロイラー雛にケトジェニック飼料を 1 週間給与し、血中脂質成分、酸化ストレスマーカーおよび脾臓サイトカイン、炎症応答因子 (COXII) の mRNA 発現量を測定した。

更に孵化直後の雛の腹腔内に  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸を 1 日 1 回、体重 1kg あたり 0.5g、1.0g の濃度で 1 週間投与し、脾臓サイトカイン、炎症応答因子 (COXII) の mRNA 発現量を測定した。

## 4. 研究成果

### (1) *In Vitro* 系におけるケトン体の鶏リンパ球酸化ストレス応答に対する作用

#### ① 鶏リンパ球の生存率に対するケトン体の作用。

産卵鶏の血液から調製したリンパ球培養系にケトン体  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸およびアセト酢酸を 0.1~10mM の濃度で添加し、24 時間後の細胞生存率を測定したところ、5mM、10mM で有意な低下が観察され (図 1)、高濃度のケトン体が直接的に鶏免疫能を低下させることが示唆された。

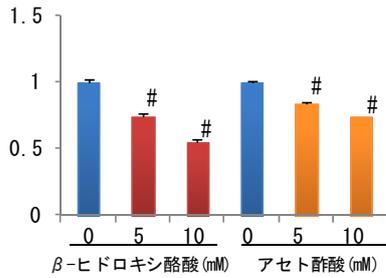


図1 鶏リンパ球のCell Viabilityに対するケトン体の作用  
採卵鶏より調製したリンパ球にβ-ヒドロキシ酪酸  
およびアセト酢酸を添加し、24時間後のCell Viability  
をWST-8法により測定した。値は無添加区を1として算出した。  
#:p<0.05 (無添加区に対して)

## ②鶏 B 細胞株 (DT40) の増殖に対するケトン体の作用

DT40 細胞培養系に β-ヒドロキシ酪酸およびアセト酢酸を 0.1~10mM 濃度で添加後 72 時間培養し、生細胞数を WST-8 法で測定した。その結果 2.5~10mM の β-ヒドロキシ酪酸は DT40 細胞数を無添加区に比べ有意に低下させたが、アセト酢酸による影響は見られなかった。以上より、高濃度のケトン体が直接的に免疫機能を低下させることが再度確認された。

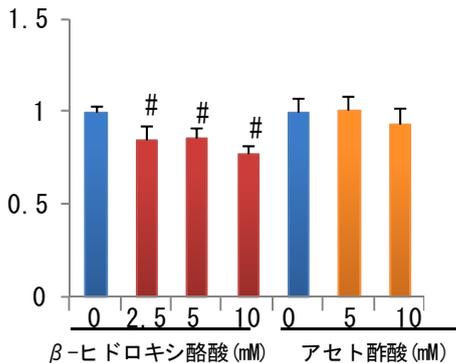


図2 ケトン体のDT40 Cell Viabilityに対する影響  
DT40細胞にβ-ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸を添加72  
時間後のCell ViabilityをWST-8法により測定した。  
値は無添加区を1として算出した。  
#:p<0.05 (無添加区に対して)

酸化ストレスに深く関与するレドックス応答転写因子である NFκB, AP-1 によりその発現量が調節される、COXII mRNA 発現量をレドックス応答転写因子活性化のマーカーとして測定した結果、5mM の β-ヒドロキシ酪酸およびアセト酢酸の添加により増加した。従って、高濃度のケトン体はレドックス応答転写因子を活性化することが示唆された。

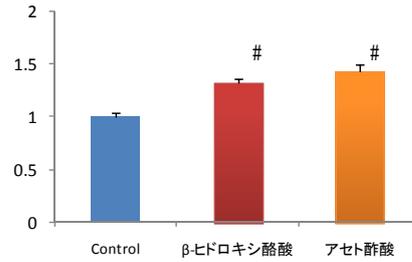


図3 DT40細胞におけるケトン体のCOXII mRNA発現量  
に対する影響  
DT40細胞に5mMの濃度のβ-ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸  
を添加し、24時間後のCOXII mRNA量を測定した。  
ハウスキーピング遺伝子(GAPDH)量で補正後、Controlを1  
として値を算出した。#:p<0.05 (無添加区に対して)

以上のように、ケトン体が鶏の免疫担当細胞の生存率を低下させ、レドックス応答転写因子によりその発現が調節される COXII mRNA 発現量を増加させることより、ケトン体の直接的効果としては鶏の免疫機能を低下させるとともに酸化ストレスを誘導することが示唆された。

## (2) In Vivo系におけるケトン体の鶏初期成長時の免疫応答、酸化ストレスに対する作用

①採卵鶏用に設計したケトジェニック飼料給与は、血中アセト酢酸濃度に影響を与えなかったが、β-ヒドロキシ酪酸濃度は有意に増加し(図4)、鶏においても、高脂肪、低炭水化物、低タンパク質飼料がケトジェネシスを亢進することが示された。また、ケトジェニック飼料は採卵鶏の血中トリグリセリドを低下、遊離脂肪酸を上昇させ(図5)、脂質代謝にも影響を及ぼすことが示された。

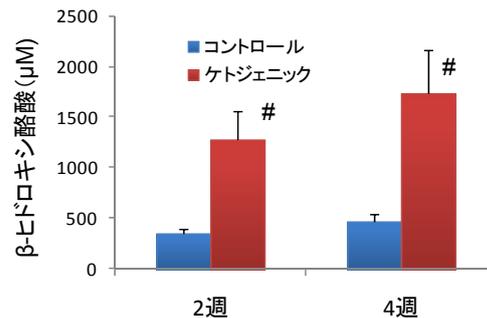


図4 ケトジェニック飼料給与による  
血液中β-ヒドロキシ酪酸濃度の変化  
採卵鶏に標準飼料(コントロール)およびケトジェニック  
飼料を給与後、2, 4週目の血液中βヒドロキシ酪酸濃  
度を測定した。#: p<0.05

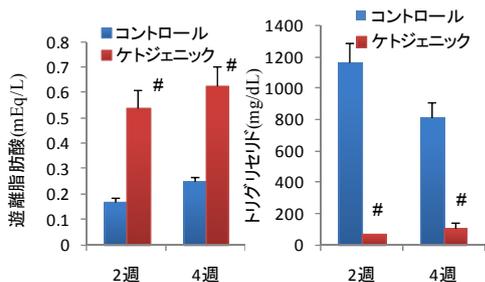


図5 採卵鶏におけるケトジェニック飼料給与の血中脂質成分に対する影響

採卵鶏に標準飼料(コントロール)およびケトジェニック飼料を給与後、2、4週目の血中遊離脂肪酸(NEFA)およびトリグリセリド濃度を測定した。#: p<0.05

このケトン体産生の亢進した採卵鶏において、酸化ストレスマーカーである TBARS の低下が確認されたが、抗酸化能も同時に低下した(図 6)。TBARS は血液中の過酸化脂質濃度であり、この TBARS の著しい低下には、血液中脂質であるトリグリセリド濃度の低下が関与している可能性が考えられる。

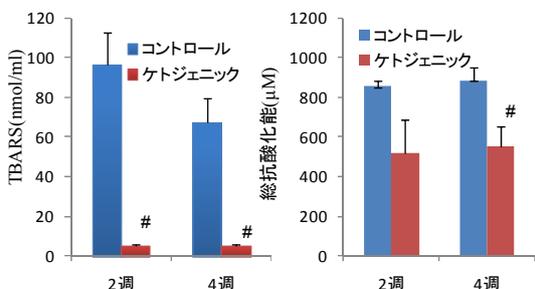


図6 採卵鶏におけるケトジェニック飼料給与の血中酸化ストレスに対する影響

採卵鶏に標準飼料(コントロール)およびケトジェニック飼料を給与後、2、4週目の血中過酸化脂質量(TBARS)および総抗酸化能(PAO)を測定した。#: p<0.05

採卵鶏におけるケトジェニック飼料給与は脾臓サイトカイン(IL-4, IFN-γ)mRNA 発現量に影響を与えなかったが、COXII mRNA 発現量を増加させた(図 7)。

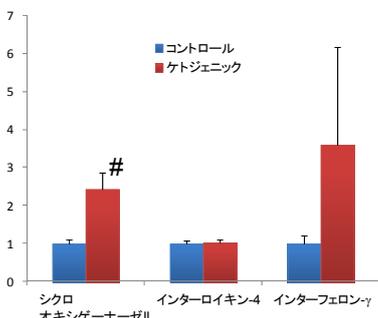


図7 採卵鶏におけるケトジェニック飼料給与の脾臓サイトカイン、シクロオキシゲナーゼII mRNA発現量に対する影響  
採卵鶏に標準飼料(コントロール)、ケトジェニック飼料を給与後4週目の脾臓中シクロオキシゲナーゼII、インターロイキン-4、インターフェロン-γのmRNA量を測定した。  
ハウスキーピングゼノン(GAPDH)発現量で補正後、コントロールを1として値を算出した。#:p<0.05

以上のように、産卵鶏におけるケトジェニック飼料給与によるケトジェネシス亢進は、

血液中脂質濃度を変化させ、血中過酸化脂質濃度(TBARS)を低下させるものの、抗酸化能を抑制した。また、採卵鶏におけるケトジェニック飼料給与はレドックス応答転写因子により発現調節される COXII mRNA 発現量を増加させた。TBARS の低下よりケトジェニック飼料給与は酸化ストレスを低減する可能性も考えられるが、血中脂質成分であるトリグリセリド濃度が大きく低下していることによるものと推察され、抗酸化能の低下、および COX II 発現量の増加、また in Vitro 系における結果から総合して考えると、産卵鶏においてケトン体は redox status において負の作用を示すと考えられる。

## ②初期成長期のブロイラー雛におけるケトジェニック飼料給与の抗酸化能・免疫応答に対する影響

ケトジェニック飼料給与により、血中 β-ヒドロキシ酪酸濃度はコントロール区に比べ有意に増加し、初期成長期雛においても、高脂肪、低炭水化物、低タンパク質飼料は産卵鶏同様、初期成長期のブロイラー雛のケトジェネシスを亢進することが示された(図 8)。ケトジェニック飼料給与はブロイラー雛においては、血中トリグリセリド、遊離脂肪酸濃度に有意な影響を与えなかった(図 9)。

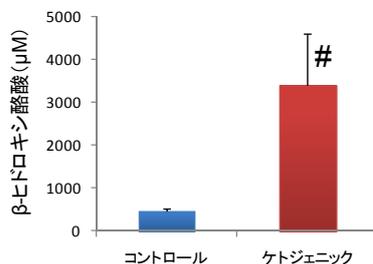


図8 初期成長期のブロイラー雛におけるケトジェニック飼料給与の血中β-ヒドロキシ酪酸濃度に対する影響

ブロイラー雛(0日齢)に標準飼料(コントロール)、ケトジェニック飼料を給与後7日後の血中β-ヒドロキシ酪酸濃度を測定した。#:p<0.05

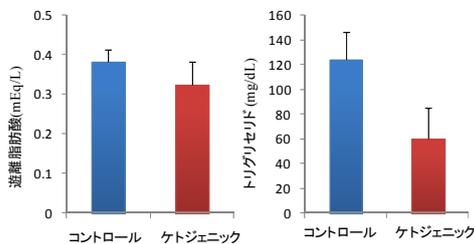


図9 ブロイラー雛におけるケトジェニック飼料給与の血中脂質成分に対する影響  
ブロイラー雛(0日齢)に標準飼料(コントロール)、ケトジェニック飼料を給与7日後の血中遊離脂肪酸、トリグリセリド濃度を測定した。

ケトジェニック飼料給与によるブロイラー雛におけるケトジェネシス亢進は血中 TBARS を低下させたものの、抗酸化能も低下させた(図 10)。

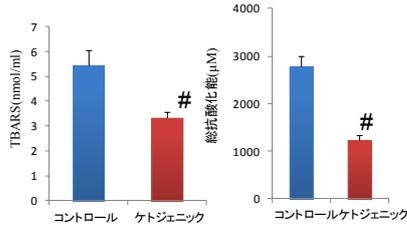


図10 ブロイラー雛におけるケトジェニック飼料給与の血中酸化ストレスマーカーに対する影響  
ブロイラー雛(0日齢)に標準飼料(コントロール)、ケトジェニック飼料給与7日後の血中TBARS、  
抗酸化能(PAO)を測定した。#p<0.05

ケトジェニック飼料給与は初期成長期の雛の脾臓サイトカイン発現量には影響を与えなかったが、COXII mRNA 発現量を増加させた(図 11)。

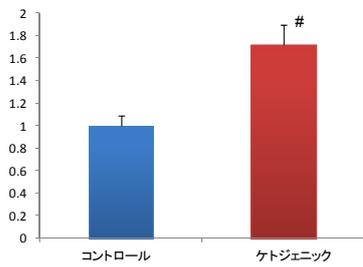


図11 ブロイラー雛におけるケトジェニック飼料給与の脾臓COXII mRNA発現量に対する影響  
ブロイラー雛(0日齢)に標準飼料(コントロール)、ケトジェニック飼料を  
給与後7日目の脾臓COXII mRNA発現量を測定した。  
ハウスキーピング遺伝子(GAPDH)発現量で方正後、コントロールを1として  
値を算出した。#p<0.05

ケトン体の初期成長期雛における酸化ストレス・免疫応答を更に詳細に検討するために、ケトン体を投与し、血中酸化ストレスマーカーおよび脾臓サイトカイン、COXII mRNA 発現量を測定したところ、ケトジェニック飼料給与と同様に TBARS を低下させたものの抗酸化能も低下させる傾向を示した(図 12)。COXII mRNA は増加する傾向を示すものの有意な変化は観察されなかった(図 13)。

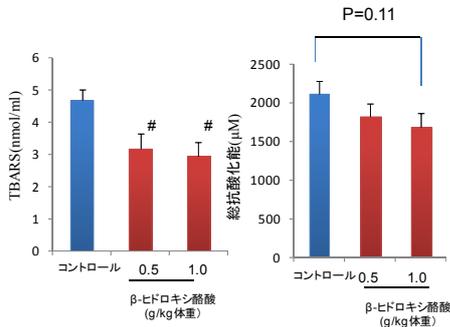


図12 初期成長期のブロイラー雛におけるケトン体投与の酸化ストレスに対する影響  
ブロイラー雛(1日齢)にβ-ヒドロキシ酪酸を体重1Kgあたり0.5、1.0gの濃度で腹腔に  
1日1回、7日間投与後の血中TBARS、抗酸化能(PAO)を測定した。  
#p<0.05

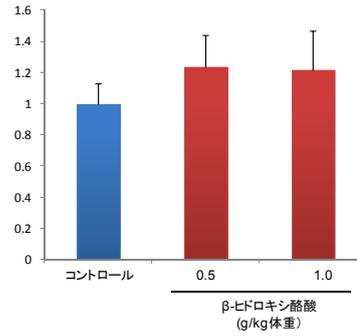


図13 初期成長期のブロイラー雛におけるケトン体投与の脾臓シクロオキシゲナーゼII mRNA発現量に対する影響  
ブロイラー雛(1日齢)にβ-ヒドロキシ酪酸を体重1Kgあたり0.5、1.0gの濃度  
で腹腔に1日1回、7日間投与後脾臓シクロオキシゲナーゼIIのmRNA発現量を測定した。  
ハウスキーピング遺伝子(GAPDH)発現量で方正後、コントロールを1として  
値を算出した。

以上のように、初期成長期のブロイラーにおいて、ケトジェニック飼料給与は、TBARS を低下させるものの、抗酸化能も低下させる、また、ケトン体投与も TBARS を低下させるが、抗酸化能も低下させる傾向を示した。採卵鶏とは異なり、初期成長期のブロイラーにおいては、血中脂質濃度に大きな影響を与えず TBARS を低下させることから、ケトン体が酸化ストレスを低減する可能性も考えられる。しかしながら、ケトジェニック飼料給与による抗酸化能の低下および COXII mRNA 発現量の増加がみられること、また、*in Vitro*におけるケトン体の COXII の発現量の増加作用の結果から、ブロイラー雛においてもケトン体は、redox status に対して負の作用を示すことが示唆される。ケトン体投与試験において、抗酸化能低下および COXII mRNA 発現量の有意な増加が観察されなかったことの要因としては、ケトジェニック飼料給与と異なり、ケトン体が恒常的に体内に存在しておらず、十分な作用時間および濃度が得られなかったと推察され、この際 TBARS が低下していることから、比較的低濃度のケトン体は酸化ストレスに対して一過性には抑制する作用をもつ可能性も考えられる。

## 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)

[学会発表] (計 2件)

①大津 晴彦、矢ヶ部 陽子、山崎 信、阿部 啓之

産卵鶏における血漿脂質成分と抗酸化能に及ぼすケトジェニック飼料給与の影響

日本畜産学会第 109 回大会

2008 年 3 月 29 日

常磐大学 (茨城)

②大津 晴彦、矢ヶ部 陽子、金谷 健、  
山崎 信、阿部 啓之  
初期成長期のブロイラーヒナの抗酸化能に  
対するケトン体の影響  
日本畜産学会第110回大会  
2009年3月29日  
日本大学生物資源科学部（神奈川）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大津 晴彦 (OHTSU HARUHIKO)  
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機  
構  
畜産草地研究所機能性飼料研究チーム  
研究員  
研究者番号：40455316