

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301  
研究種目：基盤研究(B)（一般）  
研究期間：2020～2022  
課題番号：20H03123  
研究課題名（和文）暑熱ニワトリの摂食低下機構の解明：腸管バリア機能破綻を起点とした脳摂食抑制の検証

研究課題名（英文）Study on anorexia in heat-stressed broiler chickens: possible effects due to intestinal barrier dysfunction

研究代表者  
喜久里 基（Kikusato, Motoi）  
東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：90613042  
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、暑熱ニワトリの摂食低下メカニズムを解明するため、腸管透過性亢進によるリポポリサッカライド（LPS）の血中流入、血液脳関門の透過性亢進ならびに脳内炎症の連関を調べた。慢性暑熱感作によって体内では炎症が恒常的に生じ、腸管透過性は感作後早期に亢進する一方で、血液脳関門の透過性亢進や脳内炎症は生じなかった。しかし、暑熱感作とLPS投与を同時に行うと上記透過性が亢進し、脳内炎症が生じることが示された。これらの結果から、ニワトリの慢性暑熱による摂食低下メカニズムには腸管ならびに血液脳関門の透過性亢進が関係していると考えられるが、免疫状態の違いによって異なる応答を示すことが明らかになった。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

暑熱時の摂食低下に関するこれまでの研究の多くは、脳のみを対象にした解析であり、腸管機能の破綻に始まるシステミックな代謝には着目されていなかった。最近、健康や行動の関連性において、腸（および細菌叢）と脳機能を繋ぐ主に自律神経腸腸相関が研究されているが、本研究では血中因子を介した摂食低下機構への着眼であり、更なる学術的な発展が期待できるものである。また、本研究では、暑熱に加えLPSの同時投与すなわち衛生環境要因が加わることで脳内炎症が発生することを明らかにした。これは、実際の飼育環境により近い状態での反応と考えられ、本成果は基礎研究のみならず実用研究においても重要な情報を示すものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, to clarify the mechanism underlying heat stress (HS)-induced anorexia in chickens, we investigated the influences of influx of lipopolysaccharide (LPS) into the blood due to increased intestinal permeability on increased permeability of the blood-brain barrier (BBB) and intracerebral inflammation. HS caused inflammation in the body, and intestinal permeability was increased early after the HS exposure. However, hyperpermeability of the BBB and brain inflammation did not occur simultaneously. Meanwhile, dual treatment of HS and LPS administration induced BBB permeability and brain inflammation. These results suggest that increased permeability of the intestinal tract and blood-brain barrier could be associated with the HS-induced anorexia, while their responses may depend on their immune status in chickens.

研究分野：動物生産科学

キーワード：暑熱ストレス プロイラー 腸管透過性 リポポリサッカライド 血液脳関門 ヒドロキシ酪酸 炎症 摂食

## 1. 研究開始当初の背景

暑熱環境下において肉用鶏は、増体量や摂食量、飼料効率が低下する。生産現場では換気量の増加やクーリングパットなどを用いて鶏舎内温度を物理的に下げると同時に、ビタミンやミネラル、アミノ酸などの飼料中栄養素を強化し、生産成績の低下を可能な限り抑止しようと努めている。しかし、依然として暑熱による生産成績の低下すなわち“暑熱ストレス”は完全には克服できておらず、暑熱ストレス誘導メカニズムの全貌解明が強く求められている。これまでの研究において、暑熱下のニワトリでは、骨格筋タンパク質分解の亢進や酸化ストレス、炎症反応、腸管バリア機能低下が生じることが明らかになっている。研究実施者らは、このような代謝破綻が増体低下にどの程度寄与するかを過去の研究データを用いて算出した結果、代謝破綻による暑熱時の増体低下の寄与度は全体の3分の1程度に過ぎないことが分かった。言い換えると、暑熱時の増体低下の約3分の2が摂食量低下に起因することが分かり、暑熱時の摂食低下メカニズムの解明が増体低下の抑止に向けてより重要であることを見出した。

先行研究より、暑熱ニワトリの脳内では摂食促進因子ニューロペプチド Y の発現低下や、摂食低下をもたらすグレリンの発現上昇が生じること等が報告されており、中枢神経システムにおける摂食制御メカニズムの一端が示されている。しかし、これらの変化が暑熱下でどのようにして生じているのか、とりわけ末梢の代謝破綻との関連性に着目した研究はない。暑熱時では、腸管透過性の亢進にともない、微生物由来の炎症誘導物質であるリポポリサッカライド (LPS) が血中に流入し、各種組織・器官で炎症を惹起することが知られている。他方で、LPS をニワトリの腹腔内に投与すると脳の摂食中枢 (間脳) において炎症性サイトカインの発現が増加するとともに食欲不振が生じることが示されている。これらの結果より、暑熱下では腸管バリア機能の破綻によって、腸管内腔より流入した LPS が血液脳関門に影響を与え、脳内炎症を誘導し、摂食低下を招いているとの仮説が考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では、暑熱ニワトリの摂食低下メカニズムを明らかにするため、暑熱による腸管透過性亢進 (バリア機能破綻) → LPS の血中流入 → 血液脳関門の通過 (透過性亢進) → 脳摂食中枢における炎症性サイトカイン、摂食調節因子の発現変動を調べた。

## 3. 研究の方法

**試験 1:** 民間孵卵場より入手した 0 日齢雄ブロイラー (*Gallus gallus domesticus*, Ross 308) を供試し、飼育マニュアルに従い、2 週齢時までは幼雛バタリーで飼育した後、環境温度制御室内においてワイヤー製セパレート型単飼ケージで 1 週間飼育 (順化) した。同齢時において、対照飼育条件を 24 にして、0.5、1、3、7 日間暑熱環境下で飼育した (相対湿度 55 ± 10%)。暑熱感作は、飼育室の温度を 24 から 1 時間に 1 ずつ 34 (±1) まで徐々に上昇させ、温度上昇開始後から上記日数の間、動物を飼育した。暑熱感作終了後、採血を行った後、断頭により安楽死させ、間脳、脾臓、腸管組織を採取し、分析までの間 -80 で保存した。いずれの飼育期間中もニワトリは 23 時間明期、1 時間暗期の照明下で飼育し、水および飼料は自由摂取とした。飼料は主原料としてトウモロコシおよび大豆粕、大豆油を用い、ブロイラー前期用飼料 (粗タンパク質含量 21%、代謝エネルギー含量 3.1 Mcal/kg) の栄養水準になるよう設計・調製した。本試験は再現性確認のため、2 回実施し、1 回目の試験 (試験 1-1) では、摂食量、間脳の摂食関連因子および炎症関連因子の遺伝子発現、血中のコルチコステロン (CORT)、炎症性サイトカイン (IL-6) 濃度の各経時的変化を調べ、2 回目の試験 (試験 1-2) では、上記項目に加え、血中のエンドトキシン (LPS) 濃度、ジアミノオキダーゼ (DAO) 活性を調べた。各種因子の遺伝子発現量はリアルタイム RT-PCR 法で、血中 CORT、IL-6、LPS、DAO は市販キットで各々測定した。また、本試験では、腸管透過性亢進評価のため、12h 絶食したニワトリに蛍光標識デキストラン (FITC-d) を一定量経口投与し、暑熱感作後の同物質の血中濃度を蛍光強度計で測定した。試験 2 では、血液脳関門透過性評価のため、エバンスブルー\* を翼下静脈に一定量投与し、暑熱感作後の同物質の脳内濃度を分光光度計で測定した。

**試験 2:** 試験 1 と同様の方法で飼育したニワトリより、血液を採取し、ケトン体 (ヒドロキシ酪酸濃度: BHB) 濃度を調べた (試験 2-1)。続く試験 2-2 では、BHB を投与したニワトリを暑熱感作し、試験 1 で調べた測定項目の一部を測定した。さらに試験 2-3 では、上記の暑熱感作処理に加え、LPS 腹腔内投与 (*Escherichia coli* O127:B8 由来, 1 mg/kgBW) を組み合わ

せた試験を実施し、摂食量などにおよぼす影響を調べた。また、血液脳関門透過性評価として、FITC-d\*を翼下静脈に一定量投与し、暑熱感作後の同物質の脳内濃度を蛍光強度計で測定した。  
\*研究当初は安定同位体元素を用いて、同物質の脳内濃度を観察する予定であったが、コロナ禍において検出に足る量を手に入できなかったため、代替法としてこれらの物質を用いた。

#### 4. 研究成果

**試験 1:** 試験 1-1、1-2 いずれにおいても暑熱感作 0.5 日目より、摂食量は適温区に比べ低下する傾向 ( $P = 0.08$ ) を示し、感作日数が進むにつれてその低下度は徐々に大きくなった ( $P < 0.05$  vs 同時帯の適温区)。試験 1-1 では、脳内における摂食抑制因子コレシストキニン (CCK) は暑熱感作 3、7 日目で有意に増加した。炎症性サイトカイン IL-1、IL-8 の発現量は暑熱 1 日目において有意に減少し、このうち IL-1 発現量は暑熱感作 3 日目以降も低く推移した。炎症時に発現が亢進する急性期タンパク質 CRP は暑熱 3 日目に有意に増加した一方で、間脳の抗炎症サイトカイン (IL-10) の発現量に変化は認められなかった。これに対し、試験 1-2 では上記の変化に再現性は認められず、炎症関連因子と摂食関連因子の間にも関連性が認められなかった。

試験 1 において、摂食不振をもたらす CORT の血中濃度は、暑熱 1 日目のみ有意に増加した一方で、炎症性サイトカイン IL-6 の血中濃度はいずれの暑熱感作日においても有意に高くなること示された。血中 FITC-d 濃度は暑熱感作 1、3、7 日目に有意に増加した。試験 2 では、血中 DAO 活性は暑熱感作 3、7 日目に、LPS 濃度は同 1、3、7 日目にそれぞれの適温区の値に比べ有意に増加した。適温区および暑熱区における間脳の Evans ブルー濃度に違いが認められなかった。

以上の結果から、暑熱時の摂食低下と脳内の摂食関連因子、炎症関連因子に明確な関係性は認められず、本試験の暑熱モデルでは摂食低下、脳内炎症の関連性を明らかにすることはできなかった。一方、IL-6 の結果から、ニワトリの体内では暑熱により炎症が恒常的に生じていること、また、FITC-d、LPS および DAO の結果から、暑熱時の腸管透過性亢進は感作後比較的早期に起こることが示された。しかしながら、このような変化が生じていても血液脳関門の透過性亢進は認められなかったことから、暑熱時の摂食抑制に腸管内腔由来の物質流入は関与していない可能性が推察された。

これらの結果を受け、微生物由来の物質ではなく、血液脳関門を透過する内在性の抗炎症物質の多寡が摂食行動に関連している可能性を考え、続く試験 2 では暑熱時において血中濃度が低下するケトン体に着目して実験を行った。

**試験 2:** 試験 2-1 において、ガスクロマトグラフィー質量分析計ならびに市販キットを用いて、BHB を測定した結果、いずれの暑熱感作日においても同物質の血中濃度が適温区に比べ有意に低いことが示された。続いて、試験 2-2 において、BHB を給与したニワトリを慢性暑熱感作した結果、摂食量への影響は認められなかった一方で、血中の炎症マーカー (ALT、AST 値、アルブミン、総タンパク質) 値や IL-6 濃度が改善する傾向が認められ、脾臓や骨格筋における酸化損傷、炎症性サイトカインの発現量も低く抑えられた。しかし、間脳における摂食因子や炎症因子におよぼす影響は認められなかった。これらの結果から、暑熱時の血中 BHB 濃度の低下は脳以外の組織・器官の炎症反応に関与しているものの、暑熱時の脳炎症・摂食行動に関与していないことが示された。

これまでに行った一連の試験は、ニワトリと排泄物が摂食しないセパレート型のケージにて実施していたため、微生物感染が少ない環境での試験である可能性が推察された。このため、試験 2-3 では、微生物感染を模した LPS 投与処理を暑熱感作と組み合わせた動物試験を実施した。その結果、暑熱、LPS で単独処理したニワトリでは FITC-d の脳内流入がわずかに認められ、暑熱 / LPS 同時処理によってその検出値が著しく高くなった。また、同検出値に呼応するかのよう、脳の IL-6 濃度が増加し、摂食量が低下した。これらの結果から、暑熱下において LPS が多量に血中流入する場合は、血液脳関門の透過性が高まり、脳の炎症、摂食不振を招くことが示された。

まとめ：本研究では、2 の研究目的の ~ に対して、以下の成果を上げた。

- (1) 腸管透過性亢進、LPS 流入：ニワトリの体内では暑熱により炎症が恒常的に生じており、暑熱時の腸管透過性亢進は感作後比較的早期に生じる。
- (2) 血液脳関門透過性亢進：実験的な飼育環境 (セパレート型単飼ケージ) において慢性暑熱単独処理では透過性は亢進しないが、LPS の血中流入の増大により透過性は亢進する。
- (3) 脳摂食中枢における炎症性サイトカイン、摂食調節因子の変動：遺伝子レベルでの評価では左記因子に一貫した関連性は認められないが、LPS 処理により血液脳関門の透過性

が亢進し、脳内の炎症反応が惹起された場合では摂食との関連性が認められる。

- (4) ニワトリの慢性暑熱ストレスによる摂食低下メカニズムには腸管ならびに血液脳関門の透過性亢進が関係していると考えられるが、衛生状況にともなう免疫状態の違いによって異なる応答を示すことが示された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kyouhei F, Toyomizu M, Kikusato M	4. 巻 76
2. 論文標題 Possible role of corticosterone in proteolysis, glycolytic, and amino acid metabolism in primary cultured avian myotubes incubated at high-temperature conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Domestic Animal Endocrinology	6. 最初と最後の頁 106608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.domaniend.2021.106608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Motoi Kikusato	4. 巻 34
2. 論文標題 Phytobiotics to improve health and production of broiler chickens: functions beyond the antioxidant activity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Bioscience	6. 最初と最後の頁 345-353
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5713/ab.20.0842	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kyohei Furukawa, Masaaki Toyomizu, Motoi Kikusato	4. 巻 76
2. 論文標題 Possible role of corticosterone in proteolysis, glycolytic, and amino acid metabolism in primary cultured avian myotubes incubated at high-temperature conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Domestic Animal Endocrinology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.domaniend.2021.106608	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Motoi Kikusato, Guangda Xue, Anja Pastor, Theo A Niewold, Masaaki Toyomizu	4. 巻 100
2. 論文標題 Effects of plant-derived isoquinoline alkaloids on growth performance and intestinal function of broiler chickens under heat stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Poultry Science	6. 最初と最後の頁 957-963
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.psj.2020.11.050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 喜久里基
2. 発表標題 Phytobiotics to improve health and production of broiler chickens: functions beyond the antioxidant activity
3. 学会等名 Animal Biosciences Forum 2020 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	米山 裕  (Yoneyama Hiroshi)  (10220774)	東北大学・農学研究科・教授   (11301)	
研究分担者	小島 創一  (Kojima Soichi)  (30462683)	東北大学・農学研究科・助教   (11301)	
研究分担者	橘 哲也  (Tachibana Tetsuya)  (80346832)	愛媛大学・農学研究科・教授   (16301)	
研究分担者	村井 篤嗣  (Murai Atsushi)  (10313975)	名古屋大学・生命農学研究科・教授   (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------