

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658081

研究課題名（和文） 「還元水」や「水素水」は生体酸化ストレスの制御を約束するか？

研究課題名（英文） Effects of electrolyzed-reduced water and electrolyzed-H₂ water on oxidative stress in skeletal muscle of broiler chickens

研究代表者

豊水 正昭 (TOYOMIZU MASAOKI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：80180199

研究成果の概要（和文）：慢性暑熱環境下のブロイラーにおける電解還元水と水素水の効果を確かめることを目的とし、16日齢ブロイラーに脱塩素水、電解還元水、電解水素水を各々自由飲水させ、22日齢より6日間、32℃の慢性暑熱曝露を行った。その結果、慢性暑熱環境下のブロイラーへの電解還元水、電解水素水の給水は、暑熱曝露による浅胸筋・肝臓中の脂質過酸化の増加や増体量・飼料摂取量の低下を緩和することが明らかにされた。さらに暑熱曝露による十二指腸絨毛長ならびに絨毛／陰窩の比率の低下が改善される方向が示された。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study was to clarify effects of electrolyzed-reduced water and electrolyzed-H₂ water on broiler chickens exposed to chronic heat stress. Chickens were provided with ad libitum access to 1) dechlorinated water (no H₂, pH7.3), 2) electrolyzed-reduced water (mid H₂, pH10.2), or 3) electrolyzed-H₂ water (high H₂, pH8.5) for 6 d after 16 d of age. Thereafter, they were exposed to a constant 32℃ for another 6 d, subjecting to the same treatments regarding drinking water. Chronic heat stress lowered growth performance, duodenal villus height, and ratio of the height to crypt depth and enhanced lipid peroxidation in skeletal muscle and liver of broiler chickens. However, changes in these parameters were improved by both of electrolyzed water.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	0	1,900,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,100,000	360,000	3,460,000

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：還元水、水素水、活性酸素種、ミトコンドリア、酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

近年の畜産は、家畜の健康や福祉を重視した低ストレス環境下での生産形態を構築する必要があるが、現行の施設管理方式では抗ストレスや抗病性を担保することが必ずし

もできていない。ストレス緩和による理想的な家畜飼養、すなわち細胞の呼吸代謝活性を正常に維持し、過酸化物質産生を低減する飼養形態においては、現行の抗酸化飼料資材より効果のある新規の代替法、または、現行より

抗ストレス効果を著しく高めるような方法の探索が急務である。

研究代表者らは、家禽の暑熱ストレス条件下ではミトコンドリアからの活性酸素の産生が著しく増大し(Poult.Sci.84:307,2005; FEBS Lett.580,4815,2006)、これがミトコンドリア膜電位上昇にともなうスーパーオキシドアニオンラジカル $\cdot\text{O}_2^-$ であることを証明している(Am.J.Physiol.297,R690,2009)。すでに、水を電気分解して陰極側で生成される「還元水」には、この $\cdot\text{O}_2^-$ を(Biochem Biophys Res Commun,1997)、また「水素水」には $\cdot\text{OH}$ や $\cdot\text{HOO}$ を(Nature Medicine, 2007)、それぞれ除去できることが実証されている。したがって、還元水や水素水の飲水によって、暑熱ストレス下で生じる $\cdot\text{O}_2^-$ 、 $\cdot\text{OH}$ や $\cdot\text{HOO}$ の活性酸素を低減させることができれば、生体構成物質の過酸化のレベルを低く保つことができ、その結果、エネルギー代謝系の効率改善も期待できる。さらに、還元水あるいは水素水と抗酸化剤をうまく組合せれば、それ自身の抗酸化の効果を著しく向上させることも可能であると期待された。

2. 研究の目的

暑熱などのストレス環境下では生体内で強い酸化力をもつ活性酸素種(Reactive Oxygen Species, ROS)が過剰に生じる。この多量のROS($\cdot\text{O}_2^-$ スーパーオキシドアニオンラジカル、 H_2O_2 過酸化水素、 $\cdot\text{OH}$ ヒドロキシラジカル、 $\cdot\text{HOO}$ ヒドロペルオキシラジカル)の除去に、ビタミンCやEなどの飼料素材が利用されてきた。しかし、高ストレス条件下では効果が小さい。本研究は方法論を全く異にした、電解「還元水」や「水素水」の還元力で問題を解決しようとするものである。

3. 研究の方法

暑熱時における「還元水」と「水素水」の抗酸化効果を *in vivo* 比較実験して「試験水」

を評価するため、暑熱モデル、34°C、暑熱曝露したニワトリ(肉用鶏ブロイラー)に、「還元水」ならび「水素水」を飲水させ続け、飼料摂取量、体重を計測した。具体的には、実験動物として雄肉用鶏を供試し、24°C H_2O 区

(24 : H_2O , 全脱塩素水)および32°C慢性暑熱3区(32 : H_2O , 全脱塩素水 ; 32 : R- H_2O , 電解還元水 ; 32 : H- H_2O , 電解水素水)の計4区を設定して、暑熱感作を22日齢より6日間行った。各試験水は感作6日前より終了時まで自由飲水とし、試験飼料(CP22%, ME, 3.1kcal/g)は自由摂取とした。さらに、筋肉・肝臓の脂質の過酸化は、脂質酸化の二次生成物であるマロンアルデヒド(MDA)とチオバルビツール酸との反応生成縮合物を分光学的に調べた。さらに、タンパク質の過酸化はタンパク質のカルボニル含量を指標として調査した。なお、酸化還元電位値を実験期間中モニターして、給水の供給タイミングを最適化した。さらに、試験水との増強効果の可能性のある資材の検索については、ブドウ種子ポリフェノール(OPC)水、グルコース水、CoQ10水の単体投与による暑熱ストレス緩和効果についても調べ、組合せ効果試験の準備を行った。なお、両「試験水」の飲水による小腸形態変化ならびに骨格筋タンパク質代謝を明らかにするため、小腸絨毛や陰窩の長さ、タンパク質分解関連の遺伝子発現変化を調べ、試験水の暑熱緩和効果の作用メカニズムの一端を明らかにした。

4. 研究成果

各試験水の特徴として、全脱塩素水(対照区 : 白いバー)と比較すると、電解還元水ではpHが特に高く、水素濃度が高く、酸化還元電位が低いことを確認した。一方、電解水素水ではpHはやや高く、水素濃度が非常に高く、酸化還元電位が低いことを確認した(図1)。さらに、こうした試験水の性状は暑熱の影響を受けないことが明らかになった。

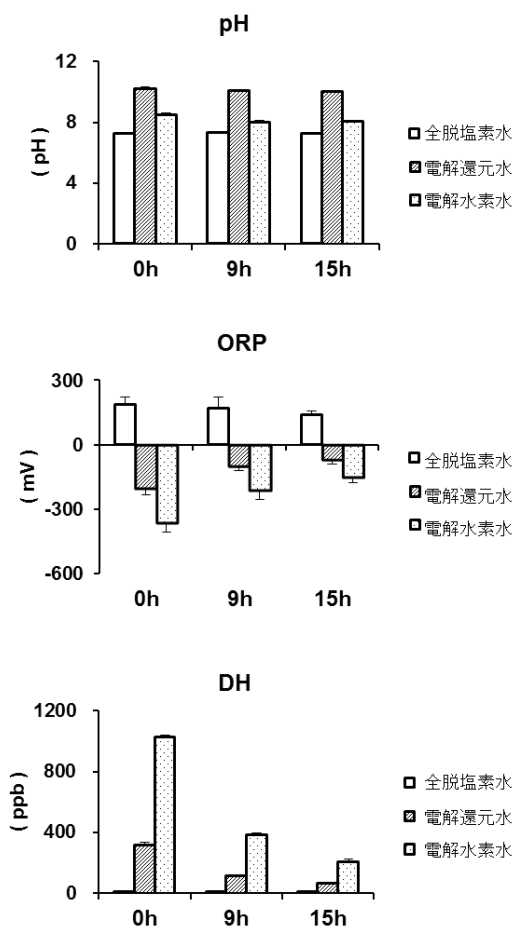


図1 試験水の性状

24℃環境下における各試験水のpH、酸化還元電位(ORP)、溶存水素濃度(DH)を測定した。測定は試験水交換時である0、9、15時間後に行った。
means ± SE., n=5, 6

そこで、「還元水」や「水素水」の給水によるストレス制御法の確立を試みた。主にスーパーオキシドに対する還元作用を有する「電解還元水」、およびヒドロキシラジカルを還元する「水素水」を用いて、これらの飲水に

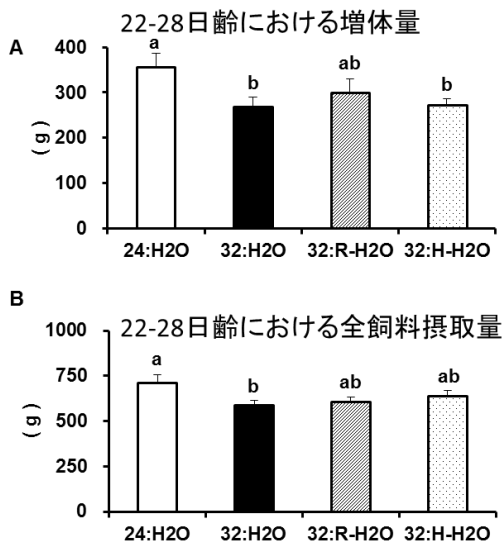


図2 22-28日齢における飼育成績

22-28日齢において、慢性暑熱3区では32℃の暑熱曝露を行った。対照区(白いバー)は24℃設定。
(A)22-28日齢における増体量
(B)22-28日齢における全飼料摂取量
Duncan's Multiple Range Test, ^{a-b}P<0.05, means ± SE., n=8-8

による慢性暑熱環境下における鶏の生産性と酸化ストレスに及ぼす影響を調べた。その結果、増体重は24:H₂O区と比較して32:H₂O区、32:H-H₂O区で有意に減少したが、32:R-H₂O区では差は認められなかった。飼料摂取量は32:H₂O区で有意に減少したが、32:R-H₂O区、32:H-H₂O区では差は認められなかった。つまり、電解還元水、電解水素水で暑熱による生産性の低下が緩和された(図2)。

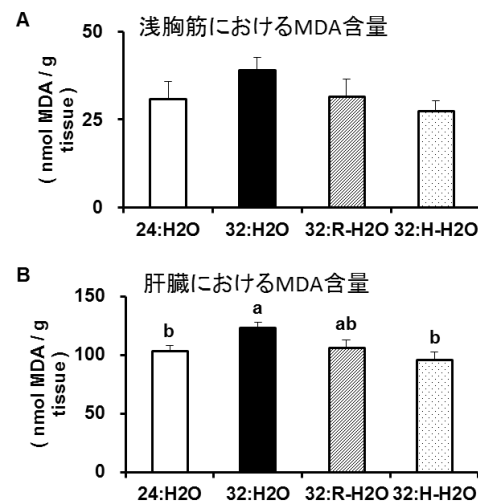


図3 組織におけるMDA含量

22-28日齢において、慢性暑熱3区では32℃の暑熱曝露を行った。対照区(白いバー)は24℃設定。屠殺後1週間以内にTBARS法により測定した。

(A)浅胸筋におけるMDA含量

(B)肝臓におけるMDA含量

Duncan's Multiple Range Test, ^{a-b}P<0.05, means ± SE., n=8-8

さらに、浅胸筋および肝臓のMDA含量は24:H₂O区と比較して32:H₂O区で有意に増加し

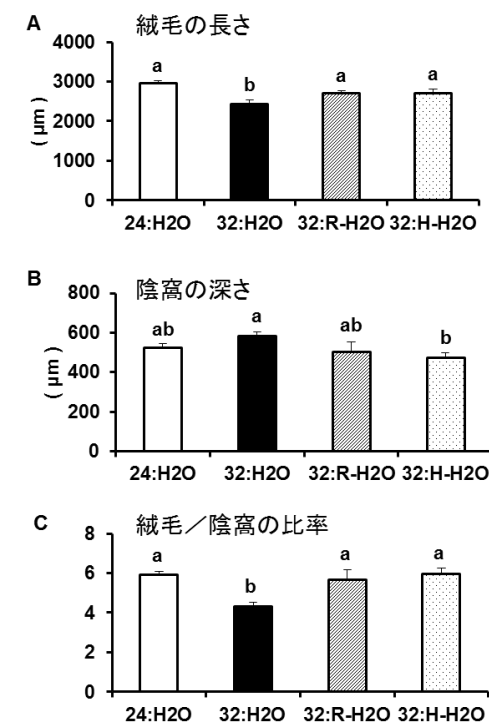


図4 小腸形態

22-28日齢において、慢性暑熱3区では32℃の暑熱曝露を行った。28日齢時に屠殺後、十二指腸の切片をHE染色し形態を観察した。

(A)絨毛の長さ

(B)陰窩の深さ

(C)絨毛/陰窩の比率

Duncan's Multiple Range Test, ^{a-b}P<0.05, means ± SE., n=8-8

たが、32:R-H₂O区、32:H-H₂O区で減少しており、電解還元水ならびに水素水の飲水により浅胸筋、肝臓の脂質過酸化を緩和しうる可能性が示された(図3)。

暑熱時における in vivo 比較実験より抗酸化効果においては「還元水」と「水素水」の両試験水で、また飼育成績においては「還元水」でより改善が認められた。そこで、両「試験水」の飲水による小腸形態変化ならびに遺伝子発現変化を明らかにし、試験水の暑熱緩和効果の作用メカニズムの一端を明らかにするとともに、試験水との組み合わせによる相乗効果の可能性について検討した。前年度同様の実験条件下、すなわち、肉用鶏雄を供試し、24°C H₂O 区(対照:全脱塩素水)および 32°C 慢性暑熱3区(感作6日前より 32:H₂O, 全脱塩素水; 32:R-H₂O, 電解還元水; 32:H-H₂O, 電解水素水)に飲水を施し、22日齢より暑熱感作を6日間行った。その結果、十二指腸の絨毛の長さは 24:H₂O 区と比較して 32:H₂O 区で有意に短くなったが、32:R-H₂O 区、32:H-H₂O 区では有意な差はみられなかった。一方、陰窩の長さは 24:H₂O 区と比較して 32:H₂O 区で長くなる傾向がみられたが、32:R-H₂O 区では有意な差はみられず、32:H-H₂O 区では短くなる傾向がみられた。また、32:H₂O 区と比較すると陰窩の長さは 32:R-H₂O 区で短くなる傾向がみられ、32:H-H₂O 区で有意に短くなった。このため、絨毛/陰窩の比率は、24:H₂O 区と比較して 32:H₂O 区で有意に低下したが、32:R-H₂O 区、32:H-H₂O 区では有意な差はみられなかった(図4)。このように、本験結果より、慢性暑熱曝露による絨毛、陰窩の状態は悪化するが、還元水、あるいは水素水によっていずれも改善される可能性が示された。このことにより、試験水が膵液や腸液の消化酵素(トリプシン、アミラーゼ、リパーゼ等)や、腸管上皮細胞、腸内細菌叢に好影響を与えている可能性が考えられた。

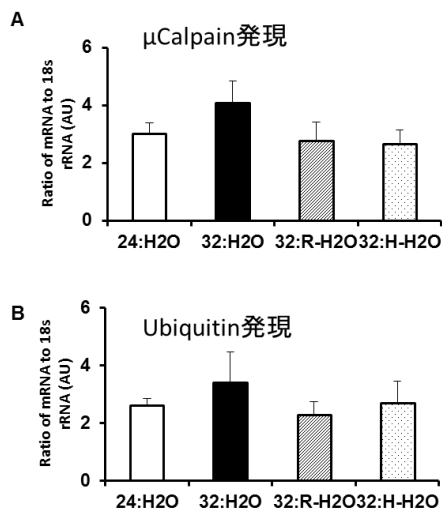


図5 浅胸筋におけるタンパク質分解関連遺伝子発現
22-28日齢において、慢性暑熱3区では32°Cの暑熱曝露を行った。対照区(白いバー)は24°C設定。28日齢時に屠殺後、浅胸筋におけるタンパク質分解関連遺伝子発現を、RT-PCR法により解析した。内部標準物質として18s rRNAを用いた。
(A) μCalpain発現
(B) Ubiquitin発現
means ± SE, n=8-6

さらに、浅胸筋におけるタンパク質分解関連遺伝子発現を解析したところ、μCalpain、Ubiquitinは24:H₂O区と比較して、32:H₂O区で上昇傾向にあったが、32:R-H₂O区、32:H-H₂O区でその上昇は抑えられる傾向にあり、このことは、暑熱感作によってタンパク質分解は促進されるが、還元水・水素水給与によって分解に関連するシグナルが抑制されていることが考えられた(図5)。

なお、試験水との増強効果の可能性のある資材の検索については、ブドウ種子ポリフェノール(OPC)水、グルコース水、CoQ10水の単体投与による暑熱ストレス緩和効果が認められなかったため、今後の課題とした。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

松枝朝子/慢性暑熱感作時のブロイラーにおける電解還元水および水素水給与による酸化ストレス緩和効果/日本家禽学会2011年秋季大会/2011.8.25/青森県 北里大学

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊水 正昭 (TOYOMIZU MASAACKI)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：80180199

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし