

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580404

研究課題名(和文) 暑熱ストレス負荷時におけるニワトリの摂食量低下メカニズムの解明

研究課題名(英文) Brain mechanisms of heat stress-induced feeding suppression in neonatal chicks.

研究代表者

河上 眞一 (Kawakami, Shin-ichi)

広島大学・生物圏科学研究科・准教授

研究者番号：50343984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：地球温暖化による気温の上昇は暑熱ストレスとして家畜・家禽の摂食行動を抑制するが、その詳細は不明である。よって本研究は、暑熱ストレス負荷時におけるニワトリの摂食行動抑制の脳内メカニズムの一端を解明することを目的とした。

まず室傍核に局在する副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)またはアルギニンバソトシン(AVT)の阻害剤を側脳室へ投与することにより、暑熱による摂食抑制が緩和された。また暑熱により神経活動の指標であるc-Fosの発現が視索前野および室傍核で観察された。よって、暑熱時におけるニワトリの摂食抑制に関与する神経伝達物質は室傍核に局在するCRHおよびAVTであることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Exposure to high environmental temperature is known to negatively affect animal growth. One of the factors has been that heat stress strongly suppresses feeding behavior of animals, the mechanisms remain unknown. Therefore, the aim of the present study was to clarify the brain mechanisms regulating heat stress-induced feeding suppression in neonatal chicks.

Intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing hormone (CRH) or arginine vasotocin (AVT) antagonist diminished heat stress-induced suppression of feed intake in neonatal chicks. In addition, heat stress elicited the expression of c-Fos, the index gene of neuronal activation, in the preoptic and paraventricular regions of the hypothalamus. These data suggest that heat stress activates CRH and AVT neurons in the paraventricular region to induce a variety of stress responses such as feeding suppression in the hypothalamus of neonatal chicks.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ニワトリ 摂食行動 暑熱 神経伝達物質 視床下部 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン アルギニンバソトシン c-Fos

## 1. 研究開始当初の背景

近年の環境温度の上昇は「暑熱ストレス」として畜産物生産に多大な損失を与えることが危惧されている。動物は暑熱ストレスに暴露されることにより摂食量が減少し、それに伴い動物の増体量、飼料効率、生産物の量および品質が低下する。ニワトリと暑熱ストレスとの関連については過去に多くの報告があり、例えば産卵鶏では暑熱環境下において摂食量、産卵率および卵質が低下することが知られており (Muiruri et al., 1991; Mashaly et al., 2004; Rozenboim et al., 2007)、また肉用鶏においても暑熱環境下で摂食量、飼料効率および屠体重が低下することが報告されている (Pourreza and Edriss, 1992; Teeter and Belay, 1996) ことから、暑熱ストレスへの対策は我が国の畜産業において重要な課題であるといえる。

近年、外界から受け取った温度情報は脊髄結合腕傍核などを介して視床下部視索前野 (POA) に統合されることが哺乳類において報告されている (Nakamura et al., 2010)。また、自律神経系の高次中枢および体温・睡眠・生殖・代謝などの中枢として知られている間脳視床下部には、摂食関連因子として室傍核 (PVN) に副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH)、弓状核 (ARC) にメラニン細胞刺激ホルモン (-MSH)、コカイン・アンタフェミン調節転写産物 (CART)、ニューロペプチド Y (NPY)、アグーチ関連ペプチド (AgRP) 等が存在し、CRH、-MSH、CART は摂食行動を抑制するのに対して、NPY、AgRP は摂食行動を促進することが知られている (Denbow et al., 1999; Kawakami et al., 2000; Tachibana et al., 2003; Tachibana et al., 2001)。これらのことから、暑熱ストレスは POA を介して摂食行動を制御する PVN、ARC 等の各神経核に作用することにより摂食行動を抑制する可能性が考えられるが、これらを証明する知見は哺乳類、鳥類の双方において存在せず、暑熱において摂食量減少に関与する神経伝達物質は現状では明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

よって本研究はニワトリヒナをモデル動物とし、薬理学、分子生物学および免疫組織化学的手法を用いて、暑熱ストレス負荷時における摂食行動抑制の脳内メカニズムの一端を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

すべての実験は卵用種ジュリアライト雄ヒナ (5~6日齢) を用いて実施した。孵化場から購入した孵化直後のニワトリヒナは、直ちに 4~5 羽ずつケージに入れて予備飼育を実施した。実験前日、ヒナは 1 羽ずつ実験用

ケージに入れて、馴化させた。実験直前にヒナの体重を測定し、各実験区の平均体重が等しくなるように区分けをおこなった。なお予備飼育は室温 30、24 時間点灯条件下で飼育し、市販の育雛用飼料および水は自由摂取とした。

まず、暑熱環境下でニワトリの摂食抑制に関与する神経伝達物質を同定することを目的として、神経伝達物質の阻害剤の脳室内投与による摂食量減少の緩和効果について検討した。使用した薬剤は CRH の非特異的アンタゴニストである *astressin* (Sigma-Aldrich, USA, 6 nmol/10  $\mu$ l)、 $\alpha$ -MSH のアンタゴニストである HS014 (Tocris Bioscience, USA, 50 pmol/10  $\mu$ l) またはアルギニンバゾトシン (AVT) の阻害剤である Manning Compound であった。薬剤は生理食塩水に溶解し、1 羽当たり 10  $\mu$ l を投与した。なお、薬剤注入部位確認のため、あらかじめエバンスブルー (0.1%) を溶かした生理食塩水を使用した。ヒナは室温の部屋から投与 5 分前に 40 に加温した部屋に移動後、試薬を投与した。実験終了後ヒナは断頭屠殺および開頭し、側脳室にエバンスブルー染色液が確認できた個体のみを集計した。摂食量、飲水量の測定は投与後 0.5、1、2、4 時間とし、給餌器重量を 1 mg まで測定可能な電子天秤で計測し、これをもとに算出した。同時に直腸温もデータロガーを用いて測定した。

次に、暑熱ストレスにより活性化する脳内部位の同定を目的として、神経活動の指標として汎用される *c-Fos* 蛋白質の抗体を用い、暑熱環境下におけるニワトリヒナ視床下部の免疫組織化学的染色を実施した。6-7 日齢のヒナを 2 区に分け、暑熱 (37、6h) または常温処理 (30、6h) の処理をそれぞれ行った後、4%パラフォルムアルデヒド固定液による灌流固定を行い、視床下部を含む脳組織片を採取した。クリオスタットを用いて厚さ 20  $\mu$ m の凍結切片を作成し、スライドガラスに張り付けて免疫染色に供した。*c-Fos* の免疫組織染色には蛍光免疫染色法を用いた。マウス抗 *c-Fos* 一次抗体は Santa Cruz Biotechnology Inc.社 (C10) の製品を 6,000 倍に希釈して用いた。また蛍光標識二次抗体として Alexa Fluor 568 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (A-11031, Molecular Probes) を 800 倍に希釈して使用した。染色した切片の観察には蛍光顕微鏡 (Eclipse-E600, ニコン) を使用した。視床下部領域を含む切片を写真撮影してデジタル画像を取得し、*c-Fos* 免疫陽性反応のあった視床下部領域を同定した。染色部位の同定には脳地図 (Pulles, et al., 2007) を用い、デジタル画像解析には ImageJ 1.46r (National Institutes of Health) を使用して視床下部の各神経核における *c-Fos* 免疫陽性神経細胞数を計測した。

## 4. 研究成果

暑熱ストレス負荷により減少した摂食量は、CRH の阻害剤である astressin および AVT の阻害剤である Manning Compound の脳室内投与により増加したが、 $\alpha$ -MSH の阻害剤である HS014 の脳室内投与により回復しなかった。CRH および AVT 含有神経細胞は PVN の小細胞領域に存在するのに対し、 $\alpha$ -MSH は ARC に局在することが過去に報告されていることから (Eskay et al., 1979; Swanson et al., 1983) これらの結果により、暑熱ストレスによるニワトリヒナの摂食抑制には、ARC に局在する  $\alpha$ -MSH は関与せず、PVN に局在する CRH および AVT の役割が重要であることが示唆された。

また抗 c-Fos 抗体を用いた免疫組織化学的染色において、暑熱環境下のニワトリヒナの POA 領域では前内側視索前核 (AMPO)、正中視索前核 (MnPO)、海馬交連核 (HiC) に c-Fos 免疫陽性神経細胞が多数観察され、また PVN 領域では室傍核小細胞部 (PaPC) および大細胞部 (PaMC) 領域に c-Fos 免疫陽性神経細胞が観察された。しかし ARC 領域では c-Fos 免疫陽性神経細胞はほとんど観察されなかった。以上の結果より、暑熱環境下のニワトリヒナ視床下部では主に POA および PVN 領域の活性化が誘起され、ARC 領域は活性化されないことが示唆された。POA 領域では哺乳類においても同様に暑熱曝露による c-Fos 免疫陽性神経細胞数の増加が過去に報告されており (Patronas et al., 1998)、本結果は過去の報告と一致した。MnPO および AMPO 領域は Preoptic/Anterior Hypothalamus (PO/AH) と呼ばれる領域の一部であり、この領域には環境温度の変化によりその発火頻度を変化させる神経細胞、いわゆる温度感受性神経細胞が多数局在することが哺乳類 (Boulant, 2000) および鳥類 (Nakashima et al., 1987) において報告されていることから、本研究で観察された POA 領域における c-Fos 免疫陽性神経細胞は温度感受性神経細胞であることが示唆された。また近年、哺乳類では加温刺激により結合腕傍核に局在する神経細胞が c-Fos を発現するとともに MnPO に直接投射することが報告されており (Nakamura et al., 2010)、MnPO は末梢からの暑熱情報を伝達する神経経路の一部であることが示唆されている。よって鳥類において同様の報告はなされていないものの、本研究においてニワトリヒナ MnPO 領域の c-Fos 免疫陽性神経細胞数が暑熱環境下にて増加したことは、鳥類においても末梢からの暑熱情報が MnPO に投射することが強く示唆された。また、PVN は内分泌系および自律神経系の機能を担う中核として知られており、特にストレス応答においては視床下部 - 交感神経 - 副腎髄質系および視床下部 - 下垂体 - 副腎皮質系の双方を制御する重要な脳内部位である (Benarroch 2005)。実際、哺乳類の PVN にはストレス応答に関与する

神経伝達物質である CRH およびアルギニンバソプレッシンを含有する神経細胞が局在し (Hisano et al., 1993; de Wardener 2001)、また鳥類の PVN にも同様に CRH および AVT を含有する神経細胞が局在する (Józsa et al., 1984; Viglietti-Panzica, 1986)。さらに、哺乳類において MnPO から PVN への直接の神経投射が観察されている (Silverman et al., 1981) ことから、本研究結果における PVN 領域での c-Fos 免疫陽性細胞数の増加は、暑熱環境下において同領域に局在するストレス関連神経細胞の活動を反映し、またそれらが暑熱環境下での摂食抑制に関与することが示唆された。但し、哺乳類の PVN においては MnPO と同様に温度感受性神経が存在するとの報告 (Inenaga et al., 1987) もあり、本研究にて c-Fos を発現する神経細胞の機能および動態については更なる検討が必要であると思われた。

これらの結果から、本研究期間全体を通じて暑熱環境下における摂食行動抑制の脳内メカニズムの一端が解明された。まず CRH または AVT 阻害剤の側脳室への投与により、暑熱による摂食抑制が緩和されたことから、暑熱時の摂食抑制に関与する神経伝達物質は CRH および AVT であることが判明した。CRH および AVT は視床下部の PVN 領域に局在し、また暑熱環境下にて PVN 領域に c-Fos 免疫陽性細胞が多数観察されたことから、この領域で観察された c-Fos 発現は CRH および AVT 含有神経細胞の活性化を反映することが示唆された。また暑熱環境下の POA 領域においても c-Fos 免疫陽性神経細胞が多数観察されたが、これらは末梢からの温度情報の受容による神経活動の活性化を反映するものと考えられた。

## 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 2 件)

1. Tanizawa H., Shiraishi J.-I., Kawakami S.-I., Tsudzuki M. and Bungo T. Effect of Short-Term Thermal Conditioning on Physiological and Behavioral Responses to Subsequent Acute Heat Exposure in Chicks. *Journal of Poultry Science*, 査読有、51, 2014, pp80-86
2. Yoshida N., Fujita M., Nakahara M., Kuwahara T., Kawakami S.-I. and Bungo T. Effect of high environmental temperature on egg production, serum lipoproteins and follicle steroid hormones in laying hens. *Journal of Poultry Science*, 査読有、48, 2011, pp207-211

[学会発表](計 2 件)

1. Kawakami S.-I., Furukawa A., Bungo T.  
Immunocytochemical localization of thyrotropin-releasing hormone (TRH)-immunoreactivity in the hypothalamus of neonatal chicks. Neuroscience 2013, 9-13 Nov. 2013, San Diego, USA
2. 河上眞一、林由里子、川井田恵子、豊後貴嗣、副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモンは暑熱環境下におけるニワトリヒナの摂食量減少に關与する、日本畜産学会第116回大会、2013年3月27-30日、安田女子大学、広島

〔図書〕(計 2件)

1. Steven L. Parker (ed.), Nova Science Publishers, Neuropeptide Y: Molecular Structure, Role in Food Intake and Direct/Indirect Effects, pp1-23, 2013
2. 江坂宗春(監修) 生命・食・環境のサイエンス、共立出版、pp68-70、2011

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

河上 眞一 (KAWAKAMI SHIN-ICHI)  
広島大学・生物圏科学研究科・准教授  
研究者番号：50343984

### (2)研究分担者

豊後 貴嗣 (BUNGO TAKASHI)  
広島大学・生物圏科学研究科・教授  
研究者番号：40325361