

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450391

研究課題名(和文) 鶏の脳内摂食調節ペプチドは自発的飼料摂取量変動に関与しているか？

研究課題名(英文) Relationship between endogenous NPY and GLP-1 in the brain and voluntary food intake in growing chickens

研究代表者

菅原 邦生 (Sugahara, Kunio)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：50091947

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：鶏ヒナに脳微小透析法を適用し側脳室から透析液を得、市販の酵素免疫吸着法キット(ニワトリ用)でニューロペプチドY(NPY)とグルカゴン様ペプチド-1(GLP-1)を定量した。それぞれの濃度は数pg/mLと100から300pg/mLと推定できた。いずれのペプチドも自発的摂食量の日内変動に伴って変動しなかった。微小透析法によるin vitro回収率は3%程度であった。透析液中GLP-1の定量に時間分解蛍光免疫測定法を適用したが、必要な定量性は得られなかった。GLP-1とNPYは生理的な摂食量の変動を制御していないことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to examine if the endogenous GLP-1 and NPY in the brain was associated with the diurnal food intake variation in growing chickens using the brain microdialysis technique. In vitro recovery ratio was as much as 3% for the both peptides. GLP-1 and NPY in dialysate from the lateral ventricle through the microdialysis probe (polyethylene, MWCO 1000 kDa) was measured in commercial ELISA kits for chickens. The concentration of GLP-1 and NPY was 100 to 300 pg/mL and less than 10 pg/mL, respectively. The variation of voluntary food intake was observed in chickens implanted cannula, but it did not follow concomitant variation of any peptides. Time-resolved fluoroimmunoassay for GLP-1 in the dialysate failed to get quantitative values. It is unlikely that GLP-1 or NPY involved in regulation of diurnal variation of food intake.

研究分野：動物栄養学

キーワード：内因性ペプチド 摂食調節ペプチド 自発的飼料摂取量 摂食量 脳微小透析法 側脳室 日内変動  
時間分解蛍光免疫測定法

## 1. 研究開始当初の背景

数週間で出荷体重に達するブロイラーやほぼ毎日産卵する採卵鶏では、飼料摂取量や栄養素供給の過不足による健康状態や生産能力の変動の程度がウシなどに比べて大きい。鶏における自発的な摂食量の調節に関する報告は四半世紀前から徐々に増えてきており、近年は ghrelin や prolactin などのペプチドが鶏ヒナの摂食量を変動させることが注目されている。これらのペプチドやその拮抗薬などの脳室内投与後の摂食量の変動に基づいてブロイラーや採卵鶏ヒナにおける摂食量の差異を説明する試みがなされている (Furuse ら、J. Poult. Sci., 44:349-356, 2007)。また、視床下部神経核のペプチド mRNA 量あるいはペプチドそのものが 24 時間以上の絶食によって変動することが報告されている (Decuyper のグループ、2012、Gen. Copm. Endo.178 : 546-555)。しかし、内因性摂食調節ペプチドが摂食量の生理的な変動、すなわち日内変動にどのような役割を果たしているかは十分に解明されていない。内因性摂食調節ペプチドの役割をより詳細に理解するためには、数時間以内に摂食量に変動する現象に注目して、摂食量の変動と脳内ペプチドの量の逐次的な変化を関連づけることが求められていた。

## 2. 研究の目的

摂食調節ペプチド、ニューロペプチド Y (NPY、側脳室に投与すると摂食を亢進する作用を持つ) とグルカゴン様ペプチド-1 (GLP-1、側脳室に投与すると摂食を抑制する作用を持つ) の側脳室脳脊髄液中の変動と摂食量の増減との関連を個体レベルで逐次的に観察し、これらのペプチドの変動が摂食量を変動させることを明らかにしようとした。

## 3. 研究の方法

### (1)脳微小透析用透析プローブの *in vitro* 回収実験

*in vitro* 回収実験は GLP-1 溶液 (1000pg/mL) または NPY 溶液 (2000pg/mL) を外液として、リンゲル液 (0.15%BSA 含有) を 1 $\mu$ L/分で灌流し、60 分ごとに透析液 60 $\mu$ L を回収し、ニワトリ用 ELISA キット (NPY;

CSB-FL016034CH, CUSABIO, GLP-1; MBS260694, MyBioSource) で定量した。透析プローブはポリアクリル製 (分画分子量 100kDa、膜長 2mm) およびポリエチレン製 (分画分子量 1000kDa、膜長 2mm) を用いた。灌流にはマイクロシリンジポンプ (780101E、KDS) とローラーポンプ (ERP-10、EICOM) を用いた。

### (2)透析用プローブ装着鶏ヒナの摂食量

18 日齢の雄鶏ヒナ (卵用種、体重約 230g) に麻酔を施した後、脳定位固定装置 (David Kopf) に保定し、Kuenzel and Masson (1988) の脳地図に従って側脳室にガイドカニューレを装着した。4~6 日後の 9 時に側脳室に挿入した透析プローブをリンゲル液 (0.15%BSA 含有) で灌流しながら (1 $\mu$ L/分)、10 時から 18 時まで 1 時間ごとに摂食量を記録した。

### (3)側脳室から得た透析液中のペプチドの定量

(2)の状態でも 60 分ごとに回収した透析液 2 本をあわせてニワトリ用 ELISA キットまたは時間分解蛍光免疫法で分析した。

### (4)時間分解蛍光免疫法の適用

抗ウサギヤギ血清および human-GLP-1 ポリクローナル抗体をイムノプレートに固相化し、検体またはユーロピウム標識 GLP-1 を結合させて検体中の GLP-1 を測定した。

## 4. 研究成果

### (1)脳微小透析用透析プローブの *in vitro* 回収実験

回収率 (透析液濃度/外液濃度)  $\times$  100 (%) はプローブの材質および分画分子量の違いには関係なく、どちらのペプチドも 3~5% であった。ここで得られた *in vitro* 回収率は  $\beta$  アミロイド (分子量 4000Da) に対して報告されている 10 から 15% より低い。NPY と GLP-1 の分子量も約 4000Da であるが、 $\beta$  アミロイドに比べ小さかった。

### (2)透析用ローブ装着鶏ヒナの摂食量

図 1 に示すように摂食量は 11 時、14 時にそれぞれ大および小のピークをもち、18 時に向けて再び増加した。このような変動はプローブを挿入していない鶏ヒナ

のものに類似していた。透析プローブの挿入とリンゲル液の灌流が摂食量の変動パターンに影響を与えないことを示した。

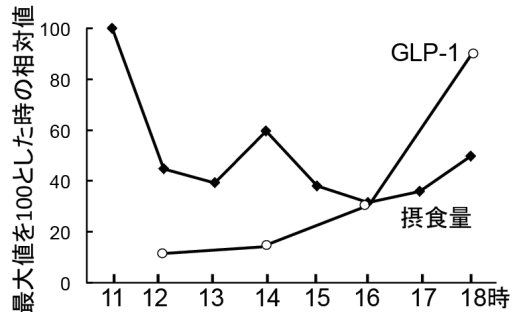


図1. 時間経過に伴う摂食量とGLP-1の変化

### (3)側脳室から得た透析液中のペプチドの定量

透析液中の NPY 濃度は 10pg/mL 未満、GLP-1 濃度は 100 ないし 300 pg/mL であると推定できた。NPY 濃度は測定キットの検出限界に近い値であり、摂食量の変動に対応する変動を見いだせなかった。なお、透析液をラジオイムノアッセイで分析した場合にも有意な変動は観察できなかった。また、0.5nM の NPY 溶液を reverse dialysis 法で側脳室に投与しても 1 時間当たりの摂食回数に変化は見られなかった。図 1 に示すように、GLP-1 濃度は 14 時まで低く、その後徐々に増加し 18 時に最大値に達した。摂食量の変動と合わせてみると、GLP-1 濃度の変動は日内変動に関連しているようには見えなかった。

GLP-1 と NPY は生理的な摂食量の変動を制御していないことが示唆された。

### (4)時間分解蛍光免疫法の適用

合成 chickenGLP-1 を検出することができた。検体容量が 100 μL の場合、良好な検量線を作成できたが、30 μL では検出限界が 40 pg/mL となり、透析液の定量には適用できなかった。測定用緩衝液や抗原抗体反応法などを改良する必要がある。

当初の計画では、側脳室と視床下部腹内側核から得た透析液中のペプチド濃度の変動の相関を調べ、より簡便、かつ安定的なサンプリングを目指したが、ペプチドの定量に時間を費やしたため、視床下部腹内側核における微小透析を実施で

きなかった。内因性の GLP-1 と NPY 含量は 100 ピコモル程度と推定でき、市販 ELISA キットで透析液 (1 時間で回収した容量 60 μL) 中の量の変動を見分けるほど精緻な定量は困難であった。時間分解蛍光免疫法の改良などによって、より少量のサンプル (例えば、30 μL/30 分) 中の濃度が定量できるようになれば、摂食量変動と内因性ペプチドの変動の関係をより精密に解析できるようになるであろう。

これまでに多くの摂食調節因子が同定されているが、今後は内因性のものかどのような情報に回答して、どのようにして摂食量を変動させるのかについて研究を進めることが必要である。

### 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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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

菅原邦生 (SUGAHARA Kunio)  
宇都宮大学・農学部・教授  
研究者番号：50091947

(2) 研究分担者

佐藤祐介 (SATO H Yusuke)

宇都宮大学・農学部・助教

研究者番号：50589520

福森理加 (FUKUMORI Rika)

宇都宮大学・農学部・助教

研究者番号：60721694

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：