

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：30109

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05907

研究課題名（和文）経済的で高効率なブロイラー異常胸肉の発現抑制飼育技術の開発

研究課題名（英文）Development of economical and highly efficient breeding technology to reduce the development of abnormal breast muscle of broilers

研究代表者

岩崎 智仁（Iwasaki, Tomohito）

酪農学園大学・農食環境学群・教授

研究者番号：30305908

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：採卵日齢の異なる卵と孵化時期の違いがWBの発現に及ぼす影響について調査し、その発現に影響しないことが明らかとなった。飼育前期の飼料栄養が欠乏することで、WBの発現割合や胸肉の酸化の度合いがリポフスチンや酸化タンパク質の測定から明らかになり、とくにオスでのWBの発現が著しことが示された。USP2と筋変性との間に高い相関関係を認めることはできなかったがmWBの重症度の増加との間にわずかに負の相関が認められた。他の関連遺伝子（炎症、アポトーシス、抗酸化酵素）の発現解析においては相関が認められる遺伝子があった。USP2と筋変性との間の関わりは、サンプル数を確保すれば相関があるレベルと考察している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

受精卵の採卵日齢とその孵化時期がWBの発現に影響しないという事実は、現在の種鶏モデル等に変更を強要するような結果ではないことから利用価値の高い知見と判断している。さらに、飼育前期の飼料栄養が欠乏することで、WBの発現割合や胸肉の酸化の度合いが明らかになり、とくにオスでのWBの発現が著しことが示されたことは、養鶏農場という現場において利用できる知見である。USP2とミトファジーあるいは筋変性との間にわずかではあるが高い負の相関が認められた。また、一部の関連遺伝子（炎症、アポトーシス、抗酸化酵素）の発現解析においても同様に相関が認められたことは、ブロイラーの骨格筋生理を理解する上で意義がある。

研究成果の概要（英文）：The effects of different egg collection ages and different hatching times on WB expression were investigated. The results showed that these factors did not affect the expression of WB. Lipofuscin and oxidized protein measurements revealed that the lack of dietary nutrients in the early stages of rearing resulted in a significant increase in WB expression, especially in males. On the other hand, we could not find a high correlation between USP2 and mitophagy or muscle degeneration. USP2 also showed a slight negative correlation with increased severity of WB. We consider that this correlation is likely to be observed when the number of individuals is increased.

研究分野：ライフサイエンス / 動物生産科学 / 畜産物利用

キーワード：ニワトリ ブロイラー 異常胸肉 骨格筋生理 酸化ストレス 筋変性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブロイラーにおいて胸肉の変性異常が全世界的に散発している。異常胸肉には緑変化、白スジ化、スパゲッティ化ならびに異常硬化などが知られている。現在、特に問題とされている異常は、異常硬化 (wooden breast, 以下WB) である。WBの発現は、胸部筋肉の発達速度を追求した育種改良に伴う酸化ストレスの増大と、それによるホメオスタシス異常が理由として示唆されている。このような背景から、WBの発現を低減するために、これまでに抗酸化成分 (ビタミンEやC等) を飼料に添加して飼育する試みが世界中で行われているが効果は限定的である。申請者は、WBの発現機序解明とその抑制の研究を進めるために、2017年より初生ヒナや種卵を導入して飼育試験を繰り返し実施してきた。これらの試験飼育の過程観察および各種試験成績から、飼育初期に低成長のヒナはその後WBを発現しやすいことを発見した。このことは、採卵日齢や孵化条件ならびに成長状態が影響するヒナ品質がWBの発現に影響する可能性を強く示唆している。さらに、申請者は初期飼料の栄養価 (代謝エネルギーと粗タンパク質量) の最適化によって、WBの発現抑制の可能性を見出した。さらに、WBの発現機序に関しては、筋ミトコンドリアの機能異常がマイトファジーを伴うWB発現の鍵になっている可能性を示した。このほかに、WBの筋組織の線維化に対応してユビキチン特異的プロテアーゼであるUSP2の発現動態が変動する新規知見を得ている。筋細胞中のUSP2は活性酸素の量を調節してミトコンドリアの機能を保護 (安定化) する可能性が示唆されている。WBは【虚血→活性酸素種の増加 (慢性的酸化ストレス) →ミトコンドリア異常 (病的なマイトファジー) による筋線維の崩壊→筋再生異常に伴う線維化→異常硬化】といった発現機序が提案されている。したがって、飼育飼料の栄養価の最適化が、USP2等を介したミトコンドリア機能維持に寄与してWBの発現抑制につながると考察し、この機序がWBの発現抑制の鍵の一つであると仮説を立てた。

2. 研究の目的

採卵日齢は卵重量に影響してヒナ品質低下の原因の1つになるが、これまでに採卵日齢等が影響するヒナ品質がWB発現に及ぼす影響についての報告はない。加えて申請者は飼育初期の栄養価でWBの発現が抑制されること、ならびにWBを発現した鶏はその後の制限給餌で症状が改善されることを確認している。栄養環境がUSP2関連タンパク質の発現に影響する可能性が示唆されている (Kitamura et al., FASEB J., 2013) ことから、ヒナ品質も考慮した代謝エネルギーや栄養価の組み合わせによる飼育飼料の最適化により、筋組織や胸筋内血管系が改善されWBを低減できる可能性がある。すなわち、最適化飼料によるブロイラーの健康な発育がWB発現抑制となり、経済的で効率の良い飼育方法の開発につながると考えている。そこで、1. 採卵日齢に起因するヒナ品質がWBの発現に及ぼす影響について、2. 栄養価の最適化飼料によるWBの発現抑制とその機序について、主にこの2点を生化学及び顕微解析手法を用いて調査した。

3. 研究の方法

① ヒナ品質がWBの発現に及ぼす影響の検証

採卵日齢の異なる種卵からヒナを得て、3群 (採卵日齢が初期、最盛期、後期) に分けて飼育した。飼育前後期ともに栄養欠乏飼料 (ROSSマニュアル基準) を給餌し、挙上試験、筋肉組織構造ならびにリポフスチンの定量により、ヒナ品質 (採卵日齢) がWB発現に及ぼす影響を明確にした。合わせて、孵化の期日 (孵化日が20日以前、ならびに21日後) によるWBの発現についても同様に調査した。

② 最適化飼料によるWB発現抑制飼育に及ぼす影響について

採卵日齢の同じ種卵からヒナを得て、2群（前期充足と前期欠乏飼料区）に分けて飼育し、後期に充足飼料を給餌してWB発現について、同様に挙上試験、筋肉組織構造ならびにリポフスチンの定量にて調査した。

③ USP2の介在について

上記で飼育したブロイラーの筋変性ならびに再生関連遺伝子の発現とUSP2関連遺伝子の発現はqPCRでそれぞれ解析した。筋変性に関してミトファジーの指標となるミトコンドリア関連遺伝子発現量も合わせて解析した。さらに炎症系のサイトカインについても解析した。

4. 研究成果

(1) 種鶏の日齢ならびに孵化の時期がWB発現に及ぼす影響

WB発現に関わる様々な可能性を調査するために、採卵日齢の異なる卵とWB発現頻度との関わりについて検証した。採卵日齢が高いほど卵重量および雛生体重も重かったが、47日齢ではいずれの群間でも生体重に有意な差は得られず、WBを示す指標（胸肉中のリポフスチン量）も顕著な差がなかった（図1）。同様に孵化の時期がWBの発現に及ぼす影響についても調査し、こちらも影響がないことを明らかにした。

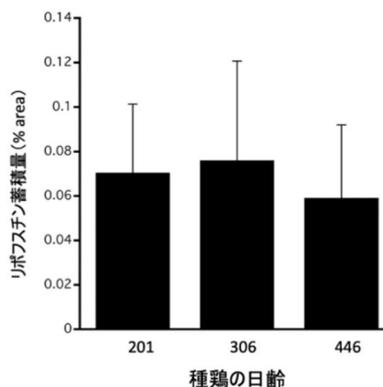


図1. 種鶏日齢の異なる卵から孵化したブロイラー浅胸筋中のリポフスチン蓄積量

(2) 給餌飼料がWBの発現に及ぼす影響

WBの発現を低減できる飼育方法の開発を目的としてブロイラーを2群にわけ、栄養価充足区には、前期飼料の栄養価が2014年版Ross308飼料基準に近い栄養価である充足飼料を与え、欠乏区には前期飼料として租タンパク質および表示代謝エネルギーがそれぞれ2.5%および4.1%低い飼料を給餌して飼養した。両区において、46日齢の生体重にいずれも有意差がなかったが、前期欠乏飼料を与えた群は翼の挙上試験で陰性が多く、リポフスチン蓄積量も有意に高い値を示した、特にオスにその傾向が強く現れていた（図2）。このことからWB発現を低減させるためには給餌飼料の栄養価が深く関わっていることを明らかにした。

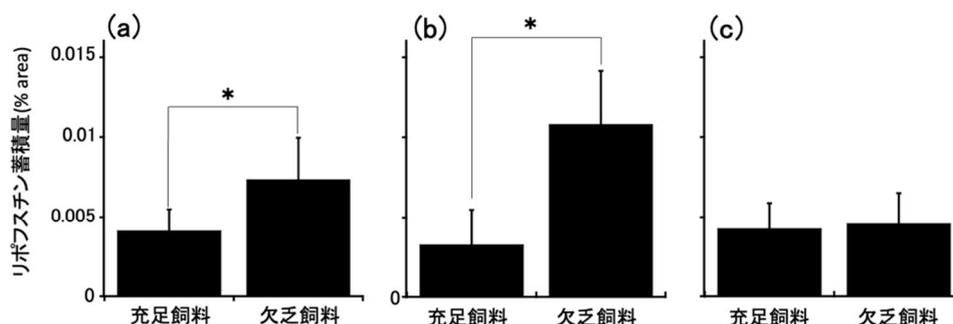


図2. 前期飼料の違いが浅胸筋中のリポフスチン蓄積量に及ぼす影響 (a)全体, (b)オス, (c)メス. エラーバーは標準偏差を, *は有意差を示す (p<0.05)

(3) WB発現におけるUSP2の関わりについて

得られた異常硬化胸肉の組織切片単位面積あたりの結合組織量を画像解析によって数値化し、結合組織量によってステージを6段階に区分けした。その際に使用した典型的なアザン

染色像を図3上段に示した．また図3下段は各ステージの筋組織 HE 染色の弱拡大像を示した．アザン染色では，ステージが高くなると出現する筋束間の組織が膠原線維，すなわちコラーゲンであることが示された．

電子顕微鏡で筋組織ならびに筋ミトコンドリア構造の観察を行った．ステージ 1 の筋組

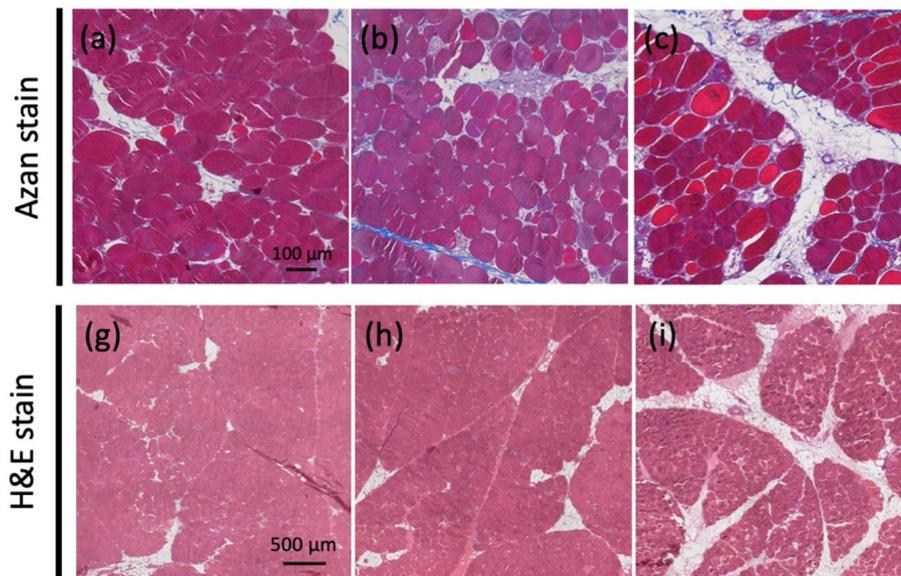


図3. 浅胸肉のAzan染色像の画像解析により重症度1-6のstageに分類した際の典型的なstage1,3,5と同じStageの弱拡大HE染色像を示した． Stage1(a, g), Stage 3(b, h), Stage 5(c, i).

織においては筋原線維構造やミトコンドリア構造に異常は認められなかった．一方，ステージ 3 以降の筋線維中にちいさな空胞が多く観察された．その空胞内を詳細に調べると空胞の中に，ミトコンドリアの変性構造物が観察され，さらにはその空胞の内側が濃く染色されていた．本試料の作製には OTO 法を用いており，脂質膜が強く染色される．したがって，この空胞は脂質を構成成分とした膜組織に覆われていることを示している．すなわち，空胞構造は，不要なミトコンドリアをオートファジーで分解している，いわゆるマイトファジー現象を観察していると判断した（図示はしていない）．図4には，関連する遺伝子群（アポトーシス，抗酸化，ならびに USP 関連）の発現量をステージ毎に分析した結果を示した．結論としては，意図していたような異常胸肉の重症度ステージと遺伝子群の発現には相関を得ることができなかった．アポトーシス関連遺伝子の発現量はステージ間で有意な差異は認められなかったが，チトクローム C の発現量と重症度ステージの増加には負の相関が認められた（スピアマンの相関係数 $\rho = -0.376$, $p = 0.0374$)．抗酸化酵素等の遺伝子発現量についてもステージ間に有意さが認められなかったが，ペルオキシレドキシシン 3 については，ステージの増加との間に負の相関が認められた（スピアマンの相関係数 $\rho = -0.532$, $p = 0.00426$)．そのほか Cu/ZnSOD の発現量についても重症度ステージの増加に伴い低下する傾向が認められた ($p = 0.208$)．USP の発現量については，異なる 2 種類プライマーセットを用いて USP2 の発現解析を行ったが，重症度の異なるステージ間には有意な差異は認められなかったが，重症度の増加との間にも相変わらずかではあるが，比較的高い負の相関（スピアマンの相関係数 $\rho = -0.306$, $p = 0.094$ ）が認められた．本結果は，個体数を多くすれば相関が認められるレベルと考えている．

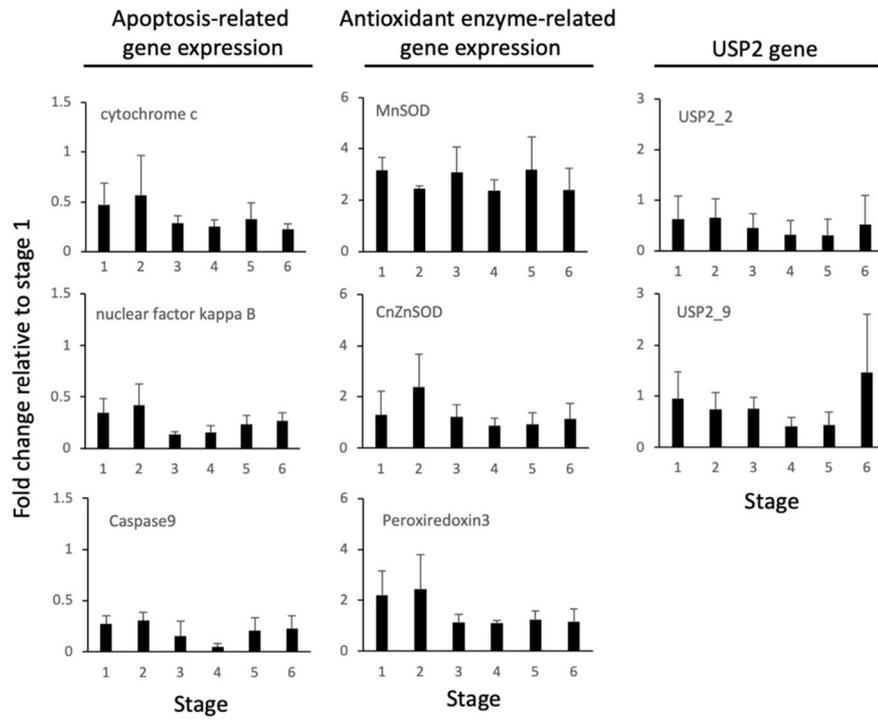


図4. 各Stageのアポトーシス関連, 抗酸化酵素, USP2の遺伝子発現量の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hasegawa Yasuhiro, Hosotani Marina, Saito Miyu, Nagasawa Tatsuki, Mori Yusuke, Kawasaki Takeshi, Yamada Michi, Maeda Naoyuki, Watanabe Takafumi, Iwasaki Tomohito	4. 巻 273
2. 論文標題 Mitochondrial characteristics of chicken breast muscle affected by wooden breast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology	6. 最初と最後の頁 111296 ~ 111296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cbpa.2022.111296	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 MAKIDA Sachi, KAMETANI Kiyokazu, HOSOTANI Marina, TAKAHASHI Naoki, IWASAKI Tomohito, HASEGAWA Yasuhiro, TAKAYA Tomohide, UEDA Hiromi, WATANABE Takafumi	4. 巻 84
2. 論文標題 Three-dimensional structural analysis of mitochondria composing each subtype of fast-twitch muscle fibers in chicken	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 809 ~ 816
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.22-0080	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 Hasegawa Yasuhiro, Kawasaki Takeshi, Yamada Michi, Hosotani Marina, Maeda Naoyuki, Watanabe Takafumi, Iwasaki Tomohito	4. 巻 103
2. 論文標題 Physicochemical properties of wooden <sc>breast extracted</sc> myosin and rheological properties of its <sc>heat induced</sc> gel	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of the Science of Food and Agriculture	6. 最初と最後の頁 5609 ~ 5615
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jsfa.12636	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 Hasegawa Yasuhiro, Kawasaki Takeshi, Maeda Naoyuki, Yamada Michi, Takahashi Naoki, Watanabe Takafumi, Iwasaki Tomohito	4. 巻 92
2. 論文標題 Accumulation of lipofuscin in broiler chicken with wooden breast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Animal Science Journal	6. 最初と最後の頁 e13517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/asj.13517	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 HOSOTANI Marina, KAMETANI Kiyokazu, OHNO Nobuhiko, HIRAMATSU Kohzy, KAWASAKI Takeshi, HASEGAWA Yasuhiro, IWASAKI Tomohito, WATANABE Takafumi	4. 巻 83
2. 論文標題 The unique physiological features of the broiler pectoralis major muscle as suggested by the three-dimensional ultrastructural study of mitochondria in type IIb muscle fibers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Medical Science	6. 最初と最後の頁 1764 ~ 1771
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1292/jvms.21-0408	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 -

[学会発表] 計8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yasuhiro Hasegawa, Takeshi Kawasaki, Michi Yamada, Marina Hosotani, Naoyuki Maeda, Takafumi Watanabe, Tomohito Iwasaki
2. 発表標題 Mitochondrial characteristics of chicken breast muscle affected by wooden breast
3. 学会等名 The 68th International Congress of Meat Science and Technology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomohito Iwasaki, Yasuhiro Hasegawa, Takeshi Kawasaki, Michi Yamada, Marina Hosotani, Naoyuki Maeda, Takafumi Watanabe
2. 発表標題 Physicochemical Properties of Wooden Breast-Extracted Myosin and Rheological Properties of its Heat-Induced gel
3. 学会等名 The 68th International Congress of Meat Science and Technology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 益田侑空, 細谷実里奈, 岩崎智仁, 長谷川靖洋, 川崎武志, 植田弘美, 渡邊敬文
2. 発表標題 ブロイラーのWooden Breast症における線維化メカニズムの研究
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 牧田紗智, 岩崎智仁, 長谷川靖洋, 細谷実里奈, 亀谷清和, 高橋直紀, 植田弘美, 渡邊敬文
2. 発表標題 ニワトリ外側腸脛骨筋ミトコンドリアの三次元構造解析
3. 学会等名 第164回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩崎智仁
2. 発表標題 食肉加工への超高压利用, 新規顕微鏡による食肉の顕微解析ならびに鶏の異常硬化胸肉に関する研究
3. 学会等名 第63回日本食肉科学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 長谷川 靖洋, 川崎 武志, 細谷 実里奈, 渡邊 敬文, 山田 未知, 前田 尚之, 岩崎 智仁
2. 発表標題 ブロイラー異常硬化胸肉における神経筋接合部の変化について
3. 学会等名 日本畜産学会第131回大会 2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 長谷川 靖洋, 川崎 武志, 細谷 実里奈, 渡邊 敬文, 山田 未知, 前田 尚之, 岩崎 智仁
2. 発表標題 ブロイラー異常硬化胸肉発現と胸肉内血管分布の関係
3. 学会等名 日本畜産学会第131回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 採卵日齢が異常硬化胸肉の発現に及ぼす影響
2. 発表標題 岩崎 智仁, 長谷川 靖洋, 細谷 実里奈, 渡邊 敬文, 山田 未知, 川崎 武志
3. 学会等名 日本畜産学会第131回大会
4. 発表年 2023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

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