

令和 6 年 6 月 8 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：21K05908
研究課題名（和文）ブロイラーに多発する異常硬化胸肉の発現機序の解明と発現を抑制させる飼養法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of expression of wooden breast in broilers and development of feeding methods to suppress its expression

研究代表者
長谷川 靖洋（Hasegawa, Yasuhiro）

酪農学園大学・農食環境学群・講師

研究者番号：50807328
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）：本研究の目的はブロイラーで高発現する異常硬化胸肉の発現と胸肉内血管との関わりを調査することである。異常硬化胸肉を発現した個体は胸肉内の胸鎖動脈の形成が不十分であることが明らかとなった。そのため、胸肉内を原因として血管形成不良により低酸素状態となることで異常硬化胸肉を発現する要因である酸化ストレスを生じることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国内外問わず、最も食されている肉種はブロイラーであり、ブロイラーの数%が異常硬化胸肉を発現し、商業的価値を損なうために廃棄されている。本研究で明らかとしたブロイラー胸肉の血管形成不良は異常硬化胸肉の発現させないために必要な基礎的な知見となり、今後の研究の展開を大いに期待できる成果である。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate the relationship between the development of wooden breast and blood vessels in the breast muscle, which is highly prevalent in broilers. It was found that individuals with wooden breast showed inadequate formation of sternal arteries in the breast muscle, and that hypoxic conditions caused by poor vascular formation resulted in oxidative stress, which is the cause of wooden breast.

研究分野：食肉科学

キーワード：ブロイラー 異常硬化胸肉 Wooden Breast

1. 研究開始当初の背景

養鶏業界では異常に硬化した胸肉(Wooden breast, 以下 WB)が多数発生し、品質の低い肉として廃棄されている。WB の組織学的特徴は筋線維の炎症と変性を伴い筋線維が結合組織に置換されていることにある。WB の発現には鶏の異常な成長速度が関係しており、胸肉の急速な発達に対して毛細血管の形成が追いつかず、筋肉内で虚血を引き起こし酸化ストレス状態にあると言われている。申請者は WB 内にリポフスチンの蓄積と筋ミトコンドリアの抗酸化酵素遺伝子の発現異常を確認した。しかしまだ、WB 内の虚血状態についての詳細は理解されていなかった。

2. 研究の目的

WB は急速な胸肉の発育に筋組織内部の血管系の発達が伴わず、虚血が生じて低酸素状態となることで酸化ストレス状態になるという、これまでの仮説に強い確信を得た。そこで、WB 発現鶏では胸肉内血管が発育不良であることを証明し、胸肉内虚血と筋損傷の関係を明らかにすることで WB 発現の機序の全容解明の一助とすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 試料の採取

所属機関の附属農場でブロイラーの出荷日齢である 46 日齢まで飼養し、定められた方法を用いて安楽殺後に胸肉を採取し、常法にて凍結切片を作成した後、各種染色を行なった WB 重症度は既報を参照し 3 群に分類した。さらに遺伝子解析用試料は RNA later に浸漬後に、常法で cDNA を合成し、遺伝子解析を行なった。

(2) 胸肉内の微細血管分布の観察

胸肉内の細動脈の染色はアルカリフォスファターゼ染色(以下、AP 染色)を用いた。10 μm に薄切した凍結切片にホルマリン、PBS、冷アセトンで 1:35:15 で混合した溶液中で 60 秒間浸漬固定した。30 秒間の流水洗浄を行ったのちに、9.2mg の Naphthol AS-MX phosphate、16mg の p ベンゼンジアゾニウム硫酸塩、500 μl の NN-dimethyl formamide、500 μl の 2M Tris-HCl(pH9.2)、9ml の蒸留水をそれぞれ秤量し、0.2 μm のフィルターで濾過したものを AP 染色液とした。前固定済みの試料に AP 染色液を滴下後、30 分間室温で静置した。30 秒間流水洗浄を行い、4%ホルマリンで 30 分間の固定した後、蒸留水で 5 分間の洗浄を 3 回を行い、PVA-DABOO で封入後に検鏡した。

(3) CD31 抗体による毛細血管の免疫組織化学染色

凍結切片作製後サンプルの周囲にハップペンで囲み、その中に 4%パラフォルムアルデヒドを含む PBS(pH7.4)を滴下し、30 分間静置した後、PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った。3%BSA を含む PBS(pH7.4)でブロッキングを 1 時間行った後、PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った。1 次抗体は 200 倍希釈した CD31 抗体をサンプルに滴下して室温で 90 分間静置した。PBS で 5 分間の洗浄を 3 回を行い、100 倍希釈した 2 次抗体を滴下後、1 時間静置した。PBS で 5 分間の洗浄を 3 回行った後、DAB 溶液を滴下した。15 分間静置後、PBS で 10 分間の洗浄を 3 回を行い、PVA DABOO で封入した。

(4) Real-time PCR

本研究では Hypoxia Inducible Factor 1 (以下、HIF1)および vascular endothelial growth factor(以下、VEGF)の遺伝子を対象とし、プライマーは合成した cDNA 溶液を Ultra Pure

Distilled Water RNase Free で濃度 100ng/μl に調製し, 使用するまで - 80 で保存した.
100ng/μl のcDNA 溶液をさらに, 同じく Ultra Pure Distilled Water RNase Free で 5 倍希釈した.
マスターミックスの作成では, 0.5μl の forward プライマー(F)ならびに, Reverse プライマー(R)に対して 50μl の SYBR qPCR Mix(2×)を加えた. 48 穴プレートにcDNA 溶液とマスターミックスをそれぞれ 5μl ずつウェルにアプライし, よく遠心したのち反応をモニタリングした. 増幅条件は, 初期変性を 95 1 分とし, 90 で 15 秒, 65 で 45 秒を 40 サイクル行った. Real time PCR 終了後, hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 を基準として比較定量法で相対値を算出してグラフ化した.

(5) 胸肉内血管走行の可視化

麻酔薬にて深麻酔下にしたプロイラーの翼下静脈に血管ルートを確認し, 医療用 CT 装置で非イオン性造影剤を注入しながら胸肉内の血管走行を可視化した. 得られた画像を常法にて再構成して画像を得た. 画像の取得後, 安楽殺し, 胸肉の 6 ヶ所から試料を採材した. (1)と同様に凍結切片を作成した後, HE 染色にて筋組織の形態の観察を行なった.

4. 研究成果

(1) 胸肉内細動脈および毛細血管の観察

AP 染色により細動脈系を青色に呈色させて観察したところ, 全ての重症度で青色に呈色された陽性部位が観察され, 陽性部位の多くは筋線維間に多く局在していた(図 1).

単位面積あたりの AP 染色陽性部位数は Normal, Mild, および Severe でそれぞれ 0.60 ± 0.60 個/mm², 1.73 ± 1.45 個/mm²および 2.10 ± 1.60 個/mm²となり, Mild および Severe の陽性部位は Normal と比較して有意に多

かった. 血管内皮マーカーの CD31 を指標とした抗 CD31 抗体による免疫染色によって, 毛細血管を黒色に染色して観察した. 陽性部位は筋線維間に多く局在していた(図 2).

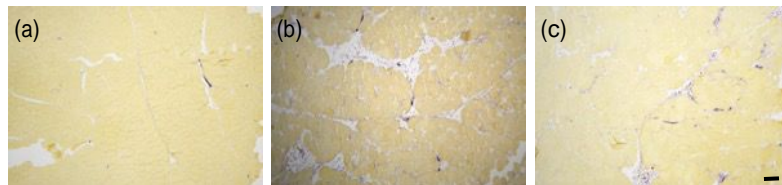


図1. AP染色による細動脈の局在観察
(a)Normal, (b)Mild, (c)Severe. エラーバーは100 μmを示す.

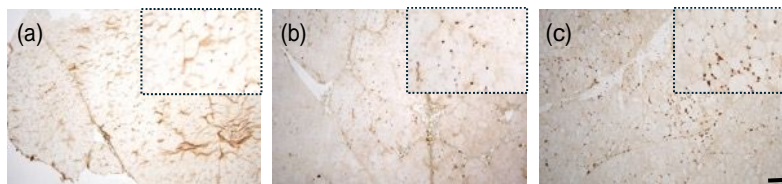


図2. CD31抗体による毛細血管の免疫組織化学染色像
(a)Normal, (b)Mild, (c)Severe. 図内ドットラインは強拡大像を示す.
エラーバーは100 μmを示す.

単位面積あたりの CD31 抗体陽性部位数は Normal, Mild, および Severe でそれぞれ 23.5 ± 10.0 個/mm², 45.3 ± 16.0 個/mm²および 81.1 ± 18.0 個/mm²となり, いずれの群間においても有意な差を認め, Severe で最も陽性部位が多かった.

(2) Real-Time PCR による発現遺伝子の定量解析

HIF1 および VEGF の遺伝子発現量はいずれの群間においても有意な差はなく, Severe, ormal, Mild の順で高値を示した. スペアマンの順位相関係数を用いた統計解析を行ったところ, Severe において HIF1 と VEGF の および p はそれぞれ, 0.8 および 0.0138 を示し, 有意な正相関を示した.

(3) 医療用 CT 装置を用いた胸肉内血管走行の可視化および HE 染色像

CT 撮像に用いた個体は翼の挙上試験を行い, 左右の翼を接触できる個体は正常, 左右の翼を接触できない個体を WB 個体とした。なお正常個体および

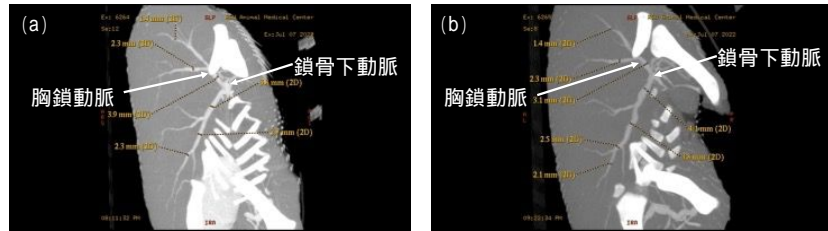


図3. 胸肉内血管走行 (a)正常個体, (b)WB個体,

び WB 個体の生体重はそれぞれ, 4110 および 4550 kg であり, WB 個体は 400 g ほど重かった。CT により可視化された胸肉内の血管径は差がなかった。血管走行はいずれも鎖骨下動脈から各血管に分岐しており, WB を高発現する腹側頭側部に走行

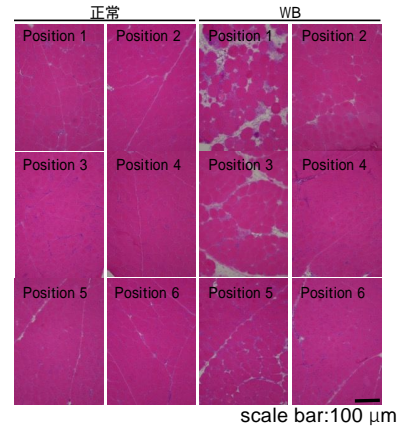
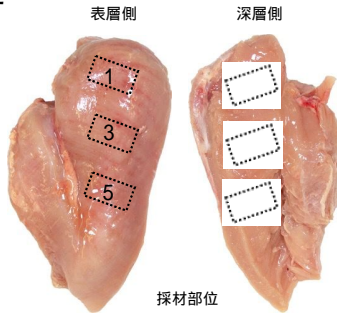


図4. CD31抗体による毛細血管の免疫組織化学染色像 (a)Normal, (b)Mild, (c)Severe. 図内ドットラインは強拡大像を示す。エラーバーは100 μmを示す。

する胸鎖動脈は正常個体で末梢部まで可視化された

(図3)。一方, WB 個体は胸鎖

動脈から腹側頭側部への分岐する血管を可視化することはできなかった。各個体の部位ごとの筋線維の形態は WB 個体の Position1 および 3 で WB に特徴的な筋線維多角形の鈍化を認め, 空胞変性を生じた組織像も観察された(図4)。

これまでの研究において WB は酸化ストレスにより発現することを明らかとしており, 酸化ストレスを生じる根本的な原因は不明瞭で合った。本研究において示した胸肉内の血管は細動脈や毛細血管は WB を重度に発現するとより多く形成しているが, 胸鎖動脈のように太い血管では正常固体で血管形成を促進されていた。骨格筋において筋再生する場合, 1. 壊死組織の貪食を伴う炎症, 2. 血液供給を回復するための血管新生, 3. 筋衛星細胞の活性化, 4. 損傷部位へ筋衛星細胞が遊走し, 筋芽細胞となり増殖, 5. 筋管細胞への分化, 6. 神経支配によって筋再生の完了をたどる。そのため, 筋損傷をより強く生じる Severe ではこの2のステップが亢進していると考えられ, これは PCR の結果と一致する。一方, CT では WB 発現固体で太い血管の形成不良を指摘され, これは胸肉内に酸素を供給する機能不全を生じさせている可能性を示唆しており, 低酸素状態により酸化ストレスを生じることを強く示唆することを明らかとした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yasuhiro Hasegawa, Marina Hosotani, Miyu Saito, Tatsuki Nagasawa, Yusuke Mori, Takeshi Kawasaki, Michi Yamada, Naoyuki Maeda, Takafumi Watanabe, Tomohito Iwasaki	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
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 Sachi Makida, Kiyokazu Kametani, Marina Hosotani, Naoki Takahashi, Tomohito Iwasaki, Yasuhiro Hasegawa, Tomohide Takaya, Hiromi Ueda, Takafumi Watanabe	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 The 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 Yasuhiro Hasegawa, Takeshi Kawasaki, Michi Yamada, Marina Hosotani, Naoyuki Maeda, Takafumi Watanabe, Tomohito Iwasaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Physicochemical Properties of Wooden Breast Extracted Myosin and Rheological Properties of its Heat Induced 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 -

〔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, ICoMST（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, ICoMST (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	プロイラーの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	長谷川 靖洋, 川崎 武志, 高橋 直紀, 渡邊 敬文, 山田 未知, 前田 尚之, 岩崎 智仁
2. 発表標題	プロイラー異常硬化胸肉の発現と胸筋内血管分布の関わり
3. 学会等名	令和5年度公益社団法人日本顕微鏡学会 北海道支部学術講演会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名 岩崎 智仁 , 長谷川 靖洋 , 山田 未知 , 細谷 実里奈 , 渡邊 敬文 , 川崎 武志
2. 発表標題 採卵日齡が異常硬化胸肉の発現に及ぼす影響
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 武島 大己, 長谷川 靖洋, 川崎 武志, 前田 尚之, 細谷 実里奈, 渡邊 敬文, 山田 未知, 岩崎 智仁
2. 発表標題 プ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年9月20日
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 プ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

〔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
研究協力者	岩崎 智仁 (Iwasaki Tomohito) (30305908)	酪農学園大学・農食環境学群・教授 (30109)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	渡邊 敬文 (Watanabe Takafumi) (50598216)	酪農学園大学・獣医学類・教授 (30109)	
研究協力者	川崎 武志 (Kawasaki Takeshi)	人と鳥の健康研究所	

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