

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580398

研究課題名(和文)ニワトリの初期栄養操作による育雛成績向上に関する研究

研究課題名(英文)Study on early nutritional operation to improve growing performance of chickens

研究代表者

太田 能之(Ohta, Yoshiyuki)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：00277667

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は孵化前と直後について少量の栄養投与で家禽の最大パフォーマンスを引き出す管理プログラムを作成することを目的とした。

その結果、無処理の3日齢ブロイラーヒナと比較して孵化前のin ovoアミノ酸投与区では消化管中部以降、孵化直後の頸部皮下投与区では消化管後部における免疫関連遺伝子発現量が増加し、凝集抗体価も増加し、薬剤に頼らない抗病性の高い飼育が可能であることを示した。また、成長後も筋肉中の成長因子受容体の遺伝子発現量が高いままで栄養インプリンティングが可能であることを明らかにした。さらに、これらのヒナは餌付け飼料の蛋白質量に関わりなく成長し、高栄養飼料原料の節約が可能であることを示した。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to produce a feeding program which induced maximum performance using minimum nutrients administration in broilers.

As a result, mRNA expressions involved in immune response in medium and later position of intestine, and blood antibody titer were higher in chicks administered amino acids by in ovo and subcutaneous injection than those of intact chicks. It indicated that healthy breeding of broilers were possible by amino acids administration on early stage. And because those treatments induced higher mRNA expression of IGF-1 receptor in pectoral muscle still on broilers 28 days of age, the nutritional imprinting might be induced by them. In addition, chicks, received above treatments, showed higher growth when they fed all diets containing several levels of protein. It is meaning that those technology can save the feedstuffs containing high levels of protein.

研究分野：動物栄養生化学

キーワード：初期栄養 in ovo投与 頸部皮下投与 アミノ酸 ブロイラー 免疫能 栄養インプリンティング 飼料中蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

食糧自給率、飼料自給率との関連からわが国の畜産業において飼料資源の有効かつ効果的な利用は重要な課題である。動物側からのアプローチとしては、動物の形質改善と栄養管理向上が求められ、飼料業界において肉養鶏の飼育は栄養要求量を含めて様々な管理スケジュールが確立されてきた。一方、育種的には遺伝資源が各メーカーによって管理され、組み換え遺伝子の利用の困難さから動物側の飼料栄養的な向上を図るためには新しいアプローチが必要である。

### 2. 研究の目的

安全な食料生産および飼料および食糧自給率向上のため、肉養鶏管理の中で、栄養に関する指標が提示されていない孵化前と直後について、栄養素投与方法の開発と栄養素の効果を経験インプリンティングによる後天的形質改善に結びつけ、少量の栄養投与で家禽の最大パフォーマンスを引き出す管理プログラムを作成することを目的とする。

### 3. 研究の方法

研究は、複数の実験で構成される以下の5試験によって行われた。

#### 試験1. 頸部皮下注射による栄養素投与が初生ヒナの免疫能に及ぼす影響

実験1はジュリア系白色レグホン採卵鶏を平均体重が同じになるように30羽ずつ2グループに振り分け、1区をアミノ酸溶液投与区、1区を対照区とし、血漿アミノ酸濃度を比較した。実験2はジュリア系白色レグホン採卵鶏種卵を温度37.8℃、相対湿度60%以上で孵化し、孵化17日目に卵重が近い卵を選んで、5%羊赤血球(SRBC)を0.1ml静脈注射した。その後再び孵化し、孵化21日目の孵化日に1区に生理食塩水(対照区)、1区にアミノ酸溶液、1区にグルコース溶液を頸部皮下注射によって投与した。頸部皮下注射24時間後(SRBCで免疫してから5日後)に心臓から採血し、血液は貪食反応による化学発光能の測定により好中球等の貪食に伴う反応の測定を行い、定法に基づき血清を分離し赤血球凝集反応を調べた。

#### 試験2. 孵化前後のアミノ酸投与部位がブロイラーヒナの糖新生および液性免疫に及ぼす影響

実験1はコブ系ブロイラーの種卵を温度37.8℃、相対湿度60%以上で孵化し、孵化21日目の孵化当日の初生ヒナを平均体重が同じになるように5羽ずつ11グループに振り分け、5区ずつをアミノ酸溶液投与区と対照区(生理食塩水投与)とし、それぞれ5区に全卵組成とかわらないアミノ酸溶液(159mg/ml)と0.9%生理食塩水を嚥嚥内に1.0ml投与した。孵化直後、各区とも1、2、4、6、もしくは8時間後に5羽ずつ採血を行い、

血漿アミノ酸濃度を測定した。実験2では、種卵を10個ずつ4グループに振り分けた。孵化18日目に1区に全卵組成のアミノ酸溶液(106mg/ml)を0.5mlずつ*in ovo*投与した。孵化後、1区を対照区とし、別の1区は頸部皮下に、最後の1区は経口から嚥嚥にアミノ酸溶液を投与した(159mg/ml;それぞれ0.2、1.0ml)。ヒナを30以上の環境下で群飼させ、24時間絶食絶水させた。孵化後24時間後に体重測定後、採血を行い屠殺後、肝臓を摘出した。得られた血液サンプルは遠心分離により血漿を分離し、3%スルフォサリチル酸により除タンパク後、血漿アミノ酸濃度を測定した。実験3では孵化17日目に種卵の卵殻膜下の血管に抗原として5%羊赤血球を50μl投与し、同様に孵化後、24時間後以降に市販されている幼雛用飼料(ME; 3,100kcal/kg、CP; 24.0%以上)を自由摂取および自由飲水させた。孵化後72時間後に体重測定を行い、心臓採血により得られた血漿サンプルを用いて凝集抗体価を測定した。

#### 試験3. 孵化前のアミノ酸投与による栄養インプリンティングによるアミノ酸利用率向上の検討

チャンキー系ブロイラー種卵に全卵組成のアミノ酸あるいは分岐鎖アミノ酸(BCAA)もしくは蒸留水を*in ovo*投与し、孵化14日目の胚および孵化後4週齢までのヒナの増体重を測定した。さらに胸筋を採取してIGF-1受容体mRNA発現量をReal time PCR法により測定した。

#### 試験4. 種卵へのロイシンとグルコースの同時投与がブロイラーの成長に及ぼす影響

実験1では90個のチャンキー系ブロイラー種卵を孵化し、孵化18日目に滅菌蒸留水、ロイシン溶液(4.5mg/0.5ml)もしくはロイシン+グルコース(4.5; 53mg/0.5ml)溶液を*in ovo*投与した。孵化した初生ヒナの体重測定と雌雄判別を行った後、幼雛用市販飼料を給与した。7日齢で各区を雌4羽を選抜し、28日齢時に体重測定後、浅胸筋および肝臓の重量を測定し、mRNA発現量を測定した。

実験2では60個の種卵を孵化し、孵化18日目にロイシンとグルコース投与の2要因の有無による2×2要因解析法により、試験1同様に滅菌蒸留水、グルコース溶液(53mg/0.5ml)、ロイシンもしくはロイシン+グルコース溶液を*in ovo*投与した。孵化した初生ヒナの体重測定と雌雄判別を行い、雄を選抜した後、幼雛用市販飼料を給与し、実験1同様に飼育し、体重と飼料摂取量を測定した。42日齢時に体重測定後、浅胸筋および肝臓の重量を測定した。

#### 試験5. 餌付け前飼料中アミノ酸含量が種卵へ栄養素投与したブロイラーの成長に及ぼす影響

100個のチャンキー系ブロイラー種卵を孵

卵し、孵卵 18 日目に蒸留水もしくはロイシン+グルコース溶液を *in ovo* 投与した。孵化した初生ヒナの体重測定と雌雄判別を行い、雄のみを選抜し、飼料中粗タンパク質含量 14.0%, 18.5%もしくは 23.0%の試験飼料を孵化後 24 時間給与し、その後は幼雛用市販飼料で飼育した。28 日齢時に体重測定後、浅胸筋および肝臓の重量を測定するために放血屠殺を行い安楽死させた。

試験飼料は主にトウモロコシと大豆粕で構成された CP を除く栄養素が NRC での要求量を満たす ME 3,100 kcal/kg の CP 14.0%, 18%および 23.0%の試験飼料を配合した。

#### 4. 研究成果

##### 試験 1. 頸部皮下注射による栄養素投与が初生ヒナの免疫能に及ぼす影響

実験 1 では血漿アミノ酸濃度のうち、血漿リジン濃度についてアミノ酸投与区が対照区に対して高かった ( $P < 0.05$ )。実験 2 では液性免疫の指標である赤血球凝集出反応の出現率がアミノ酸投与区、グルコース投与区、対照区の順に高かった ( $P < 0.05$ )。また細胞性免疫の指標である貪食反応による化学発光能についても同様の結果となった ( $P < 0.05$ )。頸部皮下注射によって投与された栄養素は体内に吸収され、特にアミノ酸は鶏初生ヒナの免疫能を液性および細胞性の両面から賦活化したと推察された。また、グルコースに対してアミノ酸投与の効果が高かったことから、アミノ酸の効果は糖新生以外にも大きいと考えられた。以上のことから、頸部皮下注射による栄養素投与は、孵化直後のヒナの栄養供給法として有効であり、特にアミノ酸投与は免疫能賦活化に対して効果がある可能性が示された。

##### 試験 2. 孵化前後のアミノ酸投与部位がブローラーヒナの糖新生および液性免疫に及ぼす影響

実験 1 ではアミノ酸投与の有無による効果はアスパラギン酸、グルタミン酸、プロリン、グリシン、アラニン、バリン、シスチン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニンおよびヒスチジンにおいて有意に増加した ( $P < 0.05$ )。アミノ酸投与後の時間経過による効果はタウリン、アスパラギン酸、Ser、グルタミン酸、プロリン、グリシン、バリン、シスチン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニンおよびヒスチジンにおいて投与後 1 時間後に有意に増加し ( $P < 0.05$ )。Ser はその後一定になり、プロリン、バリン、シスチン、メチオニン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、ヒスチジンはその後減少した ( $P < 0.05$ )。グル

タミン酸は投与後 2 時間後に有意に増加したが 4 時間後以降減少した ( $P < 0.05$ )。アスパラギン酸は投与後一時間後に増加傾向を示し、その後減少した ( $P < 0.05$ )。

交互作用はアスパラギン酸、スレオニン、グルタミン酸、プロリン、グリシン、アラニン、バリン、シスチン、メチオニン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニンおよびヒスチジンで認められた ( $P < 0.05$ )。アスパラギン酸、シスチン、イソロイシンは投与 1 時間後に対照区と比べ有意に高くなった。グルタミン酸、バリン、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニンは投与 1 および 2 時間後に対照区と比べ高くなった。プロリン、グリシン、アラニン、チロシン、ヒスチジンにおいて投与 2 時間後に対照区に比べ高い値を示した。

実験 2 では各アミノ酸供給部位へのアミノ酸投与は孵化後 24 時間後のヒナの血中アミノ酸濃度および PEPCK 活性に影響を及ぼさなかった。実験 3 では凝集抗体価では有意な差がみられなかった。血漿を 4 倍希釈した時の凝集の出現頻度を比較したとき、有意な差は見られなかったが、皮下および経口投与区で対照区および *in ovo* 区に比べ、出現頻度が高い傾向を示した。全卵組成のアミノ酸溶液を頸部皮下投与 1 時間で血中のリジン濃度が増加させ、筋肉分解を抑制させることから頸部皮下へのアミノ酸投与は孵化直後のヒナへの栄養添加できることが示された。また頸部皮下へのアミノ酸溶液の投与はその濃度に関係なく細胞性免疫を向上させることを示した。また早期餌付け (ME: 3,100 kcal, CP:18.5%) により孵化後 3 日齢時の細胞性免疫を向上させるが、早期餌付けを開始して 24 時間後では血中 3M-ヒスチジン濃度より、筋肉分解には影響を及ぼさなかったことより、アミノ酸投与部位により栄養素の役割が異なることが示唆された。しかし早期餌付けはアミノ酸の他に炭水化物および脂質を含むことからアミノ酸以外の影響が考えられた。

##### 試験 3. 孵化前のアミノ酸投与による栄養インプリンティングによるアミノ酸利用率向上の検討

BCAA の *in ovo* 投与により胚当たりの胸筋重量が増加し、孵化後 28 日齢時の体重は有意に低い一方 ( $P < 0.05$ )、胸筋重量は対照区と差が見られなかった。一方、雌雄間で差が認められ、雄においては体重の減少は認められなかった。また、28 日齢時の胸筋 IGF-1 レセプター mRNA 発現量は雄においてのみ分岐鎖アミノ酸および全卵組成アミノ酸投与区で有意に高くなり ( $P < 0.05$ )、インプリンティングが起きた可能性が示唆された。以上のことからアミノ酸を用いて筋肉蛋白質合成促進のための栄養インプリンティングは可能であるが、雄においてのみ有効である可能性が示唆された。

#### 試験4. 種卵へのロイシンとグルコースの同時投与がブロイラーの成長に及ぼす影響

実験1では3日齢および7日齢時のヒナの体重がロイシン+グルコース投与区においてロイシン投与区に比べて有意に重かった。28日齢時では、ロイシン+グルコース投与区が対照区と比べて有意に重くなった。浅胸筋 IGF-1R mRNA 発現量および肝臓 IGF-1 mRNA 発現量ともに有意な差は認められなかったが、ロイシン+グルコース投与区がロイシン投与区に比べて IGF-1R mRNA 発現量では低い値を、IGF-1 mRNA 発現量では高い値を示し、対照区と同様の mRNA 発現量の変動を示した。実験2では28日齢まではロイシンとグルコースの交互作用の影響が認められなかったが、28日齢以降での増体重ロイシン+グルコース投与区で他よりも高くなる傾向を示し、飼料効率でロイシン+グルコース投与区で有意に高くなった。

#### 試験5. 餌付け前飼料中アミノ酸含量が種卵へ栄養素投与したブロイラーの成長に及ぼす影響

*In ovo* ロイシン+グルコース投与により生産能が高められたブロイラーにおける飼料蛋白質含量について検討した。*In ovo* ロイシン+グルコース投与による影響が1日齢時と28日齢時で認められた。1日齢では体重がロイシン+グルコース投与区で対照区より低くなる傾向が、28日齢では体重がロイシン+グルコース投与区で対照区より高くなる傾向が認められた。0日齢から1日齢での摂食量では有意差はないが、ロイシン+グルコース投与区で対照区より減少傾向を示した。*in ovo* ロイシン+グルコース投与を行うと、ブロイラーは飼料中 CP 含量に影響を受けにくくなることが考えられた。

総括：以上の一連の研究結果より、孵化前後のアミノ酸投与により初生ヒナの免疫能を向上させることができること、とりわけ *in ovo* ロイシン+グルコース投与で成長に関する遺伝子発現を調節してブロイラーヒナの生産能を高める、すなわち成長促進に関する栄養インプリンティングができることを明らかにしてその方法を開発し、さらに栄養インプリンティングを行ったヒナでは飼料蛋白質含量を低く設定できる可能性が示され、新しい肉用飼養標準設定のための基盤が得られた。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 7件)

君塚万里恵・白石純一・太田能之、*In ovo* ロイシン投与がブロイラー胚の血中グルコー

ス濃度調節に及ぼす影響、日本家禽学会 2013 年秋季大会

石井春加・君塚万里恵・白石純一・太田能之、*In ovo* アミノ酸投与がブロイラー胚およびヒナの成長に及ぼす影響、日本家禽学会 2013 年秋季大会

石井春加・井上直俊・君塚万里恵・白石純一・太田能之、*In ovo* アミノ酸投与がブロイラーの成長およびインスリン様成長因子受容体遺伝子発現に及ぼす影響、日本家禽学会 2014 年春季大会

君塚万里恵・石井春加・白石純一・太田能之、アミノ酸投与がブロイラー胚の血糖調節機構に及ぼす影響、日本家禽学会 2014 年春季大会

太田能之・石井春加・君塚万里恵・白石純一、グルコースの添加が *in ovo* 分枝アミノ酸投与時のブロイラーの成長に及ぼす影響、日本家禽学会 2014 年春季大会

石井春加・江口晴基・西川薫・市川隆久・白石純一・太田能之、*In ovo* アミノ酸投与鶏の成長および胸筋 IGF-1 レセプター mRNA 発現量に影響する要因の検討、日本家禽学会 2015 年春季大会

太田能之・石井春加・曾根直弥・白石純一、ロイシンおよびグルコースの *in ovo* 投与時がブロイラーの成長と胚の筋肉タンパク質分解に及ぼす影響、日本家禽学会 2015 年春季大会

〔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：  
出願年月日：  
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

太田能之 (OHTA, Yoshiyuki)

日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・  
教授  
研究者番号：00277667

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

中尾暢宏 (NAKAO, Nobuhiro)  
日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・  
準教授  
研究者番号：60377794

古田洋樹 (FURUTA, Hiroki)  
日本獣医生命科学大学・応用生命科学部・  
準教授  
研究者番号：30366794