

近代ブロイラーの代謝障害に関わる初期栄養的要因に関する研究  
-初生ヒナの糖新生特異性と 25-ヒドロキシコレカルシフェロール  
による全身代謝制御系との関係-

(Study on early nutritional factors associated with metabolism disorders in  
modern broilers

-Gluconeogenesis specificity and the relation between systemic metabolic  
control regulation and 25-hydroxycholecalciferol in newly hatched chicks)

早川岳彦

近代ブロイラーの代謝障害に関わる初期栄養的要因に関する研究  
-初生ヒナの糖新生特異性と 25-ヒドロキシコレカルシフェロール  
による全身代謝制御系との関係-

(Study on early nutritional factors associated with metabolism disorders in  
modern broilers

-Gluconeogenesis specificity and the relation between systemic metabolic  
control regulation and 25-hydroxycholecalciferol in newly hatched chicks)

早川岳彦

日本獣医生命科学大学大学院獣医生命科学研究科  
応用生命科学専攻博士後期課程平成 28 年入学

(指導教授：太田能之)

平成 31 年 3 月

## 目次

第 I 章. 緒論	1
第 II 章. 近代ブロイラーにおける筋変性の検討	
1. 緒言	6
2. 材料と方法	8
3. 結果	13
4. 考察	24
第 III 章. 初生ヒナの糖新生特異性の検討	
1. 緒言	26
2. 材料と方法	28
3. 結果	30
4. 考察	37
第 IV 章. ビタミン D <sub>3</sub> がブロイラーの成長に及ぼす影響の検討	
1. 緒言	40
2. 材料と方法	42
3. 結果	45
4. 考察	50
第 V 章. 25-ヒドロキシコレカルシフェロールによる全身代謝制御系との関連性の検討	
1. 緒言	52
2. 材料と方法	55
3. 結果	62
4. 考察	78
第 VI 章. 総括	80
参考文献	87
謝辞	94

## 略語

アグーチ関連ペプチド：AgRP (Agouti Related Protein)

アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ：AST(Aspartate transaminase)

アミノ酸： AA (Amino acid)

アラニンアミノトランスフェラーゼ：ALT(Alanine transaminase)

ガンマーグルタミルトランスぺプチダーゼ：GGT( $\gamma$ -glutamyltranspeptidase)

インスリン様成長因子-1：IGF-1 (Insulin-like growth factor-1)

インスリン様成長因子-1 受容体：IGF-1R (Insulin-like growth factor-1 receptor)

グルコース：GLU

グルコーストランスポーター：GLUT(Glucose transport)

グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ：GOT(Glutamic oxaloacetic transaminase)

グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ：GPT(Glutamic pyruvic transaminase)

クレアチンホスホキナーゼ：CPK(Creatine phosphokinase)

神経ペプチド Y：NPY (Neuro peptide Y)

デコリン：DCN (Decorin)

トランスフォーミング増殖因子 $\beta$ ：TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ )

トリグリセリド：TAG(Triglycerides)

乳酸脱水素酵素：LDH(Lactate dehydrogenase)

ビタミン D：VD (Vitamin D)

ビタミン D<sub>3</sub>：VD<sub>3</sub> (Vitamin D<sub>3</sub>)

ビタミン D 受容体：VDR (Vitamin D receptor)

プロオピオメラノコルチン：POMC (Pro-opiomelanocortin)

ホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ：PEPCK (Phosphoenolpyruvate carboxykinase)

遊離脂肪酸:FFA(Free fatty acid)

1,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub>：1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

25-ヒドロキシコレカルシフェロール： 25(OH) D<sub>3</sub>

White striping: WS

Wooden breast: WB

## 第 I 章 緒論

世界の人口は 2017 年の 75.5 億人から 2050 年には 97.7 億人になると予測されているが、同時に経済成長の発展に伴い、収入も増えるにつれて人口比率が過疎部から都市部へと流動する。1950 年には世界人口の 30%が都市部で生活していたが、2018 年には 55%、2050 年には 68%にまで増加するとの予測である (United Nations, 2017)。人口が都市部へ増加することにより動物性たんぱく質の消費も上昇し、2006 年と 2050 年を比較すると 80%の増加予測と報告されている (Ranganathan と Waite, 2016)。特に畜産動物の中でも飼料効率が高い鶏肉の生産需要は増加し続けており、過去 10 年における世界生産量も 47%増となっている。このことは、他の動物性たんぱく質源である牛肉 (9%)、豚肉 (17%) と比較しても注目されている (FAO, 2018)。食糧供給に対する生産と確保が世界的な課題となっており、2015 年の国連サミットで採択された 17 項目の持続可能な開発目標 (SDGs, Sustainability Development Goals) にも関連している問題である。このため鶏肉産業では世界的な高需要に応えるべく、ブロイラーの育種改良は進み、1957 年と 2005 年のブロイラーを比較すると 56 日齢での生体重がそれぞれ 905 g、4,202g と大きく異なっており、43 日齢における胸肉の増加は雄で 79%、雌で 85%増加している (Zuidhof ら, 2014)。

飼料効率の改善、鶏肉生産量が増加する一方で鶏肉品質に関する問題も報告されている。羽翼の急激な運動によって筋繊維への酸素供給不足に伴う深胸筋の壊死、変性が認められる深胸筋変性症 (Deep pectoral myopathy, 別名緑胸症) は従来から報告されている症状だが (Richardson ら, 1980)、近代ブロイラー品種では、さらに White Striping (WS) と呼ばれる浅胸筋の筋線維に沿って白い筋が肉眼的に認められる症状 (Kuttappan ら, 2009) や、WS に伴うとされ

る浅胸筋が木質のように硬化する Wooden Breast (WB) と呼ばれる症状 (Sihvo ら, 2013) が報告されている。

WS は近代ブロイラーに対して特に成長を早めようとする飼養栄養管理によって低エネルギー飼料よりも高エネルギー飼料給餌によって多く発生し、雌雄別では雄の方が重症度は高く、体重はより重い個体の発生頻度が高かった (Alnahhas ら, 2016 ; Kindlein ら, 2017)。組織病理的所見では、筋線維変性が確認され、線維組織の壊死が確認されている (Ferreira, 2014)。Petracci ら (2014) は、浅胸筋における筋肉内脂肪含量とコラーゲン含量が WS 発症区で有意に高く、タンパク質含量は有意に低かったと報告している。それを防ぐためのビタミン E やセレンなどの抗酸化物質の不足等も検討されたが、ブロイラーの成長段階における栄養素給与では明らかな効果は得られなかった (Kuttappan ら, 2012)。

WB は WS と同様に筋線維変性が確認されているが、さらに炎症性による壊死性線維が確認されており、浅胸筋の pH は無発症区に比べてアルカリ域に傾いていること、水分保水能力が低下していること (Soglia ら, 2016) から、胸肉の硬化につながっているのではないかと推察される。また、WS では外見上の判別が不可能であった肉眼的判断として、WB はブロイラーのそれぞれの翼が背中側でコンタクトできるかどうかで発症の可能性を簡易診断することが可能であり、浅胸筋の硬化により翼の可動域が狭くコンタクトできない場合は発症が疑われる (Kawasaki ら, 2016)。アメリカ農務省の食品安全検査局の公示書 (FSIS Notice 52-18, 2018) によれば、WS は炎症組織との関連はないとされているが、WB においては炎症組織が認められるため、その部位をトリミングするようにとの指示が出ており、正肉として販売できず加工品へのダウングレードや廃棄といった経済的なリスクにもつながり、原因究明と解決策が求められるところである。

近代ブロイラーにおける WS、WB のような筋変性の問題は、当初胸肉消費が多い欧米特有の問題であると推測していたが、現在では日本国内でも確認されていることから (Otsu ら, 2017)、地域および市場特性、とうもろこしもしくは小麦といった主要飼料原料の相違、マッシュ、ペレットなどの飼料加工形態には関連は低いと推察され、ブロイラー育成期のサプリメントなど栄養面での改善傾向も見られにくいことから、ブロイラーの遺伝育種改良の結果による成長特性および飼養形態との関連があるのではないかと考えられるが、その発生機序はまだ明らかにされていない。ブロイラー品種はレイヤー品種と比較し、成長速度が大きく異なり、筋肉タンパク質代謝のうち、筋肉タンパク質分解を抑制させることで成長を促進させてきた。近代ブロイラーは特に胸肉の発達を主軸として育種改良されてきた種であり、同化作用である筋肉タンパク質分解抑制に強く働きかけているものと考えられる。一方で、孵化前後のニワトリは筋肉タンパク質分解による糖新生を盛んに行う。ニワトリ胚の発達における糖新生により血中グルコース (GLU) が高濃度に維持されることが知られており (Ohta ら, 1999)、糖新生はグリコーゲン合成と GLU 合成が考えられるが、グリコーゲン合成を行っていることは報告されている (John, 1988)。インスリンは異化と同化に関わるホルモンで血中 GLU を制御する働きがあり GLU 量に依存して膵臓から分泌されるが、GLU 合成もしくは血中 GLU 制御が異化段階であるニワトリ胚の発達にとって重要と考えられる。そのため、孵化後、同化作用に転換してからは筋肉タンパク質合成など成長に必要な各器官の機能連携による生命システムの構築が重要となる。ブロイラーの成長には各器官の発達が必須であり、特に骨格形成は各組織発達の基盤ではあるが、筋肉タンパク質合成分解の異化作用とは異なり、骨および各組織形成との関係についての研究はまだ限られている。現在までの研究報告において、成長段階に関しては筋肉タンパク質の合成分解系や免疫系の検討は行われてきたが、各組織の発達には



骨格の発達が重要であることや筋肉の発達は糖新生の作用と異なることから、骨格系の制御からの筋変性に対する検討は重要であると思われた。本研究の WS および WB に対する仮説として、初生ヒナの成長促進要因である筋肉タンパク質分解抑制と胚発生中の糖新生の活発による筋肉タンパク質分解促進の孵化前後における代謝的矛盾が孵化後の成長の全身制御に影響し、WS および WB のような筋変性の発症と関連があるのではないかと考えられた。また、ビタミン D (VD) は皮膚で紫外線を吸収することによりビタミン D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) が合成され、最終的にホルモン作用をもつ活性型ビタミン D<sub>3</sub> とも呼ばれる 1,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) がビタミン D 受容体 (VDR) によってカルシウムを取り込む骨格系機能に関連する役割を担っているが、骨格およびカルシウム代謝だけでなくさまざまな組織に VDR が発現していることが報告されており (Shanmugasundaram と Selvaraj, 2012)、遺伝子制御機構でもある細胞シグナルに関連する役割である全身代謝機能にもビタミン D が影響していると推察され、WS および WB に関する本研究における着目する因子として使用できるのではないかと考えた。

そのため、まず試験 1 として第 II 章では近代ブロイラーにおける筋変性症状を確認するために Ross 系コマーシャルブロイラーを用いて発症区と未発症区の発育がどのように異なるのかを調査し、WS および WB の発症状態の肉眼診断を行った後、血液生化学的評価、および浅胸筋を採取してコラーゲン形成に関わるデコリン (DCN)、その産生に関わるトランスフォーミング成長因子 (TGF- $\beta$ )、および VDR の mRNA 発現の分析を行った。

試験 2 ～ 7 となる第 III 章では、孵化前後における代謝的矛盾について検討するために、これまで明らかにされていない孵化前の胚の GLU の蓄積時期と蓄積部位を明らかにし、糖新生阻害剤であるメトフォルミンの投与によって胚発生時における血液中の GLU がどのような影響を受けるのか、そして初生ヒナ

における糖新生の特異性の検討を行った。

つづいて試験 8 となる第 IV 章では、カルシウム代謝および骨代謝の内分泌系に關与することが知られており、免疫、細胞の増殖や分化などの傍分泌系への關与も報告されている VD 機能の出発物質である  $VD_3$  に注目した。その作用については非常に多岐に渡っているが、ブロイラー飼料には、 $VD_3$  は飼料添加物としても利用されているためブロイラー種卵を用いて  $VD_3$  の in ovo 投与がブロイラーの成長にどのような影響を与えるか検討を行った。

試験 9 と試験 10 となる第 V 章では、VD の形態について検討し、 $VD_3$  の代謝産物である  $25(OH)D_3$  に注目した。 $25(OH)D_3$  はカルシウム代謝だけでなく、種鶏における繁殖成績の改善やブロイラーにおける骨の健全性の維持、跛行の低減、産肉増加への期待などで商業利用されているが、その作用機序の全てが明らかになっているわけではない。また  $25(OH)D_3$  は、飼料から摂取もしくは太陽からの紫外線により皮膚から吸収し代謝変換された  $VD_3$  が肝臓において 25 水酸化酵素により  $25(OH)D_3$  に代謝変換された物質で、ビタミン D 結合タンパク質 (DBP) とともに血液中に循環しており、必要に応じて腎臓の  $1\alpha$ -水酸化酵素により  $1,25(OH)_2D_3$  に代謝変換されてカルシウム代謝の調節機能を担っている。そこで、試験 9 ではブロイラーの初生ヒナを用いて  $VD_3$  と  $25(OH)D_3$  が全身代謝制御系へどのように影響を与えるのかを検討し、試験 10 では糖負荷試験を行い、VD 機能と第 III 章で検討していた糖代謝との関連について検討をおこなった。

## 第Ⅱ章. 近代ブロイラーにおける筋変性の検討

### 1. 緒言

近代ブロイラー品種は、在来品種と異なり成長スピードが速く、産肉量も多いことが知られている（食品需給研究センター, 2008）。その要求に応えるべく育種会社ではおおよそ4年毎にブロイラーの育種更新を行っている（Tavarez と Santos, 2016）。一方で、近年では筋変性の問題も取り上げられており、特に White striping (WS) や Wooden Breast (WB) と呼ばれている従来確認されていなかった筋変性が確認されている。WS および WB はいずれも胸肉で多くの事例が確認されているが、WS においてはブロイラーのもも肉にも確認されている（Kuttappan ら, 2013）。これらの筋変性による経済損失は、アメリカ合衆国内で毎年 200 万米ドルと言われている（Kuttappan ら, 2016）。これらの症状は、食しても害があるわけではないが、見た目もしくは調理的に消費者から好まれない傾向があるために、正肉として出荷することが難しくなっており、ダウングレードされたものが加工品もしくは廃棄されている。近代ブロイラーの品種の違いによる発現率や重症度の違いに差は認められず、飼育環境や飼養管理の検討が必要とも報告されている（Bailey ら, 2015）。日本国内でも同様の症状は報告されており（半杭, 2013）、出荷日齢を早くする、低エネルギー飼料にする、成長を遅くさせるなどの対応がとられているが、現在の生産性、供給を維持しながらの抜本的な解決までには至らず、これらの発生機序もまだ明らかになっていない。

試験 1 では、WS および WB の筋変性による問題の確認を行うためにコマーシャルブロイラーを用いて発症個体と未発症個体の肉眼的観察、成長成績、筋変性の肉眼的観察と血液の生化学的評価を実施し、細胞の分化増殖に関わるサ

イトカインであるトランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ )、コラーゲン形成に関わるプロテオグリカンであるデコリン、筋形成への関連が示唆されるビタミン D 受容体 (VDR) の mRNA 発現を分析した。

## 2.材料と方法

### 試験 1

#### 1) 動物

日本農産工業株式会社 研究所研究開発センターにて同条件で飼養された 42 日齢の Ross 系コマーシャルブロイラーの雄を用いて Kawasaki ら (2016) の方法により WB 発症個体と推測されるブロイラー6羽、未発症個体と推測される6羽の計 12 羽を無作為に選抜した (Figure II -1)。

動物の管理およびと殺は、日本農産工業株式会社の動物実験規定に基づき実施した。

#### 2) 試料の採取

日本農産工業株式会社 研究所研究開発センターの食鳥処理施設にて、選抜した 12 羽の体重を測定し、翼下静脈より血液を採取し、毛細管法によりヘマトクリット値を測定した。サンプリングした血液は、3,000g、10 分間遠心して上清を生化学分析用に保存した。採血後、浅胸筋、縫工筋、肝臓、腎臓、心臓、精巣、間脳を採取し、重量を測定した。血液は生化学的評価を行い、浅胸筋のトランスフォーミング増殖因子  $\beta$  (TGF- $\beta$ )、デコリン (DCN)、ビタミン D 受容体 (VDR) の mRNA 発現を測定した。

#### 3) 肉眼的特長と発症の確認

選抜された 12 羽の肉眼的特長と WS および WB の発症個体における浅胸筋の肉眼診断を実施した。

#### 4) 生化学的評価

グルコース (GLU)、遊離脂肪酸 (FFA)、トリグリセリド (TAG) の含量分析は、市販検査キット (グルコース CII-テストワコー, 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪) を用いて分析した。遊離脂肪酸 (FFA)、乳酸脱水素酵素 (LDH)、クレアチンホスホキナーゼ (CPK)、ガンマーグルタミルトランスペプチダーゼ (GGT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (GOT (AST))、アラニンアミノトランスフェラーゼ (GPT (ALT)) については、市販検査キット (ドライケムスライド, 富士フイルム株式会社, 東京) を用いて分析した。

#### 5) 全 RNA 抽出

浅胸筋の組織 50~100mg を 1mL の TRIzol™ 試薬 (ThermoFisher SCIENTIFIC, USA) を用いて、製造者の手順 (ThermoFisher, 2016) に従ってホモジナイズした。ホモジナイズした試料を 200  $\mu$ L のクロロホルムと共に 25 分間インキュベートした後、試料を 15,000g で 30 分間、4°C で遠心分離した。各サンプルの上清を新しいチューブに移し、500  $\mu$ L のイソプロピルアルコールと混合した。5 分間インキュベートした後、サンプルを 4°C で 15,000g で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、RNA ペレットを 80% エタノールで一度洗浄し風乾後、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理水 20  $\mu$ L に溶解した。RNA 量は、260nm での分光光度法により測定した。

#### 6) 逆転写およびリアルタイム PCR 分析

逆転写およびリアルタイム PCR を Furuta ら (2009) の方法によって実施した。TGF- $\beta$ 、DCN、VDR および内部標準遺伝子 Ribosomal protein S17 (RPS17) プライマーペアは Table II -1 のものを使用した。

## 7)統計解析

得られた結果は SAS<sup>®</sup>ソフトウェア(SAS Institute, 2001)の一般線形モデルを用いて、群間の差を Mann-Whitney の U 検定を行った。相関分析は Spearman の順位相関係数を用いて解析した。有意性の判定は危険率 5%で行った。



Figure II -1. Left: Normal broiler, right: Wooden Breast broiler, selected by using the simple method of Kawasaki et al (2016).



Table II -1. Gene-specific primers used for the analysis of chick  
TGF- $\beta$ , DCN, VDR, and RPS17 gene expression by  
quantitative RT-PCR.

Gene		primer sequence	
TGF- $\beta$	Forward	(5'-3')	GACACGCAGTACACCAAGGT
	Reverse	(5'-3')	CCGGCCCACGTAGTAAAT
DCN	Forward	(5'-3')	CCGACATGGCTCCAACAG
	Reverse	(5'-3')	GAGTTGTGTCAGGGGGAAGG
VDR	Forward	(5'-3')	GAAAGTCATCGACACCCTCCTG
	Reverse	(5'-3')	TGCTGCTGAATTTGCTTCTCAC
RPS17	Forward	(5'-3')	AAGCTGCAGGAGGAGGAGAGG
	Reverse	(5'-3')	GGTTGGACAGGCTGCCGAAGT

### 3. 結果

本試験では、WB 未発症区および発症区における 42 日齢の生体重に差は認められず (Figure II -2)、採取した浅胸筋、縫工筋、心臓、肝臓、精巣の重量に差は認められなかった (Table II -2)。血液の生化学的評価については、ヘマトクリット値 (Figure II -3)、血中 GLU、TAG、FFA、CPK、GGT、GOT(AST)、GPT(ALT)、AST/ALT 比に有意な差は認められなかった (Table II -3)。浅胸筋における TGF- $\beta$ 、DCN、および VDR の mRNA 発現は、WB 発症有無での差は認められなかったが ((Table II -4 )), TGF- $\beta$  および DCN ( $r=0.811$ ,  $P<0.01$ ; Figure II -4) で強い相関が認められ、TGF- $\beta$  および VDR ( $r=0.685$ ,  $P<0.05$ ; Figure II -5) で相関が認められた。

外見の肉眼的評価では、Figure II -6 に示したように WB 未発症区においては両翼が背面で接触できていたが、WB 発症区については浅胸筋の硬化によりそれぞれの翼の可動域が狭まり自身の背面以上に上がらないため両翼が接触することはなかった。

浅胸筋の肉眼的観察では、WS においては筋線維の方向に沿うように線維間に白い線状のようなものが多数観察され、どの個体も浅胸筋上部の鈍端部分(首方向)の方が下部の平坦部分(腹部方向)よりも白線が顕著であった (Figure II -7)。

WB については、Figure II -8 に示したように、浅胸筋全体にわたり透明～黄色味がかかった孵化時の筋肉分解に類似した物質が認められ、筋肉自体は部分的に退色し硬化していた。また、全体に渡り内出血の点在が認められた。

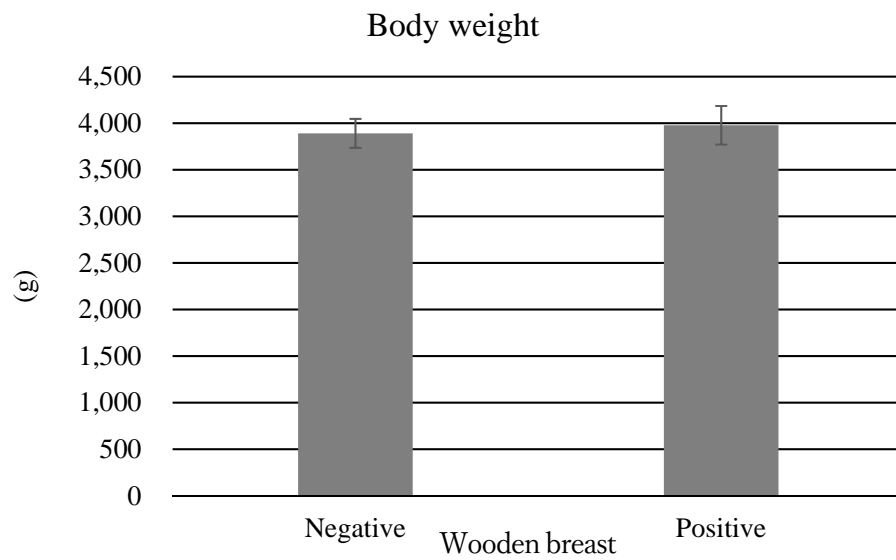


Figure II -2. Live body weight in in asymptomatic group (negative) and symptomatic group (positive) of wooden breast broilers at 42 days of age.

TABLE II -2.Weight of pectoralis major muscle, sartorius muscle, heart, liver, and testis in asymptomatic group (negative) and symptomatic group (positive) of wooden breast broilers at 42 days of age<sup>1</sup>.

	Wooden breast					
	Negative			Positive		
	(g)					
Pectoralis major muscle	402.03	±	28.39	389.70	±	21.26
Sartorius muscle	18.82	±	2.53	18.50	±	2.99
Heart	17.02	±	2.00	16.88	±	1.81
Liver	62.12	±	11.87	61.37	±	4.51
Testis	0.78	±	0.34	0.80	±	0.18

<sup>1</sup>Values are means ± SE for 6 broilers.

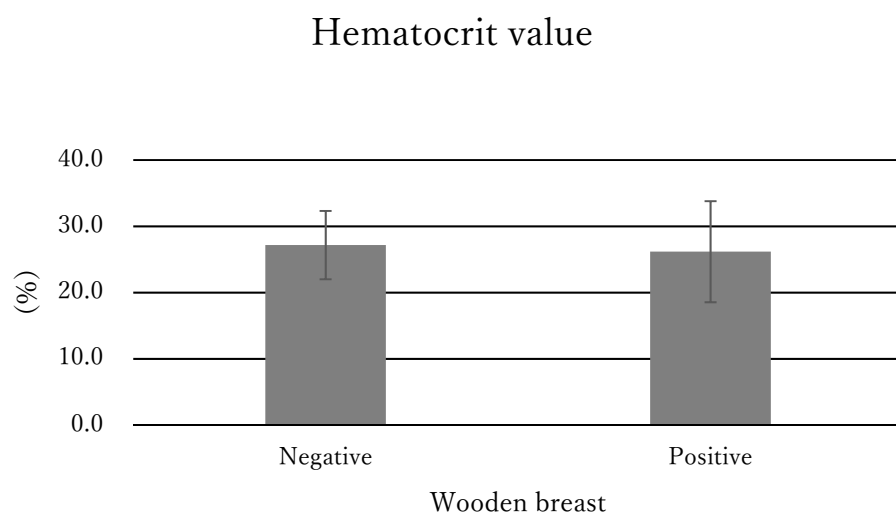


Figure II -3. Hematocrit value in asymptomatic group (negative) and symptomatic group (positive) of wooden breast broiler at 42 days of age.

TABLE II-3. Biochemical analysis data in broilers at 42 days of age.

	Wooden breast			P value
	Negative	Positive		
Glucose	219.6 ±	11.8	212.9 ±	8.8
FFA	(mg/dL)			
	826.6 ±	185.8	801.1 ±	152.9
TAG	(μEq/L)			
	35.8 ±	3.1	39.7 ±	9.2
LDH	(mg/dL)			
	3,682 ±	771	5,779 ±	1,481
CPK	(U/L)			
	58,769 ±	14,171	97,189 ±	24,061
GGT	(U/L)			
	23.8 ±	4.1	30.7 ±	2.6
GOT(AST)	(U/L)			
	461.5 ±	63.8	655.8 ±	61.0
GPT(ALT)	(U/L)			
	23.0 ±	4.5	19.4 ±	1.6
AST/ALT				
	27.7 ±	7.9	32.9 ±	4.2

Values are means ± SE for 6 broilers.

Table II - 4 . TGF- $\beta$  , DCN, and VDR mRNA expression of pectoral major muscle in broilers at 42 days of age.

	Wooden breast	
	Negative	Positive
TGF- $\beta$	0.98 $\pm$	0.26      1.08 $\pm$ 0.37
DCN	1.04 $\pm$	0.24      0.96 $\pm$ 0.17
VDR	0.82 $\pm$	0.16      0.74 $\pm$ 0.10

Values are means  $\pm$  SE for 6 broilers.

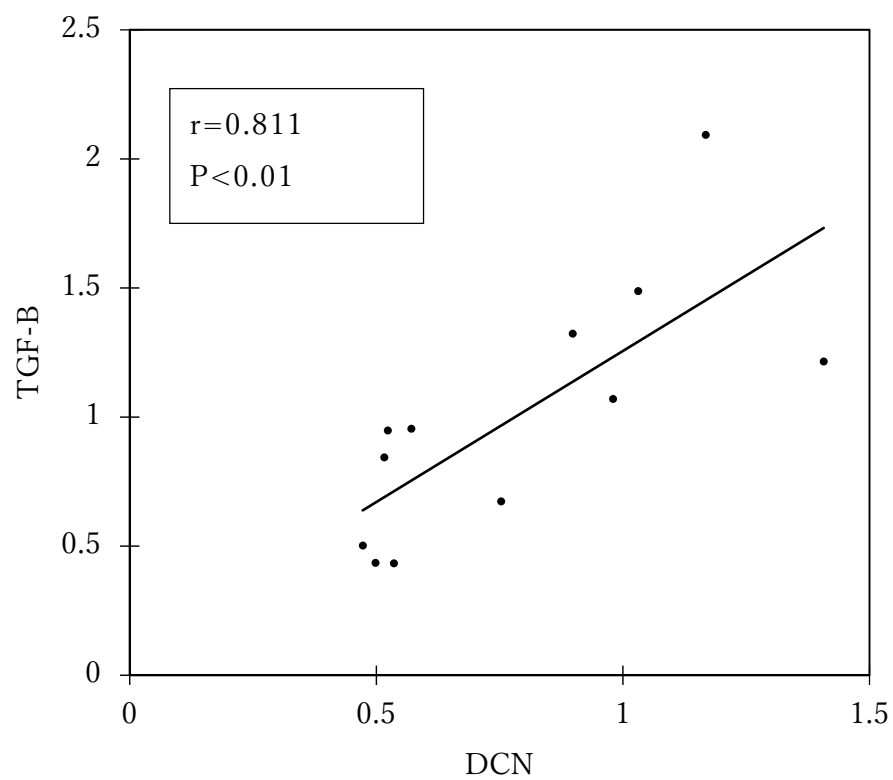


Figure II -4. Correlation analysis between TGF- $\beta$  and DCN mRNA expression of pectoral major muscle in broilers at 42 days of age.



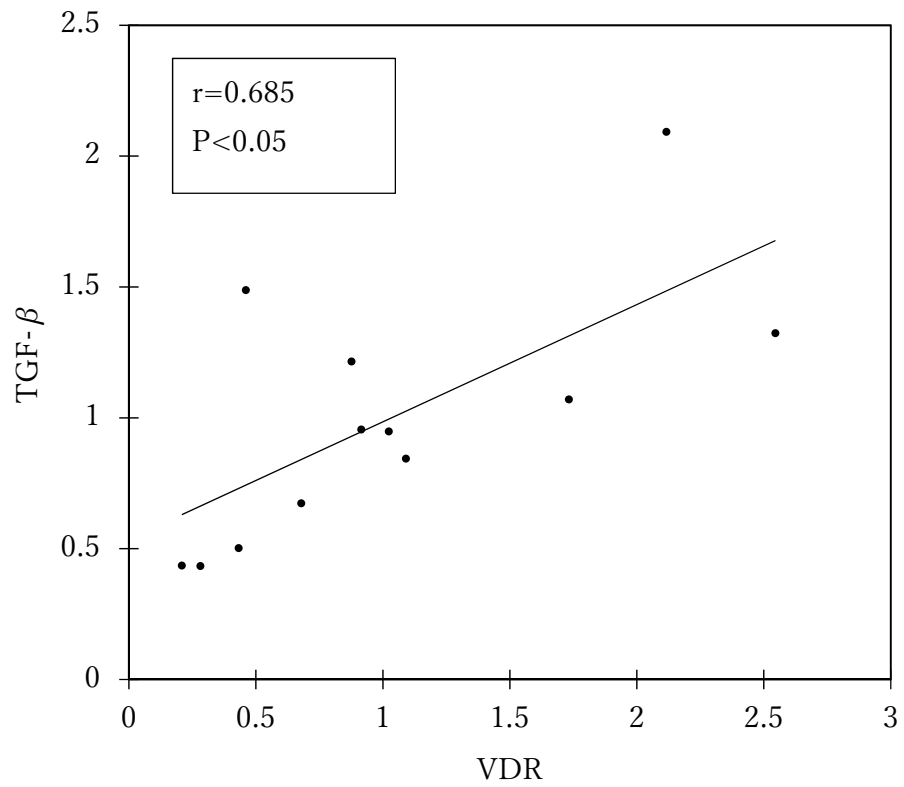
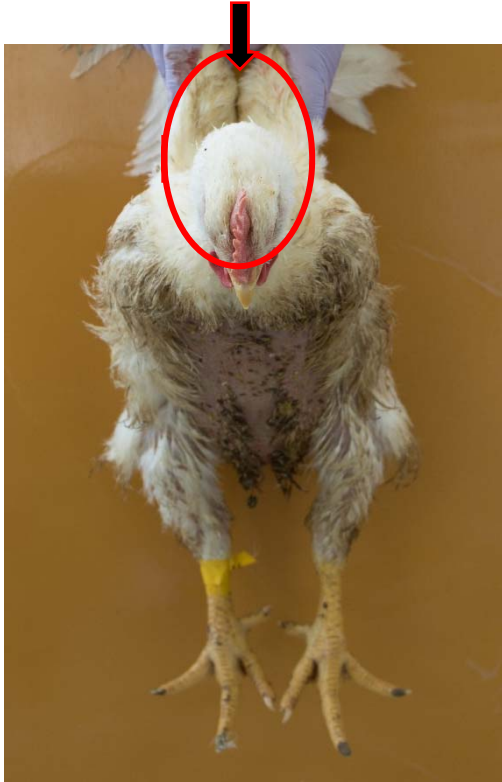


Figure II -5. Correlation analysis between TGF- $\beta$  and VDR mRNA expression of pectoral major muscle in broilers at 42 days of age.

Easy to contact wings in the asymptomatic group.



Wings cannot contact in the symptomatic group.

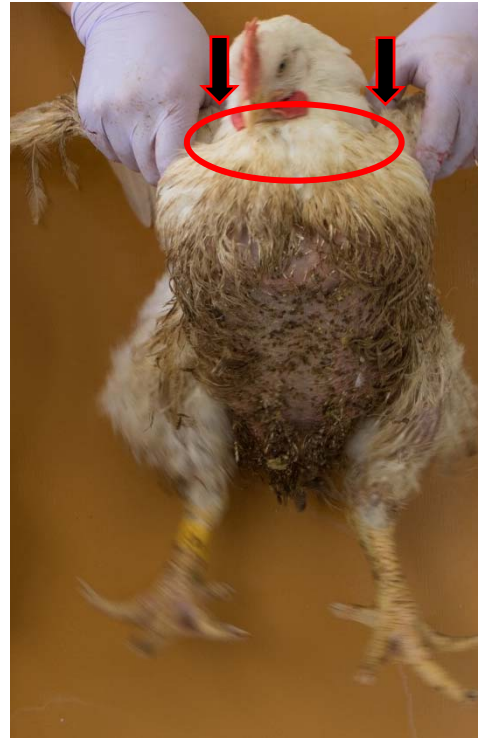


Figure II -6. Morphological observation in asymptomatic group (negative; left) and symptomatic group (positive; right) of wooden breast.

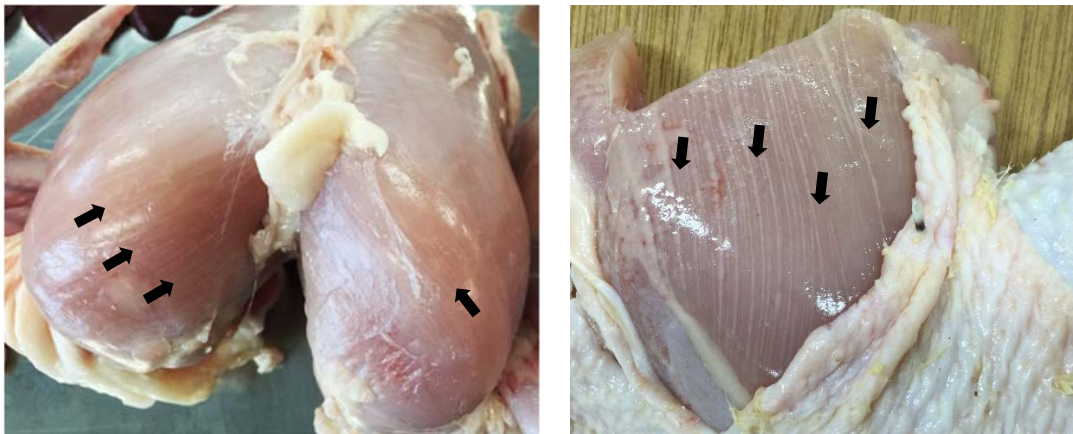


Figure II -7. White striping (direction of arrow) of the pectoralis major muscle at 42 days of age broilers.

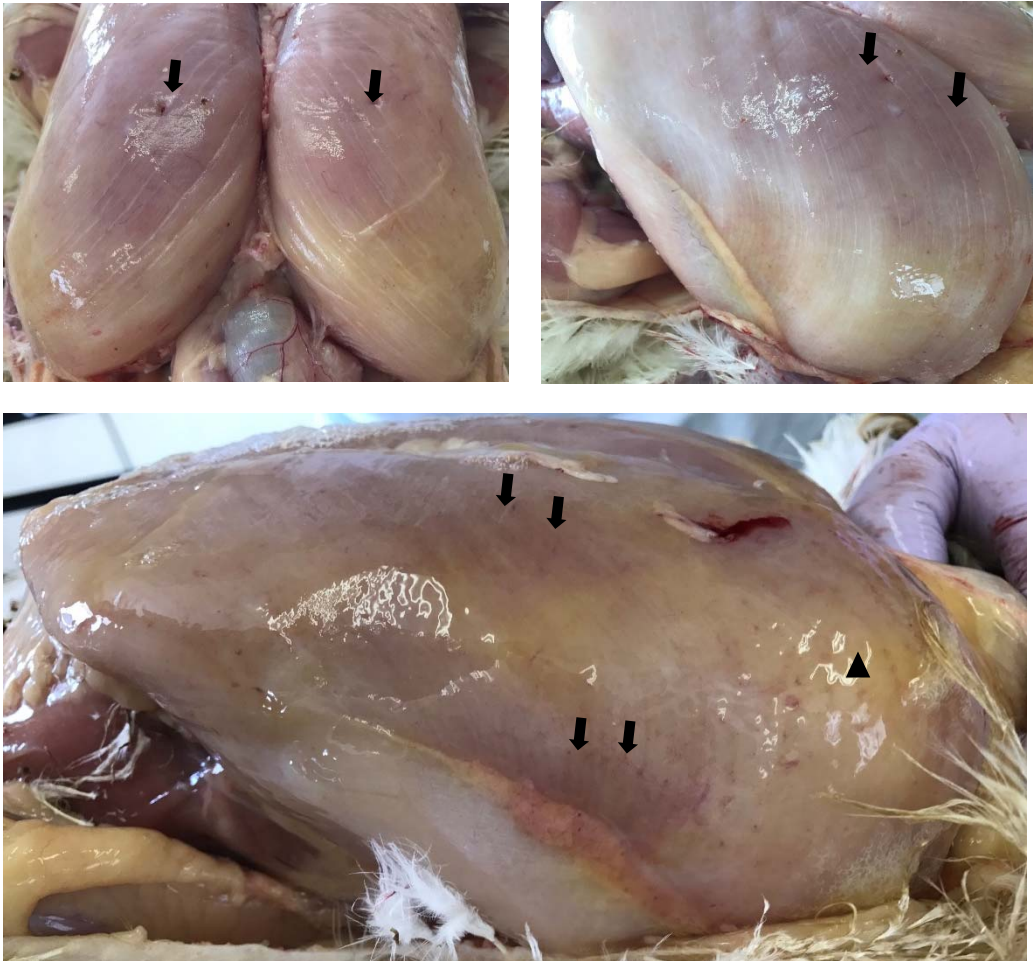


Figure II -8. Wooden breast of the pectoralis major muscle at 42 days of age broilers. Black arrow: macular intramuscular bleeding, black triangle: clear-yellowish exudate.

#### 4. 考察

本試験での 42 日齢のブロイラーにおける生体重および各器官重量については WB 未発症区および WB 発症区での明らかな違いは認められなかったが、生体重が大きく成長がより早いものの方が WS や WB の発症率は高いと報告されている (Immonen, 2014)。本試験で差が認められなかったことは得られた日齢体重が産業平均より高いことから、研究施設の飼養環境が良好であったためではないかと推察された。肉眼的には、Kawasaki ら (2016) の手法を元に WB 発症個体の判別を行ったが、WB を発症しているブロイラーの胸筋部分を触診したところ、明らかに硬く翼の背面側への可動は胸筋に牽引される形となり、WB 未発症区と比較すると可動域が明らかに狭い印象であった。WS および WB ともに筋変性の程度に差が見受けられたが、これは Kuttappan ら (2013)、Cruz ら (2017) によっても報告されている。WB 未発症区でも筋線維の間に WS が確認された個体があったが WB のように浅胸筋が硬化するようなことは確認されなかった。WS に特徴的な筋線維に平行して存在する白線状のものは Bailey (2015) らによって脂肪細胞と結合組織であったと報告されており、ブロイラーの成長速度と同様に筋線維の肥大発達のスピードが速すぎるために、毛細血管内の酸素供給が行き渡らず筋線維細胞が壊死してしまうのではないかと推察された。そのため、筋線維の発達が中断もしくは遅延してしまったところに脂肪細胞が入り込み成長と共に WS を発症していくのではと考えられた。一方で WB 発症個体においては WS を併発している個体を確認された。血液の生化学評価では、実施した項目について有意な差は認められなかったが、GLU についてはニワトリ種特有の高血糖を両区とも維持しており、ばらつきも少ないことから血中 GLU が低下しないような強い制御を受けているものと考えられた。筋肉崩壊に関連するクレアチンフォスフォキナーゼ (CPK) の数値は、発症区

の方が高い傾向があるだけでなく、ばらつきも大きいので筋肉内における障害が起きているものと考えられた。また、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ（GPT）は、肝細胞にのみ存在するのに対してグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ（GOT）は肝細胞以外にも骨格筋にも存在しており、ヒトにおいては GOT が上昇し GPT が変化しない場合は筋疾患が疑われるということからも筋崩壊との関連があるものと推察した。

WB については WS に認められていなかった炎症性単核細胞の浸潤が報告されている（Kuttappan ら, 2013）。肉眼的観察において WB 発症個体の浅胸筋の全体に孵化時に認められる筋肉分解物に類似した無色～黄色のコロイド状物質が認められ、筋肉硬化が筋肉分解の前段階である可能性が考えられた。近代ブロイラーは筋肉タンパク質分解を抑制することで成長を速めるように育種改良が進められてきたが、本来ニワトリは孵化前後において糖新生が活発であり、筋肉タンパク質分解を亢進させていることが報告されている。この代謝的矛盾が上述したような症状を引き起こしているのではないかと考えられた。浅胸筋における TGF- $\beta$ 、DCN、および VDR の mRNA 発現は発症区間に差は認められなかったものの筋肉損傷時に修復される際に必要となるコラーゲン形成に関連する DCN とその産生に関わる TGF- $\beta$  とで強い相関が認められ、TGF- $\beta$  および VDR でも相関が認められたことから VD が筋肉代謝に関連する可能性が示唆された。これらのことは緒論で仮説を立てた孵化前後の異化同化作用の生理的矛盾と VD を因子として着眼点にあてたことは間違いではないと考えられた。

### 第Ⅲ章. 初生ヒナの糖新生特異性の検討

#### 1.緒言

前章にて確認された WS および WB の筋変性は、孵化前後における糖新生による筋肉タンパク質分解の亢進とブロイラーの成長因子である筋肉タンパク質分解の抑制との生理的矛盾が生じている可能性が考えられたため、本章では孵化前後における糖新生の特異性についての検討を行った。

胚および初生ヒナの栄養状態は、その後の成長および形質発現に影響することが知られており、Ohta ら(1999)は、Cobb 系ブロイラー種鶏の種卵を用いてアミノ酸 (AA) の in ovo 投与を孵卵 7 日目に実施し、孵化時のヒナの体重を増加させることを示した。ニワトリ胚のタンパク質代謝は卵白量によって影響を受け (Muramatsu ら,1990)、in ovo AA 投与が胚における AA の利用性を改善すると報告されている (Al-Murrani, 1982; Ohta ら, 1999; Ohta ら, 2001)。AA の機能は多様であるが、糖新生のために利用され、血液中の高 GLU 濃度の維持に関与することが知られている (Ohta ら, 1999)。シチメンチョウ胚を使用した研究において、胚発生の後期段階で AA が糖新生に利用されて組織中のグリコーゲン濃度を増加させ、孵化後に組織中のグリコーゲン濃度が減少したことが報告されている (John ら, 1988)。また、ニワトリ胚を用いた研究において、孵卵の後期段階で炭水化物の投与が胚発生を促進したことも報告された (Uni ら, 2005)。これらの研究は、AA は孵化のエネルギー源として利用される可能性を示唆した。Ohta ら(2007)は、GLU 代謝の律速酵素であるヘキソキナーゼ活性は胚発生および孵化時の筋肉および肝臓で非常に低いことを示したが、糖新生および高血糖維持の生理学的意義は明らかではない。

したがって、試験 2～7 ではニワトリ胚における AA からの糖新生が活発に

なる理由を検討し、胚における GLU の蓄積時期および蓄積部位について検討した。さらに、糖新生による高血糖維持とブロイラーの筋肉タンパク質分解抑制との生理作用の矛盾が生じている可能性を調べるために、糖新生における律速酵素であるホスホエノールピルビン酸カルボキシキナーゼ (PEPCK) の発現を抑制し、糖新生を阻害することが報告されている (Madiraju ら, 2014) メトフォルミンに注目した。糖新生が活発になる前の種卵にメトフォルミンを *in ovo* 投与することによる初生ヒナの血中 GLU 濃度がどのように影響を与えるのか、そして GLU 代謝がインスリン依存性によって制御されるかを検討した。



## 2.材料と方法

### 1) 動物

Cobb 系ブロイラー種卵 86 個を種鶏農場（株式会社福島エンヤ，福島）から入手し、試験 2、3、4、5、6、および 7 において、それぞれ 24、16、8、8、20 および 10 個ずつ使用した。各試験とも温度 37.8℃、相対湿度 60%以上で孵卵した。

### 2) 試料の採取と調製

試験 2 では、孵卵 17 日目、18 日目、および 19 日目に種卵 8 個ずつを割卵し、胚を採取した。胚 GLU 含量および組織 1g 当たりの胚 GLU 濃度を分析した。

試験 3 では、孵卵 17 日目および 19 日目にそれぞれ 8 個の種卵から胚を採取し、hatching muscle、大腿筋、胸筋、腺胃、筋胃、腸、心臓、および肝臓を採取し、各器官の GLU 含量と濃度を分析した。

試験 4 では、孵卵 19 日目に 8 個の種卵から胚を採取し、腎臓、胸腺、ファブリキウス嚢、脾臓、および脳を採取し、各器官の GLU 含量と濃度を分析した。

試験 5 では、孵卵 19 日目に 8 個の種卵から胚を採取し、胚の卵黄動脈から血液を採取し、血液中の GLU 濃度を分析した。

試験 6 では、孵卵 17 日目に種卵 20 個を平均卵重量が同じになるように各 5 個の卵を 4 つの区に振り分け、メトフォルミン塩酸塩(富士フィルム和光純薬株式会社，大阪)を 0、100、200 および 300mg/mL の異なる 4 種類の濃度に調製し、Ohta ら(1999)によって述べられている方法によって孵卵 17 日目の種卵に各区 0.5mL ずつ in ovo 投与し、胚の生存率およびヒナの孵化率の用量反応を観察するとともに孵化直後のヒナの心臓採血を行い、GLU 分析を実施した。

試験 7 では、孵卵 17 日目に 10 個の種卵を平均卵重量が同じになるように 5 個ずつ 2 区に分け、試験 6 の結果から 0、200mg/mL の 2 種類の異なる濃度のメトフォルミン塩酸塩を、試験 6 と同じ要領で孵卵 17 日目に種卵にそれぞれ 0.5mL ずつ in ovo 投与し、19 日目まで孵卵を続け、孵卵 19 日目に種卵を割卵し、胚および卵黄嚢重量を測定し、胚を GLU 含量分析に使用した。

動物の管理およびと殺は「日本獣医生命科学大学動物実験規定」に基づき実施した。

### 3)GLU 含量分析

試験 2 および 7 で採取した胚のサンプルを重量測定後にハサミでスライスし、ヒストコロソ ホモゲナイザー(株式会社マイクロテック・ニチオン, 東京)を用いて 3%スルホサリチル酸水溶液中でホモジナイズを行った。各器官および組織は胚 2 個体分を 1 チューブに入れ、3%スルホサリチル酸水溶液中でホモジナイズを行い、得られたホモジネートおよび採血した血液を 4°C、3,000g で 10 分間遠心分離したのち、上清を GLU 測定用試料とした。GLU 含量は、市販検査キット(グルコース CII-テストワコー, 富士フイルム和光純薬株式会社, 大阪)を用いて分析した。

### 4)統計解析

得られた結果は SAS®ソフトウェア(SAS Institute, 2001)の一般線形モデルを用いて、試験 2、3、4、6 および 7 において一元配置の分散分析、試験 3 において二元配置の分散分析を実施し、平均値間の差を Tukey の多重比較検定を用いて分析した。試験 6 における胚の生存率、初生ヒナの孵化率については  $X^2$  検定を行った。有意性の判定は危険率 5%で行った。

### 3.結果

試験 2 では、種卵の平均卵重量は  $57.6 \pm 0.6\text{g}$  であった。胚重量は孵卵日数が経過するにつれて増加し、孵卵 17 日目と 19 日目の間に有意な差が認められた (Figure III-1;  $P < 0.05$ )。胚 GLU 含量および組織 1g 当たりの GLU 濃度は、孵卵 17 日目から 19 日目まで孵卵日数が経過するにつれて直線的に増加し、孵卵 17 日目と 19 日目の間に有意な差が認められた ( $P < 0.05$ )。同様に、胚あたりの総 GLU 含量は、孵卵日数が経過するにつれて直線的に増加し、孵卵 17 日目と 19 日目の間に有意な差が認められた ( $P < 0.05$ )。

試験 3 では、孵卵 17 日目と 19 日目の比較的大きい器官および組織の GLU 含量を比較したところ、肝臓組織 1g 中の GLU 濃度は孵卵日数の経過とともに  $7.81 \pm 1.94$  から  $3.02 \pm 0.98\text{mg}$  に有意に減少した ( $P < 0.05$ ) が、他の組織では差は認められなかった (Table III-1;  $P < 0.05$ )。

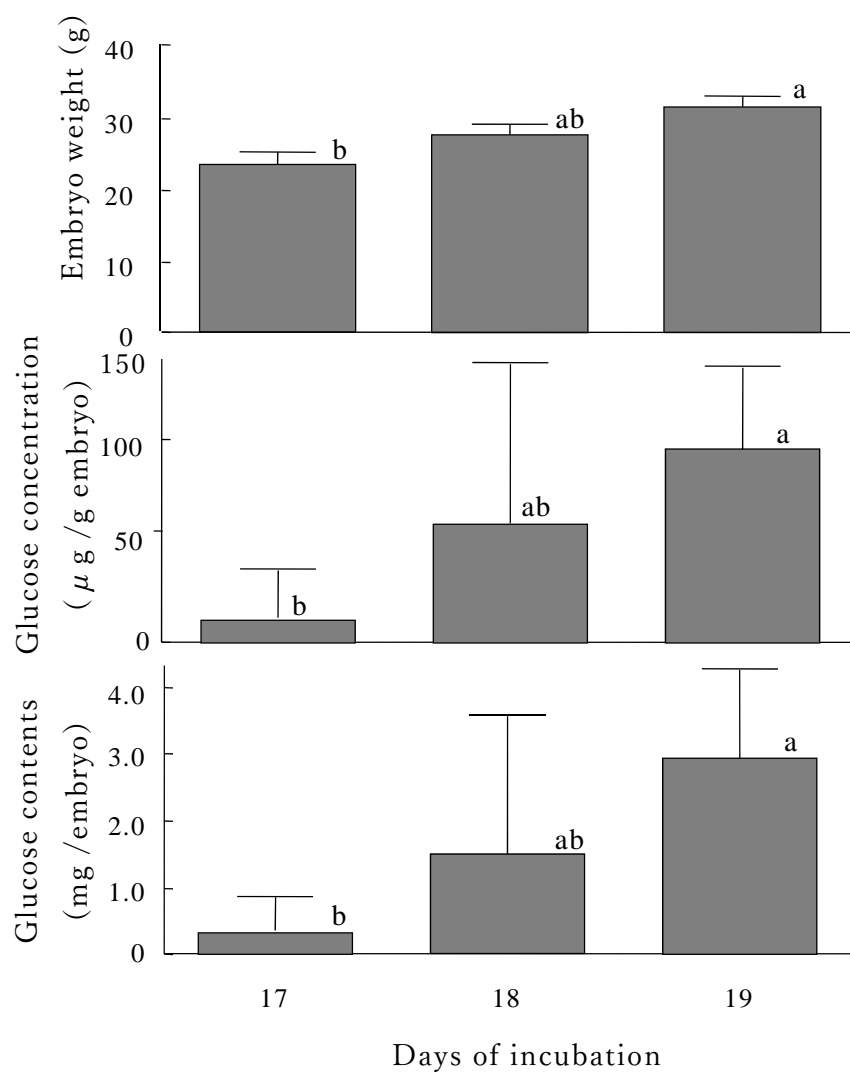
試験 4 では、GLU を主なエネルギー源として必要としているが試験 3 で検討していなかった小さな器官、組織について孵卵 19 日目の GLU 含量および濃度を分析した。脳および脾臓では GLU は検出されず、腎臓、胸腺、およびファブリキウス囊の GLU 含量は、それぞれ  $0.030 \pm 0.024$ 、 $0.005 \pm 0.002$ 、および  $0.007 \pm 0.009\text{mg}$  と低かった (Table III-2)。

試験 5 での血中 GLU 濃度は  $202 \pm 42\text{mg/dL}$  で、血中 GLU 濃度と試験 2 の胚の重量から推定算出した総 GLU 含量は  $4.50 \pm 0.49\text{mg}$  であった。

試験 6 では、メトフォルミン  $300\text{mg/mL}$  投与区においてヒナは孵化しなかったばかりでなく生存している胚も認められなかった。メトフォルミン  $100\text{mg/mL}$  投与区と対照区では胚の生存率および初生ヒナの孵化率に差は認められなかったが、 $200\text{mg/mL}$  投与区では生存率および孵化率の低下 ( $P < 0.05$ ) または低下傾向が認められた (Table III-3)。初生ヒナの孵化時体重および血中

GLU 濃度はいずれも対照区、メトフォルミン 100mg/mL 投与区および 200mg/mL 投与区間で差は認められなかった。一方で体重あたりの肝臓重量比は、メトフォルミン濃度の増加につれて減少傾向となり、メトフォルミン 200mg/mL 投与区は対照区よりも有意に低くなった( $P<0.05$ )。

試験 7 では、試験 6 の結果に基づいて生存可能なメトフォルミン 200mg/mL を in ovo 投与した結果、孵卵 19 日目の胚および卵黄嚢重量は対照区とメトフォルミン 200mg/mL 投与区との間で有意な差は認められなかった(Table III-4)。胚における GLU 濃度はメトフォルミン投与による影響は受けなかったが、胚 GLU 含量は対照区よりもメトフォルミン 200mg/mL 投与区で有意に増加したことが認められた( $P<0.05$ )。



FigureIII -1. Changes in embryo weights, tissue glucose concentration, and glucose contents of embryo with embryonic ages.

Values are means  $\pm$  SD for 8 embryos.

<sup>a,b</sup>Means with no common letter are differ significantly ( $P < 0.05$ ).

TABLE III-1. Weights and glucose contents and concentration in several tissues of broiler breeder embryos on Days 17 and 19 of incubation<sup>1</sup>

Tissue	Day of incubation	Weights		Tissue glucose					
				Contents			Concentration		
		(g)		(mg/tissue)			(μg/g tissue)		
Egg weight <sup>2</sup>	17	61.9 ± 0.7							
	19	62.3 ± 1.1							
Hatching M.	17	0.175	± 0.017	0.03	± 0.02		0.17	± 0.09	
	19	0.190	± 0.013	0.04	± 0.02		0.23	± 0.12	
Thigh M.	17	0.478	± 0.029	0.10	± 0.01		0.20	± 0.02	
	19	0.629	± 0.038	0.13	± 0.05		0.20	± 0.09	
Pectoral M.	17	0.645	± 0.086	0.15	± 0.05		0.24	± 0.07	
	19	1.034	± 0.081 *	0.35	± 0.08		0.34	± 0.09	
Stomach	17	0.153	± 0.030	0.01	± 0.01		0.09	± 0.03	
	19	0.185	± 0.007	0.02	± 0.01		0.12	± 0.04	
Gizzard	17	0.433	± 0.064	0.03	± 0.02		0.07	± 0.07	
	19	0.529	± 0.052	0.09	± 0.05		0.16	± 0.08	
Intestine	17	0.652	± 0.058	0.09	± 0.05		0.14	± 0.06	
	19	0.529	± 0.052	0.12	± 0.06		0.22	± 0.10	
Hart	17	0.589	± 0.022	0.02	± 0.01		0.03	± 0.01	
	19	0.848	± 0.035 *	0.16	± 0.11		0.18	± 0.13	
Liver	17	0.236	± 0.053	1.77	± 0.19		7.81	± 1.94	
	19	0.468	± 0.084 *	1.48	± 0.76		3.02	± 0.98 *	
Provability	Tissue	NS		0.05			0.05		
P<	Age	0.05		0.05			0.05		
	Tissue x age	NS		NS			0.05		

<sup>1</sup>Values are means ± SD for 4 samples with 2 embryos.

<sup>2</sup>Values are means ± SD for 8 eggs and embryos.

\*Significantly different from Day 17 of incubation (P< 0.05).

TABLE III- 2. Weights and glucose contents and concentration in the brain, bursa, spleen, and thymus of broiler breeder embryos at Days 19 of incubation

Tissue	Weight	Tissue glucose		
		Contents		Concentration
	(g)	(mg /tissue)		(mg /g tissue)
Egg <sup>1</sup>	57.3 ± 6.3	-		---
Embryo <sup>1</sup>	33.0 ± 3.2	-		---
Brain <sup>2</sup>	0.839 ± 0.042	ND		ND
Kidney <sup>2</sup>	0.164 ± 0.021	0.030 ± 0.024		0.169 ± 0.131
Bursa <sup>2</sup>	0.033 ± 0.003	0.007 ± 0.009		0.120 ± 0.152
Spleen <sup>2</sup>	0.012 ± 0.002	ND		ND
Thymus <sup>2</sup>	0.059 ± 0.012	0.005 ± 0.002		0.043 ± 0.013

<sup>1</sup>Values are means ± SD for 8 eggs and embryos.

<sup>2</sup>Values are means ± SD for 4 samples with 2 embryos.

ND = not detected.

TABLE III-3. Effects of metformin concentration for *in ovo* injection on survivability, hatchability, and plasma glucose

concentrations of broiler breeder eggs<sup>1</sup>

Metformin injection (mg/ml)	Initial egg weights	Body weight of hatched chicks	Liver weights	Liver : body weight	Survivability at Day 21 (%)	Hatchability at Day 21	Plasma glucose concentration (mg/dl)
0	56.1 ± 1.4	41.1 ± 1.3	0.934 ± 0.067	2.27 ± 0.12	80 <sup>a</sup>	50 <sup>a</sup>	347 ± 9
100	56.1 ± 1.4	42.0 ± 1.7	0.932 ± 0.061	2.22 ± 0.17	70 <sup>ab</sup>	60 <sup>a</sup>	345 ± 21
200	56.0 ± 1.3	43.9 ± 1.0	0.857 ± 0.090	1.95 ± 0.17	40 <sup>b</sup>	30 <sup>ab</sup>	339 ± 10
300	56.0 ± 1.3	---	---	---	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>	---

<sup>1</sup>Values are means ± SD for 5 eggs.

<sup>ab</sup> Means in the same column with no common superscripts differ significantly (P< 0.05).



TABLE III-4. Effects of *in ovo* metformin injection on glucose contents in broiler breeder embryo at

Day 19 of incubation<sup>1</sup>

Metformin (mg/ml)	Initial egg weight	Embryo weight	Yolk weight	Embryo glucose	
				Contents	Concentration
		(g)		(mg/tissue)	(µg/g tissue)
0	61.4 ± 0.5	26.4 ± 1.7	9.7 ± 0.8	4.06 ± 0.14 <sup>b</sup>	154 ± 22.0
200	61.7 ± 0.7	28.0 ± 1.4	10.3 ± 1.5	4.37 ± 0.16 <sup>a</sup>	157 ± 16.4

<sup>1</sup>Values are means ± SD for 5 eggs.

<sup>ab</sup> Means in the same column with no common superscripts differ significantly (P<0.05).

#### 4.考察

シチメンチョウ胚の発生後期においては、AA からの糖新生により筋グリコーゲン濃度が増加し孵化後消失するために、AA は孵化時のエネルギー源であると考えられてきた(John ら, 1988)。一方、ニワトリ胚においては血中 GLU が高濃度に維持されることが知られているが(Ohta ら, 1999)、この時期の GLU 取り込みに必要なグルコーストランスポーター(GLUT)の遺伝子発現は弱く(Carver ら, 2001; Shashidhara ら, 2007)、糖新生を行いグリコーゲンではなく GLU を合成した場合には、そのまま組織に蓄積され、組織中の GLU 蓄積量が大きい器官が GLU 消費器官である可能性が考えられる。

そこで本章では、まずニワトリ胚の組織における GLU が高濃度になる時期と蓄積される器官および組織ごとに検討した。その結果、孵卵 17 日目の胚の GLU 含量および 1g あたりの胚 GLU 濃度はともに非常に低く、孵卵 19 日目まで有意に増加した。これは孵卵 17 日目から 19 日目にかけて糖新生により GLU が蓄積されていると推察された。胚発生速度が異なるシチメンチョウの組織中グリコーゲン濃度とは直接比較はできないが、孵化直前に急激な増加を示したことは一致した(John ら, 1988)。一方で各組織中の GLU 濃度は低い値を示したが、唯一高い濃度が認められた肝臓中 GLU 濃度は孵卵 17 日目で胚の総量を超え、孵卵 19 日目に胚の総量の半分量を占めたが、胚の発生に伴い減少した。肝臓での糖新生は活発であるが高血糖を維持するため肝臓から血液中に運ばれていると考えられた。孵卵 17 日目の肝臓の GLU 含量の超過は、試験 2 よりも試験 3 の方が 4g 重い種卵を用いたことと肝臓組織に血液が残留していたことが原因ではないかと推測されるが、孵卵 17 日目の胚 GLU 含量の大部分は肝臓に存在すると考えられた。

試験 4 で確認された胸腺およびファブリキウス嚢における GLU 含量は 0.005 および 0.007mg であった。胸腺およびファブリキウス嚢における免疫細胞の分化には、GLU が必須のエネルギー源であることが報告されている (Shashidhara ら, 2007) が、GLU 濃度は低く GLUT-1 および GLUT-3 の mRNA 発現も低いことから、胚発生中は積極的な分化は行われていないと推察された。脳での GLU は本試験では検出されなかったが、脳が脂肪酸由来のケトンを主なエネルギー源として利用できることはよく知られている (LaManna ら, 2009)。しかしながら、胚発生中の活動そのものも明らかでないことから、GLU はエネルギー源としては利用されていないと考えられた。

試験 5 での推定全血量から算出した血中総 GLU 含量は、胚総 GLU 含量を上回り、これが組織中の GLU 濃度に影響を与えやすく、孵卵 19 日目の GLU は肝臓以外では胚に残存する血液に由来すると推察された。

試験 6、7 では、AMP キナーゼの活性化を促進し、低血糖を引き起こす 2 型糖尿病の経口薬としてのビグアノイド剤であるメトフォルミンを用いて胚発生時における血中 GLU 含量が制御されるか調べた。試験 5 での胚の生存率および初生ヒナの孵化率はメトフォルミンの高用量で明らかな低下が確認されたが生理的限界を超えたためと考えられた。メトフォルミンによる AMP キナーゼの活性化は、糖新生律速酵素である PEPCK の発現を抑制し糖新生を阻害することが知られている。Ashwell と McMurty (2003) は、14 日齢のブロイラーヒナへの AMP キナーゼの投与が血中 GLU 含量を低下させたと報告したが、試験 6 でのメトフォルミン in ovo 投与後に孵化した初生ヒナの血中 GLU 濃度に差は認められず、試験 7 で孵卵 19 日目の胚 GLU 濃度に影響を与えなかったことから、胚の発生時期において血液から各組織への GLU の取り込みおよび利用性は低いと推察された。AA から糖新生により合成された GLU は肝臓に貯蔵されると同時にその大部分が血液中に存在すると推察され、メトフォル

ミンによる血中 GLU 低減作用は認められなかったが、高用量で生存率および孵化率は低下したため高血糖維持と糖新生制御がニワトリの生命維持に重要である可能性が示唆された。糖新生がメトフォルミンによって一時的に抑制されることは佐藤（2012）によって報告されていることから、動的適応によるフィードバックを受けていることで血糖値はほとんど影響を受けないものと考えられたが、ブロイラーでは動的適応がおこるような形質が欠落してしまった可能性も考えられる。

これらのことから、肝臓および血液は主要な GLU 貯蔵器官、組織であるとともに GLU 濃度は胚発生中には影響を受けず、アミノ酸からの糖新生による GLU は孵化後に利用するためではないかと考えられ、異化作用につながる糖新生は筋肉タンパク分解亢進につながっていることから、ブロイラーの育種改良によって筋肉タンパク分解抑制が引き起こされているのではないかと示唆された。

## 第IV章. ビタミン D<sub>3</sub> がブロイラーの成長に及ぼす影響の検討

### 1. 緒言

ビタミン D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>)は、小腸におけるカルシウム吸収の促進(Bronner, 2003)、カルシウムホメオスタシスの維持(DeLuca, 2004; Fleet, 2017; Soares, 1984)、および骨代謝における骨芽細胞の増殖に関与することが知られており(Bronner and Stein, 1995; Nordin, 2010)、骨形成の観点から成長に影響を与えることが報告されている(Biely J and March BE, 1967; Saunders-Blades と Korver, 2014)。さらに、それは免疫、代謝、種々の細胞の増殖および分化、アポトーシスなどに関して多機能性であることが示唆されているが、成長を制御するための他の組織における作用機序についてはほとんど知られていない。VD<sub>3</sub>の代謝産物である 25-ヒドロキシコレカルシフェロール (25(OH)D<sub>3</sub>) の吸収性と有効性は VD<sub>3</sub> と異なるため、25(OH)D<sub>3</sub> を利用して、動物飼育における VD 源としての栄養供給が一般的になりつつある。これは従来から利用されていた内分泌的役割のカルシウム代謝を目的とした利用だけでなく、傍分泌的役割である局所的な作用をもたらすことを期待されている。ワクチン希釈緩衝液に溶解した 25(OH)D<sub>3</sub> をブロイラー種卵に in ovo 投与した結果、孵化率の改善が確認されたが、その後の成長に及ぼす影響は見られなかった(Bello et al., 2014)。さらに、25(OH)D<sub>3</sub> は、VD<sub>3</sub> から活性型ビタミン D<sub>3</sub> とも呼ばれている 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> までの VD の中間型である。したがって、Bello ら(2014)の結果は、溶媒注入または VD の形態によって影響を受ける可能性があると考えられた。さらに、25(OH)D<sub>3</sub> のブロイラー種鶏への飼料給与は、衛星細胞活性の発達および骨格筋の成長を改善した(Hutton ら、2014)。しかし、25(OH)D<sub>3</sub> の VD として出発物質である VD<sub>3</sub> の効果は胚栄養では評価されていない。

そこで試験 8 では、各組織へのシグナル伝達や代謝機能への関連が示唆される VD の出発物質としての  $\text{VD}_3$  がどのように作用するのかを確認するために、大豆油を溶媒として  $\text{VD}_3$  の in ovo 投与がブロイラーの成長に与える影響について検討を行った。

## 2. 材料と方法

### 試験 8

#### 1) 動物および試料の採取

Ross 系ブロイラー種鶏の同じ種鶏群から 24 時間以内に産まれた卵 100 個を種鶏農場（株式会社福島エンヤ，福島）から入手し、温度 37.8°C および相対湿度 60% 以上で孵卵した。うち 60 個の種卵を孵卵 17 日目にキャンドリングにより選択し、受精卵を各 20 個ずつ 3 区に分けた。孵卵 18 日目に受精卵の卵殻の鈍端側に滅菌消毒したニードルで穴を開け、0.5mL の蒸留水(対照区)、0.5mL の大豆油(大豆油区)、もしくは 60IU の VD<sub>3</sub> を 0.5mL の大豆油に溶解した溶液 (VD<sub>3</sub> 区) を in ovo 投与した。孵化時にヒナを雌雄判別し、体重を測定した。各 12 羽のヒナ(雌 6 羽、雄 6 羽)を平均体重が同じになるように 3 区に分け、市販ブロイラー前期飼料(ME 3,100kcal/kg、CP 21%; ジョイスター、日本農産工業株式会社，神奈川)を 4 週間自由摂取、自由飲水させ、体重は 0、3、7、14、21、28 日齢時に測定、記録した。28 日齢で頸椎脱臼により安楽死させたのち肝臓および浅胸筋を採取し、脛骨の長さを測定した。肝臓でのインスリン様成長因子-1 (IGF-1, Insulin-like growth factor-1) および浅胸筋でのインスリン様成長因子-1 受容体 (IGF-1R, Insulin-like growth factor-1 receptor) の mRNA 発現を測定した。

動物の管理およびと殺は「日本獣医生命科学大学動物実験規定」のもと実施した。

#### 2) 全 RNA 抽出

肝臓および浅胸筋中の組織 50～100mg を 1mL の TRIzol™ 試薬

(ThermoFisher SCIENTIFIC, USA)を用い、製造者の手順 (ThermoFisher, 2016) に従ってホモジナイズした。ホモジナイズした試料を  $200\mu\text{L}$  のクロロホルムと共に 10 分間インキュベートした後、試料を  $15,000g$  で 30 分間、 $4^{\circ}\text{C}$  で遠心分離した。各サンプルの上清を新しいチューブに移し、 $500\mu\text{L}$  のイソプロピルアルコールと混合した。5分間インキュベートした後、サンプルを  $4^{\circ}\text{C}$  で  $15,000g$  で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、RNA ペレットを 80%エタノールで一度洗浄し風乾後、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理水  $20\mu\text{L}$  に溶解した。RNA 量は、 $260\text{nm}$  での分光光度法により測定した。

### 3) 逆転写およびリアルタイム PCR 分析

逆転写およびリアルタイム PCR を、Furuta ら (2009) の方法によって実施した。IGF-1、IGF-1 受容体、およびグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) のプライマーペアは報告されている (Table IV-1; Yun ら, 2005; Furuta ら, 2009) ものを使用した。

### 4) 統計

得られた結果は SAS<sup>®</sup> ソフトウェア (SAS Institute, 2001) の一般線形モデルを用いて、主効果として投与区間および雌雄間を二元配置分散分析によって解析し、平均値間の差を Tukey の多重範囲検定を用いて解析し、統計的有意差を  $P < 0.05$  とした。



TableIV -1. Sequence of Real-time PCR primers

Gene		Primer
IGF-1	Forward (5'-3')	TGCTCCAATAAAGCCACCTAAATC
	Reverse (5'-3')	TTCTGTTCCTGTGTTCCTCTAC
IGF-1R	Forward (5'-3')	TGATCTGGCTGCGAGAAACT
	Reverse (5'-3')	CAGACGTCGGAGTGTGTGT
GAPDH	Forward (5'-3')	GCCGTCCTCTCTGGCAA
	Reverse (5'-3')	TGTAAACCATGTAGTTCAGATCGATGA

### 3. 結果

本試験では、測定日における投与区の違いによる各体重の差は認められなかった (TableIV-2)。孵化率は、対照区で 75%、大豆油区および VD<sub>3</sub> 区の両方で 95%であった。

28 日齢時の脛骨長は、投与区と雌雄間で交互作用が認められた ( $P<0.05$ )。VD<sub>3</sub> 区の雌雄間の脛骨長と雄の VD<sub>3</sub> 区と対照区で有意な差が認められた ( $P<0.05$ ) が、大豆油区との差は認められなかった (TableIV-3)。

肝臓重量、浅胸筋重量は投与区、雌雄差の違いによる有意な差は認められなかった (TableIV-4,5)。

肝臓での IGF-1 の mRNA 発現レベルは、VD<sub>3</sub> 区で有意に高いことが認められた ( $P<0.05$ ) が、雌雄間の差は認められなかった (TableIV-4)。

浅胸筋での IGF-1R の mRNA 発現レベルは、投与区と雌雄間の交互作用が認められ ( $P<0.05$ )、雌の VD<sub>3</sub> 区と対照区および大豆油区で有意な差が認められた ( $P<0.05$ ) が、雄では差は認められなかった (TableIV-5)。

TableIV-2. Effects of composition of in ovo administration control, soybean oil and vitamin D<sub>3</sub> at Day 18 of incubation, and sex differences on body weight of broilers at 0, 3, 7, 14, 21, and 28 days of age<sup>1</sup>

Treatment	Sex	Initial	Body weight					
		egg weight	Day 0	Day 3	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
		(g)						
Control	Female	60.4	45.6	68.2	144.1	427.4	770.0	1095.7
	Male	58.8	45.3	68.0	145.6	433.4	778.0	1164.0
Soybean oil	Female	59.0	45.1	67.5	142.0	420.4	761.7	1096.7
	Male	58.9	46.6	68.8	145.1	444.0	806.7	1286.7
VD <sub>3</sub> + oil	Female	58.9	43.9	70.3	154.1	441.8	783.3	1178.3
	Male	59.6	45.9	66.5	143.1	435.0	778.3	1206.7
Pooled SE		1.1	0.9	2.8	5.3	16.5	35.4	44.7

<sup>1</sup>Values are means for 6 birds.

TableIV -3. Effects of composition of in ovo administration control, soybean oil, and vitamin D<sub>3</sub> at Day 18 of incubation, and sex differences on tibia length in broilers at 28 days of age<sup>1</sup>.

		Tibia length
		(mm)
Control	Female	108.4 ± 1.4 <sup>ab</sup>
	Male	102.2 ± 3.7 <sup>b</sup>
Soybean oil	Female	105.3 ± 3.6 <sup>ab</sup>
	Male	106.5 ± 1.8 <sup>ab</sup>
VD <sub>3</sub> + oil	Female	101.2 ± 4.3 <sup>b</sup>
	Male	108.7 ± 2.6 <sup>a</sup>
P<	Treatments	NS
	Sex	NS
	Interaction	0.05

Values are means ± SE for 6 birds.

<sup>a,b</sup>Means in the same column with no common superscript differ significantly (P< 0.05).

TableIV-4. Effects of composition of in ovo administration control, soybean oil, and vitamin D<sub>3</sub> at Day 18 of incubation on weight and insulin like growth factor 1 (IGF-1) mRNA expression of liver in broilers at 28 days of age<sup>1</sup>

Treatment	Sex	Liver	
		Weight (g)	IGF-1 mRNA expression (/GAPDH)
Control	Female <sup>1</sup>	25.5 ± 1.7	1.6 ± 0.2
	Male <sup>1</sup>	29.2 ± 1.8	2.1 ± 0.3
Soybean oil	Female <sup>1</sup>	26.6 ± 1.7	2.1 ± 0.2
	Male <sup>1</sup>	28.9 ± 1.3	2.5 ± 0.3
VD <sub>3</sub> + oil	Female <sup>1</sup>	26.3 ± 2.1	2.1 ± 0.2
	Male <sup>1</sup>	28.1 ± 1.5	2.8 ± 0.5
Control <sup>2</sup>		27.3 ± 1.3	1.8 ± 0.1 <sup>b</sup>
Soybean oil <sup>2</sup>		27.5 ± 1.2	2.3 ± 0.2 <sup>ab</sup>
VD <sub>3</sub> + oil <sup>2</sup>		27.5 ± 1.1	2.4 ± 0.3 <sup>a</sup>
P<	Treatments	NS	0.05
	Sex	NS	NS
	Interaction	NS	NS

<sup>1</sup>Values are LS means ± SE for 6 birds.

<sup>2</sup>Values are LS means ± SE for 12 birds.

<sup>a,b</sup>LS Means in the same column with no common superscript differ significantly (P<0.05).

TableIV- 5. Effects of composition of in ovo administration control, soybean oil, and vitamin D<sub>3</sub> at Day 18 of incubation, and sex differences on weight and insulin like growth factor 1 receptor (IGF-1R) mRNA expression of pectoral major muscle in broilers at 28 days of age.

Treatment	Sex	Pectoral major muscle	
		Weight (g)	IGF-1R mRNA expression (/GAPDH)
Control	Female	79.8 ± 1.8	0.91 ± 0.09 <sup>b</sup>
	Male	84.8 ± 5.0	0.92 ± 0.10 <sup>b</sup>
Soybean oil	Female	76.6 ± 10.0	1.16 ± 0.08 <sup>b</sup>
	Male	92.8 ± 3.8	1.20 ± 0.15 <sup>b</sup>
Oil + VD <sub>3</sub>	Female	82.3 ± 3.2	1.61 ± 0.13 <sup>a</sup>
	Male	81.1 ± 2.4	1.22 ± 0.09 <sup>b</sup>
P<	Treatments	NS	NS
	Sex	NS	NS
	Interaction	NS	0.05

Values are LS means ± SE for 6 birds.

<sup>a,b</sup>LS Means in the same column with no common superscript differ significantly (P< 0.05).

#### 4. 考察

本章では、投与区間において体重、肝臓重量および浅胸筋重量に有意な差は認められなかったが、脛骨長においては投与区と雌雄間で交互作用が確認され、雄の  $VD_3$  区および大豆油区と対照区の脛骨長の差は、 $VD_3$  と大豆油の併用によるものではないかと考えられた。この結果は、脛骨長に対する  $VD_3$  単独の影響であるのかどうかは明らかではないが、 $VD_3$  は骨成長に影響を与える可能性がある」と報告されている (Edmund ら, 1983)。

コマーシャル農場における雌の WS および WB 発症率が雄より低いもしくは発症が遅いと言われているが、浅胸筋において筋細胞の増殖や分化に関わるとされる IGF-1R の mRNA 発現レベルは  $VD_3$  区の雌でのみ増加が認められたことから、雌における筋肉代謝が健全である可能性が考えられた。一方、雄では健全性の欠落により筋肉タンパク質分解の抑制が働くのではないかと考えられた。肝臓の IGF-1 の mRNA 発現レベルは  $VD_3$  区および大豆油区で高い値を示した。この肝臓の IGF-1 の mRNA 発現レベルの結果は、脛骨長の結果と同様の傾向が確認されことから、雄においてのみ成長が促進され、骨伸長に影響を与えるのではと考えられる。これらの結果は、 $VD_3$  の in ovo 投与が IGF-1R の mRNA 発現に影響を与える一方で成長形質には現れない可能性が示された。  $VD_3$  の機能は多岐に渡り、これらの作用機序はまだ全てが明らかになっていないわけではないが、ヒトにおいては女性ホルモンであるエストロゲンが骨代謝に関与することが報告されている (Cauley, 2015)。鳥類の雌においてもエストロゲンはカルシウム代謝や雌鳥に特有の骨髓骨の産生に関わることが報告されていることから (Beck と Hansen, 2004)、雌雄差の原因としては性ステロイドホルモンが関与していると推察された。

また、ビタミン D 受容体 (VDR) は、全ての VD 機能に関与すると考えら

れ、カルシウム代謝をつかさどる各器官、組織および下垂体、皮膚、筋細胞、リンパ球、単球など幅広く存在している。この受容体は  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 、 $\text{VD}_3$  によって制御されている (Darwish と DeLuca, 1993) が、その調節機構の全ては明らかになっていない。 $\text{VD}_3$  はすでに産業界で幅広く利用されているが WS および WB の問題は解決されていない一方で VD の機能が筋肉代謝に関連していることは本研究のこれまでの結果でも示唆されていることから、全身代謝制御に関係する VD は  $\text{VD}_3$  ではない形態の可能性も考えられた。



## 1. 緒言

前章においてビタミン D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) が胚およびブロイラーの成長に与える影響を検討した。その結果、VD<sub>3</sub> の in ovo 投与によって骨代謝、筋肉組織、および成長に関わるインスリン様成長因子-1 受容体 (IGF-1 R) の mRNA に影響を与えたが、成長形質には現れない可能性が示唆された。VD<sub>3</sub> は WS および WB の問題が報告される前から産業利用されている。筋肉代謝に VD が関与していることは本研究のこれまでの試験の結果から示されているが、投与形態として VD<sub>3</sub> が適合しているかどうかはまだ不明である。25(OH)D<sub>3</sub> は、VD<sub>3</sub> と活性型ビタミン D とも呼ばれる 1,25-ジヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> (1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>) との代謝中間型の VD 形態である (Figure V-1)。内分泌系機能である 25(OH)D<sub>3</sub> がカルシウム代謝に関わっていることは従来からよく知られている (Bronner, 2003; DeLuca, 2004; Fleet, 2017; Soares, 1984; Bronner and Stein, 1995; Nordin, 2010)。25(OH)D<sub>3</sub> を 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> に代謝変換させる酵素である 1 $\alpha$ -水酸化酵素の mRNA は腎臓ばかりでなく、胸筋、腸、盲腸、胸腺の各器官にも存在していることが報告されている (Shanmugasundaram と Selvaraj, 2012)。また、Bello ら (2014) は、ワクチン希釈緩衝液に溶解させた 25-ヒドロキシビタミン D<sub>3</sub> (25(OH)D<sub>3</sub>) が、孵化後の発育成績に悪影響を与えなかったことを報告したが、一方で 25(OH)D<sub>3</sub> 投与における孵化率は、比較とする VD<sub>3</sub> 区よりも高く孵化率を改善する可能性を報告した。また、Hutton ら (2014) は、25(OH)D<sub>3</sub> の飼料給与によりブロイラーにおける胸肉量が増加する原因として 25(OH)D<sub>3</sub> が骨格筋衛星細胞を刺激し浅胸筋の収縮に関わっていることを示した。哺乳類では、視床下部において 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> が肝臓の GLU 生産を抑制する働きがあ

り、血中の GLU を減少させると報告されている (Sisley ら, 2016)。これらのことから、VD の機能はカルシウム代謝以外での成長能力に関わる全身代謝機能に対して影響を与えるものと考えられる。しかしながら、初生段階での視床下部における VD シグナル伝達に関する知見は限られている。鳥類では視床下部の漏斗核および視床下部下核において異化作用を行うプロオピオメラノコルチン (POMC) および同化作用を行うアグーチ関連ペプチド (AgRP)、神経ニューロン Y (NYP) が存在し、エネルギー代謝制御に重要な役割を持つと報告されており (Bungo ら, 2000; Shiraishi ら, 2008)、Shiraishi ら (2011) の報告によればニワトリの脳内にインスリンを投与することによって異化作用の POMC の mRNA 発現が増加することから、インスリンの作用を介した幼雛期のエネルギー代謝調節に重要なシステムであることを示している。

そこで本章では、VD の全身代謝制御を調べるために視床下部でのメラノコルチンシステムの POMC、AgRP、NYP の遺伝子発現を評価の因子とした。また、現在産業利用可能な VD は  $VD_3$  と  $25(OH)D_3$  の 2 種類あり、欧州では VD においてはブロイラーで 5,000IU およびそのほかの家禽類が 3,000IU を上限として規制されているため (European Union, 2017)、これをベースとして  $25(OH)D_3$  の添加ガイドライン (DSM Nutritional Products, 2016) を組み合わせて VD の代謝段階における形態の違いと添加量が、投与時の血中濃度および代謝制御機構に与える影響について検討した。

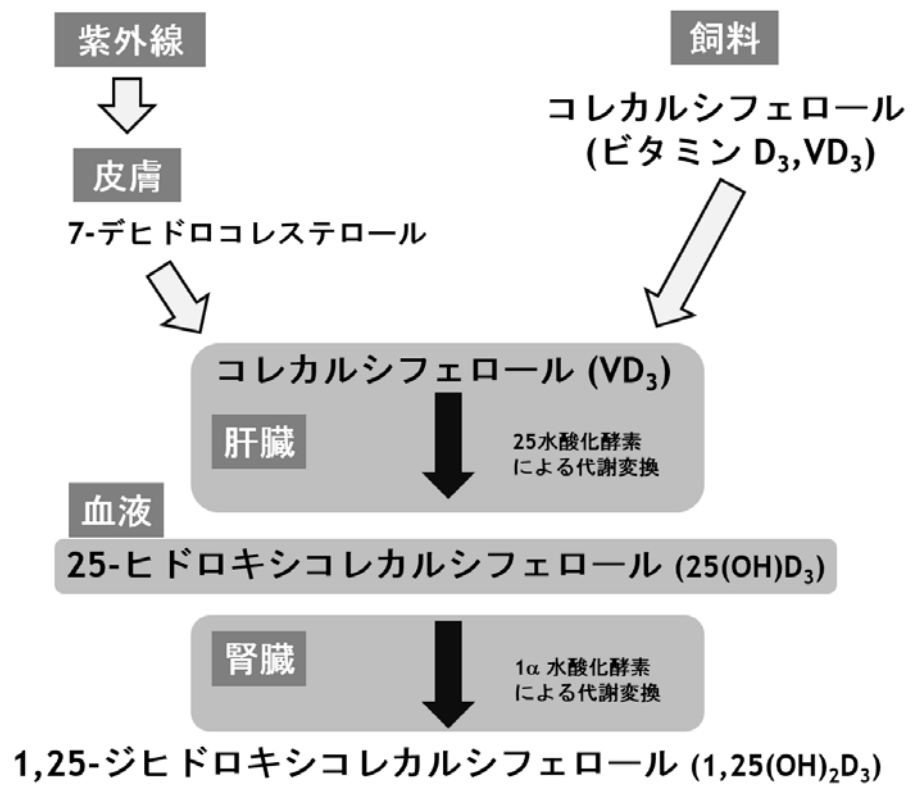


Figure V -1. Vitamin D forms and metabolism.

## 2. 材料と方法

### 1) 動物および試料の採取

試験 9 では、Ross 系ブロイラー種鶏から産まれた 40 個の種卵を種鶏農場（株式会社イシイ，徳島）から入手し、種卵を温度 37.8°C および相対湿度 60% 以上で孵卵させ、孵化時にヒナの体重を測定したのち各 6 羽のヒナを平均体重が同じになるように 4 区に分け、基礎飼料 (ME 3,200kcal/kg、CP 20%; Table V-1) に、VD<sub>3</sub> および 25(OH)D<sub>3</sub> をそれぞれ 3,000IU/kg および 0 μg/kg、5,000IU/kg および 0 μg/kg、3,000IU/kg および 69 μg/kg、5,000IU/kg および 69 μg/kg の 4 区を基礎飼料に混合して給与した (Table V-2)。飼料は 11 日間自由摂取、自由飲水させた。11 日齢時に体重を測定し血液を採取したのち頸椎脱臼にて安楽死させた。採取した血液は、25(OH)D<sub>3</sub> 含量、GLU 含量、遊離脂肪酸含量、カルシウム含量の分析用に保存した。肝臓、腎臓、浅胸筋、間脳を採取し、それぞれの器官における VDR の mRNA 発現を測定し、間脳でのプロオピオメラノコルチン (POMC; Pro-opiomelanocortin)、アグーチ関連ペプチド (AgRP: Agouti Related Protein)、神経ペプチド Y (NPY; neuropeptide Y)、VDR の mRNA 発現を測定した。

試験 10 では、Ross 系ブロイラー種鶏を用いて試験 9 と同条件で孵卵させ、同飼養条件で 4 区に給与し、10 日齢時にヒナを 16 時間の絶食処置を施し、その後、各ヒナに 40mg に調整した GLU 溶液を経口投与して、絶食・自由飲水させた。投与 0、15、30、60、120 および 180 分後に翼下静脈から血液を採取した。

動物の管理およびと殺は「日本獣医生命科学大学動物実験規定」のもと承認を得て実施した (30S-25)。

## 2) 25(OH)D<sub>3</sub> 含量分析

採取した血液は 4°C、3,000g で 10 分間遠心分離したのち、上清を 25(OH)D<sub>3</sub> 分析用測定用試料とした。試料 10  $\mu$ L に 1ng/mL 25-OH ビタミン D<sub>3</sub>-d<sub>3</sub> を含むメタノール溶液を内部標準溶液として 90  $\mu$ L を添加し、Vortex mixer にて攪拌した。それぞれの試料は 14,000g、5 分間遠心分離したのち、上清を回収後、高速液体クロマトグラフ質量分析計 (LC-MS/MS; LCMS-8050 システム, 島津製作所, 京都) を用いて分析した。LC-MS 分析条件は、Table V-3 の通りである。

## 3) GLU・遊離脂肪酸含量・カルシウム含量分析

採取した血液は 4°C、3,000g で 10 分間遠心分離したのち、上清を各測定用試料とした。GLU 含量は、市販検査キット (グルコース CII-テストワコー, 富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪) を用いて分析した。遊離脂肪酸含量は、市販検査キット (NEFA テストワコー, 富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪) を用いて分析した。カルシウム含量は、市販検査キット (カルシウム E-テストワコー, 富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪) を用いて分析した。試験 10 では、GLU 濃度を測定し、各時間における糖負荷後の血糖変化率および試験 180 分間の総変化量 (AUC: Area under the curve) も算出し、各区のインスリン感受性について検討した。

## 4) 全 RNA 抽出

肝臓、腎臓、浅胸筋、および間脳組織 50~100mg を 1mL の TRIzol™ 試薬 (ThermoFisher SCIENTIFIC, USA) を用いて、製造者の手順 (ThermoFisher, 2016) に従ってホモジナイズした。ホモジナイズした試料を 200  $\mu$ L のクロロホルムと共に 25 分間インキュベートした後、試料を 15,000g で 30 分間、4°C

で遠心分離した。各サンプルの上清を新しいチューブに移し、500  $\mu$  L のイソプロピルアルコールと混合した。5 分間インキュベートした後、サンプルを 4°C で 15,000g で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、RNA ペレットを 80% エタノールで一度洗浄し風乾後、ジエチルピロカーボネート (DEPC) 処理水 20  $\mu$  L に溶解した。RNA 量は、260nm での分光光度法により測定した。

#### 5) 逆転写およびリアルタイム PCR 分析

逆転写およびリアルタイム PCR を Furuta ら (2009) の方法によって実施した。POMC、AgRP、NPY、VDR のプライマーペアは Table V-4 のものを使用した。なお、分析で用いた内部標準遺伝子は試験 2 と同様 Ribosomal protein S17 とした。

#### 6) 統計解析

得られた結果は SAS<sup>®</sup>ソフトウェア (SAS Institute, 2001) の一般線形モデルを用いて、VD<sub>3</sub> 添加区間および 25OHD<sub>3</sub> 添加区間を二元配置分散分析によって解析し、平均値間の差を Tukey の多重範囲検定を用いて解析した。相関分析は Spearman の順位相関係数を用いて解析した。統計的有意差を  $P < 0.05$  とした。

Table V-1. Composition of basal diet.

Ingredient	(%)
Corn	42.50
Corn starch	13.00
Soy bean meal	35.68
Soy bean oil	4.18
Calcium carbonate	1.19
Tricalcium phosphate	1.90
Choline chloride	0.05
Sodium chloride	0.30
Cellulose	0.50
Amino acids	0.29
Glucose	0.24
Vitamin mineral premix	0.20

TABLE V-2.  $\text{VD}_3$  and  $25(\text{OH})\text{D}_3$  level in treatment groups.

Treatment	$\text{VD}_3$	$25(\text{OH})\text{D}_3$
	(IU)	( $\mu\text{g/kg}$ )
A	3,000	0
B	5,000	0
C	3,000	69
D	5,000	69



Table V-3. LC-MS analysis condition

<分析条件 LC>	
カラム	: YMC Triart (2.0mmI.D. x 50 mmL., 1.9 $\mu$ m)
移動相 A	: 精製水：メタノール：ギ酸=50:50:0.025
移動相 B	: メタノール
B 濃度	: 67%
初期流速	: 0.5 mL/min
カラム温度	: 40°C
試料注入量	: 10 $\mu$ L
<分析条件 MS>	
イオン化モード	: ESI positive
ネブライザーガス流量	: 3L/min.
ヒーティングガス流量	: 10L/min.
ドライイング流量	: 10L/min.
インターフェース温度	: 180°C
DL 温度	: 150°C
ヒートブロック温度	: 400°C
CID ガス圧	: 270kPa

Table V -4. Gene-specific primers used quantitative RT-PCR analysis.

Gene		primer sequence	
POMC	Forward	(5'-3')	AACAGCAAGTGCCAGGACC
	Reverse	(5'-3')	ATCACGTACTTGCGGATGCT
AgRP	Forward	(5'-3')	AGGCCAGACTTGGATCAGATG
	Reverse	(5'-3')	ACTCCAGGAGGCGGACAC
NPY	Forward	(5'-3')	GGCACTACATCAACCTCATC
	Reverse	(5'-3')	CTGTGCTTTCCCTCAACAA
VDR	Forward	(5'-3')	GAAAGTCATCGACACCCTCCTG
	Reverse	(5'-3')	TGCTGCTGAATTTGCTTCTCAC

### 3. 結果

試験 9 における 11 日齢までのブロイラーヒナの飼料摂取量、増体重、飼料要求率に差は認められず、11 日齢時の生体重および各器官重量に差は認められなかった (Table V -5)。

血中 25(OH)D<sub>3</sub> 含量は、A 区 (3000:0) および D 区 (5000:69) が B 区 (5000:0) および C 区 (3000:69) よりも有意に高かった ( $P<0.05$ ; Figure V -2)。

GLU 含量および遊離脂肪酸に差は認められなかった (Figure V -3,4)。カルシウム含量は、各投与区に差は認められなかったが、25(OH)D<sub>3</sub> の添加量によって有意な差が認められた ( $P<0.05$ ; Figure V -5)。

肝臓、浅胸筋、間脳の VDR の mRNA 発現に差は認められなかったが (Table V -6,8,9)、腎臓の VDR の mRNA 発現では、25(OH)D<sub>3</sub> が添加されていない VD<sub>3</sub> 区間で有意な差が認められ ( $P<0.05$ ; Table V -7)、25(OH)D<sub>3</sub> が添加されている VD<sub>3</sub> 区間では差が認められなかった。また、VD 間および投与種間における交互作用が確認された ( $P<0.05$ ; Table V -7)。

間脳の POMC の mRNA 発現は、25(OH)D<sub>3</sub> が添加されていない VD<sub>3</sub> 区間で有意な差が認められ ( $P<0.05$ ; Table V -10)、25(OH)D<sub>3</sub> が添加されている VD<sub>3</sub> 区間では差が認められなかった。VD 間および投与種間における交互作用が確認された ( $P<0.05$ ; Table V -10)。AgRP および NPY については VD 区間、添加区間の差は認められなかった (Table V -11, 12)。また、間脳の VDR と POMC に相関が認められた ( $r=0.409$ ,  $P<0.05$ ; Figure V -6)。

試験 10 で行った経口ブドウ糖負荷試験では、GLU 溶液を経口投与した 120 分経過後に C 区 (3000:69) の血糖値は、A 区 (3000:0) および D 区 (5000:69) より有意に低い値となったが ( $P<0.05$ ; Figure V -6)、経口投与後 180 分間の総変化量は、投与区間に有意な差は認められなかった (Figure V -7)。

Table V-5. Growth performance and weight of organ and tissue in broilers at 11 days of age.

	A	B	C	D
VD(IU): 25(OH)D <sub>3</sub> ( $\mu$ g/kg)	3000:00	5000:00	3000:69	5000:69
	--(g)--			
Feed intake (FI)	172.4 $\pm$ 11	189.5 $\pm$ 9.8	188.4 $\pm$ 11.8	174.4 $\pm$ 9.7
Body weight gain (BWG)	140.4 $\pm$ 9.7	146.8 $\pm$ 8.6	147.5 $\pm$ 11.8	144.2 $\pm$ 11.4
Body weight	252.8 $\pm$ 13.0	267.0 $\pm$ 11.7	274.6 $\pm$ 18.1	261.1 $\pm$ 14.5
FCR	1.2 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1
Heart	1.5 $\pm$ 0.1	1.8 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1
Pectoralis major muscle	9.4 $\pm$ 0.9	9.4 $\pm$ 0.5	10.4 $\pm$ 0.8	9.6 $\pm$ 0.7
Liver	8.1 $\pm$ 0.4	9.7 $\pm$ 0.8	9.6 $\pm$ 0.7	8.8 $\pm$ 0.2
GI tract	7.1 $\pm$ 0.3	7.5 $\pm$ 0.2	7.8 $\pm$ 0.9	7.7 $\pm$ 0.4
Sartorius muscle	1.0 $\pm$ 0.1	1.1 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1	0.9 $\pm$ 0.1

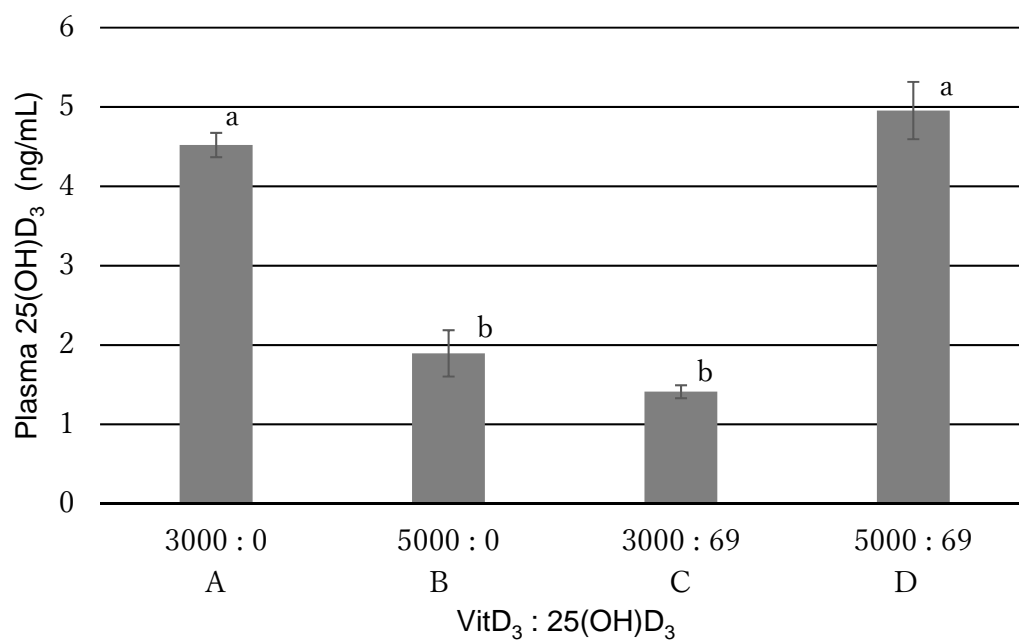


Figure V -2. Plasma 25(OH)D<sub>3</sub> level in broilers at 11 days of age.

<sup>a,b</sup>LS Means in a bar chart with no common superscript differ significantly ( $P < 0.05$ ).

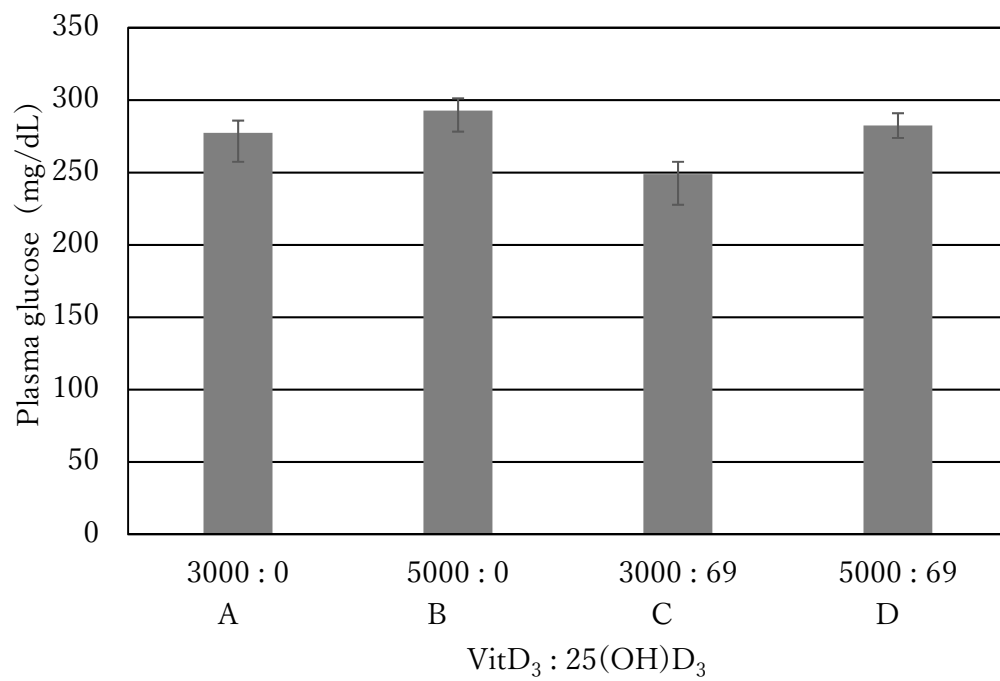


Figure V -3. Plasma glucose level in broilers at 11 days of age.

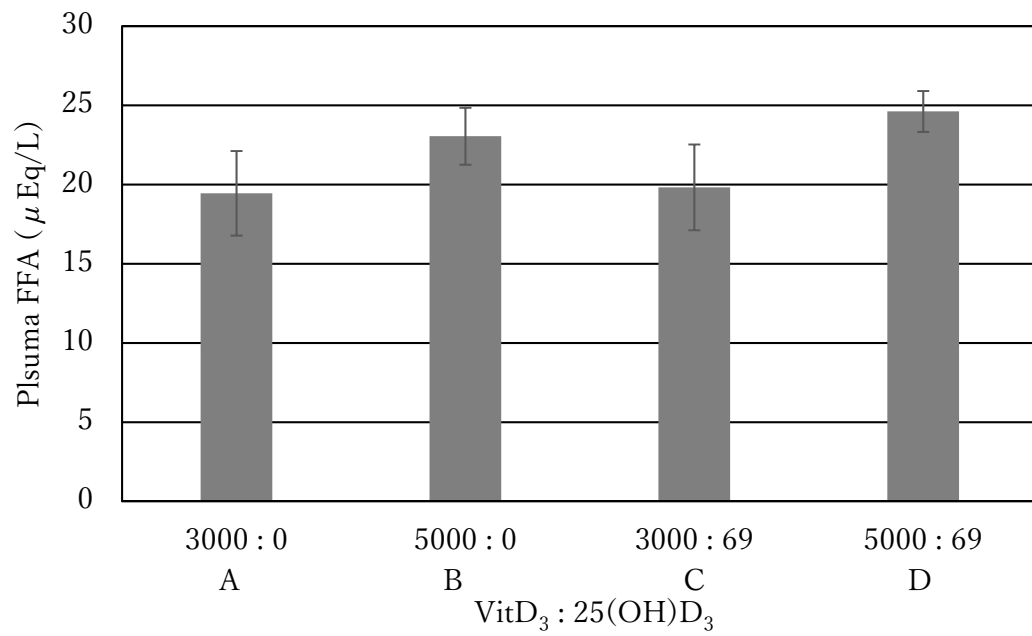


Figure V -4. Plasma FFA level in broilers at 11 days of age.

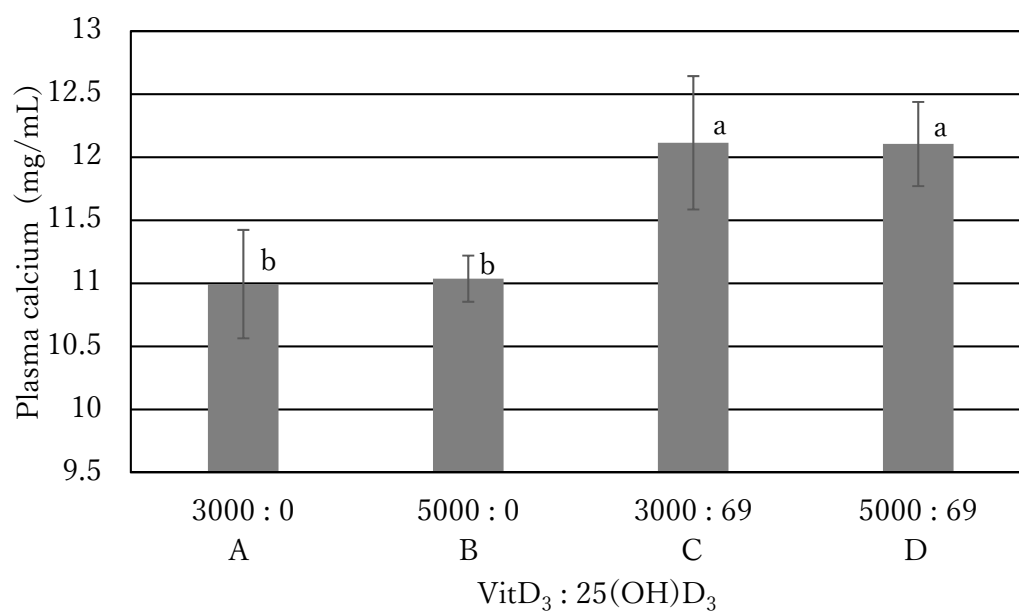


Figure V -5. Plasma calcium level in broilers at 11 days of age.

<sup>a,b</sup>LS Means in a bar chart with no common superscript differ significantly ( $P < 0.05$ ) .



Table V -6. Effects of composition of VD<sub>3</sub> and 25(OH)D<sub>3</sub> feeding on VDR mRNA expression of liver in broilers at 11 days of age.

	VD <sub>3</sub> (IU)	25(OH)D <sub>3</sub> ( $\mu$ g/kg)	VDR mRNA expression
A	3,000	0	0.017 $\pm$ 0.006
B	5,000	0	0.032 $\pm$ 0.006
C	3,000	69	0.030 $\pm$ 0.006
D	5,000	69	0.017 $\pm$ 0.006
P<	VD <sub>3</sub>		NS
	25(OH)D <sub>3</sub>		NS
	Interaction		NS

Values are LS means  $\pm$  SE for 6 birds.

<sup>a,b</sup>LS Means in the same column with no common superscript differ significantly (P< 0.05) .

Table V -7. Effects of composition of VD<sub>3</sub> and 25(OH)D<sub>3</sub> feeding on VDR mRNA expression of kidney in broilers at 11 days of age.

	VD <sub>3</sub> (IU)	25(OH)D <sub>3</sub> ( $\mu$ g/kg)	VDR mRNA expression
A	3,000	0	0.66 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>
B	5,000	0	1.06 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>
C	3,000	69	0.81 $\pm$ 0.07 <sup>ab</sup>
D	5,000	69	0.87 $\pm$ 0.10 <sup>ab</sup>
P<	VD <sub>3</sub>		0.05
	25(OH)D <sub>3</sub>		NS
	Interaction		0.05

Values are LS means  $\pm$  SE for 6 birds.

<sup>a,b</sup>LS Means in the same column with no common superscript differ significantly (P< 0.05) .

Table V -8. Effects of composition of VD<sub>3</sub> and 25(OH)D<sub>3</sub> feeding on VDR mRNA expression of pectoral major muscle in broilers at 11 days of age.

	VD <sub>3</sub> (IU)	25(OH)D <sub>3</sub> ( $\mu$ g/kg)	VDR mRNA expression
A	3,000	0	0.017 $\pm$ 0.004
B	5,000	0	0.012 $\pm$ 0.004
C	3,000	69	0.015 $\pm$ 0.004
D	5,000	69	0.016 $\pm$ 0.004
P<	VD <sub>3</sub>		NS
	25(OH)D <sub>3</sub>		NS
	Interaction		NS

Values are LS means  $\pm$  SE for 6 birds.

<sup>a,b</sup>LS means in the same column with no common superscript differ significantly (P< 0.05) .

Table V -9. Effects of composition of VD<sub>3</sub> and 25(OH)D<sub>3</sub> feeding on VDR mRNA expression of diencephalon in broilers at 11 days of age.

	VD <sub>3</sub> (IU)	25(OH)D <sub>3</sub> ( $\mu$ g/kg)	VDR mRNA expression
A	3,000	0	0.038 $\pm$ 0.001
B	5,000	0	0.052 $\pm$ 0.002
C	3,000	69	0.048 $\pm$ 0.005
D	5,000	69	0.052 $\pm$ 0.005
P<	VD <sub>3</sub>		0.05
	25(OH)D <sub>3</sub>		NS
	Interaction		NS

Values are LS means  $\pm$  SE for 6 birds.

<sup>a,b</sup>LS means in the same column with no common superscript differ significantly (P< 0.05) .

Table V -10. Effects of composition of VD<sub>3</sub> and 25(OH)D<sub>3</sub> feeding on POMC mRNA expression of diencephalon in broilers at 11 days of age.

	VD <sub>3</sub>	25(OH)D <sub>3</sub>	POMC
	(IU)	( $\mu$ g/kg)	mRNA expression
A	3,000	0	10.84 $\pm$ 0.67 a
B	5,000	0	18.42 $\pm$ 2.54 b
C	3,000	69	15.26 $\pm$ 1.17 ab
D	5,000	69	14.13 $\pm$ 0.93 ab
P<	VD <sub>3</sub>		0.05
	25(OH)D <sub>3</sub>		NS
	Interaction		0.05

Values are LS means  $\pm$  SE for 6 birds.

<sup>a,b</sup>LS means in the same column with no common superscript differ significantly (P< 0.05) .

Table V -11. Effects of composition of VD<sub>3</sub> and 25(OH)D<sub>3</sub> feeding on AgRP mRNA expression of diencephalon in broilers at 11 days of age.

	VD <sub>3</sub>	25(OH)D <sub>3</sub>	AgRP
	(IU)	( $\mu$ g/kg)	mRNA expression
A	3,000	0	147.7 $\pm$ 4.4
B	5,000	0	157.9 $\pm$ 8.5
C	3,000	69	147.7 $\pm$ 4.4
D	5,000	69	144.9 $\pm$ 5.4
P<	VD <sub>3</sub>		NS
	25(OH)D <sub>3</sub>		NS
	Interaction		NS

Values are LS means  $\pm$  SE for 6 birds.

<sup>a,b</sup>LS means in the same column with no common superscript differ significantly (P< 0.05) .

Table V -12. Effects of composition of VD<sub>3</sub> and 25(OH)D<sub>3</sub> feeding on NPY mRNA expression of diencephalon in broilers at 11 days of age.

	VD <sub>3</sub> (IU)	25(OH)D <sub>3</sub> ( $\mu$ g/kg)	NPY mRNA expression
A	3,000	0	64.79 $\pm$ 8.68
B	5,000	0	72.49 $\pm$ 15.55
C	3,000	69	78.20 $\pm$ 17.36
D	5,000	69	56.88 $\pm$ 9.39
P<	VD <sub>3</sub>		NS
	25(OH)D <sub>3</sub>		NS
	Interaction		NS

Values are LS means  $\pm$  SE for 6 birds.

<sup>a,b</sup>LS means in the same column with no common superscript differ significantly (P< 0.05) .

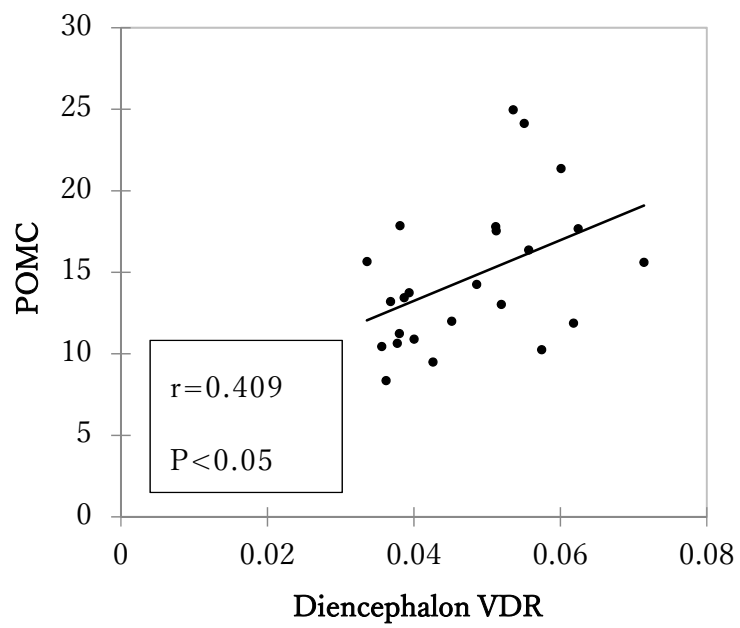


Figure V -6. Correlation analysis between Diencephalon VDR and POMC in broiler at 11days of age.



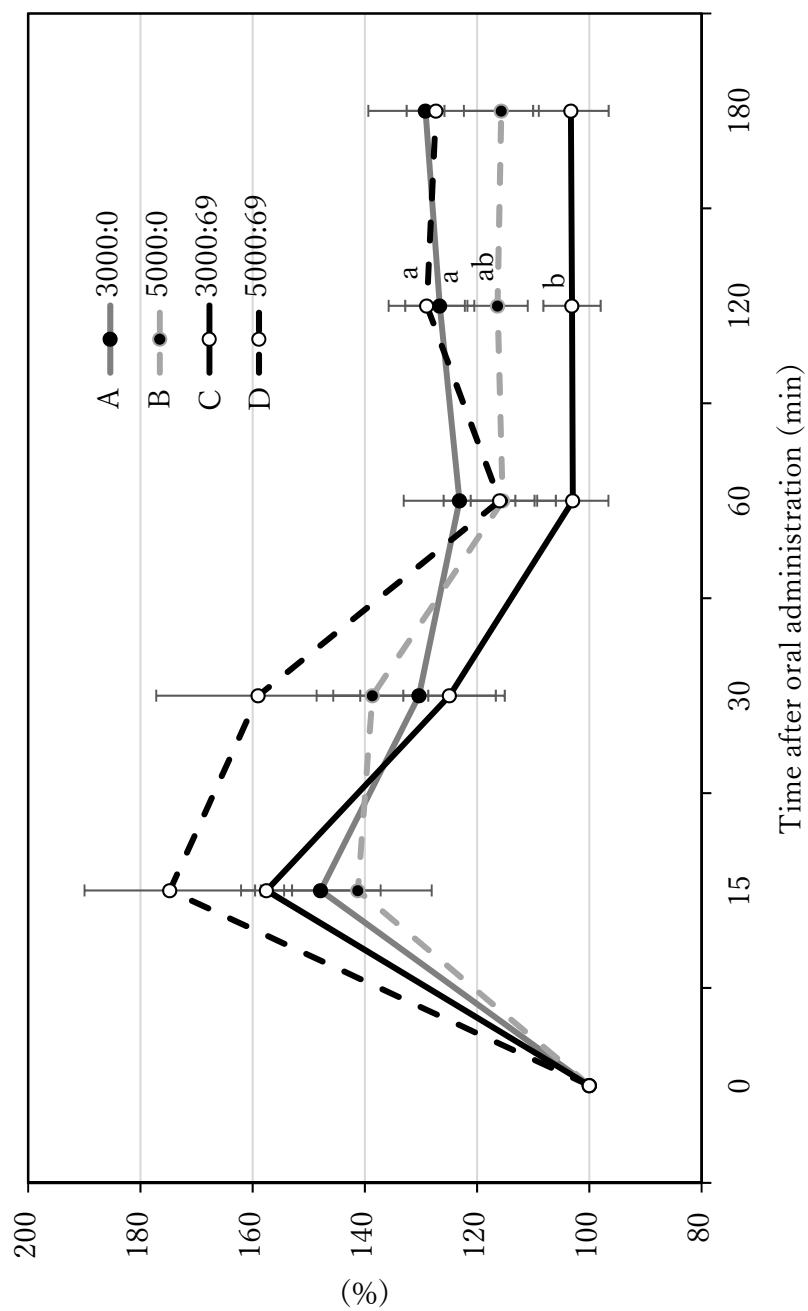


Figure V -6. The ratio of blood glucose concentration by the time course after oral glucose administration in broilers at 11 days of age.

<sup>a,b</sup>Means in a bar chart with no common superscript differ significantly ( $P < 0.05$ ) .

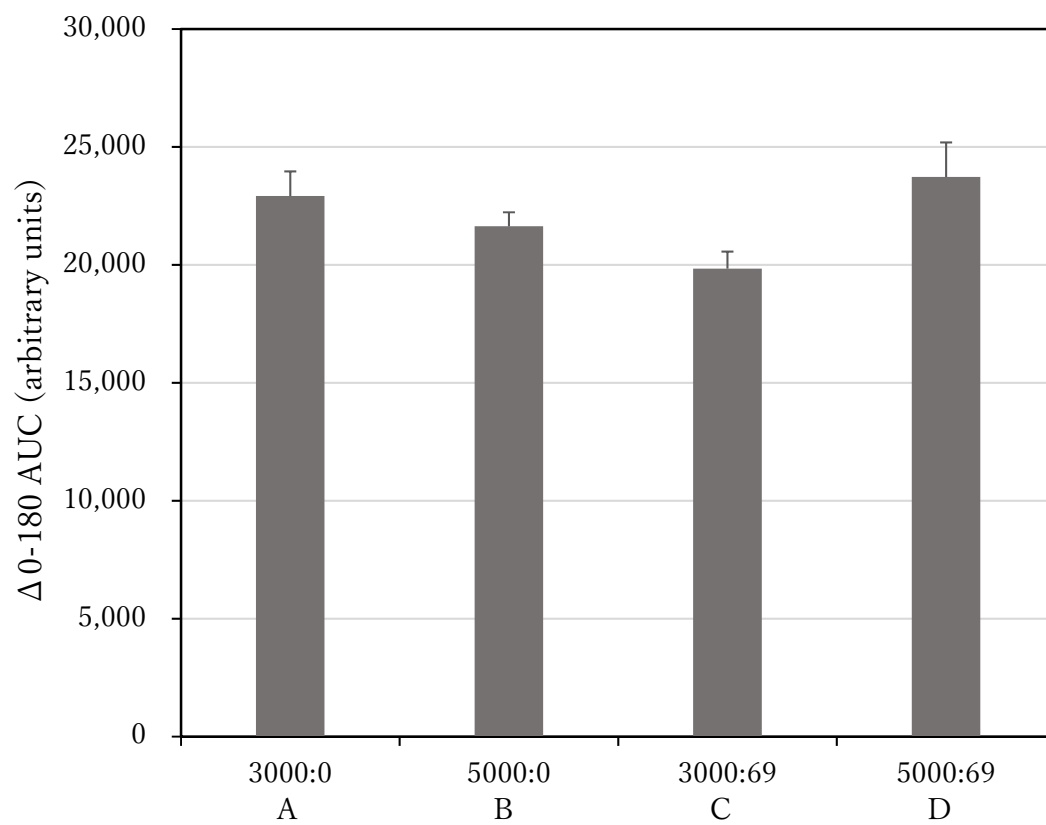


Figure V -7. Area unit curve of blood glucose concentration for 180 minutes after oral glucose administration in broilers at 11 days of age.

#### 4. 考察

VD の形態や添加量の違いによる成長への影響は試験 9 および 10 では認められなかったが、血液中のカルシウム濃度は  $25(\text{OH})\text{D}_3$  の存在下で増加したことは、従来から報告されている内分泌的な作用として  $25(\text{OH})\text{D}_3$  がカルシウム濃度制御を行っているためと推察された。血中 GLU 濃度は、投与区間に差は認められず、高血糖状態を維持するニワトリ種が持つ特異的生理作用のためではないか、そして血中脂肪酸濃度は VD による影響は受けないものと考えられた。

腎臓での VDR の mRNA 発現は、 $\text{VD}_3$  のみの添加区 (A,B 区) では有意な差が認められたが ( $P<0.05$ )、 $25(\text{OH})\text{D}_3$  を組み合わせた区 (C,D 区) では有意差はなくなった。このことは、 $25(\text{OH})\text{D}_3$  が血液から腎臓で恒常性を保っているためではないかと推察され、それにより  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の分泌量を制御する目的があるのではないかと考えた。腎臓での発現結果と類似した結果が間脳での異化作用に関わる POMC の mRNA でも観察され、 $\text{VD}_3$  のみの添加区 (A,B 区) では有意な差が認められたが ( $P<0.05$ )、 $25(\text{OH})\text{D}_3$  を組み合わせた区 (C,D 区) では有意差は認められなかった。このことは、 $25(\text{OH})\text{D}_3$  が存在することにより POMC の恒常性に影響を与えているのではないかと考えられた。VDR は、末梢器官だけでなく脳にも存在し、VD 形態の中で最も VDR と親和性が高いとされる  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  がインスリン感受性に影響を与え、摂食制御に関連する可能性が報告されていることから、エネルギー代謝制御を担うメラノコルチンペプチドである POMC の制御においても  $25(\text{OH})\text{D}_3$  が影響を与えていることが示され、全身的な代謝制御系機構に関与している可能性が示された。一方で、同化亢進を担う AgRP および NPY においては  $\text{VD}_3$  および  $25(\text{OH})\text{D}_3$  の添加による影響が認められなかったこと、VDR は異化作用に傾いていると考えられていることから、同化亢進には影響が少ないのではないかと考えられた。

また試験 10 の糖負荷試験により、GLU 経口投与 120 分後の血糖変化率は、C 区において有意な低下を示したことや ( $P<0.05$ )、有意な差は認められなかったが 180 分間の総変化量で C 区が低い傾向があることから  $25(\text{OH})\text{D}_3$  の存在によってインスリン感受性が高まることが示唆された。糖負荷試験の結果は血中  $25(\text{OH})\text{D}_3$  の結果と類似していた。A 区と C 区を比較すると C 区に低下が認められるが、制御機能と同時に局所組織での VD 利用のために  $25(\text{OH})\text{D}_3$  が利用されているためではないかと推察した。D 区の値は増加しているがこれは利用されてもまだ十分なレベルがあるのか、もしくは利用されていないのかどうかは今後の検討が必要である。肝臓での VDR の mRNA 発現に差は認められなかったが、血中  $25(\text{OH})\text{D}_3$  の結果と相反していることから、肝臓で  $\text{VD}_3$  が必要とされている場合に VDR の mRNA 発現が高い方向へ動き、血中の  $25(\text{OH})\text{D}_3$  が減少するのではないかと考えられた。

以上の結果より、 $25(\text{OH})\text{D}_3$  の存在によって POMC の変動が確認されたことは糖代謝を制御していた可能性も考えられ、糖負荷によって VD バランスによる血糖調節機能が起きたのではないかと考えられた。 $\text{VD}_3$  の形態では VDR の親和性が  $25(\text{OH})\text{D}_3$  よりも低いと報告されていることから VD の機能としては  $25(\text{OH})\text{D}_3$  で評価するべきではないかと推察された。

## 第VI章. 総括

世界人口の増加に伴い、食糧供給に対する将来的な確保が課題となっている。食糧需要が高まる中で動物性たんぱく質の生産も増加するにつれて飼料効率が高く飼育期間が短い鶏肉の生産需要は増加しており、過去 10 年での世界生産量も 47%増加して安価で栄養価の高い鶏肉に注目が上がっている。近代ブロイラーは、日本国内での一般的な出荷体重 3kg まで 45-50 日と飼育期間も短く、飼料要求率も在来種よりも優れている。ブロイラーの育種改良も他の動物種と比較して更新が早く、より成長が早く正肉量が多くとれるブロイラーが求められており、育種改良を重ねることによって近年では特に胸肉量の増加が顕著である (Zuidhof ら, 2014)。

育種改良が進んでいく一方で鶏肉品質に関する問題も取り上げられてきており、従来では認められなかった筋線維間に認められる白色の線状組織が浅胸筋で観察され、まれに大腿部でも観察される White striping (WS) と呼ばれる筋変性や、浅胸筋が硬化して部分的に内出血が認められる Wooden breast (もしくは Woody breast; WB) と呼ばれる筋変性が日本を含めた世界各地で取り上げられている。軽度の WS については鶏肉品質的には大きな影響もなく一般的に流通されているが、重度の WS や WB については品質的なダウングレードや廃棄対象となることがあり、経済的な損失としても影響を与えている。これらの筋変性については、産卵鶏や飼育期間が長い在来種ではこれまで報告されていないため、近代ブロイラー特有の育種、飼養、および栄養との関連があるのではないかと考えられる。

WS および WB の筋変性は、これまで取り上げられてきたセレン欠乏やビタミン E 欠乏に伴う筋線維の壊死を引き起こす栄養性筋症 (Nutritional myopathy) ではないかとも考えられた。しかしながら、正肉保存時のドリップ

ロスを防ぐためにビタミン E は高添加されているのが一般的であるために現代の栄養管理では考えにくく、Kuttappan ら (2012) が実施したビタミン E 給与試験でも改善は見られなかったこと、Otsu ら (2017) の病理学的診断でも浅胸筋の筋変性と栄養性筋症の病変は一致しないことから筋組織への栄養欠乏によるものではないことが示唆された。Soglia ら (2016) は WS および WB を同時発症している個体の浅胸筋の組織学的診断では筋線維数が減っており線維サイズも大きくばらついていることを報告しているが、筋線維数は胚の成長段階で増加し、孵化時点で筋線維数は固定され維持されることが知られている (Remington ら, 1994)。ビタミン D<sub>3</sub>(VD<sub>3</sub>) の代謝産物である 25-ヒドロキシコレカルシフェロール (25(OH)D<sub>3</sub>) は、孵卵期間のニワトリ胚における骨格筋発達や筋肉タンパク質合成および筋線維の増殖に関わる衛星細胞を刺激することが報告されている (Hutton ら, 2014)。これらのことから、WS と WB の筋変性に関連して筋線維数が変動したとするならば、孵化前の胚の成長段階で影響を受けている可能性が考えられる。一方で、ニワトリ胚の発生で促進される糖新生は、筋肉タンパク質分解を促進し、得られたアミノ酸を肝臓で GLU に代謝変換することでエネルギー源として利用する異化亢進を行う。初生ヒナの成長には筋肉タンパク質分解抑制が必要なため、ここで代謝的矛盾が生じてしまうが、同化亢進により筋肉タンパク質分解を抑制することで成長を促進させている可能性がある。この糖新生の同化、異化の制御の役割を行うインスリンは血中 GLU 濃度に依存して合成分泌されるが、血中 GLU の制御が同化亢進によるブロイラーの成長に影響を与えると推察される。

本研究は、近代ブロイラーの新たな筋変性問題へ取り組むために、育種改良による筋肉タンパク質分解抑制の促進が本来の異化作用を行うニワトリに代謝生理的な矛盾が生じているのではないかと、またカルシウム代謝および骨格形成に関わる内分泌機能だけでなく、各組織のシグナル伝達に関与するビタミン

Dが筋肉代謝に関係しているのではないかという2つの仮説を立て探究することとした。

まず第Ⅱ章では、WSおよびWBの筋変性について、産業現場で実際どのような問題が起こっているかを確認するために、発症・未発症個体の成長成績比較、肉眼的観察を実施し生化学的評価を行った。成長成績では、出荷日齢時の生体重や各器官の重量に有意な差は認められなかったが、このことは、成長が早く出荷体重が重い成長成績の優れた近代ブロイラーに影響が出ていると言われていることからWSおよびWBが生体重や各器官重量に影響を与えていないことは一致していた。一方で、外見の肉眼的観察ではWB発症個体における浅胸筋の硬化により翼の可動域は明らかに限定的で未発症区と異なっていた。WS発症個体については浅胸筋の硬直は認められないので外見上の違いは認められなかったが、浅胸筋の発症部分の肉眼的観察では筋線維の方向に沿って脂肪組織が白線状に存在していた。これはブロイラーの成長スピードに伴う浅胸筋の成長により筋線維の発達のための酸素供給が追いつかず、代謝不順により線維が壊死してしまう可能性が考えられ、壊死した線維の間に脂肪およびコラーゲンの結合組織が入り込んだのではと推察された。細胞増殖および分化、そしてコラーゲン形成にも関わるとされるTGF- $\beta$ やDCNのmRNAの発現量は強い正の相関が認められたことから筋変性の発症に関連している可能性が考えられ、TGF- $\beta$ とVDRの相関関係も認められたことからVDがWSおよびWBの発症を検討するうえでの因子の1つになるものと考えられた。また胚発生における異化作用と育種改良による同化作用の代謝矛盾により筋肉分解が起きている可能性も考えられた。

そのため、仮説に立てた孵化前後における糖新生の特異性を検討した第Ⅲ章では、糖新生阻害剤であるメトフォルミンを投与したことによる血中GLU濃度に変動は見られず、ニワトリに特異的な高血糖を維持していたが、過去の報

告によるとメトフォルミン投与による糖新生抑制は一時的に行われていた可能性は考えられたが、高血糖維持がニワトリの生命維持に重要であるためフィードバックにより糖新生制御が働いたと考えられた。また、ブロイラーの育種は筋肉タンパク質分解を抑制することで筋肉を成長させてきたがこの異化抑制に対する強いフィードバックにより異化作用である筋肉タンパク質分解が促進されるものと考えられた。

2 つ目の仮説に取り組んだ第IV章では、骨格筋発達や筋線維の増殖と肥大に関わる 25(OH)D<sub>3</sub> の出発物質である VD<sub>3</sub> の in ovo 投与による孵化後の成長に与える影響について調べることを目的として、Ross 系ブロイラー種鶏の種卵を用いて孵化させ、蒸留水、大豆油、VD<sub>3</sub>+大豆油の 3 区を孵卵 18 日目に in ovo 投与し、孵化後の成長と 28 日齢時の脛骨長、成長や発達を促進するインスリン様成長因子-1 (IGF-1) およびインスリン様成長因子-1 受容体 (IGF-1R) の mRNA 発現量を測定した。28 日齢までの体重に明らかな違いは認められなかったが、脛骨長は VD<sub>3</sub> 区の雌雄間、雄のみの VD<sub>3</sub> 区と蒸留水区で有意な差が認められた (P<0.05)。肝臓中 IGF-1 の mRNA 発現量は VD<sub>3</sub> 区で高い値を示したことから、雄においてのみ成長が促進され骨の成長に影響を与えることが示唆されたが、成長の指標となる浅胸筋における IGF-1R の mRNA 発現量は、VD<sub>3</sub> 区の雌のみで有意な増加が認められたことから、VD<sub>3</sub> の in ovo 投与が IGF-1R の mRNA に影響を与える一方で成長形質には現れない可能性が示された。特に雌鶏に特有のカルシウム代謝に必要な骨髓骨の産生はエストロゲンによって制御されており、雌雄差の原因としては性ステロイドホルモンが関与していると推察された。またIV章の結果から浅胸筋 IGF-1R の mRNA 発現において VD<sub>3</sub> 区の雌でのみ差が認められたことは産業界で WS および WB の発症が雄と比較して発症率が低いまた発症時期が遅いとの声もあることから雌では筋発達における健全性が保たれている可能性が考えられ、雄ではこの健全性が欠落



することにより筋肉タンパク質分解抑制が促進される可能性も考えられた。VD の機能は主にカルシウム代謝を制御する内分泌系とビタミン D 受容体 (VDR) を中心として下垂体、皮膚、筋細胞、リンパ球、単球に存在し機能する傍分泌系に分けられ、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、 $25(\text{OH})\text{D}_3$ 、 $\text{VD}_3$  によって調節されているが、そのメカニズムはまだ明らかにされていない。IV 章で得られた結果は、形態の異なる VD 間の交互作用に関係しているのではないかと推察した。

そこで第 V 章では、IV 章の結果を元に VD の形態の違いが全身代謝制御系に及ぼす影響を検討する目的で 11 日齢時まで成長と血中  $25(\text{OH})\text{D}_3$  含量、VDR の mRNA 発現およびメラノコルチン系の mRNA 発現を測定した。血中  $25(\text{OH})\text{D}_3$  含量、肝臓での VDR の mRNA、腎臓での VDR の mRNA、そして摂食抑制に関わる POMC の mRNA 発現において  $25(\text{OH})\text{D}_3$  の存在下で動きがあったことから、胚発生から初生ヒナの異化亢進および同化亢進にともなう代謝変化に対して  $25(\text{OH})\text{D}_3$  は糖代謝の制御に関連していた可能性が考えられた。また、糖負荷試験においては、 $25(\text{OH})\text{D}_3$  の存在下でインスリン感受性が高まる可能性が示されたことから VD バランスによる血糖調節が起きたものと考えられた。このことは血中  $25(\text{OH})\text{D}_3$  でも類似した傾向が見られ  $25(\text{OH})\text{D}_3$  の存在が調節機能を働かせているかもしくは  $\text{VD}_3$  と比較し効率よく局所組織に利用させているのではないかと推察された。

以上、本研究では骨格筋の形成維持が VDR の減少と比例して低下することから、VD が関与する骨格筋の維持に対して分解に傾いて起きていること、ブロイラーが孵化前後に異化を行いながら糖新生を行った後に同化に切り替わり、糖新生の阻害が生育の妨げになること、代謝制御中枢機能において VDR が飼料中  $\text{VD}_3$  および  $25(\text{OH})\text{D}_3$  に依存して変化することから骨格筋形成維持に VD が深く関わっていることを示した。また、VD の形態として  $\text{VD}_3$  と比較して  $25(\text{OH})\text{D}_3$  が骨代謝に関わるカルシウム制御ばかりでなく、 $25(\text{OH})\text{D}_3$  の存

在下で血液中の VD の制御およびインスリン感受性に関わり、 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  の制御の役割も担っていることから  $\text{VD}_3$  ではなく  $25(\text{OH})\text{D}_3$  の必要性が示された。よって、初期の糖新生制御と  $25(\text{OH})\text{D}_3$  を利用した異化制御が WS よび WB のような筋変性を制御する可能性があるのではないかと示唆された (Figure VI-1)。

今後、WS/WB の筋変性に関わる遺伝子発現の網羅的解析を進めていくことで、これまで明らかではなかった筋肉形成維持の機序と初期栄養特性と  $\text{VD}_3$  の関与が明らかにされれば、WS および WB に対する解決策を見出すことにつながると思われる。

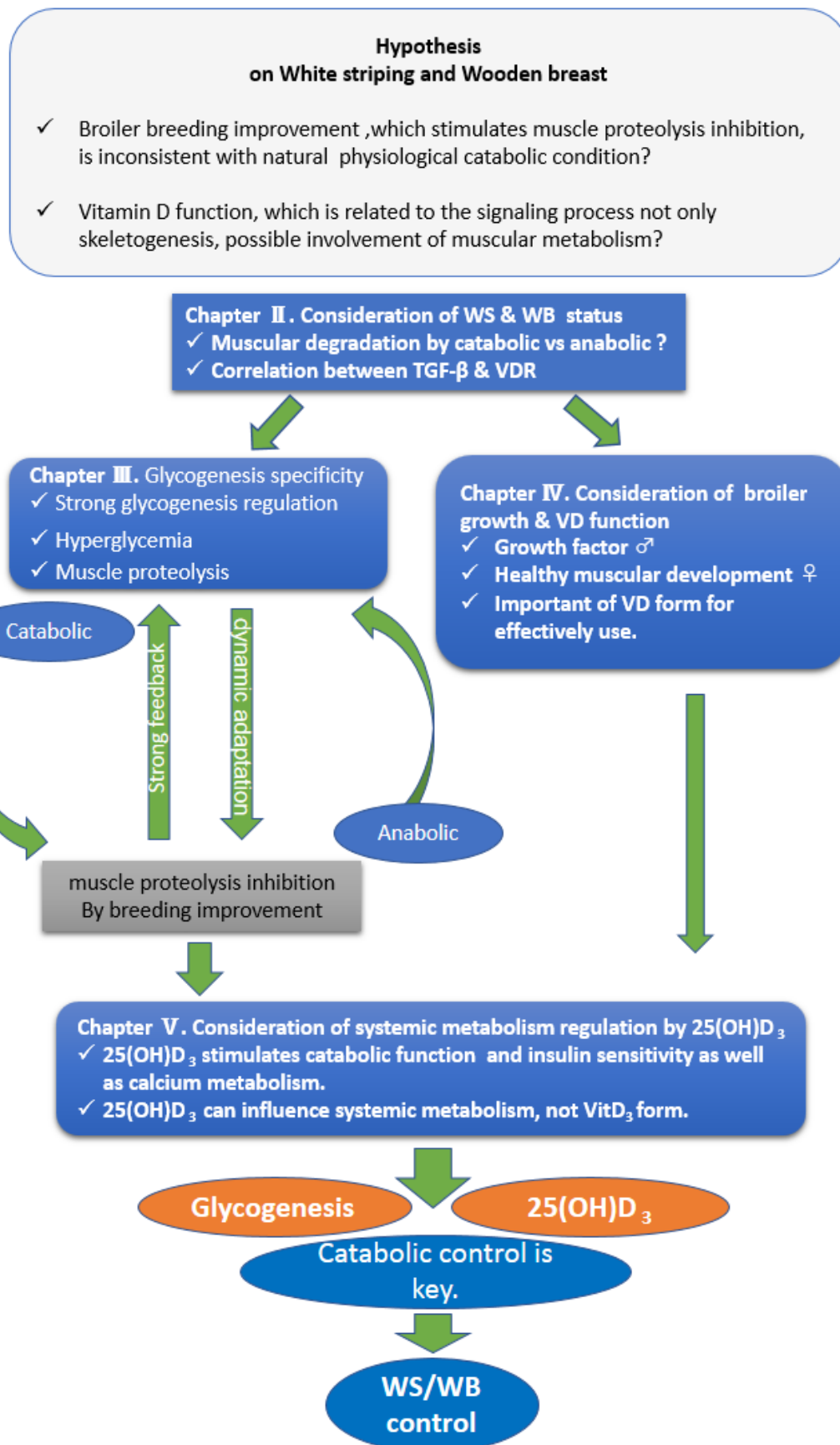


Figure VI-1. Summary of study of early nutritional factors associated with metabolism disorders in modern broilers.

## 参考文献

- Al-Murrani WK. Effect of injecting amino acids into the egg on embryonic and subsequent growth in the domestic fowl. *British Poultry Science*, 23; 171-174. 1982.
- Alnahhas N, Berri C, Chabault M, Chartrin P, Boulay M, Bourin MC, and Bihan-Duval EL. Genetic parameters of white striping in relation to body weight, carcass composition, and meat quality traits in two broiler lines divergently selected for the ultimate pH of the pectoralis major muscle. *BMC Genetics*, 17:61. 2016.
- Ashwell CM. and Mcmurty JP. Hypoglycemia and reduced feed intake in broiler chickens treated with metformin. *Poultry Science*, 82: 106-110. 2003.
- Bailey BA, Watson KA, Bilgili SF, Avendano S. The genetic basis of pectoralis major myopathies in modern broiler chicken lines. *Poultry Science*, 94: 2870-2879. 2015.
- Beck MM and Hansen KK. Role of estrogen in avian osteoporosis. *Poultry Science*, 83: 200-206. 2004.
- Bello A, Zhai W, Gerard PD, and Peebles ED. Effects of the commercial in ovo injection of 25-hydroxycholecalciferol on broiler posthatch performance and carcass characteristics. *Poultry Science*, 93: 155-162. 2014.
- Biely J and March BE. Calcium and vitamin D in broiler rations. *Poultry Science*, 46(1): 223-232. 1967.
- Bronner F. Mechanisms and functional aspects of intestinal calcium absorption. *Journal of Experimental Zoology*, 300(1): 47-52. 2003.
- Bronner F and Stein WD. Calcium homeostasis – an old problem revisited.

- Journal of Nutrition, 125(7): 1987S-1995S. 1995.
- Bungo T, Choi YH, Denbow DM, Shimojo M, Masuda Y, and Furuse M. Intracerebroventricularly administered neuropeptide Y and clonidine: Effects on feeding behavior in the neonatal chick. The Journal of Poultry Science, 37: 27-32. 2000.
- Carver FM, Shibley IA, Pennington JS, Pennington SN. Differential expression of glucose transporters during chick embryogenesis. Cellular and Molecular Life Sciences, 58: 645-652. 2001.
- Cauley JA. Estrogen and bone health in men and women. Steroids, 99: 11-15. 2015.
- Darwish H and DeLuca HF. Vitamin D-regulated gene expression. critical reviews in Eukaryotic Gene Expression, 3: 89-116. 1993.
- DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. The American Journal of Clinical Nutrition, 80: 1689S-1696S. 2004.
- DSM Nutritional Products Ltd. DSM Vitamin supplementation guidelines 2016 for animal nutrition. 2016.
- Edmund D, Pellegrino, and Biltz RM. A chick bone model for evaluating radial bone growth: 1. Effect of vitamin D<sub>3</sub> deficiency. Poultry Science, 62: 2083-2087. 1983.
- European Union. Commission implementing regulation (EU) 2017/1492 of 21 August 2017 concerning the authorisation of cholecalciferol as a feed additive for all animal species. Official Journal of the European Union, L 216/19. 2017.
- FAO. Food and agriculture data. [www.fao.org/faostat/en/](http://www.fao.org/faostat/en/) 2018.
- Ferreira TZ, Casagrande RA, Vieira SL, Driemeier D, and Kindlein L. An investigation of a reported case of white striping in broilers. The Journal of

- Applied Poultry Research, 23: 748-753. 2014.
- Fleet JC. The role of vitamin D in the endocrinology controlling calcium homeostasis. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 453: 36-45. 2017.
- Furuta H, Yoshimi Y, and Ohta Y. Expression of mRNA for 3HADH in manipulated embryos to produce germline chimeric chickens. *Cytotechnology*, 60: 165-168. 2009.
- Hutton KC, Vaughn MA, Litta G, Turner BJ and Starkey JD. Effect of vitamin D status improvement with 25-hydroxycholecalciferol on skeletal muscle growth characteristics and satellite cell activity in broiler chickens. *Journal of Animal Science*, 92:3291–3299. 2014.
- Immonen K. Wooden breast and related poultry meat quality defects. DSM satellite symposium. 2014.
- John TM, George JC, and Moran Jr ET. Metabolic changes in pectoral muscle and liver of Turkey embryos in relation to hatching: influence of glucose and antibiotic-treatment of eggs. *Poultry Science*, 67: 463-469. 1988.
- Kawasaki T, Yoshida T, and Watanabe T. Simple method for screening the affected birds with remarkably hardened pectoralis major muscles among broiler chickens. *Journal of Poultry Science*, 53: 291-297. 2016.
- Kindlein L, Ferreira TZ, Driemeier D, Nascimento VP, Vieira SL, Moraes LE, King A, and Sainz RD. Occurrence and severity of white striping in broilers until 50d of age fed with high and low-energy diets: body weight, histopathological changes and meat quality. *Journal of Veterinary Science & Technology*, Volume 8, Issue 6. 2017.
- Kuttappan VA, Brewer VB, Clark FD, McKee SR, Meullenet JF, Emmert JL, and Owens CM. Effect of white striping on the histological and meat quality

- characteristics of broiler fillets. Poultry Science 98<sup>th</sup> Annual Meeting, Volume 88(Supplement1):136–137. 2009.
- Kuttappan VA, Goodgame SD, Bradley CD, Mauromoustakos A, Hargis BM, Waldroup PW, and Owens CM. Effect of different levels of dietary vitamin E (DL-  $\alpha$  -tocopherol acetate) on the occurrence of various degrees of white striping on broiler breast fillets. Poultry Science, 91: 3230-3235. 2012.
- Kuttappan VA, Hargis BM, and Owens CM. White striping and woody breast myopathies in the modern poultry industry: a review. Poultry Science, 95: 2724-2733. 2016
- Kuttappan VA, Shivaprasad HL, Shaw DP, Valentine BA, Hargis BM, Clark FD, McKee SR, and Owens CM. Pathological changes associated with WS in broiler breast muscles. Poultry Science. 92:331–338. 2013.
- LaManna JC, Salem N, Puchowicz M, Erokwu B, Koppaka S, Flask C, and Lee Z. Ketones suppress brain glucose consumption. Advances in Experimental Medicine and Biology, 645: 301-306. 2009.
- Lu JW, Mcmurtry JP, and Coon CN. Developmental changes of plasma insulin, glucagons, insulin-like growth factors, thyroid hormones, and glucose concentrations in chick embryo and hatched chicks. Poultry Science, 86: 673-683. 2007.
- Madiraju AK, Erion DM, Rahimi Y, Zhang XM, Braddock DT, Albright RA, Prigaro BJ, Wood JL, Bhanot S, MacDonald MJ, Jurczak MJ, Camporez JP, Lee HY, Cline GW, Samuel VT, Kibbey RG, and Shulman GI. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. NATURE, Vol 510: 542-546. 2014.
- Muramatsu T, Hiramoto K, Koshi N, Okumura J, Miyoshi S, and Mitumoto T.

- Importance of albumen content in whole-body protein synthesis of the chicken embryo during incubation. *British Poultry Science*, 31:101-106. 1990.
- Nordin BE. Evolution of the calcium paradigm: the relation between vitamin D, serum calcium and calcium absorption. *Nutrients*, 2: 997-1004. 2010.
- Ohta Y, Tsushima N, Koide K, Kidd MT, and Ishibashi T. Effect of amino acid injection in broiler breeder eggs on embryonic growth and hatchability of chicks. *Poultry Science*, 78:1493-1498. 1999.
- Ohta Y, Kidd MT, and Ishibashi T. Embryo growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos, and chicks after in ovo administration of amino acids. *Poultry Science*, 78: 1430-1436. 2001.
- Ohta Y, Furuta H, Yoshimura I, Furuta H, and Ishibashi T. Effects of in ovo amino acids or glucose administration on hexokinase activity in hatching muscle of broiler embryos. *Energy and Protein Metabolism and Nutrition*, 124: 381-382. 2007.
- Otsu N, Kuramochi K, Sasaki J, Ochiai K, and Goryo Masanobu. Pathological study of superficial pectoral myopathy in broiler chickens. *Journal of the Japan Veterinary Medical Association*, 70, 257-362. 2017.
- Petracci M, Mudalal S, Babini E, Cavani C. Effect of white striping on chemical composition and nutritional value of chicken breast meat. *Italian Journal of Animal Science*, Volume 13: 3138, 179-183. 2014.
- Ranganathan J and Waite R. Sustainable diets: what you need to know in 12 charts. World Resources Institute. 2016.
- Richardson JA, Burgener J, Winterfield RW, and Dhillon AS. Deep pectoral myopathy in seven-week-old broiler chicken. *Avian Diseases*, Volume 24, No.4, pp 1054-1059. 1980.



- Sato M, Tachibana T, and Furuse M. Heat production and lipid metabolism in broiler and layer chickens during embryonic development. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A*, 143: 382-388. 2006.
- Saunders-Blades JL and Korver DR. The effect of maternal vitamin D source on broiler hatching egg quality, hatchability, and progeny bone mineral density and performance. *The Journal of Applied Poultry Research*, 23: 773-783. 2014.
- Shanmugasundaram R and Selvaraj RK. Vitamin D-1  $\alpha$  -hydroxylase and vitamin D-24-hydroxylase mRNA studies in chickens. *Poultry Science*, 91:1819-1824. 2012.
- Shashidara G, Rudrappa, and Humphrey BD. Energy metabolism in developing chicken lymphocytes is altered during the embryonic to posthatch transition. *The Journal of Nutrition*, 137: 427-432. 2007.
- Shiraishi J, Yanagita K, Fujita M, Bungo T. Central insulin suppresses feeding behavior via melanocortins in chicks. *Domestic Animal Endocrinology*, 34: 223-228. 2008.
- Sihvo HK, Immonen K, Puolanne E. Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. *Veterinary Pathology*, 51, 619–623. 2013.
- Sisley SR, Arble DM, Chambers AP, Gutierrez-Aguilar R, He Y, Xu Y, Gardner D, Moore DD, Seeley RJ, and Sandoval DA. Hypothalamic vitamin D improves glucose homeostasis and reduces weight. *Diabetes*, 65: 2732-2741. 2016.
- Soares JH Jr. Calcium metabolism and its control – a review. *Poultry Science*, 63: 2075-2083. 1984.
- Soglia F, Mudalal S, Babini E, Nunzio D, Mazzoni M, Sirri F, Cavani C, and Petracci M. Histology, composition, and quality traits of chicken pectoralis

- major muscle affected by wooden breast abnormality. Poultry Science, 95: 651-659. 2016.
- Tavarez MA and Santos FS. Impact of genetics and breeding on broiler production performance: a look into the past, present, and future of the industry. ANIMAL FRONTIERS. Volume 6, Issue 4:37-41. 2016.
- ThermoFisher SCIENTIFIC. TRIzol Reagent user guide: Experimental protocol for DNA isolation. MAN0016385. 2016
- Uni Z, Ferket PR, Tako E, and Kedar O. In ovo feeding improves energy status of late-term chicken embryos. Poultry Science, 84: 764-770. 2005.
- USDA. Deposition instructions for “woody breast” and “white striping” poultry conditions. USDA FSIS NOTICE, 42-18. 2018.
- United Nations. World population prospects: key finding & advance tables. 2017.
- Yun JS, Seo DS, Kim WK, Ko Y. Expression and relationship of the Insulin-like growth factor system with posthatch growth in the Korean native ogol chicken. Poultry Science, 84:83-90. 2005.
- Zuidhof MJ, Schneider BL, Carney VL, Korver DR, and Robinson FE. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. Poultry Science, 93: 2970-2982. 2014.
- 食品需給研究センター. トレーサビリティシステム導入事例集 第4集. 第6章 36-66. 2008.
- 佐藤 稲子. メトホルミン投与によるニワトリ血液中マンノース濃度の変化と糖新生系酵素の mRNA 発現量および活性の変動. 日本獣医生命科学大学研究報告, 61, 16-21. 2012.
- 半杭 祥子. ブロイラーの浅胸筋変性症. 鶏病研究会, 49 巻 2 号 p.132. 2013.

## 謝辞

本研究は、多くの方々のご指導と多大なるご協力をいただき、成し遂げることができました。

本研究の遂行および論文作成に際し、終始ご懇篤なご指導ならびにご鞭撻を賜りました日本獣医生命科学大学 動物生産化学教室教授 太田能之先生、助教 白石純一先生に深甚なる感謝の意を表します。

本論文の審査に際し、重要なご助言とご指導を頂戴いたしました日本獣医生命科学大学 獣医生化学教室教授 新井敏郎先生、食品機能化学教室教授 戸塚護先生、比較動物医学教室教授 横須賀誠先生、動物遺伝育種学教室教授 吉田達行先生に厚く御礼申し上げます。

本研究の試験で得られた試料分析を遂行するにあたり、分析機器をお貸しいただきました実験動物学教室 教授 藤平篤志先生に厚く御礼申し上げます。

本研究のきっかけとなった筋変性症状に関してディスカッションさせていただき、またブロイラーの提供と食鳥処理施設を利用させていただきました日本農産工業株式会社 研究開発センター 石井俊行様に心より御礼申し上げます。

本研究の各試験を遂行するにあたり、尽力いただき研究補助をしてくださった青木孝明氏、赤坂優里奈氏をはじめとする動物生産化学教室室員諸氏に深く感謝いたします。

また、本研究の遂行に助言を賜りました DSM Nutritional Products Asia Pacific 社 Dr. Thau Kiong Chung ならびに Dr. Fidelis Fru-Nji、本研究遂行への協力を賜りました DSM 株式会社 アニマルニュートリション本部諸氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、本研究の遂行への理解と支えてくれた家族に感謝いたします。