

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)

学位論文の内容の要約

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

早川岳彦

(指導教授：太田能之)

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-

早川岳彦（動物生産化学教室）

世界人口の増加に伴う動物性たんぱく質の需要増加により鶏肉生産は増加している。近代ブロイラーは鶏肉需要増加のために育種改良の更新が早く、特に胸肉の増加が顕著である一方で胸肉の変性に関する新たな問題が報告されている。浅胸筋に白い筋のようなものが認められる White Striping (WS)、硬化が認められる Wooden Breast (WB) といった筋変性が報告されているが、その発生机序はまだ明らかにされていない。

そこで、本研究では商業ブロイラーを用いて WS および WB の発症確認を行うと共に代謝障害の可能性について検討した。ニワトリは孵化前後に異化により糖新生を促進させることは報告されているが、このことはブロイラー成長促進要因である筋肉タンパク質分解抑制の同化と相反し、代謝的矛盾が筋変性の発症との関連性があるのではないかと考えられ、孵化前の胚のグルコース (GLU) 量と糖新生を阻害した時の特異性を調べた。さらに近年、骨格形成から各組織形成の代謝的誘導に関連することが示唆されているビタミン D₃ (VD₃) を種卵中に投与してブロイラーの成長に及ぼす影響について調べ、次に代謝型である 25-ヒドロキシコレカルシフェロール (25(OH)D₃) の初生ヒナの代謝制御系への影響について検討した。

1. WS および WB の発症状態の検討

試験 1 では、WS および WB の発症状態を確認するために日本農産工業株式会社 研究所 研究開発センターの協力により Ross 系ブロイラー42日齢の雄を用いて Kawasaki ら (2016) の方法で WB 発症可能性区および未発症可能性区

をそれぞれ 6 羽ずつ計 12 羽選抜した。外見の肉眼的特長を観察し、体重測定、採血を行い、発症部位の肉眼的特長を観察した後、浅胸筋、縫工筋、肝臓、腎臓、心臓、精巣、間脳を採取した。血液性化学検査を行い、浅胸筋においてコラーゲン形成に関連するデコリン、TGF- β の mRNA 発現を測定した。WB 発症区は浅胸筋の硬化により両翼がコンタクトできない外見上の特徴を示したが、本試験での体重差は認めれなかった。浅胸筋の WS 発症部位では脂肪細胞および結合組織であると報告されている白線状物質が筋線維に沿って確認された。WB 発症部位は胸肉の硬化に加え、内出血の点在と浅胸筋全体にわたり孵化時に認められる筋肉分解物に類似したコロイド状の物質が確認され、硬化症状は筋肉分解もしくは崩壊前の前段階ではないかと考えられ、孵化前後における異化および同化の生理的代謝矛盾を引き起こしている可能性が示唆された。浅胸筋においてデコリンおよび TGF- β で強い相関が認められ、TGF- β および VDR に相関が認められたことから、筋肉代謝に VD が関連しているものと推測され、本研究において VD の機能との関連性を検討することとした。

2. 糖新生特異性の検討

試験 1 にて孵化前後の同化異化の生理的代謝矛盾を引き起こしている可能性が示唆されたことを検討するために、糖新生阻害剤であるメトフォルミンの投与によって異化にどのように影響するか確認した。試験 2、3、4、5、6 および 7 では Cobb 系ブロイラー種卵をそれぞれ 24、16、8、8、20 および 10 個使用し、各試験とも温度 37.8°C、相対湿度 60% 以上で孵卵した。GLU 測定に用いる各組織は、試験 2 では孵卵 17、18 および 19 日目に 8 個ずつ胚を採取した。試験 3 では孵卵 17 および 19 日目に 8 個ずつ胚を採取し、hatching muscle、大腿筋、腺胃、筋胃、心臓および肝臓を採取した。試験 4 では孵卵 19 日目に 8 個から胚を採取し、胸腺、ファブリキウス嚢、脾臓および脳を採取した。試験

5では孵卵19日目に5個から卵黄動脈より血液を採血した。試験6では0、100、200もしくは300mg/mLのメトフォルミンを孵卵17日目にin ovo投与し、胚の生存率と初生ヒナの孵化率の用量反応を確認した。試験7では0もしくは200mg/mLのメトフォルミンを試験6と同様に孵卵17日目にin ovo投与し、孵卵19日目まで孵卵を続け、割卵して胚および卵黄嚢重量を測定した。胚のGLU含量は孵卵17日目から19日目まで直線的に増加した($P<0.05$)。肝臓中のGLU濃度は成長に伴い有意に低下したが($P<0.05$)、他の組織での差は認められなかったことから肝臓中のGLUは血液に運ばれたものと考えられた。メトフォルミンの投与により胚の死亡率および初生ヒナの孵化率は低下したが血中GLU濃度は影響を受けなかったため強いフィードバックの存在と血糖維持と糖新生制御がニワトリの生命維持において重要であること、フィードバックが糖新生に伴う筋肉タンパク質分解を亢進していること、ブロイラーの成長は筋肉タンパク質分解の抑制を育種によって引き起こされている可能性が示唆された。

3. VD_3 がブロイラーの成長に及ぼす影響の検討

試験1にて筋肉代謝との関連性が考えられたVDの出発物質である VD_3 の生理作用を確認し、成長に対する影響について調べた。試験8では、Ross系ブロイラー種卵60個を使用し、温度 $37.8^{\circ}C$ および相対湿度60%以上で孵卵した。蒸留水(対照区)、大豆油(大豆油区)、または大豆油に溶解した VD_3 (VD_3 区)を、孵卵18日目にそれぞれ20個ずつ0.5mL in ovo投与した。孵化したヒナを雌雄判別し、体重を測定した後、各12羽(雄6羽、雌6羽)を平均体重が同じになるように選別した。市販されているブロイラー前期飼料(ME 3.100kcal/kg、CP 21%)を4週間与え、28日齢で肝臓および胸筋を採取し、IGF-1およびIGF-1受容体のmRNA発現を測定し、脛骨の長さを測定した。

孵化時および 28 日齢時の体重の差は認められなかったが、脛骨長は投与間と雌雄間で相互作用が認められ、VD₃ 区の雌よりも雄で脛骨長が長く、雄では対照区よりも VD₃ 区で脛骨長が長かった。筋肉の IGF-1 受容体の mRNA 発現は VD₃ 大豆油投与区の雌のみが高く、肝臓の IGF-1 の発現レベルは VD₃ 大豆油投与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、骨伸長に影響を与えることが示唆された。一方で、成長の指標となる胸筋における IGF-1 受容体の mRNA 発現は雌のみで増加し、肝臓の IGF-1 の mRNA 発現は VD₃ の存在下で増加した。性差の原因は性ステロイドホルモンが関与していると考えられるが、産業界では WS および WB の発症は雌が雄と比較して発症率が低い、もしくは発症が遅いと言われていることを考慮すると雌の筋発達に対する健全性による可能性が考えられ、雄では健全性の欠落により筋肉タンパク質分解抑制が促進されるのではと推察された。また VD₃ は従来からブロイラー飼料に用いられながらも WS および WB の筋変性が問題になっているが、筋肉代謝と VD 機能の関連性はこれまでの本研究の試験において示唆されていることから VD の形態の違いの影響があるのではないかと考えられた。

4. 25(OH)D₃ による全身代謝制御系との関連性の検討

VD の形態の違いによりブロイラーにどのような影響を与えるか調べるために全身代謝制御系との関連性の検討を行った試験 9 および試験 10 は、Ross 系ブロイラーヒナを用い市販飼料 (ME 3,200kcal/kg、CP 20%) をベースに VD₃ を 3,000 もしくは 5,000IU/kg、25(OH)D₃ を 0 もしくは 69 μ g/kg 添加し 4 区に分けた。飼料は自由摂取、自由飲水させ、試験 9 では 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)D₃ 含量と GLU 含量、遊離脂肪酸含量、カルシウム含量の分析を行い、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 mRNA 発現量を測

定し、間脳でのプロオピオメラノコルチン(POMC)、アグーチ関連ペプチド(AgRP)、神経ペプチド Y (NPY)、VDR mRNA 発現を測定した。試験 9 においてエネルギー代謝制御に関わるメラノコルチンシステムにおいて間脳での mRNA 発現を測定した結果、同化に関わる NPY、AgRP は VD による変動は認められなかった一方で異化に関わる POMC において 25(OH)D₃ の存在下で変動が認められ、腎臓での VDR mRNA 発現の反応と類似していた。間脳での POMC および VDR の mRNA に相関が認められたことから 25(OH)D₃ による異化に対する影響があるものと考えられた。さらに、試験 10 では各区における耐糖能について経口ブドウ糖負荷試験を行って検討した結果、VD₃ 3000IU および 25(OH)D₃ 69 μg/kg 添加したものが低い傾向を示し、経口投与後 120 分で他添加区との差が認められインスリン感受性が高まったものと考えられた。糖負荷状態において VD バランスによる血糖調節機能が起きているのではないかと推察された。

以上の試験により、WS および WB が発症している状況では筋肉分解が起きていると考えられ、筋肉代謝に VD が関与していることが示された。孵化前後においては高血糖と糖新生の強い制御が認められたこと、動的適応によるフィードバックの存在が異化の筋肉タンパク質分解につながっており、これに対する分解抑制は育種によってなされたものであると考えられた。VD の成長に対する影響は雄での健常性の欠如による筋肉タンパク質分解抑制も考えられた。エネルギー代謝調節制御に関わるメラノコルチンシステムおよび VDR の関連性および血糖調節機能の可能性が 25(OH)D₃ の存在による影響があると示唆された。よって、糖新生、25(OH)D₃ を利用することによる異化調節によって WS および WB の発症制御につながる可能性が考えられた。