

2023 年度
博士論文

ブロイラーの異常硬化胸筋の発現に及ぼす酸化ストレスの影響
とその加工特性

Effect of oxidative stress on the development of
abnormal wooden breast in broilers and its processing characteristics

長谷川 靖洋
Yasuhiro Hasegawa

目次

略語	
緒論	1
第1章：ブロイラー異常硬化胸筋の部位ごとの硬さと酸化ストレスの評価	
序文	4
材料と方法	5
結果	10
考察	22
小括	24
第2章：ブロイラー異常硬化胸筋のミトコンドリア特性	
序文	25
材料と方法	27
結果	34
考察	44
小括	46
第3章：死後後の変化に伴う異常硬化胸筋の生化学的変化ならびにミオシンの理化学特性	
序文	47
材料と方法	48
結果	57
考察	75
小括	80
総合考察	81
英文要約	87
謝辞	89
引用文献	90
Appendix	98

略語

本論文で用いた略語は以下の通りである.

APF : Aminophenyl Fluorescein

ATP : Adenosine tri-phosphate

ATPB : Adenosine triphosphate synthase subunit beta, mitochondria

BPB : Bromophenol Blue

BSA : Albumin from Bovine Serum

CV% : Coefficient of Variance

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DTNB : 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid)

DTT : Dithiothreitol

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

GPX : Glutathione peroxidase

HE : Hematoxylin Eosin

NADH-TR : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Tetrazolium Reductase

PBS : phosphate-buffered saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

PRDX : Peroxiredoxin

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SEM : Scanning Electron Microscope

SOD : Superoxide Dismutase

SM : Spaghetti Meat

TBARS : 2-Thiobarbituric acid reactive substance

TEMED : N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine

Tris : Tris (hydroxymethyl) aminomethane

WB : Wooden Breast

WS : White Stripin

緒論

鶏肉は良質なタンパク質源であり、2012年以降は豚肉を抜き、日本国内で最も消費している食肉となっている。鶏肉の生産量は大部分をブロイラーで占めており、ブロイラーは食用のために生産された若鶏の総称である。これまで、ブロイラーの育種では、ホワイトミートとして世界的に需要が高い胸筋がより短期間で大きくなる形質を継続的に選択していくことで産肉性が高くなる方向に育種改良が進められてきた。この育種改良の中で必然的に育種選抜の指標として胸筋歩留が最重要視され、体重に占める胸筋割合は20%を占め【41】、過去50年間で生体重を基にした成長率は400%以上増加し、同時に飼料要求率は50%低下した【94】。しかし、生体での量的生産効率の改善と同時に主要な製品になる胸筋において、外観や機能の不具合が多発するようになり、生産される製品の品質が低く評価されることで、ブロイラー産業に多大な経済的損失をもたらしている【92】。

近年、ブロイラー胸筋において White Striping（以下、WS）、Spaghetti Meat（以下、SM）および Wooden Breast（以下、WB）と呼称される筋障害が多発し、問題となっている。WSは2009年に Kuttappan ら【43】の研究グループから報告され、その特徴は筋線維に沿って数ミリの白い筋状の構造物が胸筋表面に生じる。SMは筋線維の走行に沿って筋組織が裂けてしまう組織異常であり、筋線維を束ねる膜組織の形成不良により生じることが報告されている【6】。WBは異常に硬化した領域を中心に著明な褪色と軽度な膨隆を認めるとともに、表面がやや混濁した透明で幾分粘稠性のある浸出液で覆われ、しばしば散在性あるいは微細な点状出血を伴う【66】。また、組織学的変化の傾向として、頭側領域において筋線維変性や線維化、筋線維横断面の多角消失、脂肪浸潤、限局性静脈炎、間質の水腫などの共通所見が認められる【14, 18, 58, 82】。

WBの発現頻度は日齢に比例して高くなり、孵化後7週間で89%の割合で発現したとの報告がある【58】。これまでにWBを発現したことを理由に廃棄された公式な数値データは見当たらないが、国内の大規模食鳥処理場に勤務する職員に対する聞き取りによれば、WBの発現に関連する廃棄損耗率は3%から10%に達することもあるという。このようなことから、海外のみならず日本国内においてもWBの多発は鶏肉生産に関わる産業界全体においてより深刻な問題となっている。

WB発現の要因と根底にある発現メカニズムはいまだほとんど解明されていない。骨格筋の通常の再生メカニズムは、損傷筋線維の修復において筋線維の再生において以下の一連の過程をたどる【80】。

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,

WB 発現胸筋では, このような筋再生の過程が正常に機能していないことが示唆されており【85】, 多数の損傷筋線維, 結合組織の増成を生じており, これらは酸化ストレスの関与を示唆する報告がいくつかある. WB 発現胸筋はヒスチジンレベルを亢進しており, これは骨格筋の変性と酸化ストレスを反映した結果である【1】. さらに, WB 発現胸筋では, 正常胸筋と比較して酸化ストレスに応じて脂質が酸化されて生じる 2-Thiobarbituric acid reactive substance (過酸化脂質, 以下, TBARS) の含量が高いことも示されている【69】. 生体内において活性酸素種の産生が高まると, 局所組織細胞の膜脂質の過酸化が亢進あるいは持続することでリポフスチンあるいはその類似物質が蓄積してくることもある. リポフスチンは 1842 年に Hannover【22】によって初めて報告された不溶性色素で 30-70%のタンパク質と 20-50%の脂質からなり, 酸化ストレス下で損傷したタンパク質, 脂質および金属カチオンが高度に酸化架橋した凝集体である. この凝集体については, 以前は細胞に蓄積されるもののそのことによって直接的に細胞の機能はかく乱されないと考えられていた【99】. 最近では, リポフスチンの構成成分の 2%が触媒鉄を豊富に含む金属で構成されていることから, 細胞内で酸化反応の持続に寄与する可能性があるという考え方がある【90】. リポフスチンの構成や生体内での産生・蓄積メカニズムについては, いまだ未解明な部分が多いが, 老化に伴う蓄積だけではなく, 酸化ストレスを伴うアポトーシスや壊死に陥った細胞においても蓄積が認められることが示されている【99】. そこで, 第 1 章では, これらの知見に基づいて, 急速に成長するブロイラーの胸筋において発生が増加している WB と呼ばれる状態に陥った胸筋組織においてリポフスチンの蓄積状態と組織の変性や壊死との関係, リポフスチンの蓄積レベルと組織の活性酸素レベルや過酸化レベルとの関連および胸筋組織の力学物性について検討した.

急速に成長する筋肉内では, WB の発現とは無関係に多くの活性酸素種を生成する. ただし, WB 発現胸筋では, ミトコンドリア外膜に局在するシトクロム C オキシダーゼ活性が示されず, ミトコンドリア機能に変化が生じていることが示唆されている【60】. また, RNA-シーケンスの結果から, WB 発現胸筋では, 筋組織は低酸素状態を引き起こしている可能性があり, 低酸素状態に伴う活性酸素種の増加によって引き起こされる酸化ストレスが WB 発現の主要因の一つである可

能性も示唆されている【53】。これらの知見を踏まえ、第2章において、WBの発現にミトコンドリアの異常が関連している可能性に着目し、胸筋組織においてWB状態の進行程度とミトコンドリアの状態変化との関係を明らかにし、それらが組織の過酸化のメカニズムにどのように関わっているか検討した。

生体に起こる臓器や器官の変性・壊死・炎症・再構築の過程は連続した現象である。したがって、見た目に判断される異常や病変は、感覚的（おもに作業者の視覚と触覚）に気づくかどうかはその存在の認知に大きく関わっている。WBも例外ではなく、表層が著明な滲出物や血液で覆われており、著明に褪色・変色などの外観や触感が極端に正常と異なるとWBと判断することができるが、そのような見た目の変化が顕著にみられるもの以外を食鳥処理場の製造ラインで判別して排除することはほとんど不可能である。そのため、実際には、WBの発生プロセスにある多くの胸筋が製品化されているものと推測される。そこで、第3章では、重度のWBを発現している胸筋の利活用について検討を行い、重症化過程の途中にあるWBの利用のバリエーションを増やすことを目的に研究を展開した。本章で検討した内容については、次の2点である、1つは、重度のWBの死後の熟成（死後時間の経過）に伴うかたさや生化学的変化についての知見を得ること、2つめは、WBを発現した胸筋の肉加工品の原料肉としての可能性を明らかにすることである。

また、WB発現にかかわる一連の問題を解決していくためには、WB胸筋組織の発現メカニズムを理解にすることに加え、それらを生じる要因としての飼育条件との因果関係を詳細に明らかにしていく必要がある。本研究では、第1章から第3章までに示すWBの組織学的、生化学的なアプローチによる探索に加え、現在検討しているWBの発現傾向につながる飼育要因について示し、検討することとした。

第1章：プロイラー異常硬化胸筋の部位ごとのかたさと酸化ストレスの評価

序文

WB 発現の要因と詳細な発現メカニズムはいまだほとんど解明されていないが、酸化ストレスの関与を示唆する報告がいくつかある。WB 発現胸筋においてヒスチジンレベルの上昇には、ヒスタミン、1-メチルヒスチジン、および3-メチルヒスチジンの蓄積を伴っており、これは骨格筋の変性と酸化ストレスを反映した結果であることが示唆されている【1】。また、WB 発現胸筋では、ヒスチジン由来の抗酸化物質であるカルノシンとアンセリンが低下していることから酸化還元状態が変化していることが示唆されている。さらに、WB 発現胸筋では、正常胸筋と比較して酸化ストレスに応じて脂質が酸化されて生じる TBARS の含量が高いことも示されている。酸化ストレスの指標として組織内にリポフスチンを蓄積することも知られている。リポフスチンは老化や酸化ストレスのマーカーであり、急速に老化が進むウェルナー症候群モデルマウスの肝臓やディシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスの筋組織でその蓄積が観察されている【9, 15】。ディシェンヌ型筋ジストロフィーモデルマウスの筋組織は筋損傷と筋再生を繰り返し、筋線維が線維化することはWBの特徴と非常に似ている。WB は表層側で斑点状の出血が見られ炎症が生じており【66】、結合組織が多く存在していることから胸筋が硬化しているが、これらが胸筋においてどの程度生じているのか、また、酸化ストレスレベルの程度が示されておらず、WB を発現した胸筋は部位ごとの酸化ストレスレベルとかたさとの関係を調査した報告はされていない。そこで、本章ではWBの発現において筋肉部位ごとのかたさと酸化ストレスとの関わりを理解するために胸筋部位ごとの剪断力価とリポフスチンの蓄積量を検討することとした。

材料と方法

試料の採材

本研究に供試した胸筋は食鳥処理場でと殺・解体処理された46日齢のブロイラー（ROSS308系）から採取した。食鳥処理場では、鶏は電気スタナーで気絶させられた後、オートキラーで頸動脈切断され、急速放血によって処置された。放血が完了した後、と体は湯漬、脱羽および内臓を除去した。内臓除去と体（中抜きと体）はチラーで浸漬冷却された後、胸腰部で切断され、脱骨・解体処理された。胸筋の採取は脱骨処理直後に行い、WB発現胸筋14検体、見かけ正常な胸筋（正常胸筋）13検体をそれぞれと殺後2時間以内に採取した。胸筋においてWB発現の識別指標は、異常にかたいゴムのような弾力性を帯びていること、皮下の胸筋表層は薄い黄色みを帯びていること、皮下の胸筋表層はしばしば点状出血を伴う帯黄色浸出液で覆われていることとした。採取した胸筋は直ちにチャック付ビニール袋に空気をできるだけ排除して密封し、氷水を満たした発泡スチロール箱に入れた。これらの胸筋はと殺後6時間以内に実験室に輸送した。実験室に到着した胸筋はそれぞれ皮膚側3か所（1, 3, 5）と内臓側3か所（2, 4, 6）を切り出し部位と定め（図1）、それぞれの部位から必要な数の肉小片を切り出した。剪断力価の測定、HE染色、アザン染色、TBARSの測定およびリポフスチン蓄積量の測定には全ての切り出し部位から切り出した肉小片を使用した。

剪断力価の測定

剪断力は、レオメーター（RE-33055; ヤマデン, 東京）を用い、 $10 \times 10 \times 40$ mmの大きさに切り出した肉小片の筋線維走行に対して垂直方向になるよう直刃ブレード（厚さ0.35 mm）をあてて測定した。測定条件は格納ピッチが0.05 sec, 測定速度が1 mm/sec, 測定歪率が150%, アンブル倍率は1倍とし、ロードセルは20 kgfを用いた。この測定は供試胸筋が実験室に到着後2時間以内に完了した。

凍結組織切片標本の作製

凍結組織切片作製の試料は、Terrillら【79】によって記載された方法に従い、肉小片を1.5 cm角の大きさにトリミングし、トラガカントガムを用いてコルク台座に貼り付け、液体窒素で冷却したイソペンタンに入れて急速凍結した。急速凍結して作製した凍結組織ブロックは -80°C のフリーザー内で保存した。凍結組織ブロックは、 -23°C に設定したクリオスタット（CM3050S, Leica,

Wetzlar , Germany) 内にセットし, 30 分程度放置した後, 薄切作業を開始した. 薄切は厚さ 10 μm で行い, 1 試料ごとに連続切片を作製し, スライドガラスに接着させ, 未染色組織切片標本とした. 連続切片として作製した未染色組織切片標本は, Hematoxylin Eosin 染色 (以下, HE 染色), アザン染色, およびシュモール反応, 自家蛍光像によるリポフスチン蓄積量の測定, 蛍光色素を用いた筋組織内の活性酸素種の観察に供した.

HE 染色標本およびアザン染色標本の作製と組織観察

HE 染色標本の作製は, 以下の手順で行なった.

1. 未染色組織切片標本を 2 次蒸留水に 5 分間浸漬して解凍.
2. ギル・ヘマトキシリン (カタログナンバー: 30041, 武藤化学, 東京) に 10 秒間浸漬.
3. 流水水洗後, 蒸留水に 10 分間浸漬.
4. 70%エタノールに 3 分間浸漬.
5. 1%エオシン Y 液 (カタログナンバー: 32051, 武藤化学, 東京) に 3 分間浸漬.
6. 70%エタノール, 100%エタノール, 100%エタノールにそれぞれ 3 分間浸漬して脱水.
7. 100%キシレンで透徹. 3 分間, 3 回.
8. カバーガラスを掛け, マリノール (カタログナンバー: 10781, 武藤化学, 東京) で封入.

アザン染色標本の作製は, 以下の手順で行なった.

1. 未染色組織切片標本を 2 次蒸留水に 5 分間浸漬して解凍.
2. アザン染色用媒染剤 (カタログナンバー: 40061, 武藤化学, 東京) に 10 分間浸漬.
3. 水道水で 5 分間流水水洗し, 2 次蒸留水に 5 分間浸漬.
4. 60°C のマロリーアゾカルミン染色液 (カタログナンバー: 40011, 武藤化学, 東京) に 30 分間浸漬.
5. 2 次蒸留水で 3 秒間水洗.
6. アニリンアルコール (カタログナンバー: 40021, 武藤化学, 東京) に 30 秒間浸漬.
7. 3%酢酸を含むエタノールに 30 秒間浸漬.
8. 水道水で 5 分間流水水洗し, 2 次蒸留水に 5 分間浸漬.
9. 5%リタングステン酸 (カタログナンバー: 40041 武藤化学, 東京) に 1 時間浸漬.
10. 水道水で 5 分間流水水洗し, 2 次蒸留水に 5 分間浸漬.

11. 3倍希釈したアニリン青・オレンジG染色液（カタログナンバー：40052，武藤化学，東京）に30分間浸漬。
12. 99.5%エタノールで分別。
13. 100%エタノール，100%エタノールにそれぞれ3分間浸漬して脱水。
14. 100%キシレンで透徹。3分間，3回。
15. カバーガラスを掛け，マリノールで封入。

HE染色標本およびアザン染色標本の観察は，光学顕微鏡（ECLIPSE-Ci，ニコン，東京）を用いて行い，Kawasakiら【36】が示したWB発現胸筋の筋線維横断面において多角性の低減・消失傾向と間質の線維化傾向に着目し，それらの出現傾向を確認した。

TBARSの測定

TBARSは過酸化脂質のマーカー指標としてAsakawaら【4】の方法を用いて測定した。-80°Cで保存した各部位の試料を解凍後に5gずつ秤量し，1.15%塩化カリウム15mlを加えてポリトロン（PT1200E，KINEMATICA，Lucerne，Switzerland）でホモジナイズした。50mlの遠心管にホモジナイズした試料100μlを入れ，8%SDS溶液200μl，0.3M酢酸ナトリウム1.5ml，0.8%ジブチルヒドロキシトルエン50μl，0.8%の2-チオバルビツール酸を1.5ml，2次蒸留水700μlを加えて試料混合物とした。試料混合物は，沸騰水浴で30分間加熱し，室温まで冷却した後，氷冷した。表面に浮いた脂肪を葉さじで取り除き，純度がそれぞれ99%以上および99.5%以上のイソアミルアルコール（富士フィルム和光純薬，東京）およびピリジン（富士フィルム和光純薬，東京）を2:1で混合した溶液15mlを加え，遠心管の蓋を閉めて1分間激しく手で振とうした後，遠心分離（ローター：T15A39，2400rpm，10min，20°C）した。各試料の上清部分2mlをガラスセルに分取し，分光光度計（S2000，日立，東京）を用いて，538nmで吸光度を測定した。TBARSは，以下の換算式を用いて算出した。

$$\text{TBARS (試料 1g から生成する赤色色素, } \mu\text{mol/g)} =$$

$$[(A - A_0) \times 5.8 \times 100000 \times 50] / (\text{試料採取量 (mg)} \times 156,000)$$

A：試料の吸光度
A₀：ブランクの吸光度
5.8：上記の操作で得られる上清部分の液量

156,000 : 赤色色素の原子吸光係数

シュモール反応によるリポフスチンの検出

スライドガラス上で少量の試薬と組織切片を均一に反応させるため、撥水性のリキッドマーカー (Super pap pen, コスモバイオ, 東京) で円を描いて組織切片を囲み、その内側で反応を進めた。まず、スライドガラスに貼り付けた凍結組織切片は2次蒸留水に5分間浸漬して解凍した。シュモール反応は、1%フェリシアン化カリウム溶液 10 ml と 1%塩化第二鉄溶液 30 ml を使用直前に混合して試料にのせ、30秒間反応させた後、2次蒸留水に3分間浸漬し、さらに2次蒸留水を3回交換して十分に洗浄した。70%エタノール、90%エタノールにそれぞれ3分間、100%エタノール3分間ずつ3回浸漬して脱水、100%キシレンに3分間3回浸漬して透徹、マリノールで封入した。シュモール反応で染色された標本は、光学顕微鏡 (ECLIPSE-Ci, ニコン, 東京) で緑色調に染まるリポフスチン顆粒の存在の有無や分布を観察した。

自家蛍光像によるリポフスチン蓄積量の測定

自家蛍光物質であるリポフスチンの特性を生かして蛍光顕微鏡下で正常胸筋と WB 発現胸筋においてリポフスチンの分布や局在部位の観察を行なった【81】。未染色組織切片標本は1試料につき1枚のスライドガラスに凍結組織切片を3枚ずつ貼り付けたものを作製し、暗所室温下で1時間乾燥させた後、マリノールとカバーガラスで封入し、観察時まで -40°C で保存した。蛍光顕微鏡 (C2+, ニコン, 東京) を用いた観察では、20倍の対物レンズ下で励起波長 465-495 nm の FITC フィルターキューブ (FITC C-FL-C, ニコン, 東京) を用い、露光時間は 400 ms とした。画像の撮影では、1枚の組織切片につき 30-40 枚の画像 (JPEG, 1280×1024 pixel) を取得した。撮影した画像を観察し、偽発光がない標本 10 枚をリポフスチンの蓄積量解析に使用した。リポフスチンの蓄積量は、Tohma ら【81】の方法に従い、画像解析ソフト (Image J, version 1.8.0, Mac OS X, <https://imagej.net/ij/download.html>) に取得した画像を読み込み、以下の手順で定量解析した。

1. リポフスチン自家蛍光像を撮像した画像ファイルを Image J 上で開く。
2. Image タブ → Type → 8-bits を選択してグレースケールに変換する。
3. Analyze → Set Measurements → Area fraction, MeanStandard deviation にチェックを入れる。
4. Analyze タブ → Measure を選択する。

5. 出力された平均値 mean および標準偏差 StdDev の数値を用いて、 $\text{mean} + n \times \text{StdDev}$ を計算する。nには Threshold (閾値) として 4 - 10 の数字を入れる。
6. Image J の Image タブ → Adjust → Threshold → set → Lower threshold level に上記で算出した数値を入力して set を押す。
7. Analyze タブ → Measure を選択する。
8. %area が出力される。

以上の手順で n に 4 - 10 を入力したときの %area を出力する。

n に 4 - 10 を入力したときの切り出し部位ごとの %area 出力値を求め、n の数値ごとに正常胸筋と WB 発現胸筋の %area の平均値±標準偏差を求めた。正常胸筋と WB 発現胸筋の %area の平均値に最も差が認められた n=4 を代入した時のデータをリポフスチン蓄積量の指標値として採用した。

蛍光色素を用いた筋組織内の活性酸素種の観察

活性酸素種を発色させるための蛍光色素として、Aminophenyl Fluorescein (カタログナンバー: SK3001-01, 五稜化学株式会社, 札幌, 以下 APF) を用いた。APF は、 $5 \mu\text{M}$ となるように Tris (hydroxymethyl) aminomethane-HCl (以下, Tris-HCl) (pH7.0) を用いて希釈調製した。 $5 \mu\text{M}$ APF 希釈液 $50 \mu\text{L}$ を凍結組織切片に添加し、遮光下で室温 30 分間反応させて活性酸素種を発色させた。検鏡による観察は、蛍光顕微鏡 (C2+, ニコン, 東京) を用いて行い、 $5 \mu\text{M}$ APF 希釈液 30 分間の反応後はカバーガラスを掛けずに 20 倍の対物レンズ下で励起波長 465-495nm の FITC フィルターキューブ (FITC C-FL-C, ニコン, 東京) を用い、露光時間は 200 ms で観察した。

統計解析

剪断力値, リポフスチン蓄積量および TBARS の値は KaleidaGraph software ver. 4.5 (Synergy Software, Mt. Penn PA, USA) を用いて解析した。それ以外の数値データは、平均値±標準偏差で示すとともに、一元配置分散分析, Tukey's HSD および LSD 検定を用いて統計学的解析を行なった (有意水準は $p < 0.05$) 。

結果

剪断力価

皮膚側の切り出し部位 1, 3 および 5 において剪断力価は、正常胸筋で、それぞれ 2.08 ± 0.48 , 2.22 ± 0.75 , 1.95 ± 0.69 kgf, WB 発現胸筋でそれぞれ 7.71 ± 3.10 , 5.45 ± 2.89 , 2.78 ± 1.95 kgf であった。切り出し部位 1 および 3 では、正常胸筋と WB 発現胸筋の剪断力価の平均値間に有意差を認め、切り出し部位 5 では有意差は認められなかった (図 2)。内臓側の切り出し部位 2, 4 および 6 において剪断力価は正常胸筋で、それぞれ 1.35 ± 0.46 , 1.42 ± 0.73 , 1.41 ± 0.49 kgf, WB 発現胸筋で 2.24 ± 1.60 , 2.02 ± 0.92 , 1.89 ± 0.67 kgf であった。切り出し部位 2, 4 および 6 では、正常胸筋と WB 発現胸筋の剪断力価の平均値間に有意差は認められなかった。

HE 染色およびアザン染色標本の観察による組織所見

連続凍結組織切片から作製した HE 染色標本とアザン染色標本を光学顕微鏡下で観察し、それぞれの試料において組織の典型像を図 3-6 に示した。正常胸筋では、すべての切り出し部位において筋線維間にはほとんど膠原線維はみられず、筋周膜領域の間質には、少しの膠原線維 (図 3 および 4, 矢印) としばしば脂肪組織を含む結合組織 (図 3 および 4, 矢頭) が形成されていた。筋線維の形態は大部分で多角形であり、円形化した筋線維は僅かにしか観察されなかった。一方、WB 発現胸筋においては、皮膚側切り出し部位 1 および 3 の筋組織に脂肪組織 (図 5, 白矢印) や炎症細胞 (図 5, 白矢頭)、線維芽細胞の浸潤・増殖 (図 5, 黒矢印) がみられるとともに、間質は局所的ないし広範囲に細線維が疎密に分布し肥厚していた (図 5, 黒矢頭)。また、筋周膜を中心とした結合組織領域ではしばしば膠原線維の増生がみられた (図 5, アスタリスク)。筋線維の形態は大部分で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 5, シャープ)。WB 発現胸筋において、すべての内臓側切り出し部位においてほとんど膠原線維はみられず、わずかに脂肪組織が観察された (図 6, 矢頭)

TBARS 量

正常胸筋では、すべての切り出し部位において約 $0.1 \mu\text{mol/g}$ であった。また、WB 発現胸筋では、切り出し部位 1 から 6 の順に 0.25 ± 0.03 , 0.20 ± 0.03 , 0.23 ± 0.04 , 0.20 ± 0.10 , 0.23 ± 0.03 および $0.19 \pm 0.05 \mu\text{mol/g}$ であった。TBARS 量の平均値は、すべての切り出し部位において正常胸筋と WB 発現胸筋との間に有意差を認めた (図 7)。

リポフスチンと活性酸素種の局在

HE 染色標本の観察では、WB 発現胸筋の壊死・崩壊過程にある筋線維細胞質に緑黄色光輝性の顆粒を認めた (図 8a) . この顆粒はシュモール反応で陽性に染色された (図 8b) . さらに蛍光顕微鏡下での観察において HE 染色とシュモール反応で確認した顆粒の局在部位に一致して自家蛍光物質の分布を認めた (図 8c, d) . これらの所見から、WB 発現胸筋において壊死・崩壊過程にある筋線維細胞質に認められた顆粒は、リポフスチンであることが強く示唆された. さらに、APF を用いて、WB において活性酸素種の分布を観察した結果、WB 発現胸筋では活性酸素種の発光は、主に筋線維間に局在していた (図 8d) . 正常胸筋は筋線維の間にリポフスチン顆粒の自家蛍光を認め、WB 発現胸筋は壊死・崩壊過程にある筋線維で自家蛍光を認めた (図 9) .

切り出し部位ごとのリポフスチン蓄積量

自家蛍光を蛍光顕微鏡下で撮像した画像を用いた画像解析の結果、リポフスチン蓄積量の指標値は、WB 発現胸筋の切り出し部位 1 ($0.129 \pm 0.074\% \text{area}$) , 切り出し部位 2 ($0.086 \pm 0.065\% \text{area}$) , 切り出し部位 3 ($0.121 \pm 0.076\% \text{area}$) で正常胸筋に対して有意に高値を示した. また、切り出し部位 4, 5 および 6 では、正常胸筋と WB 発現胸筋のリポフスチン蓄積量の指標値に有意な差は無かった. 各切り出し部位の剪断力価とリポフスチン蓄積量の指標値との相関について、測定した全試料を用いて回帰式を算出した結果、一時回帰式は $y=191.9+52696x$ で、相関係数は 0.61 となり、正の相関を示した.

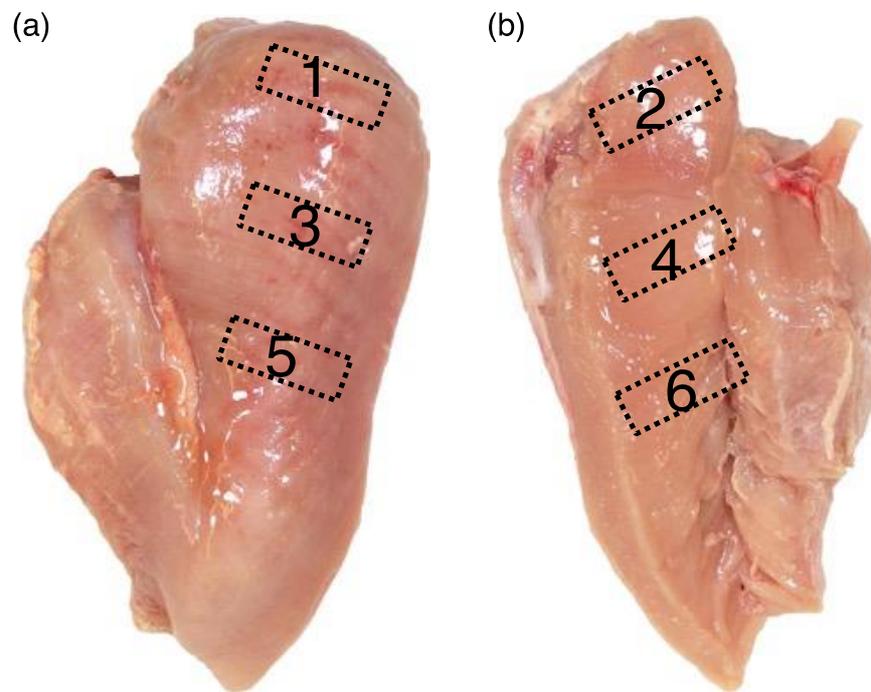


図1. 鶏胸筋の切り出し部位.

(a) 皮膚側, (b) 内蔵側. 写真内の番号は切り出し部位を示す.

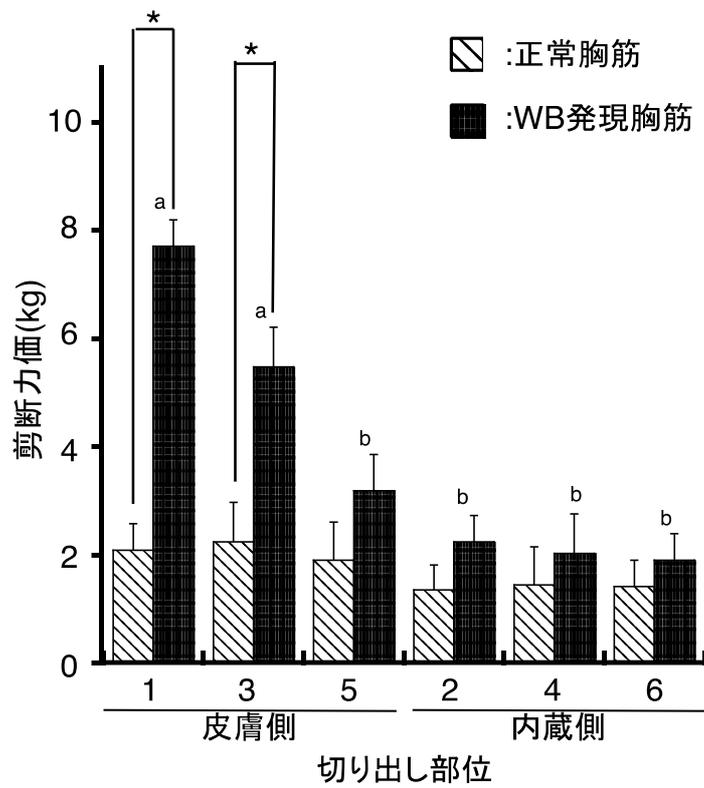


図2. 各切り出し部位の剪断力価.

剪断力価の値は平均値±標準偏差で示す. ab および異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

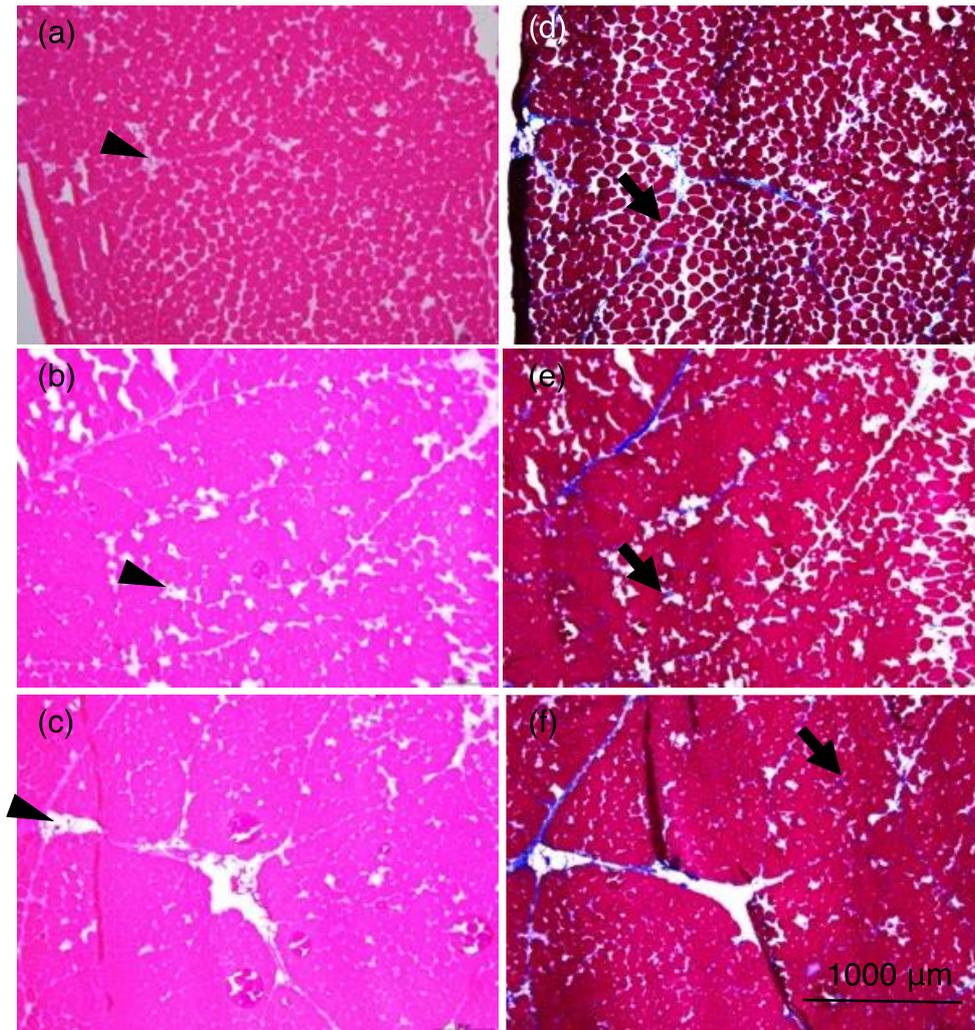


図3. 正常胸筋皮膚側のHE染色像とアザン染色像.

(a-c) HE染色, (d-f) アザン染色, (a,d) 切り出し部位1, (b,e) 切り出し部位3, (c,f) 切り出し部位5. 図内矢印および矢頭は, それぞれ膠原線維および脂肪組織を含む結合組織を示す.

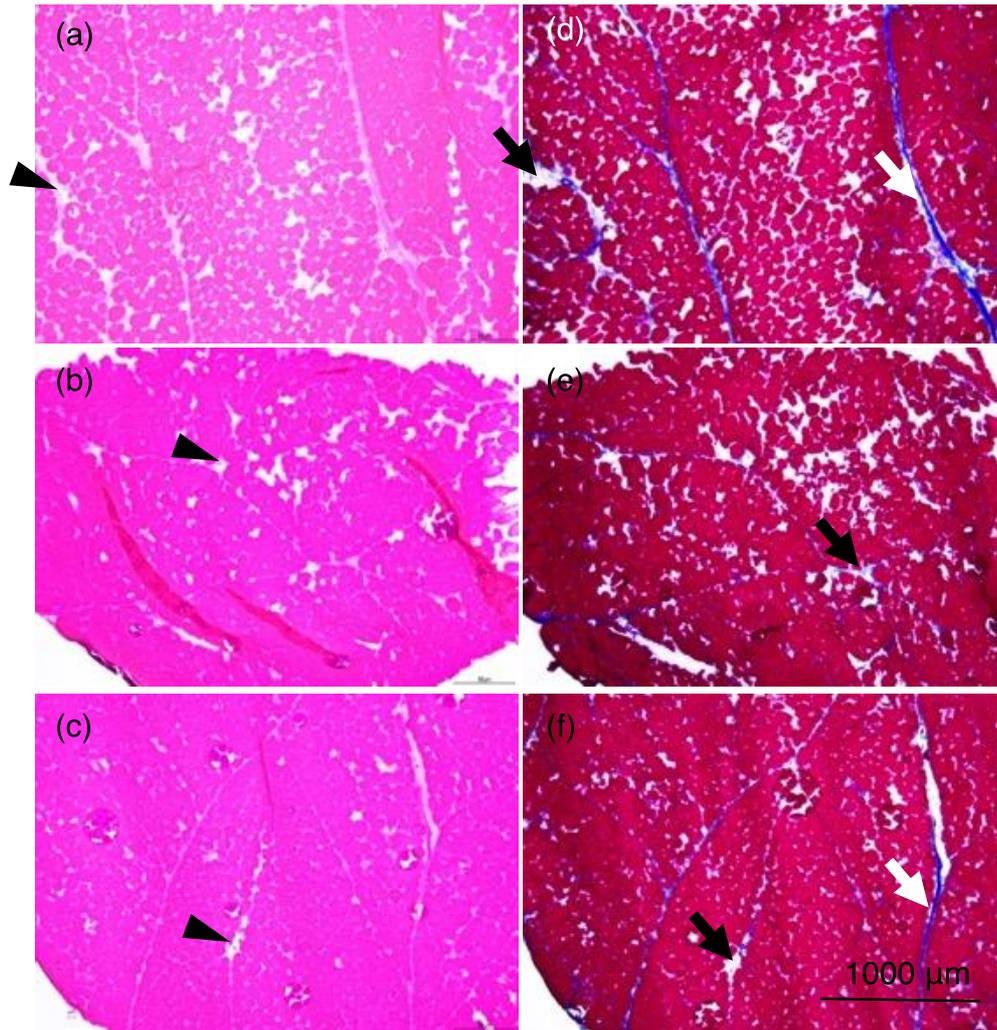


図4. 正常胸筋内蔵側のHE染色像とアザン染色像.

(a-c) HE染色, (d-f) アザン染色, (a, d) 切り出し部位2, (b, e) 切り出し部位4, (c, f) 切り出し部位6. 図内矢印および矢頭は, それぞれ膠原線維および脂肪組織を含む結合組織を示す.

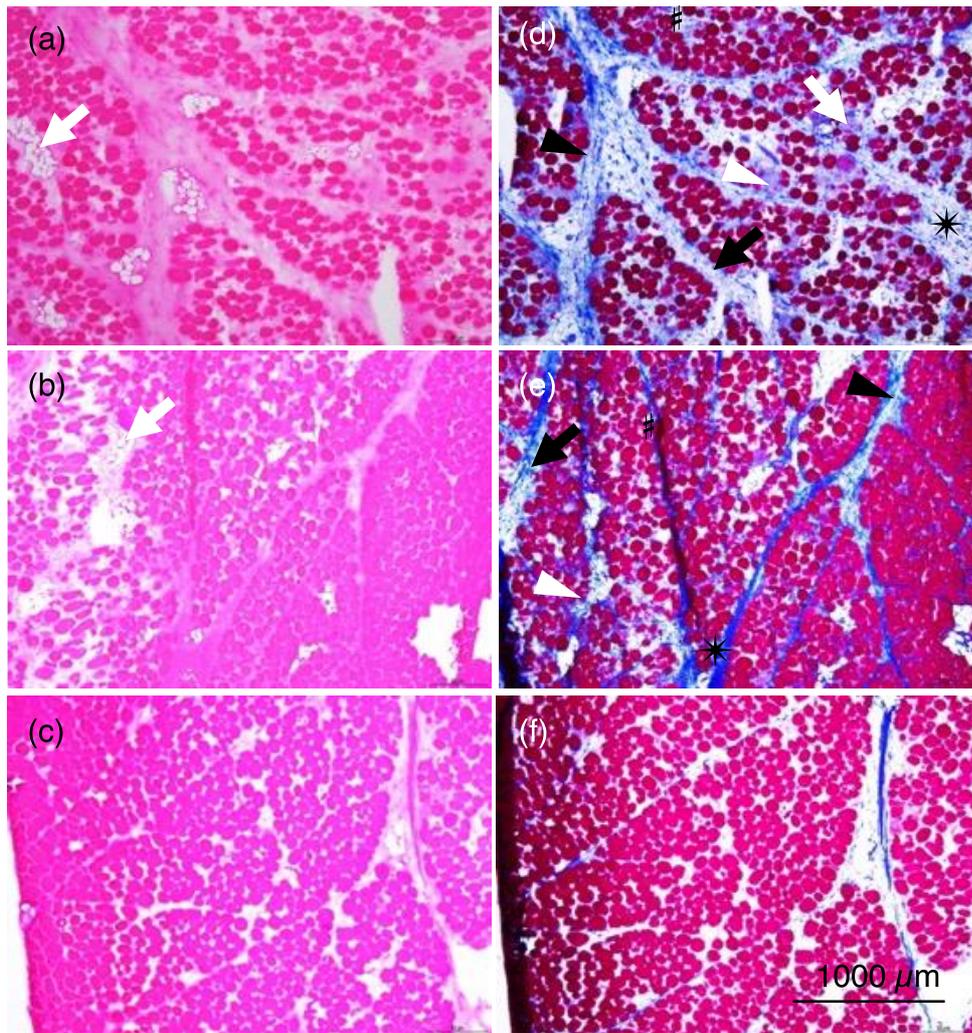


図 5. WB 発現胸筋皮膚側の HE 染色像とアザン染色像.

(a-c) HE 染色, (d-f) アザン染色, (a, d) 切り出し部位 1, (b, e) 切り出し部位 3, (c, f) 切り出し部位 5. 図内の白矢印, 白矢頭, 黒矢印, 黒矢頭, アスタリスクおよびシャープは, それぞれ脂肪組織, 炎症細胞, 線維芽細胞, 細線維の肥厚, 膠原線維の増生および空胞変性筋線維を示す.

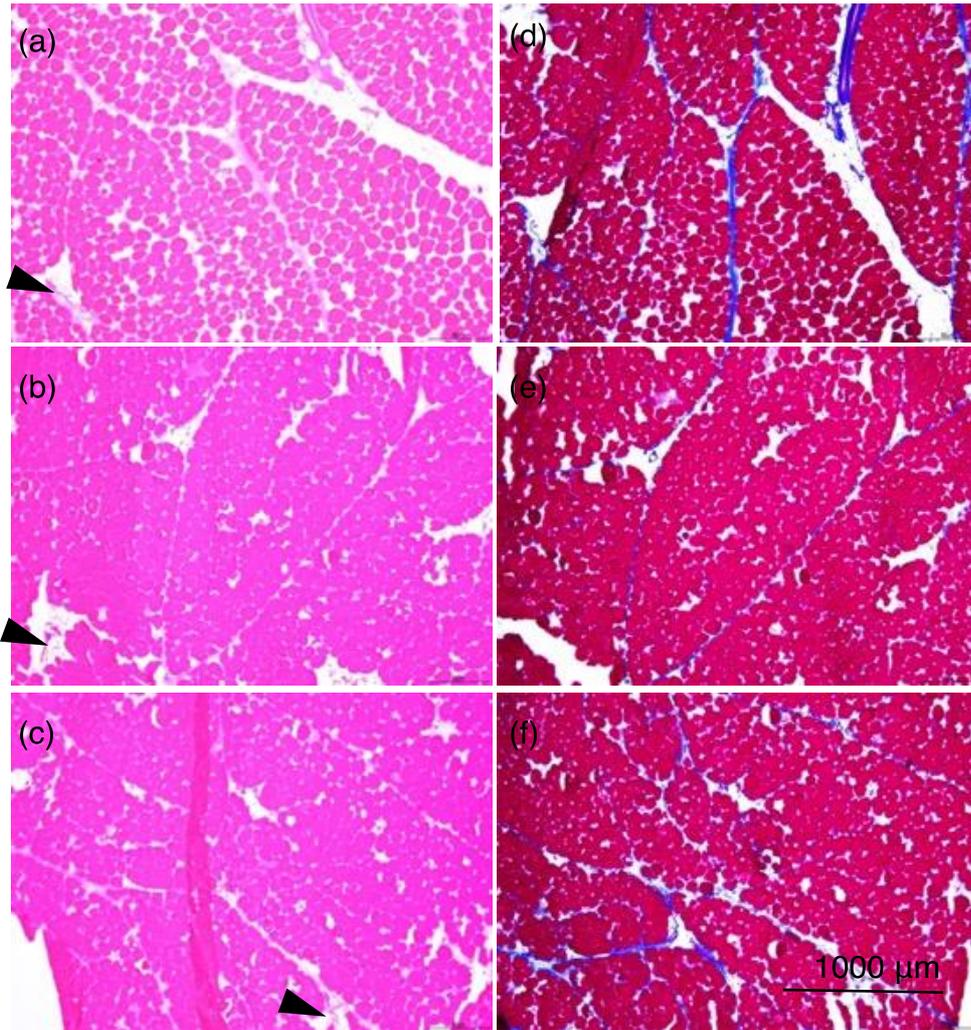


図 6. WB 発現胸筋内蔵側の HE 染色像とアザン染色像.

(a-c) HE 染色, (d-f) アザン染色, (a, d) 切り出し部位 2, (b, e) 切り出し部位 4, (c, f) 切り出し部位 6. 図内の矢頭は脂肪組織を示す.

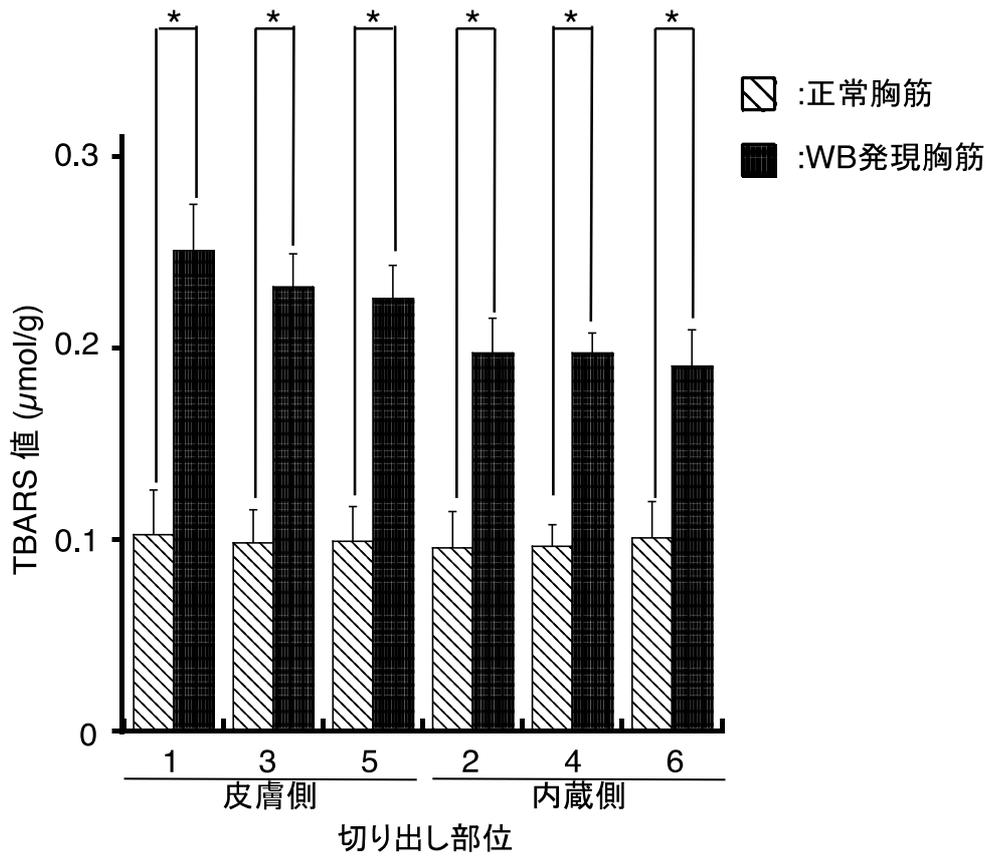


図7. 各切り出し部位での TBARS.

TBARS は平均値 ± 標準偏差を示す. 異符号間に有意差あり (p<0.05) .

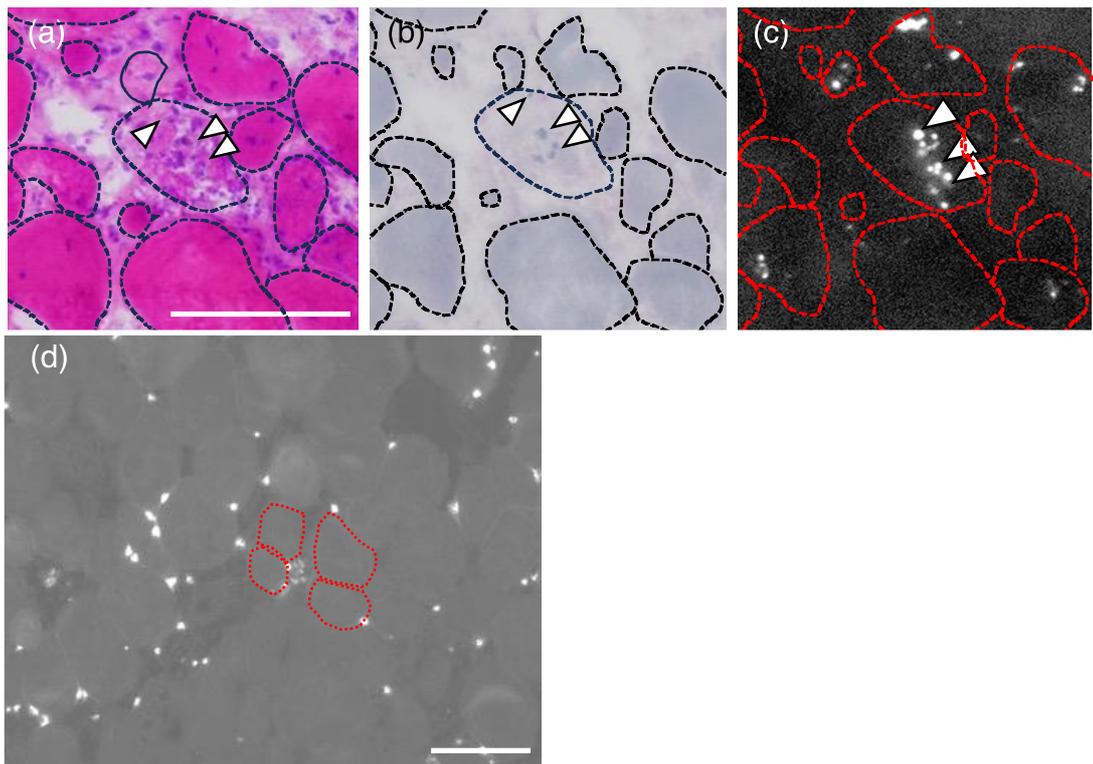


図 8. 各種組織像.

(a) HE 染色像, (b) シュモール反応陽性像, (c) リポフスチン自家蛍光像, (d) 活性酸素象. (a), (b) および (c) は連続切片を用いて各染色を行なった. 矢頭および画像内の点線は同一部位および筋線維を示す. 画スケールバーは $100\ \mu\text{m}$ を示す.

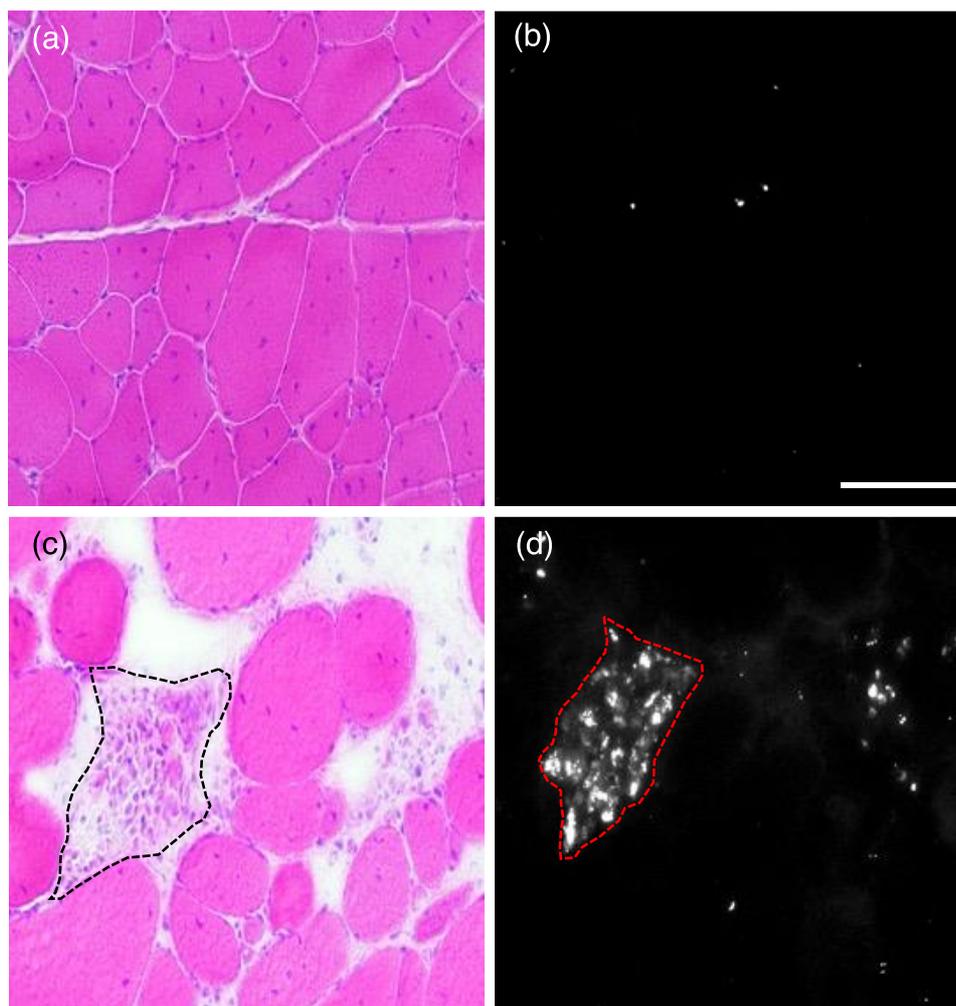


図9. 連続切片を用いたHE染色と自家蛍光像の比較.

(a) 正常胸筋のHE染色像, (b) 正常胸筋のリポフスチン自家蛍光象, (c) WB発現胸筋のHE染色像, (d) WB発現胸筋のリポフスチン自家蛍光象. 画像内の点線およびスケールバーは, それぞれ壊死・崩壊過程にある筋線維および100 μ mを示す.

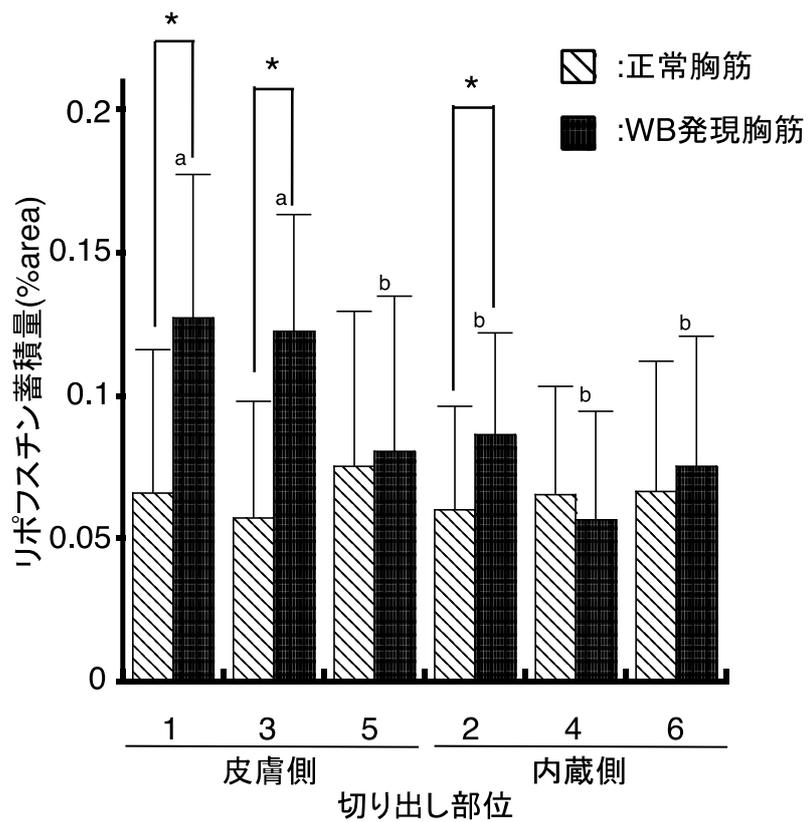


図 10.各切り出し部位のリポフスチン蓄積量.

リポフスチン蓄積量の値は平均値 ± 標準偏差を示す. ab および異符号間に有意差あり (p<0.05) .

考察

本研究では、Chatterjee【11】がWBの高発現傾向があることを示唆している胸筋の頭側領域を含む6か所の定点を定め、それらの定点から肉小片を切り出し、それぞれ同一条件により剪断力価を測定した。その結果、WB発現胸筋は正常胸筋と比較して、皮膚側領域で剪断力価が有意に高値であったことから、WB発現高発領域は、胸筋頭側の皮膚側である可能性が示唆された。剪断力価の測定で明らかにされた硬化傾向の高い領域がWB発現領域であることを確認するために、HE染色標本とアザン染色標本を観察したところ、皮膚側領域で筋線維の空胞形成、多角性の低減・消失、限局性ないし広範囲にわたる間質の膠原線維増生が認められた。これらの所見は、Sihvoら【66】が示したWBの組織所見ともほぼ一致していた。Nishimura【55】の総説では、筋組織において膠原線維量と筋肉のかたさとの相関性については必ずしも一定した傾向があるとはいえないが、高い膠原線維含量の骨格筋のほうが低い膠原線維含量の骨格筋よりもかたいことを示した研究報告があると述べている。一方、筋組織のテクスチャーに影響を与える要素として、膠原線維の分子間架橋が増加すると、膠原線維の弾性が低下するとともに筋組織がかたくなることが示されている【85,93】。本研究においては、剪断力価が高いレベルを示した領域に一致して膠原線維の増生による筋間結合組織の肥厚が著明に認められたことから、WB発現胸筋において力学物性値の増大と膠原線維の増生による筋間結合組織の肥厚の間には密接な関連があるものと推測され、Liuら【49】が報告した鶏肉の力学物性値は結合組織量と有意な正の相関をもつ報告と一致する。

本研究で用いた正常胸筋の平均重量は 417.2 ± 34.5 g、WB発現胸筋の平均重量は 507.8 ± 39.5 gであった。これらの重量差はKuttappanら【42】が示した成長速度が速い鶏ではWBが発現する可能性が高いことを示す報告、と一致していた。リポフスチンの蓄積は、WB発現胸筋の頭側皮膚側領域で有意に高い傾向が認められた。また、リポフスチン蓄積量と剪断力価の間には、正の相関が認められた。このことは、リポフスチンの蓄積がWBの発現と剪断力価の上昇に密接に関連していることを示唆するものである。このリポフスチンの蓄積は、若いX染色体関連DMD患者の骨格筋および生後4週目のDMDモデルマウスの筋肉で観察されている【54】。また、健康なヒトの骨格筋の組織化学分析では、リポフスチンが若者（20～24歳）よりも高齢者（70～80歳）でより頻繁に観察されることが示されている【28】。Sohalら【72】が行なった*in vitro*の実験においては、酸化剤を添加した培地で培養した筋細胞ではリポフスチンが蓄積するのに対して抗酸化剤を添加した培地で培養した筋細胞ではリポフスチンが減少することを確認している。これらの事実は酸化ストレスが筋組織においてリポフスチンの蓄積を促進することを示唆している。

WB の発現要因としての酸化ストレスの役割に関するさらなる証拠として、WB 発現胸筋において3-メチルヒスチジンの蓄積【1】と TBARS の増加【70】が挙げられている。これらの物質の蓄積や増加は、それぞれ筋原線維タンパク質の酸化と脂質酸化の指標となる。本研究の結果では、すべての WB 発現胸筋で正常胸筋よりも高い TBARS が検出されており、先行研究と【70】とよく一致している。WB 発現胸筋においてリポフスチンの蓄積部位と剪断力価が高い部位との一致は本研究で見いだされた新たな知見である。

一般に正常な細胞内の活性酸素種は、通常、主にスーパーオキシドジスムターゼファミリーの抗酸化酵素系によって閾値レベル以下に維持されている【40】。しかし、筋ジストロフィーのマウスモデルの骨格筋でも出現する活性酸素種【87】は、本研究において WB 発現胸筋でも強い反応性蛍光発色として筋線維間の細胞外に検出された。この蛍光発色は、正常胸筋ではほとんど検出されなかった。このことは、WB 発現鶏において活性酸素種を除去するシステムに異常があり、胸筋の筋線維損傷につながる活性酸素種の蓄積を引き起こしている可能性があることを示唆している。本研究では、WB 発現において活性酸素種の増加に関与する詳細なメカニズムについて詳細には言及できないものの、WB 発現胸筋においてリポフスチンの形成と活性酸素種の増加に関連がある証拠を示した。

リポフスチンは、細胞内タンパク質と脂質の過剰な架橋によってリソソーム内で形成される非分解性色素である【78】。最近の研究【39】では、ミトコンドリアの分裂を調節している *dynamin-related protein 1* (ダイナミン1様タンパク質) を選択的に阻害すると、老化したミトコンドリアがマイトファジーによって分解されないために、活性酸素を産出して酸化が亢進することを報告している。その結果として、リポフスチンが形成されて蓄積する。これらは WB 発現胸筋においてリポフスチンの蓄積による胸筋ミトコンドリアの機能、あるいは構造変化の可能性を示唆している。今後、WB 発現にかかわる胸筋において酸化ストレスのメカニズムとリポフスチンおよび活性酸素種の蓄積との関係性を明らかにしていくうえで、ミトコンドリアの機能と構造に焦点をあてた研究を進めていくことが必要である。

本章では WB の発現により硬化した筋肉部位と酸化ストレスマーカーであるリポフスチン蓄積量は一致していることを明らかとし、WB は過度な酸化ストレスにより発現することを明らかとした。

小括

本章では食鳥処理場でと殺・解体された46日齢のブロイラー胸筋から6部位を切り出して試料とし、WB発現の有無による胸筋組織において形態、リポフスチンの蓄積状態と組織の変性や壊死との関係性、リポフスチンの蓄積と組織の酸化ストレスとの関係性、力学物性値を検討した。WB発現胸筋の切り出し部位1および3の筋組織に脂肪組織や炎症細胞、線維芽細胞の浸潤・増殖がみられるとともに、間質は局所的ないし広範囲に細線維が疎密に分布し肥厚しており、同部位の剪断力価において正常胸筋とWB発現胸筋の剪断力価の平均値間に有意差を認めた。正常胸筋のTBARSは、すべての切り出し部位において約 $0.1 \mu\text{mol/g}$ であったが、WB発現胸筋ではいずれの部位で正常胸筋のTBARSより有意な高値を認めた。WB発現胸筋の壊死・崩壊過程にある筋線維細胞質に緑黄色光輝性の顆粒を認め、この顆粒はシュモール反応で陽性に染色されるとともに、蛍光顕微鏡下での観察においてシュモール反応で確認した顆粒の局在部位に一致して自家蛍光物質の分布を認めた所見から、この顆粒は、リポフスチンであることが示唆された。リポフスチン蓄積量はWB発現胸筋の切り出し部位1, 2および3で正常胸筋に対して有意に高値を示した。

以上のことから、WB発現胸筋には多量のリポフスチンが蓄積しており、この結果は過剰な酸化ストレスWB発現に関与していることを強く示唆し、WBの発現機構を理解するための基礎的知見であると考えられた。

第2章：プロイラー異常硬化胸筋のミトコンドリア特性

序文

第1章では、WB 発現胸筋の頭側皮膚側で高い剪断力価およびリポフスチン蓄積量をもつことを明らかにし、WB の発現と酸化ストレスとの強い関わりを示した。酸化ストレスは細胞内に過剰な活性酸素が産出され、抗酸化能とのバランスが崩れることで細胞内レドックスが酸化状態に傾くことにより生じる。除去されなかった活性酸素は様々な生体高分子に傷害を与え、組織障害を生じる。酸化ストレスを生じる主な原因は骨格筋の場合、酸化ストレスの要因となる活性酸素は主にミトコンドリアによって生成される【59】。ミトコンドリアは生体細胞において必須の小器官であり、細胞が取り込んだ酸素の90%を消費して電子伝達系での酸化的リン酸化による Adenosine tri-phosphate (アデノシン三リン酸：以下、ATP) 合成に最も寄与する【23】。ミトコンドリアの呼吸鎖では、複合体IとIIIが電子伝達系で漏出電子を発生させ、酸素をスーパーオキシドアニオン ($O_2^{\cdot-}$) へ還元する【84】。また、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸オキシダーゼは骨格筋において活性酸素を生成することを明らかにしている【17】。生体内で生成された活性酸素種は、Superoxide Dismutase (スーパーオキシドディスムターゼ：以下、SOD) ファミリーを含む抗酸化酵素によって分解されるため、筋細胞を含む動物細胞は、生理的条件下で活性酸素種の生成と除去を通じて酸化還元バランスを維持している【64, 83】。一部の筋ジストロフィーにおいては酸化還元状態の変化により酸化ストレスが増加し、活性酸素種の蓄積が引き起こされる。この酸化ストレスの蓄積は、ジストロフィン欠乏症に関連する筋肉の損傷と筋力低下に影響を与えていることが示唆されており【40】、筋ジストロフィーでは筋線維の変性変化を伴うマウスモデルによる研究では、デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) と酸化ストレスとの間に因果関係があることが報告されている【54, 81】。また、ミトコンドリアには、外膜と内膜を構成する2つの脂質二重層が含まれている。この構造は、リン脂質とタンパク質が豊富であるため、活性酸素種による酸化的損傷に対して脆弱である【10】。体内で生成された活性酸素種は、組織の恒常性維持するために酵素によって除去される【64】。骨格筋では、活性酸素種の除去システムに異常が発生すると、過剰な酸化ストレスが生じ、恒常性の維持が困難になることがある【40】。したがって、WB の発現とミトコンドリアが持つ特性やその形態を精査することはWB 発現をより理解するために重要な検討項目となる。

そこで本章では、WB の発現はミトコンドリア機能不全が引き金になっていると仮説立て、WB にみられる組織の変性の程度や進行度によって胸筋の分類を行い、ミトコンドリアの超微細構造とその機能を評価することで、ミトコンドリアの機能変化と WB の発現、ならびに筋肉組織変性との関係を明らかにすることにした。

材料と方法

供試鶏

本研究の飼育試験は、酪農学園大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号 VH18A6）。酪農学園大学フィールド教育研究センター肉畜生産ステーションの鶏舎に設置したふ卵器で孵化させた 36 羽のブロイラー（ROSS308 系）を同鶏舎で 50 日齢まで飼育した。鶏は初生から 12 日間育すう器で飼育し、その後 50 日齢までは平飼いとした。平飼い期間の飼育区画には、コンクリートの床に清潔なおが屑を 5-10 cm の深さになるように敷き詰めた。0-12 日齢の期間は幼・中すう育成用配合飼料（育雛前期 A、ホクレンくみあい飼料苫小牧工場）、12-50 日齢の期間は、ブロイラー肥育後期用配合飼料（あおぞら仕上、中部飼料北海道工場）を給与し、飼育期間中を通じて飼料と水は鶏が自由に摂取できるようにした。50 日齢時に体重が 3 kg を超えていた 35 羽を選抜し、Kawasaki ら【36】の方法によって両側翼の挙上試験を実施した。

胸筋試料の採取

供試鶏は翼下静脈からペントバルビタールナトリウム 20-30 mg/kg を注射し、深麻酔下で放血による安楽死処置を行なった後、胸筋を摘出し、すみやかに電子顕微鏡観察用の試料として 2×2×4 mm の大きさの肉小片を胸筋頭側の皮膚側から切り出し、カルノフスキー固定液に浸漬した。また、遺伝学的解析用の試料として胸筋同領域から 1 mm 角の細断片にしたものを採取し、RNAlater (RNAlater™ Soln, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA) 入りのマイクロチューブに入れ、氷水で冷却した。電子顕微鏡観察用の試料と遺伝学的解析用の試料を採取した残りの胸筋は、チャック付きビニール袋に密封した後、氷水に漬けて冷やし、一時的に保管した。これらの胸筋からは、安楽死処置後 3 時間以内に 1×1×2 cm の大きさで肉小片を切り出し、第 1 章に示した手順で凍結組織ブロックを作成した。遺伝子解析用の試料は、氷水から実験室の 4°C の冷蔵庫に移して一晩置き、翌日、マイクロチューブから RNAlater を除去し、実験に使用するまで -80°C で保存した。

凍結組織切片標本の作製と染色

凍結組織ブロックからクライオスタット（CM3050S; Leica Biosystems, ヌスロフホ, ドイツ）を使用して厚さ 10 μm に薄切し、スライドグラスに貼り付けて凍結組織切片標本作製した。HE 染色標本は常法に従って第 1 章に示した手順で作製した。NADH-tetrazolium reductase（以下、NADH-TR）染色標本は、Judson ら【34】が報告した方法を一部改変して以下の手順で作製した。すなわち、2.5

mM NADH を含む 50 mM Tris-HCl (pH7.6) と同量の 1.25 mM Nitro Blue Tetrazolium Chloride を含む 50 mM Tris-HCl (pH7.6) の混合液を NADH-TR 染色液とした。スライドガラス上の凍結組織切片に NADH-TR 染色液を滴下し、37°C 下で 30 分反応させ、その後 2 次蒸留水に 10 秒間浸漬した。30%、60%、90%、60% および 30% のアセトン溶液に順に各 3 分間浸漬した後に、カバーガラスを掛け、PVA-DABCO で封入した。

抗 ATP シンターゼ・ベータサブユニット (以下, ATPB) 抗体と抗ラミニン抗体による重染色標本は、以下の手順で作製した。

1. スライドガラスに貼り付けた凍結組織切片に 4% パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.2) に 30 分間浸漬して固定した。
2. 8.1 mM NaHPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl, 137 mM NaCl からなる Phosphate-Buffered Saline pH7.4 (リン酸生理食塩水以下, PBS) に 5 分間浸漬し、これを PBS に交換して 3 回実施した。
3. 3% ウシ血清アルブミン (カタログナンバー : 013-15143, 富士フィルム和光純薬, 大阪, 日本) を含む PBS (pH7.4) で 1 時間ブロッキング処理を行い、再び、PBS (pH7.4) による 5 分間の浸漬洗浄を、PBS を交換して 3 回した。
4. 一次抗体として、Anti-ATPB antibody [3D5] -mitochondrial Marker (ab14730, abcam, Cambridge, England) と Anti-Laminin rabbit IgG (NB300-144, Novus Biologicals, Colorado, USA) をそれぞれ 1% Albumin from Bovine Serum (以下, BSA) を含む PBS で 200 倍希釈したものを等量混合して組織切片に滴下し、湿潤箱に入れて 4°C で一晩静置して反応させた。
5. PBS (pH7.4) による 5 分間の浸漬洗浄を、PBS を交換して 3 回行なった。
6. 二次抗体として、100 倍希釈した Goat Anti-rabbit IgG Dylight 543 (ab96899, abcam, Cambridge, England) と 100 倍の希釈 Goat Anti-mouse IgG H&L Alexa Fluor®488 (ab150113, abcam, Cambridge, England) を等量混合したものを滴下し、遮光して 1 時間室温で反応させた。
7. 遮光したまま PBS による 5 分間の浸漬洗浄を、PBS を交換して 3 回行なった。
バックグラウンド核染色として、0.1 µg/ml に調整した 4',6-diamidino-2-phenylindole (以下, DAPI) を組織切片に滴下し、遮光して 10 分間室温で反応。
8. 遮光状態のまま、PBS による 5 分間の浸漬洗浄を、PBS を交換して 3 回した。
9. カバーガラスを掛け、トリエチレンジアミンを含むポリビニルアルコール封入剤で封入した。

透過型電子顕微鏡観察のための超薄組織切片作製

透過型電子顕微鏡観察のための超薄組織切片は、Hosotani ら【26】の方法に準じて以下の手順で処理した。すなわち、2×2×4 mm に切り出してカルノフスキー固定液に浸漬した肉小片は 1×1×3 mm に再成形して試料とし、ハーフカルノフスキー固定液に 2 時間浸漬した。0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH7.4) で 5 分間の振盪洗浄を 3 回行い、還元オスミウム水溶液 (4% 四酸化オスミウムと等量の 3% フェロシアン化カリウムを含む 0.2 M カコジル酸緩衝液を混合) で水中に 1 時間静置した。0.1 M カコジル酸緩衝液 (pH7.4) で 5 分間の振盪洗浄を 3 回行った。その後、0.1% チオカルボヒドラジド溶液に 20 分間浸漬し、2 次蒸留水を入れて 4 分間の振盪洗浄を 4 回実施した。2% 四酸化オスミウムに 30 分間浸漬し、さらに、2 次蒸留水を入れて 4 分間の振盪洗浄を 4 回実施した。1% 酢酸ウラン溶液に試料を入れ、4°C 下で一晩静置して染色した。翌日、アスパラギン酸鉛水溶液 (0.03 M のアスパラギン酸 0.2 g と水 5 ml, 1 N の KOH 1400 µl を混合し、60°C 下で加熱溶解して調整した溶液 10 ml に硝酸鉛 0.066 g を溶解させて使用液としたもの) に 60°C で 30 分間浸漬した。試料を 2 次蒸留水に入れて 4 分間の洗浄を 4 回繰り返した。50%, 70%, 90%, 95% および 100% エタノール溶液で各 5 分間浸漬して脱水した、再度 100% エタノールで 5 分間浸漬して完全に水分を除いた。その後に QY-1 (カタログナンバー: 310-1, 日清 EM, 東京) に入れ、10 分間置換処理を行なった。重合樹脂と等量の QY-1 を混合した溶液に入れて 2 時間振盪した。重合樹脂は、Quetol-812 (カタログナンバー: 25038-04-4, 日清 EM, 東京) 10 ml, Dodeceny Succinic Anhydride (カタログナンバー: なし, 日清 EM, 東京) 8 ml, Methyl nadic anhydride (カタログナンバー: なし, 日清 EM, 東京) 4 ml, Tris (dimethylaminomethyl) phenol (カタログナンバー: なし, 日清 EM, 東京) 0.4 ml を混合し、攪拌して調整したものを使用した。試料は重合樹脂を充填したシリコン包埋板に入れ、60°C で 2 日間静置し、加熱重合により硬化させた。超薄組織切片はウルトラマイクロトーム (Ultracut-UCT, Leica, Wetzlar, Germany) を用いて 100 nm 厚に薄切し、200 メッシュの銅製グリッドにすくい取った。

WB の重症度分類

WB の重症度は、生体において両側翼の挙上性と挙上時の胸部の触感によって評価し、また、筋組織において筋線維横断面の多角消失の程度を評価することにより次のとおり分類した。生体において両側翼の挙上性と胸部の触感については、両側翼を下から静かに持ち上げたときに無理なく翼同士を接触させることができ、かつ両側翼を最大限に挙上させた状態で胸部の触感が柔軟であるものを正常 (Normal) , 両側翼を下から静かに持ち上げたときに、両側翼同士を接触させることができ

ず、かつ、両側翼を最大限に挙上させた状態で胸部の触感がかたいゴム様であるものを WB と判定した。

筋組織において筋線維横断面の多角消失の程度の評価は、HE 染色標本を光学顕微鏡（ECLIPSE-Ci, ニコン, 東京）を使用して観察し、撮像した画像ファイル（JPEG 形式, 2880×2048 pixel）を画像解析ソフト（Image J, version 1.8.0, Mac OS X, <https://imagej.net/ij/download.html>）に読み込み、以下の手順で円形度を算出することにより行なった。

1. 画像を Image J に読み込む。
2. Analyze → Set Measurements → Shape descriptors にチェックを入れる。
3. Image J のツールボタンの中から Freehand selection を選択し、筋線維の輪郭を囲む。
4. Analyze タブ → Measure を選択する。
5. 出力された Circ. を円形度とした。

鶏 1 羽の胸筋につき 300 本分の筋線維横断面の円形度を出力してその平均値を算出した。50 日齢時において両側翼の挙上性から WB と判定された鶏の胸筋筋線維横断面の円形度平均値（WB 筋線維円形度平均値）を算出し、個々の胸筋において 300 本分の筋線維横断面の円形度平均値が WB 筋線維円形度平均値未満を WB-Mild, 平均値以上を WB-Severe とした。

NADH-TR 標本の観察

NADH-TR 染色標本は、光学顕微鏡（ECLIPSE-Ci, ニコン, 東京）を使用して観察した。

筋組織のミトコンドリアの分布状態の比較観察

免疫組織化学的染色標本は、共焦点レーザー顕微鏡（ECLIPSE TI-DH, ニコン, 東京）を用い、40 倍の対物レンズ下で以下の条件により観察するとともに撮影装置で撮像した。

ATPB : 波長 543 nm (赤) , HV-130 Offset-40 Pinhole 4.5

ラミン : 波長 488 nm (緑) , HV-115 Offset-80 pinhole 3.3

DAPI : 波長 408 nm (青) , HV-95 Offset-20 pinhole 2.9

撮像した ATPB, ラミン, ならびに DAPI の蛍光像の画像ファイル（JPEG 形式, 2048×2048 pixel）は、画像解析ソフト（Image J, version 1.8.0, Mac OS X, <https://imagej.net/ij/download.html>）に読み込み、以下の手順で重ね合わせ画像にした。

1. 各蛍光発色像の画像ファイルを Image J 上で開く.
2. Image タブ→Color→Merge channels を選択.
3. 表示された C1 (red) に ATPB 像のファイルを選択.
4. 表示された C2 (green) に lamini 像のファイルを選択.
5. 表示された C3 (blue) に DAPI 像のファイルを選択.
6. Greate composite にチェックをいれた後, OK を押す.

以上により, ATPB, ラミニン, DAPI の蛍光像が重ね合わせ画像として出力される.

ミトコンドリアが視野に占める面積の計測

電子顕微鏡による筋組織の観察と筋組織の撮像は, 透過型電子顕微鏡 (HT-7700, 日立, 東京) を使用して, 加速電圧 80 kV の条件で行なった.

透過型電子顕微鏡で撮像した筋組織の平面画像のミトコンドリアの面積は, 画像解析ソフト (Image J, version 1.8.0, Mac OS X, <https://imagej.net/ij/download.html>) に画像ファイルを読み込み, 以下の手順で計測した. なお, この作業で使用する画像ファイルは撮像倍率が同率のもので保存形式は JPEG とした. 鶏 1 羽につき 300 個のミトコンドリアの面積を出力してその平均値を算出した.

1. Image J 上で筋組織の画像ファイルを開く.
2. Analyze タブ → Set Measurements→Area にチェック入れる.
3. Image J ツールボタンの中から straight を選択し, 画像に表示されたスケールバーに沿って直線を引き, スケール (数値と単位) を記録しておく.
4. Analyze タブ → Measure を選択する.
5. Length に数値が表示されたことを確認し, Analyze → Set scale を選択する.
6. Known diastance に画像のスケールバーの数値を入力する.
7. Unit of length にスケールの単位を入力する.
8. 連続して計測作業をする場合は, Global にチェックを入れ, OK を押す.
9. Image J ツールバーの Freehand selection を選択し, ミトコンドリアの周囲を囲む.
10. Analyze タブ → Measure を選択する.

出力される Area 値をミトコンドリアの面積とした.

抗酸化酵素遺伝子の発現解析

RNA の抽出

-80°C で保存した発現遺伝子定量用試料を 5 mm のステンレスビーズ（ビーエム機器，東京）が入ったマスターチューブに約 50 mg 秤量した。RNA 抽出試薬（TRIzol, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA）を 500 μ l を加えた後，ホモジナイザー（シェクマン 6, ビーエム機器，東京）を用いて 3500 rpm で 30 秒間ホモジナイズした。5 分間静置した後，200 μ l のクロロホルムを加え，ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌を行い，3 分間静置した後，遠心分離（ローター：T15A39, 4°C, 12000 rpm, 15 分間）を行なった。下層がピンク色，上層が透明色になっていることを確認し，透明な層を回収した。500 μ l のイソプロパノールを加えて攪拌後，常温で 10 分間放置し，遠心分離（ローター：T15A39, 4°C, 12000 rpm, 10 分間）を行なった。上清部分を捨てた後，沈殿部に 500 μ l の 75%エタノールを加え攪拌後，遠心分離（ローター：T15A39, 4°C, 12000 rpm, 5 分間）を行なった。再度，上清部分を廃棄した後，沈殿部に 500 μ l の 75%エタノールを加え攪拌し，遠心分離（T15A39, 4°C, 12000 rpm, 5 分間）を行なった。上清部分を捨て，マイクロチューブのふたを開けて 15 分程度乾燥させた。30 μ l の Ultra Pure Distilled Water RNase Free（ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA）を加え混合したものを RNA 原液とした。RNA 濃度は吸光マイクロプレートリーダー（Multiskan™ Sky, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA）と専用サンプルプレート（ μ Drop™ Plates, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA）を使用して測定した。

cDNA の合成

cDNA の合成は Rever Tra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（東洋紡，大阪）を用いた方法で行い，以下の手順で行なった。

RNA テンプレートの調製：抽出した RNA 原液に Ultra Pure Distilled Water RNase Free を加えて RNA の濃度を 0.5 ng/ μ l に調整したものを RNA テンプレートとした。

反応溶液の調製：4 \times DN Master Mix 400 μ l と gDNA Remover 8 μ l を混合したものを反応溶液とした。

RNA テンプレートからの夾雑ゲノム DNA の除去反応：RNA テンプレート 6 μ l と反応液 2 μ l を混合した後，37°C 5 分間静置し，ゲノム DNA を除去した。

cDNA の合成：氷上でゲノム DNA 除去した RNA テンプレートと反応液の混合液に 5 \times RT Master Mix II 2 μ l を加え，よく混合した後，サーマルサイクラー（SimpliAmp Thermal Cycler, ThermoFisher Scientific, Massachusetts, USA）に入れて 37°C 15 分逆転写反応，さらに 98°C 5 分間酵素失活反応を行なった。合成した cDNA は使用するまで -80°C で保存した。

Polymerase Chain Reaction（以下、PCR）による発現遺伝子の定量

本章で使用したプライマーは表 1 に示した。ハウスキーピング遺伝子には β -Actin を用いた。合成した cDNA 溶液を Ultra Pure Distilled Water RNase Free で 20 ng/ μ l に希釈してテンプレート cDNA とした。PCR 反応に使うマスターミックスの調整には THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix（東洋紡、大阪）を用いた。マスターミックスは、Forward プライマー（F）と Reverse プライマー（R）をそれぞれ 0.5 μ l、THUNDERBIRD® SYBR qPCR Mix 50 μ l を混合したものとした。48 穴プレートにテンプレート cDNA とマスターミックスをそれぞれ 5 μ l ずつウェルに分注し、よく混合した後スピンドウンし、PCR 反応液とした。PCR 反応液を Real-time PCR システム（Real-Time PCR Eco, アズワン、大阪）にセットし、初期熱変性を 95°C1 分、PCR 反応を熱変性 95°C15 秒、伸長反応 60°C45 秒、40 サイクル行なった後、4°C まで冷却して反応を停止させた。反応終了後、比較定量法 ($\Delta\Delta$ Ct 法) によって目的遺伝子発現量のハウスキーピング遺伝子量に対する相対値として算出した。

統計解析

円形度、ミトコンドリア面積および抗酸化酵素遺伝子発現量の値は KaleidaGraph software ver. 4.5 (Synergy Software, Mt. Penn PA, USA) を用いて解析した。平均値 \pm 標準偏差で示すとともに Tukey's HSD および LSD 検定を用いて統計学的解析を行なった（有意水準は $p < 0.05$ ）。

結果

重症度分類

重症度分類が Normal と判定された筋組織の典型像を図 11a に示した。Normal の筋組織においてほとんどの筋線維横断面は多角形で筋線維同士は近接し整然と配列していた。一方、WB-Mild, WB-Severe と判定された筋組織では筋線維横断面の多角性が低減・消失し、類円形を呈するとともに隣接する筋線維同士の間が乖離する傾向であった（図 11b, c）。

Normal および WB 発現胸筋の平均円形度はそれぞれ、 0.750 ± 0.114 と 0.830 ± 0.095 であった。WB 発現胸筋の円形度が平均値以下の円形度を持つ個体の平均値および平均値以上の円形度を持つ個体の平均値はそれぞれ、 0.800 ± 0.097 および 0.858 ± 0.079 であり（図 12）、全ての群間で有意な差を認めた（ $p < 0.001$ ）。Normal（8羽）、Mild（12羽）および Severe（15羽）と分類された個体数の生体重はそれぞれ、 3.70 ± 0.33 、 3.97 ± 0.39 および 4.35 ± 0.48 kg であった。

NADH-TR 染色による筋線維の染色態度

Normal の筋組織横断面では、薄く染色された筋線維が大多数を占め、濃く染色される筋線維はわずかであった（図 13b）。WB-Mild の筋組織では、Normal の筋組織と比較して濃く染色される筋線維が多かった（図 13c, d）。WB-Severe の筋組織では、より濃く染色される筋線維が多かった（図 13e, f）。

ミトコンドリアの組織分布と蛍光発色態度

共焦点レーザー走査型顕微鏡で観察した免疫組織化学的染色標本の典型像を図 14 に示した。WB-Normal の標本では、ラミニンの分布を示す緑色に発色した筋線維（ラミニン陽性筋線維）の細胞膜内側にわずかに ATPB の分布を示す赤色発色粒子（ミトコンドリア粒子）が認められ、それらの粒子はごく微細であった（図 14a, b）。WB-Mild の標本では、ラミニン陽性筋線維細胞質内に Normal と比較して強く発色したミトコンドリア粒子が散在していた（図 14c, d）。WB-Severe の標本では、ラミニン陽性筋線維の細胞質を満たす強い発色のミトコンドリア粒子が多数分布していた（図 14e, f）。

ミトコンドリア超微細構造と面積

Normal, WB-Mild, WB-Severe の筋線維細胞質に含まれるミトコンドリアの典型的な超微細形態像を図 15 に示した。Normal の筋組織では、ミトコンドリアに輪郭明瞭なクリステが認められた (図 15a, b) 。WB-Mild および WB-Severe の筋組織では、ミトコンドリアは Normal の筋組織にみられるものよりも大きく、クリステは不明瞭な凝集した顆粒状物として認められた (図 15c, d, e, f) 。ミトコンドリア断面の平均面積は、Normal, WB-Mild および WB-Severe と判定した分類群でそれぞれ、 0.0988 ± 0.0550 , 0.1557 ± 0.1436 , および $0.2493 \pm 0.1830 \mu\text{m}^2$ であった。3つの分類群のミトコンドリア断面の平均面積間では、相互に有意差を認めた (図 16) 。

抗酸化酵素遺伝子の発現量

重症度群ごとにおいて各種抗酸化酵素遺伝子の発現量を比較した (図 17) 。SOD1 の遺伝子発現量は、Normal 筋組織で最も高く、WB-Mild 筋組織および WB-Severe 筋組織と比較して有意な差を認めた ($p < 0.05$) 。SOD2 の遺伝子発現量は、Normal 筋組織で最も高く、WB-Mild 筋線維において発現量との有意差は認められなかったものの、WB-Severe 筋線維において発現量との間には有意差を認めた ($p < 0.05$) 。Catalase の遺伝子発現量は、Normal 筋組織、WB-Mild 筋組織、WB-Severe 筋組織ともに著明な差を認めなかった。Glutathione peroxidase (以下、GPX) および Peroxiredoxin (以下、PRDX) の遺伝子発現量は、Normal 筋組織で高い遺伝子発現量を示したが、WB-Mild 筋組織および WB-Severe 筋組織において発現量との間に有意な差を認めなかった。

表 1. 抗酸化酵素関連遺伝子のプライマーセット.

Gene	Product size(bp)	Primer Sequence(5'-3') F: Forward, R: Reverse
ACTB	133	F:ACAATGGCTCCGGTATGTG R:CCAACGTAGCTGTCTTTCTGG
SOD1	174	F:ATTACCGGCTTGTCTGATGG R:TCCTCCCTTTGCAGTCACAT
SOD2	130	F:CAGTTGGTGTTC AAGGATCAGG R:ATTCCCAGCAATGGAATGAG
CAT	109	F:CTTTACGGAGGTAGAACAGATGC R:CGTGTCAGGATACGCAAAGA
GPX	122	F:AACCAATTCGGGCACCAG R:CCGTTACCTCGCACTTCTC
PRDX	119	F:GTTGGCCGTTCTGTTGATG R:ACATCAGGCTTGATTGTGTC

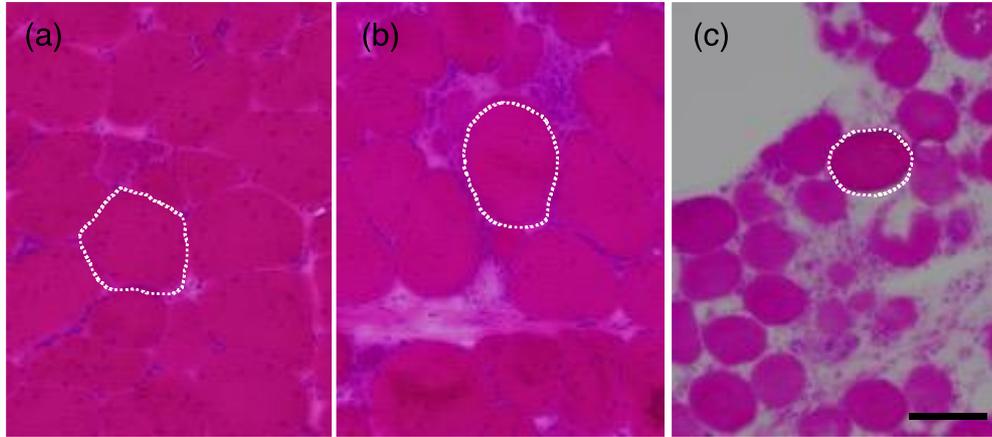


図 11. 重症度ごとの HE 染色標本典型像.

(a) Normal, (b) Mild, (c) Severe. 点線は典型的な筋線維を示し, 円形度は Normal, Mild および Severe でそれぞれ, 0.744, 0.817 および 0.897 である. スケールバーは 100 μm を示す.

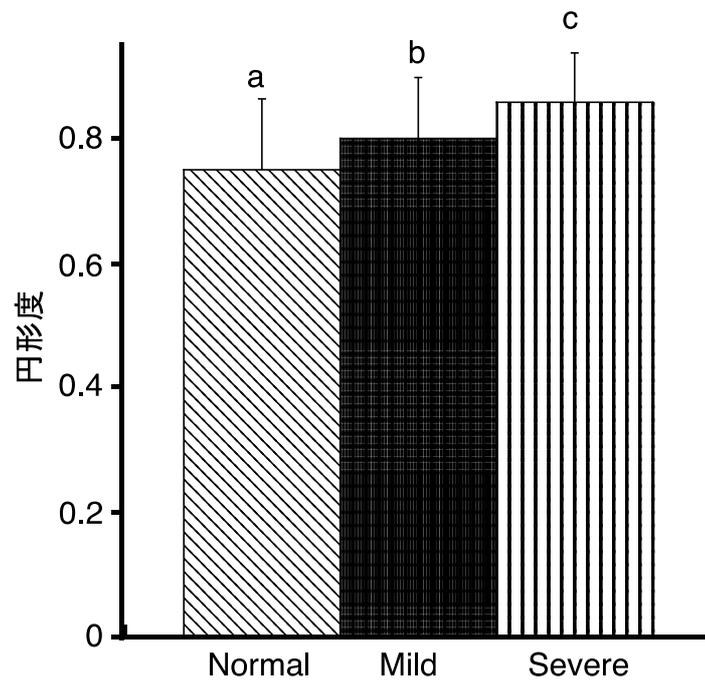


図 12. 各重症度の円形度.

円形度の値は平均値±標準偏差であり，グラフ内のプロットは個体ごとの平均値を示す．abc，異符号間に有意差あり ($p<0.05$) .

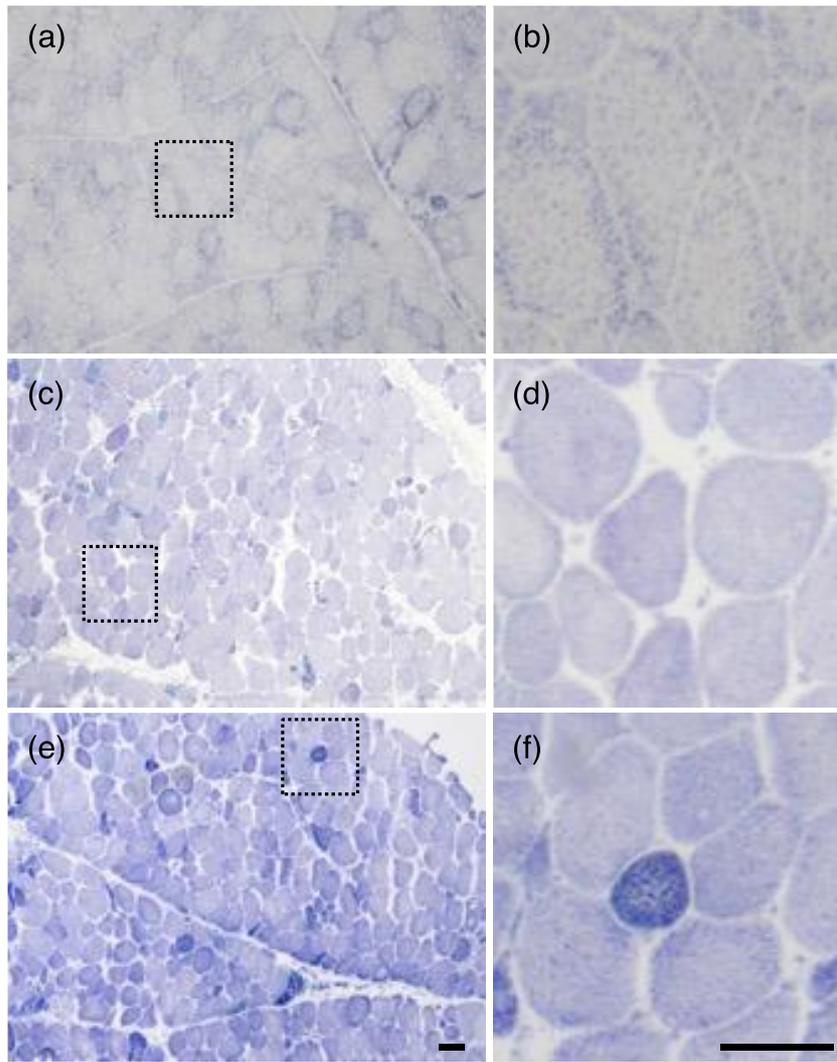


図 13. NADH-TR 染色した筋線維典型像.

(a) Normal の弱拡大像, (c) Mild の弱拡大像, (e) Sever の弱拡大像. (b), (d) および (f) は点線で示した部分の拡大像である. スケールバーは 100 μm を示す.

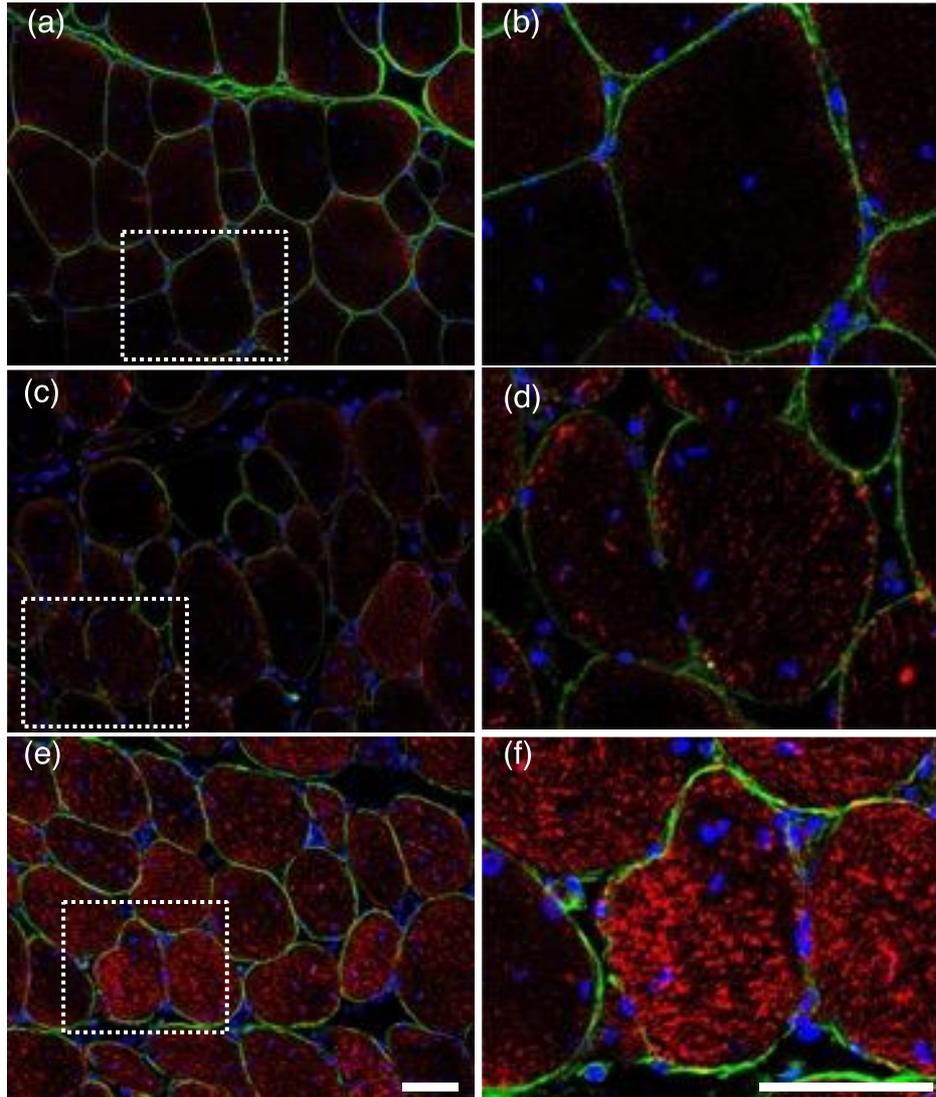


図 14.3 重免疫染色によるミトコンドリアの組織内分布.

(a) Normal の弱拡大像, (c) Mild の弱拡大像, (e) Sever の弱拡大像. (b), (d) および (f) は点線で示した部分の拡大像. スケールバーは 50 μm を示す. ATPB : 赤, ラミニン : 緑, DAPI : 青

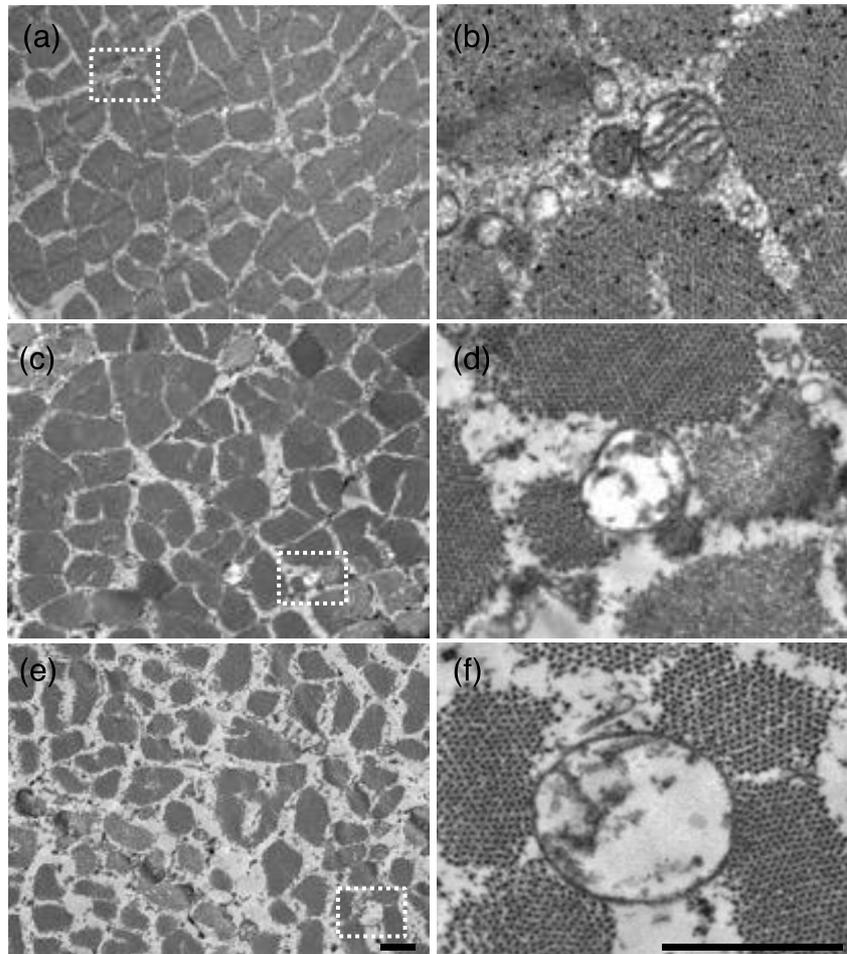


図 15. 透過型電子顕微鏡によるミトコンドリアの超微細構造観察.

(a) Normal の弱拡大像, (c) Mild の弱拡大像, (e) Sever の弱拡大像. (b), (d) および (f) は点線で示した部分の拡大像. スケールバーは 1 μm を示す.

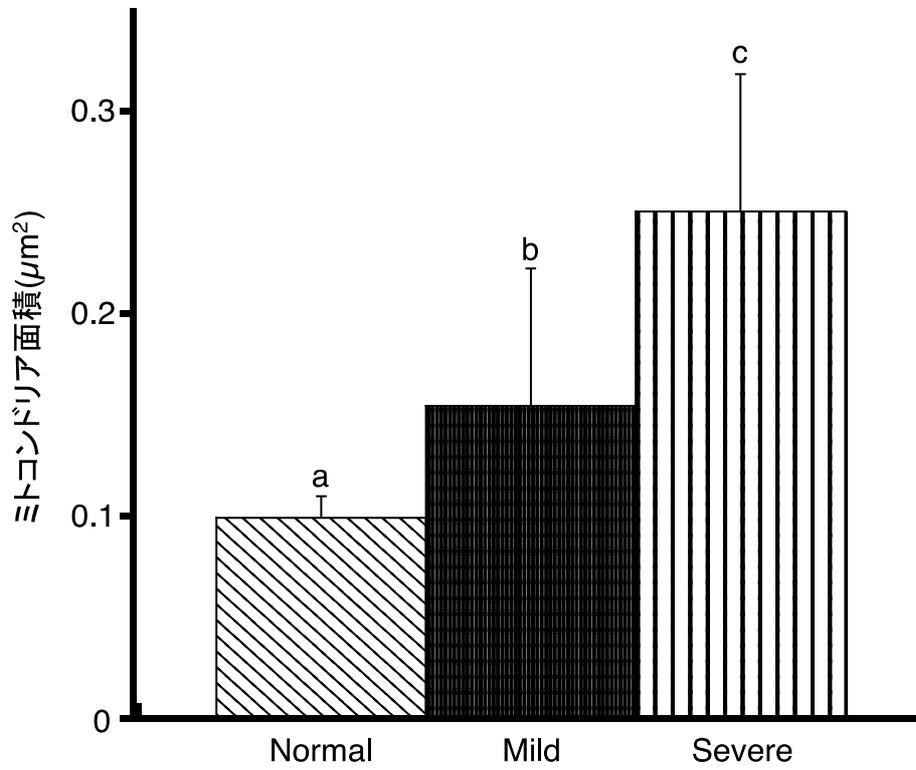


図 16. 各重症度のミトコンドリア面積.

ミトコンドリア面積の値は平均値±標準偏差であり、グラフ内のプロットは個体ごとの平均値を示す。abc に有意差あり (p<0.05)。

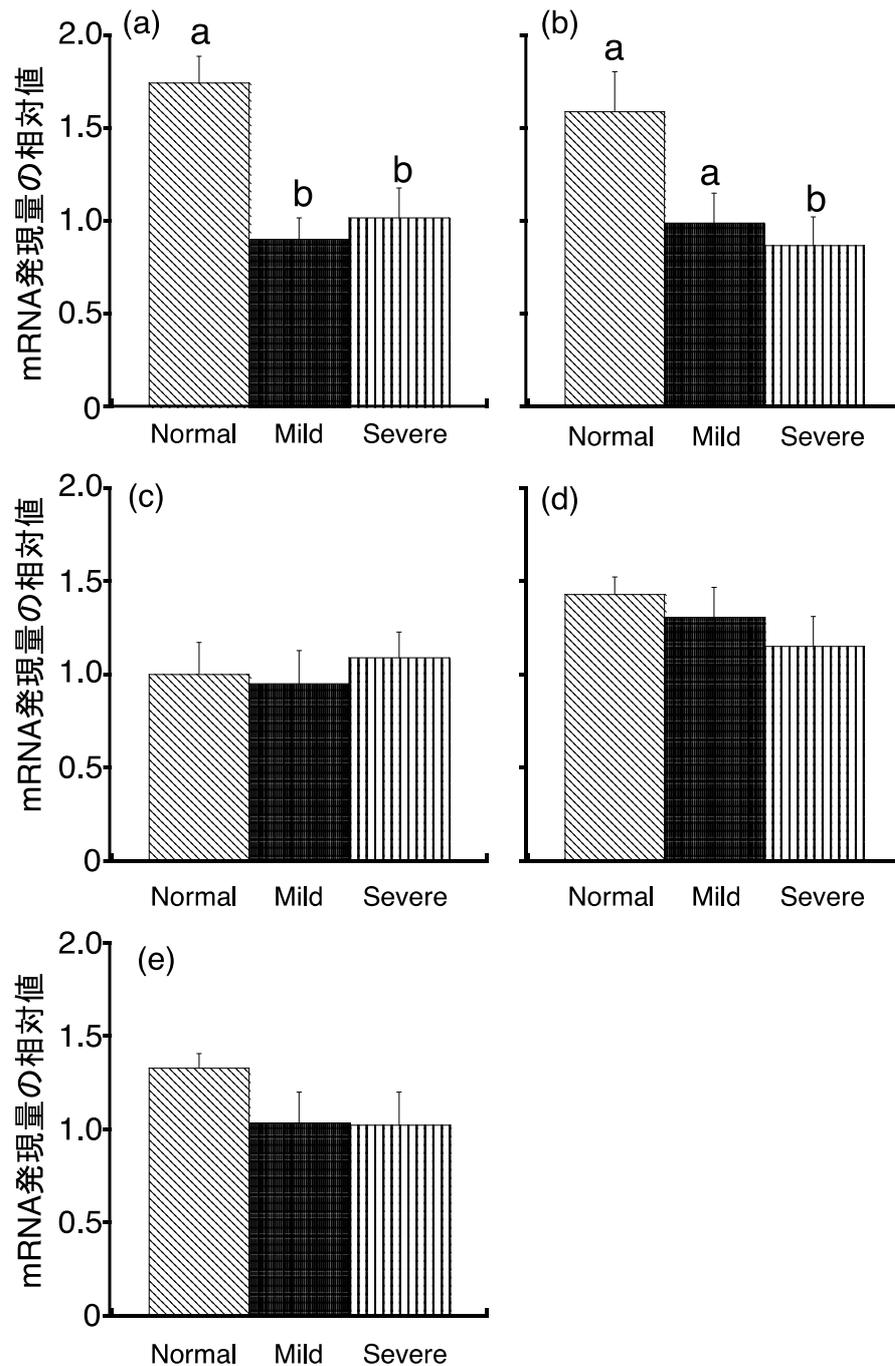


図 17. 重症度ごとの抗酸化酵素遺伝子発現量の比較.

(a) SOD1, b) SOD2, c) Catalase, d) GPX, e) PRDX. mRNA 発現量の相対値は平均値±標準偏差であり, グラフ内のプロット個体ごとの平均値および標準偏差を示す. Abc, 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

考察

ブロイラー胸筋の著しい発達は、筋線維の損傷、炎症反応、代謝障害、酸化ストレスの増加を引き起こす可能性がある【59】。本研究では、筋組織において筋線維横断面の多角消失の程度は WB を発現した胸筋において筋線維横断面にて円形度として評価した。WB を発現した胸筋の筋線維は、その程度により多角性が低減・消失し、しばしば類円形を呈していた。また、NADH-TR 染色では、WB の発現程度が重症であるものほど筋線維が濃く染色された。NADH-TR 染色は、NADH の存在下でニトロブルー・テトラゾリウムが還元されて青色を生成する酵素組織化学染色技術である。NADH はミトコンドリア呼吸鎖複合体 I に存在するため、そのレベルはミトコンドリアの数に依存する。この筋線維それぞれの種類による特性により、NADH-TR 染色では、I 型筋線維が濃く染まり、IIa 型筋線維が中間濃度、IIb 型筋線維が薄く染まる【98】。したがって、NADH-TR 染色強度を指標として、個々の筋線維の種類を識別することができる【3】。本研究では、NADH-TR で濃染された筋線維の数が WB の重症度に応じて増加し、WB 発現鶏から得られた胸筋においてミトコンドリアの形態と分布が、正常な鶏から得られたものとは異なることを明らかにした。筋ジストロフィー発症鶏の大胸筋では、ATPB 抗体を用いた免疫染色によって大きな粒子が認められ、これはミトコンドリア容積が大きいことを反映したものであることを示している【29】。本研究でのミトコンドリアの形態観察においても WB が重度に発現した胸筋のミトコンドリアは、凝集した顆粒状物にみえるクリステを含み、膨化し、断面積が大きい傾向であった。これらの所見は、Pan ら【57】の報告と一致している。また、WB 発現胸筋では、ミトコンドリアの抗酸化酵素遺伝子（カタラーゼを除く）の発現が低い傾向にあり、とくに SOD1 および SOD2 については正常組織に比べて有意に低かった。対照的に、酵素 NADPH オキシダーゼと一酸化窒素シンターゼを生成する活性酸素種の生成に関与する遺伝子には、グループ間の大きな差はなかった。

細胞内の活性酸素種酵素は、正常細胞において SOD ファミリータンパク質により閾値レベル以下に維持されている【40】。WB 発現胸筋では、ミトコンドリアの損傷によって活性酸素種が過剰に産生されることで、ミトコンドリア構造の連鎖的破壊を誘発し、さらに過剰産生された活性酸素種がミトコンドリアから漏洩することで組織の膜構造を破壊していくことが示唆されている【57】。たとえば、Ca²⁺の貯蔵庫である筋小胞体の膜構造が脆弱になり、大量の遊離 Ca²⁺が細胞内に放出される可能性がある【71】。さらに、細胞内への Ca²⁺の蓄積により、SOD1 と SOD2 が膜間腔、細胞質、およびマトリックス内のスーパーオキシドを加水分解する【29, 74】。筋組織を蛍光顕微鏡で観察すると、WB 発現胸筋の筋線維内や筋線維内に明るい自家蛍光粒子が認められる。これらの自家蛍光粒

子は第1章でリポフスチンとして同定しており、活性酸素種に関連して筋ジストロフィーのマウスモデルの骨格筋でも観察される。リポフスチンの蓄積は、抗酸化物質を含む餌を動物に与えることで減らすことができる【51】。

本研究で確認された事実は、WB 発現胸筋の筋組織では活性酸素種が生成されるが除去されないことを示唆している。すなわち、ミトコンドリアのクリステ構造の破壊は、ミトコンドリアにおいて SOD1 活性が低く、また、SOD2 がミトコンドリアマトリックスから活性酸素種を効率的に除去できないことによって、活性酸素種がミトコンドリアに蓄積した結果生じると考えられる。

WB 発現胸筋への血液供給の相対的な減少は、WB 発現の初期段階から発生する【65】。本研究で飼育された生後 50 日齢のプロイラーの胸筋では、低酸素誘導因子の発現が減弱し、血管内皮細胞誘導因子のレベルが低下することで、胸筋において酸素欠乏状態が持続的に亢進したものと推測される。

結論として、WB を重度に発現した胸筋においては、SOD1 および SOD2 抗酸化酵素をコードする遺伝子の mRNA レベルの低下が明らかになった。これにより、WB 発現胸筋では、細胞内で従来一定に保たれている活性酸素種のレベルが増加し、細胞内においてミトコンドリアなどの膜小器官の構造が破壊される。さらに、筋細胞の Ca^{2+} の貯蔵庫である筋小胞体の膜が脆弱になるとともに、筋小胞体が崩壊することで Ca^{2+} が細胞内に漏れると、細胞内プロテアーゼが活性化され、最終的には筋線維の崩壊につながるという一連のメカニズムの証拠を得ることができた。

また、本研究では、WB で好発する筋線維の円形化および翼の挙上試験を基に WB 重症度分類を行い、NADH-TR 染色および免疫組織化学染色標本の観察、ミトコンドリアの形態および面積の測定は画像解析ソフトを使用して行なった。筋線維の円形化を出力した値は解析に使用する画像の画素数や測定者の技量に多く影響されると考えられる。本研究で使用した画素数は JPEG 形式で 2880×2048pixel の一定した HE 染色標本を用いて ImageJ のフリーハンドツールで筋線維の周囲を囲うことで円形度を出力するが、画素数が無限大でない限りわずかな曲線も多角をもつ線となる可能性がある。さらに測定者が筋線維を囲うときの僅かな曲線のずれも画素数に左右されて円形値に影響を与えることも予想されることから、筋線維の円形度を指標として WB 重症度の規定を実施する場合、二値化し Threshold で筋線維領域を認識させ円形度を出力するなど、今後さらなる検討が必要と考える。

小括

本章では、WB の発現がミトコンドリアの機能不全によって引き起こされるという仮説を立て、WB 状態の進行程度とミトコンドリアの状態変化との関係を明らかにした。WB を発現した胸筋組織の特徴である筋線維形態多角形の鈍化（円形化）および両側翼の挙上性と挙上時の胸部の触感によって重症度を分類した。NADH-TR 染色の結果、Normal の筋組織横断面では、薄く染色された筋線維が大多数を占めた一方、Severe の筋組織では、より濃く染色される筋線維が多かった。ミトコンドリアの形態は Normal で輪郭明瞭なクリステが認められたが、WB-Mild および WB-Severe の筋組織でのミトコンドリアは Normal の筋組織にみられるものよりも大きく、クリステは不明瞭な凝集した顆粒状物として認められた。各種抗酸化酵素遺伝子の発現量を比較したところ、SOD1 および SOD2 で Normal が最も高く、WB-Mild 筋組織および WB-Severe 筋組織と比較して有意な差を認めた。

以上のことから、本章の結論として WB が発現した胸筋では抗酸化酵素である SOD1 および SOD2 をコードする遺伝子の mRNA レベルが低下していること、そのために活性酸素の量が上昇し、それによって細胞の様々な膜の損傷やミトコンドリアなどの膜小器官の構造破壊が引き起こされることが明らかとなった。

序文

我々が普段食している肉は家畜の筋肉であり、筋肉から食肉への変化は筋原線維由来の変化および結合組織由来の変化など、様々な構造的変化や生化学的な変化が生じる。WB 発現胸筋と正常胸筋では筋組織の構造的な違いが多く、WB 発現胸筋は結合組織量が多いことを第1章で明らかとした。このような構造的な違いが死後からの時間経過に伴う生化学的な変化に影響を及ぼしている可能性がある。先行研究では、WB 発現胸筋は死後1日目から3日目にかけてかたさが低下し、3日目以降は変化がないことを報告している【76】。また、WB 発現胸筋は内在性プロテアーゼであるカルパイン活性が亢進しており、中間系フィラメント構成タンパク質であるデスミンおよび巨大なフィラメント状タンパク質であるネブリンが断片化しているとの報告もある【71】。しかしながら、これらの先行研究では、死後からの時間経過による生化学変化や物性特性の評価は同一個体の筋組織で評価されておらず、別々の個体で様々な変化を検討している。特に、WB は同一の群で飼養管理していてもその重症度には大きな差があり、WB 発現胸筋の死後からの時間経過に伴う生化学的変化とかたさとの関係は十分に理解されていないと考えられる。そこで本章では、同一個体の筋組織を用いて生化学的分析および力学物性値の測定を行い、WB の死後時間の経過に伴う生化学的および組織構造的変化と力学物性変化の関係の詳細について検討した。

また、加工品のテクスチャーについては、加熱ゲルで表される保水性や結着性はミオシンの加熱変性に伴う変化の状態に強く影響を受けることから、肉製品の優劣はすなわち、ミオシンの変性程度およびゲル形成能に依存していると考えられている【7, 31】。ミオシンのゲル化にはその分子構造の変化が関与していることも明らかにされており、ミオシン分子間のジスルフィド結合および加熱時の部分的に不可逆的なヘリックス-コイル転移による構造変化が関連することが明らかとなっている【91】。したがって、ミオシン分子のわずかな構造変化の差異が、WB 発現胸筋の加熱ゲル化特性に影響を与えている可能性がミオシンの加熱変性がWB 発現胸筋の加工特性に及ぼす影響については明らかにされていない。そこで、本章では、WB 発現胸筋および正常胸筋からミオシンを抽出し、その物理化学的性質を調べるとともに、ミオシンの加熱ゲルの構造とレオロジー特性との差異を調査した。

材料と方法

本研究で使用した胸筋は、46日齢のROSS308系ブロイラー鶏から採材した。ブロイラー鶏は、食鳥処理場に搬入され、電気スタナーで気絶させた後、オートキラーにかけて放血してと殺された。と体は、湯漬け、脱羽後、頭部、後趾および内臓が取り除き、冷却後、解体ラインで脱骨された。胸筋は死後約2時間以内に解体ラインで採取した。WB発現の有無はSihvoら【66】の報告にある外観と物性に基づいて視覚と触感により判別し、WB発現胸筋およびWBを発現していない胸筋（正常胸筋）をそれぞれ10枚ずつ採取して本研究に供した。採取した胸筋はすべて密封袋に入れ、氷水を入れた発泡スチロールの箱内で氷冷しながら死後約12時間以内に実験室に搬入し、ミオシン調製用の正常胸筋およびWB発現胸筋それぞれ3枚を-80°Cで凍結して使用するまで保存し、それ以外の実験に供した胸筋は使用するまで氷上で保存した。凍結組織切片作製用、各種酵素活性測定用の各試料は、研究室に搬入後すぐに作製した酵素活性用試料は2mm角に細断し、液体窒素で急速凍結して使用するまで-80°Cで保存した。凍結組織切片作製用、酵素活性（カテプシン、カルパイン）測定用の各試料を採取した残りの胸筋は、死後約120時間まで4°Cの冷蔵庫内で保存し、24時間、72時間および120時間の時点でそれぞれ同じ胸筋の同一領域近接部位から採材し、剪断力価の測定、筋原線維の小片化率の算出およびSodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis（以下、SDS-PAGE）によるタンパク質組成の分析のための筋原線維調整、細胞消化法を用いた筋肉内結合組織構造の観察に供した。

肉小片の切り出し

第1章の方法に準じて切り出し箇所は胸筋頭腹側領域（切り出し部位1）とした。と殺当日、24時間後、72時間目および120時間目の採材は、同領域内の隣接部位から行った。

凍結組織切片標本の作製

第1章の方法に準じて実施した。

アザン染色標本の作製

第1章の方法に準じて実施した。

剪断力価の測定

第1章の方法に準じて死後約24時間切り出した肉小片を用いて実施した。

筋原線維の調製

肉小片を細かく細断し、細断肉重量の20倍量の0.1 M NaClを含む10 mM リン酸カリウム溶液 (pH7.0) を加え、ブレンダーで30秒間高速でホモジナイズし、遠心分離 (ローター: RPR9-2, 3000 rpm, 4°C) した。同様の操作を2回繰り返す。得られた沈殿に対して同液を加えてフロンホモジナイザーで懸濁した後、ガーゼでろ過し、ろ液を筋原線維懸濁原液とした。筋原線維のタンパク質濃度はビウレット法により求めた。すなわち、タンパク質溶液1 ml にビウレット溶液4 ml を加え攪拌し、室温で30分間静置後、光路長10 mm セルを用い550 nmでの吸光度を測定した。550 nmでの吸光度を(1)式に代入して筋原線維のタンパク質濃度を算出した。

$$\text{タンパク質濃度 (mg/ml)} = \{ [A550 - (\text{ブランク} + \text{濁度})] \div \text{吸光係数} \} \times \text{希釈倍率} \quad (1)$$

なお、吸光係数は懸濁回数が少なく不純物も含んでいることからBSAの吸光係数である0.058を用いた。

筋原線維の小片化率の算出

筋原線維の小片化率はAhnら【2】の方法に従って計数・算出した。筋原線維濃度が0.5 mg/mlになるように0.1 M NaClを含む10 mM リン酸カリウム溶液 (pH7.0) で筋原線維懸濁原液を希釈した。筋原線維希釈懸濁液をスライドガラスに1滴滴下し、カバーガラスをかけ、プロワイプ (大王製紙, 東京) を上から軽く押しつけたものを鏡検試料とした。検鏡は位相差顕微鏡 (BH-2, オリパス, 東京) を用いて行い、筋原線維の総数とサルコメアが4個以下の筋原線維数を数え、(2)式から算出した。

$$\text{小片化率 (\%)} = (\text{サルコメアが4個以下の筋原線維数} / \text{総筋原線維}) \times 100 \quad (2)$$

SDS-PAGEによる筋原線維のタンパク組成の確認

2 mg/mlに濃度調整した筋原線維を等量の10 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1% SDS, 1% 2-mercaptoethanol,

20% グリセロールおよび0.005% bromophenol blue を含む SDS- PAGE サンプルバッファーで抽出物を可溶化して SDS-PAGE 試料とした。アクリルアミドゲルは 5-20% 勾配の既製品（カタログナンバー：E-T520L, アトー, 東京）を使用し、泳動溶液は 49.5 mM Tris, 383.6 mM グリシンおよび 0.1% SDS からなる溶液とした。80 V の一定電圧で 2.5 時間通電し、泳動後のゲルは 50% メタノール, 10% 酢酸中および 0.2% の Coomassie Brilliant Blue R-250 からなる染色液で 1 時間室温下にて脱色でした。脱色は 50% メタノールおよび 10% 酢酸中で 1 時間振盪し, 10% メタノールおよび 10% 酢酸中でバックグラウンドが透明になるまで振盪した。

カルパイン活性の測定

カルパイン活性は樋口ら【25】方法に則って測定し、試料はと殺後 12 時間経過した胸筋とした。2 本の試験管にそれぞれアゾカゼイン（カタログナンバー：A2765, sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany）を 60 mg 秤量し、一方の試験管には 0.2 M KCl, 20 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM CaCl₂, 0.1 M Tris (pH7.5) からなる基質溶液 1 を 5 ml 加え、もう一方は 0.2 M KCl, 20 mM 2-mercaptoethanol, 10 mM Ethylenediaminetetraacetic acid（以下, EDTA）, 0.1 M Tris-HCl (pH7.5) からなる基質溶液 2 を 5 ml 加えて溶解させた。調製した各溶液を別の試験管に 350 μ l ずつ分注し, 25°C に設定した恒温槽で加温した。粗酵素溶液として各胸筋試料を 1 g 秤量し, 1 mM EDTA, 1 mM Na₃N, 0.1 M Tris-HCl (pH8.0) を含む溶液 4 ml 中でポリトロン（PT 1200E, KINEMATICA, Lucerne, Switzerland）を用いて均一化し, 遠心分離（ローター：RPR20-2, 13000 rpm, 30 min, 4°C）したのち上清部分を使用した。粗酵素液に各基質溶液を 350 μ l を加え, 25°C で 2 時間処理した。その後, 20% のトリクロロ酢酸溶液を 0.7 ml 加えて反応を停止させた。この反応液を遠心分離（ローター：CT-T4, 4000 rpm, 10 min, 室温）した後, 得られた上清部分を 366 nm の吸光度を分光光度計（U-2000, 日立, 東京）にて測定した。カルパインはカルシウム依存的にアゾカゼインを加水分解してアゾ色素を生成するため, その活性は生成されるアゾ色素量から評価した。すなわち, カルシウム依存性の吸光度の差（基質溶液 1-基質溶液 2）が 0.1 のときに 1 unit とし, 結果 unit/g protein /2h で示した。

カテプシン活性の測定

カテプシン活性は Barrett ら【7】の方法を用いて行なった。カテプシン活性はと殺後 12 時間経過した胸筋で測定した。1 g の胸筋試料を筋重量の 30 倍量の 0.25 M スクロース, 50 mM KCl, 1 mM EDTA および 10 mM K phosphate (pH7.4) からなる溶液中で均一化し, さらに 5 倍量の上記と同様

の組成溶液を加えた。遠心分離（ローター：T15A39, 1000 rpm, 10 min, 4°C）した後，再度遠心分離（ローター：T15A39, 12000 rpm, 20 min, 4°C）して上清部分を粗酵素溶液とした。0.5 ml の粗酵素溶液に 8 mM Dithiothreitol, 4 mM EDTA および 0.4 M K phosphate (pH5.5) からなる反応溶液を 0.25 μ l 加え，30°C で 5 分間加温した。その後，20 μ M の合成基質である aminomethylcoumarin を 0.25 ml 添加して 30°C で 10 分間加温した。その後，0.1 M クロロ酢酸ナトリウムおよび 0.1 M 酢酸ナトリウム (pH 4.3) からなる停止液を 1 ml 加えて反応を停止させた。反応液の蛍光強度を蛍光分光光度計 (F-2000, 日立, 東京) で励起波長 380 nm, 蛍光波長 460 nm で測定した。検量線は 7-Amino-4-methylcoumarin で作成した。カテプシン B+L 活性は 1 分間に 1 μ mol の 7-Amino-4-methylcoumarin 生成を 1 unit とし，unit / mg protein として示した。

細胞消化法を用いた筋肉内結合組織構造の観察

細胞消化法は Liu ら【48】の方法を用いて行った。死後 24 時間目および 120 時間目の胸筋を線維方向にそって 2×2×5 cm 切り出し，2.5% グルタルアルデヒドを含む 0.1 M Na phosphate (pH 7.2) 中で室温下において 3 時間振盪させながら固定して試料とした。固定した試料を 1×1×3 cm に整形した後，さらに，同条件で 2 日間振盪し，再固定した。2 次蒸留水で 10 分間の洗浄を 2 回行った後に 2N NaOH に浸漬し，光にかざして透けて見えるまで静置した。その後，2N NaOH を 4/5 程度捨て 2 次蒸留水を注ぎ，試料が白くなるまで毎日 2 次蒸留水を交換して静置した。最終濃度が 2% になるようにタンニン酸を加え，2 時間静置し，2 次蒸留水を加え 10 分間の静置洗浄を 3 回行った。最終濃度が 2% になるように OsO₄ 溶液を加え 1 時間静置し，2 次蒸留水での 10 分間の静置洗浄を 3 回行った。50, 70, 80, 90, 95 および 100% エタノールで各 30 分間脱水処理を行なった後に，100% エタノールで脱水処理を 3 回繰り返して，100% エタノールを満たしたゼラチンカプセル (407, 日新 EM, 東京) 内に試料を入れ，液体窒素で凍結後，線維方向に対して垂直に切断を行った。切断後の試料を 100% エタノールと t-ブチルアルコールの等量混合液で 20 分間振盪し，t-ブチルアルコールで 10 分間の振盪を 2 回繰り返した。試料が浸る程度まで t-ブチルアルコールを入れ，-40°C で凍結させた後に凍結真空乾燥機 (ES-2030, 日立, 東京) を用いて凍結乾燥させ，凍結乾燥後の試料をカーボンテープで固定し，イオンスパッター (E-102, 日立, 東京) にセットして白金パラジウム蒸着を 4 分間行なった。試料の検鏡は走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope, 以下 SEM, S-2406 型, 日立, 東京) を使用し，加速電圧 10 kV で行なった。

ミオシンの調製

-80°C で凍結させた正常胸筋および WB 発現胸筋を流水解凍した後、ひき肉にした。ひき肉重量に対して 0.1 M KCl, 20 mM K phosphate (pH7.0) を加え、ブレンダーで均一化した後、遠心分離した (ローター: RPR9-2, 5000 rpm, 10 min, 4°C) 後の上清部分を除去した。この操作は 3 回繰り返した。0.3 M KCl, 10 mM ピロリン酸, 1 mM MgCl₂, 0.15 mM (pH7.0) の混合液を沈殿の重量に対して 3 倍量となるように加え、ブレンダーで均一化した後、遠心分離した (ローター: RPR20-2, 18000 rpm, 30 min, 4°C) 。上清部分の液量を測定した後、上清部分の 5 倍量の冷水を加え、攪拌して再度遠心分離した (ローター: RPR12-2, 8000 rpm, 10 min, 4°C) 。上清部分を除去し、沈殿に 100 ml の 0.6 M KCl, 50 mM MgATP (pH7.5) の組成溶液を加えて攪拌して溶解させたのちに遠心分離した (ローター: P50AT-2, 42000 rpm, 60min, 4°C) 。上清部分の液量を測定後、この液量に対して 14 倍量の 1 mM EDTA を加えて攪拌し、遠心分離 (ローター: RPR12-2, 8000 rpm, 10 min, 4°C) して沈殿部を回収した。回収した沈殿部に 200 ml の 5 mM EDTA , 0.5 M K phosphate (pH7.0) の組成溶液を加えて均一化し、33%となるように 100%飽和硫酸アンモニウムを攪拌しながら添加して遠心分離し (ローター: RPR9-2, 8000 rpm, 10 min, 4°C) , 上清部分の液量を測定した後、100%飽和硫酸を硫酸アンモニウム濃度が 65%となるまで添加し攪拌後に、遠心分離 (ローター: RPR9-2, 8000 rpm, 10 min, 4°C) して、得られた沈澱部をミオシン画分として使用するまで 4°C 下で保存した。使用する際は 0.5 M NaCl に対して透析することで硫酸アンモニウムを除去した。

ミオシンのタンパク質濃度測定

ミオシンのタンパク質濃度は、光路長 2 mm の石英セルを用いて紫外部吸収法により 280 nm および 320 nm の吸光度を測定し、(3) 式によって算出した。なお、ミオシンの吸光係数は 0.543 とした。

$$\text{タンパク質濃度 (mg/ml)} = [(A_{280} - (A_{320} \times 1.5)) \div \text{吸光係数}] \times 5 \quad (3)$$

SDS-PAGE によるミオシン溶液のタンパク質組成の分析

ミオシン溶液は、濃度を 1.5 mg/ml になるように 2 次蒸留水で希釈したものを 200 μ l 用意し、30 μ l の 10% SDS, 4 μ l の 2-mercaptoethanol, 3 μ l の 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) , 60 μ l の BPB-Glycerol を混合し 100 °C で 5 分間加熱し放冷した。

分離アクリルアミドゲルの作製： 5.0 ml の 30% acrylamide-bis, 3.75 ml の 1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) , 0.15 ml の 10%SDS, 15 μ l の N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (以下, TEMED) を混合した溶液に 2 次蒸留水を加えて 14 ml までメスアップした (アクリルアミドゲル溶液) . これに 15 mg/ml の過硫酸アンモニウムを 1 ml 加えて転倒混和し, シリコンチューブで密着させた 2 枚のガラス板間に流し込んだ. 重合前のアクリルアミドゲル溶液の上層に 3-メチル-1-ブタノールを滴下して重層し, その表面を平らにした. 20 分間静置し, ゲルの重合を確認した後, 未重合のアクリルアミドを含む溶液を 2 次蒸留水で洗いだした.

濃縮アクリルアミドゲルの作製： 0.5 ml の 30% acrylamide-bis (30:0.8) , 1.0 ml の 0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) , 40 μ l の 10% SDS, 4 μ l の TEMED, 2.2 ml の 2 次蒸留水を加えて攪拌後, 15 mg/ml の過硫酸アンモニウムを 0.27 ml 加え. これらを転倒混和したものを分離アクリルアミドゲル上部に流し込み, コームをさして分離アクリルアミドゲルに試料スロットを形成した. 20 分後間静置し, ゲルの重合を確認した後, シリコンチューブを取り外し, ガラス板間で重合したアクリルアミドゲルをガラス板ごと電気泳動装置 (カタログナンバー: なし, マリソル) にセットした. 電気泳動装置の上部, 下部に Tris-glycine 溶液 (49.5 mM Tris, 383.6 mM glycine, 0.1% SDS) を流し込み, コームをはずし, ゲルのスロットに試料を入れた. 泳動の電圧値は濃縮ゲル中では 30 V, 分離ゲル中では 80 V とし, BPB マーカーがゲル底部に達するまで通電した. 電気泳動後のアクリルアミドゲルは筋原線維の SDS-PAGE のアクリルアミドゲルと同様に染色および脱色した.

ミオシンの加熱変性試料を用いた理化学分析

ミオシンの処理

ミオシン溶液はタンパク質濃度 0.5 mg/ml を含む 0.5 M NaCl, 10 mM Bis-Tris (pH6.0) となるように調整し, 5 本の試験管に分注した. 5 本の試験管に分注した試料は, 40, 50, 60, 70, 80°C でそれぞれ 10 分間加熱処理した.

濁度の測定

光路長 10 mm の石英セルを用いて 350 nm の波長で吸光度を測定し, それを濁度とした.

表面疎水性の測定

表面疎水性の測定は, Iwasaki ら【33】の方法を用いて行った. 各温度で加熱して作製したミオシン加熱試料それぞれ 5.0 ml に対して 3.2 mM の 8-Anilino-naphthalene-1-sulfonate を 50 μ l を加えて混合

し、室温で10分間静置した後、蛍光分光光度計 (F-2700, HITACHI, Tokyo, Japan) で励起波長 380 nm, 蛍光波長 475 nm で蛍光強度を測定し、この値を表面疎水性とした。

溶解度の測定

各温度で加熱して作製したミオシン加熱試料は、2 mm セルを用いて 280 nm および 320 nm の吸光度による紫外吸収法で測定した。タンパク質濃度は、測定値を用いて (4) 式によって算出した。なお、ミオシンの吸光係数は 0.543 とした。

$$\text{タンパク質濃度 (mg/ml)} = [A_{280} - (A_{320} \times 1.5) \div \text{吸光係数}] \times 5 \quad (4)$$

SH 基の測定

SH 基の測定は Hozumi ら【27】の方法を用いて行った。各温度で加熱した試料を 2.0 ml 分取し、0.5 mM の 5,5'-Dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (以下, DTNP) 溶液を 0.1 ml 加えて混合し、室温で 20 分間静置した。10% 下塩素酸溶液を 2.5 ml 加えて攪拌してタンパク質を不溶化させ、遠心分離 (ローター: 05P-21, 3000 rpm, 10 min, 室温) した。その後、上清部分を 386 nm で吸光度を測定し、(5) 式によって求めた。

$$\text{SH (mole/10}^5\text{g)} = A_{386} \times 14.45 / \text{タンパク質濃度 (mg/ml)} \quad (5)$$

14.45 : DTNP のモル吸光係数は 386 nm で 17400 であり、0.5 mM の DTNP 溶液、2.0 ml のタンパク質溶液を使用した際の mole/10⁵g と計算する際の換算値。

ミオシン加熱ゲルの作製

ミオシン溶液は、タンパク質濃度を 5 mg/ml になるように 0.5 M NaCl を 20 mM Bis-Tris (pH6.0) に溶解して調製した。濃度調整したミオシン溶液を、空気が入らないようにプラスチックチューブに充填した。これを真空パックにした後に 40°C で 15 分間加熱し、直ちに冷却してミオシン加熱ゲルとした。

モデルソーセージの作製

-80°C で凍結させた胸筋を流水で解凍した後、ひき肉にした。肉重量の 1% (w/w) NaCl, 0.1% (w/w) トリポリリン酸ナトリウム, 10% (w/v) の 2 次蒸留水を加え、フードプロセッサーで混合

した。これを空気が入らないように金属製のケースに入れて成形した。真空パックにして 70°C で 30 分間加熱し、直ちに冷却したものをモデルソーセージとした。

ミオシン加熱ゲルならびにモデルソーセージの初期弾性率の測定

ミオシン加熱ゲルおよびモデルソーセージの弾性率はレオメーター (RE-33005, Yamaden, t 東京, 日本) を用い、直径 5 mm の球状プランジャー (モデルソーセージの場合は 7 mm) による押し込み法で測定した。測定は、冷却した各試料を室温下に 1 時間静置した後に行なった。弾性率の測定条件は、ロードセルは 200 g (モデルソーセージの場合は 20 kgf) , アンプ倍率は 10 倍, データ取り込み格納ピッチは 0.05 sec, 測定歪曲は 50%, 測定速度は 0.5 mm/sec とした。初期弾性率は、ミオシン加熱ゲル試料をプラスチックチューブに入れたまま、ステージにプランジャーの中央になるように置き、球状プランジャーを徐々に押し込んでいき、押し込み過程において進入距離に伴う荷重 (gf) の変化を連続計測値グラフとして取得した。このグラフを基に縦軸を荷重 (N) に、横軸に侵入距離に変換した。荷重 (N) への換算は (6) -①式によって行なった。また、横軸の換算は (6) -②式によって行なった。

$$\text{荷重 (N)} = [\text{荷重 (gf)} \times 0.1/1000] \times 9.8 \dots \dots \dots (6) \text{-①}$$

$$\text{進入距離 (m)} = \text{記録点の数} \times 0.005/1000 \dots \dots \dots (6) \text{-②}$$

測定記録点の数は 1000 ポイントとし、ポイント間は 0.005 mm とした。

(6) -①および (6) -②式から進入距離が 0.5 mm (モデルソーセージの場合 0.7 mm) 以下での荷重/貫入曲線を直線で近似し、直線の傾きを求めた。微小変形領域でのずり弾性率は次式によって求めた。このとき、F : 荷重, R : プランジャー半径 (m) , G : 初期弾性率 (Pa) , h : プランジャーの半径 (m) とした。

$$F = 16\sqrt{R/3} \times G \times h \dots \dots \dots (6) \text{-③}$$

(6) -③式とグラフの傾きから初期弾性率以下のように求めることができる。このとき、G : 初期弾性率 (Pa) , SLOPE ; 傾き, R : プランジャー半径 (m) である。

$$G = \text{slope} / (16\sqrt{R/3}) \dots \dots \dots (6) \text{-④}$$

SEMによるゲル内部構造の観察

ミオシン加熱ゲルは2.5%グルタルアルデヒドを含む0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.0) に2時間浸漬した。その後、2—3 mm 角に成形して再び2.5%グルタルアルデヒドを含む0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.0) に一晩浸漬し、試料とした。試料は2次蒸留水で10分間の洗浄を3回行なった後、50, 70, 90, 95 および100%エタノールにそれぞれ30分間浸漬して脱水した。さらに100%エタノールで30分間の脱水処理を3回繰り返した後、100%エタノールで満たしたゼラチンカプセルに入れた。ゼラチンカプセルに入れた試料は、液体窒素下で急速凍結して切断した。切断後の試料はt-ブチルアルコールと100%エタノールの混合液に60分間浸漬した。つぎに100%t-ブチルアルコールで1時間振盪した後、100%t-ブチルアルコールを交換してさらに1時間振盪した。液を完全に除き、再度試料が浸る程度t-ブチルアルコールを入れ、-30°Cで凍結した。この試料は真空凍結乾燥機 (ES-2030, 日立, 東京) で凍結乾燥し、カーボンペーストでアルミステージに接着した。イオン Sputter (E-102, 日立, 東京) でPt-Pb蒸着を4分間行なった後、SEM (S-2460, 日立, 東京) 加速電圧10kVで検鏡した。

統計解析

各測定値はKaleidaGraph software ver. 4.5 (Synergy Software, USA) を用いて解析した。データは、平均値 ± 標準偏差で示し、一元配置分散分析、Tukey's HSD およびLSD検定を用いて分析して有意水準は $p < 0.05$ とした。

結果

剪断力価

死後の経過時間ごとの試料の剪断力価を図 18 に示した。WB 発現胸筋の剪断力価は、死後 24、72 および 120 時間目で、それぞれ 8558 ± 1440 、 7511 ± 989 および 5960 ± 1160 gf であった。正常胸筋の剪断力価は、死後 24、72 および 120 時間目で、それぞれ 1713 ± 291 、 1403 ± 265 および 1363 ± 277 gf であり、WB 発現胸筋の剪断力価は、死後の経過時間に関わらず有意に高い値を示した。経過時間ごとの剪断力価の比較においては、WB 発現胸筋で死後 24 時間と 120 時間の間で有意な差が認められた。

筋原線維の小片化率

筋原線維の Z 線構造の脆弱化を示す小片化率を図 19 に示した。死後 24 時間後の正常胸筋および WB 発現胸筋の筋原線維の小片化率は、それぞれ 63.0 ± 3.0 および $61.7 \pm 10.7\%$ であった。死後 72 時間後では、正常胸筋および WB 発現胸筋の筋原線維の小片化率は、それぞれ $74.3 \pm 3.2\%$ および 72.7 ± 5.5 であった。120 時間を経過すると正常胸筋および WB 発現胸筋の筋原線維の小片化率は、それぞれ 84.7 ± 2.9 および $80.3 \pm 1.5\%$ であった。正常胸筋筋原線維の小変化率は、死後の時間が経過したものほど高く、死後経過時間ごとに有意な差を認めた。また、WB 発現胸筋の筋原線維の小変化率は、死後時間経過ごとの有意な差はなかったが、死後 120 時間では 24 時間および 72 時間と比較して有意に高い小片化率を認めた。いずれの試料も死後時間が経過したものほど小片化率は高くなったが、WB 発現と正常胸筋との間の差は有意ではなかった。

SDS-PAGE による死後経過時間による筋原線維のタンパク質組成変化の確認

SDS-PAGE によるタンパク質組成は図 20 に示した。正常胸筋および WB 発現胸筋から調整した死後 24、72 および 120 時間の筋原線維において、死後の時間が経過したものほど α -アクチニンが分解され、 α -アクチニンバンドのやや下に位置するバンドの染色強度が高くなった。筋原線維を構成するトロポニン T の分解産物の指標である 30 kDa フラグメントは、正常胸筋では、死後 24 時間の時点で弱い染色強度であったが、72 時間、120 時間と時間の経過に伴い染色強度は高かった。また、WB 発現胸筋では、死後 24 時間で染色強度が高く、死後時間の経過したものでも染色強度の差は生じなかった。30 kDa フラグメント断片の染色強度を WB 発現の有無で比較すると、死後 120 時間の正常胸筋と死後 24 時間の WB 発現胸筋はほぼ同程度であった。

内在性プロテアーゼ量

内在性プロテアーゼであるカルパインおよびカテプシン含量を図 21 に示した。カルパイン活性は、WB 発現胸筋で $645.1 \pm 75.4 \text{ units / g protein / 2 h}$ 、正常胸筋で $469.0 \pm 91.4 \text{ units / g protein / 2 h}$ であった。カテプシン活性は、WB 発現胸筋で $3.08 \pm 1.39 \text{ unit / mg protein}$ 、正常胸筋で $2.5 \pm 0.33 \text{ unit / mg protein}$ で有意差はなかった。

筋肉内結合組織の死後変化

死後 24 時間のアザン染色像を図 22a および c に示した。正常胸筋試料では、筋線維が多角であり、筋周膜は薄く、結合組織は線維の間隙にわずかに観察された。一方、WB 発現胸筋試料では、筋線維は丸みを帯びた形態であり、筋周膜が肥厚しているようにみえた。細胞消化法を用いた結合組織の SEM 像を図 22b および d に示した。正常胸筋では筋周膜が薄く認められ、アザン染色像と一致していた。死後 24 時間および 120 時間の結合組織 SEM 像を図 23 に示した。死後 24 時間および 120 時間 WB 発現胸筋および正常胸筋の筋内膜および筋周膜の構造は死後の時間経過に伴う大きな構造変化は認められなかった。

SDS-PAGE を用いたミオシン溶液のタンパク質組成分析

正常胸筋および WB 発現胸筋から抽出したミオシン溶液はどちらもミオシン重鎖である 200 kDa 付近に高い染色強度を示したが (図 24) , 同時に 70-150 kDa にも多数バンドが認められた。一方、アクチンを示す 42 kDa 付近にはバンドは認められなかった。

ミオシン溶液の蛍光スペクトル

ミオシンの立体構造を比較するためのタンパク質の蛍光スペクトルは、正常胸筋から抽出したミオシンおよび WB 発現胸筋から抽出したミオシンは共に 340 nm で極大波長を示した。また、蛍光強度は正常胸筋から抽出したミオシンでは 3341、WB 発現胸筋から抽出したミオシンでは 3535 で、WB 胸筋から抽出したミオシンの蛍光強度がわずかに高値であった (図 25) 。

加熱処理によるミオシン理化学的变化

異なる温度で一定時間加熱したミオシン溶液の濁度：ミオシン頭部間の凝集反応が生じる 50 °C よりも低い温度での加熱では、正常胸筋から抽出したミオシン溶液の濁度 (正常濁度) と WB 発現胸筋から抽出したミオシン溶液の濁度 (WB 濁度) との間には差がなかったが、50 °C での加熱で

は、正常濁度に対して WB 濁度が上方乖離し、70 °C、80 °C では正常濁度と WB 濁度の値はさらに乖離した (図 26) .

異なる温度で一定時間加熱したミオシン溶液の表面疎水性：正常胸筋から抽出したミオシン溶液の表面疎水性 (正常表面疎水性) は 40, 50 および 60 °C では、それぞれ 290.35 ± 82.65 , 367.85 ± 2.275 , 385.06 ± 20.74 AU であったが、70 °C の加熱では 307.35 ± 0.35 AU であった。WB 発現胸筋から抽出したミオシン溶液の表面疎水性 (WB 表面疎水性) は 40, 50, 60, 70 °C で、それぞれ 442.20 ± 113.50 , 505.80 ± 168.30 , 576.85 ± 218.45 , 593.95 ± 216.35 AU であった。いずれの加熱温度においても正常表面疎水性は WB 表面疎水性に対して下方乖離した (図 27) .

°C

異なる温度で一定時間加熱したミオシン溶液の溶解度：40 °C の加熱では正常胸筋から抽出したミオシン溶液の溶解度 (正常溶解度) と WB 発現胸筋から抽出したミオシン溶液の溶解度 (WB 溶解度) との間には差がなかったが、50 °C の加熱では正常溶解度に対して WB 溶解度が上方乖離した。60 °C の加熱では正常溶解度と WB 溶解度との間に差がなく、70 °C および 80 °C では正常溶解度は WB 溶解度よりも僅かに高かった (図 28) .

異なる温度で一定時間加熱したミオシン溶液の SH 基：正常胸筋から抽出したミオシン溶液の SH 基 (正常 SH 基) はいずれの加熱温度においても WB 発現胸筋から抽出したミオシン溶液の SH 基 (WBSH 基) よりも下方乖離し、50 °C 以上の加熱では正常 SH 基および WBSH 基とも高かった。70 °C、80 °C では正常 SH 基および WBSH 基間の乖離が少なかった (図 29) .

加熱ゲルおよびモデルソーセージの初期弾性率

正常胸筋および WB 発現胸筋から作製したミオシン加熱ゲルの初期弾性率は、それぞれ 8.6 ± 0.44 pa および 4.2 ± 0.38 Pa であった。正常胸筋から作製したミオシン加熱ゲルの初期弾性率が WB 発現胸筋から作製したミオシン加熱ゲルと比べて有意に高い値を示した (図 30) . 正常および WB 胸筋から作製したモデルソーセージの初期弾性率は、それぞれ 170 ± 22 kPa および 60 ± 17 kPa であった。ミオシン加熱ゲルと同様に正常胸筋のモデルソーセージが有意に高い初期弾性率を示した。

SEMによる加熱ミオシゲルの構造観察

正常胸筋から作製したミオシン加熱ゲルは繊維が細かく、密な三次元構造を形成していた（図 31a）。一方で、WB から抽出したミオシンの加熱ゲルは繊維間の隙間が広く（図 31b, 矢頭部）、しばしば凝集を認めた（図 31b, 矢印部）。

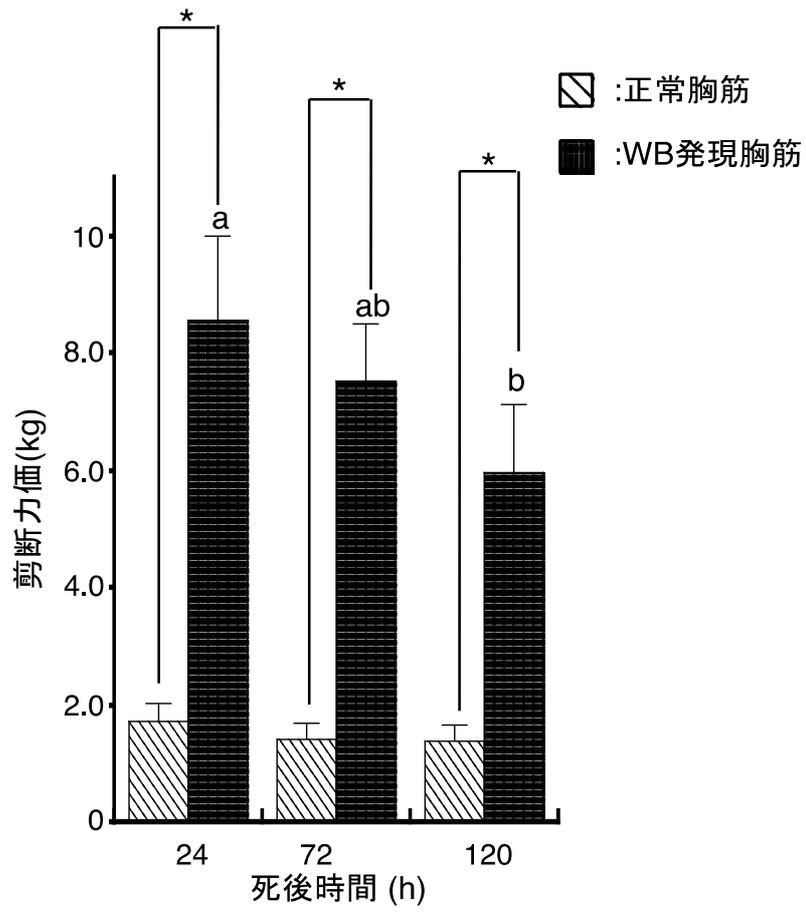


図 18. 死後から各時間経過した胸筋の剪断力価.

剪断力価の値は平均値±標準偏差であり， ab および異符号間に有意差あり ($p < 0.05$) .

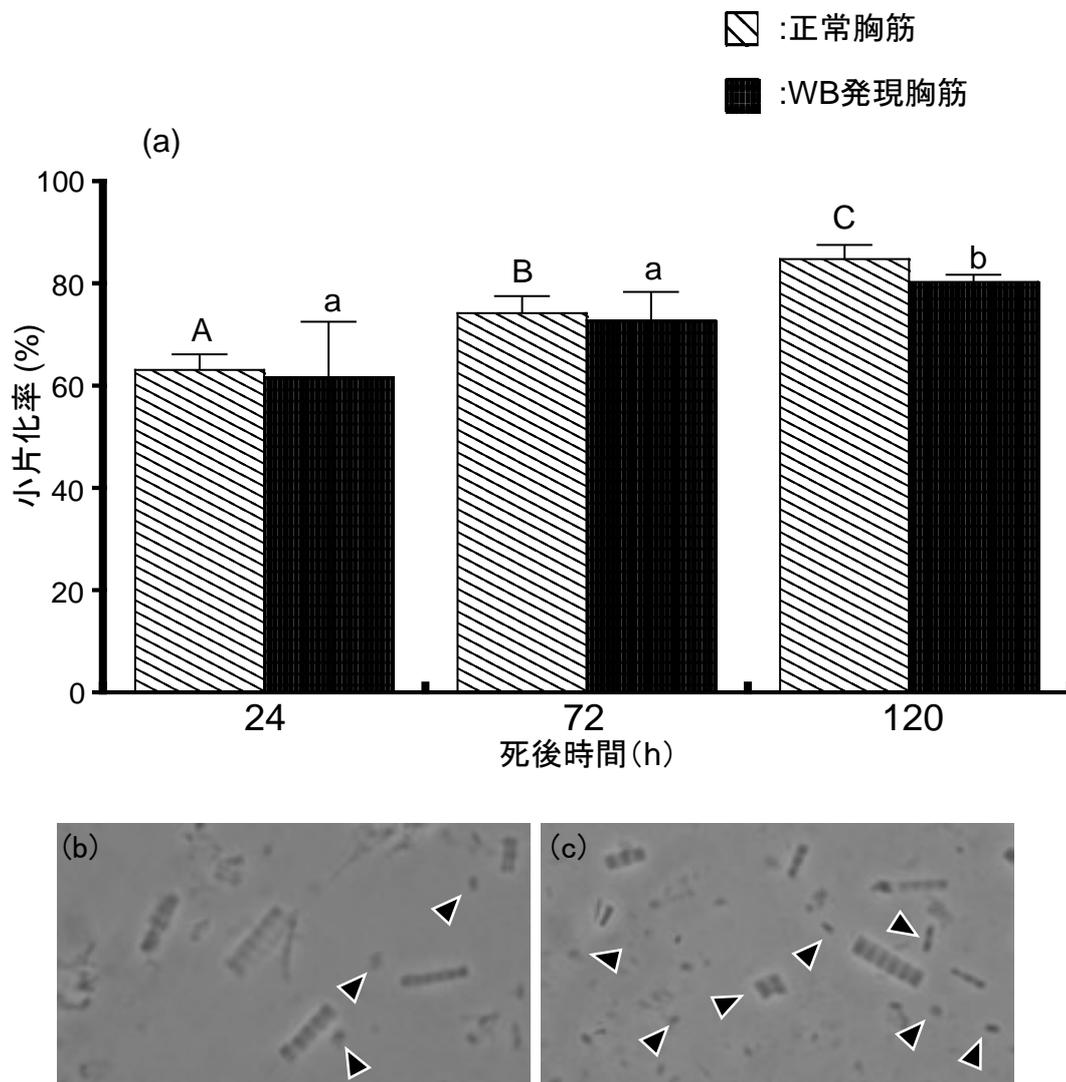


図 19. 死後から各時間経過した筋原線維の小変化率と筋原線維の位相差像.

(a) 筋原線維の小片化率, (b) 正常胸筋の筋原線維の位相差像, (c) WB 発現胸筋の筋原線維の位相差像. 筋原線維の小片化率は平均値±標準偏差であり, ABC および ab 間に有意差あり ($p < 0.05$).

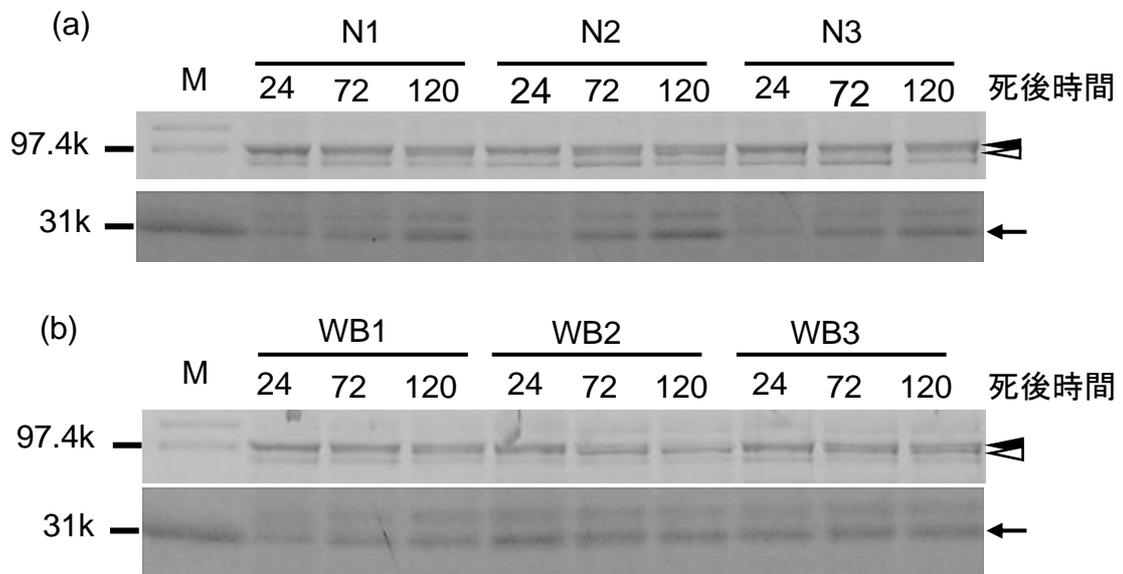


図 20. 死後から各時間経過した胸筋試料の SDS-PAGE 像.

(a) 正常胸筋, (b) WB 発現胸筋. M は分子量マーカー, 矢頭は α アクチニンの断片化物, 矢印はトロポニン T の断片化物を示す.

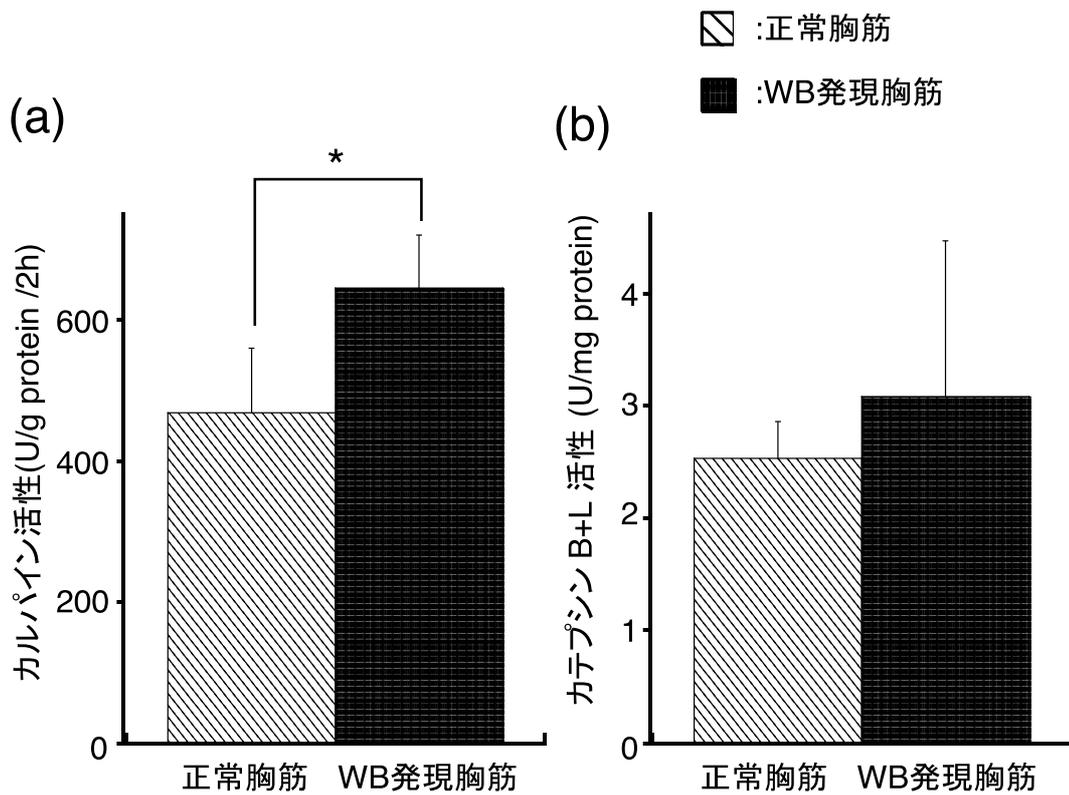


図 21. 死後から 12 時間目の内在性プロテアーゼ活性.

(a) カルパイン, (b) カテプシン B+L, 内在性プロテアーゼ活性の値は平均値±標準偏差であり, 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

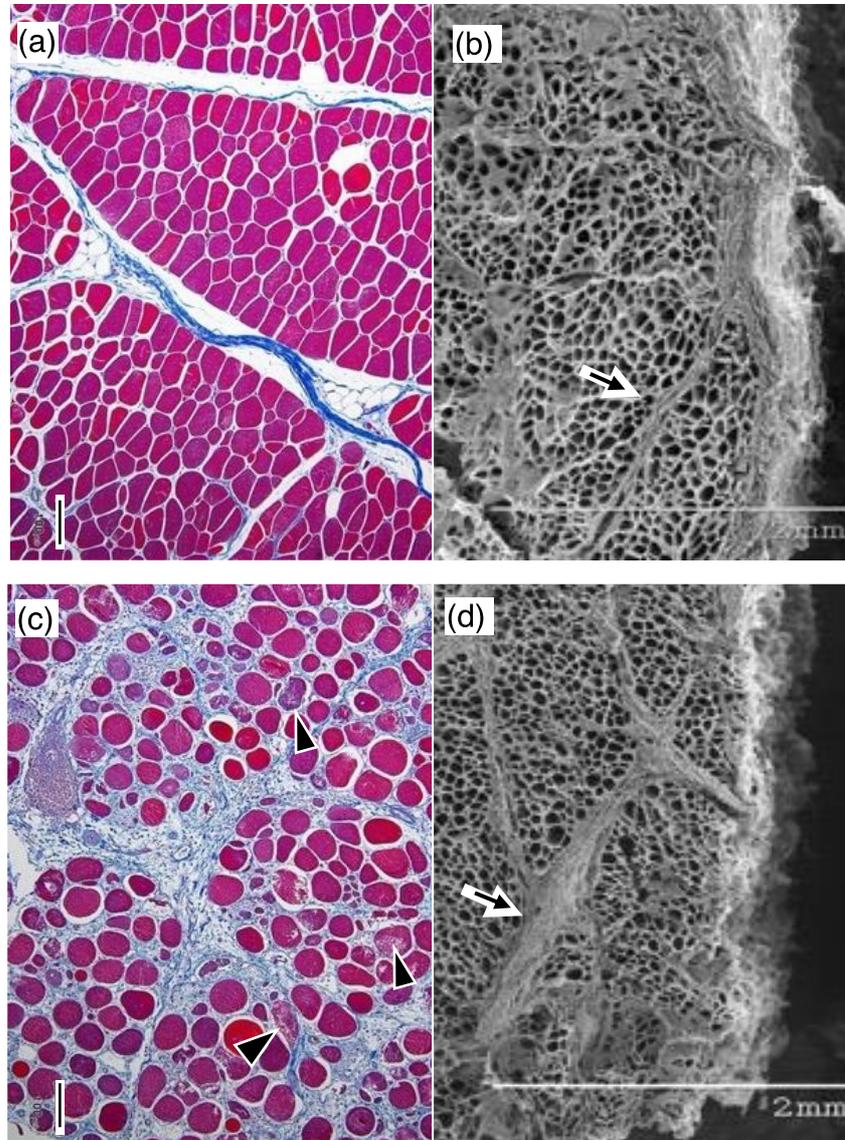


図 22. 死後から 24 時間目のアザン染色および SEM 像.

(a) 正常胸筋のアザン染色像, (b) 正常胸筋のアザン染色像, (c) WB 発現胸筋のアザン染色像, (d) WB 発現胸筋のアザン染色像矢印は筋周膜を示す. 矢頭は損傷筋線維を示す.

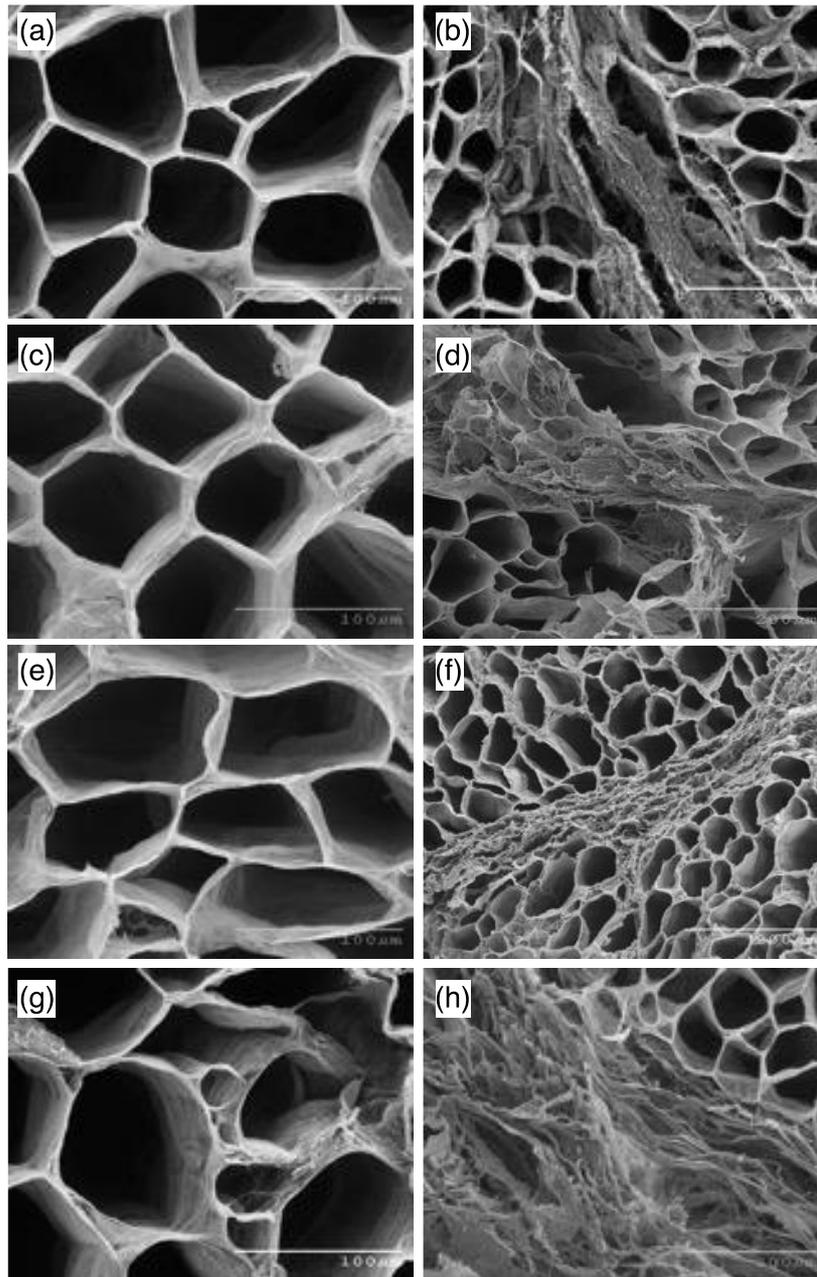


図 23. 死後から 24 時間目および 120 時間目の SEM 像.

(a) 死後から 24 時間目の正常胸筋の筋内膜像, (b) 死後から 24 時間目の正常胸筋の筋周膜像, (c) 死後から 24 時間目の WB 発現胸筋の筋内膜像, (d) 死後から 24 時間目の WB 発現胸筋の筋周膜像, (e) 死後から 120 時間目の正常胸筋の筋内膜像, (f) 死後から 120 時間目の正常胸筋の筋周膜像, (g) 死後から 120 時間目の WB 発現胸筋の筋内膜像, (h) 死後から 120 時間目の WB 発現胸筋の筋周膜像.

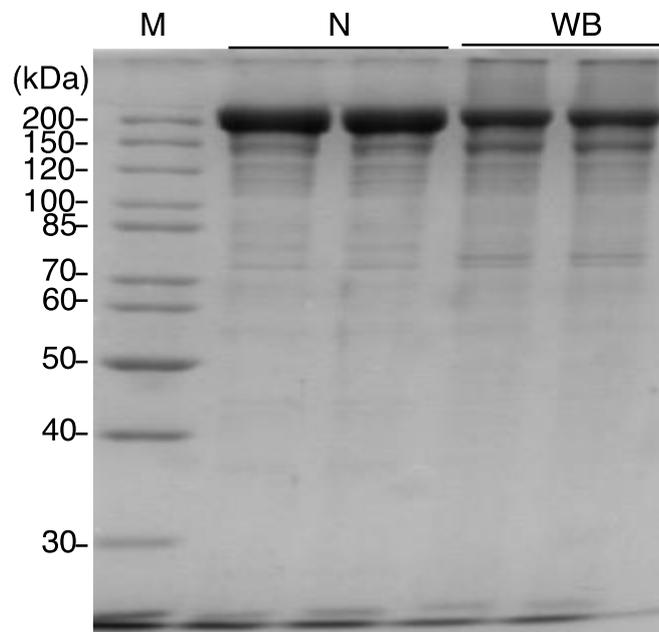


図 24. 抽出したミオシンの SDS-PAGE.

M : 分子量マーカー, N : 正常胸筋から抽出したミオシン, WB : WB 発現胸筋から抽出したミオシン

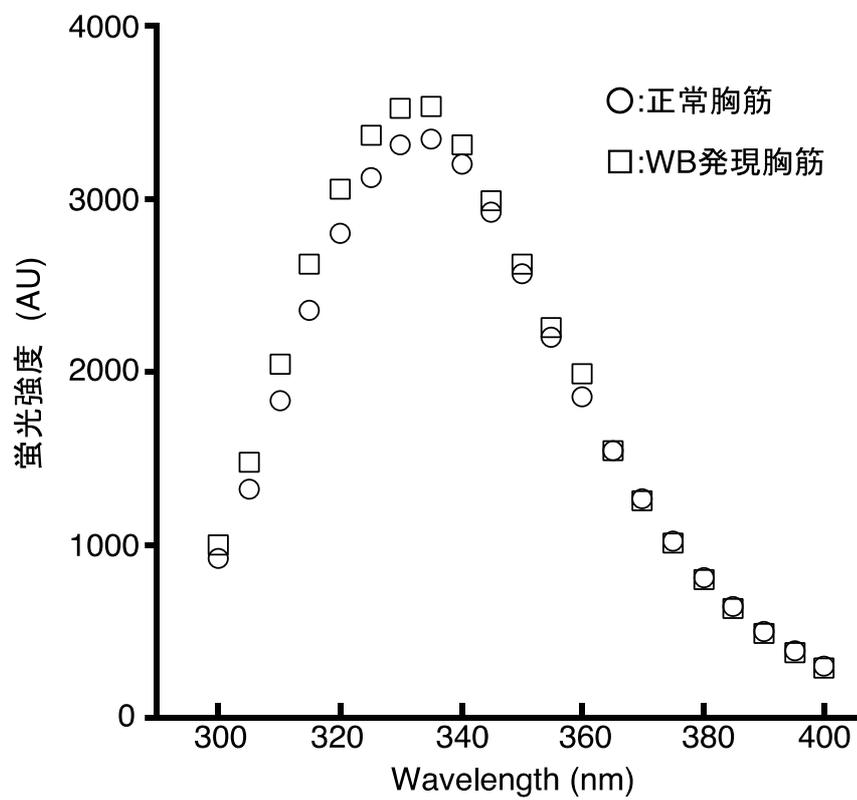


図 25. ミオシン溶液の蛍光スペクトル.

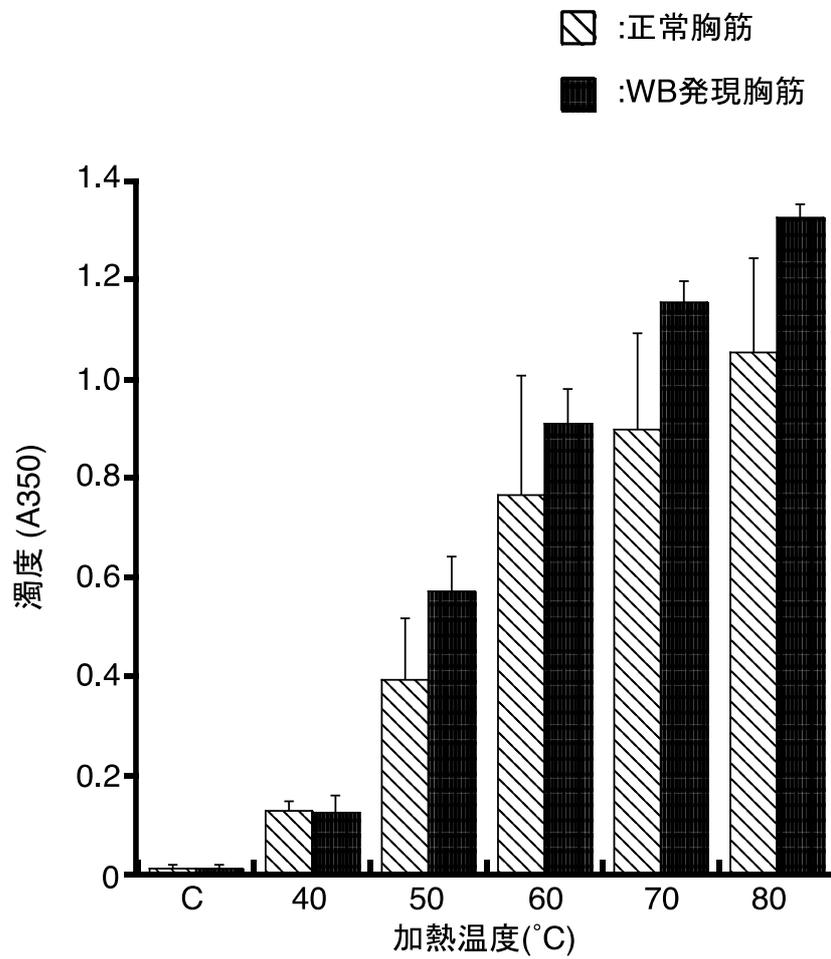


図 26. 異なる温度で一定時間加熱したミオシン溶液の濁度変化.

濁度の値は平均値±標準偏差を示す.

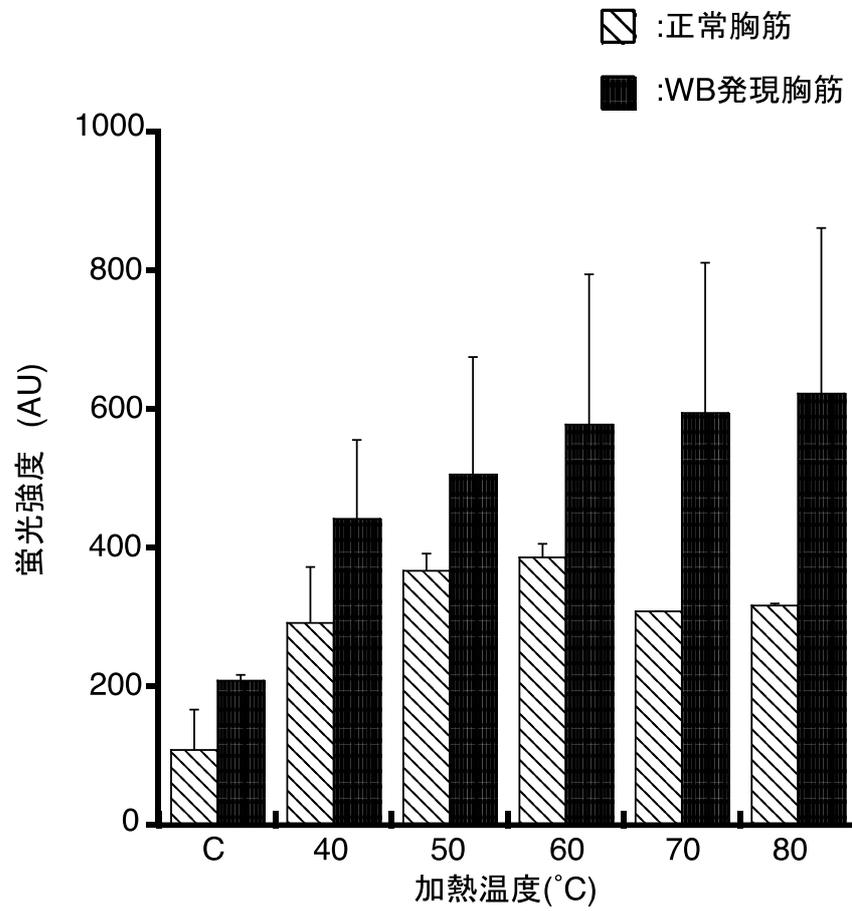


図 27. 異なる温度で一定時間加熱したミオシン溶液の表面疎水性変化.

表面疎水性の値は平均値±標準偏差を示す.

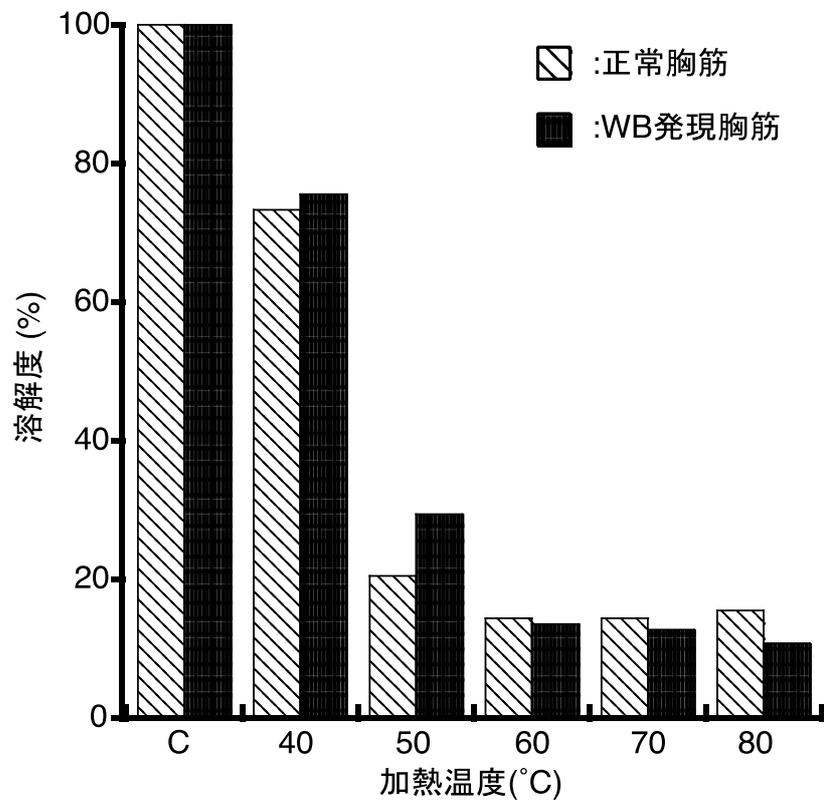


図 28. 異なる温度で一定時間加熱したミオシン溶液の溶解度変化.

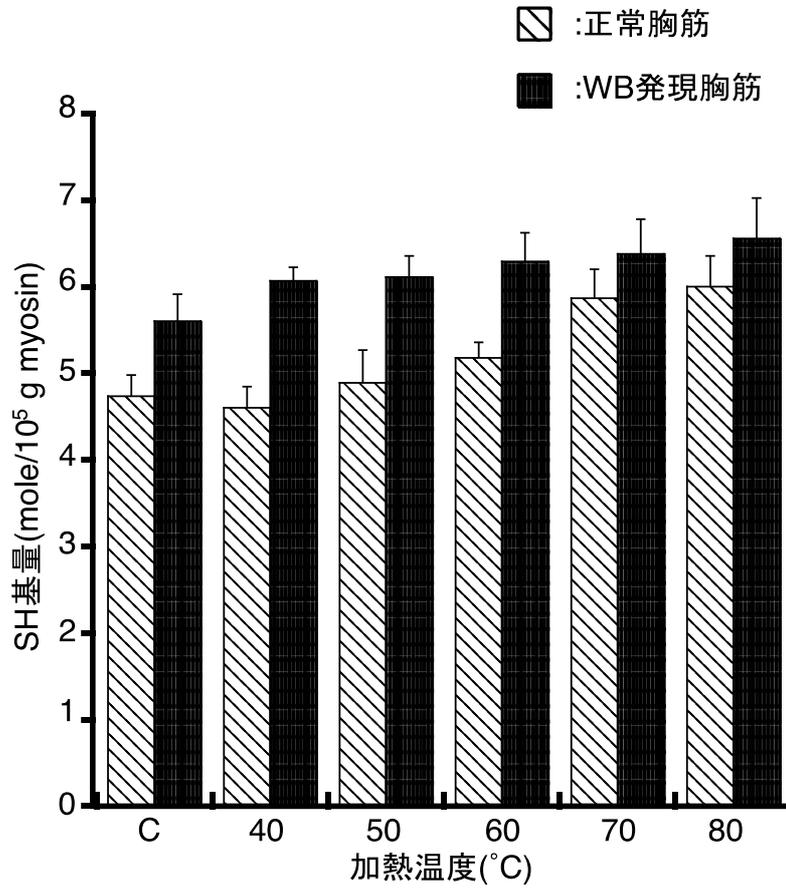


図 29. 異なる温度で一定時間加熱したミオシン溶液の SH 基変化.

SH 基の値は平均値±標準偏差を示す.

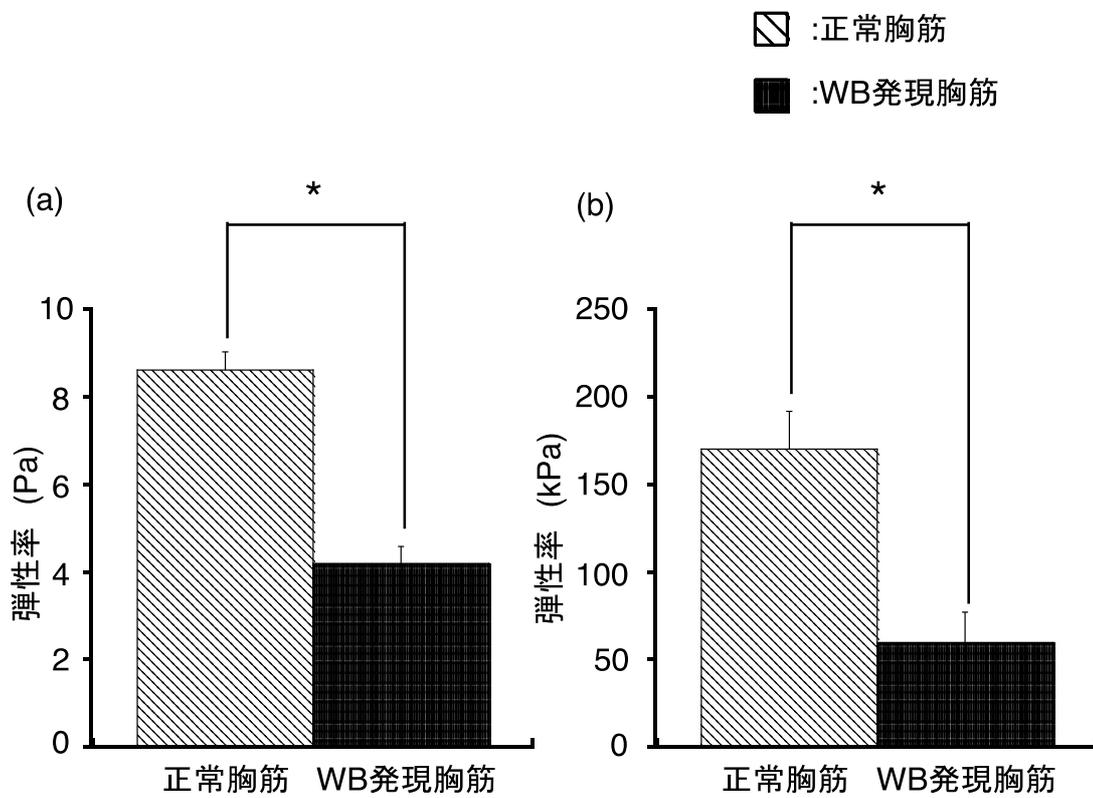


図 30. ミオシン加熱ゲルおよびモデルソーセージの弾性率.

a) 加熱ゲル, b) モデルソーセージ. 弾性率の値は平均値±標準偏差であり, 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$).

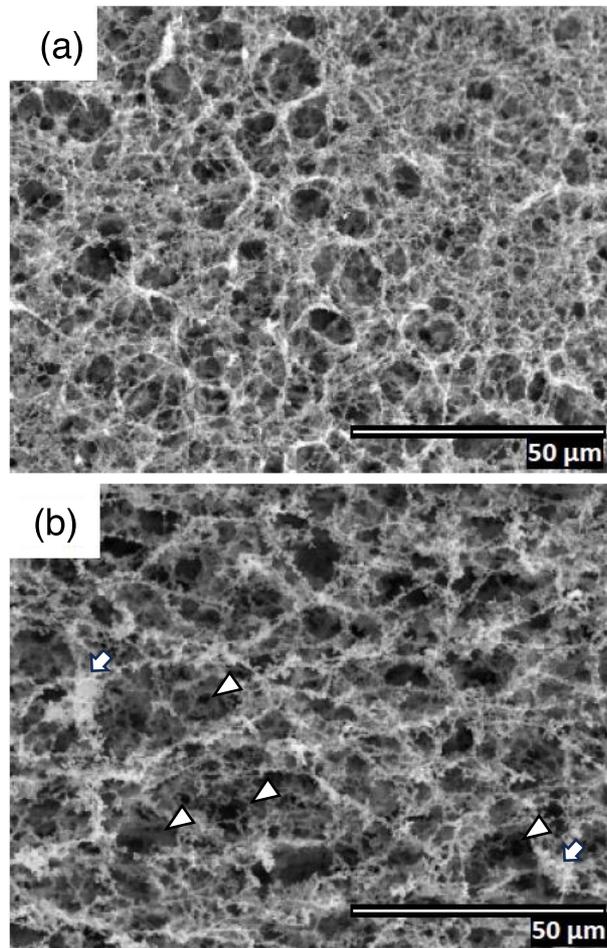


図 31. SEM によるミオシン加熱ゲルの内部構造の観察.

(a) 正常胸筋から抽出したミオシンの加熱ゲル内部構造, (b) WB 発現胸筋から抽出したミオシンの加熱ゲル内部構造. 矢頭および矢印は, それぞれゲル間の隙間および凝集物を示す.

考察

WB 発現胸筋の死後変化

本研究では、WB 発現胸筋と正常胸筋において死後の時間経過に伴う変化の違いを明らかにするために、生化学的、組織学的分析を行なった。

食肉の軟化は筋原線維を構成しているフィラメント間の相互作用が脆弱となること、および筋肉内の結合組織が糸状に構造変化することが原因とされている。前者は *actomyosin toughness* と表現されており、絶命直後に弛緩していた筋原線維のアクチンフィラメントとミオシンフィラメントが徐々に結合し、時間の経過とともに強固な硬直結合を形成することで死後硬直を起こす。さらに時間が経過すると、硬直結合が解け始め、筋原線維は再び弛緩し【28】、筋原線維の構造を原因とするかたさの変化に反映される。一方、死後の時間経過による結合組織の構造変化は *background toughness* と表現され、コラーゲン細線維間を接着しているプロテオグリカンが消失することでコラーゲン細線維の配向性が乱れ、筋周膜の構造が脆弱化することで生じる軟化現象である【56】。ウシなどの家畜では、*actomyosin toughness* と *background toughness* に関わる構造変化に時間差があることが知られている。ウシの半腱様筋は最も硬直結合を強固に形成しているのは死後 24 から 48 時間目で、硬直結合が解けるのは約 10 日目であるが、結合組織の細線維が糸状に構造変化するためには約 4 週間かかることが示されている【48】。鶏は最も硬直結合を強固に形成しているのは死後約 3 時間であり、約 24 時間後には完全に解硬する【20】。また、結合組織構造の変化の指標とされる *background toughness* は死後の筋原線維構造の変化と結合組織構造の変化はほぼ同時に起こる【20, 47, 48】。

本研究で用いた WB 発現胸筋および正常胸筋の重量は、それぞれ 343.4 ± 46.6 および 296.7 ± 24.0 g を示し、WB 発現胸筋の重量が大きい傾向であった。これは胸筋重量が大きいほど WB を発現しやすいとの報告【11】と一致する。正常胸筋において剪断力価は、死後 24 時間と比較して死後 120 時間では有意差はないものの約 20%低下していた。一方、WB 発現胸筋の剪断力価は、死後 24 時間と比較して死後 120 時間では約 30%有意に低下した。さらに、死後 120 時間において剪断力価は、正常胸筋に対して WB 発現胸筋で有意に高い値を示した。これらのことから死後経過時間とともに軟化は進むものの、WB 発現胸筋は正常胸筋と比較して死後時間が経過してもかたさが維持されることが明らかになった。これらの変化は WB 発現胸筋のかたさを圧縮試験で調べた先行研究と同様であった【68】。

SDS-PAGE を用いたタンパク質組成の分析結果からは、いずれの試料においても死後 24 時間から 120 時間で同様な筋原線維タンパク質の断片化が生じることが明らかとなった。先行研究【71】においても、正常胸筋および WB 発現胸筋で死後の時間経過に伴い、筋原線維を構成しているデスミンやネブリンが断片化することが報告されており、本研究の結果と一致する。また、本研究では、いずれの試料においても死後時間の経過とともに α -アクチニンの断片化物が形成され、トロポニン T の 30 kDa フラグメントは、正常胸筋と比べて WB 発現胸筋でより多く検出された。筋原線維を構成するトロポニン T の分解は、通常、死後の肉の柔らかさの指標として用いられている【32, 38】。これは、内在性プロテアーゼであるカテプシン B, L やカルパイン I がトロポニン T に作用して、30 kDa フラグメントに断片化し、その形成量が肉の軟化速度と一致するためである【37, 52】。加えて、カルパイン I は筋原線維の Z 線を主に構成している α -アクチニンに作用して Z 線の弱体化を引き起こすことも明らかとなっている【17】。本研究においては、WB 発現胸筋のカルパインおよびカテプシンの活性が亢進しており、このことは先行研究結果と一致する。したがって、内在性プロテアーゼ活性が亢進している WB 発現胸筋では、筋原線維タンパク質の分解や筋原線維の断片化など、死後の筋原線維の脆弱化に寄与していると考えられる。WB 発現胸筋では死後死処置後 24 時間から 120 時間にかけてトロポニン T の 30 kDa フラグメントの生成量に変化が生じておらず、組織化学染色像では筋線維が多数損傷していた。これまでに、内因性プロテアーゼ活性の亢進と損傷筋線維との間に強い正の相関があることが報告【75】されており、トロポニン T の 30 kDa フラグメントは生前から形成されている可能性がある。したがって、WB 発現胸筋は死後後 24 時間において、すでに筋原線維レベルで分解が進行しており、筋線維には軟化現象が生じていると考えられるが、筋組織が結合組織によって置換されることで、剪断力価が大きく低下しなかったと考えられた。

ミオシンの理化学特性

加熱によってゲルを形成するミオシンは筋肉由来の食品の品質を左右する重要なタンパク質であり、ミオシンの加熱ゲル形成特性は分子間相互作用によって三次元網目構造を形成することで結着性を高め、より保水効果を持つゲルを形成することにつながる【24, 63, 77, 89】。

正常胸筋および WB 発現胸筋から抽出したミオシン溶液の組成を調べるために行なった SDS-PAGE では、いずれにおいてもミオシン重鎖を示す 200 kDa 付近にバンドが観察された。一方、70-150 kDa にも多数のバンドが観察されたが、アクチンを示す 42 kDa 付近にはバンドが検出されなかった。さらに正常胸筋および WB 発現胸筋から抽出したミオシン重鎖の染色強度を比較したと

ころ、WB 発現胸筋から抽出したミオシン重鎖の染色強度が薄かったことから、WB 発現胸筋から抽出した溶液に含まれるミオシンの割合が正常な胸筋から抽出されるよりも少なかったものと考えられた。WB ミオシンの抽出量が少ないことは、WB が著しく進行した場合には、筋肉組織中の結合組織の量の割合が正常胸筋に比べて相対的に多くなることを原因として考えられる。

動物の骨格筋を加工食品として利用する場合には、ソーセージやハム、ミートボールなどの形態があり、とくにソーセージやミートボールなどのエマルジョンタイプの加工製品においては、肉パティの加熱による結着性や保水性が、その製品の品質においては重要である。肉加工製品のこれらの性質の発現には、ミオシンの加熱ゲル形成が著しく重要であることが多くの先行研究により明らかにされているが【30, 63】、ミオシンならびにアクトミオシンの重要性を最初に示したのは深澤ら【21】である。彼らは、ひき肉から塩溶性タンパク質を取り除くとゲル化しなくなることを示した。そのミオシンの加熱ゲル化機構は多くの研究者の手により以下の機序で進行することが明らかにされた【24, 96】。すなわち、0.3M 以上の塩濃度で存在するモノマーミオシンは 30-40°C で頭部間の凝集反応（会合）し、その会合はミオシン分子表面に露出する疎水性領域（表面疎水性）間の相互作用によることで頭部同士の会合が進む、そのミオシン頭部間の会合の際にはミオシンの尾部は関わらずに放射線状に広がる、さらに高温で加熱されることで、尾部のヘリカルヘリックス構造がランダム化して、凝集反応を呈すると理解されている。また、骨格筋ミオシンの表面疎水性は 20°C から 60°C の加熱温度の上昇に伴い増加し、60°C 以上の温度では変化しない【46】。このことは上述したミオシン分子の加熱に伴う凝集反応の結果であり、加熱をしたミオシンの溶解度は加熱温度の上昇とともに低下することは【31】、ミオシンが加熱変性されたことによりミオシン分子表面に疎水性が露出し、その結果としてミオシン分子同士が凝集するためである。本研究においても、正常ミオシンを加熱した際の表面疎水性変化は、先行研究【31】と類似しており、60°C 以上では変化が認められていない。また、タンパク質は加熱によって水和している水分子が少なくなることでタンパク質が不溶化するために水に溶解できなくなる。ミオシンも同様で、その溶解度は加熱温度が高くなるとともに低下する【31】。この現象はミオシン分子の立体構造が加熱によって変化（変性）し、ミオシン分子表面に疎水性が露出され、その結果としてミオシン分子同士が凝集するためである【31, 46, 89】。

WB ミオシンの濁度は、正常ミオシンのそれよりも高いことから、より変性しやすく凝集体形成が進んでいることを示す。そのことを裏付けるように、WB ミオシンの表面疎水性は、正常ミオシンに比べて、どの温度においても高い数値を示した。さらに、タンパク質の表面疎水性は凝集体が形成されることで低下するが、WB 発現胸筋から抽出したミオシンの表面疎水性は 60°C 以降も増

加したことから、疎水基の露出は続いており、加熱温度の上昇とともにミオシン分子の構造変化が継続的に生じていると考えられた。

ミオシン頭部領域であるサブフラグメント 1 には、ミオシン分子内にある 42 個の SH 基中のうち 24-26 個を含んでいる【50】。この官能基は非常に酸化されやすいが、一方で、S-S 結合によってタンパク質構造を安定化させている【19】。本研究において、WB 発現の有無に関わらず遊離 SH 基量は加熱温度の増大に伴い増え続けた。遊離 SH 基量が多いことは S-S 結合を形成していないことを意味しており、加熱に伴うタンパク質の凝集体形成に S-S 結合の関与が低いことを示している【46, 61】。したがって、WB 発現胸筋から抽出したミオシンの加熱後において、遊離 SH 基量が多いことは加熱ゲルの初期弾性率が低い原因の 1 つとして考えられる。

図 25 で示したミオシン溶液の吸収スペクトルはいずれの試料においても 340 nm 付近で最も高値を示しており、その強度は WB 発現胸筋で正常ミオシンより高い。タンパク質の自家蛍光スペクトルは、局所的な立体構造変化にともなう芳香族アミノ酸の溶媒への溶出あるいは埋没に大きく影響を受けるが、その強度の増減については特定の構造変化に完全に帰属できていない【86】。しかし、スペクトル強度の増大（あるいは減少）は、明らかにその立体構造の変化を意味していることから、WB ミオシンは加熱前から正常なミオシンと比較して立体構造になんらかの変化を生じていたことは間違いがない【41】。その立体構造の違いが、加熱によるミオシンの理化学的な変化に差異に繋がっていると考えられる。

WB 発現胸筋から抽出した加熱ミオシゲルおよびモデルソーセージ弾性率は正常のものに比べ有意に低いが、このモデルソーセージ弾性率の結果は先行研究【8, 12, 62, 92】と一致する。先行研究において、WB 発現胸筋の肉パティの加熱後の力学物性が低いことは、ミオシンを主とした塩溶性タンパク質の量が異なることに起因するとされている。これは、塩溶性タンパク質の抽出量が多いとタンパク質間の架橋が増強され、より均一な三次元ネットワークを形成する【35】からである。また、WB 発現胸筋の筋線維は膠原線維の増生を生じており、筋原線維タンパク質量が減少していることから、肉パティの加熱後の力学物性が低いとの考察もある【70】。WB では結合組織量の増大と筋原線維タンパク質の減少が生じるために、加熱ゲルの三次元構造形成能を低下させると考察する先行研究【92】もある。

本研究では、先行研究【93】で示された上記の理由でゲル強度の低下が生じているのではなく、これまでにソーセージの加熱ゲル研究でその重要性が明らかにされたミオシンの加熱ゲル物性に着目して研究を展開した。結果として、正常胸筋から抽出したミオシンの加熱ゲルの内部構造は微細

な三次元構造であったが、WB から抽出したミオシンの加熱ゲルの内部構造はその構造が粗い凝集体および多数の隙間が観察された。

タンパク質加熱ゲルの網目構造の密度は線維の結合数に相当することが報告【73】されている。すなわち、タンパク質加熱ゲルの内部構造において線維間の架橋数は加熱ゲルの力学物性において正の相関を示し【44, 88】，ミオシンの加熱ゲルの内部構造が粗い構造よりも細かく多数の繊維をもつ構造でより強い弾性率を示すことが明らかにされている【24】。さらに、加熱ゲルをSH基の観点から考えると、S-S結合を阻害させた場合、形成されたゲルは加熱ゲル内部の三次元網目構造のネットワークが発達しておらず、低い弾性率を示す【67】。これはS-S結合の形成がミオシン加熱ゲル形成において必要不可欠であることを示している。本研究で示されたようにWB発現胸筋から抽出されたミオシンはいずれの加熱温度においてもWB発現胸筋から抽出されたミオシンよりもSH基が僅かに多いことは、加熱によるS-S結合の形成が進まなかった結果でありそのことが、WB発現胸筋から抽出したミオシン加熱ゲルの構造が粗くなり、低いゲル強度となった理由の一つと考えられた。

結論として、死後のWB発現胸筋では内因性プロテアーゼ活性が亢進しており、筋原線維タンパク質とその構造への作用で、WB発現胸筋は筋原線維の脆弱化に寄与していることを明らかとした。さらに結合組織量はWB発現胸筋でより多く、死後も大きな変化はなかったことから、WB発現胸筋のかたさは、結合組織の増加に相関していることを明らかとした。また、WBを発現した胸筋はゲル形成能が低く、モデルソーセージも低い弾性率を示すことから、WB発現胸筋の食肉加工品としての有用性は低いため、ゲル化能を高めるために鶏肉単体だけではなく、豚肉など他の畜種肉に添加した場合など、より応用的に検討する必要があることが明らかとなった。

小括

本章ではWB発現胸筋において組織の構造特性が、製品化した商品の力学物性値にどう関係するかについて、正常胸筋とWB発現胸筋において生化学的分析および力学物性値の測定を行い、WBの死後から時間経過に伴う生化学的、組織構造的変化と力学物性変化の関係の詳細について検討した。また、食肉加工した際の種々の特性について正常胸筋とどのような差があるか理化学的分析手法を用いて検討した。

死後のWB発現胸筋では内因性プロテアーゼ活性が亢進しており、筋原線維タンパク質へ作用して筋原線維の脆弱化に寄与していることを明らかとした。さらに結合組織量がWB発現胸筋でより多く、WB発現胸筋のかたさは、結合組織の増加に相関していることを明らかとした。さらに、WBを発現した胸筋からミオシンを抽出し、その特性について調査した。WBを発現した胸筋のモデルソーセージゲル形成能が低く、低い弾性率を示すことから、WB発現胸筋単独での食肉加工品としての有用性は低いことが明確になった。従って、WB発現胸筋は、豚肉など他の畜種肉に添加するなどの、より応用的な利用方法の検討が必要であることが示唆された。

総合考察

パサパサ感、強い弾力性などの鶏の胸筋の食感に対する不満については、20世紀後半においても盛んに議論があった。しかし、とくにここ十数年に、それらの議論とは性質の異なる、つまり健全な筋組織を維持している中での議論ではなく、筋組織の器質破綻が発現することで、外見的に明らかな異常状態の頻発に伴う実質的な損耗が問題になっている。この筋組織の器質破綻による外見的異常は、食鳥処理場の従業員にとって、まるで木目のように黄色っぽくてかたい外見であったことから、『木のような胸筋 (wooden breast または woody breast)』という形容表現で呼ばれ始めたものである。この木のような外見とかたさの原因は、いまだ十分に解明されたとは言えないものの、胸筋の筋線維の変性或破綻、再生異常、炎症、線維増生による器質化が生じた結果を反映したものであることが明らかになってきている。本研究は、筋組織の変性・破綻および器質化に至るプロセスと外観的な異常やテクスチャーとの関係性を明らかにした。

第1章では、胸筋の複数の領域から組織片を採取し、胸筋の剪断力価の測定値と筋組織の状態とを照らし合わせることで、胸筋の物理的硬化と筋組織のしばしば器質化を伴う変性・壊死領域との間には密接な関係があり、WBの好発領域が胸筋の頭側皮膚側であることを特定した。また、WB発現胸筋の発生メカニズムに関連して組織においてリポフスチンや活性酸素種の蓄積およびそれらの分布、局在性について検討したところ、正常胸筋と比較して変性・崩壊した筋線維とその周辺組織にこれらの蓄積レベルが有意に高いことが明らかになった。さらに、筋組織において過酸化脂質成分の蓄積は、先行研究で示されているのと同様にTBARSの測定結果にも反映されることが再確認された。

第2章では、前章でWB発現胸筋において明らかにされた活性酸素種の活発な産生とリポフスチンの組織内蓄積が生じるメカニズムとして、ミトコンドリアの機能不全を伴う異常の発現が重要な要因であると仮定した。WB重症度とミトコンドリアの形態異常や数の変化との関係を明らかにするとともに、WB重症度ごとに組織において抗酸化酵素遺伝子の発現レベルについて評価を行った。その結果、WB発現胸筋では、その重症程度にかかわらずミトコンドリアの形態異常（膨化、クリステ崩壊）を認めるとともに、NADH-TR染色で濃染性が高くなることを確認した。また、NADH-TRでの濃染性は、抗ATPB抗体による免疫染色標本において蛍光発色粒子の数を確認することで、ミトコンドリアの増数を反映したものであることを確認した。抗酸化酵素遺伝子については、WB発現に伴いSOD1とSOD2の遺伝子発現が正常状態よりも有意に低下していた。

これらのことから、WB 発現胸筋では、局所組織において激しい好気性代謝が行われることで、活発に多量の活性酸素種が産生されるが、その産生レベルに対して抗酸化酵素の産生が追いつかなくなると、ミトコンドリアが傷害され、抗酸化酵素の産生も破綻していくと考えられる。一方、ミトコンドリアの数が WB 発現胸筋において多いことに関しては、胸筋組織の成長に伴いその数が増えることで好気性代謝の効率が高くなるため、それと同時に活性酸素種産生レベルが高いのか、ミトコンドリアの傷害によって局所的に代償的に増数したのかは今回明らかにできなかった。正常な胸筋においてミトコンドリアの数と胸筋の発達程度について検討することは今後の課題である。

第3章では、WB 発現胸筋を製品化して利用した場合、正常胸筋を製品化したものと比較して物性の違いが認められるかについて相対的に比較検討した。食品のテクスチャーのかたさの指標となる剪断力価の測定では、今回実施した試験においては生の状態での測定ではあったが、WB 発現胸筋は正常胸筋と比較して死後の早い段階から有意にかたいことが示された。また、WB 発現胸筋は、有意差はないものの正常胸筋よりも筋原線維の小片化率が死後の早い段階から低く推移したことから、WB 発現胸筋では筋原線維においてもかたさの要因がある。本章で用いた実験サンプルは、WB が重度に発現している胸筋の頭部表皮側を試験に用いた。このために筋肉の変性が進み線維化が進行していたことから筋組織において結合組織の割合が正常胸筋に比べて高かった。このことも WB が死後5日間経ても著しく高い剪断力を示した要因であると考えられた。WB の異常なまでに高い剪断力において結合組織の影響は先行研究でも示されており、本研究結果と一致する。ただし、データには示していないが、本章で示した重度の WB であっても75°Cで1時間湯煎することで、剪断力は正常胸筋を同レベルまで低下した。この理由については、線維化した結合組織の主成分であるコラーゲンの性状によるものであると考えられた。すなわち、孵化後50日しか経過していない鶏の筋肉内結合組織のコラーゲンは分子間架橋を形成することは難しく、相対的に水溶性コラーゲンの割合が高くなることで、加熱によってゼラチン化するためにその後の肉のかたさに寄与することはないと考えられる。しかし、このような胸筋をテーブルミートとして利用することは、外観の悪さから店頭展示に不向きであり、極めて困難である。したがって、本章では肉加工品としての利活用にその活路を見出すための検討を行なった。食肉加工において重要な品質特性は肉パティの決着性や保水性である。これらの品質特性はミオシンの加熱ゲル化によって発現していることから、WB を発現している胸筋からミオシンを抽出して、その理化学特性ならびに加熱ゲルの力学物性について、正常ミオシンを比較して、利活用の可能性を調査した。結論として、WB ミオシンは正常ミオシンに比べて、加熱前から分子の立体構造に差異があるために、加熱ゲル化能が低く、その性質が WB の肉パティの低い力学物性に影響していることが示された。すなわち、重度の

WB を単独で加工製品に利用するのではなく、他の畜肉と混合して、タンパク質含量を落とすことのない物性調整剤としての利用が可能であると一応の見解を示すことができた。

WB 発現にかかわる一連の課題を解決していくためには、WB の胸筋組織での発現メカニズムを明らかにすることに加え、WB 発現傾向がどのような生体现象の一端として表出してきたものかどうかを捉えるとともに、それらが生じる要因としての飼育条件との因果関係を詳細に明らかにしていく必要がある。本研究では、第1章から第3章までに示したWBの組織学的、生化学的なアプローチによる探索に加え、WBの発現傾向につながる飼育要因について実際に飼育試験を実施しながら多角的視点からの探索をした。第2章に関連して実施した飼育試験では、種鶏の週齢が種卵生産期間の前期(30週齢前)、中期(30-49週齢)、後期(50週齢以降)の種卵から孵化した雛を用いて2クールに分けて飼育することで、異なる産卵時期の種卵に由来した雛においてWBの発現率の差の有無を確認するとともに飼育初期に給与する飼料の粗タンパク質および粗脂肪のレベルの違いが異なる産卵時期の種卵に由来する雛の発育にどう影響するかどうかを検討した。

第1クールでは、種卵(ROSS308系)を産卵時期別にYg群:201日齢(28週齢)、Md群:306日齢(43週齢)、Od群:446日齢(63週齢)とし、酪農学園大学フィールド教育研究センターの鶏舎に設置した3台の孵卵器でそれぞれ孵卵し、雛を孵化させた。孵化した雛は、群別に雌雄鑑別した後、体重測定し、体重が大きい順に並べた。各群とも雌雄別に最も大きい体重の2羽、中央値に最も近い体重の2羽、最も小さい体重の2羽を選別(各群雌雄6羽ずつ)して飼育試験に供した。飼育区画は、同一規格(0-12日齢:育雛器床面積0.55m²、12-46日齢:平飼い床面積)の4区画とし、Yg、Md、およびOd群の雌雄鑑別と個体番号付与後、オスは体重が重い順に4群に均等に振り分け、メスは体重が軽い順に4区画に体重分布がほぼ均等になるように振り分け、各群の雛を雌雄同居させた9羽ずつの4飼育群として46日間飼育した。0-12日齢の期間は、前期飼料として、幼・中うす育成用配合飼料(育雛前期A、ホクレンくみあい飼料苫小牧工場)、12-46日齢の期間は、後期飼料として、ブロイラー肥育後期用配合飼料(あおぞら仕上、中部飼料北海道工場)を給与した。飼育期間中を通じて飼料と水は鶏が自由に摂取できるようにした。飼育期間中は、川崎ら【36】の方法に従って、1-3日ごとに体重測定と両翼の挙上試験を実施し、生体においてWB発現の有無を簡易確認した。

第2クールでは、種卵(ROSS308系)を第1クールと同様に、産卵時期別にYg群:201日齢(28週齢)、Md群:306日齢(43週齢)、Od群:446日齢(63週齢)とし、酪農学園大学フィールド教育研究センターの鶏舎に設置した3台の孵卵器でそれぞれ孵卵し、雛を孵化させ、第1クールと同じ方法で雛を選別・振り分けして9羽ずつの4飼育群として45日間飼育した。0-12日齢の期間

は、前期飼料として、幼すう育成用配合飼料（FO 餌付クランブル、フィード・ワン知多工場）、12-45 日齢の期間は、ブロイラー肥育後期用配合飼料（あおぞら仕上、中部飼料北海道工場）を給与し、飼育期間中を通じて飼料と水は鶏が自由に摂取できるようにした。飼育期間中は、1-3 日ごとに体重測定と両翼の挙上試験を実施し、生体において WB 発現の有無を簡易確認した。

第 1 クールと第 2 クールで使用した飼料の表示栄養成分量と原料配合は、それぞれ補足データ 1 および補足データ 2 のとおりである。すなわち、第 1 クールでは、飼育初期にタンパク質および脂質組成が低い飼料を給与し、第 2 クールでは、飼育初期にタンパク質および脂質組成が高い飼料を給与したものである。第 1 クールおよび第 2 クールにおいて雌雄別各種卵産卵時期群（Yg 群、Md 群、Od 群）の個体別体重曲線を異なるマーカーポイントで補足データ 3 および補足データ 4 に示した。グラフ中の赤色マーカーポイントは胸筋組織標本において顕著な WB 発現を確認した個体（WB 個体）、青色マーカーポイントは胸筋組織標本では WB 発現兆候を確認できなかった個体（正常個体）の体重曲線である。第 1 クールの 46 日齢でのオスの平均体重±標準偏差は、Yg 群、Md 群および Od 群で、それぞれ 2930 ± 193 、 2748 ± 516 および 2575 ± 283 g だった。メスの平均体重±標準偏差は Yg 群、Md 群および Od 群で、それぞれ 2228 ± 136 、 2361 ± 141 g および 2566 ± 106 g であった。第 2 クールの 45 日齢でのオスの平均体重±標準偏差は、Yg 群、Md 群および Od 群で、それぞれ 3492 ± 291 、 3750 ± 150 および 3782 ± 298 g であった。メスの平均体重±標準偏差は Yg 群、Md 群および Od 群で、それぞれ 2833 ± 242 、 2992 ± 268 および 2924 ± 249 g であった。第 2 クールでは、飼育期間を通じて雌雄の Yg 群、Md 群、Od 群のいずれにおいても体重のばらつき（coefficient of variance:以下、CV%）は大きく変動しなかった（補足データ 5）。一方、第 1 クールでは、雌雄ともに体重 CV% が飼育初期から拡大し、オスの Md 群（31 日齢以降縮小）以外は飼料を切り替えた 12 日齢時点から徐々に縮小した。

7 週齢（45、46 日齢）時点の平均体重は、オスの Md 群と Od 群において第 1 クールと第 2 クールとの間に有意差が認められ（Tukey HSD, $p < 0.01$ ）、第 1 クール、第 2 クールのそれぞれにおいて Yg 群、Md 群、Od 群相互間の比較では雌雄ともに有意な差は認められなかった（Tukey HSD, $p > 0.05$ ）。また、補足データ 3 および 4 の赤色マーカーで示した個体は著明な WB 発現を認め、青色マーカーで示した個体の筋線維は大部分で多角形であり正常であった。WB 発現を認める個体と正常個体の体重を第 1 クールと第 2 クールからそれぞれ抽出して平均体重として並べたところ（第 2 クールではオスの WB 個体は無し）、WB 個体群の平均体重は、第 1 クール、第 2 クールのいずれにおいても正常個体群の平均体重よりわずかに大きく推移した（n 数が少なく統計的比較はしていない）。

これらの結果は、ブロイラーの飼育では、飼育初期に給与する飼料の粗タンパク質と粗脂肪の比率が低いと、初期個体重が大きくばらつく要因となり、12日齢以降に飼育ステージに応じた飼料を給与しても、今日一般的なブロイラーの出荷日齢（大びな：7週齢前後）の時点で飼育初期の影響を受ける可能性を示唆している。初期体重のばらつきが生じた第1クール前期飼料は、ばらつきが少なかった第2クール前期飼料と比較して、粗タンパク質が4.5%低く（第2クール前期飼料に対して相対含量81.25%）、粗脂肪は1.5%低かった（第2クール前期飼料に対して相対含量50%）。第1クール前期飼料の代謝エネルギーについては、第2クール前期飼料に対して97.7%でほとんど同じレベルであった。第2クール前期飼料が第1クール前期飼料よりも粗タンパク質と粗脂肪の割合が高いのは、穀類の配合割合を低くし、植物性油かす類と動物性飼料（いずれもタンパク質原料）とその他の項目で動物性油脂が添加されていることを反映したものである。すなわち、体重のばらつきが少なかった第2クールでは、飼育期間を通じて動物性油脂が含まれている飼料を給与しており、体重のばらつきが初期段階で発生した第1クールにおいても、動物性油脂を含む後期飼料に切り替えた後は、体重のばらつきが幾分縮小したことから、動物性油脂は、ブロイラーの飼育初期段階においてもきわめて重要な栄養的役割を担う可能性がある。ただし、WB発現に対する影響は明らかにできなかった。油脂のエネルギー値はトウモロコシ粒の2倍以上（8250 kcal/kg 対 3350 kcal/kg）である【5】。ニワトリでは、パルミチン酸などの飽和脂肪酸の利用率はヒナの段階では低いが成長にしたがって高くなることが知られている【45】。また、長鎖不飽和脂肪酸、とくにn-3長鎖不飽和脂肪酸の供給は、細胞組織、とくに神経系の発達には重要であることが知られており、免疫機能を健全に維持するうえでも不可欠であることから【13】、飼育の初期段階から飼料を介して利用性を考慮した組成の動物油脂を十分な量で供給することが必要であると考えられる。さらに、第1クールと第2クールとの間で初期体重のばらつきを生じた前期飼料の要因として考慮されなければならない飼料配合の違いに抗菌性飼料添加物の有無があるかもしれない。飼育の初期段階から体重のばらつきが大きくなった第1クールでは、前期飼料に抗菌性飼料添加物が含まれていなかったが、同じ時期に体重のばらつきが比較的少なかった第2クールでは、前期飼料に抗菌性飼料添加物が含まれていた。第2クールの前期飼料に添加された抗菌性飼料添加物の一つ目はアピラマイシンである。アピラマイシンは、*Streptomyces viridochromogenes* Tü57によって産生されるオリゴ糖型オルトソマイシン系抗生物質で50Sリボソームサブユニットに結合することでグラム陽性細菌のタンパク質合成を阻害する【16,95】。また、サリノマイシンナトリウムは、*Streptomyces albus*の培養液から単離されたポリエーテル系の抗生物質で、グラム陽性細菌、真菌の一部に抗菌活性を有するだけでなく、*Eimeria*属などのコクシジウム原虫に対して生体膜において陽イオン透

過性を高め、膜内外のイオン分布をかく乱することによって抗原虫作用を発揮する【97】。したがって、これらが添加された前期飼料を給与した雛では、腸内細菌叢の定着初期段階においてグラム陽性菌を中心に急激な増殖を制御することにより、腸内環境バランスの差を抑制し、個体間差の少ない成長に寄与した可能性がある。

本研究で行なった一連の研究を総括すると、近年、ブロイラーの胸筋を解体処理したときに多く見られるWBと呼ばれる異常硬化した状態の本質は、顕著な過酸化と組織の広汎な膜障害を伴う筋組織障害が表出したものであることが明らかになった。また、WBの連続する過程にある胸筋を製品として利用した際の食品化学特性についても明らかにした。さらに、今後の研究展開として、異なる飼育条件を設定した飼育試験を行うことでWBの発現に影響を及ぼす要因をニワトリや飼育条件から見出していくことを試みているところであるが、現時点までにブロイラーの雛が由来する種鶏の産卵時期は、WBの発現に直接的に影響を及ぼすこと可能性が低いこと、飼育初期段階の飼料の差は飼育期間全体にわたる体重増加に影響を及ぼす可能性があることから、WBの発現につながる栄養バランスの不均衡が個体単位で生じる可能性が高いと考えられる。また、同一条件で飼育していてもWBの発現の有無や程度差は個体によって大きく異なることから、今後、飼育条件などの視点に加えて遺伝的な視点からの探索も今後併せて検討する。

Summary

A novel skeletal muscle disorder called wooden breast frequently occurs in the breast muscle of broiler chickens. The surface of the breast muscle, representing wooden breast is unsightly and has excessive drip loss, making it unsuitable for product display. Gaining knowledge about this is an important issue for the poultry industry, as wooden breasts are wasted and cause significant economic losses. In this study, the research conducted research from different perspectives to gain comprehensive knowledge about wooden breasts.

In Chapter 1, tissue pieces from different areas of the breast muscle were collected and to elucidate the role of oxidative stress in the development of wooden breast, this study investigated shear force, histochemical staining, 2-thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), and lipofuscin accumulation. There is a close relationship between areas of degeneration and necrosis accompanied by organization, the area where wooden breast occurs most frequently is the skin on the cranial side of the pectoral muscle. The TBARS value and accumulation of lipofuscin were significantly higher ($p < 0.05$) in the wooden breast than in the normal pectoral muscles. Many lipofuscin granules were localized in the cytoplasm of collapsed muscle fibers of the wooden breast. The cranial position had a large amount of connective tissue and lipofuscin granules. The results of the present study strongly suggest that high oxidative stress, especially with a significant accumulation of lipofuscin, is associated with the development of wooden breasts.

In Chapter 2, the relationship between the severity of wooden breasts in broilers and the characteristics of mitochondria as the source of reactive oxygen species was investigated. In 50-day-old broilers, the pectoral muscle was collected at the ventral cranial position. The severity of wooden breasts was classified into three groups based on the muscle fiber roundness and the wing-wing contact test, with the highest severity in severe wooden breasts and the lowest severity in normal breasts. Nicotinamide adenine dinucleotide tetrazolium reductase staining revealed an increase in darkly stained muscle fibers, indicating high severity of wooden breast. Mitochondria were swollen in severe wooden breast cases, with the highest swelling in severe wooden breast and the lowest swelling in normal breast muscle. The expression levels of the mitochondrial antioxidant enzyme genes superoxide dismutase 1 and superoxide dismutase 2 were significantly lower in severe wooden breast tissue than in normal tissue. These results suggest that when the

levels of reactive oxygen species in muscle fibers are elevated, which should be constant, mitochondrial homeostasis is not maintained and the damage levels to various cell membranes increase, leading to the disruption of normal physiological functions.

In Chapter 3, how the structural characteristics of the tissue in the wooden breast revealed in the previous chapters are related to the texture of the finished product was investigated. First, the post-mortem changes in protein composition over time, measured calpain activity and cathepsin activity, observed the connective tissue structure of muscle tissue, and compared these findings with the results of shear force measurement were confirmed. Next, the differences in various physicochemical characteristics from normal muscle myosin when heated, and the rheological properties of meat patties processed into model sausages were investigated. As a result, found that endogenous protease activity was increased in wooden breasts and that this contributed to myofibrillar weakness by affecting myofibrillar proteins and their structures. Furthermore, the amount of connective tissue was higher in wooden breasts, and the stiffness of it was correlated with the increase in connective tissue. The wooden breast has low gel-forming ability and low elastic modulus, which makes wooden breast less useful as a processed meat product. It is necessary to consider more practical uses of wooden breasts.

In conclusion, this study investigated the factors affecting wooden breasts, as well as the processing characteristics and postmortem changes. The results showed that the wooden breast was caused by excessive oxidative stress due to the failure of antioxidant enzymes to remove ROS produced in the wooden breast, that the myofibrillar structure was weakened during the postmortem, that the amount of connective tissue and firmness were similar, and that the processing characteristics were low due to the poor ability of myosin to form heating gels.

謝辞

本論文をまとめるにあたりご校閲を賜った酪農学園大学大学院酪農学研究科動物資源生産学の堂地修教授，山田未知教授，酪農学園大学大学院獣医学研究科生体機能学の渡邊敬文准教授に深く感謝致します。また，本研究を行うにあたり，適切なご指導およびご助言をいただき，研究を行う環境や機会を設けてくださった酪農学園大学大学院酪農学研究科食品機能生化学の岩崎智仁教授に深く感謝致します。

ブロイラーの飼養管理や筋組織の形態など幅広く知識や経験を教えてくださり，貴重なご意見を頂きました人と鳥の健康研究所の川崎武志博士に深く感謝致します。

本研究を行うにあたり，ご協力いただきました酪農学園大学応用生化学研究室の学生諸氏に深く感謝致します。最後に，私をいつもあたたかく応援してくれた母に深く感謝致します。

参考文献

- 【1】 Abasht, B., Mutryn, M. F., Michalek, R. D. & Lee, W. R. 2016. Oxidative Stress and Metabolic Perturbations in Wooden Breast Disorder in Chickens. *PLoS One*, 11, e0153750.
- 【2】 Ahn, D.-H., Shimada, K. & Takahashi, K. 2003. Relationship Between Weakening of Z-disks and Liberation of Phospholipids During Postmortem Aging of Pork and Beef. *Journal of Food Sci*, 68, 94-98.
- 【3】 Amann, J. F., Wharton, R. E., Madsen, R. W. & Laughlin, M. H. 1993. Comparison of muscle cell fiber types and oxidative capacity in gracilis, rectus femoris, and triceps brachii muscles in the ferret (*Mustela putorius furo*) and the domestic dog (*Canis familiaris*). *Anat Rec*, 236, 611-8.
- 【4】 Asakawa, T. & Matsushita, S. 1980. Coloring conditions of thiobarbituric acid test for detecting lipid hydroperoxides. *Lipids*, 15, 137-140.
- 【5】 Bailey, R. A., Watson, K. A., Bilgili, S. F. & Avendano, S. 2015. The genetic basis of pectoralis major myopathies in modern broiler chicken lines. *Poult Sci*, 94, 2870-9.
- 【6】 Baldi, G., Soglia, F., Mazzoni, M., Sirri, F., Canonico, L., Babini, E., Laghi, L., Cavani, C. & Petracchi, M. 2018. Implications of white striping and spaghetti meat abnormalities on meat quality and histological features in broilers. *Animal*, 12, 164-173.
- 【7】 Barrett, A. J., Kembhavi, A. A., Brown, M. A., Kirschke, H., Knight, C. G., Tamai, M. & Hanada, K. 1982. L-trans-Epoxysuccinyl-leucylamido (4-guanidino) butane (E-64) and its analogues as inhibitors of cysteine proteinases including cathepsins B, H and L. *Biochem J*, 201, 189-98.
- 【8】 Brambila, G. S., Chatterjee, D., Bowker, B. & Zhuang, H. 2017. Descriptive texture analyses of cooked patties made of chicken breast with the woody breast condition. *Poult Sci*, 96, 3489-3494.
- 【9】 Brunk, U. T. & Terman, A. 2002. Lipofuscin: mechanisms of age-related accumulation and influence on cell function. *Free Radic Biol Med*, 33, 611-9.
- 【10】 Cadenas, E. & Davies, K. J. 2000. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. *Free Radic Biol Med*, 29, 222-30.
- 【11】 Chatterjee, D., Zhuang, H., Bowker, B. C., Rincon, A. M. & Sanchez-Brambila, G. 2016. Instrumental texture characteristics of broiler pectoralis major with the wooden breast condition. *Poult Sci*, 95, 2449-54.
- 【12】 Chen, H., Wang, H., Qi, J., Wang, M., Xu, X. & Zhou, G. 2018. Chicken breast quality – normal, pale,

- soft and exudative (PSE) and woody – influences the functional properties of meat batters. *International Journal of Food Sci & Tech*, 53, 654-664.
- 【13】 Cherian, G. 2015. Nutrition and metabolism in poultry: role of lipids in early diet. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 6, 28.
- 【14】 Clark, D. L. & Velleman, S. G. 2016. Spatial influence on breast muscle morphological structure, myofiber size, and gene expression associated with the wooden breast myopathy in broilers. *Poultry Science*, 95, 2930-2945.
- 【15】 Cogger, V. C., Svistounov, D., Warren, A., Zykova, S., Melvin, R. G., Solon-Biet, S. M., O'Reilly, J. N., McMahon, A. C., Ballard, J. W., De Cabo, R., Le Couteur, D. G. & Lebel, M. 2014. Liver aging and pseudocapillarization in a Werner syndrome mouse model. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 69, 1076-86.
- 【16】 Costa, M. C., Bessegatto, J. A., Alfieri, A. A., Weese, J. S., Filho, J. A. B. & Oba, A. 2017. Different antibiotic growth promoters induce specific changes in the cecal microbiota membership of broiler chicken. *PLOS ONE*, 12, e0171642.
- 【17】 Dayton, W. R., Reville, W. J., Goll, D. E. & Stromer, M. H. 1976. A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Partial characterization of the purified enzyme. *Biochem*, 15, 2159-67.
- 【18】 De Almeida Mallmann, B., Martin, E. M., Soo Kim, K., Calderon-Apodaca, N. L., Baxter, M. F. A., Latorre, J. D., Hernandez-Velasco, X., Paasch-Martinez, L., Owens, C. M., Dridi, S., Bottje, W. G., Greene, E. S. & Tellez-Isaias, G. 2019. Evaluation of Bone Marrow Adipose Tissue and Bone Mineralization on Broiler Chickens Affected by Wooden Breast Myopathy. *Front Physiol*, 10, 674.
- 【19】 Fass, D. 2012. Disulfide bonding in protein biophysics. *Annu Rev Biophys*, 41, 63-79.
- 【20】 Franciscus, J., Gerardus, B. 2000. Postmortem changes in chicken muscle. some key biochemical processes involved in the conversion of muscle to meat. *World's Poult Sci J*, 56, 319-346.
- 【21】 FUKAZAWA, T., HASHIMOTO, Y. & YASUI, T. 1961. Effect of Some Proteins on the Binding Quality of an Experimental Sausage. *J of Food Sci*, 26, 541-549.
- 【22】 Hannover, A. 1842. Mikroskopiske undersøgelser af nervesystemet. *Ref Type: Magazine Article*, 10, 1-112.
- 【23】 Herd, R. M. & Arthur, P. F. 2009. Physiological basis for residual feed intake. *J Anim Sci*, 87, E64-71.
- 【24】 Hermansson, A.-M., Harbitz, O. & Langton, M. 1986. Formation of two types of gels from bovine

- myosin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 37, 69-84.
- 【25】 Higuchi, K., Hayashi, K., Ohtsuka, A. & Tomita, Y. 1996. Calcitonin Decreases Corticosterone-induced Skeletal Muscle Calpain Activity. *J of Nut Sci and Vitamino*, 42, 491-496.
- 【26】 Hosotani, M., Kawasaki, T., Hasegawa, Y., Wakasa, Y., Hoshino, M., Takahashi, N., Ueda, H., Takaya, T., Iwasaki, T. & Watanabe, T. 2020. Physiological and Pathological Mitochondrial Clearance Is Related to Pectoralis Major Muscle Pathogenesis in Broilers With Wooden Breast Syndrome. *Front Physiol*, 11, 579.
- 【27】 Hozumi, T. & Hotta, K. 1978. Effect of Myosin DTNB Light Chain on the Actin-Myosin Interaction in the Presence of ATP. *The J of Biochem*, 83, 671-676.
- 【28】 Huxley, H. & Hanson, J. 1954. Changes in the Cross-Striations of Muscle during Contraction and Stretch and their Structural Interpretation. *Nature*, 173, 973-976.
- 【29】 Iñarrea, P. 2002. Purification and determination of activity of mitochondrial cyanide-sensitive superoxide dismutase in rat tissue extract. *Methods in Enzymology*. Academic Press.
- 【30】 ISHIOROSHI, M., JIMA, K. S. & YASUI, T. 1979. HEAT-INDUCED GELATION OF MYOSIN: FACTORS OF pH AND SALT CONCENTRATIONS. *J of Food Sci*, 44, 1280-1284.
- 【31】 Ito, T. & Ando, N. 1975. The Effect of the Modification of Amino Groups with β -Naphthoquinones-4-sulfonic Acid on Heat Denaturation of Myosin. *Agricultural and Biol Chem*, 39, 575-578.
- 【32】 Iwasaki, T., Taniguchi, H., Hasegawa, Y., Maeda, N. & Yamamoto, K. 2016. A novel method for monitoring troponin T fragment from rabbit skeletal muscle during aging using quartz crystal microbalance. *J Sci Food Agric*, 96, 3944-9.
- 【33】 Iwasaki, T. & Yamamoto, K. 2003. Changes in rabbit skeletal myosin and its subfragments under high hydrostatic pressure. *International J of Biol Macromolecules*, 33, 215-220.
- 【34】 Judson, R. N., Gray, S. R., Walker, C., Carroll, A. M., Itzstein, C., Lionikas, A., Zammit, P. S., De Bari, C. & Wackerhage, H. 2013. Constitutive Expression of Yes-Associated Protein (Yap) in Adult Skeletal Muscle Fibres Induces Muscle Atrophy and Myopathy. *PLOS ONE*, 8, e59622.
- 【35】 Kang, Z.-L., Wang, P., Xu, X.-L., Zhu, C.-Z., Zou, Y.-F., Li, K. & Zhou, G.-H. 2014. Effect of a beating process, as a means of reducing salt content in Chinese-style meatballs (kung-wan) : A dynamic rheological and Raman spectroscopy study. *Meat Sci*, 96, 669-674.
- 【36】 Kawasaki, T., Yoshida, T. & Watanabe, T. 2016. Simple Method for Screening the Affected Birds with Remarkably Hardened Pectoralis Major Muscles among Broiler Chickens. *The J of Poult Sci*, advpub.

- 【37】 Kemp, C. M., Sensky, P. L., Bardsley, R. G., Buttery, P. J. & Parr, T. 2010. Tenderness--an enzymatic view. *Meat Sci*, 84, 248-56.
- 【38】 Kitamura, S.-i., Muroya, S., Tanabe, S., Okumura, T., Chikuni, K. & Nishimura, T. 2005. Mechanism of Production of Troponin T Fragments during Postmortem Aging of Porcine Muscle. *Journal of Agricultural and Food Chem*, 53, 4178-4181.
- 【39】 König, J., Ott, C., Hugo, M., Jung, T., Bulteau, A. L., Grune, T. & Höhn, A. 2017. Mitochondrial contribution to lipofuscin formation. *Redox Biol*, 11, 673-681.
- 【40】 Kozakowska, M., Pietraszek-Gremplewicz, K., Jozkowicz, A. & Dulak, J. 2015. The role of oxidative stress in skeletal muscle injury and regeneration: focus on antioxidant enzymes. *J Muscle Res Cell Motil*, 36, 377-93.
- 【41】 Kuttappan, V. A., Brewer, V. B., Apple, J. K., Waldroup, P. W. & Owens, C. M. 2012. Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillets. *Poult Sci*, 91, 2677-2685.
- 【42】 Kuttappan, V. A., Owens, C. M., Coon, C., Hargis, B. M. & Vazquez-Añon, M. 2017. Incidence of broiler breast myopathies at 2 different ages and its impact on selected raw meat quality parameters. *Poult Sci*, 96, 3005-3009.
- 【43】 Kuttappan, V. A., V. B. Brewer, F. D. Clark, S. R. McKee, J. F. & Meullenet, J. L. E., and C. M. Owens. 2009. Effect of white striping on the histological and meat quality characteristics of broiler fillets. *Poult. Sci*, 88, 136-137.
- 【44】 Langton, M. & Hermansson, A.-M. 1992. Fine-stranded and particulate gels of β -lactoglobulin and whey protein at varying pH. *Food Hydrocolloids*, 5, 523-539.
- 【45】 Leeson, S. a. S. J. 2005. Commercial poultry nutrition 3rd ed. *University Books 2005*, 64.
- 【46】 Lefevre, F., Fauconneau, B., Thompson, J. W. & Gill, T. A. 2007. Thermal Denaturation and Aggregation Properties of Atlantic Salmon Myofibrils and Myosin from White and Red Muscles. *Journal of Agricultural and Food Chem*, 55, 4761-4770.
- 【47】 Liu, A., Nishimura, T. & Takahashi, K. 1994. Structural changes in endomysium and perimysium during post-mortem aging of chicken Semitendinosus muscle-Contribution of structural weakening of intramuscular connective tissue to meat tenderization. *Meat Sci*, 38, 315-28.
- 【48】 Liu, A., Nishimura, T. & Takahashi, K. 1995. Structural weakening of intramuscular connective tissue during post mortem ageing of chicken Semitendinosus muscle. *Meat Sci*, 39, 135-42.
- 【49】 Liu, A., Nishimura, T. & Takahashi, K. 1996. Relationship between structural properties of

- intramuscular connective tissue and toughness of various chicken skeletal muscles. *Meat Sci*, 43, 43-9.
- 【50】 Lowey, S., Slayter, H. S., Weeds, A. G. & Baker, H. 1969. Substructure of the myosin molecule: I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J of Mol Biology*, 42, 1-29.
- 【51】 Mâncio, R. D., Hermes, T. A., Macedo, A. B., Mizobuti, D. S., Valduga, A. H., Rucpic, I. F. & Minatel, E. 2017. Vitamin E treatment decreases muscle injury in mdx mice. *Nutrition*, 43-44, 39-46.
- 【52】 Matsukura, U., Okitani, A., Nishimuro, T. & Kato, H. 1981. Mode of degradation of myofibrillar proteins by an endogenous protease, cathepsin L. *Biochim Biophys Acta*, 662, 41-7.
- 【53】 Mutryn, M. F., Brannick, E. M., Fu, W., Lee, W. R. & Abasht, B. 2015. Characterization of a novel chicken muscle disorder through differential gene expression and pathway analysis using RNA-sequencing. *BMC Genomics*, 16, 399.
- 【54】 Nakae, Y., Stoward, P. J., Kashiyama, T., Shono, M., Akagi, A., Matsuzaki, T. & Nonaka, I. 2004. Early Onset of Lipofuscin Accumulation in Dystrophin-Deficient Skeletal Muscles of DMD Patients and mdx Mice. *J of Molecular Histol*, 489-499.
- 【55】 Nishimura, T. 2010. The role of intramuscular connective tissue in meat texture. *Anim Sci J*, 81, 21-7.
- 【56】 Nishimura, T., Liu, A., Hattori, A. & Takahashi, K. 1998. Changes in mechanical strength of intramuscular connective tissue during postmortem aging of beef. *J Anim Sci*, 76, 528-32.
- 【57】 Pan, X., Zhang, L., Xing, T., Li, J. & Gao, F. 2021. The impaired redox status and activated nuclear factor-erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element pathway in wooden breast myopathy in broiler chickens. *Anim Biosci*, 34, 652-661.
- 【58】 Papah, M. B., Brannick, E. M., Schmidt, C. J. & Abasht, B. 2017. Evidence and role of phlebitis and lipid infiltration in the onset and pathogenesis of Wooden Breast Disease in modern broiler chickens. *Avian Pathol*, 46, 623-643.
- 【59】 Petracci, M., Soglia, F., Madruga, M., Carvalho, L., Ida, E. & Estévez, M. 2019. Wooden-Breast, White Striping, and Spaghetti Meat: Causes, Consequences and Consumer Perception of Emerging Broiler Meat Abnormalities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 18, 565-583.
- 【60】 Praud, C., Jimenez, J., Pampouille, E., Courousse, N., Godet, E., Le Bihan-Duval, E. & Berri, C. 2020. Molecular Phenotyping of White Striping and Wooden Breast Myopathies in Chicken. *Front Physiol*, 11, 633.
- 【61】 Reed, Z. H., Guilford, W. & Park, J. W. 2011. Thermal denaturation of tilapia myosin and its subunits as affected by constantly increasing temperature. *J Food Sci*, 76, C1018-24.

- 【62】 Rigdon, M., Stelzleni, A. M., McKee, R. W., Pringle, T. D., Bowker, B., Zhuang, H. & Thippareddi, H. 2021. Texture and quality of chicken sausage formulated with woody breast meat. *Poult Sci*, 100, 100915.
- 【63】 SAMEJIMA, K., ISHIOBOROSHI, M. & YASUI, T. 1981. Relative Roles of the Head and Tail Portions of the Molecule in Heat-Induced Gelation of Myosin. *J of Food Sci*, 46, 1412-1418.
- 【64】 Scott, K. P. & Jackson, M. J. 2008. Exercise-Induced Oxidative Stress: Cellular Mechanisms and Impact on Muscle Force Production. *Physiol Reviews*, 88, 1243-1276.
- 【65】 Sihvo, H. K., Airas, N., Lindén, J. & Puolanne, E. 2018. Pectoral Vessel Density and Early Ultrastructural Changes in Broiler Chicken Wooden Breast Myopathy. *Journal of Comparative Pathology*, 161, 1-10.
- 【66】 Sihvo, H. K., Immonen, K. & Puolanne, E. 2014. Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. *Vet Pathol*, 51, 619-23.
- 【67】 SMYTH, A. B., SMITH, D. M. & O'NEILL, E. 1998. Disulfide Bonds Influence the Heat-induced Gel Properties of Chicken Breast Muscle Myosin. *J of Food Sci*, 63, 584-587.
- 【68】 Soglia, F., Gao, J., Mazzoni, M., Puolanne, E., Cavani, C., Petracci, M. & Ertbjerg, P. 2017. Superficial and deep changes of histology, texture and particle size distribution in broiler wooden breast muscle during refrigerated storage. *Poult Sci*, 96, 3465-3472.
- 【69】 Soglia, F., Laghi, L., Canonico, L., Cavani, C. & Petracci, M. 2016. Functional property issues in broiler breast meat related to emerging muscle abnormalities. *Food Research International*, 89, 1071-1076.
- 【70】 Soglia, F., Mudalal, S., Babini, E., Di Nunzio, M., Mazzoni, M., Sirri, F., Cavani, C. & Petracci, M. 2016. Histology, composition, and quality traits of chicken Pectoralis major muscle affected by wooden breast abnormality. *Poult Sci*, 95, 651-9.
- 【71】 Soglia, F., Zeng, Z., Gao, J., Puolanne, E., Cavani, C., Petracci, M. & Ertbjerg, P. 2018. Evolution of proteolytic indicators during storage of broiler wooden breast meat. *Poult Sci*, 97, 1448-1455.
- 【72】 Sohal, R. S. & Brunk, U. T. 1989. Lipofuscin as an indicator of oxidative stress and aging. *Adv Exp Med Biol*, 266, 17-26; discussion 27-9.
- 【73】 Stading, M., Langton, M. & Hermansson, A.-M. 1993. Microstructure and rheological behaviour of particulate β -lactoglobulin gels. *Food Hydrocolloids*, 7, 195-212.
- 【74】 Sturtz, L. A., Diekert, K., Jensen, L. T., Lill, R. & Culotta, V. C. 2001. A fraction of yeast Cu,Zn-superoxide dismutase and its metallochaperone, CCS, localize to the intermembrane space of

- mitochondria. A physiological role for SOD1 in guarding against mitochondrial oxidative damage. *J Biol Chem*, 276, 38084-9.
- 【75】 Sultan, K. R., Dittrich, B. T. & Pette, D. 2000. Calpain activity in fast, slow, transforming, and regenerating skeletal muscles of rat. *Am J Physiol Cell Physiol*, 279, C639-47.
- 【76】 Sun, X., Koltjes, D. A., Coon, C. N., Chen, K. & Owens, C. M. 2018. Instrumental compression force and meat attribute changes in woody broiler breast fillets during short-term storage. *Poult Sci*, 97, 2600-2606.
- 【77】 Sun, X. D. & Holley, R. A. 2011. Factors Influencing Gel Formation by Myofibrillar Proteins in Muscle Foods. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 33-51.
- 【78】 Terman, A. & Brunk, U. T. 2004. Lipofuscin. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, 1400-4.
- 【79】 Terrill, J. R., Radley-Crabb, H. G., Iwasaki, T., Lemckert, F. A., Arthur, P. G. & Grounds, M. D. 2013. Oxidative stress and pathology in muscular dystrophies: focus on protein thiol oxidation and dysferlinopathies. *The FEBS J*, 280, 4149-4164.
- 【80】 Tidball, J. G. 2011. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. *Compr Physiol*, 1, 2029-62.
- 【81】 Tohma, H., Hepworth, A. R., Shavlakadze, T., Grounds, M. D. & Arthur, P. G. 2011. Quantification of ceroid and lipofuscin in skeletal muscle. *J Histochem Cytochem*, 59, 769-79.
- 【82】 Tonniges, J. R., Clark, D. L. & Velleman, S. G. 2018. The Effect of the Wooden Breast Fibrotic Myopathy in Broilers on Fibrillar Collagen Organization and Decorin-Collagen Binding. *Avian Diseases*, 63, 48-60, 13.
- 【83】 Trachootham, D., Wei Qin, L., Marcia, A., Ogasawara, N., Rivera-D.V., Peng, H. 2008. Redox Regulation of Cell Survival. *Antioxidants & Redox Signaling*, 10, 1343-1374.
- 【84】 Turrens, J. F. 2003. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*, 552, 335-44.
- 【85】 Velleman, S. G. & Clark, D. L. 2015. Histopathologic and Myogenic Gene Expression Changes Associated with Wooden Breast in Broiler Breast Muscles. *Avian Dis*, 59, 410-8.
- 【86】 Weinryb, I. & Steiner, R. F. 1968. The luminescence of tryptophan and phenylalanine derivatives. *Biochem*, 7, 2488-2495.
- 【87】 Whitehead, N. P., Pham, C., Gervasio, O. L. & Allen, D. G. 2008. N-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in mdx mice. *J Physiol*, 586, 2003-14.
- 【88】 Woodward, S. A. & Cotterill, O. J. 1984. Texture and micro structure of heat formed egg white gels. *Poult Sci*, 63, 207-208.

- 【89】 Yamamoto, K. 1990. Electron Microscopy of Thermal Aggregation of Myosin. *The Journal of Biochem*, 108, 896-898.
- 【90】 Yan, Y., Xing, F., Cao, J., Hu, Y., Li, L., Gao, Z., Jia, H., Miao, K., Shao, F., Deng, C. X., Luo, K. Q., Lee, L. T. O. & Liu, T. M. 2023. Fluorescence intensity and lifetime imaging of lipofuscin-like autofluorescence for label-free predicting clinical drug response in cancer. *Redox Biol*, 59, 102578.
- 【91】 Yasui, T., Ishioroshi, M., Nakano, H. & Samejima, K. 1979. Changes in shear modulus, ultrastructure and spin-spin relaxation times of water associated with heat-induced gelation of myosin. *Journal of Food Sci*, 44, 1201-1204.
- 【92】 Zhang, Y., Wang, P., Xu, X., Xia, T., Li, Z. & Zhao, T. 2020. Effect of wooden breast myopathy on water-holding capacity and rheological and gelling properties of chicken broiler breast batters. *Poult Sci*, 99, 3742-3751.
- 【93】 Zhu, X., Puolanne, E. & Erbjerg, P. 2023. Changes of Raw Texture, Intramuscular Connective Tissue Properties and Collagen Profiles in Broiler Wooden Breast during Early Storage. *Foods*, 12.
- 【94】 Zuidhof, M. J., Schneider, B. L., Carney, V. L., Korver, D. R. & Robinson, F. E. 2014. Growth, efficiency, and yield of commercial broilers from 1957, 1978, and 2005. *Poult Sci*, 93, 2970-82.
- 【95】 鈴木, 利. 2007. カラー ルービン病理学：臨床医学への基盤
- 【96】 埜中, 征. 1993. 臨床のための筋病理.
- 【97】 宮崎, 幸., 原 正幸 1980. サリノマイシンの発見と発酵生産技術の開発. *日本農芸化学会誌* 54.
- 【98】 安井, 勉. 鮫. 1985. 筋肉タンパク質のゲル形成. *New Food Industry*, 27.
- 【99】 吉村, 寿. 1984. オルトソマイシンの化学. *有機合成化学協会誌* 42, 514-522.

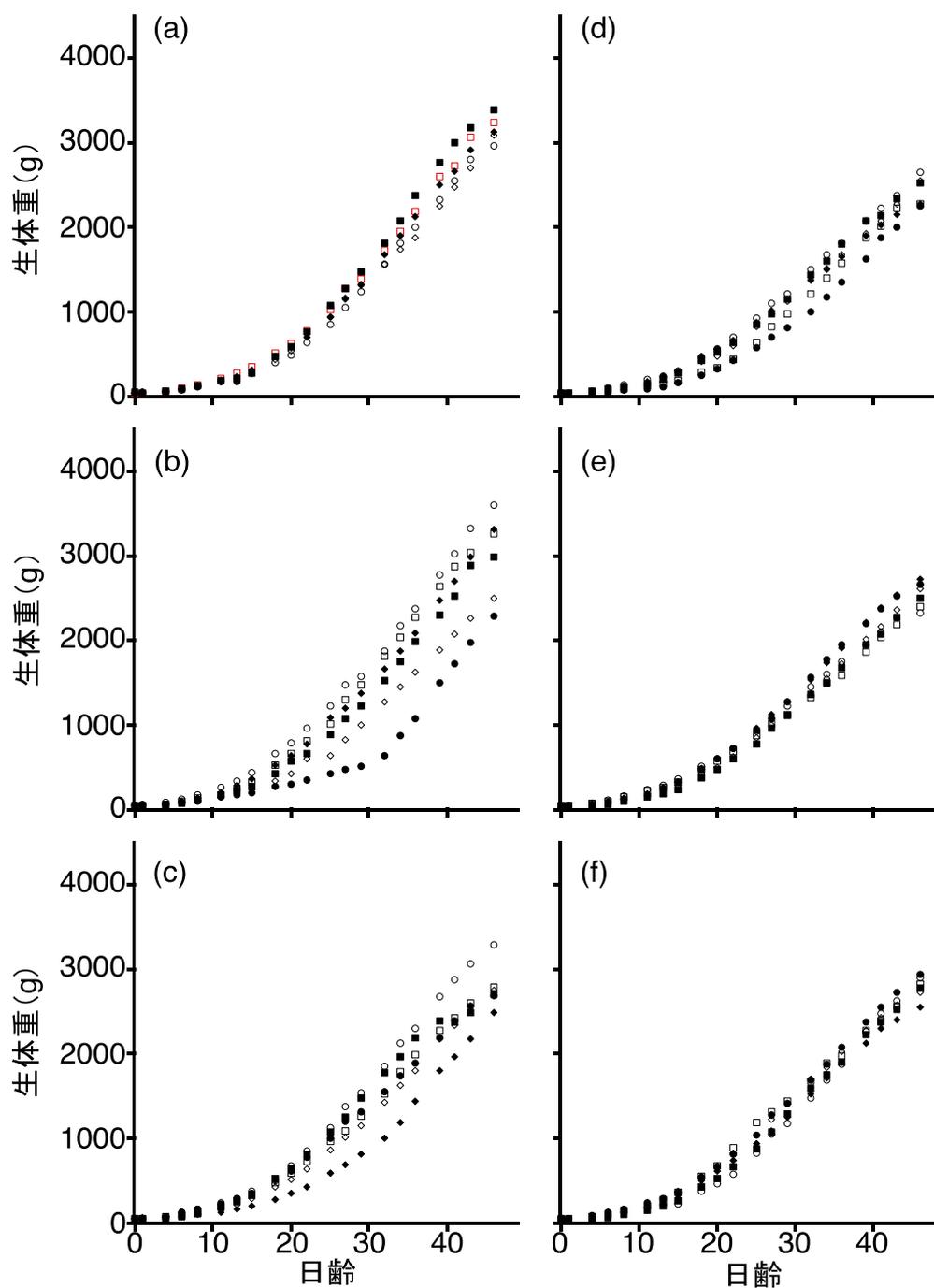
Appendix

補足データ 1. 飼育試験に使用した表示栄養成分量.

飼育試験での用途	第1クール 前期飼料	第2クール 前期飼料	第1・第2クール後 期飼料
飼料銘柄	育雛前期A	FO餌付クランブル	あおぞら仕上
粗タンパク質(%以上)	19.5	24	19
粗脂肪(%以上)	1.5	3.0	5.5
粗繊維(%以下)	5.0	5.0	5.0
粗灰分(%以下)	8.0	8.0	8.0
カルシウム(%以上)	0.9	0.7	0.45
りん(%以上)	0.6	0.55	0.3
代謝エネルギー(kcal以 上)	2,930	3,000	3,300

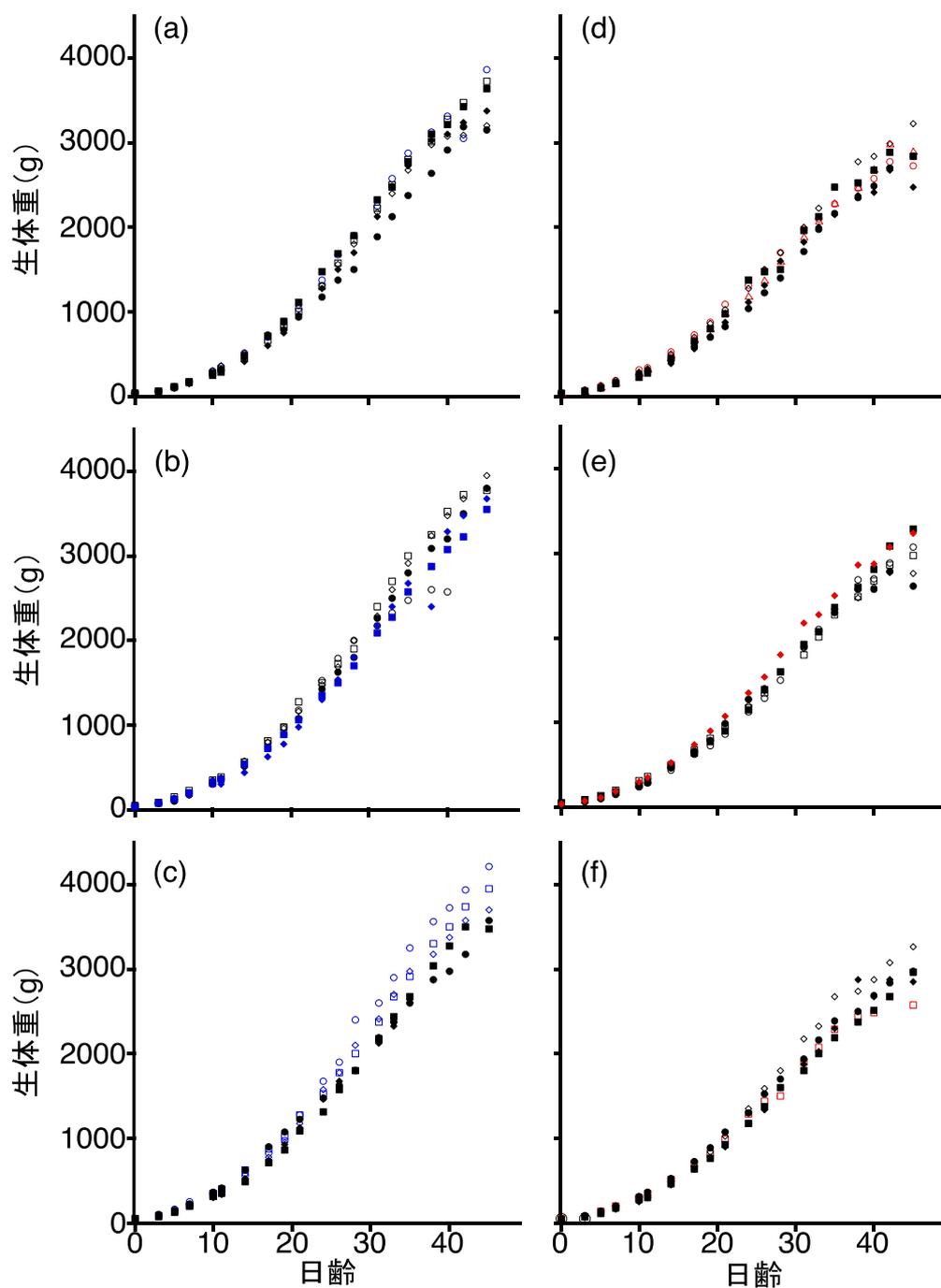
補足データ 2. 飼育試験に使用した表示原料配合割合.

飼育試験での用途	第1クール 前期飼料	第2クール 前期飼料	第1・第2クール 後期飼料
飼料銘柄	育雛前期A	FO餌付クランブル	あおぞら仕上
穀類	65%	54%	64%
植物性油かす類	31%	34%	24%
動物質性飼料	0%	5%	6%
その他	4%(動物性油脂を含まない)	6%(動物性油脂を含む)	6%(動物性油脂を含む)
抗菌性飼料添加物	なし	アビラマイシン, サリノマイシンナトリウム	なし



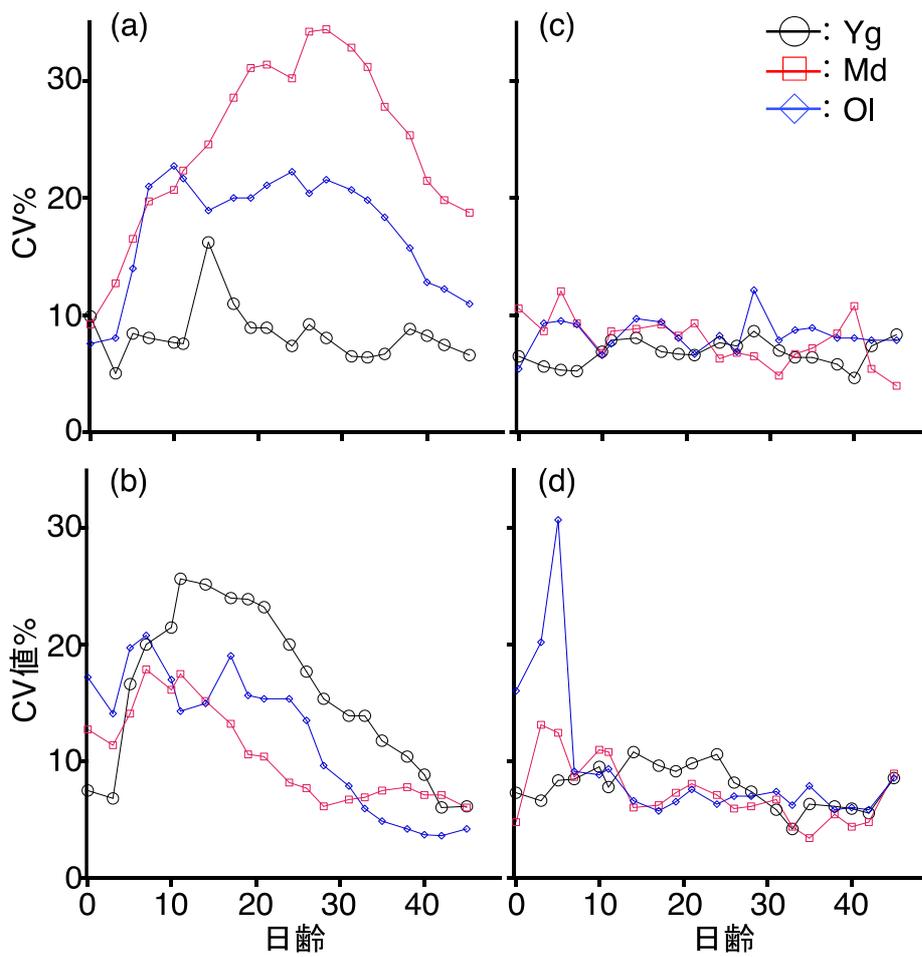
補足データ 3. 第1クールの雌雄別各種卵時期群.

(a) Yg のオス, (b) Md のオス, (c) Ol のオス, (d) Yg のメス, (e) Md のメス, (f) Ol のメス.
各グラフ内のプロットは個体ごとの体重推移を示す.



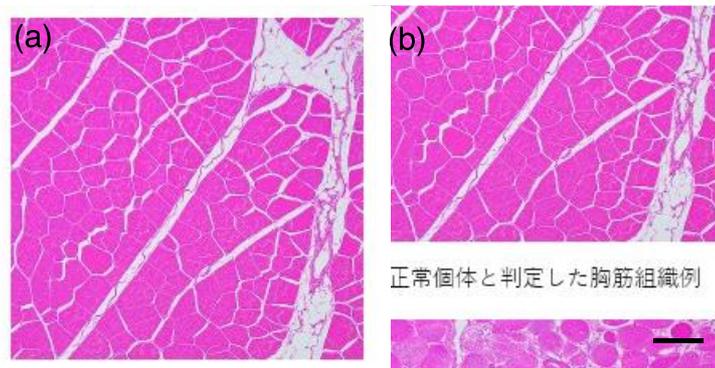
補足データ 4. 第2クールの雌雄別各種卵時期群.

(a) Yg のオス, (b) Md のオス, (c) Ol のオス, (d) Yg のメス, (e) Md のメス, (f) Ol のメス.
 各グラフ内のプロットは個体ごとの体重推移を示し, 赤色のマーカーは WB 発現した個体, 青色のマーカーは正常な個体を示す.



補足データ 5. 各群の CV%推移.

(a) 第1クールのオス, (b) 第1クールのメス, (c) 第2クールのオス, (d) 第2クールのメス.



正常個体と判定した胸筋組織例

補足データ 6. 正常個体と WB 発現個体の HE 染色標本.

(a) WB 発現個体, (b) 正常個体. スケールバーは 100 μm を示す.