

博士学位論文

学位論文内容の要旨および審査結果の要旨

氏 名 長谷川 靖洋

学位の種類 博士（農学）

学位授与の条件 酪農学園大学学位規程第3条第4項に該当

学位論文の題目 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

審査委員

主査 教授 堂地 修（動物資源生産学）

副査 教授 山田 未知（動物資源生産学）

副査 教授 岩崎 智仁（食品機能生化学）

副査 准教授 渡邊 敬文（獣医解剖学）

副査 川崎 武志（人と鳥の健康研究所）

論文要旨

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

長谷川 靖洋

ブロイラーの胸筋において **Wooden Breast**(以下, **WB**)と呼ばれる新奇な骨格筋障害が多発している。**WB** を発現した胸筋では, 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, 表面は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。また, 組織学的変化の傾向として, 頭側領域における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, 間質の水腫などが共通所見として示されており, これらの発現は胸筋組織内で生じる酸化ストレスを原因と考えている。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深刻な問題となっている。本研究では **WB** 発現胸筋について多角的に検討し, 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酸化ストレスとの関係性を明らかにするとともに, **WB** を発現した胸筋の食肉製品としての可能性を示した研究である。

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ける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は有意に高いことを明らかにした。さらに, 筋組織における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測定結果にも反映されることが再確認され, **WB** の発現は過度な酸化ストレスを原因とすることを明らかにした。

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、ミトコンドリアにおける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性を明らかにするとともに、WB重症度ごとに組織における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ける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。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。

第3章では、前章までに明らかにしたWB発現胸筋における組織の構造特性が、死後熟成による生化学的ならびに組織化学的变化に伴う力学物性に及ぼす影響と、WB発現胸筋を原料として製品化した際に、その加工品のテクスチャーにどう関係するかについて調査した。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発現胸筋の硬さは、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。したがって、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。

本研究でおこなった一連の研究を総括すると、近年、ブロイラーを解体処理したときに多く見られる胸筋のWBと呼ばれる異常硬化した状態の本質は、著しい酸化ストレスが要因の筋変性と線維化が胸筋に表出したものであることが明らかになった。また、筋変性過程にあるWBを食品として利用した際の理化学ならびに品質特性の低さについても明らかにした。

1. 論文評価点数

評価項目	主査 (堂地)	副査 (山田)	副査 (岩崎)	副査 (渡邊)	副査 (川崎)
テーマのたて方	5	5	5	5	5
研究の背景	5	5	5	5	5
研究の方法	5	5	5	5	5
研究の結果	5	5	5	5	5
考察と結論	5	5	5	5	5
参考論文	5	5	5	5	5
合計	30	30	30	30	30

2. 論文審査の要旨および結果

論文の審査は論文評価点数の項目にしたがって審査を行い、本論文はすべての項目において高い評価を得たその概要については以下の通りである。

近年のプロイラー産業は専用育種系統の造成に成功し、世界的な食肉需要に適応して堅調に業績を伸ばし続けており、グローバル世界においては最も成功した業種と言えるしかし、西洋社会に要求される高い胸肉歩留まりを求めて過度な育種開発をした結果、この10数年で急速に胸筋異常が認められるようになった特にゴム鞠のように硬くなった胸筋、いわゆる異常硬化胸筋 (wooden breast、以下 WB)は、その発現頻度の高さ、生産効率ならびに製品品質への影響の大きさから、関連業界で強い懸念材料になっている加えて、WBの発現は、種鶏供給会社の寡占により全世界的な問題になっている。これらのことから日本で本研究を展開する意義は非常に大きく、関連業界への貢献が期待される。

第1章では、国内の商業用食鳥処理場で処理された胸筋を用いて、異常硬化好発領域とその他の領域で、剪断力価と筋変性ならびに酸化ストレスマーカーとしてのリポフスチンの蓄積量等の指標を用いてWBの評価を行ったその結果、剪断力価の高い領域は腹部の頭側部であり、筋組織の変性度合いや線維化、リポフスチン蓄積量も底いことから、酸化ストレス→筋変性→繊維化(結合組織量の増大)→高い剪断力価の関係が明示された。さらにリポフスチン蓄積量と酸化ストレスレベルの関連を補完する目的で、それぞれの部位の脂質酸化指標であるTSARS値を計測したところ、リポフスチン蓄積量の増減とよく一致していることが示され、WBの発現が酸化ストレスに起因することが明らかになった。

酸化ストレスの増大とは、活性酸素種の蓄積により生体内の酸化反応が充進した状態である。哺乳動物の場合、活性酸素種は主に呼吸により酸素を取り入れてATPを合成する

酸化反応の副次的に産生される。このため ATP の合成の場である ミトコンドリアでは常に多くの活性酸素が産生されるが、その活性酸素を除去するシステム(抗酸化酵素)も併せて生体には備わっている。しかし異常硬化した部位ではリポフスチンの蓄積量や TSARS 値が高い。そこで第 2 章では、本学の実験鶏舎で飼育したプロイラー(ROSS 308)の異常硬化の重症度(Normal, Mild, Severe の 3 区分)と筋ミトコンドリアの形態やその数の変化を明らかにするとともに、筋組織における抗酸化酵素遺伝子の発現レベルについて調べた。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、Mild および Severe の筋組織ではミトコンドリアが大きく、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抗酸化酵素遺伝子の発現量は、SOD1 および SOD2 で Normal が最も高く、Mild と Severe より有意に高かったこれらのことから、WB では抗酸化酵素の発現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、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。

1 章と 2 章では WB の筋肉としての特徴(組織構造や発現遺伝子解析等)を調査することで正常胸筋との差異を明確にしたが、3 章では、タンパク質源としての食肉という視点から WB を分析することを目的に、死後熟成(軟化)に伴う骨格筋の生化学的および組織構造的変化と肉組織の力学物性変化の関係を詳細に検討したさらに WB からミオシンを抽出し、その物理化学的性質を調べた死後の WB では内因性プロテアーゼ活性が充進しており、筋原線維タンパク質に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。加えて、結合組織量が WB 発現胸筋で著しく多く、WB 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。WB からミオシンを抽出し、その特性について調査した結果、WB のモデルソーセージはゲル形成能が低く、低い弾性率を示すことから、WB 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。

以上により、本研究では現在のプロイラーに散見される WB という胸肉異常について生化学的、ならびに組織化学的手法で発現要因に迫りその一部を明確にしたすなわち、WB は筋ミトコンドリアで発生する活性酸素を除去するための SOD1 および SOD2 といった一部の酵素の発現量が低下したことで、蓄積した活性酸素種が細胞内の様々な膜組織を脆弱にし、ミトコンドリア等のオルガネラの機能不全が生じて、筋変性に至る連続した現象であることを明らかにした。またリポフスチンは未分解の脂質成分とタンパク質の重合体であることから、もっとも筋変性が著しく剪断力価の高い腹部頭側部でその蓄積量が高いことから明らかである。加えて骨格筋でのリポフスチンの蓄積量と酸化ストレスの相関が得られたことは、比較的簡便な組織観察手法で酸化ストレスを定量できることを意味しており、その点でも本研究の評価は高い。さらに、主要な筋原線維タンパク質であるミオシンの理化学的特性から、WB の加工特性の低さの一部も説明できることが示されたこのようなことから、本研究の結果は、プロイラーの WB の発現を低下させるために必要な基礎的知見と WB の利活用における有益な情報を提供しており、関連業界の振興に貢献するとともに、関連研究分野の発展にも寄与する内容である。

最後に、日本国内でこの異常硬化胸筋を対象に研究を展開している研究者は見当たらず、この点においても本研究は高く評価できる

以上のことから、審査員一同は、長谷川靖洋氏が提出した本論文が博士（農学）に値するものと判断した。

3. 最終試験の結果

審査委員 5 名が最終試験を行った結果、合格と認める。

2024 年 2 月 7 日