

博士論文

異常硬化胸筋発現鶏の生体簡易診断方法の確立および臨床病理学的研究

2019 年 3 月

川崎 武志

## 目次

第 1 章 序論	4
第 2 章 異常硬化胸筋発現鶏の生体簡易診断方法	7
2-1 はじめに	7
2-2 鶏群におけるスクリーニング対象個体の目視確認指標	8
2-3 生体検査	9
2-3-1 材料および方法	
2-3-2 成績	
2-4 血液生化学検査	15
2-4-1 材料および方法	
2-4-2 成績	
2-5 解剖検査	17
2-5-1 材料および方法	
2-5-2 成績	
2-6 細菌学的検査	20
2-6-1 材料および方法	
2-6-2 成績	
2-7 組織学的検査	20
2-7-1 材料および方法	
2-7-2 成績	
2-8 まとめ	31
第 3 章 ブロイラー胸部の異常硬化の経時的変化と臨床病理学的研究	34
3-1 はじめに	34
3-2 供試動物，飼育および生体観察	35
3-2-1 材料および方法	
3-2-2 成績	
3-3 血液生化学検査	40
3-3-1 材料および方法	
3-3-2 成績	

3-4 解剖検査	44
3-4-1 材料および方法	
3-4-2 成績	
3-5 組織学的検査	45
3-5-1 材料および方法	
3-5-2 成績	
3-6 まとめ	53
 第4章 異なる生化学測定系における測定値の相関	 58
4-1 はじめに	58
4-2 材料および方法	58
4-3 成績	58
4-4 まとめ	58
 第5章 総括	 61
 謝辞	 63
文献	64

## 第1章 序論

ブロイラーとは、食肉生産のために飼育された若鶏の呼称である（田名部，2010）。ブロイラー用育種系統では、低い生産費用で可食部位の高い歩留まりを得られることが飼育目的を達成していくうえで重要視される。すなわち、産肉能力に関する経済形質として、増体（発育速度）、肉付き（むね肉ともも肉の歩留まり）、強健性（抗病性，ストレス耐性，群飼育に対する順応性），飼料利用性（飼料を肉に転換する能力）に加え，高い繁殖能力（産卵率，受精率，ふ化率）が要求される（駒井，2010）。しかし，産肉能力と産卵能力には遺伝的に負の相関があるために，一つの系統で両方の形質を追求することができない（Bell, 2001）。そのため，育種改良においては，産肉能力の向上を目標とする系統と産卵能力の向上を目標とする系統を同時に維持する必要があることから，育種改良と形質を安定化させて系統を維持するためには費用をまかなうための膨大な資金が必要となる。ブロイラーの育種においては，1960年代あたりから欧米の資本力のある大規模な育種会社による育種事業の寡占化が進み始め，1970年代になると，全世界でのブロイラー生産が急増するのに伴い，育種会社の規模も急拡大していった（駒井，2010）。わが国の鶏肉生産においても，ほぼ同時期から飼料穀物の輸入商社を中心に欧米で育種された系統の導入が積極的に行われ，商社や食肉企業によるブロイラー生産の大規模化が拡大していった（吉田，1984）。今日では世界のブロイラー生産の大部分を占める育種系統は，3つの育種会社（Cobb-Vantress, Aviagen, Groupe Grimaud）によって維持・供給されており，今日のわが国においては，Aviagenが維持・供給する Ross308の育種系統がブロイラー鶏肉生産の大部分を占めているといわれている。Ross308は，わが国のブロイラー鶏肉生産において長く利用されている育種系統のブランドであり，市場の要請に応えるだけの高い生産能力と飼育の安定性が生産者に支持されている。Ross308だけでなく，世界で大きなシェアを獲得しているブロイラーの育種系統においては，市場ニーズにあわせて，生産能力の向上を目的として育種改良が続けられており，鶏肉生産供給市場の安定化に大きく寄与している。ROSS308の成績指標は，無鑑別（雌雄混合）飼育の場合，1988年の成績指標において，42日齢での体重 1,940g，飼料要求率 1.830であった（ロス・ブリーダーズ社，1991）が，2014年の成績指標において，42日齢での体重 2,809g，飼料要求率 1.687とされている（Aviagen，2014）。すなわち，26年前のブロイラーと比較して，同じ飼育期間で 1.4 倍を超える体重に成長するように改良されており，同時に飼料の利用効率も大幅に改善されている。近年の育種改良においては，体重や歩留まりの向上は，とくに胸筋の発達向上の



寄与するところが大きい(Clark and Velleman, 2017)。Collins et al. (2014)は、Cobb500の系統において2012年の時点での胸筋の歩留まりが1955年と比較して約10%大きくなったことを報告している。このような育種改良による胸筋の歩留まり比率の増大は、ブロイラーの生産能力を向上させる一方で、生体恒常性を維持するうえで明らかなストレスをもたらし、と殺解体時に発見される筋肉組織の異常を誘発することに関与している(Soglia et al., 2016)。

ブロイラーやシチメンチョウのむね肉では、著しい褪色と滲出を伴う異常がしばしば発生し、その外観や保水性の低下などの性質がブタのPSEと同様であるとされ、1970年代から2000年代初頭まで原因や発生機序に関する数多くの研究がなされてきた(Smith and Northcutt, 2009)。このPSE様を呈する胸筋については、遺伝的要因のほか、飼育環境、食鳥処理場への輸送状態、と殺前の興奮状態、などが要因として挙げられており(Owen et al, 2009)、と殺後、体温が高い状態で急速なpH低下を伴う筋肉の死後代謝が進行することによって発生する(Woelfel, 2002)とされるが、いまだに本質的な発生機序について十分解明には至っておらず、今なお新たな発生が報告されている。

近年、ブロイラーの胸筋において、筋間脂肪組織の異常な発達によって筋線維に沿って乳白色の線条が発達するwhite striping (WS)と呼ばれる胸筋の外観的異常と、滲出液を伴う著しい褪色やゴムのような弾力性硬化が特徴的なwooden breastあるいはwoody breast (WB)と呼ばれる胸筋の外観的・物性的異常とが食鳥処理場における解体時に発見されるようになってきている。

これらの胸筋の異常というのは、あくまで解体処理時点からそれ以降の製品化された状態における平均的性質に対する相対的外観の違いに基づくものであるため、発生状況についての認識や判断には主観的な要素が大きく影響しているところがある。ブロイラーの胸筋の異常については、解体処理時点からそれ以降のむね肉の品質の観点から、外見的な色調や保水性、食感(テクスチャー)などについての問題とPSE肉様の変化との関連が長い間議論されてきた(Barbut, 1997; Van Laack et al., 2000)。しかし、WSやWBは、これまでみられていたPSE様の変化とは外見的に明らかに異なるレベルの変化であったことから、新奇な異常として注目された。WSについては、2012年頃から報告がみられはじめ(Petracci and Cavani, 2012; Kuttappan et al., 2012)、やや遅れて、フィンランドにおいて過去3年くらいの間に発生するようになってきた異常な硬化を伴う新奇な胸筋の異常がSihvo et al. (2014)によって報告された。これらの報告以降、WSとWBについては、いくつかの国で問題となっていることやその発生状況が次々に報告されてきている。わが国における発生事例の報告は少ないが、半杭(2013)は、2010年に食鳥処理場で発見されたWBと

同様の胸筋変性病変の事例を報告している。この報告における発生時期は、Sihvo et al. (2014) の報告とほぼ同じであるが、発生が確認されたニワトリの系統は異なる。また、著者らは、WS は 2012 年、WB は 2013 年に最初の事例を確認した（未発表）。それ以降、岩手県の食鳥処理場における発生事例（佐々木ら，2015；大津ら，2017）など、全国的に発生率の時期的変動を伴いつつ継続してみられていることを確認している。Kuttappan et al. (2013a) は、ブロイラーの胸筋における筋変性病変の発生が、胸筋の頭腹側表面に多く、烏口上筋や腓腹筋よりも、胸筋と腸脛骨筋で顕著に認められると報告した。また、ブロイラーにおいては、加齢に従い、また、体重が重くなるほど、WS, WB, および点状出血病変の発生が増加し、筋病変の程度が重くなることを示した（Kuttappan et al., 2017）。畜肉や家禽肉の外観は、消費者が購入を決定する際に品質を見極める要素の一つで、通常と異なる外観は、それ以外の品質に問題がない場合であっても購入を見送るきっかけになる（Kuttappan et al., 2013a）。

これまで、胸筋の外観的・物性的な異常は、製品化されたむね肉として製品化する処理工程以降に発見され、臨床症状として生時に発見されることはほとんどなかったことから、飼育期間中のニワトリにおける臨床症状などとの関連性は明らかにされていない。そのため、胸筋の異常が発生する背景や病態発生機序を生時から個体ごとに段階を追って直接確認することができなかった。加えて、生体のままでは、胸筋に生じる異常を目視で直接確認することができないという課題がある。そこで、本研究では、胸筋の器官としての機能と性質に着目し、WB 発現胸筋の病理組織学的変化の特徴を踏まえたうえで物理的な運動性検査や触診および血液生化学検査を組み合わせることで、生体において胸筋における WB 発現を簡便に発見する方法を検討することにした。また、この方法によって飼育期間の中間期に WB 発現鶏と WB 非発現鶏を選抜し、商業的なブロイラー飼育と同じ飼育条件で飼育を継続したときに個体ごとの臨床兆候がどのように変化するかを経時的に観察した。

## 第2章 異常硬化胸筋発現鶏の生体簡易診断方法

### 2-1 はじめに

近年、ブロイラーの胸筋 Pectoral major muscles において、筋線維に沿って乳白色の線条 (White Striping) を認め (以下, WS), 加えて、胸筋の退行性変化と続発する再生性変化が混合した組織障害を伴い、胸筋が異常に硬化して弾力を帯びる wooden (woody) breast と呼ばれる外観的・物性的異常 (以下, WB) が多発するようになってきている (Kuttappan et al. 2016)。Petracci and Cavani (2012) は、胸肉における WS の発生が深刻な肉質の問題として位置づけられていることを報告している。WS は、胸筋の筋線維走行に沿って筋間に乳白色の線条が出現することによって特徴づけられ、WB は、胸筋の異常な硬化および筋表面の滲出物の出現によって特徴づけられる (Bailey et al., 2015)。しかし、2 つの病態に関しての差異は明らかにはなっておらず、厳密には区分されていない。また、Kuttappan et al. (2012) は、白い線条の程度が重度になるにつれて、脂質症および線維症とともに慢性筋変性病変の発生が有意に増加したことを明らかにした。これらの変化は、食鳥処理場の解体ラインで発見され、顕著なものは外観的に商品としての価値を損なうため、ブロイラー産業において深刻な経済的損失につながっている (Soglia et al., 2016; Chatterjee et al., 2016; Petracci et al., 2015; Kuttappan et al., 2013a, 2016, 2017)。とくに WB では、胸筋全体にわたって、著明に褪色し、ゴムのような弾力性の硬化が著しく、多くは胸筋表層がゲル状の滲出液に覆われ、しばしば点状出血を伴い、加えて解体処理後、急速に多量のドリップを生じるため歩留まり重量を減じるなど、外観の異常とともに物性的にも通常の製品性状から大きく逸脱するため問題となる。この胸筋に発生する新奇な筋退行性変化は、Sihvo et al. (2014) によって詳細な病理組織観察が行われ、筋線維の変性・壊死、再生筋線維の出現、筋間結合組織の増生あるいは線維化、しばしば炎症細胞浸潤が認められることが報告された。その後、ブロイラー生産諸国において増体速度の速いブロイラーで同様の異常を呈する胸筋が次々に報告された (Bailey et al., 2015; Mudalal et al., 2015; Trocino et al., 2015; Velleman and Clark, 2015)。Velleman and Clark (2015) は、MYOD1, myogenin, decorin, TGF- $\beta$  および myostatin の遺伝子発現を含む WB 発現胸筋の全体的な形態学的評価をおこなった。また、WB に関する多くの病理学的研究が報告されているが、生体において WB を検出する方法は、これまで生産者の経験に依存するのみであっ

た(Velleman and Clark, 2015)。また、これらの研究のほとんどは食鳥処理場で処理されたと体を対象に実施されており、生体時における本症の臨床症状やその経過についての研究報告はほとんどない。

そこで、著者らは、胸筋の器官としての機能的特性から推定すると、WBを発現することで胸筋の収縮性や伸展性が損なわれ、上腕の可動性が抑制されるという仮説をたてた。本研究では、この仮説を証明するために、商業飼育されている43日齢のブロイラー鶏群において、両側翼の肘関節外側同士との接触性の有無と胸部触診でのゴムのような弾力感の触知の有無を指標として、WB発現鶏とWB非発現鶏をそれぞれ3羽ずつ選抜・供試し、個体別に生体検査、血液生化学検査、病理組織学的検査を行った。これにより、生体における翼の可動性および挙上性と生化学的・組織学的所見との関係を明らかにすることで、翼の可動性および挙上性の試験がWB発現鶏の臨床的な発見指標として実用可能であるかを検討した。

## 2-2 鶏群におけるスクリーニング対象個体の目視確認指標

食鳥処理場の解体ラインで発見されるWBの外観および物性的特徴は、胸筋の広範囲あるいは局所における著明な硬化と膨隆、顕著な褪色、加えて多くの場合、やや濁ったゲル状の滲出液が胸筋表層を被覆し、しばしば散在性の点状出血や小さな出血巣、筋間に目立つ幅広の白い線条が認められる(Sihvo et al., 2014)。著者らは、日常的な食鳥処理場での調査において解体直後の胸筋にこれらの変化を伴うものが散見されることを確認している(図1)。また、WBの胸筋組織では、筋線維走行に対して垂直方向の断面において、筋線維径の大小不同、筋線維の円形化(多角形角の欠如)、同水平断面において、分枝した筋線維、横紋が不明瞭化し好酸性の染色性が増強した硝子様壊死、変性筋線維内および周辺の主としてマクロファージと偽好酸球からなる炎症細胞浸潤、中心核連鎖を伴う細くやや好塩基性を帯びる再生筋線維、筋線維間の疎性な線維増生や筋束間結合組織増生による線維化が主な所見である(Sihvo et al., 2014)。これらの組織所見の特徴から、WBは食鳥処理過程において死戦期から死後にかけて生じる変化ではなく、ブロイラーとしての成長段階で何らかの原因によって胸筋に生じる筋組織の退行性変化と続発する再生性変化が混合した組織障害であることが明らかである。胸筋は胸骨と上腕骨とをつないで収縮によって上腕の内転(翼の下制)に働く強大な筋であり、上腕の可動性を支配する主要な筋である(加藤・山内, 1998; König et al., 2009)。したがって、胸筋に組織

障害性の硬化が起こった場合には、上腕の可動性や挙動が著しく制限されることが推測される。そこで、本研究では、これらの WB の解剖学的特性を踏まえ、歩行時における翼の可動性と姿勢、歩様を目視確認指標として観察し、飼育中の鶏群からの WB 発現鶏の摘発を試みた。

。

## 2-3 生体検査

### 2-3-1 材料および方法

まず、食鳥処理場で発見される WB 発現胸筋（図 1）の触診を繰り返し、あらかじめ特徴的な弾力のある触感を確認した。つぎに商業飼育されている 43 日齢のブロイラー鶏群（Ross 308, 雌雄混合飼育）が飼育されている鶏舎内をゆっくり歩いて観察しながら、歩様や姿勢、翼の動作を観察し、個体ごとに上腕の可動性や挙上性の異常の検査と胸部触診を行った。翼の挙上性試験では、ニワトリを立位に静止させた後、背後から静かに両側翼下に手を入れ、腋下から上腕を支えた状態でゆっくりと背側へ持ち上げ、両側翼の肘関節外側同士との接触性を確認した。胸部触診では、両側上腕の挙上時と下制時の弾力性を確認した。これらの検査において、上腕可動性および挙上性の著明な低下を認め、胸部がゴムのように弾力に富み、異常に硬いと判定されたニワトリと、上腕可動性および挙上性に異常を認めず、胸部は柔軟性を維持していると判定されたニワトリを選抜した。前者を WB 発現鶏、後者を WB 非発現鶏として、それぞれ 3 羽ずつを本研究における個体別の精査に供した。これらの供試鶏は、WB 発現鶏を Case No.1-3, WB 非発現鶏を Case No.4-6 とし、個体ごとに立位姿勢検査、翼の挙上性試験を実施し、同時に写真撮影を行い、生体体重を測定した。

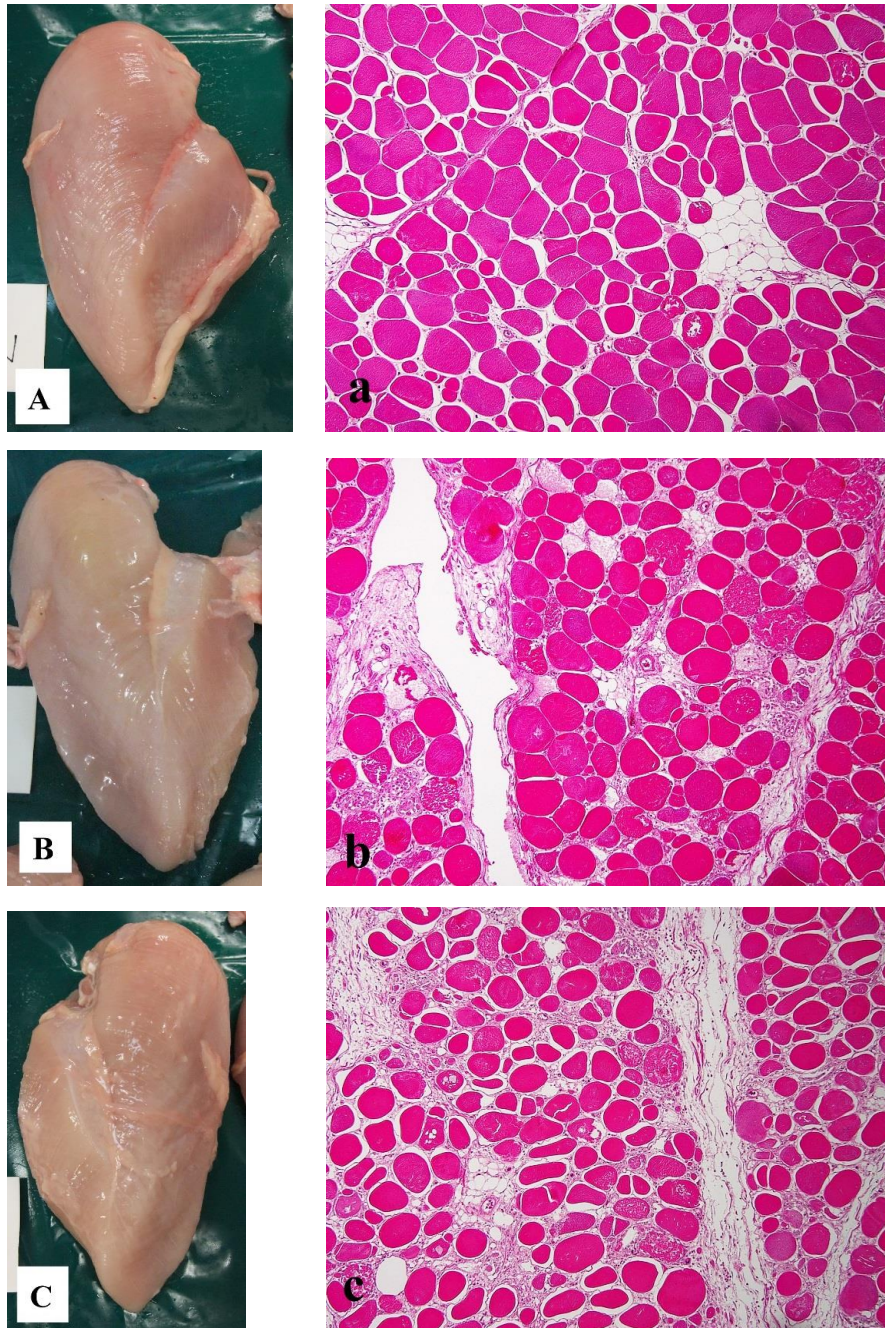


図 1 食鳥処理場で確認された WB 発現胸筋と正常胸筋の例。 正常胸筋の皮側面 (A) と比較すると、WB 発現胸筋 (B, C) は、全体的に褪色しており、加えて腋下正中側を中心に硬化して乳黄白色を呈したり (B)、モザイク状の線条が生じていたり、あるいは皮側面の広い範囲が混濁した乳白色のゲル状滲出物で覆われていたり (C) していた。WB 発現胸筋の組織 (b, c) では、著明な筋線維の変性、筋線維間における疎性線維増生、炎症細胞浸潤などがみられた。解体直後における物理的特性としては、正常胸筋はしなやかで柔らかいが、WB 発現胸筋は腋下正中側を中心に限局性ないし全体に及びゴムのように弾性に富んだ顕著な硬化が確認される。



## 2-3-2 成績

供試鶏の生体体重は、WB 発現鶏；Case No. 1, No. 2, No. 3 が順に 3,025g, 3,590g, 2,920g, WB 非発現鶏；Case No. 4, No. 5, No. 6 が順に 2,970g, 2,760g, 2,770g であった。性別については、未性成熟日齢であることから外形から厳密に判別し難いため、剖検によって判別した。

WB 発現鶏と WB 非発現鶏の立位姿勢は、それぞれ図 2 および図 3 に示した。WB 非発現鶏は、いずれも立位で静止させると背線は胸部から尾方向に下がるように傾斜し、頭部を胸腰背線よりも高い位置に保持したが、WB 発現鶏は背線が腰部から頭方向に下がるように傾斜し、頭部は常に胸腰背線よりも低い位置に保持される傾向（前傾姿勢）であった。背線より頭部が低くなる前傾姿勢では、前胸部の地上高も下がるために重心が前方に偏ることで前後方向にバランスが悪く、両後肢は立位を継続したり歩行したりする際に外転して開脚しやすく、歩行時にはときおりふらつくために立ち止まり、WB 発現鶏は両翼を広げてバランスをとる動作を繰り返した。

翼の挙上性試験における両翼の挙上状態は、それぞれ図 4 に示した。WB 非発現鶏では、両側翼は背線を超える高さまで抵抗なく挙上でき、肘関節外側同士を無理なく接することができた。しかし、WB 発現鶏では、両側翼の挙上に際して抵抗があり、2 羽では背線の高さまでしか挙上できず、1 羽は背線の高さよりやや高い位置まで挙上できたが、いずれにおいても肘関節外側同士を接することはできなかった。胸部触診においては、WB 非発現鶏では、両側翼を挙上すると幾分胸部の硬さは増したが、弾力性は強くなく、両側翼を下げて胸部静止位置に戻すと柔らかくなった。一方、WB 発現鶏では、両側翼を挙上しても胸部静止位置に戻しても腋下から前胸部正中にかけての領域から全体にわたりゴムのような弾力性を帯びていた。

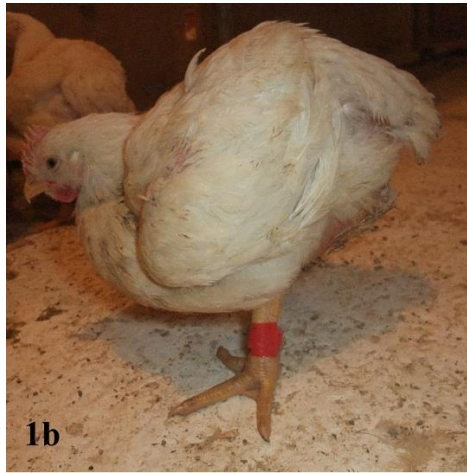


図2 WB発現鶏。 1aと1bはCase No.1, 2aと2bはCase No.2, 3aと3bはCase No.3。背線が腰部から頭方向にかけて下がり、頸部を持ち上げようとしても背線より高い位置に保持することが難しく、立位において重心が前方に偏り前後方向に不安定である。



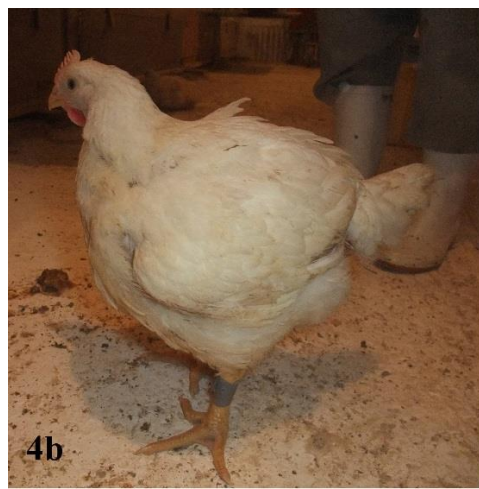


図3 WB非発現鶏。 4aと4bはCase No.4, 5aと5bはCase No.5, 6aと6bはCase No.6。いずれも立位で背線が胸部から尾方向にかけて下がり，頭部を背線よりも高い位置に保持することができた。Case No.6は背線の胸部から尾方向にかけて下がる傾きが弱く，静止時の頭部の保持位置も若干低かった。



図4 翼の挙上試験。 1-6は順に Case No.1-Case No.6。Case No.4-Case No.6 (WB 非発現鶏)は左右の肘関節外側同士を接する位置まで挙上することができた。一方、Case No.1と Case No.2 (WB 発現鶏)は両翼とも背線の高さ程度にしか挙上できず、Case No.3 (WB 発現鶏)は両翼を背線の高さよりやや高く挙上できたが、両側翼の肘関節外側同士を接することはできなかった。

## 2-4 血液生化学検査

### 2-4-1 材料および方法

本研究に供した WB 発現鶏 (Case No.1-Case No.3) および WB 非発現鶏 (Case No.4- Case No.6) からは、生体検査後、個体ごとに翼下静脈から 23 ゲージの滅菌注射針を装着した 3ml 滅菌ディスプレイ注射器を用いて採血した。採血した血液は、直ちにヘパリンリチウム入りの真空採血管に移し、6,500rpm (2,200×g) で 5 分間遠心分離を行った。分離した血漿は、直ちに血球成分を取り除くため、新しい 1.5ml マイクロチューブに移し、-20℃の冷凍庫に速やかに保存した。これらの血漿は、生化学検査を実施する直前に解凍して室温に戻した。血漿は、解凍後、マイクロチューブに入れたままよく転倒混和し、濁りや浮遊物の有無を確認した。濁りや浮遊物が認められた血漿は、新しい 1.5ml マイクロチューブに 0.5ml 取り、1,3-dichloro-1,1,2,2,3-pentafluoropropane (FRIGEN® II; Siemens Healthcare Diagnostics, Malvern, PA, USA) を 1.0ml 加えて 5 分間震とうした後、冷却遠心分離器 (MX-105, トミー精工, 東京) 12,000rpm (13,000×g) で 1 分間遠心分離し、脱脂血漿とした。生化学検査は、VetScan VS2 (Abaxis, Union City, CA, USA) と専用の multirotor III (Abaxis, Union City, CA, USA) を用いて行い、血漿中の L-aspartate aminotransferase (AST), 胆汁酸塩, creatine kinase (CK), 尿酸, ブドウ糖, カルシウム, リン, 総蛋白, アルブミン, グロブリン, カリウムイオン (K<sup>+</sup>), 塩化ナトリウムイオン (Na<sup>+</sup>) を測定した。測定に際しては、必要に応じて血漿を希釈液 (IDEXX Laboratories, Westbrook, ME, USA) で希釈した。

### 2-4-2 成績

血漿生化学検査の個体ごとの各項目の測定結果は、表 1 に示した。今回測定した項目のうち、AST は、WB 発現鶏 ; 588-635U/L, WB 非発現鶏 ; 300-553U/L, CK は、WB 発現鶏 ; 53,760-59,580U/L, WB 非発現鶏 ; 19,300-63,800U/L, K<sup>+</sup> は、WB 発現鶏 ; 10.5-10.7mmol/L, WB 非発現鶏 ; 8.1-11.0mmol/L であり、WB 非発現鶏の 2 羽 (Case No.1,2) のこれらの測定値は、WB 発現鶏と比べて低値であったが、WB 非発現鶏の 1 羽 (Case No.6) においては、WB 発現鶏と同様の水準であった。その他の項目については、WB 発現鶏と WB 非発現鶏との間で差はほとんどなく、胆汁酸は、すべての個体で <35Umol/L, 尿酸は、WB 発現鶏 ; 3.5-

5.2mg/dL, WB 非発現鶏; 2.3-6.2mg/dL, グルコースは, WB 発現鶏; 215-243mg/dL, WB 非発現鶏; 230-251mg/dL, カルシウムは WB 発現鶏; 11.6-12.6mg/dL, WB 非発現鶏; 11.5-12.2mg/dL, リンは, WB 発現鶏; 6.6-7.6mg/dL, WB 非発現鶏; 6.3-6.8mg/dL, Na<sup>+</sup>は WB 発現鶏; 145-148mmol/L, WB 非発現鶏; 144-145mmol/dL であった。総蛋白は, WB 発現鶏; 3.5-4.6g/dL, WB 非発現鶏; 3.8-4.1g/dL, アルブミンは, WB 発現鶏; 2.1-2.9g/dL, WB 非発現鶏; 2.3-2.6g/dL, グロブリンは WB 発現鶏; 1.4-1.7g/dL, WB 非発現鶏; 1.4-1.5g/dL であった。

Case No.	WB 発現鶏			WB 非発現鶏		
	1	2	3	4	5	6
AST U/L	635	588	595	346	300	553
BA Umol/L	<35	<35	<35	<35	<35	<35
CK U/L	54,720	53,760	59,580	19,760	19,300	63,800
UA mg/dL	3.5	3.7	5.2	2.3	3.1	6.2
GLU mg/dL	236	215	243	230	251	236
Ca mg/dL	12.2	11.6	12.6	12.0	11.5	12.2
PHOS mg/dL	6.7	7.6	6.6	6.4	6.3	6.8
TP g/dL	4.2	3.5	4.6	3.8	3.8	4.1
ALB g/dL	2.8	2.1	2.9	2.3	2.4	2.6
GLOB g/dL	1.4	1.4	1.7	1.5	1.4	1.4
K <sup>+</sup> mmol/L	10.5	10.7	10.5	8.1	8.6	11.0
Na <sup>+</sup> mmol/L	147	145	148	145	144	145

表 1 血漿生化学検査における供試鶏ごとの各項目測定値。 AST; L-aspartate aminotransferase, BA;胆汁酸, CK;creatine kinase, UA;尿酸, GLU;グルコース, Ca;カルシウム, PHOS;リン, TP;総蛋白, ALB;アルブミン, GLOB;グロブリン, K<sup>+</sup>;カリウムイオン, Na<sup>+</sup>;ナトリウムイオン。



## 2-5 解剖検査

### 2-5-1 材料および方法

WB 発現鶏 (Case No. 1-Case No. 3) および WB 非発現鶏 (Case No. 4-Case No. 6) には、生体検査および採血の後、23 ゲージの滅菌ディスプレイ注射針を装着した 2.5ml 滅菌注射筒を用いてペントバルビタールナトリウムを体重当たり 20-30mg 以上翼下静脈（橈骨静脈）から投与して麻酔し、深麻酔下で頸部動脈を切断して放血することにより安楽死処置を行った。安楽死処置したこれらの供試鶏は、1 羽ずつ仰臥位に固定し、消毒したハサミで胸骨尾側縁正中位置から左右方向に切り込みを入れ、1 本目の滅菌スワブ（シードスワブ γ 1 号，栄研器材，東京）を皮下に無菌的に挿入して胸筋表層を拭い、胸部皮下からの細菌分離材料とした。続いて、皮膚表層の汚れが皮下組織に付着しないように静かに剥皮した。胸腹部を剥皮し、露出した胸骨突起の尾側端に沿って無菌的に直径 1cm 程度切開して穴を開け、2 本目の滅菌スワブを肝臓の臓側面に沿うように頭方向に静かに挿入し、心臓に達する位置まで漿膜を拭い、漿膜からの細菌分離材料とした。

胸筋は、胸部を覆う皮膚を剥離し、皮側面の外観を観察した。つぎに、両側の胸筋を骨や筋腱への付着部位から丁寧に剥がして分離した後、重量を測定し、胸筋の体重比を算出した。また、両側後肢は、股関節および大腿部構成筋の腰臀部から切り離し、剥皮・趾の離断後、大腿から下腿にかけての骨と筋群をまとめて重量測定し、それらの体重比を算出した。

この解剖検査では、以上のように骨格筋の外形を比較観察するとともに、胸腹部諸臓器器官の肉眼的な異常の有無を確認した。組織検査のための採材では、胸筋のほか、脾臓、肝臓、腎臓、生殖器（卵巣または精巣）の組織片を採取し、10%ホルマリンに浸漬固定した。供試鶏個々の性別は、解剖検査時に腹腔内の生殖器を確認することで確定した。

### 2-5-2 成績

供試鶏の性別、胸筋重量、後肢重量とそれらの重量/体重比は表 2 に示した。胸筋重量/体重比は、WB 発現鶏；8.6-11.1%，WB 非発現鶏；8.4-9.0%であった。また、後肢重量/体重比は、WB 発現鶏；8.7-9.9%，WB 非発現鶏；7.3-9.4%であった。

胸筋の外形の比較観察では、両側胸筋の頭側皮側隆起頂点間の幅が WB 非発

現鶏と比較して WB 発現鶏では著明に拡大していた（図 5）。WB 発現鶏（Case No.1-No.3）の胸筋皮側表面には、筋線維走行に沿って異なる幅の乳白色ないし灰白色の線条（Milky white striping and/or grayish white striping）が認められた。Case No.1（WB 発現鶏）の胸筋では、胸筋皮側表面全体がゲル状で濁りのある乳白色の滲出物で覆われており、局所的な点状出血が認められた（図 6）。また、WB 発現鶏の胸筋は生体検査時と同様、全体的にゴムのような弾力性を帯びていた。後肢および肝臓、脾臓、腎臓、生殖器については、肉眼的な異常は確認できなかった。

	WB 発現鶏			WB 非発現鶏		
Case No.	1	2	3	4	5	6
性別	♂	♂	♀	♂	♀	♀
体重 (g)	3,025	3,560	2,920	2,970	2,760	2,770
胸筋重量 PmW (g)	335	306	271	249	232	248
PmW／体重 (g/g)	0.111	0.086	0.093	0.084	0.084	0.090
後肢重量 LgW (g)	300	345	255	280	250	203
LgW／体重 (g/g)	0.099	0.097	0.087	0.094	0.091	0.073

表 2 供試鶏の性別，胸筋重量，後肢重量とそれらの重量/体重比。

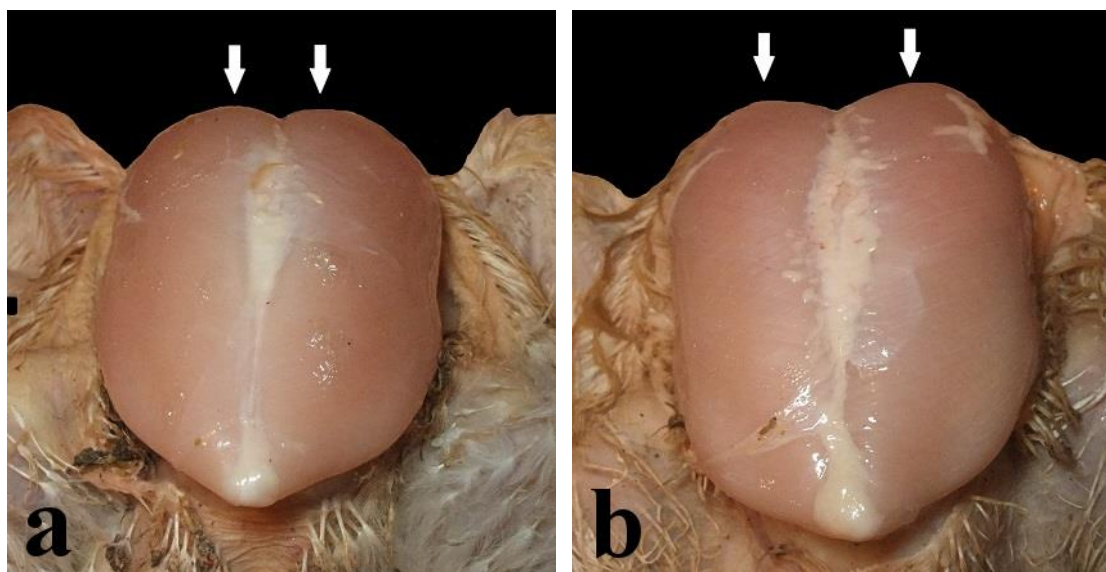


図 5 WB 非発現鶏 (a, Case No. 4) と WB 発現鶏 (b, Case No. 2) における両側胸筋の頭側皮側隆起頂点間の幅。 両側頂点 (矢印) 間の距離は, WB 非発現鶏よりも WB 発現鶏で大きく広がっていた。

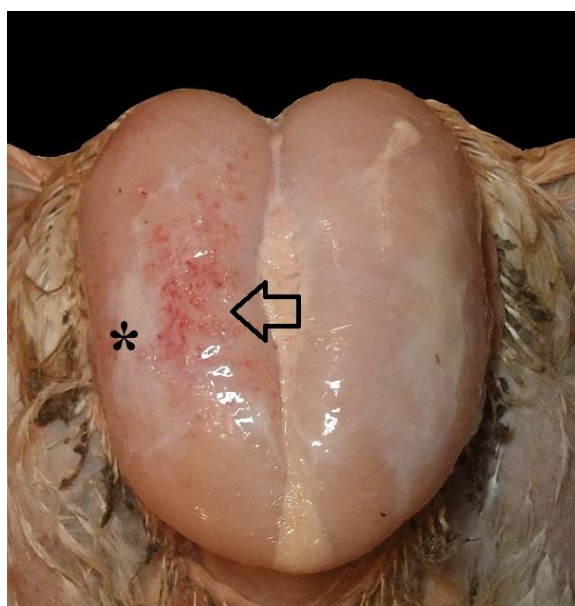


図 6 WB 発現鶏 (Case No. 1) における胸筋皮側面の著明な滲出物と点状出血。 粘稠性で乳白色の滲出物が胸筋皮側面を広く覆い (\*), 左側胸筋中央付近の表層に点状出血 (矢印) が認められた。

## 2-6 細菌学的検査

### 2-6-1 材料および方法

剖検時に滅菌スワブを用いて WB 発現鶏 (Case No. 1-No. 3) および WB 非発現鶏 (Case No. 4-No. 6) のそれぞれの胸部皮下および漿膜から採取した細菌分離材料は、ブレインハートインフュージョン培地 (Brain-heart infusion broth, BD, Franklin Lakes, NJ, USA) に 15g/1000ml の割合で寒天 (試薬特級, キシダ化学, 大阪) を加えて作製したブレインハートインフュージョン寒天培地, XM-G 培地 (ニッスイ, 東京) およびブドウ球菌培地 (Staphylococcus Medium No. 110, ニッスイ, 東京) にそれぞれ直接接種, 画線塗抹した後, 37℃ のフラン器内で 24-48 時間好気培養した。

### 2-6-2 成績

WB 発現鶏 (Case No. 1-No. 3) および WB 非発現鶏 (Case No. 4-No. 6) の胸部皮下および漿膜からは, 細菌や真菌は分離されなかった。

## 2-7 組織学的検査

### 2-7-1 材料および方法

十分に固定された胸筋からは, 筋線維走行に対して垂直方向の組織断面 (以下, 筋組織横断面) と筋線維走行に沿った方向の組織断面 (以下, 筋組織縦断面) を切り出し, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 生殖器 (卵巣または精巣) については, それぞれ 1 箇所から組織片を切り出した。切り出した組織片は, いずれも約 5mm 厚とし, 包埋カセット (村角工業, 大阪) に薄切面が下になるように入れ, ステンレス製のティッシュテックプロセスカバー (サクラファインテック, 東京) で蓋をし, 水道水で脱ホルマリン処理をおこなった。脱ホルマリン後, 自動包埋装置 (AUTO-KINETTE Type1400P, 白井松器械, 大阪) でメタノール脱水, キシレン透徹を経てパラフィンを組織片に浸透させ, パラフィン包埋ブロックを作製した。パラフィン包埋ブロックは, 滑走式ミクロトームで目盛を厚さ 3  $\mu$ m に調節して薄切し, シランコーティングされたスライドガラスに貼り付けた後, フラン器内で十分に乾燥させ, パラフィン組織切片標本とした。パラフィン組



組織切片標本は、キシレン、エタノールの各系列を通して脱パラフィンし、水に戻した後、常法に従い Hematoxylin and eosin 染色（以下、HE 染色）あるいは Azan 染色を施し、染色組織標本を作製した。染色組織標本は光学顕微鏡下で観察し、病変の有無を確認した。また、胸筋の筋組織横断面を切り出して作製した組織標本について、1 標本あたり 300 本の筋線維短径を顕微鏡写真撮影装置（DP20-5、オリンパス、東京）に実装された計測ソフトウェアを用いて計測した。

## 2-7-2 成績

胸筋の筋組織横断面の観察では、WB 非発現鶏では大部分の筋線維が多角形で、円形化筋線維はほとんど認められなかったのに対し、WB 発現鶏では、筋線維の大部分で多角形の角が鈍化しており、肥大・過収縮した円形化筋線維が散在していた。また、筋線維の変性・壊死が、筋線維束に散在性または局在性に生じており（図 7）、これらが顕著に認められる領域を中心に筋間の疎性結合組織が肥厚していた（図 8）。1 標本につき 300 本の筋線維短径の計測値から算出された中央値は、WB 非発現鶏（No. 4-No. 6）でそれぞれ 45.0, 51.8, 55.2  $\mu\text{m}$ 、WB 発現鶏（No. 1-No. 3）でそれぞれ 43.4, 47.1, 58.1  $\mu\text{m}$ であった。筋線維短径の度数分布は、WB 非発現鶏で 40-70  $\mu\text{m}$ に一峰性のピークを認めたのに対し、WB 発現鶏では、明確に識別可能な度数分布のピークが認められなかった（図 9）。

胸筋の筋組織縦断面の観察では、WB 発現鶏において、空胞・裂隙が形成された筋線維、あるいは分枝した筋線維が認められた（図 10）。筋線維の変性・壊死が多くみられる領域においては、筋線維の壊死領域には、しばしば偽好酸球やマクロファージなどの貪食細胞が認められ、炎症細胞や線維芽細胞の筋間浸潤、再生・修復筋線維における多核連鎖が認められた（図 11）。筋線維における多核連鎖は、細い再生筋線維では細胞質の中心付近に一系列に連鎖し、太い再生筋線維では、複数の直線的な核連鎖が並列していた。また、リンパ球浸潤を伴う血管が変性・壊死筋線維が多くみられる領域の筋線維間に散見された（図 12）。筋線維の過収縮を伴う壊死・断裂は、WB 発現鶏だけでなく WB 非発現鶏においても散見された（図 13）。

肝臓、脾臓、腎臓、生殖器（卵巣または精巣）の組織像を図 14-図 17 に示した。いずれにおいても特異な変化は認めなかった。

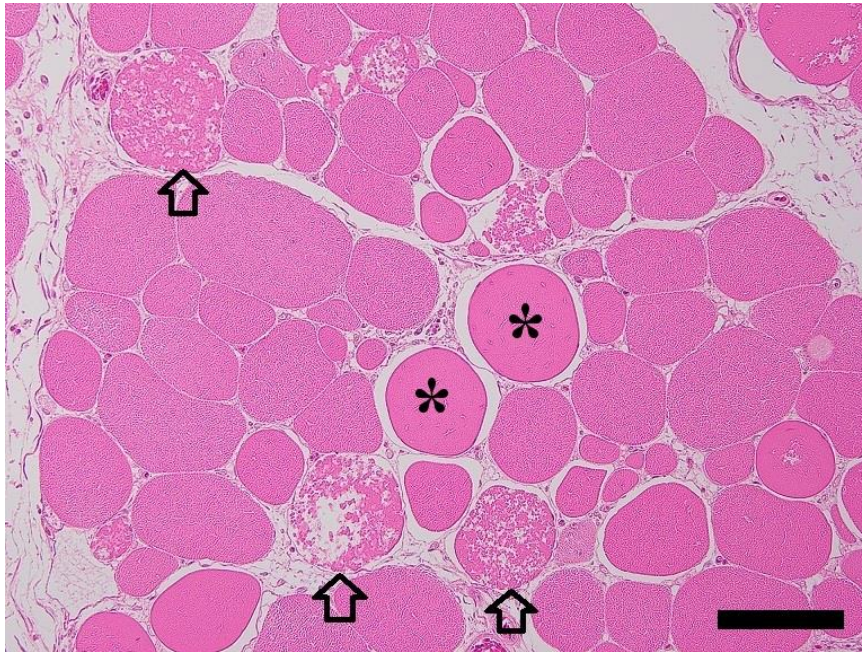


図 7 過収縮筋線維と筋線維の変性・壊死。 胸筋組織横断面における過収縮筋線維（＊）は、より円形に近い形状を呈し、染色組織標本では筋原線維が不明瞭で均質に染まる。変性した筋線維（矢印）では、筋線維の細胞質構造が不整になり、大小不定形の無数の空胞が形成され、壊死したものでは細胞膜の一部が崩壊していた。Case No. 3。HE 染色。Bar=100  $\mu$ m。



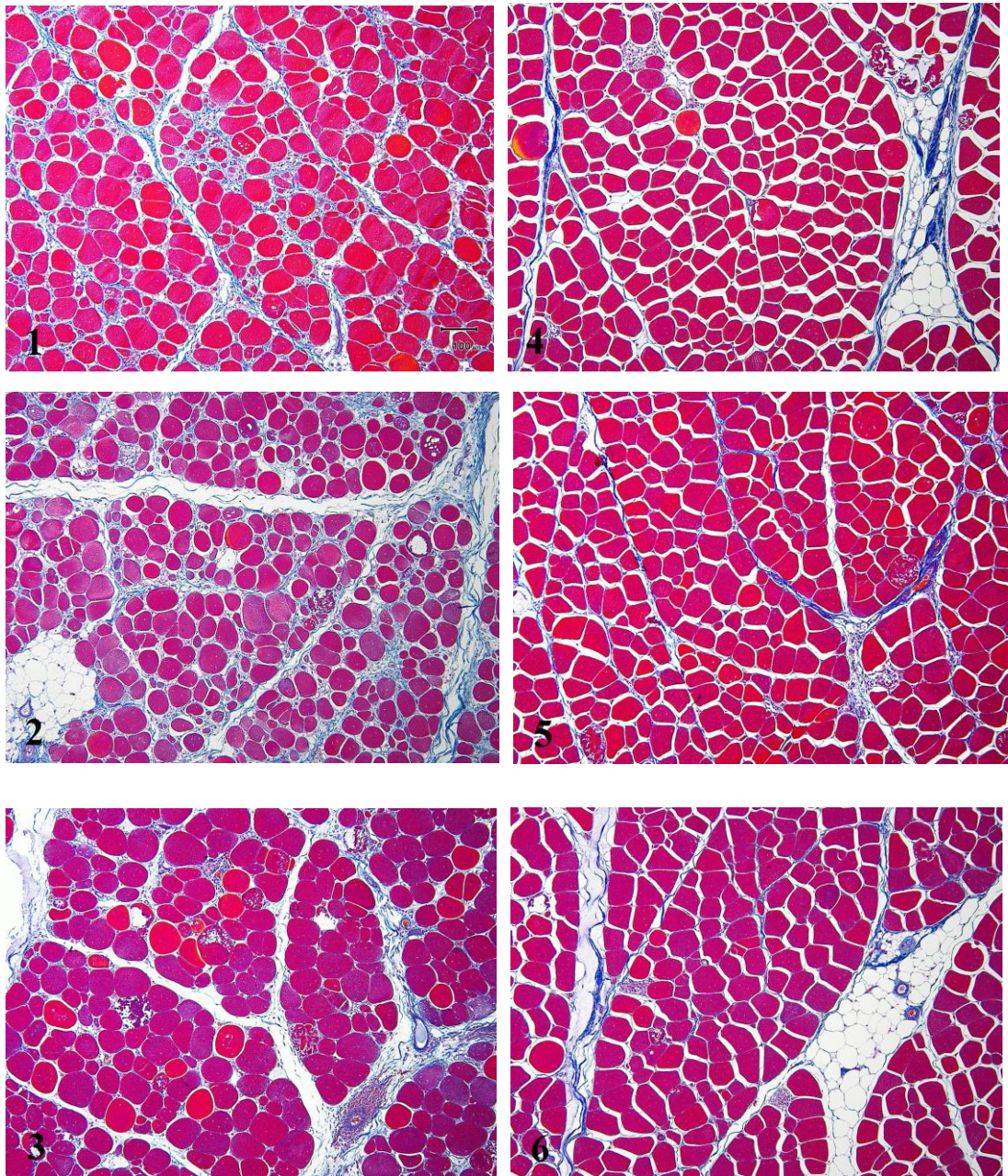


図8 WB発現鶏とWB非発現鶏における胸筋組織横断面，アザン染色。 1-6は順に Case No.1-Case No.6。Case No.4-Case No.6（WB非発現鶏）では，大部分の筋線維断面は多角形であるのに対して，Case No.1-Case No.3（WB発現鶏）では，全体的に筋線維断面は角が鈍化し，あるいは全体が円形化していた。また，Case No.1-Case No.3（WB発現鶏）では青く染まる疎性筋間結合組織の増生を認めた。

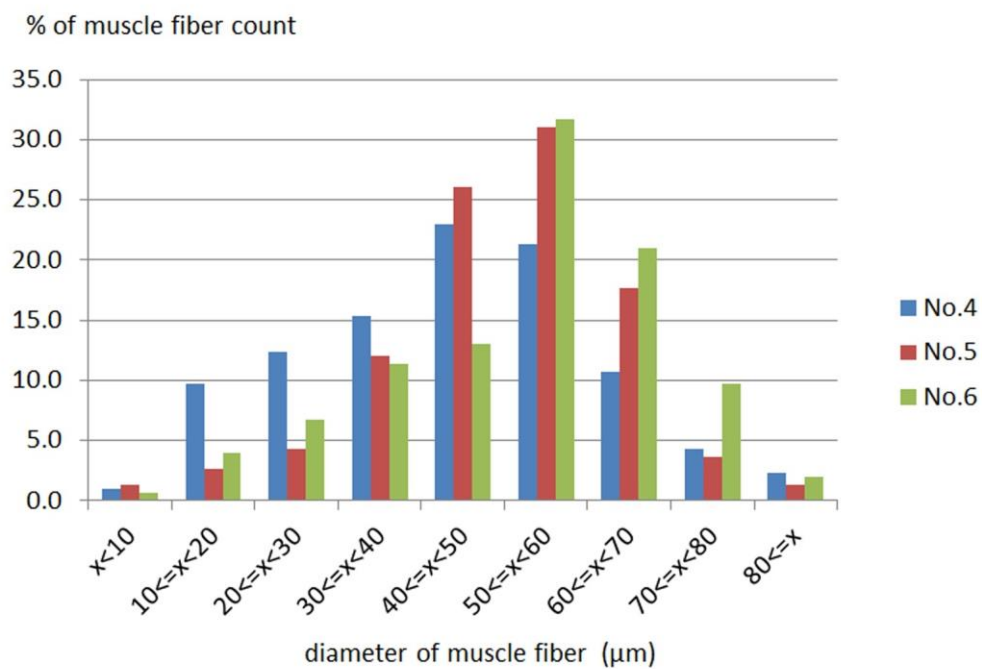
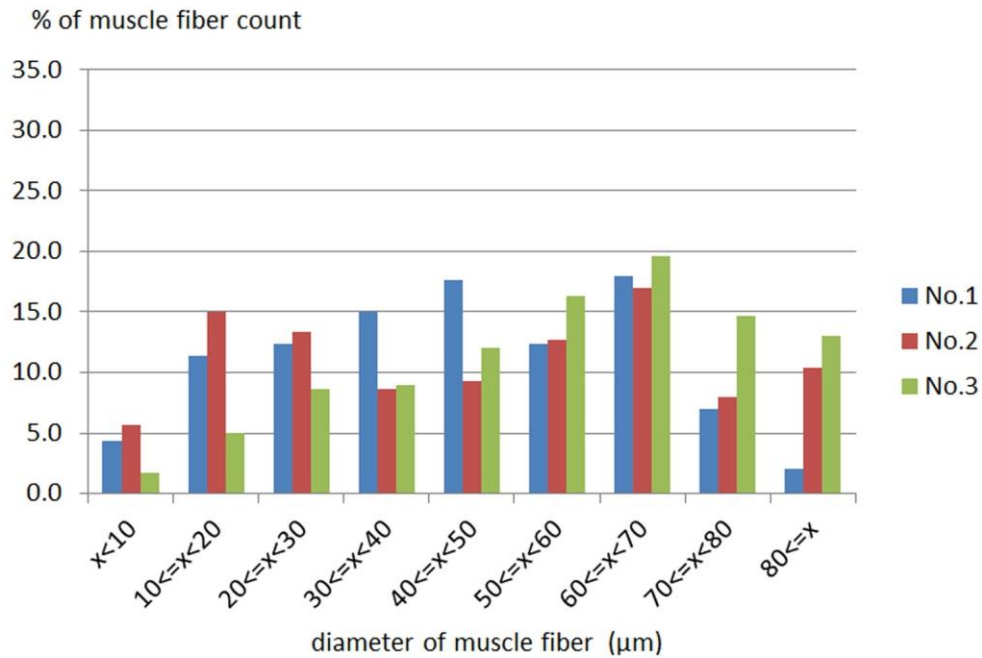


図9 WB発現鶏 (Case No.1-No.3) と WB非発現鶏 (Case No.4-No.6) の胸筋組織横断面における筋線維短径の計測値分布。WB非発現鶏では一峰性のピークを認めたが、WB発現鶏ではピークが不明瞭な分布であった。



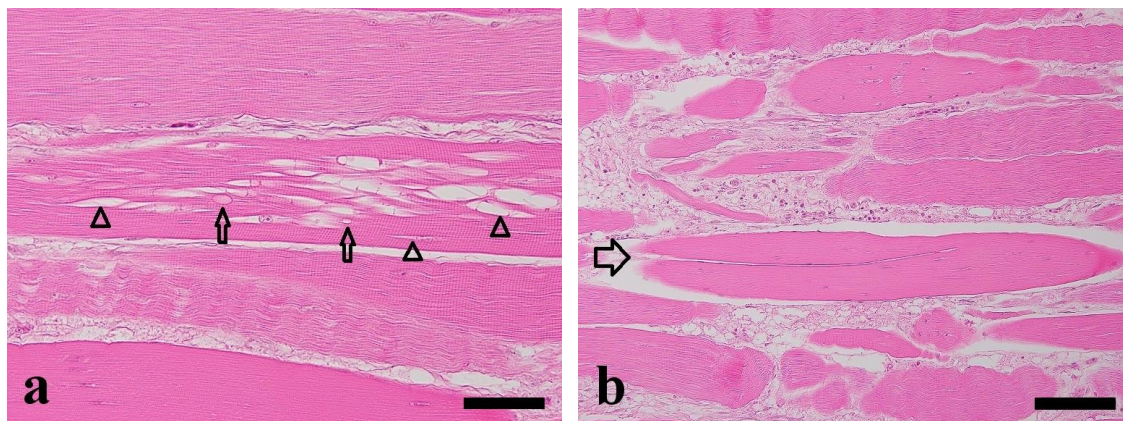


図 10 WB 発現鶏の胸筋における空胞・裂隙形成筋線維 (a) および分枝した筋線維 (b)。WB 発現鶏の胸筋では、過収縮傾向で小空胞 (a の矢印) や筋原線維間の大小の裂隙 (a の矢頭) が形成された筋線維、矢状方向に二分するように分枝した筋線維 (b の矢印) が散見された。HE 染色。a; Case No.3, Bar=50  $\mu\text{m}$ 。b; Case No.1, Bar=100  $\mu\text{m}$ 。

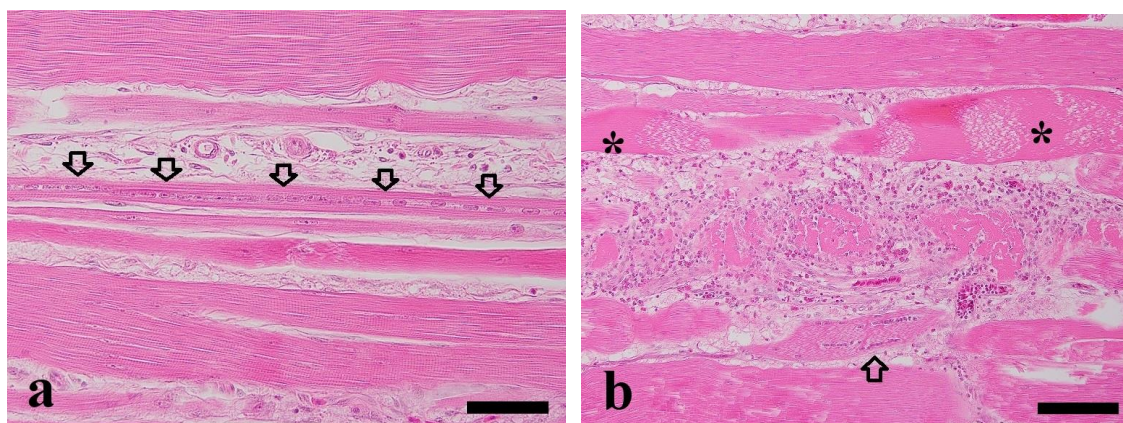


図 11 変性・壊死した筋線維と炎症細胞浸潤および再生筋線維。a (Case No.1) では細い再生筋線維の直線状に並んだ多核連鎖が認められた。また, b (Case No.3) では中心の壊死筋線維を取り巻くように偽好酸球, マクロファージ, 線維芽細胞の浸潤がみられた。また, 多核連鎖が並列したやや太い筋線維 (矢印) や過収縮して断片化した変性筋線維 (\*) が認められた。HE 染色。Bar=50  $\mu\text{m}$ 。



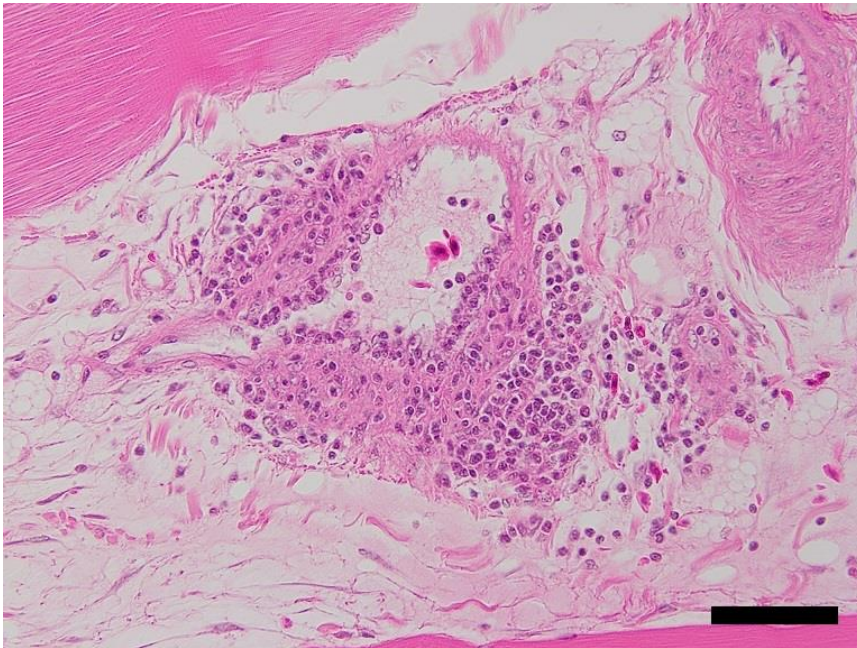


図 12 筋間結合組織に分布する血管周囲のリンパ球浸潤。筋線維の変性・壊死が多くみられる領域の間質に分布する血管の周囲から血管内にしばしばリンパ球浸潤が認められた。Case No.3。HE 染色。Bar=50  $\mu$ m。

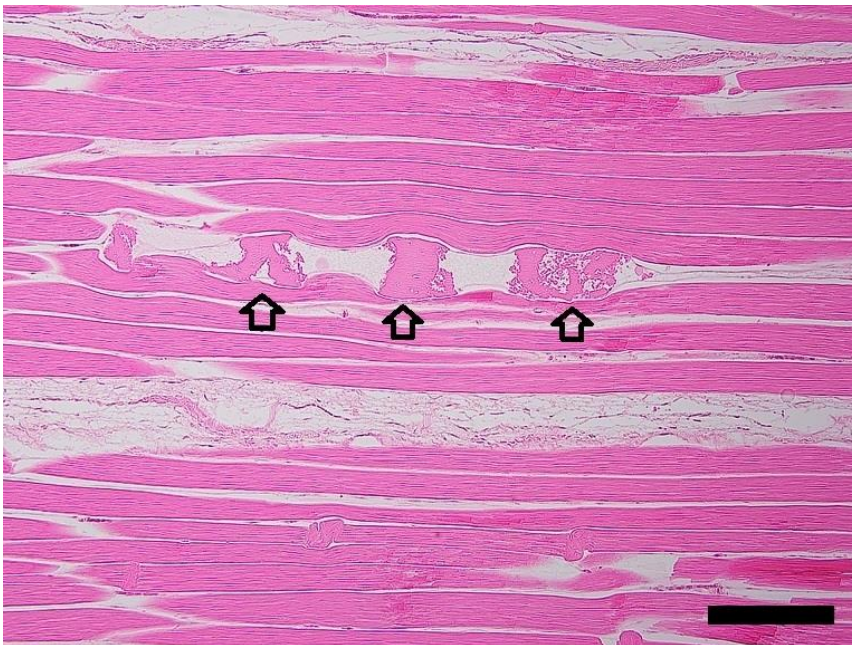


図 13 WB 非発現鶏の胸筋に散見された過収縮を伴う壊死・断裂筋線維。WB 非発現鶏では整然と並ぶ正常筋線維間に単発性に過収縮筋線維や過収縮を伴う壊死・断裂筋線維が散見された。Case No.5。HE 染色。Bar=200  $\mu$ m。



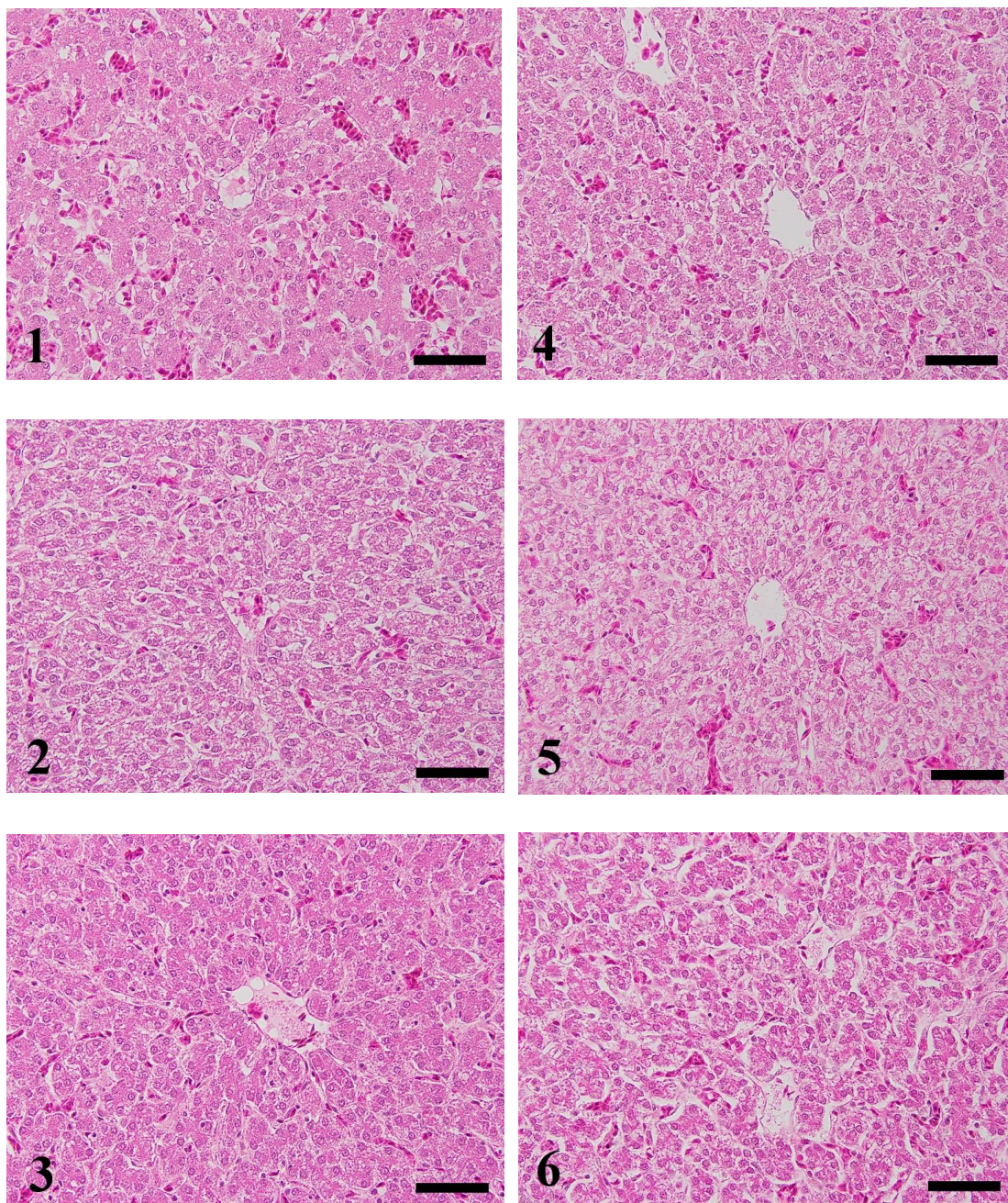


図 14 WB 発現鶏と WB 非発現鶏の肝臓。 1-6 は順に Case No.1-Case No.6。 WB 発現鶏 (Case No.1-Case No.3), WB 非発現鶏 (Case No.4-Case No.6) の肝臓において特異的な変化は認めなかった。HE 染色。Bar=50  $\mu$ m。



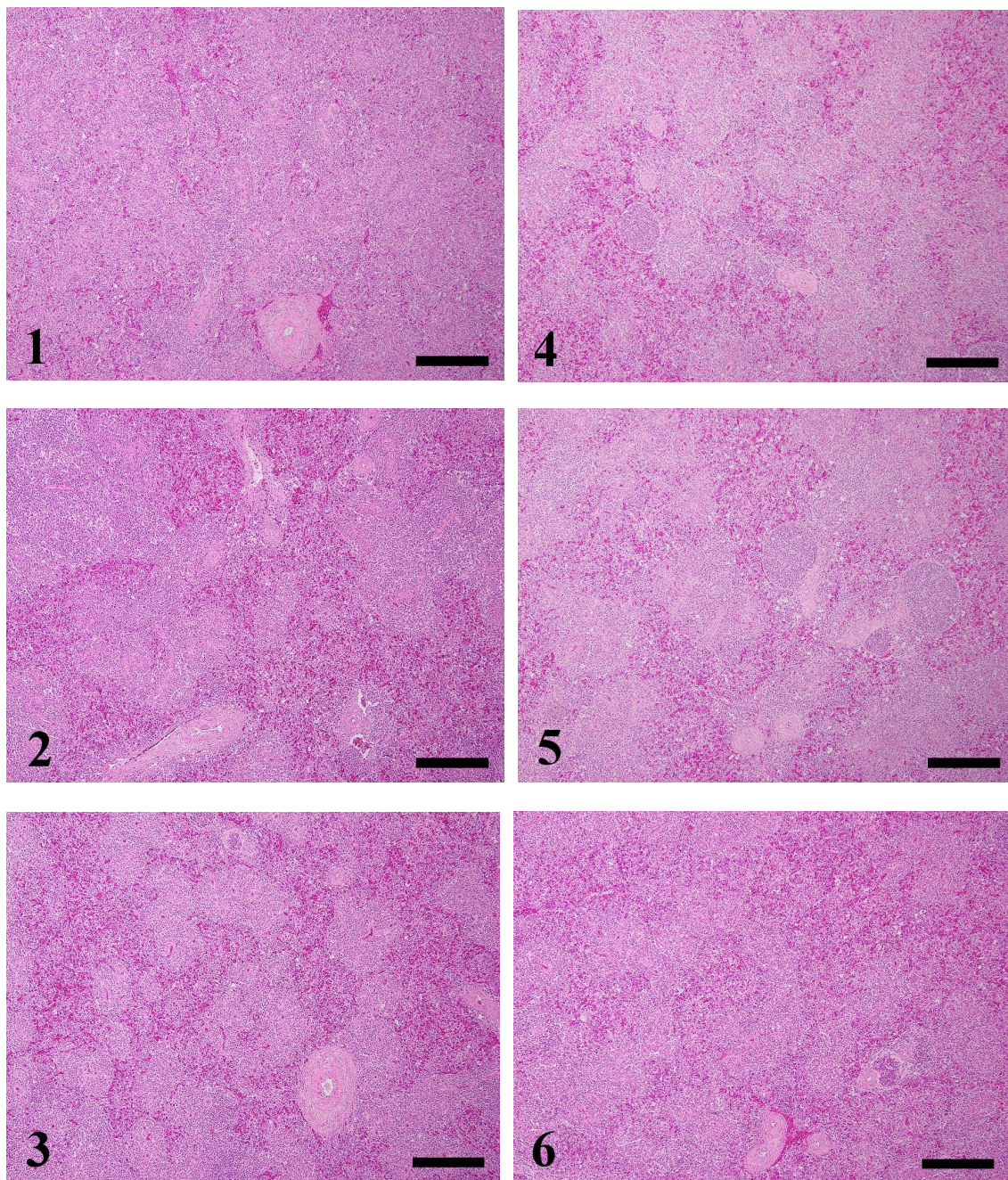


図 15 WB 発現鶏と WB 非発現鶏の脾臓。 1-6 は順に Case No.1-Case No.6。  
WB 発現鶏 (Case No.1-Case No.3), WB 非発現鶏 (Case No.4-Case No.6) の脾  
臓において特異的な変化は認めなかった。HE 染色。Bar=200  $\mu$ m。



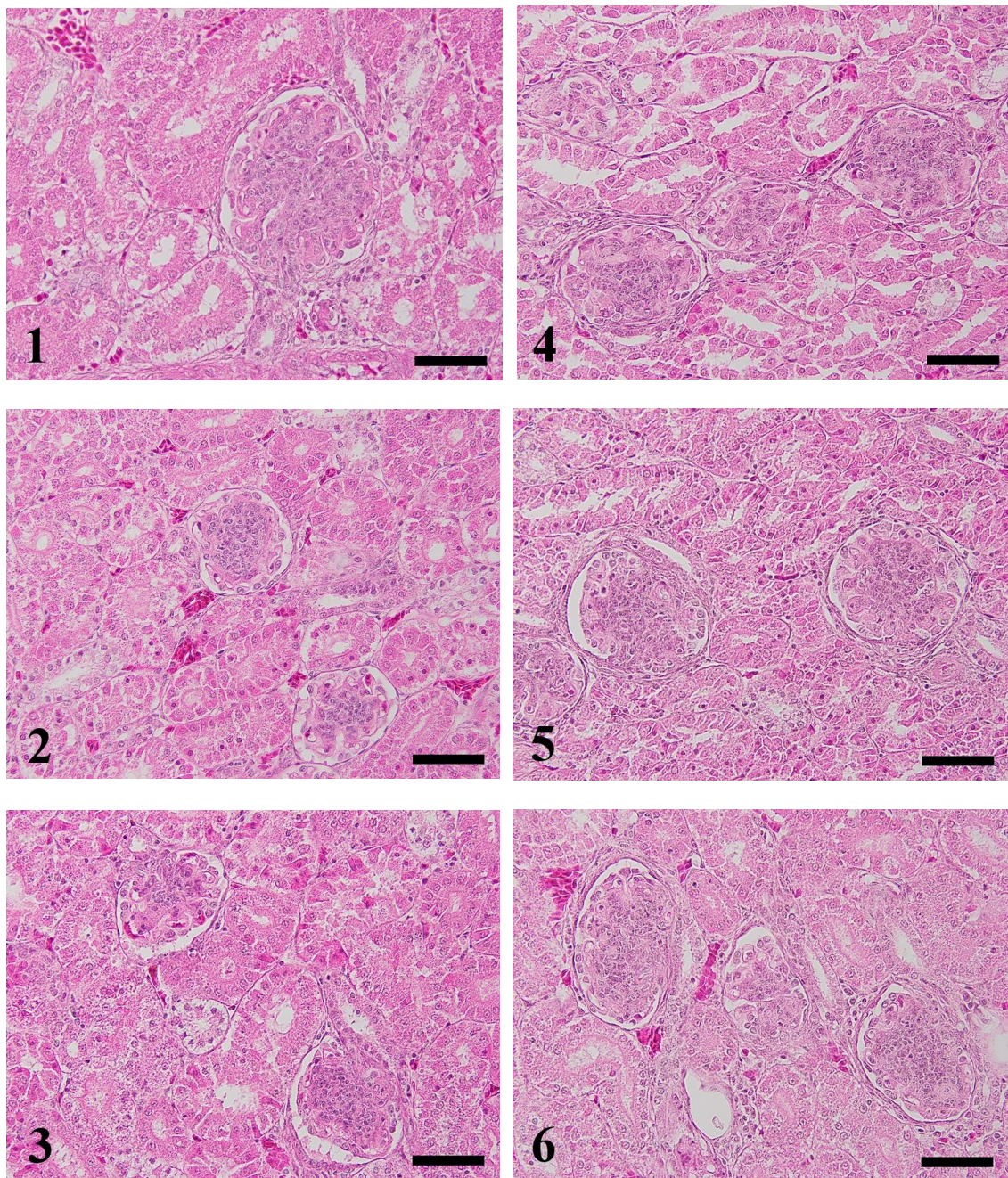


図 16 WB 発現鶏と WB 非発現鶏の腎臓。 1-6 は順に Case No.1-Case No.6。  
WB 発現鶏 (Case No.1-Case No.3), WB 非発現鶏 (Case No.4-Case No.6) の腎  
臓において特異的な変化は認めなかった。HE 染色。Bar=50  $\mu$ m。



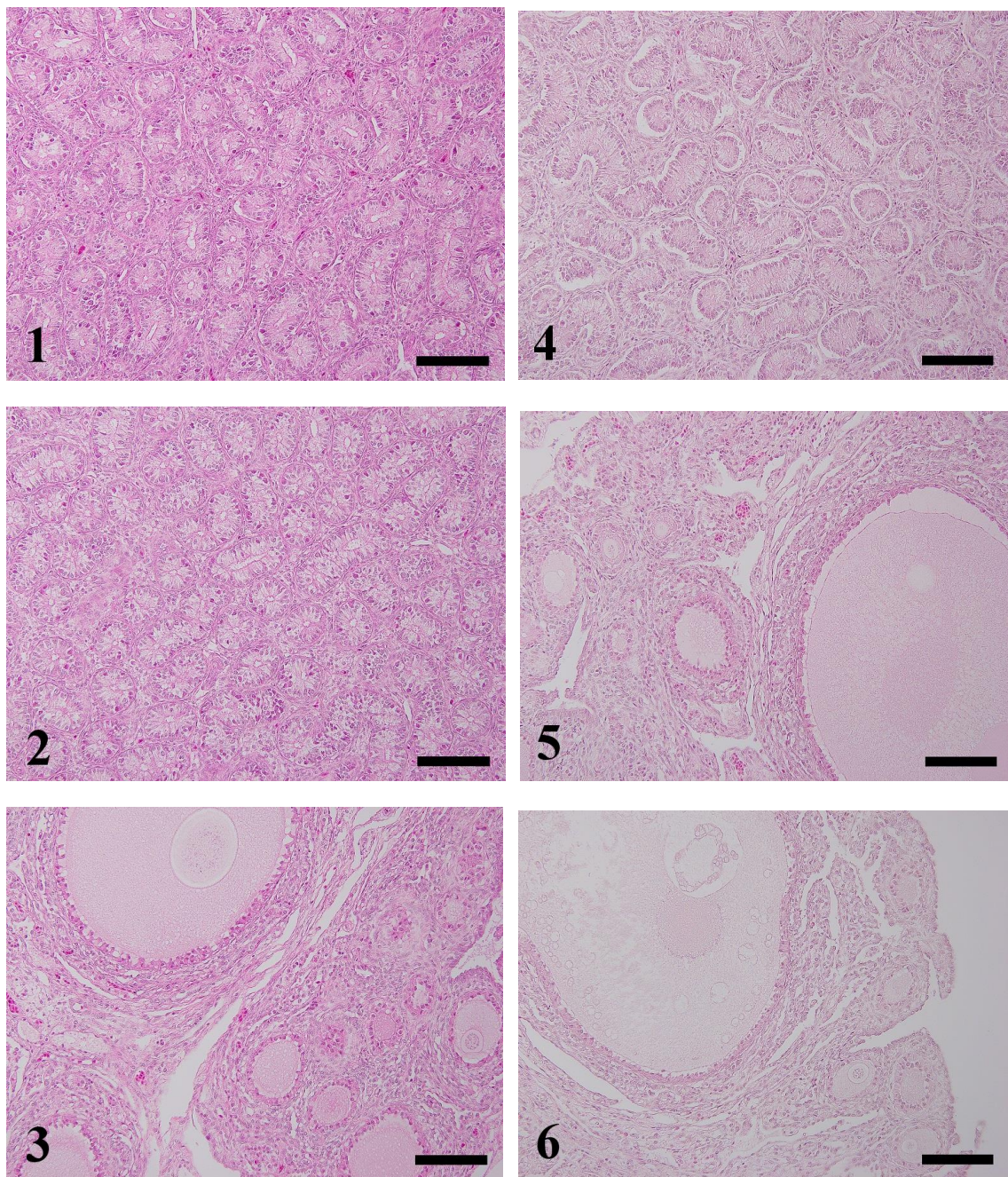


図 17 WB 発現鶏と WB 非発現鶏の卵巢および精巢。 1-6 は順に Case No. 1-Case No. 6。WB 発現鶏の Case No. 1, Case No. 2 と WB 非発現鶏の Case No. 4 は精巢，WB 発現鶏の Case No. 3 と WB 非発現鶏の Case No. 5, Case No. 6 は卵巢。いずれも未成熟で特異的な変化は認めなかった。HE 染色。Bar=100  $\mu\text{m}$ 。

## 2-8 まとめ

ニワトリの羽ばたき運動は、主として胸筋と烏口上筋が交互に収縮・弛緩を繰り返すことで上腕を内転・外転させて起こる運動である。胸筋は、飛翔筋のなかで最も大きな筋であり、収縮によって得られる力は強大である。胸筋の収縮は、上腕を内転（翼を下制）することで揚力と推力を発生し、烏口上筋の収縮は、胸筋の収縮によって内転した上腕を外転（翼を挙上）することで次の内転運動に備える基準位置あるいは静止位置に上腕を引き戻す（König et al, 2009; 加藤・山内, 1998）。

Sihvo ら(2014)は、近年、いくつかの国において、食鳥処理場で白い線条を伴い広範囲に褪色したきわめて硬い胸筋がみられるようになったことを述べるとともに、食鳥処理場の解体ラインでと体からはずされた、肉眼的に WB とみられる胸筋において、詳細に病理組織学的変化を観察し、それらに共通する組織学的変化として、筋線維の変性・壊死などの退行性変化と再生筋線維の出現、筋間結合組織の増生あるいは線維化、胸筋の組織横断面における多角形の欠如、しばしばマクロファージや偽好酸球などの炎症細胞浸潤が認められることを明らかにした。これらの組織変化は、構造機能的に同筋の収縮性や弛緩性を損なうことを裏付けるものであり、WB の発現は、臨床的に上腕の内転と外転による可動範囲を減衰させることが推定された。

そこで、本研究では、WB 発現の有無を生体で診断する方法について言及するため、商業飼育されているブロイラー鶏群において上腕の可動性を指標として、臨床的に WB 発現鶏と WB 非発現鶏と診断した個体をそれぞれ 3 羽ずつ選抜し、個体ごとに生体観察、血液生化学、解剖検査および組織学的検査を実施して、それぞれの所見の関係性について検討した。

翼の挙上性試験では、両側翼の肘関節外側同士を接することができず、両側翼を挙上しても胸部静止位置に戻しても腋下から前胸部正中にかけての領域から全体にわたりゴムのような弾力性を帯びていることを WB 発現鶏の臨床的な判定指標とした。これらの判定指標に基づいて WB 発現鶏あるいは WB 非発現鶏として判定した各個体の生体観察では、WB 発現鶏に共通して立位姿勢で背線が腰部から頭方向にかけて下がり、頸部を持ち上げようとしても背線より高い位置に保持することが難しく、重心が前方に偏り前後方向へのふらつきを認めた。このことから、WB 発現鶏では前後方向の姿勢保持に関係する何らかの構造的な不具合が生じていることが伺われた。また、WB 発現鶏では、両側後肢が外転傾向で開脚しやすい徴候もみられたが、本研究においては、WB 発現鶏と WB 非発現鶏の胸筋、後肢重量の体重比に傾向や差があるようにはみられず、胸筋

や後肢筋の発達程度の違いが重心の前方変位に影響を及ぼしているとは考えられなかった。しかし、両側胸筋の頭側皮側隆起頂点間の幅は WB 発現鶏で広がっており、胸骨形態の差異や前肢帯筋の結合状態、前肢帯構成筋個々の組織の状態などとの関係について今後検討する必要があると考えられた。また、後肢筋においては、今回、剖検時に肉眼的な異常を確認することができなかったが、今後、後肢を構成する個々の筋についても組織学のおよび機能的な観点から個別に検討する必要があると思われる。

血液生化学検査では、WB 発現鶏の CK が 53,760-59,580 U/L であった。一方、WB 非発現鶏のうち 2 羽 (Case No. 4, No. 5) の CK は、それぞれ 19,760 U/L, 19,300 U/L であり、WB 発現鶏より低値であったが、1 羽 (Case No. 6) の CK は、63,800 U/L で、WB 発現鶏と同程度の値であった。また、AST は、WB 発現鶏で 588-635 U/L, WB 非発現鶏のうち 2 羽 (Case No. 4, No. 5) でそれぞれ 346 U/L, 300 U/L, Case No. 6 では 553 U/L であった。Case No. 6 は CK と AST がともに WB 発現鶏と同じレベルであったが、翼の挙上性と可動性および胸部の硬さに異常は認めなかったことから WB 非発現鶏と診断したものであった。しかし、立位で静止させると背線の胸部から尾方向にかけて下がる傾きが弱く、頭部の保持位置も若干低かったことから、筋組織における初期段階の障害が発現していた可能性が考えられた。

胸筋における退行性変化の発現の有無を組織学的に確認した結果、上腕の可動性や挙上性を指標として選抜した WB 発現鶏の胸筋組織においては、広汎な筋線維の変性・壊死、偽好酸球やマクロファージなどの炎症細胞浸潤、疎性結合組織増生など WB に特徴的变化が顕著に認められた。WB 発現鶏の胸筋組織におけるこれらの変化は、Sihvo et al. (2014) が報告した WB 発現鶏の胸筋組織における組織学的所見と一致していた。一方、WB 非発現鶏の胸筋組織においては、これらの退行性変化はほとんど認められなかった。

家禽化されたニワトリでは、周膜の発達が大腿筋よりも胸筋で遅いことが報告されている (Nakamura et al., 2004; Roy et al., 2006)。さらに、急速に増体するニワトリでは、成長速度と胸筋の発育レベルが改善されるにつれて、胸筋の筋周膜の空間に占める割合が低減することにつながることを示されている (Velleman et al., 2003)。この筋周膜は毛細血管を含む結合組織によって構成されている (Watanabe et al., 2015)。Velleman and Clark (2015) は、結合組織領域に分布する毛細血管の機能が制限されると筋組織で生成される乳酸を効率よく除去できなくなると、蓄積した乳酸によって pH が低下し、その結果、筋組織が傷害され、WB が発現すると推測しているが、今後、胸筋における血管分布と WB 発現との関連性についてさらに検討する必要がある。



Kuttappan et al. (2012)は、胸筋における筋線維に沿った白い線条 (white striping) の出現は、その肉眼的な程度が増すにつれて、筋間脂肪組織の発達 (脂肪症) や線維増生 (線維症) とともに慢性の筋退行性変化の発生在有意に増加したことを報告している。また、胸筋における白い線条の発現を指標として胸筋の変性病変レベルを評価し、重度の胸筋変性が、ALT, AST, CK, および LDH の血清レベルの増加と関連することを報告した (Kuttappan et al., 2013b)。

血漿中の CK レベルが上昇するのは、筋組織傷害の結果であると考えられる。今回供試したニワトリは WB 発現鶏だけでなく WB 発現鶏においても Tao et al., 2011 が示した CK 値の標準的なレベルの 2-9 倍であった。また、著者の保有する過去の臨床データにおける健常なブロイラー群で測定された CK 値は、43-46 日齢で 2,398-19,743 IU/L (中央値=6,637 IU/L, n=24, 未発表) であり、ブロイラーの CK 値は従来からばらつきは大きいですが、それらの中央値と比較しても、今回の測定値は、すべて 3-10 倍の値であった。このことから、今回供試したニワトリにおいては、WB 発現鶏のみならず、WB 非発現鶏においても飼育期間中に筋障害の誘発につながる何らかの問題があったものと思われた。

本研究では、胸筋における筋組織の変性病変形成と器質化が、臨床的なニワトリの胸部の異常硬化をもたらし、両側翼の肘関節外側同士との接触性を阻害することと直接関係していることが明らかになった。胸筋は上腕の主要な内転筋であり、胸筋に変性病変の病変が形成され、収縮性の阻害が起こることで、上腕の可動性の制限に直接的に影響を及ぼす。よって、両翼の挙上試験と胸部の触診とを組み合わせることで、鶏群中において WB 発現鶏を生体のまま発見することを可能にする有用なスクリーニング技術となり得ることが示された。ただし、本研究に供試したニワトリの数は少なかったことから、本法を用いたスクリーニングを今後数多く実施することで、より精度の高い指標を付加するとともに、両翼の挙上試験における所見と WB の発現との関係性についてさらに研究する必要がある。

### 第3章 ブロイラー胸部の異常硬化の経時的変化と臨床病理学的研究

#### 3-1 はじめに

近年、急速に成長するブロイラーの胸筋（＝浅胸筋）に多発している異常な硬化を伴う退行性変化は、一般に「wooden breast」または「woody breast」と呼ばれ（以下、WB），世界中で報告されている（Sihvo et al., 2014）。WBを発現した胸筋の肉眼的・物性的な特徴は、褪色と著しい硬化で、しばしば炎症性滲出、筋線維間における乳白色～灰白色の幅の異なる線条、筋表面上の点状出血を伴う。組織学的には、筋線維の肥大、筋線維径の大小不同、筋線維の変性および再生変化、および様々なレベルの線維増生（線維症）が観察される（Sihvo et al., 2014; Kawasaki et al., 2016）。重度にWBを発現した胸筋では、筋線維間にしばしば炎症細胞浸潤を伴い、筋間結合組織がびまん性に肥厚する（Sihvo et al., 2014; Mazzoni et al., 2015; Velleman and Clark, 2015）。WBを発現した胸筋は、正常な胸筋と比べて著しく見た目や触感が異なることから、食鳥処理場の解体ラインで異常肉として発見されて廃棄されている。そのため、WB発現胸筋の多発は、商業的な鶏肉生産において経済的損失をもたらしている。

Trocino, et al. (2015) は、胸筋の発達がいよ遺伝系統と胸筋の発達が標準的な遺伝系統のブロイラーを初生日齢から雌雄別にして、それぞれ不断給餌または制限給餌で飼育し、46日齢でWBの発生頻度を調査した結果、遺伝系統の差や給餌方法の差によっては大きな差がなく、性別によって差があったことを報告した。また、Radaelli, et al. (2017) は、胸筋の発達がいよ遺伝系統と胸筋の発達が標準的な遺伝系統のブロイラーを初生日齢から飼育し、14, 21, 28, 35, 46日齢における胸筋の退行性変化の発現程度を組織学的および免疫組織化学的に評価した結果、胸筋における筋線維の変性は、ブロイラーの遺伝系統や性別に関わらず、14日齢で出現しはじめ、28日齢までに劇的に増加、46日齢時にはほとんどすべての個体に認められることを明らかにした。しかし、ブロイラーの飼育期間中におけるWBの発現に関連した臨床症状や経過についてはこれまでほとんど明らかにされていない。そこで、著者らの先行研究では、上腕の可動性と挙上性を確認し、同時に胸部を触診することで生体のままWB発現を確認できることを明らかにした（Kawasaki et al., 2016）。

本研究では、先行研究で示した方法により、商業飼育されているブロイラー群において、飼育期間の中間期にWB発現鶏とWB非発現鶏を選抜し、個体識別して試験鶏舎で飼育することで、個体ごとに経時的な臨床症状の変化を観察す

るとともに、血液生化学所見および病理学的所見との関連性について検討した。

### 3-2 供試動物，飼育および生体観察

#### 3-2-1 材料および方法

本研究における供試動物の取り扱いについては、動物の愛護及び管理に関する法律に基づき、酪農学園大学動物実験倫理委員会（DH16A2 号）による承認を得て実施した。試験飼育期間中は、すべての供試動物を動物飼育技術者が毎日観察し、必要に応じて家禽診療獣医師が状態を確認し、適切に処置した。

商業飼育されている 19 日齢のブロイラー鶏群（Ross 308）から著明に胸部硬化を認めるニワトリおよび正常な胸部のニワトリを選抜して捕獲し、同日、酪農学園大学フィールド教育研究センターの鶏舎に搬入した。これらのニワトリは、翼の挙上性検査と胸部の触診によって選抜した。鶏舎に搬入した WB 発現鶏（No. 1-No. 10）と WB 非発現鶏（No. 11-No. 20）は、個体ごとに体重を測定し、個体番号を標識したタグを上腕に装着した。個体番号標識タグは、ニワトリの成長に合わせて装着バンドを調整した。飼育期間中、飼料として、ブロイラー生産で一般的に使用されている、とうもろこし主体の抗菌性飼料添加物を添加していないブロイラー肥育後期用配合飼料（マッシュ、代謝エネルギー $\geq 3,300$  kcal）を給餌した。飼育場所は、商業的なブロイラー飼育環境にできるだけ近い状態を再現するため、清浄なコンクリート床に糞殻を敷き詰めた  $1.8 \times 1.2$  m の小区画とし、適切に空調と衛生管理を行った。飼育期間中、飼料と水は、ニワトリが常時自由に摂取できるように与えた。体重は、19, 27, 34, 41, 48 および 55 日齢で個体ごとに測定した。また、採血は、20, 29, 42 および 55 日齢で行い、同時に翼の挙上試験、胸部の触診、全身状態の観察を実施した。WB 発現鶏のうち 1 羽（No. 4）、WB 非発現鶏のうち 3 羽（No. 11, 13 および 18）は、長期飼育による観察の目的で 55 日齢以降も飼育を継続し、それらを除いては、飼育期間中に死亡した鶏はその都度、55 日齢時まで生存したニワトリは安楽死処置して解剖検査と組織学的検査に供した。WB 発現鶏、WB 非発現鶏の各グループ、あるいは WB 非発現鶏のうち、55 日齢時に翼の接触性が消失したニワトリのグループと翼の接触性が維持されたニワトリのグループの平均体重は、UNIVARIATE procedure により平均 $\pm$ 標準偏差として計算した。また、飼育期間中に測定した WB 発現鶏と WB 非発現鶏の体重の有意差は、NPAR1WAY procedure の non-parametric Mann-Whitney (Wilcoxon Rank-Sum) Tests により分析した。これ

らのデータの統計学的分析は、SAS(SAS University Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC)を用いて行った。

### 3-2-2 成績

19, 27, 34, 41, 48 および 55 日齢で測定した WB 発現鶏と WB 非発現鶏の体重は、図 18 に示した。19 日齢では、WB 発現鶏の平均体重は  $0.98 \pm 0.07\text{kg}$ 、WB 非発現鶏の平均体重は  $0.85 \pm 0.07\text{kg}$  で、27 日齢まで両群間に有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。しかし、41 日齢以降は、有意差は認められなかったものの WB 発現鶏の平均体重は、WB 非発現鶏の平均体重を下回った。WB 発現鶏 10 羽のうち 5 羽 (No. 1, No. 3, No. 5, No. 6 および No. 7) は、徐々に衰弱し、体重の増加が抑制された。WB 発現鶏 10 羽のうち 4 羽 (No. 1, No. 5, No. 6 および No. 9) は、飼育期間中に死亡した。一方、WB 非発現鶏では、No. 19 が飼育期間の後半にわずかに体重を抑制したものの、すべての個体が良好に体重増加し、55 日齢まで生存した。また、WB 発現鶏では、No. 3, No. 5 および No. 7 が 29 日齢から 42 日齢までの間に開脚性の起立歩行障害を生じ、No. 5 および No. 6 が腹水症になった。WB 非発現鶏においては、飼育期間中、すべての個体で明らかな外見上の健康異常は認めなかった。

20, 29, 42 および 55 日齢で実施した翼の挙上試験の結果を表 3 に示した。WB 非発現鶏 10 羽のうち 4 羽 (No. 12, No. 16, No. 18 および No. 20) は、飼育期間の後半で両側翼の肘関節外側同士との接触性が失われた。一方、55 日齢時まで生存した WB 発現鶏 6 羽のうち 2 羽 (No. 3 および No. 7) は、飼育期間の後半で両側翼の肘関節外側同士との接触性を回復した。また、WB 非発現鶏を 55 日齢時での翼の挙上試験における両側翼の肘関節外側同士との接触性が消失したものと維持されたものとにグループ分けした場合、接触性が消失したニワトリのグループの平均体重は、接触性が維持されたニワトリのグループの平均体重よりも飼育期間を通じてわずかに大きかった (図 19)。これらのグループ分けでは、両グループともニワトリの数が少ないことから、両グループ間の平均体重の差について統計的分析は行わなかった。



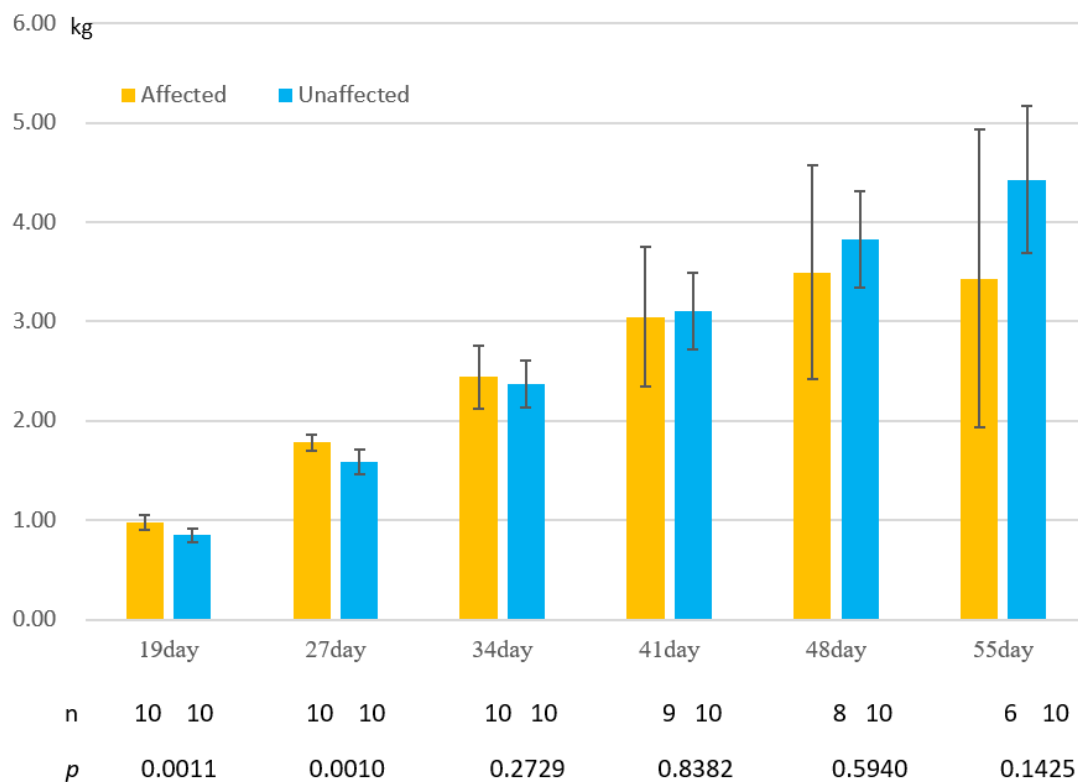


図 18 飼育期間における WB 発現鶏と WB 非発現鶏の体重の推移。 19 日齢では、WB 発現鶏の平均体重が WB 非発現鶏の平均体重よりも有意に大きかった。しかし、WB 非発現鶏の平均体重が、加齢につれてほぼ直線的に増加したのに対して、WB 発現鶏の平均体重の増加は、41 日齢以降失速した。affected; WB 発現鶏, unaffected; WB 非発現鶏。

		Back-to-back wing contact			
	Bird No.	20d	29d	42d	55d
Affected	1	-	-	-	died
	2	-	+	-	-
	3	-	-	+	+
	4	-	-	-	-
	5	-	-	-	died
	6	-	-	died	
	7	-	+	-	+
	8	-	-	-	-
	9	-	-	-	died
	10	-	-	-	-
Unaffected	11	+	+	+	+
	12	+	+	-	-
	13	+	+	+	+
	14	+	+	+	+
	15	+	+	-	+
	16	+	+	-	-
	17	+	+	+	+
	18	+	+	+	-
	19	+	+	-	+
	20	+	+	-	-

表 3 20, 29, 42 および 55 日齢時に実施した翼の挙上試験における両側翼の肘関節外側同士との接触性。 WB 非発現鶏 10 羽中 4 羽 (No. 12, No. 16, No. 18 および No. 20) が飼育期間の後半に両側翼の肘関節外側同士との接触性が失われた。一方, 55 日齢まで生存した WB 発現鶏 6 羽中 2 羽 (No. 3 および No. 7) は, 両側翼の肘関節外側同士との接触性を回復した。

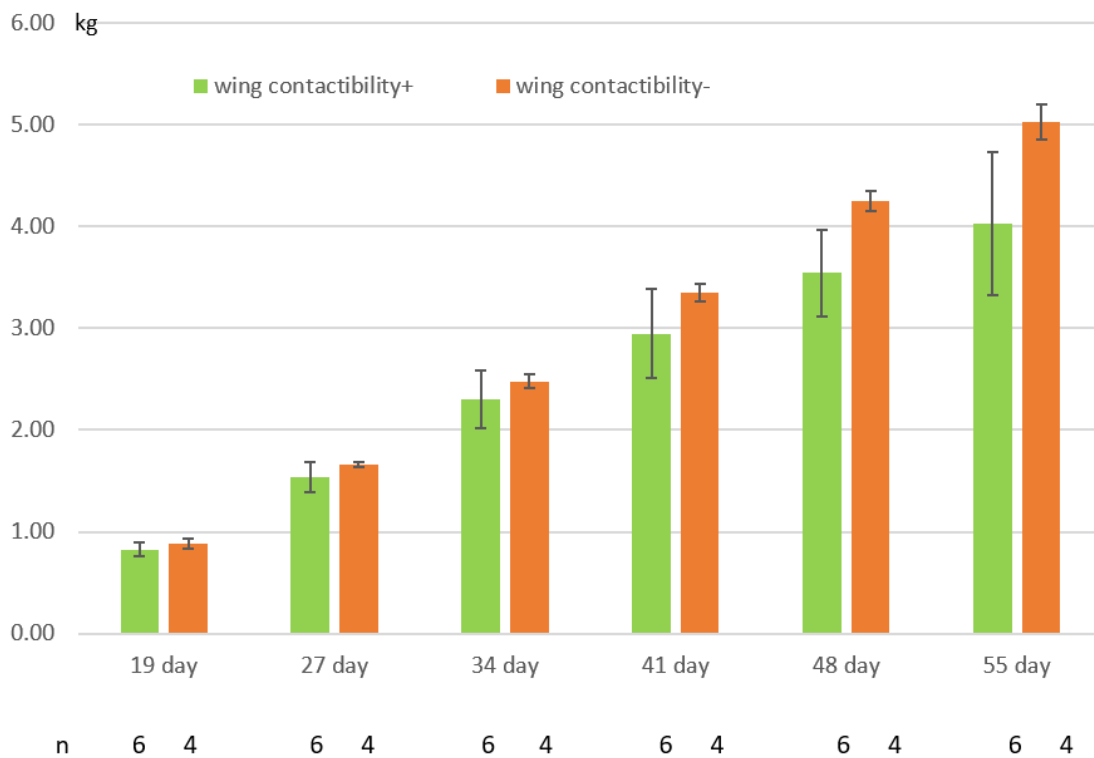


図 19 55 日齢時の翼の挙上試験において両側翼の肘関節外側同士の接触性が維持されたニワトリと消失したニワトリにグループ分けした場合のそれぞれのグループの平均体重の推移。 両側翼の肘関節外側同士の接触性が消失したグループの平均体重は、接触性が維持されたグループの平均体重よりも増加速度がやや高く推移した。



### 3-3 血液生化学分析

#### 3-3-1 材料および方法

血漿の採取は、20, 29, 42 および 55 日齢時に行った。23 ゲージのディスポーサブル滅菌注射針を装着した 2.5ml のディスポーサブル滅菌注射筒を用いて翼下静脈から採血し、直ちにヘパリンリチウム入りの真空採血管に移し、6,500rpm (2,200×g) で 5 分間遠心分離して血漿を分離した。分離した血漿は、直ちに血球成分から分離するため、新しい 1.5ml マイクロチューブに移し、-20℃の冷凍庫に速やかに保存した。凍結保存した血漿は、検査の直前に急速解凍した。

血液生化学分析は、Spotchem D system (Arkray, Kyoto, Japan)を用いて、creatine kinase (CK)と L-aspartate aminotransferase (AST)を測定した。測定に際しては、血漿を 1,3-dichloro-1,1,2,2,3-pentafluoropropane (FRIGEN II; Siemens Healthcare Diagnostic, Malvern, PA, USA)で前処理し、必要に応じて精製水で希釈した。

WB 発現鶏、WB 非発現鶏の各グループ、あるいは 55 日齢時の翼の接触性が消失したニワトリのグループと翼の接触性が維持されたニワトリのグループの CK 値および AST 値は、UNIVARIATE procedure により平均値±標準偏差として計算した。WB 発現鶏と WB 非発現鶏の CK 値および AST 値の有意差は、NPAR1WAY procedure の non-parametric Mann-Whitney (Wilcoxon Rank-Sum) Tests により分析した。これらのデータの統計学的分析は、SAS (SAS University Edition, SAS Institute Inc., Cary, NC)を用いて行った。

#### 3-3-2 成績

WB 発現鶏と WB 非発現鶏の採血日齢ごとの CK 値および AST 値は、図 20 に示した。20 日齢時においては、WB 発現鶏の平均 CK 値は、 $42,360 \pm 20,077$  IU/L (n=10)、WB 非発現鶏の平均 CK 値は、 $10,164 \pm 13,291$  IU/L (n=10)で、WB 発現鶏の平均 CK 値が WB 非発現鶏の平均 CK 値よりも有意に高かった ( $p < 0.01$ )。ただし、WB 非発現鶏の 1 羽 (No. 19) の CK 値は、47,760 IU/L で、WB 発現鶏と同等の値であった。WB 非発現鶏の平均 CK 値は、加齢とともに安定的に上昇した。対照的に、WB 発現鶏においては、加齢に従って平均 CK 値の下降がみられることがあった。55 日齢時においては、WB 非発現鶏の平均 CK 値は、 $41,204 \pm 14,811$  IU/L (n=10)、WB 発現鶏の平均 CK 値は、 $27,540 \pm 20,525$  IU/L (n=6)であり、WB 非発現鶏の平均 CK 値が WB 発現鶏の平均 CK 値を上回った。ただし、これら

の間に有意差は認めなかった ( $p>0.05$ )。また、20 日齢時においては、WB 発現鶏の平均 AST 値は、 $356\pm90$  IU/L ( $n=10$ )、WB 非発現鶏の平均 AST 値は、 $131\pm48$  IU/L ( $n=10$ ) で、WB 発現鶏の平均 AST 値が WB 非発現鶏の平均 AST 値よりも有意に高かった ( $p<0.01$ )。55 日齢時において、WB 非発現鶏と WB 発現鶏の平均 AST 値は、それぞれ  $335\pm86$  IU/L ( $n=10$ ) および  $312\pm122$  IU/L ( $n=6$ ) であり、WB 非発現鶏の平均 AST 値が WB 発現鶏の平均 AST 値を上回った。ただし、これらの間に有意差は認めなかった ( $p>0.05$ )。WB 非発現鶏を 55 日齢時に両側翼の肘関節外側同士との接触性が消失したニワトリのグループと維持されたニワトリのグループに分けて比較した場合、両側翼の肘関節外側同士との接触性の消失したニワトリのグループでは、両側翼の肘関節外側同士との接触性が維持されていたニワトリのグループよりも平均 CK 値および平均 AST 値が幾分低めであった。しかし、それらの平均 CK 値および平均 AST 値は 55 日齢で逆転し、両側翼の肘関節外側同士との接触性が消失したニワトリのグループが両側翼の肘関節外側同士との接触性を維持したニワトリのグループを上回った (図 21)。ただし、これらのグループ間での差は、それぞれのグループにおけるニワトリの数が少なかつたため、統計学的な有意差分析は行うことができなかった。

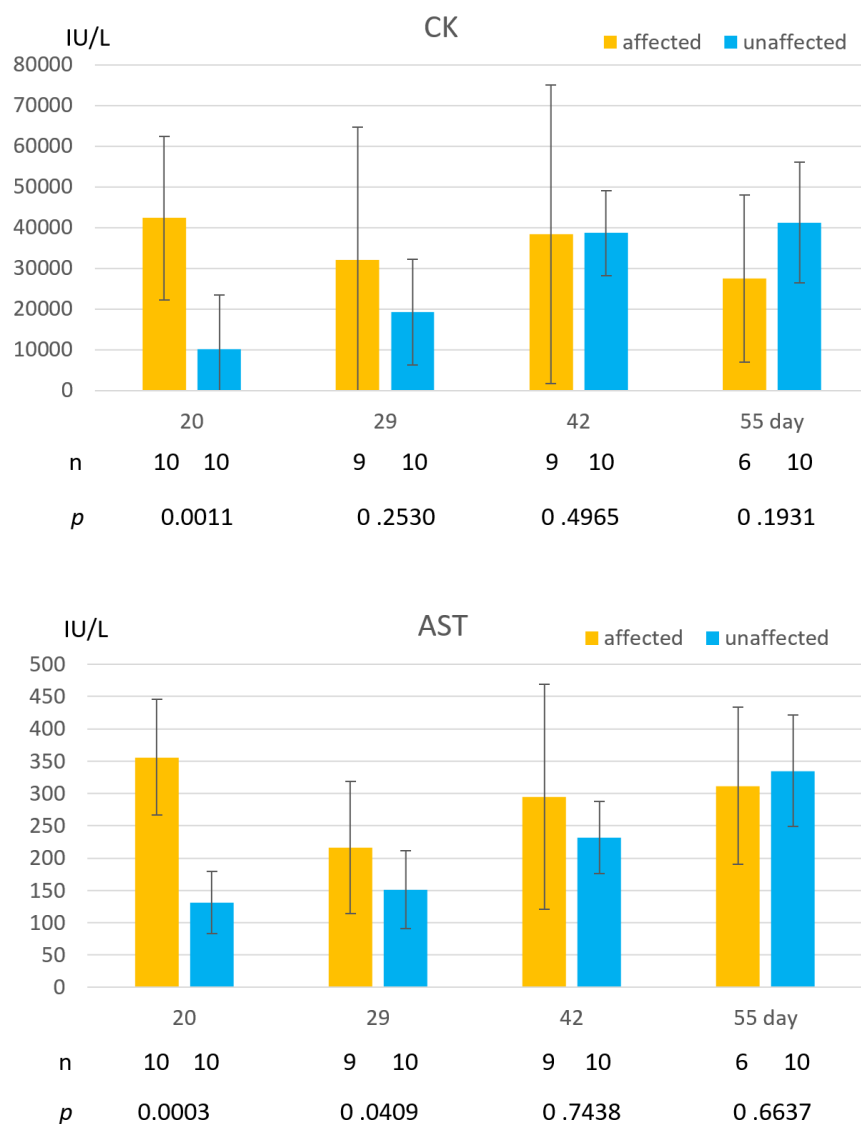


図 20 20, 29, 42 および 55 日齢時における WB 発現鶏と WB 非発現鶏の血漿中の creatine kinase (CK) と L-aspartate aminotransferase (AST) の平均値。20 日齢時においては、WB 発現鶏の平均 CK 値と平均 AST 値は、WB 非発現鶏のそれらの値より有意に高かった ( $p < 0.01$ )。また、WB 発現鶏では、加齢に従って平均 CK 値は漸減し、平均 AST 値のレベルは大きく変化しなかった。一方、WB 非発現鶏では、平均 CK 値と平均 AST 値が加齢に従って上昇し、55 日齢時においては WB 非発現鶏の平均 CK 値と平均 AST 値がともに有意差はないものの WB 発現鶏のそれらを上回るレベルになった。affected; WB 発現鶏, unaffected; WB 非発現鶏。



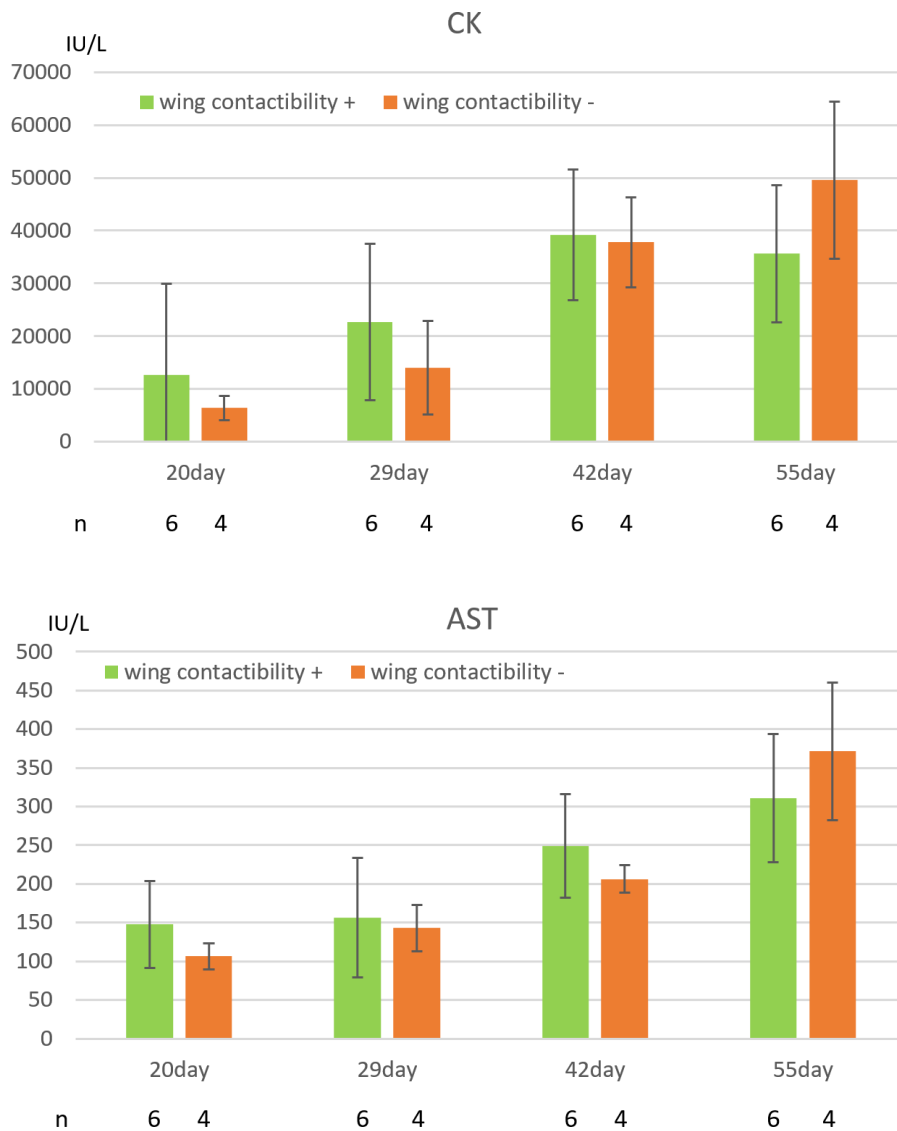


図 21 55 日齢時の翼の挙上試験において両側翼の肘関節外側同士の接触性が維持されたニワトリと消失したニワトリにグループ分けした場合のそれぞれのグループの creatine kinase (CK) と L-aspartate aminotransferase (AST) の平均値の推移。 両側翼の肘関節外側同士の接触性が消失したグループの平均 CK 値と平均 AST 値は、加齢に従って接触性を維持したグループと比べて顕著に上昇した。

### 3-4 解剖検査

#### 3-4-1 材料および方法

飼育期間中に自然死したニワトリ (No. 1, No. 5, No. 6 および No. 9) は、発見後、すみやかに冷蔵庫に入れて保管し、できるだけすぐに解剖を行った。55 日齢まで生存したニワトリ (No. 4, No. 11, No. 13 および No. 18 を除く) は、23 ゲージのディスポーサブル滅菌注射針を装着した 2.5ml のディスポーサブル滅菌注射筒を用いて翼下静脈から 20-30 mg/kg のペントバルビタールナトリウムを投与して麻酔した。十分な麻酔状態を確認した後、頸動脈を切断して放血による安楽死処置を施し、安楽死処置による死亡を確認した後、鶏体を仰臥位に保定して剥皮した。胸腹部皮側面を露出させ、胸部正中の長さとは最大幅を計測して、胸部の長さに対する最大幅の比率を計算した。解剖検査に際しては、諸臓器・器官の外観を確認するとともに、胸筋、烏口上筋 (= 深胸筋)、肝臓、腎臓を採材し、10%ホルマリンに浸漬して固定した。胸筋と烏口上筋は、頭側領域の 1/3 を採材した。

#### 3-4-2 成績

WB 発現鶏のうち 2 羽 (No. 3 および No. 7) は、55 日齢時において著明に削瘦していた。55 日齢時の胸部の長さに対する最大幅の比率は、WB 発現鶏 (削瘦した 2 羽を除く) においては、0.77 mm/mm, 0.79 mm/mm および 0.82 mm/mm, 削瘦した WB 発現鶏においては、0.52 mm/mm, 0.57 mm/mm, WB 非発現鶏では、 $0.76 \pm 0.02$  mm/mm であった。胸筋における乳白色～灰白色の筋線維に並行する線条 (white striping. 以下, WS) は、No. 3, No. 7 および No. 9 以外のすべてのニワトリで認められた (図 22)。また、No. 1, No. 5, No. 6 および No. 12 の烏口上筋においても胸筋と同様の線条 (WS) が認められた。胸筋表面におけるゲル状滲出物は、いずれのニワトリにおいてもみられなかった。No. 6 のニワトリでは、深胸筋変性症 (=deep pectoral myopathy または green muscle disease) と呼ばれる烏口上筋の中心部における限局性出血性凝固壊死が認められた。

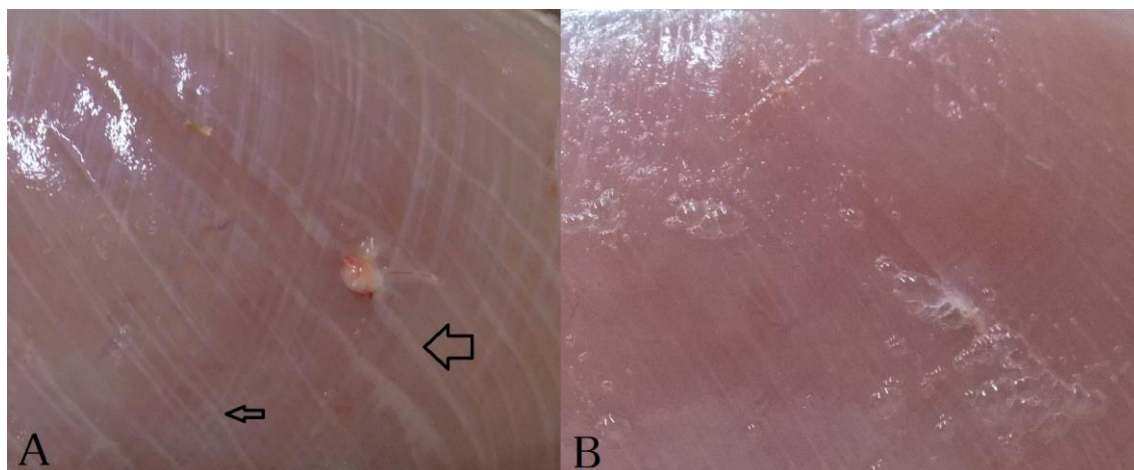


図 22 胸筋皮側表面に乳白色～灰白色の筋線維に並行する線条 (white striping) が認められた胸筋 (A; No. 2) と線条が認められない胸筋 (B; No. 15)。本研究では，55 日齢において WB 発現鶏 3 羽を除くすべてのニワトリの胸筋に認められた。

### 3-5 組織学的検査

#### 3-5-1 材料および方法

解剖検査の際に採材し，10%ホルマリンに浸漬した胸筋と烏口上筋は，筋線維走行に対して垂直方向の組織断面（以下，筋組織横断面）と筋線維走行に沿った方向の組織断面（以下，筋組織縦断面）が得られるように切り出した。また，肝臓は肝左葉，腎臓は前腎区のそれぞれ 1 箇所から組織片を切り出した。切り出した組織片は，いずれも約 5mm 厚とし，包埋カセット（村角工業，大阪）に薄切面が下になるように入れ，ステンレス製のティッシュテックプロセスカバー（サクラファインテック，東京）で蓋をし，水道水で脱ホルマリン処理をおこなった。脱ホルマリン後，自動包埋装置（AUTO-KINETTE Type1400P，白井松器械，大阪）によってメタノール脱水，キシレン透徹した後，パラフィンを組織片に浸透させ，パラフィン包埋ブロックを作製した。パラフィン包埋ブロックは，滑走式ミクロトームの目盛を厚さ  $3\mu\text{m}$  に調節して薄切し，シランコーティングされたスライドガラスに貼り付けた後，フラン器内で十分に乾燥させ，パラフィン組織切片標本とした。パラフィン組織切片標本は，キシレン，エタノールの各系列を通して脱パラフィンし，水に戻した後，常法に従い Hematoxylin and eosin 染色（以下，HE 染色）施し，HE 染色組織標本を作製した。また，必要に応じて，アザン染色，過ヨウ素酸シッフ（PAS）反応，リント



ングステン酸ヘマトキシリン（PTAH）染色を施した染色組織標本を作製した。これらの染色組織標本は光学顕微鏡下で観察するとともに HE 染色組織標本はすべて、それ以外は必要に応じて写真撮影を行った。また、胸筋と烏口上筋の筋組織横断面を切り出して作製した WB 発現鶏（No. 2, No. 3, No. 7, No. 8 および No. 10）と WB 非発現鶏（No. 12, No. 14, No. 15, No. 16, No. 17, No. 19 および No. 20）の HE 染色組織標本において、顕微鏡写真撮影装置（DP20-5, オリンパス, 東京）に実装された計測ソフトウェアを用いて筋線維短径を計測した。この筋線維短径の計測は、視野の中心にある筋線維から計測を開始して周囲に隣接する筋線維を順に 10 本計測し、これを無作為に決定した異なる視野で 10 反復して 1 標本につき 100 本分の筋線維短径の計測値を得た。筋線維短径の計測は 2 反復して精度評価した。個々のニワトリの胸筋と烏口上筋の筋線維短径の計測値からは、SAS を用いて UNIVARIATE procedure によって筋線維短径の平均値±標準偏差を求めた。筋線維短径の平均値±標準偏差については、解剖検査を実施したニワトリの数が少なかったため、統計学的分析は行わなかった。筋組織の主な組織学的所見の評価は、二重盲検法によって行った。

### 3-5-2 成績

解剖検査をおこなった 55 日齢の WB 発現鶏の筋組織における筋線維短径の平均値は、WB 非発現鶏のそれよりも小さかった。55 日齢の WB 非発現鶏（n=7）の筋組織における筋線維短径の平均値±標準偏差は、胸筋； $48.50 \pm 20.18 \mu\text{m}$ 、烏口上筋； $51.53 \pm 18.50 \mu\text{m}$  であった。高度に消瘦した個体（No. 3, No. 7）を除く WB 発現鶏（No. 2, No. 8 および No. 10）の筋線維短径の個々の平均値±標準偏差は、胸筋； $55.33 \pm 24.83 \mu\text{m}$ 、 $45.98 \pm 20.03 \mu\text{m}$  および  $43.20 \pm 20.92 \mu\text{m}$ 、烏口上筋； $57.93 \pm 19.92 \mu\text{m}$ 、 $43.78 \pm 17.30 \mu\text{m}$  および  $51.19 \pm 16.71 \mu\text{m}$  であった。高度に消瘦した個体（No. 3 および No. 7）の筋線維短径の平均値±標準偏差は、胸筋； $14.19 \pm 4.81 \mu\text{m}$  および  $30.33 \pm 13.71 \mu\text{m}$  であり、烏口上筋； $22.69 \pm 7.22 \mu\text{m}$  および  $35.73 \pm 12.27 \mu\text{m}$  であった。また、WB 非発現鶏を 55 日齢時における両側翼の肘関節外側同士との接触性の有無で分けた場合の個々の胸筋と烏口上筋の筋線維短径の平均値±標準偏差を表 4 に示した。WB 非発現鶏の 55 日齢時における両側翼の肘関節外側同士との接触性喪失については、胸筋と烏口上筋の筋線維径には著明な差として反映されていなかった。

すべての WB 発現鶏および WB 非発現鶏の胸筋および烏口上筋の筋組織横断面において、筋線維の多角形角の鈍化または欠如が認められた（図 23 および図 24）。WB 発現鶏では、WB 非発現鶏と比較して、筋線維の変性または壊死、筋間

脂肪組織の増加，びまん性の線維性間質肥厚が幾分著明に認められた（表 5）。しかし，線維性間質肥厚は個体間での程度の差が大きかった。小径（ $<20\ \mu\text{m}$ ）の筋線維が解剖検査をおこなったすべてのニワトリの胸筋または烏口上筋の一方，または両方において，局在性あるいは散在性に認められた（図 23 および図 24）。

解剖検査を行った WB 非発現鶏 7 羽のうち 6 羽の肝臓においては，ほとんどの肝細胞が PAS 反応に陽性を示したが，WB 発現鶏 9 羽のうち 7 羽の肝臓においては，ほとんどの肝細胞が PAS 反応に陰性を示した（図 25）。また，肝細胞の巣状壊死が No. 1, No. 6 および No. 8 のニワトリで観察され（図 26），No. 3 のニワトリでは，重度の肝細胞萎縮，骨髓球浸潤（髄外造血）を伴うびまん性の肝線維症が認められた（図 27）。

WB 発現鶏のうち，No. 1, No. 3, No. 8 および WB 非発現鶏の No. 14, No. 20 では，腎臓において，細胞増殖を伴わない腎糸球体毛細管壁の肥厚（膜性腎症 membranous glomerulopathy）が認められた（図 28）。

Wing contactability	Case No.	PM	SM
+	14	$51.01 \pm 20.13\ \mu\text{m}$	$60.12 \pm 16.84\ \mu\text{m}$
	15	$48.65 \pm 21.38\ \mu\text{m}$	$62.73 \pm 16.80\ \mu\text{m}$
	17	$49.42 \pm 19.25\ \mu\text{m}$	$42.62 \pm 13.25\ \mu\text{m}$
	19	$39.79 \pm 13.72\ \mu\text{m}$	$41.63 \pm 12.91\ \mu\text{m}$
-	12	$55.96 \pm 21.59\ \mu\text{m}$	$49.00 \pm 16.71\ \mu\text{m}$
	16	$47.83 \pm 19.64\ \mu\text{m}$	$55.64 \pm 18.94\ \mu\text{m}$
	20	$46.85 \pm 21.42\ \mu\text{m}$	$48.97 \pm 21.47\ \mu\text{m}$

表 4 WB 非発現鶏を 55 日齢時における両側翼の肘関節外側同士との接触性の有無で分けた場合の個々の胸筋と烏口上筋の筋線維短径の平均値。本研究においては，一部の WB 非発現鶏は，55 日齢時に両側翼の肘関節同士との接触性が喪失した。この接触性の喪失と筋線維短径との関係性をグループ分けして比較したが，両グループ間で著明な差は認められなかった。供試鶏の数が少なかったため，両グループの平均値の統計学的比較はおこなわなかった。PM；胸筋，SM；烏口上筋。

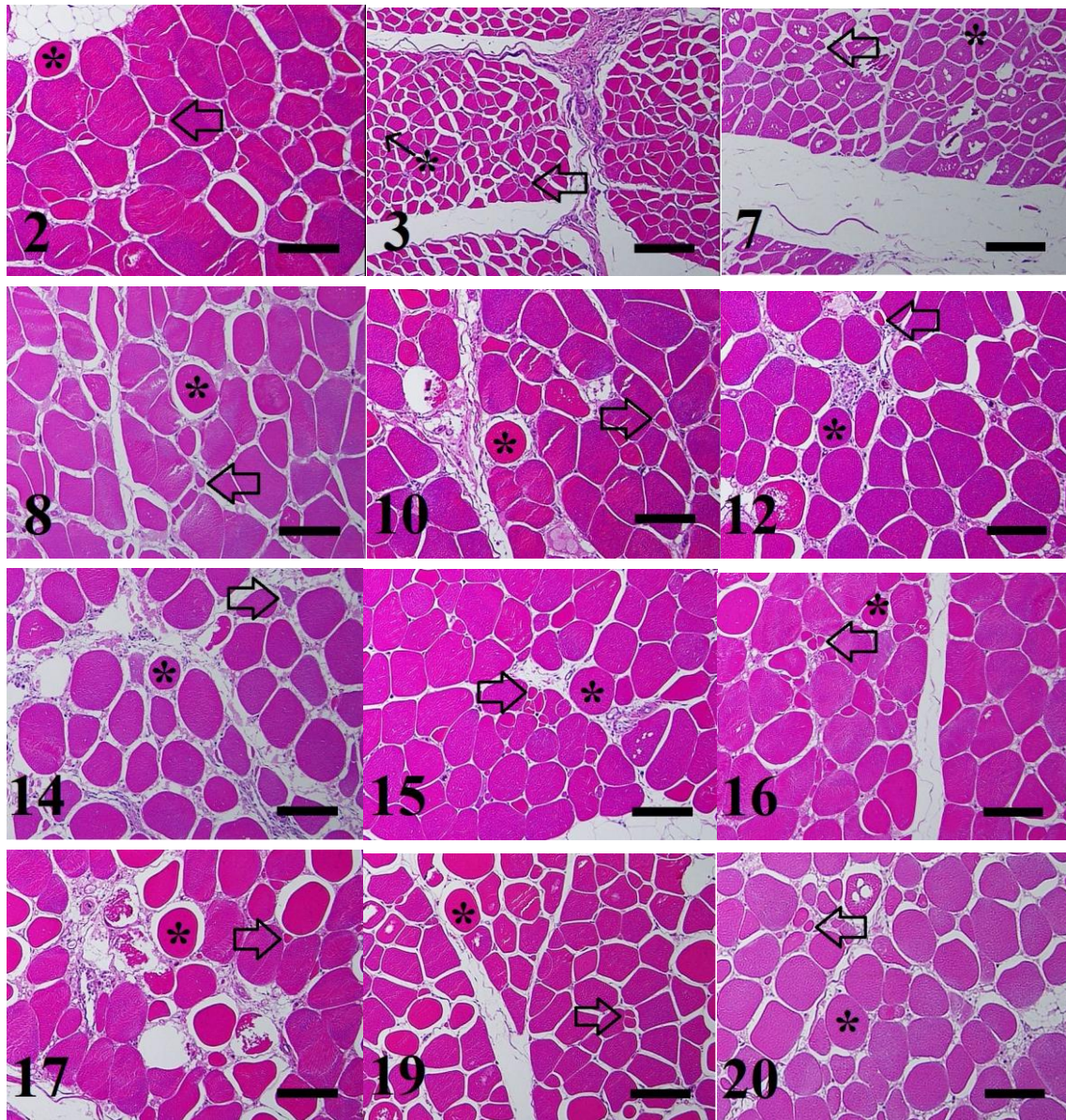


図 23 WB 発現鶏と WB 非発現鶏の胸筋組織横断面。 図の数字は Case No. を示す。No.3 および No.7 は、筋線維径が全体的に他のニワトリよりも小さかった。多角形角が鈍化または欠如した筋線維（\*）は、すべてのニワトリの胸筋において認められた（No.3 および No.7 では、多角形角の欠如は著明ではなかった）。小径（ $<20\mu\text{m}$ ）の筋線維はすべてのニワトリの胸筋において認められた（太い矢印）。HE 染色。Bar= $100\mu\text{m}$ 。



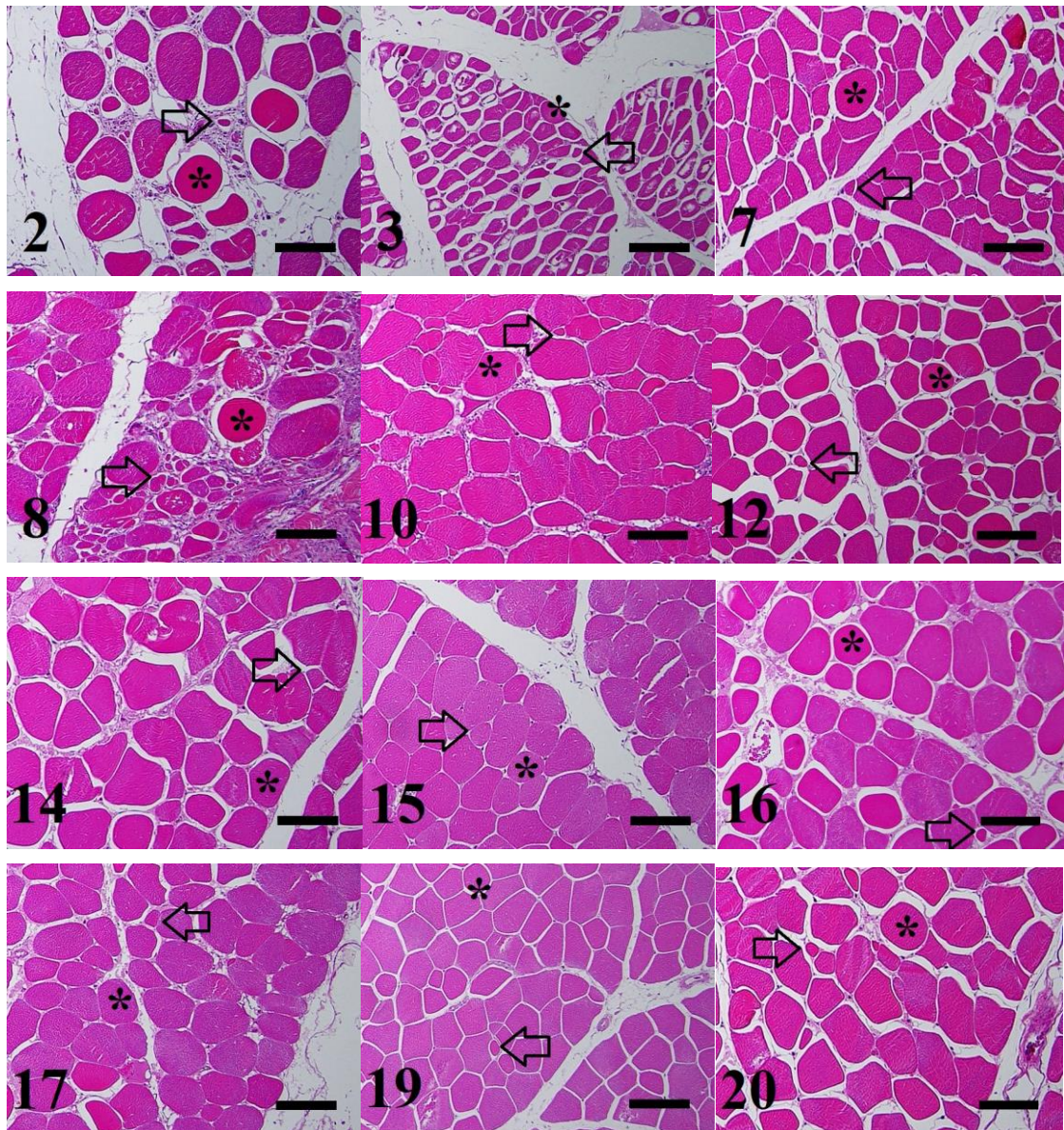


図 24 WB 発現鶏と WB 非発現鶏の鳥口上筋組織横断面。 図の数字は Case No. を示す。No. 3 は、筋線維径が全体的に他のニワトリよりも小さかった。多角形角が鈍化または欠如した筋線維（\*）は、すべてのニワトリの胸筋において認められた（No. 3 では、多角形角の欠如は著明ではなかった）。小径（ $<20\mu\text{m}$ ）の筋線維はすべてのニワトリの胸筋において認められた（太い矢印）。HE 染色。

Bar= $100\mu\text{m}$ 。

Case No.	解剖日齢	筋組織	多形角喪失筋線維	筋線維変性	小径筋線維	筋間脂肪組織	筋間結合組織	炎症細胞浸潤
6	37d	PM	+	+	+	++	+	-
		SM	++	+	+++	-	+	-
5	44d	PM	±	-	+	++	±	-
		SM	+	±	+++	-	-	-
9	52d	PM	+++	++	++	+	++	++
		SM	+++	+++	++	-	+++	++
1	54d	PM	+++	+++	+++	+	++	-
		SM	+	±	+	-	+	-
2	55d	PM	±	+	+	++	±	-
		SM	+	+	+	++	++	+
3	55d	PM	-	-	+++	-	+	-
		SM	+	±	+++	-	-	-
7	55d	PM	±	++	+++	±	+	-
		SM	-	-	+	-	-	-
8	55d	PM	+	+	+	-	±	-
		SM	++	++	++	-	++	-
10	55d	PM	++	++	+	+	+	-
		SM	±	-	±	-	±	-
12	55d	PM	++	+	±	+	+	±
		SM	+	±	+	-	+	-
14	55d	PM	++	+	++	-	++	+
		SM	-	-	±	-	-	-
15	55d	PM	+++	+	+	+	+	-
		SM	-	-	±	+	-	-
16	55d	PM	++	+	+	++	+	-
		SM	+	-	±	-	±	-
17	55d	PM	++	+	+	++	+	-
		SM	±	-	+	±	±	±
19	55d	PM	±	±	++	-	±	-
		SM	-	-	++	-	-	-
20	55d	PM	++	+	+	-	+	-
		SM	±	±	+	+	±	-

-；所見なし，±；軽微，+；軽度，++；中度，+++；重度

PM；胸筋，SM；烏口上筋

**表 5 WB 発現鶏と WB 非発現鶏の胸筋の主な組織所見の評価。** WB 発現鶏（No. 1-10）では，WB 非発現鶏（No. 12-20）よりも筋線維の変性・壊死，小径筋線維の出現頻度が高く，筋間脂肪組織の増生，びまん性の筋間結合組織の増生がやや重度であった。



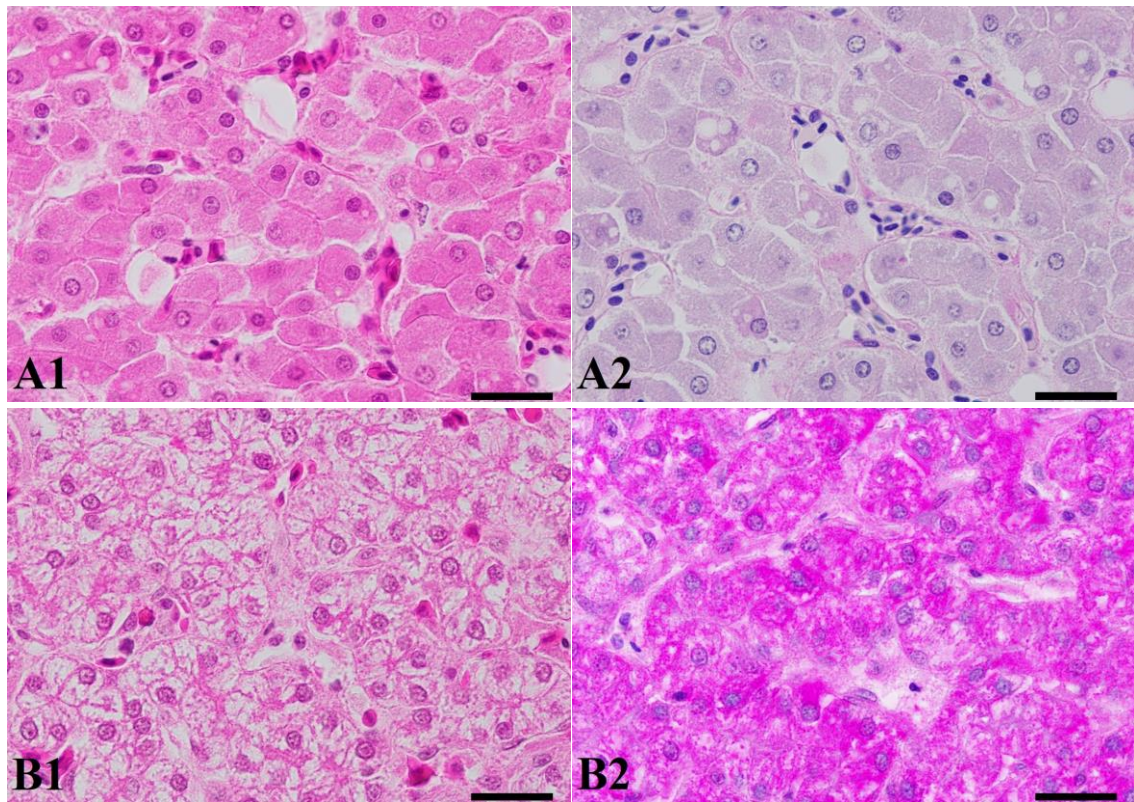


図 25 過ヨウ素酸シッフ反応で陰性を示した肝臓と陽性を示した肝臓。 A1 は Case No. 1 の肝臓の HE 染色像。A2 は同肝臓の過ヨウ素酸シッフ反応像。B1 は Case No. 20 の肝臓の HE 染色像。B2 は同肝臓の過ヨウ素酸シッフ反応像。過ヨウ素酸シッフ反応に陰性を示した肝細胞 (A2) の細胞質は、HE 染色では弱好酸性かつ充実性でしばしば限界明瞭な白く抜けた脂肪空胞が認められる (A1) のに対し、過ヨウ素酸シッフ反応に陽性を示した肝細胞 (B2) の細胞質は、HE 染色では大部分が淡明で限界不明瞭な顆粒状ないし細格子モザイク状を呈する (B1)。Bar=20  $\mu$  m。



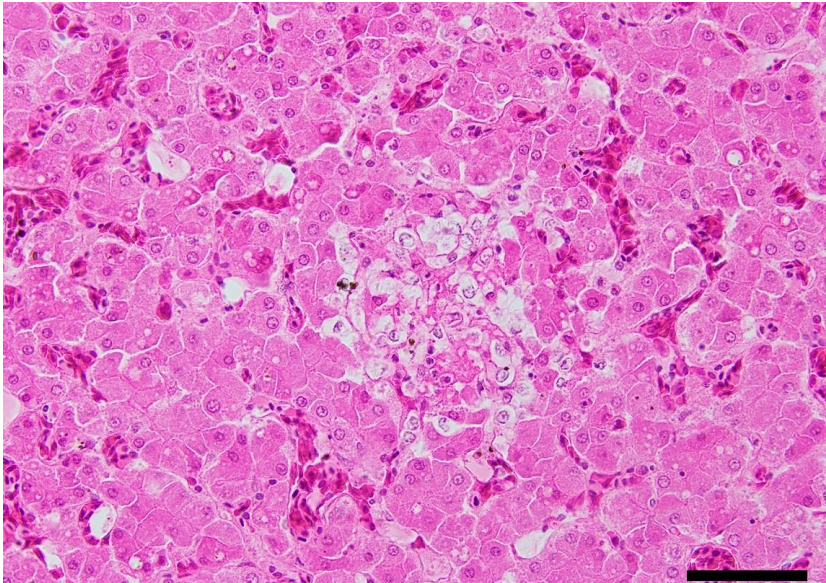


図 26 肝細胞の巣状壊死。 WB 発現鶏の一部 (No. No. 1, No. 6 および No. 8) の肝臓には、散在性の微小な肝細胞壊死巣が認められた。Bar=50  $\mu$  m。

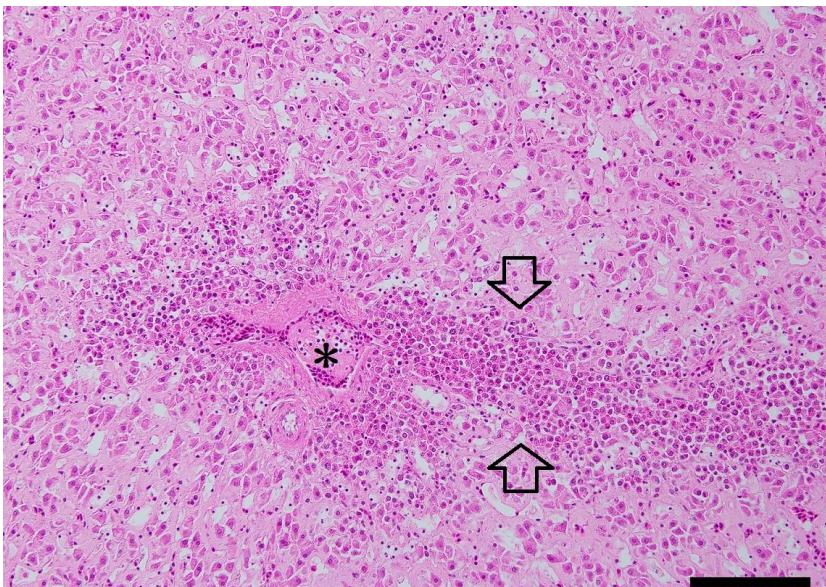
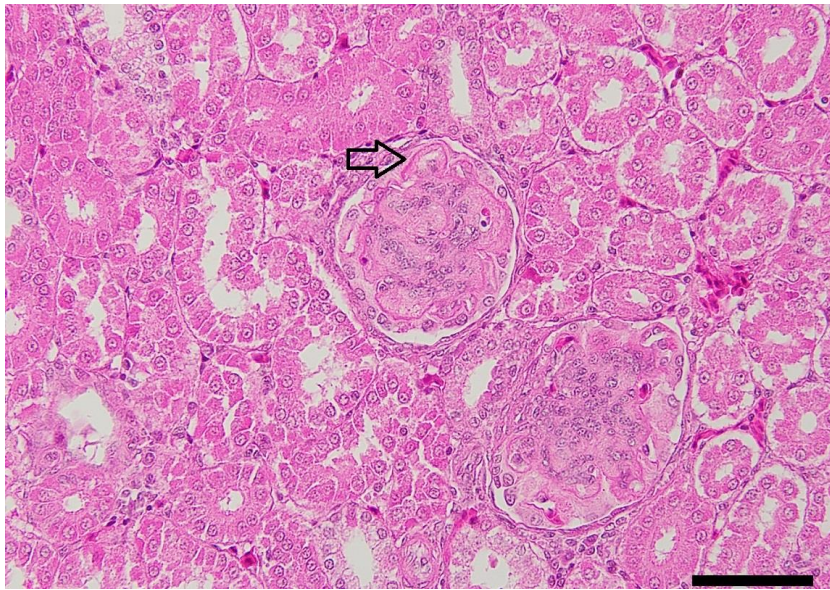


図 27 重度の萎縮肝。 No. 3 のニワトリの肝臓では、重度の肝細胞萎縮，骨髓球浸潤（髄外造血）びまん性の肝線維症が認められた。また，一部の血管に硝子様血栓が形成され (\*), 血管周囲に骨髓球が浸潤していた（矢印）。Bar=100  $\mu$  m。





**図 28 膜性腎症。** WB 発現鶏の一部のニワトリ (No. 1, No. 3, No. 8) と WB 非発現鶏の一部のニワトリ (No. 14, No. 20) の腎臓において、細胞増殖を伴わない腎糸球体毛細管壁の肥厚 (矢印) が認められた。Bar=50  $\mu$ m。

### 3-6 まとめ

筋組織内に生じる損傷は、血漿中または血清中の生化学的プロファイルに反映される (Kuttappan et al., 2013b)。とくに CK 活性の測定は、心筋梗塞、筋ジストロフィーなどの筋肉疾患で臨床的意義が高い (藤田, 2010)。CK は、筋肉において、収縮によって消費される ATP を迅速に再供給する際に、creatine phosphate から ADP へリン酸が転移される反応を触媒する酵素である (谷口・藤井, 1997)。家畜では、CK 活性の測定は、主に外傷、栄養性ミオパチー、運動誘発性筋傷害、あるいは先天性ミオパチーに関連して起こる骨格筋傷害のマーカーとして利用される (Hoffman and Solter, 2008)。また、血漿中の AST は、肝細胞や筋線維の傷害時において上昇することから、骨格筋傷害を評価する際にも有用なマーカーとなることが考えられる (Hoffman and Solter, 2008)。

本研究では、19 日齢の商業飼育されているブロイラー群から翼の挙上性試験と胸部触診によって WB 発現鶏と WB 非発現鶏を判別して、個体識別した上で、55 日齢まで飼育を継続した。20 日齢時に WB 発現鶏の CK 値および AST 値を測定したところ、それらの測定値は WB 非発現鶏のグループよりも有意に高値を示していた。したがって、翼の挙上性試験と胸部触診による WB 発現鶏と WB 非

発現鶏のグループ分けが適切に行われたことを確認することができた。

WB 非発現鶏は、29 日齢時まですべてのニワトリが両側翼の肘関節外側同士の接触性を有していた。しかし、55 日齢時においては、これらの両側翼の肘関節外側同士の接触性は、10 羽中の 6 羽で維持されたものの、4 羽では消失した。また、WB 非発現鶏の CK 値は、全体として加齢とともに上昇した。すなわち、WB 非発現鶏においては、加齢とともに徐々に WB 発現鶏と同様の筋障害を発現し、筋線維の変性・壊死が増加したものと考えられた。一方、WB 発現鶏では、加齢とともに体重増加速度が抑制され、CK 値も低下したが、これは、WB 発現鶏において飼育期間の後半に何らかの原因により筋組織の発育が急激に失速することで、筋線維の変性・壊死の発生が低減された結果であると推測された。筋組織における変化と CK 値との関係性は、55 日齢時における解剖検査と組織学的検査において、筋線維の走行に垂直な断面における多角形角の鈍化または欠如あるいは筋線維の変性・壊死およびそれらに随伴する組織変化の出現程度を確認することでも明らかにされた。WB 非発現鶏の No. 19 については、20 日齢の時点で CK 値および AST 値が WB 発現鶏とほぼ同じレベルで、潜在的に WB 発現鶏と同様の筋組織変化を発現していた可能性を考慮する必要があると思われた。以上の所見から、ブロイラーにおいては、明らかな臨床兆候を伴わずに筋線維の変性性障害を組織レベルで発現することで CK 値および AST 値の上昇が先行しはじめ、筋障害が進行するとともに両側翼の肘関節外側同士の接触性の消失が認められるようになるのではないかと考えられた。

WB 発現鶏の胸筋において頻繁にみられた筋組織の変性性病変は、胸筋だけではなく、烏口上筋にも同様に観察された。深胸筋変性症 (deep pectoral myopathy, green muscle disease) は、ニワトリおよびシチメンチョウにしばしば出現する烏口上筋の変性性病変である (Crespo and Shivaprasad, 2008)。Shiller and Wight (1978) は、シチメンチョウにおける深胸筋変性症の形態的特徴として、烏口上筋の中心領域に限局性の壊死を生じるが、同筋の前方領域は通常病変を形成しないと述べている。それに対して、烏口上筋の中心領域に限局する変性・壊死病変は、本研究においては 1 羽のニワトリに認められたが、それ以外のニワトリでは認められなかった。また、3 羽の WB 発現鶏と 1 羽の WB 非発現鶏の烏口上筋では、肉眼的に筋線維走行に沿って著明な白い線条が認められた。これらの所見の相違から、本研究において観察された大部分の烏口上筋における筋組織の変性性病変は、深胸筋変性症とは病態が異なっており、WB 発現鶏の胸筋と同様であると考えられた。烏口上筋における筋組織の変性性病変の出現頻度や病変の程度は、WB 非発現鶏よりも WB 発現鶏でより高頻度かつ重度であった。

末梢動脈疾患(PAD)は、全身性アテローム性動脈硬化症の一つの兆候であり、ヒトの下肢筋肉に分布する動脈の進行性の狭窄および閉塞をもたらす(Koutakis et al., 2014; Koutakis et al., 2015)。Koutakis et al. (2015)は、筋組織の横断面における PAD 病変では、筋線維径の縮小、多角形角の欠如あるいは円形化を伴う不規則形状、および筋線維密度の低下を認めると述べている。また、いくつかの研究報告では、ブロイラーの重度の変性性筋組織において、筋線維径の重度のばらつき、筋線維横断面に特有の多角形状の欠如が認められることを示している(Sihvo et al., 2014; Mazzoni et al., 2015; Soglia et al., 2016)。

本研究では、筋組織の筋線維横断面において、特有の多角形角の鈍化または欠如が、頻度や程度の差はあるものの、WB 発現鶏の胸筋だけでなく WB 非発現鶏の胸筋でも最も一般的にみられる所見であった。変性性変化を伴う筋線維、小径筋線維、線維増生による筋間結合組織の肥厚は、WB 非発現鶏よりも WB 発現鶏で頻繁にみられた。また、胸筋組織と同様の筋組織病変は、鳥口上筋においてもみられた。経時的な臨床所見の推移と最終的な筋組織所見との関係からは、筋線維の横断面に特有の多角形角の鈍化または欠如が筋組織への慢性的な血液供給不足によって生じた初期の変性性病変である可能性があること、WB 非発現鶏においても加齢と急速な体重増加によって WB を発現するリスクがあることが示唆された。今後、ブロイラーにおける WB の発現と胸筋あるいは鳥口上筋における進行性の動脈の狭窄や閉塞との関係性や発生に至る機序を明らかにするためには、筋間組織における血管の分布や分枝、血管周囲炎などの炎症性変化の発生や広がりなどをふまえたさらなる検討が必要である。また、本研究における試験飼育では、良好に管理された環境で十分に飼料と水を供給しているにもかかわらず、WB 発現鶏のほとんどが 55 日齢までの飼育期間に死亡するか健康状態を悪化させた。また、WB 非発現鶏においても、40-50%のニワトリが飼育期間の後半で両側翼の肘関節外側同士との接触性を失った。これらの結果からは、飼育中期までに胸筋が極度に発育することによって、胸筋組織が損傷を受けると、ニワトリの健康状態を損ない、ブロイラーの生産性に負の影響をもたらすことと、統計的有意性は示すことができなかったものの飼育中期までに WB を発現しなかったニワトリにおいても急速な発育によって WB を発現する可能性があることが示唆された。

6/7 羽の WB 非発現鶏の肝臓では、肝細胞の細胞質が PAS 反応で陽性を呈したのに対し、7/9 羽の WB 発現鶏の肝臓では、肝細胞の細胞質が PAS 反応に陰性を呈した。このことから、WB 発現鶏においては、グリコーゲンの分解または生成に関与する代謝あるいは栄養吸収の状態が WB 非発現鶏と異なっていた可能性

が示唆された。また、WB 発現鶏の 3 羽では、肝細胞の巣状壊死が認められ、WB 発現鶏の極度に消瘦したニワトリでは、重度の肝細胞萎縮が認められた。これらの肝臓の変化は、WB 発現鶏において体の機能低下と衰弱を反映したものであると推測されたが、何らかの基礎疾患を反映している可能性についても考慮すべきである。

健常なニワトリでは、肝臓におけるグリコーゲン蓄積量は、摂食後に増加し、絶食により低下する (Scanes, 2015)。Abasht et al. (2016) は、WB 発現鶏から得られた胸筋におけるグリコーゲン含量を測定した結果、WB 非発現鶏と比べて WB 発現鶏では測定値がかなり低かったことを報告している。哺乳動物においては、肝グリコーゲン合成酵素欠損症はグリコーゲンの蓄積量を減少させる (Burchell, 1998)。この疾患においては、肝臓におけるグリコーゲンの合成のみが阻害され、炭水化物を含む食餌の摂取後に食後高血糖が引き起こされる (Weinstein et al, 2006)。本研究では、WB 発現鶏において、飼育期間中に体重の増加抑制、腹水症、開脚性の起立歩行障害、著明な消瘦、死亡といった健康状態の悪化を示す臨床症状が多発した。このことから、WB 発現鶏においては、飼育期間中に二次的な健康状態の悪化と栄養状態の悪化が並行して生じたことが明らかになった。しかし、これらの因果関係については、個体ごとの摂食量や排泄量、その他全般的な健康状態の変化、などについてより綿密に観察し、変化のタイミングやその原因とみられる事象を明らかにする必要がある。また、今回得られた所見の範囲では、胸筋や烏口上筋における組織変化と肝臓の組織変化との関係を明らかにすることはできなかったことから、生化学的分析や血糖値測定、肝臓の酵素分析をふまえた多角的視点でのさらなる研究が必要である。

今回、腎臓において複数のニワトリに共通して観察された組織所見は、WB 発現鶏 3 羽と WB 非発現鶏 2 羽にみられた膜性腎症であった。この病変は、外来性タンパク質の慢性的な暴露によって誘導され、腎糸球体に沈着する循環性免疫複合体を形成する (Jennette et al., 2005)。膜性腎症は、ニワトリが健康障害によって飲水不足や脱水に陥った結果として生じる可能性があり、したがって、原発性疾患と腎障害との間に直接的な因果関係は必ずしも存在しない (Abdul-Aziz and Fletcher., 2016)。また、食餌中の過剰な塩化ナトリウム含量、全身性の高血圧症、酢酸デオキシコルチコステロンの投与、アフラトキシン中毒などとの関連性が考慮されるべきである (Abdul-Aziz and Fletcher., 2016)。

本研究では、ブロイラーの胸部の異常硬化について、病態発生機序を明らかにする十分なデータを得ることはできなかった。しかし、複数の WB 発現鶏と



WB 非発現鶏を同時に同条件で飼育し，個体ごとに継続的に観察することによって，WB を発現したニワトリの予後と WB の発現に至る段階的な臨床的变化を経時的に捉えることができた。すなわち，飼育初期の段階で胸部が異常に硬化したニワトリのほとんどは，そのまま飼育を続けると健康状態や体重増加が抑制され，しばしば死に至ることが明らかになった。また，飼育初期の段階で胸部の異常な硬化を発現していないニワトリでも，加齢とともに体重が急増してくると，胸部の異常硬化が発現する可能性があることが明らかになった。さらに，組織学的には，異常な胸部の硬化は，胸筋とともに烏口上筋の筋組織においても変性・壊死性の変化が生じることを反映しており，それらの筋組織変化は，急激な体重増加と関係している可能性が示唆された。

## 第 4 章 異なる生化学検査系における測定値の相関

### 4-1 はじめに

第 2 章および第 3 章における研究では、血漿中の creatine kinase (CK) と L-aspartate aminotransferase (AST) を異なる生化学測定装置とそれぞれ専用の試薬キットを用いて測定した。一般に検査系が異なる場合、同じ検体を測定しても異なる測定値が得られることが少なくない。そのためヒトの医学臨床検査においては、さまざまなレベルで標準化や校正方法の検討がなされている。一方、ヒト以外の動物については、測定方法や測定値についての標準化や校正方法の検討事例が少なく、異なる検査系間の測定値の比較検討をした例はほとんどない。獣医臨床で得られる動物種ごとの生化学測定値は、測定機関ごとに独自に取り扱われていたり、動物種が同一でも品種や系統、飼育背景によって測定データの範囲が広範囲に及んだりすることから、データの標準化をはかることは難しい。著者の研究室においては、2 種類の生化学検査装置を導入しており、両測定系の特性を考慮してその都度どちらを使用するかを判断して検査を実施するが、ブロイラーの血漿を用いて CK の測定をする際に、第 2 章の研究で使った測定系では、測定エラーが頻発したことから、第 3 章では別の測定系で測定することにした。そこで、第 2 章で用いた測定系と第 3 章で用いた測定系で得られた測定値の相関について明らかにする必要性から、同一検体を用いて検討することにした。

### 4-2 材料および方法

第 2 章の研究では、測定装置として、VetScan VS2 (Abaxis, Union City, CA, USA)、専用試薬は multirotor III (Abaxis, Union City, CA, USA)、第 3 章では、測定装置として、Spotchem D system (アークレイ, 京都)、専用試薬は Spotchem D CK と Spotchem D AST を用いた。ここでは、55 日齢のブロイラーから採取した血漿 15 検体を用いてこれらの 2 種類の生化学検査系で CK および AST を測定した。データの解析は、Microsoft Excel 2016 を用いた。

### 4-3 成績

2 種類の生化学検査系で同一血漿検体の CK と AST を測定した結果は、図 29

に示した。異なる検査系で得られた CK 値は、x 軸に Spotchem D system による測定値 (CK(SC))、y 軸に VetScan VS2 による測定値 (CK(VS)) をプロットし、得られた回帰直線の数式は  $y=0.9277x$ 、 $R^2=0.9788$  で両者に強い相関がみられた。また、異なる検査系で得られた AST 値は、x 軸に Spotchem D system による測定値 (AST(SC))、y 軸に VetScan VS2 による測定値 (AST(VS)) をプロットし、得られた回帰直線の数式は  $y=1.3075x$ 、 $R^2=0.6830$  で両者にある程度の相関がみられた。

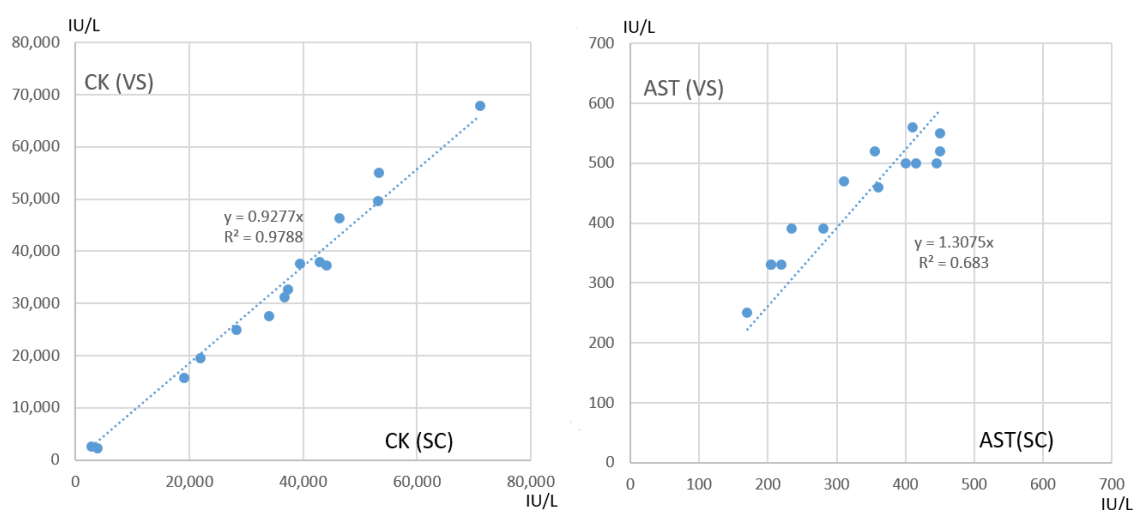


図 29 VetScan VS2 と Spotchem D system による同一血漿の CK と AST の測定値。 VetScan VS2 による測定値は、CK(VS)および AST(VS)、Spotchem D system による測定値は、CK(SC)および AST(SC)。

#### 4-4 まとめ

これらの結果から、VetScan VS2 と Spotchem D system による CK と AST の測定では、おおむね相関性のある測定結果が得られることが明らかとなったが、AST については、Spotchem D system で測定した場合、VetScan VS2 による測定値よりもやや低値を示す傾向があることがわかった。

VetScan VS2 では、CK と AST を含む複数の生化学検査項目を一度に測定することができる multirotor III に必要な測定試薬がセットされており、90-120  $\mu$  m の血漿を用いてすべての項目の同時測定をおこなう。この検査系における CK の測定では、CK 逆反応によって生成する ATP が hexokinase (HK) の作用で glucose と反応すると glucose-6-phosphate が生成され、さらに Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PD) と NADP+ との反応によって NADPH が生成さ

れる。この NADPH の生成速度を 340nm と 405nm の吸光度変化として測定する。AST の測定では、L-aspartic acid と  $\alpha$ -ketoglutaric acid が AST の作用によって、glutamic acid と oxaloacetic acid に変換され、生成された oxaloacetic acid を malate dehydrogenase の触媒によって malic acid に還元するときに NADH が酸化されて NAD に変化し、その際に生じる 340nm と 405nm の吸光度変化を測定する。Spotchem D system では、ストリップの先端に接着された多層構造の吸着パッドに 1 種類の生化学項目の測定試薬がセットされた専用試薬ストリップを用い、必要な測定項目を選択してストリップを組み合わせることで検体ごとに複数の生化学項目の同時測定が可能である。検査項目を必要に応じて組み合わせることができることから、CK と AST の測定に際しては、血漿だけでなく血清でも測定が可能である。CK と AST の測定原理は、基本的に VetScan VS2 と同じである。ブロイラーの血漿中の CK および AST は、いずれの測定装置においても血漿を原液のまま検体として測定することができず、CK は 10-160 倍程度、AST は 5-10 倍程度の希釈が必要である。検体血漿を希釈する場合、VetScan VS2 では、精製水で希釈すると測定エラーが高頻度で発生したことから、精製水、種々のリン酸緩衝液など、様々な希釈液を用いて検討を繰り返した。その結果、第 2 章の研究で用いた IDEXX Laboratories の希釈液（従来は同社の抗体検査用 ELISA キットの血清希釈用である）が CK と AST を測定する目的で検体血漿を希釈する際に測定エラーが比較的発生せず、かつ測定結果の再現性が得られる希釈液として現時点では最適であった。また、懸濁検体を用いた場合も測定エラーが起りやすいことから、FRIGEN® II による前処理で血漿脂質の除去を確実に行うことが必要であった。複数種類の生化学項目の試薬が 1 個のローターにセットされているため、必要な項目を個別に測定することができない点、測定エラーが発生するとすべての項目が測定できなくなる点が難点であった。一方、Spotchem D system は、必要な測定項目ごとに検査を行うことができ、検体の希釈は、精製水で行うことができ、さらに懸濁除去処理をせずに検体としても測定エラーはほとんど発生しなかったことから、ニワトリの血液生化学検査を行う場合、コストパフォーマンスと検査効率がともに優れていると考えられた。VetScan VS2 と Spotchem D system による同一血漿検体を用いた CK と AST の測定値を比較した結果では、相関性が確認され、CK についてはどちらの検査系によってもおおむね同じレベルの測定値が得られることが明らかになった。しかし、AST については、VetScan VS2 による測定値よりも Spotchem D system による測定値が低めになる傾向があることから、これらの測定値の信頼性と差異が生じる原因について今後明らかにする必要がある。



## 第 5 章 総括

本研究では、まず、近年、ブロイラーに多発している wooden breast (WB) と呼ばれる胸筋における異常硬化の発現を飼育中の生きたニワトリで簡易的に診断する方法を確立するための検討をおこなった。胸筋は、強力な収縮によって上腕が内転して空気をとらえることで揚力を得る作用をもたらす筋肉で、ニワトリの骨格筋のうち、単体で最も強大な筋である。一般に骨格筋に障害が起こった場合には、収縮力の低下をもたらす、さらに線維化などの器質化が生じた場合には伸展性の低下が起こることが想定される。そこで、肉眼的に異常硬化した胸筋において、器質化と異常硬化との関係を確認することにした。食鳥処理場で発見される異常硬化胸筋 (WB 発現胸筋) を解体ラインで繰り返し触知し、弾力性の程度を含む触感を確認するとともに、それらの一部を採取して組織標本を作製した。肉眼的な状態と組織変化との関係について個別に観察したところ、硬化の程度が著しい胸筋では、筋線維の変性・壊死、再生、線維化の程度が重度であることが明らかになった。このことから、胸筋では器質化を伴う WB 発現により、筋の伸展性低下が生じ、両側翼の挙上性が制限されるという仮説を立てた。

この仮説をもとに、商業飼育されている 43 日齢のブロイラー鶏群で、鶏群中のニワトリを 1 羽ずつ診察し、両側翼の挙上性と胸部の硬さを個別に検査した。この検査の結果、鶏群中のほとんどのニワトリでは、両側翼の肘関節外側同士を接触させることが可能である一方、それができないニワトリが散見されることが明らかになった。そこで、翼の挙上性試験と胸部の触診を同時に行うことで、両側翼の肘関節外側同士が接触できるニワトリと接触できないニワトリを選抜・供試し、個体別に精査することにした。供試したニワトリは、生体観察、血液生化学検査後、安楽死処置して解剖検査と組織学的検査を行った。血液生化学検査では、骨格筋の傷害時に上昇する酵素マーカーとして、血漿中の creatine kinase (CK) と L-aspartate aminotransferase (AST) を測定したところ、両側翼の肘関節外側同士が接触できないニワトリでは、これらの測定値が一律に著明な高値を呈した。また、両側翼の肘関節外側同士が接触できないニワトリの胸筋の組織学的検査においては、筋線維の変性・壊死が多発し、全体的に筋線維断面の角が鈍化～円形化しており、疎性筋間結合組織の増生を認めた。これらの組織所見は、食鳥処理場で発見される WB 発現胸筋の組織所見および Sihvo et al. (2014) が報告した WB の組織所見と一致したことから、翼の挙上試験と胸部触診によって選抜した両側翼の肘関節外側同士が接触できないニワトリでは、WB が発現していたことが確認された。

つぎに、WB を発現したニワトリと WB を発現していないニワトリそれぞれの生体における経時的な変化を観察する目的で、商業飼育されている 19 日齢のブロイラー鶏群から、翼の挙上試験と胸部触診によって WB 発現鶏と WB 非発現鶏を選抜して試験鶏舎に搬入し、商業的な飼育で用いられてるブロイラー肥育後期用配合飼料を不断給餌して 55 日齢まで試験鶏舎で飼育した。飼育期間中は、個体ごとの翼の挙上試験と一般状態の観察を経時的に行い、あわせて体重、血漿中の CK と AST を測定した。飼育途中で自然死したニワトリはその都度、飼育期間を通じて生存したニワトリは 55 日齢時に安楽死処置後、解剖検査と組織検査を行った。この飼育試験では、19 日齢で WB を発現していたニワトリ 10 羽のうち 5 羽で体重が抑制され、4 羽が自然死した。また、19 日齢で WB を発現していなかったニワトリは、飼育期間中に死亡したり体重が著しく減少したりすることはなかったが、加齢とともに体重が増加してくると、血漿中の CK と AST も著明に上昇し、40-50%の個体では翼の挙上試験における両側翼の肘関節外側同士との接触性が失われ、55 日齢時の解剖検査と組織検査においても WB の発現が確認された。これらのことから、ブロイラーの飼育初期から中期の段階で WB を発現したニワトリは、飼育期間中に健康状態や体重増加が抑制され、しばしば死に至る危険性があることが明らかになった。また、WB を発現していないニワトリにおいても、飼育期間中の急速な体重増加に伴って WB を発現する可能性があることが明らかになった。また、筋組織における変性・壊死性の変化と器質化は、ブロイラーの生体において、胸筋だけでなく、烏口上筋においても生じる可能性があり、両筋のこれらの病変がともに胸部の異常硬化と密接に関係していると考えられた。

## 謝辞

本研究は、著者が北見工業大学大学院工学研究科博士後期課程在学中に教授吉田孝博士の指導のもとに行ったものです。

ブロイラーの異常硬化胸筋は、近年、鶏肉生産上の損失につながる肉質異常をもたらす骨格筋障害として恒常的に発生しているもので、日常的な獣医診療および鶏肉製品の品質確保の一環で見出された課題です。現場における生体での異常硬化胸筋発現実態の初期段階での調査・臨床的検証については、長きにわたって共に診療業務に携わってきた坂井育子獣医師に継続反復的に協力を頂き、そこで数多くの所見と発現メカニズムの重要な手がかりを得たことが本研究に着手するきっかけとなりました。坂井育子獣医師には、この場を借りて心よりお礼を申し上げます。また、臨床的検証で得られた所見と製品化された鶏肉で発見される異常硬化との関連性についての解明をしていく段階にさしかかっていた時期における、渡邊敬文博士（当時は信州大学農学部助教、現在は酪農学園大学獣医学群准教授）との学会会場での偶然の出会いは、まさに本研究の展開におけるターニングポイントとなりました。渡邊敬文博士とは、この出会い以降、ブロイラーの異常硬化胸筋を中心に骨格筋異常の発現メカニズムに関する研究をともに精力的に進めています。さらに、渡邊敬文博士から酪農学園大学農食環境学群の教授岩崎智仁博士と准教授山田未知博士を紹介いただき、それぞれの専門分野からの多角的な視点で研究を進めていくための研究チームを結成しました。そして、同大学フィールド教育研究センターの鶏舎において、生体における異常硬化胸筋発現に関する個体別の経時的変化の観察とより詳細な胸筋の組織変化の解明についての研究を目的とした飼育試験を実施することができ、本研究の成果につなげることができました。これまで常に精力的かつ惜しみない協力と激励を頂いた渡邊敬文博士と岩崎智仁博士、そして、飼育試験に際して、全般的なフォローを頂いた山田未知博士、日々の飼育作業を通じてお世話になった酪農学園大学フィールド教育研究センターの尾崎邦嗣技師をはじめ現場の皆様に心より感謝申し上げます。

北見工業大学大学院工学研究科教授吉田孝博士には、本研究を進めるにあたり、全般を通じて数々のご助言をいただき、博士論文として取り纏めるきっかけを頂くとともに、本論文を書き上げるにあたって多大なるご支援とご指導をいただきました。ここに深く感謝の意を表します。

## 文献

Abasht B, Mutryn MF, Michalek RD, and Lee WR. (2016) Oxidative stress and metabolic perturbations in wooden breast disorder in chickens. PLoS ONE 11: e0153750. doi: 10.1371/journal.pone.0153750. PubMed: 27097013.

Abdul-Aziz T, and Fletcher OJ. Urinary system. In: Abdul-Aziz T, Fletcher OJ, Barnes HJ, Editors. Avian histopathology. 4th ed. The American association of avian pathologists, Florida; Jacksonville; 2016. p. 423-468.

Aviagen. ROSS 308 broiler: performance objectives 2014.

Bailey RA, Watson KA, Bilgili SF, and Avendano S. (2015) The genetic basis of pectoralis major myopathies in modern broiler chicken lines. Poultry Science 94:2870-2879.

Barbut S. (1997) Problem of pale soft exudative meat in broiler chickens. British Poultry Science 38:355-358.

Bell DD. Modern breeds of chickens. In: Bell and Weaver Jr ed. Commercial chicken meat and egg production 5th ed. Vol.1. Springer science + business media, New York, 2001.p.31-40.

Burchell A. (1998) Glycogen storage diseases and the liver. Baillière's Clinical Gastroenterology 12:337-354.

Chatterjee D, Zhuang H, Bowker BC, Rincon AM, and Sanchez-Brambila G. (2016) Instrumental texture characteristics of broiler pectoralis major with the wooden breast condition. Poultry Science 95:2449-2454.

Clark DL, and Velleman SG. (2017) 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.

Collins KE, Kiepper BH, Ritz CW, McLendon BL, and Wilson JL. (2014) Growth, livability, feed consumption, and carcass composition of the Athens Canadian Random Bred 1955 meat-type chicken versus the 2012 high-yielding Cobb 500 broiler. *Poultry Science* 93 :2953-2962.

Crespo R, and Shivaprasad HL. Developmental, metabolic, and other noninfectious disorders. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, editors. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. Academic Press, Massachusetts; Burlington; 2008. p.1233-1270.

半杭祥子. (2013) ブロイラーの浅胸筋変性症. 鶏病研究会報, 49:132.

藤田清貴. クレアチンキナーゼ (CK) と CK アイソザイム. 金井正光監修 臨床検査法提要改訂 33 版. 金原出版. 東京. 2010. p.530-535.

Hoffman WE, and Solter PF. (2008) Diagnostic enzymology of domestic animals. Pages 351-378 in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 6th ed. J. J. Kaneko, J. W. Harvey, and M. L. Bruss, ed. Academic Press, Burlington, MA.

Jennette JC. The kidney. In: Rubin E, Gorstein F, Rubin R, Schwarting R, Strayer D, Editors. *Rubin's pathology clinicopathologic foundations of medicine*. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Maryland; Baltimore; 2005. p.826-884.

加藤嘉太郎, 山内昭二. 改著家畜比較解剖図説上巻. 養賢堂. 東京. 1998.

Kawasaki T, Yoshida T, and Watanabe T. (2016) Simple method for screening the affected birds with remarkably hardened pectoralis major muscles among broiler chickens. *The Journal of Poultry Science* 53:291-297.

駒井亨. 肉用鶏の歴史. 養賢堂. 東京. 2010.

König HE, Korbel R, and Liebich H. Avian anatomy Textbook and colour atlas 2nd ed. 5M publishing, UK. 2009.

Koutakis P, Weiss DJ, Miserlis D, Shostrom VK, Papoutsi E, Ha DM, Carpenter LA, McComb RD, Casale GP, and Pipinos II. (2014) Oxidative damage in the gastrocnemius of patients with peripheral artery disease is myofiber type selective. Redox Biology 2:921-928.

Koutakis P, Miserlis D, Myers SA, Kim JK, Zhu Z, Papoutsi E, Swanson SA, Haynatzki G, Ha DM, Carpenter LA, McComb RD, Johanning JM, Casale GP, and Pipinos II. (2015) Abnormal accumulation of desmin in gastrocnemius myofibers of patients with peripheral artery disease: associations with altered myofiber morphology and density, mitochondrial dysfunction and impaired limb function. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 63:256-269.

Kuttappan VA, Brewer VB, Apple JK, Waldroup PW and Owens CM. (2012) Influence of growth rate on the occurrence of white striping in broiler breast fillets. Poultry Science 91:2677-2685.

Kuttappan VA, Shivaprasad HL, Shaw DP, Valentine BA, Hargis BM, Clark FD, McKee SR and Owens CM (2013a) Pathological changes associated with white striping in broiler breast muscles. Poultry Science 92:331-338.

Kuttappan VA, Huff GR, Huff WE, Hargis BM, Apple JK, Coon C, and Owens CM (2013b) Comparison of hematologic and serologic profiles of broiler birds with normal and severe degrees of white striping in breast fillets. Poultry Science 92:339-345.

Kuttappan VA, Hargis BM, and Owens CM (2016) White striping and woody breast myopathies in the modern poultry industry: a review. Poultry Science 95:2724-2733.

Kuttappan VA, Owens CM, Coon C, Hargis BM, and Vazquez-Añón M. (2017)

Incidence of broiler breast myopathies at 2 different ages and its impact on selected raw meat quality parameters. Poultry Science 96:3005-3009.

Mazzoni M, Petracci M, Meluzzi A, Cavani C, Clavenzani P, and Sirri F. (2015) Relationship between pectoralis major muscle histology and quality traits of chicken meat. Poultry Science 94:123-130.

Mudalal S, Lorenzi M, Soglia F, Cavani C, and Petracci M. (2015) Implications of white striping and wooden breast abnormalities on quality traits of raw and marinated chicken meat. Animal 9:728-734.

Nakamura YN, Iwamoto H, Shiba N, Miyachi H, Tabata S and Nishimura S (2004) Growth changes of the collagen content and architecture in the pectoralis and iliotibialis lateralis muscles of cockerels. British Poultry Science 45:753-761.

大津奈央 倉持好 佐々木淳 落合謙爾 御領政信 (2017) ブロイラーの浅胸筋変性症の病理学的研究. 日本獣医師会雑誌 70:357-362.

Owens CM, Alvarado CZ and Sams AR (2009) Research developments in pale, soft, and exudative turkey meat in North America. Poultry Science 88:1513-1517.

Petracci M and Cavani C (2012) Muscle growth and poultry meat quality issue. Nutrients 4:1-12.

Petracci M, Mudalal S, Soglia F, and Cavani C (2015) Meat quality in fast-growing broiler chickens. World's Poultry Science Journal 71:363-374.

Radaelli G, Piccirillo A, Birolo M, Bertotto D, Gratta F, Ballarin C, Vascellari M, Xiccato G, and Trocino A. (2017) Effect of age on the occurrence of muscle fiber degeneration associated with myopathies in broiler chickens submitted to feed restriction. Poultry Science 96:309-

319.

Roy BC, Oshima I, Miyachi H, Shiba N, Nishimura S, Tabata S and Iwamoto H (2006) Effects of nutritional level on muscle development, histochemical properties of myofibre and collagen architecture in the pectoralis muscle of male broilers. *British Poultry Science* 47:433-442.

ロス・ブリーダーズ社 チャンキー高品質ブロイラー生産の手引き 1991年版  
日本チャンキー協会 1991.

佐々木保・佐藤良市・大池裕治 (2015) 一食鳥処理場における浅胸筋変性症の発生状況と発症要因. *鶏病研究会報* 51:99-105.

Scanes, CG. Carbohydrate metabolism. In: Scanes CG ed. *Sturkie's avian physiology* 6th ed. Elsevier, Oxford, UK. 2015. p.421-441.

Sihvo HK, Immonen K and Puolanne E. (2014) Myodegeneration with fibrosis and regeneration in the pectoralis major muscle of broilers. *Veterinary Pathology* 51:619-623.

Siller WG, and Wight PAL. (1978) The pathology of deep pectoral myopathy of turkeys. *Avian Pathology* 7:583-617.

Smith DP and Northcutt JK. (2009) Pale poultry muscle syndrome. *Poultry Science* 88:1493-1496.

Soglia F, Mudalal S, Babini E, Di Nunzio M, Mazzoni M, Sirri F, Cavani C, and Petracci M. (2016) Histology, composition, and quality traits of chicken pectoralis major muscle affected by wooden breast abnormality. *Poultry Science* 95:651-659.

田名部雄一 家禽. 正田陽一編 品種改良の世界史・家畜編. 悠書館. 東京. 2010. p.367-437.

谷口直之・藤井順逸監訳. 生化学アトラス. 文光堂. 1997.

Tao X, Dong H, Zhang H, and Xin H. (2011) Sex-based responses of plasma creatine kinase in broilers to thermoneutral constant and cyclic high temperatures. *British Poultry Science* 52:800-806.

Trocino A, Piccirillo A, Birolo M, Redaelli G, Bertotto D, Filiou E, Petracci M, and Xiccato G. (2015) Effect of genotype, gender and feed restriction on growth, meat quality and the occurrence of white striping and wooden breast in broiler chickens. *Poultry Science* 94:2996-3004.

Van Laack RL, Liu CH, Smith MO, and Loveday HD. (2000) Characteristics of pale, soft, exudative broiler breast meat. *Poultry Science* 79:1057-1061.

Velleman SG, Anderson JW, Coy CS, and Nestor KE. (2003) Effect selection for growth rate on muscle damage during turkey breast muscle development. *Poultry Science* 82:1069-1074.

Velleman SG, and Clark DL. (2015) Histopathologic and myogenic gene expression changes associated with wooden breast in broiler breast muscles. *Avian Diseases* 59:410-418.

Watanabe T, Nishimura K, Takeuchi R, Koyama Y, Kusubata M, Takehana K, and Hiramatsu K. (2015) Oral ingestion of collagen peptide causes change in width of the perimysium of the chicken iliotibialis lateralis muscle. *The Journal of Veterinary Medical Science* 77:1413-1417.

Weinstein DA, Correia CE, Saunders AC, and Wolfsdorf JI. (2006) Hepatic glycogen synthase deficiency: an infrequently recognized cause of ketotic hypoglycemia. *Mol Genet Metab* 87: 284-288.

Woelfel RL, Owens CM, Hirschler EM, Martines-Dawson R and Sams AR (2002) The characterization and incidence of pale, soft, and exudative broiler meat in a commercial processing plant. *Poultry Science* 81:579-584.



吉田忠（1984） 最近におけるブロイラーインテグレーションの動向． 日本家禽学会誌． 21:287-295.