

飼料用米および飼料添加物が
ブロイラーの生産性能に及ぼす影響に関する研究

2023 年 3 月

新潟大学大学院 自然科学研究科

生命・食料科学専攻 生物資源科学コース

F20M005F 藤本 寛也

目次

第1章 緒言	1
第1節 ブロイラーを取り巻く環境と需給の動向	2
第2節 我が国における飼料用米をめぐる情勢	4
第3節 ブロイラーの生産効率向上のための添加物の利用	6
第4節 骨格筋タンパク質の合成と分解	11
第5節 本研究の目的と構成	12
第2章 前期ブロイラーへの飼料用米および飼料添加物給与が飼養成績およびタンパク質代謝に及ぼす影響について	15
第1節 飼料用米給与が飼養成績およびタンパク質に及ぼす影響	16
第2節 餌付け期における飼料用米給与が飼養成績に及ぼす影響	40
第3節 飼料用米飼料へのフィターゼ添加が飼養成績に及ぼす影響	50
第4節 飼料用米飼料へのカルニチン添加が飼養成績に及ぼす影響	71
第5節 高タンパク質飼料へのカルニチン添加が飼養成績に及ぼす影響	92
第3章 前期ブロイラーへのベタイン給与が飼養成績およびタンパク質代謝に及ぼす影響について	112

第1節 標準的な成長速度のブロイラーへのベタインおよびメチオニン給与が

飼養成績、タンパク質代謝に及ぼす影響・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 113

第4章 総括・・ 135

参考文献・・ 141

謝辞・・ 157

第 1 章

緒言

第1節 ブロイラーを取り巻く環境と需給の動向

ブロイラー (broiler) とは、肉鶏の一品種であり、食肉生産における大量飼育用の雑種鶏の総称である。産業としては1923年に米国を発祥の地として、1949年以降に急激に増加・拡大していった。短期間で急速に増体させることを目的に種鶏の育種が進められ、現在では42日齢で3.0kg前後まで成長する品種となっている。そのため、鶏肉は効率的な生産による安価な動物性タンパク質源としての役割を持ち、需要が非常に高く、今日の食生活において無くてはならない食材の一つである。国際連合食糧農業機関 (FAO ; Food and Agriculture Organization of the United Nations) が公開している FAO STAT によると、ブロイラーの世界飼養羽数は、2010年に197億羽だったのに対し、2020年には256億羽と大幅に増加している。また、米農務省 (USDA ; United States Department of Agriculture) 発表の「Livestock and Poultry : World Markets and Trade」によると、鶏肉の世界生産量 (Ready to Cook Equivalent) は、2023年には過去最高の102,736千トンになると予測されており、2018年の92,660千tと比較しても増加傾向(10.8%増)を示している。近年、家畜向けの配合飼料やエネルギーコストの高騰が畜産の収益性を圧迫しているが、食品価格の上昇の中で消費者が安価な動物性タンパク質を求めていることが予想され、鶏肉の需要拡大に拍車をかけていると思われる。

2022年7月11日、「世界人口デー」に国際連合 (United Nations) から発表された「World Population Prospects 2022」によると、世界人口は2030年に約85億人に達し、2050年には約97億人にまで増加する見込みで、2080年代には約104億人でピークを迎えると予測されている。

る。約 60 年後に人口が頭打ちになるとの予想だが、世界の人口は現在も増え続けており、2050 年の 97 億人に見合う食料を確保するためには、2013 年の 2 倍の食料を生産する必要がある（FAO, “The future of food and agriculture : Trends and challenges”）。さらに、FAO が公表している「World Agriculture Towards 2030/2050 (the 2012 revision)」によると、2005 - 2007 年平均と 2050 年を比較した場合に、肉類の世界消費は 76%増加すると報告されている。同様に農林水産政策研究所による「2050 年における世界の食料需給見通し」では、2050 年には 2010 年比 1.7 倍の世界食料需給となり、中でも畜産物と穀物の増加率が大きい。世界の穀物等の生産見通しでは、食料需給の増加に伴い、2010 年比で穀物が 1.7 倍、油糧種子は 1.6 倍に増加するとされる。一方で、収穫面積は穀物で 1.0 倍、油糧種子で 1.1 倍となっており、生産量の伸びと比較して増加が非常に小さい。つまり、生産量の増加は主に単収の改善によって達成されることになる。単収は経済発展に伴う農業投資による生産性向上によってもたらされる。しかし、気候変動や農地の劣化、国家間の対立等により、想定した増産が見込めない可能性は十分にある。その場合、家畜向けの配合飼料の主原料である穀物生産量が不足し、先の畜産物供給が逼迫することも考えられる。しかし、前述の通り、鶏肉の需要は今後さらに高まる見込みで、あらゆる状況においても鶏肉を安定的に供給することが求められる。そのためには、飼育設備への投資や飼育技術の向上を図るとともに、鶏が効率的に急速に大きくなる飼料や栄養水準の研究・開発に取り組む必要がある。

第2節 我が国における飼料用米をめぐる情勢

農林水産省の発表によると、日本のカロリーベースでの食料自給率は昭和40年度に73%であったものの、徐々に低下する傾向を見せ、平成17年度には遂に40%、令和2年度には37%まで低下している。この値は主要先進国の中でも最低水準であり、食料自給率向上に向けた様々な取り組みが行われている。また、戦後の食生活の変化や経済成長による所得水準の向上により、1人当たりの畜産物消費量は増え続けている。純国内産飼料自給率は約30年前から25%前後に低迷しており、平成30年度における飼料自給率を考慮したカロリーベースの畜産物自給率は15%であった。また、平成30年度の飼料自給率は25%だったことが報告されているが、令和12年度の目標として34%という数字が掲げられている。

現在、配合飼料原料の大部分は海外からの輸入に依存している状況だが、その輸入穀物価格は非常に高値で推移している。この要因としては、ロシアによるウクライナ侵攻、原油価格の高騰、世界人口の増加、気候温暖化を原因とする穀物の不作、畜産物消費量の拡大などが挙げられる。さらに、近年の急激な円安も相まって、国内の配合飼料価格上昇は歯止めが効かない状態である。2012年には米国で大規模な干ばつが発生し、トウモロコシ・大豆の価格が過去最高を記録した。前述の世界人口増大による穀物不足を含め、今後このような問題は深刻化することが予想され、それによって日本国内における畜産物安定供給が困難になると指摘されている。そのため、食料安全保障の観点から国産飼料穀物の生産が、日本の農業・食を支えるべく重要かつ緊急に解決すべき課題となっている。また、農業における課題とし

て、耕作放棄地の増加も挙げられる。日本の耕作放棄地は農業従事者の高齢化や後継者不足に伴って増加している。平成 22 年には滋賀県の面積に相当する 40 万 ha に達したことが報告され、その勢いは止まることなく平成 27 年度には 42.3 万 ha まで増えている。平成 28 年の全耕作地面積は 447 万 ha であり、耕作放棄地は全耕地面積の約 1 割を占めることが分かる。特に水田は減反政策の影響で転作を実施した土地もあるが、そのまま耕作放棄地となってしまう土地も少なくない。耕作放棄地は日本の限りある国土を無駄にするだけでなく、病害虫・鳥獣被害の発生や景観の悪化など、農地の持つ多面的機能を損なうことに繋がっている。そのため、国産飼料穀物の生産および耕作放棄地の増加に対する解決策として、耕作放棄地を利用した飼料用米生産が試みられている。

政府は平成 25 年、TPP 参加を視野に入れた農業競争力強化のための改革として、平成 28 年に減反政策を廃止にする方針を決定し、実際に約 50 年の実施を経てこの政策は終わりを迎えた。これに伴い、主食用米の過剰生産を防ぐため、飼料用米の生産農家への補助金を増やすことで、減反廃止後の飼料用米への転作を促している。飼料用米の生産量は、平成 19 年には 0 トンだったにも関わらず、平成 28 年には 51 万トン、令和 3 年度には 66 万トンにまで増加した。令和 12 年度の生産努力目標は 70 万トンに設定されており、今後さらに飼料用米生産を推進していく方針が窺える。また、輸入トウモロコシ価格の高騰を受け、飼料用米は価格のメリットが非常に大きくなっており、配合飼料メーカーで配合される米の割合は年々増加している。このような状況から飼料用米に関する研究が注目を集めている。

国内における飼料用米の研究は 1970 年代から行われていたが、米を家畜に給与することへの抵抗感から、当時は注目されていなかった。近年は飼料用の多収量品種が開発され、家畜に米を給与する研究も増えたことから、実際に飼料中に米が配合されるようになっている。米の特徴についてもいくつか報告されており、飼料原料としての可能性を感じさせる特性を有している。玄米の代謝エネルギー価および粗タンパク質（以下、CP：Crude Protein）含量はトウモロコシとほぼ同量であり、消化性も高く、アミノ酸組成もトウモロコシと比較的近似したパターンを示す（日本飼養標準家禽, 2011）。さらに、米のデンプン含量は多く、非デンプン多糖類（NSP）は少ない（Choct, 2002）。デンプン粒は 3–8 μm と、トウモロコシの 2–30 μm に比べて小さく（Tester et al., 2004）、デンプン分子は重合度が小さい（Vandeputte et al., 2004）。これらの特性は米のデンプンが消化酵素との反応に優位に働く可能性があり、デンプン消化率の向上による家畜の成長を促進する要因となり得る。実際に飼料用米がブロイラーの飼養成績を改善することが報告されている（Gonzalez-Alvarado et al. 2007; Ebling et al. 2015; F. Nanto-Hara et al., 2021）。これらの報告から、飼料用米が飼料原料として有益な栄養機能を有している可能性があるが、その情報は限られているのが現状である。

第 3 節 ブロイラーの生産効率向上のための添加物の利用

ブロイラー生産において、種鶏の育種改良による生産能力向上の取り組みが絶えず続けられている。同様に各研究機関や配合飼料メーカーでも、飼料栄養の研究・開発が進められ、

結果として出荷日齢の短縮や飼料要求率（FCR：Feed Conversion Ratio）の改善に成功している。Aviagen 社の「ROSS 308/ROSS 308 FF Performance Objectives 2022」では、42 日齢体重（As-Hatched）が 2,998g とされており、2014 年の 2,918g と比較して 2.7%増加している。同じく Aviagen 社が公開している「ROSS Nutrition Specifications 2022」によると、Finisher 2 における有効リジン含量は 1.02%と、2014 年の 0.96%から増加している。このように近代ブロイラーの増体能力が向上しているのは明らかであり、実際に鶏が求める栄養水準も高まっている。そのため、この能力を最大限に引き出し、鶏肉の生産性を向上させる飼料や資材の開発が求められている。

配合飼料による鶏肉の生産性の向上における有効な手段の一つには飼料添加物の利用が挙げられる。「飼料の安全性の確保及び品質の改善に関する法律」によると、飼料添加物とは、飼料の品質の低下の防止その他の農林水産省令で定める用途に供することを目的として飼料に添加、混和、浸潤その他の方法によって用いられる物で、農林水産大臣が農業資材審議会の意見を聴いて指定するものである。具体的には、飼料の品質の低下の防止（抗酸化剤など）、飼料の栄養成分その他有効成分の補給（アミノ酸、ビタミン、ミネラルなど）、飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進（抗生物質や酵素など）の目的で使用される。飼料への添加物使用による飼養成績への影響については数多くの研究報告がある。しかし、添加物は利用すれば必ず成績改善効果が得られるというものではなく、その添加物に適した条件（栄養水準、加工形態、飼養条件など）があり、その範囲外で使用した場合には効果を得られな

いことがある。そのため、各添加物で最適な条件を検討することが重要となる。

フィターゼ

植物中のフィチン酸から無機リンを放出させる消化酵素として知られているフィターゼは、世界的に飼料添加物に指定され、配合飼料に添加されている。フィターゼは、単胃動物では利用性の低いフィチン態リンを無機リンとイノシトールに分解し、リンの利用性を高める働きを持つ。穀類や油かす類中リンの 50 - 70%はフィチン態リンで存在する。単胃動物は、ほとんどフィターゼを分泌することができないため、フィチン態リンの利用性が低いという特徴がある。そのため、飼料にフィターゼを添加することで、植物性原料中のリンの利用性を高めることができる。また、飼料に配合するリン酸カルシウム等、無機態リンの量を減らすことができるため、配合飼料価格の低減にも寄与するほか、糞中に排泄されるリン量が減ることによって環境への負荷も軽減できる。実際にフィターゼに関する研究は数多くあり (E. T. Kornegay et al., 1995, N. Liu et al., 2008, R. B. Shirley et al., 2003, A. J. Cowieson et al., 2011, N. K. Morgan et al., 2015)、飼料に添加することによって、要求量に満たない非フィチンリン飼料でも家畜を飼養可能であると報告されている (A. Viveros et al., 2002, S. Sebastian et al., 1996)。一方で S. Y. Liu ら (2014) は、フィターゼ添加による作用効率が穀物種によって異なることを報告し、これはフィチン酸の存在位置の違いによるものと結論付けている。この研究はトウモロコシ、小麦、ソルガム飼料で実施されたもので、飼料用米にフォーカスした情報は限ら

れている。そのため、飼料用米飼料へのフィターゼ添加効果を検討して、米主体飼料での最適な利用方法を探索することは、効率的な鶏肉生産のために重要となる。

カルニチン

ヒト向けのサプリメントとして市販されている L-カルニチンは脂質代謝を促進することで、脂肪燃焼を促し、ダイエットに繋がると謳われている。海外ではブロイラー用飼料への添加が認められている国もあるが、日本国内では繁殖雌豚を除いて認可されておらず、研究目的でしか用いることができない。L-カルニチンは、メチオニンおよびリジンから生合成される物質であり (Cox and Hoppel, 1973a; 1973b)、これらの2つのアミノ酸はブロイラー用飼料において、制限アミノ酸になりやすく欠乏しやすいという特徴があるほか、植物体における含有量は少ない (Mitchell, 1978; Borum and Broquist, 1977; Bourum et al., 1983)。L-カルニチンは、長鎖脂肪酸がミトコンドリア内へ入るためのキャリアとして働き、それによって脂肪酸の β 酸化が促進される (Metzler and Metzler, 2003)。ブロイラーでは L-カルニチンの持つ働きとして、脂肪酸代謝の促進、飼養成績の改善、免疫システムおよび抗酸化能の強化が報告されている (S. H. Golzar Adabi et al., 2011; Rodehutschord et al., 2002; Rabie and Szilagyi, 1998)。一方で、ブロイラー飼料へのカルニチン添加が飼養成績に影響を及ぼさなかったという報告もあり (Barker DL and Sell, 1994)、一定の結果が得られていないのが現状である。一部で報告されている飼養成績改善効果は、ブロイラーの生産性向上において重要なファクターとなり得る。

そのため、飼料穀物の違いや CP レベル（アミノ酸）に着目してカルニチン添加に最適な条件を検討する必要がある。

ベタイン

トリメチルグリシンとも称されるアミノ酸様物質であるベタインは、50 年以上前から飼料原料として用いられている。豊富なメチル基を有するその構造的な特徴から、メチオニン代謝経路におけるメチル基ドナーとしての働きを持つ。ベタインは、ベタイン-ホモシステイン S-メチルトランスフェラーゼ (BHMT) 経路において、コリンの代謝産物として体内で作られ、ホモシステインにメチル基を供給し、メチオニン合成を促進する (P. B. Pillai et al 2006)。また、その両性イオン構造のために浸透圧調整機能を有し、熱ストレスの緩和や免疫系の代謝機能にも有効である。ベタインは、小麦と小麦フスマには多く含まれるが、トウモロコシや大豆にはほとんど含まれていない (Chendrimada T. P et al., 2002)。ベタインの必要量は、他のメチル基濃度、環境条件および鶏の健康状態に大きく依存する。そのため、ブロイラーへのベタイン給与に関する研究は、飼養成績や枝肉特性に関する報告のほか、浸透圧調整、抗コクシジウム、免疫調整、熱ストレス軽減など、様々な条件で議論されてきた。Fu ら (2016) の報告によると、飼料中の全 DL-メチオニンをベタインに代替しても、ブロイラーの飼養成績に悪影響はない。Amerah and Ravindran (2015) は、ベタインはコクシジウムの影響を減少させ、栄養消化率や飼料効率を改善することを報告している。Chand ら (2017) は、暑熱下ブ

ロイラーへのベタイン給与が飼養成績を改善すると結論付けた。Ghasemi and Nari (2019) もベタインが暑熱下の飼養成績および液性免疫を改善したと報告している。一方で、Schutteら (1997) は、ベタインは DL-メチオニンの代替材として効果が小さいと報告している。また、ベタインは胸肉産量を増加させる可能性を持つが、僅かに含硫アミノ酸を欠乏させた場合のメチオニン代替としては十分でないとの報告もある (MacDevitt et al., 2000)。このように、ベタインによる飼養成績への影響については、一定の結果が得られていないのが現状である。飼養成績や枝肉特性に影響を及ぼす可能性のあるベタインは、鶏肉生産の効率化に非常に有用であると考えられ、ベタインの濃度やメチオニンレベル等の最適な条件の検討が必要である。

第4節 骨格筋タンパク質の合成と分解

ユビキチン-プロテアソーム経路は、骨格筋における筋原線維タンパク質の分解に関与する主要なタンパク質分解経路である。この経路は、タンパク質に標識されたユビキチンをプロテアソームが認識し、ATP 依存的で不可逆的に標識タンパク質を分解する。標的タンパク質へのユビキチン付加は、ユビキチン活性酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) によって行われる。Atrogin-1 は、筋肉に特異的なユビキチンリガーゼであり、筋萎縮の開始および進行において重要な役割を果たしている (Bondine et al., 2001; Gomes et al., 2001)。また、Proteasome C2 Subunit も骨格筋のタンパク質分解関連遺伝子として知られてい

る。Nakashima ら (2009) は、鶏のムネ肉中の Atrogin-1/MAFbx および Proteasome C2 Subunit の発現量は、採卵鶏よりもブロイラーで低い値を示すことを報告している。ブロイラーは採卵鶏に比べて成長が早く、タンパク質分解が少ないと報告されており、ユビキチン-プロテアソーム経路におけるタンパク質分解速度に違いがある。このように栄養状態によるタンパク質分解は、Atrogin-1 や Proteasome C2 Subunit の発現によって制御されていることが示唆されている。一方で、主に成長ホルモン (GH) 刺激によって肝臓から分泌されるインスリン様成長因子 I (IGF-I) は、IGF-I/PI3K/Akt シグナル伝達経路を介して筋肥大を促進する因子として広く知られている (図 1-1)。そのため、栄養的操作によってタンパク質代謝に影響を及ぼしている場合、骨格筋または肝臓におけるタンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を分析することでメカニズムの解明に繋がる可能性がある。

第 5 節 本研究の目的と構成

本研究では、①飼料用米、②飼料用米と飼料添加物、③飼料添加物の 3 つに分けて研究を実施した。①については、飼料用米の栄養的特徴について着目し、ブロイラーの飼養成績への影響についてタンパク質代謝を中心に検討した (第 2 章)。②については、飼料添加物の穀物種による作用効率の違いに着目し、飼料用米飼料へのフィターゼおよび L-カルニチン添加による作用効率を検討した (第 2 章)。③については、ベタイン濃度と飼料中メチオニンレベルに着目し、ベタインの飼養成績や枝肉特性への影響を検討した (第 3 章)。分析項目として、

飼養成績や組織重量を分析するとともに、タンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を分析することで、各飼料原料や飼料添加物利用によるタンパク質代謝亢進の可能性を検討した。

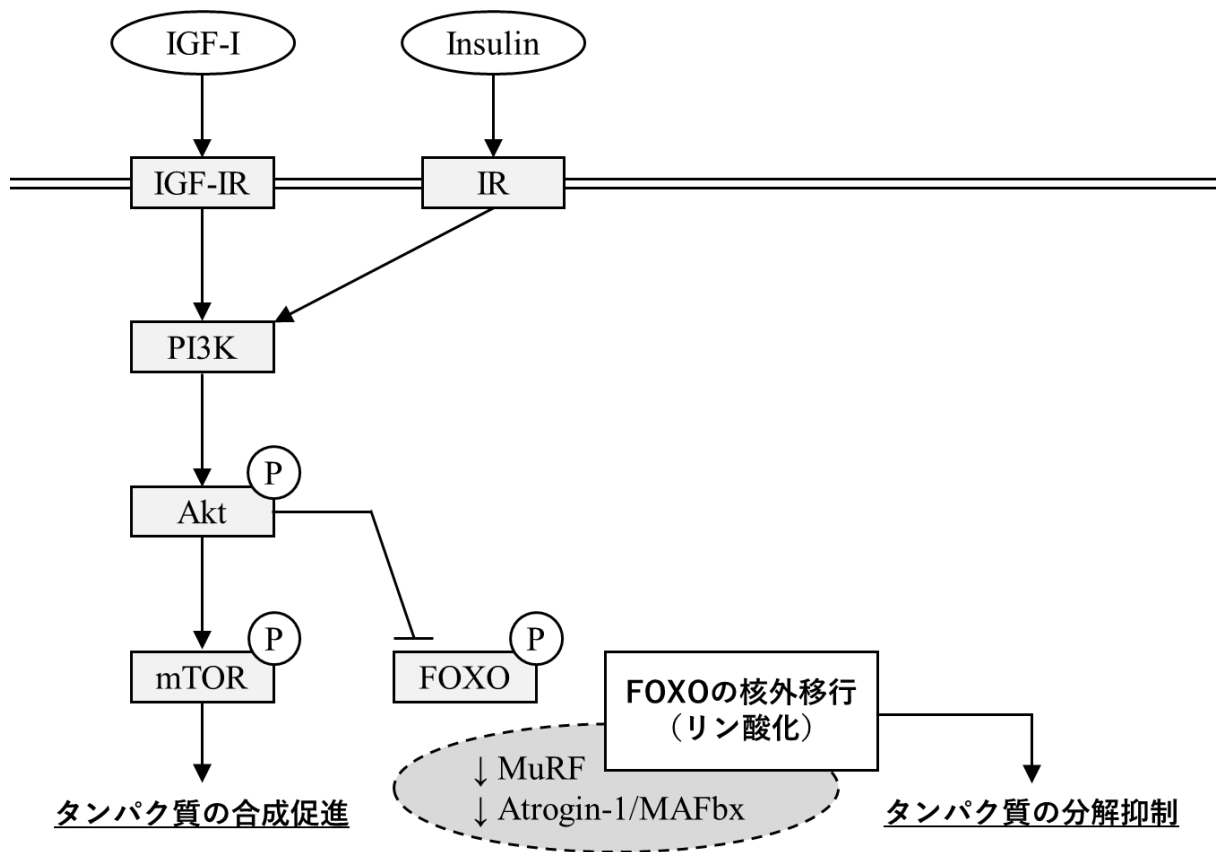


図 1-1. IGF/PI3K/Akt シグナリング経路によるタンパク質合成分解機構の模式図

第 2 章

前期ブロイラーへの飼料用米およびL-カルニチン給与が
飼養成績およびタンパク質代謝に及ぼす影響について

第 1 節

飼料用米給与が飼養成績およびタンパク質代謝に及ぼす影響

要約

本試験は、前期ブロイラーへの飼料用米給与が飼養成績に及ぼす影響について評価するとともに、タンパク質代謝への作用についても検討するために実施した。10日齢のブロイラー20羽（チャンキー種、雄）を対照区および飼料用米区に分け、不断給餌、自由飲水、適温下として2週間の飼養試験を行った。試験飼料は、ROSS 308の栄養要求量（2014）を満たすように設計し、対照飼料のトウモロコシ全量を玄米に置き換えたものを飼料用米飼料とした。試験期間全体での飼養成績について、飼料用米給与によって増体量は有意に増加し（ $p < 0.05$ ）、飼料摂取量および飼料効率は改善される傾向が観察された（ $p < 0.10$ ）。ムネ肉およびモモ肉重量は、飼料用米給与によって有意に増加した（ $p < 0.05$ ）。窒素蓄積量（g/3d）は飼料用米区において、高い値を示す傾向がみられた（ $p < 0.10$ ）。ムネ肉中の mRNA 発現量は、Proteasome C2 subunit において、飼料用米区で有意に増加したが（ $p < 0.01$ ）、Atrogin-1 は、2つの試験区間で有意な差は観察されなかった。モモ肉では、飼料用米を給与することによって Atrogin-1 の mRNA 発現量が有意に減少した（ $p < 0.05$ ）。これらの結果から、飼料用米が前期ブロイラーの飼養成績を向上させることが再確認されたほか、タンパク質代謝にも影響を及ぼすことが示唆された。

1. 緒言

米は世界中、特に東南アジアで主要穀物とされており、食用だけでなく家畜の飼料用にも広く用いられている。日本国内でもここ数年の輸入飼料原料価格の高騰を受け、価格のメリットの大きい飼料用米の配合が増加している。玄米の代謝エネルギー価および CP 含量はトウモロコシとほぼ同量であり、消化性も高く、アミノ酸組成もトウモロコシと比較的近似したパターンを示す（日本飼養標準家禽, 2011）。さらに、米のデンプン含量は多く、非デンプン多糖類（NSP）は少ない（Choct, 2002）、デンプン粒は 3–8 μm と、トウモロコシの 2–30 μm に比べて小さく（Tester et al., 2004）、デンプン分子は重合度が小さい（Vandeputte et al., 2004）。これらの特性は米のデンプンが消化酵素との反応に優位に働く可能性があり、デンプン消化率の向上による家畜の成長を促進する要因となり得る。ブロイラー初生雛では、トウモロコシを精白米に代替して飼養することが可能と報告されている（González-Alvarado, J. M et al., 2007）。さらに、ブロイラーにおいて飼料用米給与が飼養成績を改善するとの報告もある（Gonzalez-Alvarado et al. 2007; P. D. Ebling et al. 2015; F. Nanto-Hara et al., 2021）。米の形態として玄米、精白米、粳米が使用可能とされているが、粳米を多給する際に ME 維持のために添加した多量の脂質が悪影響を及ぼすため（F. Nanto et al., 2011）、粳米の配合量には注意が必要である。また、暑熱下のブロイラーへの玄米給与では、免疫グロブリン産生の減少と脾臓の免疫関連遺伝子の発現変化から玄米が免疫応答の調節に関係することが示唆されている（F. Nanto-Hara et al., 2021）。しかし、飼料用米給与がブロイラーに及ぼす影響についての情報は

まだ少ないのが現状であり、飼養成績や栄養素の利用性改善におけるメカニズム解明に向け、さらなる研究が必要である。

筋肉タンパク質は合成と分解のバランスによって筋肥大、筋萎縮を呈する。筋肉タンパク質の分解は主にユビキチン-プロテアソーム系によって制御されている。IGF-I やインスリンによって PI3K が活性化されることで Akt/PKB およびその下流標的である FOXO1 がリン酸化される (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004)。FOXO1 は Atrogin-1/MAFbx や MuRF1 の転写を促進する因子である。これらの遺伝子はプロテアソーム-ユビキチン系において重要な働きを持ち、筋肉タンパク質分解制御に大きく関わっていることが知られている。リン酸化された FOXO1 は核内への移行ができなくなるため、結果として Atrogin-1/MAFbx および MuRF1 の発現が減少し、タンパク質分解が抑制される。さらに、Akt/PKB の活性化は、タンパク質合成に重要な役割を担う mTOR の活性化を誘引するため筋肥大にも繋がる (Reynolds et al., 2002)。逆に同化作用を妨げるようなホルモンや栄養状態では、PI3K が不活性化され、FOXO1 によるタンパク質分解関連遺伝子転写が促進されるため、ユビキチン-プロテアソーム系による筋肉タンパク質分解が進行する。ブロイラーの筋肉タンパク質分解は、ユビキチンリガーゼとプロテアソームサブユニットによる制御が報告されている。ユビキチンリガーゼである Atrogin-1/MAFbx やプロテアソームサブユニットである Proteasome C2 subunit の mRNA 発現量は、栄養状態 (絶食や再給餌) や動物種 (ブロイラーとレイヤー) によって変化することが報告されている (K. Nakashima et al., 2006 and 2009)。そのため、飼料用米給与による飼養成

績改善について、骨格筋のタンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を分析することでメカニズムの解明に繋がる可能性がある。

本試験では、飼料用米給与が前期ブロイラーの飼養成績に及ぼす影響を検討するため、飼養成績、窒素出納、ムネ肉およびモモ肉重量、血漿中遊離アミノ酸濃度、血漿中尿酸濃度について分析を行った。さらに飼料用米給与による飼養成績改善メカニズムをより詳細に調べるため、筋肉中のタンパク質分解関連遺伝子の mRNA 発現量変化を検討した。

2. 材料および方法

(1) 供試動物

ブロイラー初生雛（チャンキー種、雄）を株式会社オオヌマより 40 羽購入し、市販のブロイラー餌付け飼料および水を自由摂取させ、7 日齢まで育成した。その後 10 日齢までの 3 日間、飼料の急激な変化によるストレスを軽減させるために飼料中に 2.0 - 3.0 mm に破碎した飼料用米（玄米）を 10%程度混合して給与した。10 日齢時に体重測定を行い、体重の近い個体を 20 羽選抜し、各試験区の平均体重が同等になるように 10 羽ずつに分けて試験を行った。

(2) 試験飼料

表 2-1-1 に試験飼料の配合割合を示した。試験区分は、トウモロコシ-大豆粕主体飼料を給与する対照区、対照飼料中のトウモロコシ全量を玄米に置き換えた飼料用米区の 2 つである。

飼料用米区では、玄米（新潟次郎）を約 3.0 mm に粉碎して配合した。試験飼料は各栄養素が ROSS 308 の栄養要求量（2014）の推奨値を上回るように設計した。

（3）試験方法

試験 1 日目に全ての鶏の体重測定を行い、各試験区の平均体重が同等になるように各試験区 10 羽ずつ割り当てた。試験期間中は、単飼ケージ内（ワイヤーメッシュ底）で飼育し、不断給餌、自由飲水とした。試験期間は 2 週間として、1 週間ごとに体重および飼料摂取量を測定した。窒素出納試験を行うため、3 日間（11-13 日目）全糞尿を採取し、糞尿採取期間中の飼料摂取量を測定した。採取した糞尿は 1 羽分ごとにポリ袋に入れ、分析に供するまで-30°C で凍結保存した。

試験最終日には EDTA を含んだ採血管に翼下静脈から血液サンプルを採取した。その後、通常の食鶏処理と同様にブロイラーの頸部を屠殺用のハサミで切断し放血を行い、全 20 羽の屠殺を行った。血液サンプルは採取した当日に 3,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清をエッペンチューブに移して血漿サンプルとして分析まで-30°Cで凍結保存した。その後、右部分のムネ肉（浅胸筋）、肝臓、腹腔内脂肪、右モモ肉（大腿二頭筋）を丁寧に切り取り、それぞれの重量を測定・記録した。ムネ肉、モモ肉および肝臓はその後の分析に用いるため、液体窒素で凍結し、mRNA 発現量分析まで-80°Cで保存した。

本試験の測定項目は、飼養成績（増体量、飼料摂取量、飼料効率）、ムネ肉重量、モモ肉重

量、肝臓重量、腹腔内脂肪重量、窒素蓄積率、窒素蓄積量、血漿中尿酸濃度、血漿中遊離アミノ酸濃度、ムネ肉（浅胸筋）およびモモ肉（大腿二頭筋）におけるタンパク質分解関連遺伝子の mRNA 発現量とした。

(4) 窒素出納

①風乾飼料の作成

冷凍保存した 11 - 13 日目の全糞尿を常温で解凍し、1 羽分ずつバット上に平たく広げ、60°C に設定した乾燥機内で 24 時間乾燥させた。乾燥機から取り出した後、異物が混入しないようにビニールを掛け、24 時間室温に放置して風乾状態にした。その後、重量を測定し、粉砕機で粉砕したものを分析に供した。分析まではプラスチック瓶で常温保存し、各成分の分析に供した。飼料についても同様に粉砕機で粉砕し、分析まで冷蔵保存した。

②窒素蓄積量

窒素蓄積量を算出するために糞尿および試験飼料の窒素含量を測定した。測定には NC コーダー（SUMIKA 製 NC-90）を用いた。風乾試料を専用の石英セルに 25 - 30 mg 計り取り、NC コーダーにセットして試料の窒素含量を測定した。窒素含量を用いて算出した窒素摂取量および窒素排泄量から窒素蓄積量を算出した。算出する際の式を以下に示す。

$$\text{窒素摂取量 (g/3d)} = \text{飼料 1 g 当たりの窒素含量 (g)} \times \text{期間中飼料摂取量 (g)}$$

窒素排泄量 (g/3d) = 糞尿 1 g 当たりの窒素含量 (g) × 期間中糞尿排泄量 (g)

窒素蓄積量 (g/3d) = 窒素摂取量 (g/3d) - 窒素排泄量 (g/3d)

③窒素蓄積率

②で求めた窒素蓄積量を用いて窒素蓄積率を算出した。算出する際の式を以下に示す。

窒素蓄積率 (%) = 窒素蓄積量 (g/3d) ÷ 窒素摂取量 (g/3d) × 100

(5) 血漿中尿酸濃度

ウリガーゼ・TOOS 法による血液検査用尿酸キット (FUJIFILM 製 尿酸 C-テストワコー Code 437-17301) を用いて測定を行った。常温で解凍した血漿から 0.05 mL を試験管にとり、そこに発色試薬 3.0 mL を入れてよく混合し、37°Cに設定したインキュベーターで5分間以上加温した。濃度が 5.0 mg/dL、10.0 mg/dL、19.7 mg/dL の尿酸標準液を用意し、5.0 mg/dL、10.0 mg/dL の標準液は 0.05 mL、19.7 mg/dL の標準液は 0.10 mL を試験管に取り、発色試薬 3.0 mL を入れてよく混合し、サンプルと同様に 37°Cで5分以上加温した。分光光度計を用いて、反応後の血漿サンプルおよび尿酸標準液の 570 nm における吸光度を測定し、標準直線からそれぞれのサンプルの尿酸濃度を算出した。

(6) 血漿中遊離アミノ酸濃度

-30°Cで凍結保存した血漿を常温で解凍し、600 µL をエッペンチューブにとり、同量の 6% スルホサリチル酸 (SSA) を加えてよく攪拌し、4°Cで 2 日以上放置し、血漿中のタンパク質を沈殿させた。その後、16,000 × G で 30 分間遠心分離し、上清を 0.45 µm セルロースアセテートメンブレンフィルターユニット (ADVANTEC 製 DISMIC-03CP045AN) を取り付けたシリンジを用いて濾過し、分析時まで-30°Cで保存した。分析は HPLC アミノ酸分析システム (島津製作所) を用いて測定した。

(7) タンパク質分解関連遺伝子の発現量

① mRNA 抽出

mRNA 抽出は専用のキット (QIAGEN 製 RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit) を用いて行った。-80°Cで保存した筋肉サンプルを 30 mg 量り取って 2.0 mL 丸底チューブに入れ、300 µL の Buffer RLT (Buffer RLT 1.0 mL 当たり 10 µL の β-メルカプトエタノールを含む) を添加し、ホモジナイザー (QIAGEN 製 TissueRupter) を用いてライセートが均一になるまで攪拌した。作成したライセートに 590 µL の RNase-free 水と 10 µL の proteinase K 溶液を添加しピペッティングにより混合し、55°Cで 10 分間インキュベートした。その後 20-25°C、10,000 × G で 3 分間遠心操作し、上清を新しい 2.0 mL 丸底チューブに移した。移した上清に対して 0.5 容量の 99.5%エタノールを添加しピペッティングによりよく混和した。このサンプルを、2.0 mL コレ

クションチューブを取り付けた RNeasy Mini Spin Column (スピncラム) に最大 700 μL 添加し、20-25°C、8,000 \times G で 15 秒間遠心操作し、コレクションチューブに溜まった濾液を棄てた。この操作を繰り返して丸底チューブのサンプルを全てスピncラムに移した。350 μL の Buffer RW1 をスピncラムに添加し、20 - 25°C、8,000 \times G で 15 秒間遠心操作し、濾液を棄てた。10 μL の DNase I ストック溶液と 70 μL の Buffer RDD を混和し作成した DNase I インキュベーション溶液 80 μL をスピncラムに添加し、常温 (20 - 30°C) で 15 分間インキュベートした。350 μL の Buffer RW1 をスピncラムに添加し、20 - 25°C、8,000 \times G で 15 秒間遠心操作し、濾液を棄てた。500 μL の Buffer RPE をスピncラムに添加し、20 - 25°C、8,000 \times G で 15 秒間遠心操作し、濾液を棄てた。500 μL の Buffer RPE をスピncラムに添加し、20 - 25°C、8,000 \times G で 2 分間遠心操作し、濾液の入ったコレクションチューブを棄てた。その後、スピncラムに新しい 1.5 mL コニカルチューブを取り付け、50 μL の RNase-free 水をスピncラムに添加し、20 - 25°C、8,000 \times G で 1 分間遠心操作し、コニカルチューブに RNA を溶出させた。サンプルは次の作業まで-30°Cで保存した。

②逆転写反応

リアルタイム PCR 用の逆転写反応キット (東洋紡株式会社製 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover) を用いてサンプルの逆転写を行った。

(i) RNA 溶液の濃度測定

分光光度計（Thermo Fisher Scientific 製 NANODROP LITE）を用いて 260 nm で RNA 溶液の吸光度を測定し、RNA の濃度を求めた。また、260 nm/280 nm を RNA の純度とし、この値が 1.6 - 2.0 程度のサンプルをその後の分析に使用した。

(ii) RNA の変性

逆転写効率を向上させるため、RNA の変性を行った。RNA 溶液をインキュベーター（TAITEC 製 e-ThermoBucket ETB）を用いて 65°C で 5 分間インキュベートした後、氷上で急冷した。

(iii) ゲノム DNA 除去反応

(i) で求めた濃度を参考に、100 ng の RNA を含むように RNA 溶液を量り取り、それに 4 μL の 4 \times DN Master Mix および Nuclease-free 水を加えて総量を 8 μL とし、よく攪拌した後にインキュベーター（TAITEC 製 e-ThermoBucket ETB）を用いて 37°C で 5 分間インキュベートした。

(iv) 逆転写反応

ゲノム DNA を除去した RNA サンプル 8 μL に対して 2 μL の 5 \times RT Master Mix を加えてよ

く混合し、Mini Opticon real-time PCR System (Bio-Rad Laboratories 製) にセットした。37°Cで15 分間インキュベートし、サンプルを逆転写反応させた後、50°Cで5 分間のインキュベートを行い、高温反応性に優れた酵素である ReverTra Ace の逆転写効率を向上させた。最後に 98°Cで5 分間のインキュベートを行い、逆転写酵素を失活させた。

③発現量測定

インターカレーション法によるリアルタイム PCR キット (Bio-Rad Laboratories 製 SsoFast EvaGreen Supermix) を用いて RNA 発現量の測定を行った。

(i) プライマー

乾燥状態のプライマー (eurofins Genomics 製) に対し、それぞれのモル収量を参考に RNase-free 水を加え、100 μ M のプライマー溶液を調製した。これを更に 10 倍希釈し 10 μ M としたものをその後の分析に使用した。測定したタンパク質分解関連遺伝子 (Atrogin-1、Proteasome C2 subunit)、および内部標準として使用する GAPDH のプライマー配列は表 2-1-2 に示した。

(ii) リアルタイム PCR

逆転写反応で得られた cDNA サンプル 1 μ L に対して、Sso Fast EvaGreen super mix を 10 μ L、発現量を測定する遺伝子に特異的な Forward Primer および Reverse Primer をそれぞれ 1 μ L、

RNase-Free 水を 7 μ L 加え、総量 20 μ L の反応試薬を調製した。反応試薬をよく混合した後、Mini Opticon real-time PCR System (Bio-Rad Laboratories 製) を用い、95°C で 30 秒間インキュベートし、試薬中の酵素を活性化させた。その後、95°C で 3 秒間インキュベートし cDNA を熱変性により一本鎖 DNA にし、次に 60°C で 30 秒間インキュベートし、プライマーの標的 cDNA へのアニーリングおよび伸長反応を行い、これを 1 サイクルとして 39 サイクルの反応を行った。1 サイクル毎に DNA 合成量に依存する蛍光強度を測定し、増幅曲線から標的とする遺伝子の発現量を求めた。反応後、65°C から 95°C まで 0.5°C 毎に 5 秒間インキュベートし、各温度における蛍光強度を測定することで融解曲線を求め、遺伝子配列に固有の値である融解温度を求め、増副産物が標的遺伝子のみであることを確認した。発現量の測定・比較には解析用ソフトウェアである BIO-RAD CFX-Manager (Bio-Rad Laboratories 製) を用いた。GAPDH を内部標準とし、相対的定量法 ($\Delta\Delta$ Ct 法) により各遺伝子の相対的発現量を算出した。

(8) 統計処理

得られた全てのデータは、t 検定による平均値の比較によって統計処理を行った。

3. 結果

飼養成績

飼養成績の結果を表 2-1-3 に示した。増体において、1 週目は差が認められなかったものの、

2週目 ($p < 0.01$) および2週間にわたる試験期間全体 ($p < 0.05$) では対照区に対して飼料用米区で有意に高い値を示した。2週目の飼料摂取量は、対照区に対して飼料用米区で有意に高い値を示し ($p < 0.05$)、試験期間全体では対照区に対して飼料用米区で高い値となる傾向がみられた ($p < 0.10$)。飼料効率も1週目および試験期間全体で、対照区に対して飼料用米区で高い値を示す傾向がみられた ($p < 0.10$)。

組織重量

組織重量の結果を表 2-1-4 に示した。ムネ肉およびモモ肉重量は対照区に対して飼料用米区で有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。腹腔内脂肪、肝臓重量については、有意な差は認められなかった。

窒素出納試験

窒素出納試験の結果を表 2-1-5 に示した。窒素蓄積量 (g/3d) および窒素蓄積率 (%) については、どちらも有意な差は認められなかった。しかし、窒素蓄積量 (g/3d) は対照区に対して飼料用米区で高い値を示す傾向が見られた ($p < 0.10$)。

血漿尿酸濃度

結果を表 2-1-6 に示した。対照区と飼料用米区の間に有意な差は認められなかった。

血漿中遊離アミノ酸濃度

血漿中遊離アミノ酸濃度の結果を表 2-1-7 に示した。アルギニンにおいて、対照区と比較して飼料用米区で有意に高い値を示した ($p < 0.01$)。また、メチオニンにおいて、対照区に対して飼料用米区で有意に濃度が低下した ($p < 0.05$)。

タンパク質分解関連遺伝子の mRNA 発現量

タンパク質分解関連遺伝子の mRNA 発現量測定の結果を図 2-1-a, b に示した。ムネ肉中の mRNA 発現量は、Proteasome C2 subunit において、対照区に対して飼料用米区で有意に増加したが ($p < 0.01$)、Atrogin-1 では、2つの試験区間で有意な差は観察されなかった。また、モモ肉において、Proteasome C2 subunit は試験区間に有意な差は認められなかったが、Atrogin-1 は対照区に対して飼料用米区で発現量が有意に減少した ($p < 0.05$)。

4. 考察

対照区に対して飼料用米区で 1-2 週 ($p < 0.01$) および 0-2 週 ($p < 0.05$) の増体量が有意に増加した。1-2 週の飼料摂取量は対照区と比較して飼料用米区で有意に高い値を示しており ($p < 0.05$)、試験期間全体で飼料摂取量を比べると、飼料用米を給与されたブロイラーにおいて、飼料摂取量が増える傾向がみられた ($p < 0.10$)。また、飼料効率は 0-1 週、0-2 週において、対照区に対して飼料用米区でより高い値を示す傾向が観察された ($p < 0.10$)。J. M.

González-Alvarado ら (2007) は、トウモロコシ主体飼料に比べて、飼料用米飼料を給与することによって、飼料要求率が向上することを報告している。他の研究ではソルガム主体飼料のソルガム 15%を白米に置き換えたところ、飼料効率が改善した (Salinas-Chavira, J et al., 2013)。

P. D. Ebling ら (2015) は、1 - 7 日齢および 1 - 21 日齢の飼料において、トウモロコシを白米に代替して給与することにより、飼料要求率や増体が改善すると報告しており、本実験の結果と一致している。Jiménez-Moreno ら (2009) によると、米を給与するとトウモロコシと比較して、窒素、有機物、乾物の蓄積率が有意に増加する。本試験でも飼料用米を給与によって窒素蓄積量に増加する傾向がみられた ($p < 0.10$)。これらのことから、米に何らかの栄養的特性が存在する可能性があると考えられ、本研究において確認された飼料用米給与による増体の改善についても、単に飼料摂取量が増加したことに起因するものではないと推察した。飼料効率が向上する傾向が観察されたこともそれを支持する結果である。また、本試験において飼料用米を給与された区でムネ肉 ($p < 0.05$) およびモモ肉 ($p < 0.05$) 重量が有意に増加した。米主体飼料を給与されたブロイラーにおいて、消化管重量が減少し、消化管以外の体重が相対的に増加するという報告もあり、米の消化性の高さを理由に挙げている (González-Alvarado, J. M et al., 2007, 2008)。したがって、消化性の高さを含めた米の栄養的特性によって筋肉タンパク質合成の促進または分解の抑制、あるいはその両方が誘起され、効率的に筋肉タンパクが生産された可能性が考えられる。さらに、飼料用米による飼料効率改善が 0 - 1 週という早い段階で観察されたため、幼雛の飼料原料として適している可能性も考えられる。

ユビキチン-プロテアソーム経路は、骨格筋における筋原繊維タンパク質の分解に関与する主要なタンパク質分解経路である。ユビキチン-プロテアソーム経路は、タンパク質に標識されたユビキチンをプロテアソームが認識し、ATP 依存的で不可逆的に標的タンパク質を分解する経路である。標的タンパク質へのユビキチン付加はユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) によって行われる。そのため、代表的なユビキチンリガーゼである Atrogin-1 とプロテアソームのサブユニットの 1 つである Proteasome C2 subunit の mRNA 発現量を分析し、筋肉タンパク質分解の指標とした。Nakashima ら (2009) は、ムネ肉における Proteasome C2 subunit および Atrogin-1 の発現量は、採卵鶏よりもブロイラーで低い値を示すことを報告している。ブロイラーは採卵鶏に比べて成長が早くタンパク質分解が少ないとされており、ユビキチン-プロテアソーム経路によるタンパク質分解に違いがあることが示唆されている。さらに、Nakashima ら (2006) はブロイラーに絶食処理を施すことで Atrogin-1 の発現量が増加し、さらに再給餌することでこの発現が減少することも報告しており、筋肉タンパク質分解が関連遺伝子の発現変化によって制御されていることを示唆している。本試験では、ムネ肉における Proteasome C2 subunit の発現量が対照区に対して飼料用米区で有意に増加し ($p < 0.01$)、モモ肉における Atrogin-1 の発現量は対照区に対して米を給与した区で有意に減少した ($p < 0.05$)。前述の通り、Atrogin-1 は筋肉に特異的なユビキチンリガーゼであり、筋萎縮の開始および進行において重要な役割を果たしている (Bodine et al., 2001; Gomes et al., 2001)。さらに、Atrogin-1 の発現により筋肉重量の減少を引き起こし、

筋萎縮の過程ではその発現が高レベルで維持される (Gomes et al., 2001)。また、ブロイラーを絶食させた際のタンパク質分解関連遺伝子の発現変化を観察した実験では、24 時間および 48 時間の絶食によって、体重減少とともに Atrogin-1 の mRNA 発現が上昇したことが報告されている (Ohtsuka et al., 2011)。これらの報告から Atrogin-1 がタンパク質分解に関与していることは明確である。本実験において、飼料用米区でモモ肉中の Atrogin-1 の発現が減少したことにより、飼料用米がモモ肉のタンパク質分解を抑制する働きを持つ可能性が示された。

一方で、ムネ肉における Proteasome C2 Subunit の mRNA 発現は有意に上昇する結果となった。このことから、飼料用米給与によってムネ肉の筋肉タンパク質分解が促進されているとも言える。一般的に筋肉タンパク質は常に合成と分解を繰り返しており、そのバランスによって筋肥大と筋萎縮を呈する。IGF-I やインスリンは、Akt/PKB シグナル経路に影響を及ぼし、筋肉タンパク質分解が抑制されるほか、筋肥大を促進する (Reynolds et al., 2002)。本試験では筋肉組織におけるタンパク質分解関連遺伝子に着目して分析を行ったため、タンパク質合成関連遺伝子については観察していない。筋肉タンパク質の合成・分解をバランスとして見た場合に、ムネ肉において Proteasome C2 Subunit の mRNA 発現が上昇するとともに、肝臓における IGF-I 等、タンパク質合成関連遺伝子の発現も上昇している可能性が考えられる。そのため、今後はタンパク質分解関連遺伝子とタンパク合成経路における遺伝子の関係性を分析する必要がある。

血漿中遊離アミノ酸濃度分析では、対照区に対して飼料用米区でアルギニンは有意に増加し ($p < 0.01$)、メチオニンは有意に減少した ($p < 0.05$)。これには飼料中のアルギニンおよびメチオニン濃度が関係している可能性がある。米はアルギニンを多く含むため、アルギニン含量 (計算値) はそれぞれ対照飼料が 1.38% であるのに対し、飼料用米飼料では 1.56% と差が生まれている。この濃度の差が血漿中のアルギニン濃度に影響を与えた可能性がある。同様に対照飼料中のメチオニン濃度は 0.66% であるのに対し、飼料用米飼料のメチオニン濃度は 0.60% であり、血漿中遊離アミノ酸濃度分析の結果と一貫して、飼料用米区で低い値である。また、アルギニンとメチオニンのアンタゴニズムによって飼料用米区で血漿中メチオニン濃度が減少した可能性も考えられる。アルギニンとメチオニンの間にはアンタゴニズム作用の存在が知られている。米中のアルギニン濃度が高いことから飼料用米区でメチオニンとの競合が生じ、メチオニン代謝が阻害されたことが可能性として考えられる。

また、血漿中尿酸濃度は、鳥類において尿酸が窒素代謝の最終産物であることから、低い値であるほどアミノ酸の利用効率が良いとされる (Donsbough et al., 2010)。しかし、血漿中尿酸濃度について試験区間に有意な差は認められなかった。モモ肉中 Atrogen-1 の発現が減少していることから筋肉タンパク質の分解が抑制されていることが推察されるが、血漿中尿酸濃度には反映されなかった。鳥類の血漿中尿酸濃度は、哺乳類の血漿中尿素態窒素 (BUN) ほど明確にデータが出ないことが多く、それによってこのような結果になったことが考えられる。

本実験の結果から、前期ブロイラーへの飼料用米給与が飼養成績および窒素代謝を改善し、さらにタンパク質分解関連遺伝子の発現にも影響を与えることが示された。また、タンパク質分解関連遺伝子への影響に関しては、筋肉の部位によって作用が異なることが示唆された。しかし、飼料用米給与による効果は筋肉タンパク質分解だけではなく、筋肉タンパク質合成にも関係している可能性があり、合成関連遺伝子の発現変化についても検討する必要がある。また、飼料用米区の0-1週目において飼料効率の向上が観察されたため、より早い段階での飼料用米給与実験を試みる必要がある。その消化性の高さから消化管の発達が未熟な餌付け期でさらなる効果が見込める可能性がある。これらにより飼料用米給与によるブロイラーの飼養成績改善メカニズム解明に繋がるだろう。

表2-1-1 : 試験飼料の配合割合および栄養成分 (%)

	対照区	飼料用米区
トウモロコシ	51.00	-
玄米	-	51.00
大豆粕	33.00	34.00
コーングルテンミール	6.00	6.00
植物性油脂	5.30	4.50
第2リン酸カルシウム	2.00	2.00
炭酸カルシウム	1.45	1.35
食塩	0.40	0.45
リジン塩酸塩	0.20	0.15
DL-メチオニン	0.30	0.20
トレオニン	0.05	0.05
塩化コリン	0.10	0.10
プレミックス ¹⁾	0.20	0.20
合計	100	100
栄養組成(計算値)		
ME (Mcal)	3.10	3.13
CP	23.1	24.0
Lys	1.32	1.34
Thr	0.91	0.92
Met + Cys	1.05	1.02
Arg	1.38	1.56

¹⁾ 飼料中1kg当たりの供給量: マンガン 100mg、亜鉛 100mg、鉄 40mg、銅 15mg、ヨウ素 1mg、ビタミンA 1300IU、ビタミンD₃ 5000IU、ビタミンE 80IU、ビタミンK 4mg、チアミン 4mg、リボフラビン 9mg、ビタミンB₆ 4mg、ビタミンB₁₂ 0.02mg、パントテン酸 15mg、ニコチン酸 15mg、ニコチン酸 60mg、葉酸2mg、ビオチン0.15mg

表2-1-2 : タンパク質分解関連遺伝子および、GAPDHのプライマー配列

遺伝子名	プライマー配列	PCR産物 (bp)
Atrogin-1	5'- CCA ACA ACC CAG AGA CCT GT - 3'	174
	5'- GGA GCT TCA CAC GAA CAT GA - 3'	
Proteasome C2 subunit	5'- AAC ACA CGC TGT TCT GGT TG - 3'	241
	5'- CTG CGT TGG TAT CTG GGT TT - 3'	
GAPDH	5'- CCT CTC TGG CAA AGT CCA AG - 3'	200
	5'- CAT CTG CCC ATT TGA TGT TG - 3'	

上段はForward primer、下段はReverse primerを示す

表2-1-3 : 飼料用米給与が飼養成績に及ぼす影響

	対照区	飼料用米区	p 値
開始体重 (g)	377	377	—
増体量 (g)			
0-1週	301 ± 16	339 ± 30	0.286
1-2週	609 ± 30	700 ± 18	< 0.01
0-2週	911 ± 33	1039 ± 43	< 0.05
飼料摂取量 (g)			
0-1週	417 ± 19	445 ± 32	0.468
1-2週	825 ± 27	929 ± 26	< 0.05
0-2週	1242 ± 39	1373 ± 55	< 0.10
飼料効率 (gain/feed)			
0-1週	0.738 ± 0.007	0.754 ± 0.015	< 0.10
1-2週	0.738 ± 0.011	0.755 ± 0.014	0.376
0-2週	0.730 ± 0.008	0.755 ± 0.008	< 0.10

平均値±SE, n=10

表2-1-4 : 飼料用米給与が組織重量に及ぼす影響

	対照区	飼料用米区	<i>p</i> 値
ムネ肉 (g)	68.5 ± 2.8	78.2 ± 3	< 0.05
モモ肉 (g)	82.8 ± 3.5	95 ± 2.8	< 0.05
腹腔内脂肪 (g)	10.2 ± 0.9	9.7 ± 1.0	0.731
肝臓 (g)	36.8 ± 1.5	39.4 ± 1.6	0.246
平均値±SE, n=10			

表2-1-5 : 飼料用米給与が窒素出納に及ぼす影響

	対照区	飼料用米区	<i>p</i> 値
窒素蓄積量 (g/3d)	10.6 ± 0.4	11.7 ± 0.5	< 0.10
窒素蓄積率 (%)	70.9 ± 1.7	67.1 ± 1.8	0.147
平均値±SE, n=10			

表2-1-6 : 飼料用米給与が血漿中尿酸濃度に及ぼす影響

	対照区	飼料用米区	<i>p</i> 値
血漿中尿酸濃度(mg/dl)	7.73 ± 0.78	7.57 ± 0.53	0.869
平均値±SE, n=10			

表2-1-7 : 飼料用米給与が血漿中遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響

	対照区	飼料米区	<i>p</i> 値
必須アミノ酸			
ARG	0.392 ± 0.039	0.532 ± 0.027	< 0.01
THR	0.488 ± 0.055	0.576 ± 0.041	0.215
VAL	0.148 ± 0.019	0.185 ± 0.010	0.107
MET	0.084 ± 0.011	0.056 ± 0.005	< 0.05
I-LEU	0.094 ± 0.014	0.099 ± 0.007	0.753
LEU	0.236 ± 0.033	0.224 ± 0.011	0.732
PH-ALA	0.140 ± 0.012	0.161 ± 0.010	0.194
HIS	0.065 ± 0.008	0.068 ± 0.004	0.752
LYS	0.122 ± 0.031	0.127 ± 0.027	0.905
TRP	0.063 ± 0.005	0.069 ± 0.005	0.416
非必須アミノ酸			
ASP	0.096 ± 0.035	0.050 ± 0.006	0.218
SER	0.512 ± 0.062	0.509 ± 0.029	0.97
GLU	0.275 ± 0.050	0.238 ± 0.016	0.495
GLY	0.471 ± 0.039	0.504 ± 0.029	0.515
ALA	0.843 ± 0.070	0.785 ± 0.058	0.528
TYR	0.263 ± 0.025	0.278 ± 0.022	0.662
3-ME-HIS	0.008 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.681

平均値±SE, n=10

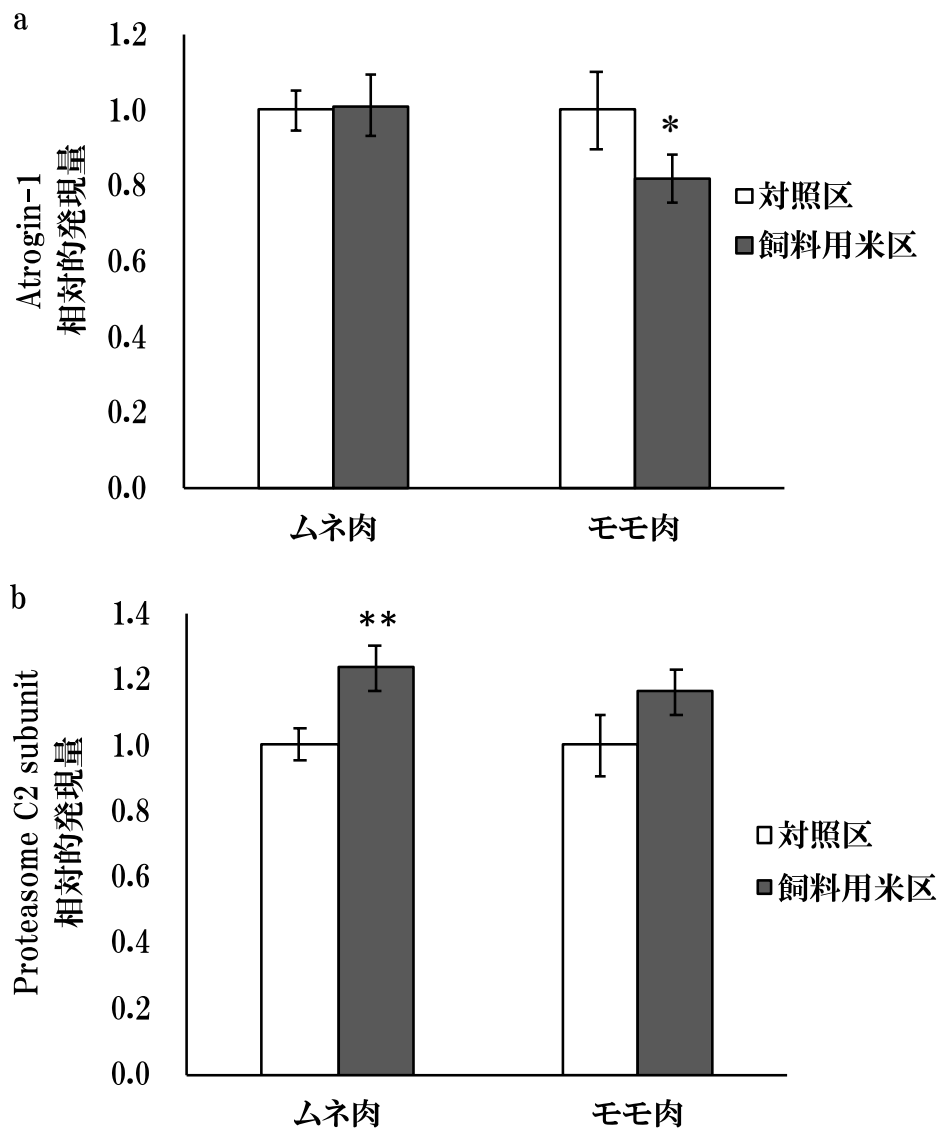


図 2-1：骨格筋におけるタンパク質分解関連遺伝子発現量に及ぼす影響

a. 飼料用米給与が骨格筋 Atrogin-1 発現に及ぼす影響

b. 飼料用米給与が骨格筋 Proteasome C2 Subunit 発現に及ぼす影響

平均値±SE, n=10, 対照区と比較して ** : $p < 0.01$ 、* : $p < 0.05$

第2節

餌付け期における飼料用米給与が飼養成績に及ぼす影響

要約

本研究は餌付け期（3-10日齢）のブロイラーへの飼料用米（玄米）給与が飼養成績に及ぼす影響を検証するために行った。タイムコース実験とすることで、餌付け期（3-10日齢）および前期（10-17日齢）のブロイラーへの影響を分析した。飼料はトウモロコシ-大豆粕をベースとした対照飼料および対照飼料中のトウモロコシ全量を飼料用米（玄米）に代替した飼料用米飼料を用いた。結果、餌付け期のブロイラーへの玄米給与は飼養成績および組織重量に影響を及ぼさなかった。前期のブロイラーへの玄米給与では増体量が増加する傾向が観察され（ $p < 0.10$ ）、飼料効率は有意に改善されるという結果が得られた（ $p < 0.05$ ）。結論として餌付け期のブロイラーへの玄米給与は飼養成績および組織重量に影響を及ぼさないことが示された。このことから、餌付け期の飼料原料として、玄米はトウモロコシと全量代替可能だが、飼養成績を改善するような効果は期待できないことが示唆されたほか、前期以降においては飼養成績を改善する栄養効果があることが再確認された。

1. 緒言

ブロイラーは高い成長能力および体温調節要求を有するため、高水準かつそれぞれの生育ステージに適した飼料を給与する必要がある。特に餌付け期（1 - 7 日齢または 1 - 10 日齢）において餌付け用飼料を選択することが推奨されている。この理由として家禽類はこの時期に卵黄囊中の脂質を主とした内因性栄養利用から、炭水化物を主とした外因性栄養利用への転換の影響を受けること、そして消化管が未成熟であることが挙げられる（Noy and Sklan, 1995 and 1997）。また、ブロイラーの飼料として配合されるトウモロコシや大豆粕は、餌付け期においては適切に利用されていない可能性についても報告されている（Batal and Parsons, 2002）。そのため、餌付け期の飼料をより適した形に改善していくことが重要である。ヒトの栄養学的研究において米に含まれるデンプン質は高い消化性を有し、それによって食後の急速な血糖応答が生じることが報告されている（Miller et al., 1992; Thompson et al., 2012）。米は家畜の成長促進に効果的な特性を持っており、特にその消化性の高さは、消化管が未発達な餌付け期のブロイラーに有効である可能性が高い。餌付け期のブロイラーへの白米を給与する研究は既に行われており、トウモロコシ主体飼料に比べて白米主体飼料を給与した方が、飼養成績が向上することが報告されている（E. D. Ebling et al., 2015）。2 章 1 節における飼料用米給与（玄米）では、0 - 1 週（10 - 17 日齢）というより早い段階で飼料効率の向上が観察されたこともあり、飼料用米給与の影響が早期ステージで現れやすい可能性が考えられ、検討する必要がある。

本研究は餌付け期のブロイラーへの飼料用米給与（玄米）が飼養成績に及ぼす影響を調べるために実施した。屠畜時期をタイムコース的に 2 つに分けることで段階的な飼料用米給与による影響を確認することを目的とした。試験項目は餌付け期（3-10 日齢）ブロイラーにおける飼養成績、組織重量および前期（10-17 日齢）ブロイラーにおける飼養成績である。

2. 材料および方法

(1) 供試動物

本試験には、ブロイラー初生雛（チャンキー種、雄）24 羽を用いた。市販のブロイラー前期飼料および水を自由摂取させ、3 日齢まで育成した。この育成期間には飼料の変化によるストレスを軽減させるために前期飼料中に 2.0 – 3.0 mm に破碎した飼料用米（玄米）を混合して給与した。3 日齢時に体重測定を行い、各試験区に分けて試験を行った。

(2) 試験飼料

表 2-2-1 に飼料配合割合を示した。試験区はトウモロコシ-大豆粕主体飼料を給与する対照区、対照飼料中のトウモロコシ全量を玄米に置き換えた飼料用米区の計 2 試験区である。飼料用米区では、玄米（新潟二郎）を約 3.0 mm に粉碎して給与した。試験飼料は各栄養素が ROSS（2014）の推奨値を上回るように設計した。

(3) 試験方法

試験開始日には 24 羽の雛を体重の平均がほぼ等しくなるように 3 羽ずつの 8 ペンに割り当てた。トウモロコシ主体飼料を給与する 4 ペンを対照区、飼料用米主体飼料を給与する 4 ペンを飼料用米区とした。各試験区のペンはそれぞれに 4 つに分類され、対照 1, 2 および飼料用米 1, 2 は 1 週間で屠畜し (3 - 10 日齢)、3, 4 のペンのブロイラーは単飼ケージに移し、さらに 1 週間 (10 - 17 日齢) 飼育するタイムコース試験とした。試験期間中、ブロイラーは群飼ケージ内または単飼ケージ内 (ともにワイヤーメッシュ底) で飼育し、不断給餌、自由飲水とした。対照 1, 2 および飼料用米 1, 2 の試験終了時に体重を測定し記録した。群飼では正確な飼料摂取量を計測することが困難であるため、飼養成績は増体量のみ算出した。その後屠畜し、右部分のムネ肉 (浅胸筋)、肝臓、右モモ肉を丁寧に切り取り、それぞれの重量を測定し記録した。対照 3, 4 および飼料用米 3, 4 はさらに 1 週間飼育し、増体量、飼料摂取量および飼料効率を計測した。

本試験の測定項目は、餌付け期 (3 - 10 日齢) においては飼養成績 (増体量)、組織重量 (ムネ肉、肝臓、モモ肉) とし、前期 (10 - 17 日齢) では飼養成績 (増体量、飼料摂取量、飼料効率) とした。

(8) 統計処理

得られた全てのデータは、t 検定による平均値の比較によって統計処理を行った。

3. 結果

飼養成績

飼養成績の結果を表 2-2-2 に示した。0 - 1 週の増体量については試験区間に有意な差は認められなかった。1 - 2 週の増体量は対照区に対して飼料用米区で増加する傾向が観察された ($p < 0.10$)。また、飼料用米給与は飼料摂取量に影響を与えなかったが、飼料用米区で飼料効率が有意に向上する結果が得られた ($p < 0.05$)。

組織重量

0 - 1 週における組織重量は表 2-2-3 に示した。組織重量においても試験区間に有意な差は観察されなかった。

4. 考察

Aviagen 社は、ブロイラーの 7 日齢体重と出荷体重に相関がみられることを報告しており、良好な出荷成績を収めるには 1 週齢体重で入雛時の 4.5 - 5.0 倍まで大きくすることが必要としている。そのためには、孵卵場から供給される雛の質や飼育管理技術に加え、良質な飼料が求められる。本試験では、ブロイラーにおける飼料用米給与が飼養成績にどのような影響を及ぼすかについて、タイムコース試験にすることで各成長段階（餌付け期および前期）の飼養成績の検討を行った。これにより、幼雛用飼料原料としての飼料用米の有用性が確認で

できれば、出荷成績の改善に繋がると考えたからである。

餌付け期 (0-1 週) において増体量および組織重量に有意な差は観察されなかった。また、餌付け期の飼料摂取量については群飼ケージでの飼育となったため、正確に計測することができなかった。前期 (1-2 週) では、増体量が飼料用米給与によって増加傾向を示すことが確認された ($p < 0.10$)。さらに、飼料用米は摂取量に影響を及ぼさなかったものの、飼料効率が有意に向上することが示された ($p < 0.05$)。この実験はより早い段階で飼料用米給与することで、飼養成績改善効果が高まるのではないかという仮説から実行した。しかし、3-10 日齢という餌付け期での飼料用米給与は、飼養成績に影響を及ぼさないという結果となった。

P. D. Ebling ら (2015) は、米 (白米またはパーボイルド米) を配合した米主体飼料を餌付け期 (1-7 日齢) のブロイラーに給与し、増体量および飼料要求率が改善されたことを報告している。この結果は玄米を用いた本研究の結果とは異なるものであった。この報告の中でトウモロコシと米の栄養利用性の違いだけでなく、白米と炊飯米との利用性の違いについても報告されている。米を熱水処理した場合、そのデンプンはゼラチン化され、冷却中に老化 (難消化性デンプン) する可能性があり (Englyst et al., 1992)、デンプン消化性を減少させる可能性がある (Guha et al., 2011)。玄米の粗繊維含量は白米よりも多いことから (玄米: 0.7%、白米: 0.2%, 日本標準飼料成分表 2009 年版)、玄米のデンプン消化率は白米と比較すると低いことが知られている。このように、米の中でもその形態や状態によって栄養利用性に変化が生じる。前述の通り、餌付け期の鶏の特徴として、消化管が未成熟で全ての栄養素を消化・

吸収することができないこと、卵黄囊中の脂質を主とした内因性栄養利用から炭水化物を主とした外因性栄養利用への転換時期であることが報告されている (Noy and Sklan, 1995, 1997)。これらのことから、白米よりも粗繊維の多い玄米は餌付け期の飼料原料として、トウモロコシ主体飼料を超えるような特筆した効果を持たない可能性があり、それによって本研究でも餌付け期における飼養成績の改善が観察されなかったと考えられる。ただ、現場レベルでは、飼料原料を細かく粉碎し、エキスパンダー加工 (デンプン質のアルファ化)、ペレット成形 (摂取効率向上) および粗粉碎した餌付け飼料 (加熱加工飼料) が用いられる。本研究の飼料用米およびトウモロコシは、3.0 mm 程に粉碎して他原料と混合したマッシュ飼料として給与したため、現場レベルで行われていることとは大きく異なる。そのため、米の微粉碎や加熱加圧、成形等、現場に即した条件で実施すれば、また異なる結果が得られる可能性も考えられる。

一方で 10-17 日齢の前期ブロイラーへの飼料用米 (玄米) 給与では、増体量が改善される傾向がみられ ($p < 0.10$)、飼料効率も有意に改善される結果が得られた ($p < 0.01$)。これは 2 章 1 節の結果と一致している。米はデンプン含量が高く (71.8% ; FEDNA, 2010)、優れた品質を有すると特徴付けられており、Tester ら (2004) はエネルギー利用効率が改善されることを報告している。Gonzales-Alvarado ら (2007, 2008) および Vincent ら (2007) の報告では、トウモロコシの代替原料として米を配合した飼料を給与することで、ブロイラーおよび子豚それぞれにおいて飼養成績・栄養利用性が改善されている。前期ブロイラーへの米主体飼料

給与による飼養成績改善は再現性が高いことが確認できた。また、餌付け期で飼養成績に影響を及ぼさなかったにも関わらず前期で改善されたことは、栄養利用の移行が進んだこと、未熟な消化管が発達したことで、白米に比べて繊維質の多い玄米を十分に利用できるようなったことが考えられる。

結論として、餌付け期(3-10日齢)においてトウモロコシから玄米へ全量代替が可能だが、飼養成績の改善は望めないことが示唆された。これには米の形態によって動物の反応が異なることに起因すると考えられ、白米や粳米など他の形態での給与を検討する必要がある。また、現場レベルに即した加熱加工飼料とした場合の変化も調査することが求められる。一方で前期ブロイラーへの飼料用米給与によって飼養成績が改善されたことはこれまでの研究と一致している。近年の研究結果と一貫して飼料効率が向上していることから、飼料用米に栄養機能が存在することが再確認された。

表2-3-1 : 試験飼料の配合割合および栄養成分 (%)

	対照区	飼料用米区
トウモロコシ	47.00	-
玄米	-	48.00
大豆粕	38.00	37.00
コーングルテンミール	5.00	5.00
植物性油脂	5.00	5.00
第2リン酸カルシウム	2.10	2.15
炭酸カルシウム	1.40	1.40
食塩	0.40	0.40
リジン塩酸塩	0.30	0.30
DL-メチオニン	0.40	0.35
トレオニン	0.10	0.10
塩化コリン	0.10	0.10
プレミックス ¹⁾	0.20	0.20
合計	100	100
栄養組成 (計算値)		
ME (Mcal)	3.12	3.13
CP	24.8	24.8
Lys	1.53	1.53
Thr	1.02	1.00
Met + Cys	1.17	1.17
Arg	1.51	1.62

¹⁾ 飼料中1kg当たりの供給量 : マンガン 100mg、亜鉛 100mg、鉄 40mg、銅 15mg、ヨウ素 1mg、ビタミンA 1300IU、ビタミンD₃ 5000IU、ビタミンE 80IU、ビタミンK 4mg、チアミン 4mg、リボフラビン 9mg、ビタミンB6 4mg、ビタミンB12 0.02mg、パントテン酸 15mg、ニコチン酸 15mg、ニコチン酸 60mg、葉酸2mg、ビオチン0.15mg

表2-3-2 : 餌付け期における飼料用米給与が飼養成績に及ぼす影響

	対照区	飼料用米区	<i>p</i> 値
初期体重 (g)	65	64	-
週増体量 (g/週)			
0-1週	199 ± 9	190 ± 8	0.461
1-2週	364 ± 21	413 ± 16	< 0.10
飼料摂取量 (g)			
1-2週	442 ± 22	452 ± 16	0.722
飼料効率 (gain/feed)			
1-2週	0.823 ± 0.025	0.914 ± 0.014	< 0.05
平均値±SE, 実験1 (0-1週) : n=12, 実験2 (1-2週) : n=6			

表2-3-3 : 餌付け期における飼料用米給与が組織重量に及ぼす影響

	対照区	飼料用米区	<i>p</i> 値
ムネ肉 (g)	8.6 ± 0.9	9.5 ± 0.4	0.385
モモ肉 (g)	19.3 ± 1.2	20.6 ± 1.5	0.407
肝臓 (g)	9.6 ± 0.3	8.4 ± 1.5	0.446
平均値±SE, n=6			

第3節

飼料用米飼料へのフィターゼ添加が飼養成績に及ぼす影響

要約

本研究は、前期ブロイラーにおける飼料用米給与および飼料用米主体飼料へのフィターゼ添加効果を評価するために実施した。7日齢のブロイラー（チャンキー種、雄）36羽を対照区（トウモロコシ主体飼料）、対照+フィターゼ区（トウモロコシ主体飼料にフィターゼ添加）、飼料用米区（飼料用米主体飼料）、飼料用米+フィターゼ区（飼料用米主体飼料にフィターゼ添加）の4試験区に割り当てた。フィターゼ添加飼料では非フィチンリン含有量を要求量の半分とした。飼料用米区における増体量と飼料摂取量は、対照区よりも有意に増加した（ $p < 0.05$ ）。飼料用米給与によってムネ肉、モモ肉重量は増加し、窒素蓄積量にも改善がみられた。対照+フィターゼ区におけるリン蓄積率は、対照区と比較して有意に増加したが、飼料用米飼料へのフィターゼ添加では、リン蓄積率に変化が認められなかった。また、対照区と比較して他の3試験区における肝臓TDH活性は有意に低下した（ $p < 0.01$ ）。これらの結果から、前期ブロイラーの飼料原料として、飼料用米がトウモロコシよりも優れていること、米主体飼料へのフィターゼ添加効果は、トウモロコシ主体飼料への添加効果に劣っていることが示唆された。

1. 緒言

現在、飼料自給率の向上や休耕地の有効利用のために飼料用米の研究が注目を集めている。米のデンプン粒は 3-8 μm と、トウモロコシの 2-30 μm に比べて小さく (Tester et al., 2004)、米のデンプン分子は重合度が小さい (Vandeputte et al., 2004)。これらの特性は米のデンプンが消化酵素との反応に優位に働く可能性があり、デンプン消化率の向上による家畜の成長を促進する要因となり得る。González-Alvarado, J. M ら (2007, 2008) によると、飼料用米給与によって消化管以外の体重が増加し、消化管の重量が減少することが明らかにされている。また、初生雛への玄米給与試験によると、トウモロコシを飼料用米へと代替して飼養することが可能であることを示している (González-Alvarado, J. M et al., 2007)。2 章 1 節、2 節の結果からも飼料用米給与が前期ブロイラーの飼養成績を改善することの再現性の高さが示されている。

近年、畜産物生産費の高騰や SDGs の観点から、生産コストや環境負荷を最小限とした家畜の飼養が強く求められている。特にリンは様々な環境問題の原因物質であり、家禽からの排泄量低減は環境保全の観点から極めて重要である (日本飼養標準家禽 2011)。飼料に消化酵素であるフィターゼを添加することで、植物性原料中のリンの利用性を高めることができ、飼料に配合するリン酸カルシウム等、無機態リンの量を減らすことができるため、配合飼料価格の低減にも寄与するほか、糞中に排泄されるリン量が減ることで環境への負荷も軽減できる。実際にフィターゼに関する研究が多く進められている (E. T. Kornegay et al., 1995; N. Liu

et al., 2008; R. B. Shirley et al., 2003; A. J. Cowieson et al., 2011; N. K. Morgan et al., 2015)。S. Y. Liu ら (2014) はフィターゼ添加による作用効率が穀物種によって異なることを示唆している。しかし、これらの研究はトウモロコシや小麦、ソルガム主体飼料を用いたものであり、米を飼料原料とした試験ではない。そのため、飼料用米へのフィターゼ添加についての情報は限られており、飼料用米給与が注目されている今、米へのフィターゼ添加によってどのような影響が現れるのか検証する必要がある。

本試験では前期ブロイラーへの飼料用米給与が飼養成績に及ぼす影響を再評価するとともに、米主体飼料へのフィターゼ添加が飼養成績や窒素・リン蓄積に及ぼす影響を調査するために実施した。分析項目は、飼養成績、酵素活性、窒素出納、組織重量とした。

2. 材料および方法

(1) 供試動物

この試験には、ブロイラー初生雛（チャンキー種、雄）36羽を用いた。市販のブロイラー前期飼料および水を自由摂取させた。試験開始前の3日間、飼料の急激な変化によるストレスを軽減させるために飼料中に2.0 - 3.0 mmに破碎した飼料用米（玄米）を10%程度混合して給与した。7日齢時に体重測定を行い、各試験区の平均体重が同等になるように選抜して9羽ずつ4試験区に分けて試験を行った。

(2) 試験飼料

試験区はトウモロコシ主体飼料を給与する対照区、トウモロコシ主体飼料にフィターゼを添加した対照+フィターゼ区、飼料用米主体飼料を給与する飼料用米区、飼料用米主体飼料にフィターゼを添加した飼料用米+フィターゼ区の計4試験区である。飼料用米区および飼料用米+フィターゼ区では、対照区のトウモロコシ全量を玄米（こしいぶき）に置き換えた。この玄米は約3.0 mmに粉碎して給与した。フィターゼの添加量は2,000 FTU/kgで実験を行った。試験飼料は各栄養素がROSS（2014）の推奨値を上回るように設計した。しかし、フィターゼ添加を実施した試験区では、フィターゼ添加によるリン利用性改善に伴うリン過剰を防ぐために、非フィチンリンを要求量の1/2になるように調整した。試験飼料の配合割合は表2-3-1に示した。

(3) 供試フィターゼ

あすか製薬株式会社より入手した、基質（フィチン酸）親和性が従来のものより高いとされるOptiPhos（4,000 単位/g）を用いた。なお、活性1単位はpH5.5、37°Cのクエン酸緩衝液中でフィチン酸5.1 mmolから1分当たり1 μmolの無機リンを遊離させる酵素の総量として定義される。

(4) 試験方法

試験 1 日目に全てのブロイラーの体重測定を行い、各試験区の平均体重がほぼ等しくなるように 1 試験区に 9 羽ずつ割り当てた。試験期間中、ブロイラーは単飼ケージ内（ワイヤーメッシュ底）で飼育し、不断給餌、自由飲水とした。試験期間は 2 週間として、1 週間ごとに体重および飼料摂取量を測定した。乾物重量、窒素蓄積率およびリン蓄積率測定に用いるため、3 日間（11-13 日目）全糞尿を採取し、糞尿採取期間中の飼料摂取量を測定した。採取した糞尿は 1 羽分ごとにポリ袋に入れ、分析のため-30℃で凍結保存した。試験最終日に屠殺を行った。屠殺方法は、通常の食鶏処理と同様にブロイラーの頸部を屠殺用のハサミで切断し放血を行った。同時に EDTA を含んだ採血管で血液サンプルを採取した。この血液サンプルは採取した当日に 3,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清をエッペンチューブに移して血漿サンプルとして分析まで-30℃で凍結保存した。その後、右部分のムネ肉（浅胸筋）、肝臓、腹腔内脂肪、右モモ肉（大腿二頭筋）を切り取り、それぞれの重量を測定し記録した。肝臓は酵素活性を測定するため-80℃で凍結保存した。

本試験の測定項目は、飼養成績（増体量、飼料摂取量、飼料効率）、ムネ肉重量、肝臓重量、腹腔内脂肪重量、モモ肉重量、全リン蓄積率、全リン蓄積量、窒素蓄積率、窒素蓄積量、肝臓酵素活性測定（TDH；Threonine Dehydrogenase）とした。

(5) リン出納

粉碎機で粉碎した飼料 1.0g または糞 0.5g を秤量し、コニカルビーカーに移し、硝酸 15mL を加え、時計皿を乗せて一晩静置した。その後、60～100°Cの比較的低温で加熱分解した。液が透明になったら冷却し、60%過塩素酸を 3.0 mL 加えたのち、温度を 150°Cに上げて分解を続けた。液が褐色になり始めたら冷却し、硝酸を 1.5 mL 加えてさらに分解を続けた。液が透明あるいは淡黄色になったら時計皿を外して乾固寸前まで濃縮した。冷却後、0.1 N 塩酸で加熱溶解して 100 mL メスフラスコで定容とした。その後、6 mL を 50 mL メスフラスコに取り、バナドモブデン酸試薬 10 mL を加え、水で定容して混和した。10 分後、分光光度計を用いて 400 nm で吸光度を測定した。イオン交換水を同様に操作してブランクの値として検量線を作成した。リン濃度が 0 µg/mL、2.5 µg/mL、5.0 µg/mL、10 µg/mL、20 µg/mL のものを調製して、検量線を作成し、リン含量を求めた。

(6) 窒素出納

①風乾飼料の作成

冷凍保存した 11 - 13 日目の全糞尿を常温で解凍し、1 羽分ずつバット上に平たく広げ、これを 60°Cに設定した乾燥機内で 24 時間乾燥させた。乾燥機から取り出したあと、異物が混入しないようにビニールをかけ、24 時間室温に放置して風乾状態にした。その後、重量を測

定し、粉碎機で粉碎したものを分析に供した。分析まではプラスチック瓶で常温保存し、各成分の分析に供した。飼料についても同様に粉碎機で粉碎し、分析まで冷蔵保存した。

②窒素蓄積量

窒素蓄積量を算出するために糞尿および試験飼料の窒素含量を測定した。測定には NC コーダー (SUMIKA 製 NC-90) を用いた。風乾試料を専用の石英セルに 25–30 mg 計り取り、NC コーダーにセットして試料の窒素含量を測定した。窒素含量を用いて算出した窒素摂取量および窒素排泄量から窒素蓄積率を算出した。算出する際の式を以下に示す。

$$\text{窒素摂取量 (g/3d)} = \text{飼料 1g 当たりの窒素含量 (g)} \times \text{期間中飼料摂取量 (g)}$$

$$\text{窒素排泄量 (g/3d)} = \text{糞尿 1g 当たりの窒素含量 (g)} \times \text{期間中糞尿排泄量 (g)}$$

$$\text{窒素蓄積量 (g/3d)} = \text{窒素摂取量 (g/3d)} - \text{窒素排泄量 (g/3d)}$$

③窒素蓄積率

②で求めた窒素蓄積量を用いて窒素蓄積率を算出した。算出する際の式を以下に示す。

$$\text{窒素蓄積率 (\%)} = \text{窒素蓄積量 (g/3d)} \div \text{窒素摂取量 (g/3d)} \times 100$$

(7) TDH 活性

屠殺時に採取した肝臓サンプルを用いて調製した粗酵素液の TDH 活性を分光光度計で測定した。測定方法は Green と Elliott (1964) によるものを微修正した Aoyama と Motokawa (1981) の方法で行った。すなわち NAD の 340nm における吸光度の変化を測定して行った。

①試薬

- 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.6)

(A) 液 (KH_2PO_4 0.68 g/超純水 500 mL + EDTA 18.6 mg + 2-mercaptoethanol 195 mg + Triton X100 0.1%、(B) 液 (K_2HPO_4 0.87 g/超純水 500 mL + EDTA 18.6 g + 2-mercaptoethanol 195 mg + Triton X100 0.1%) を予め調製し、(A) 液と (B) 液を pH 7.6 になるように混合した。

- 500 mM Tris (pH 8.4 at 41°C)

Tris 12.114 g を超純水約 150 mL に溶かし、41°C で pH 8.4 となるように調整したあと、200 mL にフィルアップした。

- 800 mM KCL

5.96 g の KCL を超純水 100 mL に溶かしたものの。

- ・ 330 mM L-Threonine

3.93 g の L-Threonine を超純水 100 mL に溶かしたものを。

- ・ 30 mM NAD (分析当日に調製)

99.45 mg の NAD を超純水 5 mL に溶かしたものを。

②粗酵素液の調製

屠殺時に採取した肝臓サンプルを用いて粗酵素液を調製した。ホモジネートチューブに、肝臓 1 g に対して 9 mL の 10 mM Potassium phosphate buffer を加え、氷で冷やしながらポリトロンホモジナイザーでホモジネートを調製した。ホモジネートを遠心チューブに移し、27,200 × G で 30 分間遠心分離を行った。上清をエッペンチューブに移し、これを粗酵素液とした。粗酵素液は分析まで-80°Cで保存した。

③分析および算出方法

500 mM Tris 0.40 mL、800 mM KCL 0.10 mL、超純水 0.29 mL、30 mM NAD 0.10 mL、粗酵素液 0.10 mL を混合したものに、330 mM L-Threonine 0.10 mL または超純水 0.10 mL を混合して 1.00 mL とし、340 nm における 1 分間の吸光度変化を測定した。活性値の算出方法は以下の式に示す。

活性値 ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g liver}$)

$$= \text{OD 値} * (\text{mAbs}) \div (\text{吸光係数} \times \text{酵素量} \times \text{ホモジネート濃度} \times 1,000)$$

$$= \text{OD 値} (\text{mAbs}) \div (6.22 \times 0.01 \times 0.1 \times 1,000)$$

* : OD 値 (mAbs) = Total - Blank

(8) 統計処理

全てのデータは一元配置分散分析を使用して分析を行い、平均値の差を Tukey の多重検定を用いて、それぞれの試験区間を比較する検定を実施した。

3. 結果

飼養成績

表 2-3-2 に 1 週間ごとの飼養成績の結果を示した。増体量は、0-1 週と 0-2 週において、対照区に対して飼料用米区で有意に増加した ($p < 0.05$)。飼料摂取量は全期間で飼料用米給与によって増加した ($p < 0.05$)。さらに、0-1 週の飼料効率は対照区に対して飼料用米区で有意に改善した ($p < 0.05$)。フィターゼ添加による飼養成績の変化は観察されなかった。

組織重量

表 2-3-3 にムネ肉、モモ肉、肝臓、腹腔内脂肪重量の結果を示した。ムネ肉およびモモ肉は、トウモロコシと比較して飼料用米を給与することで有意に増加した ($p < 0.05$)。肝臓および腹腔内脂肪に関しては、対照区と飼料用米区、およびそれら区へのフィターゼ添加による比較でも有意な差は認められなかった。

出納試験

表 2-3-4 に窒素およびリンの出納試験の結果を示した。窒素蓄積量は、対照区に対して飼料用米区で有意に増加した ($p < 0.05$)。また、対照区にフィターゼを添加することで窒素蓄積率が有意に改善した ($p < 0.05$)。さらに、対照区、飼料用米区ともにフィターゼ添加によってリン排泄量が有意に減少した ($p < 0.05$)。リン蓄積率は、対照区に対して対照+フィターゼ区で有意に改善された ($p < 0.05$)。

酵素活性

表 2-3-5 に肝臓における酵素活性値の分析結果を示した。対照区に対して飼料用米区で TDH 活性が有意に低下した ($p < 0.01$)。さらに対照区と対照+フィターゼ区の比較においても、TDH 活性は有意に低下した ($p < 0.01$)。

4. 考察

本研究では、ブロイラー前期飼料のトウモロコシを全量玄米に代替して給与することで、飼養成績が明らかに改善された。0 - 1 週および 0 - 2 週の増体量は、対照区よりも飼料用米区で有意に増加した ($p < 0.05$)。ムネ肉およびモモ肉重量も対照区と比較して飼料用米区の方が重かった ($p < 0.05$)。また、全ての試験期間で飼料用米を給与することによって飼料摂取量が増加した ($p < 0.05$)。一般に体重増加は飼料摂取量の増加に起因することが多い。しかし、0 - 1 週の飼料効率は、対照区よりも飼料用米区の方が優れていた ($p < 0.05$)。González-Alvarad ら (2007) は、トウモロコシ主体飼料を給与した群と比較して、米主体飼料の給与によって飼料要求率が大幅に改善されることを報告した。この結果は、本研究および 2 章 1, 2 節の結果と一致している。さらに、飼料用米区における窒素蓄積量は、対照区よりも有意に増加している。この結果についても、2 章 1 節の結果と一貫している。肝臓 TDH 活性は、飼料用米を給与することで対照区と比較して有意に低下した ($p < 0.01$)。このことは、飼料用米給与によって必須アミノ酸であるトレオニンの分解が低下していることを示しており、飼料用米区で対照区よりも窒素蓄積量が増加したこと、ムネ肉およびモモ肉重量が増加したことを一部説明することができる。繰り返しになるが飼料用米がブロイラー前期飼料の穀物原料として、トウモロコシよりも優れていることが再確認できた。

Zaefarian ら (2013) は、ブロイラー飼料へのフィターゼ添加 (500 FTU/kg) によって、リンと窒素の消化率を向上させるだけでなく、適切な非フィチン態リン飼料を給与したブロイ

ラーの飼養成績も改善することを報告している。本研究では、フィターゼ添加による効果を最大化することを目的に 2,000 FTU/kg のフィターゼ添加を行った。さらに、フィターゼ添加区において飼料中の非フィチンリン含量を要求量の 1/2 まで減らした。非フィチンリン含量を減らすと、ブロイラーの増体量や飼料摂取量、飼料効率が低下することがよく知られている (Yonemochi et al., 2000; Viperous et al., 2002; Dilger et al., 2004; Taheri et al., 2015)。しかし、Taheri ら (2015) は非フィチンリン含量を下げた飼料にフィターゼ添加することで、正常な飼養成績まで回復することを報告している。また、非フィチンリンを制限した飼料に段階的にフィターゼ添加 (250, 500, 2,500 FTU/kg) することで、増体量や飼料摂取量は直線的に増加する (Pirgozliev et al., 2013)。本研究では、対照区とトウモロコシ+フィターゼ区および飼料用米区と飼料用米区+フィターゼ区において、増体量、飼料摂取量、飼料効率に有意差は検出されなかった。この結果は、飼料の非フィチンリン含有量を推奨要求量の半分に調整し、本来低下するはずの飼養成績がフィターゼ添加によって同等にまで回復したと考えられる。また、トウモロコシ主体飼料へのフィターゼ添加によって、リンの蓄積率だけでなく窒素蓄積率も有意に改善された ($p < 0.05$)。また、肝臓 TDH 活性は対照区と比較してトウモロコシ+フィターゼ区で有意に低下した ($p < 0.01$)。TDH 活性の低下は必須アミノであるトレオニンの分解の低下を示すため、フィターゼ添加によって窒素蓄積率が改善したことと関係している可能性がある。一方、これにはフィターゼのリン利用性改善以外の作用、すなわちフィチン酸およびフィチン酸がフィターゼによって分解されてできるイノシトールの効果も考えられ

る。フィターゼ添加によりフィチン酸が分解されて利用可能な無機リンの量は増加し、それに伴ってイノシトールの量も増加する。C. L. Walk ら (2014) はイノシトールについても報告しており、フィターゼ添加により筋胃中のフィチン酸濃度は減少し、イノシトール濃度が増加することを示した。イノシトールはブロイラーの増体量および飼料要求率を改善することが報告されているが、この作用については一定の結果が得られておらず、Ca や P のレベル、フィターゼの有無、鶏の日齢によって結果が異なる可能性がある。さらに、この報告の中でイノシトール濃度がポジティブに増体量および飼料要求率に関係していることが示唆された。したがって、このイノシトールに窒素代謝への作用が存在する可能性が考えられる。逆にフィチン酸が窒素代謝への何らかのネガティブな作用を持っており、フィターゼ添加によってその作用が打ち消された可能性もある。C. L. Walk ら (2014) の報告によると、フィチン酸濃度が増体量および飼料要求率にネガティブな影響を及ぼしている。A. J. Cowieson ら (2006) はフィチン酸を摂取させることで、いくつかのアミノ酸消化性が有意に低下することを報告し、加えてそのフィチン酸摂取によって低下したりジン、トレオニンなどのアミノ酸消化性はフィターゼ添加によって有意に改善されることを明らかにした。したがって、本研究でトウモロコシ主体飼料へのフィターゼ添加によってリン蓄積だけでなく窒素蓄積も向上したことは、フィチン酸による窒素代謝阻害作用をフィターゼによって改善させた可能性も考えられる。

前述の通り、飼料用米へのフィターゼ添加について、飼料用米区と飼料用米+フィターゼ区間には飼養成績に有意な差は認められなかった。リンの利用性はトウモロコシと同様にフィターゼ添加で改善したと考えられ、非フィチンリンを要求量の 1/2 に制限しても飼養成績の低下は観察されていない。C. L. Walk ら (2014) によると、陽性対照区 (非フィチンリン : 0.45%) と陰性対照区 (非フィチンリン : 0.30%) との飼養成績には有意差が観察されなかったと報告している。本実験では陰性対照区 (非フィチンリン量を要求量の 1/2 にしてフィターゼ添加無し) を設けておらず、実際に非フィチンリン量を下げたときに飼養成績にどう影響していたかは不明である。この 2 つの試験区でのリン出納の結果では、リン蓄積量 (g/3d) およびリン蓄積率 (%) は改善されなかった。さらに、窒素蓄積率 (%) はフィターゼ添加によって有意に低い値となった。つまり、飼料用米主体飼料へのフィターゼ添加において、リン利用率改善さえ観察することができなかったことになる。S. Y. Liu ら (2014) は、穀物種によってフィターゼ添加による作用に差があることを報告している。フィターゼのフィチン酸の加水分解効率の穀物種による違いに関する研究では、フィターゼ 600 FTU/kg 添加時にそれぞれトウモロコシで 28.2% (30.8 vs. 59.0)、小麦で 16.1% (30.7 vs. 46.8)、大豆粕で 37.5% (34.9 vs. 72.4) 改善されると示している (Leske and Coon, 1999)。この違いについて、トウモロコシ中のフィチン酸は主に胚芽に存在する (88.0%) のに対して、小麦中のフィチン酸は主にアリュールン層に存在する (87.1%) ことが原因として考えられる (O'Dell et al., 1972)。アリュールン層に含まれる繊維成分がフィチン酸とフィターゼの接触を制限するためにトウモロコシ

と比較して小麦やソルガムにおいて、フィターゼ添加による効果が低い可能性がある。O'Dellら（1972）の報告によると、米中のフィチン酸の大部分が果皮に存在している。したがって、米においても果皮に含まれる成分がフィチン酸とフィターゼの接触を制限するためにその効果が十分に発揮されないことが示唆された。つまり、米主体飼料へのフィターゼ添加効果は、トウモロコシ主体飼料への添加による効果に劣る可能性がある。

カルシウムとリンの代謝は密接な関連があるため、飼料中のカルシウムとリンの比率は非常に重要であり、日本飼養標準家禽によるとブロイラーの場合はカルシウム：非フィチンリン=2:1が適正である（1.6-1.8:1.0程でカルシウム比率が下がる傾向あり）。そのため、様々なカルシウム濃度および非フィチンリン濃度でのフィターゼ作用について研究報告がなされている（J. P. Driver et al., 2005, Diego Paiva et al., 2014, M. Hamdi et al., 2015）。フィターゼを用いる場合、カルシウムと非フィチンリン量のバランスが崩れないように注意する必要がある（日本飼養標準家禽 2011）。M. Hamdiら（2015）は、0-14日齢のブロイラーにおいて、0.70%のカルシウム、0.38%の非フィチンリンの飼料に1,150 FTU/kgのフィターゼ添加が最も適していることを示している。彼らはトウモロコシと小麦を混合した飼料を用いている。前述の通り、フィターゼの作用効率が穀物種によって異なるのであれば、同じように穀物の種類によって適正なカルシウム：非フィチンリン比および量も異なる可能性がある。したがって、米を主要穀物としたときの適正なカルシウム、非フィチンリン濃度およびフィターゼ力価を

見出すことができれば、飼料用米へのフィターゼ添加によるフィチン酸分解作用を最大限に引き出すことができると考えられる。

まとめると、前期ブロイラーへの飼料用米給与は飼養成績を改善させることが再確認された。また、フィターゼ添加によるフィチン酸分解作用は、トウモロコシ主体飼料と比較して飼料用米主体飼料ではその効果が劣ることが示唆された。飼料用米飼料におけるフィターゼの効果を最大限に発揮させるためには、カルシウムと非フィチンリンの量および比を再検討する等、さらなる研究が必要である。

表2-3-1：試験飼料の配合割合および栄養成分（％）

	対照区	対照+フィターゼ区	飼料用米区	飼料用米+フィターゼ区
トウモロコシ	52.00	52.70	-	-
玄米（こしいぶき）	-	-	52.30	53.70
大豆粕	33.30	33.00	33.00	32.00
コーングルテンミール	6.25	6.30	6.25	6.30
植物性油脂	4.00	4.00	4.00	4.00
第2リン酸カルシウム	1.74	0.60	1.71	0.60
炭酸カルシウム	1.21	1.90	1.24	1.90
食塩	0.50	0.50	0.50	0.50
リジン塩酸塩	0.30	0.30	0.30	0.30
DL-メチオニン	0.30	0.30	0.30	0.30
トレオニン	0.10	0.10	0.10	0.10
塩化コリン	0.10	0.10	0.10	0.10
プレミックス ¹⁾	0.20	0.20	0.20	0.20
合計	100	100	100	100
ME（Mcal）	3.12	3.14	3.12	3.15
CP	24.8	24.7	24.3	23.9
非フィチンリン	0.48	0.27	0.48	0.28
カルシウム	0.98	0.99	0.98	0.98

¹⁾ 飼料中1kg当たりの供給量：マンガン 100mg、亜鉛 100mg、鉄 40mg、銅 15mg、ヨウ素 1mg、ビタミンA 1300IU、ビタミンD₃ 5000IU、ビタミンE 80IU、ビタミンK 4mg、チアミン 4mg、リボフラビン 9mg、ビタミンB6 4mg、ビタミンB12 0.02mg、パントテン酸 15mg、ニコチン酸 15mg、ニコチン酸 60mg、葉酸2mg、ビオチン0.15mg

表2-3-2 : 飼料用米飼料へのフィターゼ添加が飼養成績に及ぼす影響

	対照区	対照+フィターゼ区	飼料用米区	飼料用米+フィターゼ区
初期体重 (g)	183 ± 4	184 ± 4	184 ± 4	181 ± 1
週増体重 (g/週)				
0-1週	230 ± 10 ^b	244 ± 19 ^{ab}	297 ± 11 ^a	292 ± 16 ^a
1-2週	414 ± 18	417 ± 22	488 ± 16	464 ± 23
0-2週	645 ± 24 ^b	661 ± 32 ^b	785 ± 20 ^a	755 ± 23 ^a
飼料摂取量 (g)				
0-1週	305 ± 9 ^{bc}	294 ± 18 ^c	356 ± 8 ^a	343 ± 13 ^{ab}
1-2週	577 ± 25 ^b	573 ± 22 ^b	656 ± 13 ^a	621 ± 20 ^{ab}
0-2週	882 ± 29 ^b	871 ± 32 ^b	1012 ± 16 ^a	964 ± 20 ^{ab}
飼料効率 (gain/feed)				
0-1週	0.755 ± 0.02 ^b	0.822 ± 0.03 ^{ab}	0.833 ± 0.02 ^a	0.848 ± 0.02 ^a
1-2週	0.721 ± 0.03	0.726 ± 0.02	0.744 ± 0.02	0.744 ± 0.02
0-2週	0.737 ± 0.02	0.757 ± 0.01	0.776 ± 0.01	0.783 ± 0.01

Mean ± SE, n=9, a,b,c : 異符号間で $p < 0.05$

表2-3-3：飼料用米飼料へのフィターゼ添加が組織重量に及ぼす影響

	対照区	対照+フィターゼ区	飼料用米区	飼料用米+フィターゼ区
ムネ肉 (g)	42 ± 2 ^b	43 ± 3 ^b	51 ± 2 ^a	50 ± 2 ^{ab}
モモ肉 (g)	52 ± 2 ^b	54 ± 3 ^b	63 ± 2 ^a	58 ± 2 ^{ab}
肝臓 (g)	26 ± 1 ^b	26 ± 1 ^b	29 ± 1 ^{ab}	31 ± 1 ^a
腹腔内脂肪 (g)	4.4 ± 0.4 ^b	4.3 ± 0.7 ^b	6.5 ± 0.7 ^{ab}	7.0 ± 0.7 ^a
腹腔内脂肪 (g/kg BW)	5.3 ± 0.4 ^{ab}	5.0 ± 0.7 ^b	6.7 ± 0.7 ^{ab}	7.5 ± 0.7 ^a

Mean ± SE, n=9, a,b,c : 異符号間で $p < 0.05$

表2-3-4：飼料用米飼料へのフィターゼ添加が窒素・リン出納に及ぼす影響

	対照区	対照+フィターゼ区	飼料用米区	飼料用米+フィターゼ区
窒素蓄積量 (g/3d)	7.32 ± 0.25 ^b	7.97 ± 0.37 ^{ab}	8.58 ± 0.26 ^a	7.62 ± 0.32 ^{ab}
窒素蓄積率 (%)	64.9 ± 1.3 ^{bc}	71.8 ± 0.9 ^a	68.0 ± 1.1 ^{ac}	62.4 ± 1.5 ^b
リン蓄積量 (g/3d)	1.414 ± 0.065 ^{ab}	1.264 ± 0.054 ^{bc}	1.520 ± 0.069 ^a	1.189 ± 0.045 ^b
リン蓄積率 (%)	58.0 ± 1.8 ^b	73.8 ± 1.6 ^a	57.0 ± 2.1 ^b	64.0 ± 1.4 ^b

Mean ± SE, n=9, a,b,c : 異符号間で $p < 0.05$

表2-3-5 : 飼料用米飼料へのフィターゼ添加が肝臓TDH活性に及ぼす影響

	対照区	対照+フィターゼ区	飼料用米区	飼料用米+フィターゼ区
Threonine dehydrogenase ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g liver}$)	$0.587 \pm 0.092^{\text{A}}$	$0.238 \pm 0.061^{\text{B}}$	$0.112 \pm 0.026^{\text{B}}$	$0.241 \pm 0.067^{\text{B}}$

Mean \pm SE, n=9, A, B : 異符号間で $p < 0.01$

第 4 節

飼料用米飼料へのカルニチン添加が飼養成績に及ぼす影響

要約

飼料用米飼料へのカルニチン添加が前期ブロイラーのタンパク質代謝に及ぼす影響を調べるために本試験を行なった。試験には 10 日齢の前期ブロイラー 36 羽（チャンキー種、雄）を供試した。試験区は対照区（トウモロコシ）、対照+カルニチン区、飼料用米区（玄米）、飼料用米+カルニチン区の 4 つとし、カルニチン添加量は 100 ppm に設定した。試験飼料は全て ROSS の栄養要求量（2014）を満たすように設計した。試験期間は 2 週間、不断給餌、自由飲水で飼養試験を行なった。飼料の違いおよびカルニチン添加を主効果とした二元配置の分散分析で統計処理を行なった。飼料用米給与およびカルニチン添加の両方で有意に飼養成績が改善された。カルニチン添加によって窒素蓄積率（%）が向上する傾向（ $p < 0.10$ ）が観察された。また、ムネ肉およびモモ肉重量も飼料用米給与およびカルニチン添加によって有意に増加した。筋肉中 Atrogin-1 および肝臓 CPT-1 の mRNA 量に変化は見られなかったものの、肝臓 IGF-I は飼料用米給与によって mRNA 発現量が有意に上昇した（ $p < 0.05$ ）。これらの結果から飼料用米およびカルニチンは飼養成績を改善させる作用を有し、さらにカルニチンの効果は飼料用米飼料への添加においても発揮されることが示唆された。

1. 緒言

ブロイラーの肉は安価で高タンパク質であることは周知の事実である。この他様々な理由から近年鶏肉の需要が高まっており、生産効率を向上させることが重要になっている。この目標は増体量および飼料効率を改善することで達成される。飼料給与量をより少なく、効率的に鶏を生産することが必要である。ここまで飼料用米給与によってブロイラーの成長が促進されることを明らかにしたが、さらなる成長促進を目的として研究を行う必要がある。米は多くの国で主要穀物として食されているが、飼料として実際に用いることも珍しくはない。高い消化性を持つことから豚や鶏に給与する実験が行われ、飼養成績が改善するという結果が報告されている (Mateos et al. 2006; Vicente et al. 2008; Yagami and Takada, 2017; Fujimoto et al., 2018)。1-3 節で、鶏への飼料用米給与実験によって成績が向上することやタンパク質代謝関連遺伝子に影響を及ぼすことが明らかとなった。3 節では、飼料用米飼料に消化酵素であるフィターゼを添加し、穀物種によってフィターゼの効果が異なることを報告した。このように飼料添加物は飼料の条件 (穀物種、動物性タンパクの有無、栄養水準等) によって作用の程度が異なる可能性がある。ここでは特に L-カルニチンに着目し、トウモロコシ飼料および飼料用米飼料への L-カルニチン添加について検討した。

L-カルニチンは、長鎖脂肪酸がミトコンドリア内へ入るためのキャリアとして働き、それによって脂肪酸の β 酸化が促進される (Metzler and Metzler, 2003)。鶏や豚における研究では、脂肪酸代謝の促進、飼養成績の改善、免疫システムおよび抗酸化能の強化が挙げられている

(S. H. Golzar Adabi et al., 2011; Heo et al., 2000)。この働きは、L-カルニチンが長鎖脂肪酸をミトコンドリア内へと輸送するキャリアとしての役割を持つことに起因し、脂肪燃焼とエネルギー産生に繋がる。L-カルニチンはメチオニンおよびリジンから生合成される (Cox and Hoppel, 1973a; 1973b)。しかし、これらの2つのアミノ酸はブロイラー飼料において制限アミノ酸になりやすいことから、飼料中にはこの2つのアミノ酸が単体添加されている。植物体に含まれるL-カルニチンは少ないため (Mitchell, 1978; Borum and Broquist, 1977; Bourum et al., 1983)、飼料中のメチオニンおよびリジンが十分量存在することが鶏体内でのカルニチン合成に要求される。他にもブロイラー飼料へのL-カルニチン添加によって飼養成績が改善することが報告されており (Rodehutschord et al., 2002; Rabie and Szilagy, 1998)、L-カルニチンは脂質代謝だけでなく、タンパク質代謝にも影響する可能性がある。実際に筋肉タンパク質合成・分解にもL-カルニチンが関係していることが示唆されている。鶏の研究ではL-カルニチン添加によって血漿中IGF-I濃度が上昇することが報告されている (Kita et al., 2002)。また、カルニチン添加によってラット骨格筋におけるIGF-I/PI3K/Aktシグナル経路を活性化し、ユビキチンリガーゼ(E3)であるMuRF発現を抑制することが報告されている (J. Keller et al., 2013)。さらに豚骨格筋および肝臓においても、カルニチン添加によってユビキチンプロテアソーム系の遺伝子が下方制御されることが報告されている (J. Keller et al., 2011)。一方で、ブロイラーへのカルニチン添加が飼養成績に影響を及ぼさなかったという報告もある (Barker DL and Sell, 1994)。このようにブロイラー飼料へのL-カルニチン添加が飼養成績に及ぼす影響に関

する研究結果は、一貫した結果が得られていないのが現状である。これらの結果から、正しい条件でブロイラーへのL-カルニチン給与行われれば、タンパク質代謝に影響を及ぼしてさらなる生産効率改善が望めると考えられる。今回はまだ報告されていない飼料用米飼料へのカルニチン添加実験を実施し、米給与によって向上した飼養成績にどのような影響を及ぼすか検討した。そのため、この実験は飼料用米飼料へのカルニチン添加効果についての初めての知見となる。

本研究は、飼料用米給与が前期ブロイラーの飼養成績およびタンパク質代謝に及ぼす影響について再検討するとともに、飼料用米飼料へのカルニチン添加が及ぼす影響を評価することを目的とした。

2. 材料および方法

(1) 供試動物

本試験には、ブロイラー初生雛（チャンキー種、雄）36羽を用いた。市販のブロイラー前期飼料および水を自由摂取させ、7日齢まで育成した。その後10日齢までの3日間、飼料の急変によるストレスを軽減させるために飼料中に2.0-3.0mmに破碎した飼料用米（玄米）を10%程度混合して給与した。10日齢時に体重測定を行い、各試験区の平均体重がほぼ等しくなるように選抜して9羽ずつに分けて試験を行った。

(2) 試験飼料

表 2-4-1 に飼料配合割合を示した。試験区はトウモロコシ-大豆粕主体飼料を給与する対照区および対照飼料中のトウモロコシ全量を玄米に置き換えた飼料用米区と、この 2 つの飼料に 100 ppm の L-カルニチン（和光）を添加した対照+カルニチン区および飼料用米+カルニチン区の 4 試験区とした。飼料用米区では、玄米（ゆきん子舞）を約 3.0 mm に粉碎して給与した。試験飼料は各栄養素が ROSS（2014）の推奨値を上回るように設計した。

(3) 試験方法

試験 1 日目に全てのブロイラーの体重測定を行い、各試験区の平均体重がほぼ等しくなるように各試験区 9 羽ずつ割り当てた。試験期間中、ブロイラーは単飼ケージ内（ワイヤーメッシュ底）で飼育し、不断給餌、自由飲水とした。試験期間は 2 週間として、1 週間ごとに体重および飼料摂取量を測定した。窒素出納試験を行うため、3 日間（11-13 日目）全糞尿を採取し、糞尿採取期間中の飼料摂取量を測定した。採取した糞尿は 1 羽分ごとにポリ袋に入れ、分析に供するまで -30°C で凍結保存した。試験最終日には EDTA を含んだ採血管に翼下静脈から血液サンプルを採取した。その後、通常の食鶏処理と同様にブロイラーの頸部を屠殺用のハサミで切断し放血を行い、全 36 羽の屠殺を行った。その後、開腹し、右部分のムネ肉（浅胸筋）、肝臓、腹腔内脂肪、右モモ肉（大腿二頭筋）を丁寧に切り取り、それぞれの重量を測定し記録した。ムネ肉、モモ肉および肝臓はその後の分析に用いるため、液体窒素で凍結し、

mRNA 量分析まで-80°Cで保存した。

本試験の測定項目は、飼養成績（増体量、飼料摂取量、飼料効率）、ムネ肉重量、モモ肉重量、肝臓重量、腹腔内脂肪重量、窒素蓄積率、窒素蓄積量および骨格筋中、肝臓のタンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量とした。

(4) 窒素出納

①風乾飼料の作成

冷凍保存した 11 - 13 日目の全糞尿を常温で解凍し、1 羽分ずつバット上に平たく広げ、これを 60°Cに設定した乾燥機内で 24 時間乾燥させた。乾燥機から取り出したあと、異物が混入しないようにビニールをかけ、24 時間室温に放置して風乾状態にした。その後、重量を測定し、粉砕機で粉砕したものを分析に供した。分析まではプラスチック瓶で常温保存し、各成分の分析に供した。飼料についても同様に粉砕機で粉砕し、分析まで冷蔵保存した。

②窒素蓄積量

窒素蓄積量を算出するために糞尿および試験飼料の窒素含量を測定した。測定には NC コーダー（SUMIKA 製 NC-90）を用いた。風乾試料を専用の石英セルに 25 - 30 mg 計り取り、NC コーダーにセットして試料の窒素含量を測定した。窒素含量を用いて算出した窒素摂取量および窒素排泄量から窒素蓄積率を算出した。算出する際の式を以下に示す。

窒素摂取量 (g/3d) = 飼料 1g 当たりの窒素含量 (g) × 期間中飼料摂取量 (g)

窒素排泄量 (g/3d) = 糞尿 1g 当たりの窒素含量 (g) × 期間中糞尿排泄量 (g)

窒素蓄積量 (g/3d) = 窒素摂取量 (g/3d) - 窒素排泄量 (g/3d)

③窒素蓄積率

②で求めた窒素蓄積量を用いて窒素蓄積率を算出した。算出する際の式を以下に示す。

窒素蓄積率 (%) = 窒素蓄積量 (g/3d) ÷ 窒素摂取量 (g/3d) × 100

(5) タンパク質代謝関連遺伝子の発現量分析

①mRNA 抽出

トータル RNA を大腿二頭筋および肝臓から専用のキットである TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies) を用いて抽出した。モモ肉または肝臓サンプルを氷上で粉砕したあと、50-100mg をファルコンチューブに測り取り、TRIzol 試薬 1.5 mL を用いてホモジナイズする。ホモジナイズしてできた溶液を 2.0 mL エッペンチューブに移す。このとき筋肉サンプルは、遠心分離 (2 - 8°C、10 分、12,000 × G) してから、上清を新しい 2.0 mL エッペンチューブに移す。クロロホルム 0.3 mL を加え、ピンク色に変わるまで激しく攪拌する。その後、実験台

上で2-3分間インキュベートした後、遠心分離（2-8°C、15分、12,000×G）する。2層に分離した上清（水層）を新しいエッペンチューブに移す。そこにイソプロパノールを0.75 mL 添加し、実験台上で10分間インキュベートする。遠心分離（2-8°C、10分、12,000×G）すると、沈殿物としてRNAが確認できる。イソプロパノールを捨て、75%エタノールで洗浄する。再度75%エタノールを1.0 mL 添加し、ボルテックス処理を行う。その後遠心分離（2-8°C、5分、7,500×G）し、デカンテーションののち5-10分間風乾する。沈殿物にRNase-free水を添加して55°Cで10分間インキュベートする。

②逆転写反応

リアルタイムPCR用の逆転写反応キット（東洋紡株式会社製 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover）を用いてサンプルの逆転写を行った。

(i) RNA 溶液の濃度測定

分光光度計（Thermo Fisher Scientific 製 NANODROP LITE）を用いて260 nmでRNA溶液の吸光度を測定し、RNAの濃度を求めた。また、260 nm/280 nmをRNAの純度とし、この値が1.6-2.0程度のサンプルをその後の分析に使用した。

(ii) RNA の変性

逆転写効率を向上させるため、RNA の変性を行った。RNA 溶液をインキュベーター (TAITEC 製 e-ThermoBucket ETB) を用いて 65°C で 5 分間インキュベートした後、氷上で急冷した。

(iii) ゲノム DNA 除去反応

(i) で求めた濃度を参考に、100 ng の RNA を含むように RNA 溶液を量り取り、それに 4 μL の 4 \times DN Master Mix および Nuclease-free 水を加えて総量を 8 μL とし、よく攪拌した後にインキュベーター (TAITEC 製 e-ThermoBucket ETB) を用いて 37°C で 5 分間インキュベートした。

(iv) 逆転写反応

ゲノム DNA を除去した RNA サンプル 8 μL に対して 2 μL の 5 \times RT Master Mix を加えてよく混合し、Mini Opticon real-time PCR System (Bio-Rad Laboratories 製) にセットした。37°C で 15 分間インキュベートし、サンプルを逆転写反応させた後、50°C で 5 分間のインキュベートを行い、高温反応性に優れた酵素である ReverTra Ace の逆転写効率を向上させた。最後に 98°C で 5 分間のインキュベートを行い、逆転写酵素を失活させた。

③発現量測定

インターカレーション法によるリアルタイム PCR キット (Bio-Rad Laboratories 製 SsoFast EvaGreen Supermix) を用いて RNA 発現量の測定を行った。

(i) プライマー

乾燥状態のプライマー (eurofins Genomics 製) に対し、それぞれのモル収量を参考に RNase-free 水を加え、100 μ M のプライマー溶液を調製した。これを更に 10 倍希釈し 10 μ M としたものをその後の分析に使用した。測定したタンパク質代謝関連遺伝子 (IGF-I、Atrogin-1)、および内部標準として使用する GAPDH のプライマー配列は表 2-4-2 に示した。

(ii) リアルタイム PCR

逆転写反応で得られた cDNA サンプル 1 μ L に対して、Sso Fast EvaGreen super mix を 10 μ L、発現量を測定する遺伝子に特異的な Forward Primer および Reverse Primer をそれぞれ 1 μ L、RNase-Free 水を 7 μ L 加え、総量 20 μ L の反応試薬を調製した。反応試薬をよく混合した後、Mini Opticon real-time PCR System (Bio-Rad Laboratories 製) を用い、95°C で 30 秒間インキュベートし、試薬中の酵素を活性化させた。その後、95°C で 3 秒間インキュベートし cDNA を熱変性により一本鎖 DNA にし、次に 60°C で 30 秒間インキュベートし、プライマーの標的 cDNA へのアニーリングおよび伸長反応を行い、これを 1 サイクルとして 39 サイクルの反応

を行った。1 サイクル毎に DNA 合成量に依存する蛍光強度を測定し、増幅曲線から標的とする遺伝子の発現量を求めた。反応後、65°Cから 95°Cまで 0.5°C毎に 5 秒間インキュベートし、各温度における蛍光強度を測定することで融解曲線を求め、遺伝子配列に固有の値である融解温度を求め、増副産物が標的遺伝子のみであることを確認した。発現量の測定・比較には解析用ソフトウェアである BIO-RAD CFX-Manager(Bio-Rad Laboratories 製)を用いた。GAPDH を内部標準とし、相対的定量法 ($\Delta\Delta\text{Ct}$ 法) により各遺伝子の相対的発現量を算出した。

(8) 統計処理

全てのデータは飼料の違いおよびカルニチン添加の有無を主効果とした二元配置の分散分析で統計処理を行った。また、タンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量の分析に関しては、Tukey の多重検定を行い、それぞれの試験区間を比較する検定を実施した。

3. 結果

飼養成績

飼養成績の結果を表 2-4-3 に示した。1-2 週および 0-2 週の増体量が飼料用米給与によって有意に改善される結果が得られた ($p<0.05$)。また全ての測定期間において、カルニチンを添加することによって、カルニチンを添加しない試験区と比較して増体量が有意に向上した ($p<0.05$)。飼料用米飼料を給与された 2 つの試験区における 1-2 週および 0-2 週の飼料摂

取量は、トウモロコシベースの飼料を給与された鶏に比べて有意に増加した ($p < 0.05$)。さらに測定した全ての期間において、カルニチン添加飼料を摂取した鶏の飼料摂取量は、無添加試験区と比較して有意に増加した ($p < 0.05$)。飼料効率に関しても、測定した全ての期間において、米飼料を給与された試験区は、対照飼料を給与された試験区に比べて有意に高い値を示した ($p < 0.05$)。カルニチンを添加された飼料を摂取した鶏の飼料効率は、1-2 週および 0-2 週でカルニチン無添加区と比較して有意に向上する結果が観察された ($p < 0.05$)。

組織重量

組織重量の結果を表 2-4-4 に示した。飼料用米飼料を摂取したブロイラーにおけるムネ肉およびモモ肉重量は、トウモロコシ飼料を摂取した鶏に比べて有意に増加した ($p < 0.05$)。また、これらの重量はカルニチン添加した 2 つの試験区においても有意に増加した ($p < 0.05$)。肝臓重量に関しては、飼料用米給与およびカルニチン添加のどちらの影響も受けなかった。腹腔内脂肪は飼料用米給与によって有意に増加する結果が得られた ($p < 0.05$)。

窒素蓄積

窒素出納試験の結果は表 2-4-5 に示した。窒素蓄積量 (g/3d) は飼料の違いおよびカルニチン添加の両方で有意差は確認されなかったが、窒素蓄積率 (%) は、カルニチン添加によって改善される傾向が観察された ($p < 0.10$)。

タンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現

mRNA 発現量分析の結果を表 2-4-6 に示した。肝臓 IGF-I 発現は、飼料用米給与によって有意に増加する結果が得られた ($p < 0.05$)。骨格筋 Atrogin-1/MAFbx および肝臓 CPT-I は、飼料の違いやカルニチン添加の影響を受けなかった。

4. 考察

飼料用米給与によって増体量が有意に増加した ($p < 0.05$)。これは 1-3 節で述べた結果と一致している。また、飼料摂取量および飼料効率についても飼料用米給与によって有意に改善される結果が得られた ($p < 0.05$)。この結果も 1-3 節で述べた結果と一致している。これらの結果から飼料用米給与によって飼養成績が改善されることが再確認された。筋肉組織重量も飼料用米区の鶏で有意に増加した ($p < 0.05$)。タンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現変化については、骨格筋 Atrogin-1 は変化が観察されなかったが、肝臓 IGF-I は飼料用米給与によって有意に高いレベルを示す結果が得られた ($p < 0.05$)。IGF-I はインスリンと配列が高度に類似したポリペプチドであり、同化作用を持つことが広く知られている。IGF-I は PI3K/Akt シグナル伝達を促進することで筋肉分解を抑制する (Sandri et al., 2004, Stitt et al., 2004)。このシグナル伝達が刺激されることで、下方標的である FOXO1 がリン酸化され、それに伴って FOXO1 の核内移行が抑制され、Atrogin-1 や MuRF といったタンパク質分解関連遺伝子の発現レベルが低下する (Sandri et al., 2004, Stitt et al., 2004)。鶏の研究では、in vivo (Tomas et al.,

1998) および in vitro (Duclos et al., 1993) で IGF-I がタンパク質分解を抑制することが報告されている。つまり、飼料用米給与によって IGF-I の mRNA 発現が上昇したことは、この IGF-I/PI3K/Akt 経路が促進されていることを示している。Nakashima ら (2017) は鶏骨格筋培養細胞において、IGF-I が Atrogin-1/MAFbx の mRNA レベルを減少させることを報告している。また彼らの報告の中では、IGF-I によって Akt および FOXO1 のリン酸化タンパク質が増加することも述べられている。そのため、本研究で Atrogin-1 に変化は見られないものの、飼料用米給与によって IGF-I の mRNA 発現レベルが上昇したことは、飼料用米摂取によってタンパク質代謝のバランスが同化に傾いていた可能性が考えられる。本研究および 1-3 節の結果から飼料用米がタンパク質代謝に影響を及ぼし、飼養成績を改善させることが示唆された。しかし、タンパク質関連代謝遺伝子の発現変化については一定の結果が得られていないのが現状である。そのため、玄米給与による IGF-I、Atrogin-1/MAFbx、MuRF の mRNA 発現変化に加えて、IGF-I/PI3K/Akt 経路の変化を検証する必要がある、Akt および FOXO1 のリン酸化タンパク質の分析を行うことが求められる。

本研究では L-カルニチンを 100 ppm 飼料中に添加することによって飼養成績が有意に改善された。増体量、飼料摂取量はカルニチン添加によって有意に増加し ($p < 0.05$)、この効果はトウモロコシ飼料だけでなく、飼料用米飼料においても確認された。同じように飼料効率についてもカルニチン添加で有意に値が改善され ($p < 0.05$)、米飼料中への添加においてもその効果が観察された。米飼料中へのカルニチン添加実験はこれまで行われておらず、初めて

の知見となった。ムネ肉、モモ肉に関してもカルニチン添加によって重量が有意に増加する結果が得られた ($p < 0.05$)。腹腔内脂肪はカルニチン添加によって増加する傾向が観察された ($p < 0.10$)。L-カルニチンの脂肪燃焼作用とは矛盾する結果となったが、飼料摂取量の増加によってエネルギー摂取量が増加したことに起因する可能性がある。カルニチン添加による飼養成績への影響については一定の結果が得られていないのが現状だが、飼養成績が改善されるという本研究の結果は Rabie ら (1997、1998)、Kita ら (2002) の報告と一致している。また窒素蓄積率 (%) はカルニチン添加によって改善される傾向が観察され、これについてもカルニチンがタンパク質代謝に関連している可能性を支持する結果となった。しかし、筋肉タンパク質分解系の mRNA 発現はカルニチン添加の影響を受けなかった。J. Keller ら (2012) は豚飼料中へのカルニチン添加によって肝臓および筋肉におけるユビキチン-プロテアソーム系が下方制御されることを報告している。また、カルニチンの添加によってラット骨格筋中の IGF-I/PI3K/Akt シグナル伝達が活性化され、ユビキチン E3 リガーゼである MuRF の発現が減少することが報告されている (J. Keller et al., 2013)。採卵鶏の実験では、適正なタンパク質レベル飼料へのカルニチン添加によって血中 IGF-I 濃度が上昇することが報告されている (Kita et al., 2002)。ブロイラーへのカルニチン添加による Atrogin-1/MAFbx や MuRF、IGF-I の mRNA 発現変化に関する研究報告は少ないのが現状である。前述の Kita らの報告で血中 IGF-I レベルが上昇したのは、採卵鶏で適正タンパク質レベルで行われた研究で、カルニチン添加量が 200、500、1000 ppm と本研究の 100 ppm よりも多いものだった。本研究はブロイラ

ーを用いて適正なレベルとして CP を 23.4% の設定して実施した。しかし、近年のブロイラーの能力向上は著しく、鶏が求めるタンパク質レベルはさらに高い値となっている可能性がある。そのため、極端にタンパク質レベルを引き上げた高タンパク質飼料への L-カルニチン添加実験、または高容量での L-カルニチンの添加量での実験を行い、再度飼養成績や IGF-I や Atrogin-1 等のタンパク質代謝関連遺伝子の mRNA レベルを分析する必要がある。

結論として、ブロイラーへの飼料用米給与は肝臓 IGF-I の mRNA 発現を上昇させ、飼養成績を改善させることが示唆された。また、カルニチン添加はトウモロコシ、飼料用米飼料のどちらでも飼養成績を改善させることが示されたが、タンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現には影響を及ぼさなかった。

表2-4-1 : 試験飼料の配合割合および栄養成分 (%)

	対照区	飼料用米区
トウモロコシ	50.00	-
玄米 (雪ん子舞)	-	50.00
大豆粕	35.00	35.00
コーングルテンミール	5.00	5.00
植物性油脂	5.00	5.00
第2リン酸カルシウム	2.20	2.20
炭酸カルシウム	1.40	1.40
食塩	0.40	0.40
リジン塩酸塩	0.20	0.20
DL-メチオニン	0.40	0.40
トレオニン	0.10	0.10
塩化コリン	0.10	0.10
プレミックス ¹⁾	0.20	0.20
合計	100	100
栄養組成 (計算値)		
ME (Mcal)	3.14	3.14
CP	23.4	23.4
Lys	1.37	1.37
Thr	0.97	0.95
Met + Cys	1.14	1.17
Arg	1.42	1.52

¹⁾ 飼料中1kg当たりの供給量: マンガン 100mg、亜鉛 100mg、鉄 40mg、銅 15mg、ヨウ素 1mg、ビタミンA 1300IU、ビタミンD₃ 5000IU、ビタミンE 80IU、ビタミンK 4mg、チアミン 4mg、リボフラビン 9mg、ビタミンB₆ 4mg、ビタミンB₁₂ 0.02mg、パントテン酸 15mg、ニコチン酸 15mg、ニコチン酸 60mg、葉酸2mg、ビオチン0.15mg

表2-4-2: タンパク質代謝関連遺伝子および、GAPDHのプライマー配列

遺伝子名	プライマー配列	PCR産物 (bp)
IGF-I	5'- GCT GCC GGC CCA GAA - 3'	56
	5'- ACG AAC TGA AGA GCA TCA ACC A - 3'	
Atrogin-1	5'- CCA ACA ACC CAG AGA CCT GT - 3'	174
	5'- GGA GCT TCA CAC GAA CAT GA - 3'	
GAPDH	5'- CCT CTC TGG CAA AGT CCA AG - 3'	200
	5'- CAT CTG CCC ATT TGA TGT TG - 3'	

上段はForward primer、下段はReverse primerを示す

表2-4-3.: 飼料用米飼料へのカルニチン添加が飼養成績に及ぼす影響

	対照区		飼料用米区		<i>p</i> 値		
	Car-	Car+	Car-	Car+	飼料	カルニチン	相互作用
増体量 (g)							
0-1週	412.2	457.2	445.2	486.0	0.052	< 0.05	0.894
1-2週	588.5	675.4	698.6	724.3	< 0.05	< 0.05	0.077
0-2週	1000.7	1132.6	1143.8	1210.3	< 0.05	< 0.05	0.220
飼料摂取量 (g)							
0-1週	476.6	524.9	504.7	535.9	0.154	< 0.05	0.528
1-2週	762.9	858.1	874.0	867.6	< 0.05	< 0.05	< 0.05
0-2週	1239.5	1383.8	1378.8	1403.5	< 0.05	< 0.05	< 0.05
飼料効率 (gain/feed)							
0-1週	0.863	0.871	0.880	0.906	< 0.05	0.165	0.451
1-2週	0.771	0.788	0.799	0.835	< 0.05	< 0.05	0.422
0-2週	0.807	0.819	0.829	0.863	< 0.05	< 0.05	0.268
平均値, n=9							

表2-4-4：飼料用米飼料へのカルニチン添加が組織重量に及ぼす影響

	対照区		飼料用米区		p 値		
	Car-	Car+	Car-	Car+	飼料	カルニチン	交互作用
ムネ肉 (g)	73.3	81.6	78.8	87.1	< 0.05	< 0.05	0.997
モモ肉 (g)	105.1	117.2	114.9	122.2	< 0.05	< 0.05	0.377
腹腔内脂肪 (g)	7.2	7.8	9.4	10.1	< 0.05	< 0.10	0.943
肝臓重量 (g)	31.9	33.8	34.2	34.9	0.201	0.365	0.299

平均値, n=9

表2-4-5：飼料用米飼料へのカルニチン添加が窒素出納に及ぼす影響

	対照区		飼料用米区		p 値		
	Car-	Car+	Car-	Car+	飼料	カルニチン	交互作用
窒素蓄積量 (g/3d)	11.2	12.8	12.2	12.8	0.591	0.226	0.464
窒素蓄積率 (%)	72.0	72.5	69.5	73.9	0.711	< 0.10	0.169

平均値, n=9

表2-4-6：飼料用米飼料へのカルニチン添加がタンパク質代謝関連遺伝子に及ぼす影響

	対照区		飼料用米区		<i>p</i> 値		
	Car-	Car+	Car-	Car+	飼料	カルニチン	交互作用
IGF-I	1.00 ^b	1.03 ^{ab}	1.28 ^a	1.09 ^{ab}	< 0.05	0.281	0.146
Atrogin-1	1.00	1.05	1.39	1.18	0.272	0.729	0.571

平均値, n=9, 異符号間で $p < 0.01$

第 5 節

高タンパク質飼料へのカルニチン添加が飼養成績に及ぼす影響

要約

本研究は高タンパク質飼料への L-カルニチン添加が前期ブロイラーのタンパク質代謝に及ぼす影響を評価するために行った。鶏の求める CP レベルを十分に満たすため Aviagen 社の要求量 (2014) を大きく超える 28.0%の CP を含む飼料を基礎飼料とし、カルニチン添加区には基礎飼料に 100 ppm の L-カルニチンを添加して給与した。0-1 週目のカルニチン添加区で飼料摂取量が減少する傾向が観察されたが、増体量、飼料効率には有意な差は検出されなかった。窒素蓄積量 (g/5d) はカルニチン添加によって増加する傾向を示した ($p < 0.10$)。肝臓重量はカルニチン添加によって減少する傾向を示した ($p < 0.10$)。さらに肝臓 IGF-I の mRNA レベルがカルニチン添加によって増加する傾向が観察された ($p < 0.10$)。これらの結果から、カルニチン添加は要求量を超える CP レベル飼料に添加しても飼養成績改善効果が十分に発揮されない可能性が示唆された。しかし、L-カルニチン添加によって IGF-I の mRNA レベルおよび窒素蓄積量 (g/5d) が増加傾向を示していることから、タンパク質代謝が促進されている可能性が考えられる。結論として、高タンパク質飼料への L-カルニチン添加は飼養成績に影響を及ぼさないが、タンパク質代謝に作用している可能性が再確認された。

1. 緒言

4 節で L-カルニチン添加によってトウモロコシ、飼料用米問わず飼養成績が改善されることが示唆された。これはら Rabie ら (1997) や Kita ら (2002) の報告と一致しており、カルニチンが家畜の成長を促進する因子であることは明らかである。しかし、4 節で述べた通り、L-カルニチン添加を行っても飼養成績に影響を及ぼさないという報告も少なくなく、一定の結果が得られていないのも事実である (Kidd et al., 2009; Buyse et al., 2007)。カルニチン添加が IGF-I/PI3K/Akt シグナル伝達の活性化やユビキチンリガーゼの発現量減少に作用することが報告されており (J. Keller et al., 2013; Kita et al., 2002)、脂質代謝だけでなくタンパク質代謝に影響を及ぼすことは間違いないと考えられる。そのため、L-カルニチンによる飼養成績への影響が、どのような要因によって変化するのかを解明する必要がある。カルニチン添加実験では様々なエネルギーレベル、CP レベルでその効果を比較する研究が行われている (T-F. Lien and Y-M. Horng, 2001; Z. R. Xu et al., 2003)。我々は現在のブロイラーの成長能力向上や L-カルニチンの材料 (メチオニンおよびリジン) から、飼料中の CP レベルが L-カルニチンの効果に関係しているのではないかと仮定した。Kita ら (2002) の報告では、低タンパク質 (5%)、適正タンパク質 (20%)、過剰タンパク質 (40%) の飼料に L-カルニチンを添加して雄採卵鶏を用いた実験を行っている。様々な研究者がカルニチンの研究を行なっているが、飼料中の CP レベルでその効果を比較することは、年々育種改良されるブロイラーの成長能力によって CP 要求量が変わってくる可能性が高いため非常に難しい。しかし、カルニチンと CP レベル

との関係を明確にすることができれば効率的な鶏肉生産に活用できると考えられる。

前述の通り、L-カルニチンはブロイラー飼料で制限アミノ酸となりやすいメチオニンおよびリジンから生合成されるため (Cox and Hoppel, 1973a; 1973b)、十分量のカルニチンが生合成されるにはメチオニンおよびリジン量が重要となる可能性が高い。逆に考えるとメチオニンおよびリジンが要求量を超えて供給されるような飼料への L-カルニチン添加は効果を十分に発揮できない可能性がある。そのため、本研究では過剰なレベルではないものの、ブロイラーの要求する CP レベルを十分に満たすと考えられる CP 28.0%の基礎飼料を用いて実験を行なった。これによって L-カルニチンの飼養成績への影響について、CP レベルというアプローチからメカニズムを解明する糸口になるかも知れない。

本研究は、CP レベルと L-カルニチンの関係性を評価することを目的とした。そのため、高タンパク質飼料へのカルニチン添加による飼養成績、組織重量、窒素出納およびタンパク質代謝関連遺伝子および脂肪酸合成関連遺伝子の mRNA 発現量変化について分析を行なった。

2. 材料および方法

(1) 供試動物

本試験には、ブロイラー初生雛 (チャンキー種、雄) 20 羽を用いた。市販のブロイラー前期飼料および水を自由摂取させ、10 日齢まで育成した。10 日齢時に体重測定を行い、各試験区の平均体重がほぼ等しくなるように選抜して 10 羽ずつに分けて試験を行った。

(2) 試験飼料

表 2-5-1 に試験飼料の配合割合を示した。基礎飼料は CP レベルを約 28.0%にまで引き上げたトウモロコシ-大豆粕主体飼料を用いた。飼料は各栄養素が ROSS 308 (2014) の推奨値を上回るように設計した。対照区には基礎飼料を給与し、カルニチン区ではこの基礎飼料に L-カルニチン (Carnipure, Lonza) を 100 ppm 添加して給与した。

(3) 試験方法

試験 1 日目に全てのブロイラーの体重測定を行い、各試験区の平均体重がほぼ等しくなるように各試験区 10 羽ずつ割り当てた。試験期間中、ブロイラーは単飼ケージ内 (ワイヤーメッシュ底) で飼育し、不断給餌、自由飲水とした。試験期間は 2 週間として、1 週間ごとに体重および飼料摂取量を測定した。窒素出納試験を行うため、5 日間 (9-13 日目) 全糞尿を採取し、さらに糞尿採取期間中の飼料摂取量を測定した。採取した糞尿は 1 羽分ごとにポリ袋に入れ、分析に供するまで -30°C で凍結保存した。通常の食鶏処理と同様にブロイラーの頸部を屠殺用のハサミで切断し放血を行い、全 20 羽の屠殺を行った。開腹後、右部分のムネ肉 (浅胸筋)、肝臓、腹腔内脂肪、右モモ肉 (大腿二頭筋) を丁寧に切り取り、それぞれの重量を測定し記録した。ムネ肉および肝臓はその後の分析に用いるため、液体窒素で凍結し、mRNA 量分析まで -80°C で保存した。

本試験の測定項目は、飼養成績 (増体量、飼料摂取量、飼料効率)、ムネ肉重量、モモ肉重

量、肝臓重量、窒素蓄積率、窒素蓄積量、ムネ肉（浅胸筋）中のタンパク質分解関連遺伝子および肝臓におけるタンパク質合成関連遺伝子の mRNA 発現量とした。

(4) 窒素出納

①風乾飼料の作成

冷凍保存した 9-13 日目の全糞尿を常温で解凍し、1 羽分ずつバット上に平たく広げ、これを 60°C に設定した乾燥機内で 24 時間乾燥させた。乾燥機から取り出したあと、異物が混入しないようにビニールをかけ、24 時間室温に放置して風乾状態にした。その後、重量を測定し、粉砕機で粉砕したものを分析に供した。分析まではプラスチック瓶で常温保存し、各成分の分析に供した。飼料についても同様に粉砕機で粉砕し、分析まで冷蔵保存した。

②窒素蓄積量

窒素蓄積量を算出するために糞尿および試験飼料の窒素含量を測定した。測定には NC コーダー（SUMIKA 製 NC-90）を用いた。風乾試料を専用の石英セルに 25-30 mg 計り取り、NC コーダーにセットして試料の窒素含量を測定した。窒素含量を用いて算出した窒素摂取量および窒素排泄量から窒素蓄積率を算出した。算出する際の式を以下に示す。

窒素摂取量 (g/5d) = 飼料 1g 当たりの窒素含量 (g) × 期間中飼料摂取量 (g)

窒素排泄量 (g/5d) = 糞尿 1g 当たりの窒素含量 (g) × 期間中糞尿排泄量 (g)

窒素蓄積量 (g/5d) = 窒素摂取量 (g/5d) - 窒素排泄量 (g/5d)

③窒素蓄積率

②で求めた窒素蓄積量を用いて窒素蓄積率を算出した。算出する際の式を以下に示す。

窒素蓄積率 (%) = 窒素蓄積量 (g/5d) ÷ 窒素摂取量 (g/5d) × 100

(5) タンパク質代謝関連遺伝子の発現量分析

①mRNA 抽出

トータル RNA をムネ肉および肝臓から専用のキットである TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies) を用いて抽出した。ムネ肉または肝臓サンプルを氷上で粉砕したあと、50 - 100mg をファルコンチューブに測り取り、TRIzol 試薬 1.5 mL を用いてホモジナイズする。ホモジナイズしてできた溶液を 2.0 mL エッペンチューブに移す。このとき筋肉サンプルは、遠心分離 (2 - 8°C、10 分、12,000 × G) してから、上清を新しい 2.0 mL エッペンチューブに移す。クロロホルム 0.3 mL を加え、ピンク色に変わるまで激しく攪拌する。その後、実験台

上で2-3分間インキュベートした後、遠心分離（2-8°C、15分、12,000×G）する。2層に分離した上清（水層）を新しいエッペンチューブに移す。そこにイソプロパノールを0.75 mL添加し、実験台上で10分間インキュベートする。遠心分離（2-8°C、10分、12,000×G）すると、沈殿物としてRNAが確認できる。イソプロパノールを捨て、75%エタノールで洗浄する。再度75%エタノールを1.0 mL添加し、ボルテックス処理を行う。その後遠心分離（2-8°C、5分、7,500×G）し、デカンテーションののち5-10分間風乾する。沈殿物にRNase-free水を添加して55°Cで10分間インキュベートする。

②逆転写反応

リアルタイムPCR用の逆転写反応キット（東洋紡株式会社製 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover）を用いてサンプルの逆転写を行った。

(i) RNA溶液の濃度測定

分光光度計（Thermo Fisher Scientific 製 NANODROP LITE）を用いて260 nmでRNA溶液の吸光度を測定し、RNAの濃度を求めた。また、260 nm/280 nmをRNAの純度とし、この値が1.6-2.0程度のサンプルをその後の分析に使用した。

(ii) RNA の変性

逆転写効率を向上させるため、RNA の変性を行った。RNA 溶液をインキュベーター (TAITEC 製 e-ThermoBucket ETB) を用いて 65°C で 5 分間インキュベートした後、氷上で急冷した。

(iii) ゲノム DNA 除去反応

(i) で求めた濃度を参考に、100 ng の RNA を含むように RNA 溶液を量り取り、それに 4 μL の 4 \times DN Master Mix および Nuclease-free 水を加えて総量を 8 μL とし、よく攪拌した後にインキュベーター (TAITEC 製 e-ThermoBucket ETB) を用いて 37°C で 5 分間インキュベートした。

(iv) 逆転写反応

ゲノム DNA を除去した RNA サンプル 8 μL に対して 2 μL の 5 \times RT Master Mix を加えてよく混合し、Mini Opticon real-time PCR System (Bio-Rad Laboratories 製) にセットした。37°C で 15 分間インキュベートし、サンプルを逆転写反応させた後、50°C で 5 分間のインキュベートを行い、高温反応性に優れた酵素である ReverTra Ace の逆転写効率を向上させた。最後に 98°C で 5 分間のインキュベートを行い、逆転写酵素を失活させた。

③発現量測定

インターカレーション法によるリアルタイム PCR キット (Bio-Rad Laboratories 製 SsoFast EvaGreen Supermix) を用いて RNA 発現量の測定を行った。

(i) プライマー

乾燥状態のプライマー (eurofins Genomics 製) に対し、それぞれのモル収量を参考に RNase-free 水を加え、100 μM のプライマー溶液を調製した。これを更に 10 倍希釈し 10 μM としたものをその後の分析に使用した。測定したタンパク質代謝関連遺伝子 (IGF-I、mTOR、Atrogin-1、Proteasome C2 Subunit、FAS)、および内部標準として使用する GAPDH のプライマー配列は表 2-5-2 に示した。

(ii) リアルタイム PCR

逆転写反応で得られた cDNA サンプル 1 μL に対して、Sso Fast EvaGreen super mix を 10 μL 、発現量を測定する遺伝子に特異的な Forward Primer および Reverse Primer をそれぞれ 1 μL 、RNase-Free 水を 7 μL 加え、総量 20 μL の反応試薬を調製した。反応試薬をよく混合した後、Mini Opticon real-time PCR System (Bio-Rad Laboratories 製) を用い、95°C で 30 秒間インキュベートし、試薬中の酵素を活性化させた。その後、95°C で 3 秒間インキュベートし cDNA を熱変性により一本鎖 DNA にし、次に 60°C で 30 秒間インキュベートし、プライマーの標的

cDNA へのアニーリングおよび伸長反応を行い、これを 1 サイクルとして 39 サイクルの反応を行った。1 サイクル毎に DNA 合成量に依存する蛍光強度を測定し、増幅曲線から標的とする遺伝子の発現量を求めた。反応後、65°C から 95°C まで 0.5°C 毎に 5 秒間インキュベートし、各温度における蛍光強度を測定することで融解曲線を求め、遺伝子配列に固有の値である融解温度を求め、増副産物が標的遺伝子のみであることを確認した。発現量の測定・比較には解析用ソフトウェアである BIO-RAD CFX-Manager (Bio-Rad Laboratories 製) を用いた。GAPDH を内部標準とし、相対的定量法 ($\Delta\Delta Ct$ 法) により各遺伝子の相対的発現量を算出した。

(6) 統計処理

得られた全てのデータは、t 検定による平均値の比較によって統計処理を行った。

3. 結果

飼養成績

飼養成績の結果を表 2-5-3 に示した。高タンパク質飼料へのカルニチン添加は増体量および飼料効率に影響を及ぼさなかったが、0-1 週の摂取量が L-カルニチン添加によって減少する傾向が観察された ($p < 0.10$)。

組織重量

組織重量の結果は表 2-5-4 に示した。筋肉重量において対照区とカルニチン区の間には有意な差は観察されなかった。体重 1 kg あたりの肝臓重量はカルニチン添加によって減少する傾向が検出された ($p < 0.10$)。

窒素蓄積

窒素出納試験の結果は表 2-5-5 に示した。高タンパク質飼料へのカルニチン添加によって、窒素蓄積量 (g/5d) が増加する傾向を示した ($p < 0.10$)。窒素蓄積率 (%) には影響を及ぼさなかった。

mRNA 遺伝子発現

mRNA 発現量分析の結果を表 2-5-6 に示した。肝臓 IGF-I の mRNA 発現は、カルニチン添加によって増加する傾向が観察された ($p < 0.10$)。骨格筋 Atrogin-1、Proteasome C2 subunit および mTOR は L-カルニチン添加の影響を受けなかった。また、肝臓における脂肪酸合成酵素 (FAS) の mRNA についても変化は観察されなかった。

4. 考察

本研究では、高タンパク質飼料に L-カルニチンを添加することで、タンパク質が充足された場合のカルニチンの影響について検討した。結果として高タンパク質飼料へのカルニチン添加は飼養成績に影響を及ぼさないことが確認された。0 - 1 週の飼料摂取量のみカルニチン添加によって減少する傾向が見られた。また、筋肉重量は、ムネ肉、モモ肉両方でカルニチン添加による効果は観察されなかった。4 節でタンパク質を 23.0%に設定した飼料へのカルニチン添加で飼養成績は有意に改善されたものの、骨格筋 IGF-I や Atrogin-1 といったタンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現にはカルニチンの影響が確認されなかった。Kita ら (2002) の研究において雄の採卵鶏に 20.0%タンパク質飼料 (適正レベル) を給与し、その飼料にカルニチンを添加したところ、血中 IGF-I 濃度が有意に上昇し、飼養成績も改善された。ここで彼らは適切なタンパク質レベル飼料へのカルニチン添加によって血中 IGF-I 濃度が上昇することを示した。このことから 5 節における我々の研究では、設定した CP 23.0%は栄養要求の高まっている現代のブロイラーにおいて、その要求量を十分に満たしていないのではないかという仮説を立てた。そして飼料中の CP を 28.0%に設定し、CP を確実に充足状態にすることでカルニチン添加による飼養成績や骨格筋 IGF-I 発現への影響が変化するかを検討した。

カルニチン添加は飼養成績に影響を及ぼさないという本研究の結果は、Lien ら (2001) の報告と一致するが、我々の先行研究とは異なる結果である。彼らの報告では、CP レベルを 23.0% (0 - 3 週)、20.2% (3 - 6 週) に設定しており、6 週間の増体量は対照区で 1,860 g であ

る。これに対して ROSS 308 の成長目標（2014）は、6 週齢で 3,000 g である。また、報告の中では 42 日間の飼料摂取量が約 3,500 g であるのに対し、ROSS 308 の目標では約 5,000 g に設定されている。そのため Lien らの研究で用いたブロイラーは成長力が現在の鶏とは異なることが推測でき、CP 23.0%でも栄養要求を満たしていたと考えられる。Barker と Sell の報告（1994）においても、カルニチン添加が飼養成績に影響を及ぼさないことが観察されている。彼らの研究では、ブロイラー（Hubbard×Hubbard）に約 24.0%（1-16 日齢）、または約 18.5%（29-45 日齢）の CP を含む飼料を給与した。45 日齢で体重が約 2,500 g であり、ROSS 308 の目標の 3,339 g に比べて低い値であることが分かる。そのため、Baker と Sell の研究でも鶏の成長速度が現在とは異なり、彼らの実験でも CP 要求量を満たしていたことが推測される。このことから、L-カルニチン添加によって飼養成績に影響を及ぼさないという研究結果は、ブロイラーの CP 要求量を満たしている場合に観察される可能性がある。本研究でも、CP レベルを 28.0%まで引き上げ、CP を充足する形で実験を行なった結果、彼らの報告と同じように L-カルニチン添加の影響は飼養成績、組織重量には観察されなかった。Xu ら（2003）の研究においても、同様に十分量の CP が基礎飼料に含まれていたことでカルニチンの効果が得られなかった可能性がある。逆に飼養成績が改善された Rabie と Szilagyi（1998）の研究では、18-53 日齢の実験において 18.0%の CP を含む飼料を給与した。結果として高い CP 量を要求する、より早い段階（18-25 日齢、25-32 日齢）でカルニチン添加による飼養成績改善が観察された。したがって、CP 量が要求量を上回っている場合には、カルニチン添加による飼養

成績に改善は観察されにくいことが示唆された。また、飼料の CP レベルが要求量を満たさない場合に、カルニチン添加によって飼養成績改善効果が観察されやすいことが示唆された。つまり、L-カルニチンによる飼養成績改善効果を望むためには、CP がやや不足していることが必要と考えられる。また、メチオニンおよびリジンがカルニチン生合成の材料であることを考慮すると、それらアミノ酸が不足している飼料にカルニチンを添加することでその効果が発揮されるとも考えられる。

表 2-5-5 に示した通り、カルニチン添加は窒素蓄積量 (g/5d) を増加させる傾向が観察された ($p < 0.10$)。飼養成績は改善されなかったが窒素蓄積量が増加したことは、高タンパク質飼料への L-カルニチン添加がタンパク質代謝に何らかの影響を与えている可能性を示唆している。Kinam ら (2000) は、カルニチン添加によって生物価が有意に改善されることを報告しており、これは本研究結果でカルニチン添加によって窒素蓄積量 (g/5d) が改善されたことを支持するものである。さらに、タンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現分析において、高タンパク質飼料への L-カルニチン添加によって肝臓中の IGF-I 発現が増加する傾向を示した ($p < 0.10$)。この結果についても Kita ら (2002) の研究において、採卵鶏への L-カルニチン添加が血中 IGF-I 濃度を増加させたという報告と一致している。また、ラットの研究で L-カルニチンを給与することで IGF-I の mRNA 発現および血中 IGF-I 濃度が上昇することが報告されている (Keller et al., 2013)。IGF-I は動物の成長を促進し、同化的に作用することが広く知られている。IGF-I はタンパク質合成を促進するとともに、Akt/FOXO シグナル経路を刺激し、

筋萎縮を抑制する (Rommel et al., 2001)。この経路で IGF-I は、PI3K を活性化することで、Akt/FOXO1 のリン酸化を促進する。それによって FOXO1 の核内移行が妨げられ、Atrogin-1/MAFbx や MuRF の発現が抑制されることが報告されている (Sandri et al., 2004; Stitt et al., 2004)。そのため、本研究で IGF-I の mRNA 発現量が増加傾向を示したことから、カルニチンによってタンパク質分解経路が抑制されている可能性がある。一方でカルニチン添加による骨格筋中 Atrogin-1 や Proteasome C2 subunit への影響は観察されなかった。また IGF-I の下流標的で、タンパク質合成に関わる因子である mTOR についても mRNA レベルを分析したが、カルニチン添加による変化は観察されなかった。適正レベルまたは CP 不足 (またはメチオニンおよびリジン不足) の飼料にカルニチン添加を行い、飼養成績が改善された場合には、上記因子の mRNA 発現量変化が顕在化する可能性もある。また、リン酸化による mTOR や Akt/FOXO1 の活性化の可能性が考えられ、今後は前述の条件でウェスタンブロッティングによるリン酸化タンパク質の定量分析の必要がある。

結論として、ブロイラーの CP 要求量を確実に上回るように設計した高タンパク質飼料に L-カルニチンを添加しても、飼養成績は改善されないことが示唆された。しかし、L-カルニチンによって窒素蓄積量 (g/5d) や肝臓 IGF-I の mRNA レベルは改善される傾向が示されており、タンパク質代謝に影響を及ぼしていることが再確認された。さらに、4 節の結果と合わせると L-カルニチンの効果は基礎飼料の CP レベル (アミノ酸) の影響を受けることが示唆された。

表4-5-1:試験飼料の配合割合および栄養成分(%)

	基礎飼料
トウモロコシ	43.00
大豆粕	40.00
コーングルテンミール	7.00
植物性油脂	5.00
第2リン酸カルシウム	2.20
炭酸カルシウム	1.40
食塩	0.40
リジン塩酸塩	0.20
DL-メチオニン	0.40
L-トレオニン	0.10
塩化コリン	0.10
プレミックス ¹⁾	0.20
合計	100
栄養組成	
ME (Mcal)	3.10
CP (分析値)	27.9
Lys	1.6
Thr	1.2
Met + Cys	1.3
Arg	1.7

¹⁾ 飼料中1kg当たりの供給量:マンガン 100mg、亜鉛 100mg、鉄 40mg、銅 15mg、ヨウ素 1mg、ビタミンA 1300IU、ビタミンD₃ 5000IU、ビタミンE 80IU、ビタミンK 4mg、チアミン 4mg、リボフラビン 9mg、ビタミンB₆ 4mg、ビタミンB₁₂ 0.02mg、パントテン酸 15mg、ニコチン酸 15mg、ニコチン酸 60mg、葉酸2mg、ビオチン0.15mg

表2-5-2：タンパク質代謝および脂質代謝関連遺伝子、GAPDHのプライマー配列

遺伝子名	プライマー配列	PCR産物(bp)
Atrogin-1	5'- CCA ACA ACC CAG AGA CCT GT - 3'	174
	5'- GGA GCT TCA CAC GAA CAT GA - 3'	
IGF-I	5'- GCT GCC GGC CCA GAA - 3'	56
	5'- ACG AAC TGA AGA GCA TCA ACC A - 3'	
mTOR	5'- GGT GAT GAC CTT GCC AAA CT - 3'	220
	5'- CTC TTG TCA TCG CAA CCT CA - 3'	
FAS	5'- CTA TCG ACA CAG CAT GCT CCT - 3'	107
	5'- CAG AAT GTT GAC CCC TCC TAC C - 3'	
GAPDH	5'- CCT CTC TGG CAA AGT CCA AG - 3'	200
	5'- CAT CTG CCC ATT TGA TGT TG - 3'	

上段はForward primer、下段はReverse primerを示す

表2-5-3. 高タンパク質飼料へのカルニチン添加が飼養成績に及ぼす影響

	対照区	カルニチン区	p 値
初期体重 (g)	290	290	
増体量 (g/週)			
0-1週	473 ± 17	450 ± 10	0.247
1-2週	646 ± 45	680 ± 16	0.491
0-2週	1120 ± 51	1130 ± 19	0.852
飼料摂取量 (g/週)			
0-1週	509 ± 10	484 ± 11	< 0.10
1-2週	756 ± 33	794 ± 27	0.387
0-2週	1265 ± 35	1277 ± 32	0.791
飼料効率 (gain/feed)			
0-1週	0.928 ± 0.02	0.933 ± 0.02	0.866
1-2週	0.846 ± 0.03	0.860 ± 0.02	0.678
0-2週	0.882 ± 0.02	0.887 ± 0.01	0.818
平均値 ± SE, n=10			

表2-5-4: 高タンパク質飼料へのカルニチン添加が組織重量に及ぼす影響

	対照区	カルニチン区	p 値
胸肉 (g)	81.6 ± 3.6	83.6 ± 2.0	0.630
モモ肉 (g)	118.4 ± 2.0	122.2 ± 0.7	0.501
肝臓 (g)	34.2 ± 4.5	31.2 ± 3.2	0.182
肝臓 (g/kg BW)	24.1 ± 1.0	22.0 ± 0.3	< 0.10
平均値 ± SE, n=10			

表2-5-5：高タンパク質飼料へのカルニチン添加が窒素出納に及ぼす影響

	対照区	カルニチン区	<i>p</i> 値
窒素蓄積量 (g/5d)	17.4 ± 1.2	18.7 ± 0.8	<0.10
窒素蓄積率 (%)	69.1 ± 1.5	70.5 ± 1.3	0.147

平均値 ± SE, n=10

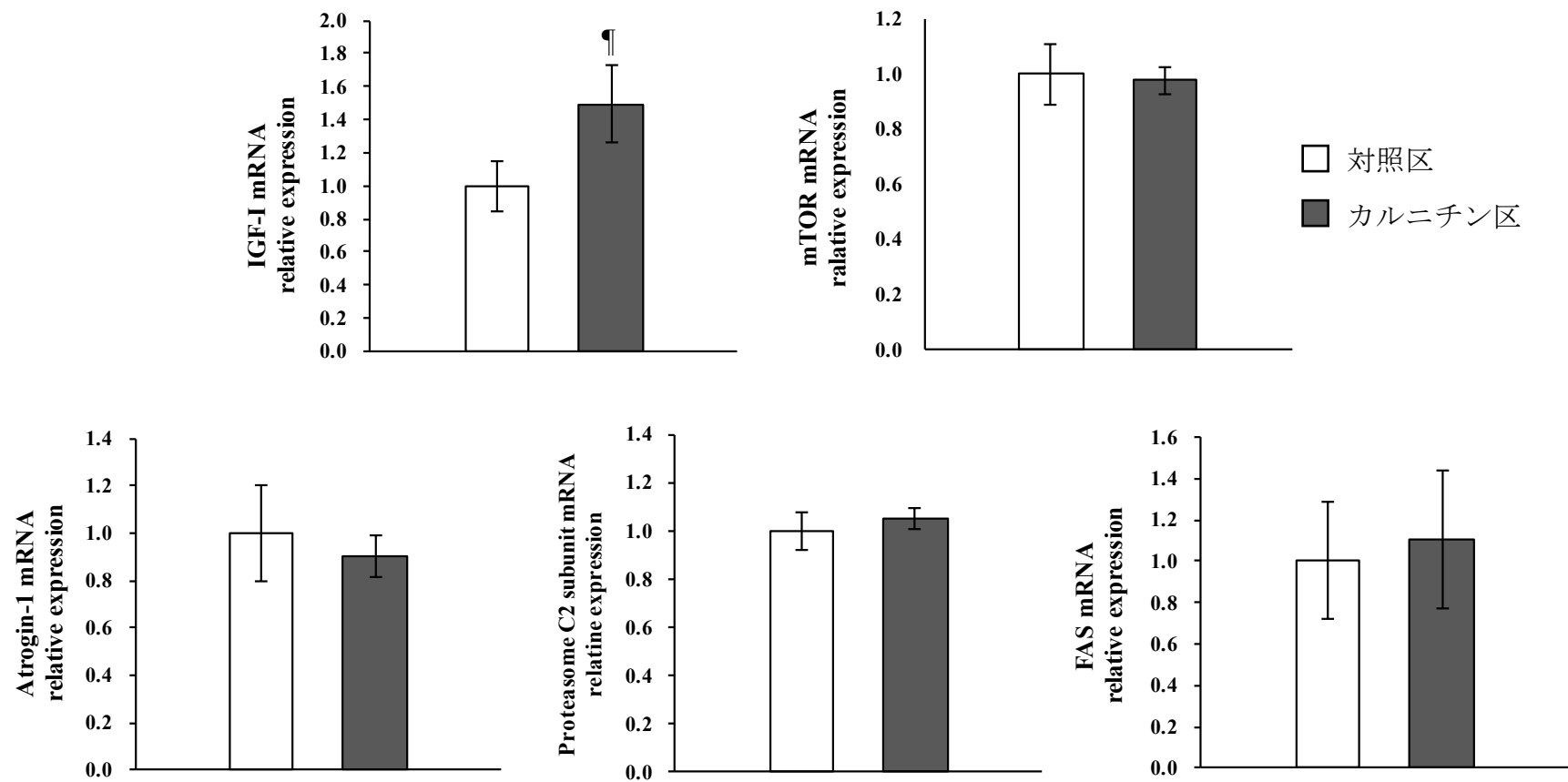


図 2-5-1. 高タンパク質飼料へのカルニチン添加がタンパク質代謝関連遺伝子、FAS の mRNA 発現に及ぼす影響
 平均値 ± SE, n=10, 対照区に対して ¶: 傾向あり ($p < 0.10$)

第3章

前期ブロイラーへのベタイン給与が
飼養成績およびタンパク質代謝に及ぼす影響について

第1節

標準的な成長速度のブロイラーへのベタインおよびメチオニン給与が 飼養成績、タンパク質代謝に及ぼす影響

要約

本試験では前期ブロイラー飼料にベタインまたはメチオニンを添加して飼養成績、タンパク質代謝に及ぼす影響を評価した。10日齢のブロイラー（チャンキー種、雄）27羽を3つの試験区に分け、単飼ケージに収容して不断給餌、自由飲水として2週間の飼養試験を実施した。ベタインの効果を観察しやすくするため、供試鶏は体重の重い個体ではなく平均的な体重の鶏から選抜した。飼料はメチオニン要求量を満たしていると考えられるメチオニン含量0.689%を含む飼料を基礎飼料とし、これにベタインまたはメチオニンを0.10%添加した。0-2週目の増体量において、ベタイン区、メチオニン区ともに対照区よりも有意に高い値が得られた ($p < 0.01$)。ムネ肉およびモモ肉重量はベタイン区、メチオニン区ともに対照区と比較して有意に増加した ($p < 0.05$)。さらに、タンパク質分解関連遺伝子である Atrogin-1 の mRNA 発現量はベタイン添加によってムネ肉で低下する傾向 ($p < 0.10$)、モモ肉で有意に低下した ($p < 0.05$)。また、タンパク質合成関連遺伝子である IGF-I は、ベタイン添加によって発現が増加する傾向がみられた ($p < 0.10$)。これらの結果から、ベタインはメチオニンの代替効果だけでなく、タンパク質代謝に影響を及ぼす固有の効果を持つことが示唆された。

1. 緒言

メチオニンは、ブロイラーの成長に必要な必須アミノ酸である。一般的に使用されるトウモロコシ-大豆粕主体飼料において、結晶アミノ酸を用いない場合メチオニンは不足しやすい。飼料中の含硫アミノ酸（メチオニン+シスチン）が不足するとブロイラーの飼養成績やムネ肉重量は減少する（Conde-Aguilera et al., 2016）。そのため、トウモロコシ-大豆粕飼料への単体メチオニン添加は一般的に実施されており、これによって飼養成績が向上するほか、枝肉生産量にも効果があるとされている（Virtanen and Rosi, 1995; Neto, 2000）。メチオニンは、メチル基ドナーとしての働きを持ち、これはベタインの主効果と同じである。そのため、ベタイン固有の効果を正確に検証するためには、飼料中のメチオニン含量を充足させる必要があると考えられる。前期ブロイラーにおけるメチオニン要求量を検証した本研究の先行研究（未発表）において、飼料中メチオニン含量は0.689%で要求量を満たすことを示した。

ベタインは飼料に添加することで飼養成績や筋肉重量を改善するという報告がある（Schutte et al., 1997; Garcia et al., 2000; Hassan et al., 2005）。一方で McDevide ら（2016）や Rostagno と Pack（1996）は、ベタインは飼養成績に悪影響を及ぼすと報告しており、一定の結果が得られていない。Zhan ら（2006）は、ベタインの効果が一貫していないのは、基礎飼料中のメチオニン含量が原因だと指摘している。先行研究で決定したメチオニン含量0.689%の基礎飼料への段階的ベタイン添加（0.05、0.10、0.20%）では飼養成績、組織重量に影響を及ぼさないという結果が得られている。ベタインによって飼養成績の改善が観察された研究

は、メチオニン不足条件や暑熱下条件、コクシジウム条件下など通常の条件とは異なる場合が多い (Amer, Shima A., et al 2018; Shaojun et al., 2015; Virtane and Rumsey, 1996)。また、M. Yang ら (2022) の研究によると、成長速度の遅い中国固有のブロイラー種である Xueshan Chicken において、飼料にベタインを添加することで増体量および飼料効率が有意に改善した。したがって、鶏の状態や成長能力によってもベタインの効果が見え隠れすることが考えられる。ブロイラーの生産現場では、成長速度の早い個体よりも標準的または遅い個体をいかに大きくするかが課題となる。成長の早い個体は飼料摂取量が多いため栄養要求量を満たしやすいことに起因すると考えられる。そのため、従来の体重の重い個体からの供試鶏選抜方法を平均的な体重（標準的な成長速度）の個体からの選抜方法に変更した。これによってベタインやメチオニン添加の効果が観察しやすくなる可能性がある。

以上のことから、本試験では標準的な成長速度の前期ブロイラーへのベタイン給与による飼養成績やタンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量を分析することを目的とした。また、メチオニン給与も同時に試験することで、メチオニン代謝とは異なるベタイン固有の効果を調査した。

2. 材料および方法

(1) 供試動物

本試験には、ブロイラー初生雛（チャンキー種、雄）27羽を用いた。市販のブロイラー前期飼料および水を自由摂取させ、10日齢まで育成した。10日齢時に体重測定を行い、各試験区の平均体重がほぼ等しくなるように9羽ずつ選抜して試験を行った。従来のように体重の重い個体からの選抜方法を平均的な体重の個体から選ぶ方法に変更した。

(2) 試験飼料

表 3-1-1 に試験飼料の配合割合を示した。試験区は、先行研究で前期ブロイラーのメチオニン要求量を満たすと判断したメチオニン 0.689%を含むトウモロコシ-大豆粕主体飼料を給与する対照区、対照飼料にベタインを 0.10%添加するベタイン区、メチオニンを 0.10%添加するメチオニン区である。試験飼料は各栄養素が ROSS 308 (2014) の推奨値を満たすよう設計した。

(3) 試験方法

試験 1 日目に全てのブロイラーの体重測定を行い、各試験区の平均体重がほぼ等しくなるように 1 試験区に 9 羽ずつ割り当てた。試験期間中、ブロイラーは単飼ケージ内（ワイヤーメッシュ底）で飼育し、不断給餌、自由飲水とした。試験期間は 2 週間として、1 週間ごとに

体重および飼料摂取量を測定した。乾物重量、窒素蓄積率測定に用いるため、3日間（11日目 - 13日目）全糞尿を採取し、糞尿採取期間中の飼料摂取量を測定した。採取した糞尿は1羽分ごとにポリ袋に入れ、分析のため-30°Cで凍結保存した。試験最終日に屠殺を行った。屠殺方法は、通常の食鶏処理と同様にブロイラーの頸部を屠殺用のハサミで切断し放血を行った。同時に EDTA を含んだ採血管で血液サンプルを採取した。この血液サンプルは採取した当日に 3,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清をエッペンチューブに移して血漿サンプルとして分析まで-30°Cで凍結保存した。その後、右部分のムネ肉（浅胸筋）、肝臓、腹腔内脂肪、右モモ肉（大腿二頭筋）を切り取り、それぞれの重量を測定し記録した。ムネ肉、モモ肉、肝臓は液体窒素で凍結し、mRNA 量の分析まで-80°Cで凍結保存した。

本試験の測定項目は、飼養成績（増体量、飼料摂取量、飼料効率）、ムネ肉重量、モモ肉重量、肝臓重量、腹腔内脂肪重量、窒素蓄積率、窒素蓄積量、骨格筋中タンパク質代謝関連遺伝子および肝臓中タンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量とした。

（4）窒素出納

①風乾飼料の作成

冷凍保存した 11 - 13 日目の全糞尿を常温で解凍し、1羽分ずつバット上に平たく広げ、これを 60°Cに設定した乾燥機内で 24 時間乾燥させた。乾燥機から取り出したあと、異物が混入しないようにビニールをかけ、24 時間室温に放置して風乾状態にした。その後、重量を測

定し、粉砕機で粉砕したものを分析に供した。分析まではプラスチック瓶で常温保存し、各成分の分析に供した。飼料についても同様に粉砕機で粉砕し、分析まで冷蔵保存した。

②窒素蓄積量

窒素蓄積量を算出するために糞尿および試験飼料の窒素含量を測定した。測定には NC コーダー (SUMIKA 製 NC-90) を用いた。風乾試料を専用の石英セルに 25–30 mg 計り取り、NC コーダーにセットして試料の窒素含量を測定した。窒素含量を用いて算出した窒素摂取量および窒素排泄量から窒素蓄積率を算出した。算出する際の式を以下に示す。

$$\text{窒素摂取量 (g/3d)} = \text{飼料 1g 当たりの窒素含量 (g)} \times \text{期間中飼料摂取量 (g)}$$

$$\text{窒素排泄量 (g/3d)} = \text{糞尿 1g 当たりの窒素含量 (g)} \times \text{期間中糞尿排泄量 (g)}$$

$$\text{窒素蓄積量 (g/3d)} = \text{窒素摂取量 (g/3d)} - \text{窒素排泄量 (g/3d)}$$

③窒素蓄積率

②で求めた窒素蓄積量を用いて窒素蓄積率を算出した。算出する際の式を以下に示す。

$$\text{窒素蓄積率 (\%)} = \text{窒素蓄積量 (g/3d)} \div \text{窒素摂取量 (g/3d)} \times 100$$

(5) タンパク質代謝関連遺伝子の発現量分析

①mRNA 抽出

ムネ肉（浅胸筋）、モモ肉（大腿二頭筋）および肝臓から専用のキットである TRIzol Reagent (Invitrogen Life Technologies) を用いてトータル RNA を抽出した。モモ肉または肝臓サンプルを氷上で粉碎したあと、50 - 100mg をファルコンチューブに測り取り、TRIzol 試薬 1.5 mL を用いてホモジナイズする。ホモジナイズしてできた溶液を 2.0 mL エッペンチューブに移す。このとき筋肉サンプルは、遠心分離（2 - 8°C、10 分、12,000 × G）してから、上清を新しい 2.0 mL エッペンチューブに移す。クロロホルム 0.3 mL を加え、ピンク色に変わるまで激しく攪拌する。その後、実験台上で 2 - 3 分間インキュベートした後、遠心分離（2 - 8°C、15 分、12,000 × G）する。2 層に分離した上清（水層）を新しいエッペンチューブに移す。そこにイソプロパノールを 0.75 mL 添加し、実験台上で 10 分間インキュベートする。遠心分離（2 - 8°C、10 分、12,000 × G）すると、沈殿物として RNA が確認できる。イソプロパノールを捨て、75%エタノールで洗浄する。再度 75%エタノールを 1.0 mL 添加し、ボルテックス処理を行う。その後遠心分離（2 - 8°C、5 分、7,500 × G）し、デカンテーションののち 5 - 10 分間風乾する。沈殿物に RNase-free 水を添加して 55°C で 10 分間インキュベートする。

②逆転写反応

リアルタイム PCR 用の逆転写反応キット（東洋紡株式会社製 ReverTra Ace qPCR RT Master

Mix with gDNA Remover) を用いてサンプルの逆転写を行った。

(i) RNA 溶液の濃度測定

分光光度計 (Thermo Fisher Scientific 製 NANODROP LITE) を用いて 260 nm で RNA 溶液の吸光度を測定し、RNA の濃度を求めた。また、260 nm/280 nm を RNA の純度とし、この値が 1.6 - 2.0 程度のサンプルをその後の分析に使用した。

(ii) RNA の変性

逆転写効率を向上させるため、RNA の変性を行った。RNA 溶液をインキュベーター (TAITEC 製 e-ThermoBucket ETB) を用いて 65°C で 5 分間インキュベートした後、氷上で急冷した。

(iii) ゲノム DNA 除去反応

(i) で求めた濃度を参考に、100 ng の RNA を含むように RNA 溶液を量り取り、それに 4 μ L の 4 \times DN Master Mix および Nuclease-free 水を加えて総量を 8 μ L とし、よく攪拌した後にインキュベーター (TAITEC 製 e-ThermoBucket ETB) を用いて 37°C で 5 分間インキュベートした。

(iv) 逆転写反応

ゲノム DNA を除去した RNA サンプル 8 μL に対して 2 μL の 5 \times RT Master Mix を加えてよく混合し、Mini Opticon real-time PCR System (Bio-Rad Laboratories 製) にセットした。37°C で 15 分間インキュベートし、サンプルを逆転写反応させた後、50°C で 5 分間のインキュベートを行い、高温反応性に優れた酵素である ReverTra Ace の逆転写効率を向上させた。最後に 98°C で 5 分間のインキュベートを行い、逆転写酵素を失活させた。

③発現量測定

インターカレーション法によるリアルタイム PCR キット (Bio-Rad Laboratories 製 SsoFast EvaGreen Supermix) を用いて RNA 発現量の測定を行った。

(i) プライマー

乾燥状態のプライマー (eurofins Genomics 製) に対し、それぞれのモル収量を参考に RNase-free 水を加え、100 μM のプライマー溶液を調製した。これを更に 10 倍希釈し 10 μM としたものをその後の分析に使用した。測定したタンパク質代謝関連遺伝子 (Atrogin-I、Proteasome C2 Subunit、IGF-I)、脂質代謝関連遺伝子 (CPT-I) および内部標準として使用する GAPDH のプライマー配列は表 3-1-2 に示した。

(ii) リアルタイム PCR

逆転写反応で得られた cDNA サンプル 1 μL に対して、Sso Fast EvaGreen super mix を 10 μL 、発現量を測定する遺伝子に特異的な Forward Primer および Reverse Primer をそれぞれ 1 μL 、RNase-Free 水を 7 μL 加え、総量 20 μL の反応試薬を調製した。反応試薬をよく混合した後、Mini Opticon real-time PCR System (Bio-Rad Laboratories 製) を用い、95°C で 30 秒間インキュベートし、試薬中の酵素を活性化させた。その後、95°C で 3 秒間インキュベートし cDNA を熱変性により一本鎖 DNA にし、次に 60°C で 30 秒間インキュベートし、プライマーの標的 cDNA へのアニーリングおよび伸長反応を行い、これを 1 サイクルとして 39 サイクルの反応を行った。1 サイクル毎に DNA 合成量に依存する蛍光強度を測定し、増幅曲線から標的とする遺伝子の発現量を求めた。反応後、65°C から 95°C まで 0.5°C 毎に 5 秒間インキュベートし、各温度における蛍光強度を測定することで融解曲線を求め、遺伝子配列に固有の値である融解温度を求め、増副産物が標的遺伝子のみであることを確認した。発現量の測定・比較には解析用ソフトウェアである BIO-RAD CFX-Manager (Bio-Rad Laboratories 製) を用いた。GAPDH を内部標準とし、相対的定量法 ($\Delta\Delta\text{Ct}$ 法) により各遺伝子の相対的発現量を算出した。

(8) 統計処理

全てのデータは一元配置分散分析を実施し、Dunnet の方法による多重検定で対照区と各試験区の比較を行った。

3. 結果

飼養成績

飼養成績の結果を表 3-1-3 に示した。メチオニン含量を十分に満たした飼料にベタインを 0.10%またはメチオニンを 0.10%添加することで、増体量は全期間において対照区よりも有意に増加した ($p < 0.05$)。ベタイン区の飼料摂取量は、1 - 2、0 - 2 週で有意に増加した ($p < 0.05$)。メチオニン区の飼料摂取量は、全期間で有意に増加した ($p < 0.05$)。飼料効率は、0 - 1 週においてベタイン区、メチオニン区ともに改善する傾向がみられ ($p < 0.10$)、ベタイン区では 0 - 2 週において有意に改善した ($p < 0.05$)。

組織重量

組織重量の結果は表 3-1-4 に示した。ベタイン区、メチオニン区において、ムネ肉およびモモ肉重量が有意に増加した ($p < 0.05$)。体重当たりのムネ肉、モモ肉重量、肝臓重量および腹腔内脂肪重量には変化が認められなかった。

窒素出納

窒素出納の結果を表 3-1-5 に示した。ベタイン区、メチオニン区ともに窒素蓄積量、窒素蓄積率に有意な差は認められなかった。

血漿中遊離アミノ酸濃度

血漿中遊離アミノ酸濃度の結果は表 3-1-6 に示した。ベタイン区において、ヒスチジン、アラニンが対照区よりも有意に増加し ($p < 0.05$)、グルタミンは増加する傾向がみられた ($p < 0.10$)。また、メチオニン区において、メチオニン、ヒスチジンが有意に増加し ($p < 0.05$)、アラニンには増加する傾向がみられた ($p < 0.10$)。

タンパク質代謝関連遺伝子および脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量

タンパク質代謝関連遺伝子および脂質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量分析の結果を表 3-1-7 に示した。Atrogin-1 の発現量はベタイン添加によって、モモ肉では有意に低下し ($p < 0.05$)、ムネ肉では減少する傾向がみられた ($p < 0.10$)。Proteasome C2 Subunit の発現量はベタイン区、メチオニン区ともに有意な差は観察されなかった。肝臓における IGF-I は、ベタイン区において増加する傾向がみられた ($p < 0.10$)。また、Carnitine palmitoyl transferase-I (CPT-I) は、メチオニン区において、有意に減少する結果が得られた ($p < 0.05$)。

4. 考察

本試験では、メチオニン含量を十分に満たした飼料にベタインまたはメチオニンを 0.10% 添加した。メチオニン添加試験も同時に行うことで、ベタインによる固有の効果の検討を目

的とした。試験飼料中のメチオニン含量は、先行研究で現代の前期ブロイラーにおける要求量を十分に満たすことが示された 0.689% に設定した。

飼養試験に関して、増体量はベタイン区、メチオニン区ともに全ての期間内で有意に増加した ($p < 0.05$)。飼料摂取量はベタイン区、メチオニン区ともに 0 - 2 週で有意に増加した ($p < 0.05$)。飼料効率 はメチオニン区では改善する傾向が観察され ($p < 0.10$)、ベタイン区では有意に改善された ($p < 0.05$)。前期ブロイラーへのベタインまたはメチオニン給与は飼養成績を改善することが示唆された。本試験と同様に飼料中メチオニン含量を 0.689% に設定して段階的にベタインを添加した先行研究では、飼養成績に有意な差は認められなかった。本試験と先行研究の相違点は供試鶏の選抜方法にある。従来は 40-50 羽のブロイラー全個体の体重測定を行い、突出して体重の重い個体を除いた上で重い個体から選抜して各試験区の平均体重を揃える。本試験では標準的な成長速度の個体として、平均的な体重の個体から供試鶏を選んだ。一般に成長の早い個体は飼料摂取量が多いことが知られ、その摂取量の多さによって栄養要求量を満たし、鶏の持つ増体能力を十分に発揮していると考えられる。実際に先行研究と本試験における対照区の飼料摂取量 (0-2 週) を比較すると、前者では 1,320.4 g であるのに対し、後者では 1,068.6 g と大きな差がある。メチオニンの摂取量としてもそれぞれ 9.098 g、7.363 g となっている。さらに、本試験ではベタインだけではなくメチオニン添加でも飼養成績が改善されるという結果が得られた。つまり、標準的な成長速度のブロイラーでは、今回設定した試験飼料のメチオニン含量 0.689% では要求量を満たせていない可能

性がある。そのため、飼養成績の結果からベタイン固有の効果の有無を判定するのは難しいが、飼料効率における有意差はベタイン区でのみ観察されたように可能性は残されている。標準的な成長速度のブロイラーでメチオニンの要求量を決定し、メチオニン要求量を満たした飼料へのベタイン添加実験をする必要がある。

組織重量において、ベタイン区、メチオニン区ともにムネ肉およびモモ肉重量が有意に増加した ($p < 0.05$)。この結果は、Saunderson と Mackinlay (1990) や Schutte (1997) によって報告されたムネ肉重量増加と一致している。今回はモモ肉重量も有意に増加しており、増体量の改善に伴って組織重量も増加したと考えられる。窒素出納試験における窒素蓄積量、窒素蓄積率にはベタイン、メチオニンともに影響を及ぼさなかった。血漿中遊離アミノ酸濃度に関しては、メチオニン区でメチオニン濃度が有意に増加しており ($p < 0.01$)、添加したメチオニンが体内に吸収されているのが分かる。

骨格筋中のタンパク質分解関連遺伝子 Atrogin-1 の mRNA 発現量は、ベタイン添加によってムネ肉中で低下する傾向が観察され ($p < 0.10$)、モモ肉中で有意に低下した ($p < 0.05$)。また、タンパク質合成関連遺伝子である IGF-I の mRNA 発現量は、ベタイン区で有意に増加する傾向が認められた ($p < 0.10$)。飼養成績や組織重量の改善は、ベタイン、メチオニン問わず両区で観察されたが、タンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量は、ベタイン区のみで同化方向に促進される結果が得られた。R. Chen ら (2018) は、中国固有のブロイラー種である Partridge shank broiler chicken へのベタイン添加によって、増体量および飼料効率が有意

に改善されたことに加え、mTOR の mRNA 発現およびリン酸化の増加した。また、骨格筋における IGF-I 濃度および IGF-I の mRNA 発現量はベタイン添加によって有意に増加したことを報告している。以上のことから、ベタインはメチオニンとは異なる効果を有し、IGF-I/PI3K/Akt シグナル伝達経路に変化を与え、これによって飼養成績や枝肉特性が改善されることが示唆された。また、メチオニン添加によって肝臓における CPT-I の mRNA 発現量が有意に増加した ($p < 0.05$)。メチオニン添加では Atrogin-1 の mRNA 発現量が低い値を示しており、筋肉タンパク質分解の抑制、すなわちエネルギー (ATP) の必要性が低くなっている可能性を示している。それと同時に、脂肪酸からのエネルギー産生に大きく関与する CPT-I の mRNA 発現量を低下させることによって、同じくエネルギー (ATP) 供給を低下させているのかもしれない。CPT-I は、アシルカルニチン形成を担う酵素であり、マロニル CoA によって活性が阻害され、脂肪沈着や脂肪酸の酸化を制御している (Zammit et al., 1999)。ラットでは、インスリンおよびグルコースがマロニル CoA 生成を促進することが報告されている (Saha et al., 1995)。CPT-I の酵素活性減少については mRNA 発現量の低下とともにマロニル CoA 上昇によるアロステリック阻害の可能性も考えられる。

本試験の結果から、ベタインがタンパク質代謝に影響を及ぼし、飼養成績や枝肉特性を改善することが示唆された。メチオニン添加でも飼養成績が向上したことは、標準的な成長速度のブロイラーにおいて飼料中メチオニン含量 0.689%では不足している可能性を示してお

り、再度メチオニン要求量を調査した上でメチオニン充足飼料へのベタイン添加試験を実施する必要がある。

表3-1-1：試験飼料の配合割合および栄養成分（%）

	対照区	ベタイン区	メチオニン区
トウモロコシ	49.55	49.45	49.45
大豆粕	35.00	35.00	35.00
コーングルテンミール	7.00	7.00	7.00
植物性油脂	4.00	4.00	4.00
第2リン酸カルシウム	1.74	1.74	1.74
炭酸カルシウム	1.21	1.21	1.21
食塩	0.50	0.50	0.50
リジン塩酸塩	0.30	0.30	0.30
DL-メチオニン	0.30	0.30	0.40
トレオニン	0.10	0.10	0.10
塩化コリン	0.10	0.10	0.10
プレミックス ¹⁾	0.20	0.20	0.20
ベタイン		0.10	
合計	100	100	100
アミノ酸含量（計算値）			
Lys	1.450	1.450	1.450
Met	0.689	0.689	0.789
Cys	0.404	0.404	0.404
Thr	1.003	1.003	1.003

¹⁾ 飼料中1kg当たりの供給量：マンガン 100mg、亜鉛 100mg、鉄 40mg、銅 15mg、ヨウ素 1mg、ビタミンA 1300IU、ビタミンD₃ 5000IU、ビタミンE 80IU、ビタミンK 4mg、チアミン 4mg、リボフラビン 9mg、ビタミンB₆ 4mg、ビタミンB₁₂ 0.02mg、パントテン酸 15mg、ニコチン酸 15mg、ニコチン酸 60mg、葉酸2mg、ビオチン0.15mg

表3-1-2: タンパク質代謝関連遺伝子および脂質代謝関連遺伝子、GAPDHのプライマー配列

遺伝子名	プライマー配列	PCR産物 (bp)
Atrogin-1	5'- CCA ACA ACC CAG AGA CCT GT - 3'	174
	5'- GGA GCT TCA CAC GAA CAT GA - 3'	
Proteasome C2 subunit	5'- AAC ACA CGC TGT TCT GGT TG - 3'	241
	5'- CTG CGT TGG TAT CTG GGT TT - 3'	
IGF-I	5'- GCT GCC GGC CCA GAA - 3'	56
	5'- ACG AAC TGA AGA GCA TCA ACC A - 3'	
CPT-I	5'- CAA TGC GGT ACT CCC TGA AA - 3'	337
	5'- CAT TAT TGG TCC ACG CCC TC - 3'	
GAPDH	5'- CCT CTC TGG CAA AGT CCA AG - 3'	200
	5'- CAT CTG CCC ATT TGA TGT TG - 3'	

上段はForward primer、下段はReverse primerを示す

表3-1-3：ベタインおよびメチオニン添加が飼養成績に及ぼす影響

	対照区	ベタイン区	メチオニン区	<i>p</i> 値
開始体重 (g)	263 ± 7	260 ± 6	260 ± 5	—
増体量 (g)				
0-1週	337 ± 12	397 ± 11 *	421 ± 24 **	< 0.01
1-2週	487 ± 28	572 ± 19 *	563 ± 19 *	< 0.05
0-2週	824 ± 35	969 ± 19 **	985 ± 29 **	< 0.01
飼料摂取量 (g)				
0-1週	414 ± 11	451 ± 7	482 ± 22 **	< 0.01
1-2週	655 ± 34	735 ± 18 *	743 ± 24 *	< 0.05
0-2週	1069 ± 43	1187 ± 17 *	1225 ± 39 **	< 0.05
飼料効率 (gain/feed)				
0-1週	0.816 ± 0.02	0.873 ± 0.03 ¶	0.873 ± 0.03 ¶	< 0.10
1-2週	0.743 ± 0.01	0.763 ± 0.03	0.763 ± 0.03	0.280
0-2週	0.771 ± 0.01	0.807 ± 0.02 *	0.807 ± 0.02	< 0.05

平均値±SE, n=9、対照区に対して **: *p* < 0.01、*: *p* < 0.05、¶: *p* < 0.10

表3-1-4 : ベタインおよびメチオニン添加が組織重量に及ぼす影響

	対照区	ベタイン区	メチオニン区	p 値
ムネ肉 (g)	60.7 ± 1.7	70.8 ± 0.7 *	71.6 ± 0.8 *	< 0.05
体重1kg当たりのムネ肉 (g)	0.0561 ± 0.001	0.577 ± 0.002	0.0574 ± 0.002	0.827
モモ肉 (g)	87.2 ± 4.6	102.4 ± 1.9 **	105.7 ± 4.1 *	< 0.05
体重1kg当たりのモモ肉 (g)	0.080 ± 0.002	0.084 ± 0.002	0.085 ± 0.003	0.264
腹腔内脂肪 (g)	4.2 ± 0.8	5.7 ± 1.1	5.7 ± 1.1	0.439
肝臓 (g)	29.6 ± 1.4	32.1 ± 1.5	32.9 ± 1.2	0.228

平均値±SE, n=9、対照区に対して ** : $p < 0.01$ 、* : $p < 0.05$

表3-1-5 : ベタインおよびメチオニン添加が窒素出納に及ぼす影響

	対照区	ベタイン区	メチオニン区	p 値
窒素蓄積量 (g/3d)	14.1 ± 0.6	15.5 ± 0.5	68.9 ± 1.0	0.449
窒素蓄積率 (%)	71.9 ± 1.2	69.1 ± 1.2	15.3 ± 0.4	0.739

平均値±SE, n=9

表3-1-6: ベタインおよびメチオニン添加が血漿中遊離アミノ酸濃度に及ぼす影響 (μmol/mL)

	対照区	ベタイン区	メチオニン区	p 値
必須アミノ酸				
THR	0.525 ± 0.037	0.662 ± 0.049	0.655 ± 0.082	0.207
VAL	0.152 ± 0.013	0.157 ± 0.014	0.167 ± 0.008	0.663
MET	0.082 ± 0.013	0.105 ± 0.009	0.158 ± 0.013 **	< 0.01
I-LEU	0.118 ± 0.012	0.122 ± 0.009	0.119 ± 0.007	0.949
LEU	0.222 ± 0.014	0.232 ± 0.018	0.230 ± 0.012	0.878
PH-ALA	0.152 ± 0.013	0.157 ± 0.014	0.167 ± 0.008	0.467
TRP	0.099 ± 0.005	0.098 ± 0.004	0.103 ± 0.005	0.741
HIS	0.054 ± 0.005	0.061 ± 0.006 *	0.069 ± 0.002 *	< 0.05
LYS	0.243 ± 0.029	0.229 ± 0.029	0.258 ± 0.015	0.710
非必須アミノ酸				
ASP	0.162 ± 0.036	0.178 ± 0.041	0.176 ± 0.043	0.953
SER	0.456 ± 0.029	0.460 ± 0.033	0.516 ± 0.037	0.380
GLU	0.612 ± 0.031	0.695 ± 0.025 ¶	0.693 ± 0.044	0.173
GLY	0.468 ± 0.027	0.529 ± 0.042	0.545 ± 0.032	0.265
ALA	0.744 ± 0.058	0.941 ± 0.070 *	0.914 ± 0.053 ¶	< 0.05
TYR	0.245 ± 0.025	0.256 ± 0.014	0.265 ± 0.019	0.762

平均値±SE, n=9、対照区に対して **:p < 0.01、*:p < 0.05、¶:p < 0.10

表3-1-7: ベタインおよびメチオニン添加がタンパク質代謝、脂質代謝関連遺伝子のmRNA発現に及ぼす影響

	対照区	ベタイン区	メチオニン区	<i>p</i> 値
ムネ肉				
Atrogin-1	1.000 ± 0.216	0.613 ± 0.080 ¶	0.719 ± 0.172	< 0.10
Proteasome C2 Subunit	1.000 ± 0.041	1.104 ± 0.102	1.167 ± 0.088	0.134
モモ肉				
Atrogin-1	1.000 ± 0.261	0.500 ± 0.065 *	0.678 ± 0.120	< 0.05
Proteasome C2 Subunit	1.000 ± 0.095	0.986 ± 0.076	1.032 ± 0.066	0.547
肝臓				
IGF-I	1.000 ± 0.099	1.277 ± 0.095 ¶	1.093 ± 0.105	< 0.10
CPT-I	1.000 ± 0.153	0.825 ± 0.070	0.617 ± 0.051 *	< 0.05

平均値±SE, n=9、対照区に対して*:*p* < 0.05、¶:*p* < 0.10

第 4 章

総括

総括

鶏肉は、安価な動物性タンパク質源としての役割を持ち、年々その需要は拡大している。しかし、気候変動や国家間の紛争による飼料原料の供給不安、それに伴う飼料原料価格および原油価格の高騰など、ブロイラー生産を取り巻く環境は厳しい状況が続いている。そういったなかで生産性の向上や安定的な生産が求められている。業界では種鶏の育種改良のほか、飼料の栄養水準や形状、新規資材などの研究が進められ、より少ない飼料でブロイラーを急速に大きくする技術の確立を目指している。また、輸入飼料原料に依存した畜産からの脱却のため、国内で生産可能な米に着目した飼料技術開発も必要とされる。飼料用米はトウモロコシの代替として用いることが可能と報告されているが (Gonzalez-Alvarado et al. 2007; Ebling et al. 2015; F. Nanto-Hara et al., 2021)、ブロイラーへの飼料用米給与に関する情報は限られているのが現状である。米は栄養的に優れた特性を有し (Choct, 2002, Tester et al., 2004, Vandeputte et al., 2004)、生産性改善への寄与も期待できる。また、畜産物の生産性を向上させるための資材として飼料添加物も有効な手段の一つである。一部の飼料添加物は、飼料中の主要穀物によってその作用効率が異なることが報告されており (S. Y. Liu et al., 2014)、各添加物で最適な条件を検討する必要がある。そのため、ブロイラーの生産能力に及ぼす飼料用米給与の影響を評価するとともに、飼料添加物の評価および最適条件の検討を目的として研究を行った。

本研究では第 2 章において、飼料用米による飼養成績の改善効果を確認するとともに、飼料用米飼料へのフィターゼまたは L-カルニチン添加が飼養成績に及ぼす影響を評価した。飼

料中のトウモロコシ全量を飼料用米に代替して給与したところ、増体量および飼料摂取量が有意に増加し、飼料効率は改善する傾向がみられた。ムネ肉中 Atrogin-1 の mRNA 発現量が低下し、モモ肉中 Proteasome C2 Subunit の mRNA 発現量が上昇した。これらの結果から、飼料用米は前期ブロイラー飼料の主原料としてトウモロコシよりも優れていることが示唆され、タンパク質代謝に影響を及ぼしている可能性がある。さらに、飼料効率の改善傾向が 0-1 週（7-14 日齢）で観察されたことから、より早い時期に米の有用性が発揮されると仮定し、餌付け期（3-10 日齢）および前期（10-17 日齢）のブロイラーへの飼料用米給与試験を実施した。結果として、餌付け期において飼養成績の改善はみられなかった。幼雛への白米給与によって飼養成績が改善するとの報告もあるが（Ebling et al. 2015）、米の種類（粳米、玄米、白米）や育成段階、飼料用米飼料への馴致期間が関係している可能性がある。餌付け期の鶏は、消化管が未成熟で全ての栄養素を消化・吸収することができないため（Noy and Sklan, 1995, 1997）、玄米よりも粗繊維の少ない白米の方が餌付け飼料の米の形態として適していると推察された。一方で、前期において増体量と飼料効率の改善が認められ再現性の高さが示唆された。これら結果は米の飼料原料としての有用性を明確に示すものであり、飼料用米の利用促進に寄与するものである。

フィターゼは植物性原料に多く存在するフィチン酸に作用して、鶏が利用可能な無機態のリンを放出させる酵素である。S.Y.Liu ら（2014）は、フィターゼの作用効率が主要穀物種によって異なることを指摘し、原因としてフィチン酸が存在する部位の違いを挙げている。本

研究では、飼料用米飼料へのフィターゼ添加試験を実施し、トウモロコシ飼料への添加と比較した。結果として、飼料用米給与による飼養成績の改善効果は観察されたが、リン蓄積率の改善はトウモロコシ主体飼料への添加でのみ認められた。O'Dell ら (1972) の報告によると、米中のフィチン酸の大部分が果皮に存在している。したがって、米において果皮に含まれる成分がフィチン酸とフィターゼの接触を制限するためにその効果が十分に発揮されない可能性が考えられる。この知見は新規性の高いものであり、米主体飼料給与による飼養成績の改善効果を最大限に発揮するためには、フィターゼの作用効率の違いについて考慮する必要がある。

L-カルニチンは、リジンおよびメチオニンから生合成され (Cox and Hoppel, 1973a; 1973b)、脂肪酸の β 酸化を促進する (Metzler and Metzler, 2003)。ブロイラーでは、脂質代謝の促進や飼養成績の改善が報告されているが (S. H. Golzar Adabi et al., 2011; Heo et al., 2000)、有効な影響を及ぼさないと報告もある (Barker DL and Sell, 1994)。J. Keller ら (2013) は、L-カルニチンがラット骨格筋における IGF-I/PI3K/Akt シグナル経路を活性化し、MuRF 発現を抑制するとの報告している。そのため、L-カルニチンによるタンパク質代謝への影響を再評価するとともに、報告されていない飼料用米飼料への添加についても検討した。L-カルニチンは、トウモロコシ飼料および飼料用米飼料の両方で増体量、飼料摂取量、飼料効率を改善するという結果が得られた。また、窒素蓄積率は L-カルニチン添加によって改善される傾向が観察された。以上のことから、L-カルニチンは、ブロイラーのタンパク質代謝に影響を及ぼし、飼

養成績を改善することが示唆され、その効果は飼料用米飼料でも発揮されることが示された。

また、カルニチンがリジンおよびメチオニンから生合成されることを考慮すると、CP およびアミノ酸レベルと関係していると考えられる。第 2 章の最後となる試験では、要求量を十分に満たした飼料への L-カルニチン添加ではその効果が潜在化すると仮定し、基礎飼料の CP レベルを 28.0% に設定して実施した。結果として、高 CP 飼料へのカルニチン添加は、飼養成績を改善しなかった。しかし、窒素蓄積量には増加する傾向がみられたほか、肝臓 IGF-I の mRNA 発現量が増加する傾向がみられたため、タンパク質代謝に影響を及ぼすことが再確認された。つまり、L-カルニチンはブロイラーの生産性向上に有効だが、飼料中の CP (アミノ酸) レベルの影響を受ける可能性があるということを示した。

第 3 章では、メチル基ドナーとしての役割を持ち、結晶メチオニンの代替材にも用いられるベタインの評価を行った。ベタインは、飼養成績の改善や枝肉特性の改善が報告されているが (Schutte et al., 1997; Garcia et al., 2000; Hassan et al., 2005)、飼養成績に悪影響を及ぼすとの報告もあり一定の結果が得られていない (McDevid et al., 2016; Rostagno and Pack, 1996)。

Zhan ら (2006) は、ベタインの結果が一貫しないのは飼料中のメチオニン濃度の影響であると報告している。当研究室の先行研究において、前期ブロイラーのメチオニン要求量は 0.689% で充足することを示している。また、メチオニン濃度 0.689% の基礎飼料への段階的ベタイン添加 (0.05、0.10、0.20%) 試験では、飼養成績への影響は観察されなかった。従来の体重の重い個体からの供試鶏選抜方法を平均的な体重 (標準的な成長速度) の個体からの選

抜方法に変更して本研究を実施した。飼養試験は、メチオニン濃度 0.689%の基礎飼料にベタインまたはメチオニンを 0.10%添加して行った。結果として、ベタインまたはメチオニン添加は、飼養成績を改善することが示唆され、先行研究とは異なる結果が得られた。さらに、本試験ではベタインだけではなくメチオニン添加でも飼養成績が改善されるという結果が得られた。つまり、標準的な成長速度のブロイラーでは、今回設定した試験飼料のメチオニン含量では要求量を満たせていない可能性がある。一方で、Atrogin-1 の mRNA 発現量は、ベタイン添加によってムネ肉中で低下する傾向が観察され ($p < 0.10$)、モモ肉中で有意に低下した ($p < 0.05$)。また、IGF-I の mRNA 発現量は、ベタイン区で有意に増加する傾向が認められた ($p < 0.10$)。飼養成績の改善は、ベタイン、メチオニン問わず両区で観察されたが、タンパク質代謝関連遺伝子の mRNA 発現量は、ベタイン区のみで同化方向に促進される結果が得られた。以上のことから、ベタインはメチオニンとは異なる効果を有し、IGF-I/PI3K/Akt シグナル伝達経路に変化を与え、これによって飼養成績や枝肉特性が改善されることが示唆された。

様々な観点から生産性の向上に努めているブロイラー産業だが、飼料の面からのアプローチは非常に有効である。本研究では、飼料用米による飼養成績改善、米主体飼料へのフィターゼ添加による作用効率の変化、米主体飼料への L-カルニチン添加による飼養成績改善、ベタイン添加による飼養成績改善について報告し、ブロイラー生産の効率化に寄与する可能性を示した。種鶏の育種改良による鶏の栄養要求量の変化など、条件は目まぐるしく変わっていくため、引き続き視野を広く持ち検証をしていく必要がある。

参考文献

1. Adabi, S. G., Cooper, R. G., Ceylan, N., & Corduk, M. (2011). L-carnitine and its functional effects in poultry nutrition. *World's poultry science journal*, 67(2), 277-296.
2. Amer, S. A., Omar, A. E., Mohamed, W. A., Gharib, H. S., & El-Eraky, W. A. (2018). Impact of betaine supplementation on the growth performance, tonic immobility, and some blood chemistry of broiler chickens fed normal and low energy diets during natural summer stress. *Zagazig Veterinary Journal*, 46(1), 37-50.
3. Amerah, A. M., & Ravindran, V. (2015). Effect of coccidia challenge and natural betaine supplementation on performance, nutrient utilization, and intestinal lesion scores of broiler chickens fed suboptimal level of dietary methionine. *Poultry Science*, 94(4), 673-680.
4. BARKER, D. L., & SELL, J. L. (1994). Dietary carnitine did not influence performance and carcass composition of broiler chickens and young turkeys fed low-or high-fat diets. *Poultry Science*, 73(2), 281-287.
5. Batal, A. B., & Parsons, C. M. (2002). Effects of age on nutrient digestibility in chicks fed different diets. *Poultry Science*, 81(3), 400-407.
6. Bodine, S. C., Latres, E., Baumhueter, S., Lai, V. K. M., Nunez, L., Clarke, B. A., ... & Glass, D. J. (2001). Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science*, 294(5547), 1704-1708.

7. Borum, P. R. (1983). Carnitine. *Annual review of nutrition*, 3(1), 233-259.
8. Borum, P. R., & Broquist, H. P. (1977). Lysine deficiency and carnitine in male and female rats. *The Journal of Nutrition*, 107(7), 1209-1215.
9. Buyse, J., Swennen, Q., Niewold, T. A., Klasing, K. C., Janssens, G. P., Baumgartner, M., & Goddeeris, B. M. (2007). Dietary L-carnitine supplementation enhances the lipopolysaccharide-induced acute phase protein response in broiler chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 118(1-2), 154-159.
10. Chand, N., Naz, S., Maris, H., Khan, R. U., Khan, S., & Qureshi, M. S. (2017). Effect of betaine supplementation on the performance and immune response of heat stressed broilers. *Pakistan Journal of Zoology*, 49(5).
11. Chen, R., Zhuang, S., Chen, Y. P., Cheng, Y. F., Wen, C., & Zhou, Y. M. (2018). Betaine improves the growth performance and muscle growth of partridge shank broiler chickens via altering myogenic gene expression and insulin-like growth factor-1 signaling pathway. *Poultry science*, 97(12), 4297-4305.
12. Chendrimada, T. P., Neto, M. G., Pesti, G. M., Davis, A. J., & Bakalli, R. I. (2002). Determination of the betaine content of feed ingredients using high-performance liquid chromatography. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(13), 1556-1563.
13. Choct, M., 2002. Non-starch polysaccharides: effect on nutritive value. In: McNab, J. N.; Boorman, K.

N., Poultry feedstuffs: supply, composition and nutritive value. Poultry Science Symposium Series, CABI Publishing

14. Conde-Aguilera, J. A., Cholet, J. C. G., Lessire, M., Mercier, Y., Tesseraud, S., & Van Milgen, J. (2016). The level and source of free-methionine affect body composition and breast muscle traits in growing broilers¹. *Poultry Science*, 95(10), 2322-2331.
15. Cowieson, A. J., Acamovic, T., & Bedford, M. R. (2006). Phytic acid and phytase: implications for protein utilization by poultry. *Poultry Science*, 85(5), 878-885.
16. Cowieson, A. J., Wilcock, P., & Bedford, M. R. (2011). Super-dosing effects of phytase in poultry and other monogastrics. *World's Poultry Science Journal*, 67(2), 225-236.
17. Cox, R. A., & Hoppel, C. L. (1973a). Biosynthesis of carnitine and 4-N-trimethylaminobutyrate from 6-N-trimethyl-lysine. *Biochemical Journal*, 136(4), 1083-1090.
18. Cox, R. A., & Hoppel, C. L. (1973b). Biosynthesis of carnitine and 4-N-trimethylaminobutyrate from lysine. *Biochemical Journal*, 136(4), 1075-1082.
19. Denbow, D. M., Ravindran, V., Kornegay, E. T., Yi, Z., & Hulet, R. M. (1995). Improving phosphorus availability in soybean meal for broilers by supplemental phytase. *Poultry Science*, 74(11), 1831-1842.
20. Dilger, R. N., Onyango, E. M., Sands, J. S., & Adeola, O. (2004). Evaluation of microbial phytase in broiler diets. *Poultry Science*, 83(6), 962-970.

21. Donsbough, A. L., Powell, S., Waguespack, A., Bidner, T. D., & Southern, L. L. (2010). Uric acid, urea, and ammonia concentrations in serum and uric acid concentration in excreta as indicators of amino acid utilization in diets for broilers. *Poultry Science*, 89(2), 287-294.
22. Driver, J. P., Pesti, G. M., Bakalli, R. I., & Edwards Jr, H. M. (2005). Effects of calcium and nonphytate phosphorus concentrations on phytase efficacy in broiler chicks. *Poultry science*, 84(9), 1406-1417.
23. Ebling, P. D., Kessler, A. M., Villanueva, A. P., Pontalti, G. C., Farina, G., & Ribeiro, A. M. L. (2015). Rice and soy protein isolate in pre-starter diets for broilers. *Poultry science*, 94(11), 2744-2752.
24. Esteve-Garcia, E., & Mack, S. (2000). The effect of DL-methionine and betaine on growth performance and carcass characteristics in broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 87(1-2), 85-93.
25. Fu, Q., Leng, Z. X., Ding, L. R., Wang, T., Wen, C., & Zhou, Y. M. (2016). Complete replacement of supplemental DL-methionine by betaine affects meat quality and amino acid contents in broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 212, 63-69.
26. Fujimoto, H., Fujita, N., & Takada, R. (2018). Effects of a rice diet and phytase addition on growth performance, tissue weights, phosphorus and nitrogen retention, and on liver threonine dehydrogenase, malic enzyme and fatty acid synthase activities in broiler chicks. *Animal Science*

Journal, 89(5), 770-776.

27. Ghasemi, H. A., & Nari, N. (2020). Effect of supplementary betaine on growth performance, blood biochemical profile, and immune response in heat-stressed broilers fed different dietary protein levels. *Journal of Applied Poultry Research*, 29(2), 301-313.
28. Gomes, M. D., Lecker, S. H., Jagoe, R. T., Navon, A., & Goldberg, A. L. (2001). Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(25), 14440-14445.
29. González-Alvarado, J. M., Jiménez-Moreno, E., Lázaro, R., & Mateos, G. G. (2007). Effect of type of cereal, heat processing of the cereal, and inclusion of fiber in the diet on productive performance and digestive traits of broilers. *Poultry science*, 86(8), 1705-1715.
30. González-Alvarado, J. M., Jiménez-Moreno, E., Valencia, D. G., Lázaro, R., & Mateos, G. G. (2008). Effects of fiber source and heat processing of the cereal on the development and pH of the gastrointestinal tract of broilers fed diets based on corn or rice. *Poultry Science*, 87(9), 1779-1795.
31. Hamdi, M., López-Vergé, S., Manzanilla, E. G., Barroeta, A. C., & Pérez, J. F. (2015). Effect of different levels of calcium and phosphorus and their interaction on the performance of young broilers. *Poultry Science*, 94(9), 2144-2151.
32. Hassan, R. A., Attia, Y. A., & El-Ganzory, E. H. (2005). Growth, carcass quality and serum constituents of slow growing chicks as affected by betaine addition to diets containing 1. Different

- levels of choline. *International Journal of Poultry Science*, 4(11), 840-850.
- 33.** He, S., Zhao, S., Dai, S., Liu, D., & Bokhari, S. G. (2015). Effects of dietary betaine on growth performance, fat deposition and serum lipids in broilers subjected to chronic heat stress. *Animal Science Journal*, 86(10), 897-903.
- 34.** Heo, K., Odle, J., Han, I. K., Cho, W., Seo, S., van Heugten, E., & Pilkington, D. H. (2000). Dietary L-carnitine improves nitrogen utilization in growing pigs fed low energy, fat-containing diets. *The Journal of nutrition*, 130(7), 1809-1814.
- 35.** Jiménez-Moreno, E., González-Alvarado, J. M., Lázaro, R., & Mateos, G. G. (2009). Effects of type of cereal, heat processing of the cereal, and fiber inclusion in the diet on gizzard pH and nutrient utilization in broilers at different ages. *Poultry Science*, 88(9), 1925-1933.
- 36.** Keller, J., Couturier, A., Haferkamp, M., Most, E., & Eder, K. (2013). Supplementation of carnitine leads to an activation of the IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway and down regulates the E3 ligase MuRF1 in skeletal muscle of rats. *Nutrition & Metabolism*, 10(1), 1-12.
- 37.** Keller, J., Ringseis, R., Koc, A., Lukas, I., Kluge, H., & Eder, K. (2012). Supplementation with l-carnitine downregulates genes of the ubiquitin proteasome system in the skeletal muscle and liver of piglets. *Animal*, 6(1), 70-78.
- 38.** Keller, J., Ringseis, R., Priebe, S., Guthke, R., Kluge, H., & Eder, K. (2011). Dietary L-carnitine alters gene expression in skeletal muscle of piglets. *Molecular nutrition & food research*, 55(3),

419-429.

39. Kidd, M. T., Gilbert, J., Corzo, A., Virden, W. S., & Woodworth, J. C. (2009). Dietary L-carnitine influences broiler thigh yield. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 22(5), 681-685.
40. Kita, K., Kato, S., Yaman, M. A., Okumura, J., & Yokota, H. (2002). Dietary L-carnitine increases plasma insulin-like growth factor-I concentration in chicks fed a diet with adequate dietary protein level. *British Poultry Science*, 43(1), 117-121.
41. Leske, K. L., & Coon, C. N. (1999). A bioassay to determine the effect of phytase on phytate phosphorus hydrolysis and total phosphorus retention of feed ingredients as determined with broilers and laying hens. *Poultry Science*, 78(8), 1151-1157.
42. Lien, T. F., & Horng, Y. M. (2001). The effect of supplementary dietary L-carnitine on the growth performance, serum components, carcass traits and enzyme activities in relation to fatty acid β -oxidation of broiler chickens. *British Poultry Science*, 42(1), 92-95.
43. Liu, N., Ru, Y. J., Cowieson, A. J., Li, F. D., & Cheng, X. C. (2008). Effects of phytate and phytase on the performance and immune function of broilers fed nutritionally marginal diets. *Poultry Science*, 87(6), 1105-1111.
44. Liu, S. Y., Cadogan, D. J., Péron, A., Truong, H. H., & Selle, P. H. (2014). Effects of phytase supplementation on growth performance, nutrient utilization and digestive dynamics of starch and protein in broiler chickens offered maize-, sorghum- and wheat-based diets. *Animal Feed Science*

- and Technology, 197, 164-175.
45. METZLER, D.E. and METZLER, C.M. (2003) Biochemistry: The chemical reactions of living cells. 2nd Edition, Vol. 1 and 2, pp. 944-945 (New York, Academic Press)
 46. McDevitt, R. M., Mack, S., & Wallis, I. R. (2000). Can betaine partially replace or enhance the effect of methionine by improving broiler growth and carcass characteristics? *British Poultry Science*, 41(4), 473-480.
 47. Miller, J. B., Pang, E., & Bramall, L. (1992). Rice: a high or low glycemic index food? *The American journal of clinical nutrition*, 56(6), 1034-1036.
 48. Mitchell, M. E. (1978). Carnitine metabolism in human subjects I. Normal metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 31(2), 293-306.
 49. Morgan, N. K., Walk, C. L., Bedford, M. R., & Burton, E. J. (2015). Contribution of intestinal-and cereal-derived phytase activity on phytate degradation in young broilers. *Poultry Science*, 94(7), 1577-1583.
 50. Nakashima, K., Ishida, A., & Katsumata, M. (2009). Comparison of proteolytic-related gene expression in the skeletal muscles of layer and broiler chickens. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 73(8), 1869-1871.
 51. Nakashima, K., Ishida, A., Shimamoto, S., Ijiri, D., & Ohtsuka, A. (2017). Effects of insulin-like growth factor-I on the expression of atrogin-1/MAFbx in chick myotube cultures. *The Journal of*

Poultry Science, 0160141.

52. Nakashima, K., Yakabe, Y., Yamazaki, M., & Abe, H. (2006). Effects of fasting and refeeding on expression of atrogen-1 and Akt/FOXO signaling pathway in skeletal muscle of chicks. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 70(11), 2775-2778.
53. Nanto, F., Kikusato, M., Ito, C., Sudo, S., & Toyomizu, M. (2012). Effects of dehulled, crushed and untreated whole-grain paddy rice on growth performance in broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*, 49(4), 291-299.
54. Nanto-Hara, F., Ohtsu, H., Yamazaki, M., Hirakawa, T., Sato, K., & Murakami, H. (2021). Effects of dietary brown rice on the growth performance, systemic oxidative status, and splenic inflammatory responses of broiler chickens under chronic heat stress. *The Journal of Poultry Science*, 58(3), 154-162.
55. Neto, M. G., Pesti, G. M., & Bakalli, R. I. (2000). Influence of dietary protein level on the broiler chicken's response to methionine and betaine supplements. *Poultry Science*, 79(10), 1478-1484.
56. Noy, Y., & Sklan, D. (1995). Digestion and absorption in the young chick. *Poultry science*, 74(2), 366-373.
57. Noy, Y., & Sklan, D. (1997). Posthatch development in poultry. *Journal of Applied Poultry Research*, 6(3), 344-354.
58. Ohtsuka, A., Kawatomi, N., Nakashima, K., Araki, T., & Hayashi, K. (2011). Gene expression of

- muscle-specific ubiquitin ligase, atrogin-1/MAFbx, positively correlates with skeletal muscle proteolysis in food-deprived broiler chickens. *The journal of poultry science*, 1102220099-1102220099.
- 59.** O'Dell, B. L., De Boland, A. R., & Koirtiyohann, S. R. (1972). Distribution of phytate and nutritionally important elements among the morphological components of cereal grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 20(3), 718-723.
- 60.** Paiva, D., Walk, C., & McElroy, A. (2014). Dietary calcium, phosphorus, and phytase effects on bird performance, intestinal morphology, mineral digestibility, and bone ash during a natural necrotic enteritis episode. *Poultry Science*, 93(11), 2752-2762.
- 61.** Pillai, P. B., Fanatico, A. C., Beers, K. W., Blair, M. E., & Emmert, J. L. (2006). Homocysteine remethylation in young broilers fed varying levels of methionine, choline, and betaine. *Poultry Science*, 85(1), 90-95.
- 62.** Pirgozliev, V., & Bedford, M. R. (2013). Energy utilization and growth performance of chicken fed diets containing graded levels of supplementary bacterial phytase. *British Journal of Nutrition*, 109(2), 248-253.
- 63.** Rabie, M. H., & Szilágyi, M. (1998). Effects of L-carnitine supplementation of diets differing in energy levels on performance, abdominal fat content, and yield and composition of edible meat of broilers. *British Journal of Nutrition*, 80(4), 391-400.

64. Rabie, M. H., Szilagy, M., Gippert, T., Votisky, E., & Gerendai, D. (1997). Influence of dietary L-carnitine on performance and carcass quality of broiler chickens. *Acta Biologica Hungarica*, 48(2), 241-252.
65. Reynolds, T. H., Bodine, S. C., & Lawrence, J. C. (2002). Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 17657-17662.
66. Rodehutschord, M., Timmler, R., & Dieckmann, A. (2002). Effect of L-carnitine supplementation on utilization of energy and protein in broiler chicken fed different dietary fat levels. *Archives of Animal Nutrition*, 56(6), 431-441.
67. Rommel, C., Bodine, S. C., Clarke, B. A., Rossman, R., Nunez, L., Stitt, T. N., ... & Glass, D. J. (2001). Mediation of IGF-1-induced skeletal myotube hypertrophy by PI (3) K/Akt/mTOR and PI (3) K/Akt/GSK3 pathways. *Nature cell biology*, 3(11), 1009-1013.
68. Rostagno, H. S., & Pack, M. (1996). Can betaine replace supplemental DL-methionine in broiler diets? *Journal of Applied Poultry Research*, 5(2), 150-154.
69. Saha, A. K., Kurowski, T. G., & Ruderman, N. B. (1995). A malonyl-CoA fuel-sensing mechanism in muscle: effects of insulin, glucose, and denervation. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 269(2), E283-E289.
70. Salinas-Chavira, J., Montoya-Chávez, Z. N., Castañeda-Licón, J., Duran-Meléndez, L. A., López-

- Cantú, D., Infante-Rodríguez, F., ... & García-Castillo, R. F. (2013). Effect of rice polishing and phytase supplementation in diets on productive behavior of broilers. *Tropical animal health and production*, 45(4), 935-939.
71. Sandri, M., Sandri, C., Gilbert, A., Skurk, C., Calabria, E., Picard, A., ... & Goldberg, A. L. (2004). Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy. *Cell*, 117(3), 399-412.
72. Saunderson, C. L., & Mackinlay, J. (1990). Changes in body-weight, composition and hepatic enzyme activities in response to dietary methionine, betaine and choline levels in growing chicks. *British Journal of Nutrition*, 63(2), 339-349.
73. Schutte, J. B., De Jong, J., Smink, W., & Pack, M. (1997). Replacement value of betaine for DL-methionine in male broiler chicks. *Poultry Science*, 76(2), 321-325.
74. Sebastian, S., Touchburn, S. P., Chavez, E. R., & Lague, P. C. (1996). The effects of supplemental microbial phytase on the performance and utilization of dietary calcium, phosphorus, copper, and zinc in broiler chickens fed corn-soybean diets. *Poultry Science*, 75(6), 729-736.
75. Shirley, R. B., & Edwards Jr, H. M. (2003). Graded levels of phytase past industry standards improves broiler performance. *Poultry Science*, 82(4), 671-680.
76. Stitt, T. N., Drujan, D., Clarke, B. A., Panaro, F., Timofeyva, Y., Kline, W. O., ... & Glass, D. J. (2004). The IGF-1/PI3K/Akt pathway prevents expression of muscle atrophy-induced ubiquitin

- ligases by inhibiting FOXO transcription factors. *Molecular cell*, 14(3), 395-403.
77. Taheri, H. R., Heidari, A., & Shahir, M. H. (2015). Effect of high-dose phytase supplementation in broilers from 22 to 42 days post-hatch given diets severely limited in available phosphorus. *British poultry science*, 56(3), 330-336.
78. Tester, R. F., Karkalas, J., & Qi, X. (2004). Starch—composition, fine structure and architecture. *Journal of cereal science*, 39(2), 151-165.
79. Thompson, S. V., Winham, D. M., & Hutchins, A. M. (2012). Bean and rice meals reduce postprandial glycemic response in adults with type 2 diabetes: a cross-over study. *Nutrition Journal*, 11(1), 1-7.
80. Tomas, F. M., Pym, R. A., McMurtry, J. P., & Francis, G. L. (1998). Insulin-like growth factor (IGF)-I but not IGF-II promotes lean growth and feed efficiency in broiler chickens. *General and comparative endocrinology*, 110(3), 262-275.
81. Vandeputte, G. E., & Delcour, J. A. (2004). From sucrose to starch granule to starch physical behavior: a focus on rice starch. *Carbohydrate polymers*, 58(3), 245-266.
82. Vincente, B., Valencia, D. G., Pérez-Serrano, M., Lázaro, R., & Mateos, G. G. (2008). The effects of feeding rice in substitution of corn and the degree of starch gelatinization of rice on the digestibility of dietary components and productive performance of young pigs^{1, 2}. *Journal of Animal Science*, 86, 119-126.

83. Virtanen, E., & Rumsey, G. (1996). Betaine supplementation can optimize use of methionine, choline in diets. *Feedstuffs (USA)*.
84. Viveros, A., Brenes, A., Arija, I., & Centeno, C. (2002). Effects of microbial phytase supplementation on mineral utilization and serum enzyme activities in broiler chicks fed different levels of phosphorus. *Poultry Science*, 81(8), 1172-1183.
85. Walk, C. L., Santos, T. T., & Bedford, M. R. (2014). Influence of super doses of a novel microbial phytase on growth performance, tibia ash, and gizzard phytate and inositol in young broilers. *Poultry science*, 93(5), 1172-1177.
86. Xu, Z. R., Wang, M. Q., Mao, H. X., Zhan, X. A., & Hu, C. H. (2003). Effects of L-carnitine on growth performance, carcass composition, and metabolism of lipids in male broilers. *Poultry Science*, 82(3), 408-413.
87. YONEMOCHI, C., TAKAGI, H., HANAZUMI, M., HIJIKURO, S., KOIDE, K., INA, T., & OKADA, T. (2000). Improvement of phosphorus availability by dietary supplement of phytase in broiler chicks. *Japanese poultry science*, 37(3), 154-161.
88. Yagami, K., & Takada, R. (2017). Dietary rice improves growth performance, mucosal enzyme activities and plasma urea nitrogen in weaning piglets. *Animal Science Journal*, 88(12), 2010-2015.
89. Yang, M., Chen, R., Song, Y. D., Zhou, Y. M., Liu, Q., & Zhuang, S. (2021). Effects of dietary betaine supplementation on growth performance, meat quality, muscle fatty acid composition and

antioxidant ability in slow-growing broiler chickens. *British Poultry Science*, 1-9.

90. Zaefarian, F., Romero, L. F., & Ravindran, V. (2013). Influence of a microbial phytase on the performance and the utilization of energy, crude protein and fatty acids of young broilers fed on phosphorus-adequate maize-and wheat-based diets. *British poultry science*, 54(5), 653-660.
91. Zammit, V. A. (1999). Carnitine acyltransferases: functional significance of subcellular distribution and membrane topology. *Progress in lipid research*, 38(3), 199-224.
92. Zhan, X. A., Li, J. X., Xu, Z. R., & Zhao, R. Q. (2006). Effects of methionine and betaine supplementation on growth performance, carcass composition and metabolism of lipids in male broilers. *British poultry science*, 47(5), 576-580.

その他参考資料

1. Aviagen. (2014). ROSS Nutrition Specifications 2014.
2. Aviagen. (2014). ROSS 308 Performance Objectives 2014.
3. Aviagen. (2022). ROSS Nutrition Specifications 2022.
4. Aviagen. (2022). ROSS 308/ROSS 308 FF Performance Objectives 2022.
5. USDA, F. (2023). *Livestock and Poultry: World Markets and Trade*. United States Department of Agriculture. Foreign Agriculture Service.
6. United Nations Department of Economic and Social Affairs, Population Division. (2022). *World*

Population Prospects 2022: Summary of Results.

7. FAO, F. (2017). The future of food and agriculture—Trends and challenges. Annual Report, 296, 1-180.
8. Alexandratos, N., & Bruinsma, J. (2012). World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision.
9. 農林水産政策研究所. (2019). 2050年における世界の食料需給見通し～世界の超長期食糧自給予測システムによる予測結果～.
10. 中央畜産会. (2011). 日本飼養標準 家禽. (2011年版).
11. 日本チャンキー. (2022). ブロイラーの冬場の管理と指標の変更点

参考 Web サイト

1. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) Web.

<https://www.fao.org/faostat/en/>

謝辞

本論文は、著者が新潟大学の社会人博士後期課程に入学してからの3年間と、学部・大学院の4年間の研究成果をまとめたものです。この3年間は新型コロナウイルスの流行により、講義や審査等が全てオンラインで行われ、大学への入構も制限されるなど、非常に難しい時期でした。しかし、先生方からの適切なお助言、勤務している清水港飼料株式会社からのご配慮によって、働きながら学ぶことができました。学部時代よりお付き合い頂いている先生方に直接お会いしてお話する機会が少なかったことは大変心残りです。

本研究の実施、本論文の作成にあたり、終始熱心なお指導を賜りました新潟大学農学部 動物遺伝学研究室の山田宜永教授に感謝の意を表します。副査・審査をお引き受けくださり、多くのお助言を頂きました動物生体機構学研究室の杉山稔恵教授、園芸学研究室の中野優教授、草地生態学研究室の板野志郎准教授、動物生殖学研究室の山城秀昭准教授に感謝の意を表します。

また、実験計画および分析、本論文の作成、審査にあたり、鯉淵学園農業栄養専門学校アグリビジネス科の高田良三教授には、新潟大学時代から7年間にわたりご指導を頂きました。研究室に配属された当時はここまで長い付き合いになるとは思いませんでした。ここに感謝を申し上げます。本当にありがとうございました。

本研究で用いた窒素分析にご協力賜った藤井崇様を始めとする新潟県農業総合研究所畜産研究センターの皆様、実験動物の提供を賜った株式会社オオヌマの皆様、動物の飼養管理や

サンプル採取、分析にご協力頂いた当研究室の皆様には厚く御礼申し上げます。

社会人特別入試による博士後期（博士）課程への進学という挑戦をご理解頂き、快諾して下さいました清水港飼料株式会社 杉山房雄相談役、杉山八洲男会長、杉山知行社長、同研究所 桜井敏行所長（当時）に深く感謝申し上げます。また、本研究および本論文作成にあたり、研究所業務と並行して進めることにご理解、ご協力頂いた同研究所 國實寿典所長（現在）、石井貴大主任を始めとする清水港飼料株式会社の皆様へ、ここに感謝を申し上げます。

最後に、本研究に関わりご支援、ご協力頂きました全ての皆様に感謝いたします。誠にありがとうございました。