

## ブロイラーの研究に対する3-メチルヒスチジン法の応用

誌名	栄養生理研究会報
ISSN	02864754
著者	林, 國興
巻/号	32巻2号
掲載ページ	p. 105-122
発行年月	1988年9月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## ブロイラーの研究に対する3-メチルヒスチジン法の応用

林 國 興 (鹿児島大学農学部畜産学科)

### 1. はじめに

わが国のブロイラー産業は1960年代に始まって急成長を遂げ、年間生産羽数は、1972年には約4億羽、1986年には7億4千万羽に達した。現在も生産羽数は少しずつ増加しており、すでに、わが国で消費される食肉の50%以上が鶏肉で占められている<sup>1, 2, 3)</sup>。

現在利用されているブロイラー用鶏種のほとんどは白色コーニッシュと白色プリマスロックであるが、実際の生産に用いられるブロイラーの多くは父親を白色コーニッシュ系に母親を白色プリマスロック系にもつ交雑種である<sup>4)</sup>。

ブロイラーは成長速度が著しく速く、飼料効率が極めて高い。動物の成長速度あるいは飼料効率を左右する要因(メカニズム)はまだ十分解明されていないが、成長と蛋白質代謝は不可分の関係にあり、量的にみれば、蛋白質、中でも、筋肉(骨格筋)蛋白質の蓄積が成長の主体となっている。筆者は育種改良により、ブロイラーは、筋肉蛋白質代謝に遺伝的変化が生じ、成長速度および飼料効率が著しく改善されたのではないかと考えている。

本報告では、まず、3-メチルヒスチジン法による筋肉蛋白質の合成・分解速度測定法について述べ、次に、3-メチルヒスチジンの定量法、ブロイラーと卵用鶏における筋肉蛋白質の合成・分解速度の比較、および、ブロイラーの筋肉蛋白質合成・分解速度に対するサイロキシン投与の影響、最後に、ブロイラー生産への応用をめざして現在進めているヨードカゼインに関する実験について報告したい。

### 2. 3-メチルヒスチジン法による筋肉蛋白質の合成・分解速度測定法

Shoenheimerら<sup>5)</sup>が<sup>15</sup>Nでラベルしたチロシンを用いて体蛋白質が動的状態にあることを示して以来、体蛋白質の代謝回転速度すなわち体蛋白質の合成・分解速度測定法は著しく進歩した。それらの方法を用いて生理学的あるいは生化学的に重要な事実が次々に明らかにされてきた。

現在、一般に用いられている体蛋白質の合成・分解速度測定法は、大別すれば、パルス標識法(pulse labelling method)、継続投与法(continuous administration method)および3-メチルヒスチジン法の3種である。パルス標識法と継続投与法はいずれも同位体を使用する合成速度測定法であり、体蛋白質に対するラベルアミノ酸のとり込み速度を測定するものである。体蛋白質の蓄積速度は、理論的に、体蛋白質の合成速度と分解速度の差である。従って、体蛋白質の蓄積速度を実測すれば分解速度は計算によって求めることができる。分解速度がわかれば同様に合成速度を計算する

ことができる。

パルス標識法と継続投与法の詳細については成書<sup>6)</sup>を参照されたい。ここでは、筆者らが主として使用している3-メチルヒスチジン (N<sup>3</sup>-メチルヒスチジン、以下3-MHと略) 法について解説する。

3-MH法は他の方法と異なり、高価な同位体を必要とせず、さらに非侵襲的な方法であるので畜産学あるいは臨床医学への応用が容易である<sup>7,8)</sup>。3-MHは筋肉のミオシン、アクチンに含まれるアミノ酸であり、一般に非代謝性である。3-MHはヒスチジンが蛋白質にくみこまれてからメチル化されたものであり、ミオシン、アクチンの分解に伴って定量的に尿へ排泄される。従って、体内に含有される3-MHの量がわかれば、尿への排泄量を測定することにより、ミオシン、アクチンの分解速度が求められる。ミオシンおよびアクチンのほとんどは骨格筋に含有され、骨格筋蛋白質のそれぞれ約60%および、20%を占める。従って、3-MH法によって得られる値は一般には骨格筋蛋白質の分解速度とみなすことができる。何らかの異常により骨格筋の量が著しく減少すると相対的に小腸や皮ふに由来する3-MHの量が増える。この場合、3-MH排泄量により計算した値を骨格筋蛋白質の分解速度とみなすには無理が生じる。Rennie and Millwardはこの点において3-MH法を強く批判している<sup>9)</sup>。しかし、通常、畜産学の分野で、このような動物を実験に供することはほとんどない。

3-MH法の有効性については、MillwardやRennieらの批判に反論して、門脇と野口が詳しい解説を試みている<sup>10)</sup>。

一方、3-MH法の応用が困難な例として、3-MHが代謝される例、あるいはバレニン (3-メチルヒスチジル-β-アラニン) が蓄積される例が報告されている。すなわち、マウスの雌では3-MHが3-メチルヒスタミンとなり、ヒスタミンと同様に代謝され、尿中へ排泄されることが示唆されている<sup>11)</sup>。また、豚と綿羊ではバレニンが蓄積する<sup>12,13)</sup>。従って、これらの場合、3-MH法を適用するのは困難である。

Harrisらは、4週齢以上の鶏でもバレニンが蓄積することを報告している<sup>14)</sup>。

ヒト、ウシ、ラットでは3-MHの排泄速度は速く、バレニンは蓄積しない<sup>15,16,17)</sup>。

ミオシンおよびアクチンの分解により遊離された3-MHが、十分速く、定量的に、尿中へ排泄されることが、3-MH法により骨格筋蛋白質の分解速度を測定するための必要条件である。Harrisらが詳細に述べているように<sup>14)</sup>、4週齢に満たない鶏ではこの条件が満たされるが、加齢に伴い、バレニンが蓄積するようになり、老鶏では3-MH法の応用が困難になる。以上述べたように、3-MH法の応用にはいろいろな制限がある。しかし、ブロイラーでは、4週齢以前のヒナを用いて実験を行えば、3-MH法の応用は十分可能である。

### 3. イオン交換クロマトグラフィーおよび高速液体クロマトグラフィーによる3-MHの定量

鶏排泄物あるいは飼料中の3-MH含量は、ヒスチジンに比べ、極めて少なく、その挙動が似ているので、その定量は非常に困難であった。そこで、西澤らのイオン交換クロマトグラフィーによる3-MH定量法<sup>18)</sup>の改良を試み、さらに、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法による高感度の定量法について検討した。

#### a. イオン交換クロマトグラフィーによる方法

サンプル (飼料約3g、筋肉約3g、新鮮鶏排泄物約8g) を共栓三角フラスコにとり、6M塩酸80mlを加え、オートクレーブ (110~115°C) で24時間過熱し、これを冷却後、沓紙 (No.5A) で濾過した。これを、全量、エバポレーターで乾固し、完全に塩酸を除去した後、0.2Mピリジンに溶かし、西澤らの方法<sup>18)</sup>に準じ、イオン交換樹脂カラム (12×200mm、Dowe×50×8、Pyridine form) を用いて分離した。分離した3-MHはフラクションコレクターで3mlずつ分取した。

3-MHの定量はWardの比色定量法<sup>19)</sup>を一部改良して行った。3-MHの溶出液の一部 (2ml) を試験管にとり、これにニンヒドリンとオルトフタルマルデヒドを主成分とするWardの発色試薬1mlを加え、よく攪拌した後、40°Cの温浴中に10分間放置した。次に、2MNaOH 1mlを加えよく攪拌し、2時間以上放置した後、490nmで吸光度を測定した。サンプル中の3-MH含量は3-MHを含むフラクションの吸光度を合計して求めた。

Wardの比色定量法ではヒスチジンはほとんど発色しないが、3-MHはよく発色する。従って、ヒスチジンと3-MHの分離が完全でない場合にも、定量が可能となる。

図1に3-MHの分離パターンを、図2に検量線を示した。

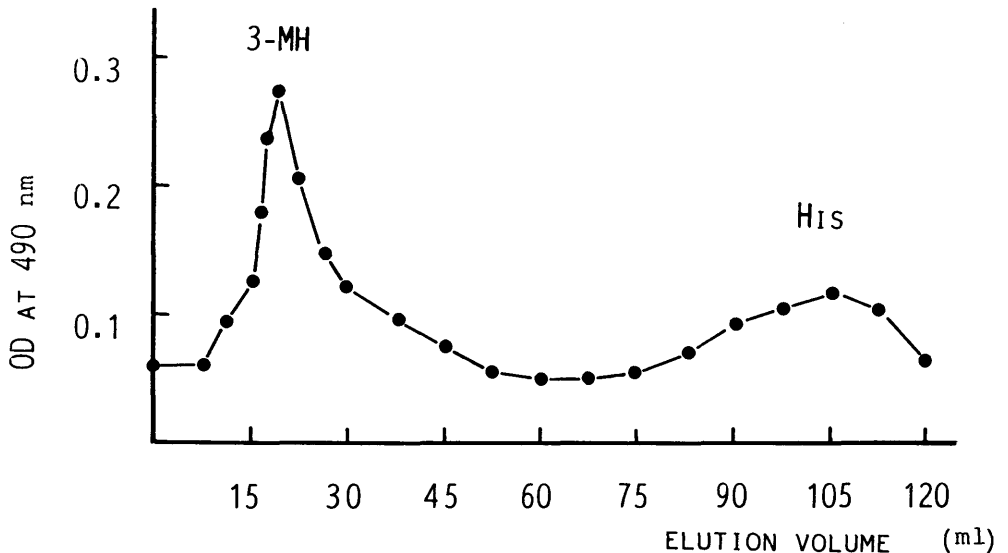


Fig. 1. Separation of 3-methylhistidine (3-MH) in chicken excreta by ion-exchange column chromatography

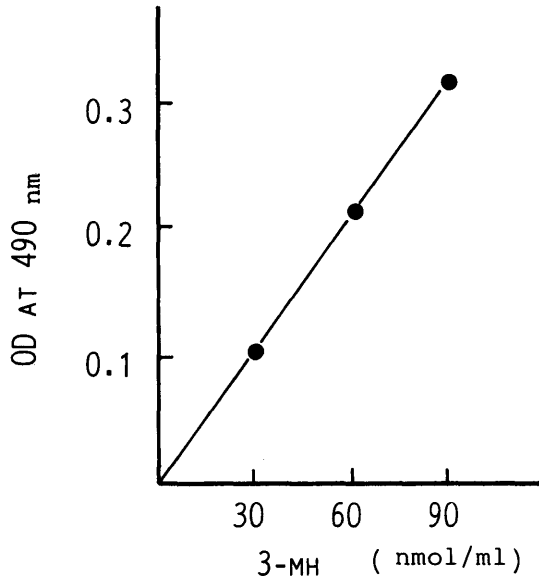


Fig. 2. Standard curve of 3-methylhistidine (3-MH)

b. HPLCによる方法<sup>20)</sup>

サンプル（飼料約0.5g、筋肉約0.5g、新鮮鶏排泄物約2g）をふた付試験管にとり、6M塩酸15mlを加え、オートクレーブ（110～115℃）で24時間加熱した。これを冷却後、ろ過し、水を加えて50mlとし、その15mlをロータリーエバポレーターで乾固し塩酸を除去した。次に、残渣を5mlの0.2Mピリジンで溶かし、全量をイオン交換樹脂カラム（6×90mm、Dowe×50×8、200～400mesh、pyridine form）に注ぎ、0.2Mピリジン20mlで洗った後、1Mピリジン20mlで3-MHを溶出した。これを再度乾固し2mlの移動相溶媒に溶解し、その10～100 $\mu$ lをHPLCの試料とした。

HPLCは島津LC4Aで、これにZorbax ODSカラム（4.6×250mm）を装着して使用した。移動相溶媒はKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液（20mM）に1-オクタンスルホン酸ナトリウム（15mM）を溶解した。カラム温度は45℃、移動相溶媒の流速は0.5ml/minとした。ガードカラムとしては、Shimadzu Gurd Column ODS（5cm、1.5ml容）を使用した。3-MHの検出には、ホウ酸緩衝液（0.4M、PH10.6）にメルカプトエタノール（0.2%）およびオルトフタルアルデヒド（0.16%）を溶解して用いた。オルトフタルアルデヒドは水に溶けにくいので最初少量のメタノールに溶かした。また、ヒスチジンの蛍光を抑える目的でフォルムアルデヒド（2%）を使用した。

この方法で、3-MHの保持時間は約60分であり、0.5～5n molの3MHを精度良く分析することができた。4.6×150mmのZorbax ODSカラムも使用可能であり、この場合3-MHの保持

時間は20分程度に短縮される。

図3に3-MHの分離パターンを、図4にその検量線を示した。

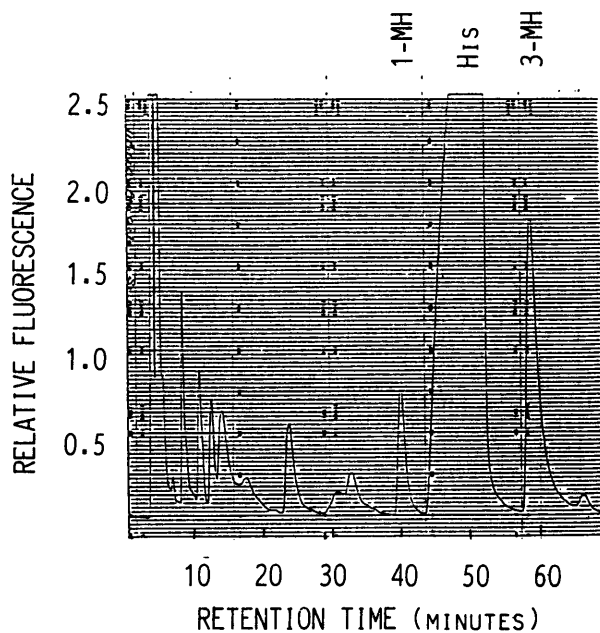


Fig. 3. Separation of 1-methylhistidine (1-MH), histidine (His) and 3-methylhistidine (3-MH) in chicken food by HPLC

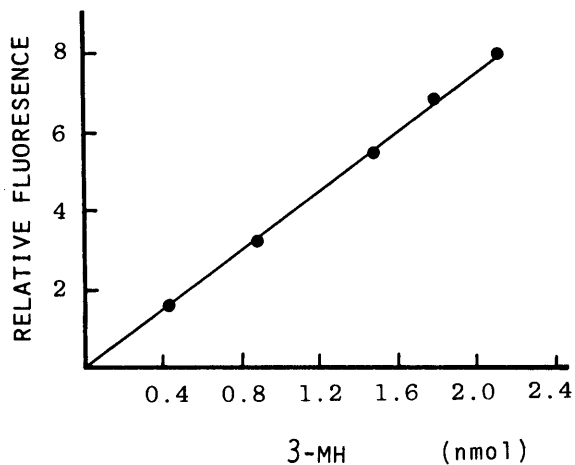


Fig. 4. Standard curve of 3-methylhistidine (3-MH)

#### 4. ブロイラーと卵用鶏における筋肉蛋白質の合成・分解速度

蛋白質の蓄積速度 (Kg) は蛋白質の合成速度 (Ks) と分解速度 (Kd) の差であるので、Kg に対する Ks と Kd の寄与率は同等である。

蛋白質の合成に関する研究に比べ、分解に関する研究は進んでいない。蛋白質合成のメカニズムはよく理解されるようになったが、分解のメカニズムには不明な点が多い。動物を絶食すれば体蛋白質が分解されエネルギーとして利用される<sup>21)</sup>。食餌蛋白質の不足は体蛋白質の分解を抑制する<sup>22)</sup>。強いストレスを受けると過剰のグルココルチコイドが分泌され、とくに筋肉蛋白質の分解が促進される<sup>23)</sup>。甲状腺機能が著しく亢進した場合にも同様のことが起こる<sup>24)</sup>。成長中の動物では体蛋白質の合成も分解も活発であり、加齢に伴いいずれも低下する<sup>25)</sup>。同属の動物でも種によって体の大きさや成長速度が著しく異なる。これは家畜の品種間に体蛋白質代謝回転速度の差のあることをうかがわせる。前田らは 3-MH 法により、鶏品種間の比較を試み、これを明らかにしている<sup>26)</sup>。

筆者の興味は、もっぱら、ブロイラーにあるので、ここではブロイラーと卵用鶏の比較を行うのではなく、ブロイラーをさらに良く理解することを主たる目的として以下の実験を行った<sup>27)</sup>。

21、42、63 日齢の雄のコマーシャルブロイラーおよび卵用鶏 (白色レグホン種) を用いて、3-MH 法により、筋肉蛋白質の分解速度ならびに合成速度を測定した。供試羽数はいずれも 10 羽とした。飼料は、トウモロコシと精製大豆蛋白質を主成分とし、21 日齢用としては、CP20%、42 および 63 日齢用としては CP14% となるよう調製した。供試鶏は 23°C に調節した飼育室で金あみケージを用いて飼育した。照明時間は 14 時間とした。排泄物採取はそれぞれ 21、42、63 日齢時よりいずれも 4 日間行ったが、試験飼料の給与はそれぞれ 17、38、59 日齢時に開始した。増体量と飼料摂取量は、それぞれ 19、40、61 日齢時より 6 日間測定した。排泄物は厚手のビニールシートで受け、毎日午後 2 時に採取した。試験終了後、供試鶏はと殺し、骨格筋をすべて骨よりはらずし重量を測定した。筋肉、排泄物および飼料中の 3-MH を先に述べた西澤らのカラムクロマトグラフィー<sup>18)</sup> により分離、Ward らの比色法<sup>19)</sup> により定量し、筋肉蛋白質の Ks、Kd を計算した。Kd は 1 日あたりの 3-MH 排泄量を試験終了時の筋肉中 3-MH 量 (P) で除して求めた。Ks は下記の船引らの式<sup>28)</sup> によって求めた。

$$Ks = \frac{Kd (P - P_0 e^{-kd})}{(1 - e^{-kd}) P}$$

$P_0$  は試験終了 1 日前の筋肉中 3-MH 量を示す。これは、排泄物を採取した期間の平均増体量より推定した。

増体量と飼料効率を表 1 に示した。増体量はどの日齢においてもブロイラーが優れていた。飼料効率は 21 および 63 日齢ではブロイラーが優れていたが、42 日齢では卵用鶏の方が優れていた。

筋肉重量、筋肉および排泄物中の 3-MH 含量は表 2 に示した。体組織由来の 3-MH 量は排泄物中の 3-MH より摂取飼料に含まれる 3-MH を差し引いて求めた。ブロイラーでは筋肉以外の組織

Table 1.  
Body weight gain and feed efficiency of layer and broiler chickens at different stages of growth

Age (d)	Initial body-wt (g)		Body-wt (g/6d)		Feed efficiency	
	Layer	Broiler	Layer	Broiler	Layer	Broiler
21	182±24	289± 23	84±14	156±33 <sup>**</sup>	.45±.03	.53±.07 <sup>**</sup>
42	353±32	1390± 51	120±13	228±33 <sup>**</sup>	.40±.02	.31±.04 <sup>**</sup>
63	693±60	1752±137	106±46	400±53 <sup>**</sup>	.21±.13	.43±.07 <sup>*</sup>

Values given are means±S.D. Values differ significantly from those for layer chickens: \* P< .05, \*\* P< .01

に約20%の3-MHが含まれるので骨格筋由来の3-MHは、この値にさらに0.8を乗じて求めた (表3)。筋肉中の3-MH含量はブロイラーの方が有意に低い値を示した。それにもかかわらず筋肉中総3-MH量は、ブロイラーが卵用鶏に比べ、はるかに大きかったのは筋肉量の差によるものである。

Table 2.  
3-Methylhistidine content in muscle in layer and broiler chickens at different stages of growth

Age (d)	Skeletal muscle wt (g)		Muscle 3-MH (μmol/g muscle)		Total muscle 3-MH (μmol)	
	Layer	Broiler	Layer	Broiler	Layer	Broiler
21	64± 8	115±11 <sup>**</sup>	.745±.087	.606±.058 <sup>**</sup>	49± 6	70± 8 <sup>**</sup>
42	124±16	482±25 <sup>**</sup>	.794±.080	.662±.150 <sup>*</sup>	99±20	319±17 <sup>**</sup>
63	209±31	706±35 <sup>**</sup>	.743±.059	.707±.139	155±24	499±70 <sup>**</sup>

Values given are means±S.D. Values differ significantly from those for layer chickens: \* P< .05, \*\* P< .01



骨格筋蛋白質のKdとKsは表4に示した。Kdはブロイラーより卵用鶏の方が高く、統計的有意性が認められた。21、42、63日齢のブロイラーと卵用鶏の筋肉蛋白質のKdはそれぞれ、5.0、2.8、0.9%/日（ブロイラー）、6.1、4.5、2.4%/日（卵用鶏）であった。Ksはブロイラーと卵用鶏でほとんど同じであったが、42日齢は例外で、ブロイラーより卵用鶏の方が高く、有意差が認められた。21、42、63日齢のブロイラーと卵用鶏のKsはそれぞれ、10.5、4.9、4.0%/日（ブロイラー）、11.2、8.7、4.5%/日（卵用鶏）であった。以上の値は、すべての組織の蛋白質分解速度が筋肉蛋白質の分解速度と同じであるという仮定に基づいている。

Table 3.  
Origin of 3-methylhistidine(3-MH) excreted by layer and broiler chickens at different stages of growth

Age (d)	Total excreted 3-MH ( $\mu\text{mol/d}$ )		3-MH derived from feed ( $\mu\text{mol/d}$ )		3-MH derived from muscle ( $\mu\text{mol/d}$ )	
	Layer	Broiler	Layer	Broiler	Layer	Broiler
21	5.4 $\pm$ 1.5	6.9 $\pm$ 1.2 <sup>**</sup>	1.7 $\pm$ 1.2	2.6 $\pm$ 1.3 <sup>**</sup>	2.9 $\pm$ 1.5	3.4 $\pm$ 1.9 <sup>**</sup>
42	8.1 $\pm$ 1.3	17.9 $\pm$ 2.6 <sup>**</sup>	2.7 $\pm$ 1.2	6.6 $\pm$ 1.6 <sup>**</sup>	4.3 $\pm$ 1.0	9.0 $\pm$ 1.9
63	8.4 $\pm$ 1.9	13.7 $\pm$ 2.8 <sup>**</sup>	3.8 $\pm$ 1.5	8.4 $\pm$ 1.8 <sup>**</sup>	3.7 $\pm$ 1.2	4.3 $\pm$ 2.0

Values given are means $\pm$ S.D. Values differ significantly from those for layer chickens: \* P < .05, \*\* P < .01

Table 4.  
Rates of muscle protein degradation(Kd) and synthesis(Ks) of layer and broiler chickens at different stages of growth

Age (d)	Kd (%/d)		Ks (%/d)	
	Layer	Broiler	Layer	Broiler
21	6.1 $\pm$ 1.1	5.0 $\pm$ 1.3 <sup>**</sup>	11.2 $\pm$ 1.3	10.5 $\pm$ 1.4 <sup>*</sup>
42	4.5 $\pm$ 1.2	2.8 $\pm$ 1.5 <sup>*</sup>	8.7 $\pm$ 1.3	4.9 $\pm$ 1.6
63	2.4 $\pm$ 1.6	2.9 $\pm$ 1.5	4.5 $\pm$ 1.0	4.0 $\pm$ 1.8

Values given are means $\pm$ S.D. Values differ significantly from those for layer chickens: \* P < .05, \*\* P < .01

NagasawaとFunabiki<sup>29)</sup>は尿中排泄3-MHに対する骨格筋、腸および皮ふの寄与率をラットを用いて求め、それぞれ76、2、22%という値を示した。ラットでは皮ふの寄与率が高い。しかし、一般に家畜はラットより筋肉の割合が多いので筋肉以外の組織の寄与率はこれより低くなると考えられる。筋肉を摘出して培養し、培養液中への3-MHの放出速度を測定すれば、より正確に筋肉蛋白質のKdを求めることができる<sup>30、31)</sup>。しかし、応用面を考えると、ここで述べたin vivo法は有利な点が多い。尿中3-MH排泄量が、筋肉以外の組織の代謝変動により著しく変化する可能性は少ないので、とくに畜産の分野では、3-MH法は十分活用できると考えられる。

本研究の結果は、ブロイラーが卵用鶏に比べ飼料効率が優れ、成長が速いのは、育種改良の結果、筋肉蛋白質のKsが速くなったのではなく、Kdが低くなったことによるものであることを示している。これらの結果は、最近発表された他の研究者の報告と一致している。Kangら<sup>32)</sup>はL-[U-<sup>14</sup>C]-チロシンを用いたisotope emulsion techniqueによってブロイラーのKsとKdを測定し、ブロイラーのKdが卵用鶏のそれより低いことを認めている。Kangらのこの報告によれば、6週齢ブロイラーの胸筋のKsとKdはそれぞれ16%/日、12%/日であるのに対して、白レグでは17%/日と14%/日であったとしている。本研究では、ブロイラーのKs、Kdがそれぞれ5%/日、3%/日、白レグでは8%/日、5%/日であった。本実験の値は、Kangらの値に比べて著しく低いが、これは3-MH法ではアクチンとミオシンの分解速度が測定されるのに対して、同位体を用いたKangらの方法では筋肉蛋白質全体の合成速度が測定されることによると思われる。Jonesら<sup>33)</sup>もKangらと同様の実験結果を報告している。さらに、Klausingら<sup>34)</sup>はin vitroの方法を用いて同様の結論を導いている。また、Jonesら<sup>35)</sup>は3-MH法によって、2週齢ブロイラーのKdは5.3%/日であったと報告している。これは本実験の値に近い。鶏では加齢に伴ってバレニンの蓄積が進むので<sup>14)</sup>、本実験で示した63日齢の鶏のKsおよびKdは真の値より低く見積られている可能性がある。

筋肉蛋白質の分解速度に遺伝的差異があるのは興味深い。前田らは、遺伝学的観点より大系、小系ウズラを用いて筋肉蛋白質代謝の問題に取り組んでおり、興味ある知見を得ているが<sup>36)</sup>、これは家畜の改良を考える上で重要な示唆を与えていると考えられる。

##### 5. ブロイラーの筋肉蛋白質合成・分解速度に対するサイロキシン投与の影響

動物の成長は内分泌機能と密接に関連している。成長ホルモンと甲状腺ホルモンが成長に対して特に重要な役割を果たしている。ソマトメディン、性ホルモン、インシュリン、グルココルチコイドなども成長に関与する。しかし、鶏の成長に対する各種ホルモンの作用には不明な点が多い。ここでは、ブロイラーの成長と筋肉蛋白質代謝に対する甲状腺ホルモン投与の影響について述べたい。

甲状腺を除去すると鶏の成長は著しく阻害されるが、甲状腺ホルモンを投与すれば回復するので、甲状腺ホルモンが成長に不可欠であることは明らかである。甲状腺ホルモンには、サイロキシン ( $T_4$ ) とトリヨードサイロニン ( $T_3$ ) があり、一般には $T_3$ が活性型であると考えられている。しかし、鶏

では、 $T_4$ と $T_3$ のいずれが活性型であるのか定かでない<sup>37)</sup>。

甲状腺ホルモンは筋肉蛋白質の合成を促進し、分解も促進する<sup>38)</sup>。甲状腺ホルモンが、条件により、成長促進的に作用したり、阻害的に作用したりするのはこのためであると考えられる。生理的少量の甲状腺ホルモンは蛋白質合成を促進するが、分解はさほど促進しない。従って、成長中の動物に少量の甲状腺ホルモンを投与すれば、成長が促進される可能性がある。事実、筆者らはマウスを用いてこの点を実証している<sup>39)</sup>。ここでは、 $T_4$ を投与することにより雄ブロイラーの筋肉成長が促進されることを報告したい<sup>40)</sup>。

成長の指標としては、体重が最も一般的に用いられるが、体重増加の主体は、水、蛋白質、脂肪およびミネラルの蓄積であるので、体重のみを成長の指標とするのは好ましくない。体重の他に、窒素蓄積量、筋肉重量などを指標として加えれば、成長の把握がよりの確になる。また、体蛋白質蓄積速度(成長速度, Kg)は、体蛋白質の $K_s$ と $K_d$ の差であり、 $K_s$ が増加した場合にも、 $K_d$ が減少した場合にも、Kgは増加するので、体蛋白質、なかでも、筋肉蛋白質の $K_s$ 、 $K_d$ を測定すれば、家畜の成長現象をさらに良く理解することができる。

ブロイラーの改良は、成長速度と飼料効率に重点が置かれ、その結果、蛋白質だけでなく過剰の脂肪が蓄積するようになった。甲状腺ホルモンは、脂肪の合成を阻害し、分解を促進するので<sup>41, 42)</sup>、ブロイラーに甲状腺ホルモンを投与すれば、筋肉成長を促進し、脂肪蓄積を減少させることが可能である。

本実験では、体重のそろった12日齢の雌雄のブロイラーそれぞれ48羽を2羽1組として4区(6反復)に分け、基礎飼料で3日間予備飼育した後、L-サイロキシンナトリウム( $T_4$ )を0(対照区)、0.4、1.2、3.6ppm添加した飼料で12日間飼育し、増体量、飼料摂取量、深胸筋重量、腹腔脂肪量、肝臓重量および3-MH法によって求めた $K_d$ と $K_s$ に対する影響を調べた。飼育室の温度は25℃、照明時間は14時間とした。

その結果を表5(雄)と表6(雌)に示した。 $T_4$ を3.6ppm添加した飼料を給与した場合、雌雄ともに増体量は減少したが、0.4ppm区、1.2ppm区では有意な差は認められなかった。雄の1.2ppm区では増体が良くなる傾向が見られた( $P < 0.1$ )。飼料摂取量は雄では1.2ppm区と3.6ppm区で明らかに低下したが、0.4ppm区では差がなかった。雌の場合、0.4ppm区と1.2ppm区は対照区と差がなかったが、3.6ppm区は明らかに減少した。飼料効率は雌雄ともに1.2ppm区で増加したが、0.4ppm区はC区と差がなく、3.6ppm区では減少した。深胸筋重量は、飼料効率と同様に、1.2ppm区で増加し、0.4ppm区では変わらず、3.6ppm区では減少した。深胸筋はホルモンに対する感受性が高く、脂肪含量が少なく、摘出が容易であるので、本実験に好都合の筋肉である。肝臓重量は雌雄ともに3.6ppm区では減少したが、0.4、1.2ppm区では変らなかった。腹腔脂肪量は、雄では3.6ppm区のみ減少し、雌では投与区で全て減少し、減少の程度は投与量が多くなるほど大であった。分散分析の結果、腹腔脂肪に対する $T_4$ と性の交互作用には有意性が認められた。

Table 5.  
Effect of dietary thyroxine on body weight gain, feed efficiency, breast muscle (M. pectoralis profundus) weight, liver weight, abdominal fat content and rates of muscle protein degradation(Kd) and synthesis(Ks) in male broiler chickens

Thyroxine level (ppm)	0	.4	1.2	3.6
Initial body-wt (g)	272± 3	273± 4	272± 3	272± 3
Body-wt (g/12d)	403±24 <sup>a</sup>	403±29 <sup>a</sup>	424±32 <sup>a</sup>	323±36 <sup>b</sup>
Feed efficiency	.52±.03 <sup>b</sup>	.53±.05 <sup>b</sup>	.58±.04 <sup>a</sup>	.49±.03 <sup>c</sup>
Breast muscle-wt (g)	16.2±.9 <sup>b</sup>	16.4±1.1 <sup>b</sup>	19.7±1.0 <sup>a</sup>	14.3±1.2 <sup>c</sup>
Liver wt (g)	23.1±3.6 <sup>a</sup>	21.2±2.9 <sup>a</sup>	22.5±1.1 <sup>a</sup>	17.8±1.6 <sup>b</sup>
Abdominal fat content (g)	4.8±1.4 <sup>a</sup>	5.3±1.6 <sup>a</sup>	5.6±1.9 <sup>a</sup>	2.1±.7 <sup>b</sup>
Total excreted 3-MH (μmol/d)	7.9±.6 <sup>c</sup>	8.7±.6 <sup>b</sup>	8.9±.8 <sup>ab</sup>	9.7±.6 <sup>a</sup>
3-MH derived from feed (μmol/d)	3.2±.03 <sup>a</sup>	3.2±.2 <sup>ab</sup>	3.1±.2 <sup>b</sup>	2.8±.2 <sup>c</sup>
3-MH derived from muscle (μmol/d)	3.7±.5 <sup>b</sup>	4.4±.3 <sup>b</sup>	4.7±.8 <sup>b</sup>	5.6±.5 <sup>a</sup>
Kd (%/d)	3.8±.3 <sup>b</sup>	4.6±.4 <sup>b</sup>	4.8±1.1 <sup>b</sup>	6.6±.6 <sup>a</sup>
Ks (%/d)	9.7±1.1 <sup>b</sup>	10.9±.8 <sup>a</sup>	11.2±1.6 <sup>a</sup>	11.3±1.2 <sup>a</sup>

Values given are means±S.D. Values not sharing a common superscript are significantly different (P< .05).

筋肉中3-MH量は、前章の実験では実測したが、ここでは、筋肉量を体重の29.3%、筋肉中の3-MHを0.61 μmol/gとして計算した。3-MH排泄量は、雄では飼料中のT<sub>4</sub>レベルが高くなるにつれて増加し、3.6ppm区では有意差が認められた。しかし、雌ではT<sub>4</sub>投与の影響は認められなかった。Kdは雄では投与区で全て増加し、3.6ppm区では有意差が認められた。しかし、雌ではT<sub>4</sub>の影響は認められなかった。Kdに対するT<sub>4</sub>と性の交互作用にも統計的有意性が認められた。Ksは、雄の場合、投与区で全て有意に高い値を示したが、雌では影響がなかった。

Singhら<sup>49)</sup>は白レグの雄ヒナに少量のT<sub>4</sub>を投与したとき成長が促進されたことを認めている。筆

Table 6.  
Effect of dietary thyroxine on body weight gain, feed efficiency, breast muscle (M. pectoralis profundus) weight, liver weight, abdominal fat content and rates of muscle protein degradation(Kd) and synthesis(Ks) in female broiler chickens

Thyroxine level (ppm)	0	.4	1.2	3.6
Initial body-wt (g)	266± 9	267± 7	267± 8	266± 4
Body-wt (g/12d)	396±34 <sup>a</sup>	380±37 <sup>a</sup>	402±38 <sup>a</sup>	294±40 <sup>b</sup>
Feed efficiency	.54±.03 <sup>b</sup>	.57±.06 <sup>ab</sup>	.58±.02 <sup>a</sup>	.53±.04 <sup>b</sup>
Breast muscle wt (g)	15.2± .8 <sup>ab</sup>	14.5±1.5 <sup>bc</sup>	16.3±1.3 <sup>a</sup>	13.1±1.5 <sup>c</sup>
Liver wt (g)	22.5±2.2 <sup>a</sup>	20.8±2.5 <sup>a</sup>	22.5±1.6 <sup>a</sup>	17.2±2.8 <sup>b</sup>
Abdominal fat content (g)	7.7±2.8 <sup>a</sup>	4.8±2.1 <sup>b</sup>	3.6± .8 <sup>b</sup>	.6± .6 <sup>c</sup>
Total excreted 3-MH (μmol/d)	7.9± .9	7.5± .8	7.4± .7	6.9±1.0
3-MH derived from feed (μmol/d)	3.1± .1 <sup>a</sup>	2.8± .3 <sup>a</sup>	2.9± .2 <sup>a</sup>	2.3± .2 <sup>b</sup>
3-MH derived from muscle (μmol/d)	3.9± .6	3.8± .7	3.7± .4	3.7± .7
Kd (%/d)	4.1±1.2	4.2±1.4	3.8± .7	4.4±1.3
Ks (%/d)	9.8± .9	10.3±1.2	10.7± .5	9.1±2.1

Values given are means±S.D. Values not sharing a common superscript are significantly different (P< .05).

者らは、マウスを用いて、同様の効果を認め、さらに、T<sub>4</sub>投与が若いマウスの肝臓蛋白質のKsを高めることを示した<sup>39)</sup>。

本実験では、T<sub>4</sub>投与により飼料効率が改善された。これは興味ある知見である。甲状腺ホルモン投与により基礎代謝が低下するとは考えにくいので、この理由としてはKsが高くなったことや、蛋白質の蓄積効率 ( $\frac{Ks-Kd}{Ks}$ ) <sup>40)</sup> が良くなったことおよび雌の場合には脂肪蓄積が減少して、蛋白質蓄積が増加したことなどが考えられる。筋肉量、Kd、Ksならびに腹腔脂肪量に対するT<sub>4</sub>の影響が雌雄で異なるのも興味ある事実である。筋肉量、KdおよびKsは雄の場合にのみT<sub>4</sub>投与によって

変化した。これはアンドロジェンと甲状腺ホルモンの相互作用によるものではないと思われる。鶏の脂質代謝に対してエストロジェンと甲状腺ホルモンが相乗的に作用することを秋葉ら<sup>45)</sup>は報告している。本実験では、雌の場合、0.4ppmのT<sub>4</sub>によっても腹腔脂肪が明らかに低下した。これは、エストロジェンの脂肪蓄積作用がT<sub>4</sub>によって抑制されたことによると考えられる。

甲状腺機能を制御することにより、飼料効率を高め、筋肉生産量を増し、さらに脂肪蓄積を減少できるとすれば、ブロイラー産業にとって誠に有益である。しかし、本研究の結果を実際に応用するには、さらに多くの点について検討しなければならない。

## 6. ブロイラーの筋肉蛋白質合成・分解速度に対するヨードカゼイン投与の影響

甲状腺ホルモンは高価であるので、実用化するにはこれに代る安価なものが必要である。古くより使用されているヨードカゼインは甲状腺ホルモン活性を有し、安価でさらに安全であるので、有望である。

Table 7.  
Effect of dietary inclusion of iodinated casein (300ppm) on body weight gain, feed efficiency, liver weight, abdominal fat content, breast muscle (M. pectoralis profundus) weight and rates of muscle protein degradation (Kd) and synthesis(Ks) in male broiler chickens

	control	treatment
Initial body-wt (g)	274± 4	275± 5 *
Body-wt (g/12d)	426±44	469±17
Feed efficiency	.56±.04	.57±.05
Breast muscle wt (g)	16.7±2.4	18.1±1.4
Liver wt (g)	25.2±2.0	28.8±3.4
Abdominal fat content (g)	8.9±2.6	10.7±4.3
Total excreted 3-MH (μmol/d)	7.9± .2	8.8±1.4
3-MH derived from feed (μmol/d)	3.2± .1	3.4± .4
3-MH derived from muscle (μmol/d)	3.8± .3	4.3±1.0
Kd (%/d)	4.3± .5	4.6±1.1
Ks (%/d)	10.9± .3	11.8±1.3

Values given are means±S.D. Values differ significantly from those for layer chickens: \* P< .05, \*\* P< .01

前述のT<sub>4</sub>の試験に準じて、ヨードカゼイン（伊勢化学工業株式会社・東京）の試験を行った。ただし、雄を使用、各区5反復とし、添加量は300ppmとした。ヨードカゼイン300ppmはT<sub>4</sub>1.2ppmに相当する。その結果を表7に示した。ヨードカゼインの効果は、概ね、T<sub>4</sub>の効果と一致した。試験区において、増体量、飼料効率、深胸筋重量、肝臓重量、腹腔脂肪量、KdおよびKsがいずれも高い値を示した。しかし、有意差が認められたのは増体量のみであった。ヨードカゼインの効果を明確にすべく現在、研究を続けているところである。

## 7. まとめ

本報告では、まず、3-メチルヒスチジンの定量法について述べ、次に、3-メチルヒスチジン法による鶏筋肉蛋白質の合成・分解速度測定法について述べた。また、この方法により、ブロイラーと卵用鶏の筋肉蛋白質の合成・分解速度を比較し、合成速度は両者に差がないが分解速度はブロイラーが低いことを示した。さらに、サイロキシン投与によりブロイラーの生産性が改善される可能性を示した。すなわち、適量のサイロキシンは雄では筋肉蛋白質の合成を促進して筋肉量を増し、雌では脂肪を減少させる。ヨードカゼインを用いた実験でも同様の結果が得られ実用化の可能性が示唆された。ブロイラーの生産性を高めるための研究の一指針として、今後、蛋白質蓄積効率（ $\frac{Ks-Kd}{Ks}$ ）の考え方をとり入れることは極めて有効なことではないかと考えられる。

謝 辞

これらの研究は本学農学部家畜栄養学教室の富田裕一郎教授、豊水正昭博士ならびに学生との共同研究として行ったものであり厚く謝意を表します。また、本論文をまとめるにあたり、多くの貴重な御助言をいただいた新潟大学農学部石橋晃助教授に感謝いたします。

## 文 献

- 1) 駒井亨、1986、ブロイラー産業、その21世紀への構図、畜産の研究40、193-197
- 2) 横山政廣、1987、昭和62年度農業観測の概要（1）畜産の研究41、983-988
- 3) 同上、1987、同上（2）同上41、1095-1098
- 4) 谷茂夫、1980、農業技術大系、畜産論5、ブロイラー基礎編43-52、農産漁村文化協会
- 5) Schoenheimer, R., S. O. Ratner and D. Rittenberg, 1939, Studies in Protein metabolism. VII. The metabolism of tyrosine, J. Biol. Chem., 127, 333-344.
- 6) Waterlow, J. C., P. J. Garlick and D. J. Millward (Eds.), 1978, Protein turnover in mammalian tissues and in the whole body, North-Holland Publishing Company, Amsterdam, New York, Oxford.
- 7) 西澤直行、板橋久雄、1984、3-メチルヒスチジン法による骨格筋タンパク質の分解及び合成速度の測定とその応用、栄養生理研究会報28：97-110

- 8) 西澤直行、1984、筋肉蛋白質の分解速度と栄養、化学と生物22 : 819-821.
- 9) Rennie, M. J. and D. J. Millward, 1983, 3-Methylhistidine excretion and the urinary 3-methylhistidine/creatinine ratio are poor indicators of skeletal muscle protein breakdown, *Clinical Science*, 65 : 217-225.
- 10) 門脇基二、野口忠、1984、3-メチルヒスチジン法は有効か、日農化誌58 : 419-424.
- 11) Murray, A. J., M. K. Nield, L. M. Jones, N. Galbraith and F. M. Tomas, 1985, Metabolism of N<sup>ε</sup>-methylhistidine by mice, *Biochem. J.*, 232 : 409-413.
- 12) Harris, C. I. and G. Milne, 1981, The inadequacy of urinary N<sup>ε</sup>-methyl histidine excretion in the pig as a measure of muscle protein breakdown, *Br. J. Nutr.*, 45 : 423-429.
- 13) Harris, C. I. and G. Milne, 1980, The urinary excretion of N<sup>ε</sup>-methyl histidine in sheep : an invalid index of muscle protein breakdown, *Br. J. Nutr.*, 44 : 129-140.
- 14) Harris, C. I. and G. Milne and R. Mcdiarmid, 1987, The retention and metabolism of N<sup>ε</sup>-methylhistidine by cockerels : implications for the measurement of muscle protein breakdown determined from the excretion of N<sup>ε</sup>-methylhistidine in excreta, *Br. J. Nutr.*, 57 : 467-478.
- 15) Long, C. L., N. Haverberg, V. R. Young, J. M. Kinney, H. N. Munro and J. W. Geiger, 1975, Metabolism of 3-methylhistidine in man, *Metabolism*, 24 : 929-935.
- 16) Harris, C. I. and G. Milne, 1981, The urinary excretion of N<sup>ε</sup>-methylhistidine by cattle : validation as an index of muscle protein breakdown, *Br. J. Nutr.*, 45 : 411-422.
- 17) Young, V. R., Alexis, S. D., Baliga, B. S., Munro, H. N., and Muecke, W., 1972, Metabolism of administered 3-methylhistidine. Lack of muscle transfer ribonucleic acid charging and quantitative excretion as 3-methylhistidine and its N-acetyl derivative, *J. Biol. Chem.*, 247 : 3592-3600.
- 18) Nishizawa, N., T. Noguchi and S. Hareyama, 1978, Quantitative isolation of N<sup>ε</sup>-methylhistidine by ion-exchange paper and column chromatography, *J. Chromatogr.*, 151 : 424-427.
- 19) Ward, L. C., 1978, A ninhydrin-orthophthalaldehyde reagent for the determination of N<sup>ε</sup>-methylhistidine, *Anal. Biochem.*, 88 : 598-604.
- 20) Hayashi, K., Y. Maeda, M. Toyomizu and Y. Tomita, 1987, High-performance



- liquid chromatographic method for the analysis of  $N^{\epsilon}$ -methylhistidine in food, chicken excreta, and rat urine, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 33 : 151-156.
- 21) Kadowaki, M., T. Nagasawa, T. Hirata, T. Noguchi and H. Naito, 1985, Effects of Insulin, amino acids and fasting on myofibrillar protein degradation in perfused hindquarters of rats, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 31 : 431-440.
  - 22) Macdonald, M. L. and R. W. Swick, 1981, The effect of protein depletion and repletion on muscle-protein turnover in the chick, *Biochem. J.* 194, 811-819.
  - 23) Hayashi, K., A. G. Kayali and V. R. Young, 1986, Synergism of triiodothyronine and corticosterone on muscle protein breakdown, *Biochim. Biophys. Acta* 883 : 106-111.
  - 24) Carter, W. J., W. S. W. Benjamin and F. H. Faas, 1981, Effect of experimental hyperthyroidism on skeletal-muscle proteolysis, *Biochem. J.* 194 : 685-690.
  - 25) Bates, P. C. and D. J. Millward, 1981, Characteristics of skeletal muscle growth and protein turnover in a fast-growing rat strain, *Br. J. Nutr.* 46 : 7-13.
  - 26) Maeda, Y., K. Hayashi, S. Toyohara and T. Hashiguchi, 1984, Variation among chicken stocks in the fractional rates of muscle protein synthesis and degradation, *Biochem. Genet.* 22 : 687-700.
  - 27) Hayashi, K., Y. Tomita, Y. Maeda, Y. Shinagawa, K. Inoue and T. Hashizume, 1985, The rate of degradation of myofibrillar proteins of skeletal muscle in broiler and layer chickens estimated by  $N^{\epsilon}$ -methylhistidine in excreta, *Br. J. Nutr.*, 54 : 157-168.
  - 28) Funabiki, R., Y. Watanabe, N. Nishizawa and S. Hareyama, 1976, Quantitative aspect of the myofibrillar protein turnover in transient state on dietary protein depletion and repletion revealed by urinary excretion of  $N^{\epsilon}$ -methylhistidine, *Biochim. Biophys. Acta* 451 : 143-150.
  - 29) Nagasawa, T. and Funabiki, R., 1981, Quantitative determination of urinary  $N^{\epsilon}$ -methylhistidine output as an index of myofibrillar protein degradation, *J. Biochem.* 89 : 1155-1161.
  - 30) 長澤孝志、船引龍平、安藤明代、1984、横隔膜インキュベーション系におけるチロシンおよび $N^{\epsilon}$ -メチルヒスチジンの放出に対するプロテアーゼ阻害剤の影響、*日本栄養食糧学会誌* 37 : 366-368
  - 31) 下尾崎裕輔、林國興、豊水正昭、富田裕一郎、1988、成長段階の異なるラットの筋肉タンパク質分解に対するコルチコステロン投与の影響、第42回日本栄養食糧学会総会講演要旨 P.24

- 32) Kang, C. W., M. L. Sunde and R. W. Swick, 1985, Growth and protein turnover in the skeletal muscle of broiler chicks, *Poultry Sci.* 64 : 370-379.
- 33) Jones, S. J., E. D. Aberle and M. D. Judge, 1986, Skeletal muscle protein turnover in broiler and layer chicks, *J. Anim. Sci.* 62 : 1576-1588.
- 34) Klasing, K. C. and C. C. Calvert, 1987, Growth characteristics, protein synthesis, and protein degradation in muscles from fast and slow-growing chickens, *Poultry Sci.* 66 : 1189-1196.
- 35) Jones, S. J., E. D. Aberle and M. D. Judge, 1986, Estimation of the fractional breakdown rates of myofibrillar proteins in chickens from quantitation of 3-methylhistidine excretion, *Poult. sci.* 65 : 2142-2147.
- 36) Maeda, Y, K. Hayashi, T. Hashiguchi and S. Okamoto, 1986, Genetic studies on the muscle protein turnover rate of coturnix quail, *Biochem. Genetics* 24 : 207-216.
- 37) Scanes, C. G., S. Harvey, J. M. Marsh and D. B. King, 1984, Hormones and growth in poultry, *Poult. Sci.* 63 : 2062-2074.
- 38) Brown, J. G., P. C. Bates, M. A. Holliday and D. J. Millward, 1981, Thyroid hormones and muscle protein turnover, *Biochem. J.* 194 : 771-782.
- 39) Hayashi, K., Y. Akiba, Y. Tomita and T. Matsumoto, 1984, The concerted effects of thyroid function and dietary protein on growth and protein metabolism in mice at different growth stages, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 30 : 235-244.
- 40) Suthama, N., K. Hayashi, M. Toyomizu and Y. Tomita, submitting to *Poult. Sci.*
- 41) Akiba, Y., T. Takahashi, M. Kimura, S. -I. Hirama and T. Matsumoto, 1988, The influence of environmental temperature, thyroid status and a synthetic oestrogen on the induction of fatty livers in chicks, *Br. Poult. Sci.* 24 : 71-80.
- 42) Elks, M. L. and V. C. Manganiello, 1985, Effects of thyroid hormone on regulation of lipolysis and adenosine 3' , 5' - monophosphate metabolism in 3T3-L1 adipocytes, *Endocrinology*, 117 : 47-953.
- 43) Singh, A., E. P. Reineke and R. K. Ringer, 1968, Influence of thyroid status of the chick on growth and metabolism, with observations on several parameters of thyroid function, *Poult. Sci.*, 47 : 212-219.
- 44) 船引龍平、1986、タンパク質代謝回転は無駄なサイクルか、*生化学* 58 : 1150-1156
- 45) Akiba, Y., K. Takahashi, A. Matsuda and T. Matsumoto, 1982, Synergism of antithyroid agent and estrogen in the induction of experimental fatty livers

in growing chicks, Jpn. Poult. Sci., 19 : 238-244.