

平成26年度

食肉に関する

助成研究調査成果報告書

VOL. 33

公益財団法人

伊藤記念財団



## 「伊藤記念財団」設立趣意書

私、伊藤傳三は、昭和3年食肉加工業を創業して以来五十有余年の永きにわたり食肉加工品の製造販売に従事して参ったところであります。

この間、昭和47年からは日本ハム・ソーセージ工業協同組合理事長、社団法人日本食肉加工協会理事長、加えて、ハンバーグ・ハンバーガー協会理事長等の重責を担わせていただく等、業界団体の役員を勤めさせていただいてきたところあります。

こうした中で昭和55年、はからずも勲二等瑞宝章受章という身にあまる榮譽に浴したのでありますが、受章に際し私自身の過ぎ来し方を振り返り、食肉及び食肉加工業界の行く末に思いを致し、2つの事柄を決意致しました。

第1は、食肉加工団体の指導体制の若返りであり、

第2は、食肉加工業の基礎的研究の充実であります。

諸情勢が激しく変わりつつある中で食肉加工業界をさらに大きく発展させるには、新しいリーダーの登場が望ましいことは論をまちません。また、食肉加工品については、これまでも日本独自の技術開発は行われてきましたものの、いずれも企業内技術であると言っても過言でなく、大学等における基礎的研究の不足が将来の日本の食肉加工業の発展を遅らせるおそれがあり、この現状を打破する必要があると考えたところあります。

以上のような基本的考えの下に私は、食肉関係団体等の役員を辞すると共に、食肉及び食肉加工に関する基礎的かつ広汎な研究を行い、あるいは助長するための財団の設立を発起するものであります。

昭和56年6月

設立発起人 伊 藤 傳 三

## Philosophy Behind the Establishment of the Ito Foundation

Approximately half of a century has passed since I established a meat packing corporation for commercial products in 1928. While involved in this business, I have had occasion to serve as chairman of the boards of trustees of several organizations related to the meat industry, such as the Ham-Sausage Industrial Association of Japan in 1972, the Meat Packing Industrial Association of Japan, and the Hamburg-Hamburger Association of Japan.

In 1980, unexpectedly, I was highly honored to receive the Order of the Sacred Treasure, Gold and Silver Star from the emperor in acknowledgment of my contributions to the meat industry and improved human nutrition during my career. This illustrious award provided a strong impetus for me to act on my long-standing concern for the future of meat packing industries.

My commitment to the establishment of a new research foundation for the promotion of meat science was based on two fundamental philosophies : first, leadership of the Association of the Meat Packing Industry should be transferred to people with novel ideas and, second, an advanced system for basic research should be established in meat industries. Clearly, fresh leadership is needed in changing situations for intensive development in the meat packing industry. Although some technical product developments have been achieved in certain individual corporations, the lack of basic research in meat science at universities and other research organizations certainly will impede future development of Japanese meat packing industries. It is urgent to end the stagnation in the meat industry through research support.

On the basis of these philosophies, I myself will resign from any official positions in meat-related associations and will establish a new research foundation to support and promote basic and applied research in meat science.

Denzo Ito, Founder  
June 1981

## 事業のあらまし

### (目的)

本財団は、食肉に関する研究及び調査を行い、もって畜産業及び食品産業の振興と国民食生活の安定に資することを目的とする。

### (事業)

本財団は、上述の目的を達成するため、次の事業を行う。

- (1) 食肉の生産、処理、加工等に関する基礎的研究及び調査。
- (2) 食肉の生産、処理、加工等に関する研究又は調査を行う大学等の研究機関に対する助成。
- (3) 食肉の生産、処理、加工等に関する情報の普及及び広報。

### (事業実績)

| 回   | 年度     | 研究調査助成 |          |
|-----|--------|--------|----------|
| 第1回 | 昭和57年度 | 48件    | 60,000千円 |
| 2   | 58     | 52     | 54,400   |
| 3   | 59     | 60     | 49,800   |
| 4   | 60     | 62     | 48,000   |
| 5   | 61     | 70     | 53,000   |
| 6   | 62     | 79     | 58,900   |
| 7   | 63     | 95     | 70,500   |
| 8   | 平成元年度  | 86     | 74,250   |
| 9   | 2      | 79     | 60,000   |
| 10  | 3      | 70     | 50,000   |
| 11  | 4      | 86     | 60,000   |
| 12  | 5      | 81     | 60,000   |
| 13  | 6      | 81     | 60,000   |
| 14  | 7      | 82     | 65,000   |
| 15  | 8      | 81     | 69,100   |
| 16  | 9      | 78     | 59,000   |
| 17  | 10     | 82     | 60,000   |
| 18  | 11     | 67     | 47,000   |
| 19  | 12     | 57     | 41,000   |
| 20  | 13     | 53     | 37,000   |
| 21  | 14     | 58     | 40,000   |
| 22  | 15     | 55     | 41,000   |
| 23  | 16     | 55     | 48,000   |
| 24  | 17     | 56     | 48,000   |
| 25  | 18     | 11     | 10,000   |
| 26  | 19     | 12     | 10,000   |
| 27  | 20     | 15     | 16,900   |
| 28  | 21     | 11     | 10,000   |
| 29  | 22     | 11     | 10,400   |
| 30  | 23     | 12     | 12,000   |
| 31  | 24     | 13     | 13,000   |
| 32  | 25     | 38     | 37,000   |
| 33  | 26     | 58     | 54,800   |

## ご 挨拶

当伊藤記念財団は、伊藤ハム株式会社の創業者故伊藤傳三による巻頭の「設立趣意書」に掲げた趣意をもって、昭和56年7月3日に財団法人として農林水産大臣から設立を許可され、平成24年4月1日に公益財団法人伊藤記念財団に移行登記したものであり、事業の内容は、「事業のあらまし」にあるとおりであります。

おかげ様で当財団は、平成24年度からは公益財団法人として活動することとなり、その活動は本年で34年となります。この間、当財団の研究調査助成事業の存在が畜産関係の方々間に浸透いたし、事業内容も逐次充実して参りつつあります。

これは、ひとえに関係各位のご指導ご鞭撻の賜と深く感謝申し上げるとともに、今後とも、食肉加工等の基礎的研究の充実を希う創設者の意志にそって、益々食肉産業ひいては畜産業の振興及び国民食生活の安定のために役立つべく、更に努力を重ねて参りたいと存じております。

本書は、第33回（平成26年度）助成事業における58件の研究調査助成対象研究者の皆様からいただいた研究成果報告をとりまとめたものでありますが、以上の目的にしたがって、食肉産業の基礎的研究等に携わる諸氏の研究の一助ともなれば幸甚でございます。

平成27年11月

理事長 伊 藤 功 一

Dear Sir :

I am very pleased to send you and your organization a complimentary copy of the research reports of the Ito Foundation. This research foundation was founded by the late Mr.Denzo Ito to advance research in meat science. The research reports are published annually. Unfortunately, the articles are largely in Japanese ; however, in the future we hope to contribute to the international development of meat science. Any constructive suggestions or critiques from others involved in meat-related research would be accepted gratefully.

You will find out philosophy behind the establishment of the Ito Foundation described by Mr.Denzo Ito, in the research report of the Ito Foundation, Vol.33 enclosed here. We appreciate any interest you may have in our research efforts.

It is my great pleasure to publish this report as the chief director.

Sincerely yours,  
Nov. 2015  
Koichi Ito  
The chief director  
The Ito Foundation



## 目 次

|  |    |
|--|----|
| ポリフェノールの強力な還元性を利用した食肉新鮮色の保持研究<br>……………増 田 俊 哉（徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部）……………                      | 1  |
| 豚血液由来食品素材の給与が脂質代謝に及ぼす影響<br>……………上曾山 博（神戸大学大学院農学研究科）……………   | 9  |
| 発酵食肉製品由来の機能性ペプチドに関する研究<br>……………津 田 治 敏（県立広島大学生命環境学部）……………  | 14 |
| 食肉の給与が海馬のタンパク質リン酸化および遺伝子発現に及ぼす影響<br>……………豊田 淳・下西 ひかり・後藤 達彦（茨城大学農学部）……………                             | 19 |
| 食肉製品の塩漬熟成に伴う呈味性発現に関する研究<br>……………市村 さやか・中村 幸信・吉田 由香・服部 昭仁<br>（一般社団法人食肉科学技術研究所）……………                   | 23 |
| 調理加工食肉・肉製品の機能性成分およびその発現に関する研究<br>……………六車 三治男・木本 早紀・川北 久美子・竹之山 愼一<br>（南九州大学健康栄養学部）……………               | 30 |
| 牛肉の匂いに及ぼす熟成と加熱調理の影響<br>……………小林 正人・佐々木 整輝（一般社団法人家畜改良事業国家畜改良技術研究所）……………                                | 39 |
| 短波帯交流電界による真空包装食肉加工品の迅速殺菌<br>……………植 村 邦 彦（農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所）……………                                | 46 |
| 可視・近赤外分光可視化法による生肉の微生物汚染状況の非破壊評価<br>……………牧野 義雄・モハメド カムルザマン（東京大学大学院農学生命科学研究科）……………                     | 51 |
| 牛肉に関する消費者ニーズの研究—内因性価値と外因性価値の特定<br>……………広岡 博之・長命 洋佑*<br>（京都大学大学院農学研究科, *九州大学大学院農学研究科）……………            | 56 |
| 味覚センサを用いた和牛の味の数値化と可視化に関する研究<br>……………都甲 潔・田原 祐助（九州大学システム情報科学研究所）……………                                 | 63 |
| レトルト加熱処理を施した筋原線維タンパク質の培養骨芽細胞の分化に及ぼす影響<br>……………林 利哉・深見 渉・小川 幸彦*・芳賀 聖一<br>（名城大学農学部, *名城大学農学部附属農場）…………… | 68 |

|  |     |
|--|-----|
| メタボロミクス解析による黒毛和種牛肉の美味しさに関わる指標の探索<br>……鈴木 啓一 <sup>1</sup> ・飯田 文子 <sup>2</sup> ・小松 智彦 <sup>3</sup> ・庄司 則章 <sup>3</sup> ・加藤 和雄 <sup>1</sup><br>( <sup>1</sup> 東北大学大学院農学研究科, <sup>2</sup> 日本女子大学, <sup>3</sup> 山形県総合農業センター) ……………  | 73  |
| ミオシンの水溶化現象に関連するミオシン尾部領域の特定<br>……………早 川 徹(帯広畜産大学畜産衛生学研究部門) ……………  | 79  |
| 畜産物由来ヘム鉄摂取が発育期スポーツ選手に及ぼす影響<br>～食事摂取状況と体組成・気分の変化から～<br>……………坂元 美子・吉川 豊(神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科) ……………  | 84  |
| 冠動脈疾患患者における食肉類の摂取と血中アミノ酸・脂肪酸組成,<br>動脈硬化惹起性リポ蛋白および血栓因子との関連に関する研究<br>……………木庭 新治 <sup>1</sup> ・横田 裕哉 <sup>1</sup> ・小林 洋一 <sup>1</sup> ・高尾 哲也 <sup>2</sup><br>中嶋 克行 <sup>3</sup> ・高田 明和 <sup>4</sup><br>( <sup>1</sup> 昭和大学医学部, <sup>2</sup> 昭和女子大学, <sup>3</sup> 群馬大学, <sup>4</sup> 浜松医科大学) …………… | 90  |
| 豚レバーパウダーの脂質代謝に及ぼす分子機能解明<br>……………岡 本 芳 晴(鳥取大学農学部) ……………   | 97  |
| ポークソーセージの「こく」とその寄与因子の解明<br>……………西村 敏英・江草 愛(日本獣医生命科学大学応用生命科学部食品科学科) ……………   | 101 |
| 新規機能性脂肪酸, フィタン酸の定量分析法の確立<br>……………河原 聡・仲西 友紀(宮崎大学農学部) ……………   | 109 |
| 牛肉のおいしさに影響する筋内遊離脂肪酸についての研究(第4報)<br>……………山之上 稔・西田 昌弘・趙 姫楠・上田 修司<br>井原 一高・豊田 浄彦<br>(神戸大学大学院農学研究科) ……………  | 116 |
| 金属表面洗浄時における食肉由来汚れの脱離特性に及ぼす外部電位印加の効果<br>……………今村 維克・石田 尚之(岡山大学大学院自然科学研究科) ……………  | 121 |
| 脂質代謝および感染症研究のための豚・牛由来肝臓細胞の樹立<br>……………福 田 智 一(東北大学農学研究科) ……………  | 127 |
| 牧草由来の機能性成分を用いた初乳中免疫グロブリンの改善方法の開発<br>……………久米 新一・王 蒙東・谷口 紗耶(京都大学大学院農学研究科) ……………  | 134 |
| スカトールによる胆汁酸代謝の攪乱: ヒト・家畜の健康維持を目指したその制御<br>……………石塚 敏・清水 英寿(北海道大学大学院農学研究科) ……………  | 139 |
| 肉牛用発酵 TMR の飼料特性の評価<br>…齋 藤 早 春(地方独立行政法人北海道立総合研究機構農業研究本部畜産試験場) ……………  | 143 |
| 乳酸菌を用いた多剤耐性菌の殺菌効果の検討と機能性家畜飼料の開発<br>……………木 下 英 樹(宮城大学食産業学部フードビジネス学科) ……………  | 149 |



|   |     |
|---|-----|
| 食肉におけるカルノシン関連ジペプチド増量法確立のための基礎研究<br>..... 友永省三 (京都大学大学院農学研究科) .....  | 156 |
| 初期成長期のミオスタチン制御が黒毛和牛の肉質に及ぼす影響<br>..... 高橋秀之 (九州大学農学部附属農場) .....  | 160 |
| 黒毛和種子牛に対する血清亜鉛濃度の基準値の設定および亜鉛添加による<br>臨床的な疾病予防効果の検討<br>..... 乙丸孝之介・窪田力・時森麻紀子*<br>(鹿児島大学共同獣医学部, *北薩農業共済組合) .....                  | 164 |
| 和牛肉に含まれる機能性成分を左右する要因の検索<br>..... 平山琢二 (琉球大学農学部) .....   | 168 |
| 黒毛和種ゲノム DNA メチル化多型と肉質形質との関係に関する研究<br>..... 須田義人 (宮城大学食産業学部) .....   | 173 |
| 牛白血病ウイルスの垂直伝播に関する研究<br>..... 目堅博久 (宮崎大学農学部獣医学科) .....   | 179 |
| 人の食品由来回虫症の感染源対策：牛と家禽の疫学的役割と制御法の探索<br>..... 野中成晃・丸山治彦*・吉田彩子*・桐野有美<br>堀井洋一郎・三澤尚明・上村涼子<br>(宮崎大学農学部, *宮崎大学医学部) .....                | 184 |
| 肺炎原因菌の特定を目的とした気管支肺胞洗浄法の牛医療への応用<br>..... 帆保誠二・野口倫子 (鹿児島大学共同獣医学部) .....   | 189 |
| 食肉として消費される野生動物における食中毒菌の保有調査<br>..... 安藤匡子・中馬猛久 (鹿児島大学共同獣医学部) .....  | 194 |
| 繁殖疫学的手法を用いた黒毛和種牛繁殖農場の飼養形態の違いが繁殖成績に及ぼす影響の定量<br>..... 佐々木羊介・上松瑞穂*・北原豪**・大澤健司**<br>(宮崎大学テニユアトラック推進機構, *NOSAIみやざき, **宮崎大学農学部) ..... | 199 |
| I型インターフェロン応答性カタボリック活性の検出による牛妊娠検出技術の開発<br>..... 高橋昌志 (北海道大学大学院農学研究院) .....   | 204 |
| 黒毛和種の脂肪交雑形成に影響するビタミンAを輸送するRBP4のDNA多型探索<br>..... 平野貴・原ひろみ・半澤恵 (東京農業大学農学部) .....  | 210 |
| 黒毛和種の雌牛における空胎期間を短縮させる遺伝的要因の解明<br>..... 佐々木慎二 (独立行政法人家畜改良センター) .....   | 216 |
| 牛胚盤胞期胚における耐暑性付与に関する研究<br>..... 阪谷美樹・森美幸*<br>( (独) 農研機構九州沖縄農業研究センター畜産草地研究領域,<br>*福岡県農林業総合試験場生産環境部) .....                         | 219 |

|  |     |
|--|-----|
| ラテックス凝集反応による抗豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス抗体検出系の開発<br>..... 堀江 真行・上野 晃聖*   |     |
| (鹿児島大学共同獣医学部附属越境性動物疾病制御研究センター,<br>*鹿児島大学共同獣医学部動物衛生学分野) .....   | 226 |
| 新規増殖因子を用いた牛・豚精子幹細胞の純化・培養技術の開発<br>..... 高 島 誠 司 (信州大学繊維学部) .....  | 231 |
| 肥育前雌子牛の摘出卵巣からの胚生産の試み<br>..... 的場 理子・平尾 雄二・武田 久美子<br>(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所) .....             | 236 |
| 生体内卵子吸引・体外受精・胚移植による子豚生産技術の開発<br>..... 吉岡 耕治・的場 理子*<br>(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所, *畜産草地研究所) ..... | 242 |
| 血清中アミロイド A およびエンドトキシン活性値を指標とした牛複合性呼吸器疾患の<br>早期予後診断システムの構築<br>..... 鈴 木 一 由 (酪農学園大学獣医学群獣医学類) .....      | 248 |
| 豚流行性下痢ウイルスのウイルス受容体の検索<br>..... 白戸 憲也・松山 州徳・田口 文広*<br>(国立感染症研究所ウイルス第3部第4室, *日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科) .....   | 253 |
| 牛精子における暑熱ストレス耐性に関する要因解析<br>..... 山 中 賢 一 (佐賀大学農学部) .....   | 258 |
| 腸管内細菌による牛腸管外臓器汚染要因の解明<br>..... 中 馬 猛 久 (鹿児島大学共同獣医学部) .....   | 264 |
| 腫瘍細胞のモノクローナリティー性状を応用した牛白血病新規診断法の開発<br>..... 猪 熊 壽 (帯広畜産大学畜産学部) .....                                   | 271 |
| 牛卵管機能に及ぼす夏季暑熱ストレスの影響<br>～性ホルモン受容体とヒートショックタンパク質の関係性～<br>..... 山本 ゆき・奥田 潔 (岡山大学大学院環境生命科学研究科) .....       | 277 |
| 牛心臓由来ペプチドを活用した革新的コレステロール代謝改善素材開発のための基礎研究<br>..... 長 岡 利 (岐阜大学応用生物科学部) .....                            | 282 |
| 牛用腸溶性生菌剤カプセルが牛の腸内細菌相に与える影響<br>..... 瀬山 智博・平康 博章・吉田 弦・笠井 浩司<br>(地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所) .....          | 287 |
| 動物由来コロナウイルスの遺伝子操作系の確立と感染予防への応用<br>..... 神 谷 亘<br>(大阪大学微生物病研究所感染症国際研究センター臨床感染症学研究グループ) .....            | 294 |

|  |     |
|--|-----|
| 赤外線深度センサーによる和牛の分娩予測技術の検討<br>..... 小針 大助・岡山 毅 (茨城大学農学部) .....   | 299 |
| 豚流行性下痢の感染拡大リスクに関する研究<br>..... 関口 敏・乗峰 潤三 (宮崎大学農学部) .....   | 304 |
| 和牛のミオグロビン含量を指標とした肉色に関わるゲノム育種価の推定<br>..... 山崎 瑞穂・戸水 一志・河野 幸雄・渡邊 敏夫*・杉本 喜憲**<br>(広島県立総合技術研究所畜産技術センター, *独立行政法人家畜改良センター,<br>**公益社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所) ..... | 308 |
| 食肉に寄生する人獣共通幼線虫の分子生物学的種同定法の開発<br>..... 黄 鴻堅・平 健介 (麻布大学獣医学部) .....   | 314 |
| 牛の発情・妊娠における迅速かつ非破壊診断システムの開発<br>..... ツェンコヴァ ルミアナ・窪田 陽介・古川 茜<br>竹村 豪・ジョージ バザール<br>(神戸大学大学院農学研究科生体計測工学研究室) .....   | 319 |

## CONTENTS

|   |    |
|---|----|
| <b>Studies on fresh meat color preservation by use of the potent reducing activity of polyphenols</b>                                       |    |
| Toshiya Masuda<br>(Institute of Socio-Arts and Sciences, University of Tokushima) .....   | 1  |
| <b>Effects of dietary porcine blood-derived food ingredient on lipid metabolism</b>   |    |
| Hiroshi Kamisoyama<br>(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) .....  | 9  |
| <b>Functional peptides derived from fermented meat products</b>   |    |
| Harutoshi Tsuda<br>(Faculty of Life and Environmental Sciences, Prefectural University of Hiroshima) .....                                  | 14 |
| <b>Effects of meat supplementation on hippocampal protein phosphorylation and gene expression</b>   |    |
| Atsushi Toyoda, Hikari Shimonishi and Tatsuhiko Goto<br>(College of Agriculture, Ibaraki University) .....                                  | 19 |
| <b>Studies on the formation of specific meat taste in cured meat products</b>   |    |
| Sayaka Ichimura, Yukinobu Nakamura, Yuka Yoshida and Akihito Hattori<br>(Japan Meat Science and Technology Institute) .....                 | 23 |
| <b>The investigation of functional properties and its expression in cooked and processed meats</b>  |    |
| Michio Muguruma, Saki Kimoto, Kumiko Kawakita and Shinichi Takenoyama<br>(Faculty of Health and Nutrition, Minami Kyushu University) .....  | 30 |
| <b>The effect of aging and heat-cooking on the profile of aroma volatiles of beef</b>   |    |
| Masato Kobayashi and Seiki Sasaki<br>(Maebashi institute of animal science, Livestock improvement association of Japan, Inc) .....          | 39 |
| <b>Inactivation of microorganisms in packed meat products by radio frequency heating</b>  |    |
| Kunihiko Uemura<br>(National Food Research Institute, NARO) .....   | 46 |
| <b>Non-destructive analysis of spatial contamination of raw meat by microorganisms using visual and near-infrared multispectral imaging</b> |    |
| Yoshio Makino and Mohammed Kamruzzaman<br>(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo) .....                | 51 |

|  |    |
|--|----|
| <b>A study on consumers' needs for beef-identifying intrinsic and extrinsic quality values</b>   |    |
| Hiroyuki Hirooka and Yosuke Chomei *   |    |
| (Graduate School of Agriculture, Kyoto University, * Graduate School of Agriculture, Kyushu University) .....  | 56 |
| <b>A study on quantification and visualization for taste of wagyu beef using a taste sensor</b>  |    |
| Kiyoshi Toko and Yusuke Tahara   |    |
| (Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University) .....   | 63 |
| <b>Effect of retort processing on the osteoblast growth promoting activities of porcine myofibrillar protein</b>   |    |
| Toshiya Hayashi, Wataru Fukami, Yukihiko Ogawa * and Seiichi Haga  |    |
| (Faculty of Agriculture, Meijo University, * Experimental Farm, Meijo University) .....  | 68 |
| <b>Search for index related to delicious of Japanese Black Cattle Beef Meat by metabolomic analysis</b>  |    |
| Keiichi Suzuki <sup>1</sup> , Fumiko Iida <sup>2</sup> , Tomohiko Komatsu <sup>3</sup> , Noriaki Shoji <sup>3</sup> and Kazuo Katoh <sup>1</sup>   |    |
| ( <sup>1</sup> Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, <sup>2</sup> Japan Women's University, <sup>3</sup> Livestock Experiment Station of Yamagata Integrated Agricultural Research Center) ..... | 73 |
| <b>The identification of myosin rod region involved in the solubilization under the low ionic strength condition</b>   |    |
| Toru Hayakawa  |    |
| (Department of Animal and Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine) .....   | 79 |
| <b>Influence of heme-iron supplement derived from animal production absorption on the athlete of growth phase</b>  |    |
| Yoshiko Sakamoto and Yutaka Yoshikawa  |    |
| (Department of Health, Sports and Nutrition, Kobe Women's University) .....  | 84 |
| <b>Studies on relationship between meat intake level and the composition of blood amino acids, fatty acids, atherogenic lipoproteins and/or thrombotic factors in patients with coronary heart diseases</b>            |    |
| Shinji Koba <sup>1</sup> , Yuuya Yokota <sup>1</sup> , Youichi Kobayashi <sup>1</sup> , Tetsuya Takao <sup>2</sup> , Katsuyuki Nakajima <sup>3</sup> and Akikazu Takada <sup>4</sup>                                   |    |
| ( <sup>1</sup> Showa University School of Medicine, <sup>2</sup> Showa Women's University, <sup>3</sup> Gunma University, <sup>4</sup> Hamamatsu University School of Medicine) .....                                  | 90 |
| <b>Molecular function analysis of lipid metabolism induced by porcine liver powder</b>   |    |
| Yoshiharu Okamoto  |    |
| (Faculty of Agriculture, Tottori University) .....   | 97 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Studies on clarification of the compounds involved in “koku attributes” of pork sausages</b>   |     |
| Toshihide Nishimura and Ai Egusa  |     |
| (Department of Food Science and Technology, Faculty of Applied Life Science, Nippon Veterinary and Life Science University) .....                         | 101 |
| <b>Establishment of a method for quantitative analysis of a novel functional fatty acid, phytanic acid</b>  |     |
| Satoshi Kawahara and Tomonori Nakanishi   |     |
| (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) .....  | 109 |
| <b>Intramuscular free fatty acids related to beef eating quality, PartIV</b>  |     |
| Minoru Yamanoue, Masahiro Nishida, Anan Cho, Syuji Ueda, Ikko Ihara and Kiyohiko Toyoda   |     |
| (Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) .....  | 116 |
| <b>Investigation of the effects of applied surface electric potential on the removal behavior of meat borne soilings on metal surface during cleaning</b> |     |
| Koreyoshi Imamura and Naoyuki Ishida  |     |
| (Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University) .....   | 121 |
| <b>Establishment of bovine and swine derived hepatocytes for the lipid metabolism and infection study</b>   |     |
| Tomokazu Fukuda   |     |
| (Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University) .....  | 127 |
| <b>Effects of functional components in grass on enhancing immunoglobulin in colostrum</b>   |     |
| Shinichi Kume, Mengdong Wang and Saya Taniguchi   |     |
| (Graduate School of Agriculture, Kyoto University) .....  | 134 |
| <b>Dysregulation of bile acid metabolism by skatole : Control of the regulation towards health promotion in both humans and livestock</b>                 |     |
| Satoshi Ishizuka and Hidehisa Shimizu   |     |
| (Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University) .....  | 139 |
| <b>Estimation of feed characteristics of fermented total mixed ration for beef cattle</b>   |     |
| Waka Saito  |     |
| (Hokkaido Research Organization, Agriculture Research Department, Amino Research Center) .....  | 143 |
| <b>Bactericidal effect of multi-drug resistance bacteria using lactic acid bacteria and development of functional domestic animal fodder</b>              |     |
| Hideki Kinoshita  |     |
| (Miyagi University, Department of Food Management, School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Department of Food Management) .....          | 149 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Basic study for the establishment of the method to increase carnosine-related dipeptide levels in meats</b>  |     |
| Shozo Tomonaga<br>(Graduate School of Agriculture, Kyoto University) .....  | 156 |
| <b>Effect of myostatin control during early growth period on meat quality of Japanese Black cattle</b>  |     |
| Hideyuki Takahashi<br>(Kuju Agricultural Research Center, Kyushu University) .....  | 160 |
| <b>Basal serum zinc value in Japanese Black calves and effect of supplemental zinc in Japanese Black calves against clinical diseases</b>   |     |
| Konosuke Otomaru, Chikara Kubota and Makiko Tokimori *<br>(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, * Hokusathu Agricultural Mutual Aid Associations) .....  | 164 |
| <b>The factor of functional component on Wagyu meat</b>   |     |
| Takuji Hirayama<br>(Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus) .....  | 168 |
| <b>The research for relationships among genome DNA methylation polymorphism and carcass traits in Japanese beef cattle</b>  |     |
| Yoshihito Suda<br>(School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University) .....  | 173 |
| <b>Studies on perinatal transmission of bovine leukemia virus</b>   |     |
| Hirohisa Mekata<br>(Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) .....  | 179 |
| <b>A countermeasure against the infectious source of human toxocariasis and ascariasis : An epidemiological role of cattle and chickens and development of a control measure</b>  |     |
| Nariaki Nonaka, Haruhiko Maruyama *, Ayako Yoshida *, Yumi Kirino, Yoichiro Horii,<br>Naoaki Misawa and Ryoko Uemura<br>(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, * Faculty of Medicine, University of Miyazaki) ..... | 184 |
| <b>Application of bronchoalveolar lavage to specify offending bacterium of the pneumonia to cow medical treatment</b>   |     |
| Seiji Hobo and Michiko Noguchi<br>(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) .....  | 189 |
| <b>Examination of food-borne bacteria in wild animals intended for consumption</b>  |     |
| Masako Andoh and Takehisa Chuma<br>(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) .....   | 194 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Standard operation procedures for Japanese Black cattle related to reproductive performance</b>   |     |
| Yosuke Sasaki, Mizuho Uematsu *, Go Kitahara ** and Takeshi Osawa **   |     |
| (Organization for Promotion of Tenure Track, University of Miyazaki, * NOSAI Miyazaki, ** Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) .....  | 199 |
| <b>Detection of type I interferon-mediated catabolic activity in blood and somatic cells for early pregnancy diagnosis</b>   |     |
| Masashi Takahashi  |     |
| (Research Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Lab of Animal Breeding and Reproduction) .....   | 204 |
| <b>Identification of polymorphisms on retinol binding protein 4 (RBP4) gene in Japanese black cattle</b>   |     |
| Takashi Hirano, Hiromi Hara and Kei Hanzawa  |     |
| (Tokyo University of Agriculture, Faculty of Agriculture) .....  | 210 |
| <b>Genetic analysis for days open in Japanese Black cattle</b>   |     |
| Shinji Sasaki  |     |
| (National Livestock Breeding Center) .....   | 216 |
| <b>The study of thermotolerance in bovine blastocysts</b>  |     |
| Miki Sakatani and Miyuki Mori *  |     |
| (Livestock and Grassland Research Division, Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), * Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center) ..... | 219 |
| <b>Development of latex agglutination tests for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses</b>  |     |
| Masayuki Horie and Kosei Ueno *  |     |
| (Transboundary Animal Diseases Research Center, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, * Laboratory of Animal Hygiene, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) .....  | 226 |
| <b>Development of porcine/bovine germline stem cell technology using novel growth factor</b>   |     |
| Seiji Takashima  |     |
| (Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University) .....  | 231 |
| <b>Production of embryos using growing oocytes derived from the ovaries removed bovine calves before fattening</b>   |     |
| Satoko Matoba, Yuji Hirao and Kumiko Takeda  |     |
| (NARO Institute of Livestock and Grassland Science) .....  | 236 |



|  |     |
|--|-----|
| <b>Production of piglets by ovum pick up, in vitro embryo production and embryo transfer</b>   |     |
| Koji Yoshioka and Satoko Matoba *  |     |
| (National Institute of Animal Health, * NARO institute of Institute of Livestock and Grassland Science, National Agriculture and Food Research Organization) .....   | 242 |
| <b>Establishment of early prognostic systems for Bovine Respiratory Diseases Complex using serum amyloid A and plasma endotoxin activity</b>   |     |
| Kazuyuki Suzuki  |     |
| (School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University) .....  | 248 |
| <b>Studies on the cellular receptor for porcine epidemic diarrhea virus</b>  |     |
| Kazuya Shirato, Shutoku Matsuyama and Fumihiro Taguchi *   |     |
| (Laboratory of Acute Respiratory Viral Diseases and Cytokines, Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases, * Department of Veterinary Science, Faculty of Veterinary Medicine, Nippon Veterinary and Life Science University) ..... | 253 |
| <b>Analysis of factors related to heat stress tolerance in bovine spermatozoa</b>  |     |
| Ken-ichi Yamanaka  |     |
| (Faculty of Agriculture, Saga University) .....  | 258 |
| <b>Enterobacterial contamination of extraintestinal organs in cattle</b>   |     |
| Takehisa Chuma   |     |
| (Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) .....   | 264 |
| <b>Development of new diagnostic methods for bovine leucosis by using monoclonarity of tumor cell</b>  |     |
| Hisashi Inokuma  |     |
| (Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine) .....  | 271 |
| <b>Effects of summer heat stress on the bovine oviductal functions</b>   |     |
| <b>~ Relationship between the receptors of sex steroid hormones and heat shock proteins ~</b>  |     |
| Yuki Yamamoto and Kiyoshi Okuda  |     |
| (Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University) .....  | 277 |
| <b>Basic study of the development of an innovative hypocholesterolemic food materials using cattle heart peptides</b>  |     |
| Satoshi Nagaoka  |     |
| (Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University) .....  | 282 |
| <b>Effect of administration of the enteric coated probiotic capsule on bacterial flora in cattle intestine</b>   |     |
| Tomohiro Seyama, Hirofumi Hirayasu, Gen Yoshida and Koji Kasai   |     |
| (Local incorporated administrative agency Research Institute of Environment, Agriculture and Fisheries, Osaka Prefecture) .....  | 287 |

**Establishment of reverse genetics system for animal coronavirus**

Wataru Kamitani

(Laboratory of Clinical Research on Infectious Diseases, Research Center for Infectious Disease Control, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University) ..... 294

**Prediction technique of parturition by IR depth sensor in beef cattle**

Daisuke Kohari and Tsuyoshi Okayama

(College of Agriculture, Ibaraki university) ..... 299

**Study on risk analysis of porcine epidemic diarrhea**

Satoshi Sekiguchi and Junzo Norimine

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ..... 304

**Prediction of genomic breeding values for meat color defined by myoglobin content in longissimus muscle of Japanese Black cattle**

Mizuho Yamasaki, Kazushi Tomizu, Sachio Kouno, Toshio Watanabe \* and Yoshikazu Sugimoto \*\*

(Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Livestock Research Center, \* National Livestock Breeding Center, \*\* Shirakawa Institute of Animal Genetics) ..... 308

**Development of molecular biological method for species identification of zoonotic nematode larvae found in meat**

Hong-Kean Ooi and Kensuke Taira

(Faculty of Veterinary Medicine, Azabu University) ..... 314

**Development of rapid and non-destructive diagnostic system for cow's estrus and pregnancy**

Roumiana Tsenkova, Yosuke Kubota, Akane Furukawa, Go Takemura and George Bazar

(Biomeasurement Laboratory, Kobe University Graduate School of Agricultural Science) ..... 319

# ポリフェノールの強力な還元性を利用した食肉新鮮色の保持研究

Studies on fresh meat color preservation by use of the potent reducing activity of polyphenols

増田 俊哉

(徳島大学大学院ソシオ・アーツ・アンド・サイエンス研究部)

Toshiya Masuda

(Institute of Socio-Arts and Sciences, University of Tokushima)

The reduction of MetMb to MbO<sub>2</sub> changes the color of meat from brown to the more desirable bright red.

The effect of polyphenols from the plants known as herbs and spices on the reduction of metmyoglobin was investigated. Potent activity in the reduction of MetMb to oxymyoglobin was observed for three flavonols, kaempferol, myricetin, and quercetin. A mechanism for the reduction by one of the active flavonols, quercetin, was proposed based on analytical results for redox reaction products derived from quercetin. This suggested the importance of a high propensity toward reduction of the flavonol structure, and rapid convertibility of a quinone form to a phenol form by a water addition.

The effect of the polyphenols in the presence of cysteine, as a more potent nucleophile, was also investigated. Although some polyphenols did not show any reducing activity from metmyoglobin to oxymyoglobin individually, they show highly potent activity in the presence of cysteine.

## 1. 目 的

加工、保蔵中における食品の変色は、食品の市場価値を下げるとともに、もしそれが食品成分の劣化反応を伴う時は、栄養価の低下のみならず、安全性にも関わる重要な問題となる。ところで、食肉の色は、色素タンパク質ミオグロビンによる。ミオグロビンは、鉄イオンをキレートしたヘムタンパク質で、その色は、主に中心鉄イオンの酸化還元状態に依存するとされる。食肉の鮮赤色は、酸素をキレートした2価の鉄イオンを有する

オキシミオグロビン (MbO<sub>2</sub>) によるが、この状態はそれほど安定的ではなく、中心鉄がキレート酸素により3価に酸化され、褐色のメトミオグロビン (MetMb) となる。一般に消費者には、新鮮な食肉のイメージがあるMbO<sub>2</sub>の色が好まれ、食肉の加工、流通段階において、その鮮赤色を保持する技術が使われているが、それぞれ一長一短があり現在でも様々な問題を抱えている<sup>1)</sup>。

ところで、古くから食肉の加工に利用されてきた香辛料などにはポリフェノールが多く含まれている。それらのポリフェノールのなかには、強い

還元性と抗酸化機能が認められているものが存在し、その機能によりミオグロビンのキレート鉄の酸化状態をコントロールできることが期待できる。

本研究では、ミオグロビンとの還元的相互作用が可能なポリフェノールを選抜し、そのポリフェノールにより褐色のMetMbを鮮赤色のMbO<sub>2</sub>に変化させることで、食肉の新鮮色を保持する新技術の確立を目的としている。今年度は、ポリフェノールによるメトミオグロビンの還元オキシミオグロビン化を中心に検討を行った結果を報告する。

## 2. 方 法

### 2.1 MetMb-MbO<sub>2</sub>の遷移測定

96ウェルマイクロプレートに、50m mol/lのリン酸緩衝液 (pH7.4, 140 μl), 120 μmol/l MetMbまたはMbO<sub>2</sub>, 同緩衝液 (150 μl), およびサンプルDMSO溶液 (10 μl) を続いて添加した。マイクロプレートを、プレートリーダー中で37°C, 3時間反応させ、1時間間隔で波長582と500nmの吸光度を測定した。また、反応の開始時と終了時に可視スペクトル (450-650nm) も得た。MbO<sub>2</sub>の濃度は次の式で計算した。: MbO<sub>2</sub> (μmol/l) = (89.7 × A<sub>582</sub>) - (32.9 × A<sub>500</sub>)。なお、MetMbとMbO<sub>2</sub>間の酸化還元変換効率は、各MbO<sub>2</sub>とMetMbの初期濃度 (60 μmol/l) を得られたMbO<sub>2</sub>濃度と比較し、%として表した。

### 2.2 MetMb還元反応中のケルセチン生成物のHPLCおよびLC-MS分析

サンプルとしてケルセチンを用いた上記反応液から、1時間間隔で、5 μl サンプリングし、以下の条件で分析した。: カラム, コスモシル5 C18-AR-II (4.6mm × 250mm, 5 μm); 流量, 1.0ml/min; 溶媒: A, 1% 酢酸水, 溶媒B, アセトニトリル; グラジエント条件: 5%-100% 溶媒B (40分)。検出: 280nm。反応混合物中の各生成物の濃度は各物質を用いて作成した検量線か

ら求めた。各生成物のMSデータは、XEVOQ-TOFMSによって以下のように得た。さらに溶液 5 μl を1および3時間後に採取し、分離条件: カラム, コスモシル5 C18-AR-II (4.6mm × 250mm, 5 μm); 流量, 0.5ml/min; 溶媒A, 1% 酢酸超純水, 溶媒B, アセトニトリル (LC-MSグレード)。グラジエント条件は: 5%-100% 溶媒B (80分)。MS条件は、モード, ネガティブESI; キャピラリー電圧, 2.4kV; コーン電圧, 40 V; イオン源温度, 150°C; 脱溶媒和温度, 500°C; コーンガス流量50 l / 時間; 脱溶媒ガス流量, 1000l/h; MS<sup>E</sup>低衝突エネルギー, 6 V; MS<sup>F</sup>高衝突エネルギー, 20-30 V; 各ピークの化合物の元素組成は、MassLynxソフトウェア v4.1 を用いて脱プロトン化分子イオンの高分解能MSデータから算出した。

### 2.3 ケルセチンからの生成物 I, II, III の調製と構造解析

ケルセチン (50mg) のアセトニトリル (50ml) および水 (50ml) の溶液に塩化鉄90mgを添加し、1時間、37°Cで攪拌した。溶液はChelex100のカラム (10 g) に通し、溶出液を真空で濃縮乾固した。得られた残留物を、以下の条件下で分取HPLCにより精製した。: カラムコスモシル5 C18-AR-II (20mm × 250mm, 5 μm); 流速9.0ml/min; 溶媒, 0.1% トリフルオロ酢酸水-アセトニトリル85:15 (v/v); 保持時間18-24分の溶出液を回収濃縮後、生成物 I (40mg) を得た。生成物 I: HR-ESIMS (m/z) [M-H]<sup>-</sup>; Calcd for C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>O<sub>8</sub>, 317.0297, found, 317.0284; UV λ max (アセトニトリル-H<sub>2</sub>O) 325 (sh), 292nm; <sup>1</sup>H-NMR (acetone-d<sub>6</sub>) δ 7.64 (1H, d, J = 2.4Hz), 7.57 (1H, dd, J = 8.1 and 1.8Hz), 6.92 (1H, d, J = 8.1Hz), 6.13 (1H, brd, J = 1.2Hz), 6.12 (1H, brd, J = 1.2Hz), 6.13 (2H, brs)。生成物 II (1 mg) と生成物 III (3 mg) は、アセトニトリ

ル - 水 1 : 1 (v/v) 100ml で, ケルセチン (55mg) を  $\text{FeCl}_3$  (99mg) で 2 時間酸化した後, 反応液を Chelex100 カラム (10 g) 処理し, 分取 HPLC により二つのピーク (保持時間, 14-16 分と 22-25 分) から生成物 II と III を単離した。生成物 II (プロトカテク酸): ESIMS ( $m/z$ ) 153  $[\text{M-H}]^-$ ; UV  $\lambda_{\text{max}}$  (アセトニトリル- $\text{H}_2\text{O}$ -酢酸) 292, 260nm;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8.30 (1H, brs), 7.31 (1H, d,  $J = 1.8\text{Hz}$ ), 7.26 (1H,  $J = 8.2$  and  $1.8\text{Hz}$ ), 6.76 (1H,  $J = 8.2\text{Hz}$ )。生成物 III (2,4,6-trihydroxyphenylglyoxylic acid): ESIMS ( $m/z$ ) 193  $[\text{M-H}]^-$  (40%), 195 (40%), 177 (50%), 153 (100%); UV  $\lambda_{\text{max}}$  (アセトニトリル- $\text{H}_2\text{O}$ -酢酸) 292nm;  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  5.62 (2H, s)。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 ポリフェノールによる MetMb の還元オキシ化

アスコルビン酸は強力に MetMb を還元することが知られている<sup>2)</sup>。しかし, インビトロでこの還元に必要な正確な濃度はまだ報告されていない。そこで, pH7.4 のリン酸緩衝液中 MetMb (60  $\mu\text{mol/l}$ ) へのアスコルビン酸濃度 (60 から 2400  $\mu\text{mol/l}$ ) の効果を調べた。その結果, 600  $\mu\text{mol/l}$  のアスコルビン酸が, 37°C で MetMb を還元し, 3 時間後に初期量の 80% 相当の  $\text{MbO}_2$  を生成することが分かった。この条件を用いて, 20 種のポリフェノールの MetMb 還元能を測定した。Fig. 1 には, 各ポリフェノールによる MetMb からの  $\text{MbO}_2$  の生成率を示した。多くのポリフェノールは, アスコルビン酸と比べると弱い還元オキシ化能を示すに留まったが, ケルセチン, ミリセチン, ケンフェロール, シナピン酸は顕著な還元  $\text{MbO}_2$  生成能を示し, カテキン, ノルジヒドログアイアレン酸, タキシフォリン, モリンがこれに続いた。

なお, フラボノールに属するケルセチン, ミリセチン, ケンフェロールは, 溶解性の問題から 300  $\mu\text{mol/l}$  の測定結果であるため, 褐変化を示したミリセチンを除いては, アスコルビン酸に匹敵する活性が期待できた。そこで, ケルセチンを用いて, さらに MetMb の還元オキシ化の機構の解明を進めた。

#### 3.2 MetMb の還元時のケルセチン生成物の HPLC 分析

酸化還元の原理に基づくケルセチンは MetMb の還元反応中に酸化されていると考えられる。そこで, 反応中のケルセチンの変化を HPLC により経時的に分析した。HPLC により, ケルセチン (17.8 分) に加えて 3 つの顕著なピークが 7.8 分 (生成物 II), 8.3 分 (生成物 III), および 11.3 分 (生成物 I) の保持時間に観察された。これらのピーク物質の経時変化を Fig. 2 にまとめた。Fig. 2 より, MetMb の還元オキシ化反応の進行に従って, ケルセチンが減少し, まず生成物 I が蓄積する。その後, 生成物 II と生成物 III が蓄積していることが分かった。おそらく, 生成物 I はケルセチンから第一酸化物であること, また II と III は, I から二次酸化物であることが予想された。ケルセチンによる MetMb の還元オキシ化は, 1 時間までに完了し, その後,  $\text{MbO}_2$  濃度は変化しないことを考え合わせると, 生成物 II と III は  $\text{MbO}_2$  レベルの維持に貢献するが, MetMb の還元にはケルセチンそのものが最も大きく関与しているであろうと考えられた。

#### 3.3 生成物 I, II, および III の同定

生成物 I-III の化学構造を  $^1\text{H-NMR}$ , UV および MS 分析により決定した。その結果, それらはケルセチンの酸化物および酸化的分解産物であることが明らかになり, II はプロトカテク酸, III は 2,4,6-trihydroxyphenylglyoxylic acid と判明した。なお, 生成物 I はケルセチンの酸化キノン由来の

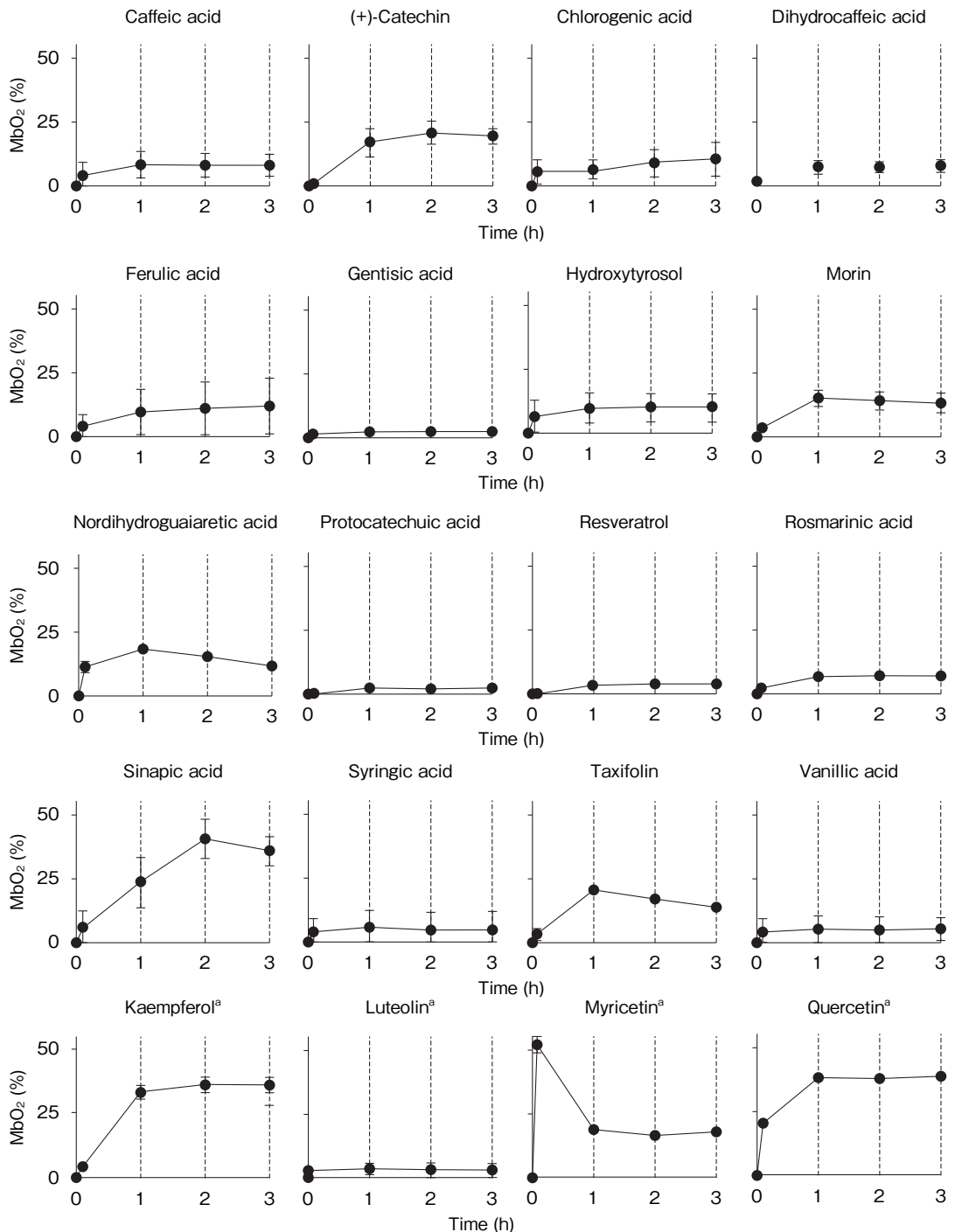


Fig. 1 Effects of polyphenols (600 or 300  $\mu\text{mol/l}$ ) on MetMb reduction.

Results are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) ( $n = 6$ ). <sup>a</sup>Activity of kaempferol, luteolin, myricetin, and quercetin was measured at 300  $\mu\text{mol/l}$  because of their solubility is below 600  $\mu\text{mol/l}$ . <sup>b</sup>Data on myricetin after 1 h are low of accuracy due to the dark brown color of the solution mixture.

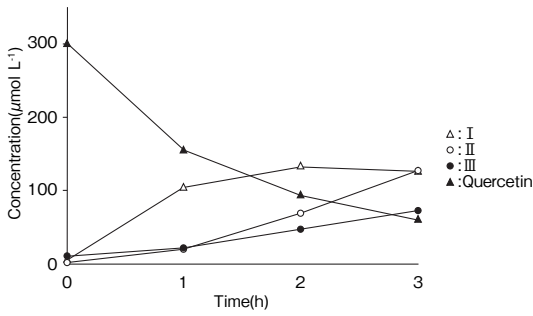


Fig. 2 Time-course analytical data for I-III in the reaction of quercetin and MetMb.

生成物で、互変異性体混合物として存在している可能性が考えられた<sup>3)</sup>。

### 3.4 ミオグロビンの酸化還元状態に対するケルセチンおよびその酸化生成物の効果

ミオグロビンの酸化還元状態に対する各酸化生成物の影響を調べた。各化合物 (60–300 μmol/l) を共存させたMetMbおよびMbO<sub>2</sub>溶液中のMbO<sub>2</sub>濃度の変化の結果をFig. 3に示した。Fig. 3のパネルAとA'より、濃度にかかわらずケルセチン

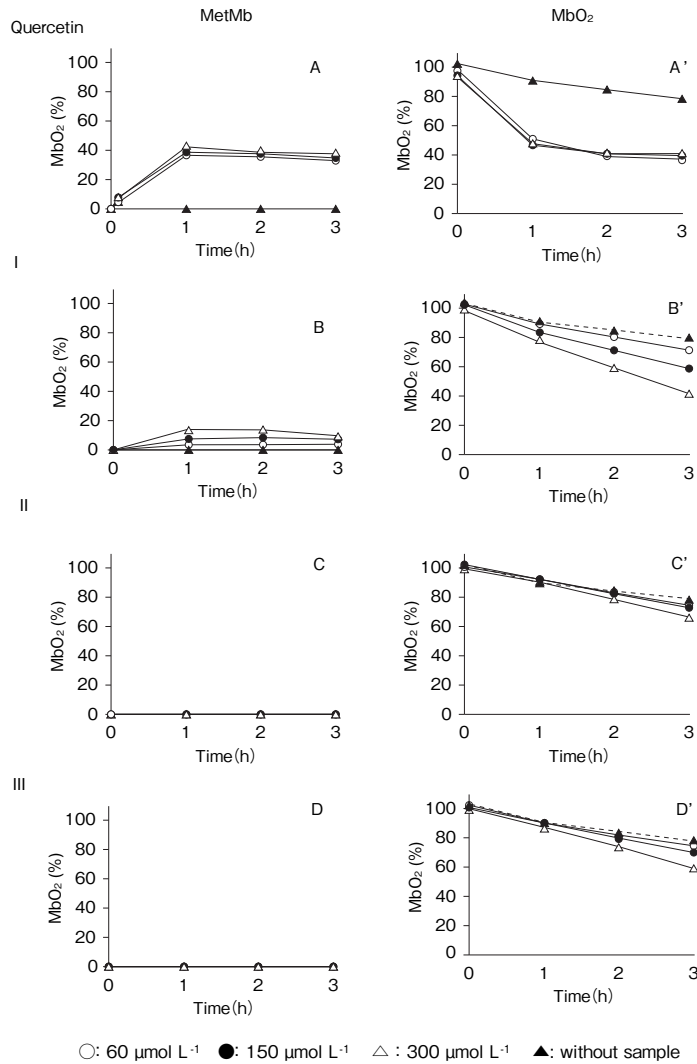


Fig. 3 MetMb reduction and MbO<sub>2</sub> oxidation of quercetin, I, II, and III.

Panels A, B, C, and D refer to MetMb reduction. Panels A', B', C', and D' refer to MbO<sub>2</sub> oxidation. Data are expressed as mean ± standard deviation (SD) : note that most SD values are smaller than the symbols used in the graph.

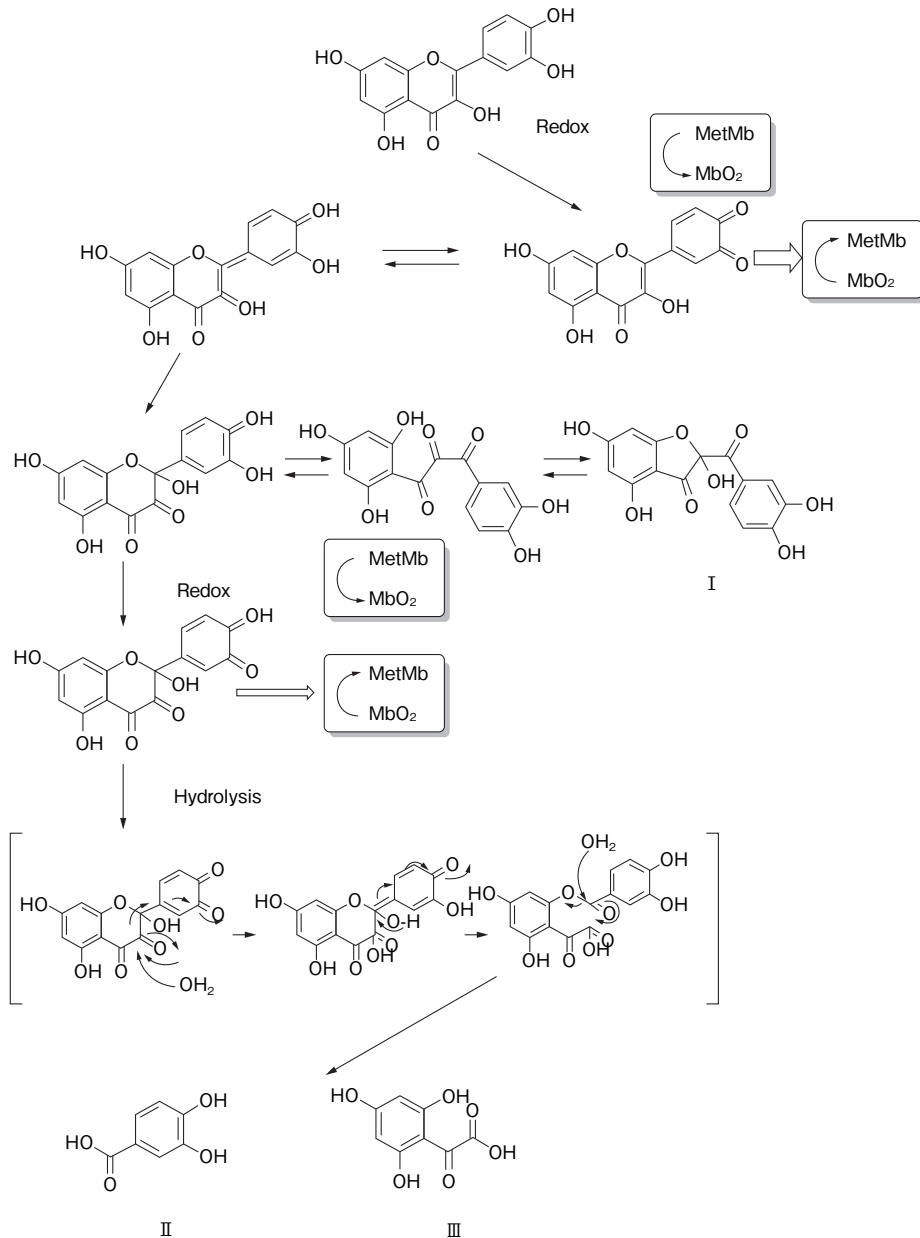


Fig. 4 Proposed mechanism for MbO<sub>2</sub> production from MetMb by quercetin..

はMetMbを還元し、MbO<sub>2</sub>にすることができるが、MbO<sub>2</sub>そのものに対しては酸化を引き起こすことが示された。抗酸化性の強いポリフェノールがMbO<sub>2</sub>を酸化させることは以前に報告しており、ケルセチンにも同様なプロオキシダントが存在することが示唆された。Fig. 3のパネルBとB'

は、生成物 I のMetMbとMbO<sub>2</sub>への効果を見た結果である。MetMbの還元オキシ化もMbO<sub>2</sub>酸化効果も、ケルセチンに比べて相当低くなり、一方で濃度効果が見られるようになった。パネルC, C', D, D'は、生成物 II および III の効果を示しているが、いずれもほとんど効果が認められなかった。



以上の解析結果から、ケルセチンによるMetMbの還元オキシ化の化学的メカニズムをFig. 4に提案した。まず、ケルセチンはMetMbを還元オキシ化し、食肉鮮赤色素であるMbO<sub>2</sub>を生成させる。しかし、B環にキノンが形成した酸化ケルセチンは、MbO<sub>2</sub>酸化を促進する。ケルセチンのキノン物質は今までのところ単離されていないが、その水付加物は確認されており、これが今回の生成物Iの互変異性体に当たる。すなわち、MetMbの還元オキシ化によって生じたケルセチン酸化物に迅速に水が付加し、酸化ケルセチンによるMbO<sub>2</sub>酸化効果（プロオキシダント効果）が軽減される。生成物Iおよびその異性体は弱いながらMetMbを還元することができる。その際生じたさらなるケルセチンからの酸化物が加水分解されることにより、不活性な生成物IIとIIIに変換されたと考えられる。

### 3.5 ポリフェノール酸化物のMbO<sub>2</sub>へのプロオキシダント効果軽減の試み

食肉の鮮赤色化につながる、ポリフェノールによるMetMbの還元を経たMbO<sub>2</sub>の生成は、ケルセチンのようなフラボノールによってある程度達成される可能性が示された。しかしながらその効率は高いとは言えない。その理由として、MetMbの還元オキシ化の際に生じ、MbO<sub>2</sub>の酸化を促進するケルセチン酸化物の不活性化が不十分であるためと考えられた。ケルセチンの場合、酸化物の不活性化は水の付加による。そこで、水より求核性の高い物質を共存させれば、不活性化効果をより高められると予想した。そこで、水酸基より求核性の高いチオール基を有する食品成分としてシステインの共存を検討した。なお、システインは還元性を示すと言われているが、MetMbに対する還元能はない。Fig. 5にポリフェノールと同量のシステインを加えた時のMetMb

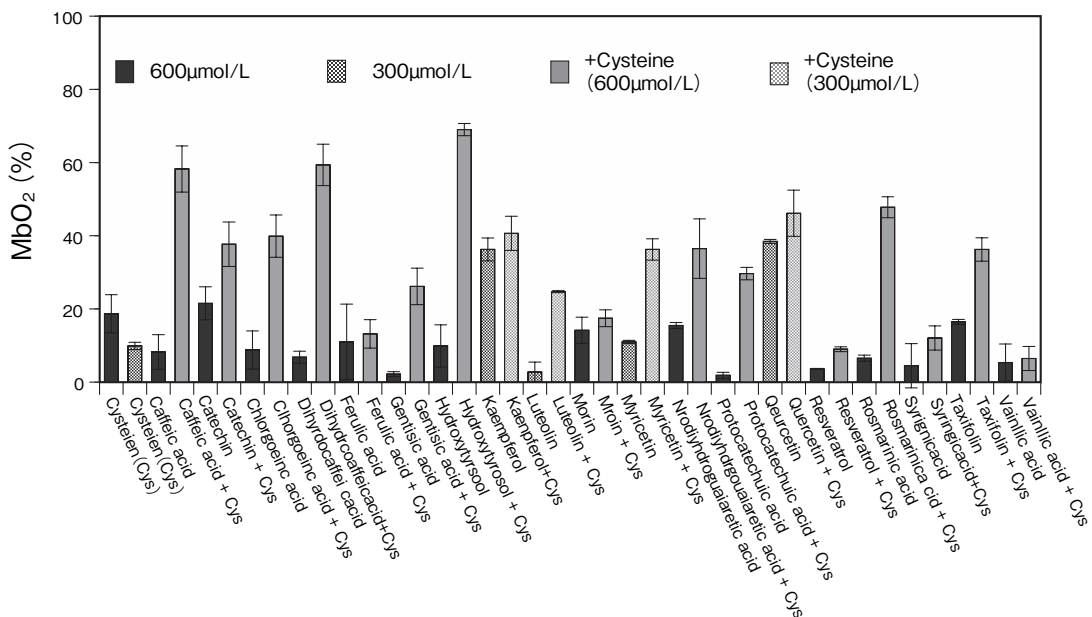


Fig. 5 Effects of polyphenols (600 or 300 μmol/l) on MetMb reduction in the presence of cysteine (600 or 300 μmol/l).

The results are expressed as mean ± standard deviation (SD) (n = 3) and \* shows significantly different data against data from the corresponding experiment in the absence of cysteine (*t*-test, *p* < 0.05).

からのMbO<sub>2</sub>の生成率を示した。ケルセチンではシステイン効果はあまり見られなかったが、その他のポリフェノール、特に還元性が強いとされているにもかかわらず、MetMb還元オキシ化効果の見られなかったポリフェノールに顕著な活性が確認された。さらにそれらの効果は高く、十分に食肉を鮮赤化するに値するものと評価できる。今後は、このシステイン共存による高鮮赤色化効果のメカニズム解明に取り組む予定である。

#### 4. 要 約

本研究によって、香辛料などに多く含まれるポリフェノールにより、食肉の新鮮さを示す鮮赤色オキシミオグロビンを還元的に発生できることが分かった。なお、その発生能は、還元性の強いポリフェノールの中でもフラボノールに属すケルセチンに顕著に見られた<sup>4)</sup>。そのメトミオグロビン生成機構を考察した結果、さらなるオキシミオグロビン化の手法として、求核性の高い生体成分・

システインを共存させる方法を検討した<sup>5)</sup>。その確立ならびに機構の詳細解明については、今後の研究課題となった。

#### 文 献

- 1) Mancini, R. A., Hunt, M. C. : Current research in meat color, *Meat Sci.*, **71**, 100~121, 2005.
- 2) Tukahara, K., Yamamoto, Y. : Kinetic studies on the reduction of metmyoglobins by ascorbic acid, *J. Biochem.*, **93**, 15~22, 1983.
- 3) Jørgensen, L. V., Cornett, C., Justesen, U., Skibsted, L. H., Dragsted, L. O. : Two-electron electrochemical oxidation of quercetin and kaempferol changes only the flavonoid C-ring, *Free. Rad. Res.*, **29**, 339~35, 1998.
- 4) Inai, M., Miura, Y., Honda, S., Masuda, A., Masuda, T. : Metmyoglobin reduction by polyphenols and mechanism of the conversion of metmyoglobin to oxymyoglobin by quercetin, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 893~901, 2014.
- 5) Miura, Y., Inai, M., Honda, S., Masuda, A., Masuda, T. : Reducing effects of polyphenols on metmyoglobin and the in vitro regeneration of bright meat color by polyphenols in the presence of cycteine, *J. Agric. Food. Chem.*, **62**, 9472~9478, 2014.

# 豚血液由来食品素材の給与が脂質代謝に及ぼす影響

Effects of dietary porcine blood-derived food ingredient on lipid metabolism

上 曾 山 博

(神戸大学大学院農学研究科)

Hiroshi Kamisoyama

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

It is well known that edible meat products and by-products are notable sources of essential nutrients such as protein, minerals, and vitamins. However, there is little attention to the biological functions of these products. In Japan, blood is not usually used as a food material, and therefore, has been wasted as a by-product. In the present study, we have investigated the effects of dietary heme iron and exercise on abdominal fat accumulation in high-fat diet-fed mice. Dietary heme iron tended to decrease the weight of the epididymal adipose tissue in mice. In contrast, exercise significantly decreased the weight of the perirenal adipose tissue in mice. Dietary heme iron increased the mRNA levels of lipoprotein lipase, adipose triglyceride lipase, and hormone sensitive lipase in the epididymal adipose tissue. The mRNA level of PPAR  $\delta$  tended to be increased by exercise. These results suggest that the heme iron and exercise decreased abdominal fat accumulation by different mechanisms in the high-fat diet-fed mice.

## 1. 目 的

高齢化社会を迎えつつある我が国においては、ごく近い将来、介護医療に要する費用の急激な増加は避け得ないと言われているが、その介護医療が必要となる疾患の主因とされている動脈硬化を引き起こすメタボリックシンドロームの原因となる肥満の効果的な予防法は未だ見出されていない。また、2011年のWHOの発表によれば、我が国における60歳以上の高齢者の割合は人口の30% (世界最高) を占める。それ故、今後は、介護医療に繋がるメタボリックシンドローム予防のため

の「抗肥満」の重要性はさらに高まると判断される。

欧米では、家畜の畜産副生物を食品として活用する文化が根付いている。例えば、血液はブラッドソーセージとして食される。我が国においても、畜産副生物のうち、消化管や肝臓等の可食臓器は食用として、その他の非可食臓器類については飼料・肥料用として、それぞれ有効に利用されているが、保存や流通に費用が掛かる血液については、我が国においては食文化がないこともあり、多額の費用を掛けて廃棄（あるいは、環境へ流出）されている。それ故、血液の有効利用法の

開発が極めて重要な課題となっている。

鉄分補給用の食品素材として用いられてきた豚の血球画分を酵素分解して得られる水溶性ヘム鉄の給与は、高脂肪食性肥満マウスにおける内臓脂肪組織重量を減少させる傾向を示す<sup>1,2)</sup>。本研究では、畜産副生物である血液の食品素材としての利用法拡大のための一環として、最も一般的な肥満抑制法である運動と、ヘム鉄との併用効果について明らかにする目的で、高脂肪食性肥満マウスにおける運動負荷と水溶性ヘム鉄給与が内臓脂肪蓄積に及ぼす影響について調べた。

## 2. 方 法

水溶性ヘム鉄を0あるいは3%含む高脂肪食飼料 (Table 1) を6週齢のICRマウス (日本エスエルシー株式会社) に、4週間給与した。その間、トレッドミルを用いて、各試験飼料給与区の半数のマウスに、初日は5 m/minで10分、10m/minで10分、15m/minで10分、2日目は10m/minで

10分、15m/minで10分、20m/minで10分、3および4日目は15m/minで10分、20m/minで10分、25m/minで10分、5日目は15m/minで5分、20m/minで5分、25m/minで20分、それぞれ運動を負荷した。2週目以降は、週3日、25m/minで1日30分間の運動を負荷し、4週間後、24時間絶食し、体重を測定した後、麻酔下で腹部大静脈より採血後、安楽死させ、肝臓、腓腹筋、精巢上体周囲脂肪組織、および腎周囲脂肪組織の重量をそれぞれ測定した。また、脂肪組織および腓腹筋からセパゾールRNA I (ナカライテスク株式会社) を用いて総RNAを抽出し、脂質代謝関連遺伝子の発現を7300Real Time PCR System (アプライドバイオシステムズジャパン株式会社) およびTHUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (東洋紡績株式会社) を用いたリアルタイムPCRにより解析した。リアルタイムPCRに用いたプライマーはTable 2に示した。統計解析は二元配置分散分析により行った。

Table 1 Composition of experimental diets

|  | (g/100g diet) |           |
|--|---------------|-----------|
|  | Control       | Heme iron |
| Casein                                 | 21            | 18        |
| L-Cystein                              | 0.39          | 0.39      |
| Corn starch                            | 20.94         | 20.94     |
| Sucrose                                | 8.9           | 8.9       |
| Soybean oil                            | 2             | 2         |
| Beef tallow                            | 32.9          | 32.9      |
| Cellulose                              | 6.5           | 6.5       |
| Mineral mixture <sup>1)</sup>          | 1.3           | 1.3       |
| Vitamin mixture <sup>2)</sup>          | 1.7           | 1.7       |
| CaHPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O | 0.71          | 0.71      |
| CaCO <sub>3</sub>                      | 2.1           | 2.1       |
| Potassium citrate                      | 1.3           | 1.3       |
| Choline-tartrate                       | 0.26          | 0.26      |
| Heme iron                              | 0             | 3         |

<sup>1)</sup> AIN-93G Mineral mixture (Japan SLC, INC., Shizuoka, Japan)

<sup>2)</sup> AIN-93G Vitamin mixture (Japan SLC, INC., Shizuoka, Japan)

Table 2 Primers used for quantitative RT-PCR

| PPAR- $\delta$ | Forward | 5'-GCC ACA ACG CAC CCT TTG-3'           |  |
|----------------|---------|---|--|
|                | Reverse | 5'-CCT TCT CTG CCT GCC ACA GT-3'        |  |
| CPT-1b         | Forward | 5'-GTG CAA GCA GCC CGT CTA G-3'         |  |
|                | Reverse | 5'-TTG CGG CGA TAC ATG ATC AT-3'        |  |
| UCP2           | Forward | 5'-TGA TGT GGT CAA GAC GAG ATA CAT G-3' |  |
|                | Reverse | 5'-CAG TGA CCT GCG CTG TGG TA-3'        |  |
| UCP3           | Forward | 5'-TTT TGC GGA CCT CCT CAC TT-3'        |  |
|                | Reverse | 5'-TGG ATC TGC AGA CGC ACC TT-3'        |  |
| LPL            | Forward | 5'-GAT GGA CGG TAA CGC GAA TG-3'        |  |
|                | Reverse | 5'-TAC AGG GCG GCC ACA AGT-3'           |  |
| ATGL           | Forward | 5'-CCT CAG GAC AGC TCC ACC AA-3'        |  |
|                | Reverse | 5'-TTG AAC TGG ATG CTG GTG TTG-3'       |  |
| HSL            | Forward | 5'-GGC GAA AAG GCA AGA TCA AA-3'        |  |
|                | Reverse | 5'-CAT CGT GCG TAA ATC CAT GCT-3'       |  |
| RPS17          | Forward | 5'-CCG GGT CAT CAT CGA GAA GT-3'        |  |
|                | Reverse | 5'-GCG CTT GTT GGT GTG GAA GT-3'        |  |

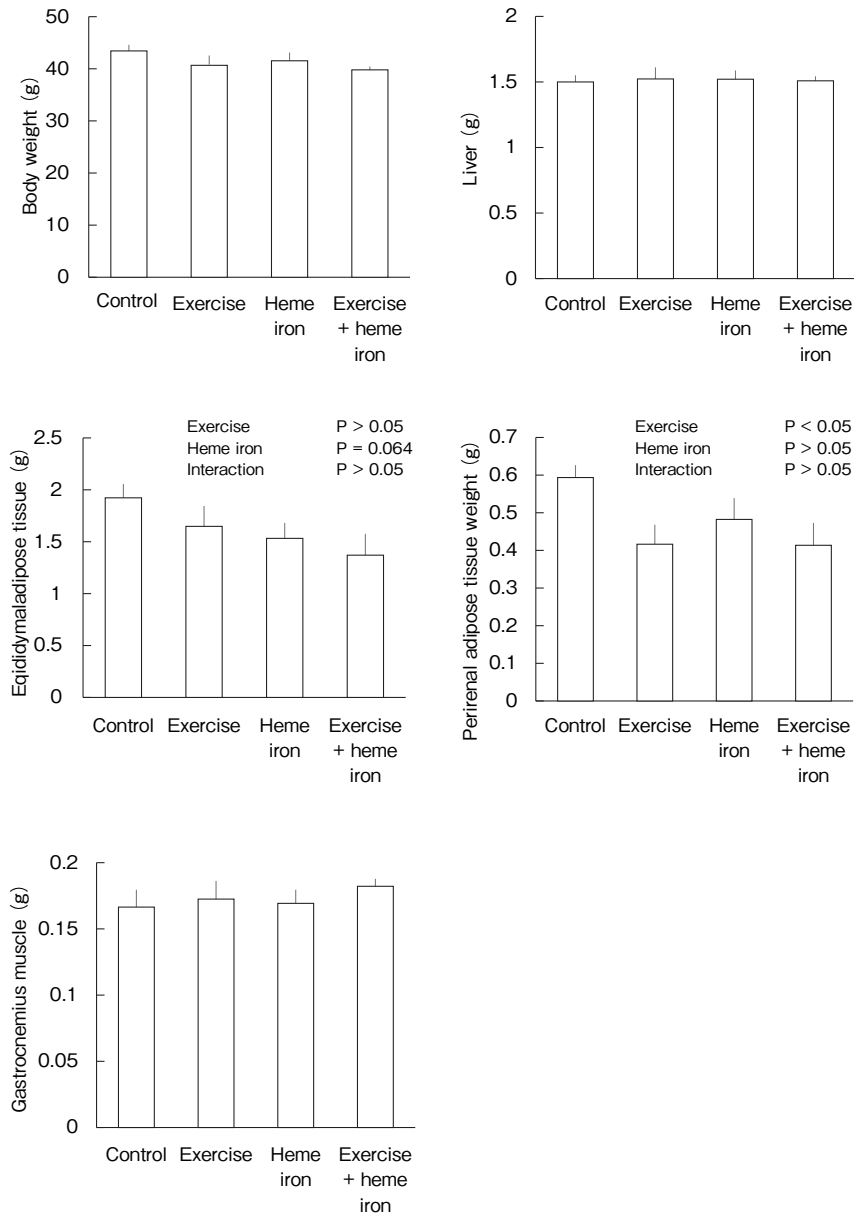


Fig. 1 Effect of heme iron on body weight and the weights of liver, adipose tissues, and gastrocnemius muscle in high-fat diet-fed mice. Data represent the mean  $\pm$  SEM for seven mice in each group.

### 3. 結果

水溶性ヘム鉄の給与はマウスの体重、褐色脂肪組織重量および腓腹筋重量には影響を及ぼさなかったが、精巣上体周囲脂肪組織重量を減少させる傾向を示した (Fig.1,  $P = 0.064$ )。腎周囲脂肪

組織重量は運動により有意に減少した (Fig.1,  $P < 0.05$ )。腓腹筋のPPAR  $\delta$  のmRNA量は、運動により増加する傾向を示した (Fig.2,  $P = 0.062$ ) が、CPT1b, UCP 2およびUCP 3のmRNA量には有意な変化は認められなかった (Fig. 2)。精巣上体周囲脂肪組織のLPLおよびHSLのmRNA量



Fig. 2 Effect of heme iron on the mRNA levels of lipid metabolism-related genes of the gastrocnemius muscle in high-fat diet-fed mice. Data represent the mean  $\pm$  SEM for seven mice in each group.

は、水溶性ヘム鉄給与により有意に増加し (Fig.3,  $P < 0.05$ ), ATGLのmRNA量も、水溶性ヘム鉄給与により増加する傾向を示した (Fig.3,  $P = 0.084$ ).

#### 4. 考 察

本実験において、水溶性ヘム鉄の給与はマウスの精巣上体周囲脂肪組織重量を減少させる傾向を示した。一方、運動は、マウスの腎周囲脂肪組織

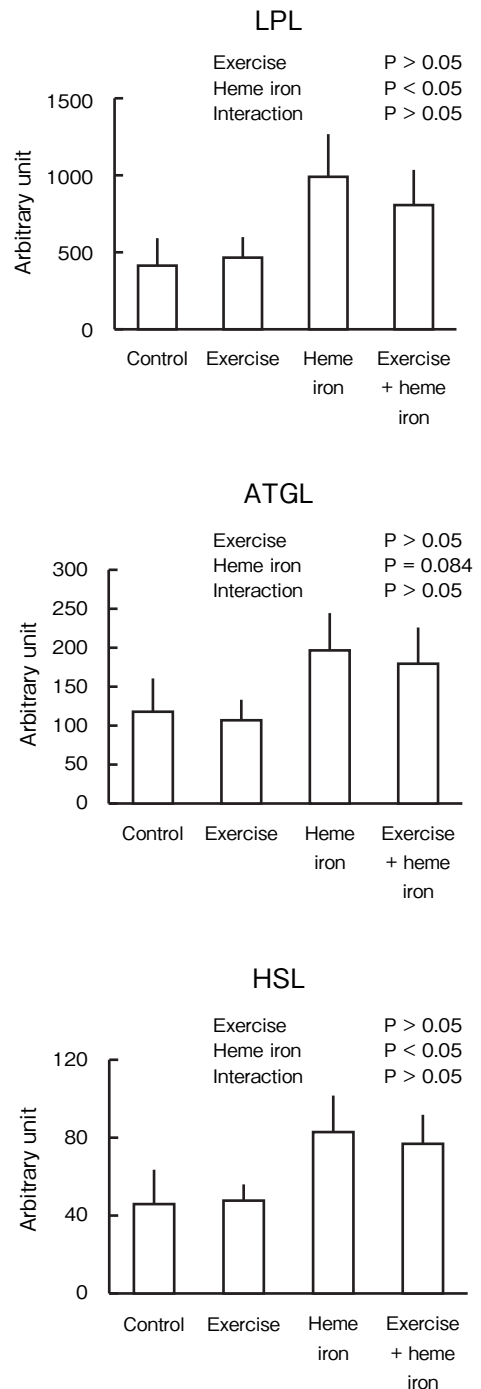


Fig. 3 Effect of heme iron on the mRNA levels of lipid metabolism-related genes of the epididymal adipose tissue in high-fat diet-fed mice. Data represent the mean  $\pm$  SEM for seven mice in each group.

重量を有意に減少させた。これらのことから、水溶性ヘム鉄と運動では、内臓脂肪蓄積を抑制する部位に相違があることが示された。

運動負荷区において、腓腹筋のPPAR $\delta$ のmRNA量が増加する傾向を示した。PPAR $\delta$ は脂肪酸酸化を促す転写因子として知られている<sup>3)</sup>。今回、PPAR $\delta$ の標的遺伝子であり、ミトコンドリアにおける脂肪酸酸化の律速酵素であるCPT1b<sup>4)</sup>のmRNA量には有意な変化は認められなかったものの、そのmRNA量の変動は、PPAR $\delta$ のそれと類似したものであった (Fig. 2)。これらの知見と我々の結果から、運動は、腓腹筋における脂肪酸酸化を亢進させる可能性が示された。

水溶性ヘム鉄の給与により、精巢上体周囲脂肪組織における血中トリグリセリドの取り込みの律速酵素であるLPL<sup>5)</sup>、貯蔵トリグリセリド分解の律速酵素であるATGLおよびHSL<sup>5, 6)</sup>のmRNA量が、有意に増加、あるいは増加する傾向を示した。この原因については不明であるが、水溶性ヘム鉄給与により、脂肪組織におけるトリグリセリドの代謝回転の増加あるいは脂肪細胞以外の細胞 (例えば、マクロファージ) の数の減少が原因である可能性も考えられる。今後、その詳細な機構について明らかにする必要がある。

## 5. 要 約

本研究では、畜産副生物の利用法開発のための一環として、運動負荷と水溶性ヘム鉄給与が高脂肪食給与マウスの内臓脂肪蓄積に及ぼす影響について調べた。水溶性ヘム鉄の給与は、マウスの精巢上体周囲脂肪組織重量を減少させる傾向を示

し、運動の負荷は、腎周囲脂肪組織重量を減少させた。また、運動は腓腹筋におけるPPAR $\delta$ のmRNA量を増加させる傾向を示し、水溶性ヘム鉄の給与は、精巢上体周囲脂肪組織におけるトリグリセリド代謝関連酵素群のmRNA量を増加させる、あるいは増加させる傾向を示した。これらの結果から、水溶性ヘム鉄と運動は、それぞれ異なる機構によって、内臓脂肪蓄積を抑制することが示唆された。

## 文 献

- 1) 上曾山博：抗肥満或いは美容効果を有する食品素材としての豚血液の有効利用法の開発。公共財団法人伊藤記念財団。食肉に関する助成研究調査成果報告書, 31, 6~11, 2013.
- 2) 上曾山博：豚血液由来抗肥満素材による内臓脂肪蓄積抑制機構の解明。公益財団法人伊藤記念財団。食肉に関する助成研究調査成果報告書, 32, 6~11, 2014.
- 3) Houten, S. M., Wanders, R. J. A. : A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid  $\beta$ -oxidation, *J. Inherit Metab Dis.*, 33, 469~477, 2010.
- 4) Jucker, B. M., Yang, D., Casey, W. M., Olzinski, A. R., Williams, C., Lenhard, S. C., Legos, J. J., Hawk, C. T., Sarkar, S. K., Newsholme S. J. : Selective PPARdelta agonist treatment increases skeletal muscle lipid metabolism without altering mitochondrial energy coupling: an in vivo magnetic resonance spectroscopy study, *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 293, E1256-E1264, 2007.
- 5) Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., Kohlwein, S. D., Haemmerle, G., Lass, A., Madeo, F. : FAT SIGNALS-lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling, *Cell Metab.*, 15, 279~291, 2012.
- 6) Schweiger, M., Schreiber, R., Haemmerle, G., Lass, A., Fledelius, C., Jacobsen, P., Tornqvist, H., Zechner, R., Zimmermann, R. : Adipose triglyceride lipase and hormone-sensitive lipase are the major enzymes in adipose tissue triacylglycerol catabolism, *J Biol Chem.*, 281, 40236~40241, 2006.

# 発酵食肉製品由来の機能性ペプチドに関する研究

Functional peptides derived from fermented meat products

津 田 治 敏

(県立広島大学生命環境学部)

Harutoshi Tsuda

(Faculty of Life and Environmental Sciences, Prefectural University of Hiroshima)

The purpose of this study was to investigate a functionality of fermented meat products. *Lactobacillus plantarum* JAB2001 was used as a starter culture for the fermented meat product. The inhibitory activity of angiotensin I-converting enzyme was shown in the extract of the fermented meat. The fraction that inhibited ACE was purified with a reverse-phase HPLC and a size-exclusion HPLC. Peptides and amino acids were not observed in the fraction after SDS-PAGE and an amino acid sequence analyses. An unfermented meat patty showed no ACE inhibitory activity. Consequently, the ACE inhibitory substance was suggested to be produced via fermentation process with strain JAB2001, although the main part of the substance was still unknown. On the other hand, various spices including white pepper, which was used in the production of the fermented meat, were applied to the ACE inhibitory activity analysis. Extraction of cumin and clove with boiling water showed high ACE inhibitory activity, while white pepper showed no activity. Thus, an application of cumin and clove would contribute to a functional processed meat products with ACE inhibitory activity.

## 1. 目 的

アンギオテンシン変換酵素 (Angiotensin Converting Enzyme, ACE) は生体の肺血管内皮細胞から分泌され、末梢の血圧を調節するレニン-アンギオテンシン系に関与している。アミノ酸10残基のアンギオテンシン I (DRVYIHPFHL) には目立った生理活性はないが、ACEの作用によってC末端のHis-Leuが遊離してアミノ酸8残基のアンギオテンシン II が生成する。このアンギオテンシン II は直接作用として末梢毛細血管を収縮させるとともに交感神経や副腎を刺激し、カテ

コールアミンの放出を促進するため血圧を上昇させる。さらに副腎皮質ホルモンであるアルドステロンの分泌を促進するため、腎臓でNaの再吸収促進、水の貯留および循環血流量の増大をもたらす。血圧を相乗的に上昇させる。また、ACEは降圧系であるカリクレイン・キニン系において、血管拡張作用をもつ短鎖ペプチドである降圧物質ブラジキニンなどを破壊する作用もある。ACEは昇圧物質の生成のみならず、降圧物質の破壊を伴うことで昇圧への関与が大きい酵素である。そのため、ACEの活性を阻害すれば、昇圧作用をもつアンジオテンシン II の生成が阻害されると同



時に降圧作用をもつキニン類の破壊も防止され、血圧上昇の抑制に効果的である。

これまでに400種類以上のACE阻害物質が食品から分離されており、実際に機能性食品として利用されているものもある<sup>1)</sup>。たとえば、*Lactobacillus helveticus*をスターターとした発酵乳から2種類のトリペプチドがACE阻害ペプチドとして分離されている<sup>2)</sup>。これまでに報告されているACE阻害物質の多くはペプチドであるが、近年、フラバノールなどのポリフェノール類がACE阻害活性を示すことが報告されている<sup>3)</sup>。

本研究では、*Lactobacillus plantarum* JAB2001をスターターとした発酵食肉におけるACE阻害物質を探索した。食肉製品は加工・調理の過程で塩分が多くなるため、一般に高血圧症などの症状を引き起こす食事の一つと考えられがちだが、ACE阻害物質を著量に含む発酵食肉であればそうしたリスクを低減できる可能性がある。本研究の目的は、鮎ずし由来の乳酸菌を用いた発酵食肉製品から、ACE阻害物質を探索することである。

## 2. 方 法

### 2.1 使用菌株

試験には*Lb. plantarum* JAB2001を用いた。この菌株は琵琶湖周辺の伝統的乳酸発酵食品「フナズシ」を分離源とするものであり、生理学的諸性

質および16S rDNAの解析結果から菌種を同定したものである<sup>4)</sup>。また、いずれの菌株も食塩や硝酸塩を添加した調製挽肉に接種した際、良好な生育性を示し、25℃で48時間発酵したときpHを4.8以下にするものである<sup>5)</sup>。

### 2.2 食肉の発酵

発酵食肉の調製は中江ら<sup>6)</sup>を参考にした(Table 1)。牛すね肉、豚背脂肪およびタマネギは4mmのミンチにして用いた。菌体懸濁液は、菌株をMRS液体培地で継代培養したのち遠心分離(1,000×G, 10分)して集菌・菌体洗浄を繰り返したのち等量の水に懸濁したものを用いた。調製食肉に菌体懸濁液を1%加え25℃、約80%RHで48時間培養したものを発酵食肉とした。

### 2.3 使用香辛料

ターメリック、サフラン、コリアンダー、クミン、シナモン、ホワイトペッパー、ナツメグおよびクローブの熱水抽出物をACE阻害活性試験に供した。香辛料0.5gを5mlの熱水に加え、よく攪拌したのち遠心分離(1500×G, 15分)し、上澄液を熱水抽出物とした。

### 2.4 ACE阻害活性の測定

前報と同じ。

### 2.5 ACE阻害物質の粗精製

前報と同じ。

### 2.6 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

最終的に得られた画分をSDS-PAGE分析に供した。プレキャストゲル(e-パジェルE-T15S, ATTO)を用い、試料処理および泳動条件等は説明書に準じた。バンドの染色にはクマシーブリリアントブルー(CBB)を用いた。

### 2.7 アミノ酸配列の解析

最終的に得られた画分を凍結乾燥し、粉末に純水を加えた。約600pmol分をガラスファイバーディスクに吸着させ分析に供した。分析機器には

Table 1 Component of fermented meat

| Component         | Ratio (%) |
|-------------------|-----------|
| Beef shank        | 72.3      |
| Porcine backfat   | 15        |
| Common salt       | 2.0       |
| Potassium nitrate | 0.05      |
| Glucose           | 0.5       |
| White pepper      | 0.2       |
| Onion             | 9         |
| Cell suspension   | 1.0       |

プロテインシーケンサPPSQ-33A (島津) を用い、エドマン分解法によるアミノ酸配列の解析を行った。

### 3. 結果

#### 3.1 発酵食肉のACE阻害活性

*Lb. plantarum* JAB2001で発酵した食肉製品100gを500mLの水に懸濁し70℃で30分間の加熱処理後、遠心分離(10,000×G, 20分)した。回収した上澄液のpHを8.3に調整したのち、1.5Lの冷エタノールを徐々に加え生成した沈殿物を除去したものをエバポレーターで約300mLまで濃縮した。濃縮液を凍結乾燥し、得られた粉末を10mLの水に溶解したものを試料とした。この試料のACE阻害活性は $29.7 \pm 11.2\%$ であった。

#### 3.2 ACE阻害物質の精製

上記の抽出試料をHPLCに供し、5分ごとに分画した。高いACE阻害活性が認められた画分をさらに同条件の逆相HPLCに供し、3つの画分を得た。得られた画分のうち、高いACE阻害活性を示したものをサイズ排除カラムに供した。5分ごとに分画し、高いACE阻害活性を示した画分を再び同条件の逆相HPLCに供した。この時のACE阻害活性は46.3%であった(Table 2)。また、ACE阻害物質の分子量はサイズ排除HPLCの結果から、300-1,000と推測された(Fig. 1)。

この画分をSDS-PAGEに供したところバンドが確認できなかった。分子量が小さすぎる、あるいはCBB染色で染まりにくいペプチドであることが考えられたため、さらにアミノ酸配列の解析を行った。解析の結果、アミノ酸のピークは出現しなかった。それゆえ、この画分にはアミノ酸がほぼ含まれていないと考えられた。

以上のことから、このACE阻害物質がペプチドである可能性は低い。推測される分子量とACE阻害物質としての報告例<sup>3)</sup>から、このACE

Table 2 ACE inhibitory activities of an unfermented meat patty and the fraction after reverse-phase HPLC and size-exclusion HPLC

| ACE Inhibitory activity (%) |                |
|-----------------------------|----------------|
| Unfermented meat patty      | ND*            |
| Fraction**                  | 46.3 (7.5) *** |

\* : Not Determined (less than 5 % ACE inhibitory activity)

\*\* : Fraction including the peak (13.70min) in Figure 1

\*\*\* : Figures in parenthesis are standard deviation (n = 3)

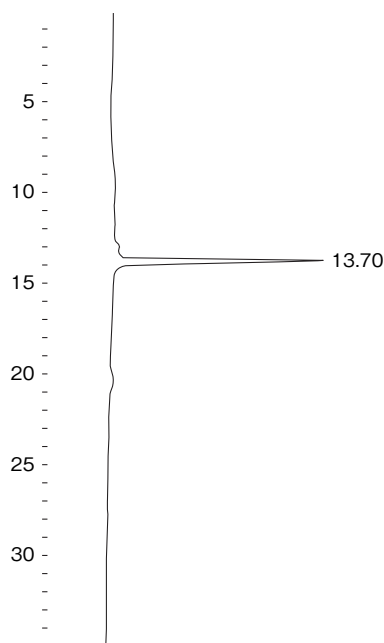


Fig. 1 A chromatogram of the ACE inhibitory fraction obtained with size-exclusion HPLC.

阻害物質はフラバノール等のポリフェノール類である可能性が高いと考えた。ポリフェノール類を多く含む食品として香辛料があり、この実験においても発酵食肉の調製においてホワイトペッパーを使用している。そこで、種々の香辛料を用いてACE阻害活性を測定し、本実験で得られたACE阻害物質がホワイトペッパー由来のものであるか確認した。

#### 3.3 香辛料のACE阻害活性

香辛料の熱水抽出物のACE阻害活性をTable 3に示した。クミンとクローブでは高いACE阻害

Table 3 ACE inhibitory activities of spices extracts

| Spice        | ACE inhibitory activity (%) |
|--------------|-----------------------------|
| Turmeric     | ND*                         |
| Saffron      | ND                          |
| Coriander    | ND                          |
| Cumin        | 84.4 (3.16) **              |
| Cinnamon     | 41.4 (8.92)                 |
| White pepper | ND                          |
| Nutmeg       | ND                          |
| Clove        | 95.6 (3.81)                 |

\* : Not determined

\*\* : Figures in parenthesis are standard deviation (n = 3).

活性が確認できたが、ホワイトペッパーでは阻害活性が認められなかった。

ホワイトペッパーの抽出液においてACE阻害活性が見られなかったこと、および未発酵の食肉パティではACE阻害活性は見られなかったことから、JAB2001株をスターターに用いた発酵食肉から分離したACE阻害物質は発酵過程において生産されたものである可能性が高い。その物質はペプチド様のもではなかったことから、タンパク質以外の物質から生成したと考えられた。すなわち、ホワイトペッパーあるいはタマネギに含まれるポリフェノール類が発酵過程において変換しACE阻害作用を示すようになったと考えられた。今後、この物質の同定を行う必要がある。

香辛料の機能性についての研究は、芳香性物質、抗菌活性および漢方薬としての保健効果など様々な分野で進められているが、ACE阻害活性についての報告はほとんどない。本実験ではホワイトペッパーを含む種々の香辛料におけるACE阻害活性を調べた。その結果、クミンおよびクローブの熱水抽出物において高いACE阻害活性が見られた。クミンはセリ科の植物の種子であり、カレーの香りの元となっている香辛料である。またクローブはフトモモ科の植物のつぼみであり、甘い芳香を有し、肉料理に使われることが

多い香辛料である。この二つの香辛料を利用した加工食肉製品は嗜好性の側面から消費者に受け入れられやすいと考えられる。また、これら香辛料の抽出物を加工食肉に添加することにより、加工食肉製品にACE阻害活性を付加し、機能性加工食肉製品の創製に寄与することができると考えられた。

#### 4. 要 約

本研究では発酵食肉製品の機能性について検討した。特にACE阻害活性に着目した。発酵食肉製品の調製には、既に食肉中での生育性が良好であることが明らかとなっているフナズシ由来の乳酸桿菌を用いた。この菌株を用いてそれぞれ発酵食肉を調製し、抽出液を逆相HPLCおよびサイズ排除HPLCに供した。得られたACE阻害画分についてSDS-PAGEおよびアミノ酸配列の解析試験を行ったが、画分にペプチド様の物質が含まれている可能性は非常に低かった。一方、ホワイトペッパーを含む種々の香辛料においてACE阻害活性を測定したところ、クミンとクローブにおいて高いACE阻害活性が見られた一方でホワイトペッパーでは阻害活性は見られなかった。また未発酵の食肉パティにおいてもACE阻害活性は見られなかった。これらの結果からこの発酵食肉製品が示したACE阻害物質はJAB2001株による発酵過程において生産したものと考えられた。

#### 文 献

- 1) 西川研次郎監修：食品機能性の科学，産業技術サービスセンター，379～413，2008.
- 2) Nakamura, Y., Yamamoto, N., Sakai, K., Takano, T. : Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.*, **78**, 1253 ~ 1257, 1995.
- 3) Actis-Goretta, L., Ottaviani, I. J., Fraga, G. D. : Inhibition of angiotensin converting enzyme activity by flavanol-rich foods. *J. Agric. Food Chem.*, **54**,

- 229~234, 2006.
- 4) Tsuda, H., Kubota, K., Matsumoto, T., Ishimi, Y. : Isolation and identification of lactic acid bacteria in traditional fermented sushi, Funazushi, from Japan. *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 77~82, 2012.
- 5) Tsuda, H., Matsumoto, T., Ishimi, Y. : Selection of lactic acid bacteria as starter cultures for fermented meat products, *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 713~721, 2012.
- 6) 中江利孝, 片岡啓, 宮本拓 : 発酵ひき肉製品の製造と生化学的性状に関する研究, 食肉に関する助成研究調査成果報告書, **5**, 298~304, 1986.

# 食肉の給与が海馬のタンパク質リン酸化および 遺伝子発現に及ぼす影響

Effects of meat supplementation on hippocampal protein phosphorylation  
and gene expression

豊田 淳・下西 ひかり・後藤 達彦  
(茨城大学農学部)

Atsushi Toyoda, Hikari Shimonishi and Tatsuhiko Goto  
(College of Agriculture, Ibaraki University)

Recently, the patients suffering from brain disorders such as depression or dementia are increasing, because of rapid aging and stressful condition in Japanese society. To reduce the risk of incidence of these diseases, the alternate approaches such as improvement of eating habits are attempted. We have tried to elucidate the chronic effect of diets containing dried beef meat on the brain function and behaviors. In this study, we focused on the plasma amino acids in the central nervous system. The rats fed beef-containing diets for 28 days, and then we analyzed the concentration of amino acids in the blood plasma. As a result, plasma phenylalanine and tryptophan significantly increased in the group fed beef-containing diet (10 g/kg of diet) compared with control group and the group fed beef-containing diet (100 g/kg of diet). Because these amino acids are precursors for dopamine and serotonin in the brain, respectively, which are related to mental disorders. It should be investigated the relation between these blood plasma amino acids and intracerebral neurotransmitters and the expression patterns of genes related to mood disorders in future.

## 1. 目 的

本研究の目的は、食肉の摂取が脳の高次機能へ与える影響を分子レベルで網羅的に解明することである。

近年の日本では、急激な高齢化の進行やさまざまなストレスの増加によって、うつ病や認知症などの中枢神経系に起因する疾患の患者数が増加している<sup>1)</sup>。そのような現状に加え、東日本大震災とその後の原発事故によるうつ病やPTSD等の患者の増加が懸念されている。これらの精神疾患へ

の薬剤治療は長期間にわたることが多く、重大な副作用（自殺企図のリスク増加、攻撃性の増加）の報告もされていることから、発症後の治療のみならず、予防（未病）対策にも早急に取り組むべきといえる。

私どもは、日々の食生活を通してこれらの中枢神経系の疾患、特に精神疾患を予防できないかと考え、農畜水産物および乳製品などの食品で中枢神経系の機能を改善させる可能性のあるものを探索している<sup>2)</sup>。現在までもいくつかの農畜水産物および食物由来の機能性因子について研究を

行ってきたが、本研究では食肉に含まれる成分が中枢神経系の機能へどのような影響を与えるか、生化学的に解析を行いたいと考えて、25年度から本研究課題を遂行している<sup>3)</sup>。

食肉には必須アミノ酸がバランスよく含まれており、末梢や中枢で神経伝達物質として機能するセロトニンやノルアドレナリン等の原料となることが知られている<sup>4)</sup>。セロトニンについてはうつ病患者の脳内で健常人よりも低い濃度である症例が知られ、うつ病等精神疾患の発症と深く関連することが知られている<sup>5)</sup>。ノルアドレナリンについても、不安障害やうつ病などいくつかの精神疾患との関連が示唆されている。これらの精神疾患はSSRIのような抗うつ剤の投薬、あるいは認知行動療法などで治療することが多く、それらの治療が奏功するケースもあるが、一方、どのような治療法を用いても治癒しない難治性うつ病の存在も知られており、患者のQOLを維持・改善するうえで重大な問題になっている。うつ病は生活習慣の乱れなどが引き金になることも知られており、うつ病予防には睡眠、栄養などを充分取ることが有効であると考えられている。また、適度な運動にもうつ病発症を予防する可能性のあることが示唆されている<sup>6)</sup>。特に栄養については、近年、消化管内微生物と精神疾患の関係が示唆されており、脳腸相関の観点から欧米を中心に盛んに研究されている<sup>7)</sup>。また、赤身を多く含む牛肉は、適正量を摂取することでうつ病や不安障害に対するリスクを減らすことが、オーストラリアで行われた疫学調査によって明らかになっている<sup>8)</sup>。以上より、私どもは食肉成分にはうつ病などの精神疾患に対して予防的な効果を期待できるのではと考えており、本研究課題では、実際に長期間食肉(牛肉)を経口摂取した場合、摂取しない場合と比較して脳内ではどのような分子機構の変化が生じるのか、実験動物(ラット)を用いて詳細に解

析している。

脳の海馬と呼ばれる部位は、記憶や学習に重要な役割を担っており、てんかんやアルツハイマー型認知症、うつ病、統合失調症など精神疾患を含むさまざまな中枢神経系疾患に深く関与すると考えられている<sup>9)</sup>。本研究課題では、牛肉の摂取による脳への影響を海馬に絞って解析することで、中枢神経系疾患に対してどのような効果を持つのか、科学的に解明しようと考えた。そこで、本研究では海馬の神経伝達物質の動態に影響する血漿アミノ酸に焦点を当て、牛肉を給与した後の血漿アミノ酸を分析し、その影響を調査することにした。

## 2. 方法

### 2.1 4週間の牛肉含有飼料の給与試験

給与試験については、先行研究と同様な方法で行った<sup>3)</sup>。-30℃で保存した牛肉(大腿二頭筋、千葉県産ホルスタイン牛)を4℃で解凍後、ナイフで破断し、ミンチ器で破碎した。ミンチ肉を真空パック後、凍結乾燥して、牛肉粉末を得た。これを精製粉末飼料(AIN93G, オリエンタル酵母)へ添加して牛肉含有飼料とした。

5週齢で飼育室へ導入したWistarラット(チャールズリバー)は、予備飼育期間1週間を経て牛肉含有飼料の給与を開始した。動物飼育はすべて茨城大学農学部中小動物舎で実施した。

対照群(Control, C)と牛肉給与群①(10 g/kg diet, LB)、牛肉給与群②(100 g/kg diet, HB)の3群に分け、それぞれ3頭ずつ用いた。牛肉含有飼料の給与は28日間続けて行った。給与期間中は、摂食量および体重を定期的に測定した。なお、動物実験については、茨城大学農学部中小動物舎のラット専用飼育室で行った。予備飼育の時期からラットを個別ケージに収容し、単飼した。水と飼料は自由摂取とし、室温22℃、湿度

50%, 12時間の明暗サイクル(6:00点灯, 18:00消灯)の環境下で飼育した。茨城大学動物実験委員会の規則に則り, 本委員会の承認を受けて実施した。

## 2.2 牛肉給与試験後の血液のアミノ酸分析

2.1の給与試験終了後, ラットの腹部大動脈より血液を採取した。血漿を前処理後, 内部標準としてアミノ酸安定同位体を加え, 誘導体化し, 55°Cで10分間インキュベートした。室温になるまで放置した後, UPLC/MS/MSによりアミノ酸分析を行った。

## 2.3 統計処理

統計処理については, 一元配置および二元配置の分散分析をエクセル統計2006(SSRI)により行った。また, 多重比較法については, Bonferonni法を用いた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 牛肉含有飼料の給与がラットの血漿アミノ酸濃度に及ぼす影響

牛肉含有飼料あるいは対象飼料を28日間給与したラットの血漿アミノ酸の分析を行った。アルギニンについては, 本分析条件ではピークが得られず, 定量が不可能であった。これについては, アルギニン分析用の最適条件を見出して, 再度定量することが必要である。その他の19種類のアミノ酸(ヒスチジン, アスパラギン, タウリン, セリン, グルタミン, グリシン, アスパラギン酸, グルタミン酸, スレオニン, アラニン, プロリン, リジン, チロシン, メチオニン, バリン, イソロイシン, ロイシン, フェニルアラニン, トリプトファン)については, 本方法で定量可能であった。

定量結果であるがアミノ酸濃度の全体的な傾向として, 牛肉給与群①(10 g/kg diet, LB)が他の2つの群よりも高かった。メカニズムの詳細は不明であり, 統計学的に有意ではないものの, 試

験期間をとおしてLB群が他の2つの群(C, HB)よりも恒常的に摂食量が多く, また体重も高く推移したこと<sup>3)</sup>, それらが血漿アミノ酸濃度の高値に結び付いた可能性が示唆された。なかでもLB群における血漿フェニルアラニンおよびトリプトファン濃度は, 他の2群よりも有意に高かった(Fig. 1)。1%の牛肉粉末飼料をラットに28日間給与することによって, フェニルアラニンとトリプトファンの血漿中濃度が上昇するメカニズムの詳細は, 今後, 解析すべき課題である。本研究は, 比較的低濃度の牛肉粉末でも効果を発揮できる可能性を示唆した結果であり, 食肉産業上, 現実的で意義のある成果であると考えられる。また, 血漿スレオニン, チロシン, メチオニンの各濃度については, LB群が牛肉給与群②(100 g/kg diet, HB)と比較して有意に高かった(Fig. 1)。末梢のフェニルアラニン, トリプトファンは, 血液脳関門を通過し, 脳内でそれぞれドーパミン, セロトニンに変換される。また, チロシンも同様にドーパミンに変換される。脳におけるセロトニンやドーパミンは, うつ病や統合失調症, パーキンソン病などさまざまな中枢神経系の疾患発症と関係しているため, 比較的低濃度の牛肉粉末含有飼料でこれらの血漿アミノ酸濃度が上昇したことは食肉の栄養科学上, 意義深い。今後は, 実際に脳内のアミノ酸, モノアミンの濃度が牛肉含有飼料の摂取でどのように変動するかを調査する予定である。また, 牛肉摂取による脳内の遺伝子発現への影響を調査する。特に精神疾患発症と深く関係する海馬における遺伝子発現をDNAマイクロアレイなどを用いて網羅的に解析する予定である。

## 4. 要 約

最近の日本では, 高齢化の急激な進行や多様なストレスの増加によって, うつ病や認知症などの中枢神経系疾患の患者数が増加しており, 食習慣

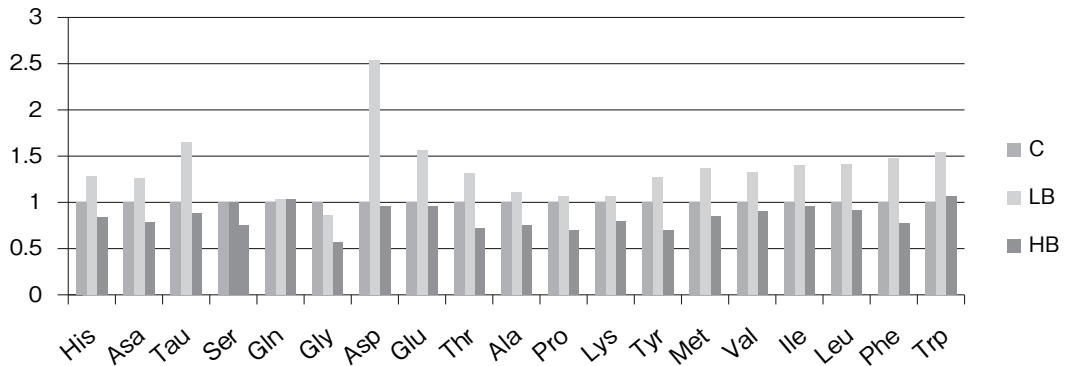


Fig. 1 Relative values of plasma concentration of amino acids in rats fed the diets containing dried powder of beef meat. C, control ( $n = 3$ ); LB, 10g/kg diet ( $n = 3$ ); HB, 100g/kg diet ( $n = 3$ ).

でこれらの疾患を予防や治療ができないか検討されている。本研究では、慢性的な食肉の摂取が脳にどのような影響をもたらしているのか解明することを目的とした。今年度は、脳の神経伝達物質の動態に深く関係する血漿中のアミノ酸に着目し、28日間の牛肉含有飼料の給与が、ラットの血漿中アミノ酸濃度に及ぼす影響について解析した。その結果、28日間、牛肉含有飼料 (10 g/kg diet) を給与することで、フェニルアラニンとトリプトファンの血漿中濃度が上昇することが明らかとなった。これらのアミノ酸はそれぞれドーパミン、セロトニンの前駆物質であり、精神疾患発症とも深く関係することから、牛肉の摂取が中枢において機能性を発揮する可能性が示唆された。今後、これらの血漿アミノ酸の変動と脳内神経伝

達物質および遺伝子発現について精査する必要がある。

#### 文 献

- 1) 厚生労働省ホームページ <http://www.mhlw.go.jp/kokoro/specialty/data.html>
- 2) 茨城大学農医連携プロジェクト <http://iucam-ibaraki.wix.com/iucam>
- 3) 豊田淳, 平成25年度食肉に関する助成研究成果報告書, 32, 53~56, 2014.
- 4) Nagasawa, M., et al., *Animal Science Journal*, 83, 493~498, 2012.
- 5) Berton, O., et al., *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 137~151, 2006.
- 6) Agudelo, LZ., et al., *Cell*, 159, 33~45, 2014.
- 7) Savignac, H. M., et al., *Behavioural Brain Research*, 287, 59~72, 2015.
- 8) Jacka, F. N., et al., *Psychotherapy and Psychosomatics*, 81, 196~198, 2012.
- 9) Nestler, E. J., et al., *Neuron*, 34, 13~25, 2002.



# 食肉製品の塩漬熟成に伴う呈味性発現に関する研究

Studies on the formation of specific meat taste in cured meat products

市村 さやか・中村 幸信・吉田 由香・服部 昭仁

(一般社団法人食肉科学技術研究所)

Sayaka Ichimura, Yukinobu Nakamura, Yuka Yoshida and Akihito Hattori

(Japan Meat Science and Technology Institute)

We evaluated the enhancement of the taste of cured meat during maturation by sensory analysis. Although nitrite ( $\text{NaNO}_2$ ) was essential for the development of the taste of cured meat, a certain period for maturation of raw meat, regardless of the presence of nitrite, was necessary for the enhancement of the taste. Some fractions increasing in raw meat during the maturation, which were the heat-stable sarcoplasmic and nitrogen containing compounds, were involved in the enhancement of the taste.

We tried to identify the compounds involved in the enhancement of the taste of cured meat during the maturation. The changes in the amount and fractions of nitrogen compounds were examined in the salted-meat immersed in a 2% NaCl solution without  $\text{NaNO}_2$  from 0 to 168 hrs incubation. The concentration of hypoxanthine (Hx) gradually increased, while inosine-5'-monophosphate (IMP) decreased during the incubation. The concentration of Hx in the salted-meat was lower than that of IMP after incubation for 72 hrs, while Hx increased after 168 hrs of incubation. The addition of Hx to model samples in a dose-dependent fashion enhanced the taste. It was concluded that Hx is essential for the enhancement of the taste of cured meat products.

## 1. 目 的

亜硝酸塩や食塩から成る塩漬剤で原料肉を処理する塩漬は食肉製品の製造において重要な工程である。塩漬には、原料肉に塩漬剤を直接すり込む乾塩漬と、塩漬剤を溶かしたピクルと呼ばれる塩漬液に漬け込む湿塩漬があり、日本では、主に湿塩漬が工業的に採用されている。塩漬は、保水性や結着性の発現、特徴的な肉色の固定、微生物

の繁殖の抑制および塩漬フレーバーと称される塩漬肉特有の風味の発現に寄与しており、塩漬フレーバーの発現以外の特性については、既におおむねその機構は解明されている。

塩漬フレーバーとは、塩漬熟成中に次第に強まる塩漬食肉製品にのみ共通する風味のことである。パルマハムやハモンセラノのようなヨーロッパ産の生ハムは、1年以上の長期乾塩漬により付与された強い風味が特徴的である。一方、日

本では短期間の湿塩漬が主流であるが、日本農林規格の熟成ソーセージ類、熟成ベーコン類および熟成ハム類の規格では、塩漬における熟成期間（それぞれ3, 5, 7日間以上）を定めている。このような塩漬熟成を経て製造された食肉製品は、強い風味を有する。

塩漬フレーバーに関するこれまでの研究は、風味、すなわち香りと味を同時に感知する官能試験に基づいて報告されてきたが<sup>1, 2)</sup>、実際は、香りと味は別の感覚であり、香りは揮発成分を嗅覚で感知し、味は遊離アミノ酸や核酸関連物質のような水溶性成分を味覚で感知している。塩漬フレーバーの発現機構を官能試験によって解明する場合には、香りと味を正確に区別して評価すべきである。

亜硝酸塩は塩漬フレーバーの発現に必須であり<sup>1, 3)</sup>、さらに、食肉の加熱の際に生じる脂質酸化臭を抑制することも明らかにされている<sup>4, 5)</sup>。また、塩漬フレーバーの香りに関わる成分については、塩漬肉に特有の揮発性化合物が同定されている<sup>6, 7)</sup>。一方、塩漬フレーバーの味に関わる成分についての研究はなく、塩漬肉のみに存在するような呈味成分は特定されていない。遊離アミノ酸や低分子ペプチド等の呈味成分が塩漬熟成に伴う特有の味の増強に寄与していると推定されているが、同様に呈味成分であるイノシン酸 (IMP) 量は熟成期間中に減少することが報告されており<sup>8)</sup>、塩漬肉特有の味の発現機構は複雑で多様であると考えられる。塩漬熟成に伴う特有の味の発現機構が解明されれば、塩漬熟成期間の短縮や、より味わい深い製品の生産が可能になるであろう。

本研究の目的は、香りの影響を排除した官能試験法を用いて塩漬熟成に伴う塩漬肉特有の味の発現機構の解明である。今回は、湿塩漬のモデル試料を用いて塩漬肉特有の味の強さに対する塩漬熟成期間、亜硝酸塩および耐熱性筋漿画分の関与を

検討するとともに、原料肉の塩漬けに伴う耐熱性筋漿画分中の含窒素成分の変化から塩漬熟成に伴う特有の味の増強に關与する因子を特定した。

## 2. 方法

### 2.1 原料

市販黒豚ロース肉から豚胸最長筋を切り出し、実験設計に合わせて厚さ5mmの薄切り肉、あるいは挽肉にした。

### 2.2 meat-extractの準備

挽肉に等量の0.1M NaCl溶液を加えガラス棒を用いて混合し、3,000×g、4℃で10分間遠心分離した。得られた上清（筋漿画分）を100℃で20分間加熱後、3,000×g、4℃で10分間遠心分離した。最終的に得られた上清をmeat-extract（耐熱性筋漿画分）として使用した。

### 2.3 官能試験用試料の準備

官能試験Ⅰ、Ⅱ、ⅢおよびⅣに用いる湿塩漬モデル試料を調製した。ピクルはNaClを2%、亜硝酸ナトリウム (NaNO<sub>2</sub>) を200ppmになるように調製した。官能試験Ⅰでは、薄切り肉を4℃で2、72および168時間塩漬した。官能試験Ⅱでは、あらかじめ薄切り肉を2%NaCl溶液に4℃で168時間漬け込み、その後NaNO<sub>2</sub>を200ppmになるように加えて4℃で2時間塩漬した。官能試験Ⅲでは、薄切り肉を重量で50%のmeat-extractを含むピクルで4℃、2時間塩漬した。官能試験Ⅳでは、薄切り肉をHxの濃度が0、4、8および16mMになるように添加したピクルに4℃で2時間塩漬した。各官能試験における試料とピクルは1:1（重量）で塩漬し、70℃で20分間加熱後、水冷した。モデル試料は各官能試験に供するときに室温に戻した。

### 2.4 官能試験

塩漬肉に特有な味のみを評価するため、パネリストは鼻をノーズクリップで閉じた状態で評価し

た。ピクルで4℃、2時間塩漬した試料を基準試料とし、基準試料と、官能試験Ⅰ、Ⅱ、ⅢおよびⅣの各モデル試料における塩漬肉特有の味の強さを比較した。味の強度は5段階で評価し、基準試料と比較した場合に味がかなり弱い場合を-2点、やや弱い場合を-1点、差がない場合を0点、やや強い場合を+1点、かなり強い場合を+2点とした。パネリストは、食肉製品の官能評価技術に熟練したJASの官能検査員とそれに準ずる者9名とし（男性6名、女性3名）、各官能試験は2回実施した。

#### 2.5 salt-extractの準備

挽肉に等量の2%NaCl溶液を加え、0、72および168時間漬け込んだ。温度は特定JAS規格の上限である10℃とし、各時間漬け込んだ原料肉をsalted-meatと定義した。salted-meatの一部は、IMPおよびHx含量の測定に使用し、残りのsalted-meatは、salt-extractの調製に用いた。salted-meatにNaCl濃度が0.1Mになるように蒸留水を加えてホモジナイズした後、3,000×g、4℃で10分間遠心分離した。得られた上清はmeat-extractと同様に処理し、最終的な上清をsalt-extractと定義した。

#### 2.6 salt-extractおよびsalted-meat中の呈味成分の化学的分析

salt-extract中の窒素濃度は、燃焼法により測定した（スミグラフNC-220F、(株)住化分析センター製）。

salt-extract中の含窒素成分の分画は、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて行った。salt-extractを0.45μmセルロース膜で精製し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（Waters2695、Waters社製）に供した。カラムは分画可能な分子量領域が100~5000のTSK-gel G2500PW<sub>XL</sub>、7.8mmID×30cm（(株)東ソー社製）を用い、流出条件は0.1M NaCl溶液で流速0.8ml/min、検出

器のUV波長は190nmから400nm（Waters2996、Waters社製）とした。

Salted-meat中のIMPおよびHx含量は、北田らの方法<sup>9)</sup>で測定した。

#### 2.7 統計処理

すべての結果は平均値±標準誤差で算出し、FおよびT検定を行った。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 塩漬肉特有の味の増強に関する要因

##### (1) 塩漬熟成期間

塩漬肉特有の味の増強に対する塩漬熟成期間の関与について、官能試験Ⅰで調製した塩漬時間の異なるモデル試料（2、72、168時間）を用いて調べた結果、基準試料と比較して、72時間塩漬した試料では味の強さはほとんど変化しないが、168時間塩漬した試料では強い味が認められた（ $p < 0.05$ ）。この強い味は、熟成食肉製品の味に共通する「旨味」「複雑さ」「濃厚さ」および「ハーモニー」が増強された味わいと表現することができた。一定期間以上の塩漬熟成により、香りに関係なく塩漬肉特有の味自体が強まることが示唆された。

##### (2) 亜硝酸塩

168時間の塩漬熟成で塩漬肉特有の味が強まることに対するNaNO<sub>2</sub>の関与について、官能試験Ⅱで調製したモデル試料を用いて調べた（Fig. 1）。前処理をした試料は、前処理をしなかった基準試料と比較して明らかに強い味が認められた（ $p < 0.05$ ）。原料肉を塩漬前に168時間NaCl溶液に漬け込むことにより、NaNO<sub>2</sub>による塩漬は2時間程度の短い時間であっても、強い味が発現したということである。また、前処理のみを施した試料では塩漬肉特有の味の発現は認められなかった。つまり、塩漬肉特有の味の発現にはNaNO<sub>2</sub>が必須ではあるが、塩漬熟成に伴う強い味の発現

には $\text{NaNO}_2$ はほとんど関与せず、 $\text{NaCl}$ 溶液への漬け込みに伴う原料肉自体の熟成が大きく関与していると示唆された。

### (3) meat-extract

原料肉の熟成中に増加する成分と、塩漬肉特有の味の増強に関与する成分を探索する目的で官能試験Ⅲを設計した。挽肉から調製したmeat-extractは、耐熱性の筋漿画分であり、含窒素成分である遊離アミノ酸や低分子ペプチド、あるいは核酸関連物質を多く含むと考えられる。このmeat-extractをピクルに加えて調製したモデル試料について、味の増強に対するmeat-extractの添加効果を調べた (Fig. 2)。meat-extract添加試料は、不添加試料と比べ味の強さが明らかに強かった ( $p < 0.05$ )。含窒素成分は食品の味に寄与することから<sup>10-13</sup>、本結果における味の増強はmeat-extractに存在する含窒素成分によって引き起こされると示唆された。

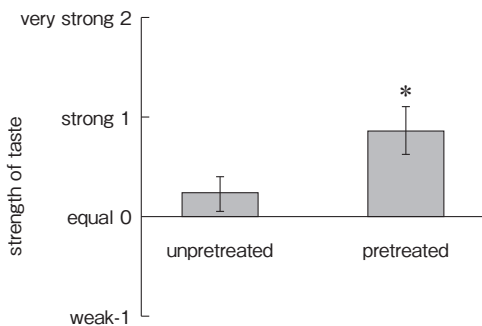


Fig. 1 Effect of the pretreatment without sodium nitrite on the taste of cured meat.

Sliced meat was immersed in a 2 %  $\text{NaCl}$  solution without  $\text{NaNO}_2$  for 168 hrs as a pretreatment, cured with a pickle containing 2 %  $\text{NaCl}$  and 200 ppm  $\text{NaNO}_2$  at 4 °C for 2 hrs, and then heated at 70 °C for 20 min. The strength of the taste of the samples pretreated was compared with that of the standard samples (N=14).

Asterisk; significantly different ( $p < 0.05$ ).

### 3.2 塩漬食肉製品の味の増強に関与する成分の同定

$\text{NaNO}_2$ 非存在下で熟成に伴って変化する原料肉の筋漿画分中の含窒素成分に着目し、塩漬肉特有の味の増強に関与する成分の同定を試みた。

第一に、2 %  $\text{NaCl}$ 溶液に10°C、0-168時間漬け込んだ原料肉から調製したsalt-extract中の全窒素濃度を測定した結果、168時間の漬け込みに伴うsalt-extractの全窒素濃度に変化は認められなかった。本結果から、168時間漬け込み中に、原料肉中のタンパク質のような高分子量の成分がアミノ酸や低分子ペプチドといった低分子量の成分へ分解されていないと推定された。

第二に、ゲルろ過クロマトグラフィーを用いて、漬け込み期間中のsalt-extractにおける含窒素成分の動態を調べた。まず、アミノ酸やペプチドに関連する220nm、あるいは280nmに極大吸収を持つ画分に関して、漬け込み時間の経過に伴うクロマトグラムの変化は観察されなかったことから、原料肉中の筋原線維構成タンパク質や結合組織構成タンパク質といった不溶性の構造タンパク

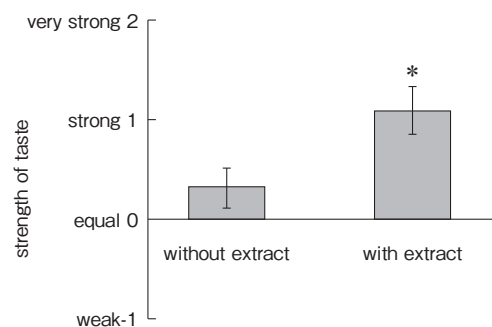


Fig. 2 Effect of the extract on the taste of cured meat.

The sliced meat was cured with a pickle containing 2 %  $\text{NaCl}$ , 200ppm  $\text{NaNO}_2$  and 50% (v/v) of the extract at 4 °C for 2 hrs, and then heated at 70 °C for 20 min. The strength of the taste of the sample with the extract was compared with that of the standard samples (N=16).

Asterisk; significantly different ( $p < 0.05$ ).

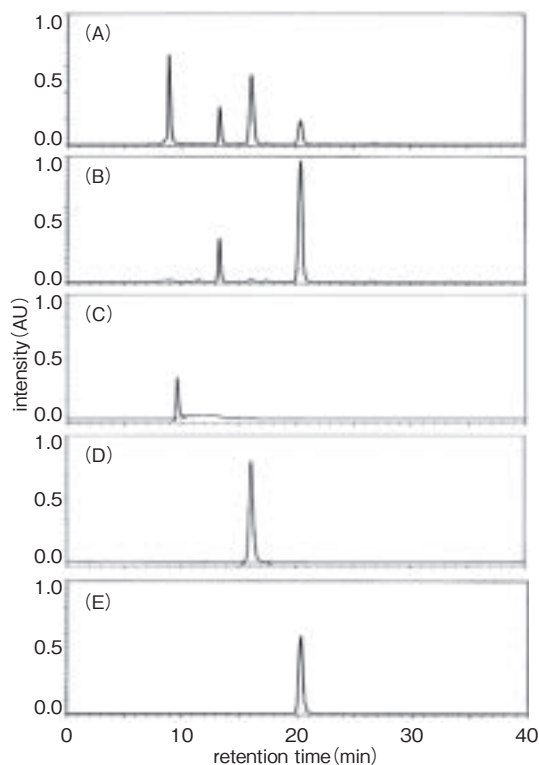


Fig. 3 Gel filtration chromatograms of the fractions of the salt-extract monitored at 250 nm.

A fractionation of nitrogen compounds in the salt-extract incubated for 0 (A) or 168 (B) hrs at 10 °C was carried out by gel filtration chromatography. The changes of nitrogen compounds were detected by a spectrophotometer using 250 nm. The calibration substances of typical ATP-related compounds included in meat, IMP (C), Ino (D) and Hx (E), were also applied to a gel filtration chromatography.

質の分解によるアミノ酸やペプチドの生成はほとんど進んでいないと推定された。一方で、核酸関連物質に関連するUV250nm付近に極大吸収を持つ画分において、0から168時間の漬け込み前後でクロマトグラムに大きな変化が観察された (Fig. 3)。漬け込み0および168時間の2つのクロマトグラムを比較すると、第1および第3画分の面積は168時間の漬け込みによってほとんど消えたのに対し、第4画分の面積は168時間の漬け込み後に明らかに大きくなった (Fig.3B)。この

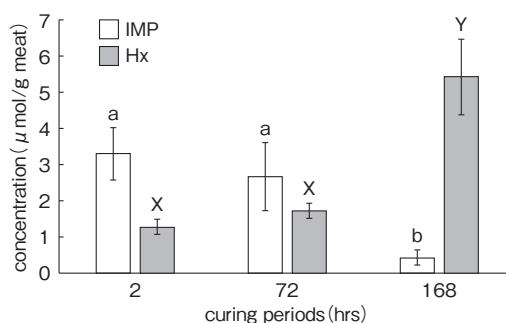


Fig. 4 Changes in the concentration of IMP and Hx in the salted-meat incubated with the 2% NaCl solution for various periods.

Minced meat was mixed to an equal weight of 2% NaCl solution, and then incubated for 0, 72 or 168 hrs at 10 °C. The concentrations of IMP and Hx in the salted-meat were analyzed by the method of Kitada *et al.* Histograms show mean values obtained from 4 samples  $\pm$  standard errors.

Bars with different capital and lowercase letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

第4画分の主要成分を同定するため、核酸関連物質 (IMP, INOおよびHx) のクロマトグラムと比較した結果、第4画分の保持時間とHxの保持時間とが一致した (Fig.3E)。また、168時間の漬け込みによって消失した第1画分の保持時間はIMPと一致した (Fig.3D)。Hxは、食肉の死後の熟成期間中にIMPが分解されて生成し、魚肉においては腐敗の指標として用いられている<sup>14)</sup>。

第三に、0、72および168時間2%NaCl溶液で漬け込んだsalted-meat中のIMPとHxの濃度の変化を調べた (Fig. 4)。0から168時間の漬け込み期間中にHxが増加し、IMPが減少しており、72時間まではHxよりもIMP濃度の方が高いが、168時間では、IMPよりもHx濃度の方が高くなった ( $p < 0.05$ )。これは、2%NaCl溶液への漬け込み中にIMPが分解し、Hxが生成したことを示す。IMPは食品中の「旨味」として広く認知されており<sup>15-17)</sup>、グルタミン酸やカリウムイオンとともに鶏肉の味に寄与する主要成分であると報告されている<sup>18)</sup>。一方、これまでにHxが食肉の味に寄与

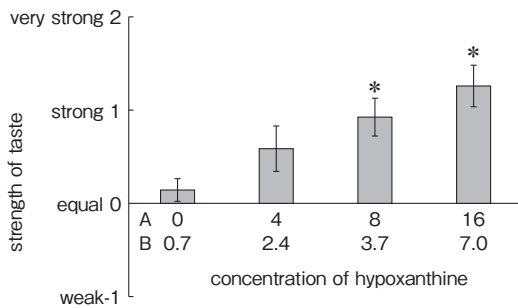


Fig. 5 Effect of Hx on the taste of cured meat.

The sliced meat was cured with the pickle containing 2 % NaCl, 200 ppm NaNO<sub>2</sub> and various concentrations of hypoxanthine (0, 4, 8 and 16 μmol/ml) at 4 °C for 2 hrs, and then heated at 70 °C for 20 min. The strength of the taste of the samples with Hx was compared with that of the standard ones (N = 12). A and B show concentration of Hx in the pickle (μmol/ml pickle) and meat (μmol/mg meat), respectively.

Asterisk; significantly different (p < 0.05).

するか否かを調べた例はない。本結果は、塩漬肉の味の増強におけるHxの寄与はIMPよりも高いことを示唆しており、長期間塩漬した食肉製品ではIMP濃度は低くHxの濃度が高いという報告によっても支持される<sup>8)</sup>。

第四に、塩漬熟成に伴う塩漬肉特有の味の増強に対してHxが寄与しているか否かを明らかにするため、官能試験Ⅳで調製した様々な濃度のHxを含むピクルで2時間塩漬したモデル試料を官能試験に供した (Fig. 5)。Hx添加試料は、Hx不添加試料と比較して強い味を示し、その強度はHxの濃度に依存して強まった。モデル試料中のHx濃度が3.7 μmol/g meat以上の場合、Hx不添加の試料と比較して有意差が認められたことから (p < 0.05)、Hxが亜硝酸塩によって発現した塩漬肉特有の味を増強することが確認された。

本研究により、Hxは塩漬熟成に伴う塩漬肉特有の味の増強に必須であると結論された。従来はHxが食肉の味に関与する成分として研究されてこなかったが、Hxは苦味を呈する成分であるこ

とから<sup>19)</sup>、Hxの持つ苦味が熟成食肉製品のおいしさに寄与している可能性が考えられる。

#### 4. 要 約

本研究では、塩漬熟成に伴う塩漬肉特有の味の発現機構について調べた。塩漬肉特有の味は、香りに関係なく、塩漬熟成期間および耐熱性筋漿画分中の未知成分によって増強した。また、亜硝酸塩は塩漬肉特有の味の発現には必須であるが、塩漬熟成に伴う味の増強には直接関与しないことが示唆された。

原料肉の塩づけに伴って顕著に増加する耐熱性筋漿画分中の含窒素成分はヒポキサンチン (Hx) であった。Hxを添加したピクルで作製したモデル試料は、短時間の塩漬にもかかわらず塩漬肉特有の味が強く発現した。以上の結果から、塩漬熟成に伴う特有の味の増強にはHxが必須であると結論した。

#### 文 献

- 1) Macdonald, B., Gray, J. I., Stanley, D. W., Osborne, W. R., *Journal of Food Science*, 45, 885 ~ 904, 1980.
- 2) Shahidi, F., Rubin, L., D'Souza, L. A., Teranishi, R., Buttery, R. G., *CRC Critical Reviews I Food Science and Nutrition*, 24, 141~243, 1986.
- 3) Brown, C. L., Hedrick, H. B., Bailey, M. E., *Journal of Food Science*, 39, 977~979, 1974.
- 4) Sato, K., Hegarty, G., *Journal of Food Science*, 36, 1098~1102, 1971.
- 5) Igene, J. O., Yamauchi, K., Pearson, A. M., Gray, J. I., Aust, S. D., *Food Chemistry*, 18, 1~18, 1985.
- 6) Ramarathnam, N., Rubin L. J., Diosady, L. L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 344~350, 1991 a.
- 7) Ramarathnam, N., Rubin, L. J., Diosady, L. L., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 1839~1847, 1991 b.
- 8) Escudero, E., Mora, L., Aristoy, M., Toldrá, F., *Meat Science*, 89, 536~539, 2011.
- 9) Kitada, Y., Hasuike, A., Sasaki, M., Tanigawa, K., Horiuchi, R., Yumiba, H., *日本食品工業学会誌*, 30, 151~154, 1983.
- 10) Yamasaki, Y., Maekawa, K., *Agricultural*

- Biological Chemistry*, **42**, 1761~1765, 1978.
- 11) Nishimura, T., Kato, H., *Food Reviews International*, **4**, 175~194, 1988.
  - 12) Buscaihon, S., Berdague, J. L., Bousset, L., Cornet, M., Gandemer, G., Touralle, C., Monin, G., *Meat Science*, **37**, 229~243, 1994.
  - 13) Kawai, M., Okiyama, A., Ueda, Y., *Chemical Senses*, **27**, 739~745, 2002.
  - 14) Hughes, R. B., Jones, N. R., *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **17**, 434~436, 1966.
  - 15) Yamaguchi, S., *Physiology & Behavior*, **49**, 833~841, 1991.
  - 16) Yamaguchi, S., Ninomiya, K., *Journal of Nutrition*, **130**, 4, 9215~9265, 2000.
  - 17) Kurihara, K., Kashiwayanagi, M., *Journal of Nutrition*, **130**, 9315~9345, 2000.
  - 18) Fujimura, S., Kawano, S., Koga, H., Takeda, H., Kadowaki, M., Ishibashi, T., *Animal Science and Technology (Japan)*, **66**, 43~51, 1995.
  - 19) Tikk, M., Tikk, K., Tørngren, M. A., Meinert, L., Aaslyng, M. D., Karlsson, A. H., Andersen, H. J., *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **54**, 7769~7777, 2006.

## 調理加工食肉・肉製品の機能性成分およびその発現に関する研究

The investigation of functional properties and its expression in cooked and processed meats

六 車 三治男・木 本 早 紀・川 北 久美子・竹之山 慎 一

(南九州大学健康栄養学部)

Michio Muguruma, Saki Kimoto, Kumiko Kawakita and Shinichi Takenoyama

(Faculty of Health and Nutrition, Minami Kyushu University)

This research aimed to study and compare the biological and functional properties as well as physiological effects of hydrolysates of pork meat treated with various kinds of heat treatment and processing ; in vitro tests. All samples separately hydrolyzed with pepsin and trypsin and then subjected to SDS-PAGE and HPLC analysis. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of the hydrolysates was determined by rabbit lung enzyme. The antioxidant activity of the hydrolysates was determined by the DPPH radical scavenging assay.

SDS-PAGE results suggest that each sample was degraded by enzyme treatment. HPLC patterns indicate that the main peak in each samples digested for 2h contains bioactive peptides (MW less than 6000). However, undigested samples of raw meat and raw ham slightly differ from each other. In comparison, HPLC patterns insignificantly varied in samples of raw meat, heat treated meat and processed meat products, which were digested for 2h. The pork loin meat treated with various heating methods showed a very similar ACE inhibition percentage, although processed meat products showed lower ACE inhibition percentage. The pork loin meat treated with various heating methods also showed a very similar DPPH inhibition activity, although loin roll and bacon showed higher DPPH inhibition activity.

Based on their remarkable ACE inhibitory activity and antioxidant activity, we suggest that the hydrolysates from cooked and processed pork meats may have potential applications as functional food.

### 1. 目 的

近年、ライフスタイルの変化や多様化に伴い、生活習慣病が増加し、国民の健康への関心は極めて高くなっている。とくに、畜産食品に代表される動物性食品は、健康に負の影響を及ぼすというイメージを持つ消費者が多く、食肉・肉製品の消

費低迷の一つの要因と考えられている。このような状況の中、乳製品の発酵乳を中心に血圧低下ペプチドを含む機能性食品の研究・開発が行われ、消費者の健康に寄与できる食品としてのイメージが定着している<sup>1)</sup>。一方、食肉は栄養豊富な食品として古くから認識されてはいたものの、機能性食品としてのアプローチが遅れていた。しかし、



食肉は良質なタンパク質を多く含んでおり、近年、疾病予防作用などの保健的な機能性に関する研究が進められている<sup>1)</sup>。

食肉には、アンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) の阻害による高血圧症予防の期待があることが報告されている<sup>2)</sup>。食肉によるこれらの効果は主にペプチドに由来する。食肉タンパク質は酵素消化によりペプチドを生成し、その機能性を発揮する。現在、食肉由来血圧降下作用ペプチドに関しては筆者らの研究も含めていくつか検出されている<sup>2-9)</sup>。さらに、我々は、各種食肉を消化酵素のペプシン、トリプシンやパンクレアチンで処理すると、鶏肉、豚肉、牛肉の順に血圧上昇抑制活性 (ACE阻害活性) が増加することを明らかにした<sup>10)</sup>。また、抗酸化活性も、有意差は認められないものの各種食肉加水分解物は高い抗酸化活性を示すことも認め、いずれの食肉を摂取しても生活習慣病予防につながる効果を食肉に期待できることを明らかにした<sup>11)</sup>。これらの一連の研究は、主として生の食肉を用いて得られた結果である。しかし、われわれが食肉を食する際には、調理加工した食肉や肉製品を摂取する場合が一般的である。

そこで、調理加工した食肉・肉製品を摂取した際にも、生体調節機能を有する機能性成分が産生されるかどうかや、それら機能性成分の発現様式についても検討することを本研究の目的とした。

## 2. 方 法

### 2.1 実験材料

食肉材料として、肉類のなかでも消費量が多く、食肉加工の主要な原料となっている豚肉を実験材料として使用した。市販の宮崎県産の豚ロース肉を購入し、各種加熱処理原料肉として用いた。一方、加工食肉製品としては、国産メーカーが製造した生ロースハム (うすぎり ラックスハ

ム)、ロースハム (加熱食肉製品) およびベーコン (加熱食肉製品) を購入し、実験試料とした。

### 2.2 生ロース肉の各種調理加工

筋繊維の配列が把握しやすい生ロース肉 (3 mm厚) を対象とした。一方、湿式加熱法 (煮る, 100°C, 30秒間), 乾式加熱法 (炒める, フライパンで両面を30秒ずつ処理), 誘電電動加熱法 (マイクロ波, National NE-NS 5 電子レンジにより 500W, 2分間処理) およびスチームコンベクション加熱法 (Sharp Healsio AX-1000により, ウォーターグリの条件で, 80°C, 10分間加熱) により, 生ロース肉 (3 mm厚) を処理した試料を加熱調理肉とした。

### 2.3 食肉および各種酵素による調製

食肉由来ペプチドの調製は以下のとおりである。各種加熱調理食肉および食肉製品のミンチ肉に2倍量の蒸留水を添加してフードプロセッサー (Panasonic MK-K61) を用いて30秒間, 2回ホモジナイズした。このホモジェネートを酵素未処理の食肉タンパク質サンプル「生肉 (0 h)」とした。その後, このホモジェネートをHClでpH1.8に調整し, 胃粘膜由来ペプシン (1 : 10000) (和光純薬工業株式会社製) をタンパク質量 (食肉重量当たり20%のタンパク質が含まれることを仮定した) に対して1/1000倍量添加し, 攪拌しながら37°Cで1時間インキュベートした。NaOHを用いてpH6.8に調整し, 10分間煮沸した後, 溶液温度を40°Cまで低下させた。この溶液をペプシン消化サンプル「ペプシン (1 h)」とした。さらにトリプシン (和光純薬工業株式会社) およびパンクレアチン (同会社) をそれぞれペプシンと同量添加し, 再び攪拌しながら37°Cで1時間インキュベートした。最後に10分間煮沸した試料を食肉由来ペプチドとした。この溶液をペプシン・トリプシン処理サンプル「ペプシン/トリプシン (2 h)」とした。

なお、食肉タンパク質「生肉 (0 h)」および各反応段階で得られた酵素消化により生じたペプチド混合物を $0.45\ \mu\text{m}$ セルロースアセテートメンブレンフィルター (アドバンティック東洋 (株)) にてろ過した試料を実験に供した。

#### 2.4 ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

得られた試料の分子種やそれらの酵素反応による分解の程度を調べるためにドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) をLaemmliの方法<sup>12)</sup>で行った。アクリルアミド濃度10~20%のグラジエントゲルを用いてスラブ型の泳動槽で行った。ゲルバンドの染色はクーマシープリリアントブルー R-250 (Bio-RAD Laboratories) により行い、脱色には10%酢酸を用いた。また、分子量マーカーとして SDS-PAGE Molecular weight standards, High Range および Low Range (BIO-RAD社製) を使用した。

#### 2.5 ゲルろ過高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

溶離液には0.05 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 300mM NaClを用いた。分析中は溶離液を脱気装置 (DGU-14 A, 島津製作所 (株)) に通し、カラムはTSK-GEL G 2000SWXL (7.8 × 300mm) (東ソー株式会社), 送液ポンプはLC-20AD (島津製作所(株)) を用い、流速2.0ml/min, 注入量 $20\ \mu\text{l}$ で行った。

ペプチドの検出には、検出器 (SPD-10AVP, 島津製作所(株)) を用い、検出波長は280nmで行った。さらに分子量マーカーとしてBSA (MW: 67,000), シトクローム C (MW: 13,000), アプロチニン (MW: 6,500), リボフラビン (MW: 376) を用いた。

#### 2.6 タンパク質の定量

酵素未処理の食肉タンパク質「Whole」の定量はBiuret法<sup>13)</sup>により行った。すなわち、タンパク質溶液に対し、4倍量のBiuret試薬を加えて常温で30分間反応させた。反応液を島津製作所(株)製 UV-VIS Spectrophotometer1240型分光光度計 (吸光度: 540nm) にて測定した。また分解物であるペプチドについてはUV法<sup>14)</sup>を適用し、測定を行った。すなわちタンパク質溶液の215nmの吸光度から225nmでの吸光度を差し引き、144倍した時の数値をタンパク質濃度とした。測定には上記と同じ分光光度計を使用した。

#### 2.7 アンギオテンシン I 変換酵素 (ACE) 阻害活性の測定

Cushmanの方法<sup>15)</sup>に準じて測定した。ACEはウサギ肺由来アンギオテンシン I 変換酵素 (ACE, Peptidyl dipeptidase, EC3.4.1 5.1, シグマ社) を用い、0.25Mホウ酸緩衝液で1 unit/mlに調整し、測定時には0.25Mホウ酸緩衝液で60unit/mlに希釈し使用した。ACEとの反応基質としては合成基質であるヒプリル-Lヒスチジル-Lロイシン (HHL, ナカライテスク社) を使用した。HHLは塩化ナトリウム (和光純薬工業), 0.25Mホウ酸緩衝液をそれぞれ0.608M, 0.1MになるようにMilliQ水を用いて調整した溶液で溶解した。

試料 $6\ \mu\text{l}$ に60unit/mlのACE溶液 $20\ \mu\text{l}$ および7.6mM HHL溶液 $50\ \mu\text{l}$ を添加し37°Cで30分間反応させた。反応は0.1NHCl (和光純薬工業)  $554\ \mu\text{l}$ を加えて停止させた。反応後には酢酸エチル (ナカライテスク) 1.5mlを加えてACEの作用により遊離した馬尿酸を振とう抽出し、2500rpm (1000 × g), 15分間遠心分離を行った。上清の酢酸エチル層を1 ml分取し、100°C, 10分間の加熱により蒸発乾固させた。乾固した馬尿酸を回収するために1 MのNaCl溶液を1 ml加えボルトックスを行った。溶解した馬尿酸吸光度を

228nmで測定した。

阻害率は酵素分解物の吸光度をS、酵素分解物の代わりにMilliQ waterを加えた時の吸光度をC、あらかじめACEを失活させてから反応させた時の吸光度をBとして次式より求めた。

$$\text{阻害率 (\%)} = \{(C - S/C - B)\} \times 100$$

### 2.8 DPPHラジカル消去活性の測定

DPPHラジカル消去活性の測定は、DPPH分光測定法に準じて行った<sup>16)</sup>。すなわち、400  $\mu$ M DPPH, MES(2-morpholino-etanesulphonic acid) buffer, 20%エタノールを同量ずつ加え、混液を作製した。混液を0.9ml分注し、80%エタノールを240  $\mu$ lとサンプルを60  $\mu$ l加え、20分間反応させた。その後、サンプルを加えた順に前述の分光光度計にて吸光度520nmで測定した。また、サンプルの代わりに、0.2mM Trolox (Sigma社製) を使って標準として測定し、検量線からサンプルのTrolox相当量を算出した。MES BufferはMESを蒸留水に溶解し、NaOHでpH 6に調製したものを使用した。

## 3. 結果と考察

一般的に食肉を食する際には、加熱調理した食肉や肉製品を摂取するが多い。本研究は、調理加工した食肉および食肉製品を摂取した際にも、生体調節機能を有する機能性成分が産生されるかどうかについて検討することが目的である。これまでの食品素材からの生体調節機能の一つである血圧上昇抑制活性 (ACE阻害活性) の研究は、タンパク質派性ペプチドの検索が中心であることや、Stamlerらの報告<sup>17)</sup> からタンパク質摂取量の増加は血圧降下に有効であるとされることなどから、本実験においても食肉を複数の酵素により処理した過程でのタンパク質分解物の出現状況や、分解されて出現したペプチド混合物のACE阻害活性やDPPHラジカル消去活性を測定した。

### 3.1 SDS-PAGEおよびゲルろ過HPLCによる分子量分布の分析

調理加工した食肉および食肉製品から、それらの消化酵素による消化過程で産生される機能性成分 (機能性ペプチド) の産生過程を検討した。まず、SDS-PAGEによるサンプル全体のタンパク質の分子量分布およびゲルろ過HPLCによる消化による食肉タンパク質分解の経時的変化の観察と分子量分布の測定を行った (Fig. 1, 2)。

対象の生ロース肉から、ペプシン処理によりミオシン重鎖 (MW: 230,000) が分解を受け分子量が97,000以下の成分に分解された (Fig.1, lane 3)。さらにトリプシンおよびパンクレアチン処理により、大部分のアクチン分子 (MW: 42,000) も低分子ペプチド (MW12,000以下) に消化された (lane 4)。湿式加熱法 (lanes 5~7)、乾式加熱法 (lanes 8~10)、誘電電動加熱法 (lanes 11~13) およびスチームコンベクション加熱法 (lanes 14~16) により処理した試料は、ほぼ同様の酵素処理による分解の程度を示した。ただ、生ロース肉のペプシンによる処理後のバンド (lane 3) と各加熱処理区のバンド (lane 6, 9, 12, 15) を比較すると、アクチンよりも高分子のバンドの量が極めて少ないことから、加熱処理をしたロース肉の方が酵素 (ペプシン) 処理により分解されやすいことが判明した。これらの結果は、豚ロース肉から調製した筋原線維タンパク質をペプシン、キモトリプシン、トリプシンで処理したところ、どの酵素でも未変性タンパク質に比べ、変性タンパク質は容易に分解された結果<sup>3)</sup> と一致した。さらにトリプシンおよびパンクレアチン処理 (酵素処理 2 h) をすると、筋肉タンパク質は分子量6,000付近を中心としたブロードなバンドに分解された。

一方、生ハム、ロースハムおよびベーコンを用いて検討した結果でも、生ロース肉や各種加熱処

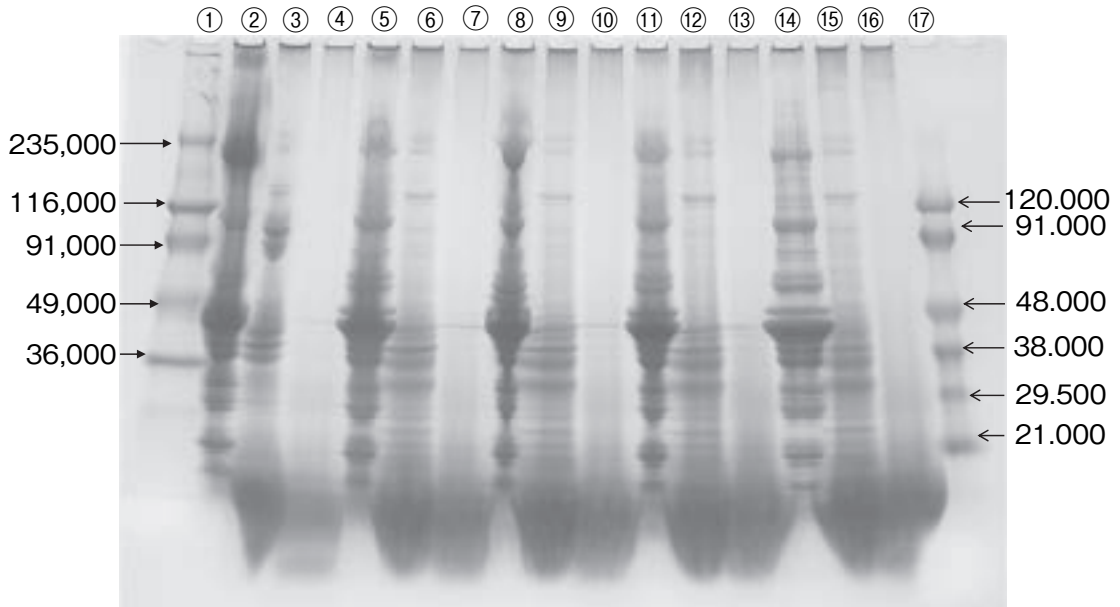


Fig. 1-a SDS-PAGE pattern of time course hydrolyzation of digested samples. 1 & 17 (molecular weight marker) ; 2 ~ 4 ( 0, 1 and 2h digestion time of raw meat ) ; 5 ~ 7 ( 0, 1 and 2 digestion time of boiled meat ) ; 8 ~ 10 ( 0, 1 and 2h digestion time of fried meat ) 11 ~ 13 ( 0, 1 and 2h digestion time of microwave heated meat ) ; 14 ~ 16 ( 0, 1 and 2h digestion time of superheated steam meat ).

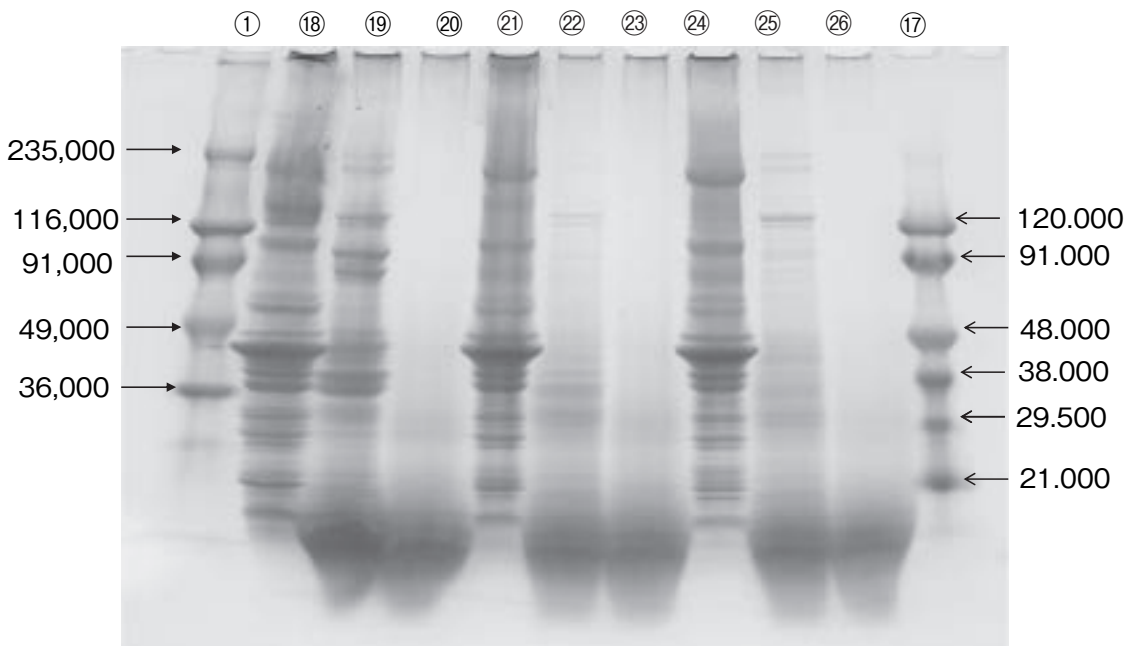


Fig. 1-b SDS-PAGE pattern of time course hydrolyzation of digested samples. 1 & 17 (molecular weight marker) ; 18 ~ 20 ( 0, 1 and 2h digestion time of raw ham ) ; 21 ~ 23 ( 0, 1 and 2 digestion time of loin role ) ; 24 ~ 26 ( 0, 1 and 2h digestion time of bacon ).

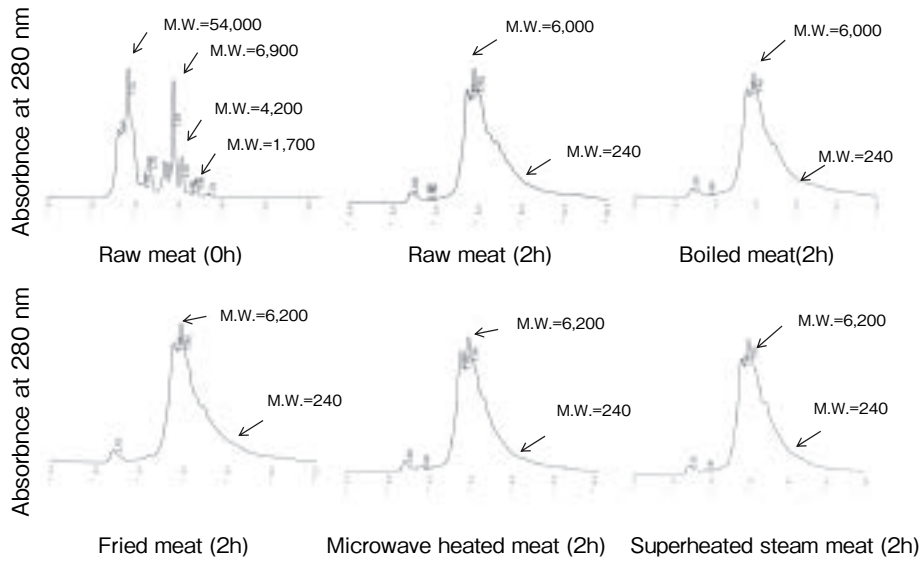


Fig. 2-a HPLC pattern of time course hydrolyzation of raw meat, boiled meat, fried meat, microwave heated meat and superheated steam meat.

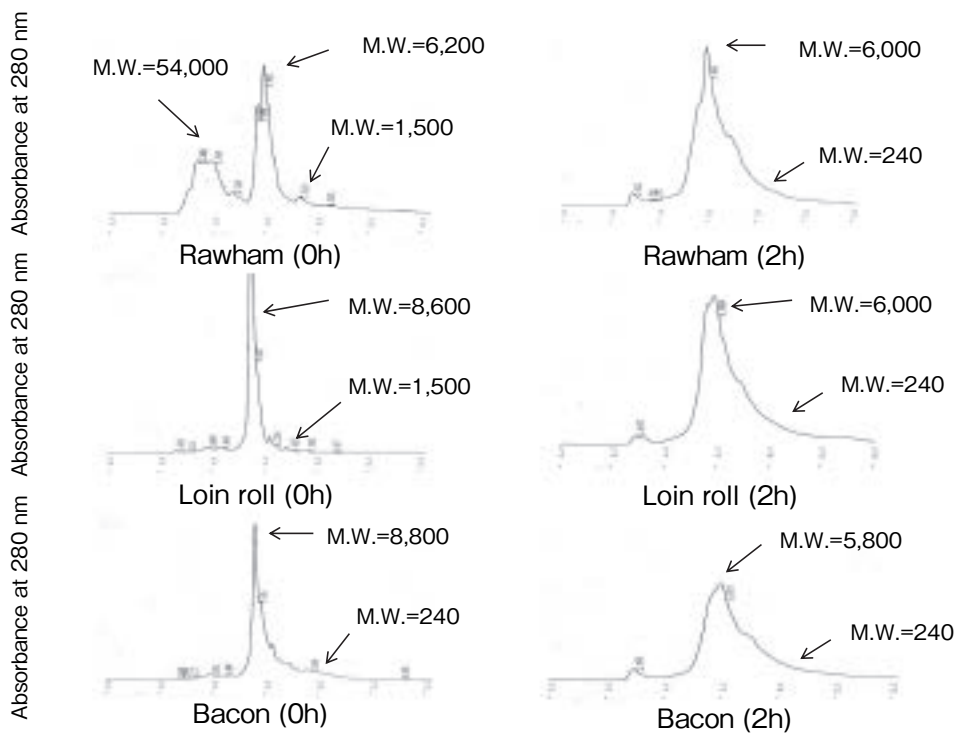


Fig. 2-b HPLC pattern of time course hydrolyzation of raw ham, loin roll and bacon.

理したロース肉から得られた結果とほぼ同様の筋肉タンパク質の分解パターンが観察された

(Fig.2a & 2b)。すなわち、加熱処理をしていない生ハムと加熱工程が加わったロースハムおよび

ベーコンでは、筋肉タンパク質の変性の度合いに起因した酵素処理による筋肉タンパク質の分解様式が認められた。

HPLCの分析結果より分子量20,000Da以上の食肉タンパク質は6,000Da以下に分解されることが明らかになり、各種プロテアーゼとの反応による高分子タンパク質の低分子化が確認された。豚肉の加工調理処理によりペプシン消化による影響の受けやすさに若干の違いが生じ、分解過程のHPLCパターンは異なったが、トリプシンおよびパンクレアチン処理後（2 h）のHPLCパターンは、ほぼ同様のパターンを示した。ペプシンとトリプシンで2時間酵素消化した食肉由来ペプチドのピークを各種調理加工および食肉製品と比較すると、どれも分子量6,000~1,000Daの間にピークを有していることが確認された。いずれの分解物も低分子量のピークの増加が認められ、機能性ペプチドの発現が期待された。

### 3.2 ACE阻害活性の測定比較検討

生ロース肉、各種調理加工処理ロース肉および3種類の食肉製品ともに消化酵素による処理で、食肉タンパク質のほとんどが6,000Da以下に分解されていることが確認された。そこで酵素処理によるACE阻害活性の比較検討を行った。

Fig. 3に、生ロース肉、各種調理加工処理ロース肉および3種類の食肉製品をペプシン、トリプシンおよびパンクレアチン処理後の、各種加熱処理および食肉と酵素処理により0.45  $\mu$ mセルロースアセテートメンブレンフィルタを透過した画分のACE活性阻害率を示した。また、ペプシン処理1時間、その後のトリプシンおよびパンクレアチン処理1時間の合計2時間の酵素処理で、既知のACE阻害剤であるカルノシンの阻害活性と同等かそれ以上のACE阻害活性が発現することが認められた。なお、有意差は認められないものの、湿式加熱法、乾式加熱法、誘電電動加熱法により

処理したロース肉はいずれも93~95%の高いACE阻害率を示した。一方、3種類の加工食品から得られた酵素分解物は、86~88%のACE阻害活性を示した。

以上の結果から、市販の豚ロース肉を用いて、それらを各種加熱調理後、消化酵素のペプシン、トリプシンおよびパンクレアチンで処理すると高いACE阻害活性が発現することが認められた。また、本実験条件下では、加工食肉製品も豚ロース肉を各種加熱調理した試料と比較すると若干低い値であるが、既知のACE阻害ペプチドであるカルノシンよりも高いACE阻害活性を有することが明らかになった。

### 3.3 DPPHラジカル消去活性の比較検討

Fig. 4に、生ロース肉、各種調理加工処理ロース肉および3種類の食肉製品をペプシン、トリプシンおよびパンクレアチン処理後得られた酵素分解物の抗酸化活性をDPPHラジカル消去法により測定した結果を示した。

各種加熱調理肉は、ペプシン処理1時間、その後のトリプシンおよびパンクレアチン処理1時間の合計2時間の酵素処理で、高いDPPHラジカル消去活性を発現した。これらの結果は食肉由来機能性成分の畜種別差異の比較検討をした際のDPPHラジカル消去活性<sup>18)</sup>よりもわずかに高い値であった。また、各種加熱調理豚ロース肉および生ハムを用いて、ペプシン、トリプシンおよびパンクレアチンで処理するとDPPHラジカル消去活性が増加する傾向が認められた。

一方、ロースハムおよびベーコンを酵素処理すると有意に高いDPPHラジカル消去活性を示した。この結果は、これらの製品を製造する際に添加される調味料等に含まれる抗酸化物質由来の活性が付加されたものと考えられる。我々は、各種食肉の消化酵素分解物における抗酸化作用の比較検討を行い、牛肉、豚肉、鶏肉の消化酵素分解物

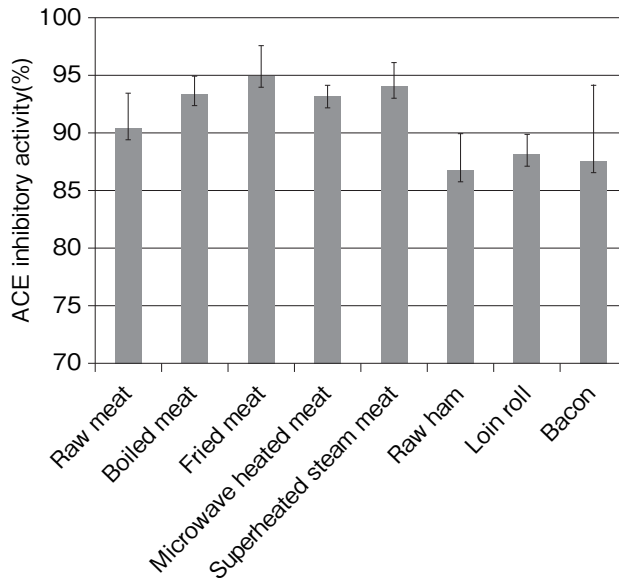


Fig. 3 Associated graph shows the value of ACE inhibition percentages.

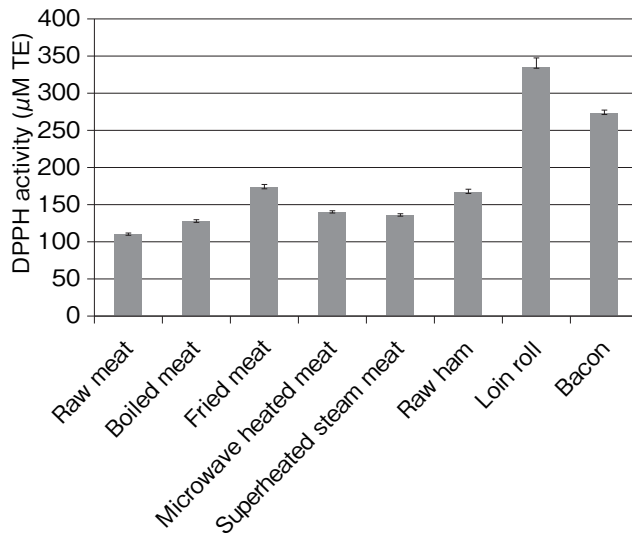


Fig. 4 Effects of various kinds of heat treatment and processing on DPPH radical scavenging activity of each sample. TE: Trolox equivalent.

に、抗酸化物質であるカルノシンと同等以上の抗酸化活性を認めている<sup>19)</sup>。本研究の結果では、その際に豚肉で得られた以上の高い抗酸化活性が確認できた。

以上の結果から、市販の豚ロース肉を用いて、それらを各種加熱調理後、消化酵素のペプシン、

トリプシンおよびパンクレアチンで処理すると高い抗酸化活性が発現することが認められた。

#### 4. 要 約

本研究は、調理加工した食肉・肉製品を摂取した際にも、生体調節機能を有する機能性成分が産

生されるかどうかや、それら機能性成分の発現様式についても検討することを目的に実施した。

SDS-PAGE分析により、各種加熱処理をした豚ロース肉の方がペプシン処理により分解されやすいことが判明した。これは、未変性タンパク質に比べ、変性タンパク質は容易に酵素分解されたためと考えられた。さらにトリプシンおよびパンクレアチン処理をすると、各種加熱ロース肉および肉製品ともに、筋肉タンパク質は低分子化し、分子量6,000付近を中心としたブロードなバンドに分解された。またHPLC分析からも、各種加熱肉および肉製品ともにそれらの酵素分解物は、分子量6,000~1,000Daの間にピークを有していることが確認された。いずれの分解物も低分子量のピークの増加が認められ、機能性ペプチドの発現が期待された。

各種加熱調理後、消化酵素のペプシン、トリプシンおよびパンクレアチンで処理すると高いACE阻害活性が発現することが認められた。また、加工食肉製品も豚ロース肉を各種加熱調理した試料と比較すると若干低い値であるが、既知のACE阻害ペプチドであるカルノシンよりも高いACE阻害活性を有することが明らかになった。さらに、各種加熱処理肉および食肉製品ともに、高い抗酸化活性の発現も認められた。

以上、調理加工した食肉・肉製品を摂取した際にも、生体調節機能を有する機能性成分が産生されることが明らかになった。

#### 文 献

1) 齊藤忠夫, 西村敏英, 松田幹編著: 最新畜産物利用学, 朝倉書店, 123~124, 2007.

- 2) Arihara, K., Nakashima, Y., Mukai, T., Ishikawa, T., Itou, M., *Meat Sci.*, **57**, 319~324, 2001.
- 3) Katayama, K., Fuchu, H., Sakata, A., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M., *Asian-Aust. Anim. Sci. J.*, **16**, 417~424, 2003.
- 4) Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M., *Anim. Sci. J.*, **74**, 53~58, 2003.
- 5) Katayama, K., Tomatsu, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Muguruma, M., *J. Agric. Food. Chem.*, **52**, 771~775, 2004.
- 6) Katayama, K., Jamhari, Mori, T., Kawahara, S., Miake, K., Kodama, Y., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Nakayama, M., Mayuyama, M., Muguruma, M. *J. Food.Sci.*, **72**, S702~706, 2007.
- 7) Katayama, K., Anggraeni, H. E., Mori, T., Ahhmed, A. M., Kawahara, S., Sugiyama, M., Nakashima, T., Mayuyama, M., Muguruma, M. *J. Agric. Food. Chem.*, **56**, 355~360, 2008.
- 8) Muguruma, M., Ahhmed, A. M., Katayama, K., Kawahara, S., Maruyama, M., Nakamura, T., *Food. Chem.*, **114**, 516~522, 2009.
- 9) Ahhmed, Muguruma, M., *Meat Sci.*, **86**, 110~118, 2010.
- 10) 六車三治男, 日本暖地畜産学会報, **55** (2), 85~91, 2012.
- 11) 竹田志郎, 久保田大樹, 竹之山愼一, 河原聡, 六車三治男, 日本暖地畜産学会報, **57** (2), 141~145, 2014.
- 12) Laemmli, U. K., *Nature.*, **227**, 680~685, 1970.
- 13) 岡田雅人, 宮崎香: タンパク質実験 ノート抽出と分離精製, 羊土社, 29, 1996.
- 14) Murphy, J. B., Kies, M., W. *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 382~384, 1960.
- 15) Cushman, D. W., Cheung, H. S., *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637~1648, 1971.
- 16) Balyasnikova, I. V., *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **34**, 545~554, 2001.
- 17) Stamler, J., Elliott, P., Kesteloot, H., Nichols, R., Claeys, G., Dyer, A. R., Stamler, R., *Circulation.*, **94**, 1629~1634, 1996.
- 18) 六車三治男, 久保田大樹, 河原聡: 平成23年度食肉に関する助成調査成果報告書, (公財)伊藤記念財団, **30**, 7~18, 2012.
- 19) 竹田志郎, 久保田大樹, 竹之山愼一, 河原聡, 六車三治男, 日本暖地畜産学会報, **57** (2), 141~145, 2014.



## 牛肉の匂いに及ぼす熟成と加熱調理の影響

The effect of aging and heat-cooking on the profile of aroma volatiles of beef

小林 正人・佐々木 整輝

(一般社団法人家畜改良事業団家畜改良技術研究所)

Masato Kobayashi and Seiki Sasaki

(Maebashi institute of animal science, Livestock improvement association of Japan, Inc)

In this study, the aromatic volatiles were analyzed from beefs, which were aged by common wet aging, long term aging as dressed carcass and dry-aging. The samples were obtained from national meat suppliers, and those were aged with usual manner of their own processing plants. Raw meat samples and heat-cooked samples were extracted by organic solvent and the resultant fractions were analyzed by the gas chromatography and the gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS). The variety and the amount of the volatiles increased dramatically during the dry-aging, however no appreciable change was observed in the long term aged beefs. The volatiles increased during the cooking with heat.

The GC-MS analysis revealed that lactones, alcohols, aldehydes, acetoin, pyrazine derivative were main aromatic volatiles. In addition to those compounds, 2-phenylethyl alcohol was newly identified in sweet and floral fraction. 2-Phenylethyl alcohol is well known as a component of a flavor of tomato and other fruits, and is also known as an attractive scent for insects of roses and other flowers. However, there is no reports about beef aroma. Although, 2-phenylethyl alcohol was scarcely detected in the Holstein beef before aging, it increased dramatically during the dry-aging and remained in the beef after the cooking with heat. These findings suggested that 2-phenylethyl alcohol may contribute to the floral aromas of dry-aged beef.

### 1. 目 的

食品のおいしさは、味、匂い、テクスチャーの3要素で構成されるが、匂いは味と感じられるため、好ましい香りはおいしさにとって最も重要な要素と考えられている。牛肉の加熱香気はおいしさの重要な要素とされ、さらに近年、ドライエー

ジング技術が普及するに伴い、熟成によって生じる香りも注目されている。しかし、牛肉の香りを分析する適切な方法がないため研究成果は必ずしも多くはない。そこで、本研究では、牛肉の匂い物質の効果的な分析法を開発し、熟成した牛肉の好ましい香りの候補物質を絞り込み、物質を同定することを目的とした。

## 2. 方 法

### 2.1 牛肉

乳雄肥育牛肉については、22日間から53日間ドライエージングした肉を8検体およびと畜後11日以内の冷蔵保存牛肉8検体を用いた。日本短角種については、4日間から35日間枝肉として冷蔵庫内で保存・熟成した肉15検体、黒毛和種については9日間から30日間冷蔵保存・熟成した肉13検体を用いた。熟成は、国内の食肉加工販売業者の自社マニュアルに従って行われた。肉試料は、入手後分析まで $-30^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、分析時に解凍してひき肉とした。

### 2.2 抽出

揮発性物質の分析には、20gのひき肉を生または $170^{\circ}\text{C}$ のホットプレートで軽く焦げ目がつくまで焼き、90%メタノール40mlとヘキサン40mlを加えて30秒間ホモジナイズし、メタノール層を回収し、さらに4回ヘキサンで洗浄した。メタノール層にジクロロメタン20mlと0.1Mリン酸緩衝液(pH6.0)40mlを加えて混和後静置し、ジクロロメタン層を分取して硫酸ナトリウムで脱水し、ついでシリカゲル(ワコーゲルC-100)を3g加えて混和後ろ過し、ヘキサンを2ml加えて減圧濃縮して最終的に1mlとし、その $20\mu\text{l}$ を分析に用いた。

質量分析用試料は、ひき肉1kgを用い、上記の50倍規模で抽出操作し、ヘキサン5mlに転溶した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーで精製し、さらにヘキサン溶液を固相抽出(Agilent, BondElute SI)により分画し、匂いを有する分画を1mlヘキサン溶液とした。

### 2.3 ガスクロマトグラフ

揮発性物質の分析は、ヘッドスペースサンプラーを装備したガスクロマトグラフ装置(PerkinElmer, Clarus580GC, 以下GC)を用い、

キャピラリーカラム(InertCAP PureWAX,  $0.25\text{mm}\times 60\text{m}$ )を用い、 $120^{\circ}\text{C}$ で2分間加熱して気化した物質をトラップして昇温分析した。相対ピーク強度はジブチルヒドロキシトルエンを内部標準として算出した。質量分析は、ガスクロマトグラフ質量分析装置(島津GCMS-QP2010Ultra, 以下GC/MS)を用い、キャピラリーカラム(DB-WAX,  $0.25\text{mm}\times 60\text{m}$ )を用い、昇温分析した。検出した主なピークをNIST(2014年版)データベースを用いて検討し化合物名を推定した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 揮発性物質の抽出および精製法

揮発性物質は、牛肉を90%メタノールとヘキサン混液で抽出し、匂い物質を90%メタノールに抽出し、同時に単純脂質をヘキサンで抽出除去する方法が有効で、これにより、多量に含まれる中性脂肪などの単純脂質がほぼ除去された。水溶性物質の除去はジクロロメタン・メタノール・水系混合溶媒からジクロロメタンに転溶することで、牛臭い酸臭の除去はpH6のリン酸緩衝液を用いることで、匂い物質と極性が類似した未同定の脂質はシリカゲルを用いたバッチ法により除去することが有効であった。

匂い物質は弱い極性を持ち、水溶性があるので、牛肉を水と加熱して得た脂質層を加温して揮発した物質を分析する一般的な方法<sup>1)</sup>では、匂い物質が熱水に残留し、また脂肪のトラップ効果のために脂肪層からの回収率が低いということが懸念されるが、今回の方法では、脂肪交雑の高い牛肉からも揮発性物質を抽出することができた。

### 3.2 揮発性物質の検出

生の乳雄牛肉に含まれる主要な揮発性物質は、平均13種類であり(Fig.1A)、加熱調理によってわずかに増加した(Fig.1B)。ドライエージングされた乳雄牛肉では、生の状態で平均78種類の物

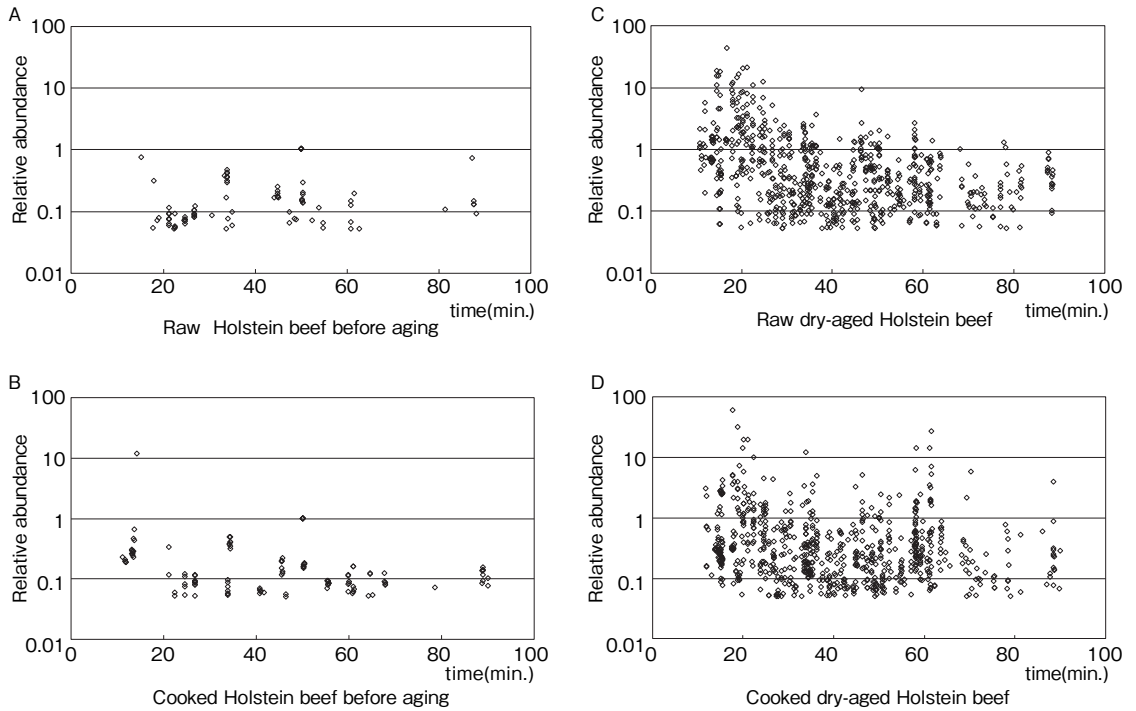


Fig. 1 Relative abundance of volatiles in raw and cooked meat

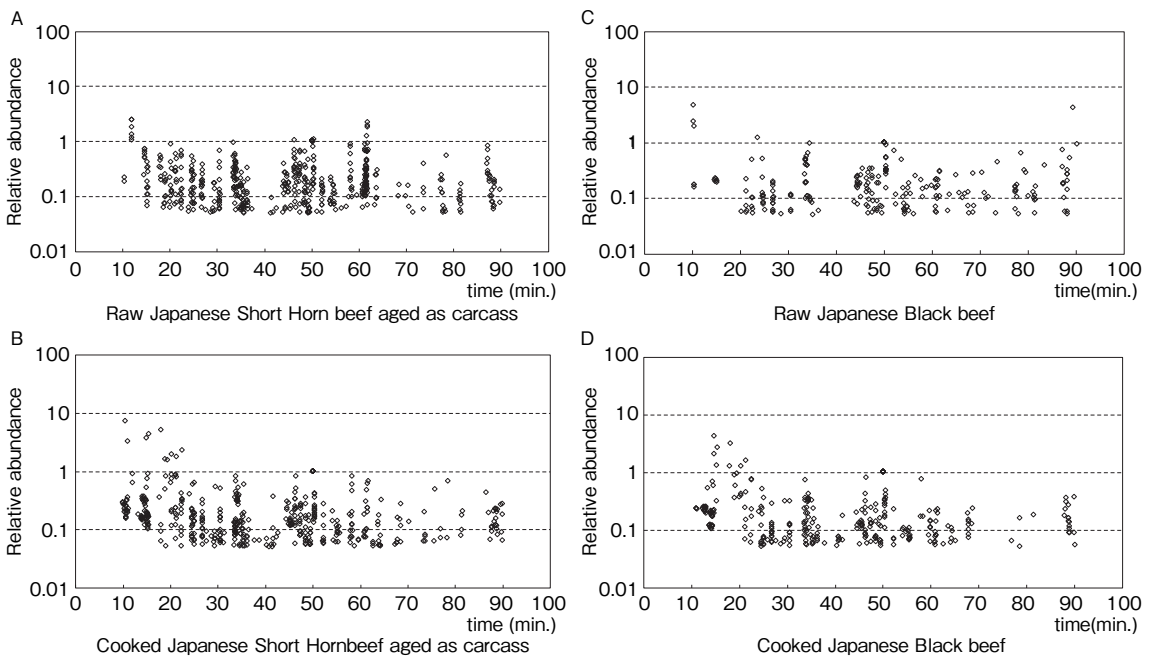


Fig. 2 Relative abundance of volatiles in raw and cooked meat

質が検出され (Fig.1C), 加熱調理によって平均65種類の物質が検出された (Fig.1D)。枝肉で冷蔵保存した日本短角種牛肉では, 生の状態で33種類の物質が検出され (Fig.2A), 加熱調理によっても検出数は変化しなかった (Fig.2B)。黒毛和種では, 生の状態で平均18種類の物質が検出され (Fig.2C), 加熱調理によって保持時間が10分から30分の物質が増加し, 相対ピーク強度も増加した (Fig.2D)。

これらの結果から, 乳雄牛肉では, ドライエージングによって揮発性物質が増加し, 加熱調理後も揮発性物質が肉に含有されることが確認された。枝肉で熟成された日本短角種牛肉では, 検出された物質数がドライエージング肉の約半数であり, 匂いは明らかに弱かった。黒毛和種では, 生

の状態では揮発性物質が少なく, 加熱により揮発性物質数が増加した。

### 3.3 揮発性物質の同定

固相カラムで分画した試料を用いて, 揮発性物質の同定を行った。その結果, 94種類の物質が同定され, 匂いを持つ物質は, ラクトン類が16種類, アルコールが23種類, アルデヒドは11種類, ケトンが3種類, 2,5-ジメチルピラジンおよびバニリンであり, これらは既報とおおむね一致していた (Table 1)<sup>2~5)</sup>。

ドライエージング香気は, 固相抽出によりナッツ様で甘い花のような匂い分画, グリーン臭分画, 脂っぽく牛臭い分画に分かれたが, 甘い花のような分画で保持時間50.2分に特徴的なピークが検出された。この物質は, 分子イオンが122, ベー

Table1 Chemical compounds detected in the extract from aged beef

| group             | compound                                   | group                  | compound                |
|-------------------|--|------------------------|-------------------------|
| lactone           | $\gamma$ -Butyrolactone                    | alcohol                | 1-Butanol               |
|                   | $\gamma$ -Hexanolactone                    |                        | 1-Butanol, 2-methyl-    |
|                   | 2(3H)-Furanone, 5-ethylidihydro-5-methyl-  |                        | 1-Butanol, 3-methyl-    |
|                   | $\gamma$ -Heptanolactone                   |                        | 3-Buten-1-ol, 3-methyl- |
|                   | $\gamma$ -Nonalactone                      |                        | 2-Pentanol              |
|                   | $\gamma$ -Decalactone                      |                        | 1-Hexanol               |
|                   | $\gamma$ -Undecalactone                    |                        | 2-Hexanol               |
|                   | 2(3H)-Furanone, dihydro-5-(2-octenyl)-     |                        | 3-Hexanol               |
|                   | $\gamma$ -Crotonolactone                   |                        | 1-Heptanol              |
|                   | $\delta$ -Dodecalactone                    |                        | 2-Heptanol              |
|                   | 2H-Pyranmethanol, tetrahydro-2,5-dimethyl- |                        | 1-Hexanol, 2-ethyl-     |
|                   | $\delta$ -Valerolactone                    |                        | 2-Nonanol               |
|                   | $\delta$ -Tetradecalactone                 |                        | 1-Octanol               |
|                   | 2H-Pyran-2-one, tetrahydro-6-undecyl-      |                        | 2-Octen-1-ol            |
|                   | 2H-Pyran-2-one, tetrahydro-6-tridecyl-     |                        | 1-Nonen-4-ol            |
| Octadecen-4-olide | 1-Nonanol                                  |                        |                         |
| aldehyde          | Butanal, 3-methyl-                         | 1-Dodecanol            |                         |
|                   | Hexanal                                    | 1-Tetradecanol         |                         |
|                   | Heptanal                                   | 1-Hexadecanol          |                         |
|                   | Nonanal                                    | 3-Heptadecanol         |                         |
|                   | Pentanal, 3-methyl-                        | Benzyl alcohol         |                         |
|                   | Pentadecanal                               | Phenylethyl Alcohol    |                         |
|                   | Hexadecanal                                | ketone                 | Acetoin                 |
|                   | Heptadecanal                               |                        | 3-Hexanone              |
|                   | Octadecanal                                |                        | 2-Heptanone             |
|                   | 9-Octadecenal                              | Vanillin               | Vanillin                |
| Benzaldehyde      | pyrazine                                   | Pyrazine, 2,5-dimethyl |                         |

スピークが91であり、これに加えてフラグメントイオンは104, 103, 102, 92, 91, 89, 77, 65, 63, 51, 50, 39, 31であり、これらはGC/MSに内蔵されている2-フェニルエチルアルコール(以下フェニルエタノール)のNISTのデータベースと一致し、類似度は97であったことから、フェニルエタノールと推定された。そこで標準物質を

分析した結果、保持時間が一致したことから、フェニルエタノールと同定した。

ラクトン類は2(3H)-フラノン誘導体( $\gamma$ -ラクトン)と2H-Pyran-2-one誘導体( $\delta$ -ラクトン)であり、甘い花のような匂いを持つ分画で多く検出された。ラクトン類は、桃の缶詰のような匂いがあるが、焼肉の匂いとは質が異なることから、

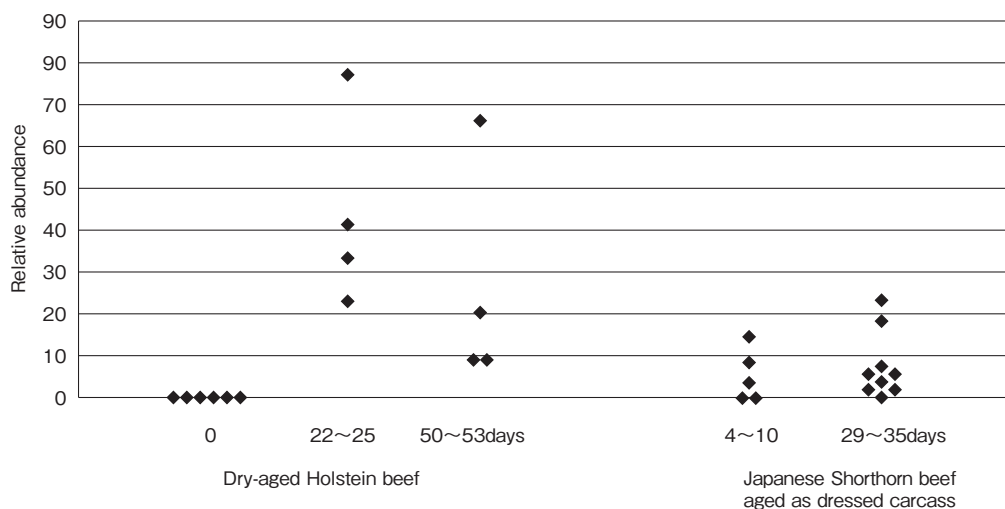


Fig. 3 Relative abundance of phenylethanol in dry-aged Holstein beef and Japanese Short Horn beef aged as dressed carcass

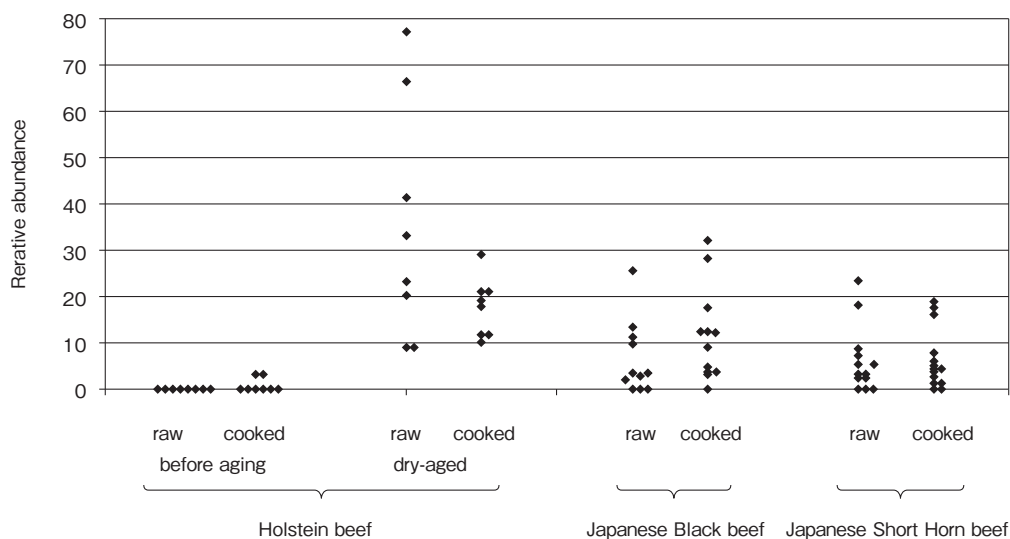


Fig. 4 Relative abundance of phenylethanol in raw and cooked meat

焼肉の匂いの中心物質と考えるのは現状では難しい。2(3H)-フラノン誘導体と2H-Pyran-2-one 誘導体は、水酸基が結合すると典型的な甘い香りを生じるが、今回の結果では水酸基を結合したそれらの誘導体は確認されなかった。

2,5-ジメチルピラジンは、ドライエージング肉のナッツ様の匂いに似た焦がした豆のような匂いを持ち、バニリンは、甘い匂いを持つ物質であるが、今回検出されたピークはいずれも小さく、匂いの中心物質とは考えにくかった。

アルコール類とアルデヒド類は、グリーン香気を持つが、ナッツ様の匂いとは異なっている。ケトン類のうち最も量が多かったのはアセトインであり、バター様の脂っぽい匂いがあることから、ドライエージング肉の匂いに関与することが推定された。

#### 3.4 2-フェニルエタノールの熟成および調理による変化

今回新たに同定されたフェニルエタノールについて、熟成および調理による変化を検討した。乳雄肉では、フェニルエタノールはドライエージング実施前の生肉では検出されず、ドライエージング22日~25日で高く、50日~53日で低い値であった (Fig. 3)。これは、2ヶ月以上の長期間のドライエージングを行うと特有の匂いが消滅するという食肉加工業者の経験則と符合する結果であった。一方、日本短角種の枝肉での保存では、明らかな増減は見られなかった。両者の熟成期間は同等であるので、熟成の方法によって生成量が異なるものと考えられた。

加熱調理によるフェニルエタノールの変化を検討した結果、乳雄生肉では加熱調理でわずかに検出され、ドライエージング肉では加熱調理で減少したのも見られた (Fig. 4)。黒毛和種牛肉では、加熱調理で増加し、日本短角種牛肉では明らかな変動はなかった。

## 4. 要 約

牛肉の匂い物質の効果的な分析法を開発し、異なった方法で熟成した牛肉の好ましい香り物質の絞り込みと同定に取り組んだ。一般的な含気熟成、枝肉での長期熟成、およびドライエージング牛肉を用いて、熟成および加熱調理によって生じる揮発性物質ならびに匂い物質を調べた。牛肉は、国内の食肉加工販売業者から、各社のマニュアルに従って熟成されたものを用いた。香気分画は、ひき肉にした試料から溶媒抽出によって抽出し、GCおよびGC/MSで分析した。揮発性物質は、ドライエージングによって著しく増加したが、枝肉での長期熟成では大きな変化が見られなかった。また、揮発性物質は加熱調理によって増加した。匂いを有する物質として、アセトイン、アルコール類、アルデヒド類、ラクトン類が検出されたほか、今回新たにフェニルエタノールの存在が確認された。フェニルエタノールは、ドライエージングによって著しく増加し、加熱調理後も大半が肉に残留することから、ドライエージング肉に含まれる甘い花様の匂いに寄与することが示唆された。

## 謝 辞

本研究で用いた熟成肉の一部は、株式会社宝山の荻澤紀子氏を中心とするドライエージングに取り組む食肉加工者および料理店の皆さんから提供いただいた。また、ガスクロマトグラフ質量分析装置による物質の同定は、株式会社島津製作所分析計測事業部グローバルアプリケーション開発センター斎藤良弘氏に依頼した。ここに感謝する。

## 文 献

- 1) Watanabe, A., Ueda, Y., Higuchi, M., Shiba, N. : Analysis of volatile compounds in beef fat by dynamic-headspace solid-phase microextraction

- combined with gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Food Science*, **73**, 1220~1225, 2008.
- 2) Hartmut, M., Liebich, David, R., Douglas, Albert, Zlatkis, Françoise, Mueggler-Chavan, A. Donzel : Volatile components in roast beef, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **20**, 96 ~ 99, 1972.
- 3) 佐藤雅彦, 中村豊郎, 本間清一, 阿部宏喜, 佐藤朗好, 藤巻正生 : 和牛, 乳牛および輸入牛肉の香気と呈味成分について, *日本畜産学会報*, **65**, 142~148, 1993.
- 4) 松石昌典, 久米淳一, 伊藤友己, 高橋道長, 荒井正純, 永富宏, 渡邊佳奈, 早瀬文孝, 沖谷明紘 : 和牛肉と輸入牛肉の香気成分, *日本畜産学会報*, **75**, 409~415, 2004.
- 5) 田口聡子, 高橋理沙, 安原久美子, 浅野雅子, 飯田文子 : 調理法の異なる黒毛和種去勢牛の香気成分について, *日本女子大学紀要*, **60**, 23~27, 2013.

## 短波帯交流電界による真空包装食肉加工品の迅速殺菌

Inactivation of microorganisms in packed meat products by radio  
frequency heating

植 村 邦 彦

(農業・食品産業技術総合研究機構食品総合研究所)

Kunihiko Uemura

(National Food Research Institute, NARO)

Plastic packed meat is popular because of its convenience and its sanitation. To inactivate microorganisms in a beef, it is therefore necessary to heat it by a heat source from outside. Unfortunately, heating degrades the color and quality of the meat. Radio-Frequency (RF) heating was thus used to inactivate microorganisms in a plastic packed beef, and microorganism inactivation by RF heating was subsequently compared to that by conventional heating. 5 logarithmic order reduction of the *Escherichia coli* in packed beef was achieved by RF heating for 45 s, the RF heating time was reduced to one-18th that of conventional heating. Some discolor of the beef was prevented by the shorter heating time of RF hearing.

### 1. 目 的

2011年4月下旬から5月上旬にかけて、富山県を中心に5人の死亡者を出したユッケによる腸管出血性大腸菌食中毒事件が発生し、消費者の食肉の安全性に関する不安が高まっている。食肉の安全性を高めるために、一般的に加熱処理が行われているが、ユッケのように加熱による食肉の色や成分の熱変性が望ましくない場合がある。そこで、本研究では短波帯加熱を用いて牛肉の迅速・均一加熱を行うことで、牛肉の色変化を抑えつつ、牛肉内部の十分な殺菌を実現することを目指した。短波帯加熱 (RF) とは3~30MHzの周波数で、300kHz以下の周波数を用いるジュール加熱と、300MHz~3GHzの周波数帯を用いるマイ

クロ波加熱の間に位置する周波数帯の交流のことを称する。ジュール加熱はオーミック加熱とも呼ばれ、一對の電極間に食品材料を密着させて食品材料に流れる電流により加熱するもので、魚肉すり身、パン生地、各種ソース、豆腐などの加熱調理に利用されている<sup>1,2)</sup>。また、ジュール加熱の電界強度を100倍以上に高めた交流高電界処理と呼ばれる液状食品の殺菌処理が開発され、果汁の新しい殺菌技術として実用化が進められている<sup>3~6)</sup>。一方、マイクロ波加熱は、家庭に普及した電子レンジで利用されているように、マグネトロンで作られたマイクロ波の電磁波をレンジの庫内に導入し、レンジ庫内に形成した定在波により、庫内の食品を非接触で加熱するものである。周波数が高くなると、電極と食品が密着していなくとも、電



気エネルギーが食品に伝わる性質をもつようになる。したがって、短波帯の交流もこの性質を有しており、電極と食品の間にプラスチックフィルムのような絶縁膜を隔てた場合でも、短波帯の交流エネルギーを食品に伝え、食品を加熱することが可能であることを味噌の加熱で示した<sup>7)</sup>。野菜や畜肉の短波帯加熱については、欧州で報告例がある<sup>8-15)</sup>が、包装済み畜肉の短波帯加熱に関して、これまでに報告例はない。

## 2. 方法

### 2.1 試験材料

近くのスーパーで購入した牛肉（青森県産，肩ロース）を材料として使用した。指標菌として、大腸菌 *Escherichia coli* (JCM1649) を10mLの液体培地（標準ブイヨン，栄研）に接種し、37°Cで12時間振とう培養して大腸菌培養液を得た。600gの牛肉をミートチョッパーでひき肉にしたものに大腸菌培養液を10mL接種し、手で均一に分布するように混練した。植菌したひき肉を約60gずつ採取し、ハンバーグ状に整形した牛ひき肉を加熱用の試料とした。

### 2.2 従来の加熱処理

恒温水槽を80°Cに設定し、大腸菌を植菌した牛ひき肉をジブロックに入れたものを温水中に一定時間浸漬することにより加熱した。加熱中は肉の中心および表面に挿入した熱電対により1秒ごとの温度を測定した。加熱後は、ジブロックごと牛ひき肉を速やかに氷水中に浸漬して冷却した。

### 2.3 短波帯加熱処理

150mm×150mm×106mmの水槽中に150mm×160mm×3mmのチタニウム製電極2枚を100mm間隔で平行に設置し、両電極間の中央に肉塊を入れたジブロックを配置し、ジブロックの外側の水槽内に60°Cの温水を満たした（Fig. 1）。肉塊の中心、表面、および水道水中に光ファイバー温度計（Neoptx, RFX-04, Canada）を挿入し、1秒ごとに各部の温度を記録した。27MHz、4kWの短波帯高周波電源（Advanced Energy, CESAR2740, USA）から整合器（Asuteck, NM5M27, Japan）を経由して、両電極に2kW短波の短波帯交流を印加した。肉塊の中心部の温度が所定の値に到達したら短波帯交流の印加を停止し、直ちに、氷水に浸漬して冷却した。

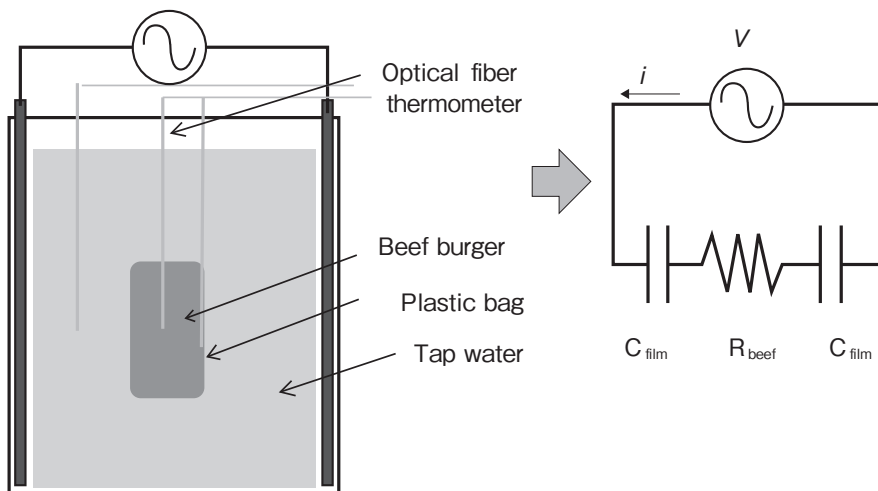


Fig. 1 RF heating setup and the equivalent circuit

## 2.4 色差の測定

未加熱および各種加熱を行った牛ひき肉の表面および中心部の色を分光型色彩差計 (Minolta MC-5) で測定し、赤みの強度を示す  $a^*$  値を色変化の指標とした。

## 2.5 残存菌数の測定

加熱処理した牛肉ひき肉塊の中心部および周辺部から約 3 g サンプルを採取した。サンプルを 10 倍量のリンゲル溶液とともにスタマッカーで粉碎した抽出液を菌測定用試料とし、適宜リンゲル溶液で希釈したものをデスオキシコレート培地に混

積培養し、37℃で24時間培養後、形成されたコロニー数をカウントした。

## 3. 結果および考察

### 3.1 温度履歴

Fig. 2 に、ジブロックに入れた 60 g の牛ひき肉を 80℃ の温槽中で 15 分間浸漬加熱した牛ひき肉の中心部および表面部の温度変化を示す。80℃ の温浴中で、15 分間加熱した時点で、ひき肉中心部および表面の温度はそれぞれ 73℃、78℃ まで上昇した。一方、2 kW の RF 加熱を行った場合、牛ひき

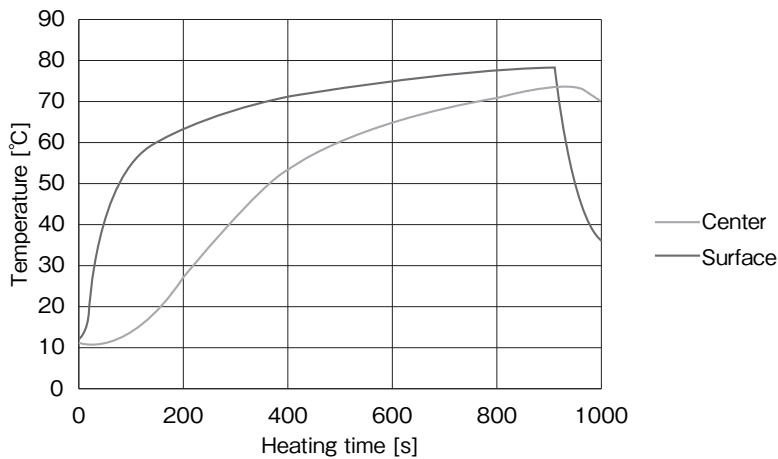


Fig. 2 Temperature records at the center and surface of a beef burger by a conventional heating at 80℃

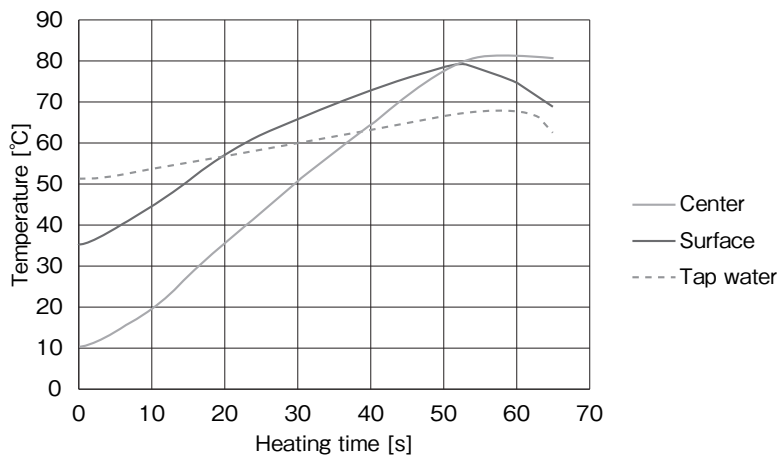


Fig. 3 Temperature records at center and surface of the beef burger and in tap water by RF heating

肉中心部の温度はRFを印加した50 s まで直線的に上昇し、中心部および表面部の温度はそれぞれ81℃、79℃まで上昇した。周辺の水は肉よりも昇温速度が遅く、RF印加終了時に68℃まで上昇した (Fig. 3)。

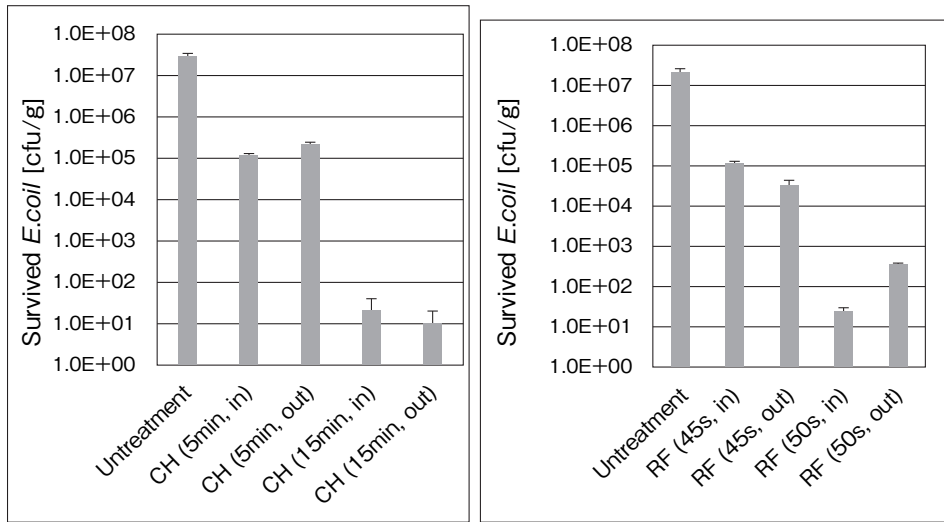
### 3.2 従来加熱処理および短波帯処理が牛肉中の大腸菌に与える影響

Fig. 4 A, Bにそれぞれ従来加熱および短波帯

加熱した牛ひき肉の中心部 (in) と表面 (out) に残存した大腸菌数を示した。図より、従来加熱の5分と短波帯加熱の45 s は約2対数オーダー、従来加熱の15分と短波帯加熱の60秒が約5対数オーダーに減少した。

### 3.3 従来加熱処理および短波帯処理が牛肉の色に与える影響

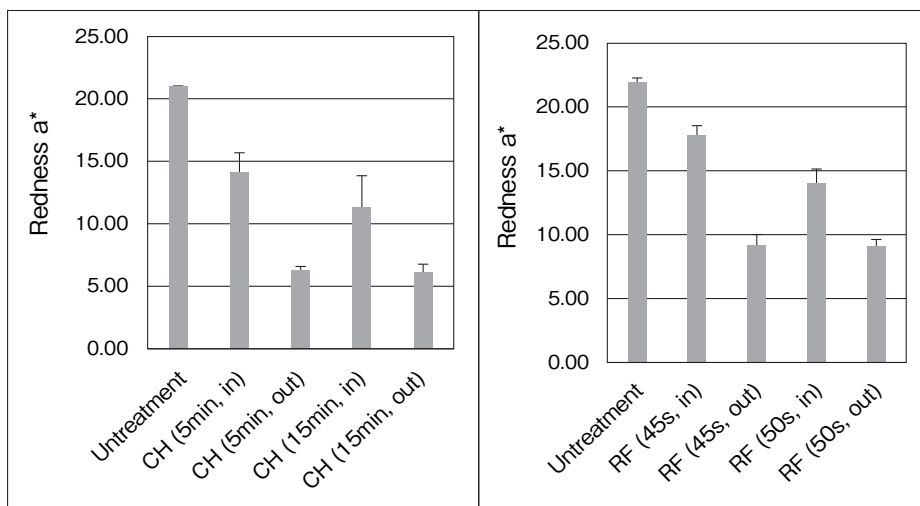
Fig. 5 A, Bにそれぞれ従来加熱および短波帯



A Conventional heating (CH)

B Radio Frequency heating (RF)

Fig. 4 Effect of heating time on survived *E. coli* by conventional heating and radio frequency heating



A Conventional heating (CH)

B Radio Frequency heating (RF)

Fig. 5 Effect of heating time on the color by conventional heating and radio frequency heating

加熱した牛ひき肉の断面 (in) と表面 (out) の色差計の赤み成分 ( $a^*$ ) の変化を示した。従来加熱および短波帯加熱に関わらず、温度が高いほど赤みが低減した。ただし、短波帯加熱を行ったサンプルは従来加熱のものよりいずれも、5ポイント程度、赤みが高いことがわかった。

#### 4. 要 約

プラスチック包装された畜肉加工品を均一、迅速に加熱および殺菌する目的で、短波帯加熱を行った。プラスチックパックの牛ひき肉に均一に添加した大腸菌は、水中で27MHz、2kWの短波帯交流の印加により、5対数オーダー低減した。従来加熱で同程度の殺菌効果を与えるためには、80℃の温浴に15分間浸漬する必要がある。また、短波帯加熱は処理時間が短いため、牛肉の変色が抑えられることがわかった。短波帯の電力を高めて加熱効率を上げることにより、包装済みの牛肉をさらに短時間で均一加熱することが可能になると考えられ、ユッケのような生食に近い牛肉加工食品を提供できることが期待される。

#### 文 献

- 1) de Alwis, A. A. P., Fryer, P. J. : The use of direct resistance heating in the food Industry, *Journal of Food Engineering*, **11**, 3e27, 1990.
- 2) Zhi-Sheng Liua, Sam, K. C., Changa, Li-Te Li, Eizo Tatsumi : Effect of selective thermal denaturation of soybean proteins on soymilk viscosity and tofu's physical properties, *Food Research International*, **37**, 8, 815~822, 2004.
- 3) Uemura, K. Isobe, S. : Developing a new apparatus for inactivating *Escherichia coli* in saline water with high electric field AC, *J. Food Engineering*, **53**, 203~207, 2002.
- 4) Uemura, K. Isobe, S. : Developing a new apparatus for inactivating *Bacillus subtilis* spore in orange juice with a high electric field AC under pressurized conditions, *J. Food Engineering*, **56**, 325~329, 2003.
- 5) Uemura, K., Kobayashi, I., Inoue, Takashi. : Inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* in orange juice by high electric field alternating current, *Food Science Technology Research*, **15**, 3, 211~216, 2009.
- 6) Uemura, K., Kobayashi, I., Inoue, Takashi. : Inactivation of *Bacillus subtilis* Spores in Orange Juice and the Quality Change by High Electric Field Alternating Current, *Japan Agricultural Research Quarterly*, **44**, 1, 61~66, 2010.
- 7) 植村邦彦, 高橋千栄子, 小林功 : 短波帯加熱処理による包装済み味噌の酵素の失活, 日本食品科学工学会誌, **61** (2), 95~99, 2014.
- 8) V. Orsat, Y. Garie'py, G. S. V. Raghavan, D. Lyew. : Radio-frequency treatment for ready-to-eat fresh carrots, *Food Research International*, **34**, 527~536, 2001.
- 9) L. Laycock, P. Piyasena, G. S. Mittal : Radio frequency cooking of ground, comminuted and muscle meat products, *Meat Science*, **65**, 959 ~ 965, 2003.
- 10) Nigel P. Brunton, James G. Lyng, Wenqu Li, Denis A. Cronin, Desmond Morgan, Brian McKenna : Effect of radio frequency (RF) heating on the texture, colour and sensory properties of a comminuted pork meat product, *Food Research International*, **38**, 337~344, 2005.
- 11) B. M. McKenna, J. Lyng, N. Brunton, N. Shirsat : Advances in radio frequency and ohmic heating of meats, *Journal of Food Engineering*, **77**, 215~229, 2006.
- 12) Lu Zhang, James G. Lyng, Nigel P. Brunton : Quality of radio frequency heated pork leg and shoulder ham, *Journal of Food Engineering*, **75**, 275~287, 2006.
- 13) Xueyan Tang, James G. Lyng, Denis A. Cronin, Caroline Durand : Radio frequency heating of beef rolls from biceps femoris muscle, *Meat Science*, **72**, 467~474, 2006.
- 14) Alina Jakó b, Jolanta Bryjak, Halina Wójtowicz, Viera Illeová, Július Annus, Milan Polakovic : Inactivation kinetics of food enzymes during ohmic heating, *Food Chemistry*, **123**, 369~376, 2010.
- 15) Jian Wang, Kunchalee Luechapattanaorn, Yifen Wang, Juming Tang : Radio-frequency heating of heterogeneous food-Meat lasagna, *Journal of Food Engineering*, **108**, 183~193, 2012.

# 可視・近赤外分光可視化法による生肉の微生物汚染状況 の非破壊評価

Non-destructive analysis of spatial contamination of raw meat by  
microorganisms using visual and near-infrared multispectral imaging

牧野 義雄・モハメド カムルザマン

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Yoshio Makino and Mohammed Kamruzzaman

(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

According to the public reports by Ministry of Health, Labour and Welfare, foodborne diseases caused by eating meat have been continuously occurring. However, conventional method to count viable cells on the surface of the meat is a sampling method. This means that leak of inspection is unavoidable. In the present study, nondestructive and rapid prediction of viable cells on the surface of meat samples by measuring two dimensional spectral absorbance using a hyperspectral camera was proposed. According to the observation results, appearance of meat surface changed overtime. This may be caused by the increase of viable cells and changes in properties of components included in the samples. A partial least square regression model was made to predict the number of standard plate count bacteria as the dependent variable by entering 2<sup>nd</sup> derivative of spectral absorbance values as the independent variables measured using the meat samples. The number of viable cells was predicted in the accuracy at the coefficient of determination as 0.76 and root mean square error as 0.45 CFU cm<sup>-2</sup>. This method may be effective for screening hygienically safe meat products at the meat factories or the butcher shops.

## 1. 目 的

厚生労働省の「食中毒統計資料」によれば、年間数万件の食中毒が発生している。2011年には生牛肉を食するユッケを原因とする食中毒が発生し、これを受けて厚生労働省は「生食用牛肉の規格基準」を制定・施行した。さらに、全国食肉事業協同組合では、食肉加工現場における衛生管理に活用するため、2014年3月に「食肉衛生マニュアル」を公表した。この中では、食肉の衛生的な

取扱い法が詳細に記述されている。

しかし、いかに厳重な取扱いがされていても、食中毒の原因となる微生物による汚染の有無を確認しなければ、真に安全な生肉を出荷し続けることは困難である。微生物汚染を発見する方法として、主に平板寒天測定法が従来から用いられている。しかし、培養を必要とし、汚染状況が判明するまでに1～2 dを要することから、消費期限の短い生肉の衛生管理に適する方法であるか疑問が残る。また、検査試薬等ランニングコストがかか

るなど他の短所も認められるが、さらに懸念されるのは、抜き取り検査であるため、検査漏れの可能性が否定できないことである。

一方、非破壊検査は、操作が簡便な上に検査対象を傷つけないという長所がある。医療など多くの分野において、検査法は破壊法から非破壊法へと置き換えられる傾向にあり、食品分野では、X線による異物検査、近赤外分光分析による果実類の糖度測定等において実用化されている。非破壊であれば全数検査が可能になることから、検査漏れの懸念がなくなる。

そこで本研究では、光センシングによる食肉の微生物汚染状況の非破壊検査法に関する研究を行った。光の中でも、過去の研究で微生物検査に有効であることが確認されている電磁波「可視・近赤外光」を選択した。また、一画素ごとに分光反射/吸収スペクトルを記録できる「ハイパースペクトルカメラ」を使用した。二次元空間における分光データの取得が可能になることから、部分的な微生物汚染状況や広い範囲を対象とした菌の種類や菌数の可視化なども可能になる。

研究代表者(牧野)、研究分担者(Kamruzzaman)は、これまで、ハイパースペクトルカメラを用いた生肉品質の非破壊検査と品質にかかわる成分の可視化に関する研究に取り組んでいる。研究室にて共同で利用している統計解析ソフトウェアを用いて牛肉の品質予測モデルを作成したところ、偏最小二乗回帰分析(PLSR)により国際照明委員会CIELABの明度( $L^*$ )、水分保持力、pHおよび水分に対して、交差検証相関係数はそれぞれ0.91, 0.83, 0.80および0.94, 交差検証最小二乗誤差はそれぞれ1.93, 0.33, 0.03および0.45の高い精度で予測可能であった。

微生物の種類や数を非破壊で予測する学術研究については、2010年頃から報告されるようになった。Siripatrawan et al.<sup>1)</sup>は、液体培地中の大腸

菌数と菌株の種類を分光分析で予測する研究を行った。研究代表者(牧野)らは、紫外可視分光分析および蛍光分光分析と偏最小二乗回帰分析(PLSR)の組み合わせにより、豚肉表面で増殖した $10^2 \sim 10^7$  CFU  $\text{cm}^{-2}$ の範囲の一般性菌数を相関係数0.9以上の精度で予測する研究<sup>2~4)</sup>を行うとともに、特許2件<sup>5,6)</sup>を取得した。しかし、すべて1点あるいは広範囲の平均的な微生物汚染を予測するにとどまっている。

一方、研究分担者(Kamruzzaman)がかつて所属したダブリン大学の研究チームが、ハイパースペクトルカメラを使用した最先端の研究<sup>7,8)</sup>を行っており、PLSRを併用して、非破壊で成分分布を評価する手法を明らかにした。さらに、赤肉(牛肉、豚肉、ラム肉)の種類を偏最小二乗判別分析によって非破壊で見分ける手法も明らかにしている<sup>9)</sup>。

本研究成果が食肉加工場に導入されれば、衛生的な取扱いに加えて微生物汚染の有無を確認したうえで出荷できるため、生肉の安全性と、生肉に対する消費者の信頼が増す効果が得られる。

## 2. 方法

東京都内の精肉店から購入した牛肉、ラム肉、豚肉を実験試料とした。食肉にはもともと付着している雑菌の増殖状況を標準寒天培地による常法で調べるとともに、分光吸収スペクトルを測定し、非破壊推定を試みた。

2 cmの厚さに成型した食肉試料をハイパースペクトルカメラ(Fig. 1)で継時的に撮影し、分光吸収スペクトルデータを得た。ハイパースペクトルカメラのハードウェア(JFEテクノリサーチ(株))について説明する。光源は150Wキセノンランプと150Wタングステン-ハロゲンランプの混合光源を使用し、可視~近赤外の広い範囲で強い光照射を可能にすることにより、測定精度を向上

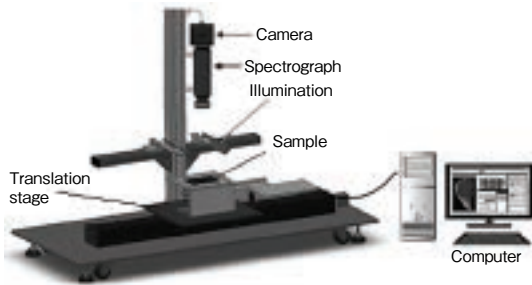


Fig. 1 Hyperspectral imaging system applied in the present study (JFE Techno-Research Co.)

させる。光センサーは12ビット（4096階調）の精度で光の強弱を判定できるCCDカメラ、分光器は透過型回折格子、レンズは16 mmのものを使用した。すべての光学部品は光学ベンチにて固定した状態で試料をカメラ撮影するため、試料、光源、光センサーの幾何学的位置関係が常に不変である。これは、再現性の高い計測データを得るために有効である。400～1,000 nmの波長範囲の分光反射/吸収データを5 nmごとに取得した（原スペクトルの取得）。

分光吸収スペクトルを測定後、食肉表面の一般生菌数を寒天平板法で測定した。培地は、3 M<sup>TM</sup> ベトリフィルム<sup>TM</sup>培地生菌数測定用ACプレート（スリーエム ジャパン(株)）を使用した。

取得した画像データの解析は、科学計算用プログラミング言語MATLAB 2014a（MathWorks, Inc.）で行った。「Image Processing Toolbox」を使用してハイパースペクトルカメラで取得した「.psf」ファイルをMATLABに取り込み、統計処理するための専用スクリプトファイル（mファイル）を作成し、データ解析を行った。まず、Savitzky-Gorey法によって原スペクトルを二次微分スペクトルに変換し、説明変数とした。次に一般生菌数を目的変数として定義し、説明変数との関係をPLSRによってモデル化した。

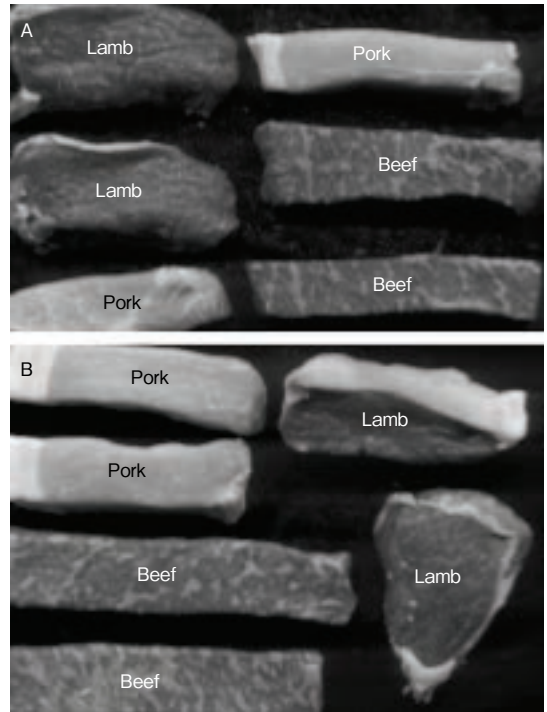


Fig. 2 Appearance of beef, pork and lamb meats on (A) the first day and (B) the fifth day from the start of storage

### 3. 結果と考察

実験に使用した食肉試料の外観変化をFig. 2に示した。貯蔵開始1日後と5日後の外観を比較したところ、外観に違いがみられた。日数の経過によって菌数が増えたことと、食肉の成分が継時的に変化し、外観色に影響を及ぼしたと考えられた。また、得られた一般生菌数の値の範囲は、4.0～7.5 CFU cm<sup>-2</sup>であった。

Fig. 3には、PLSRを用い、食肉表面の一般生菌数を分光吸収スペクトルから非破壊で予測した結果を示した。検量の決定係数（R<sup>2</sup>）は0.81、最小二乗誤差（RMSE）は0.39 CFU cm<sup>-2</sup>であった。検証のR<sup>2</sup>は0.76、RMSEは0.45 CFU cm<sup>-2</sup>であった。Williams and Norris<sup>10</sup>は、モデル式の決定係数が0.66～0.81の範囲であれば、スクリーニングに有効な水準であると述べている。本研究で

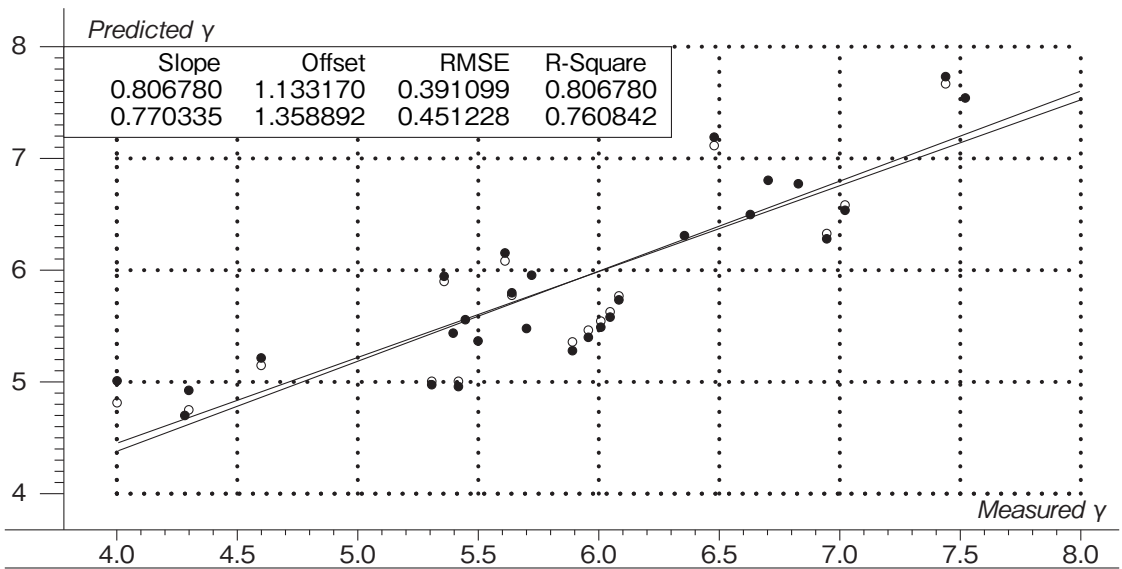


Fig. 3 Relationship between measured and predicted plate count values on the surface of meats. Open and closed circles denote the calibration and validation results. Full lines denote the linear regression results.

作成したモデル式は、微生物汚染あるいは腐敗した食肉のスクリーニングに適用可能な精度と考えられた。

本研究で対象とする光センシングは、非破壊検査であることから、迅速、簡便、低ランニングコストという特徴点があげられるが、最大の利点は、検体に対し非接触であるため、全数検査が可能になることである。

従来から行われている製造・出荷ラインにおける衛生管理の基本的手法は抜き取り検査である。当該検査を高頻度で行えば安全確保の可能性は高まるが、検体は処分せざるを得ないため、出荷品が減ってしまう欠点がある。しかも、検査には熟練を必要とし、化学薬品を使用する、カウント可能なコロニーが形成されるまで1～2 dを要するなど、見直すべき点も多い。その一方で、本研究で用いる手法である光センシングは、従来法と比較して、必ずしも測定精度は高いとは言えない。

そこで考えられるのは、破壊検査と非破壊検査

を併用した生肉の衛生管理である<sup>11)</sup>。すなわち、光センシングの特徴である非接触という利点を生かし、非破壊検査による全品のスクリーニングへの応用が考えられる。その結果、深刻な微生物汚染が疑われる検体を製造ライン上で発見・選別し、当該検体についてのみ、従来法による検査を行い、汚染が起きた原因を追究するという手段が考えられる。そうすれば、検査漏れの心配がなくなるうえに、時間やコストの削減にもつながる。

#### 4. 要 約

厚生労働省の報告によれば、食肉を原因とする食中毒の報告が後を絶たない状況である。一方、通常の衛生検査は破壊検査であるため、抜き取り法に頼らざるを得ず、検査漏れの危険性が避けられない。そこで本研究では、ハイパースペクトルカメラを利用して、分光吸収スペクトルを格納した二次元画像を撮影することにより、非破壊かつ迅速に食肉表面に存在する微生物数を推定する方



法について検討した。食肉を数日保存した結果、表面に継時的な変化が認められた。これは、菌数と内容成分の変化が原因と推定された。菌数は、分光吸収スペクトルデータから、検証の $R^2$ 0.76, RMSE 0.45 CFU  $\text{cm}^{-2}$ の精度で予測可能であった。以上の結果から、本研究で提案した方法は、食肉の衛生状態をスクリーニングするには適切な方法であると考えられた。

#### 文 献

- 1) Siripatrawan, U., Makino, Y., Kawagoe, Y., Oshita, S., *Sensors and Actuators B: Chemical*, **148**, 366~370, 2010.
- 2) Oshita, S., Al-Haq, M. I., Kawagishi, S., Makino, Y., Kawagoe, Y., Ye X., Shinozaki, S., Hiruma, N., *Journal of Food Engineering*, **107**, 262~267, 2011.
- 3) Oto, N., Oshita, S., Kawagishi, S., Makino, Y., Kawagoe, Y., Al-Haq M. I., Shinozaki, S., Hiruma, N., *Journal of Food Engineering*, **110**, 9~17, 2012.
- 4) Oto, N., Oshita, S., Makino, Y., Kawagoe, Y., Sugiyama, J., Yoshimura, M., *Meat Science*, **93**, 579~585, 2013.
- 5) 大下誠一, 叶旭君, 牧野義雄, 川越義則, 篠崎聡, 比留間直也: 鮮度測定方法および鮮度測定装置, 特許第5171366号
- 6) 大下誠一, 川岸誠司, 牧野義雄, 川越義則, 大戸尚美, 篠崎聡, 比留間直也: 微生物の数または量を測定する方法および装置, 特許第5386752号
- 7) Kamruzzaman M., ElMasry, G., Suna, D. W., Allen, P., *Analytica Chimica Acta*, **714**, 57~67, 2012.
- 8) Kamruzzaman, M., ElMasry, G., Suna, D. W., Allen, P., *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, **16**, 218~226, 2012.
- 9) Kamruzzaman, M., Barbin, D., ElMasry, G., Suna, D. W., Allen, P., *Innovative Food Sci. Emerging Technol.*, **16**, 316~235, 2012.
- 10) Williams, P., Norris, K. : Near-Infrared Technology in the Agricultural and Food Industries, 2<sup>nd</sup> ed., 163, American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota, USA, 2001.
- 11) 牧野義雄 (監修: 山本重夫): 農産物・食品検査法の新展開, 53, シーエムシー出版, 東京, 2010.

## 牛肉に関する消費者ニーズの研究—内因性価値と外因性価値の特定

A study on consumers' needs for beef – identifying intrinsic and extrinsic quality values

広岡博之・長命洋佑\*

(京都大学大学院農学研究科, \*九州大学大学院農学研究科)

Hiroyuki Hirooka and Yosuke Chomei\*

(Graduate School of Agriculture, Kyoto University, \*Graduate School of Agriculture, Kyushu University)

Beef quality concept can be divided into intrinsic quality values (which are the characteristics of beef itself) and extrinsic quality values (which are associated to the socio – economic factors such as price, brand, origin and human health concern). A national – wide on – line survey was conducted to identify the motivational factors (beef quality values) affecting consumers' beef purchasing decision in Japan. The principal component analysis revealed that three principal components (importance of overall intrinsic quality value, aging and cooking) and five principal components (importance of overall extrinsic quality value, safety, fleshiness, price and production information) were obtained for intrinsic and extrinsic beef quality, respectively. Price was the most important extrinsic quality value related with consumers' beef purchasing decision but there was no relation with other extrinsic quality values. The high correlation coefficient of principal components between overall intrinsic and extrinsic quality values was found, indicating that consumers who totally stress intrinsic beef quality also tend to determine the purchasing choice according to extrinsic quality values. The significant demographic (region, age, job status, civil status and presence of child) effects on principal components for intrinsic and extrinsic quality were observed. The daily consumers' beef purchase price was influenced by importance of price and both overall intrinsic and extrinsic quality values of consumers but the magnitudes and direction of the influences differed among the regions where consumers live. The results from the present study can be used to help identify factors to positively influence purchasing decisions within targeted markets in different regions.

### 1. 目的

わが国では、これまで枝肉市場における枝肉価格は、主に脂肪交雑の程度によって決定され、その価格がそのまま小売段階での牛肉価格に反映

し、消費者は霜降り牛肉は高価で、赤身肉は安価と考えていた。しかし、近年、テレビのグルメ番組やインターネット情報を通じて、牛肉に関するさまざまな情報が簡単に手に入るようになり、消費者のニーズは多様化してきている。

消費者のニーズと言っても、牛肉の価値は、牛肉そのものが持つ価値（内因性価値と呼ぶ）と外部からの情報によって決まる価値（外因性価値と呼ぶ）の2つが考えられる<sup>1)</sup>。前者の内因性価値には、BMSナンバーをはじめとする枝肉形質や脂肪酸組成、肉の色や脂肪の色などの外観などがあり、後者の外因性価値としてはブランド、放牧飼育、遺伝子操作飼料の給与の有無、アニマルウェルフェアや環境負荷への配慮、安全・安心性などの信頼性の確保、有機飼育牛肉（オーガニックビーフ）などが挙げられる。

DeVuystら<sup>2)</sup>は、米国の枝肉格付基準に対する消費者の認知度を調べ、予想したよりも消費者が枝肉格付に対する正しい知識を持っておらず、そのことが特に肉質に対する認識を誤った方向に導く可能性を指摘している（米国の枝肉格付基準では脂肪交雑は高く評価されているが、消費者の認識はまったく逆であった）。

わが国では、消費者を対象とした研究はこれまで少なかったが、SasakiとMitsumoto<sup>3)</sup>や佐々木ら<sup>4)</sup>が、一般公開のイベントに訪れた来訪者を対象に牛肉に関するアンケート調査を実施し、肉質に対するニーズや購買時の着目点を調べているが、これらの研究では外因的価値については検討されていない。

申請者はこれまでインターネットアンケートを用いて首都圏や京阪神の消費者の霜降り牛肉と赤身肉へのニーズを調べ<sup>5)</sup>、さらに熊本県の消費者による褐毛和種牛肉に対する認知と意識、その付加価値に関する研究を行ってきた<sup>6)</sup>。これらの研究で用いたインターネットアンケートは、近年、多数の消費者を対象とした意識調査方法として有効なツールとなっている。消費者に牛肉に関する意識調査をインターネットアンケートを利用して実施した研究は、国外でもいくつか報告されている<sup>2, 7)</sup>。

そこで本研究では、インターネットアンケート

調査によって月に2, 3回以上牛肉を購入している全国の女性消費者1,040人を対象に（1）牛肉購買時における内因性価値と外因的価値に関連する質問項目の重要度を聞き取り、（2）内因性価値と外因性価値に関する質問項目から主成分分析によって主成分を抽出し、それらの主成分に対する消費者の属性の影響を調べ、（3）それらの主成分が消費者の日常の牛肉の購買価格に及ぼす影響を特定し、これからの消費者ニーズに応える牛肉のあり方を提案することを目的とした。

## 2. 材料および方法

調査はインターネットアンケート会社のマクロミルに依頼し、月に2, 3回以上牛肉を購入している全国の女性消費者を対象に、2014年12月17日から2014年12月22日にかけてインターネットアンケートを実施した。調査対象として、25歳以上64歳以下の女性消費者を年齢層（25歳-34歳、35-44歳、45-54歳、55-64歳）別に均等な人数になるよう1040名をランダムに抽出した。その内訳は、Table 1 に示すとおりである。注意すべき分類と

Table 1 Profiles of respondents

| Region              | Number | Percent |
|---------------------|--------|---------|
| Hokkaido            | 99     | 9.5     |
| Tohoku              | 109    | 10.5    |
| Kanto               | 208    | 20.0    |
| Chiubu              | 191    | 18.4    |
| Kinki               | 225    | 21.6    |
| Chugoku and Shikoku | 93     | 8.9     |
| Kyushu              | 115    | 11.1    |
| Gender Female       | 1040   | 100.0   |
| Age                 |        |         |
| 25-34               | 260    | 25.0    |
| 35-44               | 260    | 25.0    |
| 45-54               | 260    | 25.0    |
| 55-64               | 260    | 25.0    |

して、居住地に関しては三重県を近畿地域に分類し、また職の有無に関しては自営業も含めて定職を持っているか否かで分類した。

牛肉を購入する際に重視する項目として19項目を用意し、それぞれの項目に対して、「非常に重視している」から「まったく重視していない」までの7段階を割り当て、回答を得た。そのうち、内因性価値に関する質問項目としては、肉の色やつやなどの「見た目」、 「バラ」や「肩ロース」などの「部位」、霜降りの度合い、赤身部分の多さ、肉の周りの脂肪の薄さ、牛肉の熟成の度合い、「焼肉用」や「ステーキ用」などの「用途」の7

項目を取り上げた。また外因性価値と関係する質問項目としては、消費期限、加工年月日、牛の「個体識別番号」、 「BSE検査済」の表示、「放射能検査済」の表示、販売店（または販売組織）の「信頼度」、国産・海外産などの「産地名」、 「松阪牛」や「神戸牛」などの産地・銘柄の「ブランド」、企業名・農場名などの「生産者」の情報、家畜に給与された「飼料」の情報、家畜に投与された「医薬品」の情報、価格の12項目を取り上げた。

次に、内因性価値と外因性価値のそれぞれに関する質問項目に関して、主成分分析を実施し、内因性価値と外因性価値に関して得られた主成分間

Table 2 The results from principal component analysis

| Items <sup>1)</sup>            | Intrinsic quality value <sup>2)</sup> |       |        |        |        |        |
|--------------------------------|---------------------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|
|                                | Mean                                  | PC1   | PC2    | PC3    |        |        |
| Appearance                     | 5.58                                  | 0.377 | -0.459 | 0.122  |        |        |
| Retail cut                     | 5.40                                  | 0.390 | -0.297 | 0.349  |        |        |
| Degree of marbling             | 4.90                                  | 0.407 | 0.107  | 0.185  |        |        |
| Degree of leanness             | 5.15                                  | 0.398 | -0.155 | -0.515 |        |        |
| Thinness of fat                | 5.03                                  | 0.402 | -0.013 | -0.542 |        |        |
| Aging of beef                  | 4.10                                  | 0.318 | 0.798  | -0.044 |        |        |
| End usage                      | 5.16                                  | 0.346 | 0.170  | 0.518  |        |        |
| -----                          |                                       |       |        |        |        |        |
| Proportion                     |                                       | 0.518 | 0.114  | 0.109  |        |        |
| Cumulative                     |                                       | 0.518 | 0.632  | 0.741  |        |        |
| -----                          |                                       |       |        |        |        |        |
|                                | Extrinsic quality value <sup>3)</sup> |       |        |        |        |        |
|                                | Mean                                  | PC1   | PC2    | PC3    | PC4    | PC5    |
| Durable life                   | 5.69                                  | 0.174 | 0.515  | 0.403  | -0.173 | -0.067 |
| Package date                   | 5.28                                  | 0.224 | 0.397  | 0.526  | -0.163 | -0.036 |
| Traceability number            | 3.28                                  | 0.302 | -0.216 | 0.184  | -0.026 | -0.018 |
| BSE tested                     | 3.80                                  | 0.343 | -0.172 | 0.053  | 0.150  | -0.427 |
| Radioactivity tested           | 3.90                                  | 0.348 | -0.158 | 0.016  | 0.170  | -0.416 |
| Creditability of shop          | 4.75                                  | 0.298 | 0.138  | -0.358 | 0.047  | -0.382 |
| Origin                         | 5.32                                  | 0.260 | 0.315  | -0.440 | -0.158 | -0.047 |
| Brand name                     | 4.49                                  | 0.272 | 0.158  | -0.390 | -0.419 | 0.275  |
| Information on farm and farmer | 4.00                                  | 0.345 | -0.061 | -0.052 | -0.072 | 0.392  |
| Information on feed            | 3.59                                  | 0.348 | -0.231 | 0.107  | 0.111  | 0.346  |
| Information on medicine        | 3.59                                  | 0.342 | -0.249 | 0.137  | 0.159  | 0.297  |
| Price                          | 5.92                                  | 0.046 | 0.462  | -0.129 | 0.804  | 0.231  |
| -----                          |                                       |       |        |        |        |        |
| Proportion                     |                                       | 0.495 | 0.162  | 0.074  | 0.063  | 0.052  |
| Cumulative                     |                                       | 0.495 | 0.657  | 0.732  | 0.795  | 0.847  |

1) evaluated by 7-point scale from not at all important (1) to very important (7)

2) Intrinsic quality value : PC1 Importance of overall intrinsic quality, PC2 Importance of aging, PC3 Importance of cooking

3) Extrinsic quality value : PC1 Importance of overall extrinsic quality, PC2 Importance of safety, PC3 Importance of freshness, PC4 Importance of price, PC5 Importance of production information

の相関を調べて、内因性価値と外因性価値の関連性を明らかにした。さらに抽出された主成分に関して、居住地、年齢層、職の有無、未既婚、子どもの有無およびそれらの交互作用を変動因として最小2乗分散分析を行ってそれらの変動因の影響を調べた。

最後に購買価格に対する各主成分の影響を標準化偏回帰係数によって表した。標準化偏回帰係数は、購買価格を従属変数、各主成分を独立変数とする重回帰分析を行い、得られた偏回帰係数を標準偏差で標準化したものである。求められた標準化偏回帰係数は、消費者の購買価格に対する各主成分の重要度を表す指標になると考えられる。

### 3. 結果および考察

牛肉の内因性価値に関連する質問項目の平均値と主成分分析の結果はTable 2に示すとおりである。内因性価値に関する質問項目の中で最も重要視されている項目は「見た目」で、「霜降りの度合い」や「熟成の度合い」に関する消費者の重要度は相対的に低かった。

内因性価値に関する主成分分析では、寄与率が10%を超える3主成分を抽出した。第1主成分はどの質問項目とも関連性が高かったので「内因性価値全般重視因子」とした。第2主成分は熟成の度合いのみと関連性が高かったため「熟成重視因子」とした。第3の主成分は、部位や用途と関連性が強かったので「調理重視因子」とした。

他方、牛肉の外因性価値に関連する各質問項目の平均値と主成分分析の結果はTable 2に示すとおりである。外因性価値の中で最も重要度の高かった質問項目は「価格」で、安全性や生産情報に関する質問項目の重要度は相対的に低い傾向であった。外因性価値に関連する質問項目は12項目と多かったので、主成分分析では寄与率が5%を超えるものまで取り上げ、5つの主成分を抽出し

た。第1主成分は価格以外の質問項目と関連性の高いもので、「外因性価値全般重視因子」とした。第2主成分は、消費期限や加工年月日、産地や価格と関連性が高かったので「安全性重視因子」とした。第3主成分は、産地名やブランドよりも消費期限や加工年月日の牛肉の鮮度に関する項目と関連性が高かったので「鮮度重視因子」とした。第4主成分は、価格と強い関連性があるので「価格重視因子」とした。最後の第5主成分は主として生産情報と関連性が高かったので「生産情報重視因子」とした。

内因性価値に関する主成分と外因性価値に関する主成分間の相関はTable 3に示すとおりである。外因性価値全般重視因子は、内因性価値全般重視因子と正の高い相関があった ( $r = 0.52$ )。このことから、外因性価値を全般的に重視している消費者は、内因性価値も全般的に評価する傾向にあることがうかがえた。価格は外因性価値項目の一つであるが、その他の外因性価値項目との関連性が低く (Table 2の外因性価値の第1主成分では他とは異なる関係にある)、さらに価格重視因子は内因性価値とも関連性が低く ( $r = -0.042$ )、

Table 3 Correlation coefficients of principal components between intrinsic and extrinsic quality values

| Extrinsic quality values <sup>2)</sup> | Intrinsic quality value <sup>1)</sup> |        |        |
|--|---------------------------------------|--------|--------|
|  | PC1                                   | PC2    | PC3    |
| PC1                                    | 0.52                                  | 0.255  | 0.025  |
| PC2                                    | 0.429                                 | -0.337 | 0.179  |
| PC3                                    | -0.026                                | 0.088  | -0.019 |
| PC4                                    | -0.042                                | -0.067 | -0.088 |
| PC5                                    | 0.04                                  | 0.098  | -0.017 |

1) Intrinsic quality value ; PC1 Importance of overall intrinsic quality, PC2 Importance of aging, PC3 Importance of cooking

2) Extrinsic quality value ; PC1 Importance of overall extrinsic quality, PC2 Importance of safety, PC3 Importance of freshness, PC4 Importance of price, PC5 Importance of production information

他の牛肉の価値因子とは異なっていることが示唆された。このことから、価格を重視するかどうかは牛肉の内因的あるいは他の外因的な価値とは異なり、消費者の経済状況や社会環境によって強く影響されているものと推察された。また、熟成重視因子は、外因性価値全般重視因子と中程度の関連性が認められ ( $r = 0.255$ )、熟成を重視するか否かは外因性価値と関連している可能性が示唆さ

れた。近年、赤身牛肉の評価の高まりとともに熟成技術が話題となっているが、熟成は内因性価値の1項目であるにもかかわらず、消費者から外因性価値として評価されている可能性が示唆された。

Table 4 は、主成分に対する消費者の属性の効果を調べた最小2乗分散分析の結果を示したものである。表中の数字は有意確率を示したもので、数値が0.05以下であればその属性が統計的に有意

Table 4 Demographic effects on principle components (figures are significance levels from least squares analysis of variance)

| Demographic variables | Intrinsic quality value |       |       | Extrinsic quality value |       |       |       |       |       |
|-----------------------|-------------------------|-------|-------|-------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                       |                         | PC1   | PC2   | PC3                     | PC1   | PC2   | PC3   | PC4   | PC5   |
| Region (R)            | 6                       | 0.435 | 0.775 | 0.598                   | 0.989 | 0.588 | 0.031 | 0.199 | 0.641 |
| Age (A)               | 3                       | 0.054 | 0.102 | 0.579                   | 0.001 | 0.340 | 0.051 | 0.073 | 0.731 |
| Job (J)               | 1                       | 0.788 | 0.330 | 0.143                   | 0.236 | 0.455 | 0.912 | 0.071 | 0.251 |
| Civil status (M)      | 1                       | 0.081 | 0.104 | 0.718                   | 0.082 | 0.571 | 0.787 | 0.256 | 0.310 |
| Presence of child (C) | 1                       | 0.295 | 0.754 | 0.007                   | 0.749 | 0.022 | 0.661 | 0.155 | 0.844 |
| R×A                   | 18                      | 0.008 | 0.500 | 0.340                   | 0.907 | 0.092 | 0.317 | 0.071 | 0.449 |
| R×J                   | 6                       | 0.559 | 0.269 | 0.332                   | 0.750 | 0.302 | 0.878 | 0.621 | 0.541 |
| R×M                   | 6                       | 0.654 | 0.007 | 0.471                   | 0.796 | 0.300 | 0.326 | 0.247 | 0.787 |
| R×C                   | 6                       | 0.248 | 0.336 | 0.279                   | 0.244 | 0.760 | 0.474 | 0.467 | 0.365 |
| J×M                   | 1                       | 0.786 | 0.865 | 0.624                   | 0.865 | 0.036 | 0.038 | 0.983 | 0.686 |
| J×C                   | 1                       | 0.097 | 0.170 | 0.705                   | 0.482 | 0.000 | 0.511 | 0.412 | 0.748 |

1) Intrinsic quality value ; PC1 Importance of overall intrinsic quality, PC2 Importance of aging, PC3 Importance of cooking

2) Extrinsic quality value ; PC1 Importance of overall extrinsic quality, PC2 Importance of safety, PC3 Importance of freshness, PC4 Importance of price, PC5 Importance of production information

Table 5 Standardized regression coefficients when daily beef purchase price were used as dependent variable

|                                       | Region      |          |        |        |        |        |                     |        |
|---------------------------------------|-------------|----------|--------|--------|--------|--------|---------------------|--------|
|                                       | All regions | Hokkaido | Tohoku | Kanto  | Chubu  | Kinki  | Chugoku and Shikoku | Kyushu |
| Intrinsic quality value <sup>1)</sup> |             |          |        |        |        |        |                     |        |
| PC1                                   | 0.196       | 0.342    | 0.299  | 0.229  | -0.029 | 0.231  | 0.237               | 0.251  |
| PC2                                   | 0.019       | -0.076   | -0.003 | -0.034 | -0.007 | -0.033 | 0.068               | 0.245  |
| PC3                                   | 0.086       | 0.055    | 0.038  | 0.179  | 0.050  | 0.106  | 0.136               | 0.007  |
| Extrinsic quality value <sup>2)</sup> |             |          |        |        |        |        |                     |        |
| PC1                                   | 0.113       | 0.173    | 0.063  | -0.005 | 0.270  | 0.177  | 0.036               | 0.107  |
| PC2                                   | -0.119      | -0.244   | 0.021  | -0.310 | 0.049  | -0.108 | -0.134              | -0.071 |
| PC3                                   | -0.161      | -0.037   | 0.010  | -0.236 | -0.186 | -0.147 | -0.101              | -0.140 |
| PC4                                   | -0.232      | -0.267   | -0.093 | -0.181 | -0.248 | -0.322 | -0.204              | -0.303 |
| PC5                                   | -0.043      | -0.087   | -0.007 | -0.123 | 0.013  | 0.017  | -0.048              | -0.128 |

1) Intrinsic quality value ; PC1 Importance of overall intrinsic quality, PC2 Importance of aging, PC3 Importance of cooking

2) Extrinsic quality value ; PC1 Importance of overall extrinsic quality, PC2 Importance of safety, PC3 Importance of freshness, PC4 Importance of price, PC5 Importance of production information

であると判断できる。第1主成分の内因性価値全般重視因子に関しては、居住地と年齢層の交互作用のみが統計的に有意であった。年齢層の高い消費者ほど内因性価値を重視する傾向にあったが ( $p = 0.054$ )、北海道に住む消費者では内因性価値全般重視因子は35-44歳で最も高かったのに対して、中部地域や九州地域に住む消費者では45-54歳の年齢層で最も低かった。第2の熟成重視因子では居住地と未既婚の交互作用が有意で、北海道や中部地域に住む消費者は既婚の人ほど熟成を重視しているが、他の地域では未婚の消費者ほど熟成を重視することが示唆された。第3の調理重視因子に関しては、子どもの有無が有意で、子どものある消費者ほど用途や部位を重視していた。

一方、外因性価値に関しては、第1の外因性価値全般重視因子については年齢層が高い消費者ほど外因性価値を重視していた。また、第2の安全性重視因子においては職の有無と未既婚の交互作用が有意で、定職を持っている消費者では未婚の消費者ほど安全性を重視しているのに対して、定職を持っていない消費者では既婚の消費者ほど安全性を重視していた。また、職の有無と子供の有無の交互作用も有意で、定職を持っている消費者では子どもを持つ消費者ほど安全性を重視しているのに対して、定職を持っていない消費者では子どもを持たない消費者ほど安全性を重視していた。鮮度重視因子では、北海道に住む消費者が最も鮮度を重視しており、近畿地域に住む消費者が最も軽視していることが示された。また、職の有無と未既婚間の交互作用が有意で、定職を持っている消費者は、未婚者ほど鮮度を重視しているのに対して、定職を持っていない消費者では既婚者ほど鮮度を重視していることが示唆された。以上の結果から、牛肉の外因性価値は、消費者の属性によってかなり影響されることが推察された。

本研究では、日常の牛肉購買価格の平均値は

100gあたり356円であった。日常の牛肉購買価格に対する個々の主成分の重要度を標準偏回帰係数によって示した結果がTable 5である。全データを対象に分析した結果、牛肉購買価格に最も大きな影響を示しているのが、外因性価値の第4主成分である価格重視因子で、価格を重視している消費者ほど安価に牛肉を購入する傾向が認められた。また、内因性価値を全般に重視している消費者は高価格で牛肉を購入し、また鮮度を重視している消費者は低価格で牛肉を購入していることが示唆された。その一方で、生産情報因子は購買価格にほとんど影響を及ぼしておらず、わが国の現状は、生産情報が牛肉の購買意欲に大きな影響を及ぼしていないと推察された。

同様の分析を地域別に行ったところ、中部地域に住む消費者は内因性価値よりも外因性価値を一般的に重視する傾向があり、外因性価値を重視する消費者ほど牛肉を高価で購入する傾向があった。また、九州地域に住む消費者は熟成を重視している消費者ほど高価に牛肉を購入しており、東北地域に住む消費者は、内因性価値以外にはほとんど牛肉の購買価格に影響を与えていないことが示された。

本研究では、日本中での牛肉の購買に地域間差のあることを示したが、世界的に見ても牛肉の価値に対する消費者の反応は、国や地域によって異なり、たとえばヨーロッパでは地球環境問題やアニマルウェルフェアに対する配慮や遺伝子操作飼料の不給与などへの関心が高く、そのような外因的価値を持つ牛肉は高く評価されているのに対して、米国ではこれらの問題に対する関心の低いことが知られている<sup>8)</sup>。

わが国では、近年、脂肪交雑一辺倒の価値評価から脂肪酸組成や官能評価などの他の牛肉の質に関する検討が盛んに行われている。また、牛肉の価格に関する検討も行われているが、価格以外の

外因性価値に関する検討は、その価値そのものが消費者の主観に基づく割合が高く、科学的でないなどの理由からこれまでほとんど行われてこなかった。しかしながら、先進国を中心に世界的にも牛肉の内因性価値のみならず、外因性価値を重視して消費者は牛肉を購入しており、その外因性価値の重要性はますます高まっていると考えられている。

これからの牛肉消費は、霜降り一辺倒から多様になると予想される。特に、欧米の傾向を見ていると近い将来、外因性価値の重要性はますます高まってくると考えられる。最近、わが国でも健康面への配慮から赤身肉を求める消費者や熟成などの牛肉の保存方法、生産履歴に興味を持つ消費者も出てきている。今後は、欧米並みに牛肉生産に伴う環境負荷の低減やアニマルウェルフェアへの配慮、牛肉の安全性などに関心が高まり、そのような点を保証された牛肉にプレミアムが付加されて高価で販売されることも考えられる。本研究の結果は、わが国の女性消費者の牛肉購買行動の解明の一助になることが期待され、生産者や流通業者はこのような消費者の消費行動の変化にいち早く気づき、そのような新しい消費者ニーズに応える牛肉生産にシフトしてゆくことも、持続的な牛肉生産を考えるうえで肝要であろうと推察される。

#### 4. 要 約

牛肉の価値は、牛肉そのものが持つ価値（内因性価値と呼ぶ）と外部からの情報によって決まる価値（外因性価値と呼ぶ）の2つが考えられる。本研究は、25歳から64歳までの女性消費者を対象に全国規模のインターネットアンケート調査を実施し、牛肉の購買時において重要視している価値基準について調べることを目的とした。主成分分析の結果、内因性価値として「内因性価値全般重

視因子」、**「熟成重視因子」**、「調理重視因子」の3主成分、外因性価値として「外因性価値全般重視因子」、「安全性重視因子」、「鮮度重視因子」、「価格重視因子」、「生産情報重視因子」の5主成分を抽出した。価格は最も重要な外因性価値であったが、内因性価値や他の外因性価値とは異なる性質を持っていた。「内因性全般重視因子」と「外因性全般重視因子」の間には正の高い相関があり、この結果から内因性価値を重視している消費者は外因性価値も重視して牛肉を購入していることが示唆された。また消費者の属性は、内因性価値や外因性価値に関する主成分に少なからず影響を与えていることが示唆された。日常の牛肉の購買価格は、全体としては「価格重視因子」、「内因性全般重視因子」、「外因性全般重視因子」によって影響されていたが、その影響の大きさと方向性は消費者の住んでいる地域によって異なっていた。本研究の結果は、異なる対象地域の市場における消費者の牛肉購買行動に関与する牛肉の価値基準を特定するのに役立つものと考えられた。

#### 文 献

- 1) Hocquette, J. F., Botreau, R., Picard, B., Jacquet, A., Pethick, D. W., Scollan, N. D., *Meat Science*, **92**, 197 ~ 209, 2012.
- 2) DeVuyst, E. A., Lusk, J. L., DeVuyst, M. A., *Journal of Animal Science*, **92**, 3142~3148, 2014.
- 3) Sasaki, K., Mitsumoto, M., *Animal Science Journal*, **75**, 369~376, 2004.
- 4) 佐々木啓介, 三本充, 合崎秀男, 日本畜産学会報 **77**, 67~76, 2006.
- 5) 広岡博之, 畜産の情報, **276**, 57~62, 2012.
- 6) 広岡博之, 食肉に関する助成研究成果報告書, **32**, 39~46, 伊藤記念財団, 2014.
- 7) Thilmany, D. D., Umberger, W. J., Ziehl, A. R., *Renewable Agriculture and Food Systems*, **21**, 1892 ~ 203.
- 8) Lusk, J. L., Roosen, J., Fox, J. A., *American Journal of Agricultural Economics*, **85**, 16 ~ 29, 2003.



# 味覚センサを用いた和牛の味の数値化と可視化に関する研究

A study on quantification and visualization for taste of wagyu beef using a taste sensor

都 甲 潔・田 原 祐 助

(九州大学システム情報科学研究院)

Kiyoshi Toko and Yusuke Tahara

(Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University)

In this study, we evaluated characteristics of the taste sensor membranes at 50°C (dissolution temperature of beef tallow) and the interaction between beef tallow and the taste sensor membranes to establish an objective evaluation technique of quantification and visualization for taste of wagyu using the taste sensor. The umami sensor responses to wagyu did not show definite differences between wagyu grades (A2, A3, A5). It indicates the necessity of the evaluation between the grade A, B and C which are expected to show differences of sensory score and taste qualities, as a first step. The umami sensor responses to MSG and MSG including beef tallow were different, since sensor characteristics for CPA value of the umami sensor were changed by measuring of sample including beef tallow once. These results indicated that the umami sensor can become a new evaluation technique of quantification and visualization for taste of wagyu.

## 1. 目 的

ヒトの感じる味には、基本五味と呼ばれる塩味、酸味、うま味、苦味、甘味があり、味物質は、味蕾に存在する受容体やイオンチャネルで受容される。また、渋味、辛味といった広義の味がある。食品に含まれる油脂成分は味に大きく影響するといわれているものの、具体的な役割の解明は食品分野において重要な課題となっている。牛肉の食味は、「味」、「食感」、「香り」等の総合的な要素から成ると考えられている。本研究は、脂質高分子膜電極を用いて食品や医薬品の味を客観的に評

価可能としている味覚センサ<sup>1,2)</sup>を応用し、和牛の「味」を客観的に数値化、可視化する評価技術の構築を目的としている。

牛肉は肉の種類や部位によって、その軟らかさや脂肪の入り具合など、肉の性質が異なる。油脂は味を有していないと考えられるが、牛肉の美味しさにおいて重要な要素を占め、肉中の味物質や味受容機構に影響を与えることで味が変化すると考えられ、味覚センサを用いた客観的な評価方法を検討する必要がある。また、肉中の油脂は、コク味を有する味物質に影響があると考えられる。コク味とは、基本五味および基本五味の周辺の味

の厚み、広がり、持続性、まとまりなどを増強する効果を持つとされている。味覚センサを用いたコク味の評価には、うま味物質が脂質高分子膜に吸着することによって生じる膜電位変化である後味測定値 (CPA ; Change of membrane Potential caused by Adsorption) が利用されている<sup>1,2)</sup>。

申請者が開発した味覚センサは、「味」を数値化できる世界初の装置として知られている<sup>3,4)</sup>。味覚センサは、生体系における味蕾の代わりに、脂質高分子膜を味物質の受容およびトランスデューサーとして利用し、味物質との静電相互作用や物理吸着による膜電位変化から、味を評価することができる。味覚センサはこれまでに、ビール、日本酒、お米、肉類、野菜、果物等種々の食品の味の数値化に成功しているが、肉類に関しては、脂肪がセンサ応答の感度と脂質高分子膜の耐久性に悪影響を及ぼすために、肉の味に重要とされる脂肪を除去して評価を行っているのが現状である。本研究は、和牛の味に重要な役割を担う脂肪を脱脂することなく評価可能な技術の構築を目指すものである。

## 2. 方 法

### 2.1 味覚センサを用いた測定

実験には、(株) インテリジェントセンサーテクノロジー社製の味覚センサ (味認識装置 TS-5000 Z) およびセンサ電極を使用した。測定手順は、①センサを基準液 (30mM KCl, 0.3mM 酒石酸) に浸漬し、膜電位を測定 ( $V_r$ )、②サンプル溶液に浸漬し、膜電位を測定 ( $V_s$ )、③基準液で軽く洗浄した後、再び基準液に浸漬し、膜電位を測定 ( $V_r'$ ) した。①と②の膜電位の差 ( $V_s - V_r$ ) を相対値としており、これは先味の指標として用いられている。①と③の膜電位の差 ( $V_r' - V_r$ ) は、脂質高分子膜上の味物質が吸着したことによる膜の電荷密度と構造の変化によって引き起こさ

れる<sup>1~4)</sup>。この吸着により起こる膜電位変化は後味の指標として用いられており、CPA値と呼ばれている。

通常、味覚センサの測定は室温で行うが、本研究では油脂が溶解する50℃条件下<sup>5)</sup>で測定を行った。また、測定中のサンプル溶液の蒸発を防ぐために、センサ電極がサンプル溶液に挿入される時 (電位計測) 以外は蓋をした。これまでの研究から、うま味センサ、酸味センサ、塩味センサは、常温測定と比べると相対値は増加したが、標準偏差は小さく、再現性が高いセンサ応答が確認でき、50℃条件下でも使用できる。また、苦味センサを用いた苦味サンプルの測定 (CPA) では、常温での測定と同程度のセンサ応答および高い再現性が確認できている<sup>6)</sup>。

### 2.2 味覚センサを用いた牛肉の測定

牛肉の測定には、和牛サーロイン (肉質等級 A 2, A 3, A 5) を用いた。サンプル調整は、以下のとおり行った。①牛肉を厚さ 1 cm × 4 cm × 5 cm に切断後、室温で1時間解凍した。②フライパンで牛肉表面を60秒、裏面を90秒加熱した。③処理した牛肉および等量の味覚センサ基準液をフードプロセッサーで1分間ミキシングして混合した。④ガーゼを用いて固形分を除去した。⑤得られたサンプル溶液を基準液で100倍希釈し、これらを測定用サンプル溶液とした。味覚センサの測定は50℃で行い、測定ごとに新しいエタノール含有洗浄液を交換し、センサ電極がサンプル溶液に挿入される時以外はサンプル溶液の蒸発を防ぐために蓋をした。

### 2.3 うま味センサの吸着特性

うま味センサ膜の油脂の有無によるグルタミン酸ナトリウム (MSG) 吸着量の差異を検討するため、分光光度計 (マイクロプレートリーダー、Bio-Rad Laboratories, Inc.) を用い吸着量の測定を行った。まず、濃度既知の300mM MSG溶液の

吸光度を測定した後、シャーレに製膜したうま味センサ膜に300mM MSG溶液を滴下し、上澄み液を取り出して吸光度を測定した。得られた吸光度から300mM MSG溶液の吸着量を算出した。次に、溶解した油脂をシャーレ中の膜に浸し、一定の時間後取り出してから膜を洗浄し、再び300mM MSG溶液を滴下し、上澄み液を取り出して吸光度を測定した。グルタミン酸の測定は、酵素活性を利用した比色法を用いたヤマサL-グルタミン酸測定キットII（ヤマサ醤油株）を用いた。味覚センサの測定で使用するエタノール含有洗浄液は、測定回数の増加とともに油脂で汚染されることが考えられるため、測定ごとに新しい洗浄液に交換した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 味覚センサを用いた牛肉の測定

塩味、酸味、うま味、苦味、渋味センサを用いて、味覚センサによる和牛サーロインの測定を行った。塩味、酸味、苦味、渋味センサは、肉質等級によらず数mV程度しかセンサ応答が得られなかった。Fig. 1に、牛肉の重要な味質であるうま味センサの測定結果を示した。測定は、肉質等級ごとに3サンプル行ったが、サンプルごとにセンサ応答が異なり、肉質等級の差異を評価することができなかった。うま味センサの標準偏差は低

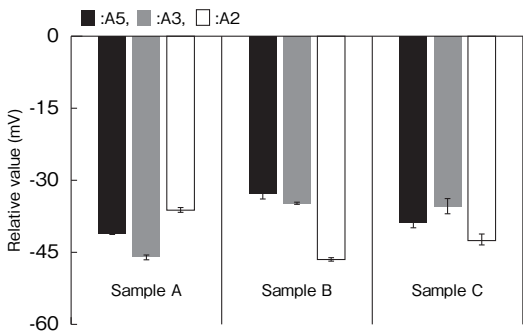


Fig. 1 Relative value of umami sensor to wagyu

いことから、サンプル間の差異が大きかったと考えられる。従って、測定サンプルの選別方法や、調整方法に関して検討する必要がある。

また、官能試験を行ったが、各味質の強度に対する肉質等級間の差異は認められなかった。アンケートによると、油の味を強く感じるため、各味質の強度を評価することが難しいという記述が多く、各味質強度の評価をするための官能試験方法を検討する必要があると考えられる。今後は、同一の等級ではなく、官能および味質に違いが出やすいと期待される歩留等級間の評価を行う必要があると考えられる。

#### 3.2 うま味センサのセンサ特性

うま味は、牛肉の味を評価するうえで重要な味質であると考えられる。また、肉中の油脂は、コク味を有する味物質に影響があると考えられる。コク味とは、基本五味および基本五味の周辺の味の厚み、広がり、持続性、まとまりなどが増強された結果の味とされている。味覚センサを用いたこれまでの研究から、うま味のCPA値とコクに関連性があることが示唆されている<sup>1)</sup>。そこで、うま味センサを用いて、うま味物質であるグルタミン酸ナトリウム（MSG）および油脂を含有したサンプルを用いたうま味センサのセンサ特性を評価した。その結果、一度油脂を含有したサンプルを測定したうま味センサは、MSGおよび牛脂含有MSGに対し、異なる応答を示すことが分かった。

Fig. 2にうま味センサの相対値を、Fig. 3にCPA値を示した。Fig. 2より、一度油脂を測定したセンサ電極でMSG溶液を測定すると、油脂を含有したMSG溶液の相対値はMSG溶液より大きかった。通常のうま味センサは、MSG濃度の増加とともに負の方向に増加する挙動を示すことから、相対値の負の方向に増加するという挙動は油脂の有無にかかわらず同様といえる。Fig. 3より、

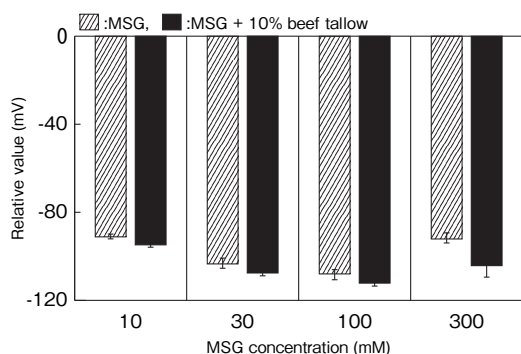


Fig. 2 Relative value of umami sensor to MSG and MSG + 10%beef tallow

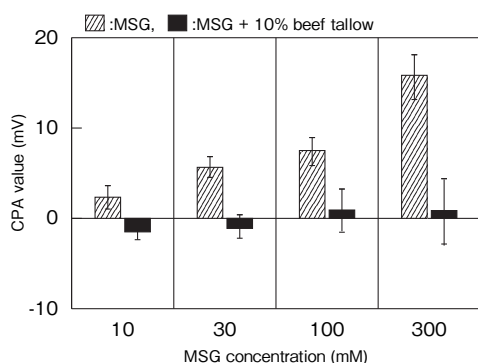


Fig. 3 CPA value of umami sensor to MSG and MSG + 10%beef tallow

CPA値は、300mM MSGで+15mV、牛脂10%含有MSGで0 mVを示し、MSGおよび油脂含有MSGともに、濃度に対し正の方向に増加することが分かった。通常、MSGのCPA値は、10mM MSGの時、0 mV程度であり、濃度の増加とともに負値方向に増加し、300mMの時、-40mV程度を示す。つまり、一度油脂を測定したうま味センサは、油脂を測定しないセンサと比較して、相対値においては膜電位応答に大きな変化はないが、CPA値に関しては応答特性の正負が逆転するということが分かった。油脂を含有したMSG溶液のCPA値はMSG溶液のCPA値に比べ負の値をとっているのが特徴的である。このCPA値の応答特性変化は、油脂の有無による違いを認識して

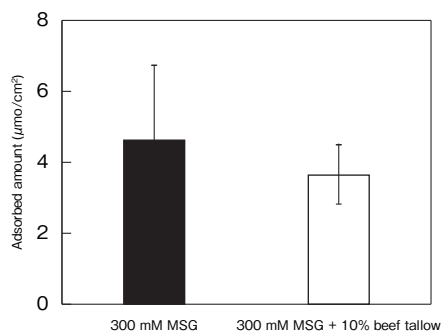


Fig. 4 Adsorbed amount of MSG on lipid polymer membrane

いることから、うま味の後味（コク）の評価に応用できることが期待される。

### 3.3 うま味センサの吸着特性

3.2から、一度油脂を含有したサンプルを測定すると、油脂の有無がCPA値に反映されることが示された。CPA値は、味物質の脂質高分子膜への吸着に反映することが分かっているため、MSGに対する吸着量の評価を行った。シャーレに製膜した脂質高分子膜（うま味センサ膜）に油脂を滴下したものをを用い、300mM MSGと油脂10%含有300mM MSGの吸着量をFig. 4に示した。うま味センサの膜は、油脂が吸着することで、MSGの吸着量が増えることでセンサ応答に影響が出ると予想したが、興味深いことにMSGの吸着量に大きな差異は見られなかった。MSGの吸着量は油脂の有無にかかわらず同程度であり、Fig. 3のように異なるCPA値を示す理由を明らかにすることはできなかったが、本知見は油脂の味に対する影響を評価できる新たな評価となることが期待できる。今後は、油脂の吸着量に関して評価を行うとともに、膜に対する相互作用を明らかにする必要がある。

## 4. 要 約

本研究は味覚センサを利用して、和牛の「味」

を客観的に数値化、可視化する評価技術の構築を目的とし、油脂が溶解する50℃条件下で味覚センサを用いた和牛の評価およびうま味センサの応答特性について評価を行った。和牛サーロイン（肉質等級A3, A2, A5）のセンサ応答では、肉質等級による差異は見られなかった。今後は、同一の等級ではなく、官能および味質に違いが出やすいと期待される歩留等級間の評価を行う必要があると考えられる。また、一度油脂を測定したうま味センサは、CPA値においてセンサ応答特性が変化し、うま味物質であるMSGにおいて、油脂の有無によるセンサ応答の差異を確認した。本知見は、油脂の味に対する影響を評価できる新たな評価手法となることが期待される。

## 謝 辞

本研究で用いた和牛は、伊藤ハム株式会社様から提供頂いた。ここに謝意を表す。

## 文 献

- 1) Y. Kobayashi, M. Habara, H. Ikezaki, R. Chen, Y. Naito, K. Toko, *Sensors*, **10**, 3411~3443, 2010.
- 2) Y. Tahara, K. Toko, *IEEE Sensors Journal*, **13** (8), 3001~3011, 2013.
- 3) K. Toko, *Biomimetic Sensor Technology*, Cambridge University Press, UK, 2000.
- 4) K. Toko (ed), *Biochemical Sensors*, Pan Stanford Publishing, Singapore, 2013.
- 5) 兼松弘, 木下葉子, 新谷助, 松本太郎, 油化学, **28** (5), 344~347, 1979.
- 6) 都甲潔, 田原祐助:平成25年度食肉に関する助成調査成果報告書, 伊藤記念財団, **32**, 34~38, 2013.

# レトルト加熱処理を施した筋原線維タンパク質の 培養骨芽細胞の分化に及ぼす影響

Effect of retort processing on the osteoblast growth promoting activities  
of porcine myofibrillar protein

林 利 哉・深 見 渉・小 川 幸 彦\*・芳 賀 聖 一

(名城大学農学部, \*名城大学農学部附属農場)

Toshiya Hayashi, Wataru Fukami, Yukihiro Ogawa\* and Seiichi Haga

(Faculty of Agriculture, Meijo University, \*Experimental Farm, Meijo University)

In this study, muscle protein degradation and expression of food functionality by retort-processing were investigated using myofibrillar protein as a simple model system of meat product. Free amino acid and peptide contents significantly increased during retort processing compared to heating at 70°C (control). Therefore, we suggest that retort processing may lead to degradation of myofibrillar proteins as a result of exposure to extremely high temperatures. Furthermore, growth-promoting activities in an osteoblast-like cell culture, i.e., alkaline phosphatase and collagen synthesis activities of osteoblast-like cell cultures, were significantly higher in the retorted myofibrillar protein than those in the protein heated at 70°C. These results suggest that retort processing may contribute to derivation of low molecular weight peptides and improvement in functionalities of meat products.

## 1. 目 的

当研究室では伝統的食品加工技術の活用による食肉製品の高付加価値化を目指し、発酵や加熱といった加工処理が食肉の品質に及ぼす影響について多面的に追究してきた<sup>1-3)</sup>。その結果、モデルソーセージを用いた製品レベルにおいて、120°C以上の高温に及ぶレトルト加熱によって著しい物性低下が起こるとともにタンパク質の分解が生じ、その結果、低分子ペプチドが増加することを見出している<sup>4,5)</sup>。また、低温乳酸発酵を施すことによりモデル製品の物性や組織構造が著しく変化し、加えて $\alpha$ -アクチニンの分解に伴う筋原線

維の小片化、その他のタンパク質の分解もより顕著にみられることを明らかにしている<sup>1)</sup>。このような加熱や発酵に伴うタンパク質分解、特に筋原線維タンパク質の分解は、製品の好ましいテクスチャー発現において、負の影響をもたらすものと考えられるが、一方で機能面においては、機能性ペプチド生成によるメリットをもたらすことが期待できる。従って、低温乳酸発酵やレトルト加熱に伴うタンパク質分解挙動の詳細を明らかにし、かつ機能性発現の有無を評価することは、食肉の機能改善を追究するうえで極めて意義深いといえる。

そこで本研究では、食肉の主要タンパク質であ

る筋原線維タンパク質を単純モデル系として用いて、まずはレトルト加熱処理を施した筋原線維タンパク質におけるペプチド・遊離アミノ酸の量的変化を調べ、かつ骨芽細胞の分化賦活能を評価することで、レトルト加熱によるタンパク質分解と機能性発現の有無について検討を行った。

## 2. 実験材料と方法

### 2.1 試料調製

できる限り脂肪と結合組織を取り除いた新鮮な豚ロース肉から、一部改変したPerry and Grey<sup>6)</sup>, Etlinger<sup>7)</sup>らの方法に準じて筋原線維を調製し、最終的に0.6M-NaCl・50mMリン酸緩衝液(pH6.0)に対して透析、遠心分離(35,000×g, 15分, 4℃)して得られた上澄み画分を筋原線維試料とした。終濃度を15mg/mlに調整した筋原線維タンパク質溶液を、レトルト殺菌釜(花木製作所, HC-VA型)を用いて、120℃, 130℃および140℃でそれぞれ15分間加熱した。また、70℃で30分間加熱したものを対照区とした。いずれの加熱処理区も、加熱後速やかに氷冷を行った。各加熱試料を遠心分離(35,000g, 15分, 4℃)し、得られた上澄みを蒸留水に対して透析(Spectra/por CE, M.W.: 500), 凍結乾燥したものを最終試料とした。

### 2.2 ペプチド・遊離アミノ酸量の測定

上記凍結乾燥試料を蒸留水で溶解させ、等量の4%トリクロロ酢酸(TCA)を加えることにより2%TCA可溶性画分を調製し、三上ら<sup>8)</sup>の方法に準じてペプチド量を、ニンヒドリン法<sup>9)</sup>に準じて遊離アミノ酸量を測定した。

### 2.3 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

上記の水溶性タンパク質画分のタンパク質分布をSDS-PAGE<sup>10)</sup>(アクリルアミド濃度: 7.5~20%)により調べた。ゲルの染色はCoomassie

Breiliant Blue R-250により行った。

### 2.4 培養骨芽細胞(MC3T3-E1)の分化指標評価

独立行政法人理化学研究所から購入した骨芽細胞様株MC3T3-E1(RCB1126)を使用した。本細胞の培養には100U/ml Penicillin, 0.1mg/ml Streptomycin, 4 mM L-Glutamineを含むMinimum Essential Medium Eagle's ( $\alpha$ -MEM)培地(SIGMA)を用い、10%FBS(MultiSerTM)を添加して継代・前培養等を行った。培養はすべてCO<sub>2</sub>インキュベーター(37℃, 5%CO<sub>2</sub>)内で行った。

細胞濃度 $2.5 \times 10^5$  cells/mlに調整したMC3T3-E1を3.5φディッシュに播種し、増殖培地(10%FBSを含む $\alpha$ -MEM)で3日間培養した。その後、新鮮な $\alpha$ -MEM培地に交換し、試料タンパク質濃度が5mg/mlの各試料を培地に対して10%(v/v)になるように添加して、3日間培養を行ったものを以下の実験に供した。

試料添加後3日間培養した細胞の表面(3.5φディッシュ)をPBSで3回洗浄後、0.25M Sucrose水溶液0.5mlを添加し、セルスクレイパーにて細胞を剥離・回収した。回収した細胞を超音波破碎機(トミー精工, UD-201)で10秒間破碎した後、破碎液を遠心分離(2,000×g, 3min)して得られた上清を活性測定試料とした。

アルカリホスファターゼ(ALP)活性測定にはラボアッセイ™ALP(和光純薬)を用いた<sup>11)</sup>。すなわち、96穴プレートに基質溶液(p-ニトロフェニルリン酸)100 $\mu$ lと細胞破碎液の上清20 $\mu$ lを加え、37℃で30分間保温した後、反応停止液80 $\mu$ lを加え、405nmの波長で吸光度を測定した。キット付属のp-ニトロフェノール標準溶液を用いて作成した検量線より試料中のp-ニトロフェノール(n mol/ml)を算出した。また細胞破碎液のタンパク質濃度をBCA法に基づくBCA™

Protein Assay Kit (PIERCE) を用いて測定し、以下のようにALP活性値 (n mol/min/ $\mu$ g protein) を算出した。

ALP活性値 (n mol/min/mg protein)

$$= \text{p-Nitrophenol (n mol/ml)} \times 30 \text{ (min)} \\ \div \text{細胞タンパク質量 (}\mu\text{g/ml)}$$

コラーゲンの定量はSircol™ Soluble Collagen Assay Kit (Biocolor Ltd) を用いて行った<sup>11)</sup>。すなわち、試料添加後3日間培養した後の培養上清200  $\mu$ l にSircol dye reagent 1mlを加えて30分間攪拌した後、遠心分離 (10,000  $\times$  g, 10min, 25°C) して得られた沈殿画分にAlkali reagent 1mlを加えて攪拌し、沈殿を溶解させた。この沈殿溶解液の吸光度 (550nm) を測定した。キット付属のコラーゲン標準溶液を用いて作製した検量線よりコラーゲン濃度を算出した。なお、各試料中に含まれるコラーゲン量を考慮するため、

Blankは10%の各試料を含む $\alpha$ -MEMとした。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 タンパク質分解に及ぼす影響

これまでにモデルソーセージを用いた製品レベルにおいて、レトルトや低温乳酸発酵処理によって食肉中のタンパク質が分解し、低分子ペプチドが派生することを確認している<sup>1, 12)</sup>。そこで本実験では、筋収縮の本体であり、主要タンパク質である筋原線維タンパク質をモデル系に用いて、レトルト加熱がタンパク質分解に及ぼす影響についてペプチドと遊離アミノ酸量を調べることにより検討した。

その結果、レトルト加熱を施すことにより、ペプチド (Fig.1A)、遊離アミノ酸量 (Fig.1B) のいずれも、対照区である70°C加熱区と比較して有意 ( $p < 0.01$ ) に高い値を示し、特に、140°C加熱区が最も顕著であった。

次に、レトルト加熱によるタンパク質分布の変

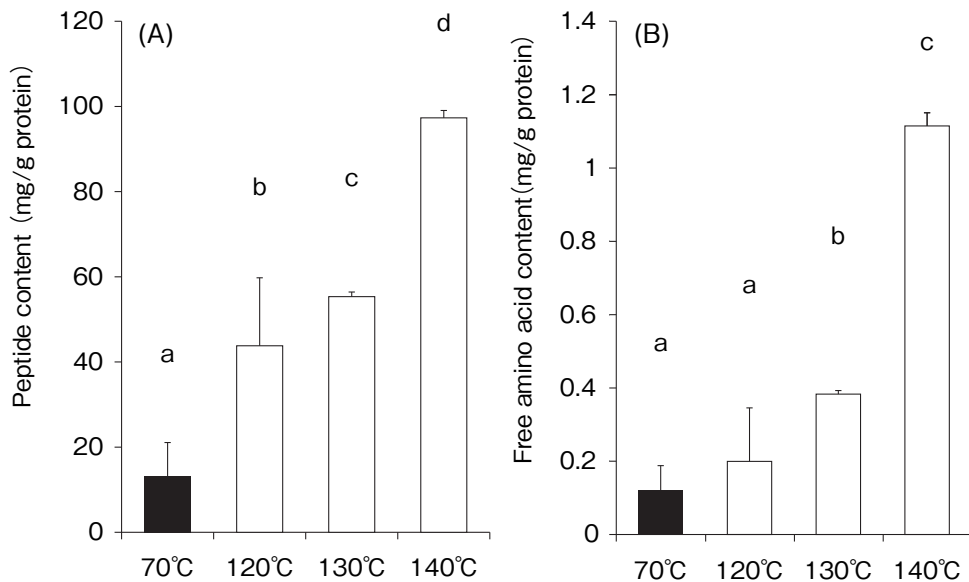


Fig. 1 Effect of retort processing on the peptide (A) and free amino acid contents (B) of the myofibrillar protein. Data represent the means  $\pm$  SD of at least three independent experiments. Values with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.01$ ).



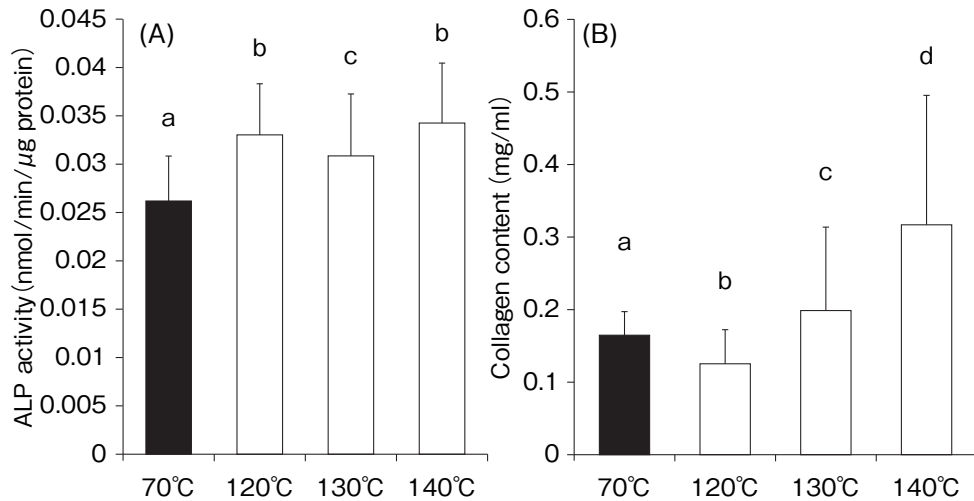


Fig. 2 Effect of peptide fractions from 70°C heated and retorted myofibrillar protein on the ALP(A) and collagen synthesis (B) activity of MC3T3-E1 cells.

Data represent the means  $\pm$  SD of at least five independent experiments.

Values with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

化をみるためにSDS-PAGEを行ったところ、データには示していないが、70°C加熱区で明瞭にみられたミオシンヘビーチェーン (200kDa) とアクチン (42kDa) の染色強度が120°C以上の高温加熱によって著しく低下するとともに、20kDa以下の低分子領域の染色強度が強くなる傾向がみられた。

これらのことより、筋原線維タンパク質の分解は、加熱温度上昇に依存して昂進することが示唆された。

### 3.2 骨芽細胞の分化に及ぼす影響

骨芽細胞の分化指標として石灰化の促進に働くALP活性や骨の構成成分であるコラーゲン量がしばしば用いられる<sup>11, 13)</sup>。これらを指標にレトルト加熱を施した筋原線維の骨芽細胞分化に及ぼす影響について検討した結果をFig.2AとFig.2Bにそれぞれ示した。対照区である70°C加熱区とレトルト加熱区のALP活性値を比較すると、いずれの加熱区も有意 ( $p < 0.05$ ) に高い値を示し、特に120°C加熱区と140°C加熱区が高い値を示した

(Fig.2A)。130°C加熱区も対照区と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に高く、120°C以上の加熱によって生じるペプチドには骨芽細胞のALP活性の促進に作用する可能性が示唆され、その程度は、骨形成にポジティブに作用するとされる $\beta$ -クリプトキサンチン ( $10^{-8} \sim 10^{-6}$  M) に相当する活性値であった<sup>14)</sup>。

一方のコラーゲン量では、対照区である70°C加熱区とレトルト加熱区を比較すると、120°C加熱区で有意 ( $p < 0.01$ ) に低い値を示したものの、130°C以上の加熱区では有意 ( $p < 0.05$ ) に高い値を示した (Fig.2B)。これらのことより、130°C以上の加熱によってコラーゲン合成能の活性化に作用するペプチドが生じたものと推察される。

今後はレトルト加熱によって派生する活性因子の特定を急ぐとともに、低温乳酸発酵の影響についても引き続き検討を続けたい。

本研究成果の一部は、公益財団法人伊藤記念財団の支援によって得られたものであり、ここに深

く感謝申し上げます。また、名城大学農学部食品機能学研究室の学生・院生諸氏に深謝申し上げます。

#### 4. 要 約

食肉の主要タンパク質である筋原線維タンパク質を単純モデル系として用いて、レトルト加熱処理を施すことによる筋原線維タンパク質のタンパク質分解と機能性発現の有無について検討を行った。

筋原線維タンパク質に120~140℃のレトルト加熱処理を施すことによって、遊離アミノ酸ならびにペプチド量が、加熱温度上昇に伴って有意に増加し ( $p < 0.01$ )、超高温加熱によって、筋原線維タンパク質の分解が生じることが示唆された。

培養骨芽細胞の分化に及ぼす影響についても、アルカリホスファターゼ活性、コラーゲン量のいずれも、70℃加熱区と比較して有意に高い値を示し ( $p < 0.05$ )、いずれの指標も140加熱区が最も高い値を示した。

以上のことより、レトルト加熱によって筋原線維タンパク質は分解し、その結果生じた低分子ペプチド群に骨芽細胞の分化を賦活する因子が含ま

れる可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) 芳賀聖一, 林利哉, 大場正春, 坂田亮一: 名城大学総合研究所総合学術研究論文集, 8, 91~96, 2009.
- 2) 芳賀聖一, ミートジャーナル, 36 (1), 107~113, 1999.
- 3) 藤田利宗, 林利哉, 芳賀聖一, 日本食品科学工学会誌, 53 (8), 423~429, 2006.
- 4) Hayashi, T., Toyoda, N., Arakawa, M., Haga, S., *Int. Cong. Meat Sci. Technol.*, 56, E60, 1~4, 2010.
- 5) Hayashi, T., Washio, S., Arakawa, M., Taguchi, M., Toyoda, N., Haga, S., *Int. Cong. Meat Sci. Technol.*, 57, P395, 1~4, 2011.
- 6) Perry, S. V., Grey, T. C., *Biochem. J.*, 64, 184~192, 1956.
- 7) Etlinger, J. D., Zak, R., Fischman D. A., *J. Cell Biol.*, 6, 123~141, 1976.
- 8) 三上正幸, 長尾真理, 関川三男, 三浦弘之, 日本畜産学会報, 66 (7) 630~638, 1994.
- 9) 日本化学会編実験化学講座23, 「生物化学 I」, 丸善, 東京, 124~130, 1964.
- 10) Laemmli, U. K., *Nature*, 227, 680~685, 1970.
- 11) Choi, E. M., *Biochem. Pharmacol.*, 70, 363~368 (2005)
- 12) Hayashi, T., Kato, K., Haga, S., *J. Res. Inst. Meijo Univ.*, 7, 71~80, 2009.
- 13) 芹澤篤, 鳥羽保宏, 月刊フードケミカル, 23 (3), 24~29, 2007.
- 14) Uchiyama, S., Yamaguchi, M., *J. Cell. Biochem.*, 95, 1224~1234, 2005.

# メタボロミクス解析による黒毛和種牛肉の美味しさに 関わる指標の探索

Search for index related to delicious of Japanese Black Cattle Beef Meat  
by metabolomic analysis

鈴木 啓一<sup>1</sup>・飯田 文子<sup>2</sup>・小松 智彦<sup>3</sup>・庄司 則章<sup>3</sup>・加藤 和雄<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東北大学大学院農学研究科, <sup>2</sup>日本女子大学, <sup>3</sup>山形県総合農業センター)

Keiichi Suzuki<sup>1</sup>, Fumiko Iida<sup>2</sup>, Tomohiko Komatsu<sup>3</sup>, Noriaki Shoji<sup>3</sup> and Kazuo Katoh<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, <sup>2</sup>Japan Women's University,

<sup>3</sup>Livestock Experiment Station of Yamagata Integrated Agricultural Research Center)

The panel test and the chemical analysis of Japanese Black Cattle Brand beef were done. In addition, to search for the index related to delicious beef, metabolomics analysis of the beef sample was executed. The multiple regression analysis of which the independent variants were the sugar and amino acid content, and the dependent variate was a desirable taste of the panel test of 35 brand beefs was done and five high beef and five low beef of a desirable taste were chosen by this multiple regression equation. The evaluated high group of desirable taste beef was higher in IMP and Carnosine + Taurin than the low group of desirable taste beef. As a result of metabolomics analysis, the desirable taste low group beef was higher in Octanoylcarnitine, Spermidine, Glutathione (GSSG)\_divalent, Phosphorylcholine and  $\gamma$ -Glu-Cys than high group beef. These results suggested that these compounds be likely to be related to an undesirable taste.

## 1. 目 的

我が国の黒毛和種牛肉は、都道府県や家畜改良センターなどが実施する直接検定、現場後代検定の成績から推定した育種価に基づく種雄牛の選抜とその効率的利用など育種改良技術と飼養管理技術の改善が相まって、枝肉重量はもとより脂肪交雑などの肉質は劇的に向上してきた<sup>1)</sup>。しかし、長期的な視点から、新たな肉質評価基準が模索されており、より付加価値の高い美味しい牛肉の指標づくりが課題となってきている。申請者らは、これまで牛肉について、BMSNo.性を一定とした

場合にモノ不飽和脂肪酸の割合の違いがどの程度食味性に影響を及ぼすかを訓練パネルにより比較検討してきた<sup>2)</sup>。さらに、黒毛和種牛肉6つの銘柄牛肉についてパネルテストと化学成分の分析を行った。その結果、パネルテストの「好ましいうま味」に関しては、銘柄間の差が認められ、さらに、この項目と生肉および焼肉のイノシン酸などATP関連物質、カルノシン、タウリン、アンセリン濃度が有意な正の相関を示し、牛肉の美味しさに関わる指標として重要であることが示唆された<sup>3)</sup>。そこで、本研究では特長のある黒毛和種銘柄牛肉を対象として牛肉サンプルの網羅的メタボ

ロミクス解析を実施し、牛肉の美味しさに関わる指標を探索することを目的とした。

## 2. 方 法

牛肉サンプルは、仙台、山形、岩手、神戸、岐阜県、沖縄県の食肉市場に出荷された銘柄牛肉「仙台牛」、「山形牛」、「前沢牛」、「神戸牛」、「飛騨牛」、「石垣牛プレミアム36ヶ月肥育牛」、「石垣牛プレミアム40ヶ月肥育牛」の肉質等級「A4～5」、「雌」のサーロイン牛肉5頭ずつ、合計35頭分を用いた。

### 2.1 パネルテスト

真空パック冷凍保存した牛肉を2℃の冷蔵庫で24時間かけて解凍した。訓練されたパネルにより、6つの銘柄牛肉の食味テストを行った。パネルテストの方法は、原則として3つの銘柄牛肉を3点比較法により、次に別の3つの銘柄牛肉を同様に3点比較法により、10人のパネルにより銘柄牛肉についてそれぞれ合計5回のテストを行った。パネルテスト項目は、「やわらかさ（はじめの一噛み）」「やわらかさ（咀嚼時）」「線維感」「多汁性」「総合的食感」「良い牛くささ」「悪い牛くささ」「風味の強さ」「好ましいうま味」「総合評価」の10項目である。評価は1から8の段階で数字の大きい方が優れている。

### 2.2 アミノ酸・ジペプチド、糖成分の分析

生肉と同時に、パネルテストと同じ条件で処理した牛肉（焼き肉）からもサンプルを採材した。サーロイン牛肉の一部200～250mgを粉碎してからホモジナイズし、ヘキササン5mLで脱脂してからヘキササンを吸引除去した。その後、アセトニトリル3.5mLを添加し、70%アセトニトリル（5mL）とした。0.45 $\mu$ mのフィルターを通したものを1mLを高速液体クロマトグラフィーで分析した。得られたクロマトグラフィーの各アミノ酸のピーク強度を標準アミノ酸のピーク強度と比較算出した。

### 2.3 糖、ATP関連物質、アミノ酸成分による主成分分析と重回帰分析

35頭の銘柄牛を特徴付けるため、糖成分、ATP関連物質およびアミノ酸等の成分による主成分分析を行った。次に、パネルテストの結果により、特に、「好ましいうま味」の評価項目を従属変量（Y）、アミノ酸、糖およびATP関連物質を独立変量（X）とした重回帰分析を行い、好ましいうま味に関する重回帰分析を行った。得られた重回帰式から得られた好ましいうま味推定値Yの値の高低それぞれ5頭ずつの牛肉を選び出し、メタボロミクス解析用のサンプルとした。

### 2.4 メタボロミクス解析

凍結ロース牛肉の中心部から肉を約50mg採材し速やかに1mlエッペンチューブに入れ、ドライアイスにて-80℃で凍結保存した。凍結保存したサンプルをメタボロミクス解析の業者に送り、CE-TOSMSによるメタボロミクス解析を行った。解析は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジー株式会社に委託した。アミノ酸、有機酸、糖リン酸および核酸を含む候補化合物160ピークについて「好ましいうま味」推定値高低間の有意差検定を行った。さらに、160のピークを用いて主成分分析とパスウェイ解析を行った。

## 3. 結果と考察

はじめに、35頭の銘柄牛肉について、糖成分、ATP関連物質およびアミノ酸等による主成分分析を行った。その結果をFig. 1に示した。第1主成分と第2主成分により銘柄牛が分類されることが明らかとなった。第1主成分と第2主成分の因子負荷量により、第1主成分は、Ser, Met, Thr, Ileなどのアミノ酸の因子負荷量が大きなウエイトを占める。一方、第2主成分はIMP, DNA, HxR, CarTa, AnsなどのATP関連物質やアミノ酸により特徴付けられることが明らかとなった。

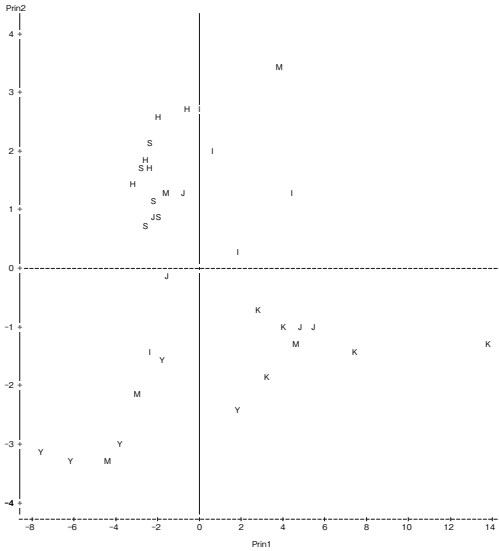


Fig. 1 Plot of principal components (PC) 1 and 2 for each brand beef.

Symbols of Y, M, S, H, K, I, J shows each brand beef.

(Table 1)。特に第2主成分は、ATP関連物質と Carnocine + Taurinにより特徴付けられることから「好ましいうま味」成分を示すことが明らかとなり、銘柄牛により異なることがわかった。

次に、パネルテストの「好ましいうま味」を従属変量、糖成分、アミノ酸、ATP関連物質を独立変量とした重回帰分析の結果、以下の重回帰式が得られた。

$$Y = -3.74136 X_1 - 0.67641 X_2 + 0.08438 X_3 + 6.37086, R^2 = 0.4832$$

ここで、X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>3</sub>はそれぞれイノシトール、K値、Carnocine + Taurinである。

3つの化学成分を上記の式に当てはめて推定されたYの値の高低により、35頭の牛肉から上下5頭ずつ10頭の牛肉を選んだ。選抜した高低10頭の牛肉のパネルテストの「好ましいうま味」、糖成分、ATP関連物質、アミノ酸・ペプチド各成分のうち、有意差のある形質の平均値をTable 2に示した。それらの中で、糖成分ではGlycogen、

Table 1 Summary of the eigenvalues and principal components

| Item        | Prin1 | Item        | Prin2 |
|-------------|-------|-------------|-------|
| Eigenvalue% | 59.4  | Eigenvalue% | 12.6  |
| Ser         | 0.232 | IMP         | 0.431 |
| Met         | 0.231 | DNA         | 0.393 |
| Thr         | 0.230 | HxR         | 0.358 |
| Ile         | 0.230 | CarTa       | 0.346 |
| Phe         | 0.228 | Ans         | 0.307 |
| Val         | 0.228 | Glyco       | 0.202 |
| Tyr         | 0.227 | Pro         | 0.187 |
| Glut        | 0.226 | FruMa       | 0.159 |
| Ala         | 0.220 | Glu         | 0.076 |
| Leu         | 0.217 | Sugar       | 0.073 |
| Lys         | 0.216 | Rib         | 0.050 |
| Sugar       | 0.215 | Ala         | 0.026 |
| His         | 0.214 | His         | 0.014 |
| Trp         | 0.210 | Arg         | 0.013 |

Table 2 Comparison of giucose, amino acids between favorable taste group

|                 | Favorable taste group |      |       |      |
|-----------------|-----------------------|------|-------|------|
|                 | High                  |      | Low   |      |
|                 | Mean                  | sd   | Mean  | sd   |
| Favorable taste | 6.48                  | 0.15 | 6.07  | 0.44 |
| Glycogen        | 2.88                  | 1.32 | 1.45  | 0.88 |
| Ribose          | 0.34                  | 0.12 | 0.22  | 0.03 |
| Gluucose        | 1.10                  | 0.22 | 0.75  | 0.18 |
| Sugar           | 2.48                  | 0.45 | 1.89  | 0.39 |
| IMP             | 1.15                  | 0.22 | 0.24  | 0.15 |
| HxR             | 0.89                  | 0.28 | 0.53  | 0.08 |
| DNA             | 3.44                  | 0.56 | 2.23  | 0.16 |
| Kvalue          | 0.66                  | 0.09 | 0.89  | 0.06 |
| Glu             | 0.61                  | 0.16 | 0.46  | 0.06 |
| Ser             | 0.54                  | 0.16 | 0.36  | 0.04 |
| His             | 0.79                  | 0.14 | 0.57  | 0.16 |
| Thr             | 0.31                  | 0.08 | 0.22  | 0.03 |
| Ala             | 3.02                  | 0.47 | 2.37  | 0.14 |
| Car + Tau       | 12.21                 | 2.06 | 7.91  | 1.67 |
| Ans             | 2.39                  | 0.46 | 1.80  | 0.27 |
| Tyr             | 0.35                  | 0.09 | 0.24  | 0.04 |
| Val             | 0.48                  | 0.11 | 0.36  | 0.08 |
| Met             | 0.25                  | 0.07 | 0.18  | 0.05 |
| Ile             | 0.30                  | 0.07 | 0.22  | 0.05 |
| Amino acides    | 10.88                 | 1.76 | 8.81  | 0.52 |
| CarTauAns       | 14.60                 | 2.20 | 9.71  | 1.86 |
| Amino + Peptide | 25.48                 | 3.69 | 18.52 | 2.34 |

Number of High and Low group was 5.

Free amino acid : nmol/g WW, Sugar : μg/gWW

**Table 3** List of compounds that are significantly different between high and low favorable taste

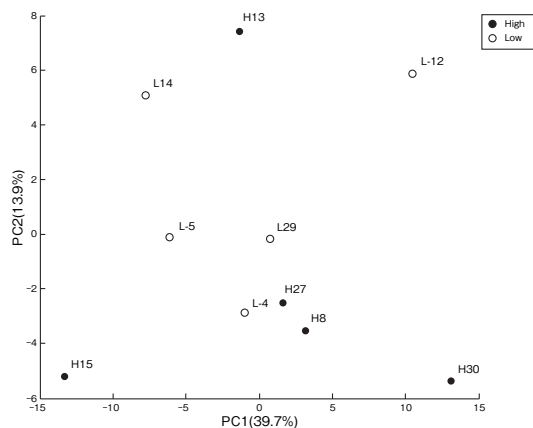
| Compound name              | Relative Area |         |         |         | Comparative Analysis |         |
|----------------------------|---------------|---------|---------|---------|----------------------|---------|
|                            | Low           |         | High    |         | Low vs High          |         |
|                            | Mean          | sd      | Mean    | sd      | Ratio                | p-value |
| Octanoylcarnitine          | 8.0E-04       | 2.5E-04 | 4.2E-04 | 1.6E-04 | 1.9                  | 0.0093  |
| Spermidine                 | 3.1E-03       | 5.5E-04 | 2.3E-03 | 3.4E-04 | 1.3                  | 0.0210  |
| Glutathione(GSSG)_divalent | 1.2E-02       | 1.9E-03 | 7.7E-03 | 3.4E-03 | 1.5                  | 0.0241  |
| XA0033                     | 7.8E-04       | 1.9E-04 | 5.5E-04 | 1.3E-04 | 1.4                  | 0.0278  |
| Phosphorylcholine          | 7.3E-03       | 1.7E-03 | 5.3E-03 | 1.3E-03 | 1.4                  | 0.0321  |
| $\gamma$ -Glu-Cys          | 6.1E-04       | 5.9E-05 | 4.0E-04 | 1.6E-04 | 1.5                  | 0.0408  |
| $\beta$ -Ala-Lys           | 3.7E-03       | 1.3E-03 | 2.3E-03 | 1.2E-03 | 1.6                  | 0.0497  |

ATP関連物質ではIMP, アミノ酸ではCar + Tau について「好ましい味」で高が低よりかなり高い値が示された。

「好ましいうま味」高低の牛肉のメタボロミクス解析の結果, 160の候補化合物のうち統計的に有意な差が検出されたのはTable 3に示した7つの化合物である。このうち, Octanoylcarnitine, Spermidine, Glutathione (GSSG)\_divalent, Phosphorylcholine,  $\gamma$ -Glu-Cysの5つの化合物については, The Human Metabolome Databaseに解説があるが, それらの機能は以下のとおりである。いずれも「好ましいうま味」が低い方が相

対的に高くなっており, これらの化合物が高いことが好ましくない味に関連することが示唆された。

Fig. 2には, 10頭の牛肉に関してメタボロミクス解析候補化合物を対象とした主成分分析の結果を示した。第1主成分について見ると, 高と低のそれぞれ1個体ずつ極端に高い個体と低い値の個体が存在するが, 全体として高も低もばらついていてる。一方, 第2主成分については高の1個体が極端に高い値を示しているが全体としては高が低より低い値となっている。第1主成分の因子負荷量について見ると, Diethanolamine, myo-Inositol 1-phosphate, myo-Inositol 3-phosphate, Cystathionine, Glycerol, Hexanoic acidなどの化学成分の負荷量が高い値となっているが, それらの牛肉の生理学的機能は不明である。しかし, 第2主成分の因子負荷量の高い化学成分を見ると Xanthine, Cytidine, Isoglutamic acid, Theobromine, Glutathione (GSSG)\_divalent, Phosphorylcholine, Spermidineなどメタボロミクス解析の結果, 有意差の認められた5つの化合物のうち, Glutathione (GSSG)\_divalent, Phosphorylcholine, Spermidineが因子負荷量の上にランクされており, また $\gamma$ -Glu-Cysは因子負荷量が低にランクされていた。よって, 第2主成分はこれらの5つの化合物によって特徴付けら



**Fig. 2** Plot of principal components (PC) 1 and 2 of metabolome for high and low favorable taste beef brand.

れる因子と考えられる。

これらの5つの化合物の代謝経路を見ると、Glutathione (GSSG)<sub>divalent</sub>は尿素回路と関連アミノ酸の代謝に関連する。二分子の還元型Glutathioneがジスルフィド結合によってつながった酸化型のGlutathione (GSSG)である。Glutathioneは、細胞内で発生した活性酸素種や、過酸化物質と反応してこれを還元して消去するが、自らは酸化され酸化型Glutathioneとなる。Glutathioneの生理的機能は、生体内の主要な抗酸化成分であるチオールの細胞内での環境を維持することや、さらに、様々な毒物・薬物・伝達物質を細胞外に排出させ細胞を解毒する機能がある。細胞中の還元型グルタチオンと酸化型グルタチオンの比率は、しばしば細胞毒性の評価指標として科学的に用いられる<sup>4)</sup>。従って、酸化型Glutathione (GSSG)が多いことは生体内の状況があまり良くない結果を反映していることになると思われる。

また、Phosphorylcholineはグリシン、セリンとトレオニン代謝経路、グリセロリン脂質代謝経路の中のコリンとシチジン二リン酸コリンの間の中間体の中のコリンの前駆代謝物質であり、脂質代謝とアミノ酸の代謝の経路に関係する物質である。人間の肝腫瘍ではPhosphorylcholine濃度が上昇することが知られている。

さらに、Spermidineはポリアミンに分類される有機化合物で、細胞代謝の際にRNAポリメラーゼの一種である酵素T7 RNAポリメラーゼを活性化するのに利用されることがある。アルギニンから生体アミンのプトレシン、Spermidineが生成される。ポリアミンの生理的機能は多年にわたる研究にも関わらずまだ十分には解明されていない。しかし活発に増殖する組織にはポリアミンが多量に含まれているだけでなく、そのような組織ではポリアミン代謝が活発であり、また、細胞

内レベルも精密に制御されていることから、ポリアミンは細胞増殖およびその制御の過程で重要な役割を果たす物質の一つであると考えられている。

さらに、 $\gamma$ -Glu-Cysは、グルタミン酸とシステインがペプチド結合したGlutathioneの前駆体であり、グルタミン酸-システインリガーゼによってグルタミン酸とシステインから $\gamma$ -グルタミルシステイン合成酵素により $\gamma$ -グルタミルシステインが合成され、さらにGlutathione合成酵素によってグリシンと反応しGlutathioneに変換される。よって、 $\gamma$ -Glu-CysはGlutathione (GSSG)<sub>divalent</sub>と関連する化学物質と言える。ところで、コク味は、甘味、塩味、酸味、苦味、うま味の5基本味では表せない味で、基本味だけではなく、厚み・ひろがり・持続性・まとまりなど基本味の周辺の味をも増強した味と考えられている。このコク味機能を有する物質としてはGlutathioneが知られている。Glutathioneは、3つのアミノ酸から成るペプチドで玉ねぎやニンニクなどに多く含まれる他、食品に広く見られる。これ自身は味を感じさせないものの、他の味の厚さ、持続性、広がりを引き出す効果を持つと言われている。

35頭の銘柄牛肉のパネルテストで好ましい味と関連した化学成分であるIMP、カルノシン+タウリンなどの化学成分と、「好ましいうま味」の高低牛肉のメタボロミクス解析の結果、抽出された化学成分との関連を見ると、いずれも負の相関を示し、これらの中でSpermidineとIMP、SpermidineとCarnocine + Taurinとの間にはそれぞれ $-0.56$  ( $P < 0.10$ )と、 $-0.61$  ( $P < 0.05$ )の負の相関が得られた。従って、ポリアミンの一つであるSpermidineの生理学的機能が何らかの形で好ましい味と関連するIMPやカルノシン+タウリンの量を抑制している可能性が高い。

以上、本研究では、牛肉の規格(肉質等級4以

上) や性を雌に統一した上で、特徴のある全国の銘柄牛肉をサンプルの分析型試食パネルテストを行い、パネルテストで明確な差が認められる牛肉について、メタボロミクス解析を行い、好ましい味に関連する化学成分の探索とそれらを作り出す生体の代謝状態を網羅的に検討して、美味しさに関わる指標を特定することを試みた。その結果、5つのメタボロームが重要な指標として検索された。これらの化学物質の生体内での機能と肉質との関係をさらに調べることで美味しい牛肉生産のための科学的指標を構築する必要があると考える。

#### 4. 要 約

黒毛和種銘柄牛肉について試食パネルテストと化学分析を行い、牛肉の美味しさに関わる指標を探索するため牛肉サンプルの網羅的メタボロミクス解析を実施した。35頭の銘柄牛肉の糖成分、アミノ酸を独立変量とし、パネルテストの好ましい味を従属変量とした重回帰分析を行い、推定した回帰式により好ましい味の牛肉高低5頭ずつを選び、メタボロミクス解析を行った。好ましい味の

高に評価された牛肉が低に評価された牛肉より、IMP, Carnocine + Taurinなどの成分が高いことが明らかとなった。メタボロミクス解析の結果、好ましい味の方の低い方が高い方よりもOctanoylcarnitine, Spermidine, Glutathione (GSSG)\_divalent, Phosphorylcholine,  $\gamma$ -Glu-Cysの5つの化合物が高くこれらの化合物は好ましくない味に関連している可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) 家畜改良センター, 全国域での種雄牛および繁殖雌牛の遺伝的能力の推移について, <http://www.nlbc.go.jp/pdf/data/trend26s.pdf>, 2015.
- 2) 鈴木啓一, 横田祥子, 塩浦宏陽, 島津朋之, 飯田文子: 試食パネルによる黒毛和種牛肉の食味性に及ぼす肉質等級, 性と脂肪酸組成の影響の評価, 日本畜産学会報, **84**, 375~381, 2013.
- 3) 鈴木啓一, 横田祥子, 塩浦宏陽, 飯田文子, 山田信一, 佐久間典弘: 試食パネルによる黒毛和種牛肉の脂肪酸組成, 香气成分, 呈味成分と食味性との関連に関する研究, 公益財団法人伊藤記念財団 平成23年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **30**, 61~67, 2013.
- 4) Pastore, A., Piemonte, F., Locatelli, M., Lo Russo, A., Gaeta, L. M., Tozzi, G., Federici, G.: Determination of blood total, reduced, and oxidized glutathione in pediatric subjects, *Clin., Chem.* **47**, 1467~1469. 2003.



## ミオシンの水溶化現象に関連するミオシン尾部領域の特定

The identification of myosin rod region involved in the solubilization under the low ionic strength condition

早 川 徹

(帯広畜産大学畜産衛生学研究部門)

Toru Hayakawa

(Department of Animal and Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Meat is rich in high quality proteins containing all essential amino acids for human. However, meat has not been utilized as a supplementary protein food to the extent of milk or soybean products due to the low degree of solubility of meat proteins. If meat proteins could be solubilized in a low ionic strength solution or water, meat could be used in various ways, such as a liquid diet. Myosin, one of the major proteins in meat, is also insoluble in low and physiological ionic strength solutions. We already have shown that myosin was solubilized in a low ionic strength solution containing L-histidine and that structural change of rod region of myosin was caused by solubilization. In this study, we tried identifying the detail region of myosin rod involving the solubilization under the low ionic strength condition. Although the surface hydrophobicity of 1700-1755 amino acids residue of myosin heavy chain, located in rod region of myosin, was increased by solubilization, there was no difference in the surface charges between solubilized protein in low ionic strength solution with L-histidine and that in high ionic strength solutions. The 1700-1755 amino acids residue region of myosin rod could not be involved in the solubilization of myosin in a low ionic strength solution containing L-histidine.

### 1. 目 的

食肉は必須アミノ酸を豊富に含む良質なタンパク質供給源であるが、そのタンパク質の大半は水および低塩濃度溶液に対して不溶性を示す。一方、高塩濃度溶液に対しては80%程度の食肉タンパク質が溶解するとされるが、高濃度の塩を含むため食味性などの観点から食品への利用は現実的ではない。もし、食肉タンパク質を水もしくは低

塩濃度溶液に水溶化させることが可能となれば、食肉タンパク質の利用性が拡大するだけでなく、新たな食肉製品の開発も期待できる。

これまでに食肉タンパク質の水溶化を試みた報告がいくつかある。Krishnamurthyらは鶏胸筋を水と低塩濃度溶液（25-150mM）での洗いを繰り返すことで筋原線維タンパク質の90%以上を溶解できたと報告したが<sup>1)</sup>、Itoらはこの方法では筋原線維タンパク質の水溶化を再現できなかつたと

し、超音波処理を加えることで80%以上の溶解度を得ることができたと報告した<sup>2)</sup>。最近では、Takaiらがアルギニンの添加により生理的塩濃度(150-200 mM)におけるミオシンの溶解性を向上させたと報告している<sup>3)</sup>。また、Itoらの報告によると、筋原線維タンパク質の溶解度を向上させるには、ミオシンの抽出率を向上させることが重要であることも示されている<sup>2)</sup>。我々はこれまでに、ミオシンの水もしくは低塩濃度溶液における溶解性について検討したところ、ミオシン単独では超音波処理を施さずともヒスチジンを含む超低塩濃度溶液(1 mM)に対して溶解すること(以下、水溶化)を明らかにした<sup>4)</sup>。

ミオシンは主要な食肉タンパク質の一つであり、2本の重鎖と4本の軽鎖からなる六量体のタンパク質である。生体筋肉組織においては、多数のミオシンが会合し、“太いフィラメント”と呼ばれる重合体として存在している。また、ATPの分解とアクチンとの相互作用を繰り返すことで筋肉を収縮させる機能も有している。ミオシンの“太いフィラメント”の詳細な形成機構は未解明であるが、非筋細胞ミオシンの重合体形成においては、その尾部領域が重要な役割を担っていることが示唆されている<sup>5-8)</sup>。ミオシンの水溶化においても、ミオシン尾部(L-メロミオシン、以下、LMM)の構造変化が関わっていることを明らかにしたが<sup>9)</sup>、詳細な水溶化機構は不明のままである。本研究では、ミオシンの水溶化機構を明らかにすることを目的とし、水溶化現象に関与しているミオシン尾部領域の特定を試みた。

## 2. 方 法

### 2.1 LMMフラグメントの作製

LMMフラグメントの作製には、Profinity eXact™ Protein Purification System (Bio-Rad)を用いた。LMMフラグメントは、鶏骨格筋ミオ

Table 1. List of PCR primers used in this study.

| Primer Sequgnce                               | Restriction enzyme |
|---|--------------------|
| # 759 5'-tttgaattcCTAattgctggcttctctgg-3'     | EcoRI              |
| # 761 5'-tttgaattcCTActtcaggccagctgc-3'       | EcoRI              |
| # 763 5'-tttaattcCTAtctaagaatgttcttgagatc-3'  | EcoRI              |
| # 765 5'-tttgaattcCTActtggtgactgtgactctgc-3'  | EcoRI              |
| # 815 5'-tttaagctttgACAGAGCGCTCGAGAA AAG-3'   | HindIII            |
| # 816 5'-tttaagctttgACTGAAGAGAAGGCCA AGAAG-3' | HindIII            |
| # 817 5'-tttaagctttgGGCAAGAAGCAAATTC AGAAG-3' | HindIII            |
| # 818 5'-tttaagctttgCTCCAGGATCTGGTGG AG-3'    | HindIII            |

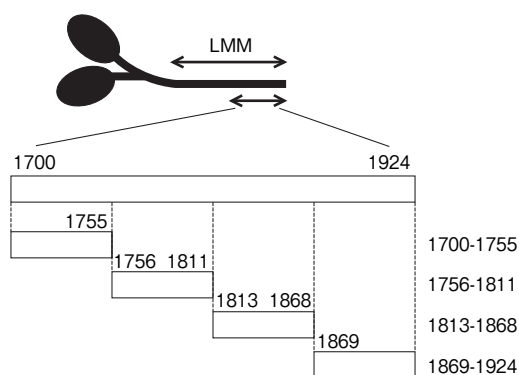


Fig. 1 Diagram of myosin heavy chain constructs. These constructs were expressed in *E. coli*. Construct 1700-1755 was expressed with promoters #759 and #815, 1756-1811 was expressed with primers #761 and #816, 1813-1868 was expressed with primers #763 and #817, and 1869-1924 was expressed with primers #765 and #818. Construct 1700-1755 was only examined in this study.

シン重鎖1 C (NM\_001113709)をもとに、アミノ酸残基1700番目から1924番目までを四分割するように設計した (Table 1, Fig. 1)。精製したLMMフラグメントは、0.6 M KCl, 5 mMリン酸緩衝液, pH 7.2からなる透析外液に対して透析し、これを対照とした。このLMMフラグメントを、1 mM KCl, 5 mMヒスチジンからなる溶液に対して透析し、これを水溶化LMMフラグメントと

した。さらに、ヒスチジン添加の影響を見るために、0.6 M KCl, 5 mMヒスチジンからなる透析外液に対して透析したLMMフラグメントも調製した。

## 2.2 表面疎水性

LMMフラグメントの表面疎水性の測定は、Guerrieriらの方法に従った<sup>10)</sup>。LMMフラグメント溶液200  $\mu$ lに、3.2 mMアニリノナフタレンスホン酸 (ANS) 溶液20  $\mu$ lを加え、よく混ぜた。室温で10分間静置させた後、励起波長380 nm、蛍光波長475 nmにおける蛍光強度を分光蛍光度計 (FP-6200, 日本分光) で測定し、表面疎水性とした。

## 2.3 ネイティブ-PAGE

ネイティブ-PAGEは、4%ポリアクリルアミドゲル (ビス比=29.2:0.8) を濃縮ゲルに、10%ポリアクリルアミドゲル (同ビス比) を分離ゲルに用いた。泳動後のゲルは、0.1%クマシーブリリアントブルー R-250溶液で染色し、5%メタノール-酢酸溶液で脱色した。

## 3. 結果と考察

我々はこれまでにミオシンがヒスチジンを含む超低塩濃度溶液に溶解することを発見し<sup>4)</sup>、水溶化条件下においてミオシンの尾部領域に構造変化が起きていることも明らかにした<sup>9)</sup>。そこで、本研究では、水溶化の際に構造変化が起きている尾部領域を特定し、水溶化現象を明らかにすることを目的とした。まず、構造変化領域の特定のために、ミオシン尾部のC末端250残基領域を分割したような変異タンパク質 (LMMフラグメント) の作製を行った。その結果、1700-1755アミノ酸残基領域を模したLMMフラグメントは発現量も多く、精製することができたが、他のLMMフラグメントは精製に十分な発現量が得られず、以降の実験に供することができなかった。特にもっと

もC末端に近い1869-1894アミノ酸残基領域のLMMフラグメントはまったく発現が確認できなかった。この結果から、以降の実験にはミオシン尾部の1700-1755アミノ酸残基領域を模したLMMフラグメントを用い、研究を進めた。

ミオシン尾部は、ほぼ全域にわたり、二本の $\alpha$ -ヘリックスが絡まるコイルドコイル構造がとられている<sup>11)</sup>。このコイルドコイル構造の形成には、アミノ酸同士の疎水結合が優位であり、よってタンパク質構造内部に配位されるアミノ酸は疎水性アミノ酸であることが多い<sup>12)</sup>。ここでは、LMMフラグメントの水溶化処理による表面疎水性の変化を見ることで、構造変化の指標とした。疎水性を認識する蛍光プローブとしてANSを用い、水溶化条件下でLMMフラグメントと反応させ、励起波長380 nmにおける蛍光波長475 nmでの蛍光強度を測定した。その結果、高塩濃度条件下ではヒスチジンの有無による蛍光強度の差は見られなかったが、水溶化条件下でのLMMフラグメントではより強い蛍光が見られ、水溶化条件下ではLMMフラグメント分子表面の疎水性が増大していることが分かった (Fig. 2)。つまり、このことは、ミオシンの1700-1755アミノ酸残基領域において水溶化により構造変化が生じていることを示唆している。

ミオシンの重合体形成には、尾部領域間の静電的相互作用が大きく関与しているとされている<sup>5, 6)</sup>。ミオシンが水溶化するためには重合体からの解離が必須であり、重合体から解離するためにはタンパク質分子表面の電荷の変化が必要になるだろう。そこで、水溶化したLMMフラグメントの表面電荷の変化をネイティブ-PAGE法により検証した。その結果、水溶化条件下のLMMフラグメントは、高塩濃度下およびヒスチジンを含む高塩濃度下におけるLMMフラグメントと移動度に違いがないことが示され、この尾部領域においては

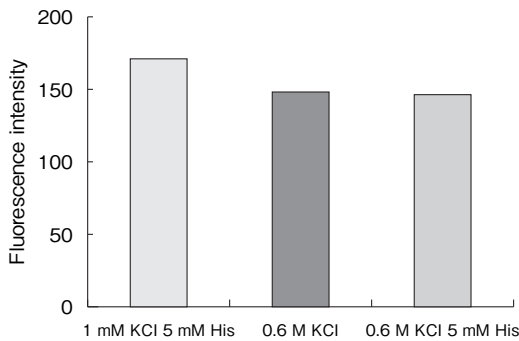


Fig. 2 Surface hydrophobicity of construct 1700-1755 in a low ionic strength solution containing L-histidine. The fluorescence intensity of ANS-construct complex was obtained with a spectrofluorophotometer. Excitation and emission wavelength were 380 nm and 475 nm, respectively.

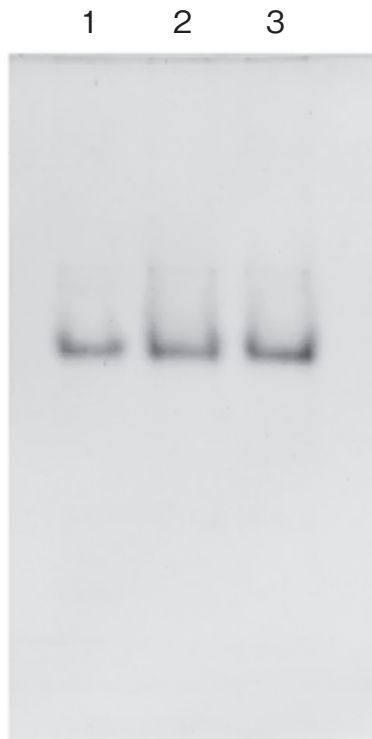


Fig. 3 Native-PAGE pattern of construct 1700-1755 in a low ionic strength solution containing L-histidine. Lane 1 : construct in a solution of 1 mM KCl and 5mM L-histidine; lane 2 : construct in a solution of 0.6M KCl ; lane 3 : construct in a solution of 0.6M KCl and 5mM L-histidine.

水溶化による表面電荷の変化は起きないことが分かった (Fig. 3)。

以上の結果から、ミオシン尾部の1700-1755アミノ酸残基領域において、水溶化条件下では表面疎水性が増大するような構造変化が生じているものの、水溶化に不可欠と考えられる表面電荷の変化は起きておらず、この領域には水溶化に関連する部分は含まれていないことが分かった。ミオシンの重合体形成には、重合反応ドメイン (assembly competence domain, ACD) と呼ばれる領域が必須であるとされており<sup>5)</sup>、この領域もしくは近接する領域について検討することで水溶化の詳細を明らかにすることができるかもしれない。

#### 4. 要 約

本研究では、ミオシンの水溶化現象の解明を目的とし、水溶化に関与しているミオシン尾部領域の特定を試みた。ミオシン尾部の1700-1755アミノ酸残基領域では、水溶化条件下において表面疎水性の増大が見られたものの、表面電荷には変化がなく、この領域は水溶化現象との関連性が低いことが分かった。今後はミオシンの重合体形成に関与されているとされるACD領域 (1876-1904アミノ酸残基領域) における構造変化について、詳細に検討していく。

#### 文 献

- 1) Krishnamurthy, G., Chang, H. S., Hultin, H. O., Feng, Y., Srinivasan, S., Kellar, S. D. : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **44**, 408 ~ 415. 1996.
- 2) Ito, Y., Tatsumi, R., Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A. : *Animal Science Journal*, **74**, 417 ~ 425. 2003.
- 3) Takai, E., Yoshizawa, S., Ejima, D., Arakawa, T., Shiraki, K. : *International Journal of Biological Macromolecules*, **62**, 647~651, 2013.
- 4) Hayakawa, T., Ito, T., Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A. : *Meat Science*, **82**, 151~154, 2009.

- 5) Sohn, R. L., Vikstrom, K. L., Strauss, M., Cohen, C., Szent-Györgyi, A. G., Leinwand, L. A. : *Journal of Molecular Biology*, **266**, 317~330, 1997.
- 6) Nakasawa, T., Takahashi, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Togashi, Y., Saitoh, T., Yamagishi, A., Yazawa, M. : *Biochemistry*, **44**, 174~183, 2005.
- 7) Rosenberg, M., Strausmann, R., Ben-Ya'acov, A., Ronen, D., Ravid, S. : *PLoS ONE*, **3**, e1496, 2008.
- 8) Thompson, R. C., Buvoli, M., Buvoli, A., Leinwand, L. A. : *FEBS Letters*, **586**, 3008~3012, 2012.
- 9) Hayakawa, T., Ito, T., Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A. : *Meat Science*, **84**, 742~746, 2010.
- 10) Guerrieri, N., Alberti, E., LAveli, V., Cerletti, P. : *Cereal Chemistry*, **73**, 368~374, 1996.
- 11) Crick, F. H. C. : *Crystallographica*, **6**, 689 ~ 697, 1953.
- 12) McLachlan, A. D., Stewart, M. : *Journal of Molecular Biology*, **98**, 293~304, 1975.

## 畜産物由来ヘム鉄摂取が発育期スポーツ選手に及ぼす影響 ～食事摂取状況と体組成・気分の変化から～

Influence of heme-iron supplement derived from animal production  
absorption on the athlete of growth phase

坂元美子・吉川 豊

(神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科)

Yoshiko Sakamoto and Yutaka Yoshikawa

(Department of Health, Sports and Nutrition, Kobe Women's University)

Athletes of growth phase need a meal required for physical growth and an increase in the meal for the amount of physical exertion. However, experience of the players about the energy intake or nutrients were very subtly. Moreover, appropriate intake of nutrients such as vitamins and minerals for the athletes of growth phase are not shown in the dietary reference intakes for Japanese. In this study, we checked the meal content, the hemoglobin values in the blood, and body constitution of the athlete of growth phase. And, we confirm the effect of heme-iron supplement derived from animal production on the hemoglobin values in the blood or sensation of weariness obtained from the Profile of Mood States (POMS) test.

### 1. 目 的

発育期におけるスポーツ選手は、身体発育に必要な食事量に加え、トレーニング等による身体活動量の増加に見合った、より多くの食事量を必要とするが、必要なエネルギー摂取量や栄養素の充足に対する選手自身の認識は非常に薄く、日本人の食事摂取基準<sup>1)</sup>にも、ビタミン、ミネラル等の栄養素のスポーツ選手への適切な摂取量は示されていない。

適切な食事と栄養摂取ができていない場合、健全な精神と肉体を育てることが不可能になるばかりではなく、成長障害、疲労骨折、および、鉄欠乏性貧血など様々な障害の要因になる<sup>2)</sup>。特に、激しい運動が原因でおこる貧血はスポーツ貧血と

よばれている。貧血とは単位容積血液中の赤血球数またはヘモグロビン濃度が減少した状態をいい、貧血症状としては、易疲労性や倦怠感、食欲不振、便秘、下痢、無月経、体動時の動悸、皮膚粘膜の蒼白、頭痛、めまい、および、耳鳴りなどがあげられる<sup>2)</sup>。スポーツ選手の貧血は貧血症状と同時に競技能力の低下をもたらすことが問題視されている<sup>2)</sup>。スポーツ貧血が起こる原因として、鉄やタンパク質等の栄養摂取不足、ランニングやジャンプ時の着地などへの衝撃による溶血、激しい運動時の血流亢進による赤血球破壊による赤血球膜構造の可塑性の低下、および、発汗や尿・便などによる損失が報告されている<sup>3)</sup>。通常はヘモグロビン値が正常値（男性では14～18g/dl、女性では12～16g/dl）<sup>4)</sup>であっても、激しい運動など

で急激に赤血球やヘモグロビンが減少し、貧血の症状を呈することもあり<sup>5)</sup>、適切な栄養素の摂取と基礎体力に見合ったトレーニングメニューの作成が必要と考えられている。また、貧血予防や改善を食品中に含まれる鉄分やタンパク質の摂取によって期待できるのは、貧血の状態が軽度であるか、潜在性鉄欠乏状態のときであり<sup>2)</sup>、激しいトレーニングによって急激に貧血の症状を呈した場合には、医薬品の摂取をはじめとする治療を余儀なくされる。そのため、貧血の症状を呈する前に、簡便な検査や調査方法でアセスメントすることが非常に重要である。

そこで、本研究は、持久的能力が必要なスポーツであるサッカー選手の血中ヘモグロビン値と体組成を測定し、消費エネルギーや運動強度に見合った栄養素摂取がなされているかについて、栄養調査と気分プロフィール検査 (Profile of Mood States, POMS) を用いて疲労感を調査し、発育期スポーツ選手の体組成と疲労感との関連を検討し、畜産物由来ヘム鉄を摂取することによる、スポーツ貧血の予防効果に対する影響を検討することを目的とする。

## 2. 方法

調査対象は、京都府の高校サッカー部に所属している男子部員のうち、すべての測定ができた76名とした。対象チームは、全国大会出場経験のある比較的高レベルのチームである。

### 2.1 栄養摂取状況調査

対象者の保護者が、連続した3日間の食事内容を評量法で測定、自記式記入法で調査用紙に記入することで行った。エネルギーおよび栄養素摂取量は栄養計算ソフトエクセル栄養君Ver.6 (健帛社) を用いて算出した。エネルギーおよび栄養素摂取量について、それぞれの基準値として、エネルギーは日本人の食事摂取基準 (2010年版) の対

象者と同年代の男性、身体活動レベル3とし、タンパク質 (P)、脂質 (F)、炭水化物 (C) は基準エネルギー値から  $P:F:C=15:25:60$  のエネルギー比率で算出した。その他の栄養素は、日本人の食事摂取基準 (2010年版) において推奨量が設定されているものは推奨量を、設定されていないもの (カリウム、リン、マンガン、ビタミンD、ビタミンE、ビタミンK) は目安の量とした。

### 2.2 スポーツ貧血調査

非侵襲式血中ヘモグロビン量測定装置、アストリムFIT (シスメックス社製) を用いて血中ヘモグロビン値を測定した。

### 2.3 エネルギー消費量調査

カロリーカウンターHJA-307IT (オムロン社製) を用いて、エネルギー消費量を測定した。

### 2.4 身体計測

身長はSECA213 (SECA社製) を用いて、体組成はボディーコンポジションアナライザーInBody720 (株式会社バイオスペース社製) を用いて測定した。

### 2.5 疲労感調査

気分プロフィール検査 (Profile of Mood States, POMS) を用いて気分尺度を算出した。POMSは、アメリカの精神科医によって開発された気分プロフィール検査であり、65の質問項目から、緊張・抑うつ・怒り・活性・疲労・精神混乱の6つの尺度を測定することができる検査として多方面で用いられている<sup>6)</sup>。

食事調査を行い、食事調査と同日の3日間カロリーカウンターを装着しエネルギー消費量を測定した。また測定と同時に、対象選手の身体計測、ヘモグロビン値測定、POMS心理テストによる疲労感調査を行った。さらに、7月より畜産物由来ヘム鉄3.5mg/日を3ヵ月間摂取させ、3ヵ月後に身体計測、ヘモグロビン値測定、POMS心理テ

ストによる疲労感調査を行った。

統計処理は、ヘモグロビンと体組成の変化についてはt検定を、エネルギー・栄養素摂取量の2群間の比較についてはMann-Whitney U検定を行った。エネルギー・栄養素摂取量の4群間の多重比較についてはTukey-Kramerの方法によって行った。P<0.05を統計的に有意とした。

本研究は、神戸女子大学ヒト倫理審査委員会(承認番号H26-9)の倫理審査承認を受け、対象者とその保護者に対して、説明書を配布し口頭で説明したのち、被験者が20歳未満のため対象者とその保護者、サッカー部の監督に書面により同意を得たうえで行った。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 サプリメントの摂取量別体組成の変化とエネルギー・栄養素摂取量の比較

期間中、遠征などでサプリメントの摂取を忘れていた選手など、毎日摂取できていなかった選手が多くいたため、サプリメントを摂取した日が40日以上であった選手を1群、40日未満であった選手を2群として各群のヘモグロビン値、身体組成の3ヵ月後の変化をTable 1に、エネルギー消費量、エネルギー摂取量、栄養素摂取量のサプリメント摂取前の値をTable 2に示す。1群と2群のサプリメント摂取日数とその人数をTable 3に示す。1群のエネルギー消費量よりもエネルギー摂取量のほうが上回っていた選手を1-a群、下回っていた選手を1-b群、2群のエネルギー消費量よりもエネルギー摂取量のほうが上回っていた選手を2-a群、下回っていた選手を2-b群として、サプリメント摂取前の栄養素摂取量の比較をTable 4に示す。

ヘモグロビン値はどちらの群でも増加しており、1群は有意な増加であった。また、1群は50

人中41名(82.0%)がヘモグロビン値が増加していたが、2群では26人中16人(61.5%)しかヘモグロビン値が増加していなかった。体組成については、どちらの群も体重と体脂肪率が有意に増加し、有意差は見られなかったものの、筋肉量の減少傾向が見られた。特に、2群で筋肉量の減少傾向が大きかった。エネルギー・栄養素摂取量は、ナイアシンが2群において有意に多く摂取していた。タンパク質、炭水化物、カルシウム、マグネシウム、ビタミンA、ビタミンB<sub>2</sub>において2群とも基準値を満たしておらず、脂質と亜鉛について1群で基準値を下回っていた。エネルギー消費量よりもエネルギー摂取量のほうが上回っていた選手は76名中24名(31.6%)であり、エネルギーが充足できていない選手の方が多く結果となった。エネルギーが充足できている選手の方が、ビタミンD、ビタミンEを除くほとんどの栄養素において有意に多く摂取することができていた。

以上の結果から、体脂肪が増加した原因として、除脂肪を構成する材料となるタンパク質、カルシウムの摂取不足と脂質の摂取比率が高いこと、さらに脂質の代謝に補酵素として必要であるビタミンB<sub>2</sub>の不足が推察される。また、エネルギー消費量に見合ったエネルギー摂取ができておらず、特にタンパク質と炭水化物の摂取量が少なかったことから、筋肉量の減少が見られたと推察される。特に2群において筋肉量の減少傾向が大きかったが、脂質のエネルギー比率が多く、2群のみ脂質の摂取量が基準値を上回っていたことが要因であると推察される。

サプリメントを多く摂取していた1群において有意にヘモグロビン値が増加し、増加率も高いことから、ヘモグロビン値の増加に、サプリメント摂取の有効性が示唆された。

発育期スポーツ選手の理想的な体づくりにおいて、特に筋肉量の増加に着目すると、エネルギー



Table 2 The energy consumption, energy intake, and nutritional intake of the target person

|               | Energy consumption (kcal) | Energy intake (kcal) | Protein (g)   | Fat (g)       | Carbohydrate (g) | Potassium (mg) | Calcium (mg)   | Magnesium (mg) | Phosphorus (mg) | Iron (mg)       | Zinc (mg)       | Copper (mg)   |
|---------------|---------------------------|----------------------|---------------|---------------|------------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| group1 (n=50) | 2887 ± 345                | 2740 ± 781           | 102.2 ± 33.2  | 85.8 ± 26.3   | 379.0 ± 127.6    | 3152 ± 1460    | 638 ± 384      | 314 ± 138      | 1439 ± 506      | 10.4 ± 7.1      | 12.7 ± 5.0      | 1.62 ± 0.91   |
| group2 (n=26) | 2949 ± 240                | 2690 ± 631           | 104.1 ± 19.3  | 87.8 ± 24.3   | 360.6 ± 112.3    | 3086 ± 863     | 543 ± 192      | 299 ± 79       | 1443 ± 307      | 9.8 ± 3.0       | 13.2 ± 3.7      | 1.44 ± 0.47   |
| Reference     | 3100                      | 3100                 | 116.2         | 86.1          | 465.0            | 2700           | 800            | 350            | 1200            | 9.5             | 13.0            | 0.90          |
|               | Selenium (mg)             | VitaminA (μg)        | VitaminD (μg) | VitaminE (mg) | VitaminK (μg)    | VitaminB1 (mg) | VitaminB2 (mg) | Niacin (mg)    | VitaminB6 (mg)  | VitaminB12 (μg) | Folic acid (μg) | VitaminC (mg) |
| group1 (n=50) | 89 ± 33                   | 630 ± 935            | 7.5 ± 5.6     | 8.1 ± 4.4     | 289 ± 407        | 1.54 ± 0.63    | 1.63 ± 0.90    | -41.88 ± 15.44 | 1.72 ± 0.84     | 9.4 ± 10.8      | 378 ± 222       | 152 ± 94      |
| group2 (n=26) | 89 ± 19                   | 573 ± 515            | 9.4 ± 6.4     | 8.0 ± 2.5     | 221 ± 138        | 1.60 ± 0.47    | 1.57 ± 0.49    | 45.64 ± 8.23   | 1.79 ± 0.49     | 8.6 ± 7.6       | 348 ± 154       | 133 ± 89      |
| Reference     | 35                        | 900                  | 4.5           | 8.0           | 80               | 1.50           | 1.70           | 16.00          | 1.40            | 2.4             | 240             | 100           |

\* : P &lt; 0.05

Value are represent the mean ± SD.

Table 1 The blood hemoglobin (HGB) concentration and physical situation of the target person

|               | HGB (g/dl)                |            | Height (cm)             |             | Body weight (kg) |      | Intracellular water content (l) |            | Extracellular water content (l) |            |            |    |
|---------------|---------------------------|------------|-------------------------|-------------|------------------|------|---------------------------------|------------|---------------------------------|------------|------------|----|
|               | pre                       | post       | pre                     | post        | pre              | post | pre                             | post       | pre                             | post       |            |    |
| group1 (n=50) | 14.4 ± 1.2                | 15.0 ± 1.3 | **                      | 170.5 ± 5.7 | 170.5 ± 5.7      | NS   | 57.8 ± 9.2                      | 60.1 ± 7.3 | *                               | 24.3 ± 2.6 | 24.4 ± 2.6 | NS |
| group2 (n=26) | 14.4 ± 1.0                | 14.7 ± 1.2 | NS                      | 171.6 ± 6.1 | 171.0 ± 5.6      | NS   | 59.8 ± 7.4                      | 60.7 ± 7.4 | *                               | 24.7 ± 2.6 | 24.9 ± 2.5 | NS |
|               | Skeletal muscle mass (kg) |            | Amount of body fat (kg) |             | BMI              |      | Body fat percentage (%)         |            |                                 |            |            |    |
|               | pre                       | post       | P                       | pre         | post             | P    | pre                             | post       | P                               | pre        | post       | P  |
| group1 (n=50) | 29.5 ± 3.7                | 29.3 ± 3.8 | NS                      | 6.8 ± 5.0   | 8.2 ± 2.9        | *    | 20.0 ± 2.2                      | 20.7 ± 1.7 | *                               | 10.3 ± 3.1 | 12.1 ± 4.0 | ** |
| group2 (n=26) | 30.2 ± 3.4                | 29.2 ± 4.9 | NS                      | 6.4 ± 2.3   | 7.5 ± 2.6        | **   | 20.3 ± 1.7                      | 20.7 ± 1.7 | **                              | 10.4 ± 2.8 | 11.7 ± 2.8 | ** |

\* : P &lt; 0.05, \*\* : P &lt; 0.01, NS : not significant

Values are represent the mean ± SD.

消費量を上回るエネルギー摂取と、タンパク質と炭水化物、脂質の理想的なエネルギー比率を満た

Table 3 The supplement intake days and the number of the people (n=75)

| number of days | number of people |
|----------------|------------------|
| 0              | 1                |
| 3              | 1                |
| 10             | 1                |
| 14             | 1                |
| 20             | 1                |
| 21             | 1                |
| 23             | 1                |
| 24             | 3                |
| 25             | 1                |
| 26             | 2                |
| 27             | 1                |
| 30             | 2                |
| 31             | 1                |
| 32             | 1                |
| 34             | 1                |
| 35             | 2                |
| 36             | 3                |
| 37             | 1                |
| 39             | 1                |
| 43             | 3                |
| 44             | 2                |
| 45             | 3                |
| 46             | 5                |
| 47             | 1                |
| 48             | 2                |
| 49             | 1                |
| 50             | 1                |
| 51             | 3                |
| 52             | 2                |
| 53             | 5                |
| 54             | 1                |
| 55             | 2                |
| 56             | 1                |
| 57             | 1                |
| 58             | 1                |
| 59             | 2                |
| 60             | 1                |
| 61             | 2                |
| 64             | 3                |
| 67             | 1                |
| 68             | 1                |
| 69             | 1                |
| 74             | 1                |
| 76             | 1                |
| 84             | 1                |
| 85             | 1                |
| 87             | 1                |

† : P < 0.10. \* : P < 0.05. \*\* : P < 0.01. Value are represent the mean ± SD.

| Reference       | Selenium (μg) | VitaminA (μg) | VitaminD (μg) | VitaminE (mg) | VitaminK (μg) | VitaminB1 (mg) | VitaminB2 (mg) | Niacin (mg) | VitaminB6 (mg) | VitaminB12 (μg) | Folic acid (μg) | VitaminC (mg) |
|-----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------------|----------------|-------------|----------------|-----------------|-----------------|---------------|
| group1-a (n=15) | 271 ± 312     | 3496 ± 902    | 1324 ± 40.1   | 1073 ± 29.0   | 4933 ± 1530   | 4484 ± 1895    | 929 ± 477      | 434 ± 184   | 1915.2 ± 605.8 | 155 ± 108       | 174 ± 6.2       | 234 ± 1.38    |
| group1-b (n=35) | 2962 ± 334    | 2416 ± 430    | 893 ± 18.7    | 765 ± 19.0    | 3300 ± 747    | 2581 ± 688     | 514 ± 256      | 262 ± 66    | 1234.6 ± 272.7 | 8.2 ± 2.9       | 106 ± 2.6       | 1.31 ± 0.30   |
| group2-a (n=9)  | 2931 ± 230    | 3323 ± 392    | 1225 ± 13.2   | 1048 ± 21.5   | 469.4 ± 101.5 | 3922 ± 636     | 728 ± 57       | 379 ± 59    | 1770.5 ± 161.7 | 119 ± 3.3       | 161 ± 2.8       | 1.91 ± 0.49   |
| group2-b (n=17) | 2852 ± 563    | 2630 ± 759    | 101.5 ± 25.6  | 86.0 ± 26.8   | 355.2 ± 120.7 | 3028 ± 967     | 533 ± 210      | 293 ± 90    | 1408.0 ± 388.5 | 9.6 ± 3.2       | 129 ± 4.1       | 1.42 ± 0.50   |
| Reference       | 3100          | 3100          | 116.2         | 86.1          | 465.0         | 2700           | 800            | 350         | 1200           | 9.5             | 130             | 0.90          |

Table 4 The nutritional intake of the target person

した栄養摂取が必要であると考え。

### 3.2 血中ヘモグロビン値と心理テストによる疲労感の変化

1群の男子スポーツ選手のヘモグロビン正常値の指標である14g/dl以上の選手を1-1群、14g/dl未満の選手を1-2群に、2群のヘモグロビン値が14g/dl以上の選手を2-1群、14g/dl未満の選手を2-2群とし、POMS心理テストの「疲労」を示す気分尺度であるF値の変化を、上昇、低下、変化無しに分けたときの人数の比率をFig. 1に示す。

1-1、2-1群で疲労感が低下した選手がそれぞれ、54%、56%であり、1-2、2-2群で疲労感が低下した選手はそれぞれ22%、30%であった。逆に、1-1、2-1群で疲労感が増加した選手はそれぞれ34%、31%であり、1-2、2-2群で疲労感が増加した選手はそれぞれ44%と70%であった。以上の結果から、ヘモグロビン値が増加すると疲労感が減り、ヘモグロビン値が低下すると疲労感が増加する選手が多く、特に疲労感の上昇に関しては2群でヘモグロビン値との間で顕著な傾向として表れており、血中ヘモグロビン値が疲労感に影響を与えることが示唆された。

POMSは、現在各種スポーツのメンタルヘルスを知るための指標として使用され、トレーニングの強度と怪我やスポーツ障害の発生との関連を見る研究がなされるなど、多くのスポーツ現場で利

用されている<sup>7)</sup>。特にオーバートレーニングの評価としてモニターに汎用されていることから<sup>7)</sup>、発育期スポーツ選手のメンタルヘルスをアセスメントするツールの一つとして利用することができるといえる。本研究の結果からもスポーツ選手の貧血予防のための簡便なアセスメント法として、気分プロフィール検査の疲労度尺度が有効であることが示唆された。

## 4. 要 約

発育期スポーツ選手の理想的な体づくりのために、筋肉量を維持・増加させるためには、消費エネルギー量に見合ったエネルギー摂取はもちろんのこと、エネルギーを充足させるだけでなく、タンパク質と炭水化物の充足を含む、理想的なエネルギー比率の摂取が重要であることが示唆され、そのことが疲労感の軽減にも有効であることも見出した。また、血中ヘモグロビン値の増加に畜産物由来ヘム鉄摂取の有効性が示唆された。

発育期スポーツ選手の貧血の予防のための簡便なアセスメント法として、気分プロフィール検査の疲労感尺度が有効であることも本研究で明らかになった。

## 文 献

- 1) 厚生労働省策定：日本人の食事摂取基準 [2015年版] の概要, [www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou/0000041955.pdf](http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou/0000041955.pdf), 閲覧日2015/4/10
- 2) 樋口満：公認アスレティックトレーナー専門科目テキスト スポーツと栄養, 財団法人日本体育協会, 48~55, 財団法人日本体育協会, 東京, 2009.
- 3) 鯉川なつえ：陸上競技におけるスポーツ貧血の現状と対策, 日本臨床スポーツ医学会誌, **16** (2), 216~220, 2008.
- 4) 坂本静男：貧血, 臨床スポーツ医学, **26** (-), 148~152, 2009.
- 5) 宮崎保：運動と貧血-発育期における運動と貧血とくに鉄欠乏性貧血を中心にして-, 体力科学, **46**, 529~534, 1997.
- 6) 横山和仁, 下光輝一, 野村忍：診断指導に活かすPOMS事例集, **1**, 金子書房, 東京, 2010.
- 7) 横山和仁, 下光輝一, 野村忍：診断指導に活かすPOMS事例集, 29~40, 金子書房, 東京, 2010.

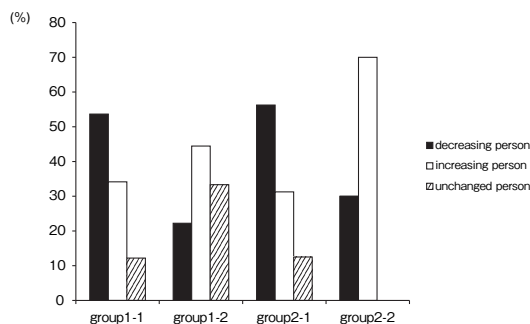


Fig. 1 The change of Fvalue in the target person

## 冠動脈疾患患者における食肉類の摂取と血中アミノ酸・脂肪酸組成，動脈硬化惹起性リポ蛋白および血栓因子との関連に関する研究

Studies on relationship between meat intake level and the composition of blood amino acids, fatty acids, atherogenic lipoproteins and/or thrombotic factors in patients with coronary heart diseases

木庭 新治<sup>1</sup>・横田 裕哉<sup>1</sup>・小林 洋一<sup>1</sup>・高尾 哲也<sup>2</sup>・  
中嶋 克行<sup>3</sup>・高田 明和<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>昭和大学医学部, <sup>2</sup>昭和女子大学, <sup>3</sup>群馬大学, <sup>4</sup>浜松医科大学)

Shinji Koba<sup>1</sup>, Yuuya Yokota<sup>1</sup>, Youichi Kobayashi<sup>1</sup>, Tetsuya Takao<sup>2</sup>,  
Katsuyuki Nakajima<sup>3</sup> and Akikazu Takada<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>Showa University School of Medicine, <sup>2</sup>Showa Women's University,  
<sup>3</sup>Gunma University, <sup>4</sup>Hamamatsu University School of Medicine)

Background: Dietary information immediately before onset of acute coronary syndrome (ACS) remains to be limited. We reported some essential amino acids were changed in patients with ACS and diet might play an important role in metabolic disorder in atherosclerosis last year. The aim of the present study is to compare amino acids and fatty acids between ACS patients and healthy men. In addition, we evaluate how dietary pattern affects amino acid and/or fatty acid compositions.

Methods and Results: The blood samples on admission of ACS in 161 male and 61 female patients were compared with those in 50 age-matched healthy men. Diet immediately before onset of ACS was assessed using self-administered diet history questionnaire (DHQL). Plasma fatty acids were measured using gas-chromatography and plasma amino acids were by Liquid Chromatograph Mass Spectrometer. Compared with control men, both male and female patients with ACS had significantly higher levels of phenylalanine and glutamic acid, and significantly lower levels of essential amino acids, histidine, tryptophan, lysine, glutamine, and arginine, while total protein, total amino acids, LDL-cholesterol, and non-HDL-cholesterol were comparable among the 3 groups. Plasma levels of arachidonic acid, eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) were significantly lower in male patients with ACS. ACS male patients took significantly more dietary fat and carbohydrate despite similar total energy intake compared with the control. Plasma concentration of tryptophan was somewhat negatively related with dietary intake of fat, animal fat, animal protein, and estimated tryptophan levels. Plasma concentration of EPA and DHA significantly correlated with fish, seaweeds, and omega-3 unsaturated fatty acid intake.

Conclusion: These suggest that some amino acids and fatty acids regulate key metabolic pathways, and disturbance of amino acid metabolism may play an important role in onset of ACS. Further studies are required to evaluate in larger number of patients.

## 1. 目 的

動脈硬化を予防・治療する食事として、脂肪制限食、炭水化物制限食、蛋白制限食などが提唱されているが、その意義について、未だ十分には解明されていない。昨年本研究助成により、急性冠症候群（ACS）発症時のアミノ酸組成、脂肪酸組成と動脈硬化惹起性リポ蛋白（マロンデアルデヒド修飾LDL, small dense LDLコレステロール、レムナントリポ蛋白コレステロール）との関連を検討した。ACS患者121人（男性101人）の解析結果では、各指標の基準値と比較し、taurine, aspartic acid, glutamic acid, alanine, cysteine, phenylalanine,  $\beta$ -alanine, ornitine が高値で、asparagine, glutamine, tryptophan, arginine が低値であった。特に糖尿病ではtryptophanがより低値を示した。トリプトファンは魚介類、肉類に多く含まれ、その成因に良質な蛋白の摂取不足の可能性を考えた。今年度は、その結果に関して、さらに患者数を増やして検証し、健康人での結果と比較した。またACS発症前1ヶ月間の食生活を調査し、入院時の血中脂質・アミノ酸分画への影響を評価することを目的とした。

## 2. 方 法

ACSによる入院時に静脈血を採取し、血清と血漿を分離した。血漿中の脂肪酸4分画をガスクロマトグラフィーで、アミノ酸39種類を高速液体クロマトグラフィー質量分析計で測定した。血清レムナント様リポ蛋白コレステロール（RLP-C）は免疫吸着法で、LDLコレステロール（LDL-C）はホモジニアス法で測定した。Non-HDLコレステロール（non-HDL-C）は総コレステロールからHDLコレステロール（HDL-C）を引いて算出した。推算糸球体濾過量（eGFR）は以下の推算式で算出した。eGFR =  $0.741 \times 175 \times \text{Age}^{-0.203} \times \text{血}$

清クレアチニン（Cr）<sup>-1.154</sup> × 1（女性例では0.742）。

食事摂取状況は自記式食事歴法質問票：self-administered diet history questionnaire（DHQL）を使用した<sup>1)</sup>。ACS入院患者に、発症前1ヶ月間の食事内容を想起してもらい、食物摂取頻度調査票に記入した。調査票の解析はDHQサポートセンター（<http://www.ebnjapan.org/>）で実施した。健康男性は、採血前1ヶ月間の食生活を調査した。

健康男性は昭和女子大学で、ボランティアで募集した。既往歴、服薬歴および喫煙歴のない健康男性53人を集めたが、空腹時血糖が126mg/dl以上の糖尿病の疑いの判明した3人を除外した残り50例をコントロール群とした。

統計解析は健康男性（control men）、ACS男性患者（ACS men）、女性患者（ACS women）の3群に分け、群内比較は分散分析（ANOVA）で、群間比較はTucky post hoc testで行った。脂肪酸およびアミノ酸の血中濃度と食事内容との関連は、Spearmanの順位相関で解析した。なお、脂肪酸組成の検討では、採血時に経口脂肪酸製剤服用者は除外した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 臨床背景

ACS患者212人と健康男性50人の背景をTable 1に示す。ACS患者の80%が高血圧、40%が糖尿病を併発し、20%の例で心筋梗塞や冠動脈血行再建術の既往を有していた。ACS男性の8例と女性3例は血液維持透析治療を受けていたが、含めて解析した。ACS男性9例、ACS女性2例は採血時にn-3系多価不飽和脂肪酸薬を服用していた。

### 3.2 脂質組成の比較

主な血液蛋白および脂質濃度の検査結果をTable 2に示す。ACS患者は男女とも血清アルブ

Table 1 Clinical characteristic

|                                       | Control men | ACS men     | ACS women  |
|---------------------------------------|-------------|-------------|------------|
| Number                                | 50          | 161         | 51         |
| Age                                   | 61.7 ± 10.0 | 66.3 ± 13.5 | 77.8 ± 8.5 |
| BMI                                   | 24.6 ± 3.4  | 24.0 ± 4.2  | 21.5 ± 3.5 |
| Hypertension                          | 0           | 101         | 40         |
| Diabetes (Insulin therapy)            | 0           | 40 (6)      | 19 (4)     |
| Prior stroke                          | 0           | 14          | 5          |
| Hemodialysis                          | 0           | 8           | 3          |
| Prior malignancy                      | 0           | 12          | 8          |
| Prior coronary revascularization      | 0           | 29          | 9          |
| Prior myocardial infarction           | 0           | 21          | 5          |
| Smoking Former/Current                | 0/0         | 56/77       | 5/7        |
| Calcium channel blocker               | 0           | 42          | 19         |
| ACE-inhibitor                         | 0           | 7           | 0          |
| Angiotensin receptor II blocker       | 0           | 39          | 22         |
| Beta-blocker                          | 0           | 19          | 3          |
| Anti-platelet agent (Dual)            | 0           | 37 (16)     | 9 (5)      |
| Anti-coagulant agent                  | 0           | 4           | 1          |
| Lipid-lowering agent (EPA or EPA/DHA) | 0           | 42 (9)      | 10 (2)     |

Table 2 Blood chemistry

Data expressed as mean ± SD. The number in parenthesis expresses actual number of measured cases. Non-HDL-C = non-HDL-cholesterol, LDL-C = LDL-cholesterol, HDL-C = HDL-cholesterol, RLP-C = remnant-like lipoprotein-cholesterol, eGFR = estimate of glomerular filtration rate, DHLA = dihomogamma-linolenic acid, AA = arachidonic acid, EPA = eicosapentaenoic acid, DHA = docosahexaenoic acid. #p<0.05, ##p<0.01, ###p<0.001 by ANOVA. \*p<0.05 vs Healthy men by Tukey post hoc test

|                                   | Control men      | ACS men       | ACS women      |
|-----------------------------------|------------------|---------------|----------------|
| Number                            | 50               | 161           | 51             |
| Total protein, g/dl               | 7.3 ± 0.3 (26)   | 7.1 ± 0.7     | 7.1 ± 0.9      |
| Albumine, g/dl###                 | 4.7 ± 0.2 (26)   | 4.1 ± 0.5*    | 3.8 ± 0.6* §   |
| Total bilirubin, mg/dl#           | 0.6 ± 0.3 (26)   | 0.8 ± 0.4     | 0.9 ± 0.5*     |
| BUN, mg/dl#                       | 14.0 ± 2.5 (26)  | 20.5 ± 12.9*  | 23.1 ± 12.2*   |
| Creatinine, mg/dl                 | 0.9 ± 0.1 (26)   | 1.4 ± 1.9     | 1.1 ± 1.3      |
| eGFR, ml/min/1.73m <sup>2</sup> # | 71.0 ± 11.4 (26) | 62.0 ± 24.9   | 55.7 ± 24.0*   |
| Non-HDL-C, mg/dl                  | 148.2 ± 33.4     | 141.9 ± 40.1  | 141.7 ± 42.5   |
| LDL-C, mg/dl                      | 123.4 ± 29.2     | 119.5 ± 36.4  | 117.1 ± 38.0   |
| HDL-C, mg/dl                      | 59.9 ± 14.9      | 44.1 ± 10.5*  | 46.9 ± 12.2*   |
| RLP-C, mg/dl                      | 7.4 ± 9.0        | 5.8 ± 4.6     | 5.2 ± 3.8      |
| DHLA, μg/ml                       | 36.7 ± 10.5      | 38.3 ± 14.0   | 34.8 ± 13.7    |
| AA, μg/ml#                        | 205.8 ± 48.7     | 179.2 ± 49.9* | 182.1 ± 50.1   |
| EPA, μg/ml##                      | 82.7 ± 46.3      | 62.1 ± 44.5*  | 72.7 ± 52.8    |
| DHA, μg/ml###                     | 154.7 ± 52.8     | 121.7 ± 44.9* | 141.8 ± 60.3 § |

**Table 3** Comparison of plasma amino acids between control and ACS

Data are expressed as mean  $\pm$  SD. # $p < 0.05$ . ## $p < 0.01$ . ### $p < 0.001$  by ANOVA.  
\* $p < 0.05$  vs Healthy men by Tukey post hoc test

|                                    | Control men        | ACS men            | ACS women          |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Number                             | 50                 | 161                | 51                 |
| Total amino acids, nmol/ml         | 2872.1 $\pm$ 236.4 | 2895.0 $\pm$ 492.7 | 2895.1 $\pm$ 704.2 |
| Essential amino acids, nmol/ml###  | 984.8 $\pm$ 98.5   | 904.4 $\pm$ 172.8* | 885.9 $\pm$ 220.2* |
| Threonine, nmol/ml                 | 131.0 $\pm$ 26.9   | 176.5 $\pm$ 242.2  | 189.9 $\pm$ 233.0  |
| Valine, nmol/ml                    | 232.3 $\pm$ 32.0   | 218.3 $\pm$ 66.3   | 201.5 $\pm$ 68.1   |
| Methionine, nmol/ml                | 27.5 $\pm$ 4.8     | 26.4 $\pm$ 29.4    | 30.7 $\pm$ 37.4    |
| Isoleucine, nmol/ml                | 67.2 $\pm$ 12.6    | 87.4 $\pm$ 100.7   | 101.0 $\pm$ 161.8  |
| Leucine, nmol/ml                   | 131.6 $\pm$ 18.5   | 153.3 $\pm$ 129.6  | 164.1 $\pm$ 152.3  |
| Phenylalanine, nmol/ml###          | 62.5 $\pm$ 8.8     | 68.5 $\pm$ 18.9    | 76.7 $\pm$ 28.9* § |
| Histidine, nmol/ml###              | 81.5 $\pm$ 8.6     | 72.6 $\pm$ 17.7*   | 72.1 $\pm$ 23.3*   |
| Tryptophan, nmol/ml###             | 59.2 $\pm$ 9.1     | 40.3 $\pm$ 11.2*   | 37.5 $\pm$ 11.7*   |
| Lysine, nmol/ml###                 | 191.9 $\pm$ 26.5   | 162.1 $\pm$ 35.4*  | 164.5 $\pm$ 50.5*  |
| Non-essential amino acids, nmol/ml | 1887.3 $\pm$ 188.3 | 1990.6 $\pm$ 378.4 | 2008.9 $\pm$ 528.6 |
| Aspartic acid, nmol/ml#            | 3.6 $\pm$ 0.7      | 259.5 $\pm$ 838.6  | 403.8 $\pm$ 927.4* |
| Serine, nmol/ml                    | 102.4 $\pm$ 17.0   | 130.7 $\pm$ 104.9  | 137.0 $\pm$ 92.0   |
| Asparagine, nmol/ml##              | 46.0 $\pm$ 6.0     | 38.8 $\pm$ 15.5*   | 36.4 $\pm$ 20.2*   |
| Glutamic acid, nmol/ml###          | 50.8 $\pm$ 17.8    | 104.0 $\pm$ 58.6*  | 91.8 $\pm$ 58.1*   |
| Glutamine, nmol/ml###              | 559.1 $\pm$ 58.5   | 453.1 $\pm$ 169.6* | 453.1 $\pm$ 226.3* |
| Proline, nmol/ml                   | 174.0 $\pm$ 59.3   | 184.0 $\pm$ 95.8   | 157.8 $\pm$ 67.2   |
| Glycine, nmol/ml                   | 203.5 $\pm$ 28.6   | 186.3 $\pm$ 55.6   | 185.3 $\pm$ 71.8   |
| Alanine, nmol/ml                   | 396.3 $\pm$ 82.6   | 405.5 $\pm$ 182.2  | 392.9 $\pm$ 258.6  |
| Cysteine, nmol/ml                  | 22.4 $\pm$ 6.5     | 37.1 $\pm$ 106.3   | 55.3 $\pm$ 159.2   |
| Thyrosine, nmol/ml                 | 67.1 $\pm$ 12.3    | 61.3 $\pm$ 16.7    | 63.9 $\pm$ 25.6    |
| Arginine, nmol/ml###               | 86.5 $\pm$ 20.4    | 47.9 $\pm$ 22.7*   | 47.8 $\pm$ 30.4*   |

ミンが有意に低く、ACS女性で総ビリルビンが有意に高値であった。Non-HDL-C, LDL-Cは同等であったが、ACS患者で非空腹時採血にも関わらず、HDL-CおよびRLP-Cが有意に低値であった。dihomogamma-linolenic acid (DHHA) は同等であったが、arachidonic acid (AA), eicosapentaenoic acid (EPA) と docosahexaenoic acid (DHA) はACS男性で健康男性に比し有意に低値であった。

### 3.3 アミノ酸濃度の比較

血漿アミノ酸濃度の比較をTable 3に示す。

ACS患者では、男女とも、必須アミノ酸濃度、ヒスチジン、トリプトファン、リジンが有意に低値であった。フェニールアラニンはACS女性で有意に高値であった。非必須アミノ酸濃度は同等であったが、ACS患者で男女ともグルタミン酸が有意に高値で、アスパラギン、グルタミン、アルギニンが有意に低値であった。昨年、本研究助成で、グルタミン酸が酸化LDLと正相関を示したことを報告した。グルタミン酸が、脂質異常と酸化ストレスを惹起することが報告されている<sup>2-4)</sup>。今回の検討でも、グルタミン酸が男女ともACS

患者で著明に高値を示した。

### 3.4 食事内容の比較

健康男性50人とACS患者27人でDHQLを実施できたが、食事内容の詳細な解析はACS患者のみ採取できた。食事摂取エネルギー量、蛋白摂取量、脂肪摂取量、炭水化物摂取量の比較結果をTable 4に示す。総エネルギー摂取量は同等であったが、ACS男性患者で脂肪摂取量と炭水化物摂取量が有意に高値であった。

### 3.5 異常値を示したアミノ酸濃度と食事内容との関連

ACS患者で健康男性よりも低値であった必須アミノ酸のヒスチジン、トリプトファン、リジンと有意に高値であったフェニールアラニンと関連する食事内容との関連をTable 5に示す。ヒスチ

ジンは脂肪摂取量および炭水化物摂取量と有意な負相関を、トリプトファン濃度は、脂肪摂取量、動物性油脂、動物性蛋白および推定摂取トリプトファン濃度と有意な負相関を示した。トリプトファンの血中濃度が、脂肪摂取量、動物性油脂、動物性蛋白および推定摂取トリプトファン濃度と有意な負相関を示したことから、その機序として、摂取蛋白の不足よりも、アミノ酸の代謝障害が考えられた。慢性炎症等のストレス下では、トリプトファンからキヌレニンが産生され、セロトニンが枯渇する一方、ネオプテリンなどの炎症惹起性物質の産生が増加する<sup>5)</sup>。トリプトファンは糖代謝や炎症状態において非常に重要なアミノ酸といえる。トリプトファンの代謝異常の解明が必要である。

Table 4 Comparison of dietary pattern between control and ACS.

Mean ± SD. #p<0.05, ##p<0.01 by ANOVA. \*p<0.05 vs Healthy men by Tukey post hoc test

|                           | Control men    | ACS men        | ACS women      |
|---------------------------|----------------|----------------|----------------|
| Number                    | 50             | 22             | 5              |
| Total energy intake, kcal | 2115.3 ± 436.1 | 2054.8 ± 496.6 | 1932.8 ± 852.9 |
| Protein intake, g         | 67.2 ± 27.9    | 66.1 ± 18.7    | 71.8 ± 37.6    |
| Fat intake, g #           | 49.5 ± 21.4    | 66.1 ± 18.7*   | 71.8 ± 37.6    |
| Carbohydrate intake, g ## | 197.6 ± 86.7   | 274.7 ± 86.7*  | 232.9 ± 85.6   |

Table 5 Spearman's correlation between plasma amino acid concentration and dietary intake

|                         | Phenylalanine | Histidine     | Tryptophan    | Lysine      |
|-------------------------|---------------|---------------|---------------|-------------|
| Fat intake (g)          | -0.088 (70)   | -0.349** (70) | -0.263* (63)  | -0.109 (63) |
| Carbohydrate intake (g) | 0.097 (70)    | -0.371** (70) | -0.231 (63)   | -0.163 (63) |
| Animal protein          | -0.376 (20)   | -0.277 (20)   | -0.657* (13)  | 0.132 (13)  |
| Animal fat              | 0.144 (20)    | 0.096 (20)    | -0.713** (13) | 0.032 (13)  |
| Seaweeds                | 0.408 (20)    | 0.450* (20)   | -0.222 (13)   | 0.190 (13)  |
| Diary product           | -0.101 (20)   | -0.080 (20)   | -0.702** (13) | 0.192 (13)  |
| Dietary phenylalanine   | -0.417 (20)   | -0.269 (20)   | -0.627* (13)  | -0.181 (13) |
| Dietary Histidine       | -0.417 (20)   | -0.292 (20)   | -0.484 (13)   | -0.077 (13) |
| Dietary tryptophan      | -0.408 (20)   | -0.278 (20)   | -0.638* (13)  | -0.176 (13) |
| Dietary Lysine          | -0.344 (20)   | -0.245 (20)   | -0.622* (13)  | -0.027 (13) |

The number in parenthesis expresses actual number of measured cases. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001



**Table 6** Spearman's correlation between plasma fatty acid and dietary intake

The number in parenthesis expresses actual number of measured cases. \*p&lt;0.05, \*\*p&lt;0.01, 45\*\*\*p&lt;0.001

|                                      | Plasma AA    | Plasma EPA    | Plasma DHA   |
|--------------------------------------|--------------|---------------|--------------|
| Fat intake (g)                       | 0.276* (77)  | 0.020 (77)    | 0.012 (77)   |
| Total fatty acid intake (g)          | 0.457* (27)  | -0.196 (27)   | -0.100 (27)  |
| Monounsaturated fatty acid (g)       | 0.513** (27) | -0.418 (27)   | -0.067 (27)  |
| Polyunsaturated fatty acid (g)       | 0.446* (27)  | -0.112 (27)   | -0.004 (27)  |
| Polyunsaturated fatty acid (n-3) (g) | 0.223 (27)   | 0.163 (27)    | 0.144 (27)   |
| Polyunsaturated fatty acid (n-6) (g) | 0.487* (27)  | -0.140 (27)   | -0.002 (27)  |
| Plant oil (g)                        | 0.515** (27) | 0.127 (27)    | -0.151 (27)  |
| Seaweed (g)                          | -0.346 (27)  | 0.490** (27)  | 0.555** (27) |
| Fish (g)                             | -0.277 (27)  | 0.543* (27)   | 0.460* (27)  |
| Meat (g)                             | 0.409* (27)  | 0.047 (27)    | 0.001 (27)   |
| Egg (g)                              | 0.436* (27)  | -0.138 (27)   | 0.017 (27)   |
| C18:1 (g)                            | 0.530** (27) | -0.192 (27)   | -0.085 (27)  |
| C18:2 (n-6) (g)                      | 0.499** (27) | -0.138 (27)   | 0.011 (27)   |
| C18:3 (n-3) (g)                      | 0.443* (27)  | -0.092 (27)   | -0.021 (27)  |
| C18:4 (n-3) (g)                      | -0.395* (27) | 0.625*** (27) | 0.412* (27)  |
| C20:2 (n-6) (g)                      | 0.425* (27)  | 0.034 (27)    | 0.054 (27)   |
| C20:4 (n-3) (g)                      | -0.350 (27)  | 0.639*** (27) | 0.423* (27)  |
| C20:5 (n-3) EPA (g)                  | -0.400* (27) | 0.634*** (27) | 0.458* (27)  |
| C22:5 (n-3) (g)                      | -0.214 (27)  | 0.539** (27)  | 0.340 (27)   |
| C22:6 (n-3) DHA (g)                  | -0.252 (27)  | 0.578** (27)  | 0.431* (27)  |
| C24:1 (g)                            | -0.203 (27)  | 0.480* (27)   | 0.292 (27)   |

### 3.6 異常値を示した脂肪酸濃度と食事内容との関連

健康人よりも低値を示したAA, EPAおよびDHAと関連する食事内容を検討し、Table 6に示す。AAは総脂肪酸量、不飽和脂肪酸量、特にn-6系不飽和脂肪酸量と有意な正相関を示した。EPAとDHAは魚介類、海藻類およびn-3系脂肪酸の推定摂取量と有意な正相関を示した。ACS患者で魚介類を主体とした食事が不足している可能性が示唆された。

## 4. 要 約

急性冠症候群 (ACS) 患者と健康男性の食事内容および血中脂肪酸濃度、アミノ酸濃度を比較

した。ACS患者では、総摂取エネルギー量は同等であったが、脂肪および炭水化物摂取量が多かった。

脂肪酸組成では、DHLAは同等であったが、AA, EPAとDHAはACS男性で健康男性に比し有意に低値であった。アミノ酸濃度では、男女ともACS患者で、必須アミノ酸濃度、ヒスチジン、トリプトファン、リジンが有意に低値であった。フェニールアラニンはACS女性で有意に高値であった。非必須アミノ酸濃度は同等であったが、ACS患者で男女ともグルタミン酸が有意に高値で、アスパラギン、グルタミン、アルギニンが有意に低値であった。DHQLの分析により、ヒスチジンは脂肪摂取量および炭水化物摂取量と有意な

負相関を、トリプトファン濃度は、脂肪摂取量、動物性油脂、動物性蛋白および推定摂取トリプトファン濃度と有意な負相関を示した。AAは総脂肪酸量、不飽和脂肪酸量、特にn-6系不飽和脂肪酸量と有意な正相関を示した。EPAとDHAは魚介類、海藻類およびn-3系脂肪酸の推定摂取量と有意な正相関を示した。以上より、ACS患者で魚介類を主体とした食事が不足している可能性が示唆された。

ACS発症前または発症時に、アミノ酸代謝が障害され、動脈硬化惹起性リポ蛋白に影響を及ぼすことが示唆された。食事内容の調査を継続し、さらなる検証が必要である。

## 文 献

- 1) Okubo, H., et al. : Validation of self-reported energy intake by a self-administered diet history questionnaire using the doubly labeled water method in 140 Japanese adults, *Eur J Clin Nutr.*, **62**, 1343~50, 2008.
- 2) Park, C. H., et al. : Glutamate and aspartate impair memory retention and damage hypothalamic neurons in adult mice, *Toxicol Lett.*, **115**, 117 ~ 125, 2000.
- 3) Singh, P., et al. : Prolonged glutamate excitotoxicity : Effects on mitochondrial antioxidants and antioxidant enzymes, *Mol Cell Biochem*, **243**, 139~145, 2003.
- 4) Gobatto, C. A., et al. : The monosodium glutamate (MSG) obese rat as a model for the study of exercise in obesity, *Res Commun Mol Pathol Pharmacol*, **111**, 89~101, 2002.
- 5) Oxenkrug, G., et al. : Kynurenines and vitamin B6: link between diabetes and depression, *J Bioinform Diabetes*, 2013 Sep 14;1 (1) . pii: <http://openaccesspub.org/journals/download.php?file=51-OAP-JBD-IssuePDF.pdf>

## 豚レバーパウダーの脂質代謝に及ぼす分子機能解明

Molecular function analysis of lipid metabolism induced by porcine liver powder

岡本 芳晴

(鳥取大学農学部)

Yoshiharu Okamoto

(Faculty of Agriculture, Tottori University)

We examined effects of degradation product from porcine liver (Liver Hi<sup>®</sup>) on gene expression related to lipid metabolism in HepG2 cells using real time PCR. In addition, we investigated liver function improvement effect of Liver Hi<sup>®</sup> on animals with liver diseases. In gene analysis, it was found that Liver Hi<sup>®</sup> enhanced LDL receptor (LDLR) gene. In half of cases with liver diseases, the levels of liver enzymes in the blood were decreased when Liver Hi<sup>®</sup> was administered. These data suggest that Liver Hi<sup>®</sup> has a potency as a new functional food.

### 1. 目 的

「2011年人間ドック現況（生活習慣病関連項目異常頻度）」によると、肥満や高中性脂肪・高コレステロール血症等の脂質異常症は年々増加傾向にあることが示されている<sup>1)</sup>。中でも内臓脂肪蓄積型の肥満は、メタボリックシンドロームの原因とされており、高血圧、脂質異常症、高血糖等の生活習慣病を引き起こす<sup>2)</sup>。脂質異常症を発症すると動脈硬化の危険性が高まるが、日本人の場合は、心筋梗塞患者の血中コレステロール値はそれほど高くなく、中性脂肪が高値を示す例が多いと言われている。したがって、日本人の場合、中性脂肪値を下げることは、狭心症、心筋梗塞、脳卒中などの動脈硬化性疾患を予防するために非常に重要であると考えられる。

筆者らは、以前に豚レバーパウダーの機能性を調べた結果、特に悪玉と考えられるリポタンパク質の分泌量が濃度依存的に有意に抑制することを明らかにした。このことより、同パウダーは脂質代謝改善効果が期待される有望な機能性食品素材である可能性が高まった。さらに、高脂肪食負荷モデル動物を用いて同パウダーの効果を検証した結果、同パウダーの摂取によってLDLコレステロールの減少、肝臓での脂肪滴減少および空砲変性・脂肪変性の減少が確認された<sup>3)</sup>。

本研究では、「豚レバーパウダー（レバーHi）」の脂質代謝改善効果をより詳細に検討するため、*in vitro*実験下でのHepG2ヒト肝癌細胞の脂質代謝関連遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにて確認し、遺伝子レベルにおける作用機序を検討した。また自然発症肝疾患罹患動物を用いて肝機能

改善効果を調べた。

## 2. 方 法

### 2.1 *in vitro*実験 (発現遺伝子解析)

HepG 2 細胞 ( $2.5 \times 10^5$  個) を12穴マイクロプレートに播種し、2日間10%FCSを含むDEM培地で前培養後、1.0%BSAを含むDMEMのみ (未処理群) および、本培地 (1.0%BSAを含むDMEM) に0.75mMオレイン酸 (オレイン酸群) またはオレイン酸+レバー-Hi (終濃度2.0mg/ml, レバー-Hi群) を添加した培地に交換し、さらに2日間培養を続けた。総RNAはTotal Quick Gene RNA cultured cell kit S (富士フィルム株式会社) を用いて回収し、鋳型cDNA合成はPrime Script RT reagent Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて合成した。

リアルタイムRT-PCRは常法に従って行い、目的遺伝子の発現量は、GAPDHに対する相対発現量で表し、未処理群を100とした ( $n = 3$ )。

### 2.2 自然発症肝疾患動物に対する効果

鳥取大学農学部附属動物医療センターに来院した犬の中で、血液検査の結果、アラニンアミノ基転移酵素 (ALT)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) およびアルカリフォス

ファターゼ (ALP) が高値であった10例を対象とした。10例の内訳はTable 1 に示した。

レバー-Hiを1頭あたり0.5-1.5 g/日を30日間経口投与し、投与前後での数値を比較した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 *in vitro*実験 (遺伝子発現解析)

Table 2 に中性脂肪およびコレステロール合成系遺伝子、ならびにリポタンパク質関連遺伝子の各群における発現量を示した。

中性脂肪合成系遺伝子では、未処理群に比べてオレイン酸群およびレバー-Hi群ではSREBP-1 c およびFASはわずかな増加が見られた。しかしオレイン酸群とレバー-Hi群間に差は見られなかった。

コレステロール合成系遺伝子では、SREBP-2 は未処置群、オレイン酸群およびレバー-Hi群間にほとんど差はなかった。いっぽう、HMG-CoA reductase (HMG-CoA還元酵素阻害遺伝子) については、未処置群とオレイン酸群間でほとんど差はなかったが、レバー-Hi群では、未処置群とオレイン酸群と比べて遺伝子の発現量が約1.7倍になっていた。

リポタンパク質関連遺伝子では、ApoA1,

Table 1 Summary of case

| Case | Breed                | Age (year) | Sex    | Body weight (kg) | Dose (/day) |
|------|----------------------|------------|--------|------------------|-------------|
| 1    | Border Collie        | 12         | Female | 14               | 1.0         |
| 2    | Bernese Mountain Dog | 5          | Male   | 31               | 1.5         |
| 3    | Shih Tzu             | 12         | Male   | 5                | 1.0         |
| 4    | Mix                  | 13         | Female | 12               | 1.0         |
| 5    | Golden Retriever     | 14         | Female | 27               | 1.5         |
| 6    | M. Dachshund         | 13         | Male   | 6                | 1.0         |
| 7    | Papillon             | 9          | Female | 1.5              | 0.5         |
| 8    | Papillon             | 12         | Female | 5                | 1.0         |
| 9    | M. Dachshund         | 11         | Male   | 6                | 1.0         |
| 10   | Pag                  | 11         | Male   | 11               | 1.0         |

ApoB-100およびMTTPに関しては3群間に変化は見られなかった。しかしながら、LDLRではレバーHi群において、未処置群ならびにオレイン酸群と比較して、発現量が約4.4倍増加していた。

生体内におけるコレステロール代謝は、以下のとおりである<sup>4)</sup>。食品中に含まれるコレステロールは、小腸から吸収されて肝臓へ運ばれる。肝臓からはVLDLに結合した形で血中に分泌され、血中でLDLにまで代謝される。その後、LDLは各組織の細胞膜表面に存在するLDL受容体により細胞中に取り込まれて末梢組織へと供給される。また肝臓細胞においてもLDL受容体は存在する。

血中脂質を低下させる薬剤として、スタチンがよく知られている。スタチンは、肝臓でのコレステロール合成に関与しているHMG-CoA還元酵素を阻害することにより血液中のコレステロールを低下させる。また、肝細胞はスタチンにより、LDL受容体の発現やHMG-CoA reductaseの発現が亢進され、コレステロールの合成や回収を促進するが、先と同薬剤作用により、結果的にはコレステロール合成レベルが抑制される。本実験において、レバーHiを添加することにより、HMG-

CoA reductaseの遺伝子やLDLリセプター遺伝子発現の増強が確認された。すなわちレバーHiはスタチン様作用を有していることが判明した。さらに今回の実験から、レバーHiはLDLRの発現を高めることで、末梢組織および肝臓へのLDL回収率を亢進し、血中脂質を改善することが判明した。

### 3.2 自然発症肝疾患動物に対する効果

レバーHi摂取前後での血中ALT, ASTおよびALP濃度をTable 3に示した。その結果、血中ALT値(10例中6例)、AST値(10例中8例)およびALP値(10例中5例)の低下が確認された。筆者らは、これまでに高脂肪食負荷モデル動物を用いたレバーHiの効果について報告しており、レバーHiの摂取することによってLDLコレステロールの減少、肝臓での脂肪滴減少、および空胞変性・脂肪変性の減少を確認している<sup>5)</sup>。今回測定した肝臓の酵素は、肝細胞が損傷を受けたときに放出されたものであるため、今回の結果からレバーHiは肝細胞に直接作用し、細胞を賦活化している可能性が示唆された。

著しく数値の減少が見られた症例6および7について詳細を記述する。いずれも、胆嚢炎・胆泥

Table 2 Expression of each gene

| Gene                       | Un-treated   | oleic acid   | oleic acid + Liver-Hi |
|----------------------------|--------------|--------------|-----------------------|
| Synthesis of triglycerides |              |              |                       |
| SREBP-1c                   | 100.0 ± 5.7  | 139.1 ± 10.1 | 158.0 ± 9.2           |
| FAS                        | 100.0 ± 6.0  | 129.8 ± 9.2  | 135.4 ± 10.3          |
| Synthesis of cholesterol   |              |              |                       |
| SREBP-2                    | 100.0 ± 6.2  | 102.5 ± 12.4 | 118.3 ± 4.5           |
| HMG-CoA reductase          | 100.0 ± 2.8  | 106.5 ± 7.5  | 171.0 ± 8.0           |
| Lipoproteins               |              |              |                       |
| ApoA1                      | 100.0 ± 3.1  | 91.2 ± 9.0   | 100.0 ± 3.1           |
| ApoB-100                   | 100.0 ± 10.0 | 122.9 ± 2.3  | 81.3 ± 5.7            |
| MTTP                       | 100.0 ± 9.7  | 138.7 ± 10.0 | 102.7 ± 4.2           |
| LDLR                       | 100.0 ± 5.5  | 107.0 ± 14.0 | 442.4 ± 13.0          |

SREBP : sterol regulatory element-binding protein, FAS : fatty acid synthase, SCD : stearyl-CoA desaturase, MTTP : microsomal triglyceride transfer protein, LDLR : LDL receptor

Table 3 Result of hematology

| Case | ALT (U/L) |        | AST (U/L) |       | ALP (U/L) |         |
|------|-----------|--------|-----------|-------|-----------|---------|
|      | Pre       | Post   | Pre       | Post  | Pre       | Post    |
| 1    | 230.0     | 261.0  | 80.0      | 113.0 | 1511.0    | 1355.0  |
| 2    | 1925.0    | 2452.0 | 324.0     | 160.0 | 3176.0    | 8345.0  |
| 3    | 907.0     | 933.0  | 82.0      | 58.0  | 540.0     | 938.0   |
| 4    | 533.0     | 648.0  | 42.0      | 65.0  | >3500.0   | >3500.0 |
| 5    | 60.0      | 21.0   | 23.0      | 18.0  | 479.0     | 189.0   |
| 6    | 429.0     | 82.0   | 79.0      | 30.0  | 495.0     | 276.0   |
| 7    | 382.0     | 99.0   | 37.0      | 29.0  | 1552.0    | 862.0   |
| 8    | 106.0     | 90.0   | 32.0      | 28.0  | 225.0     | 249.0   |
| 9    | 132.0     | 29.0   | 33.0      | 23.0  | 557.0     | 160.0   |
| 10   | 200.0     | 84.0   | 34.0      | 27.0  | 937.0     | 1334.0  |

症のために胆嚢摘出を実施した。しかし、術後も数値は改善されなかったため、ウルソデオキシコール酸20mg/kg（1日2回）およびゲルタチオン15mg/kg（1日2回）、ならびにレバーHiを30日間経口投与した。その結果、30日後には顕著な肝酵素値の低下が確認された。

以上、本研究の結果は、実際の肝臓疾患の動物においてもレバーHiが有効な機能性食品となることを示唆している。また投与期間中、食欲減退を含めて明らかな有害事象を認めなかった。

#### 4. 要 約

本研究の結果、遺伝子解析実験においてレバーHiを添加することにより、LDLRの発現が高まる

ことが判明した。また、実際の肝臓疾患を患っている動物に対してレバーHiを投与した結果、約半数において肝酵素の改善が認められた。したがって、レバーHiは有効な機能性食品となることが示唆された。

#### 文 献

- 1) 平成19年国民健康・栄養調査報告, 厚生労働省, 2008.
- 2) 佐藤隆一郎, 日本栄養・食料学会誌, **66**, 279~285, 2013.
- 3) 佐藤隆一郎, 日本栄養・食料学会誌, **56**, 127~133, 2003.
- 4) 福田伊津子, 小土井理恵, 久保麻友子, 岡本隆志, 藤田 剛, 芦田 均, 生物工学会誌, **87**, 129~134.
- 5) 岡本芳晴, 平成25年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 伊藤記念財団, **32**, 57~61, 2014.

## ポークソーセージの「こく」とその寄与因子の解明

Studies on clarification of the compounds involved in “koku attributes”  
of pork sausages

西村 敏英・江草 愛

(日本獣医生命科学大学応用生命科学部食品科学科)

Toshihide Nishimura and Ai Egusa

(Department of Food Science and Technology, Faculty of Applied Life Science, Nippon Veterinary and Life Science University)

In Japan, the term of “koku attributes” as well as taste, aroma and texture, is commonly used to assess palatable foods. Although “koku attributes” has not been defined clearly yet, it is thought to be the sensation through richness (complexity), body, mouthfulness and lingering (persistence) in terms of taste, aroma, and texture of foods.

This research was carried on to clarify the sensory characteristics and the compounds involved in “koku attributes” of pork sausages. Sensory analyses showed that 12 terms such as fatty, umami, salty, roasting, lingering, body, mouthful, deep, strong, complex, spicy and rich tastes in taste factor, 5 terms such as roasting, lingering, mouthful, smoky and spicy aromas in aroma factor, 5 terms such as elasticity, chewy, juiciness, crunchy and firm feel in texture factor were listed as sensory characteristics of pork sausages.

Sixteen micro molar of glutamic acids (Glu) and 3.4  $\mu$  moles of inosine 5'-monophosphate were detected in 1 g of pork sausages. The amount of the former was 25.8 times higher than that of pork meat used as sausage materials. This high level of Glu seemed to be derived from added seasonings and result in the sensations of umami, lingering of taste, body and mouthfulness of flavor. GC/MS analyses for the aroma compounds of sausages has found that meaty, spicy and floral flavor compounds such as Caryophyllene, 2-Furanmethanol, “2 (3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy”, Tetradecanoic acid, “Phenol, 2,6-dimethoxy-4-(2-propenyl)-”, cis-9-Hexadecanoic acid and Octadecanoic acid were detected. These compounds seemed to give complexity in “koku attributes” of pork sausages.

### 1. 目 的

食肉製品のおいしさに関する研究は、その原料となる牛肉、豚肉、鶏肉に関するものが多く、各食肉に含まれる呈味成分や加熱時の香気成分を分析した研究がほとんどである。その中で、おいし

さに寄与する呈味成分に関する研究は多く、グルタミン酸やイノシン酸が主要なうま味成分であることが明らかとなっている。

一方、香気成分に関しては、加熱による香気成分の変化に関する多くのデータが蓄積されているが、各食肉の特徴に寄与する香気成分の特定は、

十分になされていないのが現状である。これまで、和牛肉では、ラクトン類が和牛肉を加熱した時の甘い香りに関わっていることが明らかとなっている<sup>1)</sup>。また、鶏肉の不快臭の原因物質として、2,4-デカジエナールが特定されており、その生成量が増えることにより、おいしさが低下することが知られている。しかし、豚肉を加熱した時の特徴的な香りやそれを原料としたポークソーセージのおいしさに寄与する香気成分は、ほとんど明らかにされていない。また、豚肉を主原料とした食肉製品では、Mottram<sup>2)</sup>やRamarathnamら<sup>3)</sup>の報告により、硝酸アルキル、ベンゾニトリル、4-メチル-2-ペンタノン、2-ブチル-2-オクテナールなどの香気成分が亜硝酸塩を添加した製品から多く検出されることが明らかとなっている。しかし、どの成分が食肉製品のおいしさに関わっているかは、ほとんど研究がなされていない。

申請者らは、これまで食肉のおいしさを解明することを目的とし、食肉を熟成した時の呈味成分の変動ならびにそれにかかわるメカニズムに関する研究<sup>4)</sup>を進めてきた。近年、食肉のおいしさの研究に関して、うま味の役割を明らかにし、うま味物質は食肉のレトロネーサルアロマを増強させる働きがあることを解明した<sup>5)</sup>。また、食べ物の「こく」を定義するため、以下のような概念を提案している。すなわち、食べ物の「こく」には、味、香り、食感が関わっており、より多くの刺激がバランスよく与えられ、それらが広がり、持続することによりもたらされる現象であると提案している。

本申請課題では、この概念に基づいて、ポークソーセージの官能的特徴と「こく」に寄与する成分を解明することを目的に、以下の3つの項目について検討を行った。

(1) 官能評価によるポークソーセージの食味性の解析

- (2) 「こく」発現に寄与する呈味成分の分析 (遊離アミノ酸と核酸関連物質)
- (3) ポークソーセージの香気成分分析

## 2. 方法

### 2.1 官能評価によるポークソーセージの食味性の解析

試験1：官能評価用語表を用いたソーセージを特徴づける言葉の抽出

基本五味について2カ月以上の訓練を受け、濃度識別テストに合格したパネリスト12名を用いて、官能評価試験を実施した<sup>6)</sup>。具体的には、JAS特級クラスのポークソーセージ(以下、「J特」と省略する)254g(12本相当)を1Lの沸騰水浴中で3分間茹でたものを試験に供した。パネリストには、「味・香り・食感」の3項目について、表1に記した「官能評価用語表」(味…85項目、香り…87項目、食感…34項目)を渡し、「J特」を食して当てはまる項目を選択してもらった。

試験2：「対照」を用いたソーセージの食味性の比較

試験1で決定した各官能評価用語について、絶対尺度を付ける前段階として、JAS認定を受けていない比較的安価な価格で市販されている「対照」(「J特」と同じ会社にて製造されたもの、以下、「対照」と省略する)を用い、2点比較を行った。

### 2.2 「こく」発現に寄与する呈味成分の分析 (遊離アミノ酸と核酸関連物質)

ブレンダーで細切した5gの「J特」に対し、20mlの冷Dwを添加後、10,000rpmで1分間、ホモジナイズした。得られたホモジネートを遠心分離(10,000g, 10分間, 4℃)し、上清に終濃度で3%となるようスルホサリチル酸を添加した。除タンパク後の上清をアミノ酸自動分析計(日本電子)に供し、Gluの定量を行った。



表1 官能評価用語集

| 味            | 香り          | テクスチャー |
|--------------|-------------|--------|
| アク           | 青くさい        | しつこい   |
| 味わい深い        | アク          | しつとり   |
| 厚みのある味       | 悪臭          | 渋い     |
| あっさりした味      | 味わい深い香り     | 固い     |
| 後味           | あっさりした香り    | カリカリ   |
| 後をひく         | 油臭さ         | 軽い     |
| 甘味           | 甘い香り        | きめ     |
| 甘酸っぱさ        | 甘酸っぱい香り     | 口当たり   |
| 脂っこい味        | ふくよかな甘い香り   | クリーミー  |
| いやな味         | 後をひく香り      | こりこり   |
| うま味          | アンモニア臭      | さくさく   |
| 熟れた味         | いやな香り       | ザクザク   |
| えぐ味          | 磯・海・塩の香り    | さらさら   |
| 塩味           | 熟れた香り       | ざらざら   |
| 奥の深い味        | おいしそうな香り    | 刺激的な   |
| 奥行きのある味      | 重い香り        | 弾力     |
| 奥深い          | 奥深い         | つるつとした |
| 重い味          | おふくろの香り     | とろける   |
| 辛味           | かすかすい香り     | とろり    |
| 軽い味          | かすかな香り      | なめらか   |
| 気品のある味       | 軽い香り        | ぬめり    |
| 凝縮した味        | きりっとした香り    | ねっとり   |
| 強烈な味         | 気品のある香り     | 喉越し    |
| きりっとした味      | キレのある香り     | 歯ごたえ   |
| キレのある味       | 強烈な香り       | ばさばさ   |
| くせのある味       | 凝縮した香り      | バリバリ   |
| くどい味         | 臭み          | ばりばり   |
| 獣の味          | 薬臭い         | びりっ    |
| 濃い味          | くせのある香り     | ふっくら   |
| 香ばしい味        | 獣臭          | ふわっとした |
| 揚げた味         | 濃い香り        | ふんわり   |
| 心地よい味        | 芳ばしい        | ベタベタ   |
| 快い味          | 香ばしい        | ほくほく   |
| こってりした味      | 揚げた香り       | もったり   |
| ざっぱりとした味     | 心地よい香り      | やわらかい  |
| 爽やかな味        | 快い香り        |        |
| 酸味           | こってりとした香り   |        |
| 刺激的な味        | こんがりした香り    |        |
| しっかりした味      | 魚臭さ         |        |
| しつこい味        | ざっぱりとした香り   |        |
| 渋味           | 爽やかな香り      |        |
| 滋味           | 刺激的な香り      |        |
| シャープな味       | しっかりした香り    |        |
| 重厚な味         | しつこい香り      |        |
| 上品な味         | シャープな香り     |        |
| 新鮮な味         | 重厚な香り       |        |
| すがすがしい味      | 上品な香り       |        |
| すっきりとした味     | 新鮮な香り       |        |
| 繊細な味         | すがすがしい香り    |        |
| 素朴な味         | すっきりした香り    |        |
| だしぼい味        | 繊細な香り       |        |
| 淡泊な味         | 素朴な香り       |        |
| 血の味          | 立ち上がる香り     |        |
| 力強い味         | 淡泊な香り       |        |
| 土・泥の味        | 血生臭い        |        |
| 透明感のある味      | 土・泥臭さ       |        |
| 独特の味         | ツンとくる香り     |        |
| トロリとした味      | 独特の香り       |        |
| 苦味           | 生臭さ         |        |
| 濃厚な味         | 苦い香り        |        |
| バランスが良い味     | 濃厚な香り       |        |
| 引き締まった味      | 醜臭臭         |        |
| ピリッとした味      | 鼻につく香り      |        |
| 広がりのある味      | 華やかな香り      |        |
| 品のよい味        | バランスが良い香り   |        |
| 深みのある味       | 引き締まった香り    |        |
| 複雑な味         | 広がりのある香り    |        |
| ふくよかな味       | 品のよい香り      |        |
| ふくらみのある味     | 深みのある香り     |        |
| フルーティーな味     | 複雑な香り       |        |
| フレッシュな味      | ふくよかな香り     |        |
| 芳醇な味         | ふくらみのある香り   |        |
| ほっとする味       | フルーティーな香り   |        |
| ほどよい味        | フレッシュな香り    |        |
| ほのかな・ほんのりした味 | 芳醇な香り       |        |
| マイルドな味       | ほどよい香り      |        |
| まるやかな味       | ほろ苦い香り      |        |
| 水っぽい味        | ほんのり・ほのかな香り |        |
| みずみずしい味      | マイルドな香り     |        |
| 緑の味          | まるやかな香り     |        |
| むせるような味      | みずみずしい香り    |        |
| 無味           | 緑の香り        |        |
| やさしい味        | むせるような香り    |        |
| 柔らかな味        | 森の香り        |        |
| 豊かな味         | やさしい香り      |        |
| ワイルドな味       | やわらかい香り     |        |
|              | 豊かな香り       |        |
|              | ワイルドな香り     |        |

IMPの分析には、ODSカラム (Pegasil-300 ODS SP100, センシュー科学) を使い、0.05mol/L Triethylamine (pH5.0) を移動相としてアイソクラティック法で分析した。なお、カラム温度は40℃、検出には、260nmの波長を用いた。

### 2.3 ポークソーセージの香気成分分析

細切した5gの「J特」、あるいは「対照」を40ml容のバイアルに入れ、シリカモノリス捕集剤 (Monotrap:GLサイエンス) を封入後、80℃で2時間、揮発性成分を回収した。揮発性成分を捕集したMonotrapは1mlの各溶媒 (アセトン, エタノール, ジエチルエーテル, ヘキサン) で香気成分を脱着し、GC/MS (Agilent 5977A GC/MSD) に供した。カラムには、CP-wax 52CP (varian) を使い、40℃ (5 min) → (10℃/min) → 240℃ (10min) の昇温プログラムで分析を行った。検出器にはFID (260℃) を使用した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 官能評価によるポークソーセージの食味の解析

試験1：官能評価用語表を用いたソーセージを特徴づける言葉の抽出

12名のパネリストの内、3名以上のパネリストが回答した項目について、表2にまとめた。特に、9名以上が選択した言葉には、味 (風味) として「脂っこい、うま味、塩味、香ばしい味」が挙げられ、香りでは、焙煎時に感じられる「香ばしい」などが選択された。また、テクスチャーでは、「弾力、歯ごたえ、ジューシー」が選ばれた。これらは、ソーセージを特徴づける食味であると考えられた。

一方、これら選択された官能評価用語の中には、尺度づけ (絶対評価) が難しいものが含まれていることが課題となった。そこで、続く試験2では、尺度づけの足がかりとして、同一社製のラ

表2 官能評価用語表に基づいて選択されたソーセージを表現する言葉

(人数は、その用語を選択したパネリスト数を表す)

| 味    |   | 香り   |   | テクスチャー                |                                  |
|------|---|------|---|-----------------------|----------------------------------|
| 9人以上 | 脂っこい味<br>うま味<br>塩味<br>香ばしい味                                       | 9人以上 | おいしそうな香り<br>香ばしい  | 9人以上                  | 弾力<br>歯ごたえ<br>ジューシー              |
|      |   | 6~8人 | 後をひく香り<br>肉の香り  | 6~8人                  | ばりばり                             |
| 8人   | 後味<br>しっかりした味   | 5人   | 味わい深い香り<br>油(脂)臭さ<br>広がりのある香り<br>複雑な香り<br>ほどよい香り<br>スモーキー                                       | 5人                    | こりこり                             |
| 7人   | 味わい深い<br>後をひく<br>濃厚な味<br>広がりのある味                                  |      |   | 4人                    | なめらか                             |
|      |   |      |   | 3人                    | 歯切れのよい<br>ふっくら<br>ザクザク<br>プリプリした |
| 6人   | 奥の深い味<br>凝縮した味<br>濃い味<br>上品な味<br>深みのある味                           | 4人   | 奥深い<br>重厚な香り<br>芳醇な香り   | 表3 2点識別法によるソーセージの官能評価 |                                  |
| 5人   | こってりした味<br>力強い味   | 3人   | 凝縮した香り<br>こってりとした香り<br>しっかりした香り<br>立ち上がる香り<br>鼻につく香り<br>バランスが良い香り<br>ワイルドな香り<br>塩漬臭<br>スパイシーな香り |                       |                                  |
|      |   |      |   |                       |                                  |
| 3人   | 厚みのある味<br>奥行きのある味<br>心地よい味<br>さっぱりとした味<br>だしっぽい味<br>芳醇な味<br>ほどよい味 |      |   |                       |                                  |

表3 2点識別法によるソーセージの官能評価

| 評価項目     | 「対照」を選択した人数 | 「J特」を選択した人数 |     |     |
|----------|-------------|-------------|-----|-----|
| 味        | 脂っこい味       | 4           | 11  |     |
|          | うま味         | 1           | 14* |     |
|          | 塩味          | 4           | 11  |     |
|          | 香ばしい味       | 1           | 14* |     |
|          | 持続感         | 0           | 15* |     |
|          | 濃厚な味        | 2           | 13* |     |
|          | 広がりのある味     | 2           | 13* |     |
|          | 深みのある味      | 2           | 13* |     |
|          | 力強い味        | 4           | 11  |     |
|          | 複雑な味        | 1           | 14* |     |
|          | スパイシーな味     | 2           | 13* |     |
|          | 厚みのある味      | 1           | 14* |     |
|          | 香り          | 香ばしい        | 1   | 14* |
|          |             | 後をひく香り      | 3   | 12* |
| 広がりのある香り |             | 3           | 12* |     |
| スモーキー    |             | 3           | 12* |     |
| スパイシーな香り |             | 1           | 14* |     |
| テクスチャー   | 弾力          | 1           | 14* |     |
|          | 歯ごたえ        | 0           | 15* |     |
|          | ジューシー       | 0           | 15* |     |
|          | ばりばり        | 2           | 13* |     |
|          | プリプリした      | 2           | 13* |     |

\* : 「J特」と「対照」で有意差あり。

ゴシック体で示した評価項目が「こく」の発現に必要な感覚を指す。

ソウセージの異なる製品を使って比較を行った。

試験2 : 「対照」を用いたソーセージの食味性の比較

表2に示された用語の中からパネリスト間で言葉のすり合わせを行い、意味が重複する言葉の集約と相対評価による数値化が可能である用語の絞り込みを行った。具体的には、「後味」と「後をひく」は同じ言葉として「持続感」に集約し、「濃い味」を「濃厚な味」にまとめた。さらに、

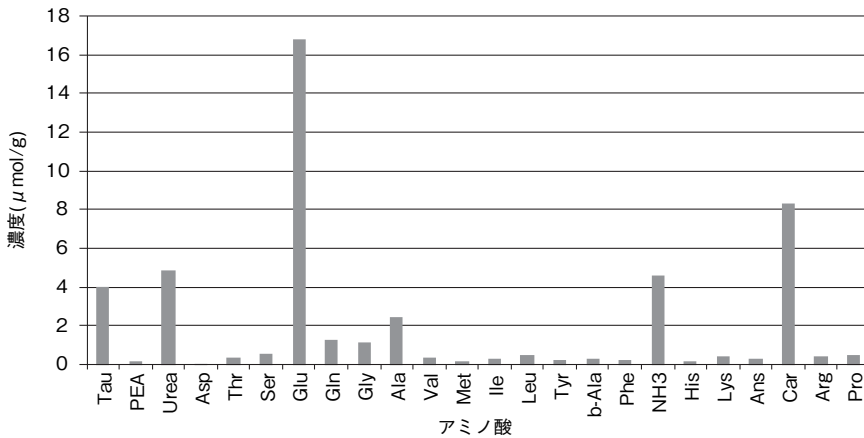


図1 ソーセージに含まれる遊離アミノ酸量

表4 各溶媒の性質

| 無極性 (低沸点) | 無極性 (高沸点) | 極性 (非プロトン) | 極性 (プロトン) |
|-----------|-----------|------------|-----------|
| ジエチルエーテル  | ヘキサン      | アセトン       | エタノール     |

「重厚な味」も「厚みのある味」に集約した。その結果、味を表現する用語としては、「脂っこい味、うま味、塩味、香ばしい味、持続感、濃厚な味、広がりのある味、深みのある味、力強い味、複雑な味、スパイシーな味、厚みのある味」の12項目が、香りを表現する用語としては、「香ばしい、後をひく香り、広がりのある香り、スモーキー、スパイシーな香り」の5項目が、テクスチャーを表現する用語としては、「弾力、歯ごたえ、ジューシー、ぱりぱり、プリプリ」の5項目が選ばれた。なお、この官能評価では、QDA法の手順に則り、試験実施者からは用語決めに関してはパネリストに対し、一切の提案や誘導を行っていないことを申し添える。

選択された上述の用語を用い、「J特」と「対照」を2点評価した結果を、表3に示す。「対照」に比べて、味の項目では、「うま味、香ばしい(風味)、持続感、濃厚、広がり、深み、複雑、厚み」

で有意に強い(数値の横に\*付記)と判断された。さらに、香りやテクスチャーの項目でも「J特」が「対照」よりすべての項目で有意に強いと判断された。著者はこれまでに「こく」を「持続性、濃厚感、広がり」と定義している。今回の評価項目では、表3中のゴシック体文字で示した項目が「こく」の発現に必要な感覚を指しており、ポークソーセージの中にもこれら項目が見出されたことは非常に興味深い。

### 3.2 「こく」の発現に寄与する呈味成分の分析(遊離アミノ酸と核酸関連物質)

「こく」の発現にはうま味物質の存在が大きいと考えられる。そこで、「J特」に含まれる遊離アミノ酸(図1)とイノシン酸含量の測定を行った。図1に示すとおり、グルタミン酸が肉1gあたり16 μmol含まれていた。と畜後6日目の豚筋肉中の遊離グルタミン酸量は0.62 μmol/gと報告されており、ソーセージ中の遊離グルタミン酸含

量は、この25.8倍量含まれていることから、調味料由来であると推定された。

また、イノシン酸量は、肉1gあたり3.4 $\mu$ mol含まれていた。イノシン酸は熱に弱いいため、加工ならびに調理中に分解すると考えられるが、測定された全量が熟成した原料肉のどれくらいに相当するかについては、今後調べべき課題である。

グルタミン酸とイノシン酸は、ともに、うま味を認知できる十分量が含まれており、ソーセージの風味増強を通して、「こく」の発現に寄与していると推察された。うま味物質による「こく」の発現を明らかにするためには、調味料の入っていないソーセージを調製し、官能評価した際に、先の評価項目がどのように変化するか確かめる必要がある。

### 3.3 ポークソーセージの香気成分分析

初めに、香気物質の抽出方法の検討を行った。シリカモノリス担体に捕集された香気成分は化合物により溶媒との親和性が異なる。そこで、今回は、極性の有無ならびに、極性溶媒の場合にはプロトン性の違う4種類の溶媒を使用し、抽出方法を検討した。なお、各溶媒の極性とプロトン性については、表4に示した。

図2と図3に「J特」あるいは「対照」の香気成分を各溶媒で抽出した際の結果を示す。図2（「J特」）および図3（「対照」）ともに、おおむね同様のパターンが得られたが、溶媒ごとに検出強度が異なる化合物も認められた。極性溶媒であるアセトンとエタノールでは、無極性溶媒であるジエチルエーテルとヘキサンに比べ、12.9分の2-Propanone、1-hydroxy-（刺激臭）、14.6分の酢酸（刺激臭）、15.5分のギ酸（刺激臭）、16.3分のCaryophyllene（クローブ精油）、31.9分のNiacinamide、33分のcis-10-Heptadecenoic acidなどが多く検出された。特にエタノールでは、アセトンに比べて、ギ酸と26.5分の2(3H)

-Furanone, dihydro-4-hydroxy-（果物香）が多く検出された。なお、エタノールは溶媒がカラムに保持される時間が長いいため、アセトンで保持時間が10分までに検出される $\beta$ -Pinene（マツ精油）や3-Carene（ローズマリー精油）は、検出されなかった。また、アセトンとヘキサンではセージやローリエを由来とするEucalyptol（10.3分）やクミン由来の $\gamma$ -Terpinene（10.7分）も検出された。

一方、ジエチルエーテルでは、8.2分の $\beta$ -Pinene（マツ精油）、9.4分の3-Carene（ローズマリー精油）、9.8分の $\alpha$ -Phellandrene（ユーカリ精油）、10.4分のD-Limonene（レモン精油）、11.7分のp-Cymene（クミン香気）、15.1分の $\alpha$ -Copaene（木香）、16.5分のCaryophyllene（クローブ精油）などの植物由来の香気成分（アルカン）が検出された。これらの他に、13.4分の1-Hydroxy-2-butanone（コーヒー香）、13.6分のNonanal（フローラル香）、14.7分の3-Furaldehyde（アーモンド香）などの香気成分が複数検出された。

検出総面積で比較すれば、香気成分の抽出量は、アセトン>エタノール>ヘキサン>エーテルの順で多くなり、アセトンではエーテルの3倍以上の化合物が抽出された。しかし、ソーセージには、食肉由来の香気成分だけでなく、香辛料の添加や燻煙工程により、様々な香気物質が添加、生成、付着するため、溶媒を変えて、各化合物量の存在量を調べる必要があると考えられた。

「J特」と「対照」で比較した場合、「J特」における香気成分検出総面積はいずれの溶媒においても、「対照」の1/2しか検出されなかった。しかし、Caryophyllene（クローブ精油；16.5分）や2-Furanmethanol（甘い香；17.4分）、2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy（前述）、Tetradecanoic acid（ミスチリン酸；27.2分）、

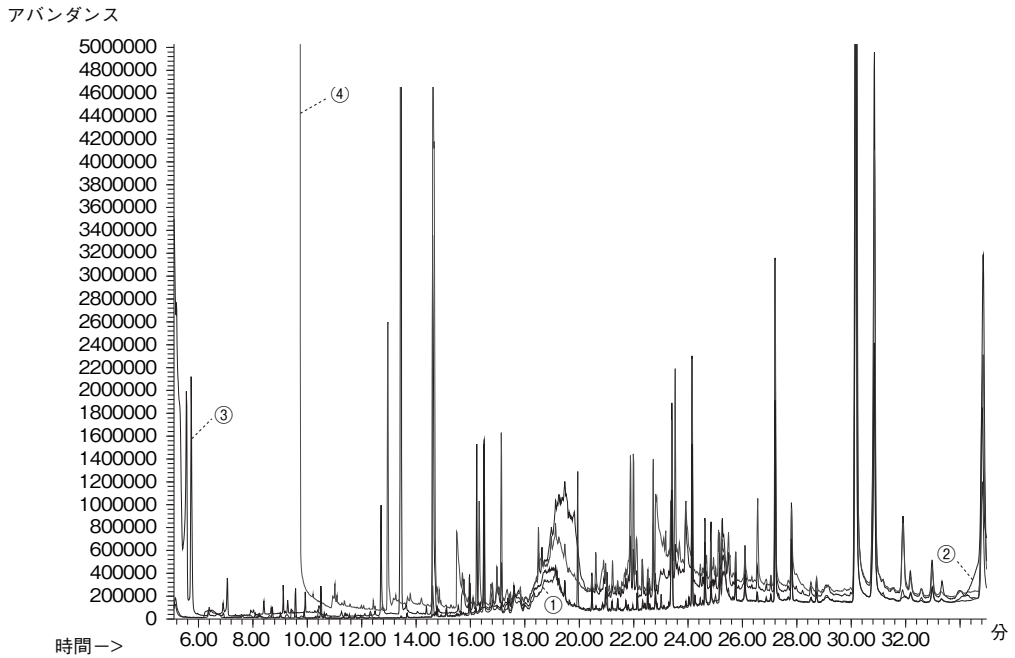


図2 使用溶媒の違いによる「J特」ソーセージの香り成分分析  
 (①：エーテル, ②：ヘキサン, ③：アセトン, ④：エタノール)

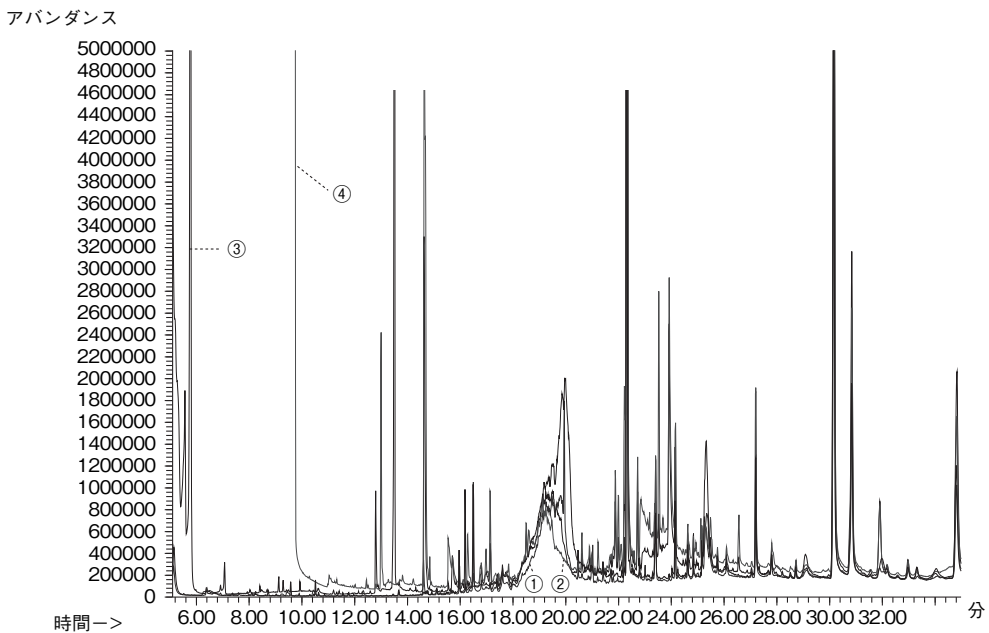


図3 使用溶媒の違いによる「対照」ソーセージの香り成分分析  
 (①：エーテル, ②：ヘキサン, ③：アセトン, ④：エタノール)

Phenol, 2,6-dimethoxy-4-(2-propenyl) - (肉様香; 27.8分), cis-9-Hexadecanoic acid (パルミトリン酸; 30.8分), Octadecanoic acid (ステアリン酸; 34.8分)の検出量は、「対照」のものより2倍以上多かった。今後は、GC-Oによるにおい嗅ぎと検出された化合物の閾値を調べる必要があるが、今回、「J特」からは原料である肉様香気と甘い香気成分が多く検出されたことは、「こく」の発現において、少なからず影響があったと推察された。

#### 4. 要 約

本課題では、ポークソーセージの官能的特徴と「こく」に寄与する成分の解明を試みた。官能評価の結果から、味を表現する用語としては、「脂っこい味, うま味, 塩味, 香ばしい味, 持続感, 濃厚な味, 広がりのある味, 深みのある味, 力強い味, 複雑な味, スパイシーな味, 厚みのある味」の12項目が、香りを表現する用語としては、「香ばしい, 後をひく香り, 広がりのある香り, スモーキー, スパイシーな香り」の5項目が、テクスチャーを表現する用語としては、「弾力, 歯ごたえ, ジューシー, ぱりぱり, プリプリ」の5項目がソーセージを特徴づける用語としてあげられ

た。また、「こく」があると評価されたポークソーセージからは、原料である肉様香気と甘い香気成分が多く検出されており、これら香気成分が「こく」の発現において、少なからず影響していると推察された。さらに、ソーセージ「J特」には、うま味物質が十分に含まれており、この風味増強作用が「こく」付与の1つの要因であると推察された。

#### 文 献

- 1) 右田光史郎, 高濱結花, 高萩康, 杉山尚弥, 菊池圭祐, 松石昌典, 沖谷明紘, 日食工誌, **59**, 127~138, 2012.
- 2) Mottram, D. M. : Organic Nitrates and Nitriles in the Volatiles of Cooked Cured Pork, *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 343~345, 1984.
- 3) Ramarathnam, N., Rubin, L. J., Diosady, L. L. : Studies on meat flavor. 3. A novel method for trapping volatile components from uncured and cured pork, *J. Agric. Food Chem.*, **41** (6), 933~938, 1993.
- 4) Nishimura, T. : Mechanism Involved in the Improvement of Meat Taste during Postmortem Aging, *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, **4** (4), 241~249, 1988.
- 5) 後藤真吾, 江草(雑賀)愛, 高倉友紀子, 西村敏英: 鶏だし中の呈味成分が畜肉だし香気に及ぼす影響, 日本食品科学工学会第60回大会講演集, 143, 2013.
- 6) 古川秀子: おいしさを測る—食品官能検査の実際, 幸書房, 1994.

# 新規機能性脂肪酸，フィタン酸の定量分析法の確立

Establishment of a method for quantitative analysis of a novel functional fatty acid, phytanic acid

河原 聡・仲西 友紀

(宮崎大学農学部)

Satoshi Kawahara and Tomonori Nakanishi

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

This study was carried out to develop a precise and convenient method using gas-liquid chromatography with flame ionized detector for determination of phytanic acid and pristanic acid in lipids from ruminant foods, which are suggested to have physiological functions such as insulin resistance. As a result, it was demonstrated that those fatty acids could be determined by the internal standard method with a gas chromatograph equipped with a capillary column of highly polar liquid phase. However some diastereomer of pristanic acid, i.e., both the *SRR* form and *SRS* form, could not be fully separated with this method. It is reported that each diastereomer of those fatty acids would have different physiological effects. Therefore this method should be improved to precisely determine each diastereomer of those fatty acids.

## 1. 目 的

脂肪の過剰摂取は肥満や動脈硬化など生活習慣病の原因になることから、消費者は食事からの脂肪摂取を控える傾向がある。食肉などに含まれる動物性脂肪は飽和脂肪酸に富み、高脂血症の原因食品になりやすいと一般に考えられている。また、食肉等の食味性は、それらに含有される脂質の含有量と正相関していることから、食味性に優れた食肉類の摂取はヒトの健康に害悪を及ぼす原因になると見なされがちである。加えて、牛肉など反芻動物に由来する食肉脂肪に比較的多く含有されるトランス脂肪酸についての近年の規制も、消費者への動物性脂肪の印象を悪化させたものと

推測される。そのような背景の中、近年、新規な機能性脂肪酸の候補として、反芻動物に由来する動物性脂肪中に含有されるフィタン酸 (phytanic acid, 3,7,11,15-tetramethylhexadecanoic acid) が注目されている<sup>1)</sup>。

フィタン酸は分岐鎖脂肪酸の1種であり、クロロフィルの構成要素であるフィトールの水素付加反応およびカルボン酸への酸化反応により生成すると考えられている (Fig. 1)。フィタン酸の生成については未だ未知の部分が多いものの、反芻動物第一胃 (ルーメン) 中の微生物が関与すると推測されている<sup>2)</sup>。近年、分子生物学的手法により、フィタン酸がヒトなどのペルオキシソーム増殖剤応答性受容体 (PPAR) の外因性リガンドと

なることが示され、高脂血症の改善や筋肉組織などにおけるインスリン抵抗性の改善などの生体調節機能を発揮することが期待されている<sup>3)</sup>。

これまでに報告されたフィタン酸の定量分析法はガスクロマトグラフ質量分析装置 (GC/MS) によるものが大半である<sup>4-6)</sup>が、分析装置が高額であるため、必ずしも普及率は高くない。また、質量分析法は既知物質の同定や未知物質の構造決定には有力なツールであるが、一般に定量性が低く、食品のルーチン分析法としては課題を持つ。そこで本研究では、より簡便かつ企業を含めた多くの試験研究施設に設置されている水素イオン化炎検出によるフィタン酸のガスクロマトグラフ分析 (GC/FID) による分析定量法の確立を試み

た。また、本研究では、フィタン酸の $\alpha$ 酸化代謝物であるプリスタン酸 (pristanic acid, 2,6,10,14-tetramethylpentadecanoic acid) の定量法についても併せて検討した。

## 2 材料および方法

### 2.1 試薬

フィタン酸、プリスタン酸およびそれらのメチルエステル標品、内部標準物質として用いたトリコサン酸 (C23:0) はすべてSigma社製のものをを用いた。定性・分離確認に用いた脂肪酸メチルエステル混合物はスペルコ37種FAMEミックス (スペルコ社製) をを用いた。

### 2.2 装置および条件

ガスクロマトグラフ装置はオートインジェクターを装着した島津製作所製GC-2010を用い、検出器は水素炎イオン化検出器 (FID) をを用いた。キャピラリーカラムはポリエチレン液相のSupelcowax<sup>®</sup>10 (0.32mm I.D.×60m, 膜厚0.25 $\mu$ m, スペルコ社製) あるいは90%シアノプロピロピルポリシルフェニレン-シロキサン液相のBPX90 (0.25mm I.D.×100m, 膜厚0.25 $\mu$ m, SGE Analytical Science社製) を使用し、それぞれを用いた場合のフィタン酸およびプリスタン酸の分離度合を比較した。クロマトグラフへの試料導入量は1.0 $\mu$ L, スプリット比を100:1とするスプリット注入法により行った。カラム温度は、Supelcowaxの場合、160 $^{\circ}$ C, 8分間保持後、220 $^{\circ}$ Cまで2 $^{\circ}$ C/分で昇温させ、その後45分間保持した。一方、BPX90の場合には、140 $^{\circ}$ C, 70分間保持後、220 $^{\circ}$ Cまで2 $^{\circ}$ C/分で昇温させ、5分間保持した。注入部および検出部温度はそれぞれ250 $^{\circ}$ Cおよび260 $^{\circ}$ Cとした。キャリアーガスにはヘリウムを用い、線速度20cm/minの流速で分析を行った。

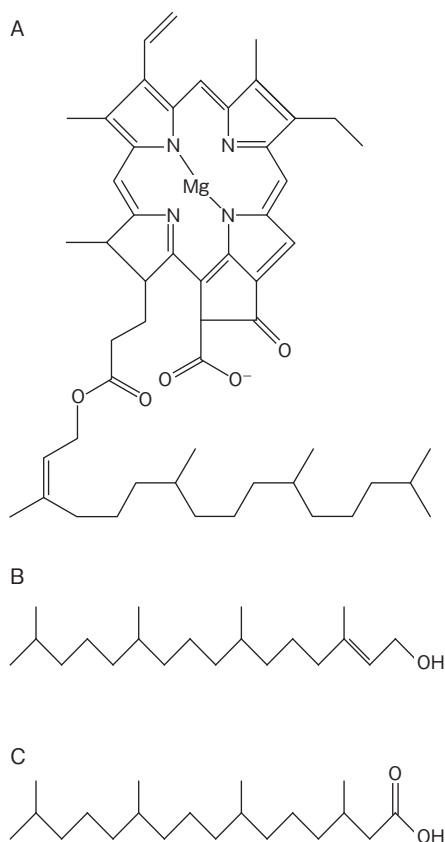


Fig.1 Structures of chlorophyll (A), phytol (B) and phytanic acid (C).



### 2.3 脂肪酸含量測定

鶏肉脂質の抽出はFolchらの方法<sup>7)</sup>に準じて行った。脂肪酸メチルエステル (FAME) の調製はTakenoyamaらの方法<sup>8)</sup>に準じて行ない、得られたFAMEを、ケイ酸カラム (Precep-C<sup>®</sup> Silica gel, 和光純薬社製) を用いた固相抽出により精製した後, GC分析に供した。フィタン酸およびプリスタン酸の定量は内部標準法により, 以下の計算式にて定量計算を行った。

〈計算式〉

$$\text{脂肪酸含量 (mg/100 g)} = A \times C / B / D \times 100$$

ただし,

A : 各脂肪酸のピーク面積

B : トリコサン酸メチルエステルのピーク面積

C : 内部標準物質添加量 (mg)

D : 試料採取量 (g)

E : フラクションAのスパイク脂肪酸メチルエステルのピーク面積

F : フラクションB以降のスパイク脂肪酸メチルエステルのピーク面積

### 3 結果と考察

#### 3.1 分析用GCカラムの検討

FAMEの分離に一般的に用いられている中極

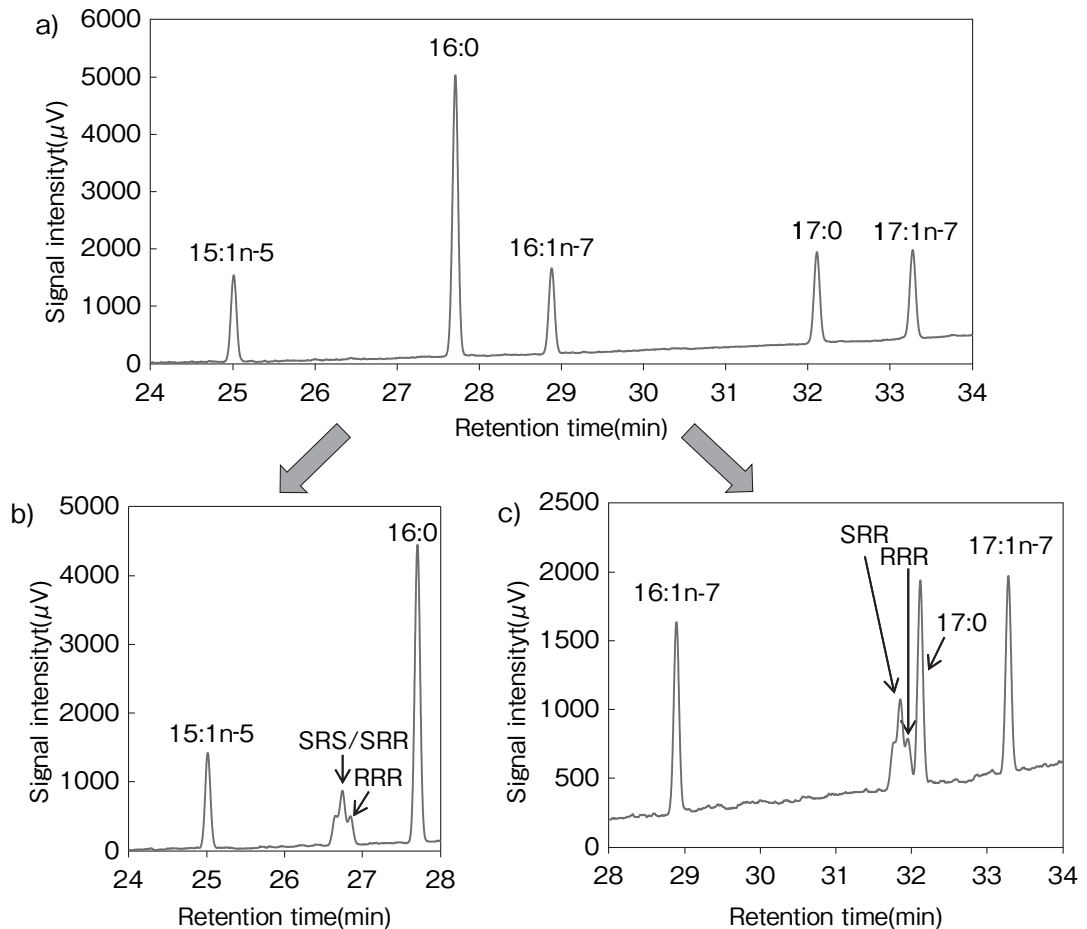


Fig.2 Elution profile of a commercial FAME mixture (a) and that containing methyl esters of pristanic acid (b) and phytanic acid (c) by a polar column (Supelcowax<sup>®</sup>10).

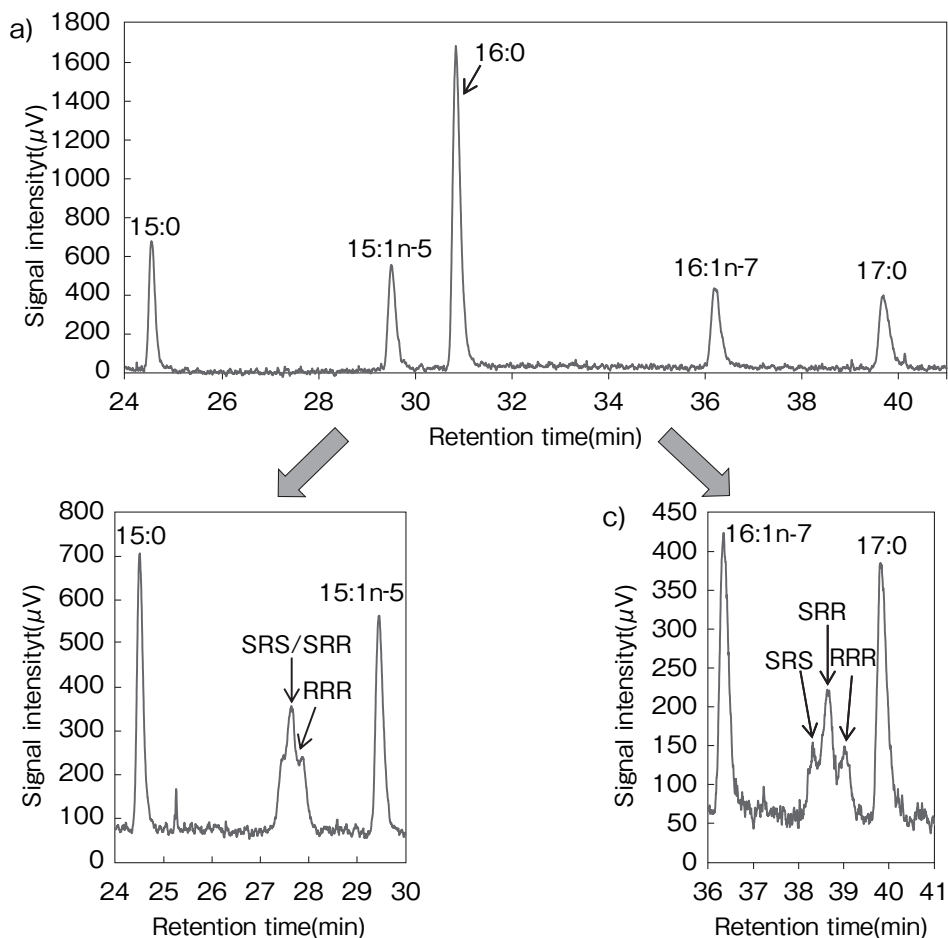


Fig.3 Elution profile of a commercial FAME mixture (a) and that containing methyl esters of pristanic acid (b) and phytanic acid (c) by a highly polar column (BPX90).

性カラム (Supelcowax<sup>®</sup>10) および液相に90%シアノプロピルポリシルフェニレン-シロキサン液相を修飾した強極性カラム (BPX90) を用いて、フィタン酸あるいはプリスタン酸を添加した市販FAME混合物を分析した結果をFig. 2およびFig. 3に示す。いずれのカラムを用いた場合も、両FAMEの分離が可能であったが、中極性カラムではフィタン酸のピークが17:0と完全に分離することができなかった。フィタン酸やプリスタン酸が比較的多く含有される反芻動物由来の脂肪には、奇数の炭素を持つ飽和脂肪酸が少なからず含有されている。そのため、フィタン酸の定量分

析を行う場合には、本研究で使用したものと同等あるいはそれ以上の強極性液相を使用したキャピラリーカラムを用いることが望ましいと考えられた。

フィタン酸およびプリスタン酸はキラル中心を3カ所持ち、SRS、SRRおよびRRRのジアステレオマーが存在する (Fig. 1)。各脂肪酸のジアステレオマーの分離に関しては、フィタン酸については強極性カラムで3種を分離することができたが、プリスタン酸についてはSRS体とSRR体の分離は困難であった。この点については、天然の脂質にはSRR体とRRR体のみが検出されること

が知られており<sup>9)</sup>、食品の分析を行ううえで、事実上の問題は生じないと考えられた。しかしながら、これら立体異性体間では脂肪酸の生理作用が異なることが示唆されていること<sup>9)</sup>から、食品の栄養機能を考察するに当たり、立体異性体の分離定量が必用になることが予測される。今後、より最適化した分離条件を確立する必用があると考えられた。

### 3.2 内部標準法によるフィタン酸，プリスタン酸の定量

内部標準法による食品中のフィタン酸およびプリスタン酸の定量性を確認するため、内部標準物質としてトリコサン酸（C23：0）を用い、種々の脂肪酸量比とピーク面積比を比較検討した。既知量の遊離フィタン酸あるいは遊離プリスタン酸標品とトリコサン酸（C23：0）の混合試料をメチルエステル化し、強極性カラムを用いたGC分

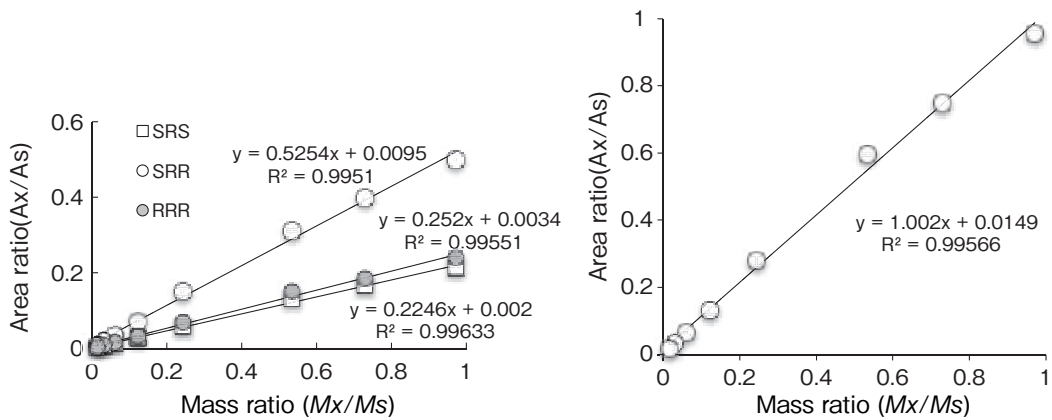


Fig.4 The relation lines between mass ratio and area ratio of phytanic acids to internal standard material.  $M_x$ , mass of analysis species;  $M_s$ , mass of internal standard;  $A_x$ , area of analysis species;  $A_s$ , area of internal standard.

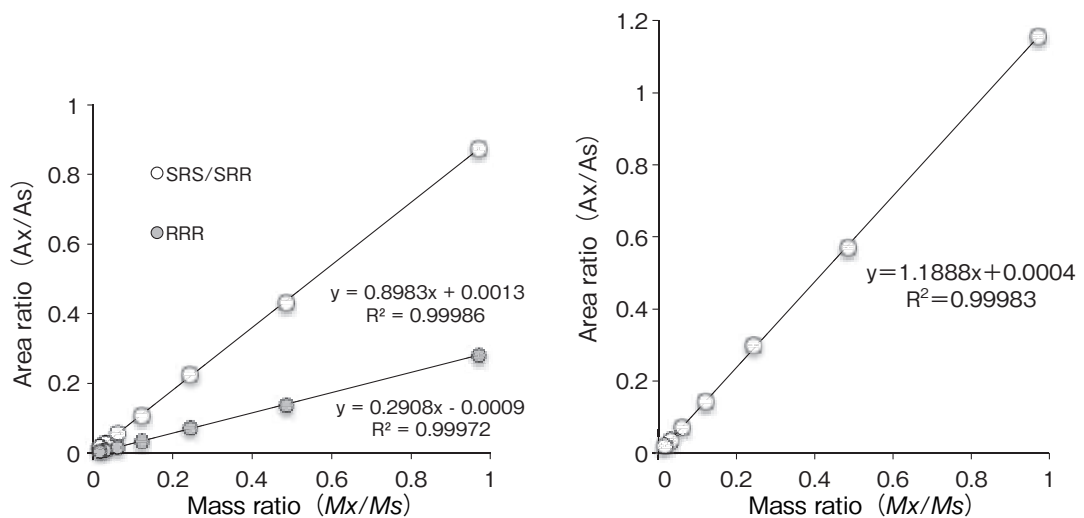


Fig.5 The relation lines between mass ratio and area ratio of pristanic acids to internal standard material.  $M_x$ , mass of analysis species;  $M_s$ , mass of internal standard;  $A_x$ , area of analysis species;  $A_s$ , area of internal standard.

析に供して混合試料のピーク面積を測定した。分析種と内部標準物質のピーク面積比 ( $A_x/A_s$ ) および混合試料中のそれぞれの重量比 ( $M_x/M_s$ ) からFig. 4 およびFig. 5 に示す関係線を得た。フィタン酸、プリスタン酸ともに、内部標準物質の重量比とピーク面積比は良好な直線関係を示し、内部標準法による定量が可能であることが確認された。また、回帰直線の残差の標準偏差から、フィタン酸については  $M_x/M_s = 0.003$ 、プリスタン酸については  $M_x/M_s = 0.005$  が検出限界であると推定された。

### 3.3 食肉中のフィタン酸およびプリスタン酸の定量

食肉中のフィタン酸およびプリスタン酸の定量に、今回確立した分析方法が適用できるかを確認する目的で、食肉中の両脂肪酸の定量実験を行った。本研究では抽出時からの回収も考慮した実験を行うため、市販鶏ひき肉に既知量 (0.5mg/100g 肉) のフィタン酸およびプリスタン酸標品を混合して調製した試料から常法により総脂肪を抽出し、FAME調製を経て、GC分析を行った。同様の試験を7反復行った結果をTable 1 に示す。なお、脂肪酸標品を添加していない鶏ひき肉につい

てはフィタン酸、プリスタン酸ともに検出限界以下であった。鶏ひき肉中に添加した両脂肪酸量と見積もられた定量値との平均的な誤差は、フィタン酸については約+14%、プリスタン酸については約-5%であり、フィタン酸で若干多く見積もられる傾向が認められた。この点については、試行回数を増やし、同様の傾向が認められる場合には定量結果に-10%程度の補正をかける必要があるかもしれない。一方、7回の定量分析操作での変動係数 (relative standard deviation) は、総フィタン酸量については8.3%、総プリスタン酸量では4.5%であり、繰り返し精度はおおむね良好であった。しかし、プリスタン酸のRRR体については、他の立体異性体より変動係数が高くなった。この点については、SRR体との分離状態の悪さ (Fig. 3) がピーク面積の計算値に影響を及ぼしているものと推測され、各異性体の定量性を向上するためには分析条件に改善を加える必要があると考えられた。

## 4 要 約

近年、反芻動物に由来する動物性脂肪中に含有される新規な機能性脂肪酸の候補として注目されているフィタン酸、およびその代謝産物であるプリスタン酸のガスクロマトグラフ分析 (GC/FID) による分析定量法の確立を試みた。種々の検討の結果、強極性液相のキャピラリーカラムを装着したガスクロマトグラフ分析により、内部標準法による両脂肪酸の定量分析が可能であることが確認された。しかしながら、本研究での分析条件では、特にプリスタン酸のジアステレオマーの一部を完全に分離することができなかった。フィタン酸、プリスタン酸の生理作用は異性体ごとに異なっていることが示唆されているため、今後、異性体レベルでの定量分析に関する確度を高めることができるよう、分析条件をより最適化する必

Table 1 Quantification of phytanic and pristanic acids in meat sample

| Fatty acid     | estimated value (mg/100g meat) | RSD* |
|----------------|--------------------------------|------|
| Phytanic acid  |                                |      |
| SRS            | 0.106                          | 8.2  |
| SRR            | 0.315                          | 8.3  |
| RRR            | 0.147                          | 9.4  |
| Total          | 0.568                          | 8.3  |
| Pristanic acid |                                |      |
| SRS/SRR        | 0.355                          | 5.4  |
| RRR            | 0.119                          | 14.0 |
| Total          | 0.474                          | 4.5  |

\*RSD=SD/average × 100

要が認められた。

#### 文 献

- 1) Young, J. F., Therkildsen, M., Ekstrand, B., Che, B. N., Larsen, M. K., Oksbjerg, N., Stagsted, J. : Novel aspects of health promoting compounds in meat, *Meat Sci.*, **95**, 904~911, 2013.
- 2) Patton, S., Benson, A. A. : Phytol metabolism in the bovine, *Biochim. Biophys. ACTA.*, **125**, 22~32, 1966.
- 3) Hellgren, L. I. : Phytanic acid-an overlooked bioactive fatty acid in dairy fat?, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1190**, 42~49, 2010.
- 4) Allen, N. E., Grace, P. B., Ginn, A., Travis, R. C., Roddam, A. W., Appleby, P. N., Key, T. : Phytanic acid: measurement of plasma concentration by gas-liquid chromatography-mass spectrometry analysis and associations with diet and other plasma fatty acids, *Brit. J. Nutr.*, **99**, 653~659, 2008.
- 5) Vetter, W., Schröder M. : Concentrations of phytanic acid and pristanic acid are higher in organic than in conventional dairy products from the German market, *Food Chem.*, **119**, 746~752, 2010.
- 6) Che, B. N., Kristensen, T., Nebel, C., Dalsgaard, T. K., Hellgren, L. I., Young, J. F., Larsen, M. K. : *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 225~230, 2014.
- 7) Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue, *J. Biol. Chem.*, **226**, 497~509, 1957.
- 8) Takenoyama, S., Kawahara, S., Murata, H., Yamauchi, K. : Investigation of some preparation procedures of fatty acid methyl esters for capillary gas-liquid chromatographic analysis of conjugated linoleic acid in meat, *Anim. Sci. J.*, **70**, 336~342, 1999.
- 9) Che, B. N., Kristensen, T., Nobel, C., Dalsgaard, T. K., Hellgren, L. I., Young, J. F., Larsen, M. K. : Content and distribution of phytanic acid diastereomers in organic milk as affect by feed composition, *J. Agric. Food Chem.*, **61**, 225~230, 2013.

## 牛肉のおいしさに影響する筋内遊離脂肪酸についての研究（第4報）

Intramuscular free fatty acids related to beef eating quality, Part IV

山之上 稔・西田 昌弘・趙 姫楠・上田 修司・井原 一高・豊田 浄彦  
(神戸大学大学院農学研究科)

Minoru Yamanoue, Masahiro Nishida, Anan Cho, Syuji Ueda, Ikko Ihara and Kiyohiko Toyoda  
(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

The aims of this study were to measure the lipase activities in water-soluble extract (broth) from Japanese Black Wagyu and Holstein beef during postmortem aging, and to prove the influence of increase of the amounts of free fatty acid (FFA) on beef eating quality, especially taste of beef broth. First, the standard curves for measurement of neutral lipase, acid lipase and acid phospholipase activities were figured with a 4-Methylumbelliferone. Then, measurement condition for each lipase activity with 4-Methylumbelliferyl-oleate as a lipase substrate was examined. Sample beef slices were taken from carcass cross-section between the sixth and seventh ribs of Japanese Black Wagyu and Holstein cattle and stored at 4°C antiseptically. At 7-, 14- and 21-days postmortem, beef broths were prepared from raw and cooked samples. The neutral lipase, acid lipase and acid phospholipase activities of both beef broths were measured. As the results, neutral lipase activity of the broth prepared from Japanese Black Wagyu beef was about two times higher than that of Holstein beef during postmortem aging. Both acid lipase and acid phospholipase activities were low and remained almost unchanged. Therefore, it is suggested that higher neutral lipase activity is possible to relate to increase in free fatty acid of Japanese Black Wagyu beef broth during postmortem aging.

### 1. 目 的

一般に、市販されている牛肉のおいしさに脂肪の影響は大きく、脂肪交雑として筋内脂肪量が多いことが重要視されてきたが、近年では脂肪を構成する脂肪酸が牛肉のテクスチャーや風味を左右することが示され、注目されている<sup>1-3)</sup>。肉牛の飼育方法や品種差が筋内脂肪蓄積に及ぼす影響を

明らかにする目的で、死直後の筋内脂肪量や脂肪酸組成に関する多くの知見が報告されている。しかしながら牛肉は摂食されるまでに長期間の熟成を経た後に加熱調理されており、それらの処理で筋内脂肪に変化が起きている可能性があるが、この件に関しての報告は少ない。また筋内脂肪変化が牛肉の呈味性に及ぼす影響を調べた報告は見当たらない。本研究は、牛肉賞味時における筋内遊

離脂肪酸の量および組成と牛肉のおいしさの関連について解明を行っている。

これまでに熟成および加熱前後の黒毛和種およびホルスタイン種牛肉からクロロホルムとメタノールの混液で抽出した総脂質中の、また牛肉賞味時に口腔内に拡がる肉汁中のトリアシルグリセロール (TG) 量および遊離脂肪酸 (FFA) 量ならびに脂肪酸組成の熟成および加熱に伴う変動を調べている<sup>4-6)</sup>。さらに肉汁の味覚センサー分析を行い、官能試験で加熱牛肉の食味性を調べた<sup>5,6)</sup>。それらの結果、熟成中に筋肉内および肉汁中の遊離脂肪酸量は増加し、その増加は牛肉の加熱処理後も変化しないことを明らかにした。またホルスタイン種牛肉に比べて食味性の優れた黒毛和種牛肉の肉汁における遊離脂肪酸量は熟成に伴い有意に増加することを認めた。味覚センサーによる酸味、苦味雑味、および旨味の熟成中の変化パターンは黒毛和種牛肉汁とホルスタイン種牛肉汁で類似していたが、それらの程度に差が認められ、熟成中の肉汁における遊離脂肪酸量増加が黒毛和種牛肉の呈味性に影響することを示唆する結果であった<sup>5)</sup>。これらのことから、黒毛和種牛肉における肉汁遊離脂肪酸量の熟成に伴う増加がホルスタイン種牛肉よりも顕著である理由を解明することは、黒毛和種牛肉のおいしさへの筋内遊離脂肪酸の寄与を明らかにするうえで重要と考えられる。本研究では、熟成中の黒毛和種およびホルスタイン種牛肉汁における酵素リパーゼ活性の変化と、肉汁中の遊離脂肪酸量の変化に及ぼすリパーゼ作用の影響を明らかにすることを目的とする。

## 2. 方 法

### 2.1 試薬および牛肉試料

試薬は特に表記してあるものを除き、ナカライテスク社もしくは和光純薬工業株式会社の特級試

薬を用いた。4-メチルウンベリフェリル-オレイン酸および4-メチルウンベリフェロン標準品はシグマ-アルドリッチ社から購入した。牛肉試料は、伊藤ハム (株) から購入した黒毛和種およびホルスタイン種枝肉の第6-7肋骨間のロース部を用いた。

### 2.2 熟成および加熱処理

ロース部の牛肉を4℃で保存し、と畜後7日目、14日目、および21日目にロース芯から牛肉片を無作為に採取して熟成および未加熱試料とした。一方、同期間熟成した牛肉ロース芯を4cm×5cmの大きさに厚さ1cmの肉片に整形し、120℃に加熱したホットプレートで内部温度が65~70℃になるように表裏を各130秒間加熱後に試料を採取し、加熱試料とした。

### 2.3 肉汁試料の調製

未加熱および加熱牛肉の各4gに10mlの蒸留水を加えて、10,000rpmで2分間ホモジナイズした。蒸留水を加えてメスシリンダーで15mlに定容にし、よく混合して均質にした後、5,000rpmで20分間の遠心分離を行った。遠心分離後、ろ過した上清を10mlに定容にして肉汁試料とした。

### 2.4 リパーゼ活性測定

肉汁中の中性リパーゼ活性、酸性リパーゼ活性、および酸性ホスホリパーゼ活性をHernándezら(1999)の方法<sup>7)</sup>に従い励起波長/蛍光波長=355nm/460nmで測定し、4-メチルウンベリフェロン当量で示した。

### 2.5 pH測定

肉汁のpHをマルチ水質計(東亜ディーケーケー株式会社, MM-60R)で測定した。

## 3. 結果と考察

食肉中の脂質の分解および酸化は風味の劣化や栄養的損失などを起こし、食肉の品質低下を招く<sup>7,8)</sup>。牛肉脂肪の分解と遊離脂肪酸の蓄積は筋肉内に在性

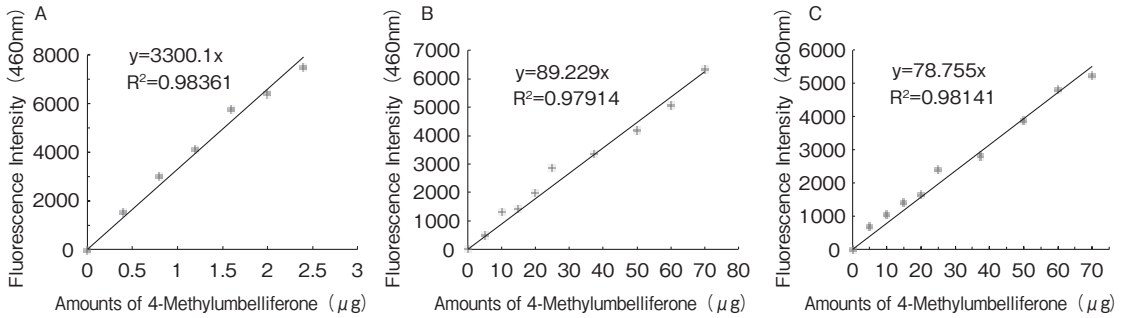


Fig.1 Standard curves for the various lipase activities of Japanese Black Wagyu and Holstein beef broths. Neutral lipase (A), acidic lipase (B), and acidic phospholipase (C) activities were measured.

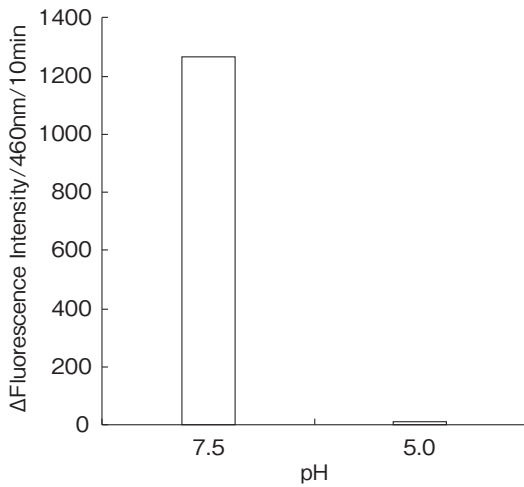


Fig.2 Effects of pH on the activity of neutral lipase in Japanese Black Wagyu beef broth prepared at 21-days postmortem (n = 2).

のリパーゼやホスホリパーゼによると考えられるが、その経緯は未だ明確ではない。さらに熟成中に筋肉内に蓄積する遊離脂肪酸と牛肉のおいしさとの関連はまったく不明である。食味性に優れた黒毛和種牛肉を低温で貯蔵したときに起こる遊離脂肪酸量の顕著な増加と内在性リパーゼとの関連を解明することは、黒毛和種牛肉のおいしさへの筋内遊離脂肪酸の寄与を明らかにするうえで重要と考えられる。

まず牛肉内に存在すると考えられる中性リパーゼ (NL), 酸性リパーゼ (AL), および酸性ホス

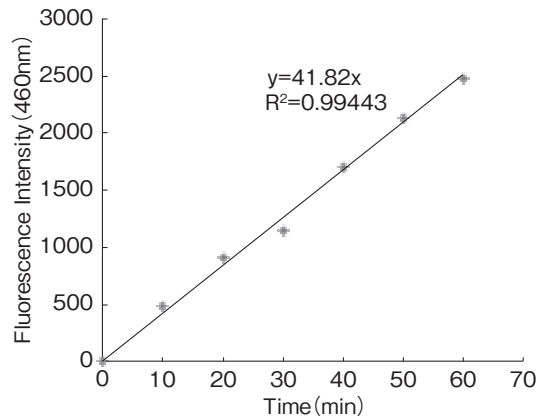


Fig.3 Changes in neutral lipase activity during the measurement time in Japanese Black Wagyu beef broth prepared at 7-days postmortem (n = 2).

ホリパーゼ (APL) のそれぞれの活性を測定する条件を検討した。基質である 4-メチルウンベリフェリル-オレイン酸がリパーゼで分解されて生じる 4-メチルウンベリフェロンを当量として、検量線を作成した (Fig. 1)。3 種類のリパーゼ活性測定条件の中で、NL活性測定条件では微量な 4-メチルウンベリフェロン量で高い蛍光強度を示した (Fig.1A)。そのためNL活性とAL活性の両リパーゼ活性の測定結果が競合する可能性を調べた。Fig. 2 に示すように、NL活性はAL活性の測定条件である pH5.0 の低 pH ではまったく活性を示さず、牛肉汁中のNL活性とAL活性の測定値



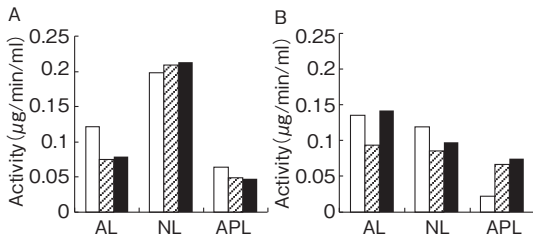


Fig.4 Effects of postmortem aging on various lipase activities in Japanese Black Wagyu and Holstein beef broths ( $n = 2$ ).

Each broth was prepared from raw samples from Japanese Black Wagyu (A) and Holstein beef (B) at appropriate postmortem days (7-days, □; 14-days, ▨; 21-days, ■).

は競合しないことが明らかになった。

牛肉汁中のNL活性の測定結果の一例をFig. 3に示す。図から明らかなように測定した条件内では4-メチルウンベリフェロンの蛍光強度は直線的に増加し、本研究における測定条件が肉汁中の中性リパーゼ活性測定に有効であることを示している。またALおよびAPL活性測定結果もNL活性測定結果と同様であった (data not shown)。

以上の結果をふまえて、熟成中の黒毛和種およびホルスタイン種牛肉から経時的に調製した肉汁中のAL活性, NL活性, およびALP活性値の変化をFig. 4に示す。黒毛和種牛肉汁中のAL活性およびALP活性は、熟成中にいずれも $0.1 \mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$ 以下の低値で推移した。NL活性は熟成7日目に $0.2 \mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$ で、熟成中にわずかに増加する傾向であった (Fig.4A) が、ホルスタイン種牛肉汁中のNL活性は熟成期間を通じて約 $0.1 \mu\text{g}/\text{min}/\text{ml}$ と低値のままであった (Fig.4B)。ホルスタイン種牛肉汁中の他のリパーゼ活性は黒毛和種牛肉汁の場合とほぼ同様に低値で推移した。過去の報告で黒毛和種牛肉では肉汁中のFFA量は熟成21日間に増加したが、ホルスタイン種牛肉肉汁のFFA量は熟成期間を通じてほぼ一定で、黒毛和種牛肉と異なることを示している<sup>5, 6)</sup>。熟成中の

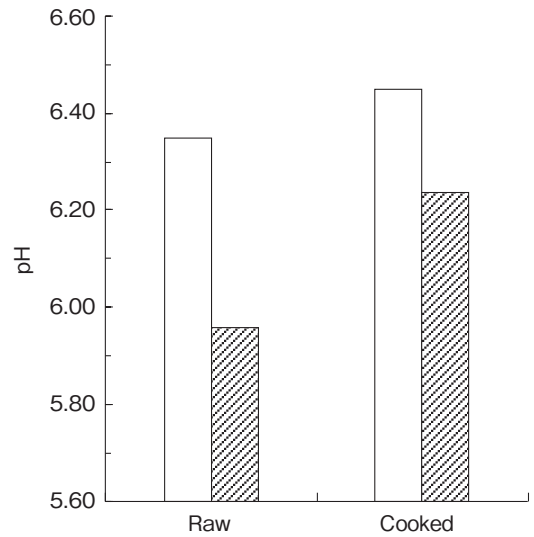


Fig.5 Difference in pHs of the broths prepared from raw and cooked Japanese Black Wagyu beef (□) and Holstein beef (▨) at 21-days postmortem ( $n = 2$ ).

黒毛和種牛肉汁中のNL活性がホルスタイン種牛肉汁中のNL活性に比べて約2倍の高い値で推移することが、黒毛和種牛肉汁中の顕著なFFA量増加の要因である可能性が考えられる。今回のリパーゼ活性は、両牛肉ともに2試料を用いた測定の平均値で示しており、今後測定数を増やして検証することが必要であろう。

肉汁中のNL活性はpH5.0の低pHではまったく活性を示さず、AL活性とは競合しないことを示した (Fig. 2)。しかし牛肉のpHは、筋漿に溶存する物質の熟成中の変化により極限pHであるpH5.6前後から若干上昇することが報告されている<sup>9)</sup>。それ故、本研究における熟成21日目の牛肉pHを、未加熱および加熱後に調製した肉汁試料で測定した (Fig. 5)。黒毛和種およびホルスタイン種牛肉汁のpH値は、約6.0~6.5を示し、極限pHから中性側に上昇していた。また未加熱および加熱後に調製した肉汁のいずれでも黒毛和種牛肉汁のpHが高い値であった。熟成中のpH上昇が黒毛和種牛肉汁中のNL活性を強め、FFA量の増

加にはたらいっていることが示唆される。今回は調べていないが、牛肉汁のpH上昇が筋肉内のリパーゼ活性に及ぼす影響があるのかもしれない。

以上の結果から、黒毛和種牛肉のおいしさと筋内遊離脂肪酸増加の関連性を明確にするために、今後の研究では熟成中の黒毛和種およびホルスタイン種牛肉汁中のリパーゼ活性の特徴を確立し、pHをはじめとする諸条件によるリパーゼ活性の変化とその影響を明らかにすることが重要と考えている。

#### 4. 要 約

牛肉のおいしさへの筋内脂肪の影響を牛肉中の遊離脂肪酸量と咀嚼時の呈味性との関係から解明するために、これまでに明らかにした熟成および加熱による肉汁中の筋内脂肪量および呈味性の変化要因を、黒毛和種牛肉とホルスタイン種牛肉のリパーゼ活性の差異に着目して調べた。

まず牛肉内に存在すると考えられる中性リパーゼ、酸性リパーゼ、および酸性ホスホリパーゼのそれぞれの活性を測定する条件を検討した。リパーゼの基質である4-メチルウンベリフェリルオレイン酸が分解されて生じる4-メチルウンベリフェロンを当量として、検量線を作成した。また中性リパーゼおよび酸性リパーゼ活性の両測定で使用されるpH条件で中性リパーゼ活性を測定した結果、測定pHが異なると中性リパーゼ活性と酸性リパーゼ活性の作用が競合しないことを確認した。

黒毛和種およびホルスタイン種牛肉の第6～7肋骨間ロース部を4℃で保存し、と畜後7、14、および21日目にロース芯から筋肉片を採取した。未加熱および加熱処理後の筋肉試料から水溶性画分を調製し、肉汁試料とした。未加熱肉汁試料の各リパーゼ活性を測定した結果、両牛肉汁中の酸性リパーゼおよび酸性ホスホリパーゼ活性は熟成期間を通じて低値で推移した。一方、黒毛和種牛肉汁中の中性リパーゼ活性はホルスタイン種牛肉汁の中性リパーゼ活性に比べて約2倍の高値で推移し、熟成中の黒毛和種牛肉汁のFFA増加に影響することが示唆された。

#### 文 献

- 1) Westerling, D. B., Hedrick, H. B. : *J. Anim. Sci.*, **48**, 1343~1348, 1979.
- 2) Melton, S. L., Amiri, M., Davis, G. W., Backus, W. R. : *J. Anim. Sci.*, **55**, 77~87, 1982.
- 3) Mandell, I. B., Buchanan-Smith, J. G., Cambell, C.P. : *J. Anim. Sci.*, **76**, 2619~2630, 1998.
- 4) 山之上稔, 矢野恵子, 上田修司, 井原一高, 豊田浄彦 : 平成23年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.30, 68~75, 2012.
- 5) 山之上稔, 大和彩弥香, 上田修司, 井原一高, 豊田浄彦 : 平成24年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.31, 42~48, 2013.
- 6) 山之上稔, 西田昌弘, 上田修司, 井原一高, 豊田浄彦 : 平成25年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.32, 27~33, 2014.
- 7) Hernández, P., José Navarro, J., Toldrá, F. : *Z. Lebensm Unters Forsch.*, **208**, 110~115, 1999.
- 8) Witte, C. V., Krause, G. F., Bailey, N. E. : *J. Food Sci.*, **35**, 582~585, 1970.
- 9) Lawrie, R. A. : *Lawrie's Meat Science, 6th ed.*, 221, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, 1998.

## 金属表面洗浄時における食肉由来汚れの脱離特性に 及ぼす外部電位印加の効果

Investigation of the effects of applied surface electric potential on the  
removal behavior of meat borne soilings on metal surface during cleaning

今村 維克・石田 尚之

(岡山大学大学院自然科学研究科)

Koreyoshi Imamura and Naoyuki Ishida

(Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University)

When a metal surface contacts with meat, some components of the meat bind to the metal surface. In this study, the attached components, originated from meat, were first analyzed by using a Fourier transform IR spectroscopy. The IR spectra indicated that the main components of the attachment matter originated from meat comprised of fatty acids, esters, and proteins. Hence, the next step of this study focused the effective methodologies for the removal of adsorbed lipid and protein on metal surfaces. Stainless steel SUS 316L was used as a metal surface. In this study, (i) alkaline cleaning, (ii) enzymatic cleaning and (iii) oxidation cleaning by OH radicals generated by hydrolysis of hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ -electrolysis cleaning) were employed. The adsorbed fatty acids and esters could be removed by  $H_2O_2$ -electrolysis cleaning while it remained after alkaline cleaning (and enzyme cleaning) at room temperature. The adsorbed protein could be removed by the enzymatic (trypsin) cleanings, the rate of which was increased with increasing the trypsin concentration. However, at the trypsin concentration above 10  $\mu\text{g/mL}$ , the adsorption of trypsin onto the stainless steel surface became significant after once the adsorbed protein was removed. The application of electric potential during the enzyme cleaning resulted in the further increase in the trypsin adsorption and did not contribute to the increase in the cleaning rate. The  $H_2O_2$ -electrolysis cleaning was also quite effective for the removal of adsorbed protein.

### 1. 目 的

食肉は食品製造・加工プロセスにおいて大量に調理・加工されている。食肉は、脂質やタンパク質を高濃度に含んでおり、これを加工する装置や器具表面にはそれらを主とする『汚れ』が付着する。この『汚れ』が製造装置内に残留すると、製造装置の機能を低下させるだけでなく、製品への

異物（汚れ物質）の混入や雑菌の繁殖により製品品質を致命的に低下させる。そのため、製造装置の洗浄は食品製造プロセス、とりわけ食肉を加工・調理するプロセスにおいては極めて重要な操作である。しかし、脂質やタンパク質といった有機物質はステンレスなどの金属表面に対して高い吸着性を有しているため、その除去は容易ではない。実際には、高温に熱したアルカリ水や酸性水、

莫大な界面活性剤と時間を費やして、やっと、汚れの残留量を検出限界以下まで下げているのが現状である。従って、汚れ物質を完全に、そして、極力効率的（少ないエネルギー）に除去できる洗浄技術の開発は極めて重要である。そこで、本研究では、まず、食肉由来汚れを構成する物質について検討した。ステンレス表面をモデル食肉素材と接触させ、そのときの付着物質の成分と量を解析した。次に食肉汚れの主成分である脂質とタンパク質の各種洗浄除去を試みた。アルカリ洗浄、酵素洗浄、薬剤（界面活性剤）、 $H_2O_2$ -電気分解洗浄によるモデル脂質汚れ、モデルタンパク質汚れの脱離の有無および程度を調べた。また、各洗浄方法におけるモデル汚れ物質の付着表面の電位が脱離特性に及ぼす影響についても調査した。

## 2. 方法

### 2.1 食肉由来汚れの分析

表面材料としてはステンレスSUS316Lを用いた。片面を鏡面研磨したSUS316Lテストピースを一定温度（室温or 180℃）に設定したホットプレート上に載せ、その上に市販のブタ挽肉を一定時間被せた。これによりステンレス表面に食肉由来汚れを形成させた。テストピース表面上のあらゆる付着物を水洗によって除去し、残留しているモデル汚れを高感度反射吸収法および全反射吸収法-フーリエ変換赤外分光分析（RA-, ATR-FTIR）により分析した。IRスペクトル中の検出ピークとその強度から、食肉由来汚れに含まれる成分を推定した。

### 2.2 モデル脂質・タンパク質汚れの洗浄実験

脂質としてpalmitic acid, stearic acidおよびtripalmitinを用いた。タンパク質としては金属表面に対する付着性が極めて高い牛血清アルブミン（BSA）を主に用いた。モデル汚れ物質はテストピースをモデル汚れ溶液（脂質：1 mMエタノー

ル溶液；タンパク質：0.1mg/mL水溶液）に1時間以上接触させ、溶剤でリンス後、乾燥させることでモデル汚れ物質を固着させた。 $H_2O_2$ -電気分解洗浄実験は電解槽を装備した偏光解析装置を用いた。あらかじめ脂質を吸着させた試料平板を電解槽中の11mM  $H_2O_2$ 水溶液（支持電解質20mM KClを含む）に浸し、ポテンシオスタットを用いて負電位を印加した（対極：白金，参照電極：Ag/AgCl）。洗浄過程における試料平板上のモデル汚れ物質の量（厚み）は偏光解析法により連続的に測定した。その他の洗浄実験では、ガラス製電気化学セル（200mL容量）にモデル汚れを付着させたテストピースに設置し、加水分解酵素溶液（Trypsin：1.0~1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）あるいはアルカリ溶液（0.1M NaOH）をガラスセルに注いだ。スターラーで攪拌し、電位を印加する場合は、上述のポテンシオスタットを用いた（対極：白金，参照電極：Ag/AgCl）。

## 3. 結果と考察

### 3.1 食肉汚れの主成分分析

Fig. 1 に豚挽き肉をあらかじめ180℃加熱したテストピースに押し付けた際に付着した物質のIRスペクトルを示す。加熱表面への接触時間によって各吸収ピークの強弱に変化は見られるが、本実験条件の範囲では、 $3000\text{cm}^{-1}$ および $1720\text{cm}^{-1}$ 近傍に鋭い吸収が見られた。これらは脂質のアルキル鎖C-Hとカルボニル基C=Oの伸縮振動に起因するピークである<sup>1)</sup>。また、 $1400\text{cm}^{-1}$ 近傍にアニオン化カルボキシル基の対称振動の吸収が見られることから、脂質はエステルだけでなく著量の脂肪酸を含んでいるものと考えられる。また、 $1650\text{cm}^{-1}$ 近傍にピークが見られ、とりわけ非加熱試料でその吸収が顕著であった。さらに $1550\text{cm}^{-1}$ 近傍にはステンレス表面に起因するマイナスの反射ピークが見られているが、その同波

数域に吸収帯の存在が認められる場合もあった。それら $1650\text{cm}^{-1}$ 、 $1550\text{cm}^{-1}$ 近傍のピークはそれぞれペプチド結合 $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動(アミドI)、ペプチド結合 $\text{N}-\text{H}$ 偏角振動(アミドII)に対応する<sup>1)</sup>。従って、脂質汚れの主成分は脂質とタンパク質であると考えられる。

また、さらに長時間、ひき肉を加熱した場合、黒色の固い析出物が生じた。それら黒色析出物は、食肉の加熱過程で極めて除去が困難となるものと考えられるが、現時点では、ATRおよびRAS-FTIRとも解析可能なIRスペクトルは得られなかった。今後、拡散反射法など他の分析手法を用いて解析を進める予定である。

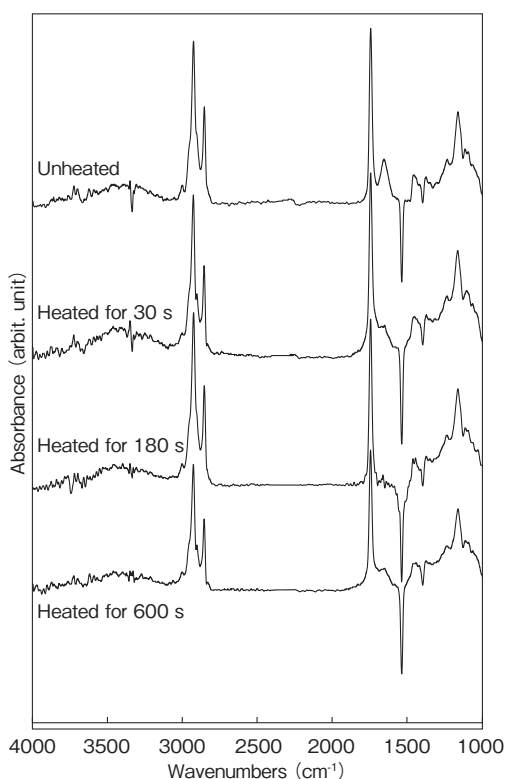


Fig.1 IR spectra for stainless steel surfaces that had been contacted with pig meat at  $180^\circ\text{C}$  for different periods. The result for the unheated surface (contact period: 10min) is also shown. All IR spectra were measured by using an attenuated total reflection (ATR) method.

### 3.2 モデル汚れ物質の洗浄実験

まず、モデル脂肪酸汚れ(パルミチン酸、ステアリン酸)を付着させたサンプルピースをアルカリ( $0.1\text{M NaOH}$ )を用いて洗浄を試みたが、顕著な脂肪酸付着層の脱離は確認できなかった(高温( $120^\circ\text{C}$ オートクレーブ中)下にアルカリ洗浄ではほぼすべて除去することができた)。本実験では脂質汚れが数百~二千Åの厚みで比較的に密に沈着しており(Fig. 2)、室温条件ではアルカリおよび加水分解酵素が汚れの付着層に十分浸透できなかったものと考えられる。一方、 $\text{H}_2\text{O}_2$ -電気分解洗浄を行った結果、いずれの脂肪酸も $-0.4\text{V vs. Ag/AgCl}$ 以下の電位で脱離が認められ、その脱離は三段階で進行することが分かった(Fig. 2)。

まず、(i) 洗浄開始とともに表面に多層的に吸着していた分子が脱離し、付着層の厚みが数千Åから $100\sim 200\text{Å}$ まで減少する。その後、(ii) しばらく付着層厚みは一定の値を示す。(iii) さらに $\text{H}_2\text{O}_2$ -電気分解処理を続けると、再び脱離が進行し、付着層厚みが0に漸近する。印加電位が低いほど(i)および(iii)段階目における脱離は速やかに進行し、(ii)の停滞期間も短くなる傾向があった。また、パルミチン酸とステアリン酸の脱離過程を比較すると脂肪酸のアルキル鎖が長いステアリン酸からなるモデル汚れの方が、脱離が生じる印加電位が低くなり、いずれの段階の脱離速度も低下する傾向があることがわかった。

脂肪酸付着層の $\text{H}_2\text{O}_2$ -電気分解洗浄の各段階におけるIRスペクトルを高感度反射法により測定した。その結果(Fig. 3)、脱離の一段階目と二段階目では吸着している物質が異なっており、第二段階においては、 $\text{C}-\text{H}$ 結合をほとんどもたない、つまり、アルキル鎖が極端に短いカルボン酸のような物質が主に残留していることが示唆された。なお、第三段階の終盤では、付着残留物は

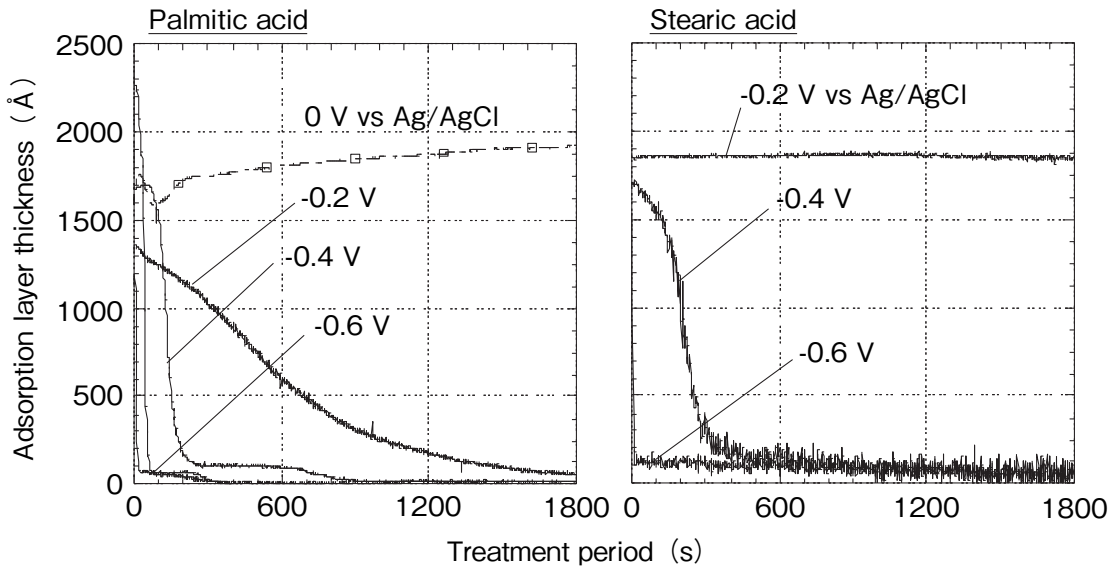


Fig.2 Courses of decrease in (a) amount of palmitic and (b) stearic acid adsorbed on stainless steel surface during  $\text{H}_2\text{O}_2$ -electrolysis cleaning ( $\text{H}_2\text{O}_2$  conc.: 11mM)

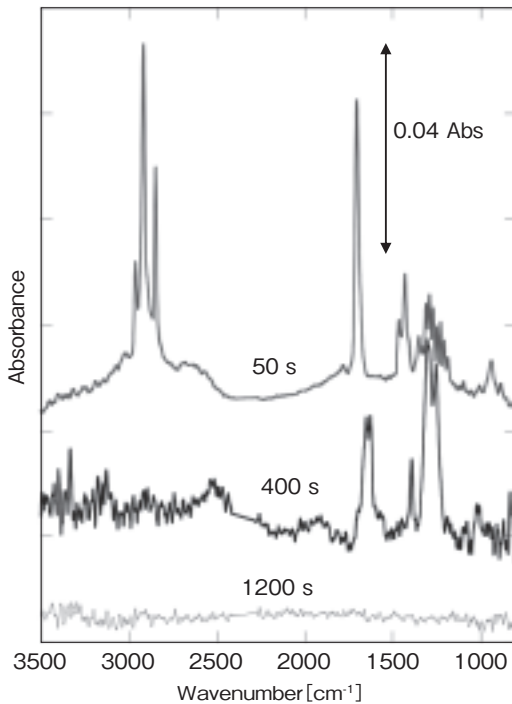


Fig.3 IR spectra of stainless steel surface, on which palmitic acid was adsorbed and then treated for different period by  $\text{H}_2\text{O}_2$ -electrolysis cleaning at  $-0.4\text{V}$  vs Ag/AgCl. IR spectra were measured by reflection absorption (RA) method.

ほとんど検出することはできず、 $\text{H}_2\text{O}_2$ -電気分解洗浄により脂肪酸の完全な除去が可能であることが分かった。

モデル汚れ (エステル) 物質としてトリパルミチンを付着させたサンプルピースを調製し、アルカリ (0.1M NaOH) および加水分解酵素 (1 mg/mL Lipase) を用いて洗浄を試みた。しかし、室温でのそれら洗浄処理では、脂肪酸汚れと同様、脱離は確認できなかった。また、 $\text{H}_2\text{O}_2$ -電気分解洗浄も行ったが、1時間の処理で約半分除去できる程度しか除去できなかった。トリパルミチンの付着層は極めて緻密で撥水性も非常に高いと考えられる。 $\text{H}_2\text{O}_2$ -電気分解洗浄では、汚れの付着面 (金属表面) に過酸化水素が浸透・到達することでOHラジカルが発生し、これが汚れ物質を酸化分解・可溶化することが前提となる<sup>2,3)</sup>。従って、脂質エステルのような緻密な汚れの付着層には $\text{H}_2\text{O}_2$ -電気分解洗浄は効果を発揮しにくかったものと考えられる。いずれの洗浄方法を用いるにせよ、モデル脂質エステル汚れを除去する

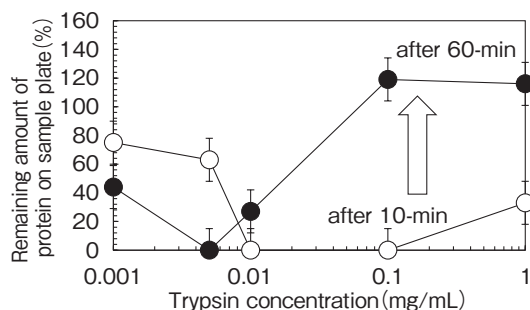


Fig.4 Remaining amount of protein (BSA) on stainless steel SUS 316L surface after enzymatic cleaning (trypsin) for 10-min (open keys) and 60-min as a function of trypsin concentration. The increases in the protein adsorbed amount after 60 min were considered to be mainly due to the adsorption of trypsin onto the stainless steel surface.

うえでは、いかに緻密な汚れ層を弛緩するかが鍵であり、汚れの弛緩技術が次の研究のターゲットとなる。

次にモデルタンパク質汚れの洗浄実験を行った。室温のアルカリ洗浄では単分子層程度残留した。高温下でのアルカリ洗浄では完全に除去することができた。続いて、trypsinを用いた酵素洗浄を行った。酵素濃度を  $1 \mu\text{g/mL}$  から  $1 \text{mg/mL}$  まで変化させた (pH 8,  $37^\circ\text{C}$ )。タンパク質の付着量は高感度FTIR測定によりIRスペクトルを測定し、そのアミドIバンドの吸収強度から評価した (Fig. 4)。その結果、酵素濃度が  $1 \mu\text{g/mL}$  ではほとんど洗浄効果は認められなかったが、それ以上では付着タンパク質の脱離が認められた。 $10 \mu\text{g/mL}$  では、付着タンパク質は1次反応的に減少し、約30分で付着タンパク質はすべて除去することができた。酵素濃度がさらに高くなると10分以内にモデルタンパク質汚れの除去が完了するが、その後、再びタンパク質吸着層の増加が見られた。酵素濃度の増加とともにタンパク質吸着量の再増加が顕著になることから、酵素であるtrypsinの吸着が生じたものと考えられる。

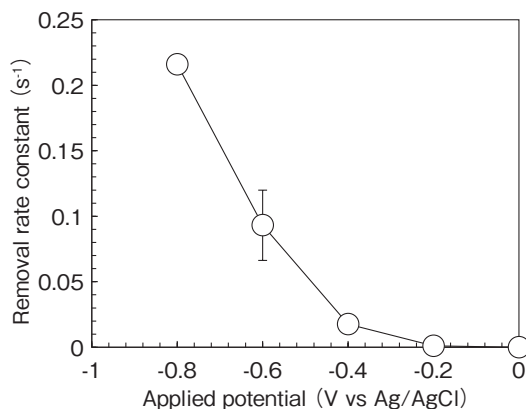


Fig.5 Removal rate constants for stainless steel SUS 316L at  $\text{H}_2\text{O}_2$ -electrolysis treatments as a function of applied potentials. Bovine serum albumin was used as a model protein.

また、モデルタンパク質が酸性タンパク質であることから、サンプルピースに負電位 ( $-0.2\text{V}$  vs Ag/AgCl) を印加し、同様に洗浄実験を行った。その結果、10分後にはすでに付着層の増加が見られた。現時点では、付着層を形成しているタンパク質の種類が特定できていないが、付着タンパク質とtrypsinの付着交換が外部電場の印加により、むしろ促進されてしまった可能性が考えられる。現在、trypsin以外のプロテアーゼについて印加電位と付着量の関係を検討しており、プロテアーゼの添加濃度が高くても (洗浄速度は高い) プロテアーゼの付着が生じないようなプロテアーゼをピックアップしていく予定である。

モデルタンパク質汚れに対して $\text{H}_2\text{O}_2$ -電気分解洗浄が有効であることは、既に筆者らは論文等で報告している<sup>2,3)</sup>。本研究においても、モデルタンパク質であるBSAのステンレス表面における付着層に $\text{H}_2\text{O}_2$ -電気分解洗浄を適用した (Fig. 5)。その結果、過酸化水素濃度が $10\text{mM}$ の場合、印加電位が $-0.2\text{V}$  vs Ag/AgClからタンパク質の脱離が認められ、 $-0.6\text{V}$  vs Ag/AgClではおよそ2分でモデルBSA汚れを除去することができた。

これまでの検討の結果、多くのタンパク質は同条件で、およそ半分の時間で付着タンパク質の除去が完了したことから、今回取り上げたタンパク質は比較的密なタンパク質付着層を形成する可能性が考えられる。

#### 4. 要 約

豚肉を室温および180℃でステンレス表面に接触させ、付着する汚れ成分をフーリエ変換赤外分光分析により分析した。その結果、食肉汚れの主成分は脂質（エステル、脂肪酸）とタンパク質であった。そこで、脂質およびタンパク質から成るモデル汚れ物質に帯する（i）アルカリ洗浄、（ii）酵素洗浄、（iii）H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-電気分解洗浄の洗浄効果を比較した。緻密に積層した脂質汚れに対しては室温でのアルカリ洗浄は効果が認められず、酵素洗浄もエステル汚れに対して効果を示さな

かった。一方、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-電気分解洗浄は脂肪酸を効果的に除去でき、エステル汚れに対してもある程度の洗浄効果を示した。タンパク質汚れに対しては、いずれの洗浄方法も有効であった。しかし、室温のアルカリ洗浄では単分子層程度のタンパク質が残留し、酵素洗浄では酵素（trypsin）濃度に最適域が存在することが示唆され、外部電場の印加により酵素自身の付着が促進された。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-電気分解洗浄では極めて速やかにモデルタンパク質汚れを除去することができた。

#### 文 献

- 1) 堀口博, 赤外吸光図説総覧, 三共出版, 東京, 1977.
- 2) Imamura, K., Tada, Y., Tanaka, H., Sakiyama, T., Nakanishi, K.: *J. Colloid Interface Sci.*, **250**, 409~414, 2002.
- 3) Imamura, K., Sakiyama, T., Nakanishi, K.: *Langmuir*, **18**, 8033~8039, 2002.



## 脂質代謝および感染症研究のための豚・牛由来肝臓細胞の樹立

Establishment of bovine and swine derived hepatocytes for the lipid metabolism and infection study

福田 智 一  
(東北大学農学研究科)

Tomokazu Fukuda  
(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

The liver is the one of the most important organs to regulate the lipid metabolism, and energy production in the livestock. Furthermore, liver is critical organ for the infectious diseases, such as type E hepatitis virus. For the molecular studies of these metabolic and infectious diseases, the *in vitro* experimental system is quite useful. However, as far as we know, there is no report for functional hepatocyte derived cell lines of the livestock. Furthermore, recent advance in cell biology showed that expression of three cell cycle regulators (Cyclin dependent kinase 4 (CDK4), Cyclin D, telomerase (TERT)) allows us to establish the immortalized cell lines, which nature is close to the original cell in human. Our previous study showed that the expression of these human derived factors enable us to establish the immortalized cells from various types of animals, such as bovine, swine, and monkey. Therefore, these situation led us to build the hypothesis that the expression of these three cell cycle regulators might be useful to establish the hepatocyte derived immortalized cells as well as bovine and swine. We cultured the primary derived bovine cell with two conditions, DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) based medium (Condition 1), and DMEM/Ham F12 based medium containing the various types of growth factor (Condition 2). In the primary culture, the hepatocyte efficiently attached to the bottom of the cultured dish, and showed cell growth. To be noted, the cell culture under the condition 1 was difficult to do the passage. However, the hepatocyte obtained under condition 2 overcame the enzymatic digestion process in the passage, and stable cell passage more than five generations. Furthermore, we prepared the recombinant lentiviruses and retroviruses which express the Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP), and introduced into the hepatocytes obtained under condition 2. Several percentage of colonies showed the positive expression of EGFP. Although we need to find the more optimized condition for the genetic introduction, these information would be the basic data to obtain the immortalized bovine derived hepatocytes.

## 1. 研究の目的および背景

肝臓は動物の体内で最大の大きさを持つ臓器のひとつである。肝臓は飼料を吸収し、脂質代謝など主要なエネルギーを産生する。すなわち、家畜の成長は肝臓の機能に大きく影響される。肝臓における遺伝子発現が家畜の筋肉内における脂肪蓄積に大きく影響している可能性があり、家畜の肝臓細胞の詳細な機能解析は重要である。

加えて肝臓は感染症の標的臓器でもある。代表的なものにブタのE型肝炎ウイルスが存在する。E型肝炎ウイルスはシカやイノシシの肉を介して感染した事例が存在する<sup>1)</sup>。家畜ブタおよびイノシシのE型肝炎の陽性割合は我が国においても高く、食の安全に対する重要な研究課題になっているが、そのウイルス増殖機構の詳細は不明な点が多い。特にE型肝炎に感染した場合は対症療法しか存在せず、有効な治療法が存在しない。このような食の安全に関わるウイルスの増殖のメカニズムを研究するのは試験管内で効率よくウイルスが増殖する肝臓細胞が必要である。しかし現在までに家畜由来かつ効率よく無限分裂する肝臓由来の細胞は知られていない。

上述した肝臓細胞であるが、肝臓由来であればどのようなものでも良いわけではない。培養細胞であるが、元の正常組織の状態を可能な限り反映したものでなくては意味がない。前述したように家畜やヒトも含めて、元の肝臓細胞由来の性質を保持した培養細胞の樹立は報告されていない。その理由は肝臓細胞が試験管内に取り出された途端に分裂能力を失うこと、加えて正常細胞は染色体の末端にあるテロメア配列の短縮によって無限に分裂できないことが原因である<sup>2)</sup>。HepG 2を代表とするヒト由来の肝臓がん細胞は複数樹立されている。しかしこれらのがん細胞由来の細胞株はがん化する過程もしくは細胞を株化する過程でゲ

ノムに異常を生じている<sup>3)</sup>。ある意味、ゲノムに異常を生じているので無限分裂が可能になったともいえる。多くのヒト由来のがん化を介した細胞株は既になんか化しているために元の肝臓細胞の性質を失っており、家畜の脂質代謝や感染症の研究に用いる材料としては適しているとはいえない。

一方、近年驚くことに元の細胞の性質をできる限りそのままにして無限分裂が可能となる新たな技術が発展してきた。本技術はShiomiらによってヒトの培養細胞において初めて報告された<sup>4)</sup>。我々は本方法がウシ、ブタ、サルを含む幅広い動物種において同様に無限分裂を可能にすることを見出し報告した<sup>5)</sup>。

そこで我々はウシ肝臓細胞に関して、まず特殊な培地を使用し初代培養を行った。その後に細胞の元の性質を保持したまま無限分裂を可能とするため、遺伝子導入のための基礎条件を検討した。

## 2. 材料および方法

### 2.1 肝臓組織の培養前処理

ホルスタイン種、雄牛5週齢を2頭使用した。動物を用いた実験内容に関して、東北大学実験動物委員会に実験内容を申請した。申請内容が委員会にて吟味された後に認可を受けた。動物に鎮静剤を注入し、自発運動を減少させた後に頸動脈から放血を行い安楽死させた。その後肝臓組織約100gを得た。肝臓組織内の血管にカニューレを挿入し、コラゲナーゼを含む酵素液にて灌流を行った。十分な量の酵素液で組織内の血液を除去した後に、肝臓組織を細切した。さらに滅菌ガーゼによって細切組織を濾過し、比較的大きな組織片を除去した。その後に得られた組織浮遊液を250Gにて5分間遠心分離を行った。遠心分離の後に浮遊液をDMEM/F12基礎培地 (DMEM/F12 + 10% Fetal Bovine Serum (FBS) + 抗生物質) にて懸濁した。この操作を2回繰り返す。細

胞浮遊液とした。

## 2.2 肝臓組織の培養

2種類の条件にて細胞培養を行った。主な培地条件は2種類である。Condition 1は高グルコースDMEM (4.5g/L) に100U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 10% FBS, 10nM Insulin, 5000KIU/L アプロチニンを加えた従来から報告のある条件である<sup>6)</sup>。Condition 2は新たに本研究にて開発した培地である。Condition 2では高グルコースDMEM/F12に100U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, 10% FBS, 10nM Insulin, EGF (Epidermal Growth factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor) を添加した培地を用いた。培養プラスチックディッシュにはコラーゲン処理を行い、細胞の張り付きを加速されるように前処理を行った。培養開始後、24時間、72時間後と経過観察を行った。細胞が培養ディッシュ底面に一杯に増殖した時点でコンフルエントと判断し、継代操作を行った。継代に際してはアキュターゼによって単一細胞にまで分散を行った。

## 2.3 組み換えレンチおよびレトロウイルスの作成

肝臓細胞へ遺伝子導入を行うための最適条件を探索した。具体的には組み換えレンチおよびレトロウイルスを作成した。Enhanced Green Fluorescence Protein (EGFP) は細胞が生存した条件のまま遺伝子導入効率を観察できる有用なマーカー遺伝子である<sup>5)</sup>。我々はこのEGFPを発現するレンチウイルス (CSII-CMV-EGFP) およびレトロウイルス (QCXIN-EGFP) を使用した。組み換えウイルスの作成にはヒト胎児由来腎臓上皮細胞である293Tを用いた。レンチウイルスの場合、リポフェクションによってパッケージングプラスミドであるHIV-gpおよびpCMV-VSV-G-RSV-RevとCSII-CMV-EGFPを導入した。レトロウイルスの場合、VSV-G領域を欠損

させたpCL-10A プラスミドおよびpCMV-VSV-G-RSV-RevとQCXIN-EGFPを293T細胞に導入した。リポフェクションによる導入後48時間目に10  $\mu$ Mのフォルスコリンを含む培地に交換し、さらに48時間培養を継続した。その後細胞上清を回収後、0.45mのフィルターにて濾過を行った。さらに30mlの濾過細胞上清ウイルス液に10mlのポリエチレングリコール6000を主成分とするウイルス濃縮溶液を加えた。4℃で一晩静置し沈殿を形成させた後に3500rpmにて1時間遠心分離を行った。得られた組み換えウイルスペレットを1.5mlのCondition 1もしくはCondition 2の培養液にてサスペンドし感染用ウイルス液とした。これらの詳細な手法に関しては我々の過去の原著論文を参照していただきたい<sup>7)</sup>。

## 2.4 組み換えウイルスの感染および導入したEGFP遺伝子の発現の検出

得られた初代培養肝臓細胞を3.5cmプラスチックディッシュあたり1 X 10<sup>5</sup>細胞播種した。翌日、感染用ウイルス溶液を曝露し37℃に設定したCO<sub>2</sub>インキュベーター内で24時間感染を行った。感染後48時間後にオリンパス社蛍光顕微鏡FSX100にてEGFPの蛍光を検出した。

## 3. 結果および考察

Condition 1 およびCondition 2 で培養を行った。図1に培養開始後72時間目の画像を示す。Condition 1においては大型の核を持ち、磨りガラス状の細胞質を持つ肝臓細胞と考えられる細胞が出現した (図1 白矢印)。この細胞は増殖を継続した。しかしCondition 1によって得られた細胞群はアキュターゼによって酵素処理を行い剥離したところ、細胞の接着が行われることはなく継代が不可能であった。この現象は細胞分散に0.05%のトリプシンを用いても同様であった。

Condition 2で培養を行ったところ、大型の核

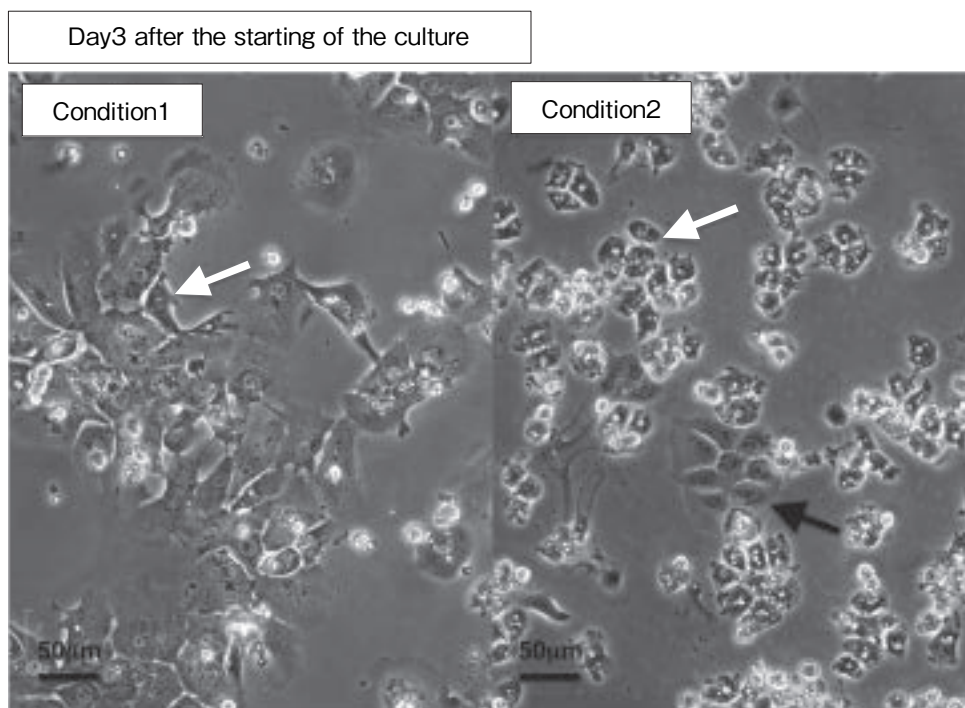


図1 培養開始後72時間後の肝臓由来細胞の形態

左側がCondition 1, 右側がCondition 2で培養を行ったもの。白矢印は磨りガラス状の細胞質を持つ細胞群, 黒矢印は上皮様コロニーを形成した細胞群を示す。

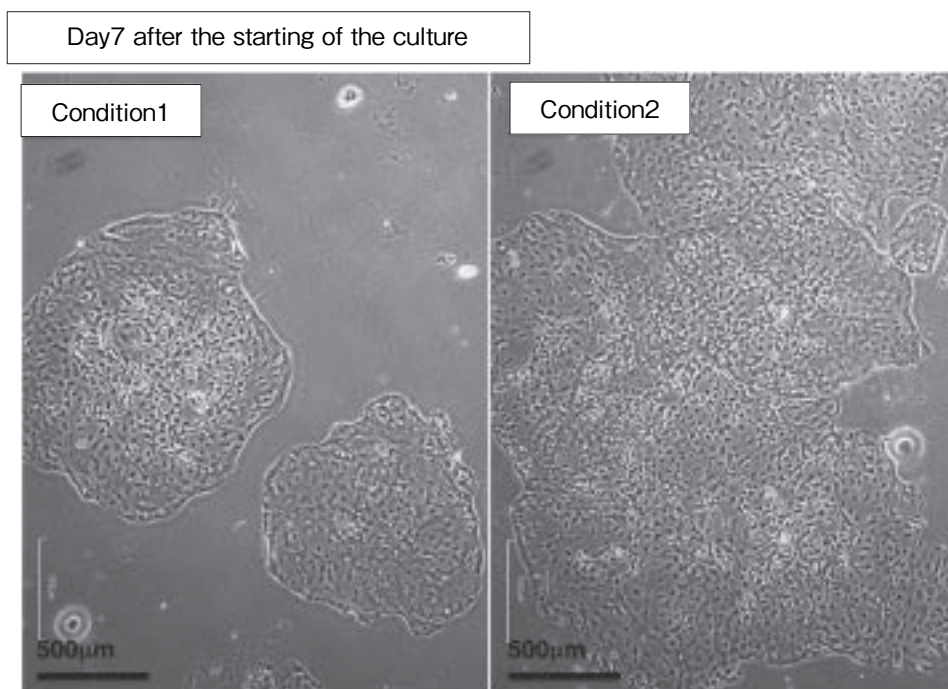
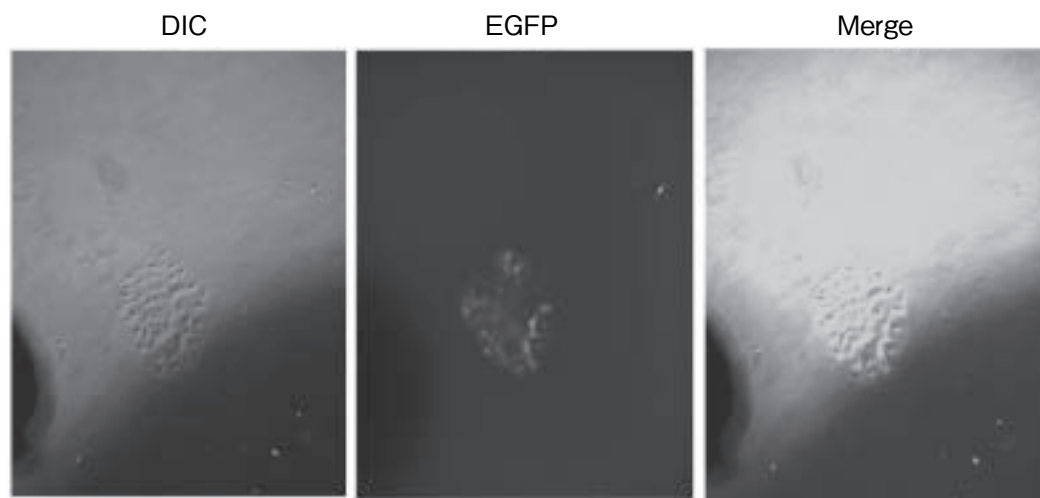


図2 培養開始後, 1週間目に認められた細胞コロニーの形態



**図3** EGFPを発現する組み換えレトロウイルス感染後の位相差および蛍光観察像  
DIC：位相差における細胞像，EGFP：蛍光管撮像，Merge：DICおよびEGFPの像の重ね合わせ。

を持ち磨りガラス状の細胞質を持つCondition 1で得られたものと同様の細胞が得られた。しかし驚くべきことに培養72時間目から、Condition 1で得られたものとは明らかに異なる形態を示す細胞群が出現した。この細胞群は島状のコロニーを形成した。加えて出現した島状のコロニーはアキュターゼによる細胞分散後も接着し、細胞の継代が可能であった。

その後、培養開始後7日目のコロニー像を示す(図2)。Condition 1では既に細胞が継代不可能な状況に達しているため結果を割愛する。一方、Condition 2では島状に細胞がさかんに増殖し、上皮様の細胞から構成されるコロニーを形成していた。

さらに驚くべきことにそれらのコロニーを構成する細胞の形態を観察すると、発生初期の肝臓に認められる二核細胞が認められた(図3)。またコロニーの内部には脂肪滴の貯留も観察された。これらの細胞集団は形態学的にある程度肝臓の細胞の機能を保持していると考えられた。

さらに無限分裂細胞を樹立するため、遺伝子導

入のための検討を行った。EGFPを発現するレトロウイルスを感染させ48時間後に観察した像が図3である。興味深いことにレンチウイルスによる感染を行ったがまったく遺伝子導入は認められなかった。一方、VSV-Gを表面蛋白として発現するレトロウイルスの場合、数パーセントであるが遺伝子導入を認めた。図3に示すように蛍光を発するコロニーの出現を認めた。さらに遺伝子導入の効率を高めることが必要であるが、本研究はウシ由来初代肝臓細胞に遺伝子導入を行った初めての試みである。

従来まで行われていたウシ由来の初代肝臓細胞の培養は、いわば一回実験に使用すれば再使用が不可能な不安定なものであった。実験に用いる肝臓細胞は毎回動物を屠殺し、組織を灌流する必要がある。このような条件では実験操作における大きな誤差が含まれ、実験の再現性を得ることは難しい。加えて実験の回数分動物を屠殺する必要があり動物愛護上、研究のコスト削減上でも安定的に細胞継代できる肝臓細胞の初代培養技術が求められている。本研究で得られた肝臓細胞は従来

のものと細胞形態が異なり、島状に増殖する細胞集団を構成した。肝臓には組織学的に様々な細胞が含まれることが知られている。肝臓を構成する肝実質細胞や類洞上皮細胞、胆管上皮細胞、オパール細胞、クッパー細胞などである。本研究において得られた細胞が組織内のどの細胞に由来するか同定するためには今後の解析を待たなければならない。しかし細胞の形態から、肝臓細胞に特徴的な二核細胞の出現や脂肪滴の貯留が認められた。二核細胞は若齢の個体においてよく認められる状態であり、加えて肝臓細胞は脂肪滴を貯留しエネルギー代謝の中心臓器としての役割を果たすことが知られている。このことから我々が本研究で樹立した細胞は肝実質由来細胞である可能性が存在する。

加えて我々はEGFPを発現する組み換えウイルスを使用し、遺伝子導入のための条件の最適化を行った。レンチウイルスとレトロウイルスを使用した。レンチウイルスにおいては遺伝子導入を認めなかった。一般にレンチウイルスは細胞の分裂、非分裂状態に関わらず遺伝子導入が可能であるが、レトロウイルスは核膜を通過する能力がないために分裂細胞にしか導入できないとされている。本研究における結果はいわばまったく逆の状態となった。今回使用したレトロおよびレンチウイルスは表面蛋白として共通のVSV-G遺伝子を使用している。肝臓由来の細胞においては組み換えウイルスによる導入の効率が大きく異なる可能性がある。

我々は今後、ウシ由来の肝臓細胞を無限分裂に導くために、変異型CDK4, Cyclin D, TERTを導入する予定である。細胞は老化するに従い、p16と呼ばれる加齢性タンパク質が蓄積する。このタンパク質はCDK4タンパク質に結合し、CDK4-CyclinD複合体の活性化を阻害する。CDK4-CyclinD複合体は細胞周期においてG1-Sに突入す

るために最も重要な回転力を生む分子群であるので、p16の蓄積は細胞周期の停止を誘導する。しかしこのp16とCDK4の結合にはCDK4の24番目のアミノ酸が重要なはたらきをしており、変異型CDK4は老化タンパク質であるp16の結合による抑制を受けない<sup>8)</sup>。したがって変異型CDK4およびCyclin Dを発現させた場合、細胞増殖が著名に加速されることになる。

我々は従来の研究において、ヒト由来変異型CDK4およびCyclin Dの発現によってウシおよびブタ由来の細胞であっても無限に分裂が可能になることを見出した。この基本原理は肝臓細胞においても同様であり、本手法の適用によって家畜由来の肝臓細胞の無限分裂が可能になると考えられる。

#### 4. 要 約

肝臓は様々な脂肪代謝、エネルギー代謝を司る重要な臓器である。加えて肝臓は家畜においてE型肝炎を代表とする感染症の標的臓器でもある。これらの肝臓の重要な機能を詳細に研究するためには試験管内での培養細胞の樹立が有用であるが、従来までにウシ、ブタ由来の安定的に維持できる肝臓由来細胞の樹立の報告はない。

我々は異なる2種類の条件でウシ由来肝臓細胞の培養を試みた。従来から報告のあったCondition 1および新たに我々が行ったCondition 2である。Condition 1では従来と報告と同様に肝実質由来と考えられる細胞の増殖を認めたが、酵素処理による細胞分散および継代は不可能であった。一方、Condition 2では島状に増殖する特殊な細胞形態を示す細胞群が出現した。この島状に増殖する細胞群は二核や脂肪滴の蓄積を認め、肝臓細胞としての性質を一部保持していると考えられた。さらにこれらの細胞を無限分裂細胞へ誘導するためにEnhanced Green Fluorescence

Protein (EGFP) を発現する組み換えレトロウイルスを導入した。今後導入効率の改善が必要であるが、EGFP蛍光タンパク質を発現するコロニーの出現を認めた。今後変異型CDK4, Cyclin D遺伝子を導入する予定である。

#### 文 献

- 1) Nishizawa, T., Takahashi, M., Endo, K., Fujiwara, S., Sakuma, N., Kawazuma, F., Sakamoto, H., Sato, Y., Bando, M., Okamoto, H. : Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from wild boars in Japan, *J Gen Virol*, **86**, 3321~3326, 2005.
- 2) Hayflick, L., Moorhead, P. S. : The serial cultivation of human diploid cell strains, *Exp Cell Res*, **25**, 585~621, 1961.
- 3) Knowles, B. B., Howe, C. C., Aden, D. P. : Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen, *Science*, **209**, 497~499, 1980.
- 4) Shiomi, K., Kiyono, T., Okamura, K., Uezumi, M., Goto, Y., Yasumoto, S., Shimizu, S., Hashimoto, N. : CDK4 and cyclin D1 allow human myogenic cells to recapture growth property without compromising differentiation potential, *Gene Ther*, **18**, 857~866, 2011.
- 5) Donai, K., Kiyono, T., Eitsuka, T., Guo, Y., Kuroda, K., Sone, H., Isogai, E., Fukuda, T. : Bovine and porcine fibroblasts can be immortalized with intact karyotype by the expression of mutant cyclin dependent kinase 4, cyclin D, and telomerase. *Journal of biotechnology*, **176**, 50~57, 2014.
- 6) Katoh, N., Miyamoto, T. : Protein kinase C and its endogenous substrate proteins in isolated cow liver parenchymal cells, *J Vet Med Sci*, **55**, 481 ~ 483, 1993.
- 7) Donai, K., Kuroda, K., Guo, Y., So, K. H., Sone, H., Kobayashi, M., Nishimori, K., Fukuda, T. : Establishment of a reporter system to monitor silencing status in induced pluripotent stem cell lines, *Analytical biochemistry*, **443**, 104~112, 2013.
- 8) Kuroda, K., Kiyono, T., Eitsuka, T., Isogai, H., Takahashi, K., Donai, K., Isogai, E., Fukuda, T. : Establishment of cell lines derived from the genus macaca through controlled expression of cell cycle regulators, *Journal of cellular biochemistry*, **116**, 205 ~211, 2015.

## 牧草由来の機能性成分を用いた初乳中免疫グロブリンの改善方法の開発

Effects of functional components in grass on enhancing immunoglobulin in colostrum

久米新一・王 蒙東・谷口紗耶

(京都大学大学院農学研究科)

Shinichi Kume, Mengdong Wang and Saya Taniguchi

(Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

Passive immunity is critical to the survival and health of neonates, and colostrum is a source of nutrients and immune components for neonatal calves. An adequate immune system is required to prevent diarrhea in neonates, and colostral IgG and IgA of cows provide protection against microbial antigens. Data from 19 Japanese Black multiparous cows were collected to clarify the relationships among IgG, IgA,  $\beta$ -carotene, vitamin A and  $\alpha$ -tocopherol contents in colostrum of cows in order to evaluate the role of fat-soluble vitamins on colostral IgG and IgA production. Mean colostral IgG was 141mg/mL, ranging from 65 to 208mg/mL, whereas mean colostral IgA was 8.7mg/mL, ranging from 1.0 to 34.6mg/mL. Colostral IgG increased with aging in multiparous cows. There were positive correlations between colostral IgG and colostral vitamin A or colostral  $\alpha$ -tocopherol in cows, and the higher adjusted  $R^2$  was obtained in the prediction model of colostral IgG from age and colostral vitamin A. Colostral vitamin A was positively correlated with colostral  $\beta$ -carotene or colostral  $\alpha$ -tocopherol in cows, but there were no relationships between colostral IgA and colostral IgG or colostral fat-soluble vitamins. These results indicate that fat-soluble vitamin contents in colostrum of cows may be changed in similar patterns and high colostral vitamin A is related with high colostral IgG. Also, supplemental  $\alpha$ -tocopherol may be useful to increase the IgA antibody-secreting cells in the jejunum in lactating mice.

### 1. 目 的

わが国の肉用牛経営では規模拡大や生産性向上が急速に進んでいるものの、下痢などによる子牛の損耗増加は黒毛和種繁殖経営に多大な経済的損失をもたらしている。代表研究者らは、農林水産省の実用技術開発事業で「ホエー代用乳を用いた

近畿産ブランド和牛のほ乳期発育改善」を実施し、黒毛和種子牛の発育改善と疾病予防に適した新たな人工ほ乳技術を開発した。しかし、黒毛和種子牛には初乳由来の免疫グロブリンG (IgG) と免疫グロブリンA (IgA) が不足して、下痢の発生するケースが多数認められたため、母乳からの免疫成分の移行を高める方法を開発して、下痢



などの疾病を予防することが重要と考えられた。

飼料中には栄養素だけでなく、家畜の生理機能や免疫機能を高める機能性成分が含まれているため、子牛の下痢予防では飼料中の機能性成分を活用することが効果的である。特に、安全・安心な牛肉生産では抗生物質などの使用量低減が求められるが、機能性成分を活用した下痢などの疾病予防方法の開発は抗生物質の使用量低減を可能にする。また、草食動物である牛は牧草中に豊富に含まれている $\beta$ -カロテンやビタミンEなどを有効利用して健康を維持しているが、筆者らは $\beta$ -カロテンによる新生子牛の下痢予防効果を見いだした<sup>1)</sup>。しかし、黒毛和種繁殖牛に良質の牧草が給与されない場合には初乳中の $\beta$ -カロテンなどが不足して、子牛の下痢発生率を高めることが危惧された<sup>2)</sup>。

そこで、平成25年度には牧草主体に飼養した黒毛和種繁殖牛9頭から初乳を採取し、初乳中IgG、IgA、 $\beta$ -カロテン、ビタミンAおよびビタミンE含量を調べたところ、初乳中脂溶性ビタミン含量間に正の相関が認められただけでなく、初乳中ビタミンAとIgG間にも正の相関が認められたため、繁殖牛のビタミン栄養の改善が初乳中IgG含量の増加に効果的なことが示唆された。また、みかんに豊富に含まれている $\beta$ -クリプトキサンチンを泌乳マウスに給与したところ、空腸のIgA産生細胞数と乳腺、空腸および回腸のIgAのmRNA発現量が増加したことから、 $\beta$ -クリプトキサンチンには $\beta$ -カロテンと類似した腸管免疫改善効果が認められた。しかし、黒毛和種繁殖牛の初乳サンプルを増やして精度を高めることと、飼料由来の機能性成分の給与による初乳中免疫グロブリンの改善方法の開発が課題として残された。

以上のことを踏まえて、本研究では平成25年度と同様に黒毛和種繁殖牛の初乳を採取し、初乳中のIgG、IgA、免疫グロブリンM (IgM)、 $\beta$ -カロ

テン、ビタミンAおよびビタミンE含量を調べ、黒毛和種繁殖牛の初乳中免疫グロブリンの改善のための基礎データを得る。また、牧草中に豊富に含まれているビタミンEを妊娠・泌乳マウスに給与し、母乳中のIgA産生の作用機序を解明する。

## 2. 方法

### 2.1 黒毛和種繁殖牛の初乳中免疫グロブリンと脂溶性ビタミンの関係

試験には、京都大学附属牧場で分娩した黒毛和種経産牛19頭を用いた。分娩前の牛には日本飼養標準の繁殖牛のTDN要求量を満たすように、フスマ2 kg/日とイタリアンライグラスサイレージ、スーダングラスサイレージなどを給与し、分娩直後に初乳を約100ml採取した。初乳中のIgG、IgAおよびIgM含量をELISA法で、 $\beta$ -カロテン、ビタミンAおよびビタミンE含量を高速液体クロマトグラフ法で測定し、初乳中の機能性成分( $\beta$ -カロテン、ビタミンAとビタミンE)と免疫グロブリン(IgGとIgA)の相関関係などをSASで解析した。さらに、黒毛和種繁殖牛の分娩前の体重と健康状態、その子牛の分娩時の体重と事故・疾病などの発生状況を調査した。

### 2.2 泌乳マウスの免疫グロブリン産生におけるビタミンEの影響

ICR系妊娠マウス15匹を対照区および $\alpha$ -トコフェロール区に割り当て、交配後6.5日目から分娩後14日目まで $\alpha$ -トコフェロールを飼料に添加(120ppm)して給与した。仔マウスは、分娩2日後に雌雄各5匹ずつに間引きした。妊娠マウスと新生仔マウスの体重と飼料摂取量は毎日測定し、分娩14日後に泌乳マウスからは血液、空腸、回腸および乳腺を、また新生仔マウスからは血液、胃内容物、小腸および糞を採取した。血清、胃内容物、小腸、糞などのIgA濃度はELISA法で、小腸と乳腺のIgA産生細胞数の計測は免疫染色法で、

小腸と乳腺のIgA産生に関連する遺伝子の発現 (IgA C-region) はRT-PCR法で調べた。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 黒毛和種繁殖牛の初乳中免疫グロブリンと脂溶性ビタミンの関係<sup>3)</sup>

黒毛和種繁殖牛の初乳中の平均IgG含量 (範囲) は141mg/mL (65~208mg/mL), また初乳

中の平均IgA含量 (範囲) は8.7mg/mL (1.0~34.6mg/mL) とともに変動が大きかったが, 初乳中のIgG含量とIgA含量間には相関関係は認められなかった (Table 1)。初乳中IgG含量は加齢に伴って増加し ( $P < 0.01$ ), 初乳中のIgG含量は初乳中ビタミンA含量 ( $P < 0.01$ ) および初乳中 $\alpha$ -トコフェロール含量 ( $P < 0.05$ ) と正の相関が認められた (Fig. 1)。初乳中ビタミンA含量

Table 1 Correlation between IgG, IgA and fat-soluble vitamins in colostrum of Japanese Black multiparous cows (n=19).

|   | Mean  | SD    | Min.  | Max.   | r      |       |
|---|-------|-------|-------|--------|--------|-------|
|   |       |       |       |        | IgG    | IgA   |
| Age, months                                   | 72.7  | 23.5  | 34.0  | 118.3  | 0.68** | 0.25  |
| Gestation length, days                        | 287.7 | 4.6   | 277.0 | 296.0  | 0.32   | 0.37  |
| Colostrum                                     |       |       |       |        |        |       |
| $\beta$ -carotene, $\mu\text{g}/\text{dL}$    | 125.7 | 56.0  | 40.0  | 221.0  | 0.35   | -0.07 |
| Vitamin A, $\mu\text{g}/\text{dL}$            | 490.5 | 259.4 | 69.0  | 1096.0 | 0.66** | -0.01 |
| $\alpha$ -tocopherol, $\mu\text{g}/\text{dL}$ | 963.2 | 554.3 | 117.0 | 2606.0 | 0.53*  | 0.17  |
| IgA, mg/mL                                    | 8.7   | 9.7   | 1.0   | 34.6   | 0.32   | —     |
| IgG, mg/mL                                    | 140.9 | 32.2  | 65.0  | 208.0  | —      | —     |

\*\*  $P < 0.01$ , \*  $P < 0.05$ .

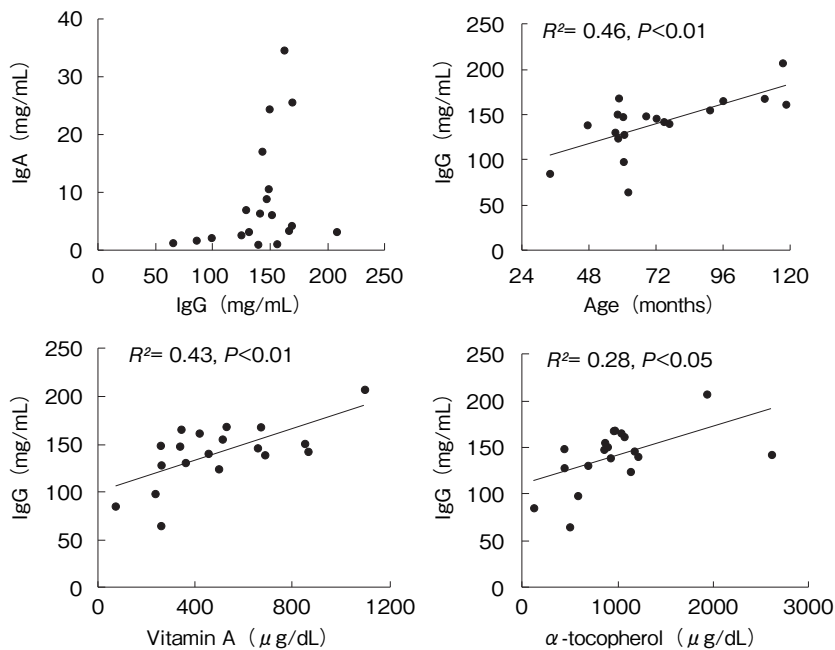


Fig. 1 Relationships between colostrum IgG and colostrum IgA, vitamin A,  $\alpha$ -tocopherol or age in Japanese Black multiparous cows (n=19).

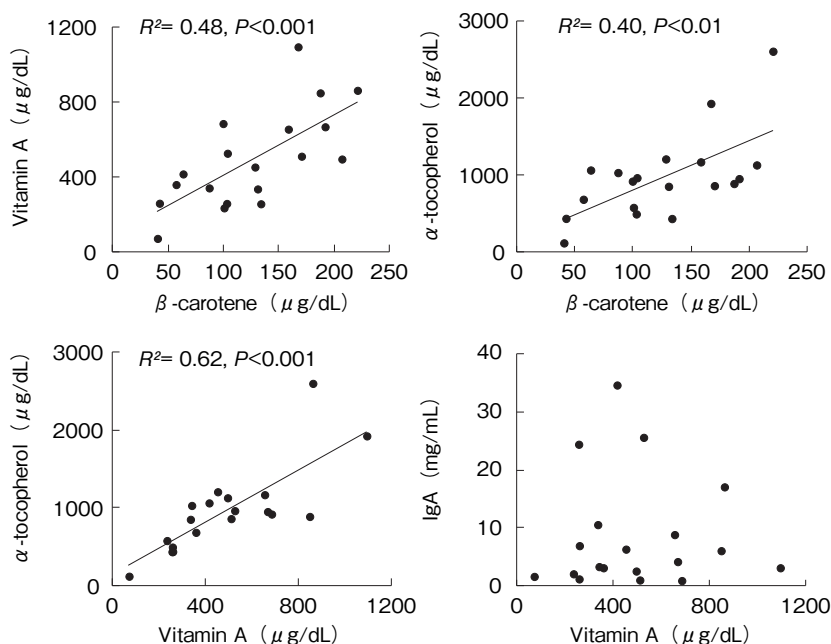


Fig. 2 Relationships between colostrum  $\beta$ -carotene and colostrum vitamin A or  $\alpha$ -tocopherol and relationships between colostrum vitamin A and colostrum  $\alpha$ -tocopherol or IgA in Japanese Black multiparous cows ( $n=19$ ).

は初乳中 $\beta$ -カロテン含量 ( $r=0.69$ ;  $P<0.001$ ) および初乳中 $\alpha$ -トコフェロール含量 ( $r=0.78$ ;  $P<0.001$ ) と正の相関が認められたが、初乳中のIgA含量と脂溶性ビタミン含量間には相関関係は認められなかった (Fig. 2)。また、初乳中のIgG含量は年齢と初乳中ビタミンA含量を変数にした重回帰式から精度良く推定できた。

以上の結果から、黒毛和種経産牛の初乳中の脂溶性ビタミン含量は給与粗飼料によって大きく変動したが、黒毛和種経産牛の初乳中脂溶性ビタミン含量間に正の高い相関が認められたことから、牧草サイレージ主体で飼養した黒毛和種経産牛では初乳中脂溶性ビタミン含量が同様なパターンで変動することが推察された。また、初乳中ビタミンA含量と $\alpha$ -トコフェロール含量が高いと初乳中のIgG含量も高くなったことから、高品質サイレージ給与は初乳中IgG含量の増加に貢献することが示唆された。

一方、黒毛和種経産牛の初乳中IgM含量 (範囲) は $9.7\text{mg/mL}$  ( $1.2\sim 22.2\text{mg/mL}$ ) であり、IgA含量と同様に変動が大きかった。牛の初乳中に豊富に含まれている免疫成分はIgGであり、新生子牛の血清IgG濃度が $10\text{mg/mL}$ 以下になると子牛の致死率が上昇する。また、初乳中のIgAは腸管内腔の抗原の捕捉や腸管壁からの抗原の侵入防止など、子牛の腸管免疫の主要な機能を担っている。しかし、初乳中のIgMの役割についてはほとんど調べられていないため、今後は黒毛和種繁殖牛の初乳中IgG、IgAおよびIgMの関係を調べる必要がある。

### 3.2 免疫グロブリン産生における $\alpha$ -トコフェロールの作用機序の解明

泌乳マウスの増体率および飼料摂取量と新生仔マウスの増体率には $\alpha$ -トコフェロール給与による影響は認められなかった。 $\alpha$ -トコフェロール給与で泌乳マウスの空腸におけるIgA産生細胞数

が増加した ( $P < 0.05$ ) が、泌乳マウスの乳腺と回腸におけるIgA産生細胞数には影響しなかった。泌乳マウスの血清IgA濃度と新生仔マウスの血清、胃内容物、小腸および糞中のIgA濃度ならびに泌乳マウスの空腸、回腸および乳腺におけるIgA mRNA発現量には、 $\alpha$ -トコフェロール給与による影響は認められなかった。

以上の結果から、 $\alpha$ -トコフェロールを120ppm給与すると泌乳マウスの空腸におけるIgA産生細胞数が増加したことから、 $\alpha$ -トコフェロールには腸管免疫改善効果のあることが推察された。黒毛和種経産牛でも初乳中のIgG含量と初乳中 $\alpha$ -トコフェロール含量間に正の相関が認められたことから、 $\alpha$ -トコフェロール給与は子牛の下痢予防に効果的なことが示唆される。

#### 4. 要 約

初乳中の免疫グロブリン産生に及ぼす脂溶性ビタミンの役割を明らかにするために、黒毛和種経産牛19頭の初乳中IgG、IgA、 $\beta$ -カロテン、ビタミンAと $\alpha$ -トコフェロールの関係を調べた。初乳中のIgG含量とIgA含量は変動が大きかったが、初乳中のIgG含量は加齢に伴って増加した。初乳中のIgG含量は初乳中ビタミンA含量および $\alpha$ -

トコフェロール含量と正の相関が認められ、初乳中のIgG含量は年齢と初乳中ビタミンA含量を変数にした重回帰式から精度良く推定できた。初乳中ビタミンA含量は初乳中 $\beta$ -カロテン含量および $\alpha$ -トコフェロール含量と正の相関が認められたが、初乳中のIgA含量は初乳中のIgG含量あるいは脂溶性ビタミン含量と相関関係が認められなかった。以上の結果から、黒毛和種経産牛の初乳中脂溶性ビタミン含量は同様なパターンで変動し、初乳中ビタミンA含量が高いと初乳中のIgG含量も高くなることが推察された。また、 $\alpha$ -トコフェロールを120ppm給与すると泌乳マウスの空腸におけるIgA産生細胞数が増加したことから、 $\alpha$ -トコフェロールには腸管免疫改善効果のあることが推察された。

#### 文 献

- 1) Kume, S., Toharmat, T. : *Livestock Production Science*, **68**, 61~65, 2001.
- 2) Nishiyama, Y., Yasumatsuya, K., Kasai, K., Sakase, M., Nishino, O., Akaike, M., Nagase, T., Sugimoto, M., Ikeda, S., Kume, S. : *Livestock Science*, **137**, 95~100, 2011.
- 3) Wang, M., Ikeda, S., Yoshioka, H., Nagase, H., Kitamura, S., Itoyama, E., Murakami, H., Sugimoto, M., Kume, S. : *Animal Science Journal*, **86**, 673~678, 2015.

## スカトールによる胆汁酸代謝の攪乱： ヒト・家畜の健康維持を目指したその制御

Dysregulation of bile acid metabolism by skatole : Control of the regulation  
towards health promotion in both humans and livestock

石塚 敏・清水 英寿

(北海道大学大学院農学研究院)

Satoshi Ishizuka and Hidehisa Shimizu

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

Excess intake of animal proteins is involved in a variety of disease pathogenesis. However, the mechanisms responsible for the pathogenesis remain to be elucidated. We investigated the relationship between skatole, an enterobacterium-derived dietary protein metabolite, and bile acid metabolism. Male SD rats were fed a diet supplemented with or without skatole for 4 weeks. The dietary intervention did not affect the food intake, body weight, and some organ weights including liver, kidney, and adipose tissues. The ingestion of skatole elevated total and secondary bile acid concentrations in the feces, especially deoxycholic acid-related bile acids. There is a trend to increase the amount of cholic acid and the taurine-conjugates in the portal vein of the skatole-fed rats. There was a promotion of *Cyp7a1* expression, the rate-limiting enzyme of bile acid synthesis, in the liver of the skatole-fed rats. An increase of skatole concentration by excess consumption of animal proteins is considered to be a responsible factor for propagation of secondary bile acid concentrations in the gastrointestinal tract, which might be involved in subsequent liver and colorectal carcinogenesis.

### 1. 目 的

近年、高脂肪食摂取による生活習慣病患者の増加が問題となっており、多様な病態を併発するメタボリックシンドロームが注目されている。高脂肪食摂取では糞中の胆汁酸量の増加が見られ、肥満では腸内細菌叢の攪乱が報告されている。胆汁酸は、脂質の吸収に必要な胆汁成分であり、脂質の過剰摂取や加齢により胆汁酸の分泌量が増大することが知られている。主要な一次胆汁酸である

コール酸から、腸内細菌により生成される二次胆汁酸であるデオキシコール酸（DCA）が、肝臓の発症に関与する<sup>1)</sup>。胆汁酸には多様な分子種があり、動物種により代謝経路が異なる。そこで、胆汁酸代謝の全貌を理解するために、各臓器等からの抽出法と、抱合体を含む約30種類の分子種を一斉分析する方法を確立した<sup>2)</sup>。生体内の様々な部位の胆汁酸を網羅的に解析することで、特定の飼料を摂取した場合での胆汁酸代謝の評価を可能にした。さらに我々は、胆汁酸が腸内細菌叢の調

節因子であることを見いだした<sup>3)</sup>。

一方、高タンパク質食を摂取することにより、タンパク質由来のトリプトファン代謝物の産生が増加することが知られている。タンパク質由来の腸内細菌トリプトファン代謝物には、インドール系の化合物であるスカトール（3-メチルインドール）が含まれる。スカトールは、糞便臭や豚肉の臭みの原因として知られる物質であることが以前から知られている。近年、スカトールが、胆汁酸合成抑制に関わる farnesoid X receptor (FXR) の活性を抑制するのみならず逆向きに亢進するインバーサゴニストであることが報告された<sup>4)</sup>。また、男性ホルモンであるアンドロステロンが、肝臓におけるスカトール代謝を抑制することが知られており<sup>5)</sup>、これが豚肉の臭みの原因となりうることが示されている。

これらの状況を踏まえると、スカトールが体内で増加する状況では、胆汁酸合成の超過によるFXRを介したネガティブフィードバックによる抑制がかからず、胆汁酸分泌が増大し続ける可能性が考えられる。一次胆汁酸分泌量の増加は、結果的にコレステロール排泄を増大すると期待される。しかしながら、過剰な胆汁酸が消化管腔内に分泌されると、管腔内における腸内細菌の作用により二次胆汁酸であるDCAを増やすことになり、消化管粘膜のバリア機能の脆弱化、肝障害・肝癌のリスクなどを増大させることになる。

そこで本研究では、食品タンパク質由来トリプトファンの消化管内代謝産物であるスカトールに着目し、腸内で増加したスカトールが胆汁酸代謝に及ぼす作用を解析した。

## 2. 方 法

### 実験1

Sprague-Dawley系ラット（5週齢雄性）にAIN-93Gに準拠した基本飼料を与え5日間の予

備飼育後、基本飼料を摂取させた対照群（ $n = 8$ ）、0.025%および0.05%スカトールを含む飼料を摂取させた試験群（それぞれ $n = 7$ ,  $n = 8$ ）として4週間の試験期間を設定し、飼料は自由摂取とした。試験期間終了時に採糞を行い、糞中胆汁酸組成をLC/MSで分析した。また、解剖時に肝臓を採取してリアルタイムPCRを用いて胆汁酸生合成関連因子の遺伝子発現解析を実施した。

### 実験2

試験群を対照群（ $n = 10$ ）および0.025%スカトール添加食群（ $n = 11$ ）とする以外は実験1と同様な実験条件として飼育を行い、試験期間終了時での糞、門脈血、肝臓および消化管内容物を採取して胆汁酸組成を分析した。

## 3. 結果と考察

### 実験1

摂食量、体重、肝重量、腎重量、各種脂肪重量に群間差は見られなかった。スカトール添加食群ではいずれも糞中総胆汁酸および二次胆汁酸の濃度が有意に増加した（Fig. 1）。中でもDCAとその類縁体である12-オキシリトコール酸（12oLCA）および3-オキシ-12 $\alpha$ -5 $\beta$ コラン酸（3o12 $\alpha$ ）が有意に増加していた。ラットにおける一次胆汁酸としてはコール酸と、ケノデオキシコール酸から合成される複数のミュリコール酸分子種が知られている。スカトールの摂取ではこれらのミュリコール酸分子種の濃度に有意な群間差が観察されなかったことから、スカトールによる胆汁酸分泌量の増大は主にコール酸の分泌増加によるものと考えられた。肝臓における胆汁酸生合成関連因子の発現解析を行ったところ、12 $\alpha$ 胆汁酸の合成に関わる*Cyp8b1*発現に有意差は見られなかったものの、胆汁酸合成の律速酵素である*Cyp7a1*の発現が0.025%スカトール群で有意に増加した（Fig. 2）。このことから、スカトール摂

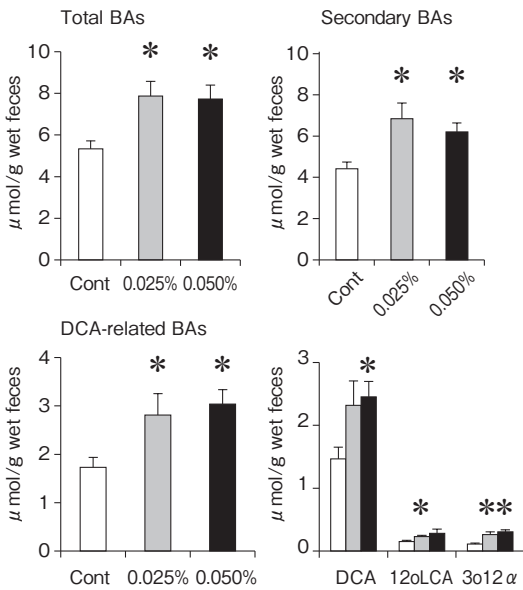


Fig.1 Fecal bile acids in the rats fed skatole-supplemented diet. The values are means  $\pm$  SEM, n = 7 or 8. Asterisks show significant difference from control.

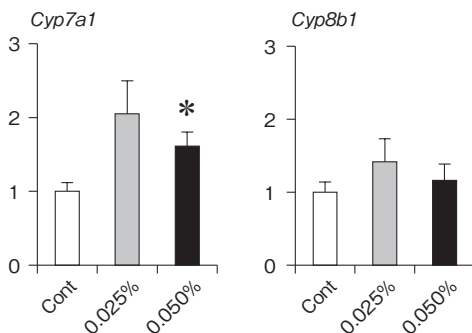


Fig.2 Liver cyp7a1 and cyp8b1 expressions in the rats fed skatole-supplemented diet. The values are means  $\pm$  SEM, n = 7 or 8. Asterisks show significant difference from control.

取による糞中胆汁酸濃度の増加は、肝臓における胆汁酸合成の増加によるものと推察された。

## 実験 2

スカトールの添加濃度を0.025%として、ラット体内の胆汁酸代謝を網羅的に解析した。その結果、消化管内ではスカトール摂取群の回腸内容物

で総胆汁酸量が増加する傾向を示した (Fig. 3)。また、胆汁酸が多量に吸収されると考えられる門脈血でも、スカトール群で総胆汁酸濃度が増加する傾向が見られた。また糞では、前述のDCA関連胆汁酸濃度が有意に増加した。

スカトールは、食品タンパク質中のトリプトファンに由来することから、高タンパク質食の摂取により体内で増えうる。一方で、スカトールは食肉の臭みの原因とされていることから、状況次第では食肉に含まれるスカトールを直接人間が摂取する可能性が考えられる。このような、体内でのスカトール濃度の増加が、結果としてコール酸やDCAに代表される12 $\alpha$ 胆汁酸の体内での増加に関わることが示された。このことは、食肉由来の成分が人の代謝性疾患に大きく関与することを示すだけでなく、家畜の代謝を健全に保つことが人の健康維持にも繋がることを示している。

## 4. 要 約

動物性タンパク質の過剰摂取は、多様な生活習慣病の発症に関わることが知られている。しかし、この病態発症に関わるメカニズムは未だに不明な点が多い。我々は、動物性タンパク質の過剰摂取によって腸内細菌により産生されるスカトールが胆汁酸に及ぼす影響について検証した。Sprague-Dawley系雄性ラットを、対照群とスカトール摂取群に分け、4週間の試験飼育後に解剖を行った。スカトール摂取は、摂食量、体重、肝重量、腎重量、各種脂肪重量に影響しなかった。糞中胆汁酸量をLC/MSで測定をしたところ、糞中の二次胆汁酸量が増加した。特に、二次胆汁酸の一種であるデオキシコール酸とその関連胆汁酸分子種の濃度が著明に上昇した。また門脈血では、コール酸と肝臓におけるコール酸の抱合体であるタウロコール酸の増加傾向が観察された。肝臓で発現している胆汁酸合成の律速酵素である

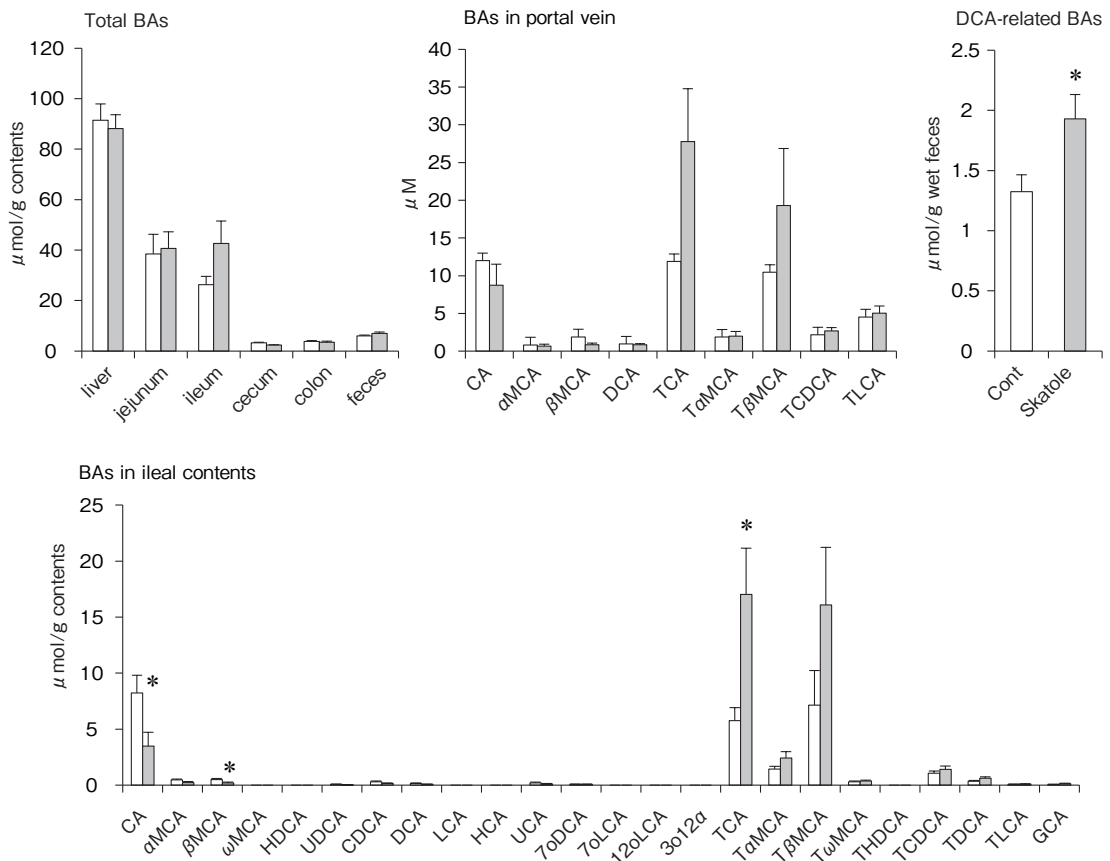


Fig.3 Bile acids in the liver, gastrointestinal contents, and feces in the rats fed skatole-supplemented diet. The values are means  $\pm$  SEM, n = 7 or 8. Asterisks show significant difference from control.

*Cyp7a1*の発現量を確認したところ、スカトール摂取群において上昇が観察された。動物性タンパク質の過剰摂取がもたらすスカトールの増加は、消化管内での二次胆汁酸の濃度上昇を招き、結果として肝臓や大腸での発がんに関与する可能性が示された。

#### 文 献

- 1) Yoshimoto, S., Loo, T. M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S., Iwakura, Y., Oshima, K., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., Ishikawa, Y., Hara, E., Ohtani, N.: *Nature*, **499**, 97~101, 2013.
- 2) Hagio, M., Matsumoto, M., Fukushima, M., Hara, H., Ishizuka, S.: Improved analysis of bile acids in tissues and intestinal contents of rats using LC/ESI-MS, *J Lipid Res*, **50**, 173~80, 2009.
- 3) Islam, K. B., Fukiya, S., Hagio, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Yokota, A.: Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats. *Gastroenterology*, **141**, 1773~81, 2011.
- 4) Gray, M. A., Pollock, C. B., Schook, L. B., Squires, E. J.: Characterization of porcine pregnane X receptor, farnesoid X receptor and their splice variants, *Exp Biol Med (Maywood)*, **235**, 718~36, 2010.
- 5) Gray, M. A., Squires, E. J.: Effects of nuclear receptor transactivation on boar taint metabolism and gene expression in porcine hepatocytes, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **133**, 110~9, 2013.



## 肉牛用発酵TMRの飼料特性の評価

Estimation of feed characteristics of fermented total mixed ration for  
beef cattle

齋藤早春

(地方独立行政法人北海道立総合研究機構農業研究本部畜産試験場)

Waka Saito

(Hokkaido Research Organization, Agriculture Research Department, Animal Research Center)

This study aimed to investigate chemical composition and fermentation quality of fermented total mixed ration (TMR) for beef cattle, and its palatability and digestibility in beef cattles. Grass silage (GS) based TMR for growing beef cattle produced butyric acid after ensiling, and the fermentation quality of corn silage (CS) based TMR for fattening beef cattle were good after ensiling. The palatability of GS based fresh TMR was significantly higher than that of fermented TMR ( $P < 0.01$ ), whereas the treatments showed no significant effect on the feed intake in the digestion trial. There was some difference on the rumen fermentation between the GS and CS based TMR, while the apparent digestibility and nitrogen utilization showed no differences between the treatments. In addition, total digestible nutrients content showed similar value. In conclusion, deterioration of fermentation quality and energy losses by fermentation were not observed between on GS and CS based TMR designed for beef cattle, therefore they were useful feed to beef cattle.

### 1. 目 的

近年の濃厚飼料価格高騰を背景に、自給飼料を活用した飼料給与体系の構築が求められており、特に濃厚飼料への依存度が高い肉牛では急務の課題となっている。我々は、濃厚飼料が多給されている黒毛和種飼養体系において、栄養価の高い自給飼料である牧草サイレージ (GS) およびとうもろこしサイレージ (CS) を用いることにより、濃厚飼料給与量を削減し、かつ、慣行法と同等の発育および牛肉生産が可能であることを明らかに

してきた。しかしながら、肉牛生産農家ではサイレージ調製に必要な機械や施設等を保有していないことが多く、サイレージを自家生産するには新たな投資が必要となる。このことが、サイレージ給与体系への転換の大きな課題となっている。

近年、北海道では自給飼料生産の外部委託化が進み、自給飼料生産とサイレージ調製を行い、サイレージと濃厚飼料の混合飼料 (TMR: Total Mixed Ration) を複数の農家へ供給するTMRセンターの設置が進んでいる。地域に存在するTMRセンターを活用することで、肉牛生産農家

でも新たに投資することなく、サイレージを給与することが可能となる。

TMRセンターでは、TMRを毎日調製し地域農家へ配送しているが、調整後そのまま給与するフレッシュTMRは微生物が増殖しやすく貯蔵性が悪い。好気的変敗により品質が低下したTMRは、牛の採食性を著しく低下させる。フレッシュTMRの貯蔵性を高めるために開発された発酵TMRは、フレッシュTMRを密封容器で数週間発酵させたもので、長期間の保存が可能であり開封してからの好気的変敗が起こりにくい。発酵TMRの利用が可能となれば、一度に大量調製できるため、1日あたりの給与量が少なくても肉牛用TMRの調製が可能となり、肉牛生産農家でもTMRが利用できるようになる。

そこで、本研究では黒毛和種のGS主体TMRおよびCS主体TMRを発酵TMRとして調製、保存した場合の発酵品質や貯蔵前後の品質変動、嗜好性や消化性などの特性について検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 供試飼料

粗飼料は、2013年に当場で生産されたタワーサイロで調製したチモシー主体GSおよびCSを用いた。供試飼料は、育成用を想定したGS主体TMR (GSTMR)、肥育前期用および後期用を想定したCS主体TMR (CSTMR①およびCSTMR②) の3種類とした。各TMRの原料構成をTable 1に示した。発酵TMRの調製には、飼料混合用ミキサーおよびドラム缶サイロを用い、GSTMRは2014年4月9日、CSTMR①は2014年6月4日、CSTMR②は2014年7月30日に調製した。

### 2.2 発酵TMRの品質評価

各発酵TMRの貯蔵期間は、GSTMRが34、56および69日間、CSTMR①が36、48および57日間、CSTMR②が41、53、65および73日間とした。調

Table1 Ingredients of experimental diets(% DM)

|                     | GSTMR | CSTMR① | CSTMR② |
|---------------------|-------|--------|--------|
| Grass silage        | 50    | -      | -      |
| Corn silage         | -     | 60     | 40     |
| Steam rolled corn   | 35.4  | 29     | 35     |
| Steam rolled barley | -     | -      | 11     |
| Soybean meal        | 14.6  | 11     | 6      |
| Wheat bran          | -     | -      | 8      |

DM : dry matter

査項目は、一般成分および発酵品質とした。

### 2.3 発酵TMRの嗜好性評価

黒毛和種経産牛8頭を用い、単房で飼養した。嗜好性は採食速度法により調査し、調査期間は予備期3日および本期4日の計7日間とした。供試飼料の給与は、10:00から行い10分後の採食量を測定した。供試飼料の給与量は、乾物で2kg程度とした。給与場所による採食量の偏りをなくするため、供試飼料を入れたコンテナを1日ごとに左右入れ替えた。

### 2.4 発酵TMRの消化特性評価

ルーメンカニューレを装着した黒毛和種去勢牛4頭(開始時平均体重 $593 \pm 35$ kg)を用いて個別のタイストールに繋留した。試験は、全糞尿採取法による消化試験および窒素出納試験とし、1期14日間(予備期9日、本期5日)のクロスオーバー法で実施した。飼料給与量は、維持TDN要求量の110%相当量とし、朝夕2回(9:00と16:30)に分けて給与した。本期4日間において全糞および全尿を採取し、採取した糞および尿サンプルの一部を冷蔵保存した。各期最終日に冷蔵保存した糞および尿サンプルを一定割合で混合し、分析用サンプルとした。各期最終日の9:00、11:00、13:00、15:00、17:00、19:00にルーメンカニューレよりルーメン内容液を採取し、4重ガーゼで濾過した後にpHを測定した。pH測定後のルーメン内容液サンプルは、揮発性

**Table 2** Changes in chemical composition and fermentation quality of experimental diets after re-ensiling

| Days                    | GSTMR |      |      |      | CSTMR① |      |      |      | CSTMR② |      |      |      |      |
|-------------------------|-------|------|------|------|--------|------|------|------|--------|------|------|------|------|
|                         | 0     | 34   | 56   | 69   | 0      | 36   | 48   | 57   | 0      | 41   | 53   | 65   | 73   |
| Chemical composition    |       |      |      |      |        |      |      |      |        |      |      |      |      |
| DM (% FM)               | 41.9  | 39.4 | 42.3 | 42.2 | 40.3   | 40.5 | 40.8 | 40.0 | 47.6   | 48.7 | 51.4 | 50.6 | 50.9 |
| CP (% DM)               | 15.9  | 17.1 | 15.7 | 17.4 | 12.4   | 12.4 | 12.8 | 12.1 | 12.4   | 11.8 | 12.4 | 12.3 | 12.0 |
| aNDFom (% DM)           | 40.9  | 43.3 | 40.1 | 42.8 | 32.8   | 31.1 | 29.6 | 31.6 | 36.9   | 33.5 | 30.2 | 30.9 | 31.4 |
| WSC (% DM)              | 2.7   | 2.3  | 1.1  | 1.4  | 5.0    | 4.0  | 3.8  | 4.4  | 5.8    | 3.7  | 3.1  | 3.5  | 3.9  |
| Protein fraction (% CP) |       |      |      |      |        |      |      |      |        |      |      |      |      |
| CPs                     | 25.6  | 35.1 | 33.2 | 31.7 | 45.7   | 51.2 | 53.4 | 52.5 | 35.3   | 45.1 | 42.0 | 41.3 | 44.5 |
| CPd                     | 54.1  | 57.0 | 53.0 | 52.3 | 67.2   | 67.1 | 68.5 | 68.9 | 59.1   | 61.6 | 62.2 | 58.3 | 60.1 |
| Fermentation quality    |       |      |      |      |        |      |      |      |        |      |      |      |      |
| pH                      | 4.97  | 4.4  | 4.45 | 4.33 | 4.02   | 3.99 | 3.98 | 4.05 | 4.30   | 4.30 | 4.25 | 4.22 | 4.19 |
| Lactic acid (% FM)      | 0.41  | 0.78 | 1.65 | 1.63 | 1.84   | 1.33 | 1.75 | 1.19 | 1.11   | 1.03 | 1.35 | 1.04 | 0.91 |
| Acetic acid (% FM)      | 0.10  | 0.13 | 0.14 | 0.17 | 0.39   | 0.28 | 0.18 | 0.22 | 0.11   | 0.35 | 0.29 | 0.41 | 0.42 |
| Propionic acid (% FM)   | 0.05  | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.02   | ND   | ND   | ND   | ND     | ND   | ND   | ND   | ND   |
| Butyric acid (% FM)     | 0.61  | 0.68 | 0.60 | 0.41 | 0.11   | ND   | ND   | ND   | ND     | ND   | ND   | ND   | ND   |
| VBN/TN (%)              | 5.51  | 5.28 | 5.12 | 6.52 | 4.44   | 4.53 | 5.26 | 3.52 | 1.63   | 2.85 | 3.20 | 3.57 | 3.52 |
| V-score                 | 59.0  | 59.4 | 59.8 | 57.7 | 98.4   | 99.4 | 99.5 | 99.9 | 100.0  | 98.9 | 99.3 | 98.4 | 98.3 |

DM : dry matter ; FM : fresh matter ; CP : crude protein ; aNDFom :  $\alpha$ -amylase treated ash-free neutral detergent fiber ; WSC : water soluble carbohydrate ; CPs : soluble crude protein ; CPd : degradable crude protein ; VBN/TN : Ratio of volatile basic nitrogen to total nitrogen  
 ND : not detected

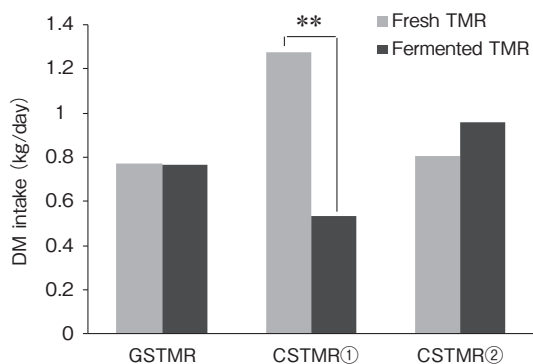
脂肪酸およびアンモニア態窒素濃度測定まで-30℃で凍結保存した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 発酵TMRの品質評価

貯蔵前後の飼料成分値および発酵品質をTable 2に示した。DMおよびCP含量は、TMRの種類および貯蔵日数に関わらず変動はなかった。aNDFom含量は、CSTMR②で貯蔵により低下したが、これは調整時(0 day)サンプルのaNDFom含量が想定よりも高いことから、サンプル採取が均等になされていなかったことが起因していると考えられた。WSC含量は、貯蔵に伴い減少した。粗タンパク質中の溶解性画分は貯蔵に伴って増加したが、分解性画分について大きな変動はみられなかった。これは、発酵過程でタン

パク質が微生物等に分解され非タンパク態窒素に合成されたため<sup>1)</sup>と考えられるが、溶解性画分だけでなく分解性画分も増加したとする報告<sup>2)</sup>とは異なっていた。GSTMRでは、調整時および貯蔵



**Fig. 1** Effects of feeding fresh and fermented total mixed ration on feed intake in beef cows  
 \*\* P < 0.01

**Table3** Effects of feeding fresh and fermented total mixed ration on dry matter intake, digestibility and nitrogen balance of fresh and fermented total ration in beef steers

|                              | GSTMR |           | CSTMR① |           | CSTMR② |           |
|------------------------------|-------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
|                              | fresh | fermented | fresh  | fermented | fresh  | fermented |
| DM intake (kg/day)           | 5.6   | 5.6       | 5.1    | 4.9*      | 5.2    | 5.4*      |
| digestibility (%)            |       |           |        |           |        |           |
| DM                           | 70.4  | 71.5      | 74.1   | 74.1      | 75.5   | 74.6      |
| CP                           | 68.7  | 68.6      | 66.5   | 68.3      | 68.9   | 68.9      |
| aNDFom                       | 67.5  | 71.6      | 59.3   | 52.1      | 56.3   | 52.1      |
| Starch                       | 90.5  | 91.7      | 97.7   | 95.5      | 97.1   | 97.0      |
| TDN (%)                      | 71.4  | 71.8      | 75.9   | 76.6      | 77.7   | 76.7      |
| Ratio of nitrogen intake (%) |       |           |        |           |        |           |
| Feces N excretion            | 31.3  | 31.4      | 33.5   | 31.7      | 31.1   | 31.1      |
| Urine N excretion            | 44.9  | 44.5      | 44.1   | 50.3      | 45.9   | 41.5      |
| N retention                  | 23.8  | 24.1      | 22.5   | 18.5      | 23.0   | 27.3      |

TDN : total digestible nutrients

\*P&lt;0.05

**Table4** Effects of fresh and fermented total mixed ration on ruminal profiles in beef steers

|                          | GSTMR |           | CSTMR① |           | CSTMR② |           |
|--------------------------|-------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|
|                          | fresh | fermented | fresh  | fermented | fresh  | fermented |
| pH                       | 6.2   | 6.3*      | 6.3    | 6.3       | 6.4    | 6.4       |
| Ammonia nitrogen (mg/dl) | 12.2  | 10.0      | 9.3    | 10.6      | 4.5    | 8.5*      |
| Total VFA (mmol/dl)      | 11.1  | 10.6      | 10.9   | 10.2      | 10.3   | 11.2      |
| VFA composition (mol %)  |       |           |        |           |        |           |
| Acetate                  | 69.8  | 64.7*     | 67.6   | 67.0      | 65.4   | 70.2*     |
| Propionate               | 15.8  | 17.1*     | 14.5   | 17.0*     | 18.2   | 13.5*     |
| Butyrate                 | 10.5  | 13.3*     | 12.6   | 8.8*      | 10.3   | 8.9*      |

VFA : volatile fatty acid

\*P&lt;0.05

後にも酪酸が生成されていたが、CS主体TMRでは貯蔵後の酪酸生成はみられなかった。

### 3.2 発酵TMRの嗜好性評価

供試飼料の乾物摂取量をFig. 1に示した。GSTMRおよびCSTMR②では、フレッシュTMRと発酵TMRで摂取量に差はみられなかったが、CSTMR①ではフレッシュTMRで有意に摂取量が多くなった。CSTMR①の嗜好性試験は7月下旬に実施しており、発酵TMRのpHが4.35であるのに対してフレッシュTMRでは6.21と高く好気

的変敗が著しかったにも関わらず、フレッシュTMRの摂取量が多かった理由として、供試牛は試験開始前にフレッシュTMRに混合したCSを給与されており、この摂取経験が嗜好性に影響を及ぼした可能性が唆された。

### 3.3 発酵TMRの消化特性評価

フレッシュTMRおよび発酵TMR給与時における乾物摂取量、消化率および窒素分配率をTable 3に示した。乾物摂取量にCSTMR①および②で差がみられたが、これは乾物含量の違いによるも

のでフレッシュTMR、発酵TMRともに給与された飼料はすべて摂取していた。消化率、TDN含量および窒素分配率には、すべてのTMRにおいて処理間で有意な差はみられなかった。これらの結果は、TMRの発酵調製が乳牛の飼料消化率や窒素出納に及ぼす影響は少ないとする報告<sup>3)</sup>と一致した。

フレッシュTMRおよび発酵TMR給与時におけるルーメン内容液性状をTable 4に示した。GSTMRでは、発酵TMRでpH、プロピオン酸および酪酸モル比が高かった。CSTMR①では、発酵TMRでプロピオン酸モル比が高く、酪酸モル比は低かった。CSTMR②では、発酵TMRでアンモニア態窒素濃度および酢酸モル比が高く、プロピオン酸および酪酸モル比は低かった。大谷ら<sup>4)</sup>は、分解性タンパク質含量の高い飼料の給与は尿中の窒素排泄量を増加させ、ルーメン内アンモニア態窒素濃度を上昇させることを報告している。本試験においても、CSを主体とした発酵TMRの給与によりルーメン内アンモニア態窒素濃度の上昇がみられた。ルーメン内で生成されたアンモニアは、微生物態タンパク質に合成されるか、ルーメン内膜から吸収され血液中に排出される。本試験では、血中尿素窒素濃度を測定していないが、尿中の窒素排泄量に有意な差はみられなかったことから、ルーメン内で生成されたアンモニア態窒素についてはルーメン細菌により無駄なく利用されたと考えられる。発酵TMR給与によるルーメン内のプロピオン酸モル比の上昇が報告<sup>5)</sup>されているが、これは発酵TMRでは材料中の可溶性糖類から乳酸生成量が増加し、摂取した乳酸はルーメン内でプロピオン酸に変換されることに起因している。本試験の消化試験で用いたフレッシュTMRおよび発酵TMRの乳酸含量は、GSTMRで0.72%および1.64%、CSTMR①で0.85%および1.56%、CSTMR②で0.67%および0.94%であり、

発酵TMRでの乳酸生成量が比較的多かったGSTMRおよびCSTMR①ではプロピオン酸モル比が高く、既往の報告と一致していた。

以上のことから、発酵TMRの再発酵による飼料成分および発酵品質の変動は小さく、フレッシュTMRと発酵TMRでは嗜好性やルーメン内発酵に若干の違いはあるものの、飼料摂取量や消化率、窒素利用性に負の影響はなく、発酵によるエネルギーロスも認められなかったことから飼料として大きな問題はないと考えられた。しかしながら、本研究では短期間の嗜好性および摂取量の比較しか行っていないことから、長期給与における採食性や生産性に及ぼす影響について検討が必要である。

#### 4. 要 約

肉牛用に調製した発酵混合飼料（TMR）の貯蔵前後の成分変動や発酵品質、嗜好性、消化特性について検討した。育成用牧草（GS）主体TMRでは、貯蔵後にも酪酸生成が認められたが、肥育用とうもろこしサイレージ（CS）主体TMRの発酵品質は良好であった。GS主体TMRでは、フレッシュTMRと発酵TMRで嗜好性に有意差が認められた（ $P < 0.01$ ）が、消化試験での飼料摂取量には処理間で差はみられなかった。また、GS、CS主体TMRともにルーメン内発酵に若干の違いが認められたものの、各成分消化率や窒素利用性に差はなく、TDN含量も同等であった。以上から、肉牛用に設計したGSおよびCS主体TMRでは発酵による品質低下やエネルギーロスは認められず、肉牛用飼料として利用可能であることが示された。

#### 文 献

- 1) 都丸友久, 平林晴飛, 群馬畜試研報, 18, 1~8, 2011.
- 2) 渡邊潤, 植村鉄矢, 佐藤寛子, 加藤真姫子, 秋田畜試研報, 23, 1~8, 2009.

- 
- 3) 寺井智子, 佐竹康明, 家木一, 岸本勇氣, 愛媛畜研七研報, 1, 2011.
- 4) 大谷文博, 樋口浩二, 小林洋介, 野中最子, 畜草研研報, 14, 23~35, 2014.
- 5) 山本泰也, 乾清人, 浦川修司, 平岡啓司, 富田智明, 田中浩二, 西川周司, 中西博司, 前澤卓, 平成16年度関東東北陸農業試験研究推進会議畜産草地部会資料, 46~47, 2005.

# 乳酸菌を用いた多剤耐性菌の殺菌効果の検討と 機能性家畜飼料の開発

Bactericidal effect of multi-drug resistance bacteria using lactic acid  
bacteria and development of functional domestic animal fodder

木下英樹

(宮城大学食産業学部フードビジネス学科)

Hideki Kinoshita

(Miyagi University, Department of Food Management, School of Food,  
Agricultural and Environmental Sciences, Department of Food Management)

Large amounts of antibiotics used for human therapy, as well as for farm animals, resulted in the selection of pathogenic multidrug-resistant organisms (MDROs). MDROs can cause serious local and systemic infections that can be severely debilitating and even life threatening. In this study, we studied on bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) as a useful and safe substitute for antibiotics. When 908 of LAB culture supernatants were tested for antimicrobial activity against *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *blugaricus* JCM1002<sup>T</sup> and *Bacillus* sp. C107, 373 and 461 samples showed antimicrobial activities against two indicator bacteria at 41.1 and 50.8%, respectively. Six strains were selected and all strains were identified as *Lactococcus lactis*. Antimicrobial resistant bacteria in porcine feces were counted using each growth agar containing three antibacterial drugs, amikacin, imipenem, and ciprofloxacin. Amikacin and ciprofloxacin resistant bacteria were higher than imipenem resistant bacteria. It is thought that this corresponds to a history of antibiotic use. Further, 24 of MDROs that grew with three-mixed growth culture were isolated and identified. Ten out of 24 isolated MDROs were identified as *Cellulosimicrobium* sp. and all of them were killed by the culture supernatants of selected LAB. Thus, LAB could reduce MDROs in feces of livestock and may be applied to a functional feedstuff.

## 1. 目 的

現在、病院での抗菌薬の過度の処方および家畜飼料への日常的な使用により、抗菌薬に耐性を示す菌が多く出現している。中でも複数の抗菌薬に耐性を示す多剤耐性菌はヒトへの感染とその拡大が危惧されている<sup>1,2)</sup>。2010年にWHOが各国政府に

対し多剤耐性菌の対策推進を呼びかけたこともあり、我が国においても使用する抗菌薬の種類を減らすなど、家畜への抗菌薬使用について見直しが進められている。

一方、乳酸菌には様々な健康保健効果が知られており、一部、抗生物質の代替品としての利用が検討されている<sup>3)</sup>。しかしながら、これらの試み

は一定の効果は見られるものの、試験的な試みであり、まだまだ子豚等の幼若動物については抗菌薬に頼らざるを得ないのが現状である。我々のこれまでの研究で多剤耐性菌に対しても抗菌作用を示すバクテリオシンが存在することを明らかにした。バクテリオシンは基本的に細胞膜に孔を形成することによって殺菌的に働くため、耐性菌が出現しづらいという特徴がある。そこで本研究では豚糞便中における多剤耐性菌の分布調査を行うことで多剤耐性菌の潜在的リスク評価を行うとともに、多剤耐性菌を指標菌としてバクテリオシンによる殺菌効果を検討し、機能性家畜飼料を開発することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 使用菌株と培養条件

抗菌活性試験のための乳酸菌は、宮城県産業技術総合センター保有の908菌株を用いた。培養はMRS broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を用い、2%接種により37℃で24時間培養した。*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *blugaricus* JCM1002<sup>T</sup> は、MRS broth で37℃、*Bacillus* sp. C107は、SCD培地(日水製薬株式会社、東京)で30℃、それぞれ18時間、静置培養したものを指標菌として用いた。

### 2.2 乳酸菌の抗菌活性試験

抗菌活性試験は、ペニシリンカップ法およびWST法により行った。ペニシリンカップ法では、*Lb. delbrueckii* subsp. *blugaricus* JCM1002<sup>T</sup> を、WST法では*Bacillus* sp. C107を指標菌として用いて抗菌活性試験を行った。サンプルには、乳酸菌の培養上清を用いた。

ペニシリンカップ法では、指標菌を1%となるよう接種した0.75% MRS agarを作成し、その上にペニシリンカップ(外径8mm, 内径6mm)を静置した。次にペニシリンカップの中にサンプ

ル100 $\mu$ lを添加し、37℃で一晩培養後、阻止円の大きさを測定した。活性値は、抗菌活性を示さなかったものを「0」、ペニシリンカップ内のみ指標菌の生育が抑えられているものを「1」、阻止円の直径が8mm以上、12mm未満のものを「2」、阻止円の直径が12mm以上、18mm未満のものを「3」、18mm以上のものを「4」とし、5段階で評価した。

WST法では、市販のMicrobial Viability Assay Kit-WST (同仁化学研究所、熊本)を使って添付のマニュアルに従って試験した。活性値は、WST-8ホルマザン生成により強く発色したものを「0」、中間発色を示したものを「1」、まったく発色しないものを「2」とし、3段階で評価した。

また、3種混合培地で生育した耐性菌に対する抗菌活性試験も上記同様ペニシリンカップ法を用いて行った。結果は、阻止円の直径で示した。

### 2.3 豚糞便からの耐性菌の分離と分布調査

薬剤耐性菌の分離と分布調査の目的で、本学坪沼農場から6検体(抗生物質投与無し3検体、有り3検体)、宮城県角田市の1農場から2検体(抗生物質投与有り)の豚糞便を採取し、試験まで-80℃で凍結保存した。凍結保存した試料を溶解後、ペプトン水にて段階希釈し、10ppmシクロヘキシミドおよび3種類の抗生物質(アミカシン; AMK, 12mg/ml, イミベネム; IPM, 12mg/ml, シプロフロキサシン; CPF, 1mg/ml)をそれぞれ単独、または混合した変法GAM寒天培地(日水製薬株式会社、東京)およびSCD寒天培地(日水製薬株式会社、東京)に混釈して、40℃で48および120時間培養してコロニーを生育させ、各培地における菌数をカウントした。変法GAM寒天培地は嫌気条件下で、SCD寒天培地は好気条件下でそれぞれ培養した。3種混合培地で生育した菌については釣菌し、豚糞便における薬剤耐性



**Table 1** The result of antibacterial test using LAB culture supernatants

| Activity levels | Number of strains (%)  |                                 |
|-----------------|--|---------------------------------|
|                 | Against <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>blugaricus</i> JCM1002 <sup>T</sup> | Against <i>Bacillus</i> sp.C107 |
| 0               | 535 (58.9)   | 447 (49.2)                      |
| 1               | 248 (27.3)   | 144 (15.9)                      |
| 2               | 96 (10.6)  | 317 (34.9)                      |
| 3               | 19 (2.1)   | –                               |
| 4               | 10 (1.1)   | –                               |
| Total           | 908 (100)  | 908 (100)                       |

**Table 2** Selected LAB strains producing antibacterial substances.

| Strain | Species                   | Source  |
|--------|---------------------------|---|
| MBR648 | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Hosta sieboldii</i> (species of plantain lily) |
| MBR652 | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Hosta sieboldii</i> (species of plantain lily) |
| MBR653 | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Hosta sieboldii</i> (species of plantain lily) |
| MBR655 | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Hosta sieboldii</i> (species of plantain lily) |
| MBR656 | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Hosta sieboldii</i> (species of plantain lily) |
| MBR738 | <i>Lactococcus lactis</i> | <i>Gentiana triflora</i> (species of gentian)     |

菌を得た。

#### 2.4 乳酸菌および耐性菌の簡易同定

選抜乳酸菌および耐性菌について、16S rDNAの相同性解析を行い、属レベルの簡易同定を行った。PCRにより16S rDNAの全長配列を増幅し、ダイターミネーター法により3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA)にて配列解析を行った。配列解析の結果から得られた塩基配列について、NCBIのBLASTプログラムにより相同性検索にて菌種同定を行った。

### 3. 結果と考察

乳酸菌(908菌株)の培養上清を用いた抗菌活性試験の結果をTable 1にまとめた。JCM1002<sup>T</sup>株に対して抗菌活性を示した菌は373菌株で、41.1%であった。8 mm以上の阻止円(活性レベ

ル「2」以上)が見られた菌株は125菌株(13.8%)であった。また、C107株に対して抗菌活性を示した菌は461菌株(50.8%)であり、その内、317菌株(34.9%)は高い抗菌活性を示した。本試験結果より、JCM1002<sup>T</sup>株に対して高い抗菌活性を示し、かつ、C107株に対しても抗菌活性を示したMBR648, MBR652, MBR653, MBR655, MBR656, MBR738を選抜した(Table 2)。これらの菌株は、宮城県栗原市にある栗駒山世界谷地原生花園から特別な許可を得て採取したコバギボウシおよびエゾオヤマリンドウから分離された菌株であり、菌種同定を行った結果、いずれも*Lactococcus lactis*であった。*Lc. lactis*は、数多くの菌株でバクテリオシンの報告がなされており、世界50カ国以上で食品保存料として使用されているナイシンAも*Lc. lactis*が生産するバクテリオシンである。また、*Lc. lactis*は、ナイシ

ンZ, ナイシンQ, ラクトコッシンQ, ラクトサイクリシンQ, ラクティシンQおよびラクティシンZなど様々な種類のバクテリオシンが報告されている<sup>4)</sup>。今後詳細な解析が必要ではあるが, 世界谷地の植物から分離した*Lc. lactis*はバクテリオシンを産生している可能性が高く, 分離源の特殊性から新奇バクテリオシンの可能性も示唆された。

各培地における豚糞便1 g当たりの耐性菌数をFig. 1に示した。AMK, IPM, CPFXの3種類の抗生物質を混合した培地はそれぞれ作用機序が異なるが, いずれの抗生物質も幅広い抗菌スペクトルを持つ広域抗菌薬であり, 殺菌的に作用するという共通の特徴がある。本試験の結果, 抗生物質の投与の有無, 培養条件の違いに関わらず, AMKおよびCPFXに耐性を示す菌が多く, IPM耐性菌は比較的少なかった。抗生物質投与区における嫌気性菌では, AMKおよびCPFXに対する耐性菌は抗生物質を含まないコントロールとほとんど変わらないか1桁低い程度であったが, 抗生物質非投与区(代わりに乳酸菌を投与)では2桁低い結果となった。しかしながら, 好気性菌ではその傾向は見られなかった。抗生物質非投与区では全体の菌数が少なかった。これは乳酸菌の産生する乳酸やバクテリオシンなどの抗菌物質によって菌の生育が抑えられていた可能性が考えられた。また, 興味深いことに抗生物質非投与区の糞便からは3種混合培地で生育した菌は見られなかったのに対し, 抗生物質投与区においては耐性菌が検出された。アミノグリコシド系抗生物質は飼料添加剤や動物用医薬品として頻用されており, フルオロキノロン系抗生物質も動物用医薬品として使われていることから, 同様の作用機序を持つAMKとCPFXに対し耐性を示す菌が多かったと考えられた。一方, カルバペネム系抗生物質は飼料や動物用医薬品としての使用は認められていない

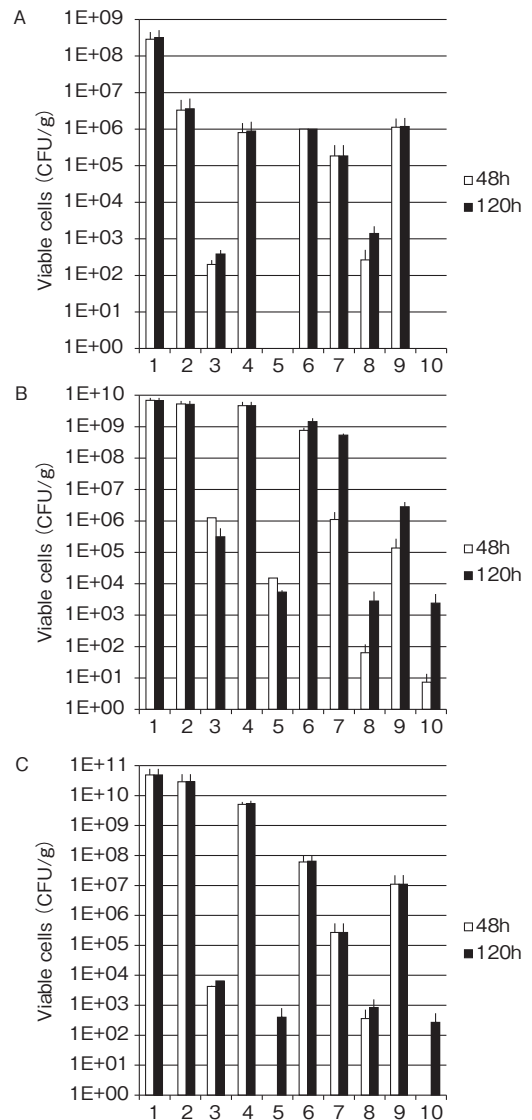


Fig.1 Viable cell counts of antimicrobial resistant bacteria using each growth agar containing three antibacterial drugs. Porcine feces were diluted and spread on each growth agar containing non-antibacterial drug (1 and 6), 12mg/ml of amikacin (2 and 7), 12mg/ml of imipenem (3 and 9), 1mg/ml of ciprofloxacin (4 and 8), and three mix (5 and 10). The plates were incubated for 48 or 120 h at 40°C under anaerobic condition (1-5) or aerobic condition (6-10). Samples were used in (A) Tsubonuma without antibacterial drug administration (n=3), (B) Tsubonuma with antibacterial drug administration (n=3), and (C) Kakuda with antibacterial drug administration (n=2).

**Table 3** MDROs isolated from three-mixed agar

| Strain | Species                       | Source      | Growth agar |
|--------|-------------------------------|-------------|-------------|
| R01    | Not identified                | Tsubonuma A | mGAM        |
| R02    | Not identified                | Tsubonuma B | mGAM        |
| R03    | Not identified                | Tsubonuma B | mGAM        |
| R04    | Not identified                | Tsubonuma B | mGAM        |
| R05    | Not identified                | Tsubonuma B | mGAM        |
| R06    | Not identified                | Tsubonuma B | SCD         |
| R07    | Not identified                | Kakuda      | mGAM        |
| R08    | <i>Cellulosimicrobium</i> sp. | Kakuda      | mGAM        |
| R09    | <i>Cellulosimicrobium</i> sp. | Kakuda      | mGAM        |
| R10    | Not identified                | Kakuda      | mGAM        |
| R11    | <i>Bacillus</i> sp.           | Kakuda      | mGAM        |
| R12    | <i>Cellulosimicrobium</i> sp. | Kakuda      | mGAM        |
| R13    | <i>Cellulosimicrobium</i> sp. | Kakuda      | mGAM        |
| R14    | <i>Cellulosimicrobium</i> sp. | Kakuda      | mGAM        |
| R15    | <i>Cellulosimicrobium</i> sp. | Kakuda      | mGAM        |
| R16    | <i>Cellulosimicrobium</i> sp. | Kakuda      | mGAM        |
| R17    | Not identified                | Kakuda      | SCD         |
| R18    | <i>Lactococcus lactis</i>     | Kakuda      | SCD         |
| R19    | <i>Cellulosimicrobium</i> sp. | Kakuda      | SCD         |
| R20    | <i>Cellulosimicrobium</i> sp. | Kakuda      | SCD         |
| R21    | <i>Cellulosimicrobium</i> sp. | Kakuda      | SCD         |
| R22    | Not identified                | Tsubonuma C | SCD         |
| R23    | Not identified                | Tsubonuma C | SCD         |
| R24    | Not identified                | Tsubonuma C | SCD         |

mGAM : modified GAM agar

**Table 4** Antimicrobial activities against MDROs using the culture supernatant of selected LAB

| Strain | MBR648 | MBR652 | MBR653 | MBR655 | MBR656 | MBR738 |
|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| R01    | 22     | 22     | 22     | 23     | 23     | 23     |
| R02    | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| R03    | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| R04    | 13     | 13     | 13     | 14     | 14     | 16     |
| R05    | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| R06    | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| R07    | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| R08    | 19     | 22     | 23     | 23     | 23     | 23     |
| R09    | 16     | 16     | 16     | 16     | 17     | 17     |
| R10    | 15     | 19     | 19     | 20     | 20     | 20     |
| R11    | 6      | 6      | 6      | 6      | 6      | 6      |
| R12    | 18     | 21     | 21     | 21     | 21     | 20     |
| R13    | 18     | 21     | 21     | 22     | 22     | 22     |
| R14    | 18     | 20     | 20     | 21     | 21     | 21     |
| R15    | 17     | 19     | 19     | 20     | 20     | 20     |
| R16    | 19     | 21     | 22     | 22     | 23     | 22     |
| R17    | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| R18    | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| R19    | 38     | 38     | 38     | 38     | 38     | 38     |
| R20    | 38     | 38     | 38     | 38     | 38     | 38     |
| R21    | 38     | 38     | 38     | 38     | 38     | 38     |
| R22    | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| R23    | -      | -      | -      | -      | -      | -      |
| R24    | -      | -      | -      | -      | -      | -      |

※Each data indicates diameter of inhibitory zone (mm), 「-」; non-inhibitory zone

め、IPM耐性菌は少なかったと考えられた。宮崎らはカルバペネム薬の使用量の削減と使用期間の制限により、IPM耐性緑膿菌と多剤耐性緑膿菌の検出率が有意に低下したと報告しており、抗生物質使用量と耐性菌の出現は密接に関連していることが示されている<sup>5)</sup>。さらに、我々が以前に行った食品における耐性菌分布調査においても飼料添加剤や動物用医薬品として使用されている抗菌物質に対する耐性菌は多く検出され（未公表データ）、本結果とも一致する。

3種混合培地で生育した耐性菌を計24株分離した（Table 3, Table 4）。これらの菌について簡易同定を試みたところ、*Cellulosimicrobium* sp.が10菌株、*Bacillus* sp.が1菌株、*Lc. lactis*が1菌株となった。残り12菌株は未同定のままであり、今後同定を行っていく予定である。*Cellulosimicrobium*属は、放線菌の一種であり、堆肥などからよく分離される菌である<sup>6)</sup>。また、心内膜炎患者の血液から分離されるなどヒトへの日和見感染も見られる菌であり、AMKおよびCPFXに耐性を示し、IPMについても耐性を示す菌がいることが報告されている<sup>7)</sup>。本試験で分離したすべての*Cellulosimicrobium*属の菌株は、選抜乳酸菌の培養上清で生育が強く阻害された。また、*Bacillus* sp. R11に対しては弱い活性を示したが、*Lc. lactis* R18には抗菌活性を示さなかった。本試験で用いた培養上清はすべて*Lc. lactis*であったことからR18株は同様の抗菌物質を生産しており、自己耐性を有している可能性が示唆された。本試験において、バクテリオシンのマスキングはJCM1002<sup>+</sup>株およびC107株を指標菌として行ったが、活性の強弱については菌種により異なることが考えられるため、活性が弱かったサンプルでも耐性菌には有効である可能性も十分考えられる。そのため、今後すべてのサンプルについて網羅的に耐性菌に対する抗菌効果を解析

する予定である。本試験では、多剤耐性菌を乳酸菌の産生する抗菌物質により殺菌できる可能性が示された。今後、さらなる詳細な研究を行い、機能性家畜飼料の開発へと繋げたい。

#### 4. 要 約

近年、多量の抗生物質の使用により多剤耐性菌が数多く出現しており、ヒトへの感染拡大が危惧されている。そこで抗生物質に代わり、安全性の高い乳酸菌のバクテリオシンを使用して、多剤耐性菌のリスクを低減できないかと考えた。まず、乳酸菌908菌株について抗菌活性試験を行ったところ、JCM1002<sup>+</sup>株に対して抗菌活性を示した菌は373菌株（41.1%）、C107株に対して抗菌活性を示した菌は461菌株（50.8%）であった。中でも高い活性を示した6菌株を選抜し、菌種同定を試みたところ、いずれも*Lc. lactis*であり、バクテリオシン産生の可能性が示唆された。また、豚糞便中の耐性菌数測定の結果、AMKおよびCPFXの耐性菌が多く、IPM耐性菌は比較的少なかった。これは飼料添加剤や動物用医薬品の使用頻度に依存している可能性が示唆された。3種混合培地で生育した菌を同定したところ、多くの*Cellulosimicrobium* sp.が検出された。これらすべての薬剤耐性*Cellulosimicrobium* sp.は、選抜乳酸菌の培養上清により生育が強く抑えられたことから、乳酸菌のバクテリオシンを用いて多剤耐性菌が殺菌できる可能性が示された。今後さらなる研究を進めることで、多剤耐性菌を抑える家畜用の機能性飼料開発が期待される。

#### 文 献

- 1) Tsuji, A., Kobayashi, I., Oguri, T., Inoue, M., Yabuuchi, E., Goto, S. : An epidemiological study of the susceptibility and frequency of multiple-drug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated at medical institutes nationwide in Japan, *J Infect Chemother*, 11, 64~70, 2005.

- 2) Hirakata, Y., Yamaguchi, T., Nakano, M., Izumikawa, K., Mine, M., Aoki, S., Kondoh, A., Matsuda, J., Hirayama, M., Yanagihara, K., Miyazaki, Y., Tomono, K., Yamada, Y., Kamihira, S., Kohno, S. : Clinical and bacteriological characteristics of IMP-type metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*, *Clin Infect Dis*, **37**, 26~32, 2003.
- 3) Suda, Y., Villena, J., Takahashi, Y., Hosoya, S., Tomosada, Y., Tsukida, K., Shimazu, T., Aso, H., Tohno, M., Ishida, M., Makino, S., Ikegami, S., Kitazawa, H. : Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* as immune-health promoting factor to improve growth performance and productivity in post-weaning pigs, *BMC Immunol*, **15**, 24~41, 2014.
- 4) 日本乳酸菌学会編, 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 初版, 309~324, 京都大学学術出版会, 京都, 2010.
- 5) 宮崎博章, 入江利行, 素元美佐, 溝口裕美, 永山真紀 : カルバペネム薬の使用制限下によるイミペネム耐性緑膿菌と多剤耐性緑膿菌の検出率の推移, 環境感染, **21**, 162~167, 2006.
- 6) Hayakawa, M., Yamamura, H., Nakagawa, Y., Kawa, Y., Hayashi, Y., Misonou, T., Kaneko, H., Kikushima, N., Takahashi, T., Yamasaki, S., Uegaki, Y., Terasawa, A., Takao, K., Mori, T., Ago, K., Saito, N., Hasegawa, T. : Taxonomic diversity of Actinomycetes isolated from swine manure compost, *Actinomycetologica*, **24**, 58~62, 2010.
- 7) Brown, J. M., Steigerwalt, A. G., Morey, R. E., Daneshvar, M. I., Romero, L. J., McNeil, M. M. : Characterization of clinical isolates previously identified as *Oerskovia turbata*: proposal of *Cellulosimicrobium funkei* sp. nov. and emended description of the genus *Cellulosimicrobium*, *Int J Syst Evol Microbiol*, **56**, 801~804, 2006.

# 食肉におけるカルノシン関連ジペプチド増量法確立 のための基礎研究

Basic study for the establishment of the method to increase carnosine-related dipeptide levels in meats

友 永 省 三

(京都大学大学院農学研究科)

Shozo Tomonaga

(Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

For the first step to establish the method to increase carnosine-related dipeptides in chicken breast meat, we investigated correlations among carnosine-related dipeptides and the molecular ion peaks derived from low-molecular-weight substances measured by gas chromatography mass spectrometry-based metabolomics in the breast muscle of chickens.

## 1. 目 的

カルノシン関連ジペプチド（もしくはイミダゾールジペプチド）であるカルノシン（ $\beta$ -アラニル-ヒスチジン）、アンセリン（ $\beta$ -アラニル-1-メチルヒスチジン）およびパレニン（ $\beta$ -アラニル-3-メチルヒスチジン）は、動物の筋肉に多く存在する。生理機能として抗酸化作用<sup>1)</sup>や緩衝作用<sup>2)</sup>などが認められている。さらに、摂取による血圧低下効果<sup>3)</sup>、運動パフォーマンス向上効果<sup>4)</sup>およびストレス反応緩和効果<sup>5)</sup>なども報告されている。一方、国内の畜産業において、「畜肉部位の余剰問題」が存在する。中でも家禽産業では鶏ムネ肉が鶏モモ肉に比して嗜好性が低い結果、鶏ムネ肉の市場価格が鶏モモ肉に比して低いことが問題となっている。そこで、鶏肉における「畜肉部位の余剰問題」の解決に貢献するために、鶏ムネ肉に多いカルノシン関連ジペプチドに着目し

て、次に述べる研究を我々は遂行してきた。カルノシンもしくはカルノシン関連ジペプチドを高含有する鶏ムネ肉抽出物の経口投与は、ラットにおける抗うつ様行動効果<sup>6)</sup>やマウスにおける学習行動改善効果<sup>7)</sup>を有することを見出した。また、鶏ムネ肉内のカルノシン関連ジペプチドをさらに増量できれば、さらなる機能性向上につながると考え、鶏においてカルノシンとアンセリンの構成アミノ酸である $\beta$ -アラニンの投与によるムネ肉内のカルノシンとアンセリン含量の増量を試みた結果<sup>8~10)</sup>、ムネ肉のカルノシン含量がわずかに増える条件があることを見出した<sup>10)</sup>。以上より、効果的な鶏ムネ肉内カルノシン関連ジペプチド増量法の確立には、構成アミノ酸の投与以外の合成を刺激する条件を見出す必要性が示唆された。

構成アミノ酸の投与による筋肉内カルノシン関連ジペプチド含量の増量法は、鶏以外にも様々な動物種で報告されている。豚では、 $\beta$ -アラニン

だけでなく、カルノシンのもうひとつの構成アミノ酸であるヒスチジンを同時摂取させることにより筋肉内カルノシン含量がわずかに増量した<sup>11)</sup>。一方で、ラットでは $\beta$ -アラニンの投与で顕著に(10倍ほど)筋肉内カルノシン含量が増加した<sup>12)</sup>。これら先行研究は、 $\beta$ -アラニン単独もしくは $\beta$ -アラニンとヒスチジンの同時投与の試験であるが、最も増量に効果的な構成アミノ酸投与の諸条件(動物種、系統、畜肉部位、投与時期、投与期間および投与濃度など)の決定には至っていない。さらに、カルノシンやアンセリンだけでなくバレニンの含量まで確認している報告は、我々が知る限り存在しない。我々は、構成アミノ酸、特にヒスチジンの投与からカルノシン関連ジペプチド増量を試みる場合は、バレニン合成系の活性化は起こりうると思う。なぜなら、ヒスチジンを構成アミノ酸とするカルノシンの合成促進だけでなく、ヒスチジンから3-メチルヒスチジンへの代謝が促進された結果、3-メチルヒスチジンを構成アミノ酸とするバレニンの合成促進にもつながる可能性があるからである。一方、 $\beta$ -アラニンの投与により、トランスポーターが拮抗するタウリンが減少する場合も認められていることから<sup>8~10)</sup>、タウリンはカルノシン関連ジペプチド増量のための有用な指標であると考えられる。以上より、鶏肉、豚肉など様々な畜肉におけるカルノシン関連ジペプチドの増量法を正確に検討するためには、各畜肉部位、品種および飼養条件などにおけるカルノシン関連ジペプチド3種類(カルノシン、アンセリンおよびバレニン)と全構成アミノ酸( $\beta$ -アラニン、ヒスチジン、1-メチルヒスチジンおよび3-メチルヒスチジン)およびタウリン含量を把握することが有用であると考えている。そこで我々は、超高速液体クロマトグラフトンデム型質量分析計(UHPLC-MS/MS)を用いたAccQ-Tag誘導体化アミノ酸分析<sup>13)</sup>におい

て、鶏ムネ肉のカルノシン、アンセリン、 $\beta$ -アラニン、ヒスチジン、1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジンおよびタウリンが定量可能であることを確認し、カルノシン関連ジペプチド増量法の確立に貢献できる可能性を示唆した<sup>14)</sup>。

次の段階として、本研究では、カルノシン関連ジペプチド増量法確立への基盤情報の取得を目指して、上記の分析法を用いて、カルノシン関連ジペプチド含量と関連する低分子成分の探索を試みた。すなわち、市販の鶏ムネ肉中のカルノシン関連ジペプチド、構成アミノ酸およびタウリン含量を定量分析し、同サンプルをガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)の低分子成分の網羅的半定量解析(メタボローム)にも供し、両分析結果を合わせて網羅的にカルノシン関連ジペプチドとの相関を調べた。

## 2. 方 法

異なる産地(国内3県)の鶏ムネ肉を各5~6サンプル、合計17サンプルを京都市内の小売店から入手した。凍結破砕装置(クライオプレス、マイクロテックニチオン)で破砕して過塩素酸による除タンパク質処理後、UHPLC-MS/MSによるAccQ-Tag誘導体化アミノ酸分析法<sup>13, 14)</sup>を用いて、カルノシン、アンセリン、バレニン、 $\beta$ -アラニン、ヒスチジン、1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジンおよびタウリンの定量を試みた。UHPLC-MS/MSは、AQUITY TQD(Waters)を用いた。定量法として内部標準法を用いた。内部標準物質は、カルノシン、アンセリン、バレニン1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジン用にL-ヒスチジン(ring2-13C)、 $\beta$ -アラニン用にグリシン-d5およびタウリン用にL-グルタミン-2,3,3,4,4-d5を採用した。同サンプルをGC/MS(QP2010-Ultra, 島津製作所)によるSmart Metabolites database(島津製作所)の分析条件

を用いたメタボローム解析にも供した。次に、分析結果からProfiling Solution (島津製作所)を用いてイオンピークデータを抽出した。成分の同定より先にイオンピークから解析する理由は、採用したデータベース (今回は前述の Smart Metabolites database) に登録されていない成分も抽出できる可能性を残すためである。さらに、これらイオンピークを用いた部分最小二乗回帰 (PLS-R) による予測モデルを作成できた物質において、モデルにおける寄与度の指標であるVIPが有意に高い (本研究では1以上かつ自身の標準誤差の2倍以上を有意とした) イオンピークの数を調べることで、関連する成分を考察した。

### 3. 結果と考察

鶏ムネ肉のカルノシン, アンセリン, バレニン,  $\beta$ -アラニン, ヒスチジンおよびタウリンを定量することができた。一方で, 1-メチルヒスチジンならびに3-メチルヒスチジンは, 全サンプルにおいて定量下限を下回っていた。そこで, カルノシン, アンセリン, バレニン,  $\beta$ -アラニン, ヒスチジンおよびタウリンに着目してGC/MS分析により得られたイオンピーク (17,691個) を用いたPLS回帰モデルの作成を検討した結果, カルノシン ( $A = 2$ ,  $R2X$  (cum) = 0.811,  $Q2$  (cum) = 0.373), アンセリン ( $A = 2$ ,  $R2X$  (cum) = 0.796,  $Q2$  (cum) = 0.288) およびバレニン ( $A = 4$ ,  $R2X$  (cum) = 0.985,  $Q2$  (cum) = 0.643) を予測するモデルを作成することができた。各モデルにおいて, VIPが有意に高いイオンピークとして, カルノシンでは1,361個, アンセリンでは354個, バレニンでは3,192個認められた。すなわち, これらイオンピークの源である低分子成分は, 各カルノシン関連ジペプチド含量と相関がある可能性を示唆している。今後は, これらイオンピークに着目して Smart Metabolites database

(島津製作所) による低分子成分の同定を試みるとともに, 本データベースに存在しない場合は, 保持指標の情報はないがより多くの化合物が登録されているデータベース (NISTなど) を用いた低分子成分の同定も試みる予定である。また, 今回は, 市販の鶏ムネ肉を用いたため, 各サンプルのと殺からの経過時間を制御することができなかった。と殺からの経過時間は, 測定物質によっては分析結果に影響を及ぼしうると考えられる。そこで, と殺直後の鶏ムネ肉においても, 今回と同様の実験を検討中であり, 今回の結果と合わせて考察することを視野にいれている。さらに, 「畜肉部位の余剰問題」は, 他の畜肉でも認められることから, 他動物種の筋肉の解析を行うなど, 様々なデータを取得することも重要である。

総括すると, 市販の鶏ムネ肉において, カルノシン関連ジペプチドと相関を示す可能性がある低分子成分由来のイオンピークを抽出することができた。今後は, 「畜肉部位の余剰問題」の解決に貢献するために, 本研究の手法を用いてさらなる基盤情報の収集に取り組む予定である。

### 4. 要 約

本研究では, 鶏ムネ肉のカルノシン関連ジペプチド (カルノシン, アンセリンおよびバレニン) 含量の増量法確立への基盤情報を得るために, 鶏ムネ肉におけるカルノシン関連ジペプチドと, ガスクロマトグラフ質量分析計によるメタボローム解析によって得られた低分子成分由来のイオンピークとの関連を探索した。

### 文 献

- 1) Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K. C., Ames, B. N.: *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 3175~3179, 1988.
- 2) Abe, H.: *Biochemistry (Mosc)*, **65**, 757~765, 2000.
- 3) Nijima, A., Okui, T., Matsumura, Y., Yamano, T., Tsuruoka, N., Kiso, Y., Nagai, K.: *Auton Neurosci.*



- 97, 99~102. 2002.
- 4) Maemura, H., Goto, K., Yoshioka, T., Sato, M., Takahata, T., Morimatsu, F., Takamatsu, K. : *Int J Sport and Health Sci.*, **4**, 86~94, 2006.
- 5) Li, Y. F., He, R. R., Tsoi, B., Li, X. D., Li, W. X., Abe, K., Kurihara, H. : *PLoS One*, **7**, e33190, 2012.
- 6) Tomonaga, S., Yamane, H., Onitsuka, E., Yamada, S., Sato, M., Takahata, Y., Morimatsu, F., Furuse, M. : *Pharmacol Biochem Behav.*, **89**, 627~632, 2008.
- 7) 友永省三, 栄養生理研究会報, 52, 37~44. 2008.
- 8) Tomonaga, S., Kaji, Y., Tachibana, T., Denbow, D. M., Furuse, M. : *Anim Sci J.*, **76**, 249~254, 2005.
- 9) Tomonaga, S., Kaneko, K., Kaji, Y., Kido, Y., Denbow, D. M., Furuse, M. : *Anim Sci J.*, **77**, 79 ~ 86, 2006.
- 10) Tomonaga, S., Matsumoto, M., Furuse, M. : *J Poult Sci.* **49** : 307~311. 2012.
- 11) Mei L, Cromwell GL, Crum AD, Decker EA. *Meat Sci.*, **49**, 55~64, 1998.
- 12) Margolis, F. L., Grillo, M., Kawano, T., Farbman, A. I. : *J Neurochem.*, **44**, 1459~1464, 1985.
- 13) Salazar, C., Armenta, J. M., Shulaev, V. : *Metabolites*, **2**, 398~428, 2012.
- 14) 友永省三, 平成25年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.32, 159~162, 2014.

## 初期成長期のミオスタチン制御が黒毛和牛の肉質に及ぼす影響

Effect of myostatin control during early growth period on meat quality of Japanese Black cattle

高橋 秀之

(九州大学農学部附属農場)

Hideyuki Takahashi

(Kuju Agricultural Research Center, Kyushu University)

This study aimed to determine effects of feeding increased volume of high-fat milk during early post-natal life on concentrations of metabolites in blood, the expression of key genes regulating intermediary metabolism in skeletal muscle and the rate of growth of Japanese Black cattle. All calves were fed a high-fat milk replacer (crude protein, 26 % ; crude fat, 25.5% ; total dissolved nitrogen, 116%). Control calves (n = 4) were nursed with 500g (4L/day) milk replacer until 3 months of age and were then weaned. In the experimental group (n = 4), calves were nursed with 1,800g (9L/day) milk replacer until 3 mo and were then weaned. From weaning to 7 mo, both groups were fed concentrate (1.5% of body weight [BW]) and hay (ad libitum). Body weight tended to be higher in the experimental group than in the control group at 7 mo. Plasma concentrations of growth hormone (GH) tended to be higher at 3 month. However, there was no difference after weaning. Insulin like growth factor-1 (IGF-1) was significantly higher in the experimental group. Expression of myostatin mRNA tended to be lower at 5 months, whereas there was no difference in myostatin expression at 7 months in the *M. longissimus thoracis* of the experimental group compared with controls. These results suggested that the plane of nutrition during early post-natal life influences the rate of growth, myostatin mRNA expression after weaning in Japanese Black cattle.

### 1. 目 的

黒毛和牛の生産現場では、穀物飼料の多給による脂肪交雑を重視した牛肉生産システムが主流となっている。一方で、安価な海外牛肉の輸入量増加や健康志向の高まりによる赤身肉消費の増加に伴い、消費者の食肉嗜好は多様化してきている。したがって、国内での牛肉生産においても、多様

な消費者のニーズに応えるために、霜降り肉の生産だけでなく赤身肉の生産量を増加させることは必須である。

ミオスタチンは主に骨格筋において産生され、脂肪形成を促進する。一方で、ミオスタチンの欠損は骨格筋量を増大して脂肪量を減少させる<sup>1)</sup>。骨格筋中の筋細胞数やサシの元となる脂肪前駆細胞の増殖・分化は、初期成長期の栄養状態やホル

モンにより影響される。近年、初期成長期に獲得した代謝生理機能は、その後の成長や肉質に不可逆的な影響を及ぼすことが報告されている。したがって、初期成長期の栄養素による内分泌管理でミオスタチンを制御し、その後の肉量や肉質をコントロールすることが可能となれば、効率的な黒毛和牛の赤身肉生産または霜降り肉生産が可能となると考えられる。成長ホルモン（GH）は筋タンパク合成を促し、脂肪分解を促進する。GHにより肝臓から分泌されるインスリン様成長因子-1（IGF-1）は、筋肉・脂肪細胞増殖を増加させる<sup>2)</sup>。これらのホルモンは、栄養素や栄養状態の変化に連動してその分泌を変化させ<sup>3)</sup>、ミオスタチンと同様に骨格筋においてインスリン感受性を制御していることが知られている<sup>4)</sup>。したがって、GHやIGF-1は骨格筋で産生され筋形成や脂肪形成を調節するミオスタチンを介してその作用を発現していると強く示唆されるが、未だ研究されていないのが現状である。そこで本研究では、黒毛和種子牛を用いて初期成長期の栄養素による内分泌管理が成長やミオスタチン発現に与える影響を検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 供試牛および飼養方法

本研究では、10頭の黒毛和種雄子牛を用いて、EXP-1区（n = 5）およびCONT-1区（n = 5）の2区に分割した。EXP-1区では、4種の異なる血統の黒毛和種雄子牛5頭を選抜し、血統はそれぞれ大分県の黒毛和種種雄牛である光平照、安金幸、寿恵福および成平照であった。一方で、CONT-1区では、4種の異なる血統の黒毛和種雄子牛5頭を選抜し、血統はそれぞれ大分県の黒毛和種種雄牛である萬福8、勝福平、寿恵福および玉吹雪であった。

EXP-1区は、哺乳ロボットにより代用乳

（CP：26%，CF：25.5%，TDN：116%）を最大1,800g/dayの条件で3ヵ月齢時まで給与し、3ヵ月以降は体重比1.5%相当量の育成用濃厚飼料（CP：18%，CF：2%，TDN：72%）および粗飼料は飽食条件で管理した。一方、CONT-1区は、EXP-1区と同様の代用乳をバケツ哺乳で500g/dayの条件で3ヵ月齢時まで給与し、3ヵ月以降はEXP-1区と同様の飼養管理方法を施した。本研究でのCONT-1区における代用乳の給与量は、肉用牛の日本飼養標準（中央畜産会、2008年）に基づき設定した。両区の供試牛は、生後14日で母牛より分離し、哺乳ロボットによる哺乳試験を開始した。

また、生後から7ヵ月齢時までの各月において体重測定を行い、採血は3、5および7ヵ月齢時に行い、胸最長筋（LT）の微量組織サンプルは5および7ヵ月齢時にバイオプシー法を用いて採取した。

### 2.2 血液サンプル

3、5および7ヵ月齢時において、朝の給餌前に、頸静脈よりヘパリン処理真空採血管を用いて血液サンプルを採取した。すべての血液サンプルは、室温で3,500×g、30分間の遠心処理を行い、血漿サンプルを採取した。採取した血漿サンプルは、分析を行うまで-35℃で保存した。

血液成分の分析項目は、GHおよびIGF-1とし、これらの血漿成分はそれぞれ時間分解蛍光免疫測定法（TR-FIA）を用いて測定した。

### 2.3 バイオプシー

LTの微量組織はバイオプシー法を用いて採取した。サンプル採取前に、スキルペン（Ltd. Intervet, Osaka, Japan）0.3mg/100kgBWの筋内注射およびキシロカイン（AsraZeneca KK, Osaka, Japan）5mlの皮下注射によって全身麻酔および局所麻酔を行った後に、ニードルバイオプシーによって胸最長筋（LT）の微量組織サンプ

ルを採取した。LTは、7ヵ月齢時において、ニードルバイオプシーにて第12-13胸椎間より総計8 cmの組織を採取した。採取した組織サンプルは、直ちに液体窒素内で凍結させ、解析を行うまで-80°Cで保存した。

#### 2.4 RNA抽出および定量的リアルタイムPCR

Total RNAは、ISOGEN (NIPPON GENE CO., LTD. Tokyo, Japan), クロロホルムおよびイソプロパノールによって抽出し、complementary DNA (以下, cDNA) は, SuperScript VILO Master Mix (Life Technologies Japan Ltd. Tokyo, Japan) を用いて, 1.5  $\mu$ g のtotal RNAより合成した。合成したcDNA 1  $\mu$ LとSYBER Greenをプレート内で混合し, Thermal Cycler Dice Real Time System (TaKaRa Bio, Shiga, Japan) によって定量的リアルタイムPCR処理を行った。その後, StepOne Plus Real Time PCR System (Life Technologies Japan Ltd., Tokyo, Japan) によって, Myostatin (MSTN) の遺伝子発現量を測定した。また, 本実験では内部標準遺伝子としてハウスキーピング遺伝子であるRPS18を採用し, 発現解析を行う遺伝子と併用して測定を行うことによって, 逆転写効率およびCt値を補正することとした。それぞれの遺伝子は, 牛の塩基配列を元に設計されたプライマーを用いて測定した。

#### 2.5 統計処理

すべての実験データは, 2対の標本におけるt検定を用いて有意差検定を行った。

### 3. 結果と考察

哺乳量および摂取養分はEXP-1区において3ヵ月間の哺乳期間に摂取した代用乳は, 乾物量で有意な差が見られた ( $P < 0.01$ )。また, 代用乳由来のCP (粗タンパク) 摂取量およびCF (粗脂肪) 摂取量は, EXP-1区が有意に多かった ( $P$

$< 0.01$ ,  $P < 0.01$ , respectively)。

体重の変化は, 14日齢時および1ヵ月齢時から3ヵ月齢時にかけて, EXP-1区がCONT-1区と比較し有意に高かった ( $P < 0.05$ )。また, 離乳後の4ヵ月齢時および7ヵ月齢時において, EXP-1区がCONT-1区と比較し有意に高い傾向が見られた ( $P < 0.1$ )。

哺乳期間中である1ヵ月齢時から3ヵ月齢時においては, EXP-1区の体重がCONT-1区に比べ有意に高かったことから, この期間では, 単胃動物と同様に下部消化管での代用乳由来のグルコースや脂肪の吸収および代謝が促されたことにより, 哺乳量の多かったEXP-1区の増体に繋がったものと考えられる。一方で, 離乳後の4ヵ月齢時から7ヵ月齢時においては, 体重の差は離乳後に小さくなったことから, 哺乳期間中の代用乳のインパクトが少ないことが示唆される。

血液成分は, 血漿GH濃度はEXP-1区において, 3ヵ月齢時に増加傾向が見られたが離乳後は両区の間には差は見られなかった。EXP-1区における哺乳条件は最大1,800g/dayであったが, 3ヵ月齢時の離乳に向けて75日齢から代用乳の給与量は漸減され, 3ヵ月齢時点ではEXP-1区の代用乳給与量はCONT-1区と同量であったため, GHに有意な差が見られなかった可能性が示唆される。一方で血漿IGF-1濃度はEXP-1区において有意に高い値を示した。さらに哺乳期間にGH濃度の上昇傾向およびIGF-1の有意な増加が見られたことから, 初期成長期の栄養素により内分泌管理が可能であることが示唆される。今後は, 哺乳期間中の代用乳最大給与期間を延長する必要があると推察される。

遺伝子発現は, 5ヵ月齢時においてEXP-1区のみオスタチン発現はCONT-1区と比較して発現量の減少傾向が見られた。一方で, 7ヵ月齢時のみオスタチン発現は両区の間には差は見られなかつ

た。したがって、初期成長期の栄養環境により離乳後のミオスタチン発現が制御される可能性が示唆された。GHの投与によりミオスタチンは抑制される<sup>5)</sup>。したがって、本試験では哺乳期間中のGH濃度を有意に上昇させることができなかったことがミオスタチンの発現制御を離乳後に維持することができなかった原因であると推察される。肉質に関しては、脂肪形成や筋線維型を示唆する遺伝子発現に変化が無かったことから肉質に差はないと考えられるが、今後の検討が必要である。

総括すると、初期成長期の栄養素による内分泌管理はミオスタチン発現の制御が可能であることが示された。しかしながら、90日の哺乳期間のうち代用乳最大給与期間が45日間であり、代用乳のインパクトが少なかつたために離乳後の血漿成分やミオスタチン発現に明確な差が見られなかったと推察された。

#### 4. 要 約

哺乳期間中の代用乳多給は子牛の成長を促進し、初期成長期の栄養制御は、その後の増体や肉質に影響を及ぼす。しかしながら、初期成長期の栄養素による内分泌管理が成長やミオスタチン発現に与える影響は不明な点が多い。そこで本研究では、黒毛和種子牛において、哺乳期間中における代用乳給与量の差が初期成長期の成長やミオスタチン発現に及ぼす影響を検討した。

体重は1ヵ月齢時から3ヵ月齢時にかけてEXP-1区がCONT-1区と比較し有意に高かった ( $P < 0.05$ )。血漿成分はEXP-1区において3ヵ月齢時に上昇傾向が見られたが、離乳後は両区間に差は見られなかった。また、LTにおける5ヵ月齢時のミオスタチン発現はEXP-1区がCONT-1区と比較し減少傾向が見られたが、7ヵ月齢時には差が見られなかった。以上より、初期成長期の栄養素による内分泌管理はミオスタチン発現を制御する可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Hayashi, S., Miyake, M., Watanabe, K., Aso, H., Hayashi, S., Ohwada, S., Yamaguchi, T. : Proc Jpn Acad Ser B, *Phys Biol Sci*, **84**, 354~362, 2008.
- 2) David, R. : Clemmons, *J Clin Invest.*, **113**, 25~27, 2004.
- 3) Takahashi, H., Kurose, Y., Suzuki, Y., Kojima, M., Yamaguchi, T., Yoshida, Y., Ogino, M., Hodate, K., Azuma, Y., Sugino, T., Kojima, M., Kangawa, K., Hasegawa, Y., Kobayashi, S. ; *Domest Anim Endocrinol*, **37**, 55~60, 2009.
- 4) Takahashi, H., Sato, K., Yamaguchi, T., Miyake, M., Watanabe, H., Nagasawa, Y., Kitagawa, E., Terada, S., Urakawa, M., Rose, M. T., McMahan, C. D., Watanabe, K., Ohwada, S., Gotoh, T., Aso, H. : *Domest Anim Endocrinol*, **48**, 62~68, 2014.
- 5) Janny, M., Oldham, Claire, C., Osepchook, Ferenc Jeanplong, Shelley, J., Falconer, Kenneth, G., Matthews, John V., Conaglen, David F., Gerrard, Heather K., Smith, Richard J., Wilkins, James J., Bass and Christopher D., McMahan. : *J physiol*, **587**, 669~677, 2009.

## 黒毛和種子牛に対する血清亜鉛濃度の基準値の設定 および亜鉛添加による臨床的な疾病予防効果の検討

Basal serum zinc value in Japanese Black calves and effect of supplemental zinc in Japanese Black calves against clinical diseases

乙丸 孝之介・窪田 力・時森 麻紀子\*

(鹿児島大学共同獣医学部, \*北薩農業共済組合)

Konosuke Otomaru, Chikara Kubota and Makiko Tokimori\*

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, \*Hokusathu Agricultural Mutual Aid Associations)

Zinc is known to play an important role in regulation of more than 200 enzymes cofactor in the animal body, and is associated with various functions, including fetal development, growth, tissue repair, ossification, reproductive system, appetite, and the immune system. The main zinc deficiency disorders in cattle include swelling of the hocks and knees, as well as parakeratosis of the skin. Recently, the blood zinc levels of Holstein and Angus calves have been reported. However, there have been no reports about the zinc level of Japanese Black calves. Therefore, the current study was conducted to establish reference values of serum zinc in growing stages of Japanese Black calves kept on ordinary farms in Kagoshima Prefecture, Japan. Four hundreds sixty eight clinically healthy Japanese Black calves on 24 farms, from birth to 8 months old, were used in the present study. Serum samples were collected once per head and data were divided into three stage based on their age, which are at suckling stage (8-89 days of age; n = 162), early growing stage (90-179 days of age; n = 161), late growing stage (180-269 days of age; n = 145). The mean concentration of serum zinc in the suckling stage (mean  $\pm$  SD : 102.7  $\pm$  25.7  $\mu$  g/dl) was significantly higher than the early growing stage (93.8  $\pm$  13.5  $\mu$  g/dl) (P<0.01), and tended to be higher than the late growing stage (98.0  $\pm$  12.9  $\mu$  g/dl) (P<0.1). The mean concentration of serum zinc in all stages were above 90  $\mu$ g/dl. The serum zinc values obtained in this study are considered useful as indices for health management of Japanese Black calves. Further studies of are needed to clearly difference with clinical healthy calves and disease calves of the serum zinc value in Japanese Black calves.

### 1. 目 的

亜鉛は生体内で200以上の補酵素としての役割を持つとともに、成長、組織修復ならびに免疫機能などさまざまな機能に重要な役割を担っている<sup>1,2)</sup>。牛における亜鉛不足の症状としては肘

や膝のふらつき、皮膚のパラケラトシスなどが報告されている<sup>3,4)</sup>。近年、ホルスタイン種子牛やアンガス種子牛における血液中の亜鉛濃度についての報告<sup>5,6)</sup>はされているが、これまで我が国固有の品種である黒毛和種子牛についての報告はされていない。そこで、本研究では鹿児島県内の

一般的な農場において飼養されていた黒毛和種子牛を対象に血清亜鉛濃度の調査を行った。

## 2. 方 法

調査では、2014年9月から2015年3月の間に鹿児島県内の一般的な24農場で飼養されていた生後から8ヵ月齢までの臨床的に健康な黒毛和種子牛468頭を供試した。供試牛は、各発育ステージにより哺乳期（8～89日齢：162頭）、育成前期（90～179日齢：161頭）、育成後期（180～269日齢：145頭）に分類した。1農場につき約20頭の供試牛を選定し分類した。すべての子牛は代用乳にて飼養され、2ヵ月齢から3ヵ月齢の間に離乳された。各農場における子牛の飼養頭数は30頭から300頭であり、すべて子牛は畜舎内で飼養されていた。各農場における給与代用乳の種類は異なっており、給与粗飼料も稲ワラ、イタリアンライグラス、オーツ、ローズグラスなど異なっており、さらに、給与されていた濃厚飼料の種類もさまざまであったが、基本的に日本飼養標準<sup>7)</sup>を満たした飼料給与を行っていた。供試牛からは、頸静脈より血清分離用真空採血管を用いて採血を行った。採取した血液は遮光下で20分常温に静置したのち、3,000rpmで20分間遠心して血清を分離し、-30℃で測定日まで保存した。

### (1) 亜鉛濃度検査

血清中の亜鉛濃度はアキュラスオートZn（シノテスト、東京）を用いて自動分析装置（7020型、日立ハイテクフィールドインテック、東京）にて測定を行った。

### (2) 統計方法

得られたデータは平均±標準偏差で示した。各期の数値の比較には一元配置分散分析を行い、有意な差を認めた場合にはTukey-Kramer法により検定した。5%未満の危険率を有意な差とし、10%未満の危険率を差のある傾向とした。統計解析にはSPSS Statistics 21（IBM、東京）を用いた。

### 3. 結果と考察

哺乳期における血清亜鉛濃度（平均±SD； $102.7 \pm 25.7 \mu\text{g/dl}$ ）は、育成前期（ $93.8 \pm 13.5 \mu\text{g/dl}$ ）と比較し有意に高く（ $P < 0.01$ ）、育成後期（ $98.0 \pm 12.9 \mu\text{g/dl}$ ）と比較し高い傾向であった（ $P < 0.1$ ）（Table 1）。すべての期において血清亜鉛濃度の平均値は $90 \mu\text{g/dl}$ 以上であった。各農場における子牛の血清亜鉛濃度は個体としてのバラつきは見られたが、全体として低値を示す農場はなかった。

日本において、繁殖農場で飼養されている黒毛和種子牛のほとんどは8から9ヵ月齢で市場に出荷される。それゆえ、本研究では8ヵ月齢までの子牛における血清亜鉛濃度を調査した。本研究において、哺乳期の血清亜鉛濃度の平均値は、育成前期と比較し有意に高く、育成後期と比較し高い傾向であった。本研究において、哺乳期における子牛は代用乳を給与されていたが、育成前期および育成後期における子牛はすでに離乳されており代用乳を給与されていなかった。それゆえ、血清亜鉛濃度は、哺乳期では育成前期および育成後期と比較し高かった要因の1つとして、代用乳中の亜鉛濃度は高いことが推察された。代用乳には高

Table 1 Serum zinc values of Japanese Black calves

| suckling stage (n=162) | early growing stage (n=161) | late growing stage (n=145) |
|------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| $102.7 \pm 25.7^{ab}$  | $93.8 \pm 13.5^a$           | $98.0 \pm 12.9^b$          |

Data are expressed as the mean ± SD ( $\mu\text{g/dl}$ ). a indicate significantly difference between the groups ( $P < 0.01$ ). b indicate marginally difference between the groups ( $P < 0.1$ ).

濃度の亜鉛が含まれていたものと推察された。血清亜鉛濃度の不足値は $80 \mu\text{g}/\text{dl}$ 未満であると報告されている<sup>8)</sup>。本研究において、血清亜鉛濃度の平均値はすべて $90 \mu\text{g}/\text{dl}$ を上回っていた。また、各農場における子牛の血清亜鉛濃度は個体としてのバラつきは見られたが、全体として低値を示す農場はなかったために、子牛への経口的な亜鉛投与による血清亜鉛濃度の推移の観察や亜鉛添加による疾病発症の予防効果を検討するまでには至らなかった。しかしながら、本研究で得られた血清亜鉛濃度は、今後、黒毛和種子牛のヘルスマネージメントを行う上での1つの指標として、十分に利用可能であると考えられる。これまで乳用牛の血清亜鉛濃度は乳房炎に罹患すると低下すると報告されている<sup>9, 10)</sup>。また、皮膚真菌症に罹患あるいは下痢症状を呈した子牛は、健康子牛と比較し血清亜鉛濃度は低下していると報告されている<sup>11, 12)</sup>。黒毛和種子牛の疾病の約30%は呼吸器病であるとされていることから<sup>13)</sup>、今後、黒毛和種子牛における健康子牛と呼吸器病発症子牛との血清亜鉛濃度の相違を明らかにするとともに、呼吸器病子牛において亜鉛濃度が不足している場合には人工的な亜鉛給与を行う研究も必要であると考えられた。

#### 4. 要 約

亜鉛は生体内で200以上の補酵素としての役割を持つとともに、成長、組織修復ならびに免疫機能などさまざまな機能に重要な役割を担っている。近年、ホルスタイン種子牛やアングス種子牛における血液中の亜鉛濃度についての報告はされているが、これまで我が国固有の品種である黒毛和種子牛について報告はなされていない。そこで本研究では鹿児島県内の一般的な農場において飼養されていた黒毛和種子牛を対象に血清亜鉛濃度の調査を行った。本研究では、24農場で飼養され

ていた生後から8ヵ月齢までの臨床的に健康な黒毛和種子牛468頭を供試した。サンプルは1農場につき1回採取し、得られた血清亜鉛濃度データは哺乳期(8日齢~89日齢;  $n = 162$ )、育成前期(90日齢~179日齢;  $n = 161$ )、育成後期(180日齢~269日齢;  $n = 145$ )の3期に区分した。その結果、哺乳期における血清亜鉛濃度( $102.7 \pm 25.7 \mu\text{g}/\text{dl}$ ; 平均 $\pm$ SD)は、育成前期( $93.8 \pm 13.5 \mu\text{g}/\text{dl}$ )と比較し有意に高く( $P < 0.01$ )、育成後期( $98.0 \pm 12.9 \mu\text{g}/\text{dl}$ )と比較し高い傾向であった( $P < 0.1$ )。すべての期において血清亜鉛濃度の平均値は $90 \mu\text{g}/\text{dl}$ 以上であり、不足値とされる $80 \mu\text{g}/\text{dl}$ を上回っていた。本研究において得られた血清亜鉛濃度は、黒毛和種子牛におけるヘルスマネージメントの1つの指標として利用可能である。今後、黒毛和種子牛における健康子牛と疾病子牛との血清亜鉛濃度の相違を明らかにするとともに、疾病子牛において亜鉛濃度が不足している場合には人工的な投与を行う研究を行うことも必要であると考えられた。

#### 文 献

- 1) Sandstead, H. H. : Understanding zinc: recent observations and interpretations and interpretations, *The Journal of laboratory and clinical medicine*, **124**, 322~327, 1994.
- 2) Rink, L., Gabriel, P. : Zinc and the immune system, *Proceedings of the Nutrition Society*, **59**, 541~552, 2000.
- 3) Price, J., Wood, D. A. : Zinc responsive parakeratosis and ill-thrift in a Friesian calf, *Veterinary Record*, **110**, 478, 1982.
- 4) Smart, M. E., Gudmundson, J., Christensen, D. A. : Trace Mineral Deficiencies in Cattle : A Review. *The Canadian veterinary journal*, **22**, 372~376, 1981.
- 5) Graham, T. W., Breher, J. E., Farver, T. B., Cullor, J. S., Kehrl, M. E., Oberbauer, A. M., Sandstead, H. H. : Biological markers of neonatal calf performance : the relationship of insulin-like growth factor-I, zinc, and copper to poor neonatal growth, *Journal of animal science*, **88**, 2585~2593, 2010.
- 6) Pavlik, A., Jelinek, P., Matejicek, M., Illek, J. :



- Blood Plasma Metabolic Profile of Aberdeen Angus Bulls during Postnatal Ontogenesis, *Journal Acta Veterinaria Brno*, **79**, 419~429, 2010.
- 7) 農業・食品産業技術総合研究機構編：日本飼養標準肉用牛. 中央畜産会, 東京, 2008.
- 8) Radostits, O. M., Gay, C. C., Hinchcliff, D. C., Constable, K. W. : Disease associated with nutritional deficiencies. In: *Veterinary Medicine*, 10th Edition. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 1698~1770, Saunders Ltd. London, 2007.
- 9) Erskine, R. J., Bartlett, P. C. : Serum concentrations of copper, iron, and zinc during *Escherichia coli*-induced mastitis, *Journal of dairy science*, **76**, 408~413, 1993.
- 10) Middleton, J. R., Luby, C. D., Viera, L., Tyler, J. W., Casteel, S. : influence of *Staphylococcus aureus* intramammary infection on serum copper, zinc, and iron concentrations, *Journal of dairy science*, **87**, 976~979, 2004.
- 11) Nisbet, C., Yarim, G. F., Ciftci, G., Arslan, H. H., Ciftci, A. : Effects of trichophytosis on serum zinc levels in calves, *Biological Trace Element Research*, **113**, 273~280, 2004.
- 12) Ranjan, R., Naresh, R., Patra, R. C., Swarup, D. : Erythrocyte lipid peroxides and blood zinc and copper concentrations in acute undifferentiated diarrhoea in calves, *Veterinary Research Communications*, **30**, 249~254, 2006.
- 13) 乙丸孝之介：育成牛におけるワクチネーションによる呼吸器病対策, 家畜感染症学会誌, **3**, 105~110, 2013.

## 和牛肉に含まれる機能性成分を左右する要因の検索

The factor of functional component on Wagyu meat

平山 琢二

(琉球大学農学部)

Takuji Hirayama

(Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus)

In this examination, we studied the effect of breed (Wagyu and F1) and sex (heifer and steer) on the functionality composition of meat (39 head sample; Wagyu-heifer: 16 head, Wagyu-steer: 11 head, F1-steer: 12 head). In fatty acid, myristic acid, palmitic acid, stearic acid, milli strain acid, palmitoleic acid, oleic acid and linoleic acid were detected. In amino acid, aspartic acid, glutamic acid, asparagine, serine, glycine, threonine, alanine, lysine, proline, histidine, arginine, tyrosine, 2-amino-3-methylbutyric acid, methionine, tryptophan, phenylalanine, iso leucine, leucine, glutamine, beta alanine, carnosine, towering, anserine and cystine were detected. In the meat of wagyu-heifers, carnitine, hematin, oleic acid, flavor, sweetness, bitterness content were higher than in other meat. The results suggested that flavor of beef meat was effected by breed. From this result, it is possible to explain the flavor of Matsusaka and Tajima beef (using wagyu-heifers) which is the worldwide brand. In future, it will be necessary to consider the relation between the fattening period and the genetic background.

### 1. 目 的

健康食ブームに関連して「牛肉」の持つ機能性が問われている。これまで牛肉、特に和牛肉は嗜好品としての価値が高く機能性に関する意識は希薄であり、消費者視点もない場合が多かった。しかし、時勢を背景に今後の和牛肉の生産拡大を考えた場合、和牛肉の持つ機能性を最大限にアピールしていく必要がある。しかし、機能性を持った牛肉、もしくは人の健康に貢献できる抗酸化作用を強く有する牛肉の安定的に生産できる技術の確

立など、課題は山積みである。ダイエットなどで取り上げられるカルニチンは、牛肉中に多量に含まれるが、これまでの肥育法ではその含量は低下するとされており、新たな肥育技術の確立が要求されている。また、カルノシンなどの運動能力を向上させる水溶性低分子化合物についても同様なことが言われている状況であり、給与飼料や肥育期間などを含めた総合的な検討が必要である。

これまでに報告されてきた牛肉の機能性として、健脳効果、脂肪燃焼促進作用、貧血予防効果、酸化抑制作用、血圧降下作用、体脂肪低減効果な

どがある。これまでの牛肉に対する“美味しい牛肉”に加えてこのような健康維持および健康促進につながる機能性成分をより多く含有する牛肉の安定的な生産を行うことで、和牛肉消費をより一層促進させ、産業の活性化に貢献できる。また、牛肉の赤身肉には貧血予防に効果的とされるヘム鉄や、脳機能を維持し、うつ病を改善するセロトニンを合成するトリプトファン、血圧降下作用、肝機能向上作用があるタウリンといった機能性を有したアミノ酸が多く含まれていることが報告されており、牛肉の赤身部位は我々消費者の健康増進において今後ますます重要な食材だと考えられる<sup>1~3)</sup>。

一方、和牛に成長や肉質に関連の深い遺伝子型(GH, SCD, FASN)の存在が認められ、それら遺伝子型の違いによって生長量や肉質が異なるとされる報告があり、このような遺伝子型との関連性についても検討する必要がある。

上述したことを背景に、今回の研究では、ミートエフェクトと呼ばれる機能性成分(カルニチン、アミノ酸、脂肪酸など)の牛肉中の含有量と品種や雌雄の関連性について検討し、機能性成分にあたる因子について検討することを目的とした。

## 2. 方 法

本試験では、国内で肥育された黒毛和種未経産牛16頭、黒毛和種去勢牛11頭、およびF1去勢牛12頭の合計39頭の牛肉を供試した。本試験で調査に用いた部位は胸最長筋とした。サンプル牛肉は、サンプル採取後、分析に供するまで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。分析項目は、得られた肉サンプル中の総カルニチン、ヘム鉄、脂肪酸組成、およびアミノ酸組成とした。得られた結果について、供試牛の品種および性を要因として分析を行い、それらの関連性について検討した。なお、脂肪酸組成

は飽和および不飽和脂肪酸に分けて分析し、アミノ酸組成は、旨み成分、甘み成分、苦み成分および機能性成分に分けて検討を行った。

## 3. 結果と考察

Fig. 1にサンプル肉中に含まれるカルニチンおよびヘム鉄の割合を示した。肉中に含まれるカルニチンおよびヘム鉄の割合は和牛の未経産牛肉、去勢牛肉およびF1去勢牛肉の順で低くなった。L-カルニチンは、アミノ酸のL-リジンとL-メチオニンを原料として肝臓や腎臓で合成される機能性ペプチドで、特に反芻動物である牛や羊で合成能が高く、その肉中に多く含まれるとされている。また、L-カルニチンは放牧などで飼育される繁殖牛の肉中に豊富に含まれることが報告されている。また、ヘム鉄は赤身部分などの色が濃く肉色素含量が多い部位に多く含まれている。ヘム鉄は鉄欠乏性貧血予防効果があるとされ、特に肉色素中のヘム鉄は、腸管での吸収率が野菜などに含まれるヘム鉄に比べ高いことから、鉄欠乏性貧血予防効果が高いと言われている。今回の調査から、和牛肉はF1肉よりも多くのカルニチンおよびヘム鉄が含まれている可能性が示唆された。また、和牛でも未経産牛肉が去勢牛よりも、その割合が増加する可能性が認められた。

Fig. 2にサンプル肉中に含まれる脂肪酸組成を示した。飽和脂肪酸であるミリスチン酸、パルミチン酸およびステアリン酸、モノ不飽和脂肪酸であるミリストレイン酸、パルミトレイン酸およびオレイン酸、ジ不飽和脂肪酸であるリノール酸が検出された。脂肪酸割合では、オレイン酸割合が最も高くなり、次いでパルミチン酸、ステアリン酸が高くなった。また、オレイン酸は和牛の未経産牛肉、去勢牛肉およびF1去勢牛肉の順で低くなる傾向を示した。パルミチン酸は、和牛去勢牛肉が他の牛肉に比べ低くなる傾向にあった。ステ

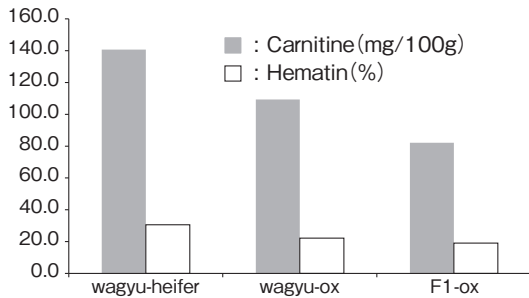


Fig. 1 Carnitine and hematin content of wagyu-heifer, wagyu-ox and F1-ox meat

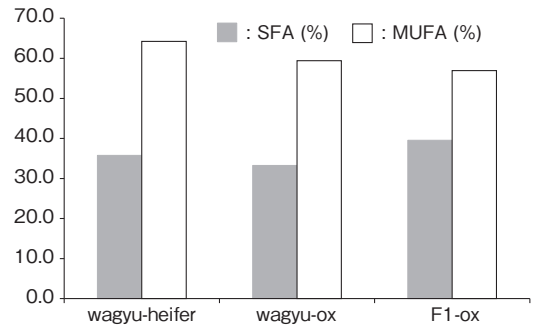


Fig. 3 SFA and MUFA content of wagyu-heifer, wagyu-ox and F1-ox meat

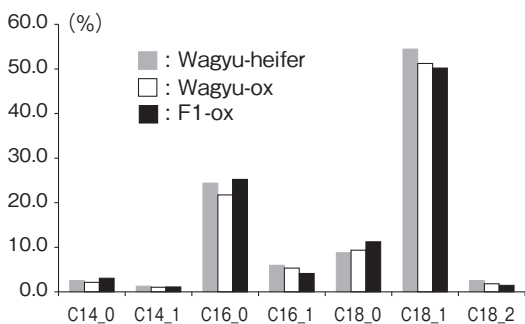


Fig. 2 Fatty acid composition of wagyu-heifer, wagyu-ox and F1-ox meat

アリン酸はオレイン酸とは逆に和牛の未經産牛肉、去勢牛肉およびF1去勢牛肉の順で高くなる傾向を示した。この中でオレイン酸は牛肉の美味しさの指標にも用いられる場合があり、本調査において、和牛の未經産牛肉で最も高くなり、F1で最も低くなったことは我が国におけるブランド牛肉の美味しさを考える上で大変興味深い結果である<sup>4)</sup>。

Fig. 3にサンプル肉中に含まれる脂肪酸組成を飽和脂肪酸および不飽和脂肪酸に分けて示した。飽和脂肪酸の割合はF1去勢牛肉が他の牛肉に比べ高くなる傾向にあった。不飽和脂肪酸の割合は和牛の未經産牛肉、去勢牛肉およびF1去勢牛肉の順で低くなる傾向がみられた。肉中の不飽和脂肪酸割合は、食味官能評価試験とも関連性が高く、特に多汁性との関連性が示唆されている<sup>5)</sup>。

そのことから、本調査において、美味しさの観点から和牛の未經産牛肉が最も高く評価される可能性が示され、オレイン酸含量との関連も含め、今後詳細に検討する必要があるだろう。またその一方で、肉中脂肪酸の不飽和度は、肉質に関連する遺伝子多型との関連性が認められており、その点で今後、SCD遺伝子型やFASN遺伝子型などの肉中脂肪酸の不飽和化に関連性のある遺伝子多型の違いも含めて検討する必要があるだろう。またこれらの遺伝子発現には肥育期間にも関連している可能性があることから、肥育期間についても合わせて検討する必要があると考える。

Fig. 4にサンプル肉中に含まれるアミノ酸組成を示した。旨み成分とされるアスパラギン酸、グルタミン酸およびアスパラギン、甘み成分とされるセリン、グリシン、スレオニン、アラニン、リジンおよびプロリン、苦み成分とされるヒスチジン、アルギニン、チロシン、バリン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、イソロイシンおよびロイシン、機能性成分とされるグルタミン、ベータアラニン、カルノシンとタウリン、アンセリンおよびシスチンが検出された。いずれの牛肉においてもカルノシンとタウリン割合が最も高くなり、さらに和牛の去勢牛肉が最も高く、次いで和牛の未經産牛肉およびF1去勢牛肉の順と

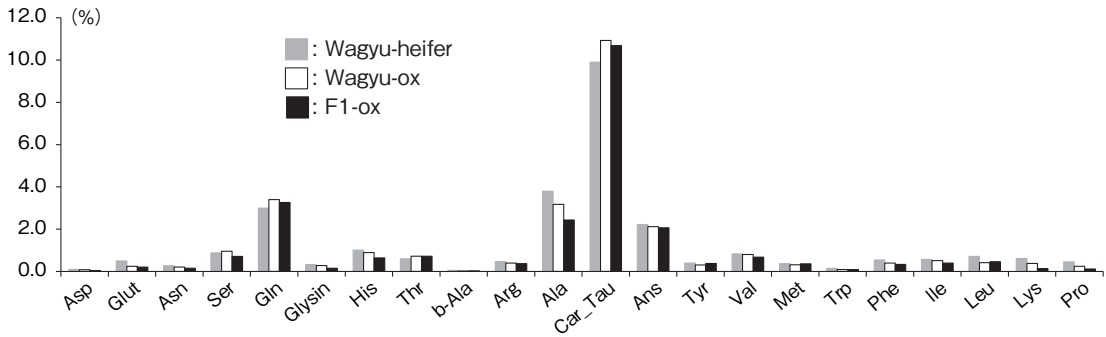


Fig. 4 Amino acid content of wagyu-heifer, wagyu-ox and F1-ox meat

なった。牛肉の美味しさと関連が深いとされるグルタミン酸は、和牛の未經産牛肉が他の牛肉に比べて高くなる傾向にあり、脂肪酸組成と合わせて、牛肉の美味しさという点で大変興味深い結果が得られた<sup>6, 7)</sup>。

Fig. 5 にサンプル肉中に含まれる旨み成分、甘み成分、苦み成分および機能性成分割合を示した。今回の調査において、肉中に含まれる旨み成分、甘み成分および苦み成分割合は、いずれも和牛の未經産牛肉、去勢牛肉およびF1去勢牛肉の順で低くなる傾向にあった。機能性成分は和牛の去勢牛肉が最も高く、次いでF1去勢牛肉および和牛の未經産牛肉の順となった。牛肉の美味しさに関連する旨み、甘みおよび苦みの成分割合が和牛の未經産牛肉で最も高くなったことは、オレイン酸含量と合わせて極めて興味深い結果を示した<sup>8)</sup>。

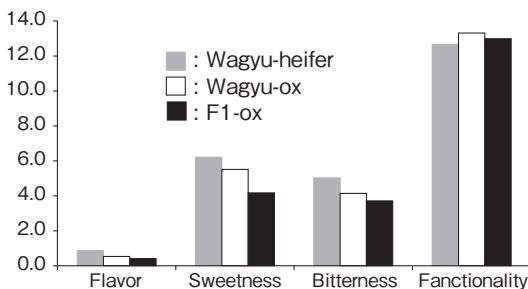


Fig. 5 Functionality composition of wagyu-heifer, wagyu-ox and F1-ox meat

さらに、和牛の未經産牛肉では機能性成分の一つであるカルニチンやヘム鉄含量も高くなる傾向が示されており、品種および性の影響がある可能性が高い。ただし、機能性成分全体としては、和牛の未經産牛肉は最も低くなっていることから、それらを構成するグルタミン、ベータアラニン、カルノシンとタウリン、アンセリンおよびシスチン割合について、今後詳細に検討する必要がある。

今回の調査では、和牛の未經産牛肉が同じ和牛の去勢牛肉やF1の去勢牛肉に比べ、機能性成分であるカルニチンやヘム鉄、美味しさに関連の深いオレイン酸、さらに牛肉の旨み、甘みおよび苦み成分などにおいて高くなる傾向がみられた。これは、我が国を代表する世界的ブランドでもある松阪牛や但馬牛などの未經産牛を用いた和牛肉の美味しさを説明できる可能性があり、その点でこれら成分との関連性の重要性が示唆された。今後、肥育期間との関連についても検討する必要がある。その一方で、性の影響や品種の影響もあり、それらの関連性に与える給与飼料や飼養環境の影響も合わせて今後詳細に検討することが必要である。また、その一方で、美味しさに関連する遺伝子多型との関連も含めて検討する必要がある。

#### 4. 要 約

今回の研究では、ミートエフェクトと呼ばれる

機能性成分（カルニチン，アミノ酸，脂肪酸など）の牛肉中の含有量と品種や雌雄の関連性について検討することを目的とし，国内で肥育された黒毛和種未經産牛16頭，黒毛和種去勢牛11頭，およびF1去勢牛12頭の合計39頭の牛肉を供試して，試験を実施した。和牛の未經産牛肉が同じ和牛の去勢牛肉やF1の去勢牛肉に比べ，機能性成分であるカルニチンやヘム鉄，美味しさに関連の深いオレイン酸，さらに牛肉の旨み，甘みおよび苦み成分などにおいて高くなる傾向がみられ，牛肉の美味しさが性と大きく関連している可能性が示唆され，次いで品種の違いも関連があることが考えられた。

#### 文 献

- 1) 中井博康，池田敏雄，安藤四郎，小堤恭平，田村久子，荒牧秀俊：市場牛肉質性状の実態調査，畜産試験場年報，25，151～162，1987.
- 2) 岩間永子，谷田部隆，齋藤隆夫，合原義人：銘柄牛のうま味成分に関する試験研究，茨城県畜産センター研究報告，43，32～34，2010.
- 3) 古賀照章，中島純子，近藤君夫，唐沢秀行：牛肉の脂肪酸組成およびアミノ酸組成に及ぼす各種要因について，長野県畜産試験場松本家畜保健衛生所，<https://www.pref.nagano.lg.jp/enchiku/sangyo/nogyo/chikusan/kairyuu/documents/saport04.pdf>，2008.
- 4) 平山琢二，北内毅，眞榮田知美，藤原望，平川守彦，及川卓郎：長期肥育和牛肉の食感および食味に関する官能評価について，日本暖地畜産学会報，56（1），67～71，2013.
- 5) 板倉弘重，柴田博，高田明和，松川正，西村敏英，沖谷明紘：牛肉の魅力，（財）日本食肉消費総合センター，8～65，2010.
- 6) 渡辺彰，滝本勇治，西村宏一，常石英作：肥育牛の各種筋肉間における熟成後の遊離アミノ酸およびタウリン含量の差異，日畜会報，60，303～305，1988.
- 7) 本郷富士弥，加香芳孝：食肉の風味成分に関する研究，琉球大学農学部学術報告，第20号，253～259，1973.
- 8) Hornstein, I., Crowe, P. E., Sulzbacher, W. L. : Constituents of meat flavor : beef, *J Agr. Food Chem.*, 8, 65～67, 1960.

## 黒毛和種ゲノムDNAメチル化多型と肉質形質との 関係に関する研究

The research for relationships among genome DNA methylation  
polymorphism and carcass traits in Japanese beef cattle

須 田 義 人  
(宮城大学食産業学部)

Yoshihito Suda  
(School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University)

Heritabilities of quality, tenderness and marbling of meat of Japanese Black cattle (JB) range between 0.3 and 0.6, and meat of JB, known as Wagyu, has become very popular worldwide for its quality. However the main mechanism of developing their characteristic features are not well understood although many researchers have reported SNPs and QTLs which may be concerning with them. Today, we know that DNA methylation to CG rich regions in the upstream region of a start codon, ATG, controls the expression of many genes on a genome wide level, and a part of methylation patterns (DMP) is specific by each tissue and differentiation stage. In its process, it might reflect the environmental effects such as feeding condition, stress and so on. So the relationships among quantitative traits are affected by environmental effects and these might also be affected by DNA methylation. This study's aims are to examine relationships among DMP at the slaughter after fattening and economic carcass traits of JB siblings of two sires. Genomic DNA samples were collected from adipose tissues around the kidneys in each 100 JBs produced from 2 sires (Sire A and B) have parent-child relation, totaling of 200 JBs. To search DMP, EpiXplore Methylated DNA Enrichment Kit, EpiScope Promoter qPCR Array (Human) and SYBR Premix Ex Taq GC (Perfect Real Time) of TAKARA was used respectively. Correlation analysis and analysis of variance (ANOVA) are performed by using SAS program, version 9.1. The CG rich regions in the upstream regions of seven genes, APC\_2, CDKN2A\_1, CDKN2A\_2, CDKN2B, GSTP1, MGMT and SFRP1 of 24 genes were very high DNA methylation level, and DMP in the other genes was similar between 2 sires with parent-child relation. Additionally, CDKN2A\_2 and RB1 was specific condition. Correlation between subcutaneous fat thickness and CHFR was 0.73 at 5% significance level in JB of sire A.

### 1. 目 的

我が国の黒毛和種の脂肪交雑などの肉質特性

は、日本食ブームとともに国内外で注目され、肥育などの技術も我が国農家の固有なものと考えられるようになっており、世界における優位性を

保っている。近年、分子生物学的技術が発達し、ヒトや豚とともにゲノム解析が進んでいることで、脂肪交雑や肉質特性に関わる分子形成メカニズムの解明も近いと考えられてきたが、やはり量的形質である経済形質にはおびただしい数の遺伝子が関与しており、その貢献遺伝子群の特定や形成機構の解明は困難を極めている。他方、特に霜降り特性は遺伝率が約60%と遺伝性が高く、特定品種かつ特定家系での現出は貢献遺伝子群の存在を強く期待させるものである。近年のQTL情報やSNP情報の経済形質への寄与率は低く、2万から3万個あるとされる遺伝子群からこれらの情報を用いて量的形質に関わる貢献遺伝子を絞り込むことは现阶段では見通しが立っていない。また、量的形質の多くは、遺伝要因のみならず環境要因の影響も強いことから、改良マーカーとして安定的にかつ早期に判断できるものとしては、遺伝要因のみならず“環境要因”の両面を反映させるものであることが必須であり、また多くの遺伝子に共通した分子メカニズムを持っていることが重要である。本研究では、多型評価できるメカニズムのエピジェネティック機構、特にゲノムDNAのメチル化機構に焦点をあてた。一般的に知られているDNAのメチル化機構が基本的な考え方で、遺伝子のmRNA発現量とタイミングを調節しているもので、プロモーター領域のCpGリッチ領域のシトシンをメチル化することで多くの遺伝子の発現量を共通して抑制する機構である。このメカニズムが発生や分化の促進に伴って組織および環境特異的に変化し、ゲノムワイドに変化して組織の特性を構築することに強く貢献すると考えられ、塩基配列非依存遺伝子発現調節機構と考えられる。黒毛和種の脂肪交雑は、たとえ同一の家系や両親であっても、飼料、農家、期間、ほか様々な要因で同程度のものにならないことは知られており<sup>1)</sup>、エピジェネティック機構との関係や相関

性についてとても興味深いと考えられる。もし、DNAメチル化度（一部の領域も含む）と枝肉成績との相関性が高い場合、若齢期あるいは初期分化ステージでの多型様式から早期に能力判定が可能であり<sup>2)</sup>、現行の改良モデルによる育種価の正確度を高めるものと期待できる。以上のことから、今回は親子関係にある2種雄牛由来のゲノムDNAを供試して、ヒトゲノムでのメチル化促進領域とされる遺伝子上流域34領域を選択し、メチル化度（メチル化割合）を調査、比較した。また、それらと枝肉成績との相関解析も行った。

## 2. 方法

### 2.1 供試材料およびゲノムDNAの抽出

親子関係にある基幹種雄牛2頭（子Aおよび父B）の産子各100頭、計200頭の枝肉腎周囲脂肪を採取し、ゲノムDNAを抽出するまで-20℃で保管した。ゲノムDNAの抽出は、QIAamp<sup>®</sup>DNA Mini Kitを用いた。以後、キット付属のプロトコルに従って行った。

### 2.2 超音波破碎およびメチル化DNAの濃縮

Vibra cell (SONICS社)を用いて、抽出したゲノムDNAを冷却下で超音波剪断処理を行い断片化を行った。条件はAMPL30%で35秒とした。EpiXplore<sup>™</sup> Methylated DNA Enrichment Kit (タカラバイオ社)を用いてメチル化DNAの濃縮を行った。以後の手順は、付属のプロトコルに従って行った。濃縮されたメチル化DNAを精製するためにエタノール沈殿法<sup>3)</sup>で行い、さらにCENTRI-SEP Spin Columns (Princeton Separations社)を用いて精製した。得られたサンプルを以後の解析に用いた。

### 2.3 ゲノムDNAのメチル化割合の解析

解析にはEpiScope<sup>®</sup> Promoter qPCR Array (Human) (タカラバイオ社) およびSYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> GC (Perfect Real Time) (タ



カラバイオ社)を用いた。以後は、付属のプロトコルに従った。各サンプルにおけるDNAの相対量を推定するためにリアルタイムPCR法を用い、そのときのThreshold (dRn) 値を0.02に設定した。その後、タカラバイオ社より公開されているEpiScope Promoter qPCR Array Analysis Toolを用いて高メチル化割合と低メチル化割合をそれぞれ算出した。本報告においては、高メチル化状態のDNA画分に関する解析結果を示した。

#### 2.4 統計解析

統計解析には、SAS (バージョン9.1) プログラムおよびGLMプロシージャおよびCORRプロシージャを用いて検討した。今回分析に用いた枝肉成績は、出荷月齢が有意であるものについて平均月齢に線形補正し、高メチル化割合(メチル化度)の格付け間での比較、さらには相関解析を行った。相関解析では5%水準で無相関検定を行った。

### 3. 結果と考察

今回調査した遺伝子上流域に関して、人およびウシゲノム情報をもとにBLAST解析を行い相同性について検討したところ、すべての遺伝子上流域において70%から80%程度一致していた。

種雄牛Aの産子において、遺伝子APC\_2, CDKN2A\_1, CDKN2B, GSTP1, MGMT, そしてSFRP1の上流域においてはA3からA5まで各格付け間で差異はなく、組織内の高メチル化割合が高い傾向にあった(Fig. 1)。一方で、種雄牛Bの産子においても同様の傾向がみられたが、特にCDKN2A\_2は種雄牛Bの方が平均的に高かった(Fig. 2)。さらには、種雄牛AのRB1は格付けA4で高メチル化割合が高く、それ以外の格付けでは低メチル化の割合が高いことが明らかとなった。この傾向は種雄牛BのA3においても確認された。この両遺伝子上流域におけるメチル

化状態は、顕著な特徴であり、改良のためのエピゲノムマーカーとして有効であることが期待された。さらなる発見として、種雄牛AおよびBの産子において、CCNA1, DAPK1, PTGS2, そしてWT1の上流域は、それぞれ100%低メチル化状態であることが明らかとなった。加えて、CDH1, CHFR, そしてMLH1はそれぞれ高メチル化割合が低い傾向であることが明らかとなった。これらの知見は種特異的もしくは高能力牛が持つ選抜に伴う特異的な特徴である可能性があり、さらなる追跡調査に加えて細胞レベルでのIn Vitro研究の実施が必要であると考えている<sup>4-6)</sup>。

種雄牛Aにおいて枝肉重量(CW)とLINE-1上流域の高メチル化割合との間に有意な正の相関(0.46)が認められた( $P < 0.05$ )。さらには、皮下脂肪厚とBNIP3との間に有意な負の相関(-0.48), そしてCHFRとの間に高い有意な正の相関(0.73)がそれぞれ認められた( $P < 0.05$ )。特に、遺伝子CHFRは顕著に高い正の相関性があり、この遺伝子はE3ユビキチンタンパク質リガーゼをコードしており、筋肉細胞あるいは脂肪細胞における機能性に影響を与える重要な因子であることから、メチル化状態が枝肉形成に相関性があることが推察された。この知見は、改良のための有効なエピゲノムマーカーの存在を示唆するものと考えられる。一方で、種雄牛Bにおいては、枝肉重量とCDKN2A\_1との間に有意な正の相関(0.49)が認められた( $P < 0.05$ )。他の形質については有意な相関は認められなかった。

種雄牛Aが子、種雄牛Bが父という親子関係にある高能力種雄牛であり、それらの産子における34種類の遺伝子上流域の高メチル化割合の傾向は類似している傾向にあったが、数種の特徴的な遺伝子上流域が明らかとなった。特に、CDKN2A\_2およびRB1はさらなる検討を要する興味深い遺伝子上流域であると考えられた。また、種雄牛

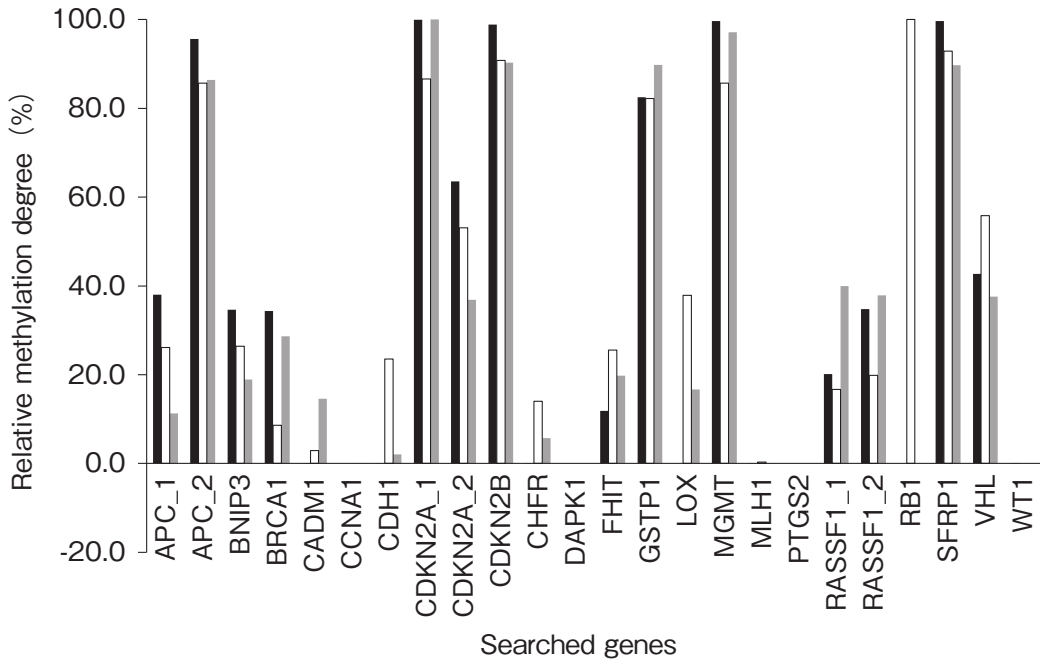


Fig. 1 Methylation degree in adipose tissue around the kidney of Sire A's child ■ A 5 □ A 4 ▒ A 3

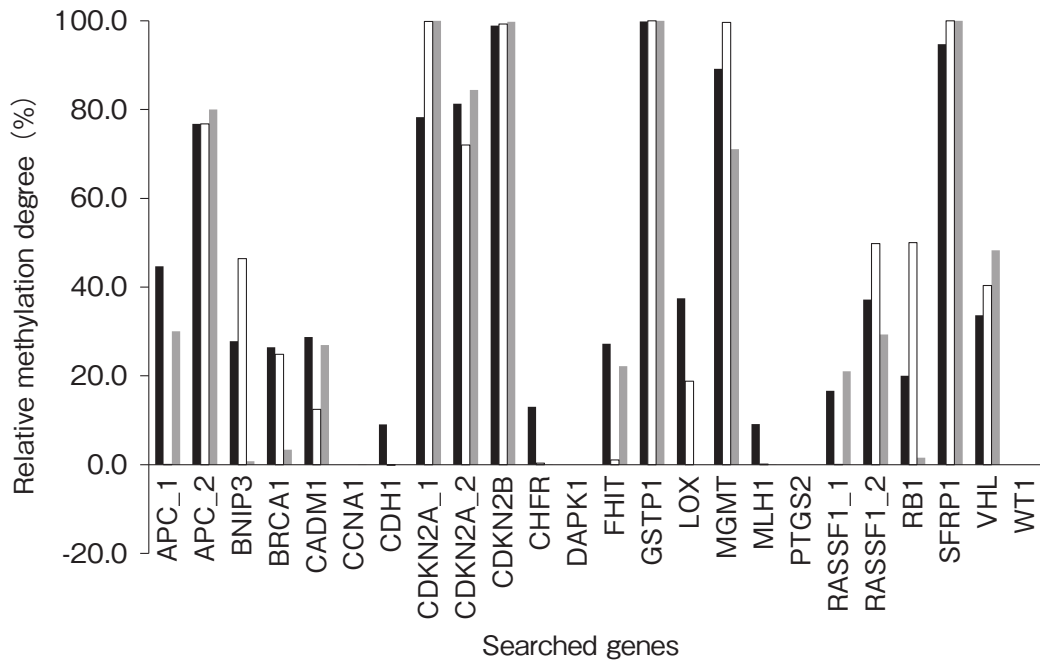


Fig. 2 Methylation degree in adipose tissue around the kidney of Sire B's child ■ A 5 □ A 4 ▒ A 3

**Table 1** Correlations among carcass traits and methylation degree of 28 upstream regions in 16 genes of the cattle produced from sire A.

| Gene     | BMS   | CW    | LEA   | RLT   | SUB    |
|----------|-------|-------|-------|-------|--------|
| APC_1    | 0.18  | 0.08  | 0.14  | -0.16 | -0.30  |
| APC_2    | 0.11  | -0.05 | -0.20 | -0.07 | 0.05   |
| BNIP3    | 0.22  | -0.26 | 0.24  | -0.09 | -0.48* |
| BRCA1    | 0.18  | -0.28 | 0.04  | 0.05  | -0.38  |
| CADM1    | -0.31 | 0.27  | -0.22 | 0.13  | 0.39   |
| CDH1     | -0.07 | 0.11  | -0.17 | -0.22 | -0.35  |
| CDKN2A_1 | 0.08  | -0.30 | -0.10 | -0.03 | 0.21   |
| CDKN2A_2 | 0.22  | -0.08 | -0.06 | 0.21  | -0.23  |
| CDKN2B   | 0.23  | 0.06  | 0.13  | 0.29  | 0.35   |
| CHFR     | -0.17 | 0.26  | -0.14 | 0.27  | 0.73*  |
| DAPK1    | -0.20 | 0.41  | -0.37 | 0.25  | 0.40   |
| FHIT     | -0.21 | -0.05 | 0.16  | -0.03 | 0.03   |
| GSTP1    | 0.03  | -0.15 | 0.31  | 0.03  | -0.02  |
| MGMT1    | 0.14  | -0.31 | -0.05 | 0.00  | 0.24   |
| MLH1     | -0.17 | 0.33  | 0.05  | 0.08  | -0.04  |
| RASSF1   | -0.06 | 0.12  | 0.37  | -0.30 | -0.19  |
| SFRP1    | 0.30  | -0.36 | 0.12  | -0.14 | -0.24  |
| LINE-1   | -0.07 | 0.46* | -0.01 | 0.22  | 0.00   |

BMS ; bovine marbling score, CW ; carcass weight, LEA ; loin eye area, RLT ; Rib loin thickness, SUB ; Subcutaneous fat thickness

\* : It was at 5% of significance level.

AおよびB間で比較すると、Aの方の産子の枝肉成績が良いことが知られており、CHFRの高メチル化割合との関係性が強いと推察された。これらの遺伝子に関するさらなる研究が重要であると考えられた<sup>7)</sup> (Table 1, Table 2)。

#### 4. 要 約

黒毛和種の脂肪交雑をはじめとした良肉質は国内外で注目されている。その優れた経済形質への貢献遺伝子群や形成機構は解明されていない。一方で、脂肪交雑特性など量的形質の遺伝率は約60%と高く、その貢献遺伝子の存在が強く期待されたが、量的形質の発現に関与する遺伝子群は膨大であり、塩基配列多型に基づくQTLおよび

**Table 2** Correlations among carcass traits and methylation degree of 28 upstream regions in 16 genes of the cattle produced from sire B.

| Gene     | BMS   | CW    | LEA   | RLT   |
|----------|-------|-------|-------|-------|
| APC_1    | 0.32  | 0.39  | 0.34  | 0.35  |
| APC_2    | 0.09  | -0.13 | 0.22  | 0.03  |
| BNIP3    | 0.26  | -0.08 | -0.34 | -0.11 |
| BRCA1    | 0.19  | -0.13 | -0.15 | -0.19 |
| CADM1    | 0.04  | 0.18  | 0.41  | 0.28  |
| CDH1     | 0.13  | -0.08 | 0.17  | 0.16  |
| CDKN2A_1 | -0.12 | -0.02 | 0.09  | -0.25 |
| CDKN2A_2 | 0.19  | 0.49* | 0.40  | 0.45* |
| CDKN2B   | -0.08 | 0.05  | 0.16  | -0.28 |
| CHFR     | 0.33  | -0.07 | 0.04  | 0.03  |
| DAPK1    | 0.04  | -0.29 | -0.15 | -0.09 |
| FHIT     | -0.06 | -0.11 | -0.22 | -0.32 |
| GSTP1    | 0.20  | -0.35 | -0.05 | -0.25 |
| MGMT1    | 0.36  | 0.17  | 0.13  | 0.27  |
| MLH1     | -0.12 | -0.16 | -0.31 | -0.07 |
| RASSF1   | -0.11 | -0.20 | -0.13 | -0.24 |
| SFRP1    | -0.19 | -0.07 | 0.00  | -0.18 |
| LINE-1   | -0.39 | 0.14  | -0.11 | 0.00  |

BMS ; bovine marbling score, CW ; carcass weight, LEA ; loin eye area, RLT ; Rib loin thickness

\* : It was at 5% of significance level.

SNP解析情報の経済形質への寄与度はそれぞれ1~5%程度と低いと、貢献遺伝子群の特定は困難とされている。そして、量的形質は遺伝および環境要因の影響を受けると考えられ、正確度の高い育種改良には双方を総合的に考慮する必要がある。そこで今回は、親子関係にある2種雄牛由来のゲノムDNAを供試して、ヒトゲノムでのメチル化促進領域とされる遺伝子上流域34領域を選択し、メチル化度(メチル化割合)を調査、比較した。また、それらと枝肉成績との相関解析も行った。

高能力種雄牛であるAおよびB産子各100頭計200頭の腎周囲脂肪由来ゲノムDNAを供試した。ヒトでDNAメチル化の影響を受けることが明らか

かになっている全34種の遺伝子プロモーター領域を対象にタカラバイオ社製キットを用いてメチル化DNA抽出濃縮およびリアルタイムPCR法との組み合わせにより脂肪組織内のDNAメチル化割合を算出した。また、DNAメチル化割合の結果と枝肉成績との相関解析を行った。その結果、種雄牛Aが子、種雄牛Bが父という親子関係にある高能力種雄牛であり、それらの産子における34種類の遺伝子上流域の高メチル化割合の傾向は類似している傾向にあったが、数種の特徴的な遺伝子上流域が明らかとなった。特に、CDKN2A\_2およびRB1はさらなる検討を要する興味深い遺伝子上流域であると考えられた。また、種雄牛AおよびB間で比較すると、Aの方の産子の枝肉成績が良いことが知られており、CHFRの高メチル化割合との関係性が強いと推察された。これらの遺伝子に関するさらなる追跡研究および細胞レベルでのIn Vitro研究が重要であると考えられた。

## 文 献

- 1) 横田祥子, 杉田春奈, 大友良彦, 須田義人, 鈴木啓一: 黒毛和種牛肉における脂肪酸組成と枝肉形質および肉質形質との遺伝的關係, 東北畜産学会報, **60** (3), 80~85, 2011.
- 2) 佐々木裕之: エピジェネティクス入門, 岩波書店, 2008.
- 3) Zeugin, J. A., Hartley, J. L.: Ethanol Precipitation of DNA. *Focus*, **7** (4), 1~2, 1985.
- 4) Esteller, M., Corn, P. G., Baylin, S. B., Herman, J. G.: A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res*, **61** (8), 3225~3229, 2001.
- 5) Kaneda, M., Akagi, S., Watanabe, S., Nagai, T.: Comparison of DNA methylation levels of repetitive loci during bovine development, *BMC Proc.*, Jun 3:5 Suppl 4:S3. doi : 10.1186/1753-6561-5-S4-S3, 2011.
- 6) Fraga, M. F., Ballestar, E., Paz, M. F., Ropero, S., Setien, F., Ballestar, M. L., Heine-Suñer, D., Cigudosa, J. C., Urioste, M., Benitez, J., Boix-Chornet, M., Sanchez-Aguilera, A., Ling, C., Carlsson, E., Poulsen, P., Vaag, A., Stephan, Z., Spector, T. D., Wu, Y. Z., Plass, C., Esteller, M.: Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins, *Proc Natl Acad Sci USA*, **102** (30), 10604~10609, 2005.
- 7) Daugela, L., Nüsgen, N., Walier, M., Oldenburg, J., Schwaab, R., El-Maarri, O.: Measurements of DNA methylation at seven loci in various tissues of CD1 mice, *PLoS One*, **7**(9), e44585. doi : 10.1371/journal.pone.0044585. Epub 2012 Sep 7, 2012.

# 牛白血病ウイルスの垂直伝播に関する研究

Studies on perinatal transmission of bovine leukemia virus

目 堅 博 久

(宮崎大学農学部獣医学科)

Hirohisa Mekata

(Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Bovine leukemia virus (BLV) is the causative agent of enzootic bovine leukosis (EBL). Many BLV-infected cattle remain asymptomatic carriers of the virus. However, 1-5% develop EBL, which is characterized by fatal lymphoma or lymphosarcoma several years after infection. Understanding perinatal transmission of BLV is essential for constructing effective countermeasures against BLV infection. However, the rate of perinatal transmission is uncertain, as larger sample sizes are needed to assess this. This study investigated the frequency of perinatal BLV infection under field conditions and evaluated some of the risk factors associated with its occurrence. A total of 129 calves born to BLV-infected cows in 2013-14 in a herd in Kyusyu, Japan, were tested for infection immediately after birth and again at one month of age using nested PCR. Maternal viral load, cattle breed, the presence or absence of midwifery and the number of births per dam were evaluated to validate the risk factors associated with perinatal infection. A total of 24 (18.2%) calves were infected with BLV, of which 14 (10.8%) calves were infected through the transplacental and 10 (7.7%) calves through the birth canal routes. Maternal viral load was significantly correlated with the frequency of perinatal infection. Fourteen of 29 (48.2%) newborn calves born to dams with more than 400 copies/10 ng of genomic DNA were infected with BLV at birth. Only nine of 95 (9.4%) calves born to dams with fewer than 400 copies/10 ng were infected with BLV. No statistical associations were found between perinatal infection and cattle breed, midwifery and number of births per dam. From the result of this study, identifying cattle with high viral load (over 400 copies/10 ng) and transferring their use from dairy cows or breeding dams to fattening cows or donor cows for embryo collection will reduce the possibility of vertical transmission in herds.

## 1. 目 的

地方病性牛白血病（以下、牛白血病）は、レト

ロウイルス科デルタレトロウイルス属 (*Retroviridae Deltaretrovirus*) に属する牛白血病ウイルスの感染を原因とし、白血病や悪性リン

パ腫を主徴とする牛の届出伝染病である。感染牛の約70%は無症状であり、25~30%がリンパ球が著明に増加する持続性リンパ球増多症となるが、外見上は臨床症状を伴わない。1~5%の感染牛が感染から数年後に牛白血病・リンパ腫を発症し、予後不良となる。また、と場で発症が発見された場合は全廃棄処分となる。2010~11年に行われた全国規模の調査で、乳牛、肉用牛の牛白血病ウイルス感染率はそれぞれ40.9%、28.7%であった<sup>1)</sup>。発症牛の届出数も急増しており、予後不良や全部廃棄による経済的な損失が大きな問題となっている。また、これまではリンパ球の増加以外に異常がないと考えられてきた持続性リンパ球増多症期においても、免疫細胞の疲弊化に伴う免疫能低下や、生産性低下が報告され<sup>2~4)</sup>、牛白血病ウイルス感染による被害が想像以上に大きいことが明らかになりつつある。

牛白血病ウイルスは感染リンパ球を含む血液や母乳を介して伝播する。伝播経路は多岐にわたり、サシバエなどの吸血昆虫、注射針や直検手袋の使い回し、出血を伴う器具の未洗浄連続使用で伝播する<sup>5~7)</sup>。また、水平伝播と比べて頻度は少ないものの、母乳を介した感染や妊娠および分娩時に母子間伝播することも知られている<sup>8,9)</sup>。牛白血病ウイルスは感染後、プロウイルスとして感染牛の染色体に組み込まれ、生涯にわたって感染が持続する。感染や発症を防ぐワクチン、治療法は存在しないため、牛白血病対策は牛白血病ウイルスの感染を防ぐ以外に方法はない。

牛白血病対策として、感染牛の積極的淘汰が推奨されている。西ヨーロッパやオセアニアの国々では、積極的淘汰の結果、牛白血病ウイルス清浄化が達成された<sup>10,11)</sup>。しかし、国や県からの補償がなく、感染率が高い日本において、感染牛の積極的淘汰は農家の経済的負担が大きいことから難しい。そのため、経済的な負担の少ない、効率的

な方法で感染牛の淘汰、非感染牛への更新をすすめる必要がある。市場など、外部から農場への牛の導入は経済的な負担があること、現在の市場システムでは確実に非感染牛を入手することが難しいことから、牛白血病対策を実行・計画する農場では自家繁殖牛による感染牛の更新が感染率を下げる主な方法となる。そのため、より実現性のある計画を立てるために牛白血病ウイルスの垂直感染リスクを正確に把握する必要がある。また、垂直感染を防ぐために垂直感染に関わるリスク因子を明らかにする必要がある。そこで、本研究では垂直感染の確率を調べるとともにリスク因子の解析を行った。本研究成果は、農場における効率的な牛白血病対策の確立、牛白血病被害の軽減につながる。

## 2. 方 法

### 2.1 材料

九州の一貫経営農場（ホルスタイン種を約2,500頭、黒毛和種を約300頭、F1種を約300頭、ブラウンスイス種を約100頭飼養）において検体の採材を行った。当該農場では母乳を介した牛白血病ウイルス感染を防ぐため、出産直後の子牛を母牛から離し、凍結後に加温融解した初乳を与え、その後は代用乳を与えた。2013年1月~10月、12ヶ月齢以上の雌牛、計2,906頭から採血を行った。すべての血液検体は遠心後（1,500g、5分）、血清分離を行い、製品の指示書に従い、ELISA法による牛白血病ウイルス感染診断を行った（JNC社、東京）。2013年6月~2014年5月、前述の方法により、牛白血病ウイルス感染と診断した母牛115頭および感染母牛より生まれた子牛129頭（黒毛和種：54頭、F1種：64頭、ホルスタイン種：3頭、ブラウンスイス種：8頭）より分娩後24時間以内に採血を行った。また、生後31~45日目、再度、子牛から採血を行った。

## 2.2 プロウイルスの検出および感染時期の決定

血液からのDNA抽出はWizard Genomic DNA Purification Kit (Promega社, Fitchburg, 米国)を用いた。抽出したDNAの濃度は分光光度計で測定し, 50 ng/ $\mu$ lに希釈調整した。抽出したDNAを鋳型として, 牛白血病ウイルスのLong terminal repeat領域およびenv遺伝子を標的としたnested PCR法を行った<sup>9)</sup>。出生直後の検査で陽性かつ31~45日齢の検査で陽性の子牛を胎盤感染, 出生直後の検査で陰性かつ31~45日齢の検査で陽性の牛を産道感染とした。

## 2.3 感染ウイルス量の測定

母牛の感染ウイルス量を測定するため, Cycleave PCR Reaction Mixおよび牛白血病ウイルス検出キット (TaKaRa社, 大津)を用いて, Real-time PCR法を行った<sup>9)</sup>。

## 2.4 統計解析

胎盤・産道感染と母牛の感染ウイルス量, 分娩介助の有無, 出産回数, 子牛の品種について統計検定を行った。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

## 3. 結果と考察

牛白血病ウイルスに感染していた母牛129頭から生まれた子牛のうち, 14頭 (10.8%)で胎盤感染が, 10頭 (7.7%)で産道感染が認められた (Table 1)。計18.6%で子牛への胎盤および産道感染が起きたことになり, これは4~6%で垂直伝

播するとした過去の報告と比べても高い値となっている<sup>6, 12)</sup>。その原因として, 検出方法の違いが考えられる。過去の報告で用いたゲル内沈降反応法と本研究で用いたnested PCR法では検出感度が異なる。新生子牛では免疫系の発達が未熟なことから, 感染からの日数が十分に経過していないことから, ウイルスに対する抗体産生が十分に行われず, ゲル内沈降反応法で検出可能なレベルまで抗体価が上昇していない可能性がある。いっぽう, nested PCR法ではウイルス遺伝子を検出するため, 新生子牛の抗体産生能に検査結果が影響されない。新生子牛では良好な発育のために, 出産後できるだけ早くに初乳を与える必要がある。これまでの報告によると, 移行抗体は最長9ヶ月齢まで持続するため<sup>13)</sup>, 9ヶ月齢未満の子牛の牛白血病ウイルス検査はPCR法が適切である。本研究では, 出産直後と31~45日齢においてnested PCR法による検査を実施した。6頭の新生子牛で, 出産後24時間以内の検査で陽性かつ31~45日齢の検査で陰性であった。これと同様の報告は, 以前にも行われている<sup>13)</sup>。この6頭に共通する点として, single PCR法による40サイクルの増幅反応ではウイルス遺伝子を検出できなかった。このことから, 母親由来のウイルスゲノムなどの混入が影響していると思われる。以上から, PCR法による子牛の検査は1ヶ月齢以降に行うことがより適切と考えられる。

胎盤・産道感染におけるリスク因子を明らかに

Table 1 The frequencies of perinatal BLV infection

| Calf breed     | Number of calves | Transplacental transmission | Birth canal infection | Total perinatal infection |
|----------------|------------------|-----------------------------|-----------------------|---------------------------|
| Japanese Black | 54               | 7 (12.9%)                   | 2 (3.7)               | 9 (16.6)                  |
| F1             | 64               | 7 (10.9)                    | 7 (10.9)              | 14 (21.8)                 |
| Holstein       | 3                | 0 (0)                       | 0 (0)                 | 0 (0)                     |
| Brown-Swiss    | 8                | 0 (0)                       | 1 (12.5)              | 1 (12.5)                  |
| Total          | 129              | 14 (10.8)                   | 10 (7.7)              | 24 (18.6)                 |

するため、母牛の感染ウイルス量、分娩介助の有無、子牛の品種、母牛の出産回数と胎盤・産道感染の相関を比較した。これらの要因をリスク因子の候補と考えた理由として、胎盤・産道感染のリスクは新生子牛への暴露ウイルス量および暴露時間が影響すると考えたからである。つまり、母牛の感染ウイルス量は新生子牛への暴露ウイルス量に、分娩介助、子牛の品種、母牛の出産回数は分娩の困難さに影響するため、子牛の産道に位置する時間の違い、つまりウイルスに暴露される時間に影響すると考えた。はじめに、母牛の感染ウイルス量と胎盤・産道感染の相関を比較したところ、感染ウイルス量の増加に比例して、胎盤・産道感染の確率は増加した (Fig. 1)。また、10 ng の抽出ゲノム中、牛白血病ウイルスの感染コピー数が400 copies未満の群では胎盤・産道感染の起こる確率が9.4% (9/95) であったのに対し、それ以上の群では48.2% (14/29) であった ( $P <$

0.01)。このことから、母牛の感染ウイルス量が産道・胎盤感染の重要なリスク因子であることが明らかとなった。続いて、分娩介助の有無と胎盤・産道感染の相関を比較した。分娩介助ありの群では産道感染が20.0% (2/10) と介助なしの群の6.1% (7/114) と比較して高い値となったが、これらの中に有意な違いはなかった ( $P=0.15$ )。また、胎盤・産道感染と子牛の品種を比較すると、F 1種で21.8% (14/64)、黒毛和種で16.6% (9/54)、ホルスタイン種とブラウンスイス種で合わせて9.1% (1/11) であった (Table 1)。子牛の品種と胎盤・産道感染の間に有意な違いはなく ( $P=0.68$ )、産子が母体に比べて小さいために分娩が比較的容易である F 1 群で最も高い感染率となった。胎盤・産道感染と母牛の出産回数を比較したところ、産道感染群の平均出産回数は4.87回、胎盤感染群は5.30回、感染なしの群は4.92回であり、それらの中に有意な違いはなかった ( $P=0.37$ )。分娩介助ありの群で高い感染率が認められたものの、子牛の品種、出産回数と胎盤・産道感染の間に相関する結果が認められなかったことから、分娩の困難さが感染のリスクであるかについてはさらなる解析が必要である。

本研究から、牛白血病ウイルス感染母牛から生まれた子牛の18.6%で胎盤・産道感染することが明らかとなった。また、母牛の感染ウイルス量が重要なリスク因子であり、400 copies/10 ngを超える高ウイルス量の感染母牛に限ると、48.2%の新生子牛が牛白血病ウイルスに感染して生まれることが明らかとなった。牛白血病ウイルスは主に水平感染で伝播する。そのため、感染牛の隔離、衛生対策が農場内での感染を防ぐために重要である。いっぽうで、感染率を下げるためには、非感染牛を増やす必要がある。繁殖母牛の感染ウイルス量を把握し、感染ウイルス量に基づいた更新計画、分娩計画を立てることが、非感染牛の増加に

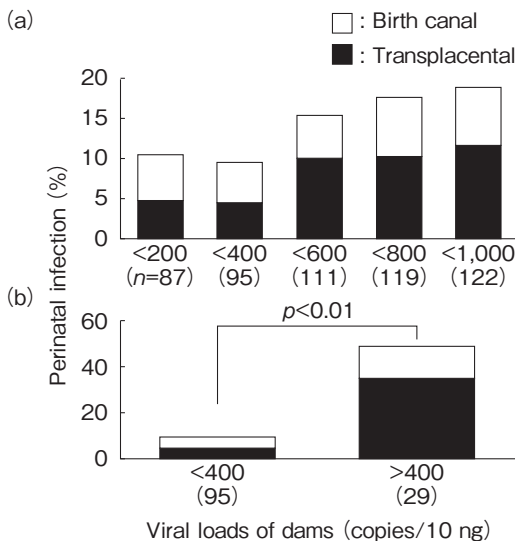


Fig. 1 Correlation between maternal viral loads and perinatal infection.

(a) Rate of perinatal infection was proportional to maternal viral load (b) Perinatal BLV infections occurred in 9.4% and 48.2% of newborn calves born from cattle with under and over 400 copies/10 ng, respectively



つながる。受精卵移植において、ドナーとなる母牛の感染状態は出産する子牛に影響しないことが明らかとなっている<sup>14, 15)</sup>。そのため、感染ウイルス量の多い母牛より受精卵を採り、BLV非感染牛に移植することで、BLVの感染リスクをゼロに抑えながら、感染ウイルス量の多い母牛の血統を維持することも可能である。

多くのレトロウイルス感染症では、感染期間が発症の重要なリスク因子である。そのため、垂直感染の制御は感染牛の減少だけでなく、発症牛の減少にもつながる可能性がある。このことから、牛白血病ウイルス感染対策は水平感染だけでなく、垂直感染対策も並行して行う必要がある。なお、本研究成果は Mekata, H., Sekiguchi, S., Konnai, S., Kirino, Y., Honkawa, K., Nonaka, N., Horii, Y., Norimine, J. : Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus, *Vet. Rec.*, doi: 10.1136/vr.102464, 2014. に誌上発表した。

#### 4. 要 約

地方病性牛白血病は牛白血病ウイルスの感染を原因とする牛の届出伝染病である。多くの感染牛は臨床症状を示さないものの、1～5%の感染牛は発症し、予後不良や全廃棄処分となるため、経済的な損失が大きい。近年、国内では牛白血病ウイルスの感染率が増加し、発症牛の届出が急増しているため、早急な対策が求められている。牛白血病ウイルスは水平および垂直感染で伝播する。主な感染経路は水平感染であり、そのリスク因子については多くの報告が行われている。いっぽう、垂直感染は多量の検体入手が難しいこともあり、その確率やリスク因子など不明な点も多い。本研究では、129頭の牛白血病ウイルス感染母牛

から生まれた新生子牛の血液を採材し、牛白血病ウイルスの垂直感染の確率およびリスク因子に関する解析を行った。本研究の結果、感染母牛から生まれた子牛の18.6%で胎盤および産道感染が起こることが明らかとなった。また、母牛の感染ウイルス量の増加に比例して、胎盤・産道感染の確率が増加した。感染ウイルス量が多い母牛から生まれた子牛(400 copies/10 ng以上)では48.2%で垂直伝播するのに対し、少ない母牛から生まれた子牛では9.4%で伝播した( $P < 0.01$ )。いっぽう、分娩介助の有無、子牛の品種、母牛の出産回数と胎盤・産道感染の確率に有意な違いはなかった。以上から、すべての牛白血病ウイルス感染母牛を一律に淘汰・更新の対象とするのではなく、感染ウイルス量の多い母牛を把握し、優先的に更新することが、牛白血病ウイルスの垂直感染対策ではより効率的である。

#### 文 献

- 1) Murakami, K., *et al.*, *Vet. Microbiol.*, 148, 84 ~ 88, 2011.
- 2) Ikebuchi, R., *et al.*, *Vet. Res.*, 42, 103, 2011.
- 3) Della Libera, A. M., *et al.*, *Vet. Res.*, 46, 2, 2015.
- 4) Gutiérrez, G., *et al.*, *BMC Vet Res.*, 10, 82, 2014.
- 5) Kohara, J., *et al.*, *Jpn. J. Vet. Res.*, 54, 5 ~ 30, 2006.
- 6) Lassauzet, M., L. *et al.*, *Am. J. Epidemiol.*, 133, 164~176, 1991.
- 7) 大島寛一ら, 日獣誌, 43, 79~81, 1981.
- 8) Ferrer, J. F., *et al.*, *Science*, 213, 1014~1016, 1981.
- 9) Mekata, H., *et al.*, *Vet. Rec.*, vetrec-2014 ~ 102464, 2014.
- 10) Acaite, J., *et al.*, *Prev. Vet. Med.*, 82, 83~89, 2007.
- 11) Nuotio, L., *et al.*, *Prev. Vet. Med.*, 59, 43~49, 2003.
- 12) Thurmond, M. C., *et al.*, *Can. J. Comp. Med.*, 47, 316~319, 1983.
- 13) Gutierrez, G., *et al.*, *Vet. Microbiol.*, 151, 255 ~ 263, 2011.
- 14) Eaglesome, M. D., *et al.*, *Vet. Rec.*, 111, 122 ~ 123, 1982.
- 15) Hare, W. C., *et al.*, *Can. Vet. J.*, 26, 231~234, 1985.

## 人の食品由来回虫症の感染源対策： 牛と家禽の疫学的役割と制御法の探索

A countermeasure against the infectious source of human toxocarosis and ascariasis : An epidemiological role of cattle and chickens and development of a control measure

野中 成晃・丸山 治彦\*・吉田 彩子\*・桐野 有美・堀井 洋一郎・三澤 尚明・上村 涼子

(宮崎大学農学部, \*宮崎大学医学部)

Nariaki Nonaka, Haruhiko Maruyama\*, Ayako Yoshida\*, Yumi Kirino,  
Yoichiro Horii, Naoaki Misawa and Ryoko Uemura

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, \*Faculty of Medicine, University of Miyazaki)

In order to evaluate human risk of infection with ascarid worms from beef and chicken meat in the southern Kyushu, sero-prevalence against the parasites infection in cattle and chicken was investigated using the diagnostic system developed for humans. In cattle, 35 % showed positive reaction in the screening ELISA, and more than 50% of those positives showed ascarid worm species-specific reactions, indicating the possibility of infection of ascarid worms (*Toxocara* and *Ascaris*) taken place at the farm level. On the other hand, more than 80% showed positive reaction in the screening ELISA in chicken. As in cattle, species-specific reactions were observed in chickens. However, it can not be denied that false-positive reactions may be involved in the result of chickens, and thus we are now performing an experimental infection in chickens to evaluate the reliability and possible cross-reaction in the ELISA systems using different antigens made from different ascarid worms. We also developed an epidemiological tool for detecting *Ascaris suum* larvae in meat products by real-time PCR in this study. We are planning to develop similar methods for detecting *Toxocara canis* and *T. cati*. Based on the results obtained, we further plan an epidemiological study in farms having sero-positive animals to clarify the conditions and factors for the ascarid infection in cattle and chickens, and want to establish a feasible countermeasure against the animal infection with the ascarid worms and to contribute to the improvement of the food safety in Japan.

### 1. 目 的

動物由来回虫症は、我が国を含め世界規模で問題となっている人獣共通寄生虫症で、動物の回虫類、すなわち犬回虫、猫回虫、豚回虫等が人に感

染した場合に、人の体内で幼虫が発育せずそのまま体内移行するために引き起こされる疾病である。我が国においては、犬・猫回虫症の顕性患者は医学中央雑誌（1993年まで）に報告されているだけで約100名にのぼり<sup>1)</sup>、また、全国レベルで

寄生虫症患者の血清診断を行っている研究分担者・丸山の研究室では1986年以降の動物由来回虫症累積症例数が1,000（約40例／年）を超えた。ところが、動物由来回虫感染のほとんどは特徴的な症状を欠き、そのため診断時に類症鑑別候補にあげられないため、感染を探知できないケース、すなわち潜在的感染患者は相当数にのぼると考えられる。実際、血清疫学調査では数%の抗体陽性率が報告されている<sup>1)</sup>。豚回虫症についても、1990年代半ばから問題視されるようになり、上記丸山研究室でも症例の数%は豚回虫によるものと推定している。

動物由来回虫の人への感染は、かつては犬、猫、豚の糞便中に排出される回虫卵の偶発的摂取が主要な経路であり、土壌の虫卵を直接口にしやすい幼児の感染が主であった。しかし、近年、我が国では、肉類の摂食、すなわち食肉に由来する感染（Fig. 1）が主になっている<sup>2)</sup>。待機宿主となる牛や鶏などの家畜・家禽がこれらの回虫に感染した場合、幼虫は体内を移行し肝臓や筋肉に幼虫のまま留まる。我が国では、食文化の変化により家畜の肉や肝臓の生食が好まれるようになって食肉由来回虫症が増加したと考えられ、実際、食生活の共有で家族感染が起こっている<sup>3)</sup>。特に南九州では、鶏肉の生食を好むという特有の食文化があり、牛肉類はもとより鶏肉類（臓器を含む）の公衆衛生上のリスクは他の地域と比べて高いと考えられる。

本研究では、人用診断システムの改良法を用いて、宮崎県の牛と鶏における抗体陽性率を調査し、検査法の信頼性評価のための感染実験を試みた。また、調査ツールとして食肉からの幼虫検出法を開発した。

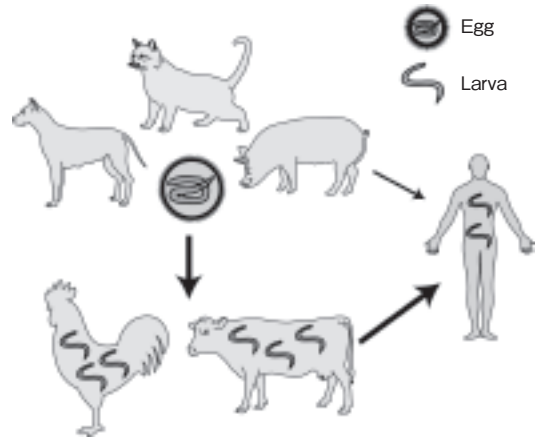


Fig. 1 Transmission routes of ascarid worms to humans

## 2. 方法

### 2.1 食肉・食鳥処理場における調査

宮崎県の食肉・食鳥処理場において、肉用牛および肉用鶏の血液材料を入手し、人用に開発された、豚回虫成虫虫体抽出抗原（As-SWAP）を用いたスクリーニングELISA検査、および犬回虫幼虫（Tc-ES）および豚回虫幼虫の排出分泌抗原（As-ES）を用いた回虫種特異ELISA検査を実施した。牛の陽性／陰性カットオフ値は、健常牛の血清6検体の吸光度の平均に標準偏差の3倍を足した値とした。鶏のものは、プロイラーを陰性コントロール群とみなし設定した。また、人用トキソカラ症診断用ウエスタンブロット（WB）キット（Toxocara WB IgG Kit, LDBIO）を牛・鶏用に改良して用い、犬・猫回虫（まとめてトキソカラ回虫）に対する特異抗体を確認した。

### 2.2 食肉からの回虫幼虫検出のためのreal-time PCR法の開発

豚回虫幼虫を検出するため、豚回虫に特異的なプライマーとプローブを作製し、これらを用いたreal-time PCR法による豚回虫幼虫検出の信頼性を評価した。

### 2.3 感染実験および抗原作成に必要な犬, 猫, 豚, 鶏回虫卵の収集

宮崎県保健所および食肉・食鳥処理場へ協力を依頼し, 犬, 猫, 豚, 鶏回虫の成虫を入手した。成虫を解剖し, 子宮内より各種回虫の虫卵を収集し, 培養フラスコで培養して成熟虫卵を得た。

### 2.4 各種回虫幼虫の排泄分泌抗原の作製

成熟虫卵の卵殻を, ガラスビーズを用いて機械的に破壊し, 強制的に感染期幼虫を得た。得られた幼虫を5%CO<sub>2</sub>下, 37℃で培養し, 培養上清を濃縮して排泄分泌抗原を得た。

### 2.5 感染実験

成熟虫卵の鶏への感染性を確認するため, 各種成熟虫卵2,000個を鶏2羽ずつに経口投与し, 3日後に安楽殺して剖検し, 腸管壁(鶏回虫), 肝臓および肺(犬回虫, 猫回虫, 豚回虫)へ到達した幼虫数を計数した。豚回虫については, 虫卵投与数を10,000に増加して追加実験を行った。次に, 各種回虫卵に対する抗体価の変化と虫種間の交差反応性を評価するための実験を開始した。

### 2.6 農家における調査

飼育動物の感染状況および飼育環境の調査を行うため, 宮崎県および関連団体と今後の具体的実施方法について協議を開始した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 食肉となる牛および鶏における各種回虫に対する抗体価の評価

#### (1) 肉用牛

まず, 農家を特定しないという条件でウシ血清300検体についてスクリーニング検査を行ったところ, 105検体(35%)が抗体陽性となった。そこで, 回虫種特異検査により感染虫種の特定を試みた。この検査では, Tc-ESに対する抗体陽性反応がAs-ESに対する反応より強い場合はトキシ

カラ回虫感染が, 逆にAs-ESに対する抗体陽性反応がTc-ESに対する反応より強い場合は豚回虫感染が疑われる。スクリーニング検査陽性となった105検体について回虫種特異検査を行ったところ, 21.9%がトキシカラ回虫感染を, 36.2%が豚回虫感染を疑う結果となった。トキシカラ回虫の感染が疑われた20検体についてWB検査を行ったところ, 18検体がWB陽性であった (Fig. 2)。第2回目の調査は農家を特定して実施した。32農家123頭を検査した結果, スクリーニング検査陽性は14農家(44%)の24頭(20%)で検出された。このうち, トキシカラ回虫の感染が疑われたものが9検体(37.5%), 豚回虫感染が疑われたものが15検体(62.5%)であった。この結果は最近報告された岐阜県の状況と同様と考えられた<sup>4)</sup>。トキシカラ回虫の感染が疑われたもののうち, 7検体がWB陽性であった。農家別に見ると, 9農家で豚回虫感染が疑われる牛のみ, 2農家でトキシカラ回虫の感染が疑われる牛のみ検出された。残りの3農場では, 両方の回虫感染が疑われる牛が検出された。これらの検査結果は, 犬, 猫, 豚回虫感染が広く牛で起こっている可能性を示唆するものと考えられる。

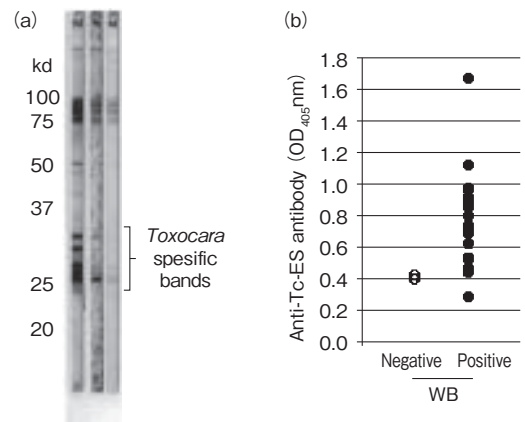


Fig. 2 Detection of *Toxocara*-specific antibodies by Western Blots

(2) 肉用鶏

鶏についてもまず、農家を特定しないという条件でブロイラー血清150検体および地鶏血清169検体を検査した。ブロイラー血清のほとんどがOD値0.2以下の低い値を示したことを受け、便宜上、陽性判定のCut-off値をOD値0.25とした。これをもとにすると、地鶏に対するスクリーニング検査では、86.4%が陽性反応を示した。回虫種特異検査を行ったところ、25.5%がトキソカラ感染を、34.9%が豚回虫感染を疑う結果となった。トキソカラ回虫の感染が疑われた11検体についてWB検査を行ったところ、10検体が陽性であった。2回目の調査は農家を特定して実施した。9農家157羽を検査した結果、スクリーニング検査陽性は91.0%の鶏（全農家）で検出された。回虫種特異検査に対する反応性は農家間で大きなばらつきが見られ、豚回虫、犬回虫および両方の感染が疑われる農家がそれぞれ2、2、3軒あった。残りの2軒では抗体反応は概して低かった。これらの検査結果は、犬、猫、豚回虫感染が広く鶏で起こっている可能性を示唆するとも考えられるが、一方で陽性反応を示す個体がかかりの数にのぼるため、感染実験を行って、用いた検査法の信頼性を精査する必要があると考えられた。

3.2 Real-time PCR法による豚回虫幼虫の検出

本法により、幼虫1匹の検出が可能であることがわかった。しかしながら、マウス肝臓500mgに

豚回虫幼虫を混入すると、幼虫2匹以上は100%検出できるが、1匹を混入させた場合は検査の5割程度でしか検出できず、本法の幼虫検出限界は1匹以上2匹未満であることがわかった。一方、本法は犬回虫および猫回虫とは交差反応を起こさないこともわかった。今後は、本法の検出感度の向上を図り、実際の食肉（牛肉類および鶏肉類）からの幼虫検出を行うとともに、同様の方法により、犬、猫回虫の検出法の開発と野外応用も行う予定である。

3.3 入手した各種回虫成熟虫卵の感染性および抗体価推移と交差反応の評価実験

Table 1 に予備実験の結果を記した。鶏回虫は鶏体内では体内移行をせず、腸管壁に侵入した後、再び管腔へ戻って成虫となる。そのため腸管壁のみの検査を行ったが、鶏2羽から15匹および48匹の幼虫が検出された。他の回虫3種は体内移行を行うため<sup>5-9)</sup>、感染後3日目に幼虫が到達すると考えられる肝臓および肺を検査した。犬回虫、猫回虫は肝臓および肺から1~113匹の幼虫が検出されたが、豚回虫は2,000個投与群ではどの臓器からも幼虫を検出できなかった。そこで、成熟虫卵のバッチを替え10,000個投与を行ったところ、他と比べて少数ではあるが、肝臓および肺から幼虫を回収することができた。これを元に投与虫卵数を犬、猫、鶏回虫は2,000個/羽、豚回虫は50,000個/羽に調整し、各種回虫抗原に対する抗体価の変化と各種抗原に対する交差反応性を

Table 1 Number of larvae recovered from various organs of chickens inoculated with eggs of different ascarid worms

| Parasite species | <i>Ascaridia galli</i> | <i>Toxocara canis</i> |      |       | <i>Toxocara cati</i> |       |      | <i>Ascaris suum</i> |        |
|------------------|------------------------|-----------------------|------|-------|----------------------|-------|------|---------------------|--------|
| Dose of eggs     | 2,000                  | 2,000                 |      |       | 2,000                |       |      | 2,000               | 10,000 |
| Organ            | Intestine              | Liver                 | Lung | Liver | Lung                 | Liver | Lung | Liver               | Lung   |
| Chicken 1        | 15                     | 76                    | 2    | 0     | 1                    | 0     | 0    | 7                   | 0      |
| Chicken 2        | 48                     | 106                   | 7    | 4     | 45                   | 0     | 0    | 1                   | 0      |

評価する感染実験を現在行っている。

### 3.4 農家における調査

計画では、食肉・食鳥処理場の調査で陽性個体が検出された地域や農家のうち、調査への協力が同意が得られた肉牛、養鶏農家を対象に飼育動物の感染状況および飼育環境の調査を行う予定であったが、並行して行っている検査法の信頼性評価が十分にできていないことを鑑み、本年度は調査方法や調査体制の調整に留め実施しなかった。これについては現在宮崎県や関連団体と調整中で、来年度以降に実施する予定である。

## 4. 要 約

南九州における人の動物由来回虫症の原因としての牛と鶏のリスクを評価するため、人用診断システムを改良して、牛と鶏における抗体陽性率を調査した。牛では35%がスクリーニング検査陽性となり、これらの50%以上で回虫種特異反応が認められ、農家において犬・猫（トキソカラ）および豚回虫のどちらの感染も起こっている可能性が示唆された。一方、鶏では80%を超える地鶏がスクリーニング検査陽性となり、これらには回虫種特異反応が認められた。しかしながら、鶏については偽陽性反応を拾っている疑いを否定できず、現在感染実験を行ってその信憑性を評価している。また、今後の検査ツールとして、Real-time PCR法による豚回虫幼虫の検出法を開発した。今後、犬・猫回虫幼虫検出法も開発予定である。今後は陽性動物が検出された農家において疫学調査を実施して動物への感染状況とその要因を明らか

にし、実行可能な対策を立案して、食の安全の確保に寄与したいと考えている。

## 文 献

- 1) 近藤力王至, IV線虫類, 6, トキソカラ感染症, 大鶴正満, 亀谷了, 林滋生監修, 日本における寄生虫学の研究, 7, 465~474, 目黒寄生虫館, 東京, 1999.
- 2) 佐藤宏: 人獣共通感染症としての回虫症—アライグマ回虫症を中心に—, モダンメディア, 51, 177~186, 2005.
- 3) Yoshikawa, S., Nishiofuku, M., Moriya, K., Ouji, Y., Ishizaka, S., Kasahara, K., Mikasa, K., Hirai, T., Mizuno, Y., Ogawa, S., Nakamura, T., Maruyama H., Alao N.: A familial case of visceral toxocariasis due to consumption of raw bovine liver, *Parasitology International*, 57, 525~529, 2008.
- 4) 釜井莉佳, 松尾加代子, 後藤判友, 高島康弘, 吉田彩子, 丸山治彦, 平健介, 赤尾信明: 牛におけるトキソカラ属回虫およびブタ回虫幼虫に対する抗体保有状況調査, 獣医寄生虫学会誌, 13, 1~6, 2014.
- 5) Taira, K., Saeed, I., Permin, A., Kapel, C.M.O.: Zoonotic risk of *Toxocara canis* infection through consumption of pig or poultry viscera, *Veterinary Parasitology*, 121, 115~124, 2004.
- 6) Taria, K., Saitoh, Y., Kapel, C.M.O., 2011. *Toxocara cati* larvae persist and retain high infectivity in muscles of experimentally infected chickens, *Veterinary Parasitology*, 180, 287~291, 2011.
- 7) Taira, K., Saitoh, Y., Okada, N., Sugiyama, H., Kapel, C.M.O.: Tolerance to low temperatures of *Toxocara cati* larvae in chicken muscle tissue, *Veterinary Parasitology*, 189, 363~366, 2012.
- 8) Olsen, A., Permin, A., Roepstorff, A.: Chickens and pigs as transport hosts for *Ascaris*, *Trichuris* and *Oesophagostomum* eggs, *Parasitology*, 123, 325~330, 2001.
- 9) Yoshihara, S., Hattori, J., Nishizono, K., Kawamura, A., Shimozaki, K., Nishida, Y., Oka, K., Tsuji, N.: Hirayama, N., Hepatic Lesions Caused by Migrating Larvae of *Ascaris suum* in chickens, *Journal of Veterinary Medical Science*, 70, 1129~1131, 2008.

## 肺炎原因菌の特定を目的とした気管支肺胞洗浄法の 牛医療への応用

Application of bronchoalveolar lavage to specify offending bacterium of  
the pneumonia to cow medical treatment

帆 保 誠 二・野 口 倫 子

(鹿児島大学共同獣医学部)

Seiji Hobo and Michiko Noguchi

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

Calf pneumonia is an infectious disease which does not only largely affect growth, but also claims the lives of calves. In addition, it is one of the most significant diseases in veterinary medicine. So far, specifying the offending bacterium of the pneumonia has been conducted by bacteriological analysis via nasal swabs. However, information obtained from the nasal swabs is often inconclusive due to a large variety of bacterium existing in the nasal cavity mucosal membrane of cows, even if they are healthy; the bacterium does not seem to connect directly to the offending bacterium of the pneumonia. The present study aimed to specify the offending bacterium of the pneumonia by analyzing nasal swabs and bronchoalveolar lavage fluid obtained from 18 pneumonia-infected cows in bacteriology. As a result, *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma bovis* were mainly isolated from the bronchoalveolar lavage fluids of the pneumonia-infected cows. It was suggested that the isolated bacterium was significantly related to the clinical condition. Moreover, the isolation agreement rates from the nasal swab and the bronchoalveolar lavage fluid of the pneumonia-infected cows was 40.0% (*P. multocida*), and 35.3% (*M. bovis*). The bacterium isolated from the cows' nasal swabs did not necessarily reflect the existence of the bacterium in the bronchoalveolar region. As a result, the pneumonia-infected area became clear. Therefore, it was assumed to be extremely difficult to isolate the bacterial strain from the nasal swab, as well as to identify the principal causative bacterium of the pneumonia.

### 1. 目 的

子牛の肺炎は、その成長に多大な影響を及ぼすばかりか、生命をも奪いかねない感染症であり、獣医療において最も重要な疾患のひとつである。牛の肺炎の診断は、体温測定を含めた臨床検査、

聴診や打診をはじめとした身体検査および血液検査を主体として実施されている。また、肺炎原因菌の特定は、主に鼻腔スワブの細菌学的検索により実施されている。しかし、肺炎の病態は複雑であるため、これら診断法のみでその病態を十分に把握し診断することは困難な場合も少なくない。

一方、牛肺炎の治療は、抗菌薬の全身投与を主体として行われる。しかし、牛における肺炎の抗菌薬治療は、臨床経験に基づく知見や鼻腔スワブからの細菌分離検査結果に基づいて実施されているため、十分な治療効果が得られないことも少なくない。これは、臨床経験に基づく知見は、あくまでも肺炎原因菌を推定して抗菌薬を投与していることから、当該牛の肺炎の治療に使用する抗菌薬が有効であるかは不明であることが主な原因である。また、鼻腔領域には様々な細菌が恒常的に存在していることから、肺炎発症牛の鼻腔スワブを用いた細菌分離検査により特定された細菌が、肺炎発症領域の情報を正確に反映していない可能性も否定できない。

我々は、臨床的に健康で気道の内視鏡検査で異常所見を認めない子牛の鼻腔領域には多数の細菌が恒常的に存在するが、気管支肺胞領域からは細菌は分離されないことを証明した<sup>1)</sup>。このことから、本来細菌が存在しない気管支肺胞領域から細菌が分離された場合、真の肺炎原因菌であることを推察できるようになった。また、慢性化した肺炎発症例牛6頭の気管支肺胞領域からは、牛の主要な肺炎原因菌である*Pasteurella multocida*が6頭中2頭から、*Mycoplasma bovis*が6頭全頭から分離され、これら細菌が肺炎病態の悪化に強く関与していることが明らかとなった<sup>1)</sup>。

本研究では、亜急性期～慢性期にある肺炎発症牛の気管支肺胞領域から細菌分離を行い、牛の肺炎原因菌を特定することを目的とした。

## 2. 方 法

### 2.1 供試子牛および臨床所見

亜急性期～慢性期にあり、抗菌薬による加療から24時間以上が経過した肺炎発症牛18頭（黒毛和種；雄8頭，去勢1頭，雌9頭； $5.0 \pm 1.8$ ヶ月齢（平均値 $\pm$ 標準偏差））を供試した。供試牛に対し

て、水銀体温計で直腸温を測定するとともに、聴診により心拍数および呼吸数を計数した。

### 2.2 血液検査

供試牛の頸静脈から気管支鏡検査直前に血液を採取し、血液自動分析装置を用いて末梢血中の白血球数、赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値を測定した。

### 2.3 呼吸器検体の採取および処理

供試牛を保定後、消毒用アルコールに浸漬した綿花を用いて鼻孔周辺を清拭した。続いて、培養用綿棒を可能な限り鼻腔深部まで挿入し、鼻腔粘膜を拭うことにより検体（鼻腔スワブ）を得た。

気管支鏡検査および気管支肺胞洗浄液の採取は、既報を参考に実施した<sup>1~5)</sup>。すなわち、非鎮静下で供試牛の鼻孔から気管支鏡を挿入し、鼻腔および咽喉頭部を観察した。その後、必要に応じて2%塩酸リドカインによる気道粘膜の表面麻酔を実施しながら、気管および気管支内腔を観察した。続いて、気管支鏡を罹患肺葉へとつながる気管支へと進め、気管支の直径が約5.5mmの気管支に楔入した。

楔入部位に37℃に加温した滅菌生理食塩水30 mLを気管支鏡の鉗子孔から注入し、即座に回収した。同操作を計2回実施し、混和したものを検体（気管支肺胞洗浄液：BALF）とした。得られた検体は冷蔵状態で検査室へ搬送し、検体採取後3時間以内に各種検査に供した。また、BALFの回収率を計測するとともに、白血球計算盤を用いて有核細胞数（上皮細胞を除く）を計数した。

### 2.4 細菌分離検査

得られた検体のうち、鼻腔スワブは300  $\mu$ lの滅菌生理食塩水に懸濁後、細菌分離検査に供した。またBALFは、遠心操作により100倍に濃縮した後、細菌分離検査に供した。検体は、5%馬血液含有コロンビア寒天培地（BA培地）およびマッコスキー寒天培地（MAC培地）にそれぞれ塗布



された。BA培地は2種類の培養法(37℃; 微好気条件: 5% CO<sub>2</sub>下および嫌気条件下)で、MAC培地は1種類の培養法(37℃; 好気条件下)で24~48時間培養された。

培養後のBA培地から主要な細菌を分離し、純培養後にグラム染色検査および細菌同定検査(飛行時間型質量分析法: Time of Flight Mass Spectrometry: TOF-MS)を実施し、菌種を同定した。なお本研究においては、*Mannheimia haemolytica*, *P. multocida* および *Histophilus somni*を主要分離・同定対象細菌とした。

### 2.5 マイコプラズマ分離検査

マイコプラズマ分離検査は、細菌分離検査と同様の検体50 μlをマイコプラズマ分離用寒天培地に塗布し、微好気条件(37℃; 5% CO<sub>2</sub>)下で7日間培養(直接培養)するとともに、マイコプラズマ増菌培地に接種(50 μl)し微好気条件下で2日間培養(増菌培養)することにより実施した。その後、増菌培養液は50 μlをマイコプラズマ分離用寒天培地に塗布し、微好気条件下で7日間培養された。培養後のマイコプラズマ分離用寒天培地は、実体顕微鏡で観察するとともに、培地上の目玉状のコロニーについてTOF-MSを用いて同定された。

## 3. 結果と考察

### 3.1 臨床所見

供試牛の平均直腸温度は39.4℃であり、健常牛に比較し軽度の高体温であった(Table 1)。このことは、供試牛の多くが肺炎の急性期を過ぎており、著しい直腸温の上昇がなかったことに起因するものと思われた。心拍数は平均74.4回/分であり、健常牛に比較し顕著な変化は認めなかった(Table 1)。一方、呼吸数は平均73.3回/分であり、健常牛に比較し著しく増加していた(Table 1)。このことは、肺炎の発症ないし慢性化に伴い肺胞領域での換気能の低下が起り、呼吸数を増加させることにより体内への酸素の取り込みを維持していることに起因すると推察された。

### 3.2 血液検査

末梢血中の白血球数は平均11,883/mm<sup>3</sup>であり、健常牛に比較し軽度増加していた。このことは、肺炎に伴う感染が継続していることを示唆しているものと考えられた。しかし、肺炎の急性期に認められるような白血球数の急激な増加が認められなかったことは、供試牛が急性期から慢性期に移行していることに起因すると推察された。

### 3.3 気管支鏡所見

Table 1 Findings of the clinical, blood and bronchoalveolar lavage fluid excretion in chronic pneumonia-infected cows

| Inspection item                                  | Unit                                 | Result<br>(mean ± S.D.) |
|--|--------------------------------------|-------------------------|
| Rectal temperature                               | (℃)                                  | 39.4 ± 0.4              |
| Heart rate                                       | (beats/min)                          | 74.4 ± 16.9             |
| Respiration rate                                 | (times/min)                          | 73.3 ± 13.6             |
| White blood count in the peripheral blood        | (/mm <sup>3</sup> )                  | 11,883 ± 4,449          |
| Red blood count in the peripheral blood          | (x10 <sup>4</sup> /mm <sup>3</sup> ) | 1.179 ± 184             |
| Hemoglobin concentration in the peripheral blood | (g/dL)                               | 12.4 ± 2.3              |
| Hematocrit in the peripheral blood               | (%)                                  | 41.0 ± 8.4              |
| Recover rates in bronchoalveolar lavage fluid    | (%)                                  | 35.4 ± 11.9             |
| Number of cells in bronchoalveolar lavage fluid  | (x10 <sup>5</sup> /mL)               | 36.3 ± 34.5             |

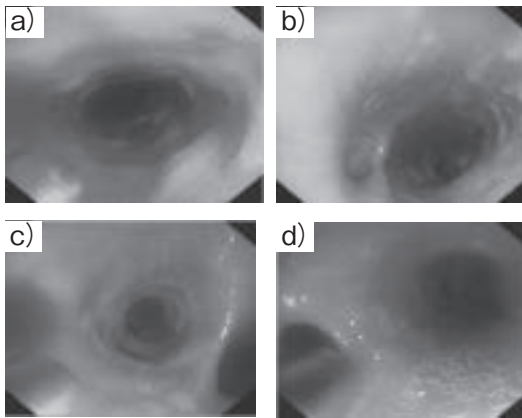


Fig. 1 Bronchoscopic findings of the pneumonia-infected cows

a) Trachea, b)~d) Bronchus

供試牛18頭すべての気管には比較的多量の膿性粘液が観察された (Fig. 1)。また、患部へとつながる気管支には多量の膿性粘液が観察された (Fig. 1)、病態の程度に応じた所見が観察された。

すなわち、臨床症状や聴診により肺炎罹患部位が広範囲に至っていることが推察される症例では、多量の膿性粘液が気管内腔や気管支内腔に観察されることが明らかとなった。

### 3.4 細菌分離検査

細菌分離検査では、*P. multocida*が鼻腔スワブ18検体中5検体 (27.8%) およびBALF18検体中10検体 (55.6%) から、*M. haemolytica*がBALF18検体中1検体 (5.6%) から分離された (Table 2)。また、*M. bovis*は鼻腔スワブ18検体中6検体 (33.3%) およびBALF18検体中17検体 (94.4%) から分離された。*M. haemolytica*, *P. multocida*および*M. bovis*は、牛の肺炎の主要原因菌であり病態の悪化に強く関与すると考えられていることから<sup>6,7)</sup>、本研究で分離された細菌も供試牛の病態悪化の主因となっているものと推察された。なお、肺炎発症牛の鼻腔スワブからは、

Table 2 Results of bacterial isolation from nasal swab and bronchoalveolar lavage fluid in chronic pneumonia-infected cows

| Animal No. | <i>P. multocida</i> |      | <i>M. haemoritica</i> |      | <i>H. somni</i> |      | <i>Mycoplasma bovis</i> |      |                    |      |
|------------|---------------------|------|-----------------------|------|-----------------|------|-------------------------|------|--------------------|------|
|            |                     |      |                       |      |                 |      | Direct culture          |      | Enrichment culture |      |
|            | Nasal swab          | BALF | Nasal swab            | BALF | Nasal swab      | BALF | Nasal swab              | BALF | Nasal swab         | BALF |
| 1          | —                   | —    | —                     | —    | —               | —    | —                       | —    | —                  | +    |
| 2          | —                   | —    | —                     | —    | —               | —    | —                       | —    | —                  | +    |
| 3          | —                   | +    | —                     | —    | —               | —    | —                       | —    | —                  | +    |
| 4          | —                   | —    | —                     | —    | —               | —    | —                       | —    | —                  | +    |
| 5          | +                   | +    | —                     | —    | —               | —    | —                       | +    | —                  | +    |
| 6          | —                   | —    | —                     | —    | —               | —    | —                       | +    | —                  | +    |
| 7          | +                   | —    | —                     | —    | —               | —    | —                       | —    | +                  | +    |
| 8          | —                   | +    | —                     | —    | —               | —    | —                       | +    | —                  | +    |
| 9          | —                   | +    | —                     | +    | —               | —    | —                       | +    | —                  | +    |
| 10         | +                   | +    | —                     | —    | —               | —    | —                       | +    | —                  | +    |
| 11         | —                   | +    | —                     | —    | —               | —    | +                       | +    | +                  | +    |
| 12         | —                   | +    | —                     | —    | —               | —    | —                       | +    | —                  | +    |
| 13         | —                   | —    | —                     | —    | —               | —    | —                       | —    | +                  | +    |
| 14         | —                   | —    | —                     | —    | —               | —    | —                       | —    | +                  | +    |
| 15         | —                   | —    | —                     | —    | —               | —    | —                       | —    | —                  | +    |
| 16         | —                   | +    | —                     | —    | —               | —    | —                       | —    | —                  | —    |
| 17         | +                   | +    | —                     | —    | —               | —    | +                       | —    | +                  | +    |
| 18         | +                   | +    | —                     | —    | —               | —    | —                       | —    | +                  | +    |

*P. multocida* : *Pasteurella multocida*, *M. haemoritica* : *Mannheimia haemolytica*, *H. somni* : *Histophilus somni*

BALF : bronchoalveolar lavage fluid

+ : Culture positive — : Culture negative

健常牛の鼻腔スワブからの細菌分離結果と同様に、これら分離細菌以外に多菌種の細菌が多数分離された。

一方、鼻腔スワブとBALFの両検体からの分離細菌一致率は、*P. multocida*では40.0% (BALF分離陽性10検体中鼻腔スワブ分離陽性4検体)、*M. haemolytica*では0.0% (同、1検体中0検体)、*M. bovis*では35.3% ((同、17検体中6検体))であった。このことから、肺炎発症牛の鼻腔スワブから分離される細菌は、必ずしも肺炎発症部位である気管支肺胞領域における細菌の存在を反映しないことが明らかとなった。すなわち、鼻腔スワブから多菌種かつ多数分離される細菌の検索結果をもって、肺炎の原因菌を推定することは極めて困難であることが示された。

本研究において、亜急性期から慢性期にある肺炎発症例牛の気管支肺胞領域からは、牛の主要な肺炎原因菌が分離され、肺炎病態の悪化に強く関与しているものと考えられた。今後は、抗菌薬による治療を開始していない肺炎発症初期における気管支肺胞領域の細菌分離に関する情報を得、肺炎発症に関与する細菌を特定することが重要であると考えられた。これにより、牛肺炎の病態解明につながるものと思われる。

#### 4. 要 約

子牛の肺炎は、その成長に多大な影響を及ぼすばかりか、生命をも奪いかねない感染症であり、獣医療において最も重要な疾患のひとつである。従来、肺炎原因菌の特定は、主に鼻腔スワブの細菌学的な検索により行われてきた。しかし、牛の鼻腔内腔には健常であっても多種の細菌が多数存在することから、鼻腔スワブから得られる情報は肺炎原因菌の特定には直結しないと思われる。本研究では、肺炎発症牛18頭に対して鼻腔スワブの採取とともに、気管支肺胞洗浄液を採取し、細菌

学的に検索することにより牛の肺炎原因菌を特定することを目的とした。その結果、肺炎発症牛の気管支肺胞洗浄液からは、主に*P. multocida*および*M. bovis*が分離され、その病態に強く関与していることが推察された。また、これら細菌の鼻腔スワブおよび気管支肺胞洗浄液からの分離陽性一致率は、それぞれ40.0%、35.3%であった。このことから、肺炎発症牛の鼻腔スワブから分離される細菌は、必ずしも肺炎発症部位である気管支肺胞領域における細菌の存在を反映しないことが明らかとなった。すなわち、鼻腔スワブから多菌種かつ多数分離される細菌の検索結果をもって、肺炎の原因菌を同定することは極めて困難であることが示された。

#### 文 献

- 1) 帆保誠二, 野口倫子, 安藤貴朗: 肺炎原因菌の特定を目的とした気管支肺胞洗浄法の牛医療への応用, 公益法人伊藤記念財団平成25年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **32**, 215~221, 2014.
- 2) Hobo, S., Oikawa, M., Kuwano, A., Yoshida, K., Yoshihara, T.: Effect of transportation on the composition of bronchoalveolar lavage fluid obtained from horses, *Am. J. Vet. Res.*, **58**, 531~534, 1997.
- 3) Hobo, S., Yoshihara, T., Oikawa, M., Jones, J. H.: Surfactant proteins in bronchoalveolar lavage fluid of horses: assay technique and changes following road transport, *Vet. Rec.*, **148**, 74~80, 2001.
- 4) Ito, S., Hobo, S., Eto, D., Sato, H.: Bronchoalveolar lavage for the diagnosis and treatment of pneumonia associated with transport in thoroughbred racehorses, *J. Vet. Med. Sci.*, **63**, 1263 ~ 1269, 2001.
- 5) Ito, S., Hobo, S., Kasashima, Y.: Bronchoalveolar lavage fluid findings in the atelectatic regions of anesthetized horses, *J. Vet. Med. Sci.*, **65**, 1011 ~ 1013, 2003.
- 6) Angen, O., Thomse, J., Larse, L. E., Larsen, J., Kokotovic, B., Heegaard, P.M., Enemark, J.M.: Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response, *Vet. Microbiol.*, **28**, 165~171, 2009.
- 7) Maunsell, F. P., Woolums, A. R., Francoz, D., Rosenbusch, R. F., Step, D. L., Wilson, D.J., Janzen, E. D.: *Mycoplasma bovis* infections in cattle, *J. Vet. Intern. Med.*, **25**, 772~783, 2011.

# 食肉として消費される野生動物における食中毒菌の 保有調査

Examination of food-borne bacteria in wild animals intended for  
consumption

安藤 匡子・中馬 猛久

(鹿児島大学共同獣医学部)

Masako Andoh and Takehisa Chuma

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

Consumption of wild game meat, especially deer and boar meat, is becoming popular in Japan as a result of population control of the animals intended to reduce wild animal-related damage in human life. Processing of domestic animals is controlled by legal hygiene regulations to retain food safety. However, there are no legal regulations for handling wild game meat, and most of the game meat goes to table without any inspections. To prevent foodborne diseases from wild game meat, information of pathogens in the animals are important to establish appropriate control measures. In this study, we investigated fecal samples from wild deers and boars for bacteria, Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC), *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Staphylococcus aureus* (SA). Out of total 134 animals (70 deers and 64 boars), 16 (11.9%), 1 (0.7%), 9 (6.7%), and 13 (9.7%) were positive for STEC, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and SA, respectively. Within isolated STEC, serotype O157 (2 isolates) was included. Carrying of STEC and SA in deers was significantly higher ( $p < 0.05$ ) compared to boars. Animals investigated in this study did not show any apparent clinical signs (e.g. diarrhea). The results show presence of food-borne bacteria in wild deers and boars feces. Careful handling of intestinal organs not to spill the contents when slaughtering is required to prevent possible bacterial contamination of wild game meat. Information on pathogens in wild animals can help avoid inappropriate consumption and prevent wild game meat-borne infection to humans.

## 1. 目 的

近年、野生のシカやイノシシなどの生育数が増加し、様々な被害が全国で拡大している。農畜産業や生活環境保護の観点から、野生鳥獣の狩猟捕獲件数は年々増加している。狩猟捕獲数の増加に

伴い、食材としての利用も増え、ジビエとして狩猟肉を一般の人が食する機会も増えてきた。主にシカおよびイノシシが食用とされ、地域振興の資源としても活用されている。

野生動物を食する場合には、衛生的に飼育・処理される家畜と異なり、食中毒のリスクは不明で

ある。野生シカおよびイノシシの解体はと畜場法の規制を受けず、その肉は公的な検査を受けずに流通している。国内においても、ジビエを食したことによる様々な感染症が報告されており、細菌性食中毒も少数であるが報告されている ([http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/shokuhin/syokuchu/04.html))。野生シカおよびイノシシにおける食中毒起因病原体については、ウイルスや寄生虫に関する情報は集積されつつあるが、細菌類に関しては情報が不足している。

安全な野生鳥獣肉の提供および消費には、適切な安全性対策が必要であり、そのための基礎的データが必要である。本研究では、食肉として消費される野生シカおよびイノシシを対象とし、細菌性食中毒の中でも発生数の多い、大腸菌やサルモネラなどの腸内細菌科細菌、カンピロバクター属細菌、およびブドウ球菌について保有状況を明らかにする。これらの結果は、野生鳥獣を食用として有効に活用するための基礎資料となり、安全な食肉（ジビエ）の供給につながると考えられる。

## 2. 方法

### 2.1 材料

2014年6月から12月に狩猟捕獲された野生シカ70頭およびイノシシ64頭、計134頭の新鮮糞便を用いた。これらの動物は、食用として解体処理された。

### 2.2 食中毒菌の分離と同定

#### (1) 黄色ブドウ球菌

糞便スワブを7%食塩加ミューラーヒントン(MH)培地に接種し、37℃にて一晚培養した。これを卵黄加マンニット食塩寒天培地に塗抹し、37℃にて一晚培養し、卵黄反応が認められたコロニーをクローニングした。グラム染色および Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization

Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)にて菌種の同定を行った。MALDI-TOF MSは、autoflex speed TOF/TOF-KG(Bruker Daltonics)を用いMALDI Biotyperソフトウェアにて解析し、スコア1.7以上で属の同定、2.0以上で種の同定可能と判定した。

#### (2) サルモネラ

糞便スワブをランバック寒天培地に塗抹し、37℃にて一晚培養した。ピンク～赤色コロニーをクローニングし、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、TSI培地、LIM培地、SC培地にて、生化学性状を確認した。また、MALDI-TOF MSにて菌種の同定を行った。

#### (3) カンピロバクター

糞便スワブをプレストン培地に接種し、42℃、微好気条件で二晩培養した。これをバツラー寒天培地に塗抹し、42℃、微好気条件で二晩培養した。カンピロバクターと疑われるコロニーをクローニングし、新鮮菌の位相差顕微鏡観察、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、MALDI-TOF MSにて菌種の同定を行った。

#### (4) 病原性大腸菌（志賀毒素産生性大腸菌、STEC）

糞便スワブをクロモアガーSTEC寒天培地（関東化学）に塗抹し、37℃にて一晚培養した。本培地は、病原性大腸菌は藤色のコロニーを形成し、紫外線を照射すると病原性大腸菌O157は蛍光せず、他の病原性大腸菌は蛍光を発する特徴がある。藤色コロニーをクローニングし、カタラーゼ試験およびオキシダーゼ試験を行い、MALDI-TOF MSにて菌種の同定を行った。

### 2.3 病原性関連因子の解析

#### (1) 黄色ブドウ球菌のコアグラマーゼ試験およびエンテロトキシン産生試験

コアグラマーゼ試験は、ウサギプラズマ“栄研”（栄研化学）を用い、凝集試験を行った。エンテ

ロトキシン産生は、SET-RPLA「生研」(デンカ生研)を用い、エンテロトキシンA, B, C, D産生を逆受け身ラテックス法にて検出した。

## (2) 大腸菌の病原性関連遺伝子検出, 毒素産生試験および血清型決定

病原性関連遺伝子は、PCRにて検出した。新鮮菌からインスタジーンDNA精製マトリクス (Bio-Rad) を用いてDNAを抽出し、PCRの鋳型とした。VT 1 遺伝子 (*stx1*), VT 2 遺伝子 (*stx2*), 細胞付着性因子遺伝子 (*eaeA*) について既報の方法に従って検出した<sup>1, 2)</sup>。*stx1* または *stx2* 陽性の場合、志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) と判定した。

ベロ毒素 (VT) 産生については、VTEC-RPLA「生研」(デンカ生研)を用い、VT 1 およびVT 2 産生を逆受け身ラテックス法にて検出した。病原性関連遺伝子が検出された株についてO抗原型を決定した。国内での食中毒事例として報告の多いO157, O26, O103, O104, O111, O121, O145について、病原大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研)を用いスライド凝集法にて判定した。

## 2.4 統計学的解析

分離率の有意差検定は、Yates補正  $\chi^2$  検定により行った。 $p < 0.05$ の場合、有意差があると判定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 細菌の分離率

黄色ブドウ球菌, サルモネラ, カンピロバクター, STECの分離頭数および分離率をTable 1にまとめた。いずれかの細菌が分離された動物は、シカ22頭 (31.4%), イノシシ14頭 (21.9%), 合計36頭 (26.9%)であった。対象動物は肉眼で異常はなく便痢様の糞便はなかったが、これらの細菌を保有していることが明らかになった。

各細菌の月別の分離率を、Fig. 1, 2, 3に示した。黄色ブドウ球菌は、6月から9月にかけて分離され8月に最も多く、10月以降は分離されなかった。サルモネラは、9月に分離された。カンピロバクターおよびSTECの分離率は月ごとの特徴は見られなかった。しかし、カンピロバクターについては分離株数が少ないため、継続した調査が必要である。

菌種により保有動物に偏りがあり、STECおよび黄色ブドウ球菌はシカからの分離が多かった ( $p < 0.05$ )。カンピロバクターおよびサルモネラはイノシシからの分離のみであった。

### 3.2 黄色ブドウ球菌

分離株13株中、コアグラゼ陽性11株、陰性2株であった。エンテロトキシンA, B, C, D産生は、いずれの株も陰性であった。食中毒の原因となるエンテロトキシンは、今回調べた型の他にもE, G, H, I, J型があり、また、エンテロ

Table 1 Number and percentage of bacterial isolation-positive animals

|       | Number of animal |  | <i>Staphylococcus aureus</i> |                   | <i>Salmonella</i> spp. |     | <i>Campylobacter</i> spp. |      | Shiga-toxin producing <i>Escherichia coli</i> |                   |
|-------|------------------|--|------------------------------|-------------------|------------------------|-----|---------------------------|------|---|-------------------|
|       | n                |  | n                            | %                 | n                      | %   | n                         | %    | n   | %                 |
| Deer  | 70               |  | 11                           | 15.7 <sup>A</sup> | 0                      | 0   | 0                         | 0    | 14  | 20.0 <sup>B</sup> |
| Boar  | 64               |  | 2                            | 3.1 <sup>A</sup>  | 1                      | 1.6 | 9                         | 14.1 | 2   | 3.1 <sup>B</sup>  |
| Total | 134              |  | 13                           | 9.7               | 1                      | 0.7 | 9                         | 6.7  | 16  | 11.9              |

A and B: There was a significant difference ( $p < 0.05$ ) between deer and boar.

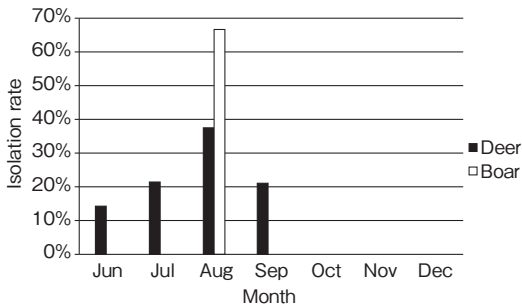


Fig. 1 Isolation rate of *Staphylococcus aureus* from wild animals. *S. aureus* were isolated from deer during June to September, while it was isolated from boar only in August.

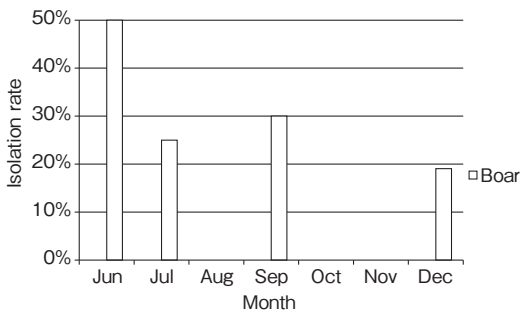


Fig. 2 Isolation rate of *Campylobacter* spp. from wild animals. The bacteria was isolated only from boar.

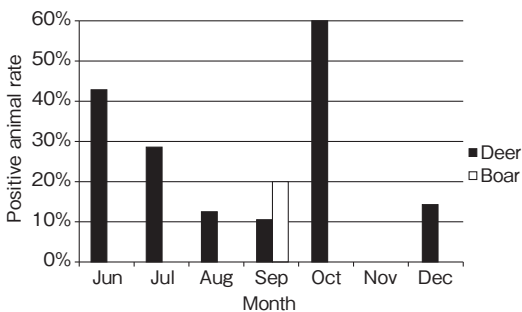


Fig. 3 Positive animal rate for Shiga-toxin producing *Escherichia coli*. The bacteria was isolated from boar only in September.

トキシン様毒素が16種ある<sup>3)</sup>。今回の結果からは、野生シカ・イノシシが保有するブドウ球菌が食中毒を起こす可能性は示されなかったが、今後、他の毒素についての解析も必要である。

### 3.3 サルモネラ

サルモネラは、イノシシから1株のみ分離された。保有率が低いことから、野生動物に起因するサルモネラ食中毒の可能性は低いと考えられる。

### 3.4 カンピロバクター

カンピロバクターは、イノシシからのみ9株分離された。菌種は、*C. coli*および*C. lanienae*各1株、*C. hyointestinalis* 7株であった。人のカンピロバクター食中毒の原因として最も多い*C. jejuni*は分離されなかったが、*C. jejuni*について多い*C. coli*が分離されたことから、イノシシは食中毒の原因となる可能性が示唆された。また、*C. lanienae*および*C. hyointestinalis*は海外において人への感染が報告されており<sup>4,5)</sup>、これらの菌種による被害が発生する可能性もある。*C. lanienae*は、動物の解体処理従事者から分離されており<sup>4)</sup>、経口以外にも人への感染ルートがあると考えられ、野生イノシシの解体時には注意が必要である。

### 3.5 STEC

STECクロモアガー寒天培地にて藤色コロニーを形成し、病原性を持つと疑われる大腸菌は82株分離された。このうち、STECは19株(23.2%)であり、*stx1*保有は6株(7.3%)および*stx2*保有は19株(23.2%)であった。*EaeA*保有株は11株(13.4%)であった。動物1個体から異なる2株が分離されることもあった。各病原因子遺伝子の保有状況をTable 2にまとめた。

STECは、イノシシよりもシカからの分離率が高かった( $p < 0.05$ )。しかし、VT遺伝子(本研究では*stx2*のみ)と同時に*eaeA*を保有する株はイノシシ由来の2株(Ec58-1BY, Ec58-2BY)のみであった。VT産生は、VT1産生は*stx1*保有と一致したが、VT2産生は*stx2*保有と一致せず検出できない株もあった(10/19株)。*stx2*は抗原型が多く、さらに同じ抗原型の中でも遺伝子に変異がある<sup>1)</sup>。今回のラテックス凝集反応では、野

Table 2. Number of *Escherichia coli* isolates carrying pathogenic gene(s).

| Gene(s)                   | Total number | Deer | Boar |
|---------------------------|--------------|------|------|
| <i>stx1</i>               | 6            | 5    | 1    |
| <i>stx2</i>               | 19           | 16   | 3    |
| <i>eaeA</i>               | 11           | 8    | 3    |
| <i>stx1 + stx2</i>        | 6            | 5    | 1    |
| <i>stx1 + eaeA</i>        | 0            | 0    | 0    |
| <i>stx2 + eaeA</i>        | 2            | 0    | 2    |
| <i>stx1 + stx2 + eaeA</i> | 0            | 0    | 0    |

生動物由来株がVT 2を産生していないのか検出できなかったのか判定できず、抗原型の異なるVT 2を産生する可能性も考えられる。

O抗原型が判明したのは、*stx2*および*eaeA*を同時に保有する2株 (Ec58-5BY, Ec58-2BY)で、血清型O157であった。野生動物が保有する株においては未知の抗原型の可能性もある。今回決定できなかった毒素や血清型については、さらなる解析が必要であると考えられる。

#### 4. 要 約

食肉として消費される野生シカおよびイノシシにおける食中毒菌の保有状況を調査した。対象動物の27%から、志賀毒素産生性大腸菌、サルモネラ、カンピロバクター、黄色ブドウ球菌のいずれかの細菌が分離され、分離率はそれぞれ11.9%、0.7%、6.7%、9.7%であった。大腸菌および黄色ブドウ球菌は、イノシシよりもシカから多く分離された ( $p < 0.05$ )。カンピロバクターおよびサルモネラは、イノシシから分離された。大腸菌には、

血清型O157も含まれた。今回調査した動物では、下痢など異常の報告はなかった。以上のことから、野生シカおよびイノシシは、食中毒を起こす可能性のある細菌を保有することが明らかになった。食用として狩猟動物を解体する際には消化管の取り扱いに注意し、可食部位の腸管内容物による汚染を防ぐことが重要と考えられる。このような野生動物における病原体保有状況などの情報提供は、適切な野生獣肉の取り扱い（衛生的な解体処理、生食をしないなど）につながると考えられ、食中毒予防の効果が期待できる。

#### 文 献

- 1) Scheutz, F., Teel, L.D., Beutin, L., Pierard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N.A., Melton-Celsa, A.R., Sanchez, M., Persson, S., O'Brien A.D. : Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature, *J Clin Microbiol.*, **50**, 2951~2563, 012.
- 2) Chapman, T.A., Wu, X.Y., Barchia, I., Bettelheim, K.A., Driesen, S., Trott, D., Wilson, M., Chin, J.J. : Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine, *Appl Environ Microbiol.*, **72**, 4782~4795, 2006.
- 3) Kadariya, J., Smith, T.C., Thapaliya, D. : *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health, *Biomed Res Int.*, **2014**, 827965, 2014.
- 4) Logan, J.M., Burnens, A., Linton, D., Lawson, A.J., Stanley, J. : *Campylobacter lanienae* sp. nov., a new species isolated from workers in an abattoir, *Int J Syst Evol Microbiol.*, **50**, 865~872, 2000.
- 5) Bullman, S., O'Leary, J., Corcoran, D., Sleator, R.D., Lucey, B. : Molecular-based detection of non-culturable and emerging campylobacteria in patients presenting with gastroenteritis, *Epidemiol Infect.*, **140**, 684~688, 2012.



## 繁殖疫学の手法を用いた黒毛和種牛繁殖農場の飼養形態の違いが繁殖成績に及ぼす影響の定量

Standard operation procedures for Japanese Black cattle related to reproductive performance

佐々木 羊介・上松 瑞穂\*・北原 豪\*\*・大澤 健司\*\*  
(宮崎大学テニユアトラック推進機構, \*NOSAIみやざき, \*\*宮崎大学農学部)

Yosuke Sasaki, Mizuho Uematsu\*, Go Kitahara\*\* and Takeshi Osawa\*\*  
(Organization for Promotion of Tenure Track, University of Miyazaki, \*NOSAI Miyazaki, \*\*Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Japanese Black is the most popular beef breed in Japan. The relationship between management procedures and reproductive performance in cow-calf operation was investigated. The target population for the present study comprised beef cattle farms located in Miyazaki prefecture, Japan. A questionnaire survey was conducted by clinical veterinarians to ask the production system and management procedures. A total of 189 farms were participated in the present study. The 189 farms were categorized into three groups based on the average cow inventory: small (1 to 10 cows;  $n = 72$ ), middle (11 to 50 cows;  $n = 90$ ) and large (more than 51 cows;  $n = 27$ ). Small farms had longer interval from calving to first service and lower conception rate than large farms ( $P < 0.05$ ). In small farms, cows served during winter and spring had lower conception rate than those during summer and fall ( $P < 0.05$ ), whereas there was no difference of conception rate among season in large farms. The results of questionnaire survey showed small farms had higher proportions of farms remaining cows in the calving room after service than large farms ( $P < 0.05$ ). In addition, small farms had higher number of calving room per cow than large farms ( $P < 0.05$ ). Cows in large farms had shorter weaning age than those in small farms ( $P < 0.05$ ). Large farms had higher proportion of farms using ICT devices to predict the timing of parturition and to find estrus of cows compared to the other farms ( $P < 0.05$ ). There was no difference of the amount of roughages per day among farm size groups, but large farms fed higher amount of concentrated feeding than small farms ( $P < 0.05$ ). In addition, many large farms had management to reduce cold stress. Based on these results, we recommend improving performances of cows by feeding concentrate feeds more, performing the practice to reduce cold stress, and introducing ICT technique to find estrus.

## 1. 目 的

黒毛和種牛の飼養戸数は年々減少する一方で、1農場あたりの飼養頭数は増加傾向にあり、少頭数飼育から多頭経営へと推移してきている<sup>1)</sup>。この多頭化と反比例して、黒毛和種牛の繁殖成績は年々低下しており、ここ20年で黒毛和種牛の受胎率は約10%低下している<sup>2)</sup>。さらに、黒毛和種牛繁殖農場は、国際競争力の激化や飼料や資材の高騰などの問題を抱えており、生産現場では繁殖成績を向上させる効率的な飼養形態の確立が求められている<sup>3)</sup>。

生産現場における生産効率の低下は、単独ではなく複数の要因が相まって影響していることが多いため、問題点を正確に抽出することが非常に困難である。その対策として、動物を「群」として認識し、蓄積された生産データを活用する「繁殖疫学」という手法がある。ブタ<sup>4)</sup>やニワトリ<sup>5)</sup>では、各個体から得られる莫大なデータを「群」として活用し、飼養形態や環境要因が繁殖成績に与えるリスクを抽出し、生産現場に還元できるシステムがすでに整っているが、ウシではいまだにこの手法が十分に活用されていない。

日本では、2001年に牛海綿状脳症 (BSE) が初めて国内で確認されたことを発端に、ウシを一生にわたって監視するための個体識別番号システムが導入された。この個体管理システムは、各個体の分娩や種付けといった生産イベントや血統情報を記録・保持し、大規模なデータベースを築き上げている。近年、Nakadaら<sup>6)</sup>は、乳用牛の牛群健康管理の指標と繁殖成績の関連性について報告し、ウシにおいても繁殖疫学の手法が生産現場に有効であることを示した。しかし、これまでに黒毛和種牛に対してこの手法を試みた報告は見当たらない。そこで、本研究では黒毛和種牛農場の飼養形態や飼養管理の実態調査を行い、飼養に関わ

る因子が黒毛和種牛の生産性に及ぼす影響を明らかにし、効率的な飼養形態の確立に寄与することを目的とする。

## 2. 方 法

### 2.1 調査対象とした集団

宮崎県内における黒毛和種牛繁殖農場を対象として、農場の飼養形態と繁殖和牛に対する飼養管理についてアンケート調査を行った。調査は臨床獣医師の協力の下、各農家に聞き取り調査で行った。

### 2.2 調査に用いた質問票

アンケート調査を実施するために、黒毛和種牛繁殖農場の飼養形態と繁殖和牛に対する飼養管理について聞き取る調査票を作成した。調査票の作成は、臨床獣医師および畜産関連団体と協議して行い、調査の対象とする項目を選定した。調査表は、農場の飼養形態、分娩に関する飼養管理、種付けに関する飼養管理、給餌に関する飼養管理、暑熱・寒冷対策の実施、廃用に関する飼養管理の6つのセクションで構築した。各々のセクションに関する代表的な質問項目をTable 1に示した。

### 2.3 生産記録の収集

繁殖成績を算出するために、各農場における黒毛和種牛の生産記録を収集した。各生産記録は電子ファイルとして抽出し、繁殖和牛の個体情報、分娩成績、種付け成績などを収集した。収集した生産記録をもとに、各農場における繁殖成績を算出した。

また、各農場における飼養頭数をもとに、農場を3つの飼養規模に分類した。分類の基準として、母牛の飼養頭数が1～10頭の農場を小規模農場、11～50頭の農場を中規模農場、51頭以上の農場を大規模農場と分類した。

### 2.4 統計解析

統計解析にはSASソフトウェア Version 9.4

Table 1 The questionnaire items in each section

| Section   | Questionnaire items  |
|---|--|
| <i>Farm basic information</i>                           | Average cow inventory<br>Type of barn<br>Distance from house to farm   |
| <i>Management for cows in calving</i>                   | Days when pregnant cows move to calving barn<br>Days when cows move from calving barn<br>Bedding materials                         |
| <i>Management for cows during estrus</i>                | Methods for estrus detection<br>Days when estrus detection performs<br>Methods for pregnancy diagnosis                             |
| <i>Feeding program</i>                                  | Feed amount of roughages per day<br>Feed amount of concentrate feeds per day<br>Feeding program in each season                     |
| <i>Management to reduce heat stress and cold stress</i> | Management to reduce heat stress<br>Management to reduce cold stress   |
| <i>Culling guidelines for cows</i>                      | Culling guidelines for old-age cows<br>Culling guidelines for cows with reproductive failure<br>Management for replacement heifers |

(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いた。飼養規模と繁殖成績の関連性に関して、Continues variableの解析にはMIXED procedureによるA linear mixed-effects modelを、Binomial variableの解析にはGLIMMIX procedureによるa mixed-effects logistic regression model を用いた。有意な関連性がみられた項目に関して、多重比較が必要な際はTukey-Kramerによる多重比較を実施した。また、各飼養形態および飼養管理に関して、飼養規模ごとに農場割合を比較し、これらの関連性に関して A linear mixed-effects modelにて有意性を検定した。

### 3. 結果と考察

本調査に協力した農場は189農場であった。189農場の平均飼養母牛頭数は26頭であった。この189農場の飼養規模別の農場数は、小規模農場が72農場、中規模農場が90農場、大規模農場が27農場であった。飼養規模と繁殖成績の関連性として、大規模農家は小規模農家と比較して、分娩から初回種付けまでの日数が短く、受胎率が高く、そして人工授精回数が少なかった ( $P < 0.05$ )。また、小規模および中規模農家では、冬または春

に種付けした母牛は夏または秋に種付けした母牛よりも受胎率が低かったが ( $P < 0.05$ )、大規模農家では季節間による受胎率の差がみられなかった。

母牛の飼養形態として、分娩前後の時期では、すべての飼養規模グループにおいて、8割前後の農場が分娩房で母牛を飼育していた。一方、AI以降の時期では、母牛をスタンション牛舎で飼育していた農場割合は大規模農場では67%であったが、小規模農場では10%であり、大規模農場が有意に高かった ( $P < 0.05$ )。小規模農家は、AI以降の時期もそのまま分娩房で飼育している農場の割合が大規模農場よりも高く ( $P < 0.05$ ; 49% vs.13%)、飼養している母牛1頭当たりの分娩房の数も有意に多かった ( $P < 0.05$ ; 0.75部屋 vs.0.18部屋)。

分娩に関する飼養管理として、妊娠末期に母牛を分娩房に移動する時期は分娩予定日の26日前、分娩後に母牛を分娩房から移動する時期は分娩後26日後であった。これらの時期は農場規模と関連性がみられなかった。しかし、大規模農家は、小規模農場と比較して、子牛の離乳日齢が約35日早かった ( $P < 0.05$ )。また、母牛の分娩時期の予

測方法として、目視による行動観察や乳房の張りを触診して予測している農場が8割以上存在した。一方、牛温恵などの温度センサーや牛舎の設置カメラなどのICT機材を活用している農場は、大規模農場で1割程度であり、小規模農場では0%であった。

種付けに関する飼養管理として、発情確認を開始するタイミングや発情誘起を行うタイミングは、飼養規模と関連がみられなかった。母牛に対してPGF2 $\alpha$ の投与などの発情誘起を実施している農場割合は、大規模農場が小規模農場よりも有意に高かった ( $P < 0.05$ ; 81% vs. 60%)。発情確認はほとんどの農場で朝夕2回実施され、発情確認の手法としては、8割前後の農場が粘液、牛の鳴き声、牛歩計によって発情を確認していた。牛歩計を使用している農場割合は、大規模農場では100%であったが、小規模農場では75%であり、大規模農場が有意に高かった ( $P < 0.05$ )。また、妊娠診断の時期は、農場規模によって差はみられなかった。

給餌に関する飼養管理として、粗飼料の成分は、主にイタリアン、飼料イネ、エンバク、野草が使用されていた。粗飼料の一日あたりの給与回数および給与量は、農場規模と関連性がなかったが、大規模農場では小規模農場よりも、授乳期、妊娠期、妊娠末期のすべてのステージにおいて、濃厚飼料を多給していた ( $P < 0.05$ )。

暑熱対策として、ほぼすべての農場が扇風機を設置していた。寒冷対策では、約7割の農場が風よけの設置を行っていた。また、ヒーターを設置している農場割合は、大規模農場が小規模農場よりも多かった ( $P < 0.05$ ; 81% vs. 21%)。

廃用に関する飼養管理として、高齢を理由として廃用に供する年齢の基準はすべての飼養規模グループにおいて11歳齢であったが、不受胎を理由として廃用に供するAI不受胎回数の基準は、大

規模農場が小規模農場よりも少なかった ( $P < 0.05$ ; 5.1回 vs. 8.5回)。

本研究では、小規模農場において、遅い発情回帰および低い受胎率が認められた。これは、飼養形態および飼養管理に関する調査で得られた、子牛の離乳日の長さ、発情確認の手法、発情確認期間中における飼養形態が関連している可能性がある。小規模農場では、子牛の離乳日が長く、子牛による授乳刺激が母牛の発情回帰を抑制している可能性がある。また、小規模農場では、他の農場と比較して、牛歩計の使用割合が低く、ICT機器を用いた発情確認を実施している農場が少なかった。これらの機器は、目視による行動観察という主観的な評価に、客観的な評価を加えることができ、発情確認の精度を向上させることが可能である。さらに、AI以降も母牛を分娩房で飼育している農場があるため、外陰部の状態や、母牛の行動観察を難しくしている可能性が考えられる。

また、小規模農場では、冬季における繁殖成績の低下が認められた。冬季には、繁殖成績だけでなく、母牛の死産および難産のリスクが有意に上昇すると報告されており<sup>7)</sup>、死産および難産を経験した母牛はその後の繁殖成績が低下する傾向にある<sup>8)</sup>。本研究の結果より、小規模農場では寒冷対策を実施している農場割合が極端に低く、さらに濃厚飼料の給与量が少ないことより、寒冷ストレスに対する対策が十分に実施されていないと推察される。今後は寒冷ストレスの軽減が繁殖成績の向上に寄与する可能性がある。

本研究では、疫学手法により、国内の繁殖和牛の飼養形態および飼養管理の実情を明らかにした。本研究から得られた知見は、繁殖和牛生産農場における生産性の改善に貢献することができると考えられる。国内では、飼養頭数の増加や生産者の高齢化などの要因により、飼養形態や飼養管理が多様化してきている。本研究で用いた研究手法は、

近年における生産形態の変化を定量化する手法として最適である。特に、本研究では現場の生産者を研究対象としているため、研究結果をすぐに現場に生かすことが可能である。現に、生産現場では数多くの生産記録が存在するが、大規模データベースを解析するためには適切な統計処理および解析技術が必要となるため、これらの記録の活用はいまだ実用的ではない。今後はこれらの解析手法を確立し、繁殖和牛生産農場の生産性向上のための研究をさらに実施する必要がある。

#### 4. 要 約

本研究では、宮崎県内における黒毛和牛の繁殖農家を対象とし、飼養管理の実態と飼養規模との関連性を明らかにした。寒冷期における繁殖成績の低下に関して、寒冷対策の手法や、濃厚飼料の給餌量が影響している可能性がある。また、受胎率の低下に関連する要因として、子牛の離乳日齢が遅いこと、発情確認の手法にICT機器を導入していないこと、AI以降の飼養形態などが関連している可能性がある。これらの知見をもとに、繁殖生産性を向上させるために、飼養管理の改善点を明確にする必要がある。

#### 文 献

- 1) MAFF : The statistical yearbook of Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan. 2013.  
<http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/List.do?lid = 000001127029>
- 2) 家畜改良事業団, 受胎調査成績2013.  
<http://liaj.or.jp/giken/gijutsubu/seieki/jyutai.htm>
- 3) Osawa, T. : International perspectives on the impacts of reproductive technologies on food production in Asia, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **752**, 213~228, 2014.
- 4) Sasaki, Y., Koketsu, Y. : A herd management survey on culling guidelines and actual culling practices in three herd groups based on reproductive productivity in Japanese commercial swine herds, *J. Anim. Sci.*, **90**, 1995~2002, 2012.
- 5) Yassin, H., Velthuis, A. G. J., Boerjan, M., van Riel, J. : Field study on broilers' first-week mortality, *Poult. Sci.*, **88**, 798~804, 2009.
- 6) Nakada, K. : Shall We Start Epidemiological Study Using Production Data in Japanese Dairy Farms? *J. Vet. Epidemiol.*, **17**, 5~9, 2013.
- 7) Uematsu, M., Sasaki, Y., Kitahara, G., Sameshima, H. and Osawa, T. : Risk factors for stillbirth and dystocia in Japanese Black cattle, *Vet. J.*, **198**, 212~216, 2013.
- 8) Sasaki, Y., Uematsu, M., Kitahara, G., Osawa, T. and Sueyoshi, M. : Effects of stillbirth and dystocia on subsequent reproductive performance in Japanese Black cattle, *Vet. J.*, **200**, 462~463, 2014.

# I型インターフェロン応答性カタボリック活性の 検出による牛妊娠検出技術の開発

Detection of type I interferon-mediated catabolic activity in blood and somatic cells for early pregnancy diagnosis

高橋 昌志

(北海道大学大学院農学研究院)

Masashi Takahashi

(Research Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, Lab of Animal Breeding and Reproduction)

The aim of this study was to investigate the type I interferon-mediated catabolic activities of cathepsinB (CTSB) and lysosomes in blood and somatic cells for early pregnancy diagnosis. Peripheral blood leukocytes (PBLs) separated from blood samples collected from non-pregnant Holstein cows were used for experiments. Separated PBLs were used for RNA extraction followed by RT-PCR to detect gene expressions of Type I interferon receptor subunits (*IFNAR1 and R2*). Both genes were expressed in PBLs. Then the PBLs were cultured for 24 and 48h with or without recombinant bovine interferon  $\tau$  (IFN  $\tau$ ) at 38.5°C in a CO<sub>2</sub> incubator. After culture, PBLs were collected and used for gene expression analysis of *MX1 and MX2*, which are interferon-stimulated genes. *CTSB* gene expression was also detected after IFN  $\tau$  stimulation. IFN  $\tau$  increased both *MX1 and MX2*, whereas *CTSB* was decreased both in control and IFN  $\tau$  administration. After staining of PBL with fluorescence dyes for active CTSB and lysosomal activities, clear fluorescence signals were observed in nucleated cells, not in anucleate cells such as erythrocytes. IFN  $\tau$  administration did not clearly show the increase of CTSB or lysosomal activities by showing the individual difference of cows. To investigate the IFN  $\tau$ -induced response of CTSB in somatic cells via possible signal transduction pathway of Type I IFN receptor, cultured bovine fibroblasts were used for IFN  $\tau$  stimulation. Both *IFNAR1 and R2* were expressed in fibroblast cells. After 20h of culture with IFN  $\tau$ , clear fluorescence signals of active CTSB were observed. These overall results indicate the possibility of the establishment of IFN  $\tau$  stimulation bioassay system for lysosomal and cathepsin activities by using appropriate somatic cells.

## 1. 目的

国内外で牛の人工授精後受胎率の低下や受精卵移植による受胎率の横ばいが懸念されており、TPPやFTA締結による海外畜産製品の国内移入

への対策として早期妊娠診断技術を含めた受胎率向上技術の開発が緊急に求められている。受精成立後、牛胚-母体間の妊娠認識には、胚から分泌されるインターフェロン (IFN)  $\tau$  が子宮内膜細胞とのシグナル応答を介し、そのシグナルを受け

た遺伝子群の応答によって妊娠成立、維持および胎盤形成が進行する。反芻動物胎盤の形態上、子宮内に分泌されたIFN $\tau$ タンパク質の母体血中への移行は起こらないとされており、実際に妊娠牛では血中IFN $\tau$ の直接検出はされていない。しかし、近年、IFN $\tau$ が属するI型IFNによって誘導される遺伝子（ISGs）の発現が末梢白血球で検出される<sup>1-3)</sup>ことから、子宮内に産生されたIFN $\tau$ が検出限界以下の微量で血中に移行し直接あるいは間接的に受容体を通して母体内血中細胞への妊娠シグナル応答を引き起こす傍証が得られている。このことから、これまでにIFN応答性遺伝子であるMX1, 2やISG15などのmRNA発現を指標とした妊娠判定技術の開発が試みられているが、遺伝子の相対発現比較のため陰性対照区を設定する必要があることや、細胞採取・調整に加えて機器や時間を要するなどの課題も多く、簡易かつ高精度な判定手法を求める声も依然として多い。一方、細胞内の微小器官であるリソソーム内に蓄積され、不要なタンパク質や微小器官の異化・再利用に関わるシステインプロテアーゼは、異化（カタボリック）作用に加えて、細胞分化、癌化や組織再構築に深く関与することが知られている。近年、ヒツジ子宮内膜でINT $\tau$ によるシステインプロテアーゼであるカテプシン群（カテプシンs）遺伝子発現の誘導が判明し<sup>4)</sup>、子宮上皮細胞膜上に存在するI型IFN受容体を介したカテプシンの発現と妊娠に伴う子宮内組織改編のシグナル応答機構の重要性への注目がなされている。しかし、子宮上皮を含む細胞でのIFN応答カテプシンの発現応答に関する研究は未着手である。

加えて、体細胞や血球細胞など多くの細胞が免疫反応に関わるIFN $\alpha$ に代表されるI型IFNの応答性を有することが知られており、妊娠血中の白血球でIFN $\tau$ 由来刺激によるISGs発現が報告されている。このことは、IFN $\tau$ が存在すれば宮上

皮細胞のみならず、他の細胞でもIFN受容体を介した応答が起こり、それによるカテプシン遺伝子発現のみならず酵素活性の増加も表現型として予想される。併せて、不活性カテプシンの貯蔵器官であるリソソームもカテプシン活性の向上に伴った活性化も予想される。そこで、本研究では、①末梢白血球細胞へのINT $\tau$ の刺激評価および、②体細胞へのIFN $\tau$ 添加によるカテプシン応答性について解析を行うことを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 非妊娠末梢白血球細胞でのカテプシン、リソソームの発現・活性に及ぼすIFN $\tau$ 応答性検出

非妊娠のホルスタイン経産雌牛より頸静脈からの採血を行い、白血球を分離した。分離白血球を10%牛血清添加RPMI1640を用いて二回洗浄し実験に供した。採取した分離白血球の一部からRNAを抽出、cDNA合成後、I型インターフェロン受容体であるIFNAR-1, -2の遺伝子発現をRT-PCRにて検出した。

RPMI-1640培地に浮遊させた分離白血球浮遊液を4ウェル培養皿に移し、(独)農業・食品産業技術総合研究機構 畜産草地研究所 木村康二博士より分与を受けたrecombinant IFN $\tau$ を400IU/mlの抗ウイルス活性に調整し、添加した。添加24および48時間後にサンプリングし、IFN応答遺伝子であるMX1, 2, およびカテプシンB遺伝子の発現を解析した。

また、IFN $\tau$ 添加20時間に白血球細胞を回収し、混和後、カテプシンB活性基質（MagicRed）を300倍に希釈して添加し、CO<sub>2</sub>インキュベータ中で38.5°C、40分培養した。この際に同時に核染色試薬であるHoechstを1 $\mu$ g/mlの濃度で同時に添加した。

リソソームの活性については、活性蛍光指示薬であるLysoTrackerを1000倍の希釈倍率で添加

し、カテプシン処理時と同様にHoechstを添加し、40分間培養した。

活性指示薬でそれぞれ染色した白血球浮遊液をマイクロスライドチャンバー (ibidi) に移し、蛍光顕微鏡 (Keyence) で赤色蛍光を検出、撮影した。撮影画像はImageJを用いて画像解析し、蛍光強度を計測・定量化した。

## 2.2 培養体細胞を用いたIFN $\tau$ 応答性カテプシン活性の検出

本計画での仮定として、I型IFN受容体が存在すれば子宮上皮細胞のみならず他の体細胞でもIFN受容体を介した応答が起こり、それによるカテプシン遺伝子発現のみならず酵素活性の増加も表現型として予想されることを実証するため、牛線維芽細胞を用いてIFN受容体の発現の確認とIFN $\tau$ 添加後のカテプシン活性誘導の有無について検討した。

牛線維芽細胞を分散後、 $1 \times 10^5$ の濃度で8ウェルディッシュ (Thermo Scientific) に播種し、5%FCS添加DMEM中で80%程度の増殖確認後に試験に供試した。IFN $\tau$ を400IU/mlの濃度になるように培養液で希釈し、培養を開始した。対照区として、5%FCS添加DMEMを用いた。IFN $\tau$ 添加20時間後に培養液を交換し、カテプシンB活性化検出蛍光試薬を5%FCS添加DMEMで300倍に希釈して各区に添加した。カテプシンB活性化検出蛍光試薬添加後、CO<sub>2</sub>インキュベーター中で40分間培養した。培養後同培養液で洗浄し、蛍光顕微鏡にてカテプシンBの活性蛍光を検出した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 非妊娠末梢白血球細胞でのカテプシン、リソソームの発現・活性に及ぼすIFN $\tau$ 応答性検出

採取した分離白血球からRT-PCR解析を行った

ところ、I型IFNの受容体であるIFNAR-1、-2の両サブユニットの遺伝子発現が検出された (Fig. 1)。分離白血球浮遊液にIFN $\tau$ を添加24時間後には、MX1および2の発現が誘導された (Fig.2 a, b)。このことから、Fig. 1で検出された白血球に存在するI型IFN受容体を介したIFN $\tau$ によるシグナル経路が働いていることが確認された。しかし、カテプシンB遺伝子についてはIFN $\tau$ による発現誘導は見られず、逆に減少した (Fig.2 c)。ヒトC型肝炎患者へのIFN $\tau$ 投与後の末梢血単核細胞においてMX1, 2およびカテプシンC, K, Lの遺伝子発現の増加が見られること<sup>5)</sup>から、I型IFNシグナル経路によって血液細胞でのカテプシン誘導も影響を受けることが想定された。今後は、B以外のカテプシンについても解析の必要がある。

また、IFN $\tau$ 添加20時間に白血球細胞を回収し、均一混和後、カテプシンBおよびリソソーム活性を検出したところ、有核細胞においてカテプシンB活性が検出され (Fig. 3)、若干の混入が見られた赤血球ではカテプシンB活性はまったく見られなかった。このことは、リソソーム活性でも同様に有核細胞のみでの活性発現であった。本実験では、分離リンパ球における活性を検出したが、無核細胞である赤血球でまったく活性が見られなかったことは、全血を用いた際に有核細胞のみ選択的に蛍光検出が可能であることが示唆され、今後の採血後、簡易迅速な活性検出に用いることが期待される。

分離リンパ球にIFN $\tau$ 添加20時間後のカテプシンBおよびリソソーム活性を画像解析によって活性輝度計測を行ったところ、採材した個体で応答の違いが見られ、IFN $\tau$ 添加による明瞭な影響は見られなかった (Fig. 4)。考えられる理由として、カテプシンが不活化されて収納されているリソソームは細胞の品質<sup>6)</sup>、暑熱等の外部からの物



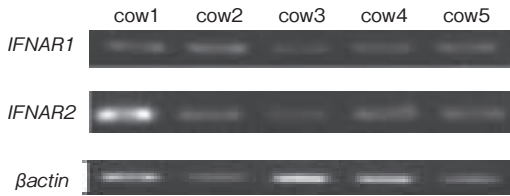


Fig. 1 Expression of *IFNAR1* and *R2* genes in peripheral blood leukocytes

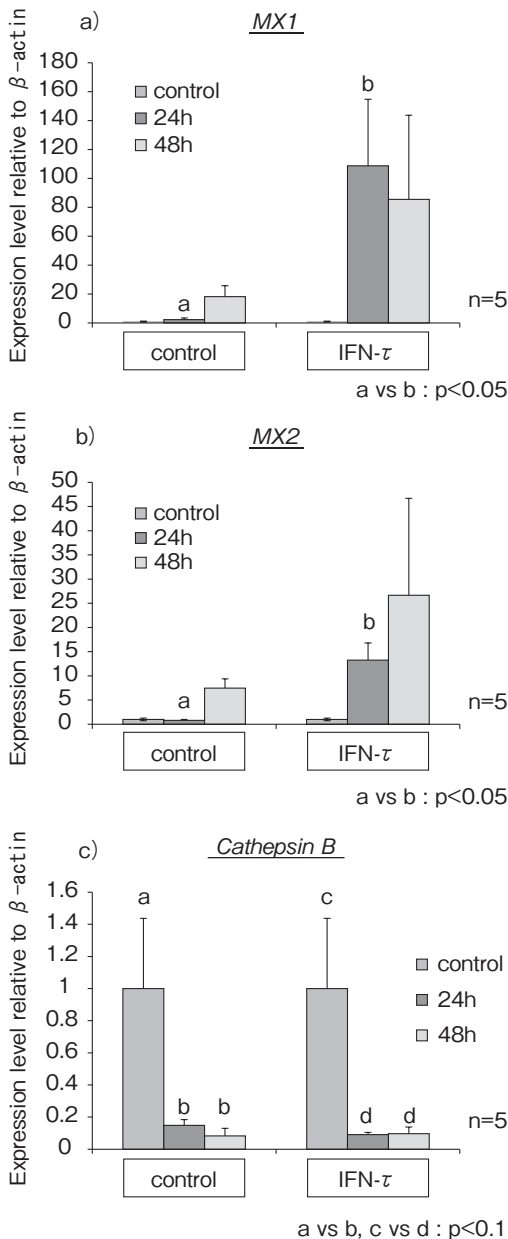


Fig. 2 Expression of *MX1*, *2* and *cathepsin B* genes in non pregnant lymphocytes by IFN- $\tau$  stimulation

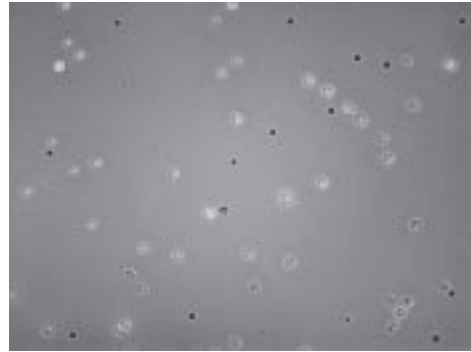


Fig. 3 peripheral blood leukocytes stained by cathepsin activity and hoechst for staining nuclei

Cells showing cathepsin activities and stained nuclei (bright cells). Black cells with no fluorescence are erythrocytes (400x)

理, 化学的なストレスによって容易に活性化し, その結果カテプシンBの漏出が起こる<sup>7)</sup>ことが知られている。このことから, 細胞の分離, 培養などの操作中の環境によってリソソームの活性化ならびにカテプシンBの漏出・活性化が起こり, IFN受容体を介した応答と混在した可能性が考えられる。今後は, 全血を使用するなど, できるだけ細胞にストレスを与えない処理を行う必要がある。

### 3.2 培養体細胞を用いたIFN $\tau$ 応答性カテプシンB活性の検出

牛線維芽細胞におけるI型インターフェロン受容体IFNAR-1および2の発現が確認された(Fig.5 a)。IFN $\tau$ 添加20時間後には活性化したカテプシンBを示す赤色蛍光の顕著な増加が観察された(Fig.5 b)。これに対して, 対照区では活性化程度が少なかった。

本実験結果より, INF $\tau$ による応答シグナルは, 妊娠子宮内での上皮細胞に特異的ではなく, I型インターフェロン受容体を有する細胞でも起こることが明らかになった。羊へのIFN $\alpha$ 投与によってIFN $\tau$ と類似した黄体退行抑制効果<sup>8)</sup>やIFN $\tau$ の投与によって体温が一過性に上昇することが報告されている<sup>9, 10)</sup>。これらのことから, 子宮, 黄

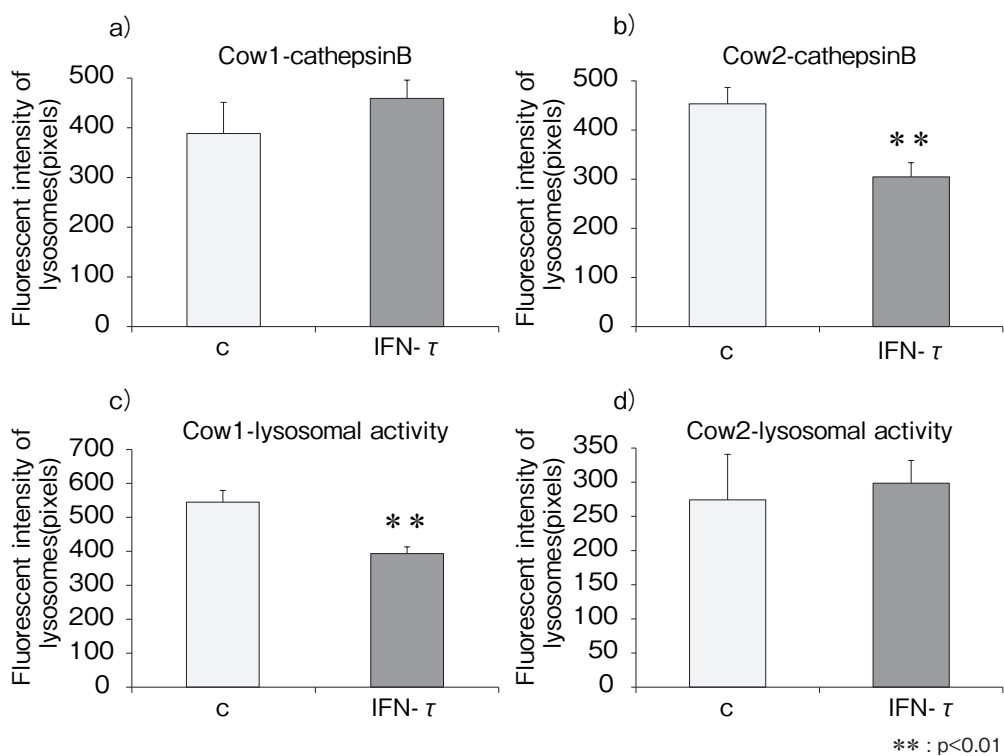


Fig. 4 Effect of IFN- $\tau$  on cathepsin and lysosomal activities of white blood cells collected from non-pregnant cows.

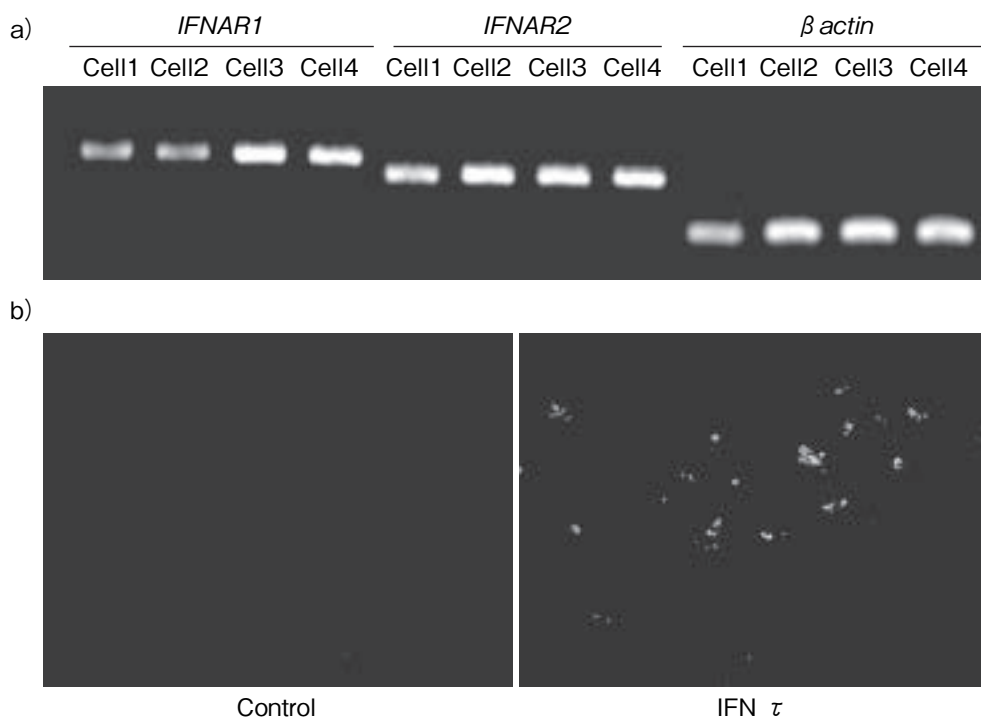


Fig. 5 Expression of type I interferon receptors and induction of cathepsin B activity by IFN- $\tau$  in bovine fibroblast cells (100x)

体などの生殖組織へのI型IFNの共通作用や、生殖組織以外の組織・細胞への応答としての副作用の応答にはIFN受容体を介した応答としてのIFNのシグナルが働いていると言える。

本研究においては、生殖細胞以外の体細胞においてもIFN $\tau$ によってシグナルの活性化が起こり、その結果として細胞内カテプシンの活性化という表現型として明瞭な反応が見られたことは興味深い。IFN $\tau$ の作用としてのカテプシン-リソソーム経路に関しては未解明な点が多いため、IFN $\tau$ が関与する妊娠に伴う新たな間接評価系としてのアッセイの開発が期待される。

#### 4. 要 約

本研究では、着床時牛受胎産物から産生されるIFN $\tau$ 応答を検出・評価することを目的として、細胞内の不要タンパク質等の異化に関わるリソソームおよび、それに含まれる主要酵素であるカテプシンBの活性に着目し、抹消白血球および繊維芽細胞におけるIFN $\tau$ 応答性を検出した。白血球ではI型IFN受容体の遺伝子が発現しており、IFN $\tau$ 添加によってMX1, 2遺伝子の誘導が確認された。しかし、カテプシンB遺伝子発現誘導は見られず、リソソームおよびカテプシンBの活性にもIFN $\tau$ による明瞭な誘導効果は見られなかった。これに対して、牛繊維芽細胞でのI型IFN受容体遺伝子発現および、IFN $\tau$ 添加によるカテプシンB活性の促進が観察された。以上の結果より、I型IFN受容体を有する細胞を適切に選ぶことにより、リソソームおよびカテプシンB活性を指標としたIFN $\tau$ のバイオアッセイに用いる可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Kizaki, K., Shichijo-Kizaki, A., Furusawa, T., Takahashi, T., Hosoe, M., Hashizume, K.: Differential neutrophil gene expression in early bovine pregnancy, *Reprod Biol Endocrinol.*, **11**, 1~10, 2013.
- 2) Green, J.C., Okamura, C.S., Poock, S.E., Lucy, M. C.: Measurement of interferon-tau (IFN-tau) stimulated gene expression in blood leukocytes for pregnancy diagnosis within 18-20d after insemination in dairy cattle, *Anim Reprod Sci.*, **121**, 24~33, 2010.
- 3) Matsuyama, S., Kojima, T., Kato, S., Kimura, K.: Relationship between quantity of IFNT estimated by IFN-stimulated gene expression in peripheral blood mononuclear cells and bovine embryonic mortality after AI or ET, *Reprod Biol Endocrinol.*, **10**, 1~10, 2012.
- 4) Song, G., Spencer, T.E., Bazer, F.W.: Cathepsins in the ovine uterus: regulation by pregnancy, progesterone, and interferon tau, *Endocrinology*, **146**, 4825~4833, 2005.
- 5) Ji, X., Cheung, R., Cooper, S., Li, Q., Greenberg, H.B., He, X.S.: Interferon alfa regulated gene expression in patients initiating interferon treatment for chronic hepatitis C, *Hepatology*, **37**, 610~621, 2003.
- 6) Balboula, A.Z., Yamanaka, K., Sakatani, M., Hegab, A.O., Zaabel, S.M., Takahashi, M.: Cathepsin B activity is related to the quality of bovine cumulus oocyte complexes and its inhibition can improve their developmental competence, *Mol Reprod Dev.*, **77**, 439~448, 2010.
- 7) Balboula, A.Z., Yamanaka, K., Sakatani, M., Kawahara, M., Hegab, A.O., Zaabel, S.M., Takahashi, M.: Cathepsin B activity has a crucial role in the developmental competence of bovine cumulus-oocyte complexes exposed to heat shock during in vitro maturation., *Reproduction*, **146**, 407~417, 2013.
- 8) Green, M.P., Spate, L.D., Bixby, J.A., Ealy, A.D., Roberts, R.M.: A comparison of the anti-luteolytic activities of recombinant ovine interferon-alpha and-tau in sheep, *Biol Reprod*, **73**, 1087~1093, 2005.
- 9) Matsunaga, S., Osawa, T., Geshi, M., Takahashi, H., Inumaru, S., Yokomizo, Y., Miyake, Y.I.: Effect of a single intrauterine administration of recombinant bovine interferon-tau on day 7 of the estrous cycle on the luteal phase length and blood profile in dairy cows, *Res Vet Sci*, **93**, 381~385, 2012.
- 10) Newton, G.R., Martinod, S., Hansen, P.J., Thatcher, W.W., Siegenthaler, B., Gerber, C., Voirol, M.J.: Effect of bovine interferon on acute changes in body temperature and serum progesterone concentrations in heifers, *J Dairy Sci.*, **73**, 3439~3448, 1990.

## 黒毛和種の脂肪交雑形成に影響するビタミンAを 輸送するRBP4のDNA多型探索

Identification of polymorphisms on retinol binding protein 4 (RBP4) gene  
in Japanese black cattle

平野 貴・原 ひろみ・半澤 恵

(東京農業大学農学部)

Takashi Hirano, Hiromi Hara and Kei Hanzawa  
(Tokyo University of Agriculture, Faculty of Agriculture)

Excellent marbling is the greatest merit of beef from Japanese black cattle, and it is known that the restriction of vitamin A improves marbling significantly. Vitamin A is absorbed in the small intestine as retinyl ester (RE), and transported to the liver. RE is then converted to retinol (ROH) in the liver. To transport ROH to the target tissues (cells), ROH binds to RBP4, and the complex is released from liver into the circulatory system. Therefore, it is suggested that polymorphisms on *RBP4* gene affects to marbling, and we tried to identify the *RBP4* polymorphisms in Japanese black cattle.

PCR was performed for a random Japanese black cattle population with primers designed in flanking regions of each exons of *RBP4*, and the sequences of the PCR products were determined. These sequences were compared with bovine *RBP4* sequence (NM\_001040475) and bovine genome sequence (UMD3.1), and 3 SNPs were detected. Two of these SNPs located in the coding region (c.237C>G) and 3'UTR (c.\*50A>G). The remaining SNP located in an intronic region (c.355 + 26C>T). c.237C>G in coding region was synonymous, and it was suggested that the polymorphism did not affect to RBP4 function. It was predicted that c.\*50A>G located in target sequences for two microRNA, bta-miR-2338 and bta-miR-485. Therefore, it was indicated that c.\*50A>G might change regulation for *RBP4* transcripts by microRNA, and affect to marbling formation.

### 1. 目 的

脂肪交雑は牛肉の価格を決定する重要な形質であり、黒毛和種はその脂肪交雑に優れた品種である。これまでに、黒毛和種特定種雄牛の肥育牛産

子200頭以上からなる父方半きょうだい家系によるQTL (Quantitative trait locus) 解析が16頭の種雄牛に対して実施され、脂肪交雑に関連する複数の染色体領域が検出されている<sup>1)</sup>。また、*EDG1* (*Endothelial differentiation sphingolipid*

*G-protein-coupled receptor 1*), *TTN* (*Titin*) や *MYBPC1* (*Myosin binding protein C, slow type*) の5'または3'UTRやプロモーター領域に位置するSNPと脂肪交雑の関連が示されるなど、脂肪交雑関連遺伝子の探索が進められている<sup>2~4)</sup>。しかし、脂肪交雑形成メカニズムは不明な部分が多い。

黒毛和種の肥育は伝統的に濃厚飼料を多給し、粗飼料にβカロテン量の少ない稲わらを給与することで血中ビタミンAを低レベルにして行われてきたと考えられている<sup>5, 6)</sup>。実際に、黒毛和種去勢牛において血中ビタミンA濃度と脂肪交雑に有意な負の相関があることが示されている<sup>7)</sup>。また、肥育牛に由来する脂肪前駆細胞の脂肪細胞分化をビタミンAが抑制することも示されている<sup>8)</sup>。

ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体γ (PPARγ) は脂肪細胞分化のマスターレギュレーターであり、レチノイドX受容体 (RXR) とヘテロ二量体を形成する必要がある<sup>9, 10)</sup>。ビタミンAは、レチノール、レチナール、レチノイン酸などの総称であり、レチノイン酸はレチノイン酸受容体 (RAR) と結合し、PPARγの発現を抑制するとともに、RARの発現を促進する。さらに、RARはRXRとヘテロ二量体を形成するため、PPARγと競合する。その結果、PPARγとRXRの二量体が減少し、脂肪細胞分化が抑制されると考えられている<sup>8)</sup>。すなわち、ビタミンAは筋肉内に存在する脂肪前駆細胞の分化を抑制しているが、ビタミンAの給与を制限することで脂肪細胞の分化抑制が解除され、脂肪交雑形成が高まると考えられている。

ビタミンAはレチニルエステルとして小腸絨毛から吸収され、リンパ管を経て肝臓へ送られた後、レチノールに変換されて各臓器へ輸送される。Retinol-binding protein (RBP) はレチノールと結合して脂溶性レチノールを可溶化し、輸送するタンパクである。また、レチノールの細胞毒

性を防ぐ働きもあると考えられている。RBPには、細胞内RBP1、細胞内RBP2、細胞内RBP3および血漿RBP4のアイソフォームが存在する。血漿RBP4は、肝臓から血液(血漿)中に分泌されるレチノールと結合して各臓器(細胞)へ輸送する役割を持っている<sup>11, 12)</sup>。RBP4は6つのエクソンからなり、ウシ26番染色体上に位置する6,200bpに渡る遺伝子で、201個のアミノ酸をコードする。また、黒毛和種の脂肪交雑QTLは26番染色体上でも検出されている<sup>1)</sup>。

これらのことから、RBP4の多型は脂肪交雑形成に影響すると考え、黒毛和種における多型を探索することとした。

## 2. 材料および方法

### 2.1 共試个体

黒毛和種に存在するRBP4多型を探索するための集団として、これまでに収集されていた生後20日以内に死産した黒毛和種490頭から74頭を選抜した。これら74頭を選抜は、遺伝的偏りを低減させるために同一種雄牛の産子が2頭を超えないように行った。これらのゲノムDNAは、耳片組織をProteinase Kによって37°Cで一晩反応した後、フェノール・クロロフォルムで処理することによって抽出した。抽出したゲノムDNAを20ng/μLの濃度に調整し、PCR反応のテンプレートとして使用した。

### 2.2 ダイレクトシーケンシング

ウシRBP4を構成する6つのエクソンをそれぞれ増幅するために、各エクソンの外側にプライマーを配置した (Fig. 1, Table 1)。これら6種のプライマーセットを使用してPCRを行った。PCR反応条件は、熱変性を94°Cで2分、その後94°Cで1分、アニーリングを60°Cで1分、伸長反応を72°Cで1分を35サイクル繰り返し、最終伸長反応を72°Cで10分間行った。得られた増幅産物を鋳型

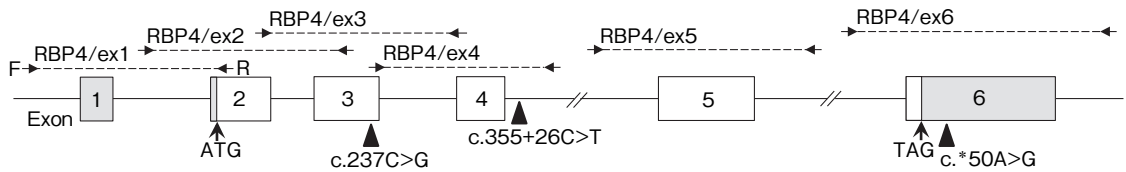


Fig. 1 Position of primers, exons, and detected SNPs

- 1) Each box indicates exons of *RBP4* gene. Shaded boxes were 3' and 5' UTR.
- 2) Arrows and dashed lines above exons indicate primers and amplified regions by each primers, respectively.
- 3) Filled triangle indicates SNP position.
- 4) ATG is initiation codon, and TAG is termination codon.

Table 1 Primers for each exons

|          |   | Primer sequence (5'→3') | Size (bp) | GC content |
|----------|---|-------------------------|-----------|------------|
| RBP4-ex1 | F | GCGCGTTATGCAAGTGCCTGG   | 427       | 0.75       |
|          | R | ACACCCACTCCATCTCGCTC    |           |            |
| RBP4-ex2 | F | ATGGGTGTGATGAGGGTCTG    | 447       | 0.71       |
|          | R | GCGACGATGTGTCTTGCAG     |           |            |
| RBP4-ex3 | F | GAGAACTTCGACAAGGCTCG    | 438       | 0.66       |
|          | R | ACACACGTCCCAGTTACTGG    |           |            |
| RBP4-ex4 | F | TCCGTCTCTTAAAGTCAGTGC   | 407       | 0.59       |
|          | R | AGTTCTGGCTACTTACACACG   |           |            |
| RBP4-ex5 | F | TCTAACTGCTGTCAGAATCC    | 511       | 0.57       |
|          | R | AAAGGCCAGTGAAGATCTGG    |           |            |
| RBP4-ex6 | F | TTACAAGTACATCTAGCTGTCC  | 590       | 0.43       |
|          | R | GCTAGAACAGACCGAAGGTC    |           |            |

としてダイレクトシーケンシングを行った。塩基配列の決定は、Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) で電気泳動後、Sequencing Analysis version 5.2によって行った。

### 2.3 多型探索

決定した塩基配列とデータベースに登録されているウシ*RBP4*塩基配列 (NM\_001040475) およびウシゲノム配列 (UMD3.1) を比較することによって多型を探索した。多型の探索および検出されたSNPが非同義置換であるかを、GENETYX-MACを用いて確認した。また、3'UTRに位置するSNPについて、そのSNPがmicroRNAのターゲット配列に含まれるかをTargetScan (<http://targetscan.org>)によって解析した。

### 3. 結果と考察

*RBP4*遺伝子多型を探索するために、黒毛和種74頭のDNAを用いてダイレクトシーケンシングを行い、各エクソンについて14~68頭の塩基配列を決定した (Table 2)。これら決定した塩基配列を用いて、コード領域内に位置するエクソン3のc.237C>G、エクソン4の3'末端から26塩基下流に位置するイントロン4のc.355+26C>Tおよびエクソン6の3'非翻訳領域 (UTR: untranslated region) に位置するc.\*50A>Gの3種のSNPを検出した (Fig.1, Table 2)。これまでに、黒毛和種のSNPが、黒毛和種肥育去勢牛52頭のプールDNAを用いた次世代型シーケンサーによる全ゲノムリシーケンシングによって、網羅的に探索されている<sup>13)</sup>。しかし、*RBP4*のエクソン1~4はread depthが不十分な領域に含まれ、SNP探索の

Table 2 Detected SNPs on *RBP4* gene

| Primer   | n * | SNP                    | Genomic position <sup>#</sup> | Genotype frequency(n) |            |            | $\chi^2$ | p     | Allele Frequency |       |
|----------|-----|------------------------|-------------------------------|-----------------------|------------|------------|----------|-------|------------------|-------|
|          |     |                        |                               | W/W                   | W/M        | M/M        |          |       | W                | M     |
| RBP4-ex1 | 14  | —                      | —                             | —                     | —          | —          | —        | —     | —                | —     |
| RBP4-ex2 | 24  | —                      | —                             | —                     | —          | —          | —        | —     | —                | —     |
| RBP4-ex3 | 68  | c.237C>G (synonymous)  | 14,946,129                    | 0.368 (25)            | 0.529 (36) | 0.103 (7)  | 1.300    | >0.1  | 0.632            | 0.368 |
| RBP4-ex4 | 65  | c.355+26C>T (intron 4) | 14,945,816                    | 0.262 (17)            | 0.323 (21) | 0.415 (27) | 7.476    | <0.01 | 0.423            | 0.577 |
| RBP4-ex5 | 45  | —                      | —                             | —                     | —          | —          | —        | —     | —                | —     |
| RBP4-ex6 | 67  | c.*50A>G (3'UTR)       | 14,940,784                    | 0.382 (26)            | 0.324 (22) | 0.294 (20) | 8.238    | <0.01 | 0.544            | 0.466 |

W : Reference type allele

M : Substitution type allele

\* : Successfully sequenced individuals

# : UMD3.1

対象領域から外れていたため、c.237C>Gとc.355+26C>Tは今回新たに検出されたSNPであった。

コード領域に位置するc.237C>Gの各遺伝子型頻度は、C/C型：0.37、C/G型：0.53およびG/G型：0.10であった。また、各アレル頻度はCアレル：0.63とGアレル：0.37であったことから、黒毛和種集団に置換型アレルが広まっていることが示された。しかし、このSNPはアミノ酸置換を伴わない同義置換であったことから、このSNPはRBP4の機能に影響しないと考えられた。また、c.355+26C>Tはイントロンに位置することから、このSNPもRBP4機能に影響しないと考えられた。c.355+26C>Tの各アレル頻度は、Cアレル：0.42とGアレル頻度：0.58であった。

3'UTRに位置するc.\*50A>Gの遺伝子型頻度とアレル頻度は、A/A型：0.39、A/G型：0.36、G/G型：0.25であり、Aアレル：0.57、Gアレル：0.43であった (Table 2)。このことから、置換型アレルが黒毛和種集団に広まっていることが示された。microRNAはmRNAの3'UTRに結合し、その翻訳を抑制するnoncoding RNAの一種であり、3'UTRにおけるそのターゲット配列の変異は表現型に影響すると考えられ、実際に3'UTRの変異と大腸ガンの関連が示されている<sup>14)</sup>。そこで、

3'UTRで検出されたc.\*50A>GがmicroRNAのターゲット配列に含まれるかをTargetScanによって解析したところ、このSNPはウシのmicroRNAであるbta-miR-2338とbta-miR-485のターゲットとなり得る配列内に位置することが示された (data not shown)。このことから、この3'UTRで検出されたc.\*50A>Gは、microRNAによるRBP4遺伝子の転写後調節を変化させ、脂肪交雑形成に影響する可能性が示された。

今回、各エクソンを増幅するプライマーを用いて、ダイレクトシーケンシングを行い、各エクソンについて14～68頭の塩基配列を決定した (Table 2)。エクソン1とエクソン2の配列を決定できた個体はそれぞれ14頭と24頭であった。これら領域のGC含量は、高GC含量とされる0.65よりも高い0.75と0.71であった (Table 1)<sup>15)</sup>。このため、これらはPCR増幅および塩基配列決定が困難な領域であり、塩基配列を決定できた頭数も他エクソン領域と比べ、低くなったと考えた。

RBP4遺伝子のエクソンおよびその近傍から3種のSNPが検出された。そのうち、3'UTRに位置するc.\*50A>Gは、microRNAのbta-miR-2338とbta-miR-485のターゲット配列内に位置する可能性が示され、脂肪交雑形成に関連することも考

えられた。また、今回用いた集団におけるc.355+26C>Tとc.\*50A>Gの遺伝子型頻度は、Hardy-Weinberg平衡から外れていた (Table 2)。今後は、これらSNPが黒毛和種の脂肪交雑と関連するかを明らかにするとともに、遺伝子型頻度の偏りが子牛死産集団を用いたためなのかを確認するために、枝肉市場などで収集した枝肉成績が判明している正常に成長した集団を用いて、これらSNPと脂肪交雑との関連解析を行う必要がある。

#### 4. 要 約

黒毛和種は脂肪交雑に優れた品種であり、肥育中期にビタミンA給与を制限することによって、脂肪交雑形成が高まることが示されている。ビタミンAはレチニルエステルとして小腸から吸収され、肝臓に輸送される。肝臓でレチノールに変換され、標的臓器（細胞）に輸送するためにRBP4と結合して、肝臓から血中に分泌される。これらのことから、RBP4遺伝子の多型は脂肪交雑形成に影響すると考え、黒毛和種集団に存在するRBP4の多型を探索した。

黒毛和種74頭のゲノムDNAとウシRBP4の各エクソンを増幅するプライマーを用いてPCRし、得られた増幅産物をシーケンスした。決定した塩基配列とデータベース登録されているウシRBP4 (NM\_001040475) およびウシゲノム配列 (UMD3.1) を比較したところ、3種のSNPが検出された。これらの2SNPsはエクソン内で検出され、コード領域と3'UTRに位置した。残りの1SNPはイントロンで検出された。コード領域のSNPは同義置換であり、RBP4機能に影響しないと考えられた。3'UTRのSNPは、2種のmicroRNAのターゲット配列に位置することが予測された。このことから、黒毛和種に存在するRBP4遺伝子の3'UTRに位置するSNPは、microRNAによる転写後調節に影響し、脂肪交雑

形成に影響する可能性が示された。

#### 文 献

- 1) Takasuga, A., Watanabe, T., Mizoguchi, Y., Hirano, T., Ihara, N., Takano, A., Yokouchi, K., Fujikawa, A., Chiba, K., Kobayashi, N., Tatsuda, K., Oe, T., Furukawa-Kuroiwa, M., Nishimura-Abe, A., Fujita, T., Mizoshita, K., Ogino, A., Sugimoto, Y. : Identification of bovine QTL for growth and carcass traits in Japanese Black cattle by replication and identical-by-descent mapping, *Mammalian Genome*, **18**, 125~136, 2007.
- 2) Yamada, T., Itoh, M., Nishimura, S., Taniguchi, Y., Miyake, T., Sasaki, S., Yoshioka, S., Fujita, T., Shiga, K., Morita, M., Sasaki, Y. : Association of single nucleotide polymorphisms in the *endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1* gene with marbling in Japanese Black beef cattle, *Animal Genetics*, **40**, 209~216, 2008.
- 3) Sasaki, S., Itoh, T., Ogino, A., Kimura, H. : Effects of a single nucleotide polymorphism in *EDGI* and *TTN* genes with meat production and carcass traits in Japanese Black beef cattle. 34th Conference of International Society for Animal genetics abstract book, 168, 2014.
- 4) Tong, B., Sasaki, S., Fujita, T., Yamada, T. : Association of the SNP in the *MYBPCI* gene with marbling in Japanese Black beef cattle. 34th Conference of International Society for Animal genetics abstract book, 149~150, 2014.
- 5) 社団法人畜産技術協会：ビタミンAのコントロールを用いた効率的肥育技術Q&A, Vol. 2, 29, 2005.
- 6) 肉牛大辞典飼育の基本から最新研究まで, 農分協, 2013.
- 7) 岡章生：黒毛和種肥育牛の肉質・増体に対するビタミンAの影響, *動物遺伝研究会誌*, **24**, 31~36, 1996.
- 8) 松井徹, 鳥居伸一郎, 矢野秀雄：ビタミンAとウシの脂肪細胞分化, *動物遺伝研究会誌*, **24**, 37~44, 1996.
- 9) Mandrup, S., Lane, M.D. : Regulating adipogenesis, *Journal of Biological Chemistry*, **272**, 5367~5370, 1997.
- 10) 今川正良：核内受容体PPAR $\gamma$ を介した脂肪細胞分化の分子機構, *脂質栄養学*, **12**, 54~64, 2013.
- 11) 渭原博：レチノール結合蛋白-4. *生物試料分析*, **34**, 354~358, 2011.
- 12) Sun, H., Kawaguchi, R. : The membrane receptor for plasma retinol-binding protein, a new type of cell-surface receptor, *International Review of Cell and Molecular Biology*, **288**, 7~9, 2011.
- 13) 平野貴, 西村翔太, 渡邊敏夫, 高須賀晶子, 半澤恵, 杉本喜憲：黒毛和種のDNAプールを用いた全ゲノムリシーケンシングによる網羅的SNP探索とその評価,



- 日本畜産学会報, 84, 319~325, 2013.
- 14) Bhaumik, P., Gopalakrishnan, C., Kamaraj, B., Purohit, R. : Single nucleotide polymorphisms in microRNA binding sites: implications in colorectal cancer, *The Scientific World Journal*, 2014, ID547154, 2014.
- 15) Choi, J. S., Kim, J. S., Joe C. O., Kim, S., Ha, K. S., Park, Y. M. : Improved cycle sequencing of GC-rich DNA template, *Experimental and Molecular Medicine*, 31, 20~24, 1999.

## 黒毛和種の雌牛における空胎期間を短縮させる 遺伝的要因の解明

Genetic analysis for days open in Japanese Black cattle

佐々木 慎 二

(独立行政法人家畜改良センター)

Shinji Sasaki

(National Livestock Breeding Center)

The days open (DO), which is the calving to conception interval, is an important trait related to reproductive performance and profitability in cow-calf operation. To identify quantitative trait loci for DO in Japanese Black cattle, we conducted a genome-wide association study using 459 animals with extreme DO values selected from a larger group of 15,488 animals. We identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) on bovine chromosome 2 that were associated with DO. Six SNPs were located in 8.5 kb-associated region, proved be in a state of high linkage disequilibrium. The association was replicated in a sample of 1,778 animals. In the replicated population, the frequency of the reduced-DO allele ( $Q$ ) was 0.63, and the effect of allele substitution on DO was a decrease of 3.74 days. The results suggest that the  $Q$  allele could serve as a useful marker in Japanese Black cattle to select animals with superior DO performance.

### 1. 目 的

肉用品種では、「雌牛が受胎し妊娠後、子牛を分娩する。その後、次の繁殖サイクルに確実に入ること」が、肥育の素牛となる子牛生産の基盤であり、食肉の生産の最初のステップとなる。黒毛和種では、約1年1産を目標としている<sup>1)</sup>。そのためには、妊娠期間は分散が小さく平均289日であるため、空胎期間（分娩から次の受精までの期間）は約80日でなくてはならないが、平成21年度時点で115日<sup>2)</sup>と、空胎期間の短縮が求められている。また、個体の生涯生産性を高めるため、複数回の産時での空胎期間の短縮が望まれる。

そこで、本研究では空胎期間を短縮させる遺伝的要因を明らかにするため、黒毛和種・雌牛の初産から4産目までの3回の平均空胎期間を表型値とし、SNP（1塩基多型）を用いたゲノムワイド関連解析を行い、空胎期間に関連するゲノム領域を特定することを目的とした。

本研究によって、空胎期間の短縮に関連するゲノム領域が特定できれば、関連領域を代表する多型をDNAマーカーとして用いることで、種雄牛の後代雌牛の空胎期間の短縮が期待できる。空胎期間の短縮は、雌牛の飼養管理費を抑えるため生産性の向上に直結する。また、本研究を起点に、関連領域のゲノム情報を詳しく調べることで、空

胎期間を短縮させる遺伝子と責任多型の同定が期待される。

## 2. 方法

黒毛和種・雌牛15,488頭から初産から4産目までの3回の平均空胎期間を得た<sup>3)</sup>。平均空胎期間が長い個体231頭(85パーセントイル)と短い個体228頭(15パーセントイル)の個体を、BovineSNP50K BeadChip (Illumina社, version 1)で型判定を行ったSNP情報を用いた。SNP情報から、型判定率が99%以上、マイナーアレル頻度が1%以上、ハーディーワインベルグ平衡度が0.001以上の33,303個のSNPを選抜した。次に、これらのSNP情報からゲノム関係行列を作成し、線形混合モデル(GEMMAソフトウェア)で関連解析を行った<sup>4)</sup>。今回の解析では、多重検定を考慮し $P < 1.5 \times 10^{-6}$ をゲノムワイドの有意水準とした。

## 3. 結果と考察

関連解析の結果、ゲノムワイドに有意なSNPとして、2番染色体に*ARS-BFGL-NGS-115142* (97,368,169bp, odds ratio = 1.703,  $P = 1.15 \times 10^{-6}$ )が検出された(Fig.1A)。

関連部位を詳細に調べるため、約1,000頭の黒毛和種をIllumina BovineHD BeadChipで型判定した約58万個のSNPを参照データとして、BEAGLEプログラムでインピューテーションを行った結果<sup>3)</sup>、2番染色体の関連領域の周辺に6つの関連するSNPが検出され、約8.5kbpが連鎖不平衡であることが分かった( $P = 1.50 \times 10^{-6} - 3.92 \times 10^{-8}$ ,  $D' = 1$ ,  $r^2 = 0.813 - 1$ ) (Fig.1B)。次に、最も有意な関連が認められた多型である*BovineHD0200028010* (97,359,632 bp)を共変量として関連解析を行った結果、この領域に関連

SNPが認められなくなったことから(Fig.1C)、この領域の量的形質遺伝子座は1つであることが分かった。そこで、1,778頭の黒毛和種・雌牛で*BovineHD0200028010*の型判定を行い、空胎期間との関連を調査した結果、優良型多型頻度は63%で黒毛和種に一般的に認められる多型であり、優良型アレルをもつ個体では、空胎期間が3.74日短縮することが分かった。今後、検証集団を増やしDNAマーカーとしての信頼性を評価するとともに、関連領域がどのようなメカニズムで空胎期間の短縮に影響を与えるのか解析する必要がある。

## 4. 要約

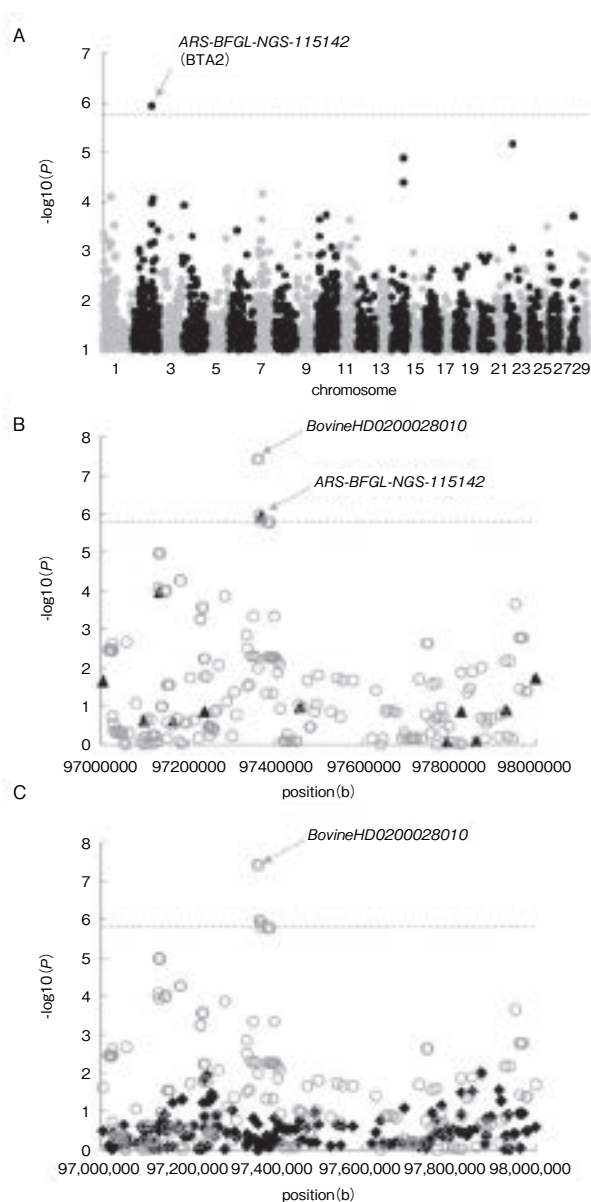
本研究は、空胎期間を短縮させる遺伝的要因を明らかにするため、黒毛和種・雌牛の初産から4産目までの3回の平均空胎期間を表型値とし、SNPを用いたゲノムワイド関連解析を行い、空胎期間に関連するゲノム領域を2番染色体に特定した。今後、関連領域がどのようなメカニズムで空胎期間の短縮に影響を与えるのか明らかにすることで、DNAマーカーとしての信頼性が確保され空胎期間を短縮させる選抜に利用することが可能になると考えられる。

## 謝辞

本研究は、公益社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所杉本喜憲博士と国立大学法人岡山大学揖斐隆之博士の協力の下に行われた。ここに感謝致します。

## 文献

- 1) 農林水産省, 家畜改良増殖目標, 2011.
- 2) Wagyu Registry Association, *Wagyu*, 255, 15~19, 2011.
- 3) Sasaki, S., Ibi, T., Watanabe, T., Matsuhashi, T., Ikeda, S., Sugimoto, Y., *BMC Genet.*, 14, 41, 2013.
- 4) Zhou, X., Stephens, M., *Nat Genet.*, 44, 821~824, 2012.



**Fig. 1** Manhattan plot of the association of SNPs with OD in 459 Japanese Black cattle

(A) Manhattan plot of the association of SNPs with DO in 459 Japanese Black cattle. The chromosomes are distinguished with alternating colors (grey, odd numbers; black, even numbers). The chromosome number is indicated on the x-axis. The dashed line is the Bonferroni genome-wide significance threshold ( $-\log_{10}(P) = 5.82$ ). The vertical axis is broken for  $P$ -values below  $-\log_{10}(1)$ . SNPs positions are based on the UMD3.1 assembly of the bovine genome.

(B) Regional plot of the locus on BTA2 associated with DO. SNPs from the 50K SNP chip are shown in black filled triangles. The imputed SNPs are shown as unfilled circles.

(C) A conditional analysis was performed by including a genotype of *BovineHD0200028010*, one of most closely associated SNP on the BTA2, as a covariate in the model. An arrow indicates the *BovineHD0200028010*. Unfilled circles and black filled diamonds represent  $P$  values in  $-\log_{10}$  scale before and after conditioning, respectively.

## 牛胚盤胞期胚における耐暑性付与に関する研究

The study of thermotolerance in bovine blastocysts

阪谷美樹・森美幸\*

((独) 農研機構九州沖縄農業研究センター畜産草地研究領域, \*福岡県農林業総合試験場生産環境部)

Miki Sakatani and Miyuki Mori\*

(Livestock and Grassland Research Division, Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), \*Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center)

Low conception rate in dairy cattle in summer is a worldwide problem. One of the possible reasons is high thermo-sensitivity of early stage embryos. The embryo transfer is a candidate to improve low conception rate in summer. However, the conception rate of frozen-thawed embryo transfer is still lower than that of fresh embryo transfer. Therefore, we conducted two experiments to understand the reason of low conception rate in in vitro derived frozen embryo transfer in summer and to improve the detrimental effects of heat shock.

In experiment 1, we evaluated the effect of heat shock to frozen-thawed in vitro derived blastocysts on survivability and gene expressions. The stress gene (*HSPA1A*) expression was increased not only by frozen-thawed treatment but also dramatically by heat shock treatment after thawing. Besides, the surviving rate and re-expanding rate of blastocysts at 6 or 48 h after thawing was decreased by heat shock treatment.

In experiment 2, we produced embryos with supplemented 5 mg/ml L-carnitine (Car-HS) or P-glycoprotein induced (PP-HS) media before freezing. And then, the effect of heat shock to frozen-thawed blastocysts were evaluated. There were no significant differences were observed in gene expressions. However, the rate of shrink blastocysts at 6 h after thawing was lower in Car-HS and PP-HS than that in heat-shocked blastocysts. And the rates of living blastocysts at 48 h after thawing were higher in Car-HS and PP-HS than that of heat-shocked group. These results indicated that the supplementation of L-carnitine to culture medium or induction of P-glycoprotein in embryos improved the detrimental effect of heat shock to frozen-thawed blastocysts.

In conclusion, in vitro derived frozen-thawed blastocysts was sensitive and easily damaged to heat shock. However, the supplementation of L-carnitine or induced P-glycoprotein to embryos were seemed to improve the survivability to heat shock after thawing.

## 1. 目 的

本研究では体外受精胚の凍結融解後の高温処理が胚盤胞期胚の品質や生存性に及ぼす影響を検討し、耐暑性の高い胚の作出法を確立することを目的とした。

近年、夏季の家畜における繁殖成績低下が大きな問題となっている。人工授精では、受精後2日目までの発生初期胚が高温により発生を阻害されることが繁殖成績低下の原因の一つと考えられる。一方、胚移植では高温感受性が高い受精直後の発生初期を体外でバイパスできる点から、高温ストレスの影響軽減が期待できる。

体外受精胚は一度に胚を大量生産できるため、生体内受精胚と比較して生産効率が高く、胚を凍結保存することで利用性が格段に高まる。夏季に体外受精由来凍結胚を活用することは、夏季の低受胎を改善できる可能性が高い有望な戦略であると考えられる。しかし、夏季の体外受精凍結胚の受胎率は新鮮胚移植と比較すると依然として低く、高温ストレスが凍結胚の融解後の生存性や品質に及ぼす影響については未だ不明な点が多い。

そこで、本研究では高温が凍結融解後の体外受精胚に与える影響を形態的ならびに遺伝子発現解析から明らかにするとともに、体外受精胚の凍結融解後の胚の耐暑性を増強し、夏季にも受胎性が高い胚の作出法を検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 体外受精および発生培養

食肉処理場由来卵巣より採取した卵子をIVMD101培養液（機能性ペプチド研究所）にて38.5℃ 3%CO<sub>2</sub>10%O<sub>2</sub>87%N<sub>2</sub>条件で20時間成熟培養を行い、その後BO液で希釈した凍結融解精液（1.0x10<sup>7</sup>/ml）とともに38.5℃ 3%CO<sub>2</sub>10%O<sub>2</sub>87%N<sub>2</sub>下で5時間媒精をした。媒精終了後、卵

子を38.5℃ 3%CO<sub>2</sub>10%O<sub>2</sub>87%N<sub>2</sub>下でグルコース不含修正M199培地（50個/500μl）にて6日間、その後10%牛胎子血清（FBS）加M199培地にて1日間培養して胚盤胞期胚を得た。

### 2.2 凍結・融解

発生培養7日目に胚盤胞期まで達した胚を凍結保存した。胚は凍結液（5%エチレングリコール、6%プロピレングリコール、0.1Mスクロース、4mg/ml牛血清アルブミン含PBS）に移した後、0.25mlストロー（IMV）に移して平衡し、プログラムフリーザーで緩慢凍結した。0.3℃/分で-30℃まで冷却した後、液体窒素中に移し保存した。

凍結保存したストローは空気中にて10秒保持した後、30℃の温湯に10秒処理して融解した。融解後の胚は100μM2-メルカプトエタノール、20%FBS含M199ドロップに移し、回復培養を行った。

### 2.3 遺伝子解析

胚盤胞は0.1%ポリビニルアルコールを含むPBSにて洗浄した後、0.5mlチューブに移し、解析まで-80℃で保存した。RNA抽出はRNeasy plus micro kit（キアゲン）を用いて行い、逆転写反応は、Superscript III逆転写酵素（ライフテクノロジー）を用いて実施した。18sリボゾーマルRNA（*RNI8SI*）を内部標準として、ヒートショックプロテイン70（*HSPA1A*）、POUドメインクラス5転写因子（*POU5F1*）、IFN $\tau$ （*IFNT*）、CDX2（*CDX2*）の各遺伝子の発現（Table 1）を定量PCRにて解析した。解析法は $\Delta\Delta$ CT法を用い、相対発現量を算出した。

### 2.4 実験区

実験1：胚盤胞を凍結融解後、38.5℃ 5%CO<sub>2</sub>で平衡化した回復培地に移し、38.5℃（対照Cryoccon）または41.0℃（高温処理Cryo-HS）で6時間培養した。6時間後に胚の形態を実体顕微鏡にて観察し、各区5胚を遺伝子発現解析用にサンプル

Table 1 Primer information

| Gene          | Sequence (5'-3')           | Product length | Accession number |
|---------------|----------------------------|----------------|------------------|
| <i>RN18SI</i> | F: AAACGGCTACCCACATCCAAGG  | 138            | DQ066896         |
|               | R: GCGGAAGGATTTAAAGTGGACTC |                |                  |
| <i>HSPA1A</i> | F: GACAAGTGCCAGGAGGTGATTT  | 117            | U09861           |
|               | R: CAGTCTGCTGATGATGGGGTTA  |                |                  |
| <i>POU5F1</i> | F: TGCAGCAAATTAGCCACATC    | 123            | NM_174580.2      |
|               | R: AATCCTCACGTTGGGAGTTG    |                |                  |
| <i>IFNT</i>   | F: TCCATGAGATGCTCCAGCAGT   | 103            | X65539           |
|               | R: TGTTGGAGCCCAGTGCAGA     |                |                  |
| <i>CDX2</i>   | F: GCAGCCAAGTGAAAACCAGG    | 118            | NM_001206299     |
|               | R: GCTTTCCTCCGATGGTGAT     |                |                  |

リングした。残りの胚は、38.5°C 5%CO<sub>2</sub>で融解48時間まで培養を継続し、48時間後の胚の形態(生存性)と直径を調査した後、各区3個の生存胚盤胞を遺伝子解析用にサンプリングした。遺伝子発現は、凍結融解を行わなかった胚(fresh)を基準として統計処理を実施した。

実験2: 胚発生培養時(0~7日目)に5 mg/ml L-カルニチン(Car-HS)または10 μM フォルスコリン、10 μM リファンピシン(PP-HS)を含む培地で作成した胚盤胞を凍結融解し、41.0°Cで6時間高温処理を行った。6時間後に胚の形態を実体顕微鏡にて観察し、各区5胚を遺伝子発現解析用にサンプリングした。残りの胚は融解48時間まで培養を継続し、48時間後の胚の形態(生存性)と直径を調査した。M199のみで培養した胚を凍結融解後38.5°C(対照区: Con)または41.0°C(Con-HS)で6時間培養した胚と比較した。

### 2.5 統計処理

統計処理はStatviewまたはRを用いた。遺伝子解析は分散分析法(Tukey-Kramer)で解析を行い、胚の生存性についてはカイ二乗検定法またはFisherの正確検定を実施した。また胚直径は対応のないStudent *t*-testを用いて解析し、P値が0.05以下のものを有意であると判定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 実験1

計34個(4反復)の胚盤胞について生存性の評価を行った。Cryo-con区では融解6時間後に90%以上の胚が再拡張中または再拡張していたが、Cryo-HS区では再拡張中または再拡張した胚は55%であり有意に低かった(Table 2)。融解48時間後の14個の胚では、Cryo-HS区で脱出率がCryo-con区と比較し有意に低く、胚の生存率、直径についても有意に低い値を示した(Table 3)。以上の結果は、凍結融解後の高温処理により胚は大きなダメージを受け、生存性が低下すること、また回復が遅れ、品質が低下する可能性を示唆している。

Fig. 1に示すように未凍結の新鮮胚を指標とした場合、ストレスマーカーである*HSPA1A*の発現は凍結融解6時間後の対照区(Cryo-con)でも有意に増加したが、Cryo-HSで劇的に増加した。また、6時間後のCryo-HS区はCryo-con区と比較しても有意に*HSPA1A*の発現が高かった。しかしながら、48時間後には*HSPA1A*の発現は新鮮胚と同レベルであった。

これまでの体外培養系の研究では、発生の進ん

**Table 2** Effect of heat shock on blastocyst survival at 6 h after thawing (after heat shock)

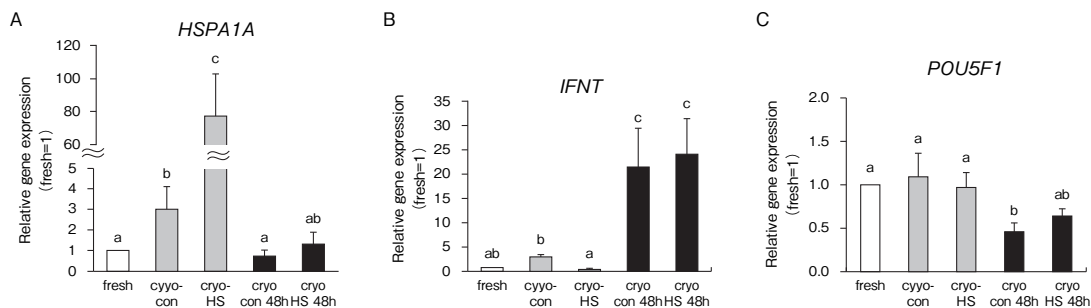
| Treatment | n (replicate) | Number of blastocysts at 6 h after thawing (%) |           |                        |
|-----------|---------------|--|-----------|------------------------|
|           |               | Shrink   | Expanding | Expanded               |
| Cryo-con  | 34 (4)        | 3 (8.9) <sup>a</sup>                           | 14 (41.2) | 17 (50.0) <sup>a</sup> |
| Cryo-HS   | 34 (4)        | 15 (44.1) <sup>b</sup>                         | 12 (35.3) | 7 (20.6) <sup>c</sup>  |

The different symbols indicate significant differences (a-b:  $P < 0.01$ , a-c:  $P < 0.05$ ).

**Table 3** Effect of heat shock on blastocyst survival and size at 48 h after thawing

| Treatment | n (replicate) | Number of hatched blastocysts at 48 h after thawing (%) | Diameter of blastocysts ( $\mu\text{m}$ ) * |
|-----------|---------------|---|---|
| Cryo-con  | 14 (3)        | 9 (64.3) <sup>a</sup>                                   | 279.4 $\pm$ 79.7 <sup>a</sup>               |
| Cryo-HS   | 14 (3)        | 2 (14.3) <sup>b</sup>                                   | 215.3 $\pm$ 63.0 <sup>b</sup>               |

\* Excluded degenerated blastocysts (Cryo-con: the average of 13 blastocysts; Cryo-HS: the average of 10 blastocysts). The different symbols indicate significant differences (a-b:  $P < 0.05$ ).

**Fig. 1** Effect of heat shock to frozen-thawed blastocysts on gene expression

Results are means  $\pm$  SEM of the fold change relative to that on fresh blastocysts. Heat shock protein 70 kDa (*HSPA1A*, A), interferon tau (*IFNT*, B) and POU domain, class 5, transcription factor 1 (*POU5F1*, C). Cryo-con: blastocysts incubated at 38.5°C for 6 h after thawing. Cryo-HS: blastocysts incubated at 41.0°C for 6 h after thawing. Cryo-con 48 h: blastocysts incubated at 38.5°C for 48 h after thawing. Cryo-HS at 48 h: blastocysts exposed at 41.0°C for 6 h, then cultured at 38.5°C for 42 h. The different symbols indicate  $P < 0.05$ .

だ胚盤胞は高温に対する耐性が高く、そのために受精卵移植技術は夏季の低受胎を改善する方法として有効である可能性が指摘されていた<sup>1,2)</sup>。しかしながら、凍結融解によってもストレスマーカーである*HSPA1A*の発現が有意に増加し、高温処理によってそのストレスレベルは劇的に上昇することが示され、さらに胚の生存性、回復力も大きく阻害される可能性が示された。

*IFNT*は6時間後のCryo-HS区でCryo-con区と比較し有意に低い値であった。IFN  $\tau$ は栄養外胚

葉 (TE) から分泌されることが報告されている<sup>3)</sup>。つまり、栄養外胚葉の障害や細胞数とその遺伝子発現量や分泌能に大きな影響を与える可能性が高い。

一方、胚盤胞で栄養外胚葉の内側に位置する内部細胞塊 (ICM) で発現する*POU5F1*は凍結融解ならびに高温処理による影響は認められず、48時間後にその発現が低下した。TE特異的に発現する*IFNT*とICM特異的に発現する*POU5F1*の発現パターンが異なる理由として、Table 2で示すよ



うに6時間後の高温処理区では拡張胚率が有意に低いことから胚盤胞細胞数に差がある可能性が示唆される。Leidenfrostら<sup>4)</sup>の報告では、拡張前、拡張、脱出胚盤胞の総細胞数ならびにTE細胞数はステージが進むことで有意に増加するものの、ICM数は胚盤胞ステージによらず差がないことが示されている。また、Moriらは<sup>5)</sup>、体外培養胚の後期発生ステージでは細胞数と胚直径に正の相関があり、胚直径が胚盤胞細胞数を推察する指標となる可能性を示している。つまり、発生が進んだ融解後48時間の胚ではTE細胞数が増加することで遺伝子発現が変化することが推察され、凍結融解や高温等の胚の外側から受ける障害に対して、ICMはTEほど影響を受けにくい可能性が示唆された。

### 3.2 実験2

凍結前の発生培養7日目の胚発生率は対照区とL-カルニチン添加、P糖タンパク質増強による差は認められなかった(データ略)。凍結融解後6時間では、Con-HS区で収縮胚率が他の3区と比較し有意に高く、拡張胚率は有意に低かった(**Table 4**)。一方、Car-HS区では他の3区と比較し有意に収縮胚が少なく、PP-HS区では6時間後の拡張胚率が他の3区と比較し有意に高かった。48時間後の生存率はCon-HS区で他の3区と比較し低い傾向( $P < 0.1$ )が認められた。

遺伝子発現に関しても実験1と同様に、高温処理をした3区(Con-HS区、Car-HS区、PP-HS区)でHSPA1Aの発現がConと比較して有意に増加した。しかしながら、L-カルニチン添加やP糖タンパク質の増強によるHSPA1A発現量への影響は認められなかった。他の遺伝子(POU5F1, CDX, IFNT)に関しても高温処理の有無や添加による発現量への影響は認められなかった(**Fig. 2**)。

凍結融解により胚の生存性が低下することはこ

れまでも報告されており<sup>6,7)</sup>、それらを改善する培養法として、脂肪代謝を活性化し凍結時のダメージを低減するL-カルニチンの培養液添加<sup>8)</sup>や細胞膜安定やアポトーシス抵抗性を有する膜タンパク質であるP糖タンパク質増強による効果<sup>9, 10)</sup>が報告されている。実験1で示されたように、凍結融解後に高温に曝されることで、胚は強いストレスを受け、その生存性が低下することが明らかとなった。そこで実験2ではこうした耐凍性効果が報告されている物質を利用し、凍結融解後の高温による胚への悪影響を低減する効果を検討したところ、遺伝子発現に差は認められなかったものの、高温処理後の胚の生存性や発生能が改善されることが明らかとなった。

これまで、受精卵移植が夏季の牛受胎率低下改善に有効である可能性が指摘されてきたが、今回の結果は夏季における体外受精凍結胚移植は、融解・移植した後に胚がダメージを受け、着床前に生存性が損なわれている可能性が高いことを明らかにした。しかしながら、カルニチン添加等の耐凍性を高める培養法を用いることで、融解後の高温に対する耐性が高く、夏季の受精卵移植にも耐えうる胚を作成できる可能性が示唆された。

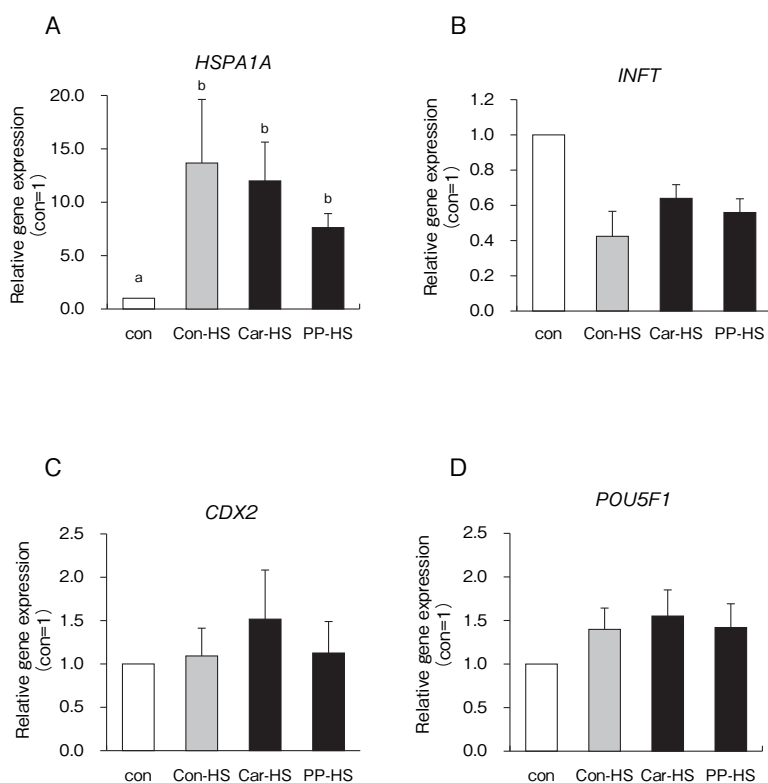
## 4. 要 約

本課題では、夏季の凍結融解体外受精胚の受胎率が低い原因解明と改善法を検討する目的で2つの実験を実施した。実験1により体外受精胚を凍結融解後に高温処理し、高温によって胚のストレスレベルが増加し、その生存性、発生能が阻害されることが明らかとなり、実験2では胚作成時にL-カルニチンを添加またはP糖タンパク質を増強することで、凍結融解後の胚の生存性や発生能が高温処理によっても低下しないことが示された。

**Table 4** Effect of heat shock on blastocyst survival after thawing

| Treatment | Number of embryos (%) at 6 h after thawing |           |                        |       | Number of embryos (%) at 48 h after thawing |          |       |
|-----------|--|-----------|------------------------|-------|---|----------|-------|
|           | Shrink                                     | Expanding | Expanded               | Total | Living                                      | Hatched  | Total |
| Con       | 7 (13.5) <sup>a</sup>                      | 27 (51.9) | 18 (34.6) <sup>a</sup> | 52    | 12 (75.0)                                   | 5 (31.3) | 16    |
| Con-HS    | 20 (39.2) <sup>b</sup>                     | 20 (39.2) | 11 (21.6) <sup>a</sup> | 51    | 7 (43.8) <sup>†</sup>                       | 5 (31.3) | 16    |
| Car-HS    | 5 (7.7) <sup>a</sup>                       | 34 (52.3) | 26 (40.0) <sup>a</sup> | 65    | 21 (67.7)                                   | 8 (25.8) | 31    |
| PP-HS     | 6 (9.4) <sup>a</sup>                       | 26 (40.6) | 32 (50.0) <sup>b</sup> | 64    | 23 (79.3)                                   | 3 (10.3) | 29    |

Con: blastocysts incubated at 38.5°C for 6 h after thawing. Con-HS: blastocysts incubated at 41.0°C for 6 h after thawing. Car-HS: blastocysts produced by supplementation of 5 mg/ml L-carnitine was incubated at 41.0°C for 6 h after thawing. PP-HS: blastocysts produced by supplementation of 10 μM forskolin and 10 μM rifampicin exposed at 41.0°C for 6 h. The different symbols indicate significant differences (a-b :  $P < 0.05$ , † :  $P < 0.1$ ).

**Fig. 2** Effect of heat shock to frozen-thawed blastocysts produced by supplementation of L-carnitine or enhancement of P-glycoprotein synthesis on gene expression

Results are means  $\pm$  SEM of the fold change relative to that on frozen-thawed blastocysts without heat shock treatment. Heat shock protein 70 kDa (*HSPA1A*, A), interferon tau (*IFNT*, B), CDX2 (*CDX2*, C) and POU domain, class 5, transcription factor 1 (*POU5F1*, D). con: blastocysts incubated at 38.5°C for 6 h after thawing. con-HS: blastocysts incubated at 41.0°C for 6 h after thawing. Car-HS: blastocysts produced by supplementation of 5mg/ml L-carnitine was incubated at 41.0°C for 6 h after thawing. PP-HS: blastocysts produced by supplementation of 10 mM forskolin and 10 mM rifampicin exposed at 41.0°C for 6 h. The different symbols indicate  $P < 0.05$ .

## 文 献

- 1) Sakatani, M., Kobayashi, S., Takahashi, M., *Mol Reprod Dev.*, **67**, 77~82, 2004.
- 2) Hansen, P.J., *J Anim Sci.*, **77**, 36~50, 1999.
- 3) Bazer F.W., *J Anim Sci Biotechnol.*, **4**, 23~32, 2013
- 4) Leidenfrost, S., Boelhaue, M., Reichenbach, M., GÜngör, T., Reichenbach, H.D., Sinowatz, F., Wolf, E., Habermann F.A., *PLoS One.*, **6**, e22121, 2011.
- 5) Mori, M., Otoi, T., Suzuki, T., *Reprod Domest Anim.*, **37**, 181~184, 2002
- 6) Fair, T., Lonergan, P., Dinnyes, A., Cottell, D.C., Hyttel, P., Ward, F.A., Boland, M.P., *Mol Reprod Dev.*, **58**, 186~195, 2001.
- 7) Moreira da Silva, F., Motelo, R., *Reprod Domest Anim.*, **40**, 205~209, 2005.
- 8) Takahashi, T., Inaba, Y., Somfai, T., Kaneda, M., Geshi, M., Nagai, T., Manabe, N., *Reprod Fertil Dev.*, **25**, 589~599, 2013.
- 9) Mori, M., Kasa, S., Isozaki, Y., Kamori, T., Yamaguchi, S., Ueda, S., Kuwano, T., Eguchi, M., Isayama, K., Nishimura, S., Tabata, S., Yamanouchi, N., Hattori, M., *Reproductive Toxicology*, **35**, 17 ~ 24, 2013.
- 10) Mori, M., Kuwano, T., Kamori, T., Isozaki, Y., Nishihara, T., Yamauchi, N., Hattori, MA., *Theriogenology*, **81**, 683~688, 2014.

## ラテックス凝集反応による抗豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス抗体検出系の開発

Development of latex agglutination tests for detection of antibodies against porcine reproductive and respiratory syndrome viruses

堀江真行・上野晃聖\*

(鹿児島大学共同獣医学部附属越境性動物疾病制御研究センター, \*鹿児島大学共同獣医学部動物衛生学分野)

Masayuki Horie and Kosei Ueno\*

(Transboundary Animal Diseases Research Center, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University,

\*Laboratory of Animal Hygiene, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is the pathogen responsible for PRRS, which causes significant economic losses in many countries including Japan. To control and monitor PRRSV infection, antibody detection ELISA is widely used in the swine industry. However, ELISA is relatively expensive and time-consuming, and needs several special laboratory equipment. Therefore, novel serological methods are demanded by the swine industry. Although many improved anti-PRRSV antibody detection systems have been reported thus far, none of them have been in practical use.

Latex agglutination test (LAT) is widely used for detection of antibodies against pathogenic microorganisms in the swine industry. LAT has several advantages compared to other assays: (1) it is easy to perform and does not need laboratory equipment; (2) it usually takes less than 10 minutes to get the results; (3) it is usually cheaper than other methods. Therefore, LAT has a potential to be an ideal serological assay for PRRSV. However, no LAT has been reported to be applied to PRRSV thus far.

In this study, we developed a LAT for detection of anti-PRRSV antibodies. We expressed recombinant PRRSV nucleocapsid (N) protein fused with glutathione S-transferase in *Escherichia coli*, purified the protein using affinity chromatography, and coupled the purified protein with latex beads. We first tested our LAT with sera from mice immunized with PRRSV N protein or small PRRSV GP5 peptide, which is also a structural protein of PRRSV but antigenically unrelated to N, showing that the LAT specifically detected anti-PRRSV N antibodies. Then we optimized our LAT with twelve swine serum samples. Although non-specific agglutination was observed when directly testing sera, pretreatment with dilution buffer, which was previously reported to suppress non-specific reaction in a LAT, significantly improved the specificity of LAT. The results obtained by our LAT are almost identical to those by a commercially available ELISA. Importantly, even including the pretreatment step, our LAT takes less than 40 min to gain the results. Our LAT can be a useful tool to control and monitor PRRSV infections.

## 1. 目 的

豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (porcine reproductive and respiratory syndrome virus: PRRSV) は豚に感染し、母豚では繁殖障害を、仔豚では呼吸器障害や発育不良を起こす。PRRSVは感染伝播力が強く強力なワクチンも存在しないため、日本においてもPRRSV感染が蔓延している。PRRSによる経済的被害は甚大で、国内における被害額は280億円と試算されており<sup>1)</sup>、PRRSVの清浄化は養豚産業における重要課題の一つである。PRRSV対策には徹底した衛生管理に加え、確実に感染豚を摘発するための安価で迅速かつ信頼性の高い診断系が必要である。PRRSVの診断系は大きく遺伝子検出系と抗体検出系に分けられる。遺伝子検出系では逆転写PCR (RT-PCR) が、抗体検出系では主にELISAが使用されている。RT-PCRは操作に習熟が必要なうえ、ウイルス遺伝子は一過性にしか血中に存在せず、必ずしもRT-PCRの結果が感染の有無を反映しているとは限らない。一方、PRRSVに対する抗体は感染後1週間程度で上昇するため、抗体検査系はPRRSVの過去の感染歴を反映し、PRRSVのモニタリングとして有用である。しかし、現行の抗体検出系であるELISAは比較的時間がかかるうえに、専用の読み取り機が必要となるため、真の簡便な検査とは言い難い。

ラテックス凝集反応 (latex agglutination test: LAT) は抗原を結合させたラテックスビーズに検体 (血清など) を混ぜ合わせるだけの極めて簡便な抗体検出法である。血清中に抗原特異的抗体が存在すると、抗体が抗原に結合することによってビーズ同士を架橋し、ラテックスビーズの凝集を目視で判定することができる。LATの利点として、以下の3点があげられる：①操作がきわめて簡単であり検出機器などの特別な設備がいらない、

②検査にかかる時間が短い、③一検体から検査が行えるため安価である。LATはこれまでに、オーエスキー病、トキソプラズマなど様々な感染症の抗体検査法として実用化されているが、これまでにPRRSに関する報告はない。

本研究は上記の性質を備えた、迅速かつ簡便な抗PRRSV抗体検出系であるLATの開発を目的として行った。

## 2. 方 法

### 2.1 組換えタンパク質の発現

PRRSVのN遺伝子、Nsp9遺伝子、GP5およびM遺伝子のcytoplasmid tail部分をそれぞれpGEX-6P-1ベクタープラスミドへとクローニングした。得られたそれぞれのプラスミドを用いて大腸菌BL21 (DE3) 株あるいはRosetta2 (DE3) 株を形質転換した。組換えタンパク質の発現は以下のように行われた。それぞれのプラスミドを保持する大腸菌BL21 (DE3) 株あるいはRosetta2 (DE3) 株を50  $\mu$ g/mlアンピシリンを含有する液体LB培地にて培養を行い、経時的にOD<sub>600</sub>を観察した。OD<sub>600</sub>=0.15-0.27 (発現タンパク質によって異なる) において最終濃度0.4mMのイソプロピル- $\beta$ -チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加し、組換えタンパク質の発現を誘導した。IPTG添加後、25°Cで15~21時間 (発現タンパク質によって異なる) の培養を行い、遠心にて大腸菌ペレットを回収した。得られた大腸菌ペレットをBugBuster protein extraction reagent (Merck Millipore) にて懸濁し、添付のマニュアルに従って大腸菌を溶解した。大腸菌溶解物を20,600  $\times$  g, 15分, 4°Cで遠心した後、上清を可溶性画分、ペレットを不溶性画分として回収し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動およびクマシーブリリアントブルー染色にて組換えタンパク質の可溶性を検討した。可溶性画分に発現したタ

ンパク質を直径 $0.22\mu\text{m}$ 孔のシリンジフィルターにて処理し、タンパク質精製を行った。

## 2.2 組換えタンパク質の精製

組換えタンパク質はGST融合タンパク質であるため、Glutathione Sepharose 4B (GEヘルスケア)を用いて、添付の説明書に従って精製を行った。精製した組換えタンパク質はCentricon Plus-20 (Millipore)を用いてPBSへとバッファーの置換を行った。

## 2.3 抗原タンパク質のラテックスビーズへの結合

Polybead<sup>®</sup> Microspheres  $1.00\mu\text{m}$  (Polysciences)を用い、添付の説明書に従ってrGST-Nをラテックスビーズへと吸着させた。またブロッキング剤として、①1% 牛血清アルブミン、②ブロッキングワン (ナカライテスク)、③ブロックエース (DSファーマバイオディカル)、④SuperBlock Blocking Buffer (Thermo scientific)を用いた。以下、それぞれのブロッキング剤にて作成したLATの系をそれぞれLAT-1、-2、-3、-4とする。

## 2.4 血清の前処理

非特異的凝集の抑制のため、dilution buffer (2.05% glucose, 0.8% trisodium citrate, 0.42% sodium chloride, and 0.1% Tween 20)<sup>2)</sup>にて血清の前処理を行った。血清の前処理は等量の血清とdilution bufferを混合し、 $37^{\circ}\text{C}$  30分の処理を行った。

## 2.5 ラテックス凝集反応

ラテックス凝集反応は堀江らの方法<sup>3)</sup>に従って行った。ガラス板の上で $5\mu\text{l}$ の血清あるいは前処理済血清と $5\mu\text{l}$ のrGST-N結合ラテックスビーズを混ぜ、その後緩やかに攪拌したまま5分間反応させ、目視によって凝集を判断した。凝集を+、非凝集を-、判断ができない場合を±とした。

## 2.6 ELISA

PRRS X3 エリーザキット (IDEXX)を用い、添付の説明書に従ってELISAを行った。マウス血清を用いた場合のみ、二次抗体として Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP (Dako)を用いた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 組換えタンパク質の発現

PRRSVのN, Nsp 9の一部、GP 5およびMの cytoplasmid tail部分の組換えタンパク質の発現に成功した。しかし、N以外のタンパク質はすべて不溶性であったこと、またNタンパク質はPRRSVのウイルス株間で保存された抗原であることから、Nタンパク質に集中して以後の研究を行った。また、Nタンパク質もGSTを切断すると凝集を起こし、不溶性となってしまうことが判明したので、GST融合Nタンパク質 (rGST-N)を精製抗原 (Fig. 1)として以後の実験を行った。

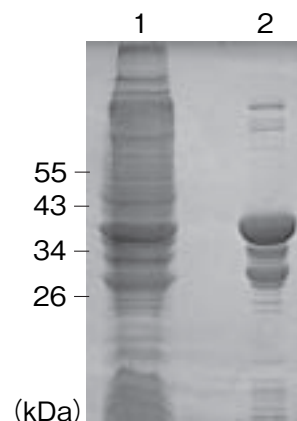


Fig. 1 Purification of recombinant PRRSV nucleocapsid protein. Recombinant PRRSV nucleocapsid protein was expressed in *E.coli* and then purified by affinity chromatography. The whole cell lysate and purified protein were analyzed by SDA-PAGE and CBB stain. Molecular weight is shown on left side of the picture. Lane 1, whole cell lysate; lane 2, purified protein.

Table 1 Latex agglutination tests with mice sera

| Number | Immunogen   | ELISA | LAT-1 | LAT-2 | LAT-3 | LAT-4 |
|--------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1      | rN          | +     | +     | +     | +     | +     |
| 2      |             | +     | +     | +     | +     | +     |
| 3      |             | +     | +     | +     | +     | +     |
| 4      | GP5 peptide | -     | -     | -     | -     | -     |
| 5      |             | -     | -     | -     | -     | -     |
| 6      |             | -     | -     | -     | -     | -     |

Table 2 Optimization of latex agglutination tests with swine sera

| Number | ELISA | Pretreatment (-) |       |       |       | Pretreatment (+) |       |       |       |
|--------|-------|------------------|-------|-------|-------|------------------|-------|-------|-------|
|        |       | LAT-1            | LAT-2 | LAT-3 | LAT-4 | LAT-1            | LAT-2 | LAT-3 | LAT-4 |
| 1      | -     | +                | -     | +     | +     | +                | -     | -     | +     |
| 2      | -     | +                | +     | +     | +     | +                | -     | -     | +     |
| 3      | -     | +                | -     | +     | +     | +                | -     | -     | +     |
| 4      | -     | +                | +     | +     | +     | +                | -     | -     | +     |
| 5      | -     | +                | +     | +     | +     | +                | -     | -     | +     |
| 6      | +     | +                | +     | +     | +     | +                | ±     | +     | +     |
| 7      | +     | +                | -     | +     | +     | +                | +     | +     | +     |
| 8      | +     | +                | -     | +     | +     | +                | +     | +     | +     |
| 9      | +     | +                | +     | +     | +     | +                | +     | +     | +     |
| 10     | -     | +                | -     | +     | +     | +                | +     | +     | +     |
| 11     | +     | +                | +     | +     | +     | +                | ±     | +     | +     |
| 12     | +     | +                | -     | +     | +     | +                | -     | +     | +     |
| 13     | +     | +                | +     | +     | +     | +                | +     | +     | +     |
| 14     | +     | +                | -     | +     | +     | +                | -     | +     | +     |

### 3.2 マウス血清を用いたラテックス凝集反応の評価

はじめに、マウス血清を用いてLATの検討を行った。陽性血清としてPRRSV Nタンパク質により免疫したマウス血清を、陰性血清としてPRRSVのGP5の細胞外領域ペプチドにより免疫したマウス血清をそれぞれ3検体ずつ用いた。その結果、LAT-1から-4すべての系において陽性血清では凝集が見られ、陰性血清では凝集が見られなかった (Table 1)。これらのことから、我々の作成したLATはPRRSVのNタンパク質を特異的に検出できる系であると考えられる。また凝集

は遅くとも5分以内に見られ、極めて迅速な判断が可能であった。

### 3.3 豚血清を用いたラテックス凝集反応の評価

次に6検体のELISA陽性野豚血清、6検体のELISA陰性野豚血清を用いてLATの検討を行った。血清とラテックスビーズを直接混合した場合、LAT-1から-4までのすべてのLATにおいて、非特異的の反応が観察されたため、dilution bufferによる血清の前処理を行った。その結果、非特異的の反応が著しく解消され、LAT-3においてELISAとほぼ一致する結果が得られた (Table

2) が、ELISA陰性にて凝集の見られる検体が1つ見られた。この検体に関してはELISAでは陰性であるものの、他の陰性血清と比べて高い吸光度を示しており、ELISAでは検出できないレベルの抗体が存在する可能性は否定できない。今後、免疫蛍光抗体法やウエスタンブロット法などによる検討が必要である。以上のことから、豚血清においてLAT-3は抗Nタンパク質抗体の検出に使用可能であると考えられた。また豚血清においても、凝集は遅くとも5分以内に見られ、極めて迅速な判断が可能であった。今後はより多検体を検査し、感度、特異度などをELISAと比較する必要がある。

#### 4. 要 約

本研究は、より簡便な豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス (PRRSV) の抗体検出法であるラテックス凝集反応 (LAT) の開発を目的として行った。

抗原として大腸菌において発現・精製した組換えヌクレオカプシド (N) タンパク質を用いたLATを作成した。はじめにNタンパク質において免疫したマウス血清を用いてLATの評価を

行った結果、市販のELISAキットと同様の結果が得られた。次に野外豚血清を用いたLATを行ったが、血清とラテックスビーズを直接混合した場合、多くの検体で非特異的凝集が観察された。しかし、ブロッキング剤の検討と血清の前処理により非特異的凝集は解消され、ELISAとほぼ同じ結果を得た。我々の開発したLATは血清の前処理を含めて40分以内に結果が得られるにもかかわらず、市販のELISAに近い結果が得られており、今後PRRS対策における有用なツールとなる可能性を秘めている。今後さらに検体数を増やして検討を行うとともに、タンパク質精製、ブロッキングなどの改良を行い、市販のELISAの代替となる簡便な抗体検出系を目指す。

#### 文 献

- 1) 山根逸郎, 日本獣医師会雑誌, **63**, 413~416, 2010.
- 2) Yu, Z., Jin, M., Xu, X., Zhang, R., Zhou, H., Hu, Q., Wu, H., Qin, B., Tan, Y., Chen, H. *Avian Dis.*, **50**, 264~268, 2006.
- 3) Horie, M., Ogawa, H., Yamada, K., Hara, A., Bui, V.N., Awad, S.S., Yoshikawa, R., Mase, M., Tsukamoto, K., Yamaguchi, S., Nakamura, K., Imai, K., *J Virol Methods*, **161**, 259~264, 2009.



## 新規増殖因子を用いた牛・豚精子幹細胞の 純化・培養技術の開発

Development of porcine/bovine germline stem cell technology using novel  
growth factor

高 島 誠 司  
(信州大学繊維学部)

Seiji Takashima  
(Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University)

Spermatogonial stem cells are foundation of male germ cell system. In 2003, cultured spermatogonial stem cell, germline stem (GS) cells were established from immature mouse testis. In the presence of glial cell line-derived neurotrophic factor, GS cells proliferated stably with undifferentiated characteristics for more than two years and restored fertility to infertile W/W<sup>v</sup> recipient mice following transplantation into seminiferous tubule. In addition, GS cells are available for gene modification of mice and rats, suggesting the benefit of livestock-derived GS cell for livestock improvement. However, establishment of bovine-/pig-derived GS cells remain to be archived. Main bottleneck is higher proliferative activity of their testis somatic cells. Moreover, population of spermatogonia in their testis is smaller than that of rodents. These data suggests that it is essential to exclude the testis somatic cells from the culture of bovine-/pig-GS cells.

In this study, we tried to identify the cell surface markers for bovine-/pig-spermatogonia. In addition, we also improved the method for enzymatic digestion of bovine-/pig-testis to obtain spermatogonia enriched-testis single cells. We assessed the capability of antibodies reactive for mouse spermatogonia and found that ITGA6 is suitable marker for both bovine and pig spermatogonia. Intracellular proteins, DDX4 and UCHL1 were also applicable to identify their spermatogonia. In the enzymatic digestion, although collagenase type IV, suitable for digestion of murine testis stroma, did not digest bovine-/pig-testis stroma, we found that collagenase type II and Liberase TL (mixture of collagenase and low concentration of thermolysin) were effective.

### 1. 目 的

繁殖工学技術は、優良家畜の大量生産に大きく貢献している。この中心を担っているのがメスの生殖細胞、つまり卵子を標的とした操作技術であ

る。この技術は1960年代から発展した卵子・初期胚の培養・操作技術を基盤としているが、卵子自体が増殖しない細胞である点で、今後の技術革新が頭打ちになる可能性がある。繁殖工学をさらに発展させるには、大きなパラダイムシフトが必要

である。

申請者はこれまで、オスの生殖細胞「精子幹細胞」をターゲットとしたまったく新しい繁殖工学技術の開発を行ってきた。精子幹細胞は精巣の精細管の最外側に局在し、個体の生涯にわたり精子を作り続ける、いわば精子の元となる細胞である。この細胞は、自己複製促進因子Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) の存在下、試験管内で2年以上の長期にわたり増殖させることが可能である<sup>1)</sup>。そしてその細胞を再び精巣内へ移植すると、生着し、精子形成を再開、子孫を作製することが可能である。この技術はこれまでに、マウス・ラット・ハムスターで確立されている<sup>1-3)</sup>。申請者はこの精子幹細胞操作技術をより大型の家畜である牛・豚へ展開することを試みてきた。

しかしながら、現在のところこうした試みは成功には至っていない。GDNFは精子幹細胞の増殖に必須であり、この因子によりげっ歯類の精子幹細胞培養が可能になった。しかしながらこの因子は大型家畜の精子幹細胞を増殖させることはできなかった。つまり、大型家畜精子幹細胞を試験管内で増殖させるには、GDNFに代わる新規自己複製因子の同定が必須であった。

申請者らは、上記研究と同時並行で、マウス精子幹細胞の自己複製メカニズムの解析を進めてきた。その研究過程で、GDNF非存在下で試験管内の精子幹細胞がどのくらいの期間生存できるかを検討したところ、2週間以上にわたって生存し、速度は遅いものの対数増殖を示すことを見出した。この現象を誘導していたのは培地添加物に含まれていたFGF 2であった<sup>4)</sup>。この発見は、「精子幹細胞の自己複製にはGDNFが必須である」という10年以上にわたり信じられてきた定説を覆すものであった。

こうした背景から申請者は、自身が発見した自

己複製因子FGF 2を用い、これまで成功例のない豚および牛の精子幹細胞の純化・培養法の確立を目的とし、研究を進めている。今回の報告では、牛・豚精巣より精子幹細胞を識別するための細胞表面マーカー探索と、牛・豚精巣から間質組織を消化し精細管を回収しさらに精細管由来のシングルセルを得るための精巣組織酵素処理条件検討を行った。

## 2. 方法

### 2.1 精巣材料の入手

牛・豚精巣は長野県畜産試験場にて去勢により摘出されたものを譲渡していただき研究に供した。牛は5ヶ月齢黒毛和種のもの、豚は大ヨークシャー種とランドレース種のF1の4週齢および8週齢のものを使用した。譲渡された検体は、氷上で維持したまま研究室まで運搬し、PBS (-) で血液などを洗浄した後各種実験に使用した。

### 2.2 牛・豚精子幹細胞純化のためのマーカー探索

牛・豚精巣組織を5mm四方形程度の立方体に切り出し、4%パラホルムアルデヒドにて4℃、一晚かけて固定した。次に30%シヨ糖溶液にて4℃、一晚かけて凍結保護した後OCTコンパウンドに包埋し、クリオスタットで10μmの凍結切片を作成した。蛍光免疫染色については、上記方法で作成した切片よりOCTコンパウンドをPBS (-) にて洗い流し、0.1% TritonX-100で透過処理を行った後、一次抗体反応を行った。使用した抗体はTable 1に記す。抗体反応は4℃で一晩行い、洗浄後二次抗体反応により可視化した。染色後は50%グリセロール-PBS (-) に2μg/ml Hoechst33342を加えた溶液で封入し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

### 2.3 牛・豚精巣からシングルセルを得るための条件検討

牛・豚精巣はマウス精巣と異なり間質が豊富である。このため、マウス精巣細胞を単離するとき用いるCollagenase type IVを用いても、間質を除去した精細管を得ることができなかった。そこで、精細管の形態を維持したまま間質を優先的に消化可能なコラゲナーゼの探索を行った。

Collagenase type IIおよびtype IV (Sigma) は2 mg/mlでHBSS (+) に溶解し、0.4  $\mu$  mシリンジフィルターで濾過滅菌して使用した。リベラーゼDL, DH, TL, TM, TH (Roche) はそれぞれ250  $\mu$  g/mlでHBSS (+) に溶解し使用した。

精巣組織は鋭利なはさみで2 mm角程度の大きさに細切し、上記組成の消化酵素で37℃, 15分酵素反応を行った。得られた精細管は300号のナイロンメッシュで回収し、さらに0.25%トリプシン・1 mM EDTAで消化することで精細管をシングルセルにした。

## 3. 結果と考察

### 3.1 牛・豚精子幹細胞純化のためのマーカー探索

申請者らはこれまでの検討で、ITGA6, CD9, EPCAM, GFRA1, CDH1, M-CAMをマウス精子幹細胞の表面分子マーカーとして同定してきた<sup>4-8)</sup>。これらの表面抗原のうち、ITGA6, GFRA1, CDH1について牛・豚精巣組織の免疫蛍光染色を行い、精子幹細胞マーカーとしての可能性を検証した。加えて、精子幹細胞表面に特異的な糖鎖を標識するレクチンのスクリーニングも同様の方法で行った。また、精子幹細胞に発現する細胞内分子PLZF, PGP9.5, DDX4, およびセルトリ細胞特異的に発現するGATA4, ASGR1についても検討を行った (Table 1)。

まず精子幹細胞表面マーカーについては、

CDH1, GFRA1 はそれぞれ2種類の抗体を用いて検証したが、精原細胞 (精細管の最外側に位置する生殖細胞で、精子幹細胞を含む) を特異的に

Table 1 Summary of Immuno-/lectin-staining.

| Marker                                      | Bovine<br>4.5 months<br>old | Pig<br>12 weeks<br>old |                    |
|---|-----------------------------|------------------------|--------------------|
| ConA  | ×                           | ×                      |                    |
| DBA   | Gonia                       | Gonia                  |                    |
| DSL   | ×                           | ×                      |                    |
| ECL   | ×                           | ×                      |                    |
| GSL1  | ×                           | ×                      |                    |
| GSL2  | ×                           | ×                      |                    |
| Jacalin                                     | ×                           | ×                      |                    |
| LCA   | ×                           | ×                      |                    |
| LEL   | Gonia                       | ×                      |                    |
| PHA-E                                       | ×                           | ×                      |                    |
| PHA-L                                       | ×                           | ×                      |                    |
| PNA   | ×                           | ×                      |                    |
| PSA   | ×                           | ×                      |                    |
| RCA120                                      | Gonia                       | ×                      |                    |
| SBA   | ×                           | ×                      |                    |
| SJA   | ×                           | ×                      |                    |
| STL   | ×                           | ×                      |                    |
| sWGA  | ×                           | ×                      |                    |
| UEA   | ×                           | ×                      |                    |
| VVA   | ×                           | ×                      |                    |
| WGA   | ×                           | ×                      |                    |
| Goat<br>GFRA1                               | ×                           | ×                      |                    |
| Mouse<br>GFRA1                              | ×                           | ×                      |                    |
| Spermatogonial<br>marker<br>(cell surface)  | ITGA6                       | "Gonia<br>Sertoli"     | "Gonia<br>Sertoli" |
|   | Rabbit Ecad<br>(24E1)       | ×                      | ×                  |
|   | Rat Ecad<br>(ECCD2)         | ×                      | ×                  |
| Spermatogonial<br>marker<br>(intracellular) | UCLH1                       | Gonia                  | Gonia              |
|   | DDX4                        | Gonia                  | Gonia              |
|   | PLZF                        | Gonia                  | ×                  |
| Sertoli marker                              | ASGR1                       | Sertoli                | ×                  |
|   | GATA4                       | Sertoli                | Sertoli            |

× : non-specific staining

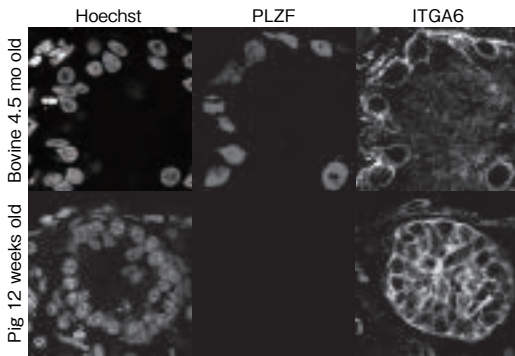


Fig. 1 Immunofluorescent staining for Bovine/Pig testis with PLZF and ITGA6 antibodies. Although anti-PLZF antibody reacted only with bovine spermatogonia, anti-ITGA6 antibody reacted with both spermatogonia.

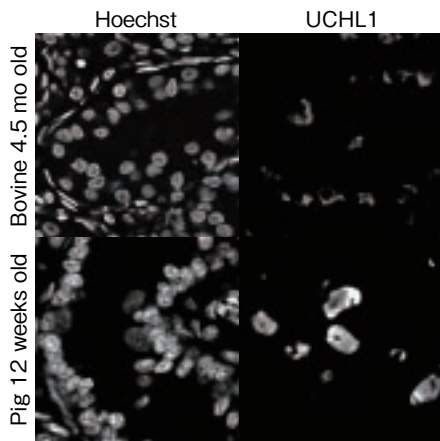


Fig. 2 Immunofluorescent staining for Bovine/Pig testis with UCHL1 antibody. Both spermatogonia were positive for UCHL1.

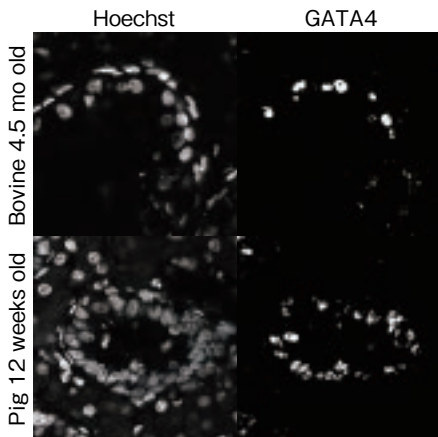


Fig. 3 Immunofluorescent staining for Bovine/Pig testis with GATA4 antibody. Both Sertoli cells were positive for GATA4.

染色することはできなかった。一方ITGA 6は牛・豚双方の精原細胞とセルトリ細胞を認識することが確認された (Fig. 1)。次に、すべての分化段階のマウス生殖細胞に発現するDDX 4, 精原細胞を染色するPLZF, およびヒト精原細胞を染色するUCHL 1の抗体を用いた場合、いずれの抗体も精原細胞を特異的に染色することができた (UCHL 1染色: Fig. 2)。加えて、マウスセルトリ細胞を認識するGATA 4, ヒトセルトリ細胞特異的に発現するASGR 1についても検討を行ったが、GATA 4が牛・豚セルトリ細胞の核を染色し、ASGR 1については特異的な染色像はみられなかった (GATA 4染色: Fig. 3)。さらに、精原細胞表面の糖鎖を特異的に認識する糖鎖のスクリーニングも行った。牛・豚精原細胞はレクチンであるDBAに反応することが知られていたが、未解析のレクチンも存在していた。本研究では入手可能な21のレクチンについて検証を行った。結果としてDBA以外のレクチンは精原細胞特異的な反応は示さなかった (Data not shown)。

以上の結果から、抗ITGA 6抗体およびDBAが精子幹細胞を標識するうえで有用である可能性が示された。これらは第一に、MACSやFACSを用いた精子幹細胞純化に応用できる。加えてこれらを蛍光標識し培地に加えることにより細胞を生きたまま識別できる、つまりライブイメージングが可能になると考えられる。また、牛・豚精原細胞を識別できるPGP9.5, DDX4, PLZFは細胞表面マーカーではないためライブイメージングや細胞純化には応用できないが、Western blotや免疫染色により精原細胞か否かを判別するのに有用であり、同様にGATA 4はセルトリ細胞か否かを判別するのに使用可能である。

牛・豚精子幹細胞は未だ培養に成功した例がないため、光学顕微鏡で培養細胞が精子幹細胞か否かを判別することはできない。本研究成果を生か

し精子幹細胞の純化法とライブイメージング手法が確立できれば、牛・豚精子幹細胞の試験管内培養法確立の一助となると考えられる。

### 3.2 牛・豚精巣からシングルセルを得るための条件検討

牛・豚精巣はマウス精巣と異なり間質が豊富である。このため、マウス精巣細胞を単離するとき用いるCollagenase type IVを用いても、間質を除去した精細管を得ることができなかった。そこで、精細管の形態を維持したまま間質を優先的に消化可能なコラゲナーゼの探索を行った。検証したコラゲナーゼはSigmaのCollagenase type II、およびRocheのリベラーゼDL, DH, TL, TM, THである。そして4週齢豚精巣を検証に用いた。

豚精巣組織を上記酵素で37℃・15分間処理した結果、Collagenase type II、およびリベラーゼTLにより、豚精巣間質が消化されることを確認した。酵素処理後にナイロンメッシュ(#300)を用いることで、効率よく消化された間質・間質細胞と、精細管組織を分別できることも確認された。さらに得られた精細管は37℃・1分のトリプシン・EDTA処理により容易にシングルセルにすることが可能であった。

2.2において精子幹細胞を標識可能な抗体・レクチンを同定したが、これらを用いて細胞を純化しライブイメージングに持ち込むには精巣から効率よくシングルセルを調製する必要があったが、申請者がマウスで適用していた方法では牛・豚精巣の間質を消化し精細管を単離することができなかった。今回の検討により、牛・豚精巣から精細管を単離し、さらにそこからシングルセルを調製することに成功した。

今後、2.3の手法でシングルセルを調製するとともに、2.2の手法を発展させ精子幹細胞の純化、ライブイメージング法を確立し、これらを活用して精子幹細胞の試験管内培養法の確立を目指す。

## 4. 要 約

本研究では、有用家畜である牛・豚精巣より精子幹細胞を樹立するための基礎技術として、①精子幹細胞を標識するマーカーのスクリーニング、②牛・豚精巣細胞を調製するための酵素処理条件の検討を行った。結果として、抗ITGA 6抗体、およびDBAレクチンが牛・豚精子幹細胞標識に有用であること、Collagenase type IIおよびリベラーゼTLが豚精巣からシングルセルを調製するのに有用であることを突き止めた。今後、これらの基礎技術を組み合わせ、精子幹細胞の純化法、ライブイメージング法の確立と、それらを応用した精子幹細胞の試験管内培養法の開発を進めたい。

## 文 献

- 1) Kanatsu-Shinohara, et al., *Biol. Reprod.*, **69**, 612 ~ 616, 2003.
- 2) Kanatsu-Shinohara, et al., *Biol. Reprod.*, **78**, 611 ~ 617, 2008.
- 3) Kanatsu-Shinohara, et al., *Biol. Reprod.*, **85**, 208 ~ 217, 2011.
- 4) Takashima, et al., *Stem Cell Reports*, **4**, 489 ~ 502, 2015.
- 5) Shinohara, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8346~8351, 2000.
- 6) Kanatsu-Shinohara, et al., *Biol. Reprod.*, **70**, 70 ~ 75, 2004.
- 7) Kanatsu-Shinohara, et al., *PLoS One*, **6**, e23663, 2011.
- 8) Kanatsu-Shinohara, et al., *Biol. Reprod.*, **87**, 139, 2012.

## 肥育前雌子牛の摘出卵巣からの胚生産の試み

Production of embryos using growing oocytes derived from the ovaries removed bovine calves before fattening

的 場 理 子・平 尾 雄 二・武 田 久 美 子  
(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所)

Satoko Matoba, Yuji Hirao and Kumiko Takeda  
(NARO Institute of Livestock and Grassland Science)

The aim of this study was to investigate if the production of embryos using growing oocytes collected from the ovaries from calves just before fattening (approximately 9-month-old) is beneficial for the rescue of them as genetic resources. Immature oocytes with normal size, approximately 120  $\mu\text{m}$  in diameter, were selected after aspiration of follicles on the calf ovaries (IM oocytes as IM group), matured (IVM) for 22-23 hours (h), fertilized (IVF) for 6 h and cultured (IVC) for 9 days *in vitro*. Growing oocytes with small size, approximately 100  $\mu\text{m}$  in diameter, were collected from dissected follicles of less than 1 mm in diameter and subjected to *in vitro* growing culture on the membrane inserts in several candidates' media for 14 days (IVG oocytes as IVG group). IM and IVG oocytes were subjected to IVM-IVF-IVC. Tentative embryos in both groups were cultured in the individual isolated microwell in culture dishes. Embryos developed to the blastocyst stage in the IM group were lower than those produced from cow ovaries from a local abattoir. When newly developed medium supplemented with supplementation was used for *in vitro* growth culture of growing oocytes from calf ovaries for 14 days, IVG oocytes showed increased diameter, volume and mitochondrial DNA copy compared with those cultured without the supplementation. Blastocyst formation was observed in the IVG group. Total number of blastocysts derived from all the oocytes combined with the IM and IVG groups was 4.3 embryos per head per session when new developed medium was used for *in vitro* growth culture. In conclusion, our approach suggested the double benefits of embryo production after IVM-IVF using both grown oocytes and growing oocytes collected from the same ovaries removed from calves before fattening. However, further study is required to improve embryo development and confirm developmental competence of produced embryos following transfer to the recipient cow.

### 1. 目 的

肉用牛，特に黒毛和種の雌牛の肥育において

は，しばしば飼養管理のしやすさから子牛の段階で肥育前に去勢（卵巣を摘出）されている。摘出された卵巣の多くが現在は廃棄されているため，

これらの廃棄卵巣を利用することができれば、血統の明らかな雌牛の後代を生産することが可能となる。体外受精で用いる卵子は、少数で培養すると発生率が低いことが知られており<sup>1)</sup>、発生率を高めるために多数の胚を集合培養することが一般的である。しかし、摘出卵巣からの卵子採取は1回限りであるため、1頭（卵巣は1頭あたり2個）あたりの採取卵子数が少ない場合の発生率の向上が欠かせない。また、性成熟に達していない若齢牛の未熟な卵巣から得られる卵子は既存の体外受精・培養法では発生率が低いという報告がある<sup>2)</sup>。

我々は、すでに少数の卵子においても、体外培養における発生能を最大限引き出せる個別識別可能な個別卵子・胚培養システムを開発している<sup>3)</sup>。さらに、若齢牛の未熟な卵巣には、成牛の成熟した卵巣に比べて多数の発育途上の卵胞を含む様々な直径の卵胞があり、それらの卵胞には様々な直径の卵子や発育途上の卵母細胞が存在している。これら卵胞卵子や発育途上の卵母細胞を廃棄せず利用できれば、体外受精に用いる通常サイズの卵子（直径約120  $\mu$ m）と合わせて雌子牛1頭から数多くの卵子を活用できる。また、今までに我々は、成牛から採取した直径約100  $\mu$ mの中型卵母細胞の長期培養によって体外受精に用いることが可能な成熟卵子を得る技術を確認しており<sup>4)</sup>、これらの発育途上の卵母細胞由来の子牛生産を可能としている<sup>5)</sup>。

そこで、本研究では、体外受精に用いる通常サイズの卵子の培養技術および発育途上の中型卵母細胞の体外受精発育技術を統合することにより、若齢牛の卵巣を「新たな牛卵子資源」として最大限有効利用することを目的とした。また、卵子に数多く含まれているmtDNAは卵子や体外発育卵母細胞の1個1個の正常性を体外受精前に評価することが可能<sup>6)</sup>と考えられることから、生産され

た卵子について、卵細胞質の成熟度を、ミトコンドリアDNAコピー数を指標として体内で発育した卵子と同等であるか否かを検証した。

## 2. 方法

### 2.1 若齢牛由来の卵子からの胚生産の検討

民間農場で飼養されている黒毛和種の若齢雌子牛（約9か月齢）から摘出された卵巣を、現地から実験室まで約5時間輸送して用いた。輸送後、直ちに通常サイズの卵子の採取を始め、体外成熟培養を輸送後から約1時間後に開始した。これらの卵巣の直径2～6mmの卵胞から吸引採取した直径約120  $\mu$ mの未成熟卵子（通常サイズの卵子、IM oocytes区）と卵丘細胞の複合体に、既報<sup>7)</sup>のとおり体外成熟、体外受精および体外発生培養を実施した。すなわち、体外成熟は、5%新生子牛血清（NBS）と0.02AU/ml FSH添加TCM199を用い、22～23時間の培養により行った。体外受精には、黒毛和種雄牛の凍結精液を融解して用いた。成熟卵子は、90%パーコール密度勾配液で夾雑物を分離したのちにIVF100（機能性ペプチド研究所）を用いて最終濃度を $3 \times 10^6$ 精子/mlに調整した精子と6時間媒精した。体外成熟と体外受精は、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>および95%空気の加湿気相下で行った。媒精後、卵子を裸化し、5%NBSと0.25mg/mlリノール酸アルブミン添加CR1aaを用い、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>および90%N<sub>2</sub>の加湿気相下で9日間の体外発生培養を実施した。発生培養には、個別識別培養皿<sup>8)</sup>を用い、卵子の発生能の検証と胚の生産性について、媒精後7～9日目の胚盤胞期胚への発生成績により検討した。

### 2.2 若齢牛由来の卵母細胞からの胚生産の検討

通常サイズの卵子採取後に発育途上の卵母細胞の採取を開始し、その体外発育培養を輸送後から

約5時間後に開始した。発育途上卵母細胞の採取と体外発育培養および成熟培養は既報<sup>4)</sup>に従った。すなわち、2.1で卵胞吸引後の卵巣表面の皮質を薄く切り出し、直径1mm未満の卵胞を2mMグルタチオン、5mMタウリン、1mMアスコルビン酸2グルコシド(AA2G)および2mMジメチルウレアを添加したMEM中に採取した。得られた卵胞を1mMピルビン酸ナトリウム、3mMグルタチオン、5mMタウリン、1mM AA2G、20mg/mlポリビニルピロリドン(PVP)添加MEM中で切開して直径約100 $\mu$ mの発育途上卵母細胞(IVG oocytes区)と顆粒膜細胞の複合体を採取し、14日間の体外発育培養を実施して卵母細胞を発育させた。体外発育培養の基本培養液には、市販のTCM199あるいはMEM- $\alpha$ に5%ウシ胎子血清(FBS)、4mMヒポキサンチンおよび4%ポリビニルピロリドンを添加して使用した。さらに、抗酸化物質、ホルモン、グルココルチコイド等の混合物を3種類の組み合わせで作成し、基本培養液に添加してそれぞれ培養液I、培養液II、培養液IIIとした。体外発育培養は、これらの培養液を入れたセルカルチャーインサート上で、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>および90%N<sub>2</sub>の加湿気相下で行った。卵母細胞の直径を培養開始後1日(Day 1)および培養14日後(Day14)に測定し、その数値をもとに体積を計算して培養の前後で比較した。体外発育培養後の卵子の体外成熟は、200 $\mu$ M AA2G、1mMピルビン酸ナトリウム、0.55mMシステイン、100ng/ml FSH、500ng/ml LH、10 ng/ml EGF、5%FBS添加TCM199を用い、通常サイズの卵子と同気相下で同時間の培養により行った。また、成熟卵子の体外受精および体外発生培養は、通常サイズの卵子と同様とした。これら発育途上の卵母細胞の体外発育培養により、体外受精可能な成熟卵子の生産や、その後の体外受精による卵子の胚の生産性を検討した。

### 2.3 作成卵子の分子レベルの正常性の検討

直径約100 $\mu$ mの卵母細胞を異なる抗酸化物質、ホルモン、グルココルチコイド等の混合物を添加した培養液で2週間体外培養した。実験は2回実施し、それぞれ異なる種類の混合物を未添加の区(S1)および添加区(S2)とした。発育した成熟卵子(IVG-IVM)の一部を卵丘細胞除去後、PVPを添加したPBS-で洗浄し、個別の卵子ごとにDNA抽出キット(QIAamp DNA micro Kit, Qiagen)を用いてDNAを抽出した(S1;n=3, S2;n=4)。卵子1個あたりのミトコンドリアDNA(mtDNA)のコピー数の計測は、Cyclooxygenase-1(COX1)およびCytochrome B(CYTB)遺伝子をターゲットとしたリアルタイムPCR(LightCycler 1.5, Roche)により既報<sup>6)</sup>に従って行った。mtDNAコピー数のコントロールとして、食肉処理場から採取した成牛卵巣由来体外成熟卵子(IVM)を用いた(S1;n=3, S2;n=4)。

### 3. 結果と考察

通常サイズの卵子において、卵丘細胞層が複数または1層以上卵子周囲に付着した卵丘卵子複合体が体外受精に利用可能であり、1頭あたり平均11.0個の体外受精可能卵子が採取できた。最近、9か月齢の子牛に経膈採卵を実施した場合、平均採取卵子数は11.7個であったとの報告<sup>2)</sup>があり、本研究で使用した約9か月齢から採取した卵子数と同等であった。採取卵子数は卵巣サイズに依存しており、性成熟前後の時期の子牛から得た卵巣を用いる場合、通常サイズの卵子採取数の大幅な向上を望むことは困難であると考えられる。通常サイズの卵子から発生した胚盤胞をFig. 1Aに示した。これらの卵子の胚盤胞期胚への発生率は実験回次によりバラツキが大きく、通常我々が食肉処理場由来の成牛卵巣の卵胞から採取した卵子に



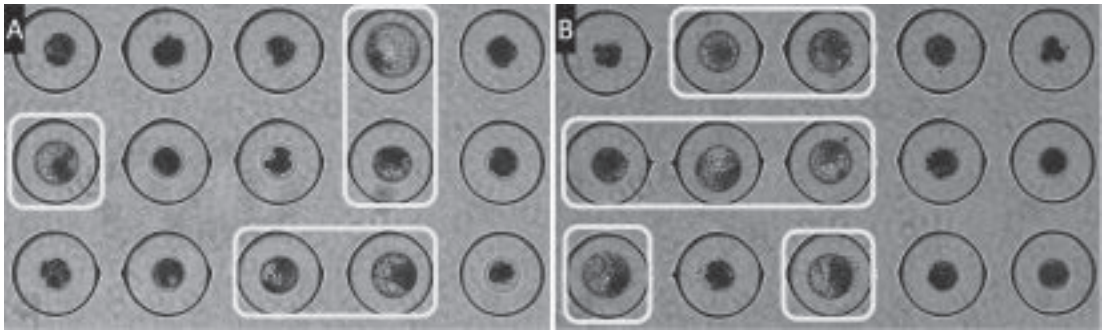


Fig. 1 Representative images of the Day 7 embryos in individual microwells of culture dishes (Day 0 = IVF). Embryos were derived from immature oocytes of approximately 120 μm (A) and 100 μm in diameter after *in vitro* growth culture (B), respectively. Note that □ indicate embryos developed to the blastocyst stage. The diameter of each microwell was 287 μm.

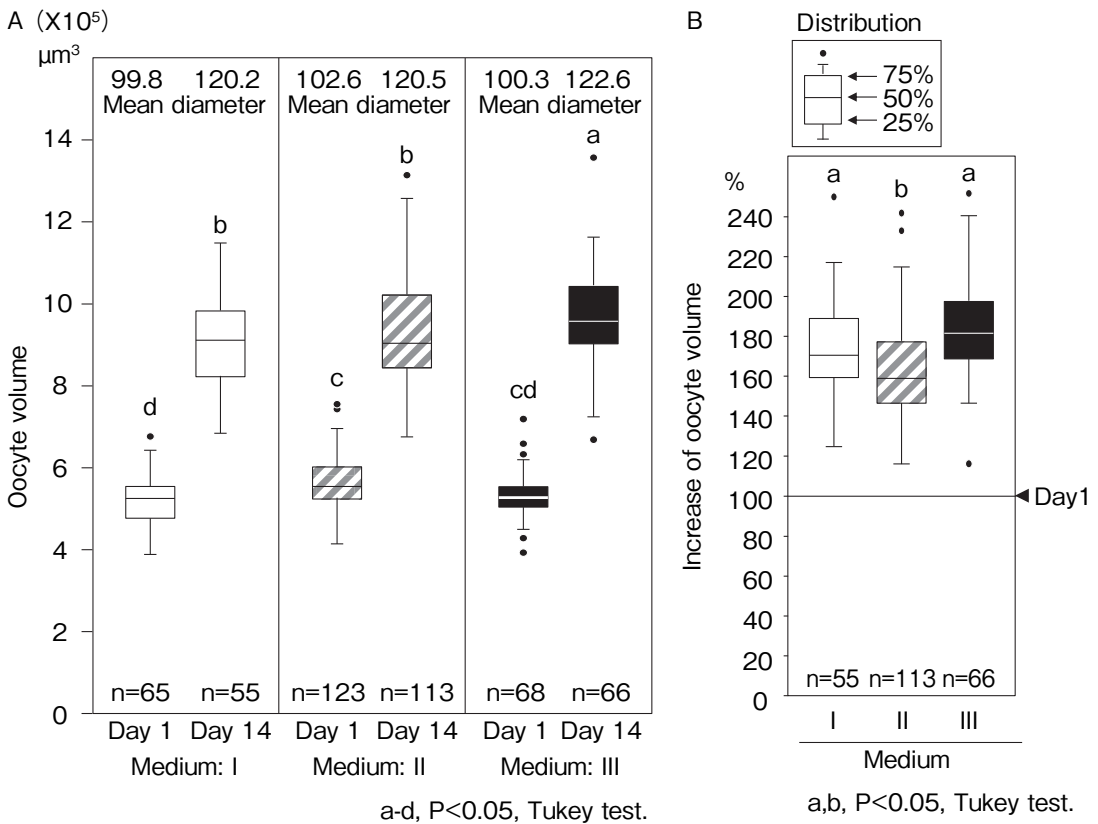


Fig. 2 *In vitro* growth of oocytes after isolation from calf ovaries. A) Increase of oocyte volume between Day 1 and Day 14 of culture. Three different types of media (I, II, and III) were used for culture of oocytes during the 14-day culture period. B) The volume gained between Day 1 and Day 14. The volume on Day 1 was designated 100%. When the type III medium was used, the increase of oocyte volume was the largest, resulting in a 1.8-fold increase.

比べて低率であった。Mullaartら<sup>2)</sup>らは、性成熟後の9~10か月齢の子牛の胚盤胞期への発生率は14.6%であったと報告している。これは1頭あた

りの生産胚数が1回あたり平均約1個であることを示している。本研究に使用した卵巣の由来には、性成熟に達した個体と達していない個体が混

在しており、性成熟の前か後かの時期別による胚発生能力の違いを検証する必要があると考えられた。

発育途上卵母細胞の直径と体積変化をFig. 2に示した。採取後1日目の直径は平均 $100\mu\text{m}$ （範囲 $99.8\sim 102.6\mu\text{m}$ ）であった。基本培養液に、異なる抗酸化物質、ホルモン、グルココルチコイド等の混合物を添加した培養液Ⅲで体外発育培養した場合、平均直径は生体内での最大直径である約 $125\mu\text{m}$ に近い $122\mu\text{m}$ に達し、その体積は80%の増大が認められた。さらに、卵母細胞周囲の顆粒膜細胞によるドームの形成や卵母細胞の成熟に伴う卵丘細胞の膨潤化も正常であった。これらの一部の卵子について調べた結果、体外成熟、体外受精および胚発生も部分的に可能であった。生産した胚盤胞はFig. 1Bのとおりであった。生体内では卵母細胞はその発育期終了直前の約2週間で、胚発生に必要な分子を内部に蓄える。本研究において、開発した体外発育培養用の培養液を用いることにより、体外で14日間発育した卵母細胞においても、直径や体積の増大だけでなく、胚に発生するための変化が正常に進行していたものと考えられる。

発育途上の卵母細胞から作成した卵子の体外成熟後の正常性の検討において、混合物を添加していないS1区では体外発育培養後の卵子の平均直径と体積の増大が認められず、mtDNAコピー数においても少ない結果となった（ $P < 0.01$ , Fig. 3）。一方、混合物を添加したS2区では体外発育培養後の卵子の平均直径と体積が増大し、mtDNAコピー数においても成牛のそれと同等であった（ $P > 0.05$ , Fig. 3）。これらの結果から、体外発育培養液に添加する血清および酸化防止剤の種類は卵子の正常性にも影響することが認められた。血清中には多種類の成長因子やステロイドホルモンが含まれていることから、それらの濃度が

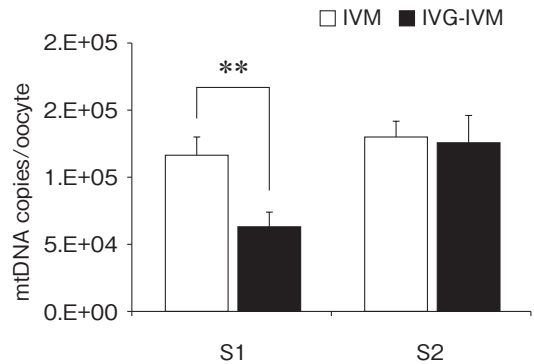


Fig. 3 Mitochondrial DNA (mtDNA) copy number per *in vitro* matured oocyte in IVG oocytes was analyzed by *COX1* gene. *In vitro* growth media without (S1) and with the newly supplementation (S2) were used for *in vitro* growth culture of IVG oocytes (IVG-IVM group). The IVM group indicates *in vitro* matured oocytes from cow ovaries obtained from a local abattoir. \*\*: Significant difference was shown between them ( $P < 0.01$ , *t*-test).

異なることにより、顆粒膜細胞の増殖や機能に違いが生まれ、その結果として卵子の正常性に影響が及ぶものと考えられる。これらの結果から、小型卵母細胞は体外培養をすることにより、食肉処理場由来の成牛の通常卵子と同等にmtDNAコピー数が増幅することが明らかとなった。

以上の結果から、通常サイズの卵子および発育途上の卵母細胞のどちらにおいても一部は胚生産が可能であり、最新の実験回次では1頭あたり計4.3個の胚生産であったことから、当初の目的は意義のあることが確認された。しかし、胚の生産数にはバラツキがあり、安定していないことが課題として残った。そのために、性成熟に達する前後の時期を分けて胚の生産性を検証するとともに発生率の向上を検討することが必要であると考えられる。また、子牛を生産するためには、生産胚を受胎牛に移植し、正常な受胎性の検証や産子が得られるかについても検討する必要がある。

#### 4. 要 約

本研究では、しばしば肥育前に摘出・廃棄される黒毛和種の若齢雌子牛の卵巣を有効活用するために、卵巣から通常サイズの卵子および発育途上の卵母細胞を採取し、両区から体外培養を経て胚生産を行うことの可能性について検討した。通常サイズの卵子からの胚生産は可能であったが、胚盤胞期胚への発生率にバラツキが大きく安定していなかった。発育途上の卵母細胞においては、体外発育培養に新たな添加剤を含む培養液を用いた場合、卵子の直径、体積、mtDNAコピー数が体内発育卵子と同等となり、卵子の一部は胚盤胞期胚へ発生した。今回開発した体外発育培養方法により、通常卵子と発育途上卵母細胞から1頭あたり4.3個の胚を生産できた。このことから、肥育前に廃棄される若齢子牛の卵巣から、1回限りの卵子採取機会を有効活用して胚生産を行うという本研究の目的は意義があったことが示された。今

後は、胚の発生率の向上や生産胚の移植による受胎性の検討が必要であると考えられる。

#### 文 献

- 1) Carolan, C., Lonergan, P., Khatir, H., Mermillod, P., *Mol Reprod Dev.*, **45**, 145~150, 1996.
- 2) Mulaart, E., Dotinga, F., Flapper, H., van de Brink, A., Pietersma, N., Schouten, J., *Reprod Fertil Dev.*, **27**, 209~210, 2015.
- 3) Matoba, S., Fair, T., Lonergan, P., *Reprod Fertil Dev.*, **22**, 839~851, 2010.
- 4) Hirao Y, Somafai T, Naruse K.: *J Reprod Dev* , **60**, 68~72, 2014.
- 5) Hirao, Y., Naruse, K., Kaneda, M., Somfai, T., Iga, K., Shimizu, M., Akagi, S., Cao, F., Kono, T., Nagai, T., Takenouchi, N., *Biol Reprod*, **89**, 1~11, 2013.
- 6) Takeda, K., Srirattana, K., Matsukawa, K., Akagi, S., Kaneda, M., Tasai, M., Nirasawa, K., Pinkert, C.A., Parnpai, R., Nagai, T., *J Reprod Dev.*, **58**, 323~329, 2012.
- 7) Matoba, S., Yoshioka, H., Matsuda, H., Sugimura, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., Hashiyada, Y., Seta, T., Nakagawa, K., Lonergan, P., Imai, K., *J Dairy Sci.*, **97**, 743~753, 2014.
- 8) Sugimura, S., Akai, T., Somfai, T., Hirayama, M., Aikawa, Y., Ohtake, M., Hattori, H., Kobayashi, S., Hashiyada, Y., Konishi, K., Imai, K., *Biol Reprod*, **83**, 970~978, 2010.

## 生体内卵子吸引・体外受精・胚移植による子豚生産技術の開発

Production of piglets by ovum pick up, in vitro embryo production and embryo transfer

吉岡耕治・的場理子\*

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所・\*畜産草地研究所)

Koji Yoshioka and Satoko Matoba\*

(National Institute of Animal Health, \*NARO institute of Institute of Livestock and Grassland Science, National Agriculture and Food Research Organization)

The objective of this research is to develop a system for piglet production by ovum pick-up (OPU), in vitro production (IVP) of embryos and embryo transfer. Firstly, to establish culture system for a small number of oocytes or embryos, we evaluated the effect of different incubation volumes and culture densities on fertilizing ability and developmental competence in vitro. Porcine oocytes derived from abattoir-obtained ovaries were matured, fertilized and then cultured in vitro as follows: in groups of 50 oocytes in 500  $\mu$ l of medium for in vitro maturation (IVM), 20 oocytes in 100  $\mu$ l of medium for in vitro fertilization (IVF) and 20 embryos in 40  $\mu$ l of medium for in vitro culture (IVC) (Group I); 20 in 100  $\mu$ l for IVM, 20 in 100  $\mu$ l for IVF and 20 in 40  $\mu$ l for IVC (Group II); and 10 in 100  $\mu$ l for IVM, 10 in 100  $\mu$ l for IVF and 10 in 40  $\mu$ l for IVC (Group III). Rates of sperm penetration, cleavage and blastocyst formation did not differ among the groups. Secondly, to increase the collection efficiency of porcine oocytes by transvaginal ultrasound-guided OPU, the effects of aspiration pressure on follicular oocyte collection were assessed. When oocytes were aspirated from ovaries of live sows using 2 different aspiration pressures (80 or 100 mmHg), a number of oocytes recovered in 100 mmHg pressure was significantly higher than in 80 mmHg pressure. Finally, 81 oocytes from 5 donor sows obtained by OPU were subjected to IVP. At 5 days after IVF, 47 transferable embryos at the morula and blastocyst stages (9.4 embryos per session) were produced. When they were transferred into five recipient gilts (5-16 blastocysts per recipient), 3 recipients became pregnant and farrowed a total of 12 live piglets. The present results clearly demonstrate that porcine blastocysts can be produced by OVP-IVP and that they can develop to full term after embryo transfer.

### 1. 目的

豚において、超音波ガイド下で経膈的に生体の

卵巣から卵子を吸引する生体内卵子吸引 (OPU) 技術と卵子を体外で受精させ、非外科的胚移植が可能な胚盤胞期まで発生させる胚の体外生産

(IVP) 技術を活用した胚移植による子豚生産システムを確立することを目的とする。遺伝的能力に優れた雌畜から受精卵(胚)を取り出し、それらの胚を他の雌畜(代理母:レシピエント)の子宮を借りて一時に多数の子畜を生産することのできる胚移植は、生体や精液による移動に比べ、疾病を伝播する可能性は極めて低いことが報告されており、同技術を種豚の導入に利用できれば、伝染病の蔓延を招くことなく優れた種豚の生産や育種改良を行うことができる。しかし、すでに受精卵移植産業として、一定規模の市場を有する牛と異なり、養豚生産農場での胚移植による子豚生産システムは未だ確立されていない。

豚の子宮は長く蛇行しており、子宮頸管はらせん構造を持つため、胚の採取および移植は開腹手術により外科的に行う必要があった。しかし近年、特殊な子宮深部注入用カテーテルを用いて非外科的に胚を移植することにより、子豚が生産できることが報告されており、胚移植については、生産現場で実施可能な技術が確立されつつある。一方、生体からの胚の採取については、現在でも開腹手術による外科的手法に頼らざるをえない状況にある。牛では従来、人工授精後の胚を子宮灌流により回収して、胚移植に利用していたが、OPU-IVP技術の進歩は、1個体から作出できる移植可能な胚盤胞の数を飛躍的に向上させ、胚移植技術のさらなる普及に貢献している。豚においても、OPU-IVPによって胚盤胞を作出することができれば、生体由来の移植胚作出から胚移植に至る工程を、開腹手術を行わず実施することが可能となり、生産現場で利用可能な胚移植を活用した子豚生産システムとして、養豚における受精卵移植産業の形成に大きく貢献する。そこで、OPU-IVPによる胚盤胞の作出と、胚移植による子豚の生産を目指す。

## 2. 方法

### 2.1 体外培養における胚培養密度の検討 (Experiment 1)

食肉処理場から卵巣を得る場合と異なり、OPUでは1個体から採取できる卵子の数は多くないと想定されることから、まず、少数の卵子でもIVPによって効率よく胚盤胞期にまで発生させることのできる培養法を検討するため、胚の体外培養における培養液量や培養密度などの影響を調べた。食肉処理場由来と畜卵巣の卵胞から吸引採取した未成熟卵子は、既報<sup>1)</sup>に従って体外成熟および体外受精した後、胚培養数/培養液量を20個/40 $\mu$ l、10個/40 $\mu$ l、5個/40 $\mu$ l、10個/20 $\mu$ lおよび5個/10 $\mu$ lとして体外培養を行い、体外受精(媒精)後2日目の分割率、5日目の胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数を調べた。

### 2.2 体外成熟および体外受精における卵子培養密度の検討 (Experiment 2)

卵胞から採取した卵子は、Table 1に示す培養密度で体外成熟、体外受精および体外培養を行い、体外受精および体外発生成績を比較した。なお、媒精の最終精子濃度はいずれも $1 \times 10^6$ /mlとした。

### 2.3 食肉処理場由来卵巣を用いたOPUにおける吸引条件の検討 (Experiment 3)

と畜卵巣を用い、OPUに使用する生体内卵子採取針および吸引器によって60、80、100または120mmHgの吸引圧でそれぞれ100個の卵胞を吸引し、回収卵子数を調べるとともに回収卵子の形態を観察し、全体が卵丘細胞に囲まれ正常な形態を示す卵子(Grade A)、卵丘細胞の一部が剥離している卵子(Grade B)、裸化卵子(Grade C)および変性卵子(Grade D)に分類し、その割合を調べた。

Table 1 Culture density of oocytes or embryos in Experiment 2

| Group | Number of oocytes or embryos/volume of culture medium |                        |                  |
|-------|---|------------------------|------------------|
|       | In vitro maturation                                   | In vitro fertilization | In vitro culture |
| I     | 50/500 $\mu$ l  | 20/100 $\mu$ l         | 20/40 $\mu$ l    |
| II    | 20/100 $\mu$ l  | 20/100 $\mu$ l         | 20/40 $\mu$ l    |
| III   | 10/100 $\mu$ l  | 10/100 $\mu$ l         | 10/40 $\mu$ l    |

#### 2.4 OPU における吸引条件の検討 (Experiment 4)

ドナーとしてランドレース, 大ヨークシャー種およびそれらの交雑種経産豚12頭 (29.0 $\pm$ 6.7ヶ月齢, 179.9 $\pm$ 18.6kg) を用いた。黄体退行を誘起し, 同時に卵胞発育を同調させるため, 排卵後8~11日目からジノプロストとして15mgのプロスタグランジン (PG) F<sub>2 $\alpha$</sub>  (パナセランHi, Meiji Seika ファルマ) を1日2回3日間筋肉内に投与し, さらに5回目のPGF<sub>2 $\alpha$</sub> 投与時 (初回PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 投与後3日目) から卵胞刺激ホルモン (アントリン, 共立製薬) 2 AUを1日2回2日間筋肉内に投与した。初回PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 投与後5日目にOPUを実施した。ドナーは移動式ストール内に入れ, 緩衝材などで保定した後, 鎮静剤 (1%メシル酸マホブラジン, マフロパン, DSファーマアニマルヘルス, 5ml 筋肉内), 副交感神経抑制剤 (2%プチルスコポラミン臭化物, ブスコパン, 日本ベーリンガーインゲルハイム, 2ml 静脈内) および局所麻酔剤 (2%リドカイン, キシロカイン2%, アストラゼネカ, 3ml 尾椎硬膜外) を処置した。OPUにはUST-9106P-7.5 (アロカ) を経膈プローブとして用い, 卵子吸引圧は80あるいは100mmHgとした。採取した卵子は形態を観察した後, 体外成熟, 体外受精, 体外培養を行い, 媒精後2日目の分割率, 5日目の胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数を調べた。

#### 2.5 OPU-IVPによる胚生産と胚移植による受胎性の検証 (Experiment 5)

ドナーとして大ヨークシャー種経産豚5頭 (22.1 $\pm$ 0.5ヶ月齢, 159.1 $\pm$ 8.9kg) を用いた。Experiment 4と同様の方法で黄体退行誘起および卵胞発育同調処置を施し, 初回PGF<sub>2 $\alpha$</sub> 投与後5日目にOPUを実施した。OPUにはUST-9106P-7.5あるいはHCV-4710MV (本多電子) を経膈プローブとして用い, 卵子吸引圧は100mmHgとした。採取した卵子は形態を観察した後, 体外成熟, 体外受精, 体外培養を行った。得られた媒精後5日目の桑実胚および胚盤胞は, 発情を同期化した5頭のランドレース種 $\times$ 大ヨークシャー種交雑種未経産豚 (6.9 $\pm$ 0.7ヶ月齢, 99.4 $\pm$ 7.0kg) の子宮内へ外科的に移植した。1頭のドナーから生産された移植胚は, 1頭のレシピエントへ移植し, 受胎促進を目的として移植後6日目のレシピエントにエストラジオールプロピオン酸エステル (オバホルモンデポー, あすか製薬) 10mgを筋肉内投与した。胚移植後20日目に超音波画像診断法による妊娠鑑定を実施し, 妊娠が確認された豚は, 分娩させ, 産子数および産子の体重を計測した。

### 3. 結果と考察

体外成熟および体外受精した後, 胚培養数/培養液量を5個/10 $\mu$ l, 10個/20 $\mu$ l, 5個/40 $\mu$ l, 10個/40 $\mu$ lおよび20個/40 $\mu$ lとして体外培養を行ったところ, 5個/10 $\mu$ lとした場合

の胚盤胞への発生率（6%）は他の区（18~24%）に比べ有意に低かった。また、卵子を50個/500 $\mu$ l, 20個/200 $\mu$ l および10個/100 $\mu$ l として成熟培養を行い、体外受精および体外培養を行ったところ、精子侵入率（56~63%）や正常受精率（34~39%）に差は認められなかった。また、卵割率、胚盤胞への発生率および胚盤胞の細胞数は、グループ間に差を認めなかった（Table 2）。これらのことから、OPUにより10個程度の卵子を回収することができれば、食肉処理場由来の大量の卵子を用いた体外生産系を利用して、同

程度の割合で胚盤胞を作出できると考えられた。

OPUを実施する際の吸引条件についてと畜卵巣を用いて検討したところ、回収卵子率は吸引圧を上げるに従い高くなり（80~91%）、正常な形態を示すGrade Aの卵子の割合は100mmHgとした場合（19%）、60mmHg（9%）に比べ有意に高かった。生体を用いてOPUを実施した場合、1セッションあたり得られた卵子数は、吸引圧80mmHg（13.7個）と比較して100mmHg（21.2個）で有意に多かった（Table 3）。胚盤胞への発生率は両区（26~29%）で差を認めなかった。1セッ

Table 2 Effect of ration of embryo number/medium volume on porcine in vitro embryo development

| Category* | No. of oocytes cultured | No. of cleaved embryos (%) | No. of blastocysts (%) | Cell number in blastocyst <sup>§</sup> |
|-----------|-------------------------|----------------------------|------------------------|--|
| Group I   | 140                     | 74 (52.9)                  | 29 (20.7)              | 48.2±14.7                              |
| Group II  | 140                     | 77 (55.0)                  | 33 (23.6)              | 47.4±20.0                              |
| Group III | 140                     | 78 (55.7)                  | 31 (22.1)              | 47.1±16.7                              |

\*See Table1.

<sup>§</sup>Mean±SD.

Table 3 Effect of aspiration pressure during oocyte harvesting on the recovery and subsequent IVP of embryos

| Aspiration pressure (mmHg) | No. of sessions | No. of oocytes collected [per session]* | No. of oocytes cultured [per session]* | No. of blastocysts [per session]* | Cell number in blastocyst* |
|----------------------------|-----------------|---|--|-----------------------------------|----------------------------|
| 80                         | 6               | 79 [13.7±5.5] <sup>b</sup>              | 75 [12.5±5.8]                          | 22 [3.7±4.3]                      | 51.5±15.1                  |
| 100                        | 6               | 127 [21.2±6.5] <sup>a</sup>             | 111 [18.5±8.0]                         | 29 [4.8±4.5]                      | 61.0±15.7                  |

\*Mean±SD.

<sup>a, b</sup>values with different superscript letters are significantly different ( $P<0.05$ ).

Table 4 Pregnancy results after transfer of porcine embryos derived from oocytes collected by OPU

| Donor ID                                  | No. of oocytes collected | No. of oocytes cultured | No. (%) <sup>*</sup> of blastocysts | No. (%) <sup>*</sup> of transferable embryos | Pregnancy | No. of piglets born (per litter) <sup>§</sup> |
|---|--------------------------|-------------------------|-------------------------------------|--|-----------|---|
| No.147                                    | 14                       | 14                      | 6 (42.9)                            | 8 (57.1)                                     | +         | 6   |
| No.146                                    | 15                       | 14                      | 4 (28.6)                            | 9 (64.3)                                     | -         | -   |
| No.150                                    | 15                       | 14                      | 7 (50.0)                            | 9 (64.3)                                     | -         | -   |
| No.145                                    | 12                       | 11                      | 4 (36.6)                            | 5 (45.5)                                     | +         | 2   |
| No.151                                    | 25                       | 24                      | 13 (54.2)                           | 16 (66.7)                                    | +         | 4   |
| Overall [Number per session] <sup>§</sup> | 81 [16.2±5.0]            | 77 [15.4±5.0]           | 34 (44.2) [6.8±3.7]                 | 47 (61.0) [9.4±4.0]                          | 60%       | 12 (4.0±2.0) [2.4±2.6]                        |

\*Percentage per oocytes cultured.

<sup>§</sup>Mean±SD.

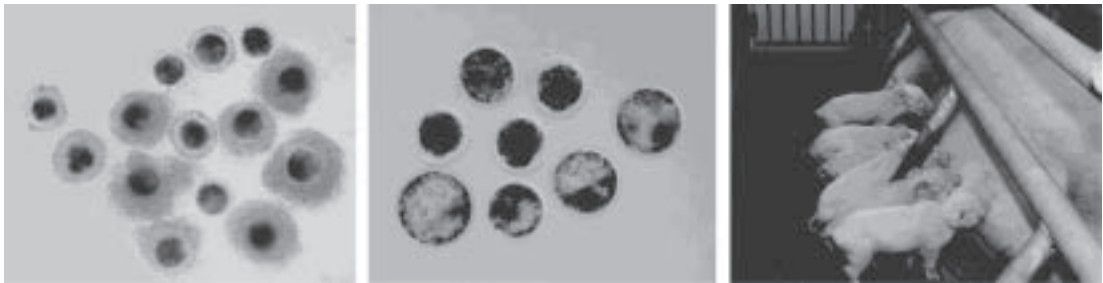


Fig. 1 Oocytes collected from a donor sow by OPU (left panel), transferable IVP embryos derived from the oocytes (center panel) and piglets obtained after transfer of the embryos (right panel).

セッションあたり、それぞれ3.7および4.8個の胚盤胞が得られ、豚のOPUでは100mmHgの吸引圧で卵胞を吸引することが適当であると考えられた。

5頭のドナーから合計81個の卵子を回収した (Table 4)。このうち77個を体外成熟・体外受精・体外培養に供試し、47個 (61.0%) の移植胚 (桑実胚および胚盤胞) を得た。胚盤胞への発生率は44.2%で、1セッションあたり平均6.8個の胚盤胞および9.4個の移植胚を作出できた。体外生産胚5~16個を5頭のレシピエントに移植したところ、3頭が妊娠・分娩し、計12頭の子豚を得た (Fig. 1)。分娩した豚の産子数は平均4.0頭で、1セッションあたり2.4頭の子豚を生産することが可能であった。豚では、腹腔内視鏡<sup>2)</sup>あるいは超音波ガイド経膈プローブ<sup>3,4)</sup>によるOPUにより卵子吸引が可能であり、体外生産により胚盤胞が得られる<sup>5)</sup>ことが報告されているが、OPUによって採取した卵子由来の体外生産胚の移植によって子豚を作出した報告はない。今回の研究では、OPU-IVPを活用して豚胚を生産することが可能であり、外科的移植により子豚を作出することに成功した。OPU-IVPの効率を改善し、非外科的胚移植により子豚を生産することが可能になれば、生産現場においても採卵および胚移植を実施することができ、優良な遺伝資源を有効に活用することが期待できる。

#### 4. 要 約

本研究では、OPU-IVP技術を活用した胚移植による子豚生産システムの確立を目的とし、豚のOPU-IVPのための諸条件を検討するとともに、得られたIVP胚を移植し、受胎性を検証した。まず、少数の卵子でもIVPによって効率よく胚盤胞まで発生させることのできる培養法を検討するため、と畜卵巣から得た卵子を用いてIVPを行い、培養液量や培養密度などの影響を調べたところ、OPUにより10個程度の卵子を回収することができれば、食肉処理場由来の大量の卵子を用いた体外生産系を利用して、同程度の割合で胚盤胞を作出できると考えられた。また、と畜卵巣および生体を用いてOPUにおける吸引圧を検討したところ、豚のOPUでは100mmHgの吸引圧で卵胞を吸引することが適当であると考えられた。さらに、上記の条件を用いて5頭のドナーから合計81個の卵子を回収した。このうち77個を体外成熟・体外受精・体外培養に供試し、ドナー1頭あたり9.4個の移植胚を作出できた。体外生産胚5~16個を5頭のレシピエントに移植したところ、3頭が妊娠・分娩し、計12頭の子豚を得た。分娩した豚の産子数は平均4.0頭で、1セッションあたり2.4頭の子豚を生産することが可能であった。以上より、OPU-IVPを活用して豚胚を生産することが



可能であることを示し、外科的移植により子豚を作出することに成功した。

#### 文 献

- 1) Mito, T., Yoshioka, K., Noguchi, M., Yamashita, S., Hoshi, H., *Mol Reprod Dev.*, **80**, 549~560, 2013.
- 2) Brüssow, K.P., Torner, H., Rátky, J., Hunter, M.G., Nürnberg G., *Acta Vet Hung.*, 145, 189~196, 1997.
- 3) Bellow, M.S., Didion, B.A., Davis, D.L., Murphy, C., Ferguson, C.E., Godke, R.A., Day, B.N., *Theriogenology*, **55**, 528 (abstract), 2001.
- 4) Ferguson, E., Bellows, S., Lemieux, F., Godke, R., *J Vet Med Sci.*, **75**, 191~194, 2013.
- 5) 生駒エレナ, 鈴木千恵, 石原康弘, 小村喜久男, 大小田勉, 丸野弘幸, 日本養豚学会誌, **51**, 45~53, 2014.

## 血清中アミロイドAおよびエンドトキシン活性値を指標とした牛複合性呼吸器疾患の早期予後診断システムの構築

Establishment of early prognostic systems for Bovine Respiratory Diseases Complex using serum amyloid A and plasma endotoxin activity

鈴木 一 由

(酪農学園大学獣医学群獣医学類)

Kazuyuki Suzuki

(School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University)

Severe Bovine Respiratory Disease Complex (BRDC) is a systematic inflammatory response caused by endotoxin and similar to human inflammatory respiratory disease. The aim of this study was to investigate the relationships, if any, in plasma and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) activities of endotoxin in calves with lung inflammation associated with *Mycoplasma bronchopneumonia*.

Seventeen healthy Holstein calves without *Mycoplasma bovis* infection were used in this study as a control group. Seventeen calves were patients at the Rakuno Gakuen University Veterinary Teaching Hospital showing clinical signs such as coughing, nasal discharge, fever, and pulmonary adventitious breath sounds. The *M. bovis* was detected in BALF of all 17 calves by a PCR method based on 16S rRNA gene. Endotoxin activity in plasma and BALF were detected by LAL-kinetic turbidimetric (KT) assay (Endosafe<sup>®</sup> KTA<sup>2</sup>, Charles River, Charleston, SC, USA). The mean values for each dependent variable were compared with the normal values, using the Student's t-test after analysis of ANOVA as F test. Receiver operating characteristic (ROC) curves was used to characterize the sensitivity and specificity of each parameter to *Mycoplasma bronchopneumonia* associated changes. The optimal cutoff point for a test was calculated by the Youden index.

The calves with *Mycoplasma* were characterized by significantly higher in endotoxin activity in plasma (0.334 EU/mL) and 105.8 EU/mL). The proposed diagnostic cutoffs for endotoxin activity in plasma and BALF based on ROC analysis in detecting bronchopneumonia were set at > 0.078 and > 6.05 EU/mL, respectively. BALF and plasma endotoxin activity value showed a significant positive correlation ( $r^2 = 0.916$ ). Calves with severe respiratory signs caused by *Mycoplasma* infection indicate high endotoxin activity in the BALF and plasma. Therefore, it is suggested that endotoxin in respiratory tract may be shifted into blood stream via affected trachea and bronchi.

### 1. 目 的

重度の牛の複合性呼吸器疾患 (BRDC) はヒト

の炎症性呼吸器疾患症候群に類似したエンドトキシン由来の全身性炎症反応を伴うが、エンドトキシンの関与は不明である。本研究ではLimulus

Amebocyte Lysate (LAL) カイネティック法を用いてMycoplasma感染の認められたBRDC子牛の肺胞洗浄液 (BALF) および血漿中エンドトキシン動態を評価した。また、健常および実験的炎症性疾患子牛の血漿サンプルを用いてKinetic-Limulus amebocyte lysate assayを標準法とした携帯型エンドトキシン活性値測定機 (Endosafe-PTS™, Charles River社) の精度および正確度を評価した。

## 2. 方法

### 2.1 試験1

本学で飼養管理している呼吸器疾患を罹患していない健常な黒毛和種-ホルスタイン種交雑種 (F1) およびホルスタイン種子牛 (対照群, n = 17), ならびに呼吸器疾患の診断または治療のため本学動物病院に入院, 外来または往診した子牛 (BRDC群, n = 17) の肺胞洗浄液 (BALF) および血漿を用いた。携帯型モバイルスコープ (エアウェイマネジメントモバイルスコープ MAF-TM, オリンパス) を用いて常法によりBALFを採取し, その一部を16S rRNA遺伝子解析に基づくPCR法による*Mycoplasma bovis*の検出を行った。血漿は経静脈から採血した後, ヘパリン添加真空採血管で保存した後, 30分以内に遠心分離して得られた上清を用いた。エンドトキシン活性値はBALFおよび血漿の前処理条件の確立ならびに希釈倍率の設定を行った後, Kinetic limulus amebocyte lysate assay (Kinetic-LAL) 法のうち, BALFを発色合成基質法 (KCA: Kinetic chromogenic assay), 血漿を比濁時間分析法 (KTA: Kinetic Thrbidimetric assay) を用いて測定した。

測定法および求められたエンドトキシン活性値の測定精度および正確度は米国食品医薬局 (FDA) および日本薬局方の推奨基準に基づいて

評価した。二群間の平均値の差はStudent's-tまたはMann Whitney U検定, エンドトキシン活性値によるBRDCの診断能はROC解析, BALFと血漿中エンドトキシン活性値の相関性はSpearman's rank testにより評価した。

### 2.2 試験2

健常な6頭の子牛にO111:B4-LPSを2.5  $\mu$ g/kg 静脈内投与して炎症病態を作出し, LPS投与後0.5, 1.0, 12および24時間後の血液を採取した。これらの血漿は20倍希釈した後80度で10分間加熱して測定に供した。エンドトキシン活性値の測定は標準法であるKTAおよびKCA法と, 被験測定法である携帯型エンドトキシン活性値測定器 (Endosafe PTS™) を用いて行った。KCAおよびKTA法と被験測定法との相関性および相関性をそれぞれFriedman検定およびPerson's product-moment correlation coefficientを用いて評価した。同様に精度および正確度は米国食品医薬局 (FDA) および日本薬局方の推奨基準に基づいて評価した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 試験1

エンドトキシン活性値は肺胞洗浄液および血漿の前処理方法の確立ならびに希釈倍率の設定を行ったところ, BALFはエンドトキシン・フリー水で200倍希釈したものをそのまま測定に供し, 血漿は20倍希釈した後に80度10分加温した後に測定に供した。Table 1にエンドトキシン活性値の測定法に対する正確度と精度を評価した。BALFはKCA (n = 34), 血漿はKTA (n = 50) により測定したため, それぞれの正確度と精度を評価したところ, BALFおよび血漿中エンドトキシン活性値の測定はFDAの規定する添加回収率 (spike recovery), 変動係数 (coefficient of variation) を満たしていた。従って, BALFと血

**Table 1** Accuracy and precision for kinetic chromogenic (KCA) and thrbidimetric (KTA) in this study

Kinetic Chromogenic (KCA) n=34

| BALF                        | Ideal*     | Actual                     |
|-----------------------------|------------|----------------------------|
| Spike Recovery              | 50%—200%   | 93.3% (range 67.8%—153.9%) |
| Coefficient of Variation    | <25%       | 0.71% (range 0%—1.97%)     |
| Lower Limited (100 diluted) | 0.300EU/mL |                            |

Kinetic Thrbidimetric (KTA) n=50

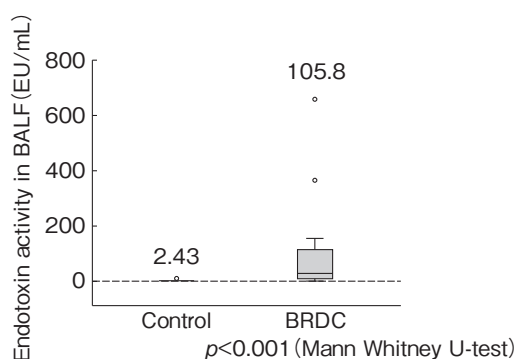
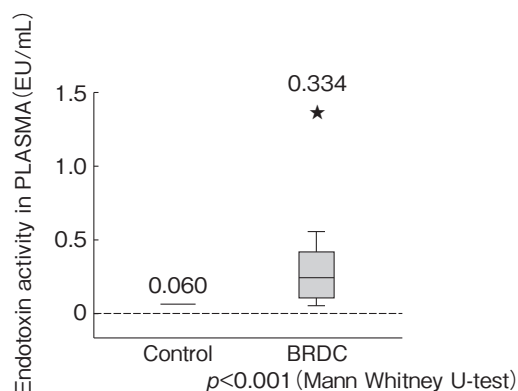
| PLASMA                     | Ideal*     | Actual                |
|----------------------------|------------|-----------------------|
| Spike Recovery             | 50%—200%   | 119.3% (62.9%—198.1%) |
| Coefficient of Variation   | <25%       | 0.47% (0%—9.6%)       |
| Lower Limited (20 diluted) | 0.060EU/mL | 28/50                 |

\* : Range of Japanese Pharmacopoeia and FDA's recommended

漿のエンドトキシン活性値測定において、KCA およびKTAは有用な方法であると思われた。

*Mycoplasma bovis*が検出された対照群およびBRDC群の子牛はそれぞれ0/17頭(0%)および17/17頭(100%)であった。Fig. 1 およびFig. 2 に、BRDC子牛におけるBALFおよび血漿中エンドトキシン活性値を示した。BRDC群のBALFおよび血漿中エンドトキシン活性値の中心値は105.8および0.334EU/mLであり、対照群の2.34および0.060EU/mLよりもそれぞれ有意に高値を示した( $p < 0.001$ )。BALF (Se = 81.3%, Sp = 84.6%) および血漿 (Se = 92.9%, Sp = 100%) においてエンドトキシン活性値によるBRDCの診

断能は有意であり、それぞれのカットオフ値は6.05および0.078EU/mL以上で陽性と判定できた。また、Speaman's rank testの結果から、BALFと血漿中エンドトキシン活性値は有意な正の相関を示し(Fig. 3,  $r^2 = 0.916$ )、その直線回帰式も満足のいく結果が得られた。これらの結果から、Mycoplasma感染したBRDC重症例では、気道内でエンドトキシンが著増しており、その一部が血漿中へ移行していることが示唆された。従って、BALF中エンドトキシン活性値が高いと血中移行が多く、また血中移行したエンドトキシンによって全身徴候が増悪すると思われる。

**Fig. 1** Endotoxin activity in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) in calves with BRDC**Fig. 2** Endotoxin activity in plasma in calves with BRDC

### 3.2 試験2

携帯型エンドトキシン活性値測定機器の臨床応用の可能性を模索するために、エンドトキシンチャレンジにより炎症状態を作出した子牛から得られた血漿サンプルを20倍希釈した後、80度10分間加熱してエンドトキシン活性値を標準法であるKTAおよびKCAと携帯型エンドトキシン活性値測定器 (PTS™) による測定結果を比較した。KTA ( $r^2=0.963$ ,  $p<0.001$ ) またはKCA ( $r^2=0.982$ ,  $p<0.001$ ) による測定値とPTS™による測定値を比較した結果、PTS™の性能は標準法であるLALベースのアッセイ法と有意に異ならなかった (Fig. 4)。これらの知見に基づいて、PTS™は、牛の血漿中のエンドトキシン活性値を評価するために、簡便かつ簡略化したシステムとして適用することが可能であることが示唆された。

## 4. 要約

### 【目的】

重度の牛の複合性呼吸器疾患 (BRDC) はヒトの炎症性呼吸器疾患症候群に類似したエンドトキシン由来の全身性炎症反応を伴うが、エンドトキシンの関与は不明である。本研究ではLimulus Amebocyte Lysate (LAL) カイネティック法を用いてMycoplasma感染の認められたBRDC子牛の肺胞洗浄液 (BALF) および血漿中エンドトキシン動態を評価した。

### 【材料と方法】

Mycoplasma陰性の健常なホルスタイン子牛17頭を対照群とした。また、呼吸器症状を主訴に来院した呼吸器疾患子牛17頭をBRDC群とした。BRDC群の子牛はすべてMycoplasma bovis陽性であった。BALFは200倍希釈して発色合成基質法、血漿は20倍希釈した後80℃、10分間加熱処理して比濁時間分析法によりエンドトキシン活性値を測定した。二群間の平均値の差はStudent's-tま

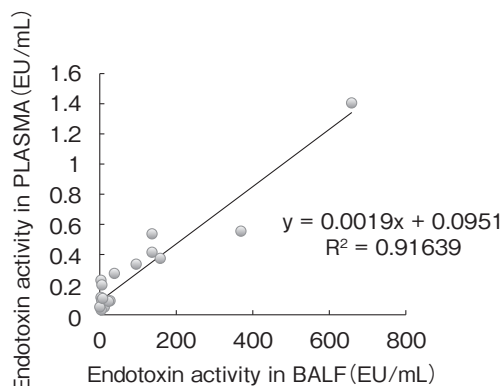


Fig. 3 Relationship between endotoxin activity in BALF and plasma obtained from calves with BRDC

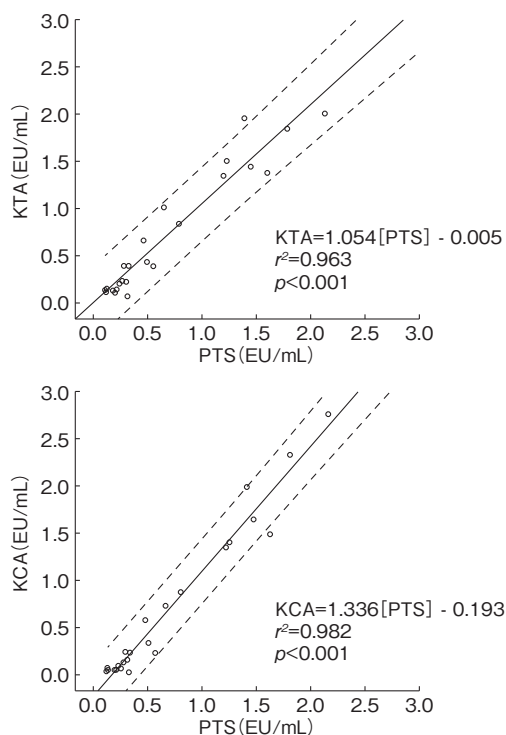


Fig. 4 Correlation of endotoxin activity in serum between the traditional kinetic limulus amebocyte lysate (LAL) analysis and portable test system (PTS™).

The endotoxin activities detected in serum samples PTS™ positively corrected with those using the kinetic turbidimetric (KTA: upper) and kinetic chromogenic (KCA: bottom) assays by Pearson's product-moment correlation coefficient.

たはMann Whitney U検定, エンドトキシン活性値によるBRDCの診断能はROC解析, BALFと血漿中エンドトキシン活性値の相関性はSpearman's rank testにより評価した。

#### 【結果】

BRDC群のBALFおよび血漿中エンドトキシン活性値の中心値は105.8および0.334EU/mLであり, 対照群よりも有意に高値を示した。BALF (Se = 81.3 %, Sp = 84.6 %) および血漿 (Se = 92.9 %, Sp = 100 %) においてエンドトキシン活性値によるBRDCの診断能は有意であり, それぞ

れの閾値は6.05および0.078EU/mL以上であった。また, BALFと血漿中エンドトキシン活性値は有意な正の相関を示した ( $r^2 = 0.916$ )。

#### 【考察】

Mycoplasma感染したBRDC重症例では, 気道内でエンドトキシンが著増しており, その一部が血漿中へ移行していることが示唆された。従って, BALF中エンドトキシン活性値が高いと血中移行が多く, また血中移行したエンドトキシンによって全身徴候が増悪すると思われる。

## 豚流行性下痢ウイルスのウイルス受容体の検索

Studies on the cellular receptor for porcine epidemic diarrhea virus

白戸 憲也・松山 州徳・田口 文広\*

(国立感染症研究所ウイルス第3部第4室, \*日本獣医生命科学大学獣医学部獣医学科)

Kazuya Shirato, Shutoku Matsuyama and Fumihiro Taguchi\*

(Laboratory of Acute Respiratory Viral Diseases and Cytokines, Department of Virology III, National Institute of Infectious Diseases, \*Department of Veterinary Science, Faculty of Veterinary Medicine, Nippon Veterinary and Life Science University)

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), a causative agent of pig diarrhea, has recently wrought great economic damage worldwide. PEDV infects only pigs, thus not other species, and this may reflect the fact that only pigs have the viral receptor. One of the principal factors determining viral species specificity is the cellular receptor with which the virus initially interacts. Other coronaviral porcine diarrhea disease, transmissible gastroenteritis virus (TGEV), utilizes the porcine aminopeptidase N (pAPN) as the cellular receptor. For TGEV, vaccines for both piglets and sows were developed and the infection is well-controlled by vaccination. In contrast, only a vaccine for sow was developed for PEDV, and the cellular receptor for PEDV remains controversial. Similar to TGEV, pAPN also has been reported to be the receptor for PEDV, although robust evidence is lacking. In the present study, we explored whether or not pAPN functions as a receptor for PEDV. HeLa cells expressing pAPN and pAPN-positive CPK cells failed to support PEDV infection, but both cell types were susceptible to infection with transmissible gastroenteritis virus (TGEV), which utilizes pAPN as a functional receptor. In contrast, Vero cells were susceptible to PEDV infection regardless of the expression status of pAPN. These results strongly suggested that pAPN failed to function as a PEDV receptor. The soluble form of pAPN (pAPs) has been reported to enhance infection by PEDV, but we could not confirm this in our present study. Furthermore, we showed that PEDV failed to bind pAPN attached to hydrophobic magnetic beads, whereas TGEV did bind to pAPN, showing that TGEV but not PEDV interacts with pAPN. These results collectively suggest that pAPN is not a functional receptor for PEDV and does not interact with PEDV. Further work on identification of receptor molecule(s) for PEDV is required.

### 1. 目 的

豚流行性下痢 (PED) はコロナウイルスであ

るPEDウイルス (PEDV) によって引き起こされる豚の疾病で、下痢症を主徴とし、嘔吐、発熱、水様性下痢等の症状を引き起こす。哺乳豚では極

めて重症化しやすく、ほぼ100%の致死率を示す。一方、成豚では死亡することはないが、食欲不振、体重減少等の症状が見られ、母豚が食欲不振で授乳停止し、子豚が衰弱死するケースも見られる。哺乳豚での致死率が極めて高いため、発生した場合の経済的損失は極めて大きく家畜伝染病予防法に基づく届出伝染病に指定されている。

PEDは、国内では1980年代より散発的に発生が見られ、1990年代に大規模な流行が見られた。その際に乳汁免疫を目的とする母豚用のワクチンが開発され、一旦流行の終息を得た。その後ワクチン未接種ケースなどで散発的発生が見られる程度であった。しかし2000年代半ばより中国を中心としたアジアで大流行が見られ、2013年にはアメリカ大陸で初めて発生が見られ、現在も流行が拡大中である。そしてついに日本国内でも沖縄、茨城で発生したのをはじめ、青森、関東、中部、九州全域での大流行が発生し、既に数万頭の子豚が死亡している。

PEDは子豚にとっては毒性が高く、家畜衛生的にも問題ではあったのだが、同じコロナウイルスによって引き起こされる豚伝染性胃腸炎(TGE)に比べて致死率が低いと言われ、その点がPEDにとって不幸であったと言える。TGEは母豚用と子豚用の両方のワクチンが開発され、効果的な予防が行われている。また基礎研究も進み、アミノペプチダーゼN (APN) がウイルス受容体分子であることも明らかになり、その脅威は激減している。一方でPEDは、母豚用ワクチンはあるものの、未だにウイルス受容体すら不明であり、そのウイルス複製機構もいまひとつよく分かっていない。このような認識の甘さが、ワクチン在庫の不足などの事態を招き、今回のような大規模な再流行を招いているとも考えられる。

ウイルス受容体を明らかにすることは、ウイルスの感染・複製機構を理解するうえで極めて重要

である。ウイルス受容体とウイルス構造タンパク質の結合の解析を行うことができれば、ウイルス感染阻止のための詳細な基礎データを得ることができるし、抗ウイルス薬の開発も可能となる。従ってPEDVのウイルス受容体の特定を行うことは基礎研究の推進のためにも非常に重要である。しかし近年、PEDVのウイルス受容体はTGEウイルス (TGEV) と同様にブタのアミノペプチダーゼN (pAPN) である、という報告がなされている<sup>1, 2)</sup>。しかしこれらの論文にはpAPN発現細胞においてPEDVが多段階複製するという明らかな証拠がなく、pAPNがウイルス受容体であるか否かは議論の余地が残っている。そこで本研究ではPEDVにウイルス受容体の検索に先立って、報告されているpAPNが本当にPEDVのウイルス受容体であるか否かの再検討を行うことを目的とした。

## 2. 方 法

### 2.1 細 胞

Vero細胞 (CCL-81) はthe American Tissue Culture Collection (ATCC) より入手した。HeLa229 (CCL-2.1) をHeLa細胞として用いた。pAPNを恒常的に発現するHeLa-pAPN細胞は、pAPNを発現するpCAGGSプラスミドとG418耐性遺伝子を持つpTargetプラスミドをコトランスフェクトすることで得た。豚由来細胞であるCPK細胞を用いた。すべての細胞は5%ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法最小必須培地 (DMEM, Sigma) で培養し、継代にはCell Dissociation Solution (Sigma) またはトリプシン (三光純薬) を用いた。

### 2.2 ウイルス

PEDV MK株は日本生物科学研究所から分与された。PEDVは通常Vero細胞を用い、トリプシンを添加して培養するが、本実験ではPEDVをトリプシンフリーの状態でもVero細胞に感染させ、3



日の培養の後、細胞ごと回収し、超音波破碎してウイルスストックとして用いた。ウイルス力価の測定は過去の報告どおりに行った<sup>3)</sup>。TGEV To-163株は動物衛生研究所から分与され、CPK細胞を用いて複製、力価測定を行った。

### 2.3 pAPN結合アッセイ

疎水性磁気ビーズ (Dynabeads M-270 Epoxy) を豚マイクロソーム由来APNであるLAP (Sigma-Aldrich) と1 Mアンモニウム存在下で混合し、37°Cで一晩放置し、ビーズに結合させる。pAPN結合ビーズをイムノブロック (DSファーマ) でブロッキングした後、ウイルス液を混合し、37°Cで2-3時間培養し、ビーズに結合したウイルスRNAを既報の方法であるウイルス特異的リアルタイムPCRによって検出した<sup>3)</sup>。

## 3. 結果と考察

海外の報告<sup>1, 2)</sup>にあるとおり、pAPNが本当にPEDVのウイルス受容体としての機能があるか否かを検討するため、PEDV非感受性のHeLa細胞にpAPNを恒常的に発現させ (HeLa-pAPN)、実際にウイルス複製するか否かの検討を行った (Fig. 1)。まず各細胞におけるpAPN発現を調べたが、想定どおりHeLa-pAPNはヒトと豚両方のAPNを発現しており (Fig. 1a)、その発現量は豚腎由来細胞のCPKの170倍ほどであった (Fig. 1b)。ウイルスを細胞に感染させ、細胞および培養上清中のウイルス力価を調べたところ、pAPNを受容体として利用するTGEVはpAPNを発現するCPKおよびHeLa-pAPNのみで明らかな複製を示した。一方、PEDVはVero細胞では複製を示したものの、pAPN発現細胞ではトリプシン添加状況でさえ複製を示さなかった (Fig. 1c)。従ってpAPNの発現は非感受性細胞であるHeLa細胞にPEDVウイルス感受性をもたらさないことが示された。

ウイルスが細胞に感染するためには、ウイルス膜タンパク質とウイルス受容体の結合が重要である。そこでpAPNとPEDVが結合するか否かの検討を行った。材料と方法で示したように疎水性磁気ビーズにpAPNを結合させ (Fig. 2a)、PEDV、TGEVと混合した後、磁石によりpAPN結合ビーズを精製し、ビーズ表面に結合しているウイルス量をリアルタイムPCRで測定した (Fig. 2b)。pAPNを受容体として使用しているTGEVはpAPN存在下でウイルス吸着量が10倍上昇するが、PEDVはpAPNの有無でウイルス吸着量の変化が見られなかった。以上からPEDVはpAPNと結合していないことが示唆された。

また、Ohらの報告<sup>1)</sup>では可溶性フォームのpAPN (sopAPN) を培養液に添加することで、トリプシンと同様にPEDV複製を促進するということが報告されている。そこで本研究でもsopAPNがPEDV複製に関与しているか否かの検討を行った。Vero細胞にPEDVを感染後、pAPNを濃度を振って培地に添加し、3日または6日培養した後、ウイルス力価を測定した (Fig. 3)。Ohらの論文では0.024~2.4pg/mlのsopAPNの添加でトリプシンと同様のウイルス複製を示すと述べているが、本実験の結果では14.8~1850ng/mlの濃度で添加しても、トリプシンのようなウイルス複製促進効果は見られなかった。またpAPNをウイルス受容体として使用するTGEVでもウイルス複製への影響は見られなかった。従って、sopAPNはPEDVウイルス複製の促進効果もないということが示された。

## 4. 要 約

ウイルス受容体を明らかにすることは、ウイルスの感染・複製機構を理解するうえで極めて重要である。海外の報告により、PEDVのウイルス受容体はTGEVと同様にpAPNである、という報告

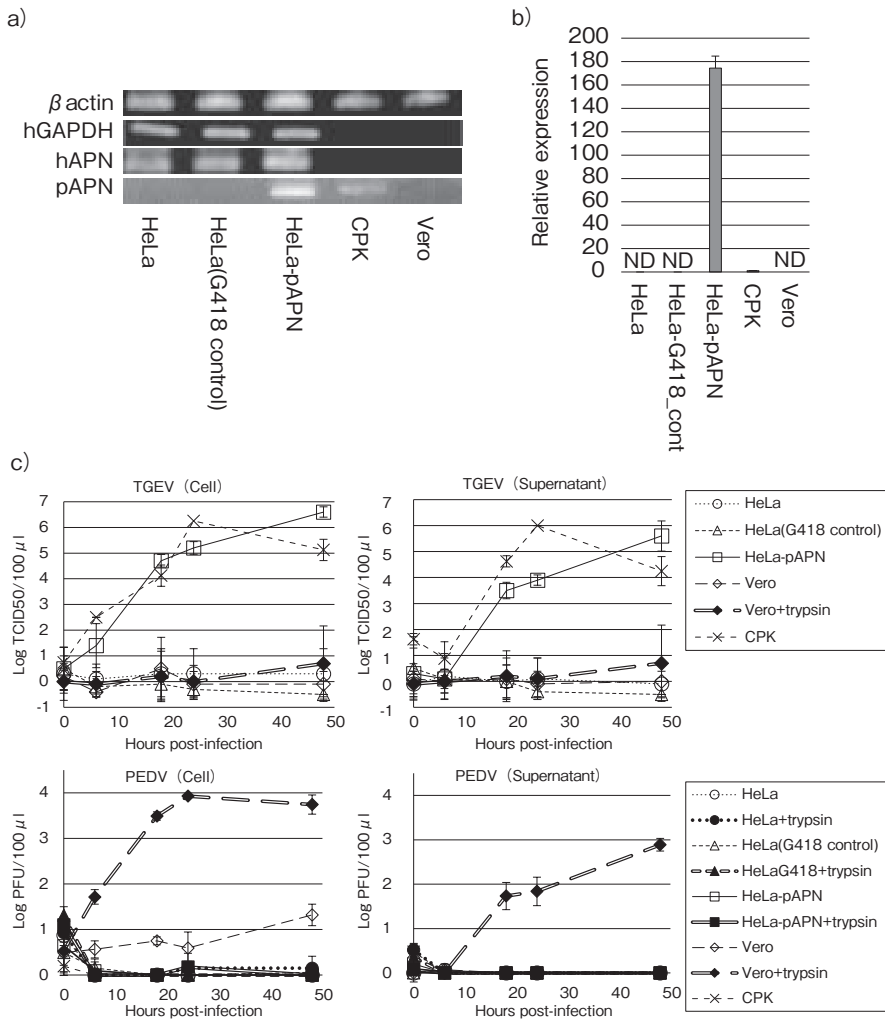


Fig. 1 PEDV replication in HeLa-pAPN cells. a) Total RNAs were extracted from HeLa, HeLa-G418, HeLa-pAPN, Vero, and CPK cells, and expression of pAPN mRNA was confirmed via PCR assay after first-stand cDNA synthesis.  $\beta$ -actin served as a positive control for all cells and hGAPDH as a human cell control. hAPN- and pAPN-encoding mRNAs were amplified from the same samples. b) pAPN expression levels were compared via real-time PCR using the samples of Figure 1a. 18s rRNA served as an internal control. The data were normalized and calculated using a comparative method, and are expressed relative to the values of CPK cells ( $n=4$ ). c) Cells were inoculated with trypsin-free PEDV or TGEV at an m.o.i. of 0.01 and incubated in 10% TPB-DMEM or 10% TPB-DMEM with 1.25  $\mu$ g/mL of trypsin at 37  $^{\circ}$ C. Cells and supernatants were separately collected at the indicated time points post-infection (0, 6, 18, 24, and 48h), and viral titers determined. Titers are expressed as PFU/100  $\mu$ L for PEDV and TCID<sub>50</sub>/100  $\mu$ L for TGEV. ( $n=5$ )

がなされていた<sup>1,2)</sup>。しかしこれらの報告はデータが懐疑的であり、pAPNがPEDVのウイルス受容体であるか否かは議論的となっていた。本研究

ではpAPNがPEDVのウイルス受容体であるということを支持する積極的なデータはなく、pAPNはPEDVのウイルス受容体であることは考

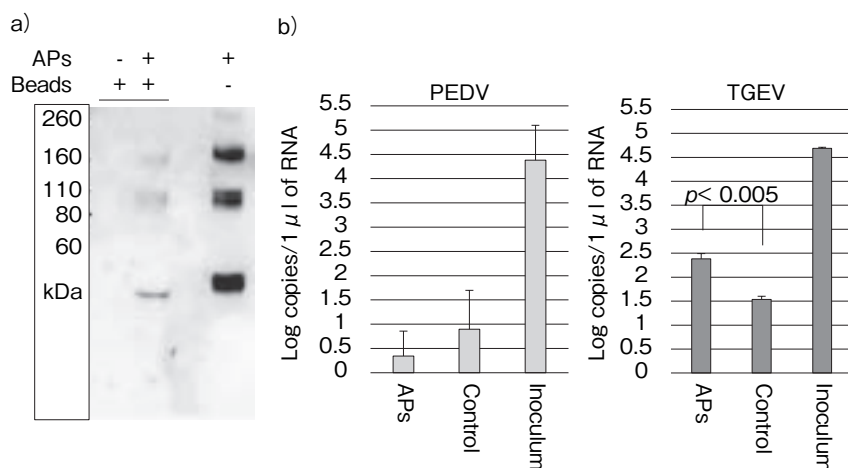


Fig. 2 APN-binding assays. a) APs were bound to hydrophobic magnetic beads (Dynabeads M-270 Epoxy) and the beads were washed and blocked using Immunoblock (DS Pharma Biomedical). Binding of APs to beads was confirmed by Western blotting. APs were detected using serum from rabbits immunized with LAP; authentic LAP (3.7ng) was used as a positive control. b) About  $2.5 \times 10^6$  copies of PEDV or TGEV (in  $100 \mu\text{L}$ ), and the same amount of Immunoblock was added to beads and incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 2–3 h. Next, the beads were washed four times with PBS and the amounts of viral genomic RNA recovered from virions were determined via real-time PCR. The data represent the averages of three independent experiment.

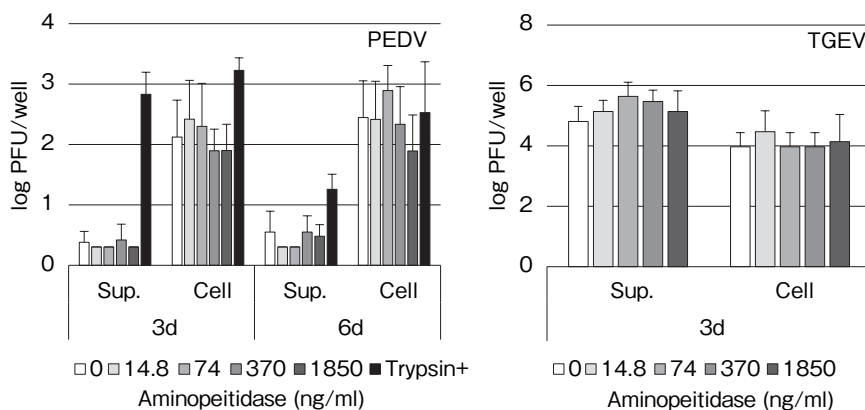


Fig. 3 Effects of soluble pAPs on PEDV and TGEV infection. PEDV or TGEV was inoculated onto Vero or CPK cells at an MOI of 0.1. After virus adsorption, cells were incubated in 10% TPB-DMEM containing the indicated concentration of pAPs (0, 14.8, 74, 370, and 1850 ng/mL). After 3 or 6 days of incubation, cells and supernatants were collected separately, and virus titers were determined ( $n=6$ ).

えにくい結果となった。従って、他にPEDVの真のウイルス受容体分子が存在すると考えられ、これを明らかにすることはPEDV感染制御のための重要な知見となると考えられる。

#### 文 献

- 1) Oh, J. S., Song, D. S., Park, B. K., *J Vet Sci.*, 4, 269–275, 2003.
- 2) Li, B. X., Ge, J. W., Li, Y. J., *Virology.*, 365, 166–172, 2007.
- 3) Shirato, K., Matsuyama, S., Ujike, M., Taguchi, F., *J Virol.*, 85, 7872–7880, 2011.

## 牛精子における暑熱ストレス耐性に関与する要因解析

Analysis of factors related to heat stress tolerance in bovine spermatozoa

山中 賢一

(佐賀大学農学部)

Ken-ichi Yamanaka

(Faculty of Agriculture, Saga University)

The objective of this study was to investigate the difference in heat stress tolerance of spermatozoa among Japanese Black bulls. *In vitro* fertilization was performed by using semen obtained from four bulls (A, B, C and D). Heat stress (40.0 °C) during *in vitro* fertilization did not affect the pronuclear formation rate of embryos regardless of bulls. The developmental rate to blastocyst stage was significantly decreased in embryos from bull A, B and C by heat stress during *in vitro* fertilization, but not in bull C. Next, acrosome integrity of spermatozoa from bull A (with low heat stress tolerance) and D (with high heat stress tolerance) was observed after thawing. There was no difference in the rate of spermatozoa with intact acrosome. In addition, we examined effect of heat stress on mitochondrial activity of spermatozoa from bull A and C at 6hr after thawing. Although the rate of spermatozoa with active mitochondria at 6hr after thawing significantly decreased in both control and heat stress groups, there was no difference between bull A and C groups. In conclusion, the present results implicated that heat stress tolerance of spermatozoa would differ among Japanese Black bulls.

### 1. 目 的

近年の地球温暖化等の気候変動による家畜へのストレスが畜産物の生産性へ及ぼす影響が危惧されている。繁殖能力に関していえば、夏季の受胎率の低下が大きな問題となっており、その対策法の開発は喫緊の課題といえる。夏季の低受胎率は卵子の品質低下、受精不成立、発生初期の胚死滅による胚損耗などがその要因であることが知られている。このような背景のもと、近年、南アジアを原産とするゼブー牛 (*Bos indicus*) とヨー

ロッパを原産とする西洋種の牛 (*Bos taurus*) から得られた精子および卵子をそれぞれ用いて体外受精を行い、生産された胚の暑熱ストレス下での発生能を比較した結果、ゼブー牛は西洋種のウシと比較して暑熱ストレスに対する耐性が高いということが報告されている<sup>1)</sup>。この結果は、ウシ生殖細胞の暑熱ストレスに対する耐性が品種間で異なることを示しており、夏季の受胎率の向上のためにはこれら暑熱ストレス耐性の高い品種の導入が有効であるということを示唆している。

しかしながら、牛肉の大部分を黒毛和種の精液

を人工授精することにより生産している我が国においてはこれらの研究結果を直接応用することは困難であると考えられ、我が国の牛肉生産体系に適合した暑熱ストレス対策を講じることが要求される。すなわち、黒毛和種内の候補牛の中から暑熱ストレス耐性の高い精子を持つ個体を選別することが必要となる。これまで、我々は暑熱ストレスの胚発生能に及ぼす影響について研究してきた過程で黒毛和種内でも異なる種雄牛に由来する精子間で生産された受精胚の暑熱ストレス耐性が異なるという結果を得ている。具体的には、体外受精または体外発生培養時に暑熱ストレス処理した場合、使用した精子の由来によって受精胚の発生率が著しく低下するもの、一方では、ほとんど発生率が低下しないものというような現象が観察された。通常の培養温度で体外受精を行った場合は精子間でこのような差が見られないことから、この結果は同品種内でも精子の暑熱ストレス耐性に個体間で違いが生じるということを示唆している。したがって、そのような個体間での違いがどのような要因によって引き起こされているのかについて明らかにすることで、暑熱ストレス耐性の高い精子を持つ種雄牛の選別が可能になるかもしれない。しかしながら、これまで黒毛和種において種雄牛精液間の暑熱ストレス耐性の違いについて詳細に検証を行った報告は少ない。

そこで、本研究では、異なる黒毛和種種雄牛から採取した精子間での暑熱ストレス耐性の違いを引き起こしている要因を探索することを目的とする。

## 2. 方 法

### 2.1 ウシ体外受精胚の作製

と場由来卵巣より、吸引採取法により直径約2～6 mm程度の卵胞から卵胞液ごと卵丘卵母細胞複合体 (COCs) を採取し、実体顕微鏡下で卵細

胞質が均一かつ3層以上の卵丘細胞が付着しているCOCsをTCM199 (Gibco) に5% FBS (Corning), FSH (0.02 AU/ml; デンカ製薬) およびゲンタマイシン (10  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich) を加えた培地中で38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 加湿条件下で22時間、体外成熟培養を行った。体外成熟後、卵丘卵母細胞複合体はIVF100 (機能性ペプチド研究所) で3回洗浄後、50  $\mu$ lのIVF100ドロップ内に移し、媒精まで38.5°C, 5%CO<sub>2</sub>, 加湿条件下で静置した。一方、精液は4頭の異なる黒毛和種雄牛から採取した人工授精用凍結精液を用いた。液体窒素内で凍結保存されている精液ストローを取り出し、35～37°Cの温水内で融解した。融解後、90%Percoll (GE Healthcare) が入った遠心チューブに精液を滴下し、室温、800×gの条件で10分間遠心を行った。遠心後、上清を捨て、5mlのIVF100を加えて懸濁し、室温、600×gの条件で5分間遠心を行った。再度上清を捨て、精子濃度が $1.0 \times 10^7$  匹/mlになるようにIVF100で調製した。調整した精子懸濁液50  $\mu$ lをCOCsが入っているドロップに加え、対照区では38.5°C, 暑熱ストレス区では40.0°Cの温度条件で、それぞれ5%CO<sub>2</sub>, 加湿条件下で6時間媒精を行った。媒精後、5%FBS添加TCM199に移し、ピペティングにより卵丘細胞および精子を完全に取り除き、SOF-BE 1 培地<sup>2)</sup>で洗浄し、50  $\mu$ lの同培地ドロップに15-25個ずつ移し、38.5または40.0°C, 5%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>加湿条件下で体外発生培養を行った。培養後、2日で分割率、8日で胚盤胞形成率を評価した。

### 2.2 前核形成の観察

受精後の核相の観察はホールマウント法により行った。媒精開始後10時間の受精胚をPBS (-) で1回洗浄後、スライドガラスに載せ、ワセリンスポットを付けたカバーガラスをかぶせた。カルノア液 (酢酸:エタノール = 3:1) で固定し、

1%オルセイン液で染色した。洗浄後、位相差顕微鏡下で核の形態を観察し前核形成率を算出した。

### 2.3 胚盤胞期胚のアポトーシス陽性細胞の検出

胚盤胞期胚のアポトーシス陽性細胞はTUNEL法を利用したIn Situ Cell Death Detection Kit (Roche Applied Science) を用いて検出した。胚盤胞期胚を4%パラホルムアルデヒド溶液 (pH7.4) 中で20分間固定を行った。固定後、0.1% PVP-PBS中に移し3回洗浄後、0.5% Triton X-100 (ナカライテスク) 添加PBSで20分間、透過処理を行った。0.1% PVP-PBS中で10分間、2回洗浄を行った。洗浄後、製造元の方法に従い調整したTUNEL反応液に胚を移し37℃、60分間、インキュベートした。反応後、0.1% PVP-PBS中で5分間、3回洗浄を行った。VECTASHILD Mounting Medium with DAPI (Vector Laboratories) でスライドガラスにマウントし、カバーガラスをかけ、蛍光顕微鏡により観察を行い、各胚盤胞期胚における総細胞数およびアポトーシス陽性細胞数を測定した。総細胞数に対するアポトーシス陽性細胞数の率をApoptosis indexとして算出した。

### 2.4 精子先体の正常性評価

精子先体の評価はTeradaらの方法<sup>3)</sup>に修正を加えて行った。上述した体外受精と同様方法により精子濃度を $3.0 \times 10^6$ 匹/mlに調整した精子懸濁液20  $\mu$ lをスライドガラスに塗り、風乾させた後、メタノール (Sigma-Aldrich) で固定する。固定後、30  $\mu$ g/mlのFITC-PNA (Sigma-Aldrich) で38.5℃、30分間、染色を行った。PBSで洗浄後、VECTASHILD Mounting Medium with DAPIを滴下し、カバーガラスをかけて蛍光顕微鏡で観察を行った。先体帽に強い緑色蛍光が見られるものをintact、先体帽の一部に緑色蛍光が見られるものをpartially damaged、緑色蛍光が見られないものをdamagedとして評価した。

### 2.5 精子ミトコンドリア活性の検出

精子のミトコンドリア活性の検出はYamauchiらの方法<sup>4)</sup>に修正を加えて行った。上述した体外受精と同様方法により精子濃度を $1.0 \times 10^7$ 匹/mlに調整し、500nM MitoTracker<sup>®</sup> Red CMXRos (Molecular Probes) および25  $\mu$ g/ml Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich) を添加した反応液中で38.5℃で20分間、インキュベーター内にて染色を行った。染色後、1mlのPBSを加え、600gで5分間遠心し、上清を除去し、PBSで再懸濁し、スライドガラスにスポットし、カバーガラスをかけて蛍光顕微鏡で観察を行い、中片部に強い赤色蛍光が見られる精子をミトコンドリア活性陽性として評価した。各実験区ともに100匹以上の精子において観察を行った。

### 2.6 統計解析

各実験ともに3回以上の反復によりデータを得た。前核形成および体外発生成績についてはchi-square test、胚盤胞期胚における総細胞数、アポトーシス陽性細胞率、先体膜の正常性およびミトコンドリア活性についてはTukey-Kramer multiple comparison testによりそれぞれ有意水準5%として検定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 暑熱ストレス下での異なる黒毛和種雄牛に由来する間での受精能および体外発生成能の比較

黒毛和種4頭から採取した凍結精液を用いて体外受精を行い、対照区および暑熱ストレス区における前核形成率 (Table 1) および体外発生成率 (Table 2) を調べた。前核形成率に関しては、種雄牛間で数値にバラつきがあるが、対照区と暑熱ストレス区間ではすべての種雄牛において有意な差は見られず、暑熱ストレスによる前核形成率への影響は認められず、過去の報告と同様の結果で

**Table 1** Effect of heat stress during *in vitro* fertilization on pronuclear formation rate of bovine embryos fertilized with semen from different Japanese Black bulls

| Bull | Heat stress | No. of embryos | No. (%) of embryos formed pronucleus |
|------|-------------|----------------|--------------------------------------|
| A    | -           | 76             | 60 (79.0)                            |
|      | +           | 73             | 57 (78.1)                            |
| B    | -           | 57             | 46 (80.7)                            |
|      | +           | 47             | 35 (74.5)                            |
| C    | -           | 50             | 41 (82.0)                            |
|      | +           | 37             | 34 (91.9)                            |
| D    | -           | 71             | 48 (67.6)                            |
|      | +           | 61             | 36 (59.0)                            |

**Table 2** Effect of heat stress during *in vitro* fertilization on *in vitro* development of bovine embryos fertilized with semen from different Japanese Black bulls

| Bull | Heat stress | No. of embryos | No. (%) of cleaved embryos | No. (%) of blastocysts |
|------|-------------|----------------|----------------------------|------------------------|
| A    | -           | 108            | 97 (89.9) <sup>a</sup>     | 24 (22.2) <sup>a</sup> |
|      | +           | 115            | 86 (74.8) <sup>b</sup>     | 9 (7.8) <sup>b</sup>   |
| B    | -           | 83             | 72 (86.7)                  | 19 (22.9) <sup>a</sup> |
|      | +           | 71             | 53 (74.6)                  | 6 (8.4) <sup>b</sup>   |
| C    | -           | 74             | 60 (81.1)                  | 17 (23.0)              |
|      | +           | 81             | 59 (72.8)                  | 13 (16.0)              |
| D    | -           | 94             | 66 (70.2)                  | 23 (24.5) <sup>a</sup> |
|      | +           | 92             | 69 (75.0)                  | 12 (13.0) <sup>b</sup> |

<sup>a, b</sup>Values with different superscripts between experimental groups (heat stress (-) vs. (+)) within the bull are significantly different ( $P < 0.05$ ).

あった<sup>5)</sup>。体外発生率に関しては、種雄牛A、BおよびDにおいて暑熱ストレス区で対照区と比較して胚盤胞期胚への発生率が有意に低下した。さらに、種雄牛Aにおいては分割率にも暑熱ストレス区で有意な低下が観察された。体外受精時の暑熱ストレスにより胚の発生率が低下することはこれまでも報告されており、それらの報告と我々の結果は一致するものであった<sup>6)</sup>。一方で、種雄牛Cにおいては暑熱ストレス区において他の種雄

牛と同様に胚盤胞期胚の発生率が低下する傾向は見られたが、その低下に有意性は認められなかった。対照区における発生率は種雄牛間で差が見られないにもかかわらず、前核形成率および体外発生率において暑熱ストレス区での有意な低下が認められなかったことから種雄牛Cの精液は他の種雄牛と比較して暑熱ストレス耐性が高いということが示唆された。一方で、暑熱ストレスの影響を受けた他の種雄牛に関していえば、分割率、胚盤胞形成率ともに暑熱ストレス区で有意に低下した種雄牛Aの精液は暑熱ストレス耐性が低いということが示唆された。加えて、いずれの種雄牛も前核形成率に暑熱のストレスの影響がないことから、体外受精時の暑熱ストレスは前核形成後の胚に悪影響を与えていることが示唆された。

次に、種雄牛AおよびCの精液を用いて得られた胚の品質を評価するために胚盤胞期胚の総細胞数およびアポトーシス陽性細胞の検出を行った結果 (Table 3)、種雄牛間、処理区間いずれにおいても差が認められなかった。我々は体外受精時の暑熱ストレスによる発生停止を回避し、胚盤胞期まで発生した胚では品質に差がないという同様の報告をしており<sup>7)</sup>、本研究でも同様の結果が得られたといえる。また、暑熱ストレス耐性が異なることが示唆された種雄牛AおよびCの精液を以降の実験では用い、それら暑熱ストレス耐性の違いを引き起こす要因について検討を行うこととした。

### 3.2 暑熱ストレス耐性の異なる精子の特徴解析

種雄牛AおよびCの精子の特徴を解析するために、まず正常な受精過程に必要な精子先体の正常性について融解直後の精液を用いて評価を行った (Table 4)。先体の状態を3つに分類して比較を行った結果、各分類ともに種雄牛間で有意な差は見られず、70%程度の精子において正常な先体を有していることが観察された。次に、融解直後、

**Table 3** Effect of heat stress during *in vitro* fertilization on total cell number and apoptosis incidence in blastocysts

| Bull | Heat stress | No. of blastocysts examined | No. of cells/blastocyst (mean $\pm$ SEM) | Apoptosis index (mean $\pm$ SEM) |
|------|-------------|-----------------------------|--|----------------------------------|
| A    | -           | 20                          | 96.6 $\pm$ 8.3                           | 11.2 $\pm$ 1.0                   |
|      | +           | 9                           | 97.9 $\pm$ 7.6                           | 11.6 $\pm$ 1.5                   |
| C    | -           | 12                          | 107.6 $\pm$ 13.5                         | 7.4 $\pm$ 1.0                    |
|      | +           | 10                          | 101.8 $\pm$ 14.5                         | 7.9 $\pm$ 1.4                    |

The data are means  $\pm$  standard errors.

**Table 4** Acrosome integrity of spermatozoa from two Japanese Black bulls after thawing

| Bull | % of sperm with intact acrosome | % of sperm with partially damaged acrosome | % of sperm with damaged acrosome |
|------|---------------------------------|--|----------------------------------|
| A    | 71.8 $\pm$ 0.4                  | 16.0 $\pm$ 0.2                             | 12.2 $\pm$ 0.2                   |
| C    | 72.7 $\pm$ 2.5                  | 15.6 $\pm$ 2.3                             | 11.6 $\pm$ 0.3                   |

The data are means  $\pm$  standard errors.

**Table 5** Effect of heat stress on mitochondrial activity of spermatozoa from two Japanese Black bulls at 6hr after thawing

| Bull | Post-thaw                   | 38.5°C for 6 hr             | 40.0°C for 6 hr             |
|------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| A    | 71.8 $\pm$ 0.4 <sup>a</sup> | 16.0 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> | 12.2 $\pm$ 0.2 <sup>b</sup> |
| C    | 72.7 $\pm$ 2.5 <sup>a</sup> | 15.6 $\pm$ 2.3 <sup>b</sup> | 11.6 $\pm$ 0.3 <sup>b</sup> |

The rates of sperm with active mitochondria are shown (means  $\pm$  standard errors).

<sup>a, b</sup>Values with different superscripts within same row are significantly different ( $P < 0.05$ ).

38.5°C (対照区) または40.0°C (暑熱ストレス区) で6時間培養した後の各種雄牛の精子におけるミトコンドリア活性の観察を行った (Table 5)。その結果、各種雄牛とも融解直後の精子では約70%において強いミトコンドリア活性が観察され、両者に有意な差は認められなかった。一方で、6時間培養した後の精子においてはミトコンドリア活性を有する精子の割合は大きく低下し、対照区、暑熱ストレス区ともに融解直後の精子と比較して

有意な差が認められたが、種雄牛間では、有意な差は認められなかった。本研究では精子の受精能に関与する要因について主に解析を行ったが、今回の結果からは種雄牛間での精子の暑熱ストレス耐性に影響を及ぼす要因について特定することはできなかった。しかしながら、今回の結果は黒毛和種個体間においても精子の暑熱ストレス耐性に違いがあることを示すとともに、これらの違いを生じさせる要因が受精後の初期胚発生過程にある可能性を強く示唆している。暑熱ストレスによる胚の発生率の低下には細胞質内で活性酸素種が関与することが報告されており<sup>8)</sup>、それらの除去に関与する遺伝子発現が精子間で異なり、暑熱ストレス下での発生能に影響を及ぼしていることも予想される。したがって、今後はこれら精子により生産された胚の初期発生過程に着目するとともに、網羅的遺伝子解析などの分子生物学的なアプローチを行う必要があると考えられる。

#### 4. 要 約

本研究では、異なる黒毛和種種雄牛から採取した精液を用いて暑熱ストレス下での体外受精を行うことにより、種雄牛間での精子暑熱ストレス耐性の違いおよびそれらに影響する要因について検討することを目的とした。体外受精時に暑熱ストレスを付与した結果、いずれの種雄牛の精子を用いても前核形成率には影響が認められなかったが、体外発生率では種雄牛間で暑熱ストレスに対する影響が異なることが示され、種雄牛間で精子の暑熱ストレス耐性が異なることが示唆された。次に、これらの違いを引き起こす要因について調べるために、各種雄牛の精子の先体の状態やミトコンドリア活性について融解後や暑熱ストレス付加後に解析を行った。その結果、これらにおいて種雄牛間および実験区間で差は認められなかった。以上の結果から、黒毛和種個体間においても



精子の暑熱ストレス耐性に違いがあること、さらに、これらの違いを生じさせる要因が受精後の初期胚発生過程にある可能性が示唆された。今後はこれら精子により生産された胚の初期発生過程における網羅的遺伝子解析などの分子生物学的なアプローチを行うことが期待される。

#### 文 献

- 1) Silva, C. F., Sartorelli, E. S., Castilho, A. C., Satrapa, R. A., Puelker, R. Z., Razza, E. M., Ticianelli, J. S., Eduardo, H. P., Loureiro, B., Barros, C. M., *Theriogenology*, **79**, 351~357, 2013.
- 2) Fields, S. D., Hansen, P. J., Ealy, A. D., *Theriogenology*, **75**, 1466~1475, 2011.
- 3) Aboagla, E. M., Terada, T., *Biology of Reproduction*, **69**, 1245~1250, 2003.
- 4) Yamauchi, S., Nakamura, S., Lay, K. M., Azuma, T., Yakabi, T., Muto, N., Nakada, T., Ashizawa, K., Tatemoto, H., *Journal Reproduction and Development*, **55**, 558~565, 2009.
- 5) Hendricks, K. E. M., Martins, L., Hansen, P. J., *Journal Reproduction and Development*, **55**, 69~74, 2009.
- 6) Sugiyama, S., McGowan, M., Phillips, N., Kafi, M., Youngm, M., *Reproduction in Domestic Animals*, **42**, 271~274, 2007.
- 7) Sakatani, M., Yamanaka, K., Balboula, A.Z., Takenouchi, N., Takahashi, M., *Molecular Reproduction and Development*, **82**, 36~47, 2015.
- 8) Sakatani, M., Kobayashi, S., Takahashi, M., *Molecular Reproduction and Development* **67**, 77~82, 2004.

# 腸管内細菌による牛腸管外臓器汚染要因の解明

Enterobacterial contamination of extraintestinal organs in cattle

中馬 猛 久

(鹿児島大学共同獣医学部)

Takehisa Chuma

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

In Japan, the sale and offering of raw beef liver was prohibited in 2012 because food-borne infection in humans related to the consumption of raw beef liver were reported every year. Because the source of contamination remains unclear, we investigated bacterial contamination of the liver, mesenteric lymph node, kidney, and spleen of culled and fed cattle. The livers without gross lesion of fed cattle were all aseptic (0/7, 0%), whereas 7/16 (43.8%) livers without gross lesion from the culled cattle were contaminated. *Escherichia coli* was the predominant species. The results of this study support the safety of extraintestinal organs without gross lesion of fed cattle from bacteriological point of view.

## 1. 目 的

牛の腸管内からは病原性大腸菌O157やカンピロバクターが検出されることがある<sup>1,2)</sup>。食肉処理場での解体過程では、牛枝肉がこれらの菌に汚染されるのを防ぐ対策が施されている。しかしながら、牛の生レバーなどの喫食を原因としたこれらの菌による食中毒は後を絶たなかった。平成10年～23年の間に牛の生レバーを原因とする食中毒が128件発生しており、患者数は852人と報告されている。このうち22件（患者数79人）が腸管出血性大腸菌によって起きており、残りのほとんどがカンピロバクターによって占められていた。厚生労働省による牛の臓器からの食中毒菌分離調査で、牛胆汁や肝臓はこれらの菌に汚染されている

ことが明らかになった。そこで、牛の生レバーを安全に食す方法がないため、平成24年7月1日にその販売・提供が全面的に禁止となった。しかしながら、牛の腸管外臓器の細菌汚染に係る要因はわかっていない。近年、微生物、特に細菌を同定する手法として、質量分析法の一つであるMatrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight Mass Spectrometer (MALDI-TOF MS) が利用されて始めている<sup>3)</sup>。MALDI-TOF MSとはマトリックスにレーザー光を照射し、試料をイオン化させ、電圧をかけて真空管を走行させて、その成分の質量の違いから固有なマススペクトルを得る手法である。細菌の同定は、得られる固有のマススペクトルとデータベースに登録されているどの細菌のスペクトルとのパターンが一致して

いるかを照合することで行われる。この方法によって、寒天培地にコロニーが形成されれば1つのコロニーから所要時間10分ほどで同定が遂行されることから、その迅速性、簡便さ、ランニングコストの低さが利点としてあげられる。そこで、本研究では、MALDI-TOF MSを用いて牛の腸管外臓器の細菌汚染状況を詳細に調査し、廃用牛と肥育牛との間で汚染の要因を比較検討した。さらに、肝臓と他臓器から同時に菌が分離された例について、その特徴を比較解析することにより菌の生体内移行について解析した。

## 2. 材料と方法

### 2.1 材料の採取と菌株の分離、同定

鹿児島県内の食肉検査所に2012年8月から2013年2月の間に計6回搬入された廃用牛43頭、肥育牛36頭の肝臓、脾臓、腎臓、腸間膜リンパ節(MLN)を材料とした。食肉検査時に切り出されたこれらの臓器の表面をアルコール清拭し、加熱したスパークテルで焼烙後、深部を切り出し無菌的に採材し、血液寒天培地に直接スタンプした。その後、37℃、24から48時間ローソク培養を行い、肉眼的に形状の異なる発育コロニーをもう一度血液寒天培地に塗布し、純培養を行った。純培養後の発育したコロニーをMALDI-TOF MSにより同定した。MALDI-TOF MSでスコアが1.7以上で同定可能であるとし、1.7未満であった株を同定不能とした。

カンピロバクターの分離を目的として、検体約1gをプレストン液体培地ににて42℃、48時間好気増菌培養後、CCDA培地に塗布し、同条件で培養した。

### 2.2 パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)

分離された大腸菌をDHL寒天培地に塗布し、37℃、24時間好気培養した。発育したコロニーを2mlのLB培地に接種し、37℃、24時間好気培養

した。この培養液を1白金耳とり、LB培地に接種して同条件で6から7時間震盪培養して得られた培養液700 $\mu$ lを12000rpmで5分間遠心し、沈渣を得た。これにProteinase K (20mg/ml) 10 $\mu$ lとCSB190 $\mu$ lを混合した液に溶解し、これに1.5%アガロースゲルを200 $\mu$ l加え、モールドに入れて固まるまで約10分静置した。固まったプラグをCell Lysis Solution (50mM Tris, 50mM EDTA, 1%サルコシル, 0.1mg/ml Proteinase K) 5mlに入れ、24時間56℃で震盪した。

プラグは蒸留水で洗浄し、TE bufferで56℃、15分間震盪洗浄を行った。これを3回繰り返した後、プラグを4つに分け、その1片を制限酵素*Xba* Iで37℃、4時間処理した。処理したプラグを1%Pulsed Field Certified Agarose (Bio-Rad)の穴に入れ、0.5 $\times$ TBEを満たしたBio-Rad CHEF DR IIIを用いてInitial Timeを5.0秒、Final Timeを50.0秒、gradientを6 V/cm、included angleを120°に設定し、14℃で24時間電気泳動した。1 $\mu$ g/mlのエチジウムブロマイドを加えた蒸留水で20分染色し、UV照射でバンドを観察した。

*Xba* I処理で同じPFGEパターンを示した大腸菌は上記と同じ条件で*Bln* I処理による電気泳動が行われた。

### 2.3 大腸菌の血清型別

大腸菌のO群血清型には病原性大腸菌免疫血清「生研」(デンカ生研株式会社)の混合血清を用いてスクリーニングを行い、凝集が認められた場合、該当した混合血清に含まれるO群血清を用いて凝集の有無を確認した。

### 2.4 vero毒素産生試験

逆受身ラテックス凝集反応試験によりvero毒素の検出を行った。大腸菌をBHI寒天培地で37℃、24時間培養し、平板の3分の1以上の菌体を1mlのポリミキシンB溶液(5000U/ml)に混

濁させ、37℃で30分間震盪させた。この間5分ごとに軽く混和した。培養菌液を6400rpmで10分間遠心して得られた上清を毒素原液とした。U字マイクロプレートの3列で毒素原液25 $\mu$ lを2倍階段希釈し、それぞれの列にVT1およびVT2感作ラテックス、対照ラテックス（デンカ生研株式会社）を分注した。プレートミキサーで震盪後、室温に一晩放置して凝集の有無を確認した。

### 3. 結 果

#### 3.1 廃用牛と肥育牛の臓器での細菌の分離頭数および分離率と菌株

廃用牛43頭のうち33頭（76.7%）、肥育牛36頭のうち4頭（11.1%）の臓器から細菌が分離された。臓器別では、肝臓、MLN、腎臓、脾臓の細菌陽性率は廃用牛でそれぞれ39.5%（17/43）、46.5%（20/43）、41.8%（18/43）、23.3%（10/43）であり、肥育牛ではそれぞれ11.1%（4/36）、2.8%（1/36）、0%（0/36）、2.8%（1/36）であった。

廃用牛から分離された細菌の種類と株数をTable 1に示した。合計136株が分離され、このうち86株の細菌がMALDI-TOF MSで同定可能で

あり、24属に分けられた。*E. coli*が16株と最も多かった。肥育牛では合計6株の細菌が分離され、3株が*E. coli*、次いで*Acinetobacter*属が2株であり、残りの1株は同定不能であった。カンピロバクターは廃用牛、肥育牛のいずれからも分離されなかった。

#### 3.2 廃用牛と肥育牛の肝臓と細菌汚染

43頭の廃用牛のうち16頭の肝臓が食肉検査で合格と判定され、肥育牛では36頭のうち7頭の肝臓が合格となった。合格と判定された廃用牛の肝臓で16頭中7頭（43.8%）から細菌が分離されたのに対して、肥育牛の合格と判定された肝臓からは細菌が分離されなかった。

病変所見が認められた肝臓は廃棄処分された。廃用牛では27頭の肝臓が廃棄され、最も多くみられた病変所見は肝富脈斑（10頭：肝富脈斑のみ7頭、肝富脈斑+その他の所見3頭）、次いで鋸屑肝（6頭：鋸屑肝のみ4頭、鋸屑肝+その他の所見2頭）と続いた。肥育牛では19頭の肝臓が廃棄され、肝出血斑（14頭：肝出血斑のみ11頭、肝出血斑+その他の所見3頭）が最も多かった。廃棄処分となった肝臓は廃用牛、肥育牛のいずれから

Table 1 廃用牛から分離された菌の種類と株数

| 菌  | 株数  |
|--|-----|
| <i>E. coli</i>   | 16  |
| <i>Bacillus</i> 属  | 12  |
| <i>Streptococcus</i> 属   | 9   |
| <i>Corynebacterium</i> 属   | 8   |
| <i>Kocuria</i> 属   | 7   |
| <i>Staphylococcus</i> 属  | 5   |
| <i>Enterococcus</i> 属 <i>Moraxella</i> 属   | 4   |
| <i>Chryseobacterium</i> 属  | 3   |
| <i>Acidovorax</i> 属 <i>Macroccoccus</i> 属 <i>Stenotorophomonas</i> 属   | 2   |
| <i>Antrobacter</i> 属 <i>Neisseria</i> 属 <i>Pseudomonas</i> 属 <i>Trueperella</i> 属 <i>Agromyces</i> 属 <i>Brevibacterium</i> 属<br><i>Dermaococcus</i> 属 <i>Viridibacillus</i> 属 <i>Aerococcus</i> 属 <i>Sphingomonas</i> 属 <i>Paenibacillus</i> 属 <i>Enterobacter</i> 属 | 1   |
| 同定不能 <sup>1)</sup>   | 50  |
| 合計   | 136 |

1) MALDI-TOF MSでスコアが1.7未満であった株

も細菌が分離され、その陽性率はそれぞれ40.7%、21.1%であった。

### 3.3 同一廃用牛の肝臓と他臓器から分離された*E. coli*の比較

分離された*E. coli*の株数および血清型をTable 2に示した。*E. coli*は廃用牛11頭から計16株分離され、臓器別では肝臓から9株、MLNから5株、腎臓から2株分離され、脾臓では検出されなかった。肥育牛では3頭から3株の*E. coli*が分離され、すべて肝臓由来であった。分離された*E. coli*の血清型は6つに分けられた。廃用牛ではO63、O121、O125、O127 aの4つに分けられ、それぞれ1株、2株、4株、3株であった。6株はuntypeableであった。肥育牛ではO1、O119、O125がそれぞれ1株ずつみられた。分離された*E. coli*はすべてvero毒素陰性であった。

同一廃用牛の肝臓と他臓器から分離された*E. coli*の血清型、PFGEパターンをTable 3とFig. 1

に示した。4頭の廃用牛の肝臓と他臓器から同時に*E. coli*が分離され、3頭(枝肉番号1467、1479、3055)は肝臓とMLNから、1頭(枝肉番号3051)は肝臓と腎臓から同時に*E. coli*が分離された(Table 3)。枝肉番号3051の肝臓からは2株の*E. coli*が分離された。これら7株の*E. coli*の*Xba* I切断によるPFGEパターンは4種(A~D)に分けられた(Fig. 1)。枝肉番号1467、3051、3055のそれぞれの肝臓と他臓器から分離された*E. coli*のPFGEパターンと血清型は完全に一致した。枝肉番号1479の肝臓、MLN由来の*E. coli* L47株とM61株のPFGEパターンはバンド1本みの違いしかみられなかったことから、同一であると判断した。また、これらの株は*Bln* Iによる切断でも同様な結果が得られた。

## 4. 考 察

本研究で用いたMALDI-TOF MSは多検体か

Table 2 廃用牛と肥育牛から分離された*E. coli*の分離株数と血清型

|     | 分離頭数 | 分離株数 | 臓器別分離株数 |     |    |    | 血清型 |     |      |      |      |        |                  |
|-----|------|------|---------|-----|----|----|-----|-----|------|------|------|--------|------------------|
|     |      |      | 肝臓      | MLN | 腎臓 | 脾臓 | O1  | O63 | O119 | O121 | O125 | O127 a | ut <sup>1)</sup> |
| 廃用牛 | 11   | 16   | 9       | 5   | 2  | 0  |     | 1   |      | 2    | 4    | 3      | 6                |
| 肥育牛 | 3    | 3    | 3       | 0   | 0  | 0  | 1   |     | 1    |      | 1    |        |                  |

1) untypeable

Table 3 同一廃用牛の肝臓と他臓器から分離された*E. coli*のPFGEパターンと血清型

| 枝肉番号 | 臓器  | 菌株  | PFGEパターン<br>( <i>Xba</i> I) | 血清型              |
|------|-----|-----|-----------------------------|------------------|
| 1467 | 肝臓  | L24 | A                           | O27 a            |
|      | MLN | M27 | A                           | O127 a           |
| 1479 | 肝臓  | L47 | B                           | ut <sup>1)</sup> |
|      | MLN | M61 | B'                          | ut               |
| 3051 | 肝臓  | L4  | C                           | O125             |
|      | 肝臓  | L3  | D                           | O121             |
|      | 腎臓  | K8  | D                           | O121             |
| 3055 | 肝臓  | L18 | C                           | O125             |
|      | MLN | M29 | C                           | O125             |

1) untypeable

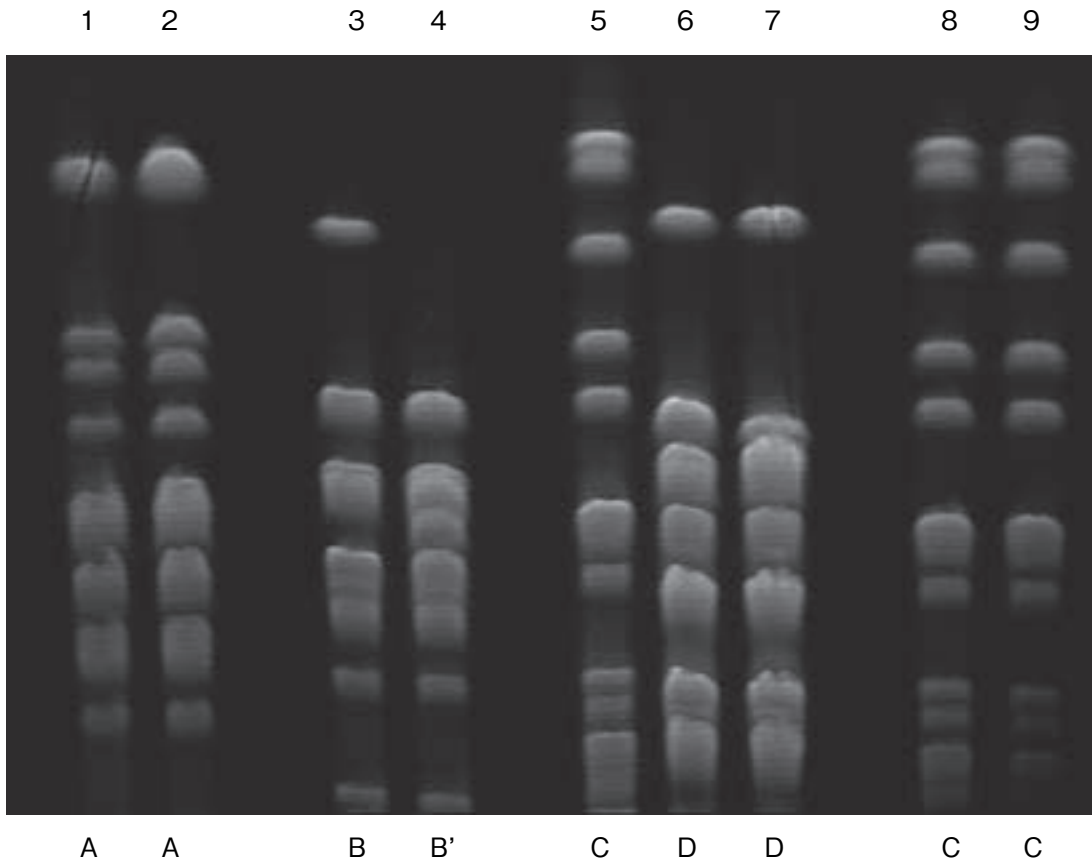


Fig. 1 同一廃用牛の肝臓と他臓器由来*E. coli*の*Xba* I 切断によるPFGEパターン  
 レーン 1, 2 : 枝肉番号1467, それぞれ肝臓とMLN由来*E. coli* (L24, M27)  
 レーン 3, 4 : 枝肉番号1479, それぞれ肝臓, MLN由来*E. coli* (L47, M61)  
 レーン 5, 6, 7 : 枝肉番号3051, それぞれ肝臓, 肝臓, 腎臓由来*E. coli* (L4, L3, K8)  
 レーン 8, 9 : 枝肉番号3055, それぞれ肝臓, MLN由来*E. coli* (L18, M29)

らの細菌同定に役立ち、牛の臓器から様々な菌を分離同定することができた。廃用牛の臓器からは、腸内細菌である*E. coli*, 土壌由来と思われる*Bacillus*属が多数分離された。廃用牛からの細菌分離率(76.7%)は肥育牛からの分離率(11.1%)を大きく上回っており、臓器別でも肝臓, MLN, 腎臓, 脾臓のすべての臓器で廃用牛が肥育牛より高く、廃用牛の臓器は高いレベルで汚染されていることが明らかになった。Enokimotoらの報告<sup>4)</sup>では健康牛の肝臓の5%, Acikらの報告<sup>5)</sup>では同様な試料の6.5%からそれぞれカンピロバクターが分離されているが、本研究では、廃

用牛、肥育牛いずれからもカンピロバクターは分離されなかった。採材する部位、検体の量や数などを増やし検討する必要があるかもしれない。

食肉検査時に合格と判定された肥育牛肝臓から細菌はまったく分離されなかったが、廃棄処分となった肝臓にはわずかながら菌が分離された例があった。肥育牛の肝臓は細菌に汚染されることはあるものの、検査時に何らかの病変が認められ廃棄処分になっていると考えられる。一方、廃用牛の肝臓は食肉検査の合否に関わらず細菌が分離された。このことから、廃用牛の肝臓はたとえ検査合格といえども細菌学的には安全とは言えないこ

とが明らかになった。

肝臓から*E. coli*が分離された廃用牛のうち、3頭は肝臓と同時にMLNから、1頭は肝臓と同時に腎臓から*E. coli*が分離された。同一廃用牛の肝臓と他臓器から同時に分離された*E. coli*のPFGEパターン、血清型は一致したことから、腸内細菌である*E. coli*はMLNに侵入したのち生体内を移行し、同時に複数の腸管外臓器を汚染しうることが示唆される。廃用牛は肥育牛と比較して搾乳や出産などによるストレスを受けていると考えられており、腸内細菌叢の変動、免疫能の低下、外傷やストレスなどは、腸管内細菌が宿主の腸管粘膜およびリンパ節を越えて生体内へ侵入する現象を引き起こすことが知られている<sup>6,7)</sup>。このような現象が腸管外臓器での細菌汚染の要因となっている可能性としてあげられる。

本研究により、牛の腸管外臓器の細菌汚染状況が明らかになり、廃用牛の臓器は肥育牛より高いレベルで細菌に汚染されていることがわかった。同一廃用牛の肝臓および他臓器から分離された大腸菌の血清型とPFGEパターンは一致し、廃用牛における腸内細菌の生体内侵入と臓器移行が示唆された。

## 5. 要 約

牛肝臓が細菌に汚染される要因は不明だが、加齢やストレス、栄養不良などにより生体防御能が低下すると腸管内細菌が生体臓器へ移行する可能性が考えられている。本研究では廃用牛と肥育牛の臓器における細菌汚染状況と汚染要因を調査した。鹿児島県内のと畜場に搬入された廃用牛43頭、肥育牛36頭の肝臓、腸間膜リンパ節 (MLN)、腎臓、脾臓を材料とし、無菌的に血液寒天培地で培養後、発育した集落をMALDI-TOF MSを用いて同定した。カンピロバクターの分離にはプレストン培地、CCDA培地を用いた。大腸菌では血

清型別、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) による遺伝子型別、逆受身ラテックス凝集反応によるvero毒素の検出を実施した。43頭の廃用牛のうち33頭、36頭の肥育牛のうち4頭の少なくとも1つの臓器から細菌が分離された。分離された細菌のうち大腸菌、*Bacillus*属、*Streptococcus*属、*Corynebacterium*属がその上位を占めた。カンピロバクターは廃用牛・肥育牛のいずれからも分離されなかった。廃用牛、肥育牛の肝臓の細菌陽性率はそれぞれ41.9%、11.1%であった。食肉検査で合格となった肥育牛の肝臓からは細菌は分離されなかったが、廃用牛の合格肝臓では43.8%から細菌が分離された。MLN、腎臓、脾臓の陽性率は廃用牛でそれぞれ46.5%、41.8%、23.3%であったが、肥育牛ではそれぞれ2.8%、0%、2.8%と低かった。全廃用牛のうち、8頭の廃用牛の肝臓から大腸菌が分離された。そのうち3頭ではMLNからも大腸菌が分離され、その血清型とPFGEパターンは肝臓からの分離株と一致した。1頭の廃用牛からは肝臓と腎臓から同時に大腸菌が分離され、両菌の血清型、PFGEパターンは一致した。vero毒素はすべての大腸菌で検出されなかった。廃用牛の肝臓からは検査の可否にかかわらず菌が分離されたが、肥育牛の合格肝臓からは分離されなかった。肥育牛の肝臓は廃用牛の肝臓と比較して菌汚染率が低いものと思われる。同一廃用牛の肝臓および他臓器から分離された大腸菌のPFGEパターンは一致し、廃用牛における腸内細菌の生体内侵入と臓器移行が示唆された。

## 文 献

- 1) Walker, C., Shi, X., Sanderson, M., Sargeant, J., Nagaraja, T. G. : Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in gut contents of beef cattle at slaughter, *Foodborne Pathog Dis.*, 7, 249~55, 2010.
- 2) Wesley, I. V., Wells, S. J., Harmon, K. M., Green, A., Schroeder-Tucker, L., Glover, M., Siddique, I. : Fecal shedding of *Campylobacter* and *Arcobacter* spp. in

- dairy cattle, *Appl Environ Microbiol.*, **66**, 1994~2000, 2000.
- 3) Wang, Z., Dunlop, K., Long, S. R., Li, L. : Mass spectrometric methods for generation of protein mass database used for bacterial identification, *Anal Chem.*, **74**, 3174~82, 2002.
- 4) Enokimoto, M., Kubo, M., Bozono, Y., Mieno, Y., Misawa, N. : Enumeration and identification of *Campylobacter* species in the liver and bile of slaughtered cattle, *Int J Food Microbiol.*, **118**, 259~63, 2007.
- 5) Acik, M. N., Cetinkaya, B. : The heterogeneity of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from healthy cattle, *Lett Appl Microbiol.*, **41**, 397~403, 2005.
- 6) Gue, M., Sun, J. S., Boudier, T. : Simultaneous localization of MLL, AF4 and ENL genes in interphase nuclei by 3D-FISH: MLL translocation revisited, *BMC Cancer.*, **6**, 20, 2006.
- 7) Herek, O., Kara, I. G., Kaleli, I. : Effects of antibiotics and *Saccharomyces boulardii* on bacterial translocation in burn injury, *Surg Today.*, **34**, 256~60, 2004.



# 腫瘍細胞のモノクローナリティー性状を応用した 牛白血病新規診断法の開発

Development of new diagnostic methods for bovine leucosis by using  
monoclonarity of tumor cell

猪 熊 壽

(帯広畜産大学畜産学部)

Hisashi Inokuma

(Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine)

Monoclonal integration of bovine leukemia virus (BLV) proviral DNA into bovine genomes was detected in peripheral blood from two clinical cases of enzootic bovine leukosis (EBL) without enlargement of superficial lymph nodes. A BLV-specific probe hybridized with 1 to 3 *EcoRI* and *HindIII* fragments in these 2 atypical EBL cattle by Southern blotting and hybridization, as well as in 3 typical EBL cattle. The probe also hybridized to a large number of *EcoRI* and *HindIII* fragments in 5 cattle with persistent leukosis. These results suggest that the detection of monoclonal integration of BLV provirus into the host genome may serve as a marker of monoclonal proliferation and malignancy in difficult to diagnose EBL cattle.

## 1. 目 的

地方病性牛白血病 (EBL) は牛白血病ウイルス (BLV) によって引き起こされる牛の悪性腫瘍である<sup>1-3)</sup>。EBLの臨床徴候は、一般的に食欲不振、元気消失、生産性低下、体表リンパ節腫大等、非特異的である<sup>1,2)</sup>。EBLの確定診断には体表リンパ節または末梢血液中に腫瘍細胞を示すことが必要であるが、通常体表リンパ節の針穿刺吸引 (FNA) が行われる<sup>2)</sup>。しかし、FNAの感度と特異性は、それぞれ38~67%と25~80%であり<sup>4)</sup>、また、異型リンパ球の出現はEBL症例の10.4%のみで認められる<sup>5)</sup>。さらに、EBLでは体表リンパ節の腫大またはリンパ球増多症が認められないものもあり<sup>2)</sup>、このような症例では生前の確定診断

が困難であり、病理解剖によりはじめて確定する。近年、より信頼性の高いEBL発症マーカーとして血清チミジンキナーゼ (TK) 活性が報告されているが<sup>6)</sup>、ラジオイムノアッセイが必要であることが欠点である。また他にも末梢血のインターロイキン2受容体遺伝子やウィルムス腫瘍遺伝子の発現などがEBLの発症マーカーとして研究されているが、感度と特異度に問題がある<sup>7)</sup>。したがって、EBL発症のための新しい診断マーカーが求められている。

ヒトT細胞白血病ウイルス-1 (HTLV-1) はBLVに近縁のウイルスであり、成人T細胞白血病 (ATL) を引き起こす。すべてのATL患者では、腫瘍細胞内にHTLV 1がモノクローナルに組み込まれていること (monoclonal integration)

が、サザンブロット解析により証明されている<sup>8,9)</sup>。この知見は、ATL患者におけるリンパ球のモノクローン性増殖を示唆しており、感染リンパ球の悪性転化マーカーとして用いられている<sup>10,11)</sup>。同様に、BLVのリンパ球への組込みはEBL発症牛でも研究されている<sup>12-16)</sup>。BLVプロウイルスはEBL発症牛の腫瘍細胞ゲノムに、1ないし複数個所組み込まれている<sup>13,16)</sup>。いっぽう、EBL発症の前段階である持続性リンパ球増多症 (persistent lymphocytosis: PL) では、BLVプロウイルスは宿主ゲノムの様々な部位に組み込まれている<sup>3)</sup>。これらの所見は、BLVプロウイルスの宿主ゲノムへの組込みパターン解析が、感染細胞の悪性度診断のマーカーとなりうる可能性を示唆している。これまで報告されたBLVプロウイルス組込みパターンの研究では、体表リンパ節の明らかな腫大を伴う典型的EBL症例だけが材料として用いられており、体表リンパ節腫大やリンパ球増加症を伴わない、いわゆる非定型EBLに対する臨床的有用性は評価されていない。本研究ではBLVプロウイルス組込みパターン解析の非定型EBL発症マーカーとしての有用性を検討した。

## 2. 方 法

臨床診断が困難であった非定型EBL発症牛2頭を供した (Table 1)。症例1は7歳のホルスタイン種 (ATY-1) で、発熱、咳、喘鳴、呼吸困難、起立困難を呈していたが、体表および骨盤腔内のリンパ節腫脹は認められなかった。白血球数増多 ( $12,900/\mu\text{l}$ ) と軽度のリンパ球増多症 ( $6,579/\mu\text{l}$ ) がみられたが、血液塗抹標本では異型リンパ球は認められなかった。BLV抗体は陽性であった。EBL発症が疑われたが、直接的な証拠が得られなかったため、喉頭炎と仮診断された。病理解剖では腸間膜リンパ節、第四胃周囲リンパ節および喉頭周囲のリンパ節が腫大しており、最終

的にEBLと診断された。症例2は6歳のホルスタイン種 (ATY-2) で、突然の食欲廃絶と起立不能を呈し、体表および骨盤腔内のリンパ節腫脹は認められなかった。白血球数増多 ( $13,400/\mu\text{l}$ ) と軽度のリンパ球増多症 ( $9,916/\mu\text{l}$ ) がみられたが、血液塗抹標本では異型リンパ球は認められなかった。BLV抗体陽性とリンパ球増多症からEBL発症を疑ったが、生前には確定診断できなかった。病理解剖では腹腔内リンパ節の腫大が認められ、最終的にEBLと診断された。

対照として計13頭の牛を用いた (Table 1)。典型的EBL発症牛3頭 (TY-1~3) は、いずれもBLV抗体陽性で、体表リンパ節の腫大または末梢血リンパ球数増多症が認められ、かつリンパ節または末梢血に腫瘍細胞が確認されて生前にEBLと診断された。残りの10頭は臨床的には健常であり、陰性対照として用いた。4頭はBLV抗体陽性かつPLを呈した (PL-1~4)。5頭はBLV抗体陽性であるがPLは認められなかった (BLV-1~5)。1頭はBLV抗体陰性でリンパ球増多もみられなかった (N1)。なお、リンパ球数基準はBendixen's keyを用いた。

末梢血200  $\mu\text{l}$  からQIAamp<sup>®</sup>DNAミニキット (Qiagen) を用いてゲノムDNAを抽出し、分析まで-30℃で保管した。DNA約10  $\mu\text{g}$  をEcoRIまたはHindIII (Roche Diagnostics) で消化し、1.0%寒天ゲルで50V、7.5時間泳動したのち、PVDF膜に転写した<sup>12)</sup>。ハイブリダイゼーション用のBLV *tax*遺伝子特異的プローブは、511bpのPCR産物をアルカリホスファターゼ標識し、CDP-Star (RPN3690, GE Healthcare) システムを用いて作成した<sup>17)</sup>。ハイブリダイゼーションはプローブ4 ng/mlを用いて、65℃で実施した。シグナルは高性能オートラジオグラフィフィルム (アマシャム) を使用して検出した。

**Table 1** Profiles of 2 atypical enzootic bovine leukosis (EBL) cattle and 13 control cattle

| Group and ID                                   | Breed | Sex | Age (months) | White blood cell count (/ul) | Lymphocyte count (/ul) | BLV antibody | TK (U/L) | Clinical findings                               |
|--|-------|-----|--------------|------------------------------|------------------------|--------------|----------|---|
| Atypical EBL without lymphadenopathy           |       |     |              |                              |                        |              |          |   |
| ATY-1  | HF    | F   | 94           | 12,900                       | 6,579                  | +            | 51.0     | Fever, cough, wheezing, astasia                 |
| ATY-2  | HF    | F   | 72           | 13,400                       | 9,916                  | +            | 52.5     | Anorexia, astasia                               |
| Control Animals                                |       |     |              |                              |                        |              |          |   |
| Typical EBL                                    |       |     |              |                              |                        |              |          |   |
| TY-1   | HF    | F   | 89           | 266,700                      | 258,699                | +            | 1000.0   | Anorexia, depression, anemia, diarrhea, astasia |
| TY-2   | HF    | F   | 50           | 104,000                      | 102,960                | +            | 1000.0   | Anorexia, anemia, lethargy, lymphadenopathy     |
| TY-3   | HF    | F   | 21           | 46,200                       | 43,890                 | +            | 40.0     | Anorexia, depression, lymphadenopathy           |
| Persistent lymphocytosis                       |       |     |              |                              |                        |              |          |   |
| PL-1   | HF    | F   | 69           | 16,700                       | 10,251                 | +            | NT       | Clinically healthy                              |
| PL-2   | HF    | F   | 54           | 14,400                       | 9,792                  | +            | NT       | Clinically healthy                              |
| PL-3   | HF    | F   | 53           | 14,300                       | 11,011                 | +            | NT       | Clinically healthy                              |
| PL-4   | HF    | F   | 46           | 14,700                       | 11,319                 | +            | NT       | Clinically healthy                              |
| BLV infection without persistent lymphocytosis |       |     |              |                              |                        |              |          |   |
| BLV-1  | HF    | F   | 66           | 8,300                        | 5,395                  | +            | NT       | Clinically healthy                              |
| BLV-2  | HF    | F   | 64           | 7,500                        | 4,050                  | +            | NT       | Clinically healthy                              |
| BLV-3  | HF    | F   | 61           | 6,900                        | 3,657                  | +            | NT       | Clinically healthy                              |
| BLV-4  | HF    | F   | 53           | 9,700                        | 6,208                  | +            | NT       | Clinically healthy                              |
| BLV-5  | HF    | F   | 41           | 8,600                        | 4,730                  | +            | NT       | Clinically healthy                              |
| Clinically normal without BLV infection        |       |     |              |                              |                        |              |          |   |
| N-1  | HF    | F   | 51           | 8,600                        | 5,676                  | -            | NT       | Clinically healthy                              |

HF : Holstein Friesian, F : Female, BLV : bovine leukemia virus, TK : thymidine kinase, NT : not tested

### 3. 結果と考察

EBLおよび非EBL牛のハイブリダイゼーションの結果をそれぞれFig. 1とFig. 2に示す。非定型EBL発症牛2頭と典型的EBL発症牛3頭では、いずれも1～3本の明白なバンドが認められた(Fig. 1)。いっぽう、PL牛4頭では、BLV*tax*遺伝子特異的プローブが、多くの断片と反応しており、*EcoRI*断片では8 kbp以上の部位に、また*HindIII*断片では5 kbp以上の部位にスメアとして認められた(Fig. 2)。BLV抗体陽性でPLを呈していない5頭のうち3頭(BLV-3～5)では

*EcoRI*断片でスメアパターンがみられ、残りの2頭では反応がみられなかった(Fig. 2)。BLV-3と4の2頭には*HindIII*断片においてもスメアパターンが認められた。その他の牛では何の反応もみられなかった。

BLVは牛のBリンパ球に感染しDNAに無作為に組み込まれるため、腫瘍化していない牛では、BLVプロウイルスの組込みはポリクローナルである<sup>12-14)</sup>。しかし、いったん細胞の悪性転化が生じると、Bリンパ球はモノクローナルに増殖するため、BLVプロウイルスの組込み部位も特定の場所に集中する<sup>12-14)</sup>。このため、ハイブリダイゼー

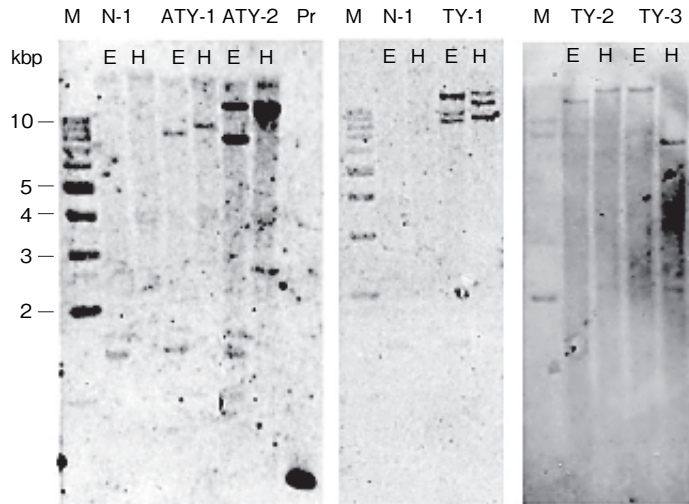


Fig. 1 Hybridization of the BLV *tax* probe to *EcoRI* and *HindIII* fragments in 2 atypical and 3 typical EBL cases. The probe hybridized with 1 to 3 *EcoRI* and *HindIII* fragments in these cases. ATY-1 and 2: Atypical EBL. TY-1, 2 and 3: Typical EBL cases with obvious lymphadenopathy and/or remarkable lymphocytosis. N-1 : Negative controls without persistent lymphocytosis or BLV infection. H: *EcoRI* digestion, H: *HindIII* digestion, M: Marker, Pr: PCR product of 511 bp was used as the DNA probe.

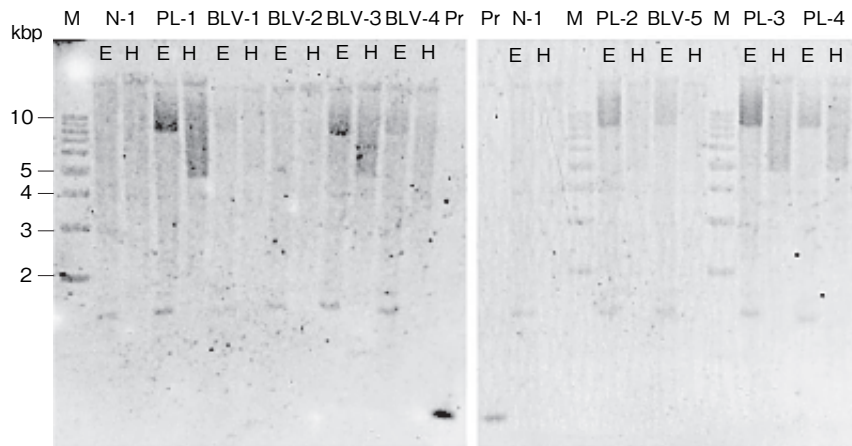


Fig. 2 Hybridization of the BLV *tax* probe to *EcoRI* and *HindIII* fragments in non-EBL cattle, including 4 cattle with persistent lymphocytosis (PL), 5 BLV infected cattle and 1 BLV-negative healthy cow. Integration patterns of the 5 PL cattle showed a 'smear' for both *EcoRI* and *HindIII* fragments. *EcoRI* fragments from three (BLV-3, 4 and 5) among five cattle with BLV infection without lymphocytosis showed a 'smear' pattern; however, samples from the remaining two cattle showed no smear. *HindIII* fragments from 2 (BLV-3 and 4) among five cattle positive for BLV infection without lymphocytosis showed also a 'smear' pattern. PL-1 to 4 : Clinically normal cattle with persistent lymphocytosis and BLV infection. BLV-1 to 5 : Clinically normal cattle with BLV infection but normal lymphocyte counts. N-1 : Negative control without persistent lymphocytosis or BLV infection. E: *EcoRI* digestion, H: *HindIII* digestion, M : Marker, Pr: PCR product of 511 bp which was used as the DNA probe.

ション解析を行うと、EBL発症牛では1または複数の明瞭なバンドを形成することになる。このようなモノクローナルな組込みパターンはEBL発症牛におけるBリンパ球の腫瘍性増殖を示唆する。逆に、PL牛またはBLV感染牛でみられたスメアパターンはBLV感染リンパ球のポリクローナル性を示唆するものである。BLV感染牛の中には、バンドがまったくみられないものもあったが、これはBLV感染量が検出限界以下であったと考えられた。

今回の結果は、腫瘍細胞におけるBLVプロウウイルスのモノクローナルな組込みに関する以前の報告と一致するものである<sup>3,16)</sup>。しかし、本研究では体表リンパ節腫大を伴わず、臨床的に診断が困難であった非定型EBL発症牛の末梢血から抽出したゲノムDNAを材料として用いており、BLVプロウウイルスの組込みパターン解析のEBL発症診断マーカーとしての有用性を評価する点がこれまでと異なる試みである。本研究の結果から、サザンプロットとハイブリダイゼーションを用いたBLVプロウウイルスの組込みパターン解析は、非定型的EBLにおける発症マーカーとなりうることが示唆された。また、末梢血塗抹標本の顕微鏡検査により異型リンパ球が認められないEBL発症例においても、末梢血リンパ球が腫瘍性に増殖していることが示唆された。今後、本方法を臨床診断に応用するにあたっては、多くの症例を解析することにより、その感度と特異性について十分に検討する必要があると思われる。

本研究の成果はThe Journal of Veterinary Medical Science, 76 (2015)に掲載された。

#### 4. 要 約

本研究ではBLVプロウウイルス組込みパターン解析が非定型EBLの発症マーカーとして有用であるかどうかを検討した。体表リンパ節の腫大が無

く、臨床的に確定診断が困難であった非定型EBL発症牛2頭の末梢血から抽出したDNAを材料として、サザンプロット解析を行ったところ、1～3本の明白なバンドが認められた。BLVプロウウイルスはEBL発症牛ゲノムDNAにモノクローナルに組み込まれていることが示された。いっぽうBLV感染しているが発症していない牛のサザンプロット解析ではスメアが認められ、BLVプロウウイルスの組み込みはポリクローナルであった。サザンプロットとのハイブリダイゼーションを用いたBLVプロウウイルスの宿主ゲノムへの組み込みパターン解析は、非定型的EBLにおける発症マーカーとなりうることが示唆された。

#### 文 献

- 1) Angelo's, J. A., Thurmond, M. C. : Large Animal Internal Medicine 5th ed. (Smith, B.P. ed.), 1070～1073. Mosby Elsevier, Burlington, 2015.
- 2) Garry, F. : Rabun's Diseases of Dairy Cattle, 2nd ed. (Divers T. J. and Peek, S. F. eds.), 624～633. Saunders Elsevier, St. Louis, 2008.
- 3) Reed, V. I. : *Can. Vet. J.*, **22**, 95～102, 1981.
- 4) Washburn, K. E., Streeter, R. N., Lehenbauer, T. W., Snider, T. A., Rezabek, G. B., Ritchey, W., Meinkoth, J. H., Allison, R. W., Rizzi, T. E., Boileau, M. J. : *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **230**, 228～232, 2007.
- 5) Burton, A. J., Nydam, D. V., Long, E. D., Divers, T. J. : *J. Vet. Intern. Med.*, **24**, 960～964, 2010.
- 6) Sakamoto, L., Ohbayashi, T., Matsumoto, K., Kobayashi, Y., Inokuma, H. : *J. Vet. Diagn. Invest.*, **21**, 871～874, 2009.
- 7) Tawfeeq, M. M., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Furuoka, H., Inokuma, H. : *J. Vet. Med. Sci.*, **75**, 1213～1217, 2013.
- 8) Yamaguchi, K., Seiki, M., Yoshida, M., Nishimura, H., Kawano, F., Takastuki, K. : *Blood*, **63**, 1235～1240, 1984.
- 9) Yoshida, M., Seiki, M., Yamaguchi, K., Takastuki, K. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 2534～2537, 1984.
- 10) Cook, L. B., Melamed, A., Niederer, H., Valganon, M., Laydon, D., Foroni, L., Taylor, G. P., Matsuoka, M., Bangham, C. R. : *Blood*, **123**, 3925～3931, 2014.
- 11) Takemoto, S., Matsuoka, M., Yamaguchi, K., Takastuki, K. : *Blood*, **84**, 3080～3085, 1994.
- 12) Coulson, J., Daniel, R. C. W., Lavin, M. F. : *Arch. Viral.*, **119**, 13～23, 1991.
- 13) Hetman, R., Clutter, Y., Mammerickx, M., Rotival,

- M. M., Bernardi, G., Burny, A., Chantrenne, H. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2577~2581, 1980.
- 14) Hetman, R., Meunier-Rotival, M., Cortadas, J., Cuny, G., Ghysdael, J., Mammerickx, M., Burny, A., Bernardi, G. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4822~4826, 1979.
- 15) Murakami, H., Yamada, T., Suzuki, M., Nakahara, Y., Suzuki, K., Sentsui, H., *Virus Res.*, **156**, 107~112, 2011.
- 16) Onuma, M., Sagata, N., Okada, K., Ogawa, Y., Ikawa, Y., Oshima, K. : *Microbiol. Immunol.* **26**, 813~820, 1982.
- 17) Costa, J. M. P., Sumitra, L. M., Saguaro, A. C. : *J. Viral. Meth.*, **137**, 29~33, 2006.

## 牛卵管機能に及ぼす夏季暑熱ストレスの影響 ～性ホルモン受容体とヒートショックタンパク質の関係性～

Effects of summer heat stress on the bovine oviductal functions

～Relationship between the receptors of sex steroid hormones and heat shock proteins～

山本 ゆ き・奥 田 潔

(岡山大学大学院環境生命科学研究科)

Yuki Yamamoto and Kiyoshi Okuda

(Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University)

Summer heat stress depresses fertility in cattle. Recently, we have shown that heat shock protein (HSP) 90 expression in the bovine oviduct in summer is higher than in winter. Mammalian oviducts play key roles in fertilization, in early embryonic development and in gamete/embryo transport. Oviductal function is regulated by several steroid hormones. Since HSP90 binds to receptors of these hormones and makes them activated in cytosol, high expression of HSP90 in the oviduct can affect functions of steroid hormone receptors in summer. Here, we compared expressions of sex steroid hormone receptors (estrogen receptor  $ER\alpha$ ,  $ER\beta$  and progesterone receptor (PR)) and glucocorticoid receptor ( $GR\alpha$ ), which also binds to HSP90 in cytosol in bovine oviducts in winter and summer. The oviducts were collected from 6 cows in winter and 6 cows in summer. All the cows were at ovulation day. Messenger RNA expressions of  $ER\alpha$ ,  $ER\beta$  and PR were insignificantly different in winter and in summer. Interestingly,  $GR\alpha$  expression was lower in summer than in winter. In addition, the previous study has shown that plasma concentrations of glucocorticoid show abnormality in hot condition. Because of high expression of HSP90 and low expression of  $GR\alpha$  in summer season, the effects of steroid hormones on oviductal cells might be affected by high temperature in summer season. Further study about the effects of high temperature on oviductal function induced by steroid hormones is needed to clarify the mechanism of summer infertility in cattle.

### 1. 目 的

牛において、夏季の気温の上昇による暑熱ストレス (heat stress; HS) は、発情徴候の微弱化、卵胞の発育異常による排卵障害、初期胚の死滅な

どを引き起こし、受胎率を低下させることが報告されている。そのため、近年の地球温暖化に伴い、より広い地域において夏季の受胎率低下が生じ、畜産業が損害を被ることが懸念されている。本研究では、雌性生殖器官である卵管に着目する。卵

管は、受精および初期胚（受精卵）の発育の場であると同時に、配偶子／初期胚を輸送する生殖器官であることから<sup>1,2)</sup>、卵管機能異常は初期胚の死滅に直結する。近年我々は、夏場の暑熱が牛卵管の熱ショックタンパク質90（HSP90）の発現を亢進させることを見出した<sup>3)</sup>。HSP90は、性ホルモンであるエストロゲンやプロジェステロンの受容体機能に密接に関係している。エストロゲンおよびプロジェステロンは雌性生殖器官の機能を支配するホルモンであり、卵管においては初期胚輸送のための平滑筋運動や上皮細胞の繊毛活性を調節する。性ホルモン受容体は細胞質内のHSP90と結合した状態でリガンドが結合可能な活性化状態を保つ。そのため、夏季の暑熱条件下でHSP90発現が亢進されることでリガンドが結合可能な性ホルモン受容体が増加し、過剰なシグナルが誘導されることで卵管機能に悪影響を及ぼす可能性が考えられる。さらに、HSP90はグルココルチコイド受容体にも結合することが知られている。グルココルチコイドはいわゆるストレスホルモンとして知られ、ストレスを受けると盛んに副腎から分泌されることが知られている。グルココルチコイド受容体は細胞質中ではHSP90と複合体を形成しており、リガンドであるグルココルチコイドと結合することによってHSP90との結合が切断され、細胞核内に受容体が移行し、転写因子として作用する。これまでに、暑熱ストレスを受けた牛の血中グルココルチコイド濃度が上昇することが報告されていることから、暑熱ストレスを受けた牛において、グルココルチコイド受容体の機能にも何らかの障害が生じている可能性も考えられる。

本研究では、暑熱下における卵管要因の不妊メカニズムを明らかにすることで、夏季暑熱下においても家畜の繁殖効率を維持することを最終目標とし、卵管機能における性ホルモン受容体（エス

トロジェン受容体およびプロジェステロン受容体）およびグルココルチコイド受容体と、HSP90との関係性を明らかにすることを試みた。

## 2. 方法

### 2.1 牛卵管のサンプリング

岡山市食肉センターならびに津山市食肉センターより、と殺後30分以内の牛卵管（膨大部）を採取した。採取した卵管は氷冷した生理食塩水中で保管し岡山大学まで輸送した。2011年11月21日～2012年3月1日に採取した卵管を冬季サンプルとして、2012年7月23日～2012年9月6日に採取した卵管を夏季サンプルとして実験に供した。なお、冬季期間および夏季期間の平均気温はそれぞれ5.7℃および27.5℃であった。夏季期間の最低気温と最高気温の範囲は22.1～36.8℃であり、かつ同期間（46日間）のうち33日間において最高気温が33℃以上を記録した。乳牛は気温が25℃を超えるとストレスの影響を受け始めると言われており、本研究で夏季期間に卵管を採取した牛は、十分な暑熱ストレスを受けていたと推察される。なお気温に関する記録は気象庁ホームページ (<http://www.jma.go.jp/jma/index.html>) より入手した。

採取した卵管は、Okudaら（1988）<sup>4)</sup>の方法にしたがって卵巣ならびに子宮の肉眼的所見により排卵周期を推定した。子宮広間膜より卵管を切り取り、余分な組織を除去した後、液体窒素中で凍結および破碎し、total RNAならびにタンパク質の抽出に用いた。

### 2.2 卵管組織中のTotal RNA抽出および第1鎖cDNAの合成

液体窒素中で凍結した卵管組織より、定法に基づきtotal RNAを抽出した。抽出したRNAより、iScript™ Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (BioRad Laboratories) を用いて第1



鎖cDNAを合成した。

### 2.3 Realtime Reverse Transcription

#### Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法

夏季および冬季における卵管組織中の卵巣ステロイドホルモン受容体およびグルココルチコイド受容体遺伝子発現量を解析するため、Real-time RT-PCR法により各mRNA発現量を測定した。解析は比較Ct法を用いて行った。

### 2.4 卵管組織からのタンパク質抽出およびタンパク質濃度測定

液体窒素で凍結した卵管組織から、タンパク質分解酵素阻害剤存在下、かつ氷冷下でホモジナイズした。ホモジナイズ溶液を濾過し、回収した濾液をさらに超音波破碎した。その後遠心分離によって得た上清を回収してタンパク質サンプルとした。タンパク質サンプル溶液中のタンパク質濃度は、Bicinchoninate法により測定した。タンパク質標準液には牛血清アルブミン (O-1200  $\mu$ g/ml) を用いた。

### 2.5 共免疫沈降法およびWestern blotting法

HSP90と各受容体が細胞中で結合しているかどうかを解析するために、抽出したタンパク質サンプルを共免疫沈降に供した。抗HSP90抗体を磁気ビーズに結合させ、抽出タンパク質サンプルと混和し、磁石によって集められた磁気ビーズ結合タンパク質中の卵巣ステロイドホルモン受容体ならびにグルココルチコイド受容体の発現をWestern blot法により検出した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 夏季および冬季におけるステロイドホルモン受容体遺伝子発現量の比較

牛卵管組織におけるエストロゲン受容体 (ER $\alpha$  および ER $\beta$ )、プロゲステロン受容体 (PR) ならびにグルココルチコイド受容体 (GR $\alpha$ ) の夏季および冬季間での発現量比較を行った。そ

の結果、ER $\alpha$ 、ER $\beta$ ならびにPR mRNA発現の、夏季および冬季間における差異は認められなかった (Fig. 1)。このことから、性ステロイドホルモン受容体の発現自体に暑熱ストレスは影響を及ぼさないと推察された。その一方で、排卵日の卵管におけるGR $\alpha$  のmRNA発現が、冬季と比較して夏季においては低いことが明らかとなった (Fig. 2)。GRのリガンドであるグルココルチコイドは、ストレスホルモンとして知られ、実際に暑熱ストレスを受けた牛において、血中のグルココルチコイド濃度が異常となることがこれまでに明らかとなっている<sup>5,6)</sup>。副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドは、血液を介して全身に廻り渡り、それぞれの臓器・器官に発現するGRを介して炎症反応の抑制や様々なホルモン分泌に作用する。グルココルチコイドのターゲットである炎症メディエーターのひとつにプロスタグランディン (PG) があげられ、グルココルチコイドはPGの分泌を抑制することが、広範な組織において報告されている。一方で卵管におけるPGの重要な役割のひとつに、初期胚の輸送に必須である平滑筋運動の調節があげられる。PGは平滑筋の収縮と弛緩を調節することで、ぜん動運動を含む卵管平滑筋運動に関与している。本研究において夏季卵管のGR $\alpha$  発現が抑制されたことから、夏季の環境によって血中グルココルチコイド濃度が異常となる他、リガンドを受け取る卵管側のレセプター発現量も影響を受けることが示された。このことから、通常期と比べて夏季の卵管では、グルココルチコイドによるPG分泌の抑制が低水準にとどまり、より大量のPG分泌が促されることで平滑筋運動に影響が及び、その結果、配偶子および初期胚輸送に異常が生じて不受胎を引き起こす可能性がある。

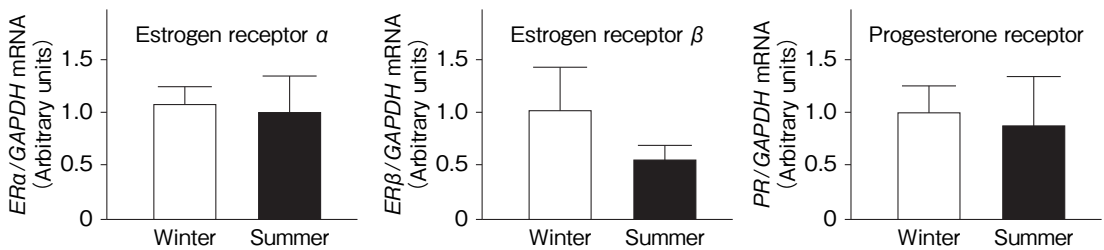


Fig. 1 Messenger RNA expressions of estrogen receptor $\alpha$ , estrogen receptor $\beta$  and progesterone receptor in bovine oviducts (n = 6) in the ovulation day in winter (November 21, 2011–March 1, 2012) and summer (July 23, 2012–September 6, 2012). There were no significant differences ( $P > 0.05$ ; Student's t-test).

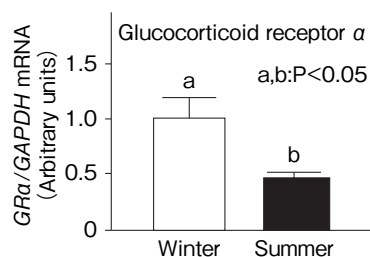


Fig. 2 Messenger RNA expressions of glucocorticoid receptor $\alpha$  in bovine oviducts (n = 6) in the ovulation day in winter (November 21, 2011–March 1, 2012) and summer (July 23, 2012–September 6, 2012). Different superscript letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ; Student's t-test).

### 3.2 卵管における活性型ステロイドホルモン受容体の発現

性ステロイドホルモン受容体およびグルココルチコイド受容体は、細胞質中でHSP90と結合することで活性化し、リガンドと結合したのちにHSP90と解離、リガンド-受容体複合体は核内に移行して転写因子として作用する。そこで細胞質中における活性型ステロイドホルモン受容体量の変化を明らかにするために、HSP90と受容体との結合を共免疫沈降法により検出することを試みる。現在、タンパク質サンプルの調整や共免疫沈降法、Western blot法の実験条件等の検討を進めている段階である。

今後、共免疫沈降法による活性型ステロイドホルモン受容体の発現量を明らかにするとともに、

高温条件によって卵管細胞のステロイドホルモンに対する反応性に変化が起こるか否かを、牛卵管細胞培養法を用いて検討することを予定している。

## 4. 要 約

牛において、夏季の暑熱ストレス (summer heat stress; HS) は受胎率を低下させる一因であることが知られている。Heat shock protein (HSP) は熱ストレスにより発現が増強されるタンパク質で、牛卵管において、冬季と比較し夏季におけるHSP90の発現量が上昇することを、近年著者らが明らかとした。卵管は受精の場かつ初期胚の輸送に重要な器官であり、卵管の機能は性ステロイドホルモンに支配されることが知られる。この性ステロイドホルモンの受容体は細胞質内でHSP90と結合しており、夏季にHSP90の発現量が

変化することで、ステロイド受容体の機能にも何らかの影響が出る可能性がある。本研究では、性ステロイドホルモン受容体 ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$  および PR) と、同様に HSP90 と結合することの知られるグルココルチコイド受容体 ( $GR\alpha$ ) の発現量を冬季と夏季で比較した。牛卵管 (膨大部) は、冬季および夏季それぞれ 6 頭の排卵日の牛から採取した。各受容体の遺伝子発現を冬季と夏季間で比較したところ、 $ER\alpha$ ,  $ER\beta$  ならびに PR の発現量には冬季と夏季の間で有意な変化が認められなかった。その一方、 $GR\alpha$  の mRNA 発現量は、冬季と比較し夏季において低いことが明らかとなった。過去の報告において、ストレスホルモンであるグルココルチコイドの血中濃度は、暑熱ストレスを受けた牛において異常を示すことが知られており、本研究において、それを受け取る側の受容体の発現も異常となることが明らかとなった。夏

季において、HSP90 の発現量が上昇しグルココルチコイド受容体の発現量が低下することから、ステロイドホルモンによる卵管への作用に影響が生じることが推察された。今後、高温環境がステロイドホルモンを介した卵管細胞機能制御にどのような影響を与えるかを明らかにする必要がある。

#### 文 献

- 1) Menezo, Y., Guerin, P., *Euro J Obst Gynecol Reprod Biol.*, **73**, 99~104, 1997.
- 2) Greve, T., Callesen, H., *Reprod Nut Develop.*, **41**, 451~459, 2001.
- 3) Kobayashi, Y., Wakamiya, K., Kohka, M., Yamamoto, Y., Okuda, K., *Reproduction*, **146**, 103~110, 2013.
- 4) Okuda, K., Kito, S., Sumi, N., Sato, K., *Vet Rec.*, **123**, 80~183, 1988.
- 5) Abilay, T A., Mitra, R., Johnson, H D., *J Anim Sci.*, **41**, 113~117, 1975.
- 6) Wise, M E., Armstrong, D V., Huber, J T., Hunter, R., Wiersma, F., *J Dairy Sci.*, **71**, 2480~2485, 1988.

# 牛心臓由来ペプチドを活用した革新的コレステロール代謝改善素材開発のための基礎研究

Basic study of the development of an innovative hypocholesterolemic food materials using cattle heart peptides

長 岡 利

(岐阜大学応用生物科学部)

Satoshi Nagaoka

(Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

Only a few reports have dealt with the effects of animal protein and animal protein hydrolysate on cholesterol metabolism. The cattle heart protein hydrolysate ultra-filtrate (HPHU, MW < ca. 1,000 Da peptides fraction) derived from HPH imparts a stronger hypocholesterolemic activity than HPH in rats. Thus, after purification of HPHU by a reverse phase chromatography and gel filtration chromatography, we try to identify the active hypocholesterolic peptide derived from HPHU using in vitro assay related to micellar solubility of cholesterol in vitro. Micellar solubility of cholesterol was significantly decreased by HPHU RP1, RP2 or RP3 (purified by a reverse phase chromatography) -group compared to CTH-group. Micellar solubility of cholesterol was significantly decreased by HPHU gf3 (purified by a gel filtration chromatography) -group compared to CTH-group. Micellar solubility of cholesterol was significantly decreased by gf3-RPI, gf3-RPII or gf3-RPIII (purified by a reverse phase chromatography) -group compared to CTH-group.

## 1. 目 的

一般に、大豆タンパク質などの植物性タンパク質は、カゼインなどの動物性タンパク質と比較して、抗動脈硬化作用を有すると考えられている<sup>1)</sup>。しかし、現在活発に行われている有効成分の検討により<sup>2~10)</sup>、このような血清コレステロール低下作用は動物性素材にも見られることが明らかにされている。実際に、私は、牛乳の乳清タンパク質が、動物性タンパク質でありながら大豆タンパク質よりも、強力な血清コレステロール低下作用を

発現することを発見し検討している<sup>2,3)</sup>。また、主要な食糧資源でありながら、従来ほとんど検討がなされていない畜産食品素材のうち、牛肉ペプチド、牛レバーペプチドが体内コレステロール低下作用を有することも見出した<sup>6)</sup>。さらに、昨年度の研究で、動物性食餌タンパク質である牛肉に再度着目し、畜産資源の高度有効利用という観点から、廃棄部位を含めた各部位である牛肉、牛心臓、牛赤血球、牛血漿加水分解物を用いた研究を行った結果、特に牛心臓加水分解物 (HPH) が強力なコレステロール代謝改善作用を発現するこ

とを発見した<sup>7)</sup>。

さらに、我々の既報<sup>8-10)</sup>の研究手法を用いて、牛心臓タンパク質加水分解物 (HPH) のコレステロール低下作用機構を明らかにした。コレステロールミセル溶解性はカゼインよりもHPHで有意に低下した。Caco-2細胞のコレステロール吸収抑制はカゼインミセルよりもHPHミセルで有意に高かった。血清コレステロールはカゼインよりもHPHで有意に低かった。放射性コレステロールで測定したコレステロール吸収はカゼインと比べてHPHで有意に減少し、HPHのコレステロール低下作用は空腸のコレステロール吸収阻害によるものである。さらに、HPH由来の牛心臓タンパク質加水分解物の限外濾過物 (HPHU, 分子量約1000ダルトン以下のペプチド分画物) は、ラットにおいてHPHよりも強力なコレステロール低下作用を示すことを発見し、報告した<sup>11)</sup>。

そこで、本研究では、ペプチド混合物であるHPHUのコレステロール代謝改善作用に寄与する活性ペプチドを特定するために、HPHU由来ペプチドの分画精製を実施し、*in vitro*のコレステロールミセル溶解性試験を行った。

## 2. 方法

### 2.1 実験1

HPHUを逆相クロマトグラフィー (RPC) により3分画 (RP 1~3) し、CHOLミセル溶解性に対する影響を評価した。なお、HPHUの逆相クロマトグラフィーによる分画は、島津高速液体クロマトグラフィーにより、TSK-GEL ODS-80Ts (東ソー) を用いて行った。

### 2.2 実験2

HPHUをゲル濾過クロマトグラフィー (GFC) により4分画 (gf 1~4) し、CHOLミセル溶解性に対する影響を評価した。なお、HPHUのゲル濾過クロマトグラフィーによる分画は、AKTA

avant 25 (GE Healthcare) 高速液体クロマトグラフィーにより、HiLoad 26/60 Superdex 30 pg (GE Healthcare) を用いて行った。

### 2.3 実験3

実験2で得られたサンプル (gf 3) をRPCにより4分画 (gf3-RPI~IV) し、CHOLミセル溶解性に対する影響を評価した。なお、実験2で得られたサンプル (gf 3) のRPCによる分画は、AKTapurifier 10 plus (GE Healthcare) により、SOURCE 5 RPC ST 4.6/150 (GE Healthcare) を用いて行った。

なお、実験結果の統計的分析には、Duncan's Multiple Range-Testを用いた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 実験1

Fig. 1に、HPHUのRPCによる溶出パターンを示した。

HPHUのRPCによる分画物であるRP 1, RP 2, RP 3はカゼイントリプシン加水分解物 (CTH) と比較して、コレステロールミセル溶解性が有意に低下した (Table 1)。

### 3.2 実験2

Fig. 2に、HPHUのGFCによる溶出パターンを示した。

HPHUのGFCによる分画物であるgf 3はCTHと比較して、コレステロールミセル溶解性が有意に低下した (Table 2)。

### 3.3 実験3

Fig. 3に、gf 3のRPCによる溶出パターンを示した。

HPHUのGFCによる分画物であるgf 3はCTHと比較して、コレステロールミセル溶解性が低下傾向を示し、さらに、gf 3のRPCによる分画物であるgf3-RPI, gf3-RPII, gf3-RPIIIでは有意に低下した (Table 3)。

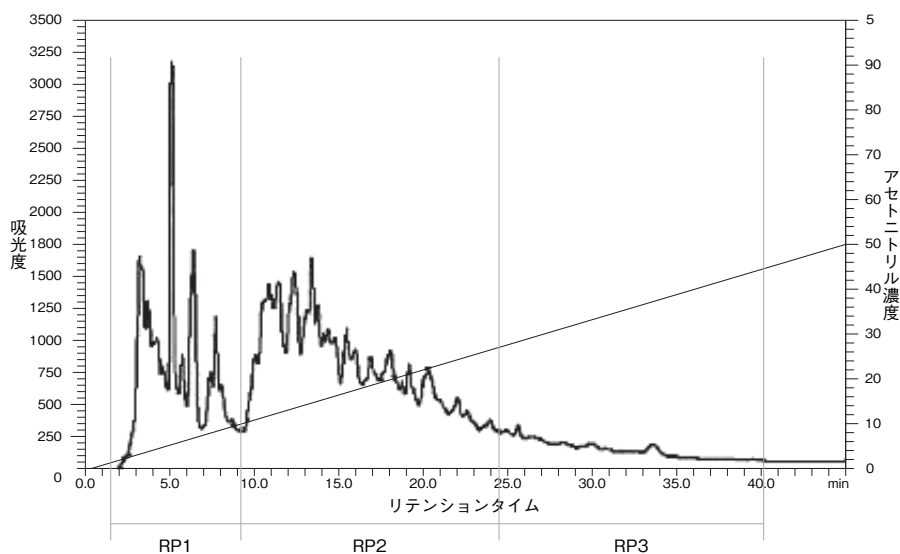


Fig. 1

Table 1 Effects of samples (5mg/ml) on micellar solubility of cholesterol

| sample    | concentration | micellar solubility of cholesterol (%) |
|-----------|---------------|--|
| CTH       | 5 mg/ml       | 90.6 ± 3.3 c                           |
| HPHU      | 5 mg/ml       | 79.2 ± 2.6 b                           |
| HPHU RP 1 | 5 mg/ml       | 57.4 ± 1.4 a                           |
| HPHU RP 2 | 5 mg/ml       | 72.2 ± 1.2 b                           |
| HPHU RP 3 | 5 mg/ml       | 61.1 ± 1.5 a                           |

1. The data are Means ± SEM of 4 samples per group.

2. Means with different letters are significantly ( $P < 0.05$ ) by Tukey's multiple range test.

CTH : Casein Tryptic Hydrolysate

HPHU : Cattle Heart Protein Hydrolysate Ultrafiltrate

HPHU RP : Cattle Heart Protein Hydrolysate Ultrafiltrate Reverse Phase Chromatography Fractionate

なお、予備的な機器分析によるペプチド分析から、gf3-RPI, gf3-RPII, gf3-RPIIIは、種々のペプチドの混合物であることから、活性ペプチドの特定のためには、さらなる分画精製が必要である。

#### 4. 要 約

私たちはHPHU由来の牛心臓タンパク質加水分解物の限外濾過物（HPHU、分子量約1000ダルトン以下のペプチド分画物）は、ラットにおいて

HPHよりも強力なコレステロール低下作用を示すことを発見し、報告した。

そこで、本研究では、ペプチド混合物であるHPHUのコレステロール代謝改善作用に寄与する活性ペプチドを特定するために、HPHU由来ペプチドの分画精製を逆相クロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィーにより実施し、分画物について、in vitroのコレステロールミセル溶解性試験を行った。その結果、gf3のRPCによる分画

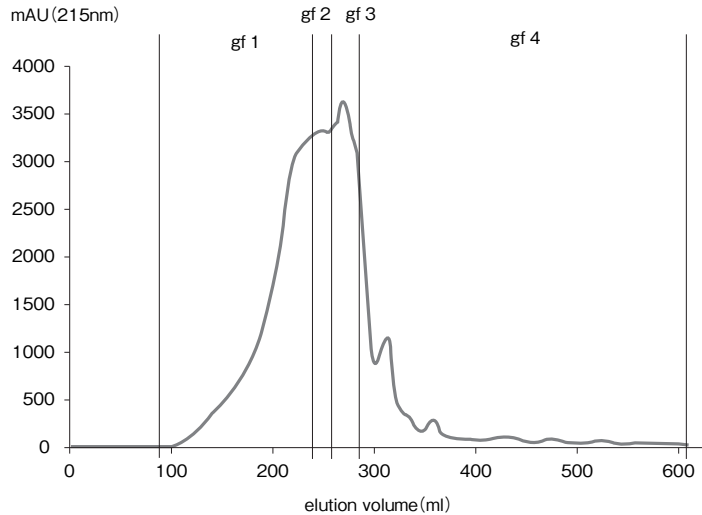


Fig. 2

Table 2 Effects of samples (5mg/ml) on micellar solubility of cholesterol

| sample    | concentration | micellar solubility of cholesterol (%) |
|-----------|---------------|--|
| CTH       | 5 mg/ml       | 90.7 ± 3.3 b                           |
| HPHU      | 5 mg/ml       | 79.1 ± 2.6 a                           |
| HPHU gf 1 | 5 mg/ml       | 95.6 ± 1.7 b                           |
| HPHU gf 2 | 5 mg/ml       | 96.2 ± 2.3 b                           |
| HPHU gf 3 | 5 mg/ml       | 79.9 ± 2.0 a                           |
| HPHU gf 4 | 5 mg/ml       | 105.4 ± 3.4 b                          |

1. The data are Means ± SEM of 4 samples per group.

2. Means with different letters are significantly ( $P < 0.05$ ) by Tukey's multiple range test.

CTH : Casein Tryptic Hydrolysate

HPHU : Cattle Heart Protein Hydrolysate Ultrafiltrate

HPHU gf1~4 : Cattle Heart Protein Hydrolysate Ultrafiltrate Gel Filtration Fraction 1 ~ 4

物であるgf3-RPI, gf3-RPII, gf3-RPIIIでは有意に低下した。活性ペプチドの特定のためには、さらなる分画精製が必要である。

#### 文 献

- 1) Carroll, K. K., Hamilton, R. M. G. : *J. Food Sci.*, **40**, 18, 1975.
- 2) Nagaoka, S., Kanamaru, Y., Kuzuya, Y., Kojima, T., Kuwata, T. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1484, 1992.
- 3) 長岡利 : 日本栄養・食糧学会誌, **49**, 303, 1996.
- 4) Iwami, K., Sakakibara, K., Ibuki, F. : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1217, 1986.
- 5) Sugano, M., Goto, S., Yamada, Y., Yosida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T., Kimoto M. : *J. Nutr.*, **120**, 977, 1990.
- 6) 長岡利 : 食肉に関する助成研究調査成果報告書 336, 1998.
- 7) 長岡利 : 食肉に関する助成研究調査成果報告書 378, 1999.
- 8) Nagaoka, S., Awano, T., Nagata, N., Masaoka, M., Hori, G., Hashimoto, K. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 354, 1997.
- 9) Nagaoka, S., Miyazaki, H., Oda, H., Aoyama, Y.,

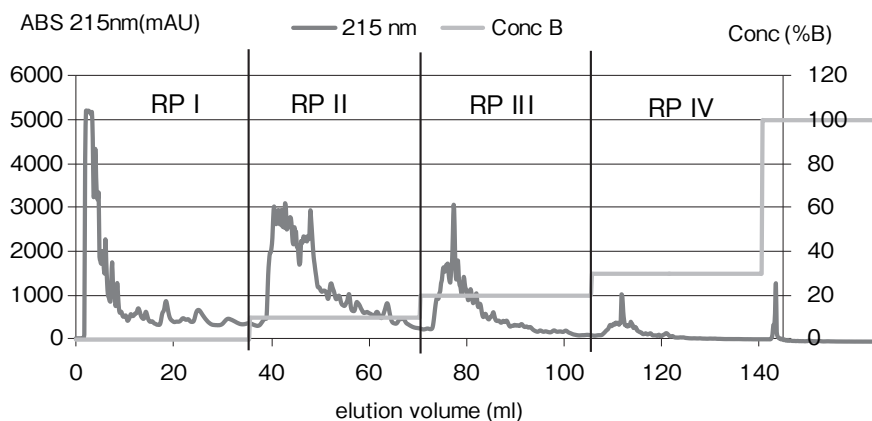


Fig. 3

**Table 3** Effects of samples (5mg/ml) on micellar solubility of cholesterol

| sample         | concentration | micellar solubility of cholesterol (%) |
|----------------|---------------|--|
| CTH            | 5 mg/ml       | 90.6 ± 3.3 c                           |
| HPHU           | 5 mg/ml       | 79.0 ± 2.6bc                           |
| HPHU gf3       | 5 mg/ml       | 83.0 ± 5.7 c                           |
| HPHU gf3-RPI   | 5 mg/ml       | 64.9 ± 2.2ab                           |
| HPHU gf3-RPII  | 5 mg/ml       | 65.3 ± 2.1ab                           |
| HPHU gf3-RPIII | 5 mg/ml       | 62.7 ± 1.0 a                           |
| HPHU gf3-RPIV  | 5 mg/ml       | 80.7 ± 2.8 c                           |

1. The data are Means ± SEM of 4 samples per group.

2. Means with different letters are significantly ( $P < 0.05$ ) by Tukey's multiple range test.

CTH : Casein Tryptic Hydrolysate

HPHU : Cattle Heart Protein Hydrolysate Ultrafiltrate

HPHUGf3 : Cattle Heart Protein Hydrolysate Ultrafiltrate Gel Filtrate Fraction 3

HPHUGf3-RPI ~ IV : Cattle Heart Protein Hydrolysate Ultrafiltrate Gel Filtrate Fraction 3 Reverse Phase Chromatography Fraction I~IV

Yoshida A. : *J. Nutr.*, **120**, 1134, 1990.

10) Nagaoka, S., Miwa, K., Eto, M., Kuzuya, Y., Hori, G., Yamamoto, K. : *J. Nutr.*, **129**, 1725, 1999.

11) Nakade, K., Kaneko, H., Oka, T., Ahmed, A. M., Muguruma, M., Numata, M., Nagaoka, S. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 607, 2009.



## 牛用腸溶性生菌剤カプセルが牛の腸内細菌相に与える影響

Effect of administration of the enteric coated probiotic capsule on bacterial flora in cattle intestine

瀬山 智博・平康 博章・吉田 弦・笠井 浩司

(地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所)

Tomohiro Seyama, Hirofumi Hirayasu, Gen Yoshida and Koji Kasai

(Local incorporated administrative agency Research Institute of Environment, Agriculture and Fisheries, Osaka Prefecture)

Effect of lactic acid bacterium, delivered by enteric capsule on intestinal flora of cattle was discussed. The enteric coated capsules, containing  $3 \times 10^{11}$  cfu of *Lactobacillus coryniformis* subsp. (JCM 1099) for each were orally administrated to lactating cows once a day for consecutive 7 days. Various DNA, including 16S rDNA of the administrated lactic acid bacterium were picked up from the feces, collected every 24 hours after the administration in order to examine the changes in intestinal flora. DNA detection was done by the denaturing gradient gel electrophoresis. The 16S rDNA of JCM 1099 was detected from a fecal sample of one cow out of two, which were administrated with enteric capsules containing powdered JCM 1099, while none was detected from the cows treated with blank capsules and powdered JCM 1099 separately (control). The changes in intestinal flora were analyzed by using Next Generation Sequencer. No difference was seen in the change of relative abundances of *Lactobacillus* between capsule administrated cows and control cows, nevertheless, there was a significant change in relative abundances of *Ruminococcus* and *Paraprevotella* between two groups. In addition, principal component analysis proved that the distribution of metagenomic data from intestinal flora of capsule administrated cows and control cows tended to be separated into two different groups by PCO 1 and PCO 2. These results suggest that intestinal flora of cattle could be changed by administration of lactic acid bacterium using enteric coated capsule.

### 1. 目 的

近年、宿主に有益な作用をもたらす微生物を投与することで、腸内細菌相の菌種構成を改善するプロバイオティクスが、ヒトの健康維持に役立つという報告が多くなされている<sup>1~3)</sup>。そして、こ

のプロバイオティクスは畜産分野にも応用されつつある。鶏や豚、魚では、プロバイオティクスによって増体率や免疫力の向上が確認されている<sup>4~6)</sup>。一方、反芻動物である牛では、巨大な第一胃が微生物発酵槽となっており、経口摂取した乳酸菌がこの第一胃で希釈され、あるいは死滅す

るため、腸には限られた菌種しか届いていないことが明らかにされており<sup>7)</sup>、生菌剤の直接経口投与によるプロバイオティクス効果は期待できない。

我々は、成牛での乳酸菌製剤の利用の最大の障壁が、第一胃での死滅や希釈にあると考え、これらを防ぐため、乳酸菌を腸溶性カプセルに封入した。このカプセルは、比重を1.3に、直径を6mmに設定して、反芻を回避して速やかに反芻胃を通過する<sup>8)</sup>。また、中性から弱酸性の第一胃液内で溶解せず、下部消化管で崩壊あるいは溶解して、内容物を放出する。この腸溶性カプセルを用いて、菌を生きたまま高濃度に牛の腸に届けて腸内細菌相を変化させることができれば、牛用プロバイオティクスの可能性が広がる。そこで、本研究では、乳酸菌を含有する腸溶性カプセルの投与が牛の腸内細菌相に与える影響を検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 実験1：乳牛排せつ物培地を用いた乳酸菌培養試験

本研究では、文部科学省のナショナルバイオリソースプロジェクトを通じて、理研バイオリソースセンターから提供を受けた牛排せつ物由来乳酸菌 (JCM 1099; *Lactobacillus coryniformis* subsp.) を使用した。JCM 1099はMRS培地 (Becton, Dickinson and Company, New Jersey, USA) を用いて、30℃で培養し、以後の実験に用いた。

既報の培養液の組成を参考に<sup>9)</sup>、牛排せつ物を含む培養液でJCM 1099を48時間培養し、Power soil DNA Extraction Kit (MO BIO Laboratories, Inc., California, USA) でDNAを抽出した。その抽出DNAを鋳型として、リバースプライマーの5'末端にGCクランプを付加した乳酸菌増幅用プライマーペア WBAC-F (5'-GTC GTC AGC TCG TGT CGT GAG A-3'), WBAC-R (5'-CGC

CCG CCG CGC CCC GCG CCC GGC CCG CCG CCC CCG CCC CGG GAA CGT ATT CAC CGC G-3')<sup>10)</sup> を用いて、PCRで乳酸菌16S rDNAの増幅を行った。増幅条件は、初期変性94℃ 5分、35サイクルの変性94℃ 30秒、アニーリング60℃ 30秒、伸長72℃ 1分、最終伸長72℃ 7分とした。変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) はDCode (Bio-Rad Laboratories, Inc., California, USA) を用いて、8%アクリルアミド、30~60%変性剤濃度勾配ゲルで60℃ 5.5時間、150V定電圧で200ngのPCR増幅産物の泳動を行った。

### 2.2 実験2：カプセル投与試験

ホルスタイン種泌乳後期牛4頭 (平均分娩後日数295±29日, 平均体重670.3±52.9kg) を供試した。試験区は、1頭1日あたり3\*10<sup>11</sup>cfuのJCM 1099を含むカプセルを午前10時に牛 (No. 3-4) に投与した。対照区は、同じタイミングで、3\*10<sup>11</sup>cfuのJCM 1099凍結乾燥菌粉末をPBSに懸濁して、試験区と同量のブランクカプセルとともに牛 (No. 1-2) に投与した。投与は1週間継続して行った (1から7日目)。最初の投与直前と、投与から24時間ごと、さらに最初の投与から14日目に排せつ物を直腸から約500g回収した (1から8日目と14日目)。約500gの排せつ物を滅菌容器内で均一になるように混合し、そのうち250mgをDNA抽出に用いた。

抽出したDNAを鋳型に、16S rDNAのV3-V4領域を増幅した。プライマーは16S Amplicon PCR Primer (Forward: 5'-TCG TCG GCA GCG TCA GAT GTG TAT AAG AGA CAG CCT ACG GGN GGC WGC AG-3', Reverse: 5'-GTC TCG TGG GCT CGG AGA TGT GTA TAA GAG ACA GGA CTA CHV GGG TAT CTA ATC C-3') を用いた<sup>11)</sup>。このPCR産物を用いて、Illumina MiSeqシステム (Illumina, Inc., California, USA) で細菌相を解析した。得られたFASTQ

データはMG-RAST (<https://metagenomics.anl.gov/>) で解析を行った。データの帰属分類群推定はRibosomal database project (RDP) を利用した。

### 2.3 統計解析

各個体を変量効果、投与後経過時間と処理区を固定効果として、一般化線形混合モデルで統計解析を行った。解析はR statistical software (version 3.1.0: [www.r-project.org](http://www.r-project.org)) を使用した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 実験1：乳牛排せつ物培地を用いた乳酸菌培養試験

牛排せつ物由来の乳酸菌 (JCM 1099) の排せつ物中での生存性を、乳牛排せつ物培地を用いた培養試験で確認した。培養試験後のDNA抽出サンプルのDGGE結果をFig. 1に示す。JCM 1099は培養開始後48時間まで、死滅することなく検出することができた。ただし、培養開始直後と比較して、24時間後、48時間後ではバンドが薄くなっていることから、その生存数はやや減少傾向にあると考えられる。JCM 1099が牛排せつ物から採取、単離された菌であることと、この乳牛排せつ物培地を用いた乳酸菌培養試験の結果を合わせて考慮すると、プロバイオティクスとして投与した場合、一定期間、腸内で生存することが可能と推察された。そこで、以後の試験にもJCM 1099を用いることとした。なお、加熱殺菌した菌を用いて、同様の培養試験を行っており、死菌のDNAは24時間以内に分解されることを確認している (データ省略)。

### 3.2 実験2：カプセル投与試験

JCM 1099を凍結乾燥し、カプセル化してから牛に投与し、排せつ物を継時的に回収して、DGGE法で投与乳酸菌 (JCM 1099) の16S rDNA検出を試みた。しかし、投与対象牛の常在乳酸菌

の16S rDNAと、JCM 1099の16S rDNAのバンド位置が近接しており、1回のDGGEでは明瞭な鑑別が不可能であったため、JCM 1099 16S rDNAの位置を含む領域をアクリルアミドゲルから切り出し、DNAを抽出した。この抽出DNAを鋳型として、ネステッドPCRと2nd DGGEを行い、JCM 1099の16S rDNAの検出を試みた。ネステッドPCRには、JCM 1099の16S rDNA PCR産物塩基配列 (データ省略) を用いて、データベース上の既知*L. coryniformis*塩基配列 (Accession No.

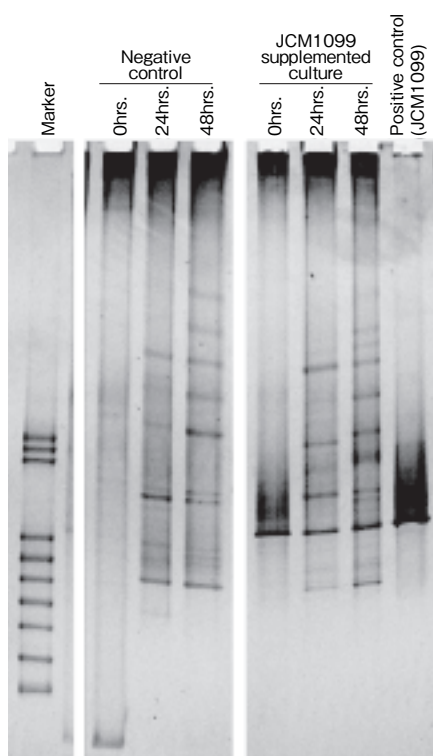


Fig. 1 Result of denaturing gradient gel electrophoresis of the PCR product that amplified 16S rDNA region V7-8. DNA was extracted after static batch culture fermentation. Negative control was not supplemented any lactic acid bacterium, and positive control was the amplified 16S rDNA of pure cultured JCM 1099. 0hrs; DNA extraction was done immediately after starting static batch culture fermentation. 24hrs. and 48hrs; DNA extraction was done after 24hours or 48hours later.

KP189215.1) と比較して2塩基の挿入があった部位(塩基番号1012-1026)に3'末端がくるようにプライマーを設計した。その結果、カプセル投与牛2頭のうち、1頭の排せつ物から投与乳酸菌の16S rDNAを検出した(Fig. 2)。排せつ物からJCM 1099の16S rDNAが検出できたのは、試験開始後6日目のサンプルだけであった。この理由は、JCM1099は排せつ物中で死滅しにくいものの、増殖する能力を有しなかったために、排せつ物中の菌濃度が低くなっていたことによると考えられる。

腸内細菌相全体に占める乳酸菌割合とその変化を明らかにするため、次世代シーケンサを用いたメタゲノム解析を実施した。各サンプルから、平均147種の属が検出された(Table 1)。相対存在比が0.5%以上の主要な19属について、投与期間中の相対存在比の変化をTable 2に示す。有意差検定は、各牛個体(No.1-4)を変量効果、経過時間と処理区を固定効果とした比較を一般化線形混合モデルで行った。*Ruminococcus*と*Paraprevotella*では、それぞれの属が腸内細菌相に占める割合の経時変化について、試験区、対照区間に差があり( $p < 0.01$ )、*Prevotella*と*Phaeocystis*、*Alkaliphilus*では、それぞれ差がある傾向が見られた(順に  $p = 0.0578$ ,  $p = 0.0517$ ,  $p = 0.0837$ )。*Ruminococcus*は、対照区で試験開始前を基準とした相対値が投与期間を通じて増減しないのに対して、乳酸菌をカプセル化して投与した試験区では、明瞭に増加した。また、*Paraprevotella*では、対照区で減少しているのに対して、試験区では変動しなかった。このことから、カプセル化乳酸菌の投与が、腸内細菌相の一部の属の構成比に影響を与えることが示された。一方、JCM 1099が属する*Lactobacillus*については、区間に有意な差は見られなかった( $p = 0.7273$ )。これは、乳牛排せつ物培地を用いた乳酸菌培養試験の結果のように、JCM1099が排

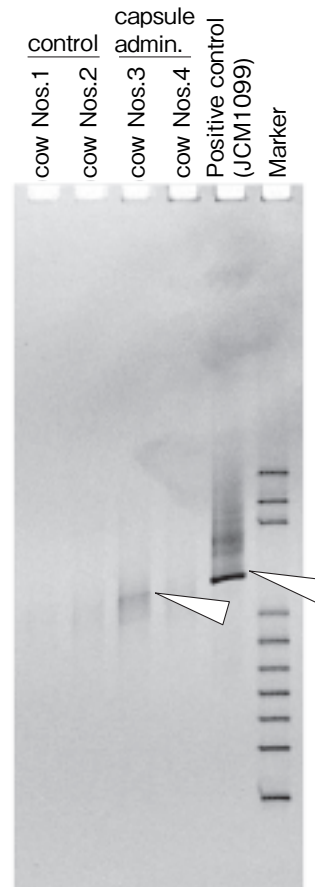


Fig. 2 Result of denaturing gradient gel electrophoresis of the PCR product that amplified 16S rDNA region V7-8. DNA was extracted from the excrement of six days after the administration. Control; blank capsule and freeze dried JCM 1099 powder were administered. Capsule admin.: Capsuled JCM 1099 was administered. Arrow head shows the 16S rDNA of JCM 1099.

Table 1 average number of detected genera

| animal Nos. | treatment <sup>a</sup>  | No. of average sequence reads | No. of average detected genera |
|-------------|-------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 1           | control                 | 175,116                       | 140                            |
| 2           |                         | 79,300                        | 147                            |
| 3           | JCM 1099 capsule admin. | 103,446                       | 150                            |
| 4           |                         | 74,872                        | 147                            |

<sup>a</sup> Control was administrated freeze dried JCM 1099 powder and blank capsule.

Table 2 Changes of relative value of different bacterial genera

| bacterial genera  | treatment <sup>a</sup> | Relative value of abundances against to before administration |       |       |       |       |       |       |       | significant difference <sup>b</sup> |
|---|------------------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------------|
|   |                        | day 1   | day 2 | day 3 | day 4 | day 5 | day 6 | day 7 | day 8 |                                     |
| <i>Ruminococcus</i>                                       | capsule admin.         | 1.74  | 1.38  | 1.60  | 2.77  | 2.08  | 2.38  | 2.26  | 4.49  | **                                  |
|   | control                | 0.93  | 0.73  | 1.20  | 1.41  | 1.78  | 1.23  | 1.05  | 0.86  |                                     |
| <i>Paraprevotella</i>                                     | capsule admin.         | 0.21  | 0.44  | 1.11  | 0.96  | 0.98  | 0.85  | 0.76  | 0.77  | **                                  |
|   | control                | 1.37  | 0.71  | 0.52  | 0.54  | 0.44  | 0.15  | 0.21  | 0.48  |                                     |
| <i>Prevotella</i>   | capsule admin.         | 1.03  | 0.97  | 0.76  | 0.66  | 0.65  | 0.58  | 0.58  | 0.49  | †                                   |
|   | control                | 0.83  | 2.30  | 1.52  | 1.17  | 1.21  | 1.59  | 1.17  | 1.79  |                                     |
| <i>Phaeocystis</i>  | capsule admin.         | 0.83  | 0.83  | 0.77  | 0.68  | 0.86  | 0.72  | 0.61  | 0.60  | †                                   |
|   | control                | 0.91  | 1.03  | 0.62  | 0.86  | 0.95  | 1.16  | 0.99  | 1.06  |                                     |
| <i>Alkaliphilus</i>                                       | capsule admin.         | 0.94  | 0.92  | 0.89  | 0.96  | 1.20  | 1.05  | 0.96  | 1.14  | †                                   |
|   | control                | 0.70  | 1.38  | 2.27  | 1.87  | 1.29  | 2.04  | 1.49  | 2.46  |                                     |
| <i>Eubacterium</i>  | capsule admin.         | 0.79  | 0.71  | 0.89  | 0.76  | 1.07  | 0.98  | 0.92  | 0.78  | n.s.                                |
|   | control                | 1.14  | 0.82  | 2.37  | 2.22  | 1.22  | 2.01  | 2.30  | 1.30  |                                     |
| <i>Clostridium</i>  | capsule admin.         | 1.14  | 1.31  | 1.12  | 1.38  | 1.12  | 1.04  | 1.25  | 1.04  | n.s.                                |
|   | control                | 1.16  | 1.49  | 0.76  | 0.73  | 1.14  | 0.68  | 1.17  | 1.35  |                                     |
| <i>Bacteroides</i>  | capsule admin.         | 0.96  | 0.88  | 0.91  | 0.77  | 0.69  | 0.60  | 0.85  | 0.57  | n.s.                                |
|   | control                | 1.19  | 1.07  | 0.82  | 0.74  | 0.63  | 1.02  | 1.07  | 1.13  |                                     |
| unclassified (derived from <i>Clostridiales</i> )         | capsule admin.         | 1.17  | 1.33  | 0.94  | 1.13  | 0.81  | 0.90  | 0.93  | 0.90  | n.s.                                |
|   | control                | 1.22  | 1.13  | 0.79  | 0.80  | 1.02  | 1.08  | 0.91  | 1.17  |                                     |
| <i>Chloroidium</i>  | capsule admin.         | 0.44  | 0.82  | 0.83  | 0.59  | 0.85  | 0.00  | 0.62  | 0.61  | n.s.                                |
|   | control                | 0.89  | 1.01  | 0.68  | 0.85  | 0.91  | 0.38  | 0.90  | 1.02  |                                     |
| <i>Alistipes</i>  | capsule admin.         | 1.23  | 0.96  | 1.09  | 0.95  | 0.91  | 1.01  | 1.03  | 0.73  | n.s.                                |
|   | control                | 1.19  | 0.95  | 1.42  | 0.90  | 0.81  | 0.90  | 0.97  | 0.89  |                                     |
| unclassified (derived from <i>Ruminococcaceae</i> )       | capsule admin.         | 0.87  | 0.80  | 0.90  | 1.47  | 1.15  | 1.21  | 1.10  | 1.14  | n.s.                                |
|   | control                | 0.70  | 1.03  | 1.19  | 1.51  | 1.07  | 1.53  | 1.09  | 1.19  |                                     |
| <i>Porphyromonas</i>                                      | capsule admin.         | 0.99  | 1.12  | 0.89  | 0.84  | 0.66  | 0.88  | 0.75  | 0.70  | n.s.                                |
|   | control                | 1.41  | 1.27  | 0.87  | 1.09  | 0.95  | 1.03  | 0.88  | 0.85  |                                     |
| <i>Ethanoligenens</i>                                     | capsule admin.         | 1.04  | 1.27  | 1.02  | 1.06  | 1.07  | 1.62  | 1.12  | 1.29  | n.s.                                |
|   | control                | 0.80  | 0.77  | 0.53  | 1.13  | 0.85  | 1.06  | 0.96  | 1.13  |                                     |
| unclassified (derived from <i>Peptostreptococcaceae</i> ) | capsule admin.         | 0.83  | 0.71  | 0.83  | 0.68  | 0.68  | 0.86  | 0.62  | 0.83  | n.s.                                |
|   | control                | 0.78  | 1.03  | 0.75  | 0.74  | 0.87  | 0.87  | 0.88  | 1.13  |                                     |
| <i>Acetivibrio</i>  | capsule admin.         | 1.13  | 1.22  | 1.11  | 1.07  | 1.03  | 0.93  | 1.04  | 0.70  | n.s.                                |
|   | control                | 0.67  | 0.99  | 0.83  | 0.81  | 0.69  | 0.70  | 0.84  | 0.86  |                                     |
| <i>Selenomonas</i>  | capsule admin.         | 1.16  | 1.36  | 1.40  | 1.26  | 1.47  | 1.66  | 1.34  | 1.82  | n.s.                                |
|   | control                | 0.83  | 0.42  | 1.40  | 0.58  | 1.06  | 0.66  | 0.42  | 1.36  |                                     |
| unclassified (derived from <i>Bacteria</i> )              | capsule admin.         | 1.68  | 1.02  | 0.91  | 0.94  | 1.08  | 1.64  | 0.85  | 1.01  | n.s.                                |
|   | control                | 1.63  | 1.38  | 0.75  | 0.84  | 2.18  | 2.79  | 1.69  | 1.13  |                                     |
| <i>Lactobacillus</i>                                      | capsule admin.         | 0.98  | 0.69  | 0.72  | 1.23  | 0.81  | 0.88  | 1.32  | 1.00  | n.s.                                |
|   | control                | 0.76  | 1.06  | 1.40  | 0.87  | 1.37  | 0.90  | 0.79  | 1.24  |                                     |

<sup>a</sup>Control was administrated freeze-dried *L. coryniformis* spp. (JCM 1099) powder and blank capsule.

<sup>b</sup> †, 0.05 < p < 0.1; \*\*, p < 0.01

せつ物中で長く生存することが困難なことから、投与後、腸内に定着、増殖することができなかったことに起因すると考えられる。*Lactobacillus*ではなく、*Ruminococcus*と*Paraprevotella*などの相対存在比が変化した理由は、JCM 1099は腸内で死滅していく一方で、毎日投与されることで、試験期間内は一定数が常に腸内に存在しており、そのことが菌対菌の直接的、あるいは宿主免疫機構やその他の菌を介した間接的な相互作用をもたらしたと推察される。

さらに、MG-RAST serverを用いて主成分解析を行った結果、カプセル投与前 (Nos.1-2; ▽, Nos.3-4; ▼) とカプセル投与終了後7日目 (Nos.1-2; △, Nos.3-4; ▲)、ブランクカプセルおよび粉末化JCM 1099を投与している対照区 (Nos.1-2; ◇) のサンプルのプロットは主成分1と主成分2に広く分布しているのに対して、カプセル化したJCM 1099を投与している期間の試験区 (Nos.3-4; ■) のプロットは、主成分2の上方に集中し、他のプロットと区分できる傾向にあった (Fig. 3)。これは、カプセル化したJCM 1099の投与により、腸内細菌相が、その他の細菌相と異なる、一定の細菌構成に収束する傾向にあったことを示唆するものである。

*L. coryniformis* spp. (JCM 1099) のカプセル投与によって*Ruminococcus*と*Paraprevotella*の相対存在比が有意に増加し、主成分解析ではカプセル投与区と対照区で区分できる傾向にあった。この結果から、反芻胃を有するため、経口摂取した乳酸菌が死滅するとされる牛においても、乳酸菌をカプセル化して投与することで、腸内細菌相に変化をもたらす得ることが明らかになった。この牛用腸溶性カプセルは、牛用のプロバイオティスの可能性を示すものである。

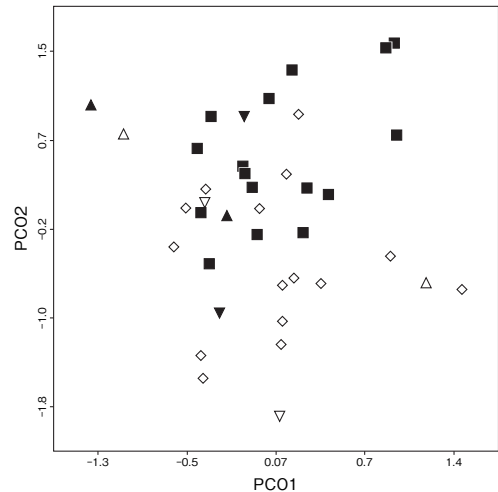


Fig. 3 Principal component analysis of the bacterial composition.

Each sample is shown in a different symbol according to ▽ and ▼; before administration of capsules, △ and ▲; 7 days later of finishing administration, ◇; treated with blank capsules and powdered JCM 1099 separately (control) and ■; administrated with enteric capsules, containing powdered JCM 1099. Furthermore, animal Nos.1-2 (control) are shown in white and Nos.3-4 (administrated with enteric capsules, containing powdered JCM 1099) are in black.

#### 4. 謝 辞

本研究を実施するにあたり、実験の手法や分析に関する御指導をいただきました北海道大学人獣共通感染症リサーチセンターの鈴木定彦教授、中島千絵准教授に深謝いたします。

#### 5. 要 約

本研究では、反芻胃を通過可能な腸溶性カプセルに充填して経口投与した乳酸菌が牛の腸内細菌相に与える影響を検討した。*Lactobacillus coryniformis* subsp. (JCM 1099)  $3 \times 10^{11}$ cfu を含有する腸溶性カプセルを泌乳牛に1日1回、7日間経口投与した。投与後24時間ごとの排せつ物からDNAを抽出して、投与した乳酸菌16S rDNAの

検出と、腸内細菌相の変化を検討した。投与乳酸菌の16S rDNA検出は変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法で行い、カプセル化した*L. coryniformis* subsp.を投与した乳牛2頭のうち1頭から、投与菌16S rDNAを検出した。一方、凍結乾燥した同量の菌粉末とブランクカプセルを投与した対照区では、検出されなかった。腸内細菌相については、次世代シーケンサを用いたメタゲノミクス解析を行った。カプセル投与区と対照区の間で*Lactobacillus*の相対存在量の変化は見られなかったが、*Ruminococcus*と*Paraprevotella*では有意な変化があった。さらに、主成分解析では、カプセル投与区と対照区は主成分2により分離できる傾向にあった。以上から、腸溶性カプセルを用いて、乳酸菌を投与することで、牛の腸内細菌相を変化させ得ることが示された。

## 文 献

- 1) Andersson, H., Asp, N. G., Bruce, A., Roos, S., Wadstrom, T., Wold, A. : *Journal of Nutrition*, **45**, 58~75, 2001.
- 2) Szajewska, H., Mrukowicz, J. : *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **33**, 17~25, 2001.
- 3) Sanders, M. : *Nutrition reviews*, **61** (3), 91~99, 2003.
- 4) Macha, M., Taras, D., Vahjen, W., Arini, A., Simon O. : *Archives of Animal Nutrition*, **58** (6), 443~452, 2004.
- 5) Timmerman, H. M., Veldman, A., van den Elsen, E., Rombouts, F. M., Beynen, A. C. : *Poultry Science*, **85** (8), 1383~1388, 2006.
- 6) Wang, Y., Tian, Z., Yao, J., Li, W. : *Aquaculture*, **277**, 203~207, 2008.
- 7) Wang, C., Han, H., Gu, X., Yu, Z., Nishino, N. : *Animal Science Journal*, **85**, 32~36, 2014.
- 8) Adachi, T., Seyama, T., Hirayasu, H., Kasai, K., Fujitani, Y. : Japanese Patent Application No.017200/PCT JP2015 052754, granted 31 January 2014.
- 9) Rycroft, C., Jones, M., Gibson, G., Rastall, R. : *Journal of Applied Microbiology*, **91**, 878~887, 2001.
- 10) Lopez, I., Ruiz-Larrea, F., Cocolin, L., Orr, E., Phister, T., Marshall, M., Vander Gheynst, J., Mills, D. : *Applied and Environmental Microbiology*, **69** (22), 6801~6807, 2003.
- 11) Kindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., Glockner, O. : *Nucleic Acids Reserch*, 1~11, 2012.

# 動物由来コロナウイルスの遺伝子操作系の確立と感染予防への応用

Establishment of reverse genetics system for animal coronavirus

神 谷 亘

(大阪大学微生物病研究所感染症国際研究センター臨床感染症学研究グループ)

Wataru Kamitani

(Laboratory of Clinical Research on Infectious Diseases, Research Center for Infectious Disease Control, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

Coronaviruses are an enveloped virus carrying a long (~ 27kb), single-stranded, positive-sense RNA genome. Coronaviruses have been identified in mice, chickens, pigs, dogs, cats, and humans. Coronaviruses are associated with respiratory, enteric, hepatic, and central nerves system disease. Reverse genetic system is important and useful tool in Virology filed. However, in coronaviruses, the reverse genetic system is difficult to handle due to the long RNA genome. Porcine Epidemic Diarrhea virus (PEDV), which belongs to the genus alphacoronavirus in the family Coronaviridae, is the etiological agent of porcine epidemic diarrhea. Our purpose is to establish the reverse genetic system for PEDV to understand viral replication and pathogenesis of PEDV. For the system, we chose the Bacterial Artificial Chromosome (BAC) to make the infectious clone. We amplified six cDNA fragments from PEDV (CV777 strain) RNA and the fragments were sequentially cloned into BAC to generate the PEDV infectious clone. Our PEDV infectious clone is useful to understand the replication and pathogenesis of PEDV.

## 1. 目 的

近年、コロナウイルスによる感染症は、医学領域および獣医学領域において重要な感染症の1つである。医学領域においては、2002年度に発生した重症急性呼吸器症候群コロナウイルス (SARS コロナウイルス)、その10年後の2012年度に中東地域で発生している中東呼吸器症候群コロナウイルスが知られている。SARS コロナウイルスは世界中にその感染が拡大したが、幸運にも1年でそ

の感染は終息した。MERSコロナウイルスは、中東地域でいまだにその感染が拡大しており、致死率は30%以上であると報告されている。

一方、獣医学領域では、犬、牛、鳥などでコロナウイルス感染症が知られている。2014年より国内において豚流行性下痢症の原因ウイルスであるPEDVの発生が問題となっている。

ウイルス学領域においてウイルスゲノムに任意の変異を導入できる遺伝子操作系は、いまや基礎ウイルス学に必須の方法である。しかしながら、



コロナウイルスは遺伝子ゲノムとして約30,000塩基のRNAを保有するため、コロナウイルスを用いた遺伝子操作系は非常に困難であり、ごくわずかのグループからの報告のみである<sup>1, 2)</sup>。

動物コロナウイルスの中でも、アウトブレイクしている豚流行性下痢症コロナウイルス (PEDV) は、一度発生するとその経済損失は大きく養豚業界においてコントロールしなければならないウイルス感染症の1つである。PEDVは、コロナウイルス科  $\alpha$  コロナウイルス属に分類され、ワクチンは存在するが、それでもなお、発生しているのが現状である。

PFDVによる感染予防あるいは感染防御のためには、PEDVのウイルス学的性状ならびに分子生物学的特徴を理解することが必須である。しかしながら、前述のようにコロナウイルスに対する遺伝子操作系は困難であり、PEDVに関する遺伝子操作系はごく限られた報告しか存在しない<sup>3)</sup>。

そこで、本研究課題では、PEDVの遺伝子操作系の確立を Bacterial Artificial Chromosome (BAC) システムを用いて完全長の PEDV の cDNA クローンの作製を試みる。

## 2. 方法

### 2.1 材料とコンストラクト

PEDVのCV777株を感染させた培養上清から、TRIzolを用いてウイルスRNAの抽出を行った。抽出したウイルスRNAを用いて、SuperScriptIII (Invitrogen) にてウイルスcDNA合成を行った。合成したcDNAを用いてTable 1 で示すPrimerを用いてPEDVの遺伝子断片を順次合成した。各PEDVの遺伝子断片をサイトメガロウイルスのプロモーターとBGHポリ A シグナルの間に挿入した。さらに、完全長のPEDV cDNAの3'末端には25塩基のA (polyA-25) を付加し、BGHポリ A シグナルとpolyA-25の間には、D型肝炎ウイルス由来のリボザイム配列を挿入することで、サイトメガロウイルスのプロモーターによって合成されるPEDVの完全長のRNAの末端に余分な塩基配列が付加されないように構築した。各遺伝子断片は内部の制限酵素サイトを用いることで、PEDVの完全長のcDNAを構築した。

### 2.2 大腸菌へのBACの形質転換

PEDVの各遺伝子断片とBACを制限酵素で処

Table 1 Primer used for construction of PEDV infectious clone

| Primer name | Primer Sequence                                |
|-------------|--|
| PEDV1       | 5'-cgcaatggtaccATCGATGTTAACAAAACACTT-3'        |
| PEDV2       | 5'-GAGCTCGCTTGC GGCCGCTCCTCCACTCTGGGATGTCTT-3' |
| PEDV3       | 5'-TAGGTACAGTGGATCCTATACGTTTT-3'               |
| PEDV4       | 5'-TAAGCAGTGGAGGCTTCACACAGAG-3'                |
| PEDV5       | 5'-CTCTGTGTGAAGGCTCCACTGCTTA-3'                |
| PEDV6       | 5'-CCTGACCAGAATCGATGTAGCTGAGA-3'               |
| PEDV7       | 5'-TCTCAGCTACATCGATTCTGGTCAGG-3'               |
| PEDV8       | 5'-TTTTGTTAACATCGATGTAATCTGGG-3'               |
| PEDV9       | 5'-gtacagGGCGCCACTTAAAAAGATTTTCTATCTACG-3'     |
| PEDV10      | 5'-GAACATCAATACGCGTGAACGATGA-3'                |
| PEDV11      | 5'-TCATCGTTACACGCTATTGATGTTTC-3'               |
| PEDV12      | 5'-CTCAGGCCTAAAACGTATAGGATCCACTGTACCTA-3'      |

理した後、約150ngのBACに対して、モル比で1 : 3のPEDVの遺伝子断片をT4 ligase (TAKARA) を用いて、16°CでO/Nで反応を行った。その後、エタノール沈殿にて完全に塩を取り除き、30ulのコンピテントセルNEB10beta (NEB) を用いてエレクトロポレーション法にて形質転換を行った。

エレクトロポレーションは、0.1mmギャップのキュベット (Nepagene) を用いて、1700 Vの条件でエポレーター (Roche) を用い行った。

### 2.3 Red/ETによる相同組換え

PEDVの各遺伝子断片を制限酵素でBACに挿入するのが困難な時は、Red/ET Recombination System (GENE BRIDGES) を用いて行った。プロトコールに従い、導入したい領域に50塩基の相同配列を持つセレクションマーカー遺伝子をPCRにより増幅し、Red/ETにより相同組換え反応を行った。次に、導入したい目的の配列に、50塩基の相同配列を持つ領域をPCRにて増幅し、セレクションマーカーと置き換わるように、Red/ETにて相同組換え反応を行った。

### 2.4 Inverse PCRによる塩基配列の修復

塩基配列が報告されているCV777株と異なる場合は、インバースPCR法によるmutagenesis kit (TOYOBO) を用いてデータベースに報告されている塩基配列になるように修復を行った。

### 2.5 塩基配列の確認

塩基配列の確認は、Big Dye v1.1 (Life technologies) を用いて、ABI PRISM 3100にて塩基配列の決定を行った。

### 2.6 BACを用いたPEDV cDNAクローンの作製手順

まず、BACにPEDVの遺伝子断片を挿入するにあたり、BACに、SfoI, MluI, BamHI, StuI, ClaIの制限酵素サイトを挿入しpBAC\_PEDV\_MCSを作製した。新たに付加した制限酵素の配列は

BigDye v1.1を用いて塩基配列を確認した。

次に、PEDVの27221塩基から28033塩基までを人工遺伝子合成 (Eurofine) により合成した。合成した人工遺伝子合成配列とPEDVの24365塩基から27222塩基の領域をPEDV 1とPEDV 2のプライマーを用いてPCRを行い、上記のBAC (pBAC\_PEDV\_MCS) に組み込むことで新たにpBAC\_PEDV\_MCS 1を作製した。

次に (1番目の断片)、PEDVの12493塩基から16353塩基をPEDV 3とPEDV 4のprimerを用いて増幅し上記のpBAC\_PEDV\_MCS 1にBamHIとStuIの制限酵素を用いて挿入し、pBAC\_PEDV\_1とした。

次に (2番目の断片)、PEDVの16328塩基から20893塩基をPEDV 5とPEDV 6のprimerを用いて増幅し上記のpBAC\_PEDV\_1にStuIとClaIの制限酵素を用いて挿入し、pBAC\_PEDV\_1 + 2とした。

次に (4番目の断片)、PEDVの20868塩基から24379塩基をPEDV 7とPEDV 8のprimerを用いて増幅し上記のpBAC\_PEDV\_1 + 2にClaIの制限酵素を用いて挿入し、pBAC\_PEDV\_1 + 2 + 4とした。

次に (5番目の断片)、PEDVの1塩基から6827塩基をPEDV 9とPEDV10のprimerを用いて増幅し上記のpBAC\_PEDV\_1 + 2 + 4にSfoIとMluIの制限酵素を用いて挿入し、pBAC\_PEDV\_1 + 2 + 4 + 5とした。

次に (6番目の断片)、PEDVの6802塩基から12518塩基をPEDV11とPEDV12のprimerを用いて増幅し上記のpBAC\_PEDV\_1 + 2 + 4 + 5にMluIとStuIの制限酵素を用いて挿入し、pBAC\_PEDV\_1 + 2 + 4 + 5 + 6とした。

次に、PEDVのcDNAの5'末端とサイトメガロウイルスのプロモーター領域を制限酵素などの余分な配列の付加なしに塩基配列をつなぎ合わせる

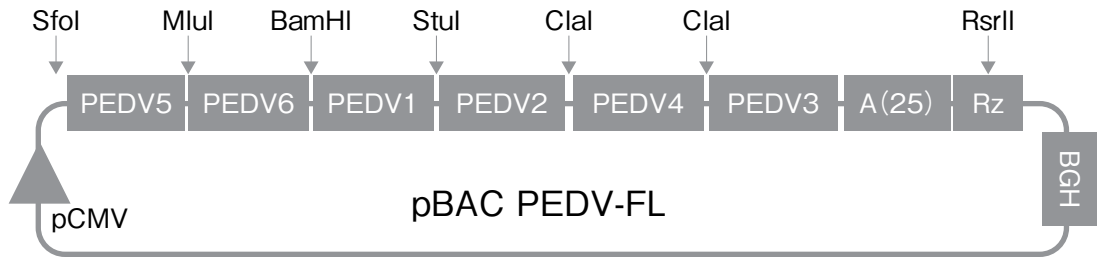


Fig. 1 Strategy to assemble the PEDV infectious clone

Six DNA fragment, generated by using PCR, were sequentially cloned into the plasmid pBelobac 11 to generate the PEDV infectious clone (pBAC PEDV-FL). Relevant restriction sites, pCMV promoter (pCMV), HDV ribozyme (Rz), BGH termination and polyadenylation sequence (BGH) are shown.

ために、Red/ET recombination systemを用いた。

なお、Fig. 1で示す3断片目は、GenBankに報告されている配列 (Genebank, アクセス番号: AF353511.1) と異なる配列であった。そのため、mutagenesis kit (TOYOBO) を用いて、報告されているCV777株に一致する塩基配列になるように修復を行った。

最後に (3番目の断片) を、Red/ET recombination systemを用いて、4番目の下流に挿入した。

### 3. 結果と考察

今回、Bacterial Artificial Chromosome (BAC) を用いて、豚流行性下痢症ウイルス (PEDV) のCV777株を元に、感染性クローンの構築を試みた。感染性クローンは、PEDVの完全長cDNAの5'末端にサイトメガロウイルスのプロモーター配列、そして、3'末端にBGHのポリAシグナルを挿入することで、培養細胞内でサイトメガロウイルスのプロモーターから完全長のPEDVのmRNAが産生される。さらに、PEDVのcDNAの3'末端にD型肝炎ウイルスのリボザイム配列を挿入することで、25塩基のポリA配列を持つウイルスのmRNAが培養細胞内で産生されるように構築した。

Fig. 1に示すようにPEDVの内部の制限酵素配列を用いて、PEDVの完全長のcDNAを6つの断片に分けた。その後、PEDVのそれぞれのcDNA断片をTable 1のprimerを用いてPCRによって増幅し、制限酵素とligaseを用いて、BACに順番に組み込んだ。

その後、挿入したPEDVのcDNA断片の塩基配列をシーケンスにより確認した。

今回用いたCV777株由来のサンプルにおいては、データベース (Genebank, アクセス番号: AF353511.1) に報告されているものと以下の塩基配列が異なっていた。

まず、はじめに、S遺伝子とORF3遺伝子の間に52塩基の欠損が認められた。この欠損によりORF3遺伝子が発現できなくなるため、inverse PCRを用いて欠損領域を修復した。

次に、34番目の塩基がCからT、72番目の塩基のAが欠損、89番目から92番目の塩基TTCCが欠損、22156番目の塩基がCからT、23323番目の塩基がGからA、24461番目の塩基がAからC、26940番目の塩基がCからTへと変わっていた。

上記の欠損に関しては、PEDVのcDNAをクローニング中に欠損したのか、あるいは、今回使用したウイルスストックにすでに塩基の欠損が生じていたのか、今後検討を進めて完全長のcDNA

クローンを作製する必要があると分かった。

今回、PEDVの完全長cDNAをBACに挿入することができた。しかしながら、上述の欠損が認められたため、現在、Red/ETによる相同組換えシステムを用いて、欠損領域の修復を行っている。今後、修復が完了後、pBAC\_PEDV\_FLを培養細胞に導入して組換えウイルスの回収を行う予定である。

今回、用いたBACによるコロナウイルスの感染性cDNAの作製方法は、一度、BACに挿入した後は、遺伝子の変異などが認められず、非常に安定してコロナウイルスのcDNAを保持できる方法であり、Red/ETの相同組換えシステムと組み合わせることで、非常に簡便にGFPなどの外来遺伝子を任意の場所に挿入できることが期待できる。

#### 4. 要 約

コロナウイルスは、遺伝子ゲノムとしてRNAを有し、ヒトおよび動物において重要なウイルス感染症である。コロナウイルスは、RNAウイルスの中で最長のおおよそ30,000塩基を有するエンベロープウイルスである。コロナウイルスの遺伝子操作系は、その取扱いが煩雑で、ごく限られた

グループのみで成功している。豚流行性下痢症の原因ウイルスであるPEDVの感染は畜産業界に大きな経済損失をもたらす。このPEDVの遺伝子操作系を確立することは、PEDVのウイルス学的特徴および性質を理解するうえで必要な技術である。

今回、我々はBacterial Artificial Chromosome (BAC) システムを用いて、PEDVのCV777株の全長をBACに挿入することができた。今後、このPEDVの感染性クローンとRed/ETによる相同組換えにより、任意の変異を加えた変異PEDVの作製ならびにGFPなどの各種レポーター遺伝子を有するレポーターPEDVの作製を行うことにより、PEDVの複製阻害薬のスクリーニングおよびワクチン候補の選択に役立つと思われる。

#### 文 献

- 1) Yount, B., Curtis, K. M., Fritz, E. A., Hensley, L. E., Jahrling, P. B., Prentice, E., Denison, MR., Geisbert, T. W., Baric, R. S., *Proc Natl Acad Sci USA*, **100** (22), 12995~13000, 2003.
- 2) Almazán, F., Dediego, M. L., Galán, C., Escors, D., Alvarez, E., Ortego, J., Sola, I., Zuñiga, S., Alonso, S., Moreno, J. L., Nogales, A., Capiscol, C., Enjuanes, L., *J Virology*, **80** (21), 10900~109006.
- 3) Chunhua Li, Zhen Li, Yong Zou, Oliver Wicht, Frank J M van Kuppeveld, Peter J M Rottier, Berend Jan Bosch, *PLoS one*, **8**, e6997, 2013.

## 赤外線深度センサーによる和牛の分娩予測技術の検討

Prediction technique of parturition by IR depth sensor in beef cattle

小 針 大 助・岡 山 毅

(茨城大学農学部)

Daisuke Kohari and Tsuyoshi Okayama

(College of Agriculture, Ibaraki university)

Prediction of parturition time in breeding cattle using some predictive instruments is helpful for breeding support. Although many sensors put on an animal's body can facilitate prediction of their parturition from changes of some pre-parturition behaviour, a more direct and non-invasive sensing method was formulated using IR depth-sensor cameras. This study clarified the sensing accuracy of IR depth sensor camera systems for assessing the pre-parturition behaviour of breeding cattle. Eight cattle delivered between May and November 2014 to the Field Science Center of Ibaraki University were used as subject animals. Two video cameras and an IR depth-sensor camera were placed at the calving pen. The authors observed four 24-h periods of pre-parturition behaviour such as posture change (standing, lying down), circling, tail lifting, and turning the head to the abdomen. The frequencies and percentages of these behaviours were calculated from the video observation data. Furthermore, these data from video and IR depth-sensor camera were compared and were used to calculate concordance rates. Data were analyzed using software (R ver. 3.1.2; The R Foundation for Statistical Computing). The posture change frequency and the percentage of walking were increased 6 h before calving. Tail lifting was increased 5 h before calving. Turning the head to the abdomen was increased 3 h before calving. Posture, circling and turning the head to the abdomen concordance rates were 90-100%. However, that of tail lifting decreased during 4 h before calving because their condition exhibited some differences. These results demonstrate that the IR depth-sensor camera had high accuracy for detection of pre-parturition behaviour of cattle. Detection of tail lifting requires more definition to discriminate their conditions..

### 1. 目 的

1991年の牛肉の輸入自由化以降、我が国の肉牛生産においては、高脂肪交雑系統の育種改良の増進とそれぞれの系統の生産特性に合わせたきめ細

やかな管理により、輸入牛肉と和牛肉との質的差別化路線がとられてきた。しかしTPP交渉の結果によっては、関税が著しく低い値まで下げられるとの報道もあるように、近年、日本の肉牛生産をめぐる状況は、一層厳しくなりつつある。加えて、

担い手である農業就業人口は、昭和35年以降減少の一途をたどっており、その高齢化も進んでいる。一方で、1戸あたりの飼養頭数は年々増加していることから、これからの我が国の肉牛農家には、飼養頭数の増加に対して現在の品質を維持しつつ、これまで以上に効率的かつ精密な管理が求められているといえる。1頭あたりの生産単価の高い肉牛の生産においては、そのもととなる子牛の確実かつ効率的な生産が不可欠であるが、その中でも分娩時の事故は、子取り生産における大きな問題の一つとなっている。特に逆子や難産時には分娩介助が不可欠となることから、分娩予定日の前後は立ち会いに備えて繁殖牛の観察に気を配る必要がある。しかし、分娩は必ずしも予定どおりに行われるケースばかりでなく、数日間にわたって注意しなければならないことや実際に分娩が始まったとしても、人が寝静まった夜間に始まることも多く、農家にとっては非常に労力が大きい作業となっている。まして前述のような飼養者の高齢化に加えて、1戸あたりの飼養頭数の増加は、分娩監視業務にとってさらなる負担となっており、喫緊に対策が不可欠となる問題であると考えられる。

そこで本研究では、近年急速に低価格化が進んでいる赤外線深度センサーカメラ (IR depth sensor camera) という3次元情報を取り扱うことが可能なセンサーカメラを使用し、繁殖和牛を対象とした簡易かつ高精度の分娩予測技術の確立のための研究を行った。牛の分娩予測の指標としては、これまでにも分娩直前における仙骨韌帯の変化や尾挙上運動の出現<sup>1)</sup>、体温の低下<sup>2)</sup>や活動量の増加、乳房の張り具合の変化などが知られており、従来は1日何回かの肉眼観察やそれらを計測するためのセンサー類を牛体に設置してモニタリングする手法が考えられてきた。しかし、我々が応用を検討している赤外線深度センサーカメラ

では、動物の立体的な体型の経時変化や分娩前における特徴的な行動の変化をリアルタイムで数値情報として直接捉えることが可能である。今回は、まず対象となる分娩前行動の挙動をモニタリングし、次いでそれらの赤外線深度センサーによる記録を試みた。

## 2. 方法

### 2.1 供試牛と飼養方法

調査は茨城大学附属フィールドサイエンス教育研究センターの牛舎で行った。供試牛は、黒毛和種繁殖牛8頭で、分娩予定日の1~2週間前に通常飼育している妊娠牛群から奥行4.0m、幅3.0mの分娩房に移動し、調査に供した。給餌は1日1回16時に乾草・デントコーンサイレージ・濃厚飼料を給餌した。

### 2.2 調査に使用した機器と設置方法

本研究で使用した赤外線深度センサーカメラ (以下深度センサー) はASUS社製のXtion PRO LIVEであった。本深度センサーは、主に赤外線照射部と深度センサーの2つの部分からなり、照射部から無数の赤外線レーザーを一様に照射し、深度センサーカメラで照射範囲内の各反射光の分布の歪みを読み取ることから、対象の3次元情報を得るものである。したがって、深度センサーは、対象となる分娩房が撮影範囲内に収まるように、床から高さ3.5mの位置に設置した。またデータ記録のために防塵ケースに入れたノートパソコン (U24A-PX3210R, ASUS社製) を設置した。さらに各行動の肉眼観察用に、分娩房の床から2.8mの位置にある牛舎の梁に赤外線暗視カメラ (S643TDN, 株式会社ワイケー無線製, 以下暗視カメラ) も2台設置した。

### 2.3 分娩前行動の録画と観察方法

暗視カメラと深度センサーによる録画は、分娩予定日の約1週間前から開始した。暗視カメラは

30フレーム／秒で、深度センサーは1フレーム／5秒で録画した。録画したデータのうち、分娩前24時間分を解析に用いた。カメラデータはパソコンの動画再生ソフトで、深度センサーデータはProcessingを使用して、深度情報をカラースケール画像として生成し、観察を行った。調査項目は分娩房内での姿勢変化（立位・伏臥）、回転（分娩房内を旋回する行動）、尾挙げ、屈曲（頭部を腹部側に向ける行動）の4項目とし、暗視カメラではそれぞれの開始・終了時刻を、深度センサーでは録画時に対象行動の実施の有無を記録した。

## 2.4 統計解析

深度センサーおよび暗視カメラによる分娩前24時間の各行動反応のデータは1時間ごとに集計した。なお、姿勢変化と回転、屈曲は1時間あたりの出現頻度、尾挙げについては1時間あたりの出現割合として算出した。また深度センサーの検知精度確認のため、深度センサーと暗視カメラ両方で撮影ができた個体について、5秒ごとの行動の実施・不実施を記録し、1時間ごとに結果の一致率を算出した。データ解析にはR（version3.1.2）を使用した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 分娩前における母牛の行動変化

姿勢変化の頻度は、分娩24～7時間前にかけては、中央値が5.5～14.5回／hの範囲を推移したが、Miedemaら（2011）<sup>3)</sup>や、Jensen（2012）<sup>4)</sup>と同様に、分娩6時間前付近から徐々に中央値の上昇が見られはじめた（Median：18.5回／h，Mean：23.9回／h）。また、3時間前には一度低下したが（Median：20.5回／h，Mean：36.3回／h）、2時間前に再び上昇し、8頭中6頭で1時間に5回以上姿勢が変化するようになった（Median：6.2回／h，Mean：7.7回／h）。1時間前にはすべての個体で9回以上の姿勢変化が見

られた（Median：13.0回／h，Mean：12.9回／h）。このように、行動型が大きく変化し、特に分娩至近時から急増するといった量的変化は、深度センサーで検知しやすいものと考えられた。

一方、回転頻度は、分娩3時間前まではほとんど見られなかったが、3時間前に中央値で1回／h（Mean：0回／h）、2時間前に2.5回／h（Mean：0.8回／h）と増加した。鳥根県畜産技術センターの報告<sup>5)</sup>では、2時間半くらい前から10数回以上見られるとのことであったが、本結果では、頻度上昇は見られたものの、その値はわずかであり、指標としては慎重に見極める必要があるものと考えられた。

尾挙げ割合は、分娩前24～6時間前は中央値0.7～4.8%の間でほぼ一定に推移したが、その後、5時間前から増加し始め（Median：6.9%，Mean：25.2%）、3時間前には8頭中6頭で、1時間の尾挙げ割合は50%を超え（Median：72.5%，Mean：67.5%）、2時間前には8頭中7頭（Median：100%，Mean：94.8%）で100%、1時間前にはすべての個体で100%となった（Median：100%，Mean：100%）。また、尾挙げ割合は20～40%以上になると分娩まで持続的に実施されており、これを検知することにより、早くて2時間以内に分娩がおこることが予測できる可能性が考えられた。

屈曲頻度は、分娩前24～4時間前の中央値は5.5～18.5回／hと個体によって大きく異なった。3時間前の中央値は20.5回／h、2時間前は26.5回／h、1時間前は34回／hに増加した。しかし第一四分位範囲と第三四分位範囲の差は3時間前で36回、2時間前で13.5回、1時間前は30.5回と大きく、明確な増加傾向が認められるのは分娩1時間前くらいからであった。Jensen（2012）<sup>4)</sup>は、分娩2時間前から頻発すると報告しているが、個体差も大きく、この行動単体ではなく他の行動と

の関係から判断する必要性も考えられた。

### 3.2 赤外線深度センサーによる分娩前行動の検知

牛舎の電圧の低下や停電などにより、一部の深度センサーデータの取得に失敗したため、データが取れたのは3頭のみであった。それぞれの行動について、暗視カメラと深度センサーによる取得データの1時間あたりの一致率を算出した結果、姿勢変化で99.7%、回転で97.7%、屈曲については93.4%とやや落ちるが、それぞれ比較的高い精度で行動が検知できていることが明らかとなった。

一方、尾挙げについては、分娩4～2時間前に一致率が著しく低下した。特に2頭で分娩4時間前に15.0%と47.1%、もう1頭は分娩3時間前に24.3%、2時間前に15.0%まで低下した。この理由として、一つはそれぞれ対象となる尾が深度センサーの撮影範囲外に出てしまっていたこと、もう一つは日光が深度センサーに干渉したことが影響していたと考えられた。これは深度センサーの画角や強い日射による深度センサーの赤外光受光への干渉によるものであり、撮影環境の整備で今後改善可能と考えられた。一方、前述のデータ欠損分を除外して再計算しても、分娩2～4時間前の一致率は30～40%であった。この原因としては、尾の状態により、尾挙げと判断できなかったことが影響していたものと考えられた。特に、排泄後や第一破水の前で多く見られる尾の付け根が少し牛体から離れている状態は、尾根部の挙動が小さいためか、カラースケール画像のみではうまく判別できていなかった。母牛は分娩3～4時間前からいきむことが多く、ここから第一破水までは、この尾の状態が長かったため、この時間の一致率が低下したと考えられた。

しかし今回は、最初の試みとして深度センサーの行動データ取得状況を確認するために、あくまで深度情報をもとに作成したカラースケール画像

を目視で判別したものと的一致率を見ただけであり、本来の利点である深度センサーの3次元情報を十分に活かしていないという問題もあった。特に尾の挙上状態には様々な段階があり、判別には工夫が必要と考えられたが、これこそ本来3次元情報を扱う深度センサーの真骨頂である。現在、各種行動判別のため深度センサーで得られた3次元情報に基づく牛の骨格認識プログラムの開発を試みており、今後それぞれの尾の挙上状態の情報と合わせて解析することにより、尾挙げ行動の検知精度の向上が図れるとともに、より高精度な行動判別法の開発ができるものと考えている。

## 4. 要 約

本研究では、3次元情報を扱うことができる赤外線深度センサーカメラを用いた和牛の非侵襲的分娩予測技術の開発を目的として、予測指標となる和牛の分娩前24時間の行動反応の特定と赤外線深度センサーによるそれら行動反応の記録精度についての調査を試みた。今回、評価分娩前行動とした姿勢変化および尾挙げについては、分娩5～6時間前になると、それまでと比べて大きく変化することから、分娩至近状況を示す有効な予測指標となりうると考えられた。一方、回転、屈曲については、出現頻度が少なかったり、明確な特徴が見られず、予測指標にはしづらいつと考えられた。また、指標行動とした姿勢変化、回転、屈曲行動は、いずれも赤外線深度センサーによる検知精度は非常に高かったが、尾挙げについては微妙な挙動の変化をとらえるためにはさらなる工夫が必要であると考えられた。

## 文 献

- 1) 小迫孝実, 井村毅, 河野道治, 野田博, 日本草地学会誌, 37, 311~312, 1991.
- 2) 池滝孝, 山口光治, 石黒敏夫, 鈴木省三, 帯大研報, 13, 13~18, 1982.



- 3) Miedema, H. M., Cockram, M. S., Dwyer, C. M., Alister, M. I. *Applied Animal Behaviour Science*, **132**, 14~19, 2011.
- 4) Jensen, M. B. : *Applied Animal Behaviour Science*, **139**, 195~202, 2012.
- 5) 島根県農林技術センター, 畜産技術レポート第69号 [https://ssl.pref.shimane.lg.jp/industry/norin/gijutsu/chikusan/report/tikusan\\_gijutsu\\_report.data/69\\_kitaka.pdf](https://ssl.pref.shimane.lg.jp/industry/norin/gijutsu/chikusan/report/tikusan_gijutsu_report.data/69_kitaka.pdf)

## 豚流行性下痢の感染拡大リスクに関する研究

Study on risk analysis of porcine epidemic diarrhea

関 口 敏・乗 峰 潤 三

(宮崎大学農学部)

Satoshi Sekiguchi and Junzo Norimine

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

The porcine epidemic diarrhea (PED) virus, a member of the *Coronaviridae* family, causes acute diarrhea and dehydration in pigs, and it was first identified in Europe in 1971. PED has widely spread in many Asian countries from 2012 and caused economic loss due to high morbidity and mortality in neonatal piglets. In Japan, PED cases were usually detected with syndromic surveillance based on clinical signs and symptoms. Syndromic surveillance system can rapidly detect disease outbreaks, but not detect subclinically infected animals. In contrast, active serosurvey at slaughterhouse enables to detect both infected animals showing clinical signs and subclinically infected animals of infected farms. Additionally, systematic survey at slaughterhouse is very useful in terms of collecting samples, biosecurity and animal welfare. Thus, the aim of this study was to perform active serosurvey to detect infected animals, and to differentiate free farms and infected farms at slaughterhouse. Blood samples of growing-finishing pig were collected at the slaughterhouse in Kyushu area from March 2014 to July 2014. Blood samples were collected from 13 case farms and 95 non-case farms. Seropositive animals were detected in all case farms (100%), and in 15 out of 95 non-case farms (15.8%). This study showed evidence for the existence of subclinical infection with PED virus in non-case farms. In addition, all case farms had infected animals showing positive results with neutralization test. These results indicate active serosurvey system at slaughterhouse is more sensitive than syndromic surveillance system and useful to detect infected farms. To differentiate susceptible farms and infected farms is very important for control measures, especially in prevention of cross-contamination and epidemiological analysis. The data obtained from this study is fed back to livestock hygiene service center and meat inspection center to utilize for effective preventive measures against PED outbreak.

### 1. 目 的

豚流行性下痢 (PED) は、PEDウイルス感染

による豚の下痢を主徴とする急性感染症で、哺乳豚での死亡率は時に100%に達する<sup>1, 2)</sup>。米国では2013年4月から大規模な流行が続いており、31州

で発生が確認されるなどいまだ収まる気配を見せておらず、むしろ深刻化している。同年10月には我が国で7年ぶりとなる発生が沖縄県で確認され、その後わずか8ヵ月で38道県に感染が拡大し、過去最悪の37万頭以上が死亡するなど被害が顕在化している。PEDの防疫措置には消毒などのウイルス侵入対策の徹底や、PED発生農場から非発生農場へのウイルスの混入を防ぐために両農場間における動物の移動を自粛する等の対策が実施されている<sup>3)</sup>。しかしながら、いまだにPEDウイルスが感染拡大する要因は明らかになっておらず、発生農場数は増加の一途をたどっている。我が国や米国で認定されているPED発生農場とは、豚が臨床症状を示し、PEDの診断検査で陽性となった農場のことを示す。すなわち、症状を確認してから検査を依頼する現行の制度（受動的サーベイランス）ではウイルスに感染した状態でも豚が症状を示さない農場（不顕性感染農場）、あるいは生産者が症状に気づかない農場は検査の対象にならず非発生農場として扱われる。このことは動物やヒト、物の移動によって不顕性感染農場から非感染農場にウイルスが侵入する可能性を示唆している。これに対し、症状の有無に関わらずすべての調査対象農場から豚をランダムに抽出して検査する方法（能動的サーベイランス）では、症状にとらわれず感染状態と非感染状態を識別することができる。感染農場と非感染農場を正確に把握できれば、移動制限の徹底が可能になるだけでなく、両者を比較し相違点を明らかにすることでウイルスの侵入・感染拡大の原因（リスク因子）を明らかにすることができる。また、PEDウイルス感染が猛威をふるう中、依然として感染を免れている農場も少なくない。このことは非感染農場に共通した感染を防ぐ要因（防御因子）が存在する可能性がある。そこで本研究は、能動的サーベイランスを用いて感染農場と非感染農場を

識別することを目的とする。

## 2. 方法

### 2.1 調査対象地域

これまでの受動的サーベイランスのデータから、調査対象地域を宮崎県内のA地域およびB地域とした。調査対象農場は発生農場が13農場、非発生農場が95農場とした。検査試料はA地域およびB地域それぞれに所在すると畜場にて採材を行った。採材は2014年3月から同年7月に行った。

### 2.2 検査試料

1農場あたり14～30頭の肥育豚（約190日齢）の放血血液を採取し、4℃、2000gで5分遠心後、血清を-20℃で保存した。

### 2.3 中和試験

56℃で30分間非動化した血清50μlにイーグルMEMを50μl加え、96穴プレート1ウェルあたり50μlずつ2倍段階希釈系列を作成した。各ウェルに200TCID<sub>50</sub>/50μlに調整したPEDウイルスNK94株（動物衛生研究所より供与）を50μlずつ添加し、37℃で1時間、反応させた。反応後、10%FCSイーグルMEMで3×10<sup>5</sup>個/mlに調整したペロ細胞KY-5株（動物衛生研究所より供与）の細胞浮遊液を100μlずつ、すべてのウェルに添加し、37℃で7日間培養した。2ウェルとも細胞変性効果を抑制した検体を陽性と判定し、希釈倍率から抗体価を測定した。

### 2.4 統計処理

データは各群の平均値、中央値および標準偏差を算出し、両群間でウィルコクソンの順位和検定を行い、統計学的有意差検定を行った。なお、有意水準は5%とした。

### 2.5 人権の保護および法令等の遵守への対応

本研究で取り扱う農場情報や試料は生産者を含む畜産関係者の同意の下、実施しているものであり、「国立大学法人宮崎大学個人情報保護規則」

および「国立大学法人宮崎大学保有個人情報管理規定」を遵守するものである。

### 3. 結果と考察

中和試験の結果、感染が確認された農場はA地域で25% (9/36)、B地域で26.4% (19/72)であった (Table 1)。そのうち、A地域での非発生農場における陽性率は10% (3/30)、B地域での

Table 1 Results of neutralization test for PED virus infection in case and non-case farms in area A and B

| Area | Status   | Total number of farms | Number of positive farms | Number of negative farms | Positive rate |
|------|----------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|---------------|
| A    | Case     | 6                     | 6                        | 0                        | 100.0%        |
|      | Non-case | 30                    | 3                        | 23                       | 10.0%         |
|      | Total    | 36                    | 9                        | 23                       | 25.0%         |
| B    | Case     | 7                     | 7                        | 0                        | 100.0%        |
|      | Non-case | 65                    | 12                       | 53                       | 18.5%         |
|      | Total    | 72                    | 19                       | 53                       | 26.4%         |

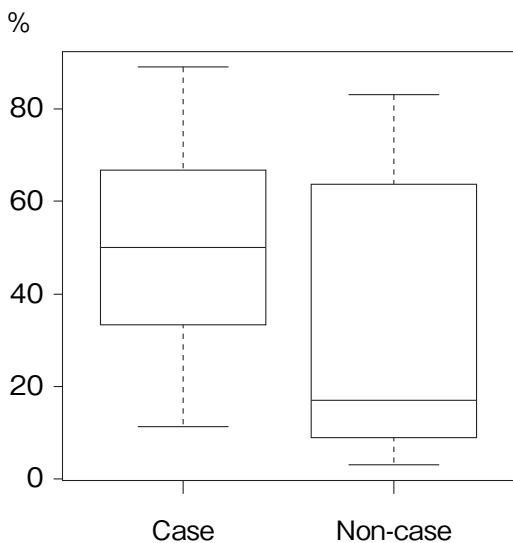


Fig. 1 Percentage of positive animals for neutralization test in case and non-case farms. There is not a significant difference between case and non-case farms

非発生農場における陽性率は18.5% (12/65)であった。この結果から、両地域において非発生農場の中に不顕性感染農場が存在していることが明らかとなった。発生農場については両地域ともすべての農場で陽性が認められた。感染農場において陽性を示した個体の割合は発生農場で平均 $46.7\% \pm 0.25$ 、非発生農場で平均 $33.3\% \pm 0.30$ で、両群間における有意な差は認められなかった (Fig. 1)。このことは、PEDウイルスに感染した農場では症状の有無に関わらず、ウイルスが群内で伝播していることを意味している。また中和試験の抗体価は発生農場由来の感染豚が平均で $4.3 \pm 6.97$ 、非発生農場由来の感染豚が平均で $2.5 \pm 1.00$ で、両群に有意な差は認められなかった。本研究では中和試験による血清学的な検査によって感染歴の有無を診断しており、ウイルス自体の存在を証明するものではない。そのため感染リスクを直接的に評価することは難しいが、抗体価の結果から、発生農場と不顕性感染農場の感染リスクはほぼ同等と考えられた。よって、感染農場と非感染農場を明確に識別することは、衛生管理上、非常に重要であると思われる。

現在PED発生農場の確定診断には糞便を用いたPCRによる遺伝子検査が用いられている。しかしながら、糞便へのウイルス排泄期間は短いため、糞便を用いたPCRによる遺伝子検査の検出感度は満足できるものではない。そこで本研究では中和試験による血清学的検査を用いて感染の有無を診断した。中和試験を用いれば、PEDウイルスに対する特異抗体が検出でき、感染の有無を正確に把握することができる。PEDワクチンは母豚に接種するため肥育豚を調査対象とする今回のサーベイには影響がない。また、中和試験で用いる血液の採材は、作業の効率化を図るためと畜場で実施したことも本研究の特徴である。と畜場で行う大きな利点は、複数の農場の肥育豚が一所

に集められる点にある。これにより、一度に複数の農場の豚血液を短時間で入手することが可能となる。さらに、バイオセキュリティが厳重な農場では関係者を除いて場内へ入ることができないが、と畜場であればこの問題も解決される。このように、と畜場は家畜伝染病の発生を監視する上で非常に有用な場所であり、国内外において様々な家畜伝染病の監視プログラムに利用されている<sup>4,5)</sup>。今後は本研究の成果を食肉衛生検査所や家畜保健衛生所にフィードバックし、衛生管理対策の強化や疫学調査研究に活用する予定である。

#### 4. 要 約

本研究は、能動的サーベイランスを用いてPEDウイルスの感染農場と非感染農場を識別し、衛生対策やPEDの感染拡大要因の解明に役立てるこ

とを目的とする。その結果、PED非発生農場由来豚の中から感染豚が確認された。このことは不顕性感染農場の存在を示唆し、防疫対策を強化するうえで重要なリスク因子になりうると考えられた。

#### 文 献

- 1) Chen, Q., Li, G., Stasko, J., Thomas, J. T., Stensland, W. R., Pillatzki, A. E., Gauger, P. C., Schwartz, K. J., Madson, D., Yoon, K. J., Stevenson, G. W., Burrough, E. R., Harmon, K. M., Main, R. G., Zhang J. : *J Clin Microbiol.*, **52**, 234~243, 2014.
- 2) Song, D., Park, B. : *Virus Genes.*, **44**, 167~175, 2012.
- 3) Dee, S., Clement, T., Schelkopf, A., Nerem, J., Knudsen, D., Christopher-Hennings, J., Nelson, E. : *BMC Vet Res.*, **10**, 1~9, 2014.
- 4) Lynch, J. A., Silva, P. : *Rev Sci Tech.*, **32**, 409~416, 2013.
- 5) Kaneene, J. B., Miller, R., Meyer, R. M. : *Vet Microbiol.*, **112**, 273~282, 2006.

## 和牛のミオグロビン含量を指標とした肉色に関わる ゲノム育種価の推定

Prediction of genomic breeding values for meat color defined by  
myoglobin content in longissimus muscle of Japanese Black cattle

山崎 瑞穂・戸水 一志・河野 幸雄・渡邊 敏夫\*・杉本 喜憲\*\*

(広島県立総合技術研究所畜産技術センター, \*独立行政法人家畜改良センター,  
\*\*公益社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所)

Mizuho Yamasaki, Kazushi Tomizu, Sachio Kouno, Toshio Watanabe\* and Yoshikazu Sugimoto\*\*

(Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Livestock Research Center,  
\*National Livestock Breeding Center, \*\*Shirakawa Institute of Animal Genetics)

The color of Japanese Black cattle beef influences desirability to consumers. However, breeding for this purpose has barely advanced. In Japan, beef color is evaluated using the beef color standard number (BCS No.) established by the Japan Meat Grading Association. However, BCS No. is a trait which is not a continuous value but an ordered categorical data ranging from No. 1 to 7. This trait is unsuitable for genomic analysis because it is evaluated subjectively based on visual inspection and tends to be classified to only three categories (No.3-5). In addition, no genetic locus has been reported to be associated with beef color so far. In the present study, we attempted to estimate genomic breeding values of the myoglobin (Mb) content, a major component of meat pigmentation using genome-wide SNP array data.

Mb content in the fat-free dry matter of longissimus muscles from 768 Japanese Black steers were determined, and SNPs were genotyped with the Illumina BovineLD or the GeneSeek SuperLD SNP arrays. The Mb content increased as the BCS number increased. The heritability of Mb content was estimated to be 0.43, which is higher than 0.29, the estimated heritability of the beef marbling standard (BMS) score, suggesting that Mb content may be used as a novel indicator for genetic improvement of beef color trait.

The genomic breeding values estimated with SNP data were strongly correlated with breeding values estimated with pedigree information ( $r=0.79$ ). In the present study, the accuracies of both breeding values were low because of the small number of myoglobin content records. In the future, it is important to improve the accuracy of breeding value estimation for purpose of the breeding of Mb content trait. For further investigation, collection of more SNP data and Mb content records is needed.

### 1. 目 的

黒毛和種牛肉において肉色は消費者の購買行動

を大きく左右し、流通業者からの改善要望も大き  
いがその育種改良は進んでいない。我が国では、  
肉色の評価指標として、日本食肉格付協会の定め

る「BCS No. (Beef Color Standard Number)」があるが、格付員の目視による主観的評価であること、評価区分が少なく黒毛和種牛肉の大部分が3区分(No.3~5)に格付けされることから、育種改良の指標としては適用しにくいと考えられる。同様の理由から、ゲノム解析にも適さず、これまでゲノム上の関連領域の報告もない。

一方、黒毛和種牛の遺伝的能力評価には、形質情報と血統情報に基づく「育種価」が広く活用されているが、近年、高密度なSNP (Single Nucleotide Polymorphism) 情報が利用できるようになり、ゲノム全体に分布するSNPが変数としてすべての遺伝的要素を説明するとの仮定に基づく、「ゲノム育種価」の研究が進められ、その活用が期待されている。ゲノム育種価の利点には、血統情報では評価できなかった全きょうだいの能力差を評価できることや、SNP情報が得られれば形質情報のない若齢牛の段階で評価できること等がある<sup>1)</sup>。欧米では乳牛の種雄牛選抜において後代検定を中止し、改良速度を高めるためゲノム育種価により選抜する手法への見直しが進んでおり、黒毛和種牛においても実用化が期待されている。

我々はこれまでに、肉の色素の主要成分であるミオグロビン (Mb) の含量が、牛肉の肉色を左右する要因であり、BCS No.とも相関があることを明らかにしている<sup>2)</sup>。黒毛和種牛において従来の評価指標である枝肉6形質(枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚、歩留基準値、BMS基準値)以外の新たな評価項目を設け、ゲノム育種価により効率的に改良することは、黒毛和種牛和牛間でのさらなる差別化・高付加価値化に大きく貢献するものと考えられる。従って本研究では、BCS No.に代わってMb含量を肉色の新たな評価指標とし、ゲノム上の関連領域の検出とゲノム育種価による遺伝的能力評価を試みた。

## 2. 方法

### 2.1 ミオグロビン含量の測定

広島県産黒毛和種去勢肥育牛768頭について、と畜後に第6~7肋骨間のロース芯部分を採取した。採取した肉について、赤身肉中のみ存在するMbを正確に評価するため脂肪含量を排除した無脂肪乾物中Mb含量を求めた。具体的には、Boccardら<sup>3)</sup>の方法によりMb含量、ソックスレー抽出法により脂肪含量、凍結真空乾燥法により水分含量を測定し、無脂肪乾物中Mb含量を算出した。

### 2.2 種雄牛後代育種価の算出

広島県内に後代牛を持つ種雄牛36頭について、788頭の後代肥育牛との血縁関係から計算された相対的血縁行列情報を用いて、アニマルモデルBLUP法により、無脂肪乾物中Mb含量の遺伝分散と残差分散を推定し、遺伝率および育種価(以後「後代育種価」と記述)を算出した。枝肉6形質についても、同様に38,861頭の後代肥育牛との血縁関係から、遺伝率および後代育種価を算出した。

### 2.3 SNPタイピング

肥育牛768頭のロース芯、種雄牛36頭の精液から、核酸自動分離装置 (NA-3000, 倉敷紡績株式会社) によりDNAを抽出した。肥育牛についてIllumina BovineLD (Illumina) もしくはGeneSeek SuperLD (GeneSeek)、種雄牛についてIllumina BovineHD (Illumina) によりSNP情報を得た。得られた情報のうち、個体・SNPあたりのコールレート $<0.95$ 、ハーディー・ワインベルグ平衡からの乖離 $P < 0.001$ 、マイナーアリル頻度 $<0.01$ のSNPを除いた。さらに、肥育牛のSNP情報については、ソフトウェアBEAGLE3.3.2 (Browning, University of Washington) により50K情報へデータ補完を行い、最終的に739頭の33,800SNPを以後の解析に利用した。

## 2.4 SNP効果推定, ゲノム育種価算出

肥育牛のSNP型から計算されるゲノム関係行列を用いて, G-BLUP法 (AI-REML法) により, 無脂乾物中Mb含量および枝肉6形質の遺伝 (SNP) 分散と残差分散を推定し, 遺伝率および種雄牛の育種価 (以後「ゲノム育種価」と記述) を算出した (母数効果: と畜年次・出荷月齢・と畜場)。また別に, ベイズB法によって, 分散成分を推定し, SNP置換効果を算出した (Burn-in

回数: 50,000, 反復回数: 50,000, サンプリング: 10回ごと, SNPが効果を持たないと仮定する比率: 0.95)。ゲノム育種価の評価精度を検証するため, 「後代育種価」と「ゲノム育種価」の相関係数を求めた。

## 3 結果と考察

### 3.1 ミオグロビン含量の分布

本集団における無脂乾物中Mb含量 (mg/100

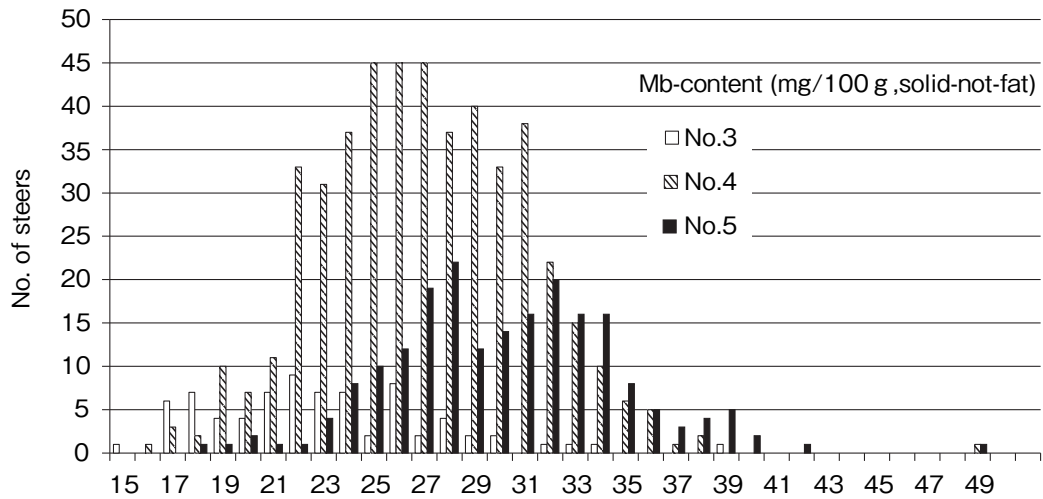


Fig. 1 Distribution of Mb content in the fat-free dry matter of longissimus muscles by BCS No. A total of 768 Japanese Black steers were examined. Means of Mb content were 22.5 (No. 3), 26.5 (No. 4), and 29.7 (No.5).

Table 1 Genetic ( $V_g$ ) and residual ( $V_e$ ) variance and heritability  $\pm$  standard deviation ( $h^2$ ) estimated for Mb content, carcass weight (CW), longissimus muscle areas (LMA), rib thickness (RT), subcutaneous fat thickness (SFT), yield estimates (YE), and beef marbling scores (BMS) using G-BLUP and BLUP

| Trait      | G-BLUP  |         |                 | BLUP   |         |                 |
|------------|---------|---------|-----------------|--------|---------|-----------------|
|            | $V_g$   | $V_e$   | $h^2 \pm SE$    | $V_g$  | $V_e$   | $h^2 \pm SE$    |
| Mb content | 12.65   | 17.10   | $0.43 \pm 0.08$ | 6.32   | 11.43   | $0.36 \pm 0.11$ |
| CW         | 1658.21 | 1117.38 | $0.60 \pm 0.08$ | 980.75 | 1376.82 | $0.42 \pm 0.02$ |
| LMA        | 26.20   | 32.43   | $0.45 \pm 0.08$ | 30.45  | 33.65   | $0.48 \pm 0.02$ |
| RT         | 0.24    | 0.39    | $0.37 \pm 0.08$ | 0.26   | 0.55    | $0.32 \pm 0.02$ |
| SFT        | 0.28    | 0.42    | $0.40 \pm 0.08$ | 0.38   | 0.34    | $0.52 \pm 0.02$ |
| YE         | 0.88    | 0.95    | $0.48 \pm 0.08$ | 1.11   | 0.89    | $0.55 \pm 0.02$ |
| BMSNo.     | 0.06    | 0.15    | $0.29 \pm 0.08$ | 0.23   | 0.25    | $0.49 \pm 0.02$ |



g) の平均値±標準誤差は $26.72 \pm 4.72$ 、最大値は48.97、最小値は14.09であった。我々の以前の報告同様<sup>2)</sup>、無脂乾物中Mb含量はBCS No.に比例して多くなる傾向が認められた (Fig. 1)。

### 3.2 分散成分の推定

ゲノム関係行列および相加的血縁行列による無脂乾物中Mb含量の遺伝率は、それぞれ0.43および0.36と比較的近い値となった (Table 1)。枝肉6形質の遺伝率についても比較的近い値であった。この結果からMb含量の遺伝率は、黒毛和種牛の改良指標として用いられているBMS基準値

の0.29および0.49やロース芯面積の0.60および0.42と同程度もしくはやや大きい値で、肉色の新たな育種改良指標として十分利用可能であると考えられる。

### 3.3 SNP効果の推定

1番染色体上に高い効果が推定されるSNPが複数存在し (Fig.2A)、1番染色体以外は、おおむね染色体上に配置されたSNP数に依存した効果が推定された (Fig.2B)。最も効果が高いと推定されたSNPは1番染色体上155.7Mb付近に存在し、アリル置換効果は+2.558mg/100g、SNPが説明

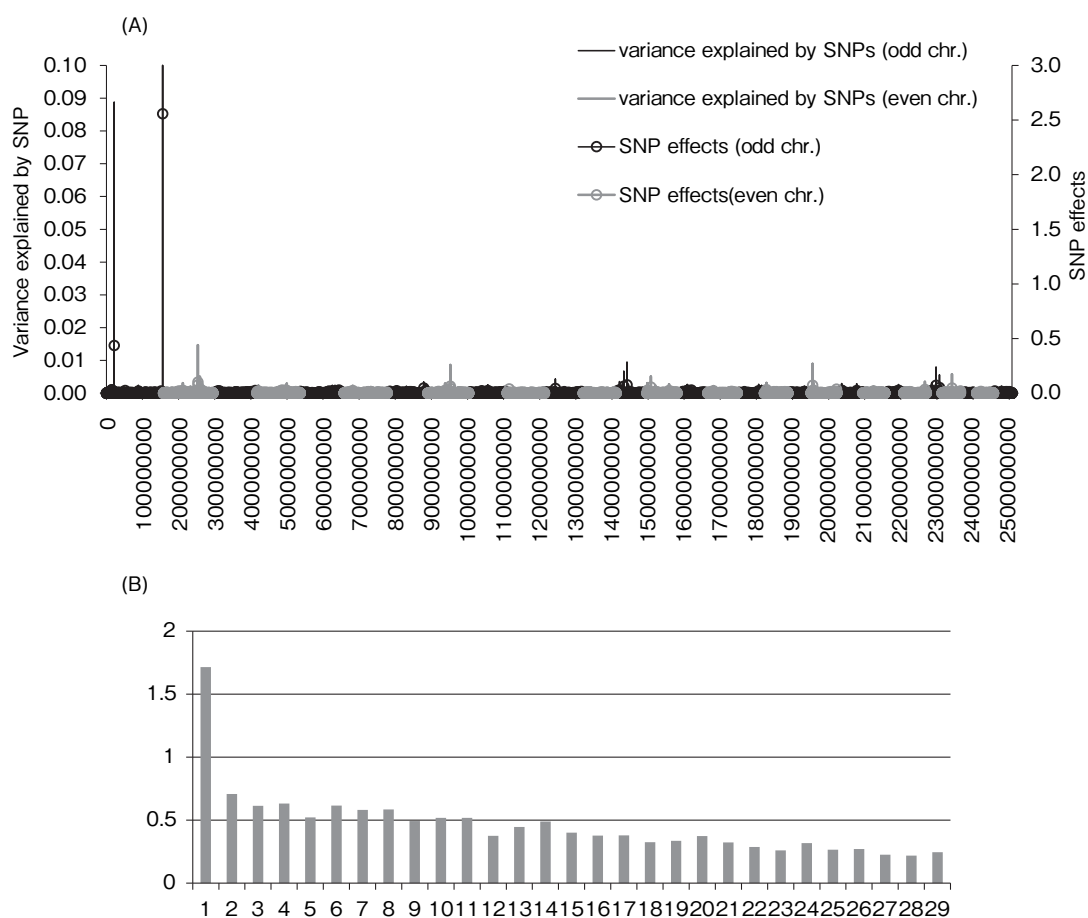
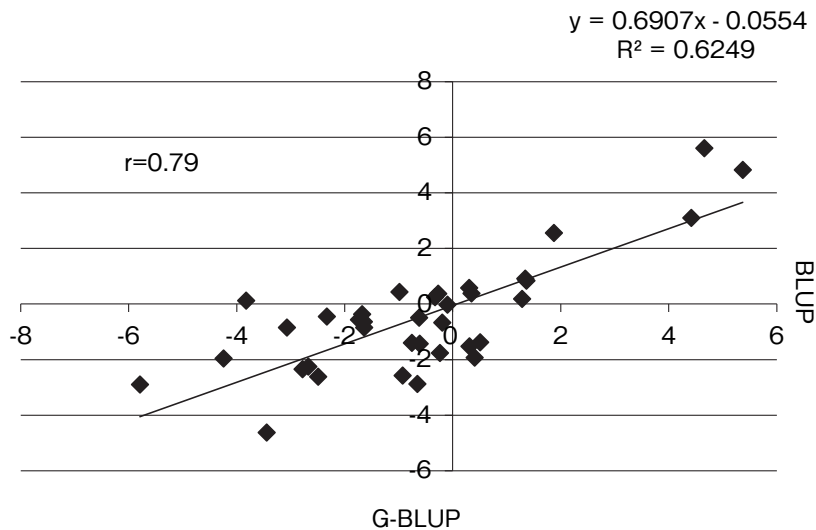


Fig. 2 (A) Effects of SNP substitutions and variance explained by SNP for Mb content estimated by the BayesB method

A total of 33,800 SNPs of 739 Japanese Black steers were used.

(B) Variance explained by SNP for each chromosome



**Fig. 3** Scatter plot of breeding values calculated using G-BLUP (genomic breeding values) and BLUP (true breeding values) for Mb content

Genomic and true breeding values were estimated in 36 Japanese Black bulls.

**Table 2** Correlation coefficient (r) between genomic breeding values and true breeding values  
Accuracy of genomic breeding values and true breeding values

| Trait      | r    | G-BLUP |      |      | BLUP |      |      |
|------------|------|--------|------|------|------|------|------|
|            |      | Mean   | Max. | Min. | Mean | Max. | Min. |
| Mb content | 0.79 | 0.82   | 0.94 | 0.72 | 0.59 | 0.90 | 0.22 |
| CW         | 0.78 | 0.88   | 0.96 | 0.81 | 0.98 | 0.99 | 0.94 |
| LMA        | 0.31 | 0.83   | 0.95 | 0.73 | 0.98 | 0.99 | 0.93 |
| RT         | 0.37 | 0.80   | 0.93 | 0.69 | 0.98 | 0.99 | 0.92 |
| SFT        | 0.34 | 0.81   | 0.94 | 0.71 | 0.97 | 0.99 | 0.94 |
| YE         | 0.37 | 0.84   | 0.95 | 0.75 | 0.98 | 0.99 | 0.94 |
| BMS No.    | 0.76 | 0.76   | 0.92 | 0.64 | 0.98 | 0.99 | 0.94 |

する分散は0.832, 寄与率 (全相加的遺伝分散に占めるSNPが説明する分散の割合) は0.062であった。このSNPは細胞内のシグナル伝達に関与するリン脂質切断酵素である phospholipase C-like 2 遺伝子上に存在する。次に効果が高いと推定されたSNPは, 1番染色体上21.9Mb付近に存在し, アリル置換効果は  $-0.44\text{mg}/100\text{g}$ , SNPが説明する分散は0.089, 寄与率は0.007であった。なお, Mb遺伝子は5番染色体上74.2Mb付近

に存在するが, この付近では効果の高いSNPは検出されなかった。

### 3.4 ゲノム育種価算出

無脂乾物中Mb含量において, 相加的血縁行列による育種価予測値とゲノム育種価の相関係数は0.79と高い相関を示した (Fig. 3, Table 2)。枝肉6形質における相関係数は, 枝肉重量0.78, ロース芯面積0.31, バラ厚0.37, 皮下脂肪厚0.34, 歩留基準値0.37, BMS基準値0.76であり, 無脂乾物

中Mb含量の相関が枝肉6形質よりも高かった。しかし今回、後代育種価の算出に用いた個体数が枝肉6形質(38,861個体)に比べてMb含量(788個体)で少ないために、Mb含量の後代育種価の正確度が低いという課題があり、今後は形質情報を持った個体を増やすことで改善し、再度検討する必要がある。後代育種価種雄牛36頭の平均正確度は、枝肉6形質の枝肉重量0.98、ロース芯面積0.98、バラ厚0.98、皮下脂肪厚0.97、歩留基準値0.98、BMS基準値0.98に対して、無脂乾物中Mb含量では0.59であった。

本研究では、黒毛和種牛の新たな付加価値・差別化要素となることを期待して、無脂乾物中Mb含量のゲノム育種価による評価を試みた。今後、生産現場でゲノム育種価により種雄牛選抜を行うには、現在利用されている後代育種価と同程度の高い評価精度の実現が重要であり、そのためには形質情報およびSNP情報を持つ肥育牛集団の拡大が有効である。必要な肥育牛集団の規模については、渡邊らが、黒毛和種肥育牛で枝肉6形質を対象に3,686頭の肥育牛を用いて、種雄牛22頭を評価した際の報告がある<sup>4)</sup>。現在、黒毛和種牛の種雄牛選抜において、後代育種価が算出できない若齢牛は両親の後代育種価の平均である「期待育種価」により選抜される。渡邊らは、期待育種価と後代育種価、ゲノム育種価と後代育種価の相関について、ロース芯以外の5形質でゲノム育種価の方が高かったと報告しており、無脂乾物中Mb含量においてもこの程度の精度が確保されれば、早期選抜の手段として実用化可能と考える。従って今後は、数千頭程度まで肥育牛のSNP情報を追加してゲノム育種価の精度を高め、さらに詳細な検討する必要がある。

一方で、現在黒毛和種牛肉の肉色は淡いほど評価が高いことから、Mb含量を下げる育種改良が

想定されるが、極端にMb含量が低い場合には、見た目を損なうことも考えられる。その他に食味への影響として、Mbはヘム鉄を有すが、鉄含量が牛肉らしい香りに影響するとの報告もある<sup>5)</sup>。これらを踏まえ、Mb含量の育種改良をどの程度まで行うべきか検討する必要がある。

#### 4. 要 約

本研究では、黒毛和種牛において、肉色の新たな評価指標として無脂乾物中ミオグロビン含量を用い、ゲノム育種価による能力評価を試みた。無脂乾物中ミオグロビン含量は、BCS No.と相関し、比較的高い遺伝率を持つことから、肉色のよりの確な育種改良指標となりうると考えられる。肥育牛739頭を訓練群としたゲノム育種価は、後代育種価と高い相関(0.79)を示し、種雄牛選抜に有効であることが示唆された。一方、今回の研究では、ミオグロビン含量情報を持つ肥育牛数が少ないために、後代育種価の正確度が低いという課題もある。今後、ミオグロビン含量を対象にゲノム育種価を活用した種雄牛選抜を行うためには、高い推定精度を実現することが重要であり、訓練群を拡大してさらに検討する必要がある。

#### 文 献

- 1) 広岡博之：畜産の研究, 66, 1181~1188, 2012.
- 2) 河野幸雄, 坂井宏行, 長尾かおり：肉用牛研究会報, 68, 27~29, 2005.
- 3) Boccard, B., Buchter, L., Casteels, E., Cosentino, E., Dransfield, E., Hood, D. E., Joseph, R. L., Macdougall, D. B., Rhodes, D. N., Schon, I., Tinbergen, B. J., Touraille, C.: *Livestock Production Science*, 8, 385~397, 1981.
- 4) 渡邊敏夫, 北村夕貴, 花田敬吾, 小林宙, 杉本喜憲：日本畜産学会第119回大会講演要旨, 170, 2015.
- 5) Mateescu, R. G., Garmyn, A. J., Tait Jr., R. G., Duan, Q., Liu, Q., Mayes, M. S., Garrick, D. J., VanEennaam, A. L., VanOverbeke, D. L., Hilton, G. G., Beitz, D. C., Reecy, J. M.: *J. ANIM. SCI.*, 91, 1067~1075, 2013.

# 食肉に寄生する人獣共通幼線虫の分子生物学的 種同定法の開発

Development of molecular biological method for species identification of  
zoonotic nematode larvae found in meat

黄 鴻 堅・平 健 介

(麻布大学獣医学部)

Hong-Kean Ooi and Kensuke Taira

(Faculty of Veterinary Medicine, Azabu University)

The presence of zoonotic nematode larvae in meat pose a hazard to food safety, and there is a need to clarify the species of the nematode involved, so as to provide more information for identifying the source of contamination and origin of the infection of nematode larvae in humans. Thus, we developed a PCR-based molecular biological method for species identification of zoonotic nematode larvae found in meat. We developed the LAMP method for the identification of these nematode. The target nematode larvae were *Toxocara canis*, the large round worm of dogs, and *Toxocara cati*, the large round worm of cats. We constructed LAMP species-specific primer sets for *T. canis* and *T. cati* using the nucleotide sequences for the ITS-2 gene. We found that our primer sets were useful and specific for the identification of the respective toxocarids. There was no cross-reaction to other ascaridoids worms, such as *Ascaris suum* or *Baylisascaris procyonis*, in our LAMP reactions for *T. canis* and *T. cati*, respectively. This implies that the LAMP method we have developed can be used in the field for identifying *T. canis* and *T. cati* larvae in the meat.

## 1. 目 的

家畜や家禽の筋肉には、トリヒナ *Trichinella* spp. (旋毛虫) およびトキソカラ属回虫 *Toxocara* spp. の幼虫が寄生し、これらの幼虫は生肉や加熱不十分な肉料理や肉製品の摂食によってヒトに感染する。トリヒナ症 (旋毛虫症) については、特に豚肉を感染源とするヒト寄生例が世界的に多く、年間1万人以上 (致死例を含む) の患者が発生している。日本におけるヒトの症例は、1981年の熊肉の生食を原因とした集団発生症例以後は、

輸入症例を含めた散発的な約10例のみが報告されている<sup>1)</sup>。しかしながら、近年の日本でもキツネなどの野生動物の筋肉などからはトリヒナが検出されていることから<sup>2,3)</sup>、家畜や家禽におけるトリヒナ感染については警戒を強める必要がある<sup>4)</sup>。

トキソカラ属回虫は、犬や猫等のコンパニオン動物に普通にみられる身近な寄生虫で、幼虫がヒトに寄生すると幼虫移行症 (トキソカラ症) を引き起こす。近年、特に日本では、牛や鶏の肝臓や肉の生食を原因とするトキソカラ症例が増えており、食肉を介するトキソカラ症が注視されるよう

になってきた<sup>5,6)</sup>。鶏の筋肉や肝臓にトキソカラ属回虫幼虫が寄生してヒトの感染源になり得ることは知られているが、農場の家畜・家禽におけるトキソカラ属回虫幼虫の感染実態はいまのところ不明である<sup>7)</sup>。

本研究は、家畜・家禽の筋肉に寄生するトリヒナおよびトキソカラ属回虫の幼虫の簡易・迅速な分子生物学的種同定法の開発を目的とするもので、まず、トキソカラ属回虫の種特異的DNA断片を検出するためのLAMP法を開発する。本研究により、簡易・迅速な食肉製品の寄生虫検査が確立されれば、これを応用して、食肉製品の安心・安全が保障できるようになる。

## 2. 方法

### 2.1 寄生虫DNA

犬回虫 *Toxocara canis* および猫回虫 *Toxocara cati* のDNA抽出には、自然感染動物の糞便から採材した虫卵を用いた。糞便から精製した虫卵は、0.5%ホルマリン液中で室温4週間培養後、供試するまで10℃で保存した。また、検査法の種特異性の確認のため、豚回虫 *Ascaris suum* およびアライグマ回虫 *Baylisascaris procyonis* のDNAをそれぞれ虫卵および幼虫から抽出し、比較対象とした。

### 2.2 DNAの抽出

それぞれの虫卵あるいは幼虫をTE Buffer 10ml の入った15ml試験管に入れ、2000rpmで3分間遠心して上清を除き、MilliQ water 10mlを加えた。この作業を3回繰り返して虫卵または幼虫を洗浄した。それぞれの虫卵または幼虫の約10~100個をパスツールピペットで1.5ml容エッペンチューブに入れ、バイオマッシャーII (Nippi社) で粉碎後、QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN社) を用いて、付属の手順書に準じて核DNAの抽出を行った。抽出したDNAは供試するまで-20℃で

保存した。

### 2.3 プライマー設計

LAMP法に用いるプライマーはPrimer Explorer V3 (栄研社) を用いて、付属の手順書に準じて作成した。設計はrDNAのITS2領域の5'側から、F3領域、F2領域、F1領域、B1領域、B2領域、B3領域という6つの領域を利用して実施し、末端の自由エネルギーが-4 kcal/mol以下になるように設定した。Tm値は、F1cおよびB1c領域で65℃前後(64~66℃)、F2領域、B2領域、F3領域、B3領域で60℃前後(59~61℃)、ループプライマーは65℃前後(64~66℃)に設定した。以上のように設計したプライマーをTable 1に示した。

### 2.4 LAMP法

Loopamp DNA amplification (栄研社) を用いて付属の手順書に準じてrDNAのITS2領域を増幅した。反応液は、1x Reaction buffer 12.5  $\mu$ l, *Bst* DNA polymerase 1  $\mu$ l, FIBとBIPプライマーのそれぞれ40pmol, B3とF3プライマーのそれぞれ5 pmol, 鋳型DNA 2  $\mu$ l および蒸留水(DW)で、総量25  $\mu$ lになるように調整した。増幅反応は、伸長・合成反応を65℃で60分間を行い、80℃2分間で酵素を失活させ反応を停止させた。

DNA増幅産物は10倍希釈SYBR GREEN I (Invitrogen, Taiwan) の1  $\mu$ lを注加して反応させた後、蛍光発光の目視により確認した。また、DNA増幅産物の2%アガロース電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色した後、UVライトで紫外線をあてて蛍光発光の有無を確認した。

また、検出限界DNA量を調べるために10ng DNA (2  $\mu$ l of template) を基にして10倍段階希釈でサンプルを調整し、同様のLAMP法を行った。

**Table 1** Nucleotide sequences of primers for the ITS-2 loop-mediated isothermal amplification of *Toxocara canis* and *Toxocara cati*.

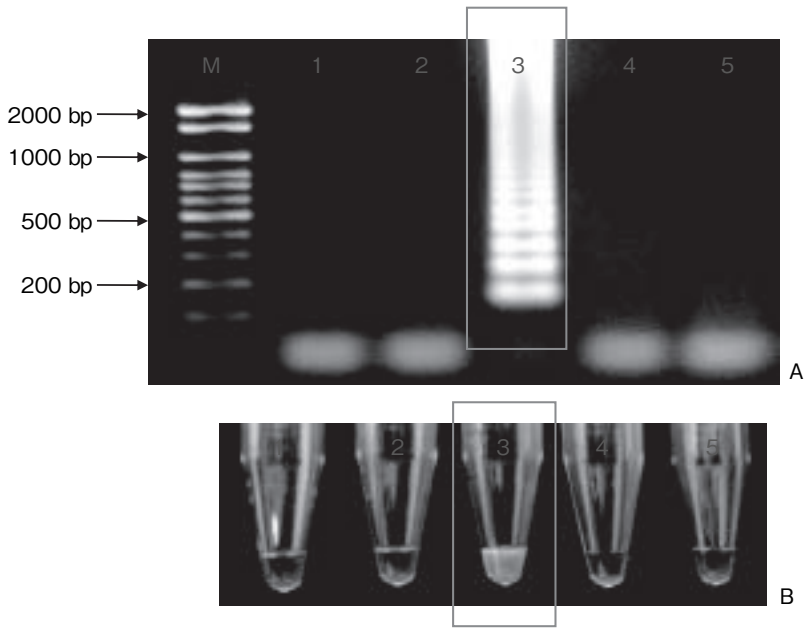
| Parasite Primer type |                | Sequence (5'-3')                           | Length |
|----------------------|----------------|--|--------|
| <i>T. canis</i>      | F 3            | TGTGATTAACGCGCAAGGTT                       | 20     |
|                      | B 3            | GCTGCCACAACCAAACA                          | 18     |
|                      | FIP (F1c + F2) | CTTGGCAAGGTACGCTGTACAGGTGCATTTCGGTGAGCTATG | 42     |
|                      | BIP (B1c + B2) | TCGCACAAGAAATGGCTGTCTGGCCGTATCGTGAAGCAA    | 40     |
| <i>T. cati</i>       | F 3            | TGCACAAGAAATCGCTGTCTG                      | 20     |
|                      | B 3            | TCAACCATTACGCGCATT                         | 19     |
|                      | FIP (F1c + F2) | GCTGGAGGCCATATCGTGAAGGTTTGCTCGTGAAGAGGCCG  | 40     |
|                      | BIP (B1c + B2) | CGCTTGTTTGTGTGTGCTTGCCCTTCTTCAAGCAGCCGATG  | 42     |

### 3. 結果と考察

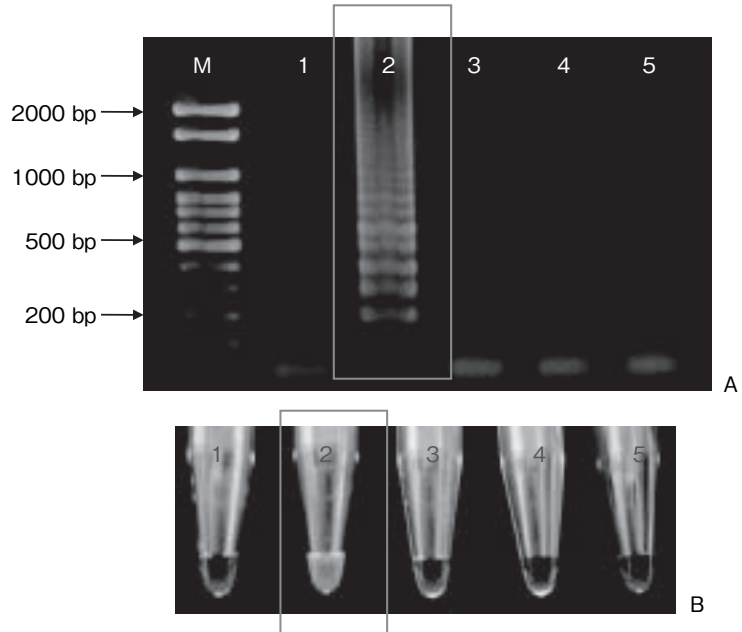
*Toxocara canis*および*Toxocara cati*の特異的なrDNAのITS-2領域塩基配列を検出するために2つのプライマーセットを設計し、これらを用いて上述の*Toxocara*属回虫2種、豚回虫、およびアライグマ回虫の各DNAを用いてLAMP反応を行った(**Table 1**)。*Toxocara cati*のプライマーセットにおいては、*Toxocara cati*のDNAでのみ増幅産物のバンドが2%アガロース電気泳動で認められたが、*T. canis*, *A. suum*および*B. procyonis*では認められなかった。また、蛍光目視検出試験でも、*T. cati*のDNA増幅産物のみが肉眼で緑色にみえたが、*T. canis*, *A. suum*および*B. procyonis*では茶色のままで変色はみられなかった(**Fig. 1**)。*Toxocara canis*のプライマーセットにおいては、*Toxocara canis*のDNAでのみ増幅産物のバンドが2%アガロース電気泳動で認められたが、*T. cati*, *A. suum*および*B. procyonis*では認められなかった。また、蛍光・目視検出試験でも、*T. canis*のDNA増幅産物のみが緑色を発したが、*T. cati*, *A. suum*および*B. procyonis*では茶色のままで変色はみられなかった(**Fig. 2**)。2%アガロース電気泳動で認められた最下位のバンドの塩基配列をみると、今回の*Toxocara cati*および*Toxocara canis*の配列は、既

報の*Toxocara cati* (Genbank accession numbers: Y09493) および*Toxocara canis* (Y09489) の配列と一致した。今回用いた*Toxocara canis*のDNAサンプル (10ng DNA in 2  $\mu$ l template) における当LAMP法の検出限界DNA量は10fgであった。

*Toxocara*属回虫や*Trichinella*属線虫の幼虫はヒトに寄生して病気を起こすことから、人獣共通感染症として重要である。これらの幼虫は形態的な区別が難しいことから、分子生物学的鑑別が有用である<sup>6)</sup>。今回、ヒトに寄生して病気を起こす*Toxocara*属回虫の重要種である*Toxocara canis*および*Toxocara cati*の特異的DNAを検出するLAMP法がほぼ確立できた。LAMP法は、*Bst* polymeraseを使用するために増幅の効率が高く、一定の温度で反応が進むことにより、PCR法の場合よりも比較的短い時間で増幅を行うことができる。また、SYBR GREEN IIによる反応液の変色によって簡単に特異的DNA断片の増幅が判断できる。感度が高くかつ簡便・迅速であることから、LAMP法は特に食肉検査や検疫の現場では、有用性が高いと考える。一方、適切なLAMPプライマーを設計することは、容易でない。今回、*Trichinella spiralis* と *Trichinella pseudospiralis* のLAMP法の開発も試みたが、これらは未だ確立されていない。今後、*Trichinella*属線虫を種特



**Fig. 1** Specificity of *Toxocara cati* LAMP primer set. (A) Agarose gel electrophoresis. Lanes (M) 100 bp DNA ladder; (1) *Baylisascaris procyonis*; (2) *T. canis*; (3) *T. cati*; (4) *Ascaris suum*; and (5) Negative control. (B) Visual detection of LAMP products after addition of 1  $\mu$ l of 1/10 dilution of SYBR Green I. Positive sample (3, *T. cati*) turned green while negative samples remained orange (1, *B. procyonis*; 2, *T. canis*; 4, *A. suum*; and 5, negative control.)



**Fig. 2** Specificity of *Toxocara canis* LAMP primer set. (A) Agarose gel electrophoresis. Lanes (M) 100 bp DNA ladder; (1) *Baylisascaris procyonis*; (2) *T. canis*; (3) *T. cati*; (4) *Ascaris suum*; and (5) Negative control. (B) Visual detection of LAMP products after addition of 1  $\mu$ l of 1/10 dilution of SYBR Green I. Positive sample (2, *T. canis*) turned green while negative samples remained orange (1, *B. procyonis*; 3, *T. cati*; 4, *A. suum*; and 5, negative control.)

異的に検出する適切なプライマーを設計し、これらを検出するLAMP法を開発する予定である。家畜・家禽の筋肉に寄生する主な人獣共通寄生線虫であるトリヒナおよびトキソカラ属回虫の幼虫の簡易・迅速な分子生物学的種同定法が開発されれば、これを応用して、食肉製品の安心・安全が保障できるようになると考える。

#### 4. 要 約

食肉に寄生する人獣共通寄生幼線虫について、PCR法を基礎とした分子生物学的種同定法の開発を試みた。すなわち、LAMP法を犬回虫 *Toxocara canis* および猫回虫 *Toxocara cati* の同定に応用した。犬回虫および猫回虫のITS-2領域の塩基配列を種特異的に検出するLAMP法用プライマーセットを設計し、LAMP法を行ったところ、犬回虫および猫回虫のDNAそれぞれにおいて種特異的に反応が起こることが確認された。また、これらの *Toxocara* 属のプライマーセットは、豚回虫

*Ascaris suum* やアライグマ回虫 *Baylisascaris procyonis* との交叉反応を示さなかった。今回設計したLAMP法プライマーセットは犬回虫や猫回虫の幼虫を検出・同定することが可能であることから、食肉に寄生するこれらの幼線虫を検出する方法として有用であると考ええる。

#### 引用文献

- 1) Yamaguchi, T., Ohbayashi, M., Ooi, H. K. : ICT 6th Trichinellosis (Kim K.W. ed.) , 274 ~ 279. State University of New York Press, Albany, 1985.
- 2) Kanai, Y., Inoue, T., Mano, T., Nonaka, N., Katakura, K., Oku, Y. : *Jpn. J. Vet. Res.*, **54**, 175~182. 2007.
- 3) Ooi, H. K., Kamiya, M., Ohbayashi, M. : *Jpn. J. Vet. Res.*, **35**, 87~97, 1987.
- 4) Alkarmi, T., Behbehani, K., Abdou, S., Ooi, H.K. : *Jpn. J. Vet. Res.*, **38**, 139~146, 1990.
- 5) Taira, K., Saitoh, Y., Okada, N., Sugiyama, H., Kapel, C. M. O. : *Vet. Parasitol.*, **189**, 238 ~ 239, 2012.
- 6) Taira K., Saitoh Y., Kapel C. M. O. : *Vet. Parasitol.*, **180**, 287~291, 2011.
- 7) Taira, K., Yanagida, T., Akazawa, N., Saitoh, Y. : *Vet. Parasitol.*, **196**, 397~400, 2013.



# 牛の発情・妊娠における迅速かつ非破壊診断システムの開発

Development of rapid and non-destructive diagnostic system for cow's estrus and pregnancy

ツェンコヴァ ルミアナ・窪田 陽介・古川 茜・竹村 豪・ジョージ バザール  
(神戸大学大学院農学研究科生体計測工学研究室)

Roumiana Tsenkova, Yosuke Kubota, Akane Furukawa, Go Takemura and George Bazar  
(Biomeasurement Laboratory, Kobe University Graduate School of Agricultural Science)

The purpose of this research is to develop a system which enables us to diagnose cow's estrus non-destructively, rapidly and easily by means of near infrared spectroscopy (NIRS) and Aquaphotomics proposed as new NIRS analytical method recently. Aquaphotomics is the method that can measure changes of solutes in solution by observing water NIR spectra which is changed by changes of solutes, so this method is very useful to measure changes in bio systems.

This research examines the possibility that NIR spectra of milk and foremilk of dairy cows can be used to diagnose estrus which caused by sexual hormone (progesterone).

17 cows whose estruses were induced by hormone infusion were used. Sampling period contained planned estrus days in the middle of it.

Progesterone concentration of serum samples was measured by enzyme immunoassay which was used as conventional method to measure sexual hormone. Progesterone concentration decrease just before estrus period, so we divide the samples high progesterone period and low progesterone period.

From the results of milk and foremilk, the important wavelength ranges which showed changes of progesterone were investigated. In the future, with knowledge acquired, we will try to construct a small, cheap NIR sensor for easy and fast estrus detections.

## 1. 目 的

本研究では近赤外分光法とアクアフォトミクスを用いて、牛の発情・妊娠を非破壊、迅速かつ簡便に診断可能なシステムの開発を行う<sup>1)</sup>。

当研究グループでは近年、近赤外分光法の解析において、アクアフォトミクスという新たな分析

手法を開発している。アクアフォトミクスは、さまざまな物質と水分子と光の相互関係を分析し、迅速かつ包括的に生体の情報を得るという新たな科学の概念である。あらゆる生体の大部分は水分で構成されるため、この手法で生体の溶質の微量な変化を水の吸収スペクトルを通しての測定が可能となる。同手法を用いた既往研究としては、生

乳中の成分分析<sup>2)</sup>、乳牛における乳房炎診断<sup>3~5)</sup>があり、近年では、ジャイアントバンダ<sup>6)</sup>およびオランウータン<sup>7)</sup>の尿スペクトルから水分子構造が尿中物質濃度を反映していることが示唆され、迅速かつ非破壊の絶滅危惧動物発情診断への応用可能性が示された。

本研究ではこの手法を用いて、牛の発情・妊娠に関するホルモンの分泌状況から牛の発情・妊娠時に特徴的な近赤外スペクトルパターンを明らかにし、これを非破壊、迅速かつ簡便に検出する診断システムを開発する。将来的にはこのシステムを用いて畜産農家が日々の業務の中で利用できる小型、安価かつ簡易なセンサーを開発することを目指す。

特に本稿では牛の発情について、発情時期の直前に血液や生乳中でその濃度が急低下するという特徴を持つ、性ホルモンであるプロジェステロン(以下、 $P_4$ )濃度に基づく発情診断を目的とした。

## 2. 方 法

牛の発情時期の直前には、血中 $P_4$ 濃度が大きく低下することが報告されている<sup>8)</sup>。また、血中 $P_4$ 濃度の変化は生乳中の同濃度に反映され、高い相関関係があることがわかっている<sup>9)</sup>。従って、本研究では発情時期を含む一定期間、供試牛から血液、生乳、前絞り乳をサンプルとして採取し、すべてのサンプルの近赤外スペクトルを測定した。また、血清サンプルは、各供試牛から60mL採血し、37°Cで30分間インキュベートを行った後に0°C、3000rpmの条件下で15分間遠心分離を行い精製した。

本実験では、供試牛として兵庫県立農林水産技術センター淡路農業技術センターのホルスタイン牛23頭を用いた。23頭の内、17頭(発情同期牛A-Q)はホルモン製剤によって発情同期された発情同期牛群れとし、残りの6頭(コントロール

牛R-W)は発情同期をせず、かつ非発情時期のコントロール牛群とした。

スペクトル測定用のサンプルは、生乳と前搾り乳とし、生乳については、牛A-W(発情同期牛:17頭、コントロール牛:6頭)、前搾り乳では、牛D-W(発情同期牛:14頭、コントロール牛:6頭)から採材した。生乳と前搾り乳については各牛につき、発情予定期間を中間に前後1週間毎日、午前と午後に採材し、コントロール牛も同様に採材した。また、性ホルモン測定のために血清サンプルも合わせて採材した。

生乳と前搾り乳は設置型近赤外分光器XDS(Metrohm社)により40°Cの温度条件下で、光路長1mmで全サンプルの400-2500nm(解析領域は水の第一倍音領域である1300-1600nm)のスペクトルを3本連続測定した。血中 $P_4$ 濃度はKinoshitaら<sup>6)</sup>の手法に基づいてエンザイムイムノアッセイ(EIA)法を用いてマイクロプレートリーダーiMark(BioRad社)で測定した。

本年度の研究成果として、「生乳午前」、「生乳午後」、「前搾り乳午前」、「前搾り乳午後」の4種類の各乳サンプルでのスペクトル解析結果を報告する。

## 3. 結果および考察

### 3.1 EIA法による血中 $P_4$ 濃度測定

牛の性周期は約21日間であり、その中で卵巣内に黄体が形成され、血中プロジェステロン濃度が高い値を保つ時期(以下、高 $P_4$ 期)と黄体が退行して低い値を保つ時期(以下、低 $P_4$ 期)があり、高 $P_4$ 期と低 $P_4$ 期の境界では、 $P_4$ 濃度の急低下が観察される。発情は、血中 $P_4$ 濃度の急低下が起きた3-4日後(人工授精適期)に発生する。その性周期を利用するホルモン製剤による発情の誘起は、膣内留置型ホルモン製剤(PRIDもしくはCIDR)を挿入し、人工的に牛の体内 $P_4$ 濃

度を高い水準に保ち、適当な期間留置した後、製剤を除去することで体内 $P_4$ 濃度を人工的に急激に低下させることで行う。

EIA法による血清中 $P_4$ 濃度 (ng/ml) を測定した結果、コントロール牛を除くすべての牛で、膈内留置型ホルモン製剤の除去前後で $P_4$ 濃度に大きな高低差が確認され、ホルモン製剤による体内 $P_4$ 濃度の操作は成功していたことが確認された (Fig. 1)。

### 3.2. 生乳および前搾り乳におけるスペクトル解析

#### (1) 差スペクトルによる $P_4$ 濃度変化に関する波長の抽出

近赤外分光器により3回連続で測定した各乳スペクトルを平均し、スペクトルのランダムノイズ低減のために平滑化を行った後、ベースライン補正としてMSC (Multiplicative Scattering Correlation) を適用した。その後、高 $P_4$ 期と低 $P_4$ 期の各乳スペクトルを平均し、差スペクトル (高 $P_4$ 期-低 $P_4$ 期) を算出した。

各乳スペクトルから算出した差スペクトルから

Leave-one cow-out法を用いて、 $P_4$ 濃度変化に関係する波長を抽出した。Leave-one cow-out法とは、サンプル群から供試牛1頭分のサンプルを除き、残りの全供試牛のサンプルの差スペクトルを平均し、Savitzky-Golay法に基づく二次微分を適用することで、ピークを示す波長領域を探索し、全供試牛の頭数回ループすることにより、再現性の高い波長領域を抽出する手法である。

本研究においては、前搾り乳サンプルにおいては20ループ、生乳サンプルにおいては23ループで解析を行った。また、全ループの80%以上で抽出された各波長領域において、最も抽出された回数が多い波長を $P_4$ 濃度変化に関係の深い波長群であると見なした (Table 1)。

#### (2) $P_4$ 濃度変化に関する波長を用いてアクアグラムによる $P_4$ 濃度診断

Leave-one cow-out法により抽出された代表波長を用いて、アクアグラムによる $P_4$ 濃度診断を行った。アクアグラムとは、次式により特定波長の吸光度を標準化した値 (アクアグラム値) をレーダーチャートとして図示したものである。こ

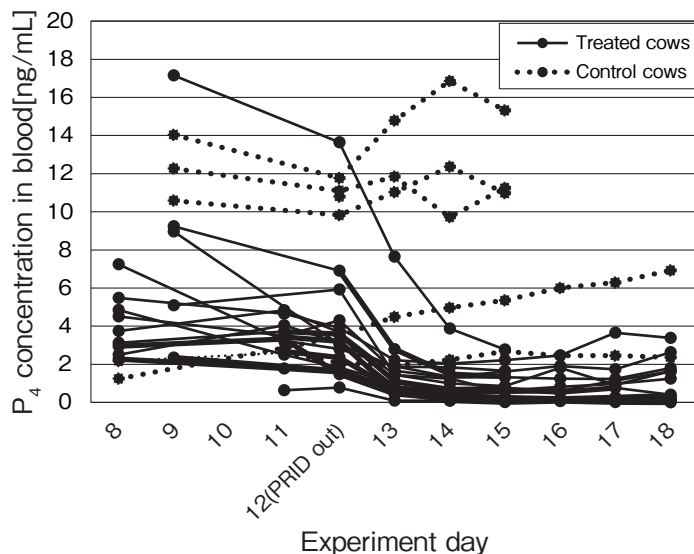
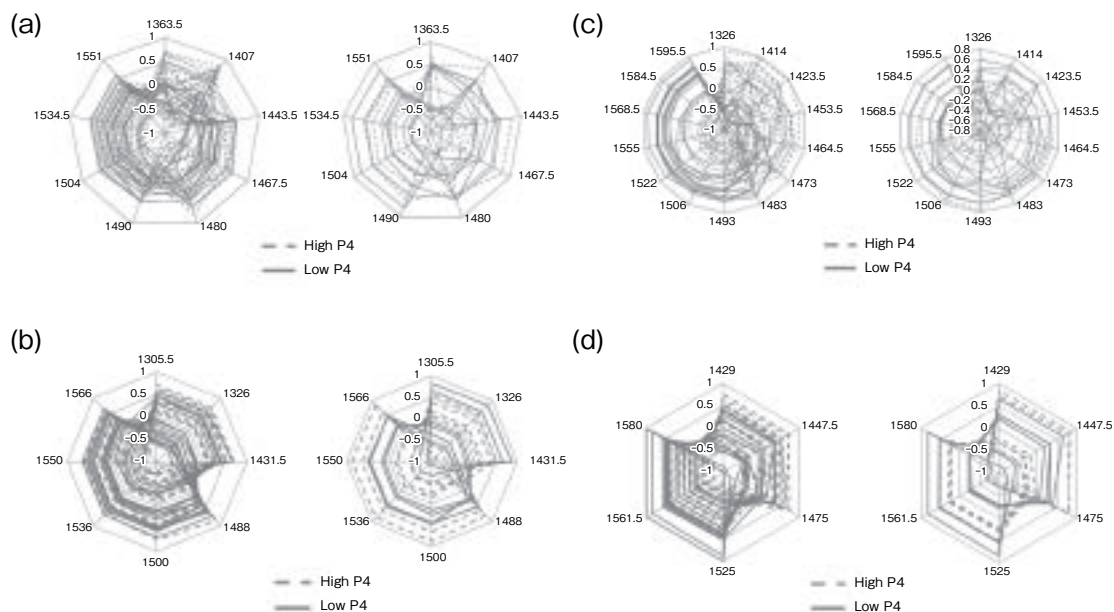


Fig. 1 Concentration of serum samples measured by EIA

**Table 1** Represented wavelengths related to P4 concentration change picked up by Leave-one cow-out

| Milk (AM)        | Milk (PM)        | Foremilk (AM)    | Foremilk (PM)    |
|------------------|------------------|------------------|------------------|
| Wave length (nm) | Wave length (nm) | Wave length (nm) | Wave length (nm) |
| 1363.5           | 1305.5           | 1326             | 1429             |
| 1407             | 1326             | 1414             | 1447.5           |
| 1443.5           | 1414             | 1423.5           | 1475             |
| 1467.5           | 1423.5           | 1453.5           | 1525             |
| 1480             | 1431.5           | 1464.5           | 1561.5           |
| 1490             | 1488             | 1473             | 1580             |
| 1504             | 1500             | 1483             |                  |
| 1534.5           | 1536             | 1493             |                  |
| 1551             | 1550             | 1506             |                  |
|                  | 1566             | 1522             |                  |
|                  |                  | 1540             |                  |
|                  |                  | 1555             |                  |
|                  |                  | 1568.5           |                  |
|                  |                  | 1584.5           |                  |
|                  |                  | 1595.5           |                  |

**Fig. 2** Aquagrams of treated cows (left) and control cows (right)  
(a) milk AM, (b) milk PM, (c) foremilk AM, (d) foremilk PM

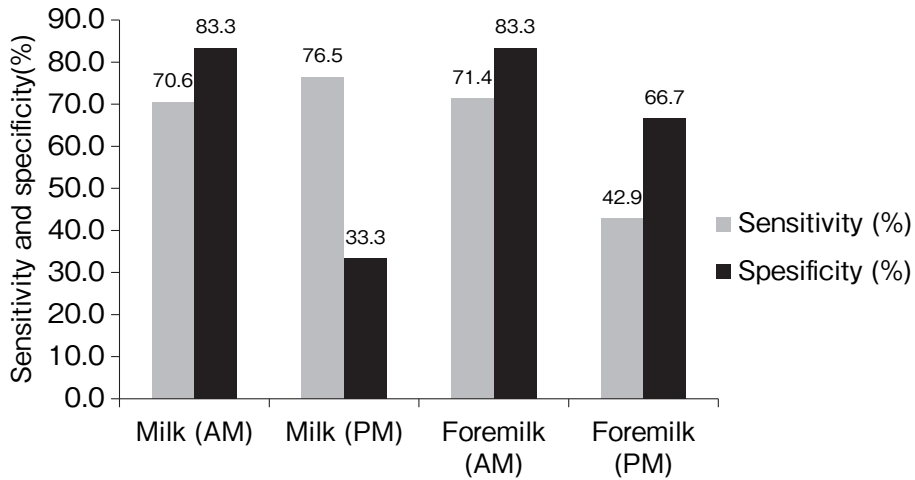


Fig. 3 Sensitivity and specificity of each sample type aquagram

れにより、高 $P_4$ 期と低 $P_4$ 期を視覚的に比較することが可能となる。

$$Aqg_{\lambda} = \frac{\chi_{\lambda} - \bar{\chi}_{\lambda}}{\sigma_{\lambda}}$$

$Aqg_{\lambda}$ : 波長 $\lambda$ のアクアグラム値

$\chi_{\lambda}$ : サンプルの $\lambda$ における吸光度

$\bar{\chi}_{\lambda}$ :  $\lambda$ における全サンプルの吸光度の平均

$\sigma_{\lambda}$ :  $\lambda$ における全サンプルの吸光度の標準偏差

アクアグラムによる $P_4$ 濃度診断の結果、各乳サンプルについて、各波長で高 $P_4$ 期と低 $P_4$ 期の間にアクアグラム値の差が見られ、大部分の発情同期牛が同じ差のパターンを示していることがわかった (Fig. 2)。これらについて、t検定 (有意水準5%) を行った結果、発情同期牛群では、生乳 (午前) の1467.5nmおよび1480nm以外の波長において有意差が認められた。しかし、コントロール牛群では全波長で有意差が認められなかったため、発情同期牛群から得られた代表波長における高 $P_4$ 期と低 $P_4$ 期の差のパターン (以下、 $P_4$ 診断パターン) を用いて、感度と特異度2つの指

標により、アクアグラムによる乳中 $P_4$ 濃度変化診断の精度を検討した。

$$\text{感度 (\%)} = \frac{P_4 \text{ 診断パターンを示した発情同期牛数}}{\text{全発情同期牛数}} \times 100$$

$$\text{特異度 (\%)} = \frac{P_4 \text{ 診断パターンを示さなかったコントロール牛数}}{\text{全コントロール牛数}} \times 100$$

2つの指標の値を算出した結果、特に前搾り乳 (午前) を用いた場合に78%以上の感度および83%以上の特異度を得ることができた (Fig. 3)。また、生スペクトルなどから、牛ごとの顕著な個体差が認められたが、代表波長を用いたアクアグラムに関しては、異なる個体の間で共通した結果を得ることができたことから、本手法の有用性が示された。

上記の結果から、生乳と前搾り乳の近赤外スペクトルの解析結果から、午前の前搾り乳が $P_4$ 濃度診断に最適なサンプル種であり、すべてのサンプル種で70%以上の感度を得られたことから、特定波長を用いたアクアグラムによる乳中 $P_4$ 濃度

診断の可能性が示された。また、波長の帰属から発情時期付近では水素結合の強固な水構造が支配的であるという傾向が見られ、同傾向は先行研究の結果と類似していることから、動物の発情診断において本手法が有用である可能性が示された。

#### 4. 要 約

本研究では近赤外分光法と、近年提唱されている近赤外分光法における新たな分析手法であるアクアフォトミクスを用いて、非破壊、迅速かつ簡便に牛の発情診断を行うシステム開発を目的とする。アクアフォトミクスとは、水溶液中の溶質の変化に伴う水分子の変化を近赤外スペクトルの変化から読み取る手法であり、生体内の変化を診断するのに適している。本研究では生乳と前搾り乳の近赤外スペクトルから、血清中の $P_4$ 濃度の変化をとらえることで、発情診断の可能性を検討した。従来の性ホルモン濃度測定法であるEIA法により、ホルモン製剤によって発情を同期した計17頭の牛の $P_4$ 濃度の変化を測定し、高 $P_4$ 期と低 $P_4$ 期の近赤外スペクトルを解析することで、午前の前搾り乳が $P_4$ 濃度診断に最適なサンプル種であると示された。今後は、得られた知見を用いて小型、安価で簡易なセンサーの開発を目指す。

#### 文 献

- 1) Tsenkova, R. : Introduction aquaphotomics: Dynamic spectroscopy of aqueous and biological systems describes peculiarities of water, *Journal of near infrared spectroscopy*, **17**, 303~314, 2009.
- 2) Tsenkova, R., Atanassova, S., Itoh, K., Ozaki, Y., Toyoda, K. : The World Wide Web at: Near infrared spectroscopy for biomonitoring: Cow milk composition measurement in a spectral region from 1, 100 to 2, 400 nm 1, *Journal of animal science*, **78**, 515~522, 2000.
- 3) Tsenkova, R. : Atanassova, S., Morita, H., Ikuta, K., Toyoda, K., Iordanova, I.K., Hakogi, E. : Near infrared spectra of cows' milk for milk quality evaluation: disease diagnosis and pathogen identification, *Journal of near infrared spectroscopy*, **14** (6), 363~370, 2006.
- 4) Tsenkova, R. : Introduction aquaphotomics: Dynamic spectroscopy of aqueous and biological systems describes peculiarities of water, *Journal of near infrared spectroscopy*, **17**, 303~314, 2009.
- 5) Morita, H., Kuroki, S., Ikuta, K., Tsenkova, R. : Real-time near infrared spectral monitoring of mammary gland for inflammation diagnosis in dairy cows, *Journal of near infrared spectroscopy*, **21** (5), 427~433, 2013.
- 6) Kinoshita, K., Miyazaki, M., Morita, H., Vassileva, M., Tang, C., Li, D., Ishikawa, O., Kusunoki, H., Tsenkova, R. : Spectral pattern of urinary water as a biomarker of estrus in the giant panda, *Scientific Reports*, **2**, 856, 2012.
- 7) 木下こづえ : 近赤外分光法を用いた野生動物の生理モニタリング技術の開発, 第30回記念近赤外フォーラム講演要旨集, つくば, 91~94, 2014.
- 8) 中尾敏彦 : 最新・乳牛の繁殖管理指針, 酪農総合研究所, 136, 2000.
- 9) Roelofs, J.B., Van Eerdenburg, F.J.C.M., Hazeleger, W., Soede, N.M., Kemp, B. : *Animal reproduction science*, **91**, 337~343, 2006.

## 平成26年度助成研究調査一覧

本年度の対象とする研究または調査：

食肉および食肉製品の食品価値、加工技術及び家畜生産技術の向上に関する研究又は調査

単位：千円

| 研究課題                                  | 継続年数  | 代表研究者  |                                    | 助成金額  |
|---------------------------------------|-------|--------|------------------------------------|-------|
|                                       |       | 代表研究者名 | 所属機関                               |       |
| ポリフェノールの強力な還元性を利用した食肉新鮮色の保持研究         |       | 増田 俊哉  | 徳島大学大学院<br>ソシオ・アンド・サイエンス研究部        | 800   |
| 豚血液由来食品素材の給与が脂質代謝に及ぼす影響               | H.24～ | 上曾山 博  | 神戸大学大学院<br>農学研究科                   | 1,000 |
| 発酵食肉製品由来の機能性ペプチドに関する研究                | H.24～ | 津田 治敏  | 県立広島大学<br>生命環境学部                   | 700   |
| 食肉の給与が海馬のタンパク質リン酸化および遺伝子発現に及ぼす影響      | H.25～ | 豊田 淳   | 茨城大学農学部                            | 1,000 |
| 食肉製品の塩漬熟成に伴う呈味性発現に関する研究               |       | 服部 昭仁  | (一社)食肉科学<br>技術研究所                  | 1,000 |
| 調理加工食肉・肉製品の機能性成分およびその発現に関する研究         |       | 六車三治男  | 南九州大学<br>健康栄養学部                    | 1,000 |
| 牛肉の匂いに及ぼす熟成と加熱調理の影響                   |       | 小林 正人  | 一般社団法人<br>畜改良事業団<br>畜改良技術研究所       | 1,000 |
| 短波帯交流電界による真空包装食肉加工品の迅速殺菌              |       | 植村 邦彦  | 農業・食品産業<br>技術総合研究<br>機構食品総合<br>研究所 | 800   |
| 可視・近赤外分光可視化法による生肉の微生物汚染状況の非破壊評価       |       | 牧野 義雄  | 東京大学大学院<br>農学生命科学科<br>研究           | 800   |
| 牛肉に関する消費者ニーズの研究—内因性価値と外因性価値の特定        |       | 広岡 博之  | 京都大学大学院<br>農学研究科                   | 800   |
| 味覚センサを用いた和牛の味の数値化と可視化に関する研究           | H.25～ | 都甲 潔   | 九州大学<br>システム情報<br>科学研究院            | 1,000 |
| レトルト加熱処理を施した筋原線維タンパク質の培養骨芽細胞の分化に及ぼす影響 |       | 林 利哉   | 名城大学農学部                            | 800   |
| メタボロミクス解析による黒毛和種牛肉の美味しさに関わる指標の探索      |       | 鈴木 啓一  | 東北大学大学院<br>農学研究科                   | 1,000 |
| ミオシンの水溶化現象に関連するミオシン尾部領域の特定            |       | 早川 徹   | 帯広畜産大学<br>畜産衛生学<br>研究部             | 800   |

|   |       |       |                    |       |
|---|-------|-------|--------------------|-------|
| 畜産物由来へム鉄摂取が発育期スポーツ選手に及ぼす影響～食事摂取状況と体組成・気分の変化から～              | H.24～ | 坂元 美子 | 神戸女子大学健康福祉学部       | 1,000 |
| 冠動脈疾患患者における食肉類の摂取と血中アミノ酸・脂肪酸組成、動脈硬化惹起性リポ蛋白および血栓因子との関連に関する研究 | H.25～ | 木庭 新治 | 昭和大学医学部            | 700   |
| 豚レバーパウダーの脂質代謝に及ぼす分子機能解明                                     | H.25～ | 岡本 芳晴 | 鳥取大学農学部            | 1,000 |
| ポークソーセージの「こく」とその寄与因子の解明                                     |       | 西村 敏英 | 日本獣医生命科学大学応用生命科学部  | 800   |
| 新規機能性脂肪酸、フィタン酸の定量分析法の確立                                     |       | 河原 聡  | 宮崎大学農学部            | 700   |
| 牛肉のおいしさに影響する筋内遊離脂肪酸についての研究（第4報）                             | H.23～ | 山之上 稔 | 神戸大学大学院農学研究科       | 800   |
| 金属表面洗浄時における食肉由来汚れの脱離特性に及ぼす外部電位印加の効果                         |       | 今村 維克 | 岡山大学大学院自然科学研究科     | 800   |
| 脂質代謝および感染症研究のための豚・牛由来肝臓細胞の樹立                                |       | 福田 智一 | 東北大学農学研究科          | 1,200 |
| 牧草由来の機能性成分を用いた初乳中免疫グロブリンの改善方法の開発                            | H.25～ | 久米 新一 | 京都大学大学院農学研究科       | 1,000 |
| スカトールによる胆汁酸代謝の攪乱：ヒト・家畜の健康維持を目指したその制御                        |       | 石塚 敏  | 北海道大学大学院農学研究科      | 1,200 |
| 肉牛用発酵TMRの飼料特性の評価  |       | 齋藤 早春 | 北海道立総合研究機構畜産試験場    | 950   |
| 乳酸菌を用いた多剤耐性菌の殺菌効果の検討と機能性家畜飼料の開発                             |       | 木下 英樹 | 宮城大学食産業学部フードビジネス学科 | 850   |
| 食肉におけるカルノシン関連ジペプチド増量法確立のための基礎研究                             | H.25～ | 友永 省三 | 京都大学大学院農学研究科       | 1,000 |
| 初期成長期でのミオスタチン制御が黒毛和牛の肉質に及ぼす影響                               |       | 高橋 秀之 | 九州大学農学部附属農場        | 900   |
| 黒毛和種子牛に対する血清亜鉛濃度の基準値の設定および亜鉛添加による臨床的な疾病予防効果の検討              |       | 乙丸孝之介 | 鹿児島大学共同獣医学部        | 700   |
| 和牛肉に含まれる機能性成分を左右する要因の検索                                     |       | 平山 琢二 | 琉球大学農学部            | 1,100 |
| 黒毛和種ゲノムDNAメチル化多型と肉質形質との関係に関する研究                             |       | 須田 義人 | 宮城大学食産業学部          | 900   |
| 牛白血病ウイルスの垂直伝播に関する研究   |       | 目堅 博久 | 宮崎大学農学部獣医学科        | 1,000 |
| 人の食品由来回虫症の感染源対策：牛と家禽の疫学的役割と制御法の探索                           |       | 野中 成晃 | 宮崎大学農学部            | 800   |
| 肺炎原因菌の特定を目的とした気管支肺胞洗浄法の牛医療への応用                              | H.25～ | 帆保 誠二 | 鹿児島大学共同獣医学部        | 1,000 |
| 食肉として消費される野生動物における食中毒菌の保有調査                                 |       | 安藤 匡子 | 鹿児島大学共同獣医学部        | 900   |
| 繁殖疫学の手法を用いた黒毛和種牛繁殖農場の飼養形態の違いが繁殖成績に及ぼす影響の定量                  |       | 佐々木羊介 | 宮崎大学テニユアトラック推進機構   | 1,000 |
| I型インターフェロン応答性カタボリック活性の検出による牛妊娠検出技術の開発                       |       | 高橋 昌志 | 北海道大学大学院農学研究科      | 1,000 |



|   |       |                         |       |
|---|-------|-------------------------|-------|
| 黒毛和種の脂肪交雑形成に影響するビタミンAを輸送するRBP4のDNA多型探索              | 平野 貴  | 東京農工大学農学部               | 1,000 |
| 黒毛和種の雌牛における空胎期間を短縮させる遺伝的要因の解明                       | 佐々木慎二 | (独) 家畜改良センタ             | 800   |
| 牛胚盤胞期胚における耐暑性付与に関する研究                               | 阪谷 美樹 | (独) 農研機構九州沖縄農業研究センタ     | 1,000 |
| ラテックス凝集反応による抗豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス抗体検出系の開発                | 堀江 真行 | 鹿児島大学獣医学部               | 1,200 |
| 新規増殖因子を用いた牛・豚精子幹細胞の純化・培養技術の開発                       | 高島 誠司 | 信州大学繊維学部                | 1,000 |
| 肥育前雌子牛の摘出卵巣からの胚生産の試み                                | 的場 理子 | 国立研究開発法人農業技術機構畜産研究所     | 1,000 |
| 生体内卵子吸引・体外受精・胚移植による子豚生産技術の開発                        | 吉岡 耕治 | 国立研究開発法人農業技術機構動物衛生研究所   | 1,200 |
| 血清中アミロイドAおよびエンドトキシン活性値を指標とした牛複合性呼吸器疾患の早期予後診断システムの構築 | 鈴木 一由 | 酪農学園大学獣医学部              | 1,200 |
| 豚流行性下痢ウイルスのウイルス受容体の検索                               | 白戸 憲也 | 国立感染症研究所                | 1,200 |
| 牛精子における暑熱ストレス耐性に関する要因解析                             | 山中 賢一 | 佐賀大学農学部                 | 1,000 |
| 腸管内細菌による牛腸管外臓器汚染要因の解明                               | 中馬 猛久 | 鹿児島大学獣医学部               | 1,000 |
| 腫瘍細胞のモノクローナリティー性状を応用した牛白血病新規診断法の開発                  | 猪熊 壽  | 帯広畜産大学畜産学部              | 900   |
| 牛卵管機能に及ぼす夏季暑熱ストレスの影響～性ホルモン受容体とヒートショックタンパク質の関係性～     | 山本 ゆき | 岡山大学大学院環境生命科学研究科        | 1,000 |
| 牛心臓由来ペプチドを活用した革新的コレステロール代謝改善素材開発のための基礎研究            | 長岡 利  | 岐阜大学応用生物科学部             | 800   |
| 牛用腸溶性生菌剤カプセルが牛の腸内細菌相に与える影響                          | 瀬山 智博 | 地方独立行政法人大阪府立環境農林水産総合研究所 | 1,000 |
| 動物由来コロナウイルスの遺伝子操作系の確立と感染予防への応用                      | 神谷 亘  | 大阪大学大学院微生物病研究センター       | 1,000 |
| 赤外線深度センサーによる和牛の分娩予測技術の検討                            | 小針 大助 | 茨城大学農学部                 | 1,000 |
| 豚流行性下痢の感染拡大リスクに関する研究                                | 関口 敏  | 宮崎大学農学部                 | 900   |
| 和牛のミオグロビン含量を指標とした肉色に関わるゲノム育種価の推定                    | 山崎 瑞穂 | 広島県立総合技術研究所畜産センタ        | 1,000 |
| 食肉に寄生する人獣共通幼線虫の分子生物学的種同定法の開発                        | 黄 鴻堅  | 麻布大学獣医学部                | 800   |

|                             |       |            |              |        |
|-----------------------------|-------|------------|--------------|--------|
| 牛の発情・妊娠における迅速かつ非破壊診断システムの開発 | H.25～ | ツェンコヴァルミアナ | 神戸大学大学院農学研究科 | 1,000  |
| 合                           | 計     |            | 58件          | 54,800 |

# 食肉に関する助成研究調査成果報告書

Final Reports for Research Grants for Meat and Meat Products

平成26年度 (Vol. 33)

---

2015年11月 発行

編集・発行——公益財団法人伊藤記念財団

THE ITO FOUNDATION

東京都目黒区三田1丁目6番21号 アルト伊藤ビル

〒153-8587

Alt Ito Building, 1-6-21 Mita, Meguro-ku, TOKYO

153-8587 JAPAN

TEL : 03 (5720) 8611

FAX : 03 (5720) 8612

印刷・製本——株式会社友楽社

---

<非売品・無断禁転載>

